

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biochemie

Untersuchungen  
zur pathophysiologischen Funktion  
der G-Protein-vermittelten Transaktivierung  
des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors  
in Tumorzellen

Michael Andreas Leserer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Horst Kessler

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Nediljko Budisa  
(Technische Universität Berlin)
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Michael Groll
3. Hon.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Axel Ullrich  
(Eberhard Karls Universität Tübingen)

Die Dissertation wurde am 17.02.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22.02.2012 angenommen.



Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Tyrosinphosphorylierung und Protein-Tyrosinkinasen .....</b>	<b>2</b>
1.1.1	Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) .....	3
1.1.2	Die EGFR Familie und Rezeptoraktivierung .....	4
1.1.3	Rezeptoraktivierung durch Wachstumsfaktoren der EGF Familie .....	6
1.1.4	Zytoplasmatische Tyrosinkinasen .....	8
1.1.5	RTK „downstream signaling“ und Interaktionsdomänen von Proteinen .....	9
<b>1.2</b>	<b>G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRn) .....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Heterotrimere G-Proteine .....	11
1.2.2	GPCR Signaltransduktion im zentralen Nervensystem .....	12
1.2.2.1	Bombesin-ähnliche Peptide .....	13
1.2.2.2	Endothelin .....	13
1.2.2.3	Neurotensin .....	13
<b>1.3</b>	<b>Mitogene GPCR-vermittelte Signaltransduktion und der Signalweg der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK).....</b>	<b>14</b>
<b>1.4</b>	<b>Die EGFR Transaktivierung.....</b>	<b>17</b>
1.4.1	Historische und mechanistische Beschreibung der EGFR Transaktivierung.....	17
1.4.2	Zelltypspezifische Elemente der G-Protein-induzierten EGFR Transaktivierung und Vermittlung von GPCR-induzierten zellulären Ereignissen .....	19
1.4.3	ADAM Metalloproteasen als Schlüsselemente der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung.....	24
<b>1.5</b>	<b>Krebsentstehung und molekulare Onkologie .....</b>	<b>26</b>
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Bezugsquellennachweis .....</b>	<b>30</b>
2.1.1	Chemikalien .....	30
2.1.2	Enzyme .....	31
2.1.3	Radiochemikalien .....	31
2.1.4	Liganden und Wachstumsfaktoren .....	31
2.1.5	„Kits“ und sonstige Materialien .....	32
<b>2.2</b>	<b>Medien und Puffer .....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Medien für E.coli Bakterien .....	32
2.2.2	Zellkulturmedien .....	32
2.2.3	Puffer und Stammlösungen .....	33
<b>2.3</b>	<b>Zelllinien, Bakterienstämme und Antikörper .....</b>	<b>34</b>
2.3.1	Zelllinien .....	34
2.3.2	Bakterienstämme .....	35
2.3.3	Antikörper .....	35
<b>2.4</b>	<b>Plasmide.....</b>	<b>37</b>
2.4.1	Ausgangsvektoren .....	37
2.4.2	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren .....	37
2.4.3	Wichtige Oligonukleotide .....	37

<b>2.5</b>	<b>Allgemeine Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>38</b>
2.5.1	Plasmidpräparation für analytische Zwecke .....	38
2.5.2	Plasmidpräparation für präparative Zwecke .....	38
2.5.3	Enzymatische Behandlung von DNA .....	38
2.5.3.1	Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen.....	38
2.5.3.2	Dephosphorylierung von 5'-Enden linearisierter Vektoren .....	38
2.5.3.3	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	38
2.5.4	Gelelektrophorese von DNA .....	39
2.5.5	Isolierung von DNA-Fragmenten .....	39
2.5.6	Transfer von DNA in E.coli Bakterien .....	39
2.5.6.1	Herstellung kompetenter E.coli Bakterien .....	39
2.5.6.2	Transformation von kompetenten E.coli Bakterien .....	39
2.5.6.3	Dauerkulturen von transformierten E.coli Bakterien .....	39
2.5.7	Amplifikation von DNA- und cDNA Fragmenten mit PCR (Polymerase Kettenreaktion).....	40
2.5.8	Sequenzierung.....	40
2.5.9	Sequenzvergleich.....	41
2.5.10	cDNA Makroarrays .....	41
<b>2.6</b>	<b>Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen</b> .....	<b>42</b>
2.6.1	Allgemeine Zellkulturtechniken .....	42
2.6.2	Mykoplasmentest.....	42
2.6.3	Lipofectamine® -Lipofectine®- und Lipofectamine 2000® Trans-fektion .....	42
2.6.4	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	43
<b>2.7</b>	<b>Proteinanalytische Methoden</b> .....	<b>43</b>
2.7.1	Stimulation und Triton X-100 Lyse von Zellen.....	43
2.7.2	Proteinbestimmung .....	43
2.7.3	Immunpräzipitation von Proteinen .....	43
2.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	44
2.7.5	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran .....	44
2.7.6	Immundetektion von Proteinen (Immunoblotanalyse).....	45
<b>2.8</b>	<b>Zellbiochemische und –biologische Untersuchungen</b> .....	<b>45</b>
2.8.1	Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine .....	45
2.8.2	Quantifizierung von Immunoblots mit einer CCD-Kamera.....	46
2.8.3	In vitro Kinase-Assay zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der MAP Kinase (Erk2).....	46
2.8.4	„Wound healing“ Test .....	46
2.8.5	Invasions Assay .....	47
<b>2.9</b>	<b>Statistische Analyse</b> .....	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Transaktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch Neuropeptide: die „Neuro-Psycho-Onko“-Verbindung</b> .....	<b>48</b>
3.1.1	LPA, ET-1 und Bombesin-ähnliche Liganden induzieren EGFR Transaktivierung in verschiedenen Prostatakarzinomzellen .....	49
3.1.2	Gastrin Releasing Peptide transaktiviert den EGFR in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen .....	52
3.1.3	Weitere Neuropeptide als Aktivatoren des EGFR Signalweges in Prostatakrebszellen .....	55
3.1.4	Analyse weiterer Tumortypen: Charakterisierung von Magen- und Pankreastumorzellen in Hinsicht auf Gastrin- und LPA Antworten.....	58
3.1.5	Screen weiterer Tumorzellen .....	59
<b>3.2</b>	<b>Metalloprotease-abhängige Transaktivierung des EGFRs nach Stimulation von GPCRs in Krebszellen</b> .....	<b>61</b>
3.2.1	Verringerung der basalen EGFR Tyrosinphosphorylierung sowie der Phosphorylierungslevel der Signalmoleküle SHC und ERK1/2 in Tumorzellen durch die Metalloprotease-Inhibitoren Batimastat und Marimastat .....	62
3.2.2	Inhibition der EGFR Transaktivierung durch TIMP-3 .....	66

<b>3.3</b>	<b>Test des Peptid-Inhibitors "Acetyl Gastrin Releasing Peptide" (AcGRP) .....</b>	<b>67</b>
<b>3.4</b>	<b>Die GPCR-vermittelte EGFR Transaktivierung und ihre „Downstream“-Signale in Abhängigkeit von HB-EGF- oder Amphiregulin .....</b>	<b>69</b>
<b>3.5</b>	<b>Zusammenfassung der auf EGFR Transaktivierung positiv getesteten Tumorzelllinien sowie die Inhibitor-Sensitivität der zellulären Antworten nach GPCR-Stimulation der Zellen .....</b>	<b>74</b>
<b>3.6</b>	<b>cDNA Makroarrays von Prostatakrebszelllinien zur Expressionskontrolle verschiedener Signaltransduktionsmoleküle .....</b>	<b>75</b>
<b>3.7</b>	<b>EGFR-vermittelte Phosphorylierung zellulärer Proteine nach GPCR-Stimulation.....</b>	<b>80</b>
3.7.1	SHC Tyrosinphosphorylierung induziert von G <sub>q</sub> - und G <sub>i</sub> -gekoppelten Rezeptoren in Abhängigkeit des EGFRs und Metalloproteasen .....	80
3.7.2	Sowohl EGFR- als auch Metalloproteaseinhibition beeinträchtigen die MAPK Aktivierung durch GPCR in Prostatakarzinomzellen .....	84
3.7.3	Metalloproteaseabhängigkeit der GPCR-induzierten Erk1/2-Stimulation in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen .....	85
3.7.4	Additiver Effekt von LPA und GRP auf die MAP Kinase Aktivierung in PC3 Prostatakarzinomzellen .....	87
3.7.5	Keine Phosphorylierung der ERK5 nach GPCR-Aktivierung in PC3 Zellen .....	88
3.7.6	Keine Aktivierung von Focal Adhesion Kinase (FAK) in PC3 und TSU Zellen nach GPCR-Stimulation .....	88
<b>3.8</b>	<b>Spielt die Protein Kinase C (PKC) im Signalweg der EGFR Transaktivierung in den ausgewählten Krebszelllinien eine Rolle? .....</b>	<b>89</b>
3.8.1	In PC3 und TSU Prostatakarzinomzellen ist PKC nicht in die G-Protein-vermittelte Transaktivierung des EGFRs involviert.....	90
3.8.2	Auch in FTC-133 Zellen vermittelt PKC keine EGFR Transaktivierung.....	93
3.8.3	TPA verringert den basalen Phosphotyrosingehalt des EGFRs in BT-20 und MDA-MB 468 Mammakarzinomzellen .....	94
3.8.4	Rolle der PKC bei der GPCR-stimulierten MAPK- und Akt-Signalaktivierung in PC3 Zellen .....	96
<b>3.9</b>	<b>Ermittlung der pathophysiologischen Rolle der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung in Tumorzellen .....</b>	<b>99</b>
3.9.1	Die G-Protein-vermittelte Migration von Krebszellen ist EGFR- und Metalloprotease-abhängig .....	99
3.9.2	Zusammenfassung der Wounding-Assay Ergebnisse: .....	102
3.9.3	EGFR- und Metalloprotease-abhängige Invasion von Prostatakarzinomzellen.....	102
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>106</b>
<b>4.1</b>	<b>Metalloprotease-abhängige Transaktivierung des EGFRs durch Neuropeptide in Tumorzellkulturen („Neuro-Psycho/Onko“ Verbindung) .....</b>	<b>107</b>
<b>4.2</b>	<b>„Downstream“-Antworten der Neuropeptid-vermittelten EGFR Transaktivierung in Tumorzellen .....</b>	<b>111</b>
4.2.1	Aktivierung des Adapterproteins SHC und der MAPK .....	111
4.2.2	Einfluß der Signalmoleküle Akt und FAK .....	112
4.2.3	Rolle der PKC.....	113
<b>4.3</b>	<b>HB-EGF als Vermittler der Neuropeptid-vermittelten EGFR Transaktivierung in PC3 Prostatakarzinomzellen.....</b>	<b>115</b>
<b>4.4</b>	<b>Pathophysiologische Rolle der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung in Tumorzellen ...</b>	<b>118</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>120</b>

<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>122</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>126</b>
	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>142</b>
	Posterbeiträge .....	142
	Präsentationen.....	143
	Patente .....	143
<b>8.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>144</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>147</b>

## Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Unterfamilien der Rezeptortyrosinkinasen.....	4
Abb. 2: HER2 ist der bevorzugte Dimerisierungspartner für die anderen ErbB Rezeptoren.....	5
Abb. 3: Die EGFR Familie und EGF-ähnliche Liganden.....	7
Abb. 4: Die verschiedenen MAP Kinase Signalwege.....	15
Abb. 5: Der “Triple Membrane Passing Signal” (TMPS) Mechanismus der EGFR Transaktivierung.....	23
Abb. 6: Die Domänenstruktur der ADAM Proteine und verwandter Metalloproteasen.....	24
Abb. 7: Strukturformeln der Metalloprotease Inhibitoren Batimastat (BB94) und Marimastat (BB2516).....	26
Abb. 8: EGFR Transaktivierung in diversen Prostata-Tumorzelllinien:.....	51
Abb. 9: EGFR Transaktivierung und MAP Kinase Aktivierung in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen:.....	53
Abb. 10: EGFR- und MAP Kinase Aktivierung in FTC-133 Zellen.....	55
Abb. 11: Neurotensin-vermittelte Transaktivierung des EGFR in PC3-Zellen ist Metalloprotease- aber nicht PKC-abhängig.....	57
Abb. 12: Transaktivierung der EGFRs durch LPA in AGS-Magenkrebszellen:.....	59
Abb. 13: Ermittlung der notwendigen Marimastat-Konzentration zur Senkung des EGFR Phosphotyrosingehalt nach Bombesin-Stimulation in PC3 Zellen.....	61
Abb. 14: Batimastat und Marimastat vermindert die basale EGFR Tyrosinphosphorylierung in Tumorzellen....	63
Abb. 15: Batimastat vermindert die basalen Phosphorylierungslevel von EGFR, SHC und MAPK in Capan-1 Pancreastumorzellen.....	65
Abb. 16: TIMP-3 vermindert die SHC Phosphorylierung nach GPCR-Stimulation in PC3 Zellen.....	67
Abb. 17: Der Peptid-Inhibitor AcGRP vermindert die GRP-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung, hat aber keinen Effekt auf die ERK Phosphorylierung.....	68
Abb. 18: Heparin vermindert die Tyrosinphosphorylierung nach GPCR-Stimulation von EGFR und SHC in PC3-Zellen.....	70
Abb. 19: Heparin blockiert die LPA- und Thrombin-induzierte EGFR Transaktivierung in COS7 Zellen.....	71
Abb. 20: Heparin reduziert die EGFR Transaktivierung nach Stimulation mit GPCR Liganden in FTC-133 Zellen.....	72
Abb. 21: Heparin inhibiert die Bradykinin-induzierte MAPK Aktivierung in MDA-MB 436 Zellen.....	73
Abb. 22: HB-EGF ist in EGFR-Transaktivierung in PC3 Zellen involviert.....	74
Abb. 23: Genexpression von EGF-ähnlichen Liganden, ADAMs, GRPR und Gene der HER- und Edg-Familien in verschiedenen Prostata-Tumorzelllinien, bestimmt durch eine cDNA Array Analyse.....	78
Abb. 24: GPCR-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung in Tumorzellen unter Einfluß von BB94 und AG1478:.....	83
Abb. 25: MAP Kinase Aktivierung durch Peptidliganden in PC3 Prostatakarzinomzellen.....	84
Abb. 26: Quantifizierung der GPCR-induzierte Erk Aktivierung in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen.....	86
Abb. 27: Additiver Effekt von LPA und GRP auf die MAP Kinase Aktivierung in PC3 Zellen.....	87
Abb. 28: Keine nachweisbare FAK-Aktivierung nach GRP- und HB-EGF-Stimulation in PC3 Zellen.....	89
Abb. 29: GPCR-vermittelte EGFR Transaktivierung ist in PC3 Zellen PKC unabhängig.....	90
Abb. 30: PKC Unabhängigkeit des LPA-vermittelten EGFR Transaktivierungssignals in TSU Zellen.....	92
Abb. 31: Rolle der PKCs bei der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung in FTC-133 Zellen.....	94
Abb. 32: Verringerung der basalen EGFR Tyrosinphosphorylierung durch TPA in MDA-MB-468 Zellen.....	95
Abb. 33: Abnahme der basalen EGFR-Aktivität durch TPA in BT-20 Brustkrebszellen.....	96
Abb. 34: Schwache Inhibition der Neurotensin-induzierten MAP Kinase Aktivierung durch GF109203X in PC3 Zellen.....	97
Abb. 35: Partielle Inhibition der MAP Kinaseaktivität durch PKC-Inhibition in PC3 Zellen:.....	99
Abb. 36: LPA beschleunigt die Wundschließung in PC3 und TSU Zellen.....	100
Abb. 37: Quantifizierung von „Wounding Assays“ dreier getesteter Tumorzelllinien.....	101
Abb. 38: Chemo-Invasionsanalyse von PC3 Zellen auf Matrigel-beschichteten Polycarbonatfiltern.....	104
Abb. 39: „Triple Membrane Passing Signal“ (TMPS) Mechanismus der EGFR Transaktivierung in PC3 Zellen.....	116
Abb. 40: Potentielle Interventionsziele für Tumorthherapie im TMPS Signalweg.....	121

**Tabellen:**

Tabelle 1: Cross-Talk zwischen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und dem EGFR. ....	20
Tabelle 2: EGFR Transaktivierungscreen in Magen- und Pankreastumorzellen: .....	58
Tabelle 3: EGFR Transaktivierungs-„Screen“ verschiedener Tumorzellen: die Negativresultate: .....	60
Tabelle 4: Übersicht über die auf die Transaktivierung des EGFRs getesteten Zellen .....	75
Tabelle 5: Zusammenfassung relative Expressionslevel ausgewählter Gene der cDNA Makroarray Analyse in Prostatatumorzelllinien. ....	79
Tabelle 6: Zusammenfassung der Migrations-Assay Ergebnisse verschiedener Zelllinien .....	102
Tabelle 7: Zelltypspezifität des TMPS Signalweges in Tumorzellen .....	117

# 1. EINLEITUNG

Keine Säugetierzelle lebt isoliert von anderen Zellen; sie muß deshalb ständig auf eine große Zahl extrazellulärer Signale durch Aktivierung verschiedener Signalwege reagieren. Diese Fähigkeit stellt ein Grundprinzip in der embryonalen Entwicklung und im adulten Stadium eines multizellulären Organismus dar, basierend auf dem komplexen Zusammenwirken aller an seinem Aufbau beteiligten Zellen durch regulierten Informationstransfer mit Hilfe von Signaltransduktionswegen. Wie in (Downward, 2001) dargestellt, sind diese linearen Signalwege keine isolierten Einheiten, sondern Teile eines großen Kommunikationsnetzwerkes. Signalübertragungswege tauschen ihre Informationen sowohl zwischen verschiedenen Zellen als auch zwischen diversen Kompartimenten innerhalb ein und derselben Zelle aus. Benachbarte Zellen kommunizieren meist durch direkten Zell-Zell-Kontakt, wohingegen bei nicht benachbarten Zellen die Signalübertragung durch sekretierte Signalmoleküle wie Zytokine, Hormone, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie Neurotransmitter, die an Zelloberflächenrezeptoren binden und diese aktivieren können, verläuft. So können vielfältige Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose induziert und reguliert werden (Gutkind, 1998; Ullrich and Schlessinger, 1990). Die extrazelluläre Bindung dieser Liganden an spezifische Transmembranproteine initiiert die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die zur Regulation der Genexpression und den daraus resultierenden verschiedenen physiologischen Vorgängen führt. Störungen des Ablaufs dieser komplexen Signalwege durch Überexpression, Amplifikation oder Mutation wichtiger Signalmolekülgene können pathophysiologische Veränderungen auslösen, die zu Krebsentstehung, Immunschwäche, Diabetes Mellitus oder kardiovaskulären Krankheiten führen können (Hanahan and Weinberg, 2000; Olayioye et al., 2000; Schlessinger, 2000; Shawver et al., 2002).

Als zentrales regulatorisches Element der meisten Signaltransduktionsprozesse wurde die reversible Phosphorylierung bestimmter Proteine identifiziert (Cohen, 2002). Dabei wird die Phosphorylierung durch sogenannte Proteinkinasen und die Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen enzymatisch katalysiert; die Funktion eines Proteins wird so reversibel modifiziert bzw. gesteuert. Dies kann mit der Beeinflussung der biologischen Aktivität, Lokalisationsänderung innerhalb der Zelle, Affinitätsänderung zu Interaktionspartnern oder auch der Stabilisierung oder Degradation des Proteins einhergehen.

Etwa ein Drittel aller Proteine von Säugerzellen können phosphoryliert werden. Die Sequenzierung durch das „Humane Genom Projekt“ hat 518 potentielle Proteinkinase-Gene und etwa 130 Gene von Proteinphosphatasen identifiziert (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Manning et al., 2002). Entsprechend ihrer Substratspezifität und Lokalisation innerhalb der Zelle werden Proteinkinasen und Phosphatasen in zelluläre Proteine oder Transmembranproteine sowie in Tyrosin- oder Serin/Threonin-spezifische Kinasen bzw. Phosphatasen eingeteilt. Außerdem besitzen einige Enzyme duale Spezifität für Tyrosin und Serin/Threonin; Mitglieder der Phosphatidylinositolkinase-Familie wiederum weisen zudem ebenfalls eine Protein-Serin/Threonin Kinaseaktivität auf (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Die dynamisch regulierte, spezifische Phosphorylierung und Dephosphorylierung ergibt sich somit aus dem Zusammenspiel von Proteintyrosinkinasen (PTKn) und den antagonistisch wirkenden Proteintyrosinphosphatasen (PTPn).

Die Einteilung der hier vorzustellenden Zelloberflächenrezeptoren geschieht anhand ihrer strukturellen Unterschiede. Vertreter zweier Hauptklassen der Transmembranrezeptoren sind einmal die Rezeptortyrosinkinasen (RTKn), deren intrinsische Tyrosinkinaseaktivität bei der Signalübertragung in der Zelle von entscheidender Bedeutung ist (Geer et al., 1994) und die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRn), die die größte Familie von Signalmolekülen repräsentieren. Im Gegensatz zu RTKn weisen die GPCRn keine eigene enzymatische Aktivität auf, sondern interagieren nach Aktivierung durch Ligandenbindung mit heterotrimeren G-Proteinen und sind regulativ an der Steuerung zellulärer Antworten beteiligt (Coughlin, 1994; Gutkind, 1998).

## 1.1 Tyrosinphosphorylierung und Protein-Tyrosinkinasen

In den 30 Jahren nach seiner Entdeckung hat sich die Tyrosinphosphorylierung als fundamentaler und wichtiger Mechanismus der Signaltransduktion und Regulation in eukaryontischen Zellen herausgestellt. Mit ihrer Hilfe werden viele Prozesse wie Zellproliferation, Zellmigration, Transkriptionsregulation, Differentiation, Entwicklung, Überleben oder Alterung gesteuert (Hunter, 2009).

Protein-Tyrosinkinasen sind wichtige Regulatoren intrazellulärer Signaltransduktionswege, die zur Zell-Zell-Kommunikation und Zellentwicklung beitragen (Cohen, 2002), indem sie den Transfer von  $\gamma$ -Phosphat des ATPs auf die Hydroxylgruppen der Tyrosinreste des Substratproteins katalysieren (Hunter, 1998). Rezeptortyrosinkinasen spielen eine kritische

Rolle bei der Kontrolle entscheidender zellulärer Prozesse wie Zellzyklusprogression, Proliferation, Zelldifferenzierung, Migration sowie beim Metabolismus und Überleben der Zelle. Im humanen Genom wurden bisher etwa 90 Tyrosinkinasegene identifiziert, von denen wiederum 58 Gene für Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) mit ihren 20 Unterfamilien und 32 Gene für Nicht-Rezeptortyrosinkinasen (NRTKn) mit ihren zehn Untergruppen codieren (Blume-Jensen and Hunter, 2001).

### **1.1.1 Rezeptortyrosinkinasen (RTKn)**

Rezeptortyrosinkinasen bilden eine Familie von bislang 50 bekannten aminoterminal-glykosylierten Transmembranproteinen, die alle eine gemeinsame Topologie aufweisen. Sie bestehen aus einem extrazellulären Teil, einer einzigen Transmembranhelix, die aus hydrophoben Aminosäuren aufgebaut ist, und dem intrazellulären Teil. Die extrazelluläre Domäne ist für die Ligandenbindung zuständig. Der zytoplasmatische Teil des Rezeptors setzt sich aus der Juxtamembranregion, der hochkonservierten Tyrosinkinasedomäne sowie dem Carboxy-Terminus zusammen (Ullrich and Schlessinger, 1990) und besitzt sowohl Proteinphosphorylierungsstellen als auch strukturelle Motive für Protein-Protein-Interaktionen. Die Kinasedomäne, die eine ATP-Bindungsstelle enthält, katalysiert die Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste des Rezeptors, sowie die Tyrosinphosphorylierung von zellulären RTK-Substraten (Yarden and Ullrich, 1988).

RTKn werden aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede in den Motiven der extrazellulären Ligandenbindungsstelle in mittlerweile 20 Unterfamilien aufgeteilt (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Geer et al., 1994). So zeichnet sich beispielsweise die EGFR (epidermal growth factor receptor) Familie durch Cystein-reiche Domänen aus, während die FGF (fibroblast growth factor) Rezeptoren über Immunglobulin-ähnliche Strukturen verfügen (Abb. 1).

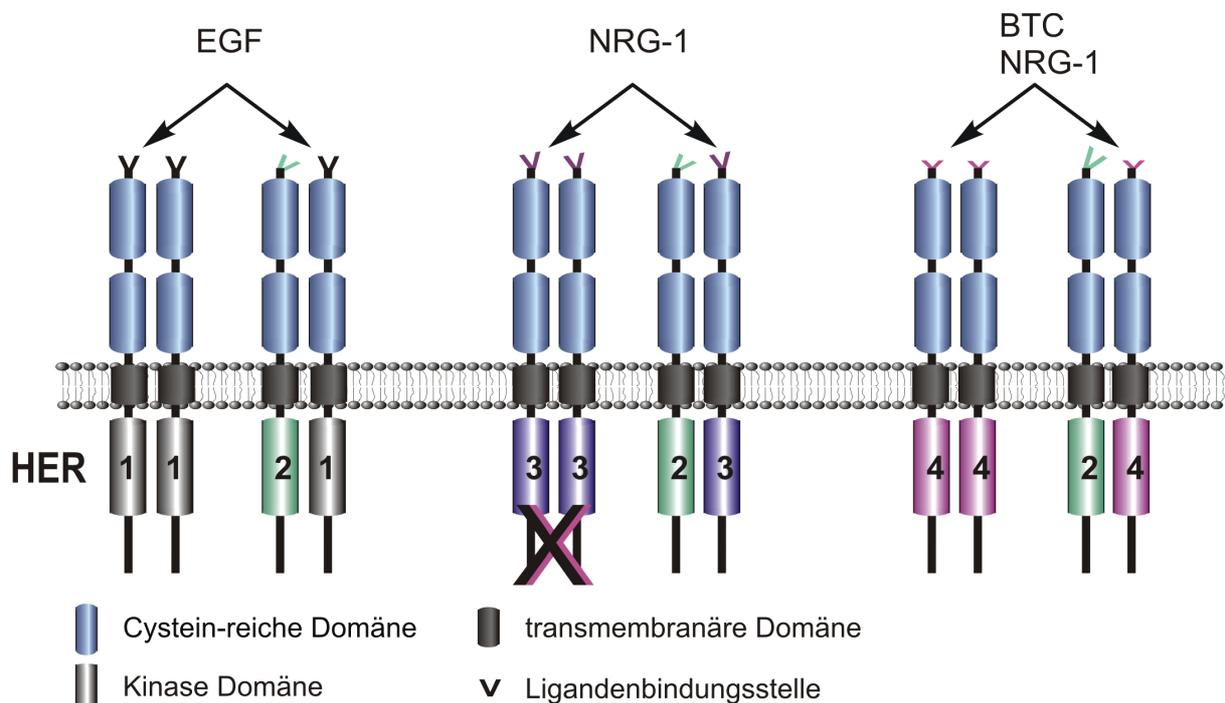
Die Aktivierung der RTKn geschieht in Anwesenheit eines Liganden, wodurch Rezeptordimere stabilisiert werden und somit das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der dimeren Form verschoben wird, gefolgt von Konformationsänderungen, welche dann aufgrund der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivitäten der beiden Rezeptormoleküle zu einer gegenseitigen Transphosphorylierung bestimmter Tyrosinreste im carboxyterminalen Bereich führen (Lemmon and Schlessinger, 1994; Schlessinger, 1988; Ullrich and Schlessinger, 1990).



Signalwegen in hohem Maße. Insbesondere Heterodimerkombinationen zwischen EGFR und HER2 rufen starke biologische Antworten hervor (Alroy and Yarden, 1997; Riese et al., 1995; Wallasch et al., 1995).

Die wohl bekannteste Rezeptortyrosinkinase ist der EGFR, welcher auch das erste, durch molekularbiologische Methoden identifizierte Zelloberflächenprotein darstellt (Ullrich and Schlessinger, 1990). In verschiedenen Formen von Krebs werden häufig sowohl der EGFR selbst als auch seine Liganden überexprimiert. Die durch diese autokrine Wachstumsstimulation erhöhte Rezeptoraktivität ist für Krebsarten des Darms (Damstrup et al., 1999), der Lunge und Prostata (Seth et al., 1999) sowie für epitheliale Krebszellen (Dong et al., 1999) berichtet worden.

Für HER2 wurde bisher kein spezifischer Ligand beschrieben (Goldman et al., 1990). Diese Tyrosinkinase benötigt andere Mitglieder der EGFR Familie um transphosphoryliert zu werden und ist somit ein häufiger Dimerisierungspartner von EGFR, HER3 und HER4 (Beerli et al., 1995; Graus-Porta et al., 1997) (Abb. 2).



**Abb. 2: HER2 ist der bevorzugte Dimerisierungspartner für die anderen ErbB Rezeptoren.**

Ligandenbindung an EGFR (EGF), HER3 (NRG-1) oder HER4 (NRG-1, BTC) induziert die Bildung von Rezeptorhomodimeren und -Heterodimeren mit HER2. HER3 Homodimere haben keine Signalwirkung, da dem Rezeptor eine inaktive Kinasedomäne zu eigen ist. In der Grafik sind nur einige der möglichen Ligand-Rezeptor-induzierten Kombinationen aufgezeigt um die Abbildung einfach zu halten. *Skizziert nach* (Olayioye et al., 2000). Die genannten Liganden werden in 1.1.3 näher erläutert.

Einige Mitglieder dieser RTK Familie werden mit diversen Krebsarten in Zusammenhang gebracht und dienen nicht nur als prognostische Marker, sondern auch als therapeutische Angriffspunkte (Gschwind et al., 2004; Prenzel et al., 2001; Voldborg et al., 1997). HER2 besitzt bei erhöhter Genamplifikation eine stark transformierende Aktivität (Hudziak et al., 1987), wird durch den EGFR nach EGF-Stimulation transphosphoryliert (Stern and Kamps, 1988) und ist für die Entstehung und Progression von Brustkrebs von entscheidender Bedeutung (Slamon et al., 1987).

HER3 nimmt innerhalb der Familie eine Sonderstellung ein, da seine Kinasedomäne aufgrund einer Punktmutation im katalytischen Zentrum nur eingeschränkte Aktivität besitzt. Daher erfolgt die Signalweiterleitung bei diesem Rezeptor durch Heterodimerisierung mit dem EGFR bzw. HER2 (Guy et al., 1994; Wallasch et al., 1995; Weiss et al., 1997).

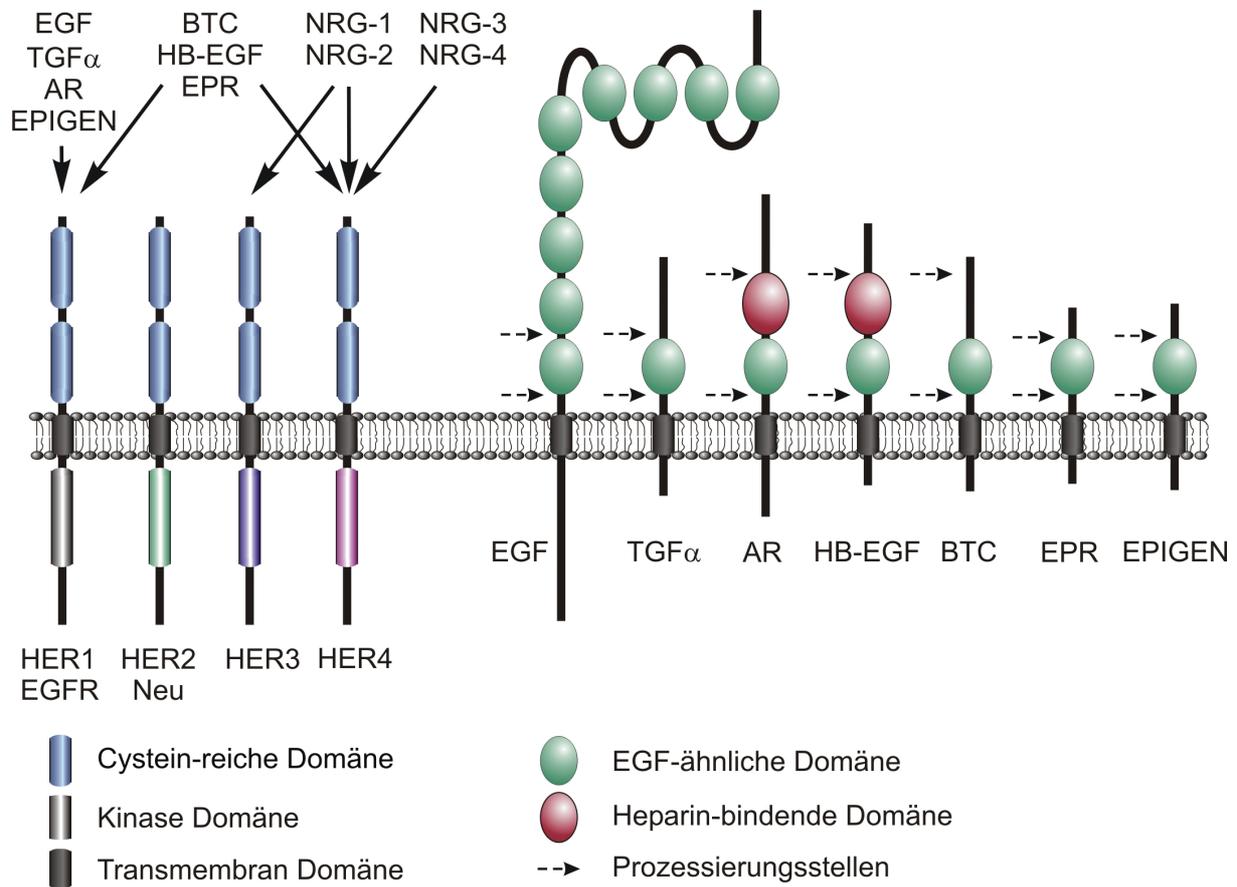
Das Rezeptornetzwerk aus den vier RTKn der EGFR Familie besitzt eine große Komplexität, die sich aus der Vielzahl der Liganden, der spezifischen Rezeptordimere und der damit aktivierten Signalwege ergibt.

### **1.1.3 Rezeptoraktivierung durch Wachstumsfaktoren der EGF Familie**

Es sind acht EGF-ähnliche Wachstumsfaktoren bekannt, die als direkte Liganden für den EGFR agieren: EGF selbst, TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), Amphiregulin (AR), HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), Epiregulin (Epi) (Riese and Stern, 1998; Shelly et al., 1998), Betacellulin (Riese et al., 1996), Cripto (Salomon et al., 1999) und Epigen (Strachan et al., 2001). Alle Liganden, außer Cripto, werden als glykosylierte membranständige Vorläuferproteine („precursors“) synthetisiert; sie werden proteolytisch durch Metalloproteasen an der Zelloberfläche gespalten, um so den reifen, löslichen und diffusionsfähigen Wachstumsfaktor freizusetzen (Abb. 3).

Die löslichen Liganden wiederum aktivieren die Rezeptoren der EGFR Familie via autokriner oder parakriner Stimulation (Massague and Pandiella, 1993). Einige Studien weisen darauf hin, daß die membrangebundenen EGF-ähnlichen Wachstumsfaktorvorläufer selbst ebenfalls biologisch aktiv sein können (Brachmann et al., 1989; Wong et al., 1989) Die Neuregulin (NRG)-Isoformen NRG-1 und NRG-2 binden an HER3. NRG-3 und NRG-4 aktivieren den HER4 Rezeptor (Abb. 3, *linke Seite*). Alle Mitglieder dieser Ligandenfamilie zeichnen sich durch ihre Cystein-reichen, EGF-ähnlichen Domänen aus (Engel, 1989). Eine allen gemeinsame Struktur aus drei Disulfidbrücken (A-, B- und C-Loop genannt), die von sechs

konservernten Cystein-Resten gebildet wird, ist hierbei entscheidend für die Bindung der Wachstumsfaktoren an den jeweiligen Rezeptor (Massague and Pandiella, 1993; Wingens et al., 2003).



**Abb. 3: Die EGFR Familie und EGF-ähnliche Liganden**

Die Darstellung zeigt schematisch die Vorläufer der EGF-ähnlichen Liganden (ohne die Neureguline), die als Transmembranproteine synthetisiert werden und ihren aktiven Bereich, der durch Prozessierung freigesetzt wird. Abkürzungen: AR, Amphiregulin; BTC, Betacellulin; EGF, epidermal growth factor; EPR, Epregeulin; HB-EGF, Heparin-binding EGF-like growth factor; NRG, Neuregulin; TGF $\alpha$ , transforming growth factor  $\alpha$ . Weiterhin sind die Mitglieder der EGFR Familie mit ihren dazugehörigen Liganden dargestellt (linke Seite). *Skizziert nach (Harris et al., 2003) und (Olayioye et al., 2000).*

Ferner wurde gezeigt, daß die proteolytische Prozessierung von TGF $\alpha$  und HB-EGF durch Zellstimulation mit Phorbol ester, Serum oder dem Kalzium-Ionophor Ionomycin induziert werden kann (Goishi et al., 1995; Pandiella and Massague, 1991a; Pandiella and Massague, 1991b).

Neue Einblicke in die Mechanismen von Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung wurden durch Strukturanalysen erzielt, die ein Konzept stützen, in dem die Rezeptordimerisierung durch eine Liganden-induzierte Konformationsänderung hervorgerufen wird und nicht einfach

durch Verbindung der Rezeptor Monomere durch den Liganden selbst (Garrett et al., 2002; Jorissen et al., 2003; Ogiso et al., 2002; Schlessinger, 2002). Nach Ligandenbindung ist ein sogenannter „Dimerisierungs-Loop“, der bislang nur in der EGFR Familie gefunden wurde, für die Rezeptor-vermittelte Rezeptordimerisierung verantwortlich; denn Deletionen oder Mutationen in diesem „Loop“-Motiv unterbinden völlig die Liganden-induzierte EGFR Aktivierung (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002). Dieser „Dimerisierungsarm“ wird erst nach Ligandenbindung als Folge einer Neuordnung der Domänen des extrazellulären Teils des EGFRs exponiert und reguliert somit die Rezeptorfunktion. Interessanterweise weist HER2, der keinen direkten Liganden besitzt, eine Konfiguration mit einem konstitutiv exponierten „Dimerisierungsarm“ auf (Cho et al., 2003; Garrett et al., 2003). Diese Beobachtung weist zusammen mit anderen biophysikalischen Studien, die nur eine schwache Interaktion von HER2 Rezeptormolekülen aufzeigen, darauf hin, daß HER2 vorwiegend Heterodimere mit den anderen durch Liganden aktivierten Mitgliedern der EGFR Familie bildet (Garrett et al., 2002) (siehe Abb. 2).

#### **1.1.4 Zytoplasmatische Tyrosinkinasen**

Zusätzlich zu den Membran-verankerten Rezeptortyrosinkinasen existiert eine zweite Klasse von Tyrosinkinasen, die zytoplasmatische Tyrosinkinasen oder Nicht-Rezeptortyrosinkinasen (NRTKn) genannt werden. Die 32 bislang bekannten NRTKn werden, basierend auf der Sequenz ihrer Kinasedomäne, in zehn Unterfamilien unterteilt: Abl, Ack, Csk, Fak, Fes, Frk, Jak, Src, Tec und Syk (Robinson et al., 2000).

NRTKn können intrazellulär an Zelloberflächenrezeptoren binden, sind aber auch in verschiedenen Kompartimenten wie Zytoplasma, Zellkern, Mitochondrien oder dem Endoplasmatischen Retikulum zu finden. Weiterhin können sie durch Myristyl- oder Palmitylreste an die Zellmembran binden (Hantschel and Superti-Furga, 2004). Zusätzlich zu ihrer Tyrosinkinaseaktivität besitzen NRTKn Domänen, die Protein-Protein-, Protein-Lipid- und Protein-DNA Interaktionen vermitteln können (Hubbard and Till, 2000).

Die Src Familie ist gegenwärtig mit neun Mitgliedern die größte Untergruppe der NRTKn und besteht aus den Proteinen Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes und Yrk (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Sie spielen in vielen Signalprozessen wie Mitogenese, T- und B-Zell Aktivierung und Restrukturierung des Zytoskeletts eine wichtige Rolle.

Onkogene Varianten von Src-Kinasen induzieren in Zellen die Tyrosinphosphorylierung einer Fülle von Proteinen. Zu diesen gehören z.B. Proteine der Fokalkontakte wie Paxillin und die NRTK FAK (focal adhesion kinase), deren Phosphorylierung wiederum die Aktivierung vieler weiterer Effektoren fördert (Rozengurt, 2002) und ausschließlich an Punkten der Zell-Matrix-Adhäsion, den sogenannten „focal adhesions“ lokalisiert ist (Schaller et al., 1992). GPCR Liganden wie Bombesin induzieren eine schnelle FAK-Phosphorylierung an Tyr397. (Rozengurt, 2002). Zu den für Src beschriebenen Substraten gehören interessanter Weise auch der EGFR, der PDGFR, das Adapterprotein p130 Cas, das in Integrin- und Wachstumsfaktoren-vermittelte Signale involviert ist und Cortactin, ein Actin-bindendes Protein, das für die richtige Ausbildung von Kontaktstellen der Zellmatrix wichtig ist (Hubbard and Till, 2000). Die Kinasefamilie Src wird außerdem mit etlichen humanen Karzinomen wie Brust-, Lungen- und Darmkrebs in Zusammenhang gebracht (Biscardi et al., 1999).

### **1.1.5 RTK „downstream signaling“ und Interaktionsdomänen von Proteinen**

Liganden-induzierte Dimerisierung und Autophosphorylierung von RTKs aktiviert spezifische intrazelluläre Signaltransduktionswege, die abhängig vom Stimulus und vom Zelltypus sind. Durch tyrosinphosphorylierte Epitope an Zielproteinen von durch RTKs aktivierten NRTKs werden eine Reihe zytoplasmatischer Signalproteine rekrutiert und aktiviert (Hunter, 2000). Die meisten dieser intrazellulären Signalproteine besitzen modulare Proteindomänen, die mit Domänen anderer Proteine, bestimmten Peptidsequenzen, Phospholipiden oder Nukleinsäuren interagieren, wodurch sie fähig sind, verschiedene zelluläre Prozesse zu regulieren. Diese Interaktionsdomänen können unter anderem Konformation, Aktivität und Substratspezifität von Enzymen kontrollieren (Pawson and Nash, 2003). In der Signalkette von RTKs sind diejenigen Domänen, welche spezifische Phosphotyrosinreste erkennen, von großer Bedeutung (Schlessinger and Lemmon, 2003). Die wohl am häufigsten vorkommenden Interaktionsdomänen für Phosphotyrosine sind die SH2 (src homology 2)-Domänen (Pawson, 1995; Schlessinger, 2000). Nach Stimulation von RTKs werden SH2 Domänen enthaltende Proteine rekrutiert und aktiviert, wie zum Beispiel PLC- $\gamma$ , die an das autophosphorylierte Ende des EGFRs bindet und so an die Plasmamembran transloziert wird. Des Weiteren sind auch die PTB (phosphotyrosine binding)-Bindungsmotive

zu erwähnen, die in ihrer Bindungsfähigkeit nicht nur auf Phosphotyrosine beschränkt sind, sondern auch nicht-phosphorylierte Peptidsequenzen erkennen (Kavanaugh et al., 1995).

Viele Signalproteine besitzen zusätzlich SH3 (src homology 3)-Domänen, welche an Prolinreiche Proteinmotive vom Typ PXXP binden können (Yu et al., 1994). PH (pleckstrin homology)-Bindungsmotive, können sowohl spezifisch mit dem Phospholipid PI(4,5)P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat) als auch mit den Gβγ-Dimeren der heterotrimeren G-Proteinen wechselwirken (Shaw, 1996). PHOX (phox homology) und FYVE Domänen binden an PI-3-P (Phosphatidylinositol-(3)-phosphat), wohingegen FERM Domänen wiederum PI(4,5)P<sub>2</sub>-Reste erkennen. PDZ Domänen binden spezifisch an hydrophobe Reste am C-Terminus ihrer Zielproteine (Pawson and Nash, 2003).

Eine Reihe von Proteinen weist neben SH2 Interaktionsdomänen auch enzymatische Aktivität auf. So haben die Src-Kinasen, wie in 1.1.4 erwähnt, eine Proteinkinase Aktivität, SHP2 besitzt Tyrosinphosphataseaktivität und PLC-γ zeigt eine Phospholipase C-Aktivität.

Eines dieser wichtigen Adapterproteine in diesem multimeren Signalkomplex stellen die SHC (src homology and collagen) Proteine dar, die selbst über keine enzymatische Aktivität verfügen. Alle drei SHC Isoformen (46, 52 und 66 kD) weisen eine carboxyterminale SH2-Domäne, eine aminoternale PTB-Domäne, sowie einen zentralen Kollagen-homologen Bereich auf (Migliaccio et al., 1997; Pelicci et al., 1992). SHC Proteine docken mittels ihrer SH2- und PTB-Motive an autophosphorylierte RTK<sub>n</sub> an und werden nachfolgend an mehreren Stellen Tyrosin-phosphoryliert (Bonfini et al., 1996). Ferner können sie auch mit dem Tyrosin-phosphoryliertem Adapterprotein Grb2 interagieren, wodurch sich für Rezeptoren, die zwar keine Grb2-, aber eine SHC-Bindungsstelle besitzen, die Möglichkeit ergibt, an den Ras-induzierten Signalweg zu koppeln (Rozakis-Adcock et al., 1992).

Die Fähigkeit der RTK<sub>n</sub>, mehrere Adapterproteine zu binden und zu aktivieren, bietet somit der Zelle Möglichkeiten, vielschichtige biologische Antworten zu geben und komplexe Signalsysteme zu regulieren.

## 1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR<sub>n</sub>)

Mit über 1000 verschiedenen Transmembranmolekülen bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR<sub>n</sub>) die größte Gruppe unter den Zelloberflächenrezeptoren, die in der Lage sind, auf verschiedene Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Hormone, Pheromone, Opiate,

Cannabinoide, Endorphine, Duft- und Geschmacksstoffe, Nukleotide, Kalziumionen und Photonen zu reagieren (Gutkind, 1998; Marinissen and Gutkind, 2001). GPCR-Gene bilden bis zu 1% des Genoms eines Säugetiers (Hermans, 2003). Sie sind an vielen physiologischen Funktionen wie Metabolismus, Neurotransmission, Photorezeption (Sehvorgang), Wachstum und Differenzierung beteiligt (Fukuhara et al., 2001).

Wegen ihrer hoch konservierten Proteinstruktur, in der sieben  $\alpha$ -Helices die Plasmamembran passieren, werden GPCRn auch Siebentransmembrandomänen-Rezeptoren genannt. Sie verfügen im Gegensatz zu Rezeptortyrosinkinasen über keine enzymatische Aktivität, sondern ihr C-Terminus und die intrazellulären Schleifen interagieren sowohl mit heterotrimeren G-Proteinen als auch mit diversen anderen Proteinen mit PDZ-, PTB- oder SH3-Domänen, um an intrazelluläre Signalkaskaden zu koppeln (Bockaert et al., 2003). Der N-Terminus der GPCRn befindet sich extrazellulär und wird für die Ligandenbindung verantwortlich gemacht. Außerdem beeinflusst eine Di- oder Oligomerbildung von gleichen GPCRn, GPCRn verschiedener Familien sowie GPCRn nahe verwandter Familienmitglieder die Ligandenbindung, Rezeptoraktivierung, Desensibilisierung und Signalweiterleitung der Rezeptoren (Breitwieser, 2004).

### **1.2.1 Heterotrimere G-Proteine**

Die heterotrimeren G-Proteine gehören zu einer Familie der GTPasen, die aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten bestehen. Die GDP-bindende  $\alpha$ -Untereinheit assoziiert im nicht-aktiven Zustand mit einem  $\beta\gamma$ -Dimer. Die Aktivierung eines GPCRn durch Ligandenbindung führt nach Konformationsänderung im intrazellulären Teil des Rezeptors zur Interaktion mit dem heterotrimeren G-Protein und zum GDP/GTP-Austausch in der  $G\alpha$ -Untereinheit. Dadurch kommt es zur Dissoziation des  $G\alpha$ -GTPs vom  $\beta\gamma$ -Dimer, worauf wiederum beide Untereinheiten mit einer bestimmten Reihe von zellulären oder membrangebundenen Effektoren wechselwirken können und somit unter anderem Neuropeptid-Signale in biologische Antworten umwandeln (Conklin and Bourne, 1993; Hermans, 2003; Rozengurt, 2002).

Es sind mittlerweile 23  $G\alpha$ -Untereinheiten bekannt, die von 17 Genen kodiert werden. Sie werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in vier Klassen eingeteilt:  $G\alpha_s$  aktiviert die Adenylatzyklase, während  $G\alpha_{i/z}$  einen inhibierenden Einfluß auf die Adenylatzyklase hat,

$G\alpha_q$  aktiviert die Phospholipase  $C\beta$ , ein Enzym, das die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und die Aktivierung der Proteinkinase C reguliert (Hermans, 2003; Pierce et al., 2001; van Biesen et al., 1996). Die Untereinheiten  $G\alpha_{12/13}$  wurden im Zusammenhang mit Veränderungen des Zytoskeletts durch Aktin-Stressfaserbildung und der Ausbildung von Fokalkontakten beschrieben (Buhl et al., 1995; Gohla et al., 1999). Des Weiteren existieren sechs  $\beta$ - und zwölf verschiedene  $\gamma$ -Untereinheiten (Hermans, 2003; Pierce et al., 2001).

Die Menge der Interaktionsmoleküle der heterotrimeren G-Proteine ist von begrenztem Umfang und umfaßt Adenylat- und Guanylatzyklase, GAPs (GTPase-activating protein), GEFs (guanine-nucleotide exchange factor), Kalziumkanäle, Phospholipasen, Phosphodiesterase und die c-Src Tyrosinkinase. Viele G-Proteine binden an denselben Effektor. Es werden außerdem „Second Messenger“ wie zyklisches AMP, zyklisches GMP, Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) und 1,2-Diazylglyzerol (DAG), die via Phospholipase  $C\beta$  aus  $PI(4,5)P_2$  gebildet werden, durch aktivierte G-Proteine reguliert. Der Kalziumspiegel wird, wie zuvor beschrieben, ebenfalls von ihnen beeinflusst (Marinissen and Gutkind, 2001).

Einige Studien berichten außerdem über G-Protein-unabhängige Signalwege von GPCRn, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll (Bockaert and Pin, 1999; Hall et al., 1999).

### **1.2.2 GPCR Signaltransduktion im zentralen Nervensystem**

Neuropeptide, wie z.B. Bombesin, Endothelin-1 (ET-1), GRP (gastrin releasing peptide), Neuromedin B (NMB), Neurotensin, Substance P und Vasopressin sind molekulare Botenstoffe, die vielschichtige Aufgaben via GPCRn im zentralen Nervensystem und dessen Umfeld regulieren. Diese Peptide agieren als Neurotransmitter und spielen eine entscheidende Rolle bei der Schmerzübertragung, der Blutdruckregulation und bei Entzündungen. Bei ihrer Tätigkeit im zentralen Nervensystem regeln Bombesin-ähnliche Peptide (nachfolgend näher beschrieben) außerdem die Nahrungsaufnahme, die Bluttemperatur, den Glukose-Level oder bestimmte Verhaltensreaktionen (Heasley, 2001; Rozengurt, 2002). Neuropeptide agieren außerdem als wirkungsvolle zelluläre Wachstumsfaktoren für verschiedene Zelltypen. Viele Studien postulieren überdies die Beteiligung dieser Peptide als autokrine oder parakrine Wachstumsfaktoren an der humanen Krebsentstehung (Rozengurt, 2002).

### **1.2.2.1 Bombesin-ähnliche Peptide**

Die Isolierung des Neuropeptids Bombesin, einem amphibischen Tetradecapeptid (Zachary and Rozengurt, 1985), aus der Haut des Frosches *Bombina bombina* führte zur Identifikation des humanen Homologen GRP, ein Polypeptid mit 27 Aminosäuren, und NMB. Diese kontrollieren ein weites Spektrum von Abläufen einschließlich der Kontraktion glatter Muskelzellen sowie exokrine und endokrine Sekretion. GRP ist in der Tat benannt nach seiner Fähigkeit die Gastrin-Freisetzung in Zellen der Magenschleimhaut zu fördern, wodurch es zu einer Steigerung der Salzsäureproduktion im Magen kommt. GRP (Cuttitta et al., 1985; Moody et al., 1981) und NMB (Cardona et al., 1991) waren die ersten Neuropeptide, die als autokrine Wachstumsfaktoren in Lungenkrebs identifiziert wurden. In Zellen des kleinzelligen Lungenkrebses (SCLC) werden GRP und NMB weitverbreitet synthetisiert und in das Medium sekretiert (Heasley, 2001).

### **1.2.2.2 Endothelin**

Endothelin-1 (ET-1), ein starker Vasokonstriktor (gefäßverengende Substanz), ist sowohl an vasospastischen Krankheiten (Reduktion des Gefäßquerschnittes durch Kontraktion der Gefäßmuskulatur), wie Herzkranzgefäßerkrankung und Subarachnoidalblutung (akute Hirnblutung), als auch an Nieren- und kardiovaskulär fibrotischen Veränderungen beteiligt (Chansel et al., 2006)

### **1.2.2.3 Neurotensin**

Das Neuropeptid Neurotensin besteht aus 13 Aminosäuren und wird sowohl im Zentralnervensystem als auch in den N-Zellen des Dünndarms gebildet. Es besitzt eine duale Funktion: Im zentralen Nervensystem fungiert es als Neurotransmitter respektive als Neuromodulator der Dopamin Transmission und der Sekretion von Hypophysenhormonen. Weiterhin übt es Einfluß auf hypothermische und analgetische Effekte im Gehirn aus. Hingegen im Magen-Darm-Trakt und im kardiovaskulären System wirkt es als peripheres Hormon (Heasley, 2001) Als Intestinal-Hormon hemmt es die Säuresekretion des Magens und stimuliert die Darmkontraktion und Glukagonfreisetzung. NT wurde in Androgen-unabhängigen, prostatistischen Karzinomen entdeckt und trägt als autokriner Wachstumsfaktor zum Wachstum und Überleben dieser Tumorzellen bei (Seethalakshmi et al., 1997).

### 1.3 Mitogene GPCR-vermittelte Signaltransduktion und der Signalweg der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK)

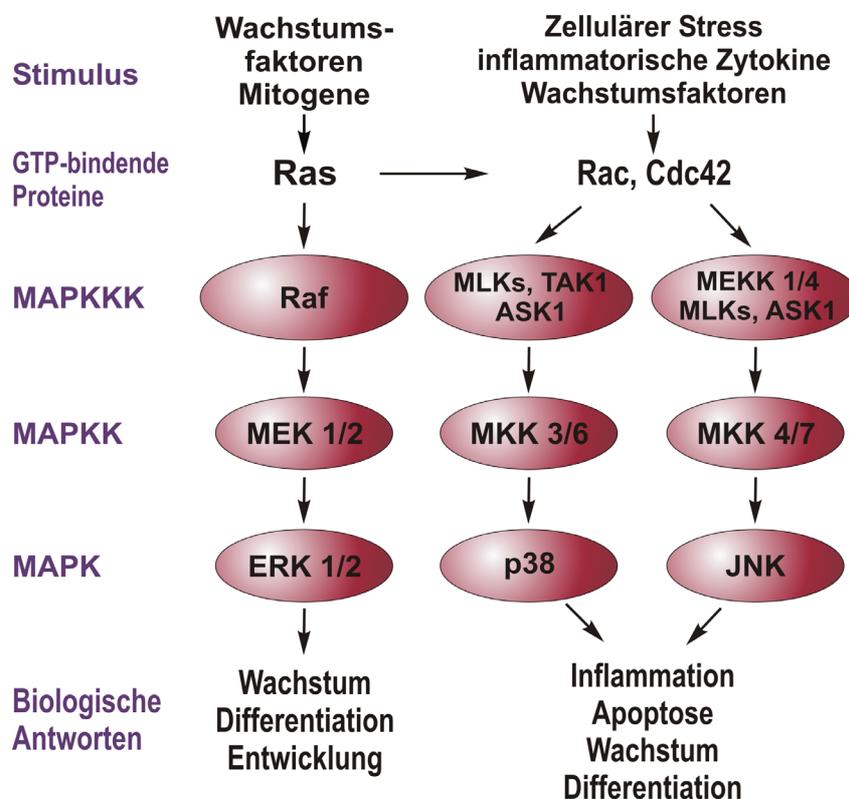
Die Signalwege der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK<sub>n</sub>) sind von entscheidender Bedeutung für die Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und zellulärer Transformation (Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998; van Biesen et al., 1996). Außerdem spielt dieser Signalabschnitt bei der Kontrolle von metabolischen Prozessen, intrazellulären Enzymregulationen, sowie bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Zellmigration eine große Rolle. Außerdem haben sie großen Einfluß auf Invasion, Angiogenese und das Überleben der Zelle. MAPK<sub>n</sub> sind Serin/Threonin Proteinkinasen, die extrazelluläre Stimuli an entscheidende regulatorische Punkte in der Zelle weitervermitteln. Eine der Hauptfunktionen der MAP Kinasen ist die Kontrolle der Genexpression durch direkte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren oder mit Hilfe von Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressoren (Yang et al., 2003). Es sind mindestens vier MAPK Gruppen in Säugern exprimiert, die einen hohen Grad an Homologie zeigen: die extrazellulär regulierten Kinasen ERK-1/2, die Jun-aminoterminalen Kinasen JNK-1/2/3 (benannt nach ihrem Hauptsubstrat c-Jun), die nach ihrer Molekülmasse bezeichneten Kinasen p38 bzw. p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  und die MAP Kinase ERK5 (Chang and Karin, 2001).

Das bekannteste Beispiel für eine sog. MAPK-Kaskade ist die Aktivierung der ERK Kinasen durch Rezeptortyrosinkinasen. Nach Liganden-induzierter Stimulation von RTK<sub>n</sub> wird das Adapterprotein Grb2 rekrutiert, das wiederum mit Hilfe seiner SH3-Domäne mit dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sos (son of sevenless) assoziiert. Der Grb2/Sos-Komplex wird von einer RTK durch Bindung der Grb2-SH2-Domäne an einen autophosphorylierten Tyrosinrest des Rezeptors rekrutiert, aktiviert daraufhin die Membran-assoziierte kleine GTPase Ras und regt dort den GTP/GDP-Austausch an. Die Membranbindung von Sos kann jedoch auch durch Bindung des Grb2/Sos-Komplexes an SHC stattfinden, einem weiteren Adapterprotein, das eine Komplexbildung mit Hilfe seiner PTB-Domäne vermittelt (Hunter, 2002; Schlessinger, 2000). Aktiviertes Ras kann nun mit der Serin/Threoninkinase Raf-1 interagieren. Diese wird nach Translokation zur Plasmamembran phosphoryliert und aktiviert (Barnard et al., 1998; Moodie et al., 1993; Morrison and Cutler, 1997; Vojtek et al., 1993; Warne et al., 1993; Zhang et al., 1993). Daraufhin werden die dualspezifischen Threonin/Tyrosinkinasen MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase 1/2, MAPK Kinase oder MAPKK) durch das aktivierte Raf-1 (eine MAPKK Kinase oder MAPKKK) an einem bestimmten Serinrest im aktiven Zentrum phosphoryliert und modifizieren selbst wiederum die MAP

Kinasen ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninresten des regulatorisch wichtigen TEY-Motifs (Thr-Glu-Tyr-Motiv) (Hunter, 2000; Robinson and Cobb, 1997). Die aktivierte MAPK phosphoryliert anschließend eine große Anzahl an zytoplasmatischen und Membran-gebundenen Substraten. Zusätzlich translozieren die MAP Kinasen nach Aktivierung in den Zellkern, wo sie durch Serin/Threoninphosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (TFen), wie z.B. Elk, entscheidend zur Zellproliferation beitragen (Robinson and Cobb, 1997; Treisman, 1996). Diese Signalkaskade aus drei aufeinanderfolgenden, in Serie aktivierten Proteinkinasen (MAPKK Kinase, MAPK Kinase und MAPK) ist ein stark konserviertes Kernmodul der Signaltransduktion (Hunter, 2000; Waskiewicz and Cooper, 1995) (Abb. 4).

Parallel zur ERK Kinasekaskade werden in höheren eukaryontischen Systemen weitere MAP Kinase Signalwege aktiviert, die, abhängig vom aktivierenden Stimulus, die Signalübertragung in den Zellkern übernehmen (Abb. 4).

## MAP Kinase Signalkaskaden



**Abb. 4: Die verschiedenen MAP Kinase Signalwege**

Schematische Darstellung der wichtigsten MAP Kinasekaskaden in eukaryontischen Zellen, die zur Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2 und JNK1/2 führen. Diese sind derzeit am besten charakterisiert.

Skizziert nach: (Davis, 2000; Schaeffer and Weber, 1999), dem Katalog „Cell Signaling Technology 2000-2001“ (www.cellsignaling.com) und (Yang et al., 2003)

Die spezifische Wirksamkeit der MAPK Interaktionen mit den stimulierten Effektormolekülen hängt stark von den involvierten MAPK Subtypen ab. ERK1/2 werden primär durch Wachstumsfaktoren oder Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRn) aktiviert und vermitteln Zellwachstum und Differenzierung. JNKs und p38 MAP Kinase hingegen werden hauptsächlich durch zelluläre Streßstimuli, wie UV-Bestrahlung, osmotischer Schock oder proteininflammatorische Zytokine aktiviert und sind ebenfalls in Zellwachstum und Differenzierung involviert, aber auch beteiligt am Überleben der Zelle, Apoptose und Zytokin-Produktion (Derijard et al., 1994; Marinissen and Gutkind, 2001; Su and Karin, 1996).

Die Aktivierung der ERK- und JNK MAP Kinase Kaskaden führt innerhalb kurzer Zeit zur Transkription der sogenannten „immediate-early“ Gene, den Transkriptionsfaktoren *c-fos* und *c-jun*, welche entscheidende Funktionen bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen haben. Diese beiden TFen bilden einen heterodimeren *c-fos/c-jun* Komplex aus der AP-1 (activating protein 1)-Familie von TFen und reguliert über die in zahlreichen Promotoren enthaltene AP-1-Bindungsstelle die Gentranskription (Karin et al., 1997; Lengyel et al., 1995). Weitere Studien zeigten, daß auch verschiedene RTKs, wie der EGFR und einige GPCRn die Aktivität der JNK- bzw. p38-Signalwege regulieren können (Cao et al., 2001; Kanda et al., 2001; Logan et al., 1997; Minden et al., 1995). Vergleichbar zum Erk Signalweg sind diese Signalkaskaden für verschiedene zelluläre Vorgänge wie Entzündungsprozesse, Apoptose und die Tumorentwicklung von großer Bedeutung (Davis, 2000; Ono and Han, 2000).

Es ist bekannt, daß GPCRn mitogene Antworten vermitteln, an normalem bzw. pathologischem Zellwachstum beteiligt sind und sowohl für Transformation als auch für Differenzierung von Bedeutung sind (Crespo et al., 1994; Gutkind, 1998). Für starke Mitogene wie Acetylcholin, Angiotensin, Bombesin, Bradykinin, Endothelin-1, Isoproterenol, LPA (Lysophosphatidylsäure), Neurotensin, Prostaglandin oder Thrombin wurde die Aktivierung mitogener Signalwege gezeigt (Daaka, 2004; Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998).

Das extrazellulär anzutreffende Phospholipid LPA ist das Hauptmitogen in Serum und ist unter anderem am Reorganisation des Zytoskeletts (Gohla et al., 1998), der Zellproliferation (van Corven et al., 1989), der Unterdrückung von Apoptose (Fang et al., 2000) und bei der Migration und Invasion von Tumorzellen (Fishman et al., 2001; Imamura et al., 1993) beteiligt. Die Zelloberflächenrezeptoren für LPA sind Mitglieder der EDG (endotheliales

Zell-Differenzierungs-Gen)-Unterfamilie der GPCRn (Kranenburg and Moolenaar, 2001). Nach Stimulation durch die spezifischen Liganden LPA und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) binden diese Rezeptoren an verschiedene G-Proteine und aktivieren intrazelluläre Signalwege. LPA ist involviert in die Modulation der Adenylatzyklase, Stimulation der Phospholipase C (PLC) und der darauf folgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung, Aktivierung des Ras/MAPK-Signalweges, Phosphorylierung des „Survival Mediators“ Akt/protein kinase B (PKB) durch die PI-3Kinase und Transkriptionsregulierung der „immediate-early“ Gene (Kranenburg and Moolenaar, 2001; Moolenaar, 1999; Moolenaar, 2000; Moolenaar et al., 1997).

Ektopisch exprimierte GPCRn wie die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (M1R, M2R und M5R) sind in der Lage, Fibroblasten, abhängig von der Ligandenstimulation, zu transformieren. Damit kann vermutet werden, daß endogene GPCRn Tumor-auslösend wirken können, wenn sie übermäßige Stimulation erfahren. Es wurden auch GPCR Liganden mit Tumorentstehung in Verbindung gebracht, da z.B. erhöhte LPA Konzentrationen im Plasma von Patienten mit Ovarialkarzinom gefunden wurden (Xu et al., 1995) und LPA ferner in Brustkrebszellen (Goetzl et al., 1999) und Ovarialkarzinomzellen (Erickson et al., 2001) als starkes Mitogen wirkt. Neuropeptide wie Bombesin, GRP und Bradykinin hingegen stimulieren die Zellproliferation beim kleinzelligen Lungenkrebs (SCLC) (Sethi et al., 1992).

## 1.4 Die EGFR Transaktivierung

Verschiedene Klassen von Zelloberflächenrezeptoren kommunizieren miteinander, um die große Schar extrazellulärer Signale auf eine eingeschränkte Anzahl von Signalwegen zu übertragen. Neben der unter 1.1.3 beschriebenen Aktivierung von RTKn durch ihre spezifischen Liganden können RTKn auch Liganden-unabhängig aktiviert werden.

### ***1.4.1 Historische und mechanistische Beschreibung der EGFR Transaktivierung***

Zahlreiche frühere Arbeiten beschrieben die Tyrosinphosphorylierung von RTKn als Antwort auf verschiedene Formen von zellulärem Streß wie z.B. hyperosmotischem Schock, Behandlung mit UV-Licht und verschiedenen Oxidantien, wie Hydrogenperoxide (Coffer et al., 1995; Huang et al., 1996; King et al., 1989; Knebel et al., 1996; Miller et al., 1994; Rao,

1996; Sachsenmaier et al., 1994). Als Mechanismus wurde für diesen Typus der RTK-Aktivierung ein Liganden-unabhängiger Weg über Inaktivierung von Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPn) und die Generierung von ROS (reactive oxygen species) postuliert (Knebel et al., 1996; Weiss et al., 1997). Eine GPCR-vermittelte Erhöhung des ROS-Spiegels in Zusammenhang mit der Tyrosinphosphorylierung der Met-Rezeptor Tyrosinkinase in Tumorzellen wurde in neueren Arbeiten gezeigt (Fischer et al., 2004a).

Wie in 1.3 bereits beschrieben, regeln neben den RTKs auch die GPCRs Wachstum, Differenzierung und Gentranskription der Zellen über den Ras/MAP Kinase Signalweg, wofür bei beiden Rezeptorklassen die Formation der Proteinkomplexe aus den Adapterproteinen SHC, Grb2 und Sos notwendig ist. Diese Signalschritte können durch den generellen Tyrosinkinaseinhibitor Genistein unterdrückt werden (van Corven et al., 1993). Dieses Erkenntnis löste die Forschung nach den für die GPCR-induzierte Ras/MAP Kinase Aktivierung verantwortlichen Kinasen aus.

In diesem komplexen Netzwerk konnten sowohl der EGFR als auch HER2 als kritische Elemente für die Signalübertragung verschiedener GPCR, Zytokinrezeptoren, Integrine, Ionenkanäle und RTKs identifiziert werden (Carpenter, 1999; Gschwind et al., 2001; Prenzel et al., 2001).

Daub und Kollegen konnten zum ersten Mal einen Signalaustausch zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und dem EGFR aufzeigen. Sie bewiesen damit eine entscheidende Rolle des EGFRs in der GPCR-induzierten Mitogenese von Rat-1 Fibroblasten. Stimulation dieser Fibroblasten mit den GPCR-Agonisten Endothelin-1, LPA und Thrombin führte zu einer transienten Tyrosinphosphorylierung des EGFRs. Um diesen G-Protein-induzierten Prozeß von der EGFR Tyrosinphosphorylierung durch direkte Ligandenbindung zu unterscheiden, wurde dieser als G-Protein-vermittelte EGFR Transaktivierung bezeichnet (Daub et al., 1996).

Die Transaktivierung dieser Rezeptortyrosinkinase koppelt die GPCR-Ligandenbindung mit ERK-Aktivierung, Induktion von *fos*-Genexpression, DNA-Synthese und Zellwachstum, welche sowohl durch den selektiven EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478 als auch durch Expression einer dominant-negativen EGFR-Mutante blockiert werden können. Weitere Forschungen deckten auf, daß dieser EGFR-GPCR-„Cross-Talk“-Mechanismus, der vielen Zelltypen zu eigen ist, sich durch einen schnellen und transienten Verlauf auszeichnet (Daub et al., 1997; Keely et al., 1998; Li et al., 1998) und unter Beteiligung der intrinsischen EGFR Kinaseaktivität verläuft (Eguchi et al., 1998; Tsai et al., 1997; Zwick et al., 1997). Da allerdings im Zellkulturmedium nach GPCR-Stimulation keine EGF-ähnlichen Liganden

nachgewiesen werden konnten (Eguchi et al., 1998; Tsai et al., 1997), folgerte man damals, daß dieser Mechanismus Liganden-unabhängig sei und aus rein intrazellulären Elementen bestehe (Carpenter, 1999; Zwick et al., 1999a). Der Mechanismus an sich etablierte sich jedoch als weit verbreiteter Signalübertragungsweg für die Aktivierung des MAPK Signals.

Neben der EGFR Transaktivierung wurde auch für andere RTKs eine Aktivierung durch GPCRn gezeigt. Z.B. wurde in primären glatten Muskelzellen der Ratte sowohl eine Angiotensin-II-induzierte PDGFR- (Linseman et al., 1995) als auch eine Thrombin-stimulierte IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) Rezeptor Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen (Rao et al., 1995; Weiss et al., 1997). Ebenso wurde die Aktivierung des PDGFR- $\beta$  in L-Zellen berichtet (Herrlich et al., 1998). Weitere Studien bewiesen die Transaktivierung des FGFR-1 (fibroblast growth factor receptor-1) in C6 Glioma Zellen der Ratte, welche keinen EGFR besitzen, durch die MOR- ( $\mu$ -opioid receptor) Agonisten Endomorphin-1 and Morphin (Belcheva et al., 2002), ebenso wie die bereits oben erwähnte Transaktivierung des Met Rezeptors, die unabhängig von der EGFR Kinaseaktivität beschreiben wurde (Fischer et al., 2004a), was darauf hinweist, daß auch die Transaktivierung bestimmter anderer RTKs in einer zelltypspezifischen Weise einen Beitrag zur GPCR-Signaltransduktion leisten können.

#### ***1.4.2 Zelltypspezifische Elemente der G-Protein-induzierten EGFR Transaktivierung und Vermittlung von GPCR-induzierten zellulären Ereignissen***

Interessanterweise konnten Daub und Kollegen in COS-7 Zellen die LPA-induzierte Transaktivierung des EGFRs durch Pertussis Toxin (PTX), das  $G\alpha$  Untereinheiten der  $G_{i/o}$  G-Protein-Familie inaktiviert, abschwächen, wohingegen die Thrombin-stimulierte EGFR Tyrosinphosphorylierung und die untersuchten „Downstream“-Antworten nicht beeinflusst wurden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß in Zellen, in denen der  $G_q$ -gekoppelte Bombesin Rezeptor (BombR) oder der  $G_i$ - gekoppelte M2 muscarinische Acetylcholin Rezeptor (M2R) ektopisch exprimiert wurde, diese GPCRn nach Ligandenstimulation eine EGFR Transaktivierung und die darauf folgende SHC Tyrosinphosphorylierung mit Bildung des SHC/Grb2 Komplexes auslösen (Daub et al., 1997). Diese Ergebnisse demonstrieren, daß EGFR Transaktivierung sowohl mittels PTX-sensitiver als auch insensitiver Signalwege auftreten kann, und daß der EGFR die Aktivierung der MAP Kinase durch  $G_q$ - und  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren in COS-7 Zellen vermittelt.

Weitere Arbeiten zeigten, daß  $G\alpha_{13}$  Untereinheiten LPA-induzierte Actin Polymerisation und Actin-Streßfaserbildung in Swiss 3T3 Zellen und Mausfibroblasten via EGFR Transaktivierung vermitteln (Gohla et al., 1998; Gohla et al., 1999).

GPCR Ligand	involvierte G-Proteine	Zelltyp oder Gewebe	zelluläre Antwort	Referenz
Endothelin-1, LPA, Thrombin	ND	Rat-1	ERK Aktivierung, FOS Transkription	(Daub et al., 1996)
Bradykinin	$G_q$	PC-12	ERK Aktivierung, $Ca^{2+}$ , Pyk2, <i>c-fos</i>	(Zwick et al., 1997; Zwick et al., 1999b)
Bombesin, Carbachol, LPA	$G_q, G_i$	COS-7	ERK Aktivierung	(Daub et al., 1997)
Isoproterenol	ND	COS-7	ERK Aktivierung	(Maudsley et al., 2000)
Angiotensin II	$G_q$	Glatte Muskelzellen	ERK Aktivierung	(Eguchi et al., 1998)
Thrombin, LPA	ND	HaCaT	ERK Aktivierung	(Daub et al., 1997)
Thrombin	ND	Primäre Astrocyten	ERK Aktivierung	(Daub et al., 1997)
Thrombin	ND	Glatte Muskelzellen	ERK Aktivierung, Migration	(Kalmes et al., 2000)
Carbachol	$G_q$	HEK 293	Modulation der Aktivität von Kv1.2 Ionenkanälen	(Tsai et al., 1997)
Carbachol	$G_q$	T84	ERK Aktivierung, Inhibition von $Cl^-$ Sekretion	(Keely et al., 1998)
LPA	$G_{13}$	Swiss 3T3	Bildung von Streßfasern	(Gohla et al., 1998)
LPA	ND	HeLa	ERK Aktivierung	(Cunnick et al., 1998)
LPA	ND	NIH 3T3	MKK1/2 Aktivierung, DNA Synthese	(Cunnick et al., 1998)
Bombesin	ND	PC3	EGFR Tyrosin-phosphorylierung	(Prenzel et al., 1999)
Substance P	$G_i$	U-373 MG	ERK Aktivierung, DNA Synthese	(Castagliuolo et al., 2000)
Interleukin-8	$G_q$	SK-OV-3	ERK Aktivierung, Morphologieänderung	(Venkatakrisnan et al., 2000b)
PYY	$G_i$	IEC-6	ERK Aktivierung, Zellwachstum	(Mannon and Mele, 2000)
GnRH	$G_q$	alphaT3-1	ERK Aktivierung	(Grosse et al., 2000)
TxA2	$G_i$	ECV304	ERK Aktivierung	(Gao et al., 2001)
LPA	ND	Adenoakanthomzellen SCC-9/SCC-25 ( <i>HNSCC</i> )	ERK Aktivierung, DNA Synthese, Zellzyklus Progression, Migration	(Gschwind et al., 2002)
LPA, Carbachol	ND	SCC-9	TACE/ADAM17 induziertes proAR "Shedding", Akt/PKB Phosphorylierung	(Gschwind et al., 2003)
Angiotensin II	ND	Prostata Bindegewebszellen	Zellwachstum	(Lin and Freeman, 2003)
THC (CB1/2 Rezeptor)	ND	U373-MG, NCI-H292	ERK Aktivierung, Akt/PKB Aktivierung, Zellproliferation	(Hart et al., 2004)
Angiotensin II, Endothelin-1, LPA	ND	ACHN (Nierenkrebszellen)	ERK Aktivierung, Zellproliferation	(Schäfer et al., 2004b)
Endothelin-1, LPA	ND	TccSup (Blasenkrebszellen)	Akt Aktivierung	(Schäfer et al., 2004b)
LPA, S1P, Thrombin	ND	MDA-MB-231, MCF-7 (Brustkrebszellen)	SHC-, ERK-, Akt Aktivierung	(Hart et al., 2005)

**Tabelle 1: Cross-Talk zwischen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und dem EGFR.**

Abkürzungen: extracellular regulated kinase (ERK), lysophosphatidic acid (LPA), mitogen-activated protein kinase kinase 1 und 2 (MKK1/2), Gonadotropin releasing hormone (GnRH), G-protein coupled peptide YY (PYY), Thromboxane A2 receptor (TxA2), nicht gezeigt - not determined (ND). (adaptiert und erweitert von Gschwind *et al.*, 2001)

In Tabelle 1 sind einige für die vorliegende Arbeit wichtige Forschungsergebnisse zusammengefaßt, die eine weitverbreitete Verwendung der EGFR-Signaltransaktivierung durch unterschiedliche GPCRn in den vielfältigsten Zelllinien nachweisen. Außerdem zeigt die Tabelle das Vermögen verschiedener G-Proteine, wichtige intrazelluläre Verbindungen zu knüpfen.

Zusammenfassend kann gesagt werden:  $G_i$ -,  $G_q$ - und  $G_{13}$ -gekoppelte Rezeptoren vermögen den EGFR nach Stimulation durch GPCR-Liganden in unterschiedlichen Zellsystemen (sowohl Tumor- als auch in nicht-kanzerogenen Zellen) zu transaktivieren.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, daß der EGFR Transaktivierungsmechanismus von Zelltyp-spezifischen, regulatorischen Einflüssen abhängig ist. Mehrfach wurde die Rolle von  $Ca^{2+}$  als essentieller Parameter in der Transaktivierung des EGFRs durch  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen wie z.B. in den Neuronen-ähnlichen PC12 Zellen, glatten Muskelzellen, Epithelzellen des Darms und Ovariarkarzinomzellen beschrieben (Eguchi et al., 1998; Iwasaki et al., 1999; Murasawa et al., 1998; Soltoff, 1998; Venkatakrishnan et al., 2000a; Zwick et al., 1997).

Als Vermittler der GPCR-induzierten MAP Kinase Aktivierung wurden außer dem EGFR auch zytoplasmatische Proteine, wie etwa die  $Ca^{2+}$ -abhängige Tyrosinkinase Pyk2 (Dikic et al., 1996; Eguchi et al., 1999; Lev et al., 1995; Prenzel et al., 2001) oder Mitglieder der Src Kinase Familie (Dikic et al., 1996; Luttrell et al., 1996), diskutiert. Src gilt hierbei als wichtiges Element (Grosse et al., 2000; Mannon and Mele, 2000) wird aber kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten zeigten eine  $G_i$ -vermittelte EGFR Transaktivierung über  $\beta\gamma$ -Untereinheiten und Src-Kinasen (Luttrell et al., 1997). In glatten Gefäßmuskelzellen verläuft die AT-II-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung sensitiv gegenüber dem Src Kinase Inhibitor PP1 (Bokemeyer et al., 2000) und Src komplexiert mit dem EGFR nach ATII Stimulation (Eguchi et al., 1998). Andererseits existieren andere Forschungsberichte, die eine Src-unabhängige EGFR Transaktivierung, aber Src-abhängige SHC Tyrosinphosphorylierung und ERK Aktivierung aufzeigen (Adomeit et al., 1999; Daub et al., 1997; Slack, 2000). Somit erscheint es wahrscheinlich, daß Src vom transaktivierten EGFR rekrutiert wird, um so bei der Aktivierung des Ras Signalweges mitzuwirken.

Ein weiterer Vermittler der EGFR Transaktivierung, der vor allem bei der Signalweiterleitung von  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren, wie dem M1R, benötigt wird, ist die Serin/Threoninkinase PKC (Protein Kinase C) (Grosse et al., 2000; Soltoff, 1998; Tsai et al., 1997). Für diese

Kinase wurde zum einen eine positive Beteiligung an der GPCR-vermittelten Aktivierung des EGFRs gezeigt (Adomeit et al., 1999; Kodama et al., 2002; Tsai et al., 1997) zum anderen eine negative (Li et al., 1998). Die EGFR Signal-Transaktivierung in COS-7 Zellen ist beispielsweise PKC-abhängig (Adomeit et al., 1999).

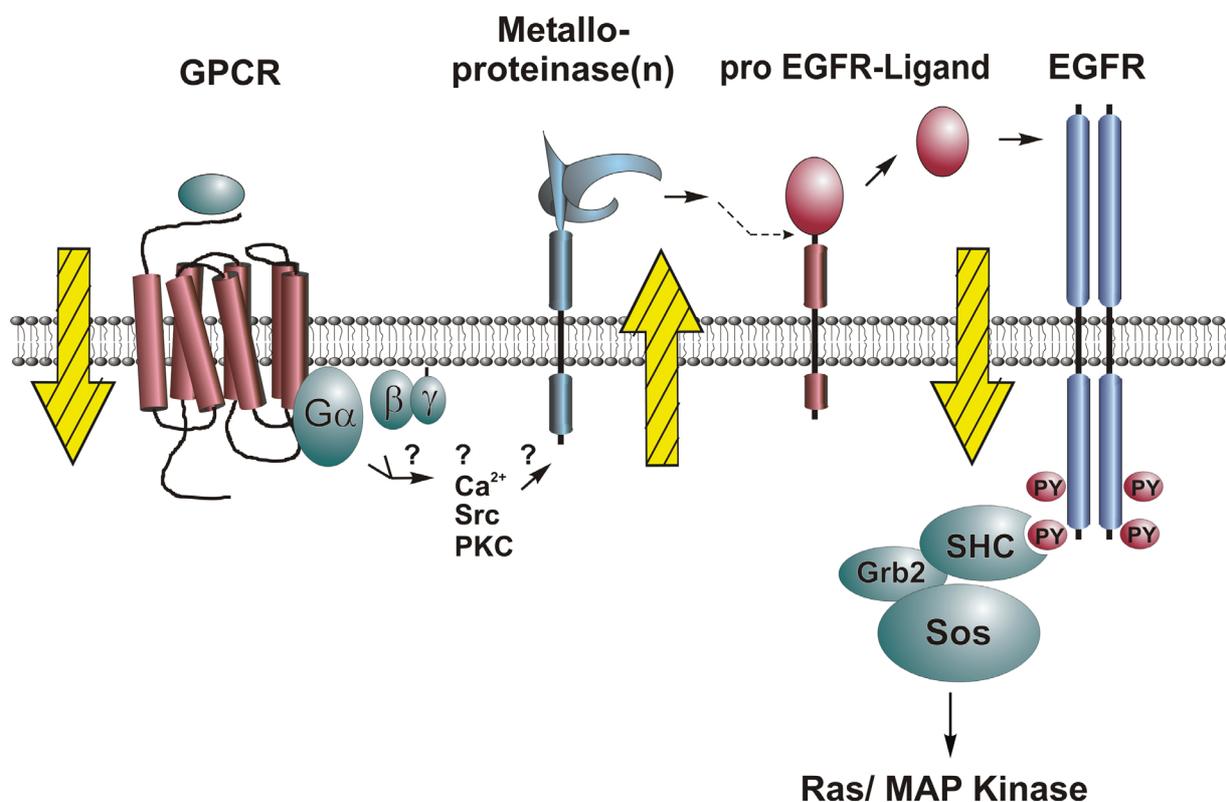
Aufgrund der schnellen Kinetik der EGFR Signal-Transaktivierung und der Tatsache, daß nach GPCR-Stimulation keine Freisetzung von EGFR-Liganden detektiert werden konnte, wurde der Mechanismus der EGFR Transaktivierung als Liganden-unabhängig und infolgedessen ausschließlich auf intrazellulären Elementen, wie  $Ca^{2+}$ , PKC oder Src, beruhend angedacht (Carpenter, 1999).

Dennoch konnten N. Prenzel und Kollegen eine entscheidende Rolle der extrazellulären Domäne des EGFRs im GPCR-EGFR „Cross-Talk“-Mechanismus durch Einsatz einer RTK-Chimäre, bestehend aus der Liganden-bindenden Domäne des EGFRs und dem transmembranären und dem intrazellulären Teilbereich des PDGFRs, dokumentieren. Dieses chimäre Proteinkonstrukt war, in Rat-1 Fibroblasten eingebracht, durch GPCR Liganden Behandlung transaktivierbar und es konnte ein für den PDGFR charakteristisches intrazelluläres Signal nachgewiesen werden. Ein ebenfalls ektopisch exprimierter PDGFR wurde nach GPCR-Stimulation der Rat-1 Zellen nicht tyrosinphosphoryliert, so daß das Signal über den extrazellulären Teil der EGFR/PDGFR-Chimäre verlaufen mußte (Prenzel et al., 1999).

Weiterhin konnte durch Experimente mit Rat-1, COS-7 oder HEK-293 Zellen nachgewiesen werden, daß die GPCR Liganden LPA, Bombesin, Carbachol sowie der Phorbolester TPA (Tetra-Decanoyl-Phorbol-13-Acetat) die proteolytische Prozessierung des transmembranen proHB-EGF-Vorläufers zu einem reifen EGF-ähnlichen Liganden induzieren. Sowohl der Metalloproteinaseinhibitor Batimastat als auch die spezifische HB-EGF-antagonistische Diphtherietoxinmutante CRM197 blockierte die GPCR-induzierte EGFR Transaktivierung und die Tyrosinphosphorylierung des Adapterproteins SHC (Leserer et al., 2000; Prenzel et al., 1999). Flow-Zytometrie-Analysen bestätigten direkt das Zelloberflächen-„Ectodomain-Shedding“ von proHB-EGF nach Zellstimulation mit GPCR Agonisten oder TPA (Prenzel et al., 1999). Diese Daten etablierten das Konzept des TMPS („Triple Membrane Passing Signal“)-Mechanismus der EGFR Signal-Transaktivierung. Dieses beinhaltet eine Metalloprotease-Aktivität und die proteolytische Prozessierung eines transmembranen EGF-ähnlichen Vorläufers wie z.B. proHB-EGF als essentielle Schlüsselemente (Gschwind et al.,

2001; Leserer et al., 2000; Prenzel et al., 2001; Prenzel et al., 2000) (Abb. 5). Das Modell erlaubt außerdem die Transaktivierung von EGFRn benachbarter Zellen, aber nur über eine kurze Distanz, also Zelldichte-abhängig, und unter Beteiligung einer Heparan-Sulfat-Proteoglykanmatrix (Prenzel et al., 1999). Rückblickend erklärt dies, daß EGF-ähnliche Liganden in konditioniertem Medium von GPCR Ligand-stimulierten Rat-1 Zellkulturen von H. Daub und Mitarbeitern nicht detektiert werden konnten (Daub et al., 1996).

## Triple-Membrane-Passing-Signal (TMPS)



**Abb. 5: Der "Triple Membrane Passing Signal" (TMPS) Mechanismus der EGFR Transaktivierung.**

Die GPCR-induzierte und Metalloprotease-vermittelte proteolytische Spaltung der EGF-ähnlichen Wachstumsfaktorvorläufer führt zur Transaktivierung des EGFRs. Dieses neue mechanistische Signalmodell für Ligand-abhängige Kommunikation zwischen Rezeptoren schließt drei Membrandurchgänge ein und koppelt die Rezeptoraktivierung an den Ras/MAP Kinase Signalweg. Adaptiert aus (Gschwind et al., 2001; Leserer et al., 2000; Prenzel et al., 2000)

### 1.4.3 ADAM Metalloproteasen als Schlüsselemente der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung

Metalloproteasen sind in vielen Aspekten der Biologie von entscheidender Bedeutung. Ihr Wirkungsbereich erstreckt sich über Zellproliferation, Differenzierung, Restrukturierung der extrazellulären Matrix (ECM) bis hin zu Zellmigration, Vaskularisierung und Metastasierung. Diese Enzyme sind somit auch an der Tumorprogression beteiligt. Die meisten dieser Metalloprotease-gesteuerten Prozesse beruhen auf einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen den Funktionen von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) oder Metalloprotease-Disintegrinen (ADAMs) und Ihren natürlichen Inhibitor-Proteinen, den TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteases). Vier homologe TIMPs wurden identifiziert, wobei TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 sekretiert werden, TIMP-3 hingegen Membran-ständig ist (Crocker et al., 2004). TIMPs inhibieren Zellinvasion *in vitro*, Tumorgenese und Metastasierung *in vivo* (Gomez et al., 1997). ADAMs (a disintegrin and metalloprotease domain) sind transmembranäre Glykoproteine, die eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen und der Prozessierung von Protein-Ektodomänen spielen (Wolfsberg et al., 1995). Weiterhin werden sie mit Fertilisation, Myoblastenfusion, Prozessierung und Spaltung von Zytokinen, Zytokinrezeptoren, Adhäsionsproteinen und anderen extrazellulären Proteindomänen in Zusammenhang gebracht (Schlondorff and Blobel, 1999).

Eine schematische Veranschaulichung der ADAM Enzyme sei in Abb. 6 in Kürze vorgestellt.

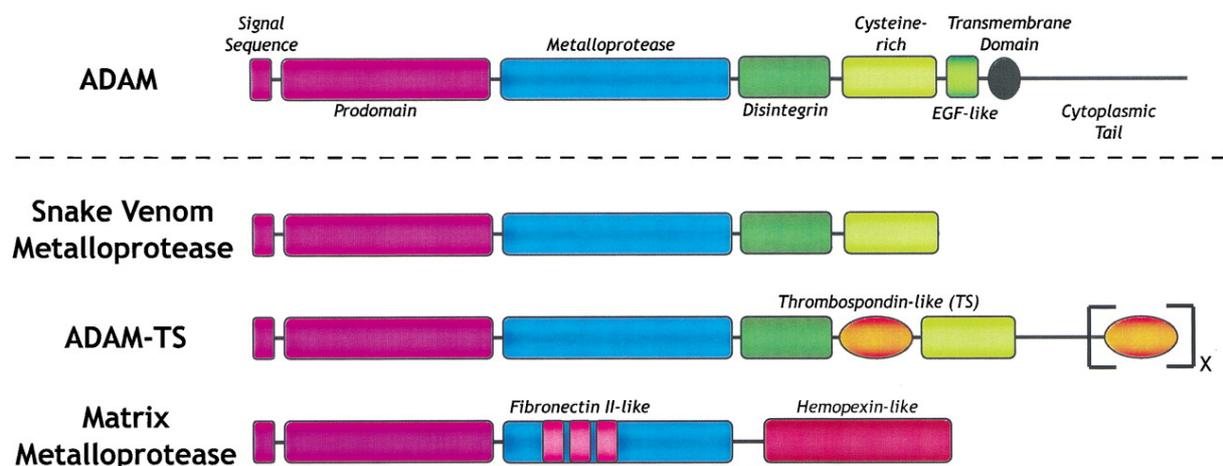


Abb. 6: Die Domänenstruktur der ADAM Proteine und verwandter Metalloproteasen.

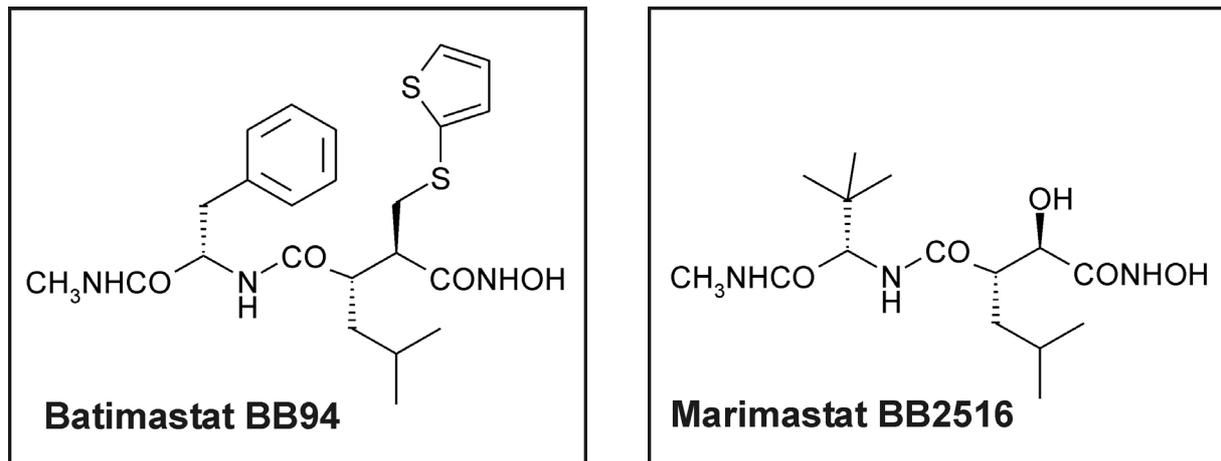
(Seals and Courtneidge, 2003)

Sie vereinen Eigenschaften von Zelloberflächenadhäsionsmolekülen und Proteinasen. Sie lassen sich durch eine konservierte Domänenstruktur charakterisieren: Eine N-terminale Signalsequenz, gefolgt von einer Pro-Domäne, Metalloprotease- und Disintegrindomänen, einer Cystein-reichen Region und schließlich dem transmembranären- und zytoplasmatischen Teil (Seals and Courtneidge, 2003).

Metalloproteasen können durch synthetische Inhibitoren wie Batimastat (BB94) oder Marimastat (BB2516) (Abb. 7) gehemmt werden. Sie binden reversibel im aktiven Zentrum der Proteinase. Die Hydroxamat Gruppe (-CONHOH) des Batimastats bindet an das Zinkatom im aktiven Zentrum der Metalloprotease. Batimastat (4-(*N*-Hydroxyamino)-(2*R*)-isobutyl-(3*S*)-[(2-thienylthiomethyl)succinyl]-*L*-phenylalanin-*N*-methylamid) ist ein Breitbandinhibitor mit Aktivität gegen MMPs im Nanomolbereich. In Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. W. Bode lieferte eine Kristallstrukturanalyse der katalytischen Domäne der Kollagenase aus Humanneutrophilen mit gebundenem Batimastat eine zweizählige Koordination des Inhibitors an das katalytische Zn<sup>II</sup>-Zentrum über die Hydroxy- und Carbonylsauerstoffatome der Hydroxamatgruppe (Grams et al., 1995). BB94 inhibierte die Bombesin- und TPA-induzierte EGFR Transaktivierung in PC3 Protatakarzinomzellen und verringerte nach einigen Stunden den basalen Tyrosinphosphorylierungslevel des EGFRs in ungehungerten PC3- (Prenzel et al., 1999) sowie in HNSCC-Zellen (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma)-Zellen (Gschwind et al., 2002). Weiterhin konnte die Proliferation und die Migration einer epithelialen Brustzelline (HMEC), deren Wachstum EGF-abhängig ist, durch BB94 reduziert werden (Dong et al., 1999). Ebenfall ist bekannt, daß BB94 die Proliferation von Tumorzelllinien inhibiert, die auf autokrine Stimulation des EGFRs angewiesen sind. Gschwind und Kollegen zeigten, daß die LPA-induzierte DNA Synthese, Zellzyklus Progression und Migration von HNSCC-Zellen (*siehe auch Tabelle 1*) mit einer Metalloprotease-abhängigen Transaktivierung des EGFRs einhergehen (Gschwind et al., 2002). Interessanter Weise zeigten transgene Mäuse, denen die Zink-abhängige transmembrane Metalloproteinase ADAM17 (TACE) fehlte, ähnliche phänotypische Veränderungen wie TGF- $\alpha$ - oder EGFR-„knock-out“-Tiere (Prenzel et al., 2001). Die Ektodomänenspaltung von proTGF- $\alpha$ , proAR und proHB-EGF durch ADAM17 ist ebenfalls beschrieben (Higashiyama and Nanba, 2005; Sunnarborg et al., 2002). In diesem Zusammenhang deutete vieles auf die ADAM Familie der Metalloproteinasen als Schlüsselenzyme der Wachstumsfaktor-Vorläufer-Prozessierung hin (Leserer et al., 2000).

Mittlerweile ist bekannt, daß in HNSCC Zellen die LPA- bzw. Carbachol-induzierte EGFR Transaktivierung durch eine TACE-abhängige Spaltung und Freisetzung des EGFR Liganden

Amphiregulin (AR) vermittelt wird (Gschwind et al., 2003). Dies konnte durch Stilllegung des AR-Gens mittels siRNA (small interfering RNA) oder durch Inhibition der biologischen Aktivität von Amphiregulin durch neutralisierende Antikörper belegt werden. Die ADAM17 Beteiligung wurde sowohl mit Hilfe der Expression einer dominant-negativen Mutante, als auch durch siRNA-Experimente gegen TACE bewiesen.



**Abb. 7: Strukturformeln der Metalloprotease Inhibitoren Batimastat (BB94) und Marimastat (BB2516).**  
Skizziert nach (Brown and Giavazzi, 1995); vgl. Kapitel (8).

## 1.5 Krebsentstehung und molekulare Onkologie

Tumorzellen zeichnen sich gegenüber normalen Zellen durch die sechs Kernfähigkeiten für Krebs aus: Autarkes Wachstum und erhöhte Zellteilungsrate, Verlust der Differenzierungsfähigkeit und der Kontaktinhibition, das Unterlaufen des programmierten Zelltodes (Apoptose), unlimitedes replikatives Potential, dauerhafte Angiogenese, sowie die Fähigkeit zur Invasion und Metastatisierung in andere Gewebe (Hanahan and Weinberg, 2000). Diese Eigenschaften werden während der Tumorentwicklung in einem mehrstufigen Prozeß, der durch die Akkumulation von sowohl angeborenen als auch im Laufe der Zeit hinzugekommenen Gen-Defekten oder genetischen Veränderungen ausgelöst wird, erworben, wodurch normale humane Zellen durch progressive Transformation zu hoch malignen Derivaten mutieren (Hanahan and Weinberg, 2000; Kinzler and Vogelstein, 1996). In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Gene, die bei der Positiv- respektive Negativregulation des Zellwachstums eine entscheidende Rolle spielen. Gen-Defekte sind

Veränderungen der Chromosomen z.B. durch Translokationen ganzer Chromosom-Abschnitte, Verlust von Chromosomen-Abschnitten, aber auch die Vervielfältigung von Genen oder die Veränderung der Nukleotidsequenz einzelner Gene durch Punktmutationen, Insertionen oder Verlust von Nukleotiden. All diese Gen-Veränderungen verursachen Störungen in der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle, indem sie entweder die Aktivität von Proteinen der Signalketten erhöhen oder deren negative Regulatoren blockieren.

Krebs ist eine weitverbreitete Krankheit und kann auch durch Störungen der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen ausgelöst werden, was die Entwicklung einer Reihe von klinisch zugelassener Inhibitoren gegen Tyrosinkinasen, die für Tumorentstehung verantwortlich gemacht werden, veranlaßte (Hunter, 2009). Diese „low molecular weight compounds“ sind allerdings häufig nicht ausreichend spezifisch und verursachen in einer Therapie erhebliche Nebenwirkungen. Weiterhin existieren spezielle Antikörper als therapeutisches Arzneimittel für Krebsbehandlung. Hier ist z.B. der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin, Genentech Inc.) zu erwähnen, der in der Brustkrebstherapie, bei HER2 überexprimierenden Brustkrebsarten, eingesetzt wird und in Kombination mit konventioneller Chemotherapie zu höheren Überlebensraten der Patienten führt (Finn and Slamon, 2003; Gschwind et al., 2004; Ropero et al., 2004).

Häufige kritische Punkte, an denen die Regulationsstörungen auftreten, sind die Phosphotyrosinkinasen, die Wachstum-stimulierende Signale in die Zelle weiterleiten (Hanahan and Weinberg, 2000). Die Überexpression von Tyrosinkinasen und im besonderen von RTK kann eine Krebszelle hypersensitiv gegenüber sehr geringen Mengen eines bestimmten Wachstumsfaktors machen, die normalerweise nicht ausreichen, um die Zell-Proliferation zu stimulieren (Fedi P, 1997). Ferner wurde in Blasen- und Brustkarzinomen (Neal et al., 1990; Nicholson et al., 1991) eine stark erhöhte Expression des EGFRs gefunden, was mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert. Dies gilt ebenfalls für die Gen-Amplifikation von HER2 in Brustkarzinomen (Slamon et al., 1987).

Auch sind zahlreiche Beispiele für Onkogene bekannt, die für mutierte Formen von Rezeptortyrosinkinasen kodieren, und deren transformierende Eigenschaften sich häufig auf ihre konstitutive Aktivierung zurückführen lassen. Mutationen können dazu beitragen, daß die Tyrosinkinasen ständig aktiv und nicht mehr der Kontrolle der Liganden unterworfen sind. So wurde beispielsweise bei Mutationen in der Transmembrandomäne der FGF Rezeptor Familie eine durch die Mutation hervorgerufene konstitutive Aktivierung der jeweiligen mutierten Rezeptoren festgestellt (Li et al., 1997).

Neben der unkontrollierten Bildung von Rezeptoren wird aber oft auch die Überexpression von Liganden in Krebszellen beobachtet. Dieses gilt sowohl für die Liganden der EGF Familie (EGF und TGF- $\beta$ ) als auch für PDGF (Hermanson et al., 1992; Rusch et al., 1993; Tateishi et al., 1990).

Auch die in 1.2.2 beschriebenen Neuropeptide können in autokrinen und parakrinen Stimulationsprozessen bei der Tumorzell-Proliferation und -Migration beteiligt sein (Rozenfurt, 2002).

Auch Genome von verschiedenen transformierend wirkenden Viren, wie das dem Kaposi's Sarkoma zugeordnete Herpesvirus (KSHV), besitzen in ihrem Genom Sequenzen für konstitutiv aktive GPCRn, für die Krebsinduzierung in Tiermodellen gezeigt wurde (Montaner et al., 2003).

Prostatakrebs ist mit Hautkrebs einer der häufigsten Tumorarten bei Männern. In einschlägigen Untersuchungen wurde gezeigt, daß in Prostatatumorzellen GPCRn zusammen mit Wachstumsfaktor Rezeptoren „Survival“-Signale vermitteln können, und daß Inhibierung von G-Protein Signalen das Wachstum dieser Karzinomzellen in Tiermodellen reduziert. Die Tumorzellen von Prostatakrebspatienten in fortgeschrittenem Stadium exprimieren einen erhöhten Level an GPCRn und GPCR Liganden, wodurch darauf geschlossen werden kann, daß das aktivierte G-Protein-System zum Tumorwachstum beiträgt (Daaka, 2004; Yowell and Daaka, 2002).

Diese Tatsache, zusammen mit der autokrinen und parakrinen Wirkungsweise von Neuropeptiden in diversen Tumorarten, und dem Wissen, daß metastasierende Prostatakarzinomzellen nach Bombesin-Stimulation mit erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung reagieren (Wasilenko et al., 1997), macht diese Tumorart als Modellsystem für die Erforschung der EGFR Signal-Transaktivierung interessant.

Prostatatumorzellen wurden zudem mehrfach mit der Aktivierung des EGFRs durch Liganden von GPCRn und daraus resultierenden mitogenen Antworten in Verbindung gebracht (Kue et al., 2002; Madarame et al., 2003; Stewart and O'Brian, 2005; Xiao et al., 2003)

## 1.6 Zielsetzung

Die EGFR Signal-Transaktivierung stellt ein weit verbreitetes Merkmal der G-Protein-vermittelten Signalübertragung dar, wie Ergebnisse von H. Daub, E. Zwick und N. Prenzel (*diese Arbeitsgruppe*) zusammen mit den in 1.4 vorgestellten Arbeiten zeigten.

Auf dieser Basis und der Tatsache, daß sowohl die Fehlregulation des EGFR- als auch des GPCR-Signalsystems als Ursachen für die Entartung von Zellen gesehen werden, sollten zur Charakterisierung der pathophysiologischen Bedeutung der GPCR-vermittelten EGFR Tyrosinphosphorylierung, humane Tumorzelllinien in Hinsicht auf die Metalloprotease-abhängige und durch Stimulation mit GPCR-Liganden vermittelte EGFR Transaktivierung analysiert werden. Vor allem war die „Gastro-Neuro“-Verbindung (gut-brain axis) (Konturek et al., 2004; Track, 1983), die beschreibt, daß viele Peptide sowohl in Zellen des Magen-Darm-Trakts, als auch in Gehirnzellen Signale vermitteln, von Interesse. Somit stellte sich die Frage, ob und gegebenenfalls auf welche Weise die EGFR Transaktivierung für Reaktionen von Neurotransmittern auf Prostatakarzinomzellen oder Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes, vor allem für den Einfluß der Mitogene auf Migrations- oder Invasionsfähigkeit der Zellen, relevant ist.

In dieser Arbeit sollten weiterhin Untersuchungen mechanistischer, für die physiologische Signalweiterleitung bedeutsamer Elemente durchgeführt werden, die an diesem prototypischen Zelloberflächenrezeptor-Kreuzkommunikations-Signalweg (TMPS-Modell, siehe Abb. 5) beteiligt sind. Hier war vor allem die Aktivierung der Signalproteine SHC, Akt, FAK oder PKC nach Stimulation durch GPCR-Liganden von Interesse.

Die Experimente sollten vorzugweise endogen erfolgen, da die Überexpression von Proteinen und die sich daraus ergebenden artifiziellen Zellsysteme nicht hinreichend für physiologische Untersuchungen aussagekräftig sind.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Chemikalien

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

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
AG1478 (Tyrphostin)	P. Hirth (SUGEN)
Agar	Difco (Detroit)
Agarose	Gibco-BRL (Eggenstein)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad (München)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
Adenosintriphosphat (ATP)	Pharmacia (Freiburg)
Batimastat	British Biotech, Oxford, UK
Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Bisindolylmaleimid I (GF 109203X)	LC Laboratories (Grünberg)
Bromphenolblau	Sigma (Taufkirchen)
BSA	Sigma (Taufkirchen)
Desoxynukleotide (dNTPs)	Pharmacia (Freiburg)
Didesoxynukleotide (ddNTPs)	Pharmacia (Freiburg)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Taufkirchen)
Ethidiumbromid	Sigma (Taufkirchen)
Geneticin <sup>®</sup> (G 418)	Gibco-BRL (Eggenstein)
GF109203X	LC Laboratories (Grünberg)
Hefeextrakt	Difco (Detroit)
Hearin (H-9399)	Sigma (Taufkirchen)
Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin- ethansulfonsäure)	Serva (Heidelberg)
Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol (Hamburg)
L-Glutamin	Gibco (Eggenstein)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen)
Lipofectamine <sup>®</sup>	Gibco (Eggenstein)
Lipofectamine 2000 <sup>®</sup>	Gibco (Eggenstein)
Lysozym	Sigma (Taufkirchen)
MBP (Myelin basic protein)	Sigma (Taufkirchen)
Marimastat	Sugen Inc., CA, USA
Natriumazid	Serva (Heidelberg)
Natriumfluorid	Sigma (Taufkirchen)
Natriumorthovanadat	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG (Berlin)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma (Taufkirchen)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma (Taufkirchen)

Polypren (Hexadimethrinbromid)	Sigma (Taufkirchen)
Polyethylenglycol 4000	Serva (Heidelberg)
Ponceau S	Sigma (Taufkirchen)
Protein A-Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Serva (Heidelberg)
TPA (Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)	Sigma (Taufkirchen)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Riedel de Haen (Seelze)
Triton X-100	Serva (Heidelberg)
Tyrphostin AG 1478	LC Laboratories (Grünberg)
Xylencyanol	Biorad (Bad Homburg)

### 2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase C.I.A.P.)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Lysozym	Roche (Mannheim)
Restriktionsenzyme	Roche (Mannheim)
	Biolabs (New England)
RNase A	Sigma (Taufkirchen)
TaKaRa-LA-Taq-Polymerase	TaKaRa (Otsu, Japan)
T4-DNA-Ligase	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Polymerase	Roche (Mannheim)
T4-Polynukleotidkinase	Roche (Mannheim)
T7 DNA-Polymerase	Pharmacia (Freiburg)
Trypsin, TPCK behandelt	Sigma (Taufkirchen)

### 2.1.3 Radiochemikalien

$[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  > 5000 Ci/mmol

Die Radiochemikalien wurden vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt, und von der Firma NEN (Boston, USA) bezogen.

### 2.1.4 Liganden und Wachstumsfaktoren

Angiotensin II	Sigma (Taufkirchen)
Anisomycin	Calbiochem
Amphiregulin	R&D Systems
Bombesin	Sigma (Taufkirchen)
Bradykinin	Sigma (Taufkirchen)
Carbachol	Sigma (Taufkirchen)
EGF (Maus)	Toyoba (Japan)
Endothelin-1 (ET-1)	Calbiochem (Bad Soden)
Gastrin-Releasing Peptide	Sigma (Taufkirchen)
Heparin-binding EGF (human, HB-EGF)	Sigma (Taufkirchen)
Lysophosphatidylsäure (LPA)	Sigma (Taufkirchen)
Neuromedin B (human)	Sigma (Taufkirchen)

Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA, TPA)	Alexis (Läuflingen, Schweiz)
Thrombin	Sigma (Taufkirchen)

### 2.1.5 „Kits“ und sonstige Materialien

ECL-Kit	NEN (Boston, USA)
Filterpapier 3MM	Whatman (USA)
Glutathion Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
Hyperfilm™ MP	Amersham (Braunschweig)
Kodak X-Omat AR	Kodak (Stuttgart)
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce (USA)
Parafilm	Dynatech (Denkendorf)
Protein A Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
Protein G Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Sephadex G-50 (DNA Qualität)	Pharmacia (Freiburg)
Sterilfilter 0.22µm, Zelluloseacetat	Nalge Company (USA)
Sterilfilter 0.45µm, Zelluloseacetat	Nalge Company (USA)
„Transwell“ Zellkultureinsätze	BD Falcon (Franklin Lakes)
Zellkulturgefäße, Plastik	Greiner (Solingen)
	Nunclon (Dänemark)
	Sarstedt (Nümbrecht)
	BD Falcon (Franklin Lakes)
Zellulosenitrat (0.45 µM)	Schleicher & Schull (Dassel)

## 2.2 Medien und Puffer

### 2.2.1 Medien für *E.coli* Bakterien

LB-Medium	1.0 % Typton
	0.5 % Hefeextrakt
	1.0 % NaCl
	pH 7.2; alle w/v

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Ampicillin (100 µl/ml) zugesetzt. Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium jeweils 1.5 % (w/v) Agar beigelegt.

### 2.2.2 Zellkulturmedien

Fötales Kälberserum (FCS) wurde von der Firma Sigma (Taufkirchen), alle Zellkultur-Medien und dazu nötigen Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4.5 g/l Glukose,  
10 % FCS, 2mM Glutamin, 1mM Natriumpyruvat

F-12K Nutrient Mixture (Kaighn's Modification),  
7% FCS

Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen,  
10% FCS, 2 mM Glutamin

RPMI 1640,  
10% FCS, 2 mM Glutamin

Einfriermedium: 90% FCS, 10% DMSO

### 2.2.3 Puffer und Stammlösungen

Acrylamidlösung (30/0.8%)	30.0% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) Bisacrylamid
DNA-Auftragspuffer (6x)	0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylencyanol 30.0% Glycerin 100.0 mM EDTA pH 8.0
HNTG-Puffer	20.0 mM Hepes pH 7.5 150.0 mM NaCl 0.1% Triton X-100 10.0% Glycerin 10.0 mM Tetra-Natrium-Pyrophosphat
Laemmli-Puffer (2x)	65.0 mM Tris/HCL pH 6.8 3.0% SDS 30.0% Glycerin 0.01% Bromphenolblau 5.0% $\beta$ -Mercaptoethanol
Lyse-Puffer (Stammlösung)	50.0 mM Hepes pH 7.5 150.0 mM NaCl 1.0 mM EDTA 10.0% Glycerin 1.0% Triton X-100 10.0 mM Tetra-Natrium-Pyrophosphat
NET (10x)	500.0 mM Tris/HCl pH 8.0 50.0 mM EDTA pH 8.0 1.5 mM NaCl 0.5% Triton X-100
PBS	13.7 mM NaCl 2.7 mM KCl 80.9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1.5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4 (HCl)

SD-Transblot	50.0 mM Tris/HCl pH 7.5 40.0 mM Glycin 20.0% Methanol 0.004% SDS
TAE (10x)	400.0 mM Tris/HCl pH 7.5 50.0 mM Natriumacetat 10.0 mM EDTA pH 8.0
TE (10:0,1)	10.0 mM Tris/HCl pH 8.0 0.1 mM EDTA pH 8.0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248.0 mM Tris/HCl pH 7.5 1918.0mM Glycin 1.0% SDS

## 2.3 Zelllinien, Bakterienstämme und Antikörper

### 2.3.1 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
A431	humane Epidermoidkarzinomzellen	ATTC CRL-2592
AGS	humane Magenkrebszellen	ATTC CRL-1739
BT-20	humane Brustkarzinomzellen	ATTC HTB-19
BT-549	humane Brustdrüsenkarzinomzellen	ATTC HTB-122
BT-474	humane Brustdrüsenkarzinomzellen	ATTC HTB-20
Capan-1	humane Pankreasadenokarzinomzellen (Lebermetastase)	ATTC HTB-79
CaCo-2	humane Kolonkarzinomzellen	ATTC HTB-37
COS-7	immortalisierte Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze	ATCC CRL-1651
Du-145	humane Prostatakarzinomzellen (Gehirnmetastase)	DKFZ 610022; ATTC HTB-81
FTC133	humane follikuläre Thyroidkarinomzellen (Lymphknotenmetastase)	CAMR ECACC No. 94060901
HEK-293	embryonale Nierenfibroblasten, transformiert mit humaner adenoviraler DNA Typ 5 (Ad 5)	ATTC CRL-1573
HS 746 T	humane Magenkarzinomzellen	ATTC HTB-135
HT-29	humane Kolonkarznomzellen	ATTC HTB-38
Kato III	humane gastrische Magenkarzinomzellen	ATTC HTB-103
LNCaP clone FGC	humane Prostatakarzinomzellen	ATTC CRL-1740
MKN-28	humane Magenkarzinomzellen	Axxima Pharmaceuticals AG, (Nakatani et al., 1986)
MDA-MB-175	humane Brustdrüsenkarzinomzellen	ATTC HTB-25
MDA-MB-361	humane Brustadenokarzinomzellen (Gehirnmetastase)	ATTC HTB-27
MDA-MB 468	humane Brustadenokarzinomzellen	ATTC HTB-132

MCF7	humane Brustadenokarzinomzellen	TZB Nr.: 610030 (DKFZ); ATCC HTB-22
NIH/3T3	embryonale immortalisierte Mausfibroblasten	CRL-1658
PC3	humane Prostata-Adenokarzinomzellen (Knochenmarksmetastase) (Grad IV)	ATTC CRL-1435
PPC1	humane Prostatakarzinomzellen	(Brothman et al., 1989)
Panc-1	humane duktale, epitheliale Pankreaskarzinomzellen	ATTC CRL-1469
RF-1	humane Magenkarzinomzellen	ATTC CRL-1864
RF-48	humane Magenkarzinomzellen	ATTC CRL-1863
NCI-H-69	humane Small Cell Lung Carcinoma	ATTC HTB-119
SH-SY-5Y	humane Neuroblastomzellen (Knochenmarksmetastase)	ATTC CRL-2266
SkBr3	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-30
SKNSH	humane Neuroblastomzellen	ATTC HTB-11
STK-2	humane gastrische Karzinomzellen	Axxima Pharmaceuticals AG
T-47D	humane Brustdrüsenkarzinomzellen	HTB-133
TSU-pr1	humane Prostatakarzinomzellen	(Iizumi et al., 1987)
U1240	humane Glioblastomzellen	Sugen Pharmaceuticals, Inc.
U1242	humane Glioblastomzellen	Sugen Pharmaceuticals, Inc.
U373	humane Glioblastomzellen	Sugen Pharmaceuticals, Inc.
U373-MG	humane Glioblastom/ Astrocytomzellen (Grad III)	ATCC HTB-17

### 2.3.2 Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ F'	F'/endA1 hsd17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), supE44, recA1, gyrA (Nal), thi-1, (lacZYA-argF)	Stratagene (USA)
<i>E.coli</i> /MC1061/p3	F- <i>hsdR</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>araABC-leu</i> )7679 <i>ga/K</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>rpsL</i> <i>thi</i> <i>merB</i> [p3: amber Amp <sup>r</sup> , amber Tet <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ]	Invitrogen (San Diego)

### 2.3.3 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
4G10	Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste	Upstrate Biotechnology, Lake Placid
108-1	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen EGFR	(Lax et al., 1989)
Akt1/2	Kaninchen, polyklonal, gegen AA 345-480 des humanen Akt1	Santa Cruz, USA
AR	Goat, polyclonal/ recombinant, human AR	R&D Systems
TGF $\alpha$	Mouse, monoclonal/ recombinant, human	Oncogene, Bad Soden

EGFR	TGF $\alpha$ Schaf, polyklonal, gegen Teil der zytoplasmatischen Domäne des humanen EGFRs als Fusionsproteins	Upstrate Biotechnology (UBI), Lake Placid
ERK1 (K-23)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der Subdomäne XI der Ratten Erk1	Santa Cruz Biotech. Inc.
ERK2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem carboxyterminalen Bereich der Ratten-ERK2	Santa Cruz Biotech. Inc.
ERK5 (CT)	Kaninchen, polyklonal, gegen Fusionsprotein aus GST und humaner ERK5 aa 710 – 815	M. Buschbeck, d. AG.
ERK5 (PR1)	Kaninchen, polyklonal, gegen Fusionsprotein aus GST und humaner ERK5 aa 410 – 558	M. Buschbeck, d. AG.
FAK	Maus, monoklonal, gegen carboxyterminales Proteinfsegment der murinen FAK	Santa Cruz Biotech. Inc.
HB-EGF	Goat, polyclonal/ recombinant, human HB-EGF	R&D Systems, Wiesbaden
HA	Maus, monoklonal, gegen das Influenza Hämagglutinin-Epitop	Roche, Mannheim
SHC	Kaninchen, polyklonal, gegen die 202 carboxyterminalen AS des humanen SHC als Fusionsprotein	Babco, California, USA
SHC (S6820)	Maus, monoklonal; Clone 30, IgG1	R. Lammers, d. AG.
p-Akt/PKB	Kaninchen, polyklonal, erkennt phospho-Akt/PKB	Transduction Laboratories
p-ERK (phospho-p42/p44)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid Thr-202/Tyr-204	NEB
P-ERK5	Kaninchen, polyklonal, erkennt phospho-ERK5 (Thr218/Tyr220)	New England Biolabs
VSV	Maus, monoklonal, gegen das VSV Epitop (vesicular stomatitis virus glycoprotein VSV-G)	BioSource, Solingen
		Roche, Mannheim Boehringer, Mannheim

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

Antikörper	Verdünnung	Referenz
Ziege gegen Maus	1 : 20 000	Sigma (Taufkirchen)
Ziege gegen Kaninchen	1 : 50 000	Dianova
Kaninchen gegen Schaf	1 : 20 000	Dianova
Ziege gegen Maus F(ab') <sub>2</sub> Fragment	1 : 20 000	MoBiTec (Göttingen)

## 2.4 Plasmide

### 2.4.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
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, SV 40 Promotor	(Miller and Rosman, 1989)
pBluescript II SK+ (pBSKII+)	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> ; CMV Promotor, BGH poly A-site; hohe Kopienzahl	Stratagene (USA)

### 2.4.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektoren

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pBSKII+-GRPR	cDNA des humanen Gastrin-releasing Peptide Rezeptors in pBluescript	diese Arbeit
pBSKII+-BRS3	cDNA des humanen Bombesin Rezeptors (Bombesin-like receptor 3) in pBluescript	diese Arbeit
pcDNA3-GFP	cDNA des „green fluorescence proteins“ in pcDNA3 zur Bestimmung der Transfections-effizienz	BD Biosciences/ Clontech (USA)
pcDNA3-ET <sub>A</sub> R	cDNA des humanen ET <sub>A</sub> R in pcDNA3	C. Wallasch/ H. Daub, d. AG.
pLXSN-ET <sub>A</sub> R	cDNA des humanen ET <sub>A</sub> R in pLXSN	C. Wallasch/H. Daub, d. AG.
pcDNA3-HA-ERK2	cDNA Hämagglutinin-getaggtter ERK2 in pcDNA3	H. Daub, d. AG.
pLXSN-ESK-Timp-3-VSV	cDNA des humanen Timp-3 in pLXSN-ESK C-terminal VSV-tag	S. Hart, d. AG.

### 2.4.3 Wichtige Oligonukleotide

**GRPR:** Schnittstellen: EcoRI - XHO I:

Primer sense: 5'-3'

ACAGAATTCGCCACCATGGCTCTAAATGACTGTTTCCTTC

Primer antisense: 5'-3'

ACACTCGAGATCTAGACATACCGCTCGTGACAGA

**BRS3:** Restriktionsschnittstellen: EcoRI - XHO I:

Primer sense: 5'-3'

ACAGAATTCGCCACCATGGCTCAAAGGCAGCCTCACTCA

Primer antisense: 5'-3'

ACACTCGAGGAATCTGTCCTCTGCCTGCTTCAC

## 2.5 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen von DNA (2-10 µg) nach der Methode von (Lee and Rasheed, 1990), oder mit Hilfe des Quiagen Mini Kits (Quiagen, Hilden) präpariert.

### 2.5.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion von COS-7 und Tumor Zelllinien wurden größere und reinere DNA-Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Quiagen Maxi-Kits (Quiagen, Hilden) durchgeführt wurde.

### 2.5.3 Enzymatische Behandlung von DNA

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

Restriktionen erfolgten mit Typ II Restriktionsendonukleasen. Die Reaktionen erfolgten in den vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffern für einen Zeitraum von 1-3 h beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms.

#### 2.5.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden linearisierter Vektoren

Zur Unterdrückung der Religation von geschnittenen Vektoren mit kompatiblen Enden wurde eine Dephosphorylierung der 5'-Termini durchgeführt, um so die Effizienz der Klonierung zu erhöhen. Nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme eines 1-4 µg gespaltene Vektor-DNA enthaltenden Restriktionsansatzes wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in 1x Dephosphorylierungspuffer (M.B.I. Fermentas) und 1 µl Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (C.I.A.P.; 1 E) 30 min bei 37°C inkubiert. Die dephosphorylierte DNA wurde anschließend über ein Agarosegel (0.6-1.0% Agarose) aufgereinigt und eluiert (siehe unter 2.5.4)

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

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert bei der Ligation die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylterminus von Polynukleotiden.

20-100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5 -fachen Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragments, 1 µl 10 x T4-DNA-Ligasepuffer (0.66 M Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT und 10 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) versetzt (Gesamtvolumen 10 µl) und über Nacht bei 15°C inkubiert. Die Menge an eingesetztem DNA-Fragment richtet sich nach dessen Größe. Je kleiner das Fragment ist, desto kleiner sollte der Überschuß an Masse des Inserts sein, um eine eventuelle Dimerisierung desselben zu vermeiden. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

### **2.5.4 Gelelektrophorese von DNA**

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kbp wurden in 0.6-2.0%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen eines 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße, Agarosekonzentration und aufzutrennenden DNA-Fragmenten bei 40-80 Volt innerhalb von 1-2 Stunden. Die DNA Banden wurden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht ( $\lambda = 302$  nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters fotografiert (Polaroid 667).

### **2.5.5 Isolierung von DNA-Fragmenten**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des „QIAquick™“ Gel Extraktions Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

### **2.5.6 Transfer von DNA in *E.coli* Bakterien**

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

Es wurde die Methode von (Chung and Miller, 1993) verwendet.

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

Zur Transformation von *E.coli* wurden 100 ng Plasmid-DNA bzw. 10  $\mu$ l des entsprechenden Ligationsansatzes mit 20  $\mu$ l 5 x KCM-Puffer (500 mM KCl, 150 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM MgCl<sub>2</sub>) und 70  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> versetzt, 100  $\mu$ l kompetente, auf Eis aufgetauter Bakterien hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. bei 4°C. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur belassen, dann mit 0.8 ml LB-Medium versetzt und für 40-50 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (1 min, 6500 rpm) wurde der Überstand bis auf ca. 100  $\mu$ l abgenommen und resuspendiert. Der Reaktionsansatz wurde auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **2.5.6.3 Dauerkulturen von transformierten *E.coli* Bakterien**

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0.5 ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0.5 ml einer 87%igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.5.7 Amplifikation von DNA- und cDNA Fragmenten mit PCR (Polymerase Kettenreaktion)

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 (Annealing der Primer) an die Muster-Stränge und Synthese des komplementären Stranges ausgehend von den Hybridisierungsstellen der Primer wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis and 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 10 x LA-Taq Polymerase Puffer
- 1 µl dNTP-Mix, 10 mM (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
- 0.2 µl LA-Taq-Polymerase (5 U/ µl)
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen an H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ersetzt. Die Synthesereaktion wurde in einem „Thermal Reactor“ der Fa. Techne (Cambridge) durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wurde der folgende Temperaturzyklus verwendet:

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

X ist die Annealing Temperatur. Sie ist vom Oligomer abhängig.

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war, wurde es mit Hilfe des Quiagen „PCR Purification Kits“ nach Herstellerangaben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Anwendungen zur Verfügung.

### 2.5.8 Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse wurde der „Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit“ von ABI PRISM™ (Perkin Elmer, Weiterstadt) nach Herstellerangaben verwendet.

Der folgende Mix wurde für eine PCR-Lauf verwendet:

- 0.5 µg DNA
- 10 pmol Oligonukleotide
- 4 µL „Terminator Ready“ Reaktions Mix
- Addition von 20 µL H<sub>2</sub>O

25 Zyklen: 30 sec 94°C  
15 sec 45-60°C  
4 min 60°C

Das Sequenzierungsprodukt wurde mit NaAc/EtOH Präzipitation gereinigt in 20 µL „Template Suppression Reagent“ gelöst und für 2 min bei 90°C denaturiert. Die Auswertung der Proben erfolgte mit einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer, Weiterstadt) und den Macintosh Programmen ABI PRISM™ „310 Genetic Analyser“ Vers. 2.1.5 und „Sequencing Analyser“ Vers.3.4.1.

### **2.5.9 Sequenzvergleich**

Die ermittelten DNA-Sequenzen konnten durch algorithmische Suche in Datenbanken (NCBI-Genbank und EMBL-Genbank EBI) mit der jeweiligen Originalsequenz eines Gens unter Verwendung der Programme Bio Edit Vers.4.8.9 und Mac-DNASIS verglichen werden.

### **2.5.10 cDNA Makroarrays**

Die cDNA-Filter wurden in der Arbeitsgruppe hergestellt. Die Herstellung erfolgte durch Auftragen von pBluescript-Plasmiden, die Sequenzen von 536 Genen von speziellen Signaltransduktions-Molekülen sowie Kontrollen enthielten, auf HybondN<sup>®</sup>-Membranen mit einem Gridder (Genomic Solutions). Die Plasmide wurden dreimal in unterschiedlichen Bereichen der Membran aufgetragen, was Mehrfachbestimmungen der Expression eines Gens erlaubt und somit die Zuverlässigkeit der Daten steigert. Anschließend wurden die Filter bei 80°C in einem Vakuumofen für 2 h gebacken.

Zur Prähybridisierung wurden die Membranen in einem Hybridisierungsgefäß mit 15 ml Prähybridisierungslösung (50 ml 100x Denhardt, 250 ml 20x SSC, 100 ml 0.5 M NaPO<sub>4</sub>, pH 6.8, 10 ml 100 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 90 ml ddH<sub>2</sub>O) mit 150 µl tRNA (Roche, 10 mg/ml) in einem Hybridisierungssofen (MWG-Biotech) 16 h bei 68°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Anschließend wurden 15 ml Hybridisierungspuffer (250 ml 20x SSC, 10 ml 10%iges SDS, 740 ml ddH<sub>2</sub>O) mit 150 µl tRNA auf 70°C im Wasserbad erhitzt. Die cDNA-Sonde wurde mit einem Amersham Labelling-Kit mit <sup>33</sup>P radioaktiv markiert, gereinigt, mit COT-DNA (Invitrogen) gegen unspezifische Bindungen blockiert und anschließend 10 min. bei 100°C denaturiert. Die cDNA-Präparate der jeweiligen Krebszelllinien wurden mir freundlicherweise von Frau Tatjana Knyazeva zur Verfügung gestellt. Die Sonde wurde dann dem Hybridisierungspuffer zugesetzt und gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Temperatur der Hybridisierungslösung konstant blieb. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 68°C. Um den radioaktiven Hintergrund der Filter zu minimieren, wurden diese zweimal für 20 min. bei 42°C in 2x SSC, 0.1% SDS und anschließend zweimal in 0.2x SSC, 0.1% SDS (20 min., 42°C; 60 min., 65°C) gewaschen. Danach wurden die Filter noch dreimal kurz mit ddH<sub>2</sub>O gespült und getrocknet.

Anschließend wurden die Filter auf einer Phosphoimager-Platte exponiert, mit einem Phosphoimager (Fujifilm BAS-2500) eingelesen und die Daten mit Hilfe des Programms „Image Reader v.1.7E“ (Fuji Photo Film Co, LTD) digitalisiert. Die Intensität der Punkte auf den cDNA-Filtern wurde mit Hilfe des Programms Array Vision (Raytest, Kanada) ermittelt und die Daten in Microsoft Excel exportiert. Die Daten wurden mit einem Excel Makro (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Reimar Abraham) ausgewertet. Zuerst wurde der durchschnittliche Hintergrund (pBluescript, Kontrollgene, Wasser) ermittelt. Dieser Wert wurde von den Werten aller anderen Hybridisierungssignale abgezogen. Ergaben sich

dabei Werte kleiner Null, so wurden diese gleich Null gesetzt. Alle so ermittelten Werte eines Filters wurden summiert, um die Gesamtintensität zu ermitteln. Zum Abgleich der Gesamtintensität der einzelnen Filter untereinander wurde jeder Wert eines Filters durch die Gesamtintensität dividiert und zur leichteren Handhabung der Werte mit  $10^4$  multipliziert (normalisierter Wert). Aus den normalisierten Werten wurde anschließend der Durchschnitt der 3 Werte eines Gens und die Standardabweichung ermittelt. Diese Werte wurden dann zur Basis 2 logarithmiert. Alle Werte kleiner 0.1 wurden dabei gleich 0.1 gesetzt. Diese Werte der exprimierten Gene der jeweiligen Zelllinien wurden im Vergleich zu der Referenzzelllinie (hier PC3-Zellen) in einem Diagramm aufgetragen.

## 2.6 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

### 2.6.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen und Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO<sub>2</sub>) bei 5-7% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mit frischem Medium versorgt und stets vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in sogenanntem Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellanzahl zum Aussähen der Zellen in einer gewünschten Dichte erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer oder mit einem Zellzahl-Analysator Coulter Z1 (Beckman Coulter, Inc.).

### 2.6.2 Mykoplasmentest

Die Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen beeinflusst den Stoffwechsel der Zellen, die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, und andere Vorgänge. Sie führt so zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen.

Subkonfluente Zellen auf 6 cm Schalen wurden mit PBS gewaschen, mit Methanol fixiert, wiederum mit PBS gewaschen und für 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0.1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Nach weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.

### 2.6.3 Lipofectamine® -Lipofectine®- und Lipofectamine 2000® Trans-fektion

Das polykationische Transfektionsreagenz Lipofectamine® bildet mit DNA nicht-kovalente Wechselwirkungen und ermöglicht auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften den DNA-Transfer in Säugerzellen.

Die Transfektionsversuche mit den jeweiligen Reagenzien wurden nach den Herstellerangaben (Invitrogen, Gröningen) durchgeführt.

### **2.6.4 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Bei dem Test wurden Säugerzellen mit einem pcDNA3-GFP (Green Fluorescence Protein) Expressionsplasmids wie unter 2.6.3 transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm betrachtet und der prozentuale Anteil der GFP-exprimierenden Zellen bestimmt.

## **2.7 Proteinanalytische Methoden**

### **2.7.1 Stimulation und Triton X-100 Lyse von Zellen**

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen 24 bis 48 h in Serum-freiem Medium gehungert und anschließend nach Bedarf mit Inhibitoren bzw. Liganden behandelt.

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 (siehe Tabelle) Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 20 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM EDTA pH 8.0 und 1% Triton X-100), lysiert. Dem Lysepuffer vor der Verwendung wurden frisch zugegeben: 10.0 µg/ml Aprotinin, 1.0 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 10.0 mM Natriumfluorid, 2.0 mM Natrium-orthovanadat (pH 10.0). Nach 5 bis 10 min Lyse auf Eis wurde das Zellysats 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 Gesamtzellysats weiterverarbeitet.

### **2.7.2 Proteinbestimmung**

Zur Proteinbestimmung wurde der "Micro BCA Protein Assay Kit" (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört, wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt und in einem Elisa-Reader (Dynatech MR5000) gemessen. Als Kalibrierungskurve wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-1200 µg Protein/ml) eingesetzt.

### **2.7.3 Immunpräzipitation von Proteinen**

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus dem Zellysats 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 aus

Antikörper und Protein erleichtert (Chenais et al., 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30-35 µl Protein A-Sepharose (50%ige Suspension in HNTG) und 1-5 µg monoklonaler Antikörper oder polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer verdünnten Zellysaten gegeben und für mind. 4 Stunden oder über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Sepharose wurde bei 6000 rpm sedimentiert und der Überstand vorsichtig mit einer Kanüle an einer Motorpumpe abgezogen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden für 5 min bei 100°C aufgekocht, kurz abzentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen.

#### 2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Polyacrylamidgele ermöglichen die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, die nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung abhängt und so ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird. Es wurden stets vertikale Gelapparaturen (Atto Cooperation, Japan) verwendet. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15%ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Über die Trenngele wurde im Anschluß ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von (Sambrook, 1990) beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Gele auf Nitrozellulose transferiert (siehe 2.7.5). Als Molekulargewichtsstandard (Biorad) bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

<i>Protein</i>	<i>MG [kD]</i>	<i>Protein</i>	<i>MG [kD]</i>
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

#### 2.7.5 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Die Proteine wurden zur Immundetektion nach Auftrennung durch die SDS-PAGE auf Nitrozellulose transferiert (Gershoni and Palade, 1982; Gershoni and Palade, 1983). Der Transfer erfolgte im sogenannten „Semi-Dry“-Verfahren bei 0.8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 3½ Stunden mit einer dementsprechenden Blottaperatur. Nach dem erfolgten Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden diese mit Ponceau S (2 g/l in 2% (w/v) Trichloressigsäure) angefärbt, die Banden des Proteinmarkers markiert. und die Membran mit NET-Gelatine (0.25% Gelatine in 1 x NET) entfärbt.

### **2.7.6 Immundetektion von Proteinen (Immunoblotanalyse)**

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 spezifische sog. primäre Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch sog. sekundäre Antikörper erkannt werden, die an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-System“ (enhanced chemiluminescence) der Firma NEN™.

Zur Detektion der Proteine in der Western Blot Analyse 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. Um die Haltbarkeit der Blotantikörperlösungen zu erhöhen wurde Natriumazid (1:5000) hinzugegeben. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für mindestens eine Stunde mit NET-Gelatine inkubiert. Der Filter wurde über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach viermal 15 min mit NET-Gelatine gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (siehe 2.3.3) in NET-Gelatine inkubiert. Vor der Detektion mit dem ECL-Reagenz (NEN™) wurde der Blot schließlich drei- bis viermal für 15 min mit NET-Gelatine gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter für 1 min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert, anschließend 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 „Strip“-Lösung (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 100 mM β-Mercaptoethanol und 2% SDS) bei 50°C für 1 h entfernt werden. Danach muß das β-Mercaptoethanol durch intensives Waschen mit NET-Gelatine mindestens 4 h vollständig entfernt werden, bevor ein weiterer primärer Antikörper mit der Membran inkubiert werden kann.

## **2.8 Zellbiochemische und –biologische Untersuchungen**

### **2.8.1 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 Serum-freien Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse (2.7.1) wurden die Zellen für 3 bis 10 min mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Liganden G Protein-gekoppelter Rezeptoren stimuliert. Wurden die Auswirkungen von Inhibitoren verschiedener Proteine auf die Tyrosinphosphorylierung zu untersuchender Proteine getestet, so wurden die Zellen vor der Stimulation mit den Antagonisten oder den entsprechenden Kontrollsubstanzen für 20 min vorbehandelt. Nach der Zellyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation (2.7.3) isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.7.4) aufgetrennt und der Phosphorylierungszustand mit Hilfe eines Phosphotyrosin (αPY)-spezifischen Antikörpers im Immunoblot (2.7.6) analysiert.

### **2.8.2 Quantifizierung von Immunoblots mit einer CCD-Kamera**

Mit Hilfe einer digitalen CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000) konnten die Westernblotts quantitativ ausgewertet werden. Dazu wurde der Immunoblott wie in 2.7.6 beschrieben durchgeführt, die ECL-Chemilumineszenz mit der Kamera fotografiert und anschließend mit dem Macintosh Programm „Science Lab 99 Image Gauge v.3.3“ (Fuji Photo Film Co, LTD) quantifiziert.

### **2.8.3 In vitro Kinase-Assay zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der MAP Kinase (Erk2)**

Endogene MAP Kinase ERK2 wurden aus 6- oder 12-Loch-Schalen immunpräzipitiert. Die Sepharose mit den Präzipitaten wurden 3 x mit je 250 µl HNTG-Puffer und einmal mit 400 µl Äquilibrationpuffer für die Kinasereaktion (20 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 µM Orthovanadat) gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Immunpräzipitaten je 30 µl Reaktionspuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM Orthovanadat, 5 mM *p*-Nitrophenylphosphat (PNPP, Phosphatasesubstrat), 0.5 mg/ml MBP und 50 µM ATP) mit 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP gegeben und 10 min bei Raumtemperatur in einem Schüttler inkubiert. Die aktivierte, an die feste Phase gebundene MAP Kinase phosphoryliert nun proportional zu ihrer Kinaseaktivität das künstliche Substrat MBP (myelin basic protein) unter Verwendung der [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-Phosphatgruppe.

Mit je 30 µl 2 x Laemmli-Puffer wurde die Kinasereaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Lauffront des Gels wurde abgetrennt, um eine radioaktive Kontamination der Blotapparatur durch nicht umgesetzte Nukleotide zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine Färbung der Membran mit Ponceau S. Die untere Hälfte der Membran, auf der sich das MAP Kinasesubstrat MBP (22 kDa) befand, wurde getrocknet und auf Röntgenfilm exponiert bzw. mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet. Die obere Membranhälfte wurde wie unter 2.7.6 beschrieben auf Expression der MAP Kinase (42 kDa) hin analysiert.

### **2.8.4 „Wound healing“ Test**

Der Assay wurde mit einigen Modifikationen wie in (Fishman et al., 2001) beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden auf 6-Loch-Schalen mit je 500 000 Zellen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden in den Zellrasen mit Hilfe einer 1ml Pipettenspitze in mehrere gerade gleichmäßige Bahnen gekratzt, vorsichtig mit Medium (0% FCS) gewaschen und mit serumfreiem Medium bedeckt. Die Zellen wurden entweder mit DMSO oder einem Inhibitor 20 min vorinkubiert und danach mit den Liganden stimuliert. Den Zellen wurde bei 37°C 24h lang erlaubt in den freigelegten Bereich zu wandern. Mit Hilfe eines Axiovert S100 Mikroskops der Firma Zeiss und der Software OpenLab 2.1 wurden von jedem „Scratch“ 8-11 repräsentative Bilder mit gleicher Größe des Ausschnitts aufgenommen. Zur Auszählung wurde bei jedem Photo mit Hilfe des Computerprogramms „Corel Photo Paint“ ein und derselben Rahmen über den „Wundbereich“ gelegt, per Handauszählung die in die „Wunde“ gewanderten Zellen ermittelt und bei jeder Probe Mittelwert gebildet.

### 2.8.5 Invasions Assay

Mit dem Invasionsassay wird die Fähigkeit von Zellen bewertet in andere Zellgewebe einzuwandern. Es wurde ein modifizierter Boyden Chamber Assay verwendet (Albini et al., 1995; Sieuwerts et al., 1997).

Dazu werden die Polykarbonatfilter der Transwell-Zellkultur-Einsätze mit 8.0 µm Porengröße (BD Falcon) mit je 50µg Matrigel gelöst in 100 µl Wasser beschichtet, über Nacht getrocknet, mit Medium 3h rehydriert und die jeweiligen Zellen mit  $1 \times 10^5$  Stück in 250 µl Medium darauf ausgesät. Die untere Kammer wurde mit 750 µl Medium, das 10 µg/ml Fibronectin als „Chemoattractant“ enthält, gefüllt. Gleichzeitig mit dem Aussäen der Zellen werden die jeweiligen Stimuli mit DMSO bzw. den Inhibitoren sowohl in den unteren als auch in den oberen Bereich der Transwell-Schalen gegeben. Nach 24h im Inkubator bei 7% CO<sub>2</sub>, 37°C werden die Zellen an der Oberfläche des Transwell-Membraneinsatzes mit einem Wattestäbchen entfernt und die Zellen, die zur Unterseite der Membran migrierten, mit Methanol fixiert, wahlweise mit einer frisch erstellten Lösung aus 0,1% Kristallviolett, in 0.1 M Borate (pH 9.0) und 2% Ethanol (Aprikian et al., 1997) oder Kristallviolett in 10%iger Essigsäure gefärbt und vorsichtig mit Wasser gewaschen. Die blaugefärbten Zellen wurden mit je 50 µl 10%iger Essigsäure 10 min lang gelöst, die Lösung durch Zentrifugieren in ein Eppendorf Gefäß quantitativ übergeführt und photometrisch bei 570 nm quantitativ bestimmt.

## 2.9 Statistische Analyse

Der Student's *t*-test wurde benutzt, um die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu beweisen. Die Werte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung (StD. standard deviation) von mindestens drei Proben dargestellt.

Der Test wurde mit folgenden Parametern in Microsoft Excel eingegeben: Seiten: 2 (zweiseitiger Test); Typ: 3 (ungleiche Varianz; heteroskedastisch).

$P < 0.05$  wurde als statistisch signifikant bezeichnet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Transaktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch Neuropeptide: die „Neuro-Psycho-Onko“-Verbindung

Der gastrointestinale Trakt ist das größte Organ im menschlichen Körper und sekretiert mehr als 20 verschiedene Peptidhormone (Hameed et al., 2009). Viele dieser Signalpeptide sind in Zellen des Magen-Darms-Trakts und in Zellen des Gehirns gleichermaßen vorhanden und wirksam. Diese „gut-brain axis“ ist vor allem bei der Regulation des Glucose Mechanismus, Appetit, Sättigung, Nahrungsaufnahme, Fettmetabolismus und Insulinsekretion von großer Bedeutung (Konturek et al., 2004; Romijn et al., 2008) und stellt eine Verbindung zwischen Endokrinologie und Neuroendokrinologie her (Track, 1983). Drüsen im Gehirn, wie der Hypothalamus, produzieren ebenfalls Hormone, Neuropeptide und Neuromodulatoren und empfangen Signale über den Ernährungszustand. Eine Fehlregulation kann zu Adipositas und Diabetes mellitus führen. Weiterhin existiert eine sog. Hypothalamus-Pancreas Achse, in der autonome Nerven die Freisetzung von Glukagon und Insulin modulieren und so direkt in den Glucose-Metabolismus eingreifen (Heijboer et al., 2006). Neuropeptide können darüber hinaus auch Tumorwachstum durch autokrines und parakrines Wirken beschleunigen (Marinissen and Gutkind, 2001; Wasilenko et al., 1997).

Neuropeptide sind Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRn) und sind somit potentielle Kandidaten für Aktivatoren des Signalwegs der Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR).

Die GPCR-induzierte EGFR Signal-Transaktivierung koppelt eine G-Protein Aktivierung mit dem Ras-MAPK-Signalweg in untransformierten Zelllinien, wie COS-7, HEK-293, Rat-1 Fibroblasten und vaskulären, glatten Muskelzellen (Gschwind et al., 2001; Leserer et al., 2000). Die Signaltransduktion durch GPCRn und Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) regelt essentielle zelluläre Prozesse. Ihre Fehlregulation ist häufig mit Tumorgenese *in vitro* und *in vivo* verbunden.

Der GPCR-EGFR “Crosstalk” verläuft über einen “triple membrane passing signalling” (TMPS) Mechanismus (Leserer et al., 2000; Prenzel et al., 1999) und konnte mittlerweile auch in Tumorzelllinien, wie z.B. PC3 Zellen (Prenzel et al., 1999), HNSCC Zellen (Gschwind et al., 2002), ACHN Nieren- und TccSup Blasenkarzinomzellen (Schäfer et al.,

2004b) und Brustkrebszellen (Hart et al., 2005), als wichtiger Signalweg für Zellwachstum und Zellwanderung nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit soll die GPCR-vermittelte EGFR Transaktivierung mit Untersuchung der Beteiligung von Metalloproteasen in weiteren Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurden in den folgenden Experimenten weitgehend die Metalloproteaseinhibitoren Batimastat oder Marimastat eingesetzt, um zu bestätigen, daß die verwendeten Zelllinien funktionsfähige Transaktivierungs-Modellsysteme darstellen. Auf diese Inhibitoren wird später in Kapitel 3.2 näher eingegangen.

Zudem ist noch wenig über die Rolle der EGFR Transaktivierung in der Pathophysiologie von Tumorzellen bekannt. Deswegen wurden eine größere Anzahl Tumorzelllinien auf das Verhalten des EGFRs in Gegenwart von wichtigen GPCR-Agonisten und Neurotransmittern hin untersucht.

### ***3.1.1 LPA, ET-1 und Bombesin-ähnliche Liganden induzieren EGFR Transaktivierung in verschiedenen Prostatakarzinomzellen***

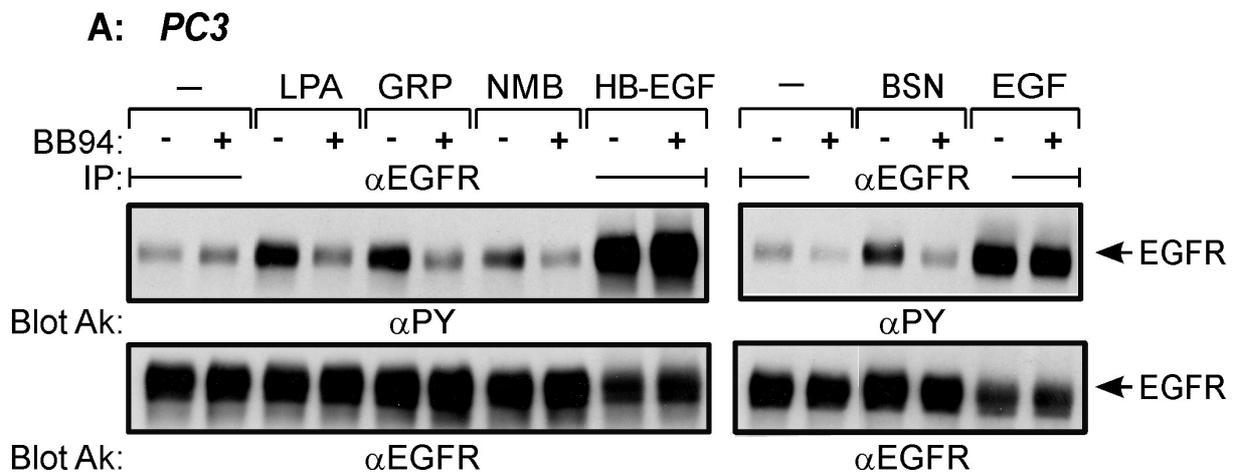
Prostatakrebs ist einer der unter Männern am häufigsten vorkommenden bösartigen Tumoren. Während der Tumorprogression benötigen einige malignen Prostatazellen für ihr Wachstum und Überleben eine reduzierte Androgenabhängigkeit. Dieses Phänomen rührt teilweise von anormalen Signalen her, die in Tumorzellen durch eine Reihe autokriner und parakriner Botenstoffen, wie traditionelle Wachstumsfaktoren, aber eben auch von Neurotransmittern und Neuropeptiden induziert werden (Wasilenko et al., 1997). Frühere Arbeiten zeigten, daß in Zellen verschiedener fortgeschrittener Prostatakarzinomen unter anderem Bombesin, GRP, LPA, Thrombin, Endothelin, und Bradykinin die Konzentration von intrazellulärem, freiem Kalzium  $[Ca^{2+}]_i$  erhöhten und somit Kalzium-sensitive, zelluläre Prozesse zur Tumorprogression in Prostatakrebs beitragen könnten (Wasilenko et al., 1997).

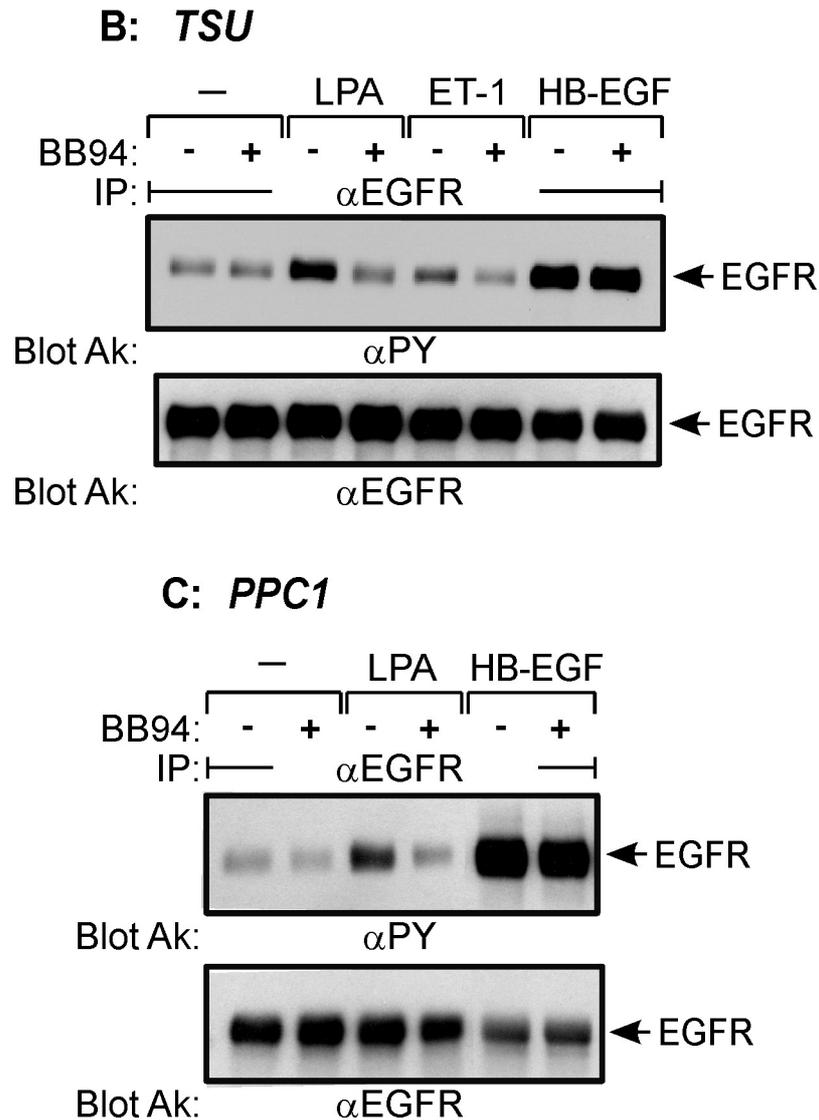
Um die pathophysiologische Relevanz des EGFR Transaktivierungsmechanismus aufzuzeigen, wurden zunächst verschiedene Prostatakarzinomzelllinien, die als Modellsysteme in Frage kommen, hinsichtlich ihrer EGFR Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation der Zellen mit G-Protein Liganden untersucht. Dazu wurden die Zellen für 24h durch Serumentzug „gehungert“ und mit diversen GPCR Liganden stimuliert. Abb. 8 zeigt Westernblotanalysen des EGFR-Phosphorylierungsgrades in Abhängigkeit der G-Protein Stimuli. Es kann ersehen werden, daß die Liganden durchaus unterschiedliche Wirkung auf

den Phosphotyrosingehalt des EGFRs haben. Die durchgeführten Experimente in PC3-, TSU- und PPC1 Prostatakarzinomzelllinien zeigen, daß, bei vergleichbaren, physiologischen Ligandenkonzentrationen, Gastrin Releasing Peptide (GRP), Lysophosphatidylsäure (LPA) und Bombesin (BSN) einen höheren Phosphorylierungsgrad des transaktivierten EGFRs zeigen als Neuromedin B (NMB) und Endothelin (ET-1). Diese Liganden werden auch in den weiteren Experimenten Verwendung finden.

Durch Präinkubation der Zellen mit dem Metalloproteaseinhibitor Batimastat (BB94) konnte in allen Fällen der Tyrosinphosphorylierungsgehalt des EGFRs signifikant herabgesetzt werden. Damit wurde die Involvierung von Metalloproteasen in dem G-Protein-vermittelten EGFR Transaktivierungs-Signalweg in den untersuchten Prostatatumorzelllinien bewiesen. Als Positivkontrolle wurde die direkte Stimulation des EGFRs durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) oder „Heparin-binding“ EGF (HB-EGF) herangezogen.

In PC3 Zellen konnte durch LPA-, GRP-, Bombesin- und Neuromedin B-Stimulation ein klarer Transaktivierungseffekt gezeigt werden. In TSU Zellen war dies mit LPA und Endothelin möglich. Ferner sprach die Zelllinie PPC1 nur auf eine LPA-Stimulation an.





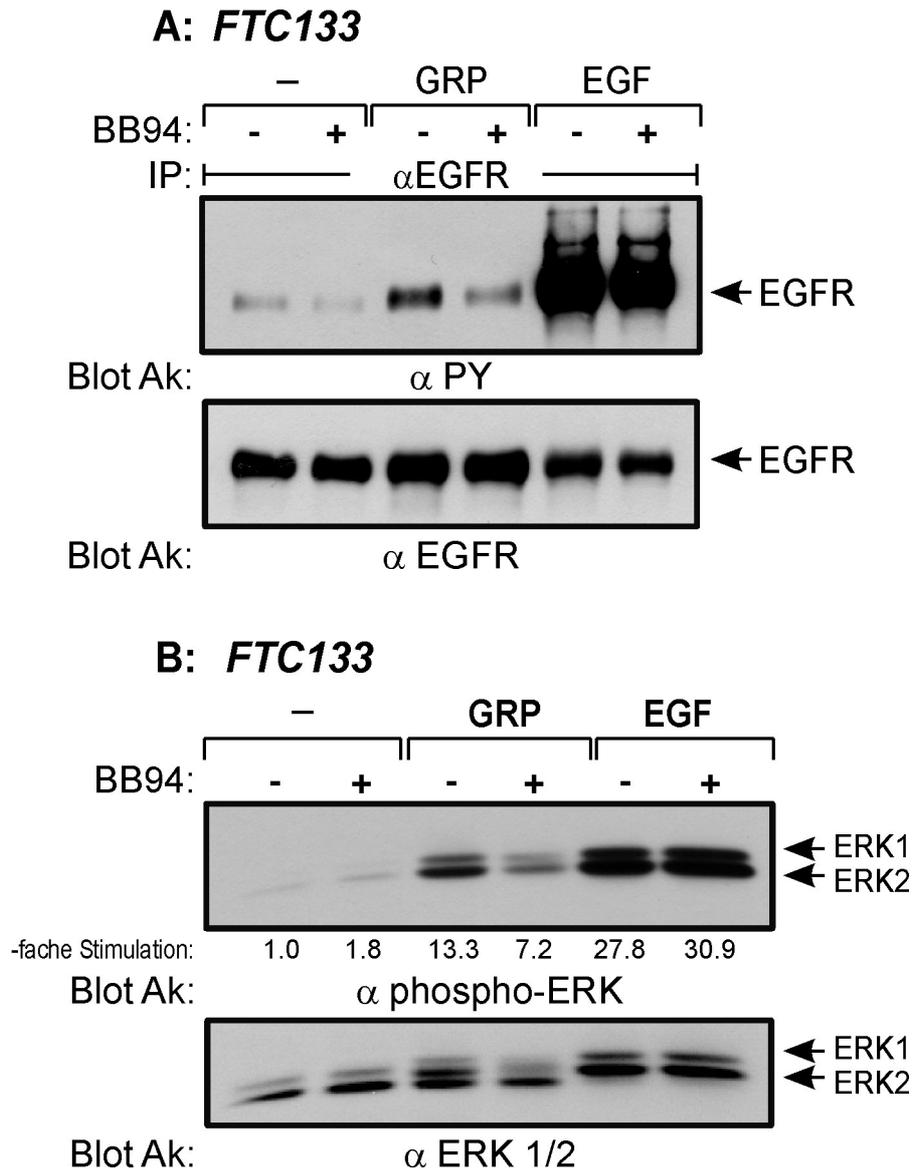
**Abb. 8: EGFR Transaktivierung in diversen Prostatatumor Zelllinien:**

(A) PC3-, (B) TSU- bzw. (C) PPC1 Prostatakarzinomzellen wurde für 24h das Serum entzogen, mit Batimastat (BB94, 10  $\mu$ M) (+) oder DMSO (-) für 20 min vorinkubiert und mit den angegebenen Liganden für 3 min stimuliert: Lysophosphatidylsäure (LPA, 5  $\mu$ M), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 200 nM), Neuromedin B (NMB, 450 nM), Bombesin (BSN, 200 nM), Endothelin-1 (ET-1, 200 nM), EGF (10 ng/ml) oder Heparin-binding EGF (HB-EGF, 10 ng/ml) und daraufhin lysiert. Anschließend wurde Protein des endogenen EGFRs mit monoklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR, 108.1) immunpräzipitiert und die Proteine mittels 7,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran erfolgte eine Immunoblotanalyse mit monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern 4G10 ( $\alpha$ PY, *oberes Panel*). Nach dem Entfernen des  $\alpha$ PY-Antikörpers wurde mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR, UBI) der bekanntlich PY-sensitiv ist, immundetektiert (*unteres Panel*).

### **3.1.2 Gastrin Releasing Peptide transaktiviert den EGFR in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen**

Die Metastasierung ist eine der pathophysiologischen Erscheinungen, bei der Metalloproteasen eine entscheidende Rolle spielen. Hierbei wandern die Tumorzellen durch die Gefäße und gelangen über die Blutbahn in andere Organe. Die TSU und PC3 Zellen leiten sich von menschlichen Knochenmarksmetastasen, deren Ursprung aber Prostata Tumoren sind, ab. Das Knochenmark ist ebenfalls ein prinzipielles Ziel der Metastasierung von Schilddrüsenkarzinomzellen. So sollen hier FTC-133 als Vertreter eines Schilddrüsenkarzinoms (allerdings in diesem Falle gewonnen aus Gewebeproben einer Lymphknotenmetastase) als Vergleichszelllinie herangezogen werden, um zu untersuchen, ob Neurotransmitter in der Lage sind, den EGFR und damit weitere mitogene Signale unter Beteiligung von Metalloproteasen in diesen Zellen zu aktivieren.

Es wurde weiterhin nachgeprüft, ob sich das Verhalten der FTC-133 Thyroidkarzinomzellen nach GPCR-Stimulierung vergleichbar mit dem der Prostata Tumorzellen darstellt. Es konnte gezeigt werden, daß diese Zellen auf dieselben Stimuli reagieren, wie PC3 Zellen, nämlich auf GRP (Abb. 9a), LPA (Abb. 10 und Abb. 31), NMB, BSN (Abb. 10), Endothelin (Abb. 20 sowie Abb. 26) und Neurotensin (*Daten nicht gezeigt*; siehe Tabelle 4). Damit kann die Bedeutung der Bombesin-ähnlichen Neuropeptide an der Beteiligung an der GPCR-vermittelten Transaktivierung des EGFRs auch auf die FTC-133 Tumorzellen der Schilddrüse ausgedehnt werden.



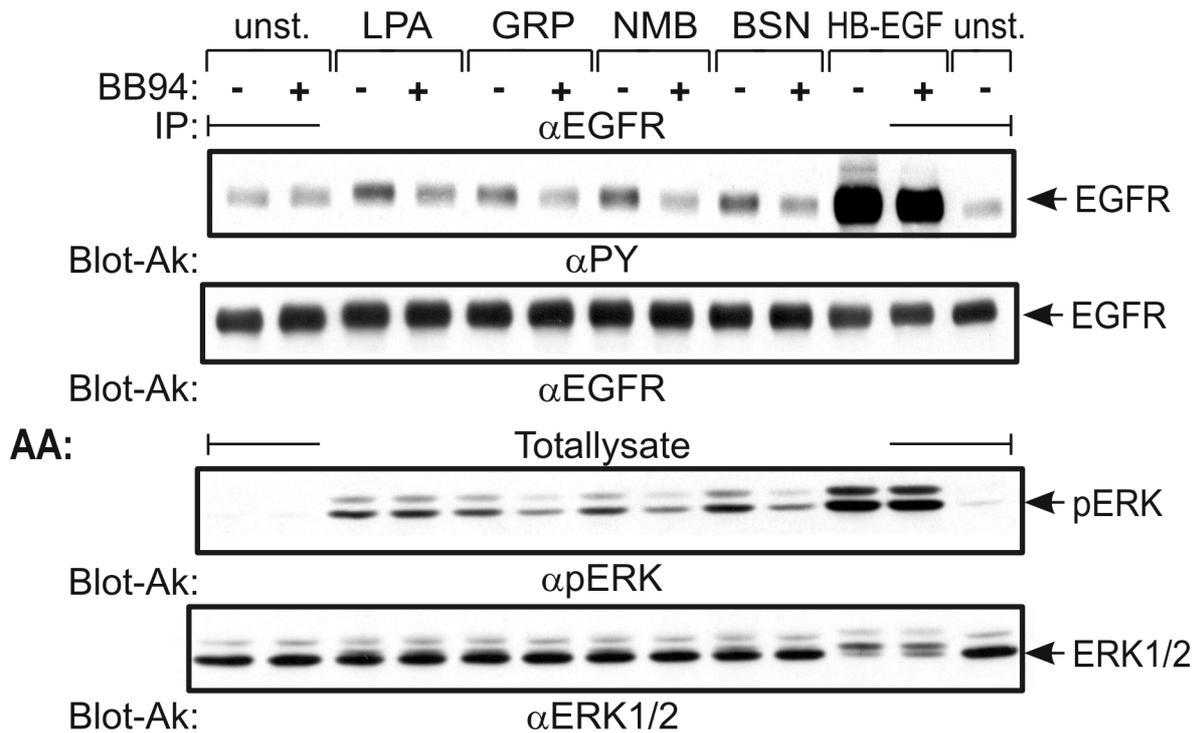
**Abb. 9: EGFR Transaktivierung und MAP Kinase Aktivierung in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen:**

(A) FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen (je 1,5 M Zellen in 10cm Schalen) wurden für 24h Serum-gehungert, mit 10  $\mu$ M Batimastat (BB94) (+) oder DMSO (-) für 20 min präinkubiert und mit den angegebenen Liganden für 3-5 min stimuliert: Gastrin Releasing Peptide (GRP, 200 nM) und EGF (3 ng/ml). Anschließend wurden die Zellen lysiert, der endogene EGFR mit monoklonale Anti-EGFR-Antikörper 108.1 immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5%-iger SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und gegen monoklonale Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) immundetektet. Danach erfolgte zur Kontrolle nach Ablösen des PY-Antikörpers eine Immunoblotanalyse mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR).

(B) Totallysate wurden gegen Phospho-Erk1/2 sensitive Antikörper geblottet und anschließend der Phosphorylierungsgrad durch die Lichtreaktion des ECLs mit Hilfe einer digitalen CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000) gemessen und wie in 2.8.2 beschrieben quantifiziert. Nach Ablösen des Anti-Phospho-Erk1/2-Antikörpers erfolgte eine Westernprobe gegen polyklonale ERK1-Antikörper (K 23).

Die weitergehenden, durch GRP angeregten, „Downstream“-Signaltransduktionwege wurden anhand der Aktivierung der MAP Kinasen (MAPK<sub>n</sub>) ERK1/2 untersucht. GRP induziert bereits nach 5 min eine rapide, deutliche Phosphorylierung der detektierten ERKs um ein Vielfaches des basalen Wertes (Abb. 9B). Sehr schön ist bei diesem Experiment im Reblot zu erkennen, daß der ERK1/2 Shift bei den GRP-stimulierten Proben nicht so ausgeprägt ist, wie bei den EGF-stimulierten Kontrollproben, was durch die indirekte Aktivierung durch den GPCR Liganden zu erklären ist (Abb. 9B, *unterer Röntgenfilm*).

Des weiteren läßt sich in diesen Zellen mittels Batimastat-Vorbehandlung eine Differenzierung in der Aktivierung verschiedener Signalwege an Hand der Betrachtung des Phosphorylierungsgrades von EGFR und MAPK nach GPCR-Stimulation aufzeigen. Batimastat ist in der Lage die Transaktivierung des EGFRs aller betrachteten GPCR-Stimuli auf basales Phosphorylierungsniveau zu senken (Abb. 10A). Jedoch die G<sub>i</sub>-gekoppelte (siehe 1.2.1), LPA-induzierte MAPK-Stimulation weist keine signifikante Abhängigkeit von Metalloproteasen auf, was bedeuten könnte, daß, trotz des Metalloprotease-abhängigen Transaktivierungsweges, das Downstreamsignal zusätzlich über EGFR unabhängige Signaltransduktionswege verläuft (Abb. 10AA). Die G<sub>q</sub>-gekoppelte GRP-, NMB- und Bombesin-Aktivierung der MAPK läßt sich mit dem Metalloproteaseinhibitor zwar verringern, jedoch nicht komplett ausschalten. Damit kann gezeigt werden, daß das „Downstream“-Signal nicht ausschließlich über den EGFR und Metalloproteasen verläuft, sondern, daß auch hierbei weitere, parallel verlaufende Wege involviert sind. Endothelin-1 (ET-1) bewirkt ebenfalls eine Transaktivierung des EGFRs in FTC-133 Zellen (*Daten nicht gezeigt*). Die ET-1-induzierte ERK1/2-Stimulation ist ebenfalls Batimastat sensitiv, wie später in Abb. 26 gezeigt wird.

**A: FTC133:****Abb. 10: EGFR- und MAP Kinase Aktivierung in FTC-133 Zellen**

(A und AA): Serum-gehungerte (24h) FTC-133 Zellen wurden in 10 cm Schalen zur Kontrolle mit Batimastat (BB94, 10  $\mu$ M) oder Tyrphostin (AG1478, 250 nM) vorbehandelt und anschließend für 5 min mit LPA (2,5  $\mu$ M), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 100 nM), Neuromedin B (NMB, 450 nM), Bombesin (BSN, 200 nM) oder Heparin-binding EGF (HB-EGF, 5 ng/ml) stimuliert.

(A):EGFR Proteine wurden nach der Zellyse mit monoklonalen Antikörpern immunpräzipitiert und mit Phosphotyrosin-Antikörpern ( $\alpha$ PY) immunogelblottet, gefolgt von einem Immunoblot mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR).

(AA): Phosphorylierte ERK1/2 wurde durch Immundetektion von Totallysaten mit Phospho-ERK-Antikörpern sichtbar gemacht ( $\alpha$ pERK). Die Gegenprobe erfolgte mit polyklonalen ERK1-Antikörper (K 23).

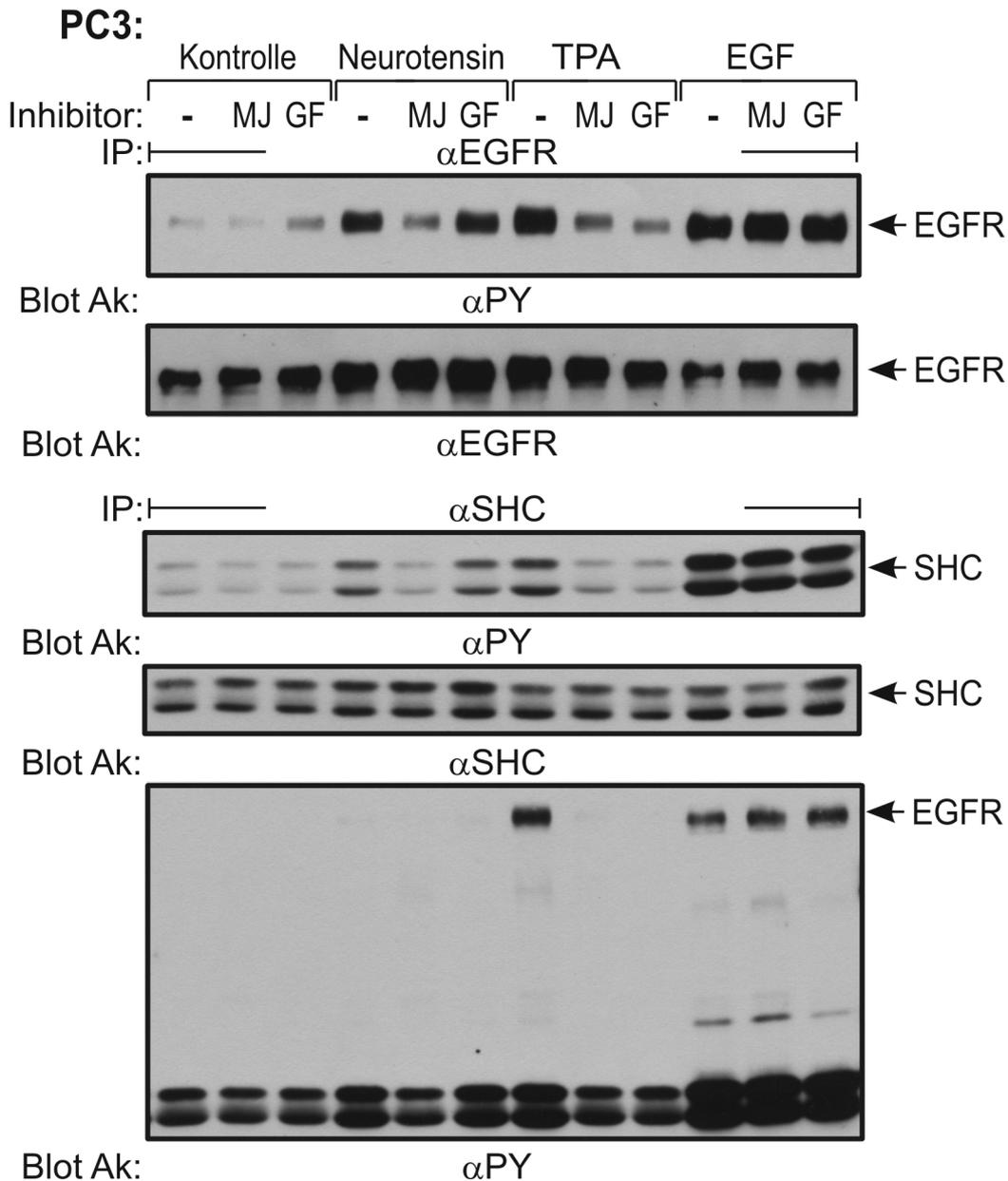
### 3.1.3 Weitere Neuropeptide als Aktivatoren des EGFR Signalweges in Prostatakrebszellen

Das Neuropeptid Neurotensin (NT) besitzt Hormon-Funktion im Magen-Darm-Trakt und eine Neurotransmitter-Funktion im Gehirn. Es ist bekannt, daß NT in Androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzellen das Zellwachstum und das Überleben der Zellen fördert (Seethalakshmi et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch Neurotensin der Phosphotyrosingehalt des endogenen EGFRs von PC3 Prostatakrebszellen in beträchtlichem Maße via GPCR-vermittelter Transaktivierung erhöht wird.

Die Serin/Threoninkinase PKC (Proteinkinase C) ist in einigen Zellsystemen ein Vermittler der EGFR Transaktivierung (Grosse et al., 2000; Soltoff, 1998; Tsai et al., 1997). So sollte in dieser Arbeit auch deren Beteiligung am Neuropeptid-stimulierten Signalweg der EGFR Signaltransaktivierung in Prostatakarzinomzellen untersucht werden. Dazu wurde die PKC-Aktivität durch den Inhibitor GF109203X selektiv ausgeschaltet. Als Kontrollstimulation zur direkten Aktivierung von PKCs wurde der Phorbolster TPA verwandt. Es konnte gezeigt werden, daß sich in diesen Zellen die GPCR-induzierte Transaktivierung des EGFRs und des Adapterproteins SHC auf einem PKC-unabhängigen Weg darstellt, da der Inhibitor zwar die EGFR-Tyrosinphosphorylierung der TPA-stimulierten Probe fast auf basales Niveau senkt, jedoch auf die der Neutensin stimulierten Zellen keinen Einfluß nimmt (Abb. 11).

Auf die PKC Unabhängigkeit der Transaktivierung in PC3 Zellen wird nachfolgend in 3.8.1 genauer eingegangen.

In der TPA-stimulierten Kontrollprobe konnten EGFR-Proteine, die an den aktivierten SHC-Molekülen als Komplex anhaften, mit Hilfe des SHC-Antikörpers co-präzipitiert werden, was in stark abgeschwächter Form auch in der Neutensin-stimulierten Probe zu erkennen ist. Dies ist als Nachweis zu sehen, daß die EGFR-SHC-Signalkette in diesen Zellen funktionell in Takt ist.



**Abb. 11: Neurotensin-vermittelte Transaktivierung des EGFR in PC3-Zellen ist Metalloprotease- aber nicht PKC-abhängig.**

PC3 Prostatakarzinomzellen wurden für 24h in serumfreiem Medium gehalten, anschließend mit dem Metalloproteaseinhibitor Marimastat BB2516 (MJ, 10  $\mu$ M) respektive dem PKC-Inhibitor GF109203X (GF, 1  $\mu$ M) für 20 min. vorinkubiert und danach mit den beschriebenen Liganden behandelt: Neurotensin (NT, 50 nM, 5 min), TPA (1  $\mu$ M, 10 min) und EGF (6 ng/ml, 5 min). Die Zellen wurden daraufhin lysiert.

αEGFR IP: Immunpräzipitation gegen monoklonale EGFR-Antikörper (108.1) und anschließender Westernblot gegen PY-Antikörper. Nach Ablösen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde derselben Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper (1005) immundetektiert (αEGFR).

Mittlere Abb.: Die SHC-Isoformen wurden mit polyklonalen SHC-Antikörpern (αSHC) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der anschließende Westernblot erfolgte mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY). Nach Ablösen dieses Primärantikörpers erfolgte ein SHC-Immunoblot gegen monoklonale SHC-Antikörper (αSHC)

αSHC IP: Längere Belichtung des mittleren Filters (SHC-IP und PY-Blot) wodurch die mit dem SHC-Protein co-präzipitierenden phosphorylierten EGFR-Moleküle sichtbar werden.

### 3.1.4 Analyse weiterer Tumortypen: Charakterisierung von Magen- und Pankreastumorzellen in Hinsicht auf Gastrin- und LPA Antworten

Das Peptid Hormon Gastrin ist in Magen- und Pankreastumoren als Wachstumsfaktor bekannt. Es konnte jedoch in dieser Arbeit keine Tyrosinphosphorylierung des EGFRs nach Gastrin Stimulation in Zellkultur der getesteten Krebszelllinien detektiert werden. Bei den meisten Zellen lag auch nach Serumentzug noch eine sehr hohe basale EGFR Tyrosinphosphorylierung vor, so daß dadurch keine EGFR Transaktivierung nachzuweisen war.

Tabelle 2 zeigt einen „Screen“ von Westernblot Experimenten, die hier allerdings nur tabellarisch aufgezeigt werden sollen:

Zelllinie	Gewebe	EGFR Transaktivierung	„Downstream“ Antworten
HS 746 T	Magentumor	nicht detektierbar <sup>1)</sup>	nicht ermittelt
Kato III	Magentumor	nicht detektierbar <sup>1)</sup>	nicht ermittelt
STK-2	Magentumor	nicht detektierbar <sup>1)</sup>	MAPK Aktivierung durch LPA, Bradykinin, Carbachol
AGS	Magentumor	LPA, TPA <sup>2)</sup>	MAPK Aktivierung durch LPA
MKN-28	Magentumor	schwache EGFR-Aktivierung durch LPA und Bradykinin <sup>2)</sup>	MAPK Aktivierung durch Gastrin, LPA, Bradykinin und Bombesin
Capan-1	Pancreastumor	nicht detektierbar <sup>1)</sup>	Keine MAPK Aktivierung durch GRP/Bombesin

**Tabelle 2: EGFR Transaktivierungsscreen in Magen- und Pankreastumorzellen:**

Die genannten Zellen wurden nach Serumentzug mit Gastrin (200nM), Bombesin (200 nM), GRP (100nM), Bradykinin (1 µM), Carbachol (1 mM) oder LPA (5 µM) jeweils für 5 min. stimuliert, lysiert und gegen EGFR-Antikörper (108.1) immunpräzipitiert. Der anschließende Westernblot wurde gegen PY-Antikörper geblottet. Zusätzlich wurden, um eine etwaige Downstream-Stimulation zu detektieren, Totallysate gegen phospho-Erk-Antikörper geblottet.

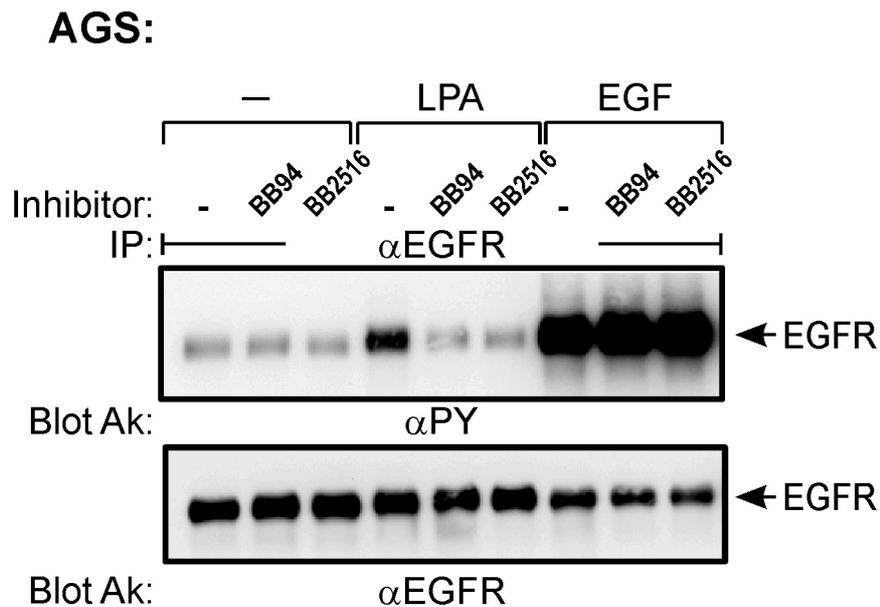
<sup>1)</sup> sehr hohe basale EGFR Tyrosinphosphorylierung nach Serumentzug

<sup>2)</sup> niedrige basale EGFR Tyrosinphosphorylierung nach Serumentzug

Allerdings konnte in STK-2 und MKN-28 Magentumorzellen eine Aktivierung der MAPK nach Gastrin- bzw. LPA-Behandlung sichtbar gemacht werden, was zumindest eine Downstream-Antwort auf Gastrin impliziert.

Als System zur Erforschung der EGFR-Transaktivierung nach Stimulation mit Gastrin oder den anderen getesteten Neuropeptiden schienen jedoch alle genannten Zellen nicht geeignet.

Nur in Experimenten mit AGS Magentumorzellen konnte eine Transaktivierung des EGFRs nach LPA-Stimulation gezeigt werden. Die Proteaseinhibitoren Batimastat (BB94) oder Marimastat (BB2516) bewirkten eine vollständige Abnahme der Tyrosinphosphorylierung des EGFRs nach LPA-Behandlung der Zellen. Somit konnte eine G<sub>i</sub>-gekoppelte, Metalloprotease-abhängige Aktivierung des EGFR in diesen Tumorzellen bestätigt werden (siehe Abb. 12).



**Abb. 12: Transaktivierung der EGFRs durch LPA in AGS-Magenkrebszellen:**

AGS Magentumorzellen wurden für 24 h Serum-gehungert, mit Batimastat (BB94, 10 µM) oder Marimastat (BB2516, 10 µM) 15 min vorbehandelt und anschließend mit LPA (5 µM) oder EGF (3 nM) für 3 min stimuliert und danach sofort lysiert. Immunpräzipitation gegen EGFR-Antikörper (108.1) und Westernblot gegen PY-Antikörper folgten. Die Reblot-Probe erfolgte gegen polyklonale EGFR-Antikörper (UBI).

### 3.1.5 Screen weiterer Tumorzellen

Um eine möglichst große Bandbreite von transaktivierbaren Zellen zu finden, wurden weitere Zellkulturen verschiedener Tumorarten nach Serumentzug auf ihre Reaktion auf GPCR Liganden getestet. In den folgenden aufgelisteten Zellen (Tabelle 3) konnte nach Stimulation mit den verwendeten Liganden keine signifikante Transaktivierung des EGFRs detektiert werden. Bei vielen dieser Zellen ist wiederum die basale Tyrosinphosphorylierung des EGFRs zu hoch, so daß auch ein- bis zwei-tägiger Serumentzug der Zellen die EGFR Phosphorylierung nicht wesentlich abnehmen ließ. D.h. ein „Hungern“ der mit (\*) gekennzeichneten Zellarten war auf Grund der hohen EGFR-Aktivität in diesen Zelllinien

nicht möglich. Dies bedeutet jedoch nicht, daß eine EGFR Transaktivierung in diesen Zellen nicht trotzdem Bestandteil ihrer Signaltransduktion sein kann, bei der die basale Phosphorylierung des Rezeptors involviert ist. Dies kann jedoch mit den zu Verfügung stehenden molekularbiologischen Methoden nicht nachgeprüft werden. Die Experimente wurden analog oder mit ähnlichen Liganden zu den in Tabelle 2 berichteten, in Hinsicht auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFRs nach G-Protein-Stimulation, durchgeführt:

Herkunft des Tumors	Name
Brust	MDA-MB-361
Brust	MDA-MB-468 (*)
Brust	MDA-MB-175
Brust	BT-20 (*)
Brust	BT-549
Brust	BT-474
Brust	SkBr3
Brust	T47D
Pankreas	Panc-1 (*)
Pankreas	Capan-1 (*)
Prostata	Du-145 (*)
Prostata	LNCaP
gastrisch	MKN-28
gastrisch	STK-2 (*)
gastrisch	RF-1
gastrisch	RF-48
Magen	HS 746 T (*)
Kolonkarznom	CaCo2
Kolonkarznom	Kato III (*)
Kolonkarznom	HT-29
Glioblastom	U1242
Glioblastom	U373
Glioblastom	U373 MG
Neuroblastom	SKNSH
Neuroblastom	SH-SY-5Y
SCLC (kleinzelliger Lungenkrebs)	NCI-H-69
epidermoides Karznom	A431 (*)

**Tabelle 3: EGFR Transaktivierungs-„Screen“ verschiedener Tumorzellen: die Negativresultate:**

Die genannten humanen Zellen wurden nach Serumentzug mit diversen Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stimuliert und mittels Westernblot der Tyrosinphosphorylierungsgehalt des EGFRs ermittelt. Alle Experimente mit diesen Zellen zeigten keine signifikante Erhöhung der EGFR Tyrosinphosphorylierung.

(\*) EGFR basal sehr hoch phosphoryliert

### 3.2 Metalloprotease-abhängige Transaktivierung des EGFRs nach Stimulation von GPCRs in Krebszellen

Um in endogenen Experimenten zu erforschen, ob die GPCR-vermittelte Transaktivierung in den Tumorzelllinien, die sich als „verwendbare“ Modellsysteme herausstellten, Metalloprotease-abhängig und somit möglicherweise durch EGF-ähnliche Liganden vermittelt wird, wurden Inhibitoren eingesetzt:

Batimastat (BB94) und Marimastat (BB2516) sind zwei spezifische Metalloprotease-Inhibitoren. In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß von Batimastat bzw. Marimastat auf den G-Protein-vermittelten Signalweg der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors in Prostata- und Pankreaskarzinomzellen getestet, um geeignete Systeme für die weiteren, pathophysiologisch relevanten Studien zu finden.

Hierzu wurde in einem Marimastat Dosis Experiment mit PC3 Zellen die Konzentration an Inhibitor ermittelt, die nötig ist, um eine Tyrosinphosphorylierung des EGFRs, ausgelöst durch GPCR Liganden, auf basales Niveau zu senken. Im Experiment (Abb. 13) lag bei Verwendung von 5  $\mu\text{M}$  Marimastat die EGFR Tyrosinphosphorylierung, angeregt durch Aktivierung des Bombesin-Rezeptors, nur noch geringfügig über basalem Niveau. Mit 10  $\mu\text{M}$  Molarer Konzentration des Inhibitors ließ sich die Bombesin-Stimulation vollständig inhibieren.

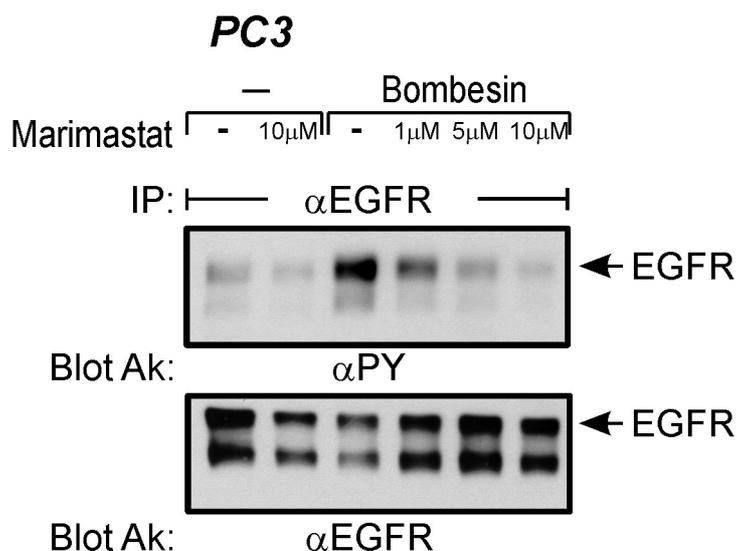


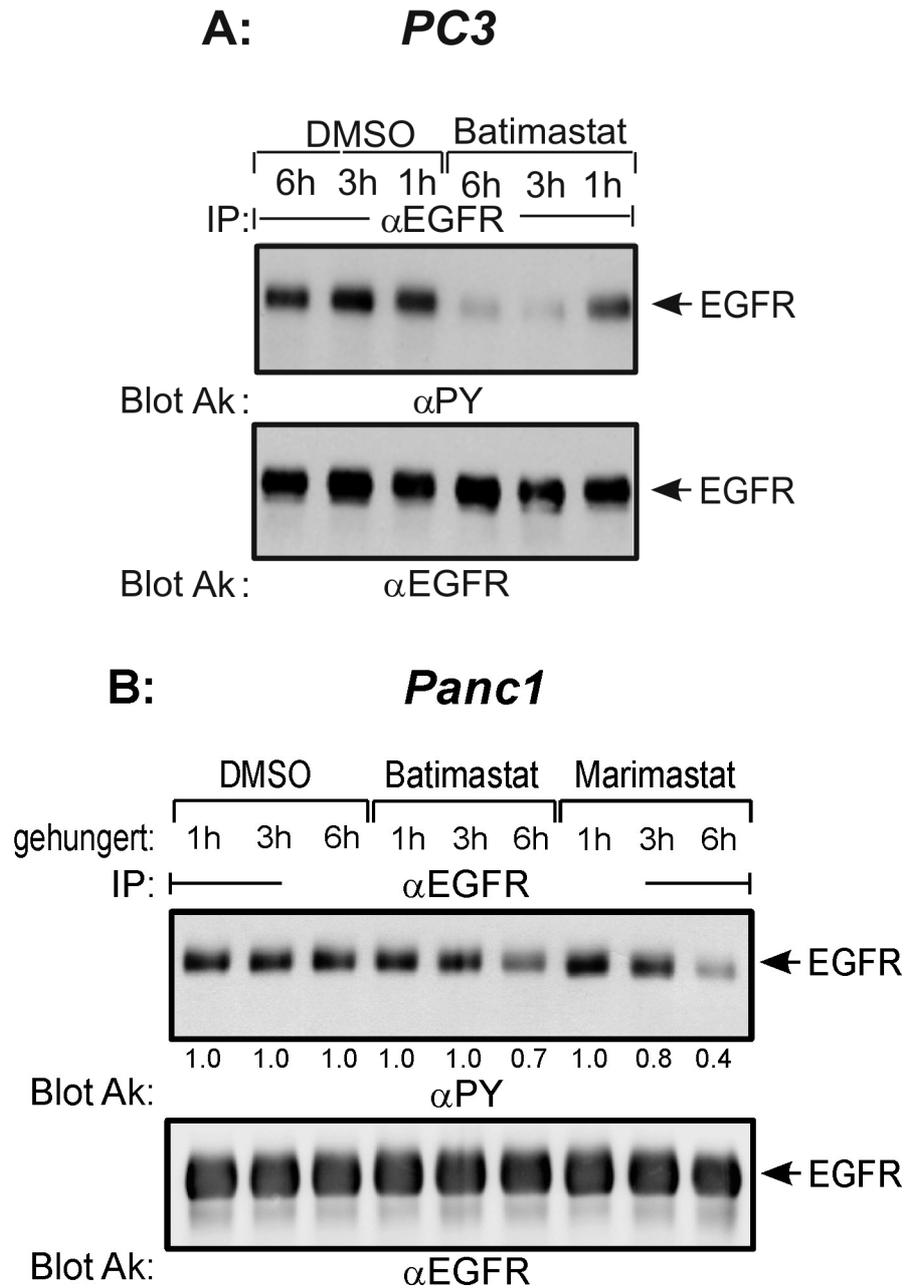
Abb. 13: Ermittlung der notwendigen Marimastat-Konzentration zur Senkung des EGFR Phosphotyrosingehalt nach Bombesin-Stimulation in PC3 Zellen.

Die für 24h in Serum-freiem Medium kultivierten PC3 Zellen wurden 20 min mit DMSO oder BB2516 (Marimastat) in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt. Danach erfolgte die Stimulation mit Bombesin (200nM) für 5 min. Die Abnahme der Tyrosinphosphorylierung des EGFRs wurde nach Immunpräzipitation mit 108.1-Antikörpern durch Westernblot gegen monoklonale PY-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) und anschließender Kontrollprobe gegen polyklonale EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR) sichtbar gemacht.

Somit konnte die Beteiligung von Metalloproteasen bei dieser GPCR-induzierten EGFR-Stimulation in den Tumorzellen bestätigt werden. Der Inhibitor Batimastat wirkt in ähnlicher Konzentration inhibierend auf die EGFR Transaktivierung wie bereits in Abb. 8, Abb. 10 und Abb. 12 gezeigt wurde.

### ***3.2.1 Verringerung der basalen EGFR Tyrosinphosphorylierung sowie der Phosphorylierungslevel der Signalmoleküle SHC und ERK1/2 in Tumorzellen durch die Metalloprotease-Inhibitoren Batimastat und Marimastat***

Die Absenkung der EGFR-Aktivität durch die beiden Metalloprotease-Inhibitoren Batimastat (BB94) und Marimastat (BB2516) ist zeitabhängig, wobei die Inhibitionszeit vom jeweiligen basalen Tyrosinphosphorylierungslevel des zellulären EGFRs abhängig ist, wie in Abb. 14 gezeigt wird. Im Fall der Panc-1 Pankreaskarzinomzellen ist die basale Rezeptorphosphorylierung sehr hoch, so daß sich erst nach 6 Stunden Inkubation mit Batimastat oder Marimastat eine Verringerung des Rezeptor-Tyrosinphosphorylierungsgehaltes um die Hälfte (*siehe Quantifizierung*) einstellt. Die in Abb. 14B ersichtliche, leicht stärkere Inhibition von Marimastat bei gleicher Konzentration des Inhibitors im Vergleich zu Batimastat wurde nicht weiter verifiziert. Panc-1 Zellen erwiesen sich deshalb auch für die Stimulation mit G-Proteinrezeptorliganden als ungeeignet, da der EGFR in diesen Zellen eine zu hohe Basalphosphorylierung besitzt und keine Aktivierung des Rezeptors nach GPCR-Stimulation im Westernblot sichtbar zu machen war (*Daten nicht gezeigt*). Somit wurden diese Zellen im weiteren Verlauf der Arbeit nicht weiter untersucht. Bei einem äquivalenten Experiment mit den hoch invasiven PC3 Prostatakarzinomzellen zeigt sich auf Grund der niedrigeren basalen Tyrosinphosphorylierung eine deutlich schnellere Inhibition des Rezeptors (bereits nach 3 Stunden) nach Behandlung mit Batimastat (Abb. 14A; (Prenzel et al., 1999)). Die PC3 Zellen erwiesen sich als gut geeignetes Modell um die Transaktivierung des EGFRs durch G-Protein-Stimulation zu untersuchen.



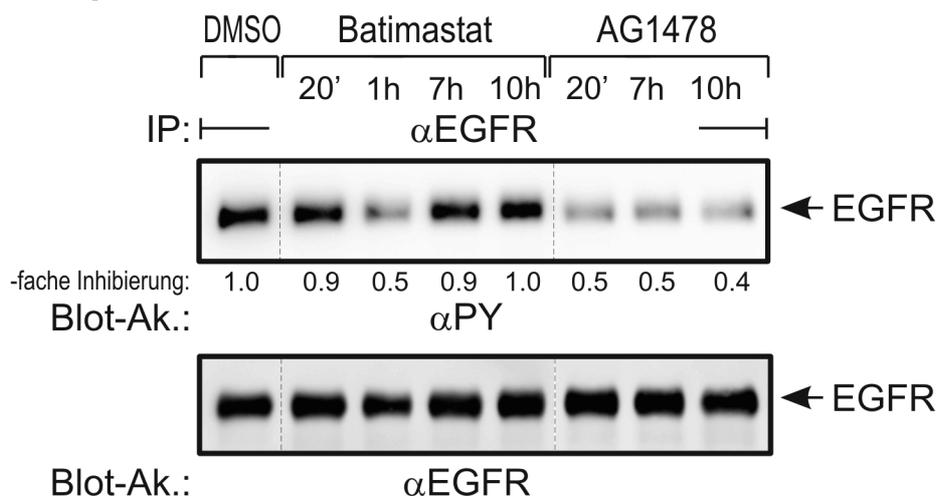
**Abb. 14: Batimastat und Marimastat vermindert die basale EGFR Tyrosinphosphorylierung in Tumorzellen**

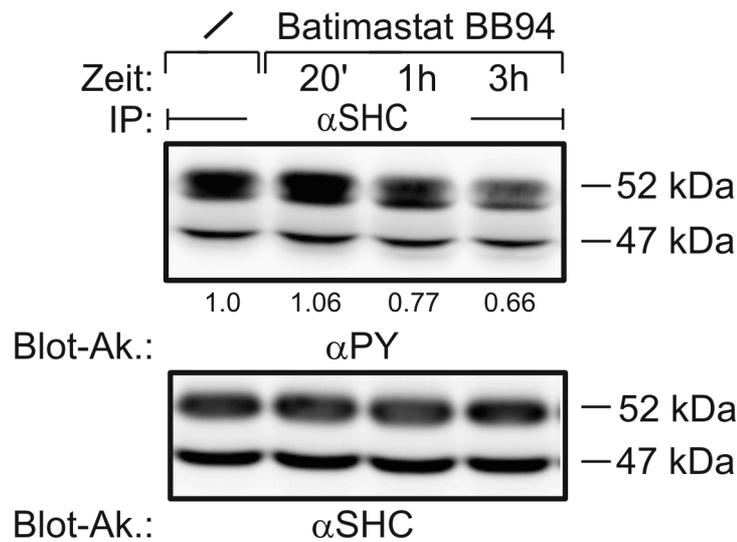
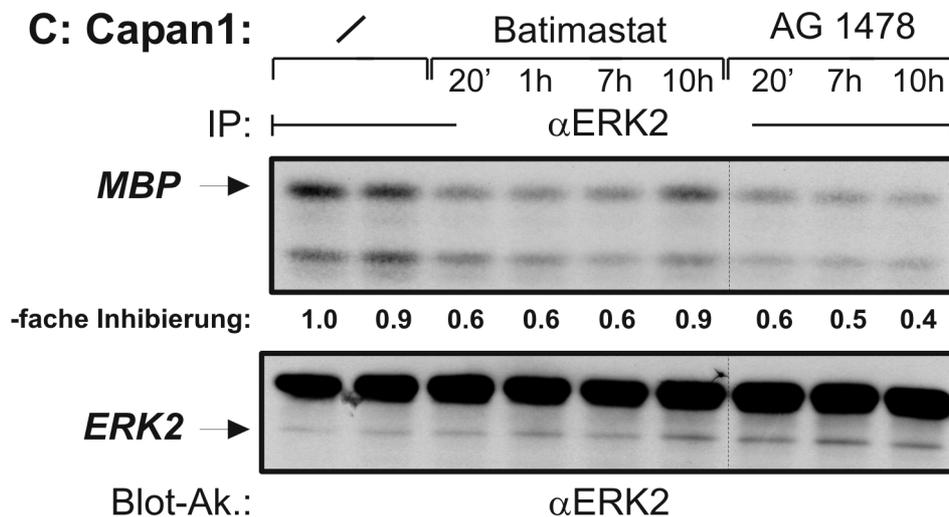
(A und B) Ungehungerte PC3-Prostatakarzinomzellen respektive Panc-1 Pankreastumorzellen wurden zu  $\frac{3}{4}$  Konfluenz gezogen, mit Serum-freiem Medium gewaschen und in diesem 0% Medium für die angegebene Zeit entweder mit DMSO (1µl/ml) zur Kontrolle bzw. mit BB94 (Batimastat, 10µM) oder BB2516 (Marimastat, 10µM) behandelt. Die Zellen wurden alle zur selben Zeit lysiert, gegen EGFR-Antikörper (108.1) immunpräzipitiert und im Westernblot gegen PY-Antikörper geblottet. Es schloß sich ein Immunoblot mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper an (αEGFR). (A) veröffentlicht in (Prenzel et al., 1999). In (B) wurde der Phosphorylierungsgrad an Hand der Chemolumineszenz durch die ECL-Reaktion mit Hilfe einer digitalen CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000) quantifiziert.

Experimente mit einer weiteren Pancreaskarzinomzelllinie, Capan-1, konnten ebenfalls die inhibierende Wirkung von Batimastat auf die EGFR-Basalphosphorylierung bestätigen. Bereits nach einer Stunde Inkubation mit dem Inhibitor konnte der basale Phosphotyrosinlevel des EGFRs deutlich auf den haben Wert herabgesetzt werden (Abb. 15A). Allerdings ist dem Anschein nach die Autophosphorylierung des Rezeptors in diesen Zellen so stark, daß bereits nach sieben Stunden erneut ein hoher Tyrosinphosphorylierungsgrad des EGFRs zu detektieren ist. Der inhibitorische Effekt der Metalloproteaseinhibitoren ist somit in zeitlicher Abhängigkeit reversibel. Die basale Phosphorylierung des Adapterproteins SHC wird ebenfalls durch BB94 nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Stunden reduziert (Abb. 15B). Abb. 15C zeigt eine vergleichbare Auswirkung des Inhibitors auf die MAP Kinaseaktivität, die jedoch interessanterweise bereits nach 20 Minuten eintritt. Anscheinend sind hier Metalloprotease-abhängige Regulatoren der MAPK-Aktivität beteiligt, die schneller inhibiert werden als der Liganden-abhängige Signalweg über den EGFR.

Durch Inkubation der Zellen mit dem EGFR-Inhibitor Tyrphostin (AG1478) konnte ebenfalls eine Inhibition der MAPK Phosphorylierung über einen Zeitraum von mehr als 10h erreicht werden. Die MAPK-Aktivität ist in diesen Tumorzellen somit auch in Abhängigkeit des EGFRs zu sehen.

### A: Capan1:



**B: Capan1:****C: Capan1:**

**Abb. 15: Batimastat vermindert die basalen Phosphorylierungslevel von EGFR, SHC und MAPK in Capan-1 Pancreastumorzellen.**

(A) *EGFR Tyrosinphosphorylierung:* Für 72h Serum-gehungerte Capan-1 Zellen wurden in 10 cm Schalen für die angegebene Zeit mit BB94 (Batimastat, 10 $\mu$ M) respektive dem EGFR-Inhibitor Tyrphostin (AG1478, 250 nM) inkubiert. Nach der Zellyse wurde der endogene EGFR immunpräzipitiert, durch 7,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern ( $\alpha$ PY) detektiert und mit Hilfe der digitalen CCD-Kamera „Fujifilm LAS-1000“ quantifiziert. Die Expressionskontrolle erfolgte nach Ablösen des ersten Antikörpers mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper. *Anmerkung:* Zwischen der Spur nach Probe 1 und 5 wurden einige für die Abbildung nicht relevante Spuren per Bildbearbeitung aus dem Original-Photo entfernt, jedoch ohne Veränderung des eigentlichen Bildes.

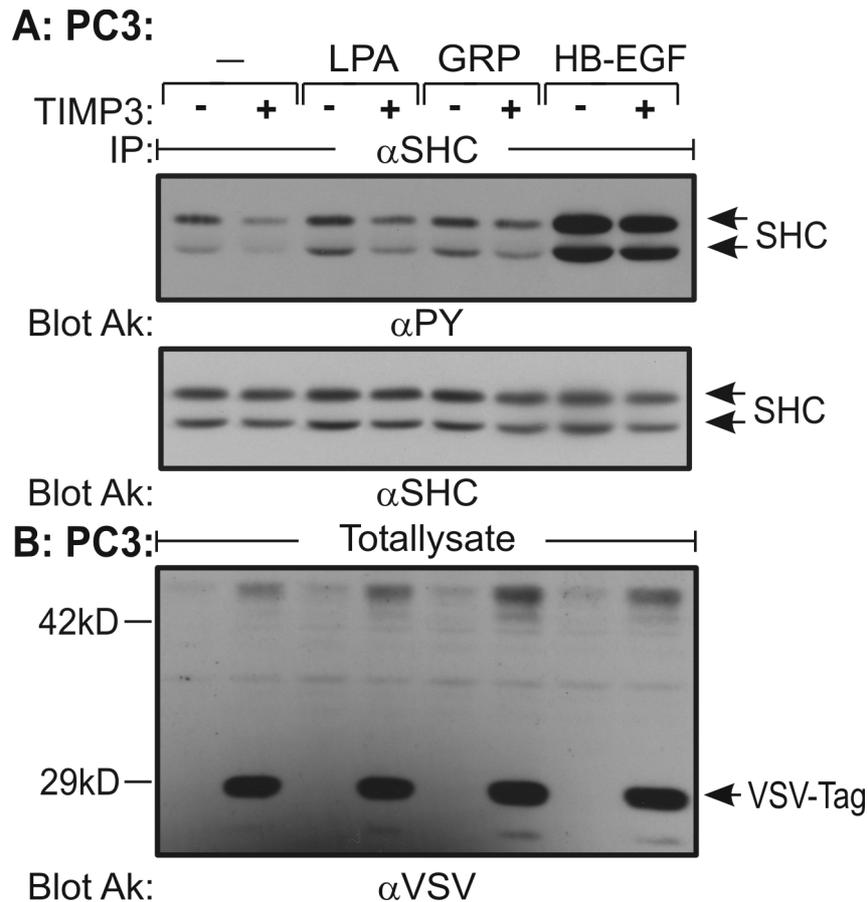
(B) *SHC Phosphorylierung:* Capan-1 Zellen wurden in 10 cm Schalen mit Batimastat inkubiert wie in (A) beschrieben. Aus dem Zellysate wurde die drei endogenen SHC-Proteinisoformenten mit polyklonalem  $\alpha$ SHC-Antikörper immunpräzipitiert, und nach Auftrennung der Proteine mittels 7,5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der anschließende Westernblot erfolgte mit monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern 4G10 ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen dieses Primärantikörpers erfolgte ein SHC-Immunoblot gegen monoklonale SHC-Antikörper ( $\alpha$ SHC)

(C) *MAP Kinase-Assay:* Aus Anteilen der Zellysate aus Experiment (A) wurde endogene ERK2 mit polyklonalem Anti-ERK2-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend ein *in vitro*-Kinaseassay mit MBP als Substrat durchgeführt (siehe 2.8.3). Nach Proteinauftrennung mittels 15%iger SDS-PAGE wurde phosphoryliertes MBP autoradiographisch sichtbar gemacht und mit einem Phosphoimager (Fuji) quantifiziert.

Parallele Immunoblotanalyse mit einem polyklonalen Anti-ERK2-Antikörper ( $\alpha$ ERK2) zeigte, daß gleiche Mengen ERK2 analysiert wurden. *Anmerkung:* Zwischen Spur 6 und 7 wurden einige für die Abbildung nicht relevante Proben per Bildbearbeitung aus dem Original-Röntgenfilm entfernt, ohne an dem eigentlichen Bild des Röntgenfilms Veränderungen vorzunehmen.

### **3.2.2 Inhibition der EGFR Transaktivierung durch TIMP-3**

Um einen Einblick zu bekommen, welche Metalloprotease(n) mit der EGFR Transaktivierung in den verwendeten Zellen in Verbindung stehen, wurde VSV-„getagtes“ TIMP-3 durch transiente Transfektion in PC3 Zellen eingebracht. Diese Expression des Membran-ständigen TIMP-3 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*) vermindert die LPA- und GRP-induzierte SHC-Aktivierung, die als direktes Folgesignal zur Detektion des EGFR-vermittelten GPCR Signals gewählt wurde. TIMP-3 senkt zwar schon die basale SHC Phosphorylierung herab (Abb. 16), aber dies ist erklärbar durch die Inhibition der Metalloproteasen, die diese basale Aktivität hervorrufen. Der inhibitorische Effekt von Timp-3 ist jedoch in der 46 kD SHC-Isoform wesentlich deutlicher zu ausgeprägt, als in der 52 kD Isoform. Da auch Phosphorylierung der 46 kD Isoform durch GPCR Liganden Stimulierung deutlicher ist, kann das Experiment dennoch als aussagekräftig gewertet werden. Die EGFR Tyrosinphosphorylierung nach GPCR-Stimulation kann ebenfalls durch die transiente Expression der TIMP-3 Proteine herabgesenkt werden (*Daten nicht gezeigt*). Somit konnte die Anzahl der möglichen Proteasen eingeschränkt werden: AMAM TS4, TS5, 10, 12, 17 und die MMPs MMP1,-2,-3,-7,-9,-14, die von TIMP-3 inhibiert werden (Crocker et al., 2004), kommen somit in die engere Wahl. Eine exakte Identifikation der Protease(n), die die Transaktivierung in PC3 Zellen vermitteln, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden. Die Anzahl der Kandidaten konnte jedoch durch cDNA Makroarrayanalyse noch eingeschränkt werden (siehe 3.6).



**Abb. 16: TIMP-3 vermindert die SHC Phosphorylierung nach GPCR-Stimulation in PC3 Zellen**

**(A):** PC3 Zellen wurden mit einem VSV-getagten TIMP-3 cDNA-Konstrukt (+, pLXSN-ESK-Timp-3-VSV) oder pLXSN Leervektor (-) mit Hilfe des Transfektionsreagenz „Lipo 2000“ transient transfiziert. Nach Serumentzug wurden die Zellen für 5 min mit LPA (5  $\mu$ M), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 100 nM) oder HB-EGF (3 ng/ml) stimuliert. Nach der Zellyse wurden die SHC-Isoformen 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.

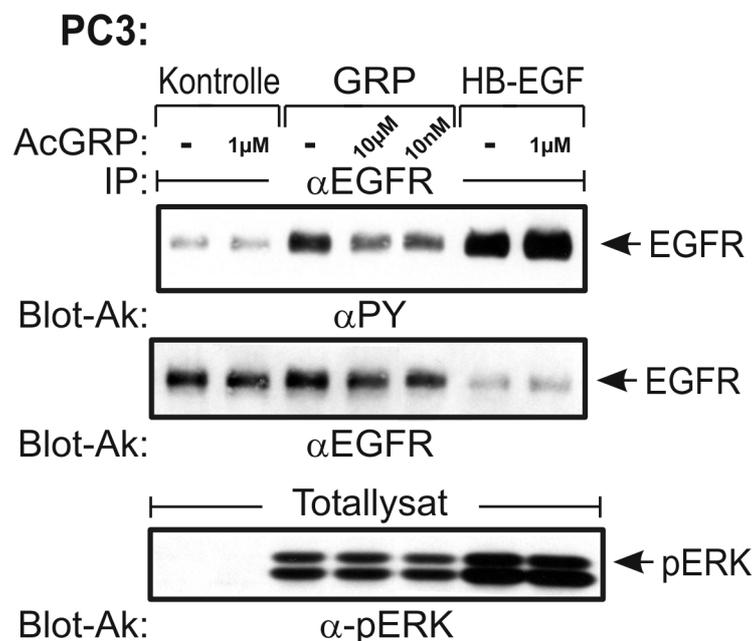
**(B):** Totallysate wurden zur Expressionskontrolle des TIMP-3 Proteins durch 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend erfolgte ein Immunoblot gegen den VSV-Tag mit einem  $\alpha$ VSV-Antikörper.

### 3.3 Test des Peptid-Inhibitors “Acetyl Gastrin Releasing Peptide” (AcGRP)

Als spezifischer Inhibitor des Gastrin Releasing Peptide Rezeptors (GRPR) soll hier das Peptid “Acetyl Gastrin Releasing Peptide” (AcGRP) auf seine Fähigkeit in PC3 Zellen die Transaktivierung zu blocken getestet werden. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors verwendet (10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 100nM und 10nM). In den Konzentrationen 10 $\mu$ M und

10nM konnte eine deutliche Verringerung der GRP-induzierten EGFR Transaktivierung durch AcGRP festgestellt werden. Die Proben, in denen die beiden anderen Konzentrationen getestet werden sollten, lieferten keine verwertbaren Daten, so daß sie in Abb. 17 nicht gezeigt werden. Auf die GRP-stimulierte MAPK-Aktivierung hatte AcGRP jedoch keine signifikante inhibierende Auswirkung (Abb. 17, *unteres Photo*). Dies könnte damit zusammenhängen, daß die Inhibition der EGFR-Aktivierung nicht vollständig erfolgte, und es in diesen Zellen EGFR-unabhängige Signalwege vom GRP-Rezeptor hin zur MAPK-Aktivierung gibt.

Daher war der Inhibitor auch nicht in der Lage, Migration oder Invasion der PC3 Zellen zu hemmen (*Daten nicht gezeigt*). Er wurde somit nicht für weitere Experimente verwendet.



**Abb. 17: Der Peptid-Inhibitor AcGRP vermindert die GRP-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung, hat aber keinen Effekt auf die ERK Phosphorylierung**

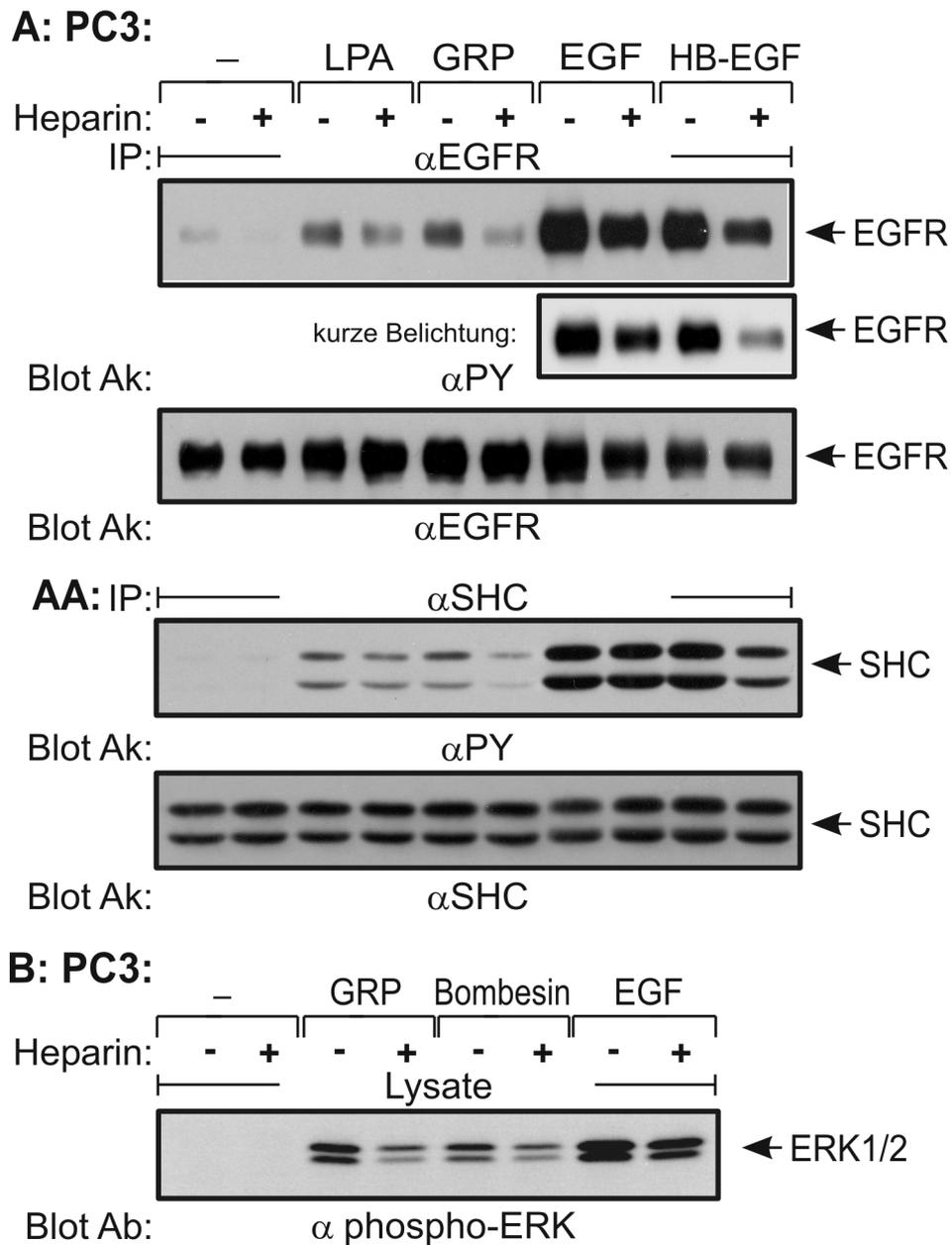
**αEGFR IP:** PC3 Zellen (1,5 M) wurden in 10 cm Schalen ausgesät, nach 24h Serumentzug teilweise für 20 min mit AcGRP in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert und anschließend 5 Minuten mit HB-EGF (3 ng/ml) oder Gastrin Releasing Peptide (GRP, 100 nM) stimuliert. Aus den Zellysaten wurde der EGFR mit monoklonalem Antikörper (αEGFR) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (αPY) wurde dieser abgelöst und mit polyklonalem αEGFR-Antikörper immunodetektiert.

**Totallysat:** Jeweils gleiche Anteile des PC3-Zellysats wurden als Totallysat mit Lämmli Puffer versetzt, mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Anti-Phospho-ERK-Antikörper (α-pERK) immunodetektiert.

Alle Photos wurden hier mit Hilfe der digitalen CCD-Kamera „Fujifilm LAS-1000“ erfaßt.

### 3.4 Die GPCR-vermittelte EGFR Transaktivierung und ihre „Downstream“-Signale in Abhängigkeit von HB-EGF- oder Amphiregulin

Der schnelle Verlauf der EGFR Tyrosinphosphorylierung nach GPCR-Stimulation wurde seinerzeit von H. Daub und Kollegen als ein Anzeichen für eine Liganden-unabhängige EGFR-Aktivierung interpretiert (Daub et al., 1996). Es wurde aber später augenscheinlich, daß die Transaktivierung tatsächlich durch transmembranäre Vorläufermoleküle der EGFR Liganden, wie HB-EGF oder Amphiregulin, die proteolytisch in reife und lösliche Wachstumsfaktoren prozessiert werden, vermittelt wird (Asakura et al., 2002; Gschwind et al., 2003; Lin and Freeman, 2003; Prenzel et al., 1999; Yan et al., 2002). Um einen ersten Anhaltspunkt über die Identität des EGFR Liganden zu bekommen, sollte untersucht werden, ob Behandlung der Zellen mit Heparin, einem Glukosaminoglykan der extrazellulären Matrix, die EGFR Aktivierung hemmen kann. Sowohl HB-EGF als auch der strukturell verwandte EGFR Ligand Amphiregulin benötigen Zelloberflächen-assoziierte Heparansulfat Proteoglykane (HSPGs) als Co-Rezeptoren für die EGFR-Aktivierung. Komplexbildung mit exogen hinzugefügtem Heparin unterbindet die Bindung beider Liganden an HSPGs und inhibiert somit wirksam die HB-EGF- oder Amphiregulin-vermittelte EGFR Transaktivierung (Gschwind et al., 2003; Kalmes et al., 2000). Als LPA, GRP, Bombesin (*nicht gezeigt*) und HB-EGF verwendet wurden um die Autophosphorylierung des EGFRs in PC3 Zellen zu stimulieren, beeinflusste die Vorinkubation mit Heparin sehr deutlich die Aktivierung des Rezeptors (Abb. 18A). Dies spiegelte sich ebenfalls in der Abschwächung der SHC Phosphorylierung (Abb. 18AA) und der MAPK-Aktivität (Abb. 18B) wieder. Die HB-EGF Kontrollstimulation konnte im Gegensatz zur EGF-behandelten Probe signifikant inhibiert werden, was die Wirksamkeit und die Spezifität dieses Inhibitors aufzeigt (siehe Abb. 18A „kurze Belichtung“). Interessanterweise wird das GRP-Signal stärker von Heparin beeinflusst als die LPA-Stimulation, was wiederum mit dem unterschiedlichen Verlauf des Signals bei der Aktivierung  $G\alpha_q$ - respektive  $G\alpha_i$ -gekoppelter Rezeptoren zusammenhängen könnte. So kann vermutet werden, daß in PC3 Zellen entweder HB-EGF oder Amphiregulin, von einer Metalloprotease aus ihren Vorläufermolekülen freigesetzt, zur Aktivierung des EGFR nach GPCR-Stimulation in diesen Tumorzellen benötigt werden.



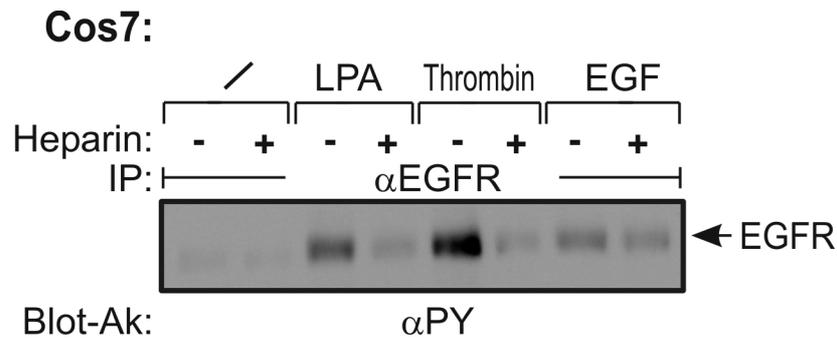
**Abb. 18: Heparin vermindert die Tyrosinphosphorylierung nach GPCR-Stimulation von EGFR und SHC in PC3-Zellen.**

(A): Für 24h serumgehungerte PC3 Zellen wurden in 10 cm Schalen für 20 min mit Heparin (100 ng/ml) vorinkubiert. Die Zellen wurden für 5 min mit LPA (5  $\mu$ M), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 100 nM), EGF (5 ng/ml) oder HB-EGF (3 ng/ml) stimuliert. Nach der Zellyse wurde der endogene EGFR immunpräzipitiert, durch 7,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) detektiert. Die Expressionskontrolle erfolgte mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR).

(AA): Aus Anteilen der Zellysate desselben Experiments wurden die SHC-Proteinisofomen mit einem polyklonalem 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.

(B): PC3 Zellen wurden für 72 h das Serum entzogen und mit Heparin (100 ng/ml, 20 min) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit Gastrin Releasing Peptide (GRP, 200 nM), Bombesin (200 nM) bzw. EGF (5 ng/ml) stimuliert. Zur Bestimmung der ERK-Aktivierung erfolgte eine Immunoblotanalyse der Totallysate mit einem Anti-phospho-ERK-Antikörper.

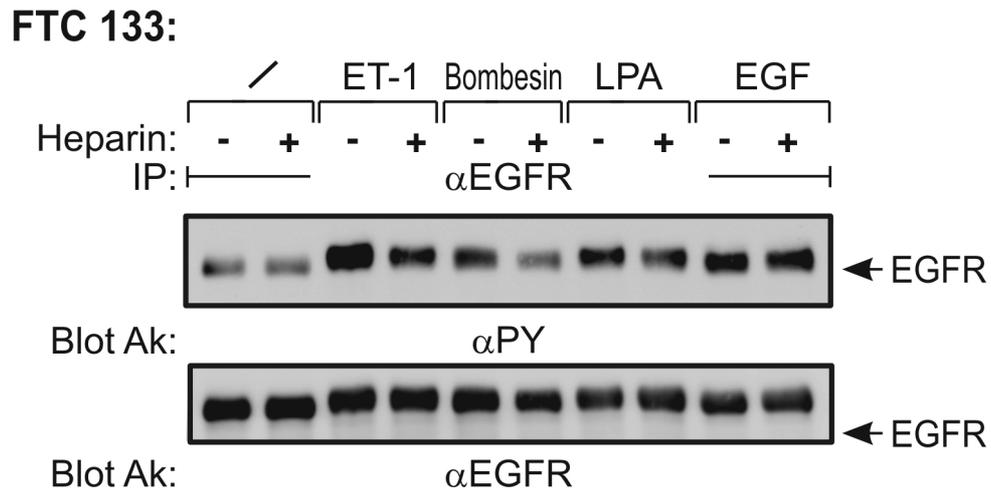
Als Kontrolle für die Wirksamkeit des Inhibitors Heparin wurden COS7 Zellen herangezogen. Die LPA- und Thrombin-stimulierte EGFR Tyrosinphosphorylierung kann durch Heparin fast auf Basalniveau herabgesenkt werden (Abb. 19). Da bekannt ist, daß in COS7 Zellen HB-EGF die Transaktivierung vermittelt (Prenzel et al., 1999), konnte so die Spezifität von Heparin dargestellt werden.



**Abb. 19: Heparin blockiert die LPA- und Thrombin-induzierte EGFR Transaktivierung in COS7 Zellen.**

Serumgehungerte COS-7 Zellen wurden für 30 min mit Heparin (100 ng/ml) vorinkubiert und mit LPA (5  $\mu$ M), Thrombin (2 U/ml) und EGF (3 ng/ml) für 3 min stimuliert, lysiert und der endogene EGFR mit dem monoklonalen Antikörper 108.1 ( $\alpha$ EGFR) immunpräzipitiert. Nach Gelelektrophorese mit 7,5%ige SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Immundetektion mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY).

In FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen konnte ebenfalls durch Vorbehandlung der Zellen mit Heparin eine Absenkung des Phosphotyrosingehalts des nach Peptid-Liganden-Stimulation transaktivierten EGFRs erreicht werden. Am deutlichsten erscheint die Abnahme in den Endothelin-1- und Bombesin-stimulierten Proben (Abb. 20). Somit kann angenommen werden, daß in FTC-133 Zellen ebenfalls HB-EGF oder Amphiregulin an der EGFR Transaktivierung beteiligt sind.

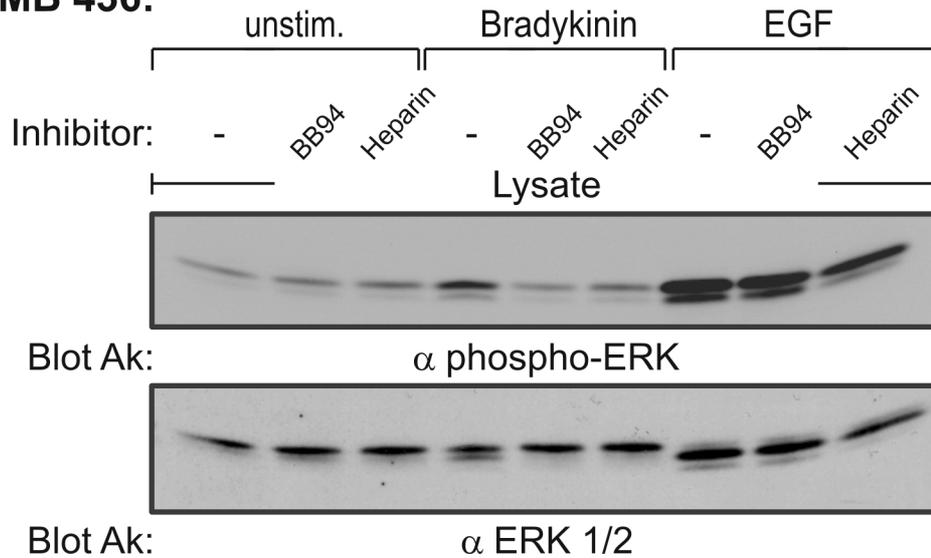


**Abb. 20: Heparin reduziert die EGFR Transaktivierung nach Stimulation mit GPCR Liganden in FTC-133 Zellen.**

Serumgehungerte FTC-133 Zellen wurden in 10 cm Schalen für 30 min mit Heparin (100 ng/ml) vorinkubiert. Die Zellen wurden für 8 min mit Bombesin (200 nM), Endothelin-1 (ET-1, 200 nM), LPA (5  $\mu$ M) oder EGF (1,5 ng/ml) stimuliert. Der endogene EGFR wurde nach der Zellyse mit monoklonalem Antikörper 108.1 immunpräzipitiert und die Proteine durch anschließende 7,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern ( $\alpha$ PY). Die Expressionskontrolle erfolgte mit polyklonalem anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR).

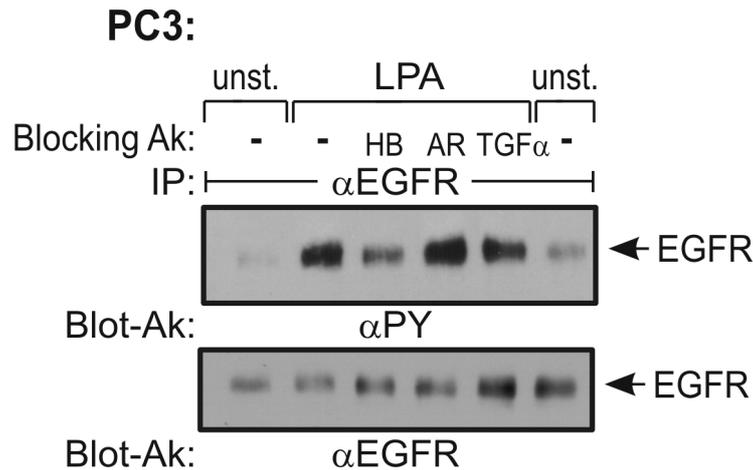
In MDA-MB 436 Brustkrebszellkulturen konnte des weiteren die Bradykinin-induzierte MAPK-Aktivität sowohl durch Heparin als auch durch den Metalloproteaseinhibitor Batimastat (BB94) deutlich herabgesetzt werden, was in Abb. 21 an Hand eines phospho-ERK1/2 Immunoblots gezeigt wird. Somit werden auch in diesen Tumorzellen zelluläre Antworten auf die GPCR-Stimulation durch EGF-ähnliche Liganden vermittelt.

TSU Zellen wurden in vergleichbarer Weise getestet. Es konnte jedoch in diesem Prostatakarzinom-Zellsystem mit Heparin kein abschwächender Effekt der LPA-stimulierten EGFR Transaktivierung beobachtet werden (*Daten nicht gezeigt*).

**MDA MB 436:****Abb. 21: Heparin inhibiert die Bradykinin-induzierte MAPK Aktivierung in MDA-MB 436 Zellen**

MDA-MB 436 Brustkrebszellen wurden nach 24h Serumentzug teilweise für 20 min mit Batimastat (BB94, 10  $\mu$ M) oder Heparin (100 ng/ml) vorinkubiert. Nach 5 minütiger Stimulation mit Bradykinin (1  $\mu$ M) oder EGF (3 nM) erfolgte die Zellyse, Auftrennung der Proteine mittels 15%iger SDS-PAGE und die Immunoblotanalyse der Totallysate zur Bestimmung der ERK1/2-Aktivität mit einem  $\alpha$ -phospho-ERK Antikörper. Der Reblot wurde mit dem ERK1-Antikörper K23 durch geführt ( $\alpha$ ERK1).

Als weiterer Anhaltspunkt zur Identifikation des EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors, der die Transaktivierung in Tumorzellen, insbesondere in PC3 Zellen, vermittelt, sollten sogenannte Blocking-Antikörper eingesetzt werden. Die Zellen wurden mit blockierenden Antikörpern gegen Amphiregulin (20  $\mu$ g/ml), HB-EGF (20  $\mu$ g/ml) oder TGF $\alpha$  (1 $\mu$ g/ml) vorinkubiert. Die Behandlung der PC3 Zellen mit dem HB-EGF-Antikörper inhibierte entscheidend die LPA-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFRs, wohingegen der Einsatz die beiden anderen Antikörper keinen Einfluß auf das EGFR Transaktivierungssignal nahmen. Als Fazit dieser Ergebnisse konnte somit belegt werden, daß in PC3 Zellen HB-EGF an der Transaktivierung des EGFRs nach GPCR-Stimulation beteiligt ist.



**Abb. 22: HB-EGF ist in EGFR-Transaktivierung in PC3 Zellen involviert.**

PC3 Prostatakarzinomzellen (500.000 Zellen/6 cm Schale) wurden für 24h Serum gehungert und mit den Blocking-Antikörpern  $\alpha$ HB-EGF (HB, 20  $\mu$ g/ml),  $\alpha$ Amphirelulin (AR, 20  $\mu$ g/ml) oder  $\alpha$ TGF $\alpha$  (TGF $\alpha$ , 1  $\mu$ g/ml) für 60 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit LPA (5  $\mu$ M, 5 min). Nach der Zellyse wurde endogenes EGFR Protein mit monoklonalem Antikörper 108.1 ( $\alpha$ EGFR) immunpräzipitiert und die Proteine mittels 7,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geschah der Westernblot mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen des Primärantikörpers vom Filter erfolgte ein Immunoblot mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR).

### 3.5 Zusammenfassung der auf EGFR Transaktivierung positiv getesteten Tumorzelllinien sowie die Inhibitor-Sensitivität der zellulären Antworten nach GPCR-Stimulation der Zellen

In Tabelle 4 sind die getesteten Zelllinien zusammengefaßt, die nach GPCR-Stimulation eine EGFR Transaktivierung zeigten. Ebenfalls ist das Ansprechen auf den Metalloproteaseinhibitor Batimastat (BB94), den EGFR-Inhibitor Tyrphostin (AG 1478) oder Heparin ausgewiesen.

Krebs	Zelllinie	EGFR Transaktivierung	ERK- Aktivierung	BB94- Sensitivität	AG 1478- Sensitivität	Heparin- Sensitivität
Brust	MDA-MB 435s	LPA, Carbachol, Thrombin	Carbachol	EGFR: ja	N/D	N/D
Brust	MDA-MB 436 (kultiviert in <i>L15 Medium</i> )	Bradykinin	LPA	EGFR: ja; pERK: ja	pERK: ja	EGFR: ja; pERK: ja
Brust	ZR 75-1	Carbachol	Carbachol	N/D	pERK: ja	N/D
Magen	AGS	LPA	LPA	EGFR: ja; pERK: ja	pERK: ja	N/D
Prostata	PC3	LPA, Bombesin, GRP, TPA	Bombesin, GRP	ERFR: ja; pERK: ja	pERK: ja	EGFR: ja; pERK: ja, aber nicht bei LPA
Prostata	PPC1	LPA, Thrombin	LPA-SHC	N/D	N/D	N/D
Prostata	TSU	LPA, ET-1, Thrombin, Neurotensin	LPA, ET-1, GRP, NMB	EGFR: ja; pERK: nein	N/D	EGFR: ja (nur LPA); pERK: nein
Schilddrüse	FTC-133	LPA, Bombesin, GRP, NMB, ET-1, TPA	LPA, Bombesin, GRP, NMB, ET-1, NT	EGFR: ja; pERK: ja	pERK: ja	EGFR: ja; pERK: ja
Glioblastom	U1240	LPA, Bombesin, Thrombin, Carbachol, TPA	Bombesin, Carbachol, TPA	N/D	pERK: nein	N/D

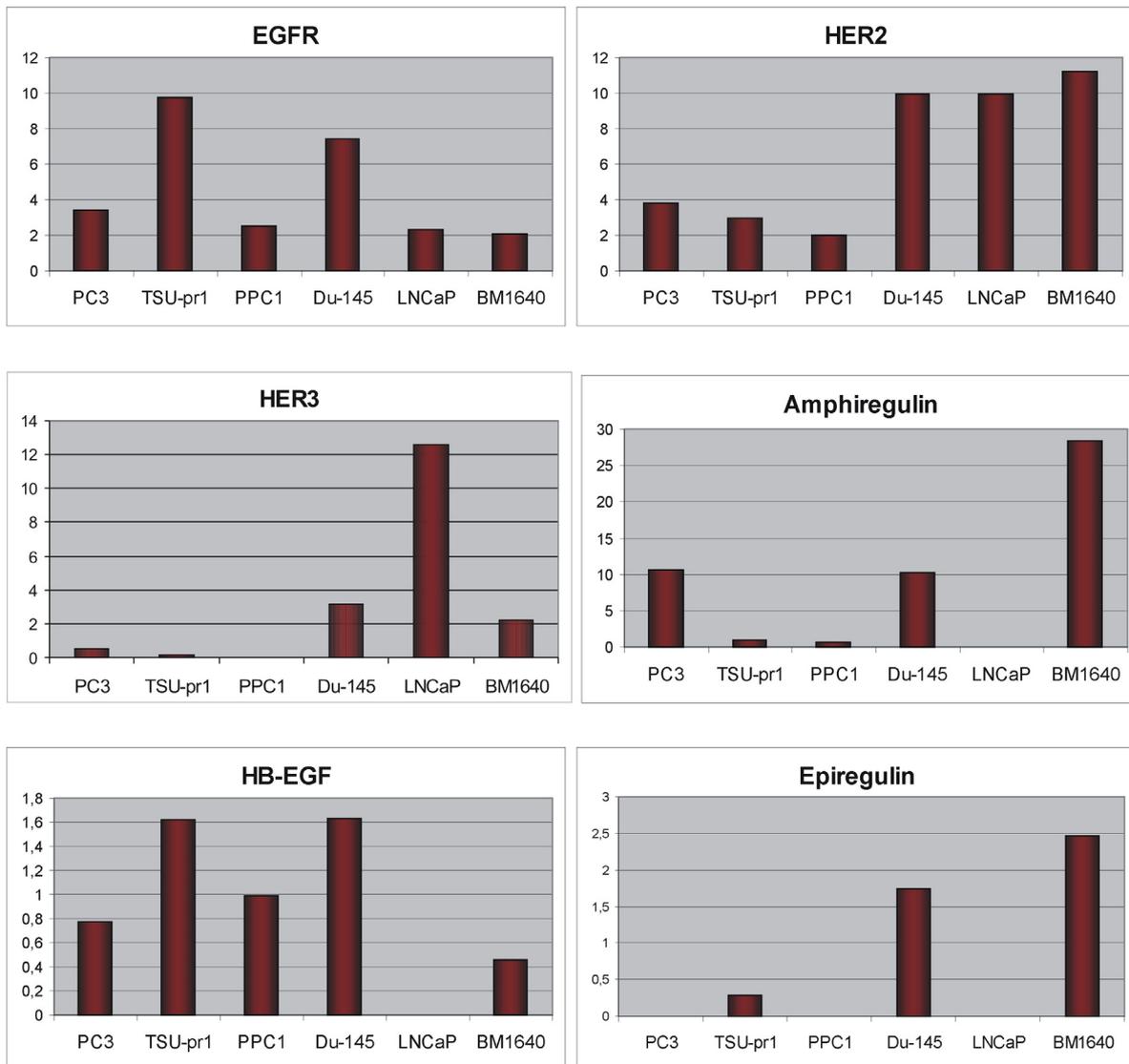
**Tabelle 4: Übersicht über die auf die Transaktivierung des EGFRs getesteten Zellen**

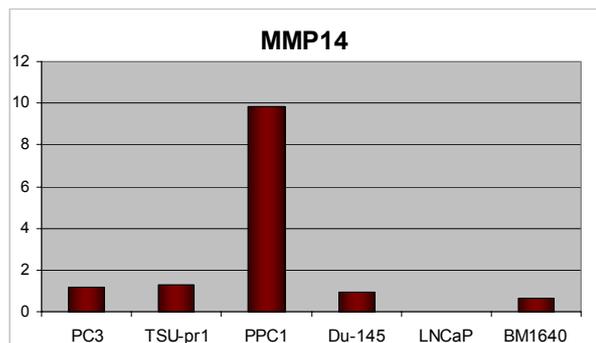
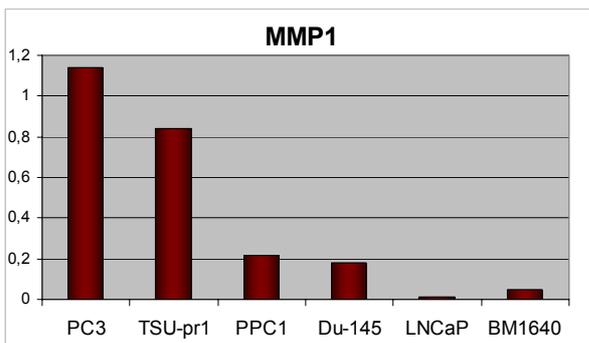
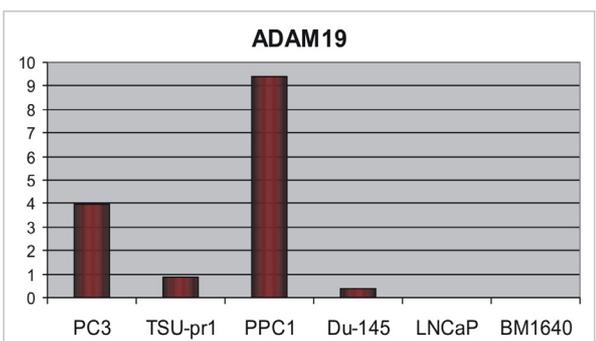
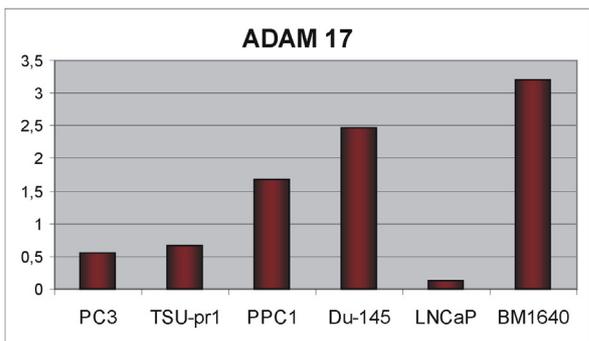
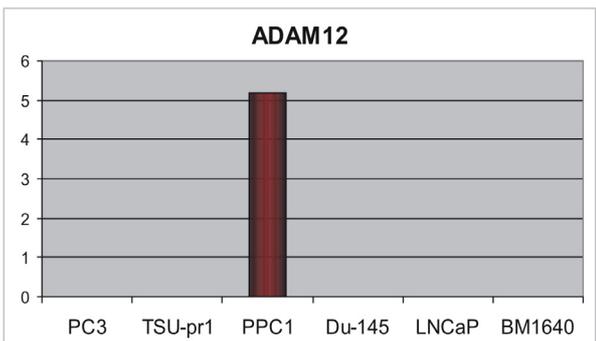
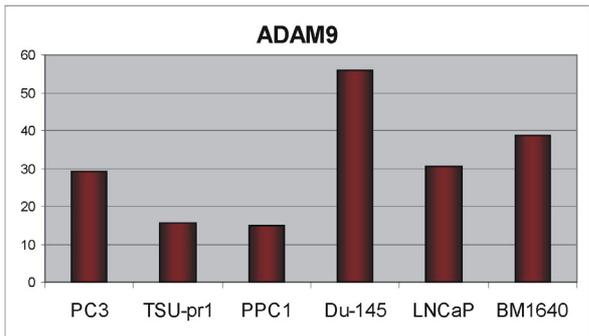
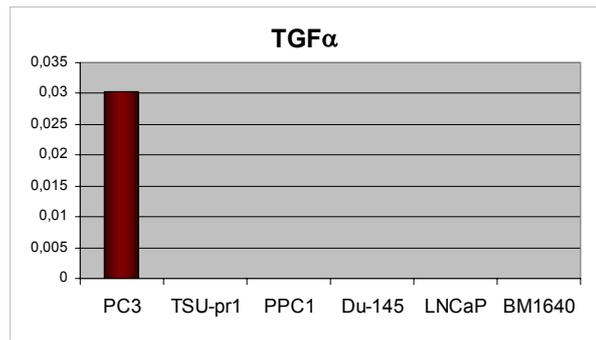
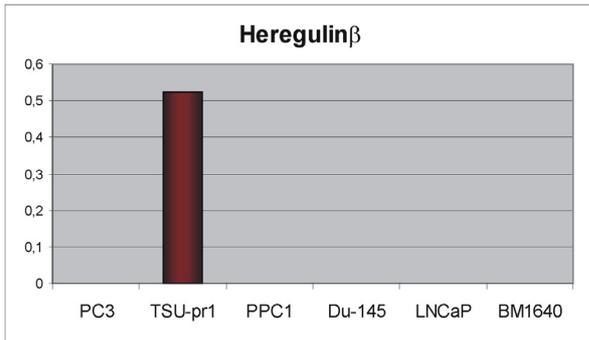
N/D (nicht durchgeführt, „not determined“)

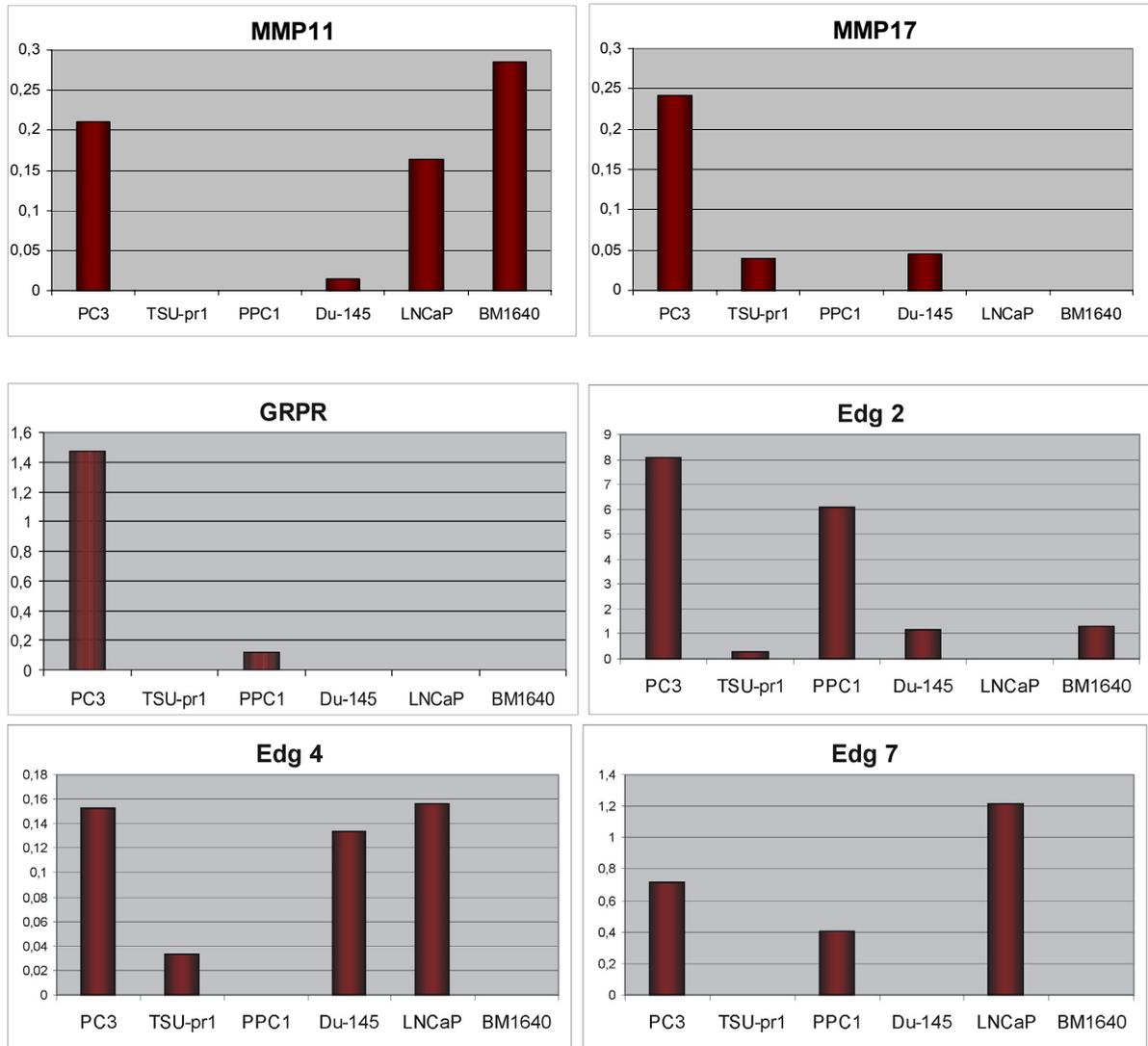
### 3.6 cDNA Makroarrays von Prostatakrebszelllinien zur Expressionskontrolle verschiedener Signaltransduktionsmoleküle

Zur Expressionsanalyse verschiedener Gene, die für die EGFR Transaktivierung von Bedeutung sein könnten, wurden cDNA Makroarrays verschiedener Prostatakrebszelllinien herangezogen. Es wurden mit dieser Methode Genexpressionsprofile für sechs verschiedene Protatatumorzelllinien erstellt, aus dem hier einige, für die EGFR Transaktivierung interessante Gene betrachtet werden sollen. Deren Expressionsanalyse wird in den Grafiken der Abb. 23 in relativer Darstellung (mit PC3 als Referenzzelllinie) vorgestellt.

Als Ergebnis dieser Experimente stellte sich heraus, daß der EGFR und HER2 in allen Zelllinien nachgewiesen werden konnten. HER3 ist nur in PPC1 Zellen nicht nachweisbar. HER4 wird von keiner der getesteten Zelllinien exprimiert. Die für die EGFR-ähnlichen Liganden Amphiregulin und HB-EGF codierenden Gene fehlten nur in den wenig kanzerogenen LNCaP Zellen. TGF $\alpha$  war nur in PC3 Zellen schwach detektierbar. Die weiteren Liganden des EGFRs, wie Betacellulin und Crypto, sind in den getesteten Prostatazellen nicht signifikant exprimiert (*Daten nicht gezeigt*).







**Abb. 23: Genexpression von EGF-ähnlichen Liganden, ADAMs, GRPR und Gene der HER- und Edg-Familien in verschiedenen Prostata-Tumor Zelllinien, bestimmt durch eine cDNA Array Analyse**

cDNA wurde von PC3, TSU-pr1, PPC1, Du-145, LNCaP und BM1640 Prostatakarzinomzellen präpariert und mit  $\alpha^{33}\text{P}$ dATP „gelabelt“ und auf Arrayfilter hybridisiert wie unter *Material und Methoden* beschrieben. Die Daten repräsentieren relative Hybridisierungssignale der einzelnen Gene.

Tabelle 5 zeigt nun eine Zusammenfassung der relativen Expressionsdaten der cDNA Makroarray-Analyse in semi-quantitativer Weise:

Zelllinie/Gene	PC3	TSU-pr1	PPC1	Du-145	LNCaP	BM1640
EGFR	++	+++	++	+++	++	++
HER2	++	++	++	+++	+++	+++
HER3	+	+	-	++	+++	++
HER4	-	-	-	-	-	-
Amphiregulin	++	+	+	++	-	+++
Epiregulin	-	+	-	++	-	+++
HB-EGF	++	+++	++	+++	-	+
TGF- $\alpha$	+	-	-	-	-	-
Heregulin- $\beta$	-	++	-	-	-	-
ADAM9	++	++	++	+++	++	++
ADAM10	+	+	+	+++	++	+++
ADAM12	-	-	++	-	-	-
ADAM17	++	++	+++	+++	+	+++
ADAM19	++	+	+++	+	-	-
MMP1	++	++	+	+	-	+
MMP11	++	-	-	+	++	++
MMP14	+	+	+++	+	-	+
MMP17	++	+	-	+	-	-
Edg2	+++	+	+++	++	-	++
Edg4	++	+	-	++	++	-
Edg7	+	-	+	-	++	-
GRPR	+++	-	+	-	-	-

**Tabelle 5: Zusammenfassung relative Expressionslevel ausgewählter Gene der cDNA Makroarray Analyse in Prostatatumorzelllinien.**

Die Experimente wurden wie in 2.5.10 beschrieben durchgeführt.

Erklärung: +++ sehr hohe Expression ++ hohe Expression + geringe Expression - nicht detektierbar

Mehrere Vertreter der ADAM und MMP Metalloproteasefamilien treten in den verschiedenen Zellen in unterschiedlicher Stärke auf. Von den in PC3 Zellen detektierten Proteasen werden ADAM10, ADAM17, MMP1 und MMP14 von TIMP-3 inhibiert. Da die EGFR Transaktivierung in diesen Zellen TIMP-3 sensitiv war, kommen diese vier Enzyme für die proteolytische Spaltung von proHB-EGF in diesem Signalweg in Frage.

Deutlich ist zu erkennen, daß LNCaP Zellen, in denen keine signifikante Transaktivierung des EGFRs zu ermitteln war (siehe Tabelle 3), auch die Expression von EGF-ähnlichen Liganden, der MMPs MMP1, 14 und 17 nicht zu detektieren war. Außerdem wiesen diese Zellen einen

äußerst geringen Expressionslevel der ADAM17 Protease auf. Somit kann durch diese Arrayanalysen die Expression von EGFR Liganden, wie vor allem HB-EGF und Amphiregulin (*siehe PC3 Zellen*) und Metalloproteasen der MMP und ADAM Familien als Voraussetzung für eine funktionsfähige Transaktivierung des EGFR in Prostatatumorzellen postuliert werden. In PC3- und PPC1 Zellen konnte des weiteren die Expression des GRP-Rezeptors (GRPR) mittels einer in dieser Arbeit klonierten cDNA nachgewiesen werden. Diese beiden Zelllinien sind nachweislich mit GRP stimulierbar (*siehe Abb. 8A für PC3 Zellen, Daten nicht gezeigt bei PPC1 Zellen*) wodurch in imposanter Weise die Nachhaltigkeit dieser Array-Analysemethode gezeigt werden konnte. Edg Rezeptoren, für die unter anderem LPA als Ligand fungiert, wurden in unterschiedlichen Expressionspattern in allen untersuchten Zellen nachgewiesen.

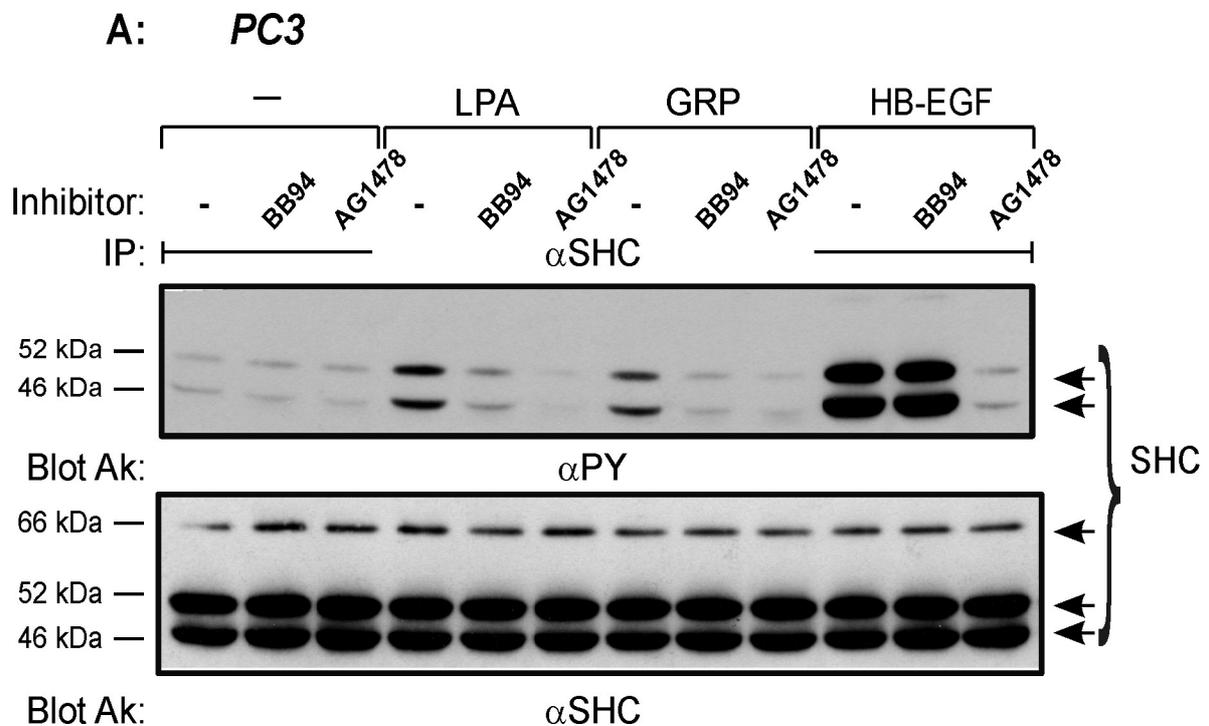
### **3.7 EGFR-vermittelte Phosphorylierung zellulärer Proteine nach GPCR-Stimulation**

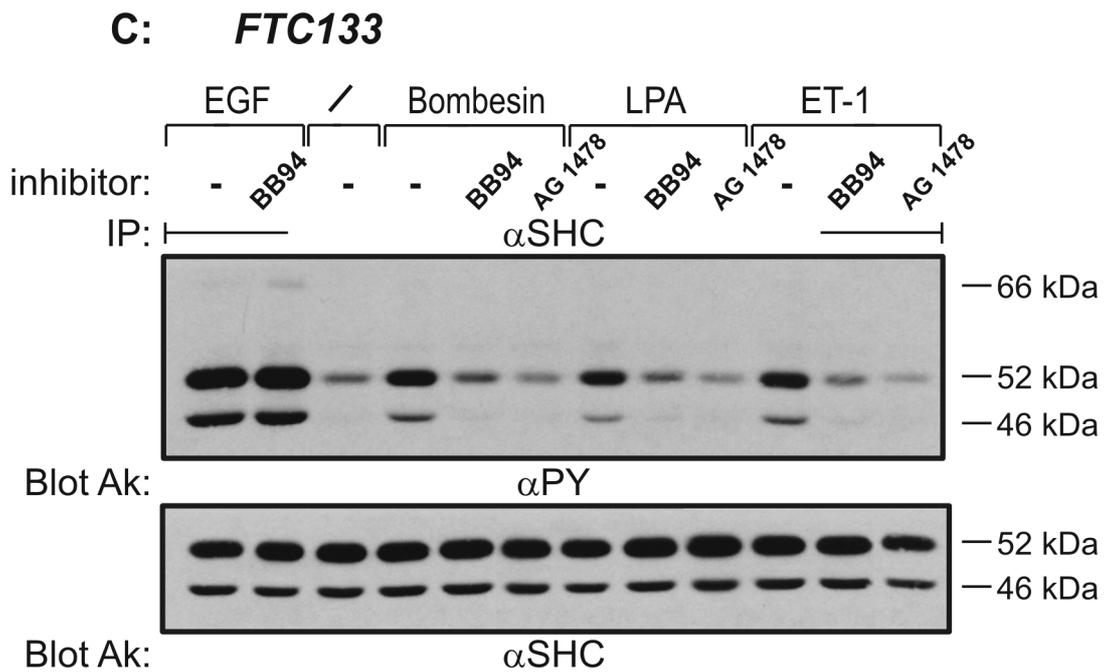
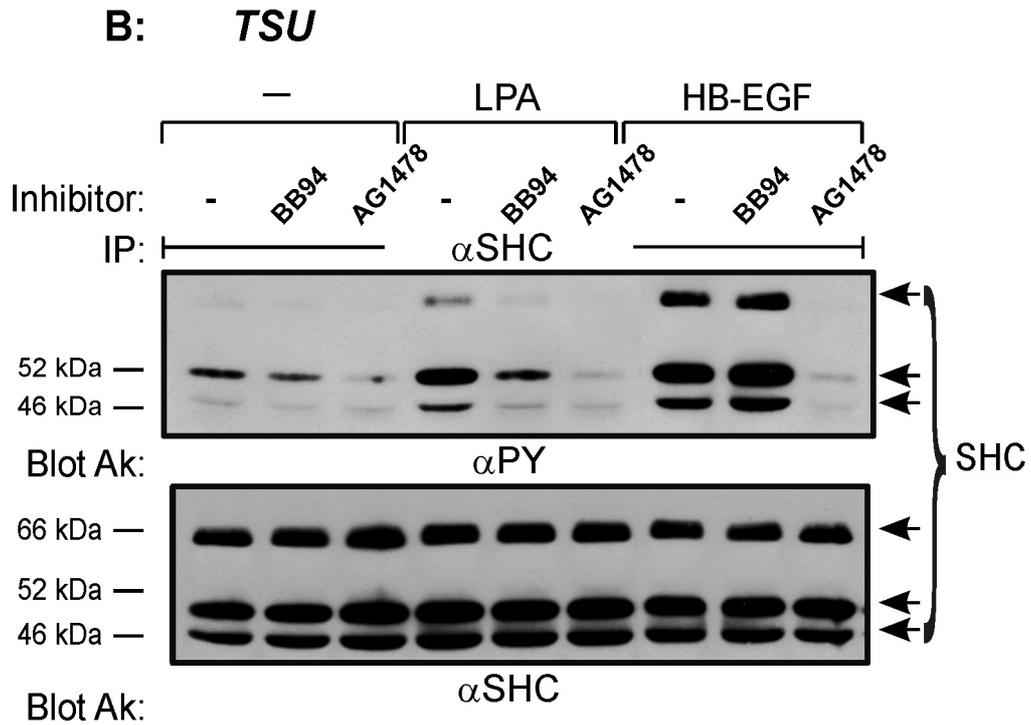
In diesem Abschnitt werden der EGFR Transaktivierung nachfolgende Signaltransduktionsschritte in Tumorzellen analysiert. Die Aktivierung der zellulären Signalproteine SHC, MAPK, FAK, PKC und Akt (PKB) wurde nach GPCR-Stimulation durch Peptidliganden in verschiedenen Zelllinien durch Westernblotanalysen in endogenen Experimenten getestet.

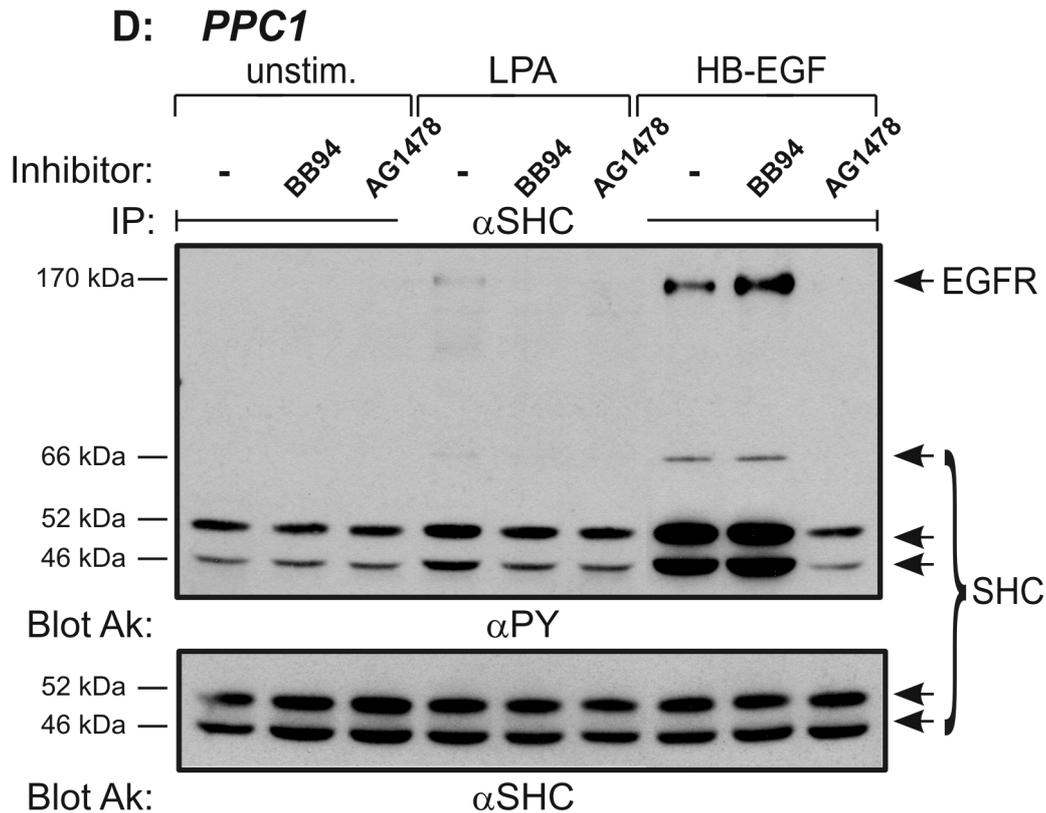
#### ***3.7.1 SHC Tyrosinphosphorylierung induziert von $G_q$ - und $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren in Abhängigkeit des EGFRs und Metalloproteasen***

Tyrosinphosphorylierung des Adapterproteins SHC ist ein prominenter, zeitlich nahegelegener Folgeschritt des EGFR-Signals im Signalweg der Transaktivierung (Daub et al., 1997). Deswegen wurde die Tyrosinphosphorylierung von SHC in PC3, TSU und PPC1 Prostatakarzinomzellen nach Stimulation mit LPA, Gastrin-Releasing-Peptide (GRP, *nur PC3-Zellen*) und Endothelin-1 (ET-1, *nur TSU-Zellen*) in Gegenwart oder Abwesenheit des Metalloproteaseinhibitors Batimastat (BB94) oder des spezifischen EGFR-Inhibitors Tyrphostin (AG1478) näher untersucht. Als weiteres System wurden FTC-133

Schilddrüsenkarzinomzellen einbezogen, die ebenfalls bereits auf ihre EGFR „Transaktivierbarkeit“ positiv getestet wurden und auf ähnliche Stimuli reagieren wie PC3 Zellen (siehe Abb. 10). Abb. 24 zeigt in allen vier Zelllinien eine LPA-induzierte, EGFR-vermittelte und Metalloprotease-sensitive SHC-Aktivierung. In den stark invasiven PC3 Prostatatumorzellen konnte dieses Ergebnis auch mit GRP als Stimulus bestätigt werden (Abb. 24A). Eine Bombesin- bzw. TPA-stimulierte SHC Phosphorylierung in PC3 Zellen (*Daten nicht gezeigt*) und eine Bombesin- bzw. Endothelin-1-Stimulation von SHC in FTC-133 Zellen (Abb. 24C) ist ebenfalls Batimastat- und Tyrphostin-sensitiv. Die HB-EGF- bzw. EGF-Kontrollstimulation wird, wie erwartet, nur durch AG1478 und nicht von BB94 beeinflusst.







**Abb. 24: GPCR-induzierte SHC Tyrosinphosphorylierung in Tumorzellen unter Einfluß von BB94 und AG1478:**

(A) Serum-gehungerte PC3 Zellen wurden in 10 cm Schalen für 20 min mit DMSO (Kontrolle), Batimastat (BB94, 10 $\mu$ M) oder Tyrphostin (AG1478, 250 nM) vorinkubiert, für 5 min mit LPA (5  $\mu$ M), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 200 nM) oder HB-EGF (5 ng/ml) stimuliert. Die Isoformen der SHC-Proteine wurden mit einem polyklonalen Antikörper ( $\alpha$ SHC) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 10%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.

(B) TSU Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät (3M Zellen/Schale) und Serum-gehungert. Das Experiment erfolgte analog zu (A), mit dem Unterschied, daß anstatt der GRP-Stimulation eine Endothelin-1 (ET-1, 200 nM) Behandlung der Zellen erfolgte (*Daten nicht gezeigt*).

(C) FTC-133 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und Serum-gehungert. Das Experiment erfolgte analog zu (A): 5 min Stimulation der Zellen mit Bombesin (200 nM), LPA (5  $\mu$ M), Endothelin (ET-1, 200 nM) bzw. EGF (1.5 nM).

(D) PPC1 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät (3M Zellen/Schale) und Serum-gehungert. Das Experiment erfolgte analog zu (A) mit den angegebenen Stimuli: LPA (5  $\mu$ M) und HB-EGF (5 ng/ml). *Nicht gezeigt*: Endothelin-1-Stimulation (200 nM)

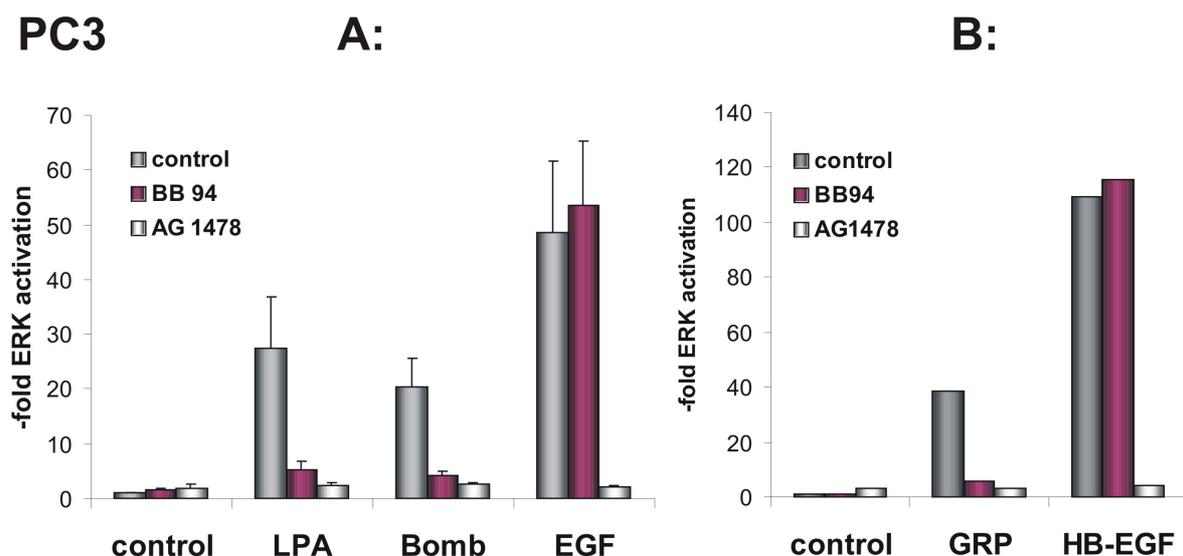
In den TSU Zellen konnte darüber hinaus eine Abnahme der SHC Tyrosinphosphorylierung in Gegenwart von BB94 und AG1478 nach Endothelin-1-Stimulation gezeigt werden (*Daten nicht gezeigt*). Auf MAP Kinase Ebene hingegen konnte keine Beeinflussung der GPCR-induzierten ERK1/2-Aktivität durch die Inhibitoren festgestellt werden (*Daten nicht gezeigt*), was bedeuten könnte, daß es in diesen Tumorzellen weitere aktive Signalwege von den GPCRs hin zur Aktivierung mitogener Antworten geben könnte. In PPC1 Zellen führte eine ET-1-Stimulation zu keiner signifikanten SHC Phosphorylierung (*Daten nicht gezeigt*).

Interessanter Weise ist in Abb. 24D in der LPA-stimulierten Probe eine Co-Präzipitation des EGFR zu beobachten, was die direkte Assoziation der SHC Proteine mit dem EGFR nach GPCR-Aktivierung auch in diesen Tumorzellen beweist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden PC3 Zellen und FTC-133 Zellen ausgewählt, um die EGFR Transaktivierung durch Bombesin-ähnliche Peptide auf MAPK (ERK1/2)-Aktivierung weiter zu untersuchen.

### 3.7.2 Sowohl EGFR- als auch Metalloproteaseinhibition beeinträchtigen die MAPK Aktivierung durch GPCR in Prostatakarzinomzellen

Um den weiteren Verlauf des Signals der EGFR Transaktivierung nach Peptid-Stimulation zu erkunden, wurden PC3 Zellen mit den Inhibitoren BB94 und AG1478 vorinkubiert und mit LPA, Bombesin und GRP stimuliert. Die Westernblottanalysen der ERK Phosphorylierung wurden anschließend quantifiziert und in Abb. 25 grafisch ausgewertet. Als Ergebnis läßt sich sowohl eine deutliche Metalloprotease-abhängigkeit des GPCR-Signals zeigen, als auch der Beweis erbringen, daß das durch die Neuropeptide (Bombesin, GRP) und LPA vermittelte, zur MAPK-Aktivierung führende Signal, in PC3 Zellen fast ausschließlich über den EGFR verläuft.



**Abb. 25: MAP Kinase Aktivierung durch Peptidliganden in PC3 Prostatakarzinomzellen**

Serumgehungerte PC3 Prostatakarzinomzellen wurden in 6-Loch-Schalen ausgesät, mit Bombesin (Bomb, 200 nM), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 200 nM), LPA (5  $\mu$ M), EGF (5 ng/ml) bzw. HB-EGF (5 ng/ml) nach 20

minütiger Vorbehandlung mit DMSO (Kontrolle), Batimastat (BB94, 5  $\mu$ M) oder Tyrphostin (AG1478, 250 nM) stimuliert. Es folgte ein Immunoblot der Totallysate mit einem Anti-Phospho-Erk1/2-Antikörper. Die Filter wurden nach ECL-Probe mit einer digitalen CCD-Kamera (Fuji LAS 1000) photographiert und mit dem Programm „Image Gauge“ für MAC quantifiziert. **(A)** zeigt den Mittelwert, gewonnen aus vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  STD, **(B)** weist ein repräsentatives Experiment von Vieren aus. Die Expressionskontrolle erfolgte bei jedem Experiment nach Ablösen des Primärantikörpers in einem Immunoblot der Filter mit polyklonalen ERK2-Antikörpern (*Daten nicht gezeigt*)

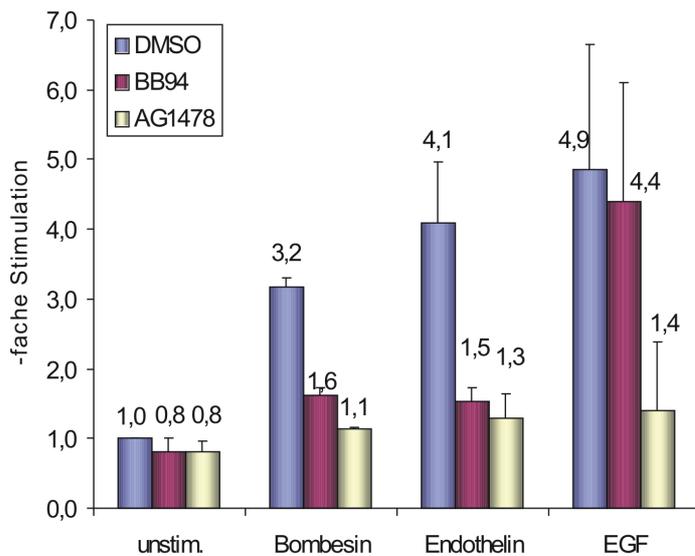
### **3.7.3 Metalloproteaseabhängigkeit der GPCR-induzierten Erk1/2-Stimulation in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen**

Um einen weiteren Einblick in den Signalweg der G-Protein-vermittelten MAP Kinase Aktivierung in Tumorzellen zu erhalten, wurde in FTC-133 Zellen die EGFR-Aktivität durch Vorbehandlung mit Tyrphostin (AG 1478) bzw. die Aktivität der Metalloproteasen durch Batimastat (BB94) blockiert und die ERK1/2 Phosphorylierung nach Bombesin-, Endothelin-1- bzw. EGF-Stimulation analysiert (Abb. 26).

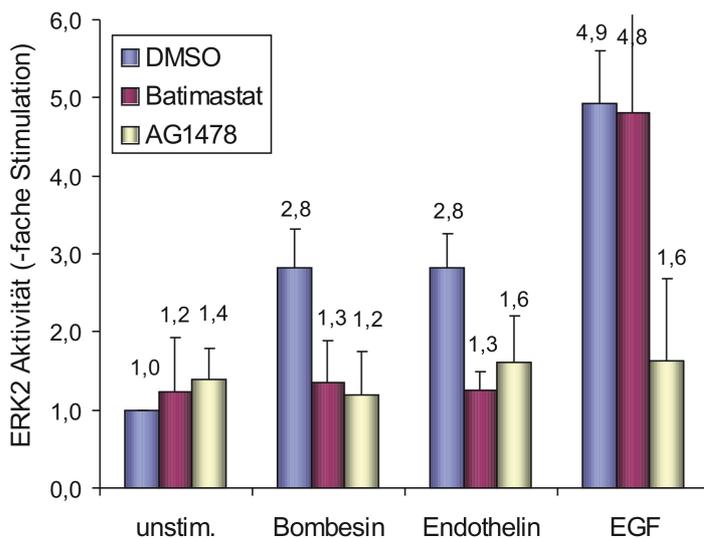
Die quantitative Auswertung der Westernblotanalyse der ERK1/2 Phosphorylierung mit Anti-Phospho-ERK-Antikörpern (Abb. 26A) zeigt hierbei ein vergleichbares Ergebnis wie die Ergebnisse des MAPK-Assays, bei dem die Aktivität der den Zell-eigenen, endogenen ERK2 durch radioaktive MBP Phosphorylierung gemessen wird (Abb. 26B). Beide Inhibitoren senken die GPCR-induzierte MAPK Phosphorylierung beinahe auf den basalen Wert ab. Das „Downstream“-Signal der verwendeten  $G_q$ -gekoppelten GPCR Liganden ist demnach stark Metalloprotease-abhängig. Auch der EGFR spielt somit bei der Vermittlung mitogener Antworten nach Stimulation von GPCRn in diesen Schilddrüsenkarzinomzellen, wie bereits bei PC3 Prostatakarzinomzellen (siehe 3.7.2) demonstriert, eine große Rolle. Ein davon abweichendes Ergebnis wurde zuvor in U1240 Glioblastomzellen gezeigt, in denen sich die MAPK-Aktivierung durch Bombesin und Carbachol als AG1478 insensitiv darstellte (Leserer, 1998). Diese Ergebnisse offenbaren erneut die starke Zelltypspezifität und die damit verbundenen Unterschiede in der Signalweiterleitung des EGFR Transaktivierungssignals.

Es sei noch erwähnt, daß in FTC-133 Zellen Neurotensin und GRP ebenfalls die MAPK-Aktivität anregen (im Experiment erwies sich GRP als stärkeres Stimulanz als Neurotensin, bei vergleichbarer Konzentration des Liganden) und diese Stimulation ebenfalls BB94 sensitiv war (*Daten nicht gezeigt*). Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht quantitativ ausgewertet.

### A: FTC133 - p-Erk Westernblot



### B: FTC133 - MAPK Assay



**Abb. 26: Quantifizierung der GPCR-induzierte Erk Aktivierung in FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen**

(A) zeigt die Quantifizierung von Phospho-ERK (p-Erk) Westernblotanalysen mit dreifachen Proben. Die Versuche wurden, wie in Abb. 10 beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden in 6-Loch Schalen ausgesät und gehungert. Die Inhibitor Vorinkubation erfolgte für 15 min mit DMSO (1:1000, Kontrolle), Batimastat (BB94, 10  $\mu$ M) bzw. Tyrphostin (AG1478, 250 nM), danach eine 6 minütige Stimulation der Zellen mit den Liganden Bombesin (BSN, 200 nM), Endothelin-1 (ET-1, 100 nM) oder EGF (1,5 ng/ml). Nach der Zellyse wurden die Proben mit Lämmli-puffer versetzt, mittels 15%iger SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit Anti-Phospho-ERK-Antikörpern immunogelblottet. Anschließend wurde die Chemolumineszenz der MAPK-Spur auf den Nitrozellulosemembranen nach ECL-Behandlung unter Verwendung einer digitalen CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000) aufgenommen und danach mit dem Programm „Image Gauge“ quantifiziert. Jede Säule weist den Mittelwert der drei unabhängigen Experimente aus (Mittelwert  $\pm$  STD). Die Expressionskontrolle erfolgte bei jedem Experiment nach Ablösen des Primärantikörpers in einem Immunoblot der Filter mit polyklonalen ERK2-Antikörpern (Daten nicht gezeigt)

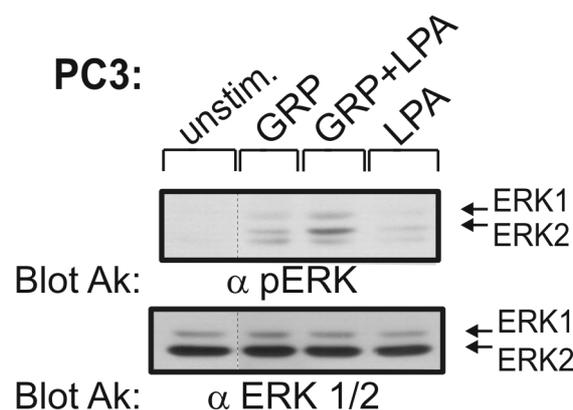
(B) zeigt je drei unabhängige Experimente eines MAPK-Assays (siehe 2.8.3): FTC-133 Zellen wurden für 24h das Serum entzogen mit dem EGFR-Inhibitor Tyrphostin (AG1478, 250 nM), Batimastat (BB94, 10  $\mu$ M)

respektive DMSO (1:1000, Kontrolle) vorinkubiert und mit den GPCR Liganden Bombesin (BSN, 200 nM) und Endothelin-1 (ET-1, 200 nM) bzw. EGF (1,5 ng/ml) für 10 min stimuliert. Die endogene MAP Kinase ERK2 wurde mit polyklonalem anti-ERK2-Antikörper immunpräzipitiert. Nach erfolgtem *in vitro* Kinase Assay mit MBP als künstlichem Substrat wurden die Proben mittels 15%iger SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die autoradiographische Quantifizierung der MBP Phosphorylierung mit einem Phosphoimager (Fuji) ausgewertet (Mittelwert  $\pm$  STD). Parallel hierzu wurde durch ERK2 Immunoblotanalyse sichergestellt, daß gleiche Mengen an ERK2 präzipitiert wurden (*Westernblot-Photos nicht gezeigt*).

Die kombinierten Ergebnisse von Abb. 25 und Abb. 26 zeigen eine klare Metalloprotease-abhängigkeit der ERK1/2 nach Stimulation mit Peptidliganden in PC3 und FTC-133 Tumorzellen.

#### 3.7.4 Additiver Effekt von LPA und GRP auf die MAP Kinase Aktivierung in PC3 Prostatakarzinomzellen

In PC3 Zellen konnte beobachtet werden, daß bei simultaner Stimulation der Zellen mit GRP und LPA eine Verstärkung der MAPK-Aktivität, im Vergleich zur Stimulation mit einem einzelnen Liganden, eintritt (Abb. 27). Dies könnte durch die unterschiedlichen Signalwege zu verstehen sein, die durch  $G_i$ - bzw.  $G_q$ -gekoppelte GPCRn angeregt werden, und sich somit die Signale addieren. In Tumorzellen könnte so durch autokrine oder parakrine Stimulation mit Neuropeptiden und GPCR Liganden des Serums eine Verstärkung des Tumorwachstums eintreten.



**Abb. 27: Additiver Effekt von LPA und GRP auf die MAP Kinase Aktivierung in PC3 Zellen**

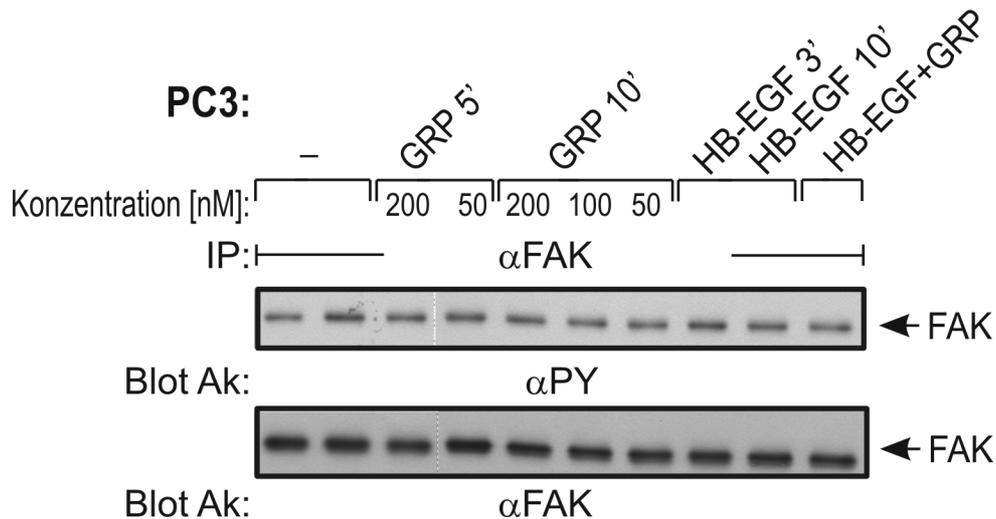
PC3 Zellen wurden nach 24h Serumentzug für 5 Minuten mit Gastrin Releasing Peptide (GRP, 100 nM), LPA (5  $\mu$ M) oder mit beiden Liganden stimuliert. Nach der Zellyse wurden Totallysate mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Phosphorylierte ERK1/2 wurde durch Immundetektion mit Anti-Phospho-ERK-Antikörpern sichtbar gemacht ( $\alpha$  pERK). Die Gegenprobe erfolgte mit polyklonalen ERK1 Antikörper (K 23). *Anmerkung: Aus den Originalphotos wurden einige, für die Abbildung nicht relevante Spuren entfernt. Helligkeit oder Kontrast wurden jedoch nicht verändert.*

### **3.7.5 Keine Phosphorylierung der ERK5 nach GPCR-Aktivierung in PC3 Zellen**

Mittels Anti-Phospho-ERK5-Antikörpern wurde im Westernblot von Lysaten stimulierter PC3 Zellen eine etwaige Involvierung der ERK5 in den EGFR Transaktivierungs-Signalweg untersucht. Es konnte allerdings keine Aktivierung von ERK5 nach LPA- und GRP-Stimulation der PC3 Zellen detektiert werden (*Daten nicht gezeigt*). Dieses Experiment leitete sich von Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe ab, in denen gezeigt wurde, daß eine EGF-Stimulation in Swiss 3T3 Zellen zu einer Aktivierung der endogenen ERK5 führt. Zudem konnte dort eine HA-getaggte ERK5, überexprimiert in COS-7 Zellen, durch LPA und Thrombin aktiviert werden (Buschbeck M., 2003 Dissertation).

### **3.7.6 Keine Aktivierung von Focal Adhesion Kinase (FAK) in PC3 und TSU Zellen nach GPCR-Stimulation**

Als wichtiger Faktor für die Aktivierung der Migration gilt die intrazelluläre Tyrosinkinase p125 FAK (*focal adhesion kinase; nonreceptor tyrosine kinase p125*). FAK ist in PC3 (Abb. 28) und TSU Zellen (*Daten nicht gezeigt*) konstitutiv aktiv und weder durch GRP noch durch LPA oder HB-EGF in seinem Tyrosinphosphorylierungsgrad beeinflussbar. Dies steht jedoch nicht zwingend im Widerspruch zu früheren Ergebnissen (Daub et al., 1996; Salazar et al., 2003) in denen eine EGFR unabhängige FAK und Paxillin Aktivierung durch GPCR-Stimulation gezeigt wurde. Es ist durchaus denkbar, daß FAK durch seine konstitutive Phosphorylierung das Signal weitergibt.



**Abb. 28: Keine nachweisbare FAK-Aktivierung nach GRP- und HB-EGF-Stimulation in PC3 Zellen**

PC3 Zellen wurden in 10cm-Schalen für 24h Serum-gehungert und mit der beschriebenen Konzentration an Gastrin Releasing Peptide (GRP) und/oder HB-EGF (5 ng/ml) für die angegebene Zeit stimuliert. Nach der Zellyse wurden aus den Lysaten endogenes FAK-Protein mit monoklonalem FAK-Antikörper ( $\alpha$ FAK) immunpräzipitiert, mittels 7,5%iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Immunoblotanalyse mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY) wurde dieser von dem Filter abgelöst und zur Expressionskontrolle mit einem monoklonalen Anti-FAK-Antikörper ( $\alpha$ FAK) immundetektiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment aus insgesamt vier verschiedenen, unabhängigen Versuchen. (Anmerkung: Aus den Originalblots wurden einige, für die Abbildung nicht relevante Proben entfernt. Helligkeit oder Kontrast wurden jedoch nicht verändert.)

### 3.8 Spielt die Protein Kinase C (PKC) im Signalweg der EGFR

#### Transaktivierung in den ausgewählten Krebszelllinien eine Rolle?

Für die Protein Kinase C (PKC) wurde gezeigt, daß sie entweder positiv (Adomeit et al., 1999; Kodama et al., 2002; Tsai et al., 1997) oder negativ (Li et al., 1998) an der GPCR-vermittelten Aktivierung des EGFRs beteiligt ist. In (Adomeit et al., 1999) wurde z.B. eine PKC-abhängige EGFR Signal-Transaktivierung in COS-7 Zellen gezeigt.

Wie bereits in Abb. 11 vorweggenommen, besteht Anlaß zur Vermutung, daß nicht in allen Zellen die Transaktivierung durch PKC vermittelt wird. Somit wurde die Rolle der PKC im Signalweg der EGFR Transaktivierung in verschiedenen Zelllinien von Prostatumoren und FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen untersucht.

### 3.8.1 In PC3 und TSU Prostatakarzinomzellen ist PKC nicht in die G-Protein-vermittelte Transaktivierung des EGFRs involviert

In den folgenden Abbildungen werden Ergebnisse von Experimenten zu Aufklärung der potentiellen Rolle der Protein Kinase C bei der Modulation der Rezeptorphosphorylierung in Prostatakrebszellen vorgestellt. In PC3 Zellen wird sowohl die LPA- und GRP-induzierte Transaktivierung als auch die direkte Stimulation des Rezeptors mit HB-EGF nicht von der Gegenwart des spezifischen PKC-Inhibitors GF109203X beeinträchtigt (Abb. 29). Auch mit Neurotensin als Stimulus verhält es sich in vergleichbar Weise (siehe Abb. 11). Hingegen führt die direkte intrazelluläre Stimulation der PKC durch Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster TPA zu einer EGFR Tyrosinphosphorylierung, die deutlich durch GF109203X außer Kraft gesetzt wird. Phosphorylierung von SHC-Proteinen, die im unteren Teil der Abb. 29 veranschaulicht wird, spiegelt dieses Ergebnis sehr klar wieder, und ist unter diesen experimentellen Bedingungen in Übereinstimmung mit dem EGFR-Aktivierungsstatus.

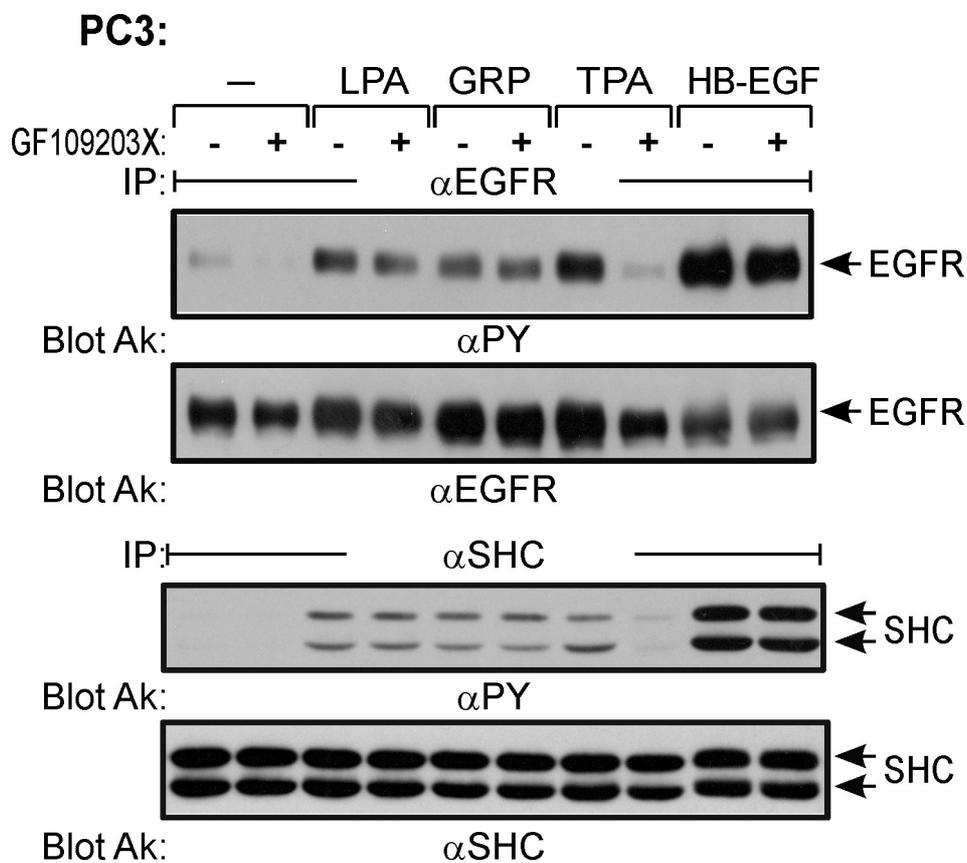


Abb. 29: GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung ist in PC3 Zellen PKC unabhängig

PC3 Zellen wurden für 24h in Serum-freiem Medium gehalten, anschließend mit dem PKC-Inhibitor GF109203X (+, 1  $\mu$ M) oder DMSO (-, 1  $\mu$ l/ml) für 20 min. vorinkubiert und danach für 5 min mit den Liganden LPA (5  $\mu$ M), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 100 nM), HB-EGF (5 ng/ml) oder für 10 min TPA (1  $\mu$ M) behandelt und danach lysiert.

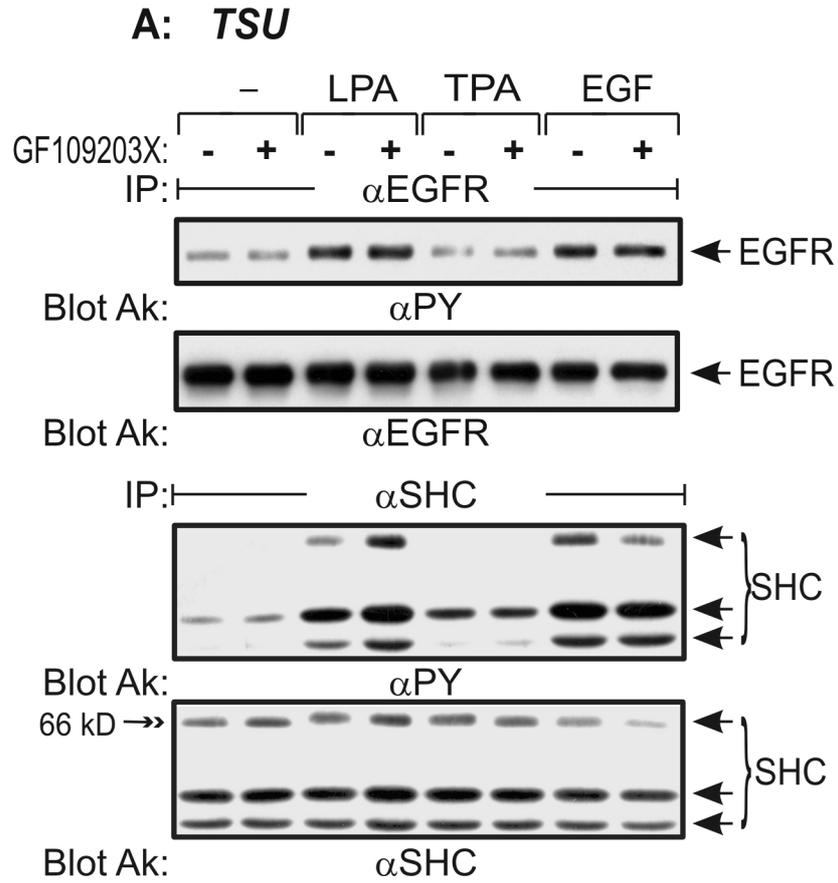
$\alpha$ EGFR IP: Es erfolgte eine Immunpräzipitation gegen monoklonale EGFR-Antikörper (108.1) und anschließender Westernblot gegen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen des ersten Antikörpers wurde derselben Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper immundetektiert ( $\alpha$ EGFR).

$\alpha$ SHC IP: Die SHC-Isoformen wurden mit polyklonalen Anti-SHC-Antikörpern ( $\alpha$ SHC) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der anschließende Westernblot erfolgte mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen dieses Primärantikörpers erfolgte ein SHC-Immunoblot gegen monoklonale Anti-SHC-Antikörper ( $\alpha$ SHC).

Als TSU Prostatakarzinomzellen vergleichbaren Experimenten unterworfen wurden, konnte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von PC3 Zellen, weder die LPA-induzierte noch die EGF-stimulierte EGFR-, SHC- oder ERK1/2 Aktivierung durch Inhibition der PKC beeinflusst werden (Abb. 30). Interessanter Weise führte eine TPA-Stimulation in diesen Zellen zu keiner signifikanten EGFR Tyrosinphosphorylierung sondern nur zu einer sehr geringen Phosphorylierung des Adapterproteins SHC. Das Ergebnis des Experiments konnte in einem zweiten reproduziert werden (*Daten nicht gezeigt*). Die Wirksamkeit des GF-Inhibitors konnte in diesem Versuch durch Aufhebung des LPA- und TPA-induzierten „SHC-Shiftes“ der 66 kD-Isoform bewiesen werden (*siehe  $\alpha$ SHC-Blot*). Dagegen werden „Downstream“-Signale, wie die ERK1/2, sehr wohl durch einen offensichtlich PKC-abhängigen, aber EGFR-unabhängigen Mechanismus durch TPA aktiviert. Die LPA-vermittelte MAPK-Aktivierung geschieht allerdings wiederum ohne signifikante Beteiligung der PKC (Abb. 30B).

Die Behandlung von PPC1 Prostatakarzinomzellen mit dem PKC-Inhibitor GF109203X führte ebenfalls zu keiner Inhibition der LPA-induzierten EGFR-Transaktivierung (*Daten nicht gezeigt*).

Zusammengefaßt kann gesagt werden, daß PKC offenbar keine ausschlaggebende Rolle für eine, durch Neuropeptide oder LPA ausgelöste, GPCR-vermittelte Transaktivierung des EGFRs in den erforschten Prostatakrebszelllinien spielt.



**B: TSU**

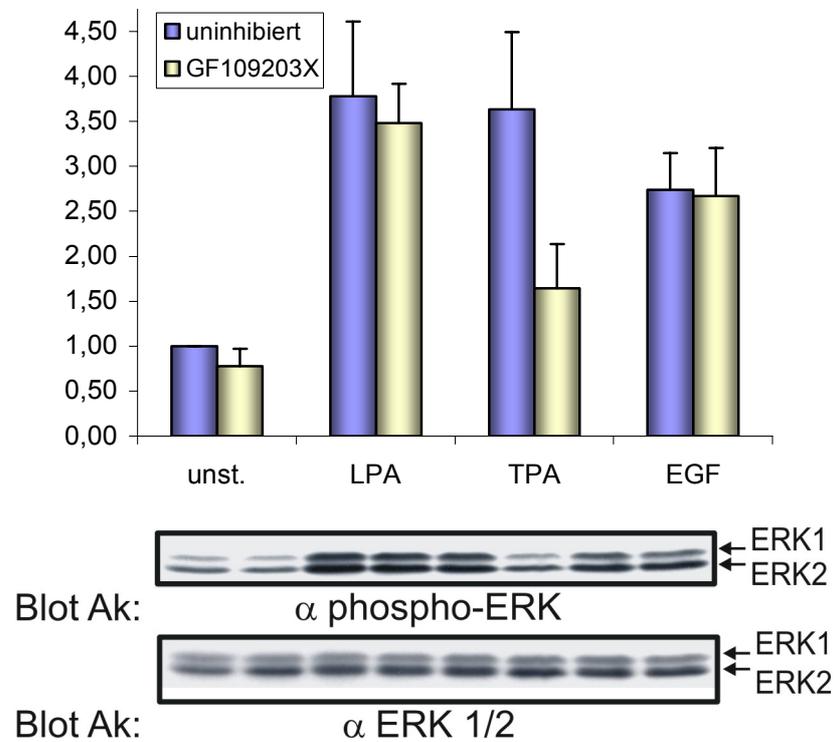


Abb. 30: PKC Unabhängigkeit des LPA-vermittelten EGFR Transaktivierungssignals in TSU Zellen

(A) TSU Prostatakarzinomzellen (in 10 cm Schalen) wurde für 24 h das Serum entzogen. Die Zellen wurden mit dem PKC-Inhibitor GF109203X (+, 1  $\mu$ M) oder DMSO (-, 1  $\mu$ l/ml) für 20 min vorinkubiert und danach mit den Wachstumsfaktoren LPA (5  $\mu$ M, 5 min), TPA (1  $\mu$ M, 10 min) oder EGF (3 ng/ml, 5 min) stimuliert und anschließend lysiert.

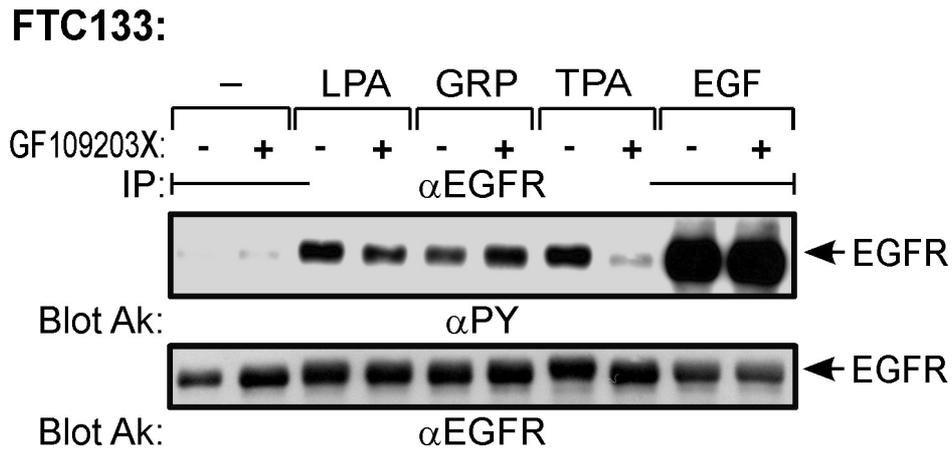
$\alpha$ EGFR IP: Der endogene EGFR wurde mit monoklonalem  $\alpha$ EGFR-Antikörper (108.1) immunpräzipitiert, danach die Proben durch 7,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach erfolgter Immundetektion mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ( $\alpha$ PY) wurde der Filter nach Ablösen des Primärantikörpers mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR) inkubiert, um gleiche Expressionen sicherzustellen.

$\alpha$ SHC IP: Die SHC-Isoformen wurden mit polyklonalen SHC-Antikörpern ( $\alpha$ SHC) immunpräzipitiert und nach Auftrennung der Proteine mittels 7.5%iger SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der anschließende Westernblot erfolgte mit einem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 ( $\alpha$ PY). Nach Ablösen dieses PY-Antikörpers geschah ein SHC-Immunoblot gegen monoklonale Anti-SHC-Antikörper ( $\alpha$ SHC).

(B) TSU Prostatakarzinomzellen wurde für 24 h das Serum entzogen. Die Zellen wurden mit dem PKC-Inhibitor GF109203X (GF, 1  $\mu$ M) oder DMSO (1:1000, uninhibiert) für 20 min. vorinkubiert und anschließend zum Teil mit LPA (5  $\mu$ M), TPA (1  $\mu$ M) oder EGF (3 ng/ml) stimuliert. Nach der Zellyse wurden die Proben mit Lämmli-puffer versetzt und mittels 15%iger SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte ein Immunoblot mit Anti-Phospho-ERK-Antikörpern. Anschließend wurde die Chemolumineszenz der MAP Kinase-Banden auf den Nitrozellulosemembranen nach ECL-Behandlung unter Verwendung einer digitalen CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000) fotografiert und mit dem MAC-Programm „Image Gauge“ quantifiziert. Jede Säule weist den Mittelwert dreier Experimente aus (Mittelwert  $\pm$  StAbw). Die Expressionskontrolle erfolgte bei jedem Experiment nach Ablösen des Primärantikörpers in einem Immunoblot der Filter mit polyklonalen Anti-ERK2-Antikörpern. Die untere Abbildung zeigt Photos eines repräsentativen Experiments der oben ausgewerteten Westernblotanalysen.

### **3.8.2 Auch in FTC-133 Zellen vermittelt PKC keine EGFR Transaktivierung**

Auch in FTC-133 Zellen konnte keine signifikante Inhibition der GPCR-vermittelten Transaktivierung des EGFRs durch den PKC-Inhibitor GF109203X beobachtet werden (Abb. 31). Überdies läßt sich die GRP-induzierte SHC Phosphorylierung durch Blockierung der PKC nicht unterdrücken (*Daten nicht gezeigt*). Diese Ergebnisse von 3.8.1 und 3.8.2 lassen auf einen Zelltyp-übergreifenden, PKC-unabhängigen EGFR Signal-Transaktivierungsmechanismus in Tumorzellen schließen.

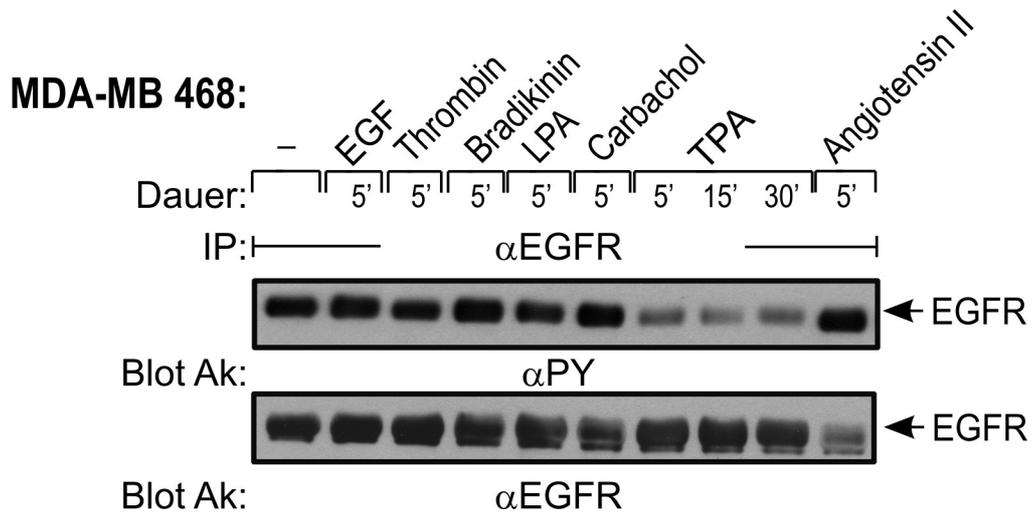


**Abb. 31: Rolle der PKCs bei der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung in FTC-133 Zellen**

FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen wurden 24h Serum gehungert, 20 min mit dem PKC-Inhibitor GF109203X (+) oder DMSO (-, 1:1000) vorinkubiert und anschließend mit den angegebenen Liganden stimuliert: LPA (5  $\mu$ M), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 100 nM), EGF (1,5 ng/ml) für 5 min oder TPA (1  $\mu$ M) für 10 min. Nach der Zellyse erfolgte eine Immunpräzipitation gegen monoklonale EGFR-Antikörper (108.1) und anschließender Westernblot gegen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (4G10,  $\alpha$ PY). Nach Ablösen des Primärantikörpers wurde derselbe Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper immundetektiert ( $\alpha$ EGFR).

### **3.8.3 TPA verringert den basalen Phosphotyrosingehalt des EGFRs in BT-20 und MDA-MB 468 Mammakarzinomzellen**

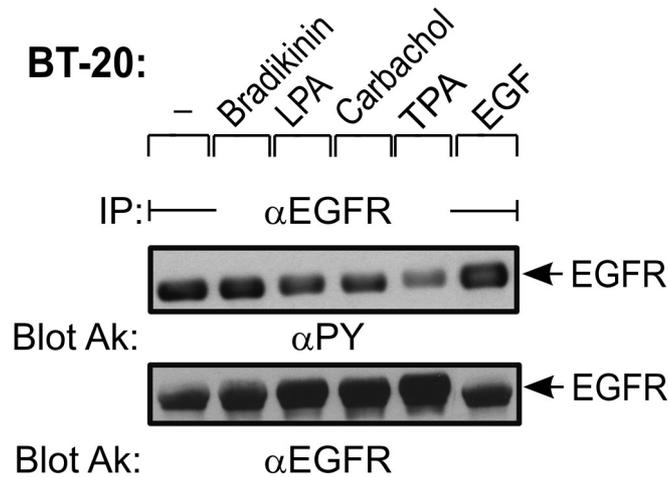
Wie in Tabelle 3 berichtet, weisen BT-20 und MDA-MB 468 Mammakarzinomzellen eine sehr hohe Basalphosphorylierung auf, und somit war in diesen Zelllinien keine EGFR Transaktivierung nachweisbar. Interessanterweise konnte aber eine Reduktion des EGFR Phosphotyrosingehalts nach Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster TPA beobachtet werden (Abb. 32 und Abb. 33). Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß Phosphatasen durch TPA aktiviert werden, die ihrerseits den EGFR dephosphorylieren und so zu der beobachteten „Downregulierung“ des Rezeptors beitragen.



**Abb. 32: Verringerung der basalen EGFR Tyrosinphosphorylierung durch TPA in MDA-MB-468 Zellen**

MDA-MB-468 Mammakarzinomzellen wurden für 24h Serum-gehungert und in 6-Loch-Schalen (400.000 Zellen/Probe) für die angegebene Zeit mit 3 ng/ml EGF, 2 U/ml Thrombin, 1  $\mu$ M Bradykinin, 10  $\mu$ M LPA, 1 mM Carbachol, 1  $\mu$ M Angiotensin II oder 1  $\mu$ M TPA stimuliert. Nach der Zellyse wurde endogenes EGFR-Protein mit monoklonalem Anti-EGFR-Antikörper (108.1) immunpräzipitiert und durch 7,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte ein Immunoblot mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern (4G10,  $\alpha$ PY). Nach Ablösen des Primärantikörpers wurde der Filter mit polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper immundetektiert ( $\alpha$ EGFR).

Die anderen getesteten Stimuli zeigten in beiden Brustkrebszelllinien keinen signifikanten positiven oder negativen Einfluß auf die EGFR Tyrosinphosphorylierung. In einer Analyse der Totallysate des Experiments mit BT-20 Zellen auf ihren Phosphotyrosingehalt konnte eine klare Aktivierung mehrerer Proteine (unter anderem vermutlich MAP Kinasen und SHC) in den LPA-, Carbachol-, EGF- und TPA-stimulierten Proben gefunden werden (*Daten nicht gezeigt*), was darauf hinweist, daß die Zellen die entsprechenden Rezeptoren besitzen und auf die genannten Stimuli mit „Downstream“-Signalen reagieren. Auf eine genaue Analyse der aktivierten Signalproteine wurde im Rahmen der Arbeit allerdings verzichtet.



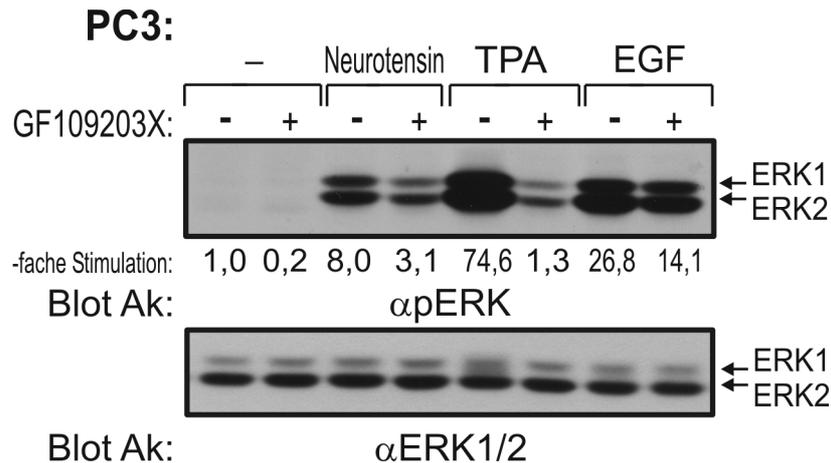
**Abb. 33: Abnahme der basalen EGFR-Aktivität durch TPA in BT-20 Brustkrebszellen**

Für 24h Serum-gehungerte BT-20 Mammakarzinomzellen wurden in 10 cm Schalen (2,2 M Zellen/Probe) entweder unstimuliert belassen oder für 4 min mit 3 ng/ml EGF, 1  $\mu$ M Bradykinin, 1 mM Carbachol, 10  $\mu$ M LPA oder 10 min mit 1  $\mu$ M TPA stimuliert. Der endogene EGFR wurde nach der Zellyse mit monoklonalem Anti-EGFR-Antikörper (108.1) immunpräzipitiert und durch anschließende 7,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte eine Immundetektion mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern (4G10,  $\alpha$ PY). Die Expressionskontrolle erfolgte mit einem polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper ( $\alpha$ EGFR).

### **3.8.4 Rolle der PKC bei der GPCR-stimulierten MAPK- und Akt-Signalaktivierung in PC3 Zellen**

Im Folgenden sollen nun auch in Versuchen mit PC3 Prostatakarzinomzellen die späteren Signalwege der GPCR-induzierten Transaktivierung des EGFRs in Hinsicht auf ihre PKC Abhängigkeit analysiert werden.

Es konnte gezeigt, daß die MAP Kinase Aktivierung durch Neurotensin nur schwach durch den PKC-Inhibitor GF109203X beeinflusst wird (Abb. 34). Die Tyrosinphosphorylierung der unstimulierten Probe und der EGF-stimulierten Kontrolle wird jedoch ebenfalls sichtlich vermindert (*siehe Quantifizierung*). Dies könnte auf unerwünschte Nebenwirkungen des Inhibitors zurückzuführen sein. Das Phosphorylierungssignal der TPA Kontrolle wird hingegen fast vollständig durch den Inhibitor ausgelöscht. Somit ist die Neurotensin-induzierte MAPK-Aktivierung in PC3 Zellen ebenso als PKC unabhängig einzustufen.



**Abb. 34: Schwache Inhibition der Neurotensin-induzierten MAP Kinase Aktivierung durch GF109203X in PC3 Zellen**

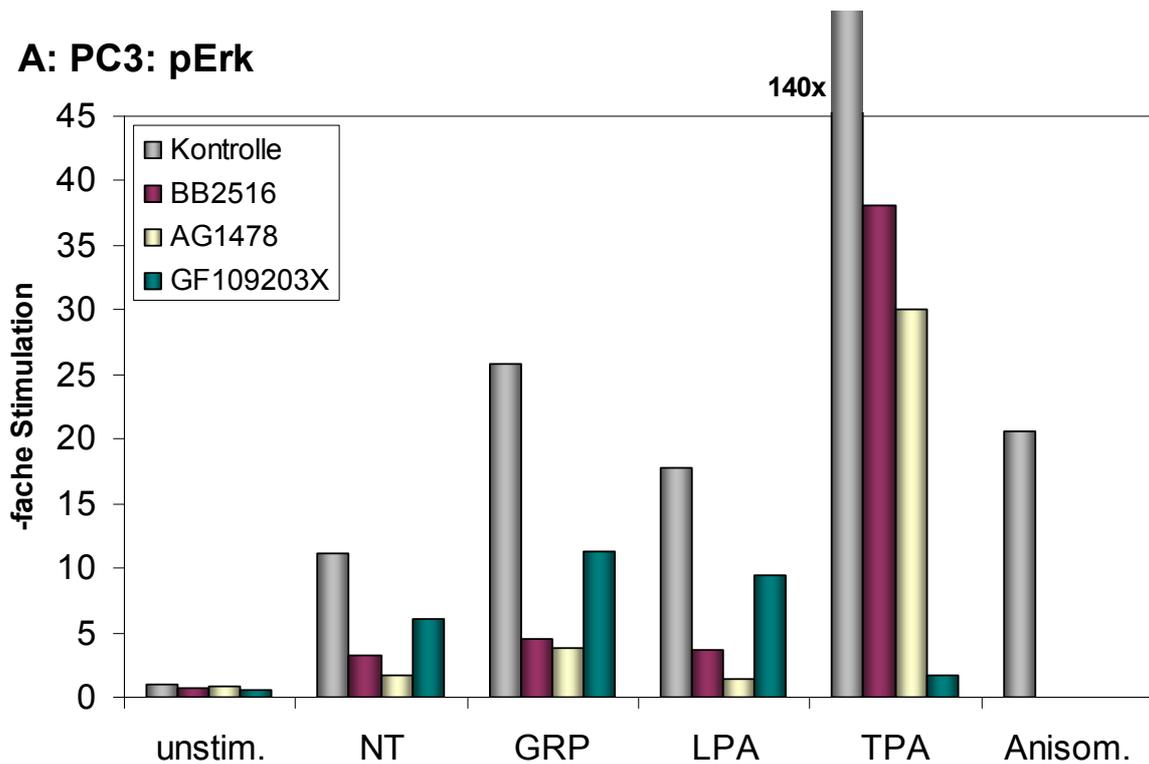
PC3 Zellen wurden nach 24h Serumentzug 20 min mit dem PKC-Inhibitor GF109203X (+, 1  $\mu$ M) oder DMSO (-, 1:1000) vorinkubiert und anschließend mit Neurotensin (50 nM, 5 min), TPA (1  $\mu$ M, 10 min) oder EGF (5ng/ml, 5 min) stimuliert. Nach der Zellyse wurden Totallysate mittels 15%iger SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Phosphorylierte ERK1/2 wurde durch Immundetektion mit Anti-Phospho-ERK1/2-Antikörpern sichtbar gemacht ( $\alpha$ pERK). Die Quantifizierung der Chemuluminiszenz der ECL-Reaktion erfolgte mit Hilfe einer digitalen CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000). Die Expressionskontrolle erfolgte mit polyklonalen Anti-ERK1-Antikörper (K 23).

Weiterhin wurden PC3 Zellen, die mit dem Metalloproteaseinhibitor Marimastat (BB2516), dem EGFR-Inhibitor Tyrphostin (AG1478) oder dem PKC-Inhibitor GF109203X vorbehandelt wurden, mit GPCR Liganden bzw. dem PKC-Aktivator TPA stimuliert. Abb. 35A zeigt die grafische Darstellung der Quantifizierung von Westernblotanalysen dieser Versuche. Das Experiment läßt eine partielle Inhibition der MAP Kinaseaktivität durch den PKC-Inhibitor in diesen Prostatakarzinomzellen vermuten. Diese Reduktion der Tyrosinphosphorylierung könnte jedoch ebenfalls durch die Verringerung der basalen Phosphorylierung (*Probe: unstim./GF109203X*) durch den GF-Inhibitor herrühren, wie es beim Experiment von Abb. 34 bereits diskutiert wurde. Es wären aber durchaus zwei Signalwege von der Zelloberfläche zum Zellkern denkbar: ein PKC-abhängiger „Downstream“-Weg, ohne Beteiligung des EGFRs und ein Weg über den EGFR, ohne Beteiligung der PKCs.

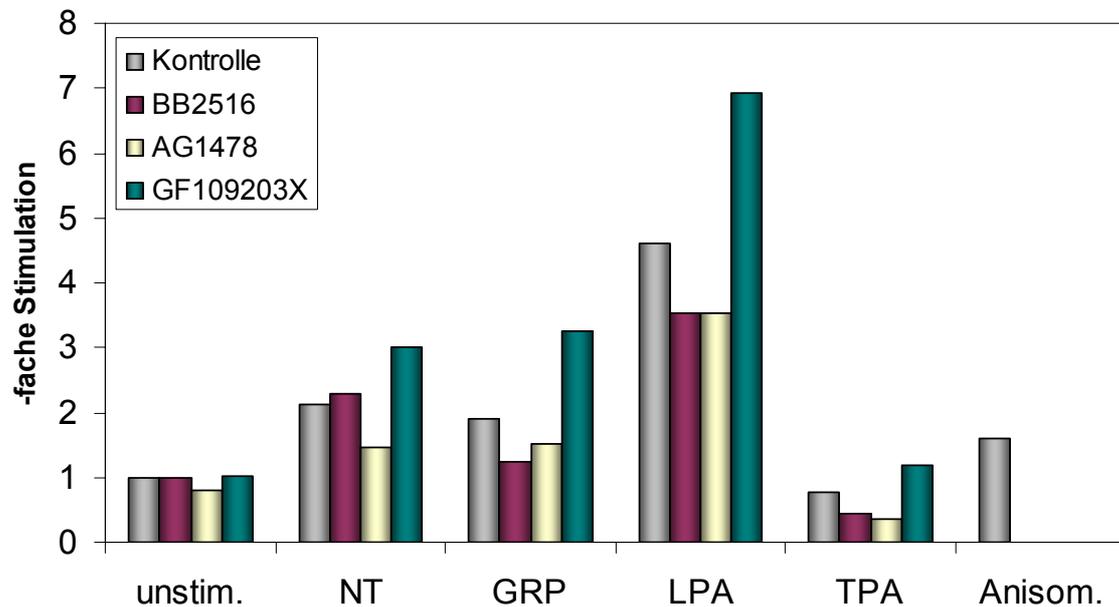
Weiterhin wurde die Rolle des EGFRs, Metalloproteasen und der PKCs auf die Akt/PKB Aktivierung untersucht. Durch das „Ausschalten“ der PKCs durch GF109203X wird das Akt/PKB-Signal sogar noch zusätzlich verstärkt, wohingegen im pERK-Immunoblot die sehr starke TPA-induzierte Aktivierung der MAPK durch den PKC-Inhibitor vollständig ausgelöscht wird. Es scheint, daß der Inhibitor auf Akt-Ebene unter diesen Bedingungen unerwünschte Folgen, eventuell verursacht durch einen Streß-Stimulus des Inhibitors selbst,

mit sich bringt. Auch Metalloproteasen und der Signalweg über den EGFR spielen bei der Akt-Aktivierung in diesen Zellen nur eine untergeordnete Rolle, da Marimastat und Tyrphostin das GPCR-Signal nur teilweise inhibieren können. Anisomycin, ein Antibiotikum, das die Proteinsynthese hemmt und das Streß-aktivierte Proteinkinasen und die MAPK aktiviert, wurde als Positivkontrolle für die Akt/PKB Aktivierung in diesem Versuch mitgeführt (siehe Abb. 35A).

### A: PC3: pErk



### B: PC3: pAkt



**Abb. 35: Partielle Inhibierung der MAP Kinaseaktivität durch PKC-Inhibition in PC3 Zellen:**

PC3 Zellen wurden nach 24h Serumentzug 20 min mit den Inhibitoren Marimastat (BB2516, 10  $\mu$ M), Tyrphostin (AG1478, 250 nM) GF109203X (1  $\mu$ M) oder DMSO (Kontrolle, 1:1000) vorinkubiert und anschließend für 5 Minuten mit Neurotensin (50 nM), Gastrin Releasing Peptide (GRP, 100 nM), LPA (5  $\mu$ M), Anisomycin (Anisom.) oder TPA (1 $\mu$ M, 10 min) stimuliert. Nach der Zellyse wurden Totallysate mittels 10%iger SDS PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden geteilt und die obere Hälfte gegen polyklonalen  $\alpha$ -Akt/PKB-Antikörper (**B**), die untere Hälfte gegen polyklonalen  $\alpha$ pERK-Antikörper (**A**) geblottet und anschließend wieder zur ECL-Analyse zusammengesetzt. Danach wurde die Chemolumineszenz der entsprechenden Banden unter Verwendung einer digitalen CCD-Kamera (Fujifilm LAS-1000) photographiert und mittels „Image Gauge“ quantifiziert. Nach Ablösen der Primärantikörper wurden die Filter zur Expressionkontrolle gegen polyklonalen Anti-ERK1-Antikörper respektive gegen polyklonalen Anti-Akt1/2-Antikörper immunodetektiert (*Photos nicht gezeigt*).

### 3.9 Ermittlung der pathophysiologischen Rolle der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung in Tumorzellen

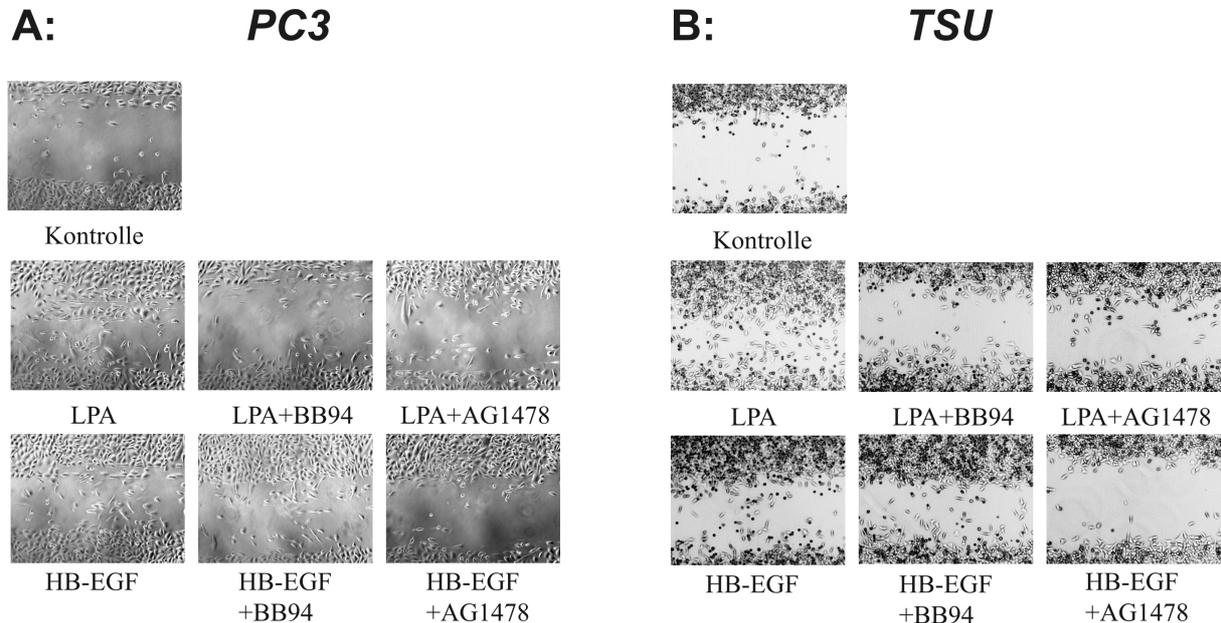
Invasion und Metastasierung sind Schlüsselemente von Krebs (Hanahan and Weinberg, 2000). Das Einwandern (Invasion) der Zellen in andere Gewebe setzt eine verstärkte Zellmotilität voraus. Daher wurde in dieser Arbeit die Rolle des EGFR bei der Migration und Invasion von verschiedenen Tumorzellen nach GPCR-Stimulation, als Beispiel für einen pathophysiologischen Vorgang, experimentell untersucht.

#### ***3.9.1 Die G-Protein-vermittelte Migration von Krebszellen ist EGFR- und Metalloprotease-abhängig***

(Aprikian et al., 1997) zeigten bereits früher eine Verstärkung der Migrationsfähigkeit von PC3 Zellen nach Bombesin-Stimulation. Dies soll in diesen Zellen nun auch im Zusammenhang mit der EGFR Transaktivierung untersucht werden.

Ein *in vitro* Zell-Monolayer-Wundschließungsversuch kann als Model für die Zellmigration herangezogen werden. Im diesem „Wounding“- oder „Scratch-Assay“ entsteht eine erhöhte Ligandenkonzentration innerhalb einer zellfreien Zone (Wunde) nach Zugabe der jeweiligen Stimuli, da diese nicht sofort von dem konfluenten Zellrasen weggefangen werden. Somit migrieren und wachsen die Zellen bevorzugt in die Wunde hinein und wetteifern so um die dort vorhandenen Wachstumsfaktoren. Die Liganden- oder Inhibitorgabe beschleunigt bzw. verlangsamt diese Zellwanderung in die Wunde.

In Abb. 36 soll zunächst anhand zweier Experimente ein Eindruck der entstandenen Bilder vermittelt werden.



**Abb. 36: LPA beschleunigt die Wundschließung in PC3 und TSU Zellen**

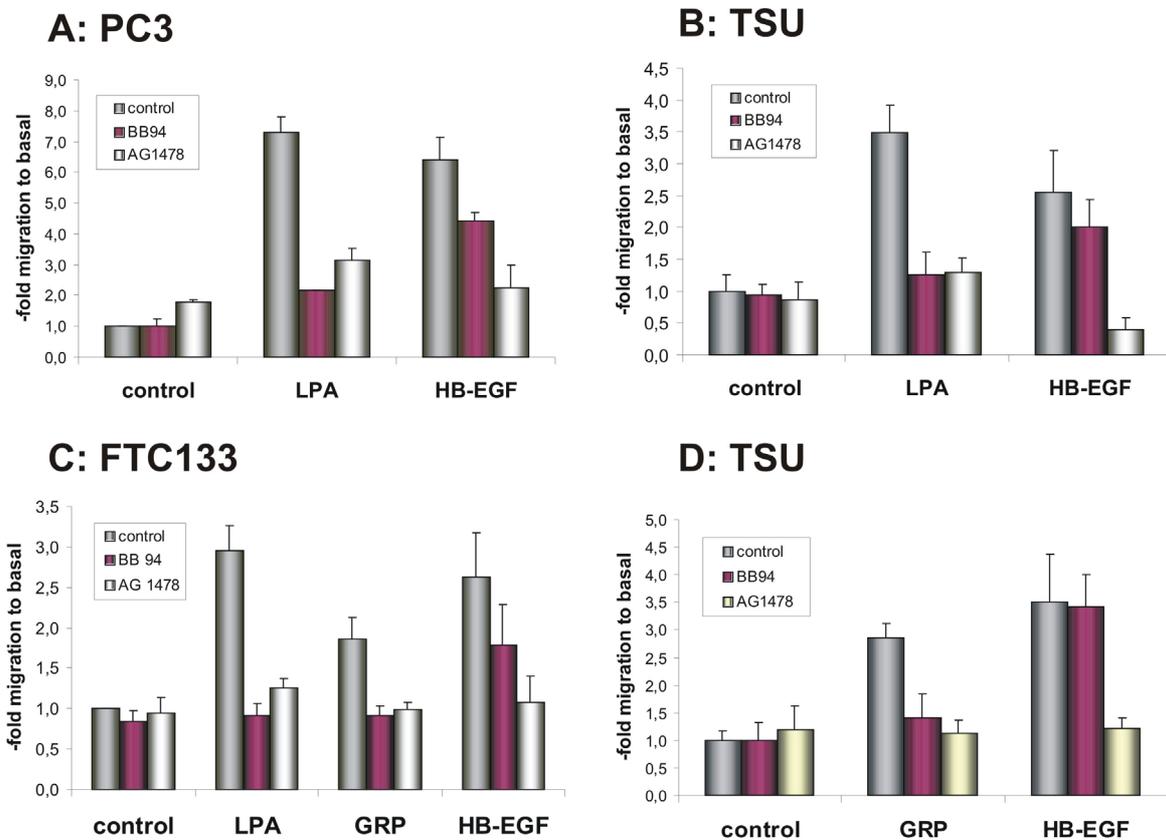
„Wundheilungs-Assay“: Originalaufnahmen des Phasenkontrastmikroskops

(A) zeigt repräsentative Photos der in Abb. 37A ausgewerteten Experimente mit PC3 Prostatakarzinomzellen nach 24h Stimulation mit den angegebenen Stimuli bzw. Inhibitoren.

(B) zeigt repräsentative Photos des in Abb. 37B ausgewerteten Experiments mit TSU Prostatakarzinomzellen nach 24h Stimulation mit den angegebenen Stimuli bzw. Inhibitoren.

Zur genaueren Ermittlung der Migrationsfähigkeit der Zellen nach Behandlung mit den Reagenzien wurden die in die „Wunde“ migrierten Zellen, wie in (2.8.4) beschrieben, ausgezählt und ihr Mittelwert in Abb. 37 grafisch dargestellt.

In allen gezeigten Zelllinien konnte eine klare Stimulation der Zellmigration durch das Serumpeptid LPA nachgewiesen werden. In FTC-133 und TSU Zellen konnte darüber hinaus eine beschleunigte Wundschließung durch das Neuropeptid GRP beobachtet werden. Die durch LPA bzw. GRP hervorgerufene Förderung der Migration und Wundschließung konnte sowohl durch den Metalloproteaseinhibitor Batimastat (BB94) als auch durch den EGFR-Inhibitor Tyrphostin (AG1478) drastisch gehemmt werden. In TSU und FTC-133 Zellen war diese Inhibition sogar bis auf basales Niveau möglich (Abb. 37B, C und D). Dies verdeutlicht, daß die durch GPCR-Stimulation verstärkte Migration in den untersuchten Zelllinien sowohl von Metalloproteasen als auch vom EGFR vermittelt wird.



**Abb. 37: Quantifizierung von „Wounding Assays“ dreier getesteter Tumorzelllinien**

Die Experimente wurden wie in *Material und Methoden* (2.8.4) beschrieben, durchgeführt.

(A) zeigt die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. PC3 Zellen wurden 24h bei 0,5% FCS-haltigen Medium vorgehungert, da diese Zellen in serumfreiem Medium auf der Petrischale nur noch wenig anhaften und sie sich nach dem Kratzen mit der Pipettenspitze beim Waschen der Zellen ablösen würden. Nach dem „Scratch“ und dem Waschen der Zellen erfolgte die Vorinkubation für 20 min entweder als Kontrolle mit DMSO (1:1000) oder den Inhibitoren Batimastat (BB94, 5  $\mu$ M) bzw. Tyrphostin (AG1478, 250 nM). Anschließend wurden die Zellen mit LPA (2,5  $\mu$ M), GRP (100 nM) bzw. HB-EGF (20 ng/ml) für 24h in Serum-freiem Medium stimuliert.

(C) zeigt die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen wurden einen Tag nach dem Aussähen für 2x 24h Serum-gehungert. Die Stimulation erfolgte nach dem „Scratch“ und dem Waschen der Zellen für 24h mit LPA (2,5  $\mu$ M), GRP (100 nM) bzw. HB-EGF (20 ng/ml).

(B) und (D) zeigen zwei unabhängige Experimente. TSU Zellen wurden 24h bei 0,5% FCS vorgehungert und danach 24h bei in serumfreiem Medium belassen. Nach dem „Scratch“ und dem Waschen der Zellen erfolgte die Stimulation mit LPA (2,5  $\mu$ M), GRP (100 nM) bzw. HB-EGF (20 ng/ml) für 24h.

### 3.9.2 Zusammenfassung der Wounding-Assay Ergebnisse:

Weitere Tumorzelllinien sollen in „Scratch“-Assay-Experimente auf ihre Migrationsfähigkeit nach Liganden-Stimulation getestet werden. Die Ergebnisse aller durchgeführten Versuche sind in Tabelle 6 zusammengefaßt:

Tumor	Zelllinie	Migrationsfähigkeit der Zellen durch G-Protein-Ligand stimulierbar	BB94 sensitiv	AG1478 sensitiv
Prostata	PC3	LPA(Abb. 37), GRP (negativer Effekt)	Ja	Ja
Prostata	PPC1	LPA	Ja	Ja
Prostata	TSU	GRP (Abb. 37)	Ja	Ja
Prostata	DU-145	keine Migration; nur LPA verengte die Wunde, aber nicht durch BB94 u. AG1478 inhibierbar	Nein	Nein
Prostata	LnCaP	keine Migration, Zelltod nach 3 Tagen nach TPA-Stimulation beobachtet		
Schilddrüse	FTC-133	LPA, GRP (Abb. 37)	Ja	Ja
Brust	MDA-MB 435s	Migration in diesen Zellen beobachtet		

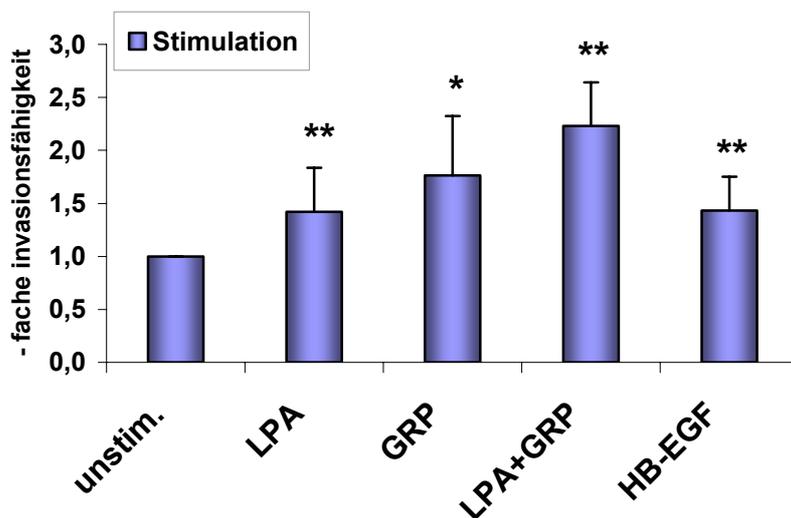
Tabelle 6: Zusammenfassung der Migrations-Assay Ergebnisse verschiedener Zelllinien

### 3.9.3 EGFR- und Metalloprotease-abhängige Invasion von Prostatakarzinomzellen

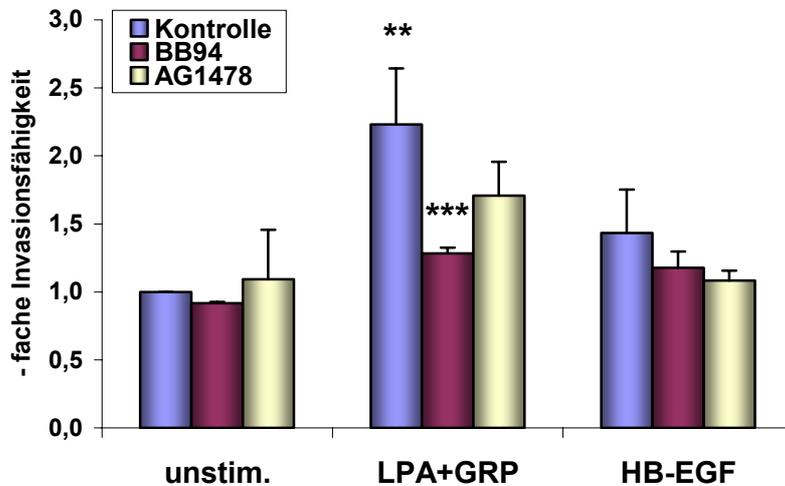
Das Durchdringen der extrazellulären Matrix stellt einen Schlüsselschritt bei der Tumorausbreitung und der Invasion bei Krebszellen dar. Bereits 1994 konnte eine Induktion der Invasionsbereitschaft von PC3 Prostatakarzinomzellen durch EGF demonstriert werden (Jarrard et al., 1994). Auch eine Erhöhung der Motilität von PC3 Zellen durch konditioniertes Osteoblasten-Medium, das *TGF-β1* enthielt, war zuvor beschrieben worden (Festuccia et al., 1999). Diese Erkenntnisse gaben in dieser Arbeit Anlaß für Untersuchungen, inwiefern das Invasionsvermögen der PC3 Zellen von der EGFR Transaktivierung bestimmt wird. Dies wurde mittels *in vitro* Invasion-Assay experimentell ermittelt und ausgewertet.

Es zeigte sich, daß die GPCR Liganden GRP und LPA in Kombination einen stärkeren Effekt auf die Invasionsfähigkeit von PC3 Zellen haben als die jeweiligen Liganden alleine. Dieses Phänomen wurde bereits bei den Untersuchungen der MAPK-Aktivierung in diesen Zellen gefunden (siehe 3.7.4). Bei Stimulation der Prostatakarzinomzellen mit beiden Liganden ist eine deutliche Verstärkung der Zellwanderung durch eine Matrigel-Polycarbonat-Membran zu beobachten (Abb. 38A). Wie schon im letzten Abschnitt im Falle der Untersuchungen zur Migration von Tumorzellen dargelegt wurde, konnte in PC3 Zellen die Verstärkung der Invasionsfähigkeit nach Behandlung mit GPCR Liganden wiederum durch Batimastat und Tyrphostin signifikant eingeschränkt werden (Abb. 38B). Dies zeigt in eindrucksvoller Weise, daß die Signaltransduktionswege für die Invasion von Prostatakarzinomzellen nicht monokausal sind, sondern, daß es mehrerer zugleich erfolgreicher Stimuli bedarf, um ein so komplexes Geschehen wie das Durchbrechen von Zellwänden, wie es bei dem Vorgang der Metastasierung von Tumorzellen vorstatten geht und wie es in diesem zellbiologischen Versuch simuliert wurde, auszulösen. Der EGFR und eine oder mehrere Metalloproteasen spielen in diesem Zusammenhang somit ebenfalls als Vermittler der GPCR-induzierten Invasionsfähigkeit der Zellen eine wesentliche Rolle.

### A: PC3



## B: PC3



**Abb. 38: Chemo-Invasionsanalyse von PC3 Zellen auf Matrigel-beschichteten Polycarbonatfiltern.**

Invasions Transwell Assay von Prostatakarzinomzellen: Die Versuche wurden wie in *Material und Methoden* beschrieben, durchgeführt. Serumgehungerte PC3 Zellen wurden für jede Probe mit 250.000 Zellen/ Transwell auf die Oberfläche der Matrigel-beschichteten Polycarbonatmembran ausgesät und nach Stimulation mit LPA (2,5  $\mu$ M), GRP (100 nM) oder HB-EGF (10 ng/ml) 48h inkubiert. Die durch die Membran gewanderten Zellen wurden gefärbt, gewaschen, anschließend der Farbstoff gelöst und die Proben photometrisch bei 570 nm quantitativ ausgewertet.

In Diagramm (A) wird der Mittelwert zweier unabhängiger Experimente gezeigt, in denen jede Probe als Dublette geführt wurde.

Diagramm (B) zeigt eine Auswertung derselben Experimente aus (A). Hier wurde die Metalloproteaseinhibitor- und die EGFR-Inhibitor Sensitivität durch Vorinkubation (20 min) der Zellen mit 5  $\mu$ M Batimastat (BB94) respektive 250nM Tyrphostin (AG1478) untersucht.

(\*  $P < 0,03$ , \*\*  $P < 0,01$  gegenüber der Kontrolle („unstim.“), \*\*\*  $P < 0,01$  gegenüber den stimulierten Zellen („LPA+GRP“); einseitiger, gepaarter Students t-Test, siehe 2.9)

Die Rolle des EGFRs bei der LPA/GRP- und HB-EGF-induzierten Invasionsfähigkeit der PC3 Zellen wurde durch Verwendung des EGFR-Inhibitors Tyrphostin (AG1478) ermittelt. Die HB-EGF stimulierte Probe konnte durch Zugabe des Inhibitors auf Basal-Niveau gesenkt werden. Bei den Proben, die eine Kombinationsstimulation von LPA und GRP erfuhren, konnte durch AG1478 eine Reduktion der Zellwanderung durch die Matrigel-beschichtete Membran um 1/3 beobachtet werden (Abb. 38B). Somit konnte eine partielle Beteiligung der EGFR Transaktivierung an der PC3 Zellinvasion bestätigt werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob der GRP-Rezeptor-Inhibitor Acetyl-GRP dazu verwendet werden könnte, die GRP-induzierte Migration oder Invasion von PC3 Zellen näher zu erforschen, da man durch Acetyl-GRP eine spezifischere Inhibition des Signalweges erreichen

---

könnte. Leider erwies sich der Inhibitor in diesem experimentellen Umfeld als nicht sehr potent. Wie bereits in Abb. 17 gezeigt wurde, lies sich mit ihm zwar auf EGFR Ebene eine partielle Reduktion der Tyrosinphosphorylierung nach GPCR-Stimulation erwirken, jedoch hatte AcGRP schon auf die MAP Kinaseaktivität keine reduzierende Wirkung mehr. Daher war es nicht erstaunlich, daß bei Verwendung des AcGRP-Inhibitors in allen durchgeführten Experimenten mit PC3 Zellen keine Auswirkung auf die Motilität der Zellen beobachtet werden konnte (*Daten nicht gezeigt*).

## 4. Diskussion

Die Wege eines jeden Signalmoleküls hin zu seinem physiologischen Effekt sind vielschichtig und lassen sich meist nicht auf einen Signalweg begrenzen. Falls ein Signalweg ausfällt, ist es möglich, daß ein anderer seine Funktion ganz oder teilweise übernimmt, was aber natürlich damit auch zu anderen physiologischen „Outputs“ führen kann.

In dem Film Jurassic Park 2 heißt es: „Das Leben findet einen Weg.“ (Robert Blankenship). Leider gilt dasselbe auch für den Krebs. Ein Ziel des Lebens ist der Erhalt und Weitergabe von Erbgut. Dies wissen Krebszellen auf tragische Weise mit großem Erfolg zu vollbringen.

In der Wissenschaft sind fundamentierte Erkenntnisse über molekulare, mitogene Signalübertragungsmechanismen von Zelloberflächenrezeptoren äußerst bedeutungsvoll für das Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in Tumorzellen und damit unerlässlich, um erfolgversprechende therapeutische Interventionsansätze finden zu können.

Das Zusammenspiel und die Kreuzkommunikation von Mitgliedern verschiedener Rezeptorfamilien ist ein gut etabliertes Konzept in der Signaltransduktion von Zellen. Diese Signalnetzwerke gehören zu den elementaren Kontrollmechanismen der komplexen und weit verzweigten physiologischen Prozesse. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRn) und Rezeptortyrosinkinasen stellen dabei bedeutende Familien von Zelloberflächenproteinen dar, die Zellantworten auf äußere Reize regulieren. Deregulation der autokrinen und parakrinen Steuerung der GPCR-Signalwege, wie Mutationen oder ein Überschuß an Agonisten können zu hyperproliferativen Erkrankungen führen (Marinissen and Gutkind, 2001).

In Hinblick auf die pathophysiologische Relevanz der Siebentransmembranrezeptor-vermittelten und der direkten EGFR Signaltransduktion erforscht diese Arbeit die Rolle und die molekularen Mechanismen der EGFR Transaktivierung durch GPCR Liganden in humanen Tumorzellen.

#### **4.1 Metalloprotease-abhängige Transaktivierung des EGFRs durch Neuropeptide in Tumorzellkulturen („Neuro-Psycho/Onko“ Verbindung)**

Der EGFR wurde in vielen Publikationen mit der molekularen Pathologie verschiedenster Tumortypen wie z.B. NSCLC, Brustkrebs, Nierenkrebs, Glioblastom oder Astrocytom in Verbindung gebracht (Konecny et al., 2003; Lage et al., 2003; Mischel and Cloughesy, 2003; Sridhar et al., 2003). Weiterhin wurden GPCR-Signalschleifen in vielen Krebsarten gefunden (Fischer et al., 2003; Moody, 1996; Whitehead et al., 2001).

Die Wechselkommunikation zwischen GPCRn und dem EGFR wurde zuerst wegen ihres schnellen Verlaufs und des Fehlens von detektierbaren, löslichen, EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren im Medium als Liganden-unabhängig postuliert (Daub et al., 1996).

Aufgrund anknüpfender Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, wonach die Transaktivierung einer Rezeptorchimäre aus der Ligandenbindungsdomäne des EGFRs und dem transmembranären und intrazellulären Teil des PDGFRs möglich ist, erschien eine Beteiligung der extrazellulären EGFR-Domäne im GPCR-EGFR „Crosstalk“ jedoch sehr wahrscheinlich. Weiterhin konnte die Abhängigkeit der EGFR Transaktivierung von Metalloproteasen durch Verwendung eines Breitband-Metalloproteaseinhibitors, dem Hydroxamsäurederivat Batimastat (BB94), bewiesen werden (Prenzel et al., 1999).

Ein EGFR „Blocking“-Antikörper (AB3) verringert in PC3 Zellen die Bombesin-induzierte EGFR Transaktivierung und die damit verbundene MAPK-Aktivierung (Xiao et al., 2003). So wurde später auch in Prostatatumorzellen die essentielle Rolle der extrazellulären Domäne des EGFRs gefestigt.

Als Kandidaten für die Spaltung der EGF-ähnlichen Vorläuferproteine werden in engerer Wahl zwei Familien von Zink-abhängigen Transmembran-Metalloproteasen diskutiert. Einmal die sog. Matrix Metalloproteasen (MMPs), die mit dem Abbau der extrazellulären Matrix und mit der daraus resultierenden Invasion bzw. Metastasierung von Tumorzellen in Zusammenhang gebracht werden (Ellerbroek and Stack, 1999) und als zweites die ADAM Metalloproteasen (Moss et al., 2001), die die Prozessierung von Transmembranproteinen bewerkstelligen (Quaranta, 2000; Werb, 1997). Mit BB94 können aufgrund seines chemisch-strukturellen Aufbaus und seiner hoher Bindungsaffinität schon bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen beide Enzymfamilien inhibiert werden (Parvathy et al., 1998; Wojtowicz-Praga et al., 1997).

Einige Metalloproteasen wurden bereits zuvor mit EGF-ähnlichen Liganden in Verbindung gebracht. MMP3 hat die Fähigkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* pro-HB-EGF zu prozessieren (Suzuki et al., 1997). Die Transfektion von ADAM17 in ADAM17-defiziente primären Keratinocyten erhöhte die Spaltung von Amphiregulin und HB-EGF Proteinen (Sunnarborg et al., 2002). Es wurde zudem bewiesen, daß ADAM17-defiziente „knock-out“-Mäuse (Peschon et al., 1998; Sunnarborg et al., 2002) ähnliche Phänotypen wie TGF $\alpha$ - (Luetteke et al., 1993) und EGFR-defiziente Tiere (Sibilia and Wagner, 1995; Threadgill et al., 1995) aufweisen. Da ADAM17-„Knock-out“-Zellen proTGF $\alpha$  nicht mehr zu reifen Wachstumsfaktoren spalten können, wurde vermutet, daß diese Metalloprotease auch bei der Transaktivierung des EGFRs eine wichtige Rolle spielen könnte. Es konnte in dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß eine dominant negative Mutante der ADAM17/TACE (tumour necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme) in HNSCC Krebszellen die GPCR-vermittelte Amphiregulin Prozessierung und damit die Aktivierung des EGFRs in diesen Zellsystemen unterbindet (Gschwind et al., 2003). Somit ist ADAM17 in der Lage, auch andere EGF-ähnliche Ligandenvorläufer zu prozessieren. Dies wurde durch Arbeiten an Brustkrebszellen bekräftigt, in denen durch Inhibierung von ADAM15 und ADAM17 mit Hilfe von siRNAs eine HB-EGF-gestützte EGFR Transaktivierung blockiert werden konnte (Hart et al., 2005). In COS7 und PC3 Zellen konnte gezeigt werden, daß die integrale Membranmetalloprotease Kuzbanian (KUZ, ADAM10), die Notch-Signalwege in *Drosophila* kontrolliert, bei ektopischer Expression die GPCR-vermittelte Transaktivierung des EGFRs verstärkt (Yan et al., 2002).

Eine autokrine Prozessierung von EGFR Liganden, die durch den Metalloproteaseinhibitor Marimastat (BB2516) geblockt werden kann, wurde in HNSCC Tumorzellen bei (Charoenrat et al., 2002) beschrieben.

Autokrines Wirken der humanen Bombesin-ähnlichen Neuropeptide Neuromedin B und Gastrin-Releasing Peptide (GRP) wurde in Lungenkrebszellen sowohl bei SCLC (Carney et al., 1987; Cuttitta et al., 1985; Heasley, 2001) als auch bei NSCLC (Siegfried et al., 1999) festgestellt.

Um die generelle Bedeutung dieser zellulären Signalmechanismen zu erforschen wurden in dieser Arbeit weitere Tumorzellen auf das Vorkommen der EGFR Transaktivierung und deren Metalloproteaseabhängigkeit untersucht.

In Prostata-, Pankreas- und Schilddrüsenkarzinomzellen konnte die basale Tyrosinphosphorylierung des EGFRs durch Inkubation der Zellen mit Batimastat stark

verringert werden. Weiterhin weist diese Reduzierung der basalen Rezeptoraktivität durch BB94 eine zeitliche Abhängigkeit auf. Je nach Zellsystem verläuft die Inhibierung schneller oder langsamer. In den untersuchten Zelllinien betrug die Zeit bis zur signifikanten Reduzierung des Phosphorylierungslevels 1-6 Stunden. Die Inhibition ist reversibel, so daß bei den Zellen mit der schnellsten Inhibierung (CAPAN-1) der Tyrosinphosphorylierungsgrad bereits nach 7h auf basales Niveau zurückgeführt wurde, während die Kontrollinhibition mit AG1478 auch noch nach zehn Stunden anhielt (siehe 3.2.1). Diese Ergebnisse implizieren, daß Zink-abhängige Metalloproteasen in die autokrine, basale Aktivierung des EGFRs involviert sind.

Die GPCR Liganden Bombesin und GRP werden auch von neuroendokrinen Zellen in Prostatatumoren verstärkt exprimiert und sekretiert und stimulieren in diesen Zellen die EGFR Transaktivierung (Xiao et al., 2003).

Die Daten in dieser Arbeit konnten Aussagen über die funktionelle Relevanz Metalloprotease-abhängiger EGFR Transaktivierung nach GPCR-Stimulation durch Neuropeptide und LPA in Zellen verschiedener Tumorarten liefern. Stimulierung der Zellen mit GPCR Liganden ruft in den Zellen eine schnelle Tyrosinphosphorylierung des EGFRs und diverse nachfolgende „Downstream“-Signalkaskaden, abhängig vom untersuchten Zellsystem, hervor (siehe 3.1.1 bis 3.1.4 und Tabelle 4). Auf der Suche nach den dabei beteiligten Metalloproteasen konnten diese in PC3 Zellen als TIMP-3 sensitiv dargestellt werden, so daß die Zahl der in Frage kommenden Enzyme eingeschränkt wurde, und somit sowohl die oben beschriebenen Proteasen ADAM10 und ADAM17 als auch MMP 1 und MMP14, deren Expression durch c-DND Makroarray Analyse nachgewiesen wurde (siehe 3.6) als mögliche Kandidaten in PC3 Zellen in Frage kommen könnten (siehe 3.2.2). Anzumerken sei hier, daß die zuvor erwähnte MMP3, aufgrund fehlender Expression, wie aus Makroarray Daten ersichtlich, ausgeschlossen werden konnte. In einer anderen Arbeit konnte bereits die Thrombin-induzierte EGFR Transaktivierung in A498 Nierenkarzinomzellen in Abhängigkeit von ADAM10 gezeigt werden (Marg Dissertation LMU 2005). Eine „Down-Regulation“ von ADAM10 durch siRNA Konstrukte führte in diesen Zellen gleichzeitig zu einer verminderten Expression von ADAM17. Dies deutet in Kombination mit den oben beschriebenen Ergebnissen darauf hin, daß ADAM10 und 17 Expression zellulär in einer funktionellen Abhängigkeit stehen. Denkbar wäre z.B. die Regulation des ADAM17 Promotors durch ADAM10-vermittelte Signalwege.

Im menschlichen Körper werden Neurotransmitter in unterschiedlichen Organen produziert. Folgende Neuropeptide waren für diese Arbeit zur Untersuchung einer möglichen „Neuro-Psycho/Gastro-Onko“ Verbindung (ein weiterführendes Konzept der „brain-gut“-Achse, siehe Kapitel 3.) von besonderem Interesse: NMB, ein Peptid des zentralen Nervensystems und des Magen-Darm-Traktes, GRP, das von neuroendokrinen Zellen des Magens und des Zwölffingerdarms sowie von Pituizyten des zentralen Nervensystems sekretiert wird, Endothelin, das hauptsächlich vom Endothel von Blutgefäßen produziert wird und Neurotensin, das im Zentralnervensystem und in den N-Zellen des Dünndarms gebildet wird. All diese Peptide sind Liganden für GPCRn und aktivieren die G Protein-Untereinheit  $G\alpha_q$ . In einigen der hier untersuchten Tumorzelllinien wurde Neuropeptid-stimuliertes Zellwachstum und mitogene Antworten durch Aktivierung von GPCRn veröffentlicht (Aprikian et al., 1997; Bologna et al., 1989; Wasilenko et al., 1997; Xiao et al., 2003). Zudem war die Expression des GRP-Rezeptors in Prostatatumorgewebe beschrieben worden (Sun et al., 2000).

In der Tat zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, daß diese Neurotransmitter mitogene Antworten in verschiedenen Tumorzellen über den Weg von der Metalloprotease-abhängigen EGFR Transaktivierung vermitteln können (vgl. 3.1.1 bis 3.1.3).

Frühere Publikationen beschrieben, daß die Prostatatumorzellen Du-145 und PC3 einen funktionalen GRP-Rezeptor exprimieren, während LNCaP Zellen einen pharmakologisch nicht-funktionalen GRPR besitzen (Aprikian et al., 1996). Die Expression dieses GPCRs konnte in dieser Arbeit unter Verwendung von Makroarray Analysen nur in Hinsicht auf die PC3 und LNCaP Zellen bestätigt werden. In Du-145 Zellen konnte die Existenz des Rezeptors nicht nachgewiesen werden (siehe 3.6). Auch die Expression von drei verschiedenen Edg Rezeptoren, die Rezeptoren für den Serum-Liganden LPA darstellen, konnten in allen Prostatakarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Somit verfügen einige der untersuchten Prostatakrebszellen über die molekularen Voraussetzungen für eine funktionelle GPCR-Stimulation.

Es wurde eine große Anzahl von Tumorzelllinien auf ihre Fähigkeit hin, nach GPCR-Stimulation eine EGFR Transaktivierung zu zeigen, untersucht. Dieses Phänomen wurde bei zehn von 39 getesteten Zelllinien eindeutig bewiesen (siehe Tabelle 4). Im überwiegenden Teil der Fälle ließ sich aufgrund der hohen basalen Phosphorylierung des Rezeptors in den „gehungerten“ Zellen allerdings keine EGFR Tyrosinphosphorylierung durch GPCR Liganden ermitteln (siehe Tabelle 3). Jedoch ist es durchaus denkbar, daß auch ein basal aktiver Rezeptor in der Lage sein könnte, das GPCR Signal weiterzuleiten und so trotzdem der TMPS Transaktivierungs-Signalweg in diesen Zellen bei der mitogenen

Signalübertragung eine Rolle spielen könnte. Diese Tatsache, daß die untersuchten Tumorzelllinien des Magen-Darm-Trakts (bis auf AGS-Magentumorzellen, die jedoch nur nach LPA-Stimulation eine EGFR Transaktivierung zeigten; siehe Tabelle 2) keine geeigneten Systeme für Experimente der EGFR Transaktivierung darstellten, wurde die Untersuchung einer „Neuro-Psycho/Gastro-Onko“ Verbindung auf ein allgemeines „Neuro-Psycho/Onko“ Konzept, also einem Zusammenhang zwischen Neurobiologie und Onkologie, ausgeweitet und vor allem Prostatakrebszellen und Schilddrüsenkarzinomzellen in die Arbeit mit einbezogen.

## **4.2 „Downstream“-Antworten der Neuropeptid-vermittelten EGFR Transaktivierung in Tumorzellen**

Die der EGFR Transaktivierung nachfolgenden Signalantworten von GPCR Liganden (im speziellen derjenigen, die durch Neuropeptide und LPA vermittelt werden) wurden an Hand der Aktivierung von MAP Kinasen, dem Adapterprotein SHC, der Streß-aktivierten Kinase Akt und der Nicht-Rezeptorkinase FAK untersucht. Weiterhin wurde die PKC-Abhängigkeit der Transaktivierung in verschiedenen Krebszelllinien nachgeprüft.

### **4.2.1 Aktivierung des Adapterproteins SHC und der MAPK**

(Daub et al., 1997) zeigten in mit DNA des Bombesin Rezeptors transfizierten COS-7 Zellen eine Aktivierung des Adapterproteins SHC in Abhängigkeit der EGFR Tyrosinphosphorylierung. Prenzel und Kollegen konnten auch die Batimastat Sensitivität der Liganden-vermittelten SHC Phosphorylierung in COS-7 Zellen zeigen (Prenzel et al., 1999). Als erster „Downstream“-Schritt nach der EGFR Transaktivierung wurde in dieser Arbeit die Phosphorylierung von SHC in mehreren Tumorzellen untersucht. In PC3, TSU und PPC1 Prostatakarzinomzellen und FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen ließ sich eine EGFR-abhängige Aktivierung der SHC Isoformen durch LPA und verschiedene Neuropeptide bestätigen. Zugleich wurde auch auf dieser Signaltransduktionsebene eine Beteiligung von Metalloproteasen durch Inhibition der GPCR-Stimulation mit Batimastat bewiesen (siehe 3.7.1).

In Rat-1 Zellen wurde zuvor durch Einbringen der dominant-negativen EGFR Mutante HERCD533 die ET-1-, Thrombin- und LPA-induzierte Aktivierung von ERK1/2 herabgesenkt (Daub et al., 1997). Eine MAPK-Aktivierung durch Bombesin-Stimulation wurde später auch in DU145 und PC3 Zellen beschrieben. Dieser geht in PC3 Zellen eine

EGFR Tyrosinphosphorylierung voraus (Xiao et al., 2003), was auch in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Zudem führten Stimulationsversuche der PC3 Zellen mit LPA und GRP ebenfalls zu einer verstärkten ERK Phosphorylierung, die sich durch BB94 und AG1478 auf basales Niveau zurückdrängen ließ. (siehe 3.7.2).

FTC-133 Schilddrüsenkrebszellen reagierten nach Stimulation mit den Neuropeptiden Neurotensin, GRP, Bombesin und Endothelin-1, sowie dem Phospholipid LPA, mit schnell eintretender, erhöhter MAPK-Aktivität. Auch in diesen Tumorzellen senken die Inhibitoren BB94 und AG1478 die ERK Phosphorylierung auf den basalen Wert ab (siehe 3.7.3).

Somit wurde in dieser Arbeit in verschiedenen Tumorzellarten eine klare Metalloprotease- und EGFR-Abhängigkeit des mitogenen Signalweges, ausgehend von der GPCR-Stimulation, gezeigt.

In PC3 Zellen war zudem eine additive ERK-Stimulation nach gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit LPA und GRP feststellbar (siehe 3.7.4). Die simultane Stimulation von G<sub>i</sub>- und G<sub>q</sub>-gekoppelten GPCRn könnte unterschiedliche Signalwege anregen und so zu einer Addition der Signale führen. So ist es denkbar, daß in Tumorzellen durch autokrine oder parakrine Stimulation mit Neuropeptiden und GPCR Liganden des Serums eine Zunahme des Tumorwachstums eintritt.

#### **4.2.2 Einfluß der Signalmoleküle Akt und FAK**

Im Zusammenhang mit Zellüberleben und Zellwachstum können neben der Aktivierung der MAPK<sub>n</sub> auch weitere wichtige Signalwege von der GPCR-induzierten EGFR Transaktivierung initiiert werden. Die Proteinkinase B/Akt spielt beim Überleben von gesunden Zellen und Tumorzellen durch Regulation der Zellzyklusprogression und Apoptose eine entscheidende Rolle (Datta et al., 1999; Hutchinson et al., 2001). Weiterhin kann eine Deregulation der PKB-Aktivierung zur Tumorfortschreitung, zur Metastasierung und zu einer chemotherapeutischen Resistenz führen (Hanada et al., 2004; Nicholson and Anderson, 2002). Akt ist konstitutiv in NSCLC Zellen aktiv und fördert deren Überleben (Brognard et al., 2001). Neuere Studien belegten, daß Akt in diesen Lungentumorzellen von GRP über den Signalweg der EGFR Transaktivierung mit Amphiregulin und c-Src als Vermittler aktiviert wird (Liu et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung von Akt via EGFR Transaktivierung nach GRP, Neurotensin und LPA-Stimulation von PC3 Zellen nachgewiesen (siehe 3.8.4). BB94 und

AG1478 konnten die Akt Phosphorylierung jedoch nur teilweise herabsetzen, was bedeuten könnte, daß noch andere Signalwege außer der EGFR Transaktivierung für die Aktivierung von Akt verantwortlich sind. PKC ist wiederum an diesem Signalweg nicht beteiligt.

In einer früheren Studie konnte durch Verwendung dominant negativer FAK-Mutanten in co-transfizierten LNCaP-EtkWT Prostatakrebszellen gezeigt werden, daß die drei Nicht-Rezeptor Kinasen FAK, Src und Etk nach Stimulation der Zellen mit Bombesin aktiviert werden und miteinander interagieren (Lee et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen keine Aktivierung der FAK in PC3 und TSU Prostatakarzinomzellen detektiert werden (siehe 3.7.6). Dies könnte auf Zelltyp-spezifische Aktivierung dieser Tyrosinkinasen, oder alternativ auf ihre bereits im basalen Zustand hohe Tyrosinphosphorylierung hindeuten.

Als Resultat der Untersuchungen der EGFR Signalkette kann gesagt werden, daß das „Downstream“-Signal in den getesteten Zelllinien nicht ausschließlich über den EGFR und über Metalloproteasen verläuft, sondern daß noch andere, parallel verlaufende Wege involviert sind. Der EGFR fungiert dennoch als ein zentraler Konvergenzpunkt für vielschichtige GPCR Signale in Prostata- und Schilddrüsenkarzinomzellen.

Die in dieser Arbeit berichteten Ergebnisse legen zudem eine starke Zelltypspezifität der GPCR-Aktivierung und die damit verbundenen Unterschiede in der mitogenen Signalweiterleitung der EGFR Transaktivierung dar. Dies macht es so kompliziert, einen Ansatzpunkt für die Tumorbehandlung zu finden, denn selbst Krebszellen, die vom gleichen Ursprungsorgan stammen, besitzen verschiedene zelluläre Eigenschaften und verschiedene Mechanismen für das Tumorwachstum.

#### **4.2.3 Rolle der PKC**

Die Rolle der PKC bei der Transaktivierung des EGFRs wurde bisher in mehreren Studien unter Verwendung nicht-kanzerogener Zellen untersucht. (Adomeit et al., 1999) zeigten, daß in COS-7 Zellen, die transient mit dem Bradykinin B2 Rezeptor und einer Hämagglutinin-getaggen MAPK co-transfiziert wurden, die Bradykinin-induzierte MAPK-Aktivierung einmal über einen PKC-abhängigen und zum anderen über einen EGFR-abhängigen Weg verläuft. Die Inhibition der PKC blockiert in diesem System nicht die Bradykinin-vermittelte Transaktivierung des EGFR. In, mit dem muskarinischen M1-Rezeptor transfizierten, HEK293 Nierenfibroblasten wurde hingegen die EGFR Transaktivierung PKC-abhängig

beschrieben (Tsai et al., 1997). Ebenfalls wurde die PKC in Kardiomyozyten der Ratte (Kodama et al., 2002) und in PC12 Zellen (Soltoff, 1998) als „Upstream“-Element der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung beschrieben. Außerdem war durch (Aprikian et al., 1997) bekannt, daß der PKC Inhibitor GF109203X die Migration von PC3 Zellen beeinträchtigt, wobei in dieser Veröffentlichung die Rolle des EGFRs nicht untersucht wurde. Auf der anderen Seite wurde berichtet, daß in GN4 Leberepithelzellen der Ratte die PKC einen Angiotensin-II-stimulierten EGFR Transaktivierungssignalweg unterdrückt, da in PKC-depletierten Zellen Angiotensin eine stärkere Stimulation des Ras Signalweges hervorruft.

In dieser Arbeit wurde nun die mechanistische Vermittlerrolle der PKC in Tumorzellen durch Inhibition mit GF109203X untersucht. In allen getesteten Krebszelllinien (PC3, TSU und FTC-133) hatte der Inhibitor keinen signifikanten Einfluß auf die EGFR Tyrosinphosphorylierung, die durch die verwendeten GPCR Liganden angeregt wurde. Somit stellte sich die EGFR Transaktivierung in diesen Zellen PKC-unabhängig dar. Auch die GPCR-induzierte SHC Phosphorylierung blieb bei Inhibitorgabe unverändert. Eine Teilreduktion der MAPK-Aktivierung wurde in GRP-, Neurotensin- und LPA-stimulierten PC3 Zellen festgestellt (vgl. 3.8.4). Da aber TPA eine EGFR Tyrosinphosphorylierung hervorruft, während die GPCR Liganden-angeregte EGFR-Aktivierung offensichtlich nicht über PKCs verläuft, könnte dies auf Nebenwirkungen des PKC Inhibitors oder einem positiven Einfluß PKC-abhängiger Signale „downstream“ des EGFRs zurückzuführen sein. In TSU Zellen wirkt sich der Inhibitor allerdings weder auf die EGFR- und SHC-Phosphorylierung noch auf die MAPK-Aktivierung aus. Hier führt auch die direkte Stimulation der PKC mit dem Phorbolster TPA zu keiner EGFR Tyrosinphosphorylierung. Die TPA-stimulierte ERK-Aktivierung geschieht in diesen Zellen folglich ohne Mitwirken des EGFRs (siehe Abb. 30). Somit kann gesagt werden, daß die PKC in den untersuchten Tumorzellen keine signifikante Rolle im Mechanismus der EGFR Transaktivierung spielt.

Interessanterweise führte hingegen eine Behandlung von MDA-MB468 und BT20 Brustkrebszellen mit TPA zu einer Verringerung der basalen EGFR-Aktivität (3.8.3). Diese Zellen besitzen auch nach Serumentzug eine sehr hohe basale EGFR Tyrosinphosphorylierung (siehe Tabelle 3). Eine Erklärung für die beobachtete „Downregulierung“ des Rezeptors könnte sein, daß durch TPA Phosphatasen aktiviert werden, die ihrerseits den EGFR dephosphorylieren. Andererseits könnte auch PKC-vermittelte Ser/Thr-Phosphorylierung des EGFRs dessen Aktivität negativ beeinflussen.

### 4.3 HB-EGF als Vermittler der Neuropeptid-vermittelten EGFR Transaktivierung in PC3 Prostatakarzinomzellen

Auf der Suche nach dem EGF-ähnlichen Ligandenvorläufer, der die Transaktivierung auslöst, konnte in einem Modellversuch in transienten COS-7/M1R und COS7/BombR Zellen die Prozessierung eines co-transfizierten VSV-proHB-EGF Konstruktes nach Stimulation mit den jeweiligen GPCR Liganden (Carbachol oder Bombesin) nachgewiesen werden, wodurch ein möglicher EGFR Ligand identifiziert wurde (Prenzel et al., 1999).

Weiterhin konnte in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte die Thrombin-induzierte EGFR Transaktivierung durch Zugabe des Glukosaminoglykans Heparin unterbunden werden (Kalmes et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine partielle Inhibition der GPCR-induzierten EGFR-, SHC- und MAPK Phosphorylierung durch Heparin in PC3 Zellen beobachtet (siehe 3.4). Heparin verhindert durch Komplexbildung die Bindungsfähigkeit von Amphiregulin und HB-EGF an die Heparansulfat Proteoglykan Matrix (HSPG-Matrix) und blockiert so die EGFR-Aktivierung. Somit könnten diese beiden Liganden als Vermittler der EGFR Transaktivierung in PC3 Zellen in Frage kommen. Durch spezifische „Blocking“-Antikörper gegen EGF-ähnliche Liganden konnte Amphiregulin als Kandidat ausgeschlossen und HB-EGF bestätigt werden (Abb. 22). Demzufolge kann angenommen werden, daß die EGFR Transaktivierung in diesen Zellen über den pro-HB-EGF-Vorläufer verläuft.

In einer anderen Arbeit mit PC3 Zellen, die transient mit einem AP-(alkalische Phosphatase)-getaggten HB-EGF Konstrukt transfiziert wurden, wurde die Prozessierung dieses ektopisch exprimierten HB-EGF gezeigt (Madarama et al., 2003). Somit gehen die Ergebnisse der endogenen Experimente der vorliegenden Arbeit, wonach HB-EGF in PC3 Zellen die Transaktivierung vermittelt, mit den Beobachtungen dieser Veröffentlichung, unter Verwendung eines artifiziellen Überexpressions-Systems, konform.

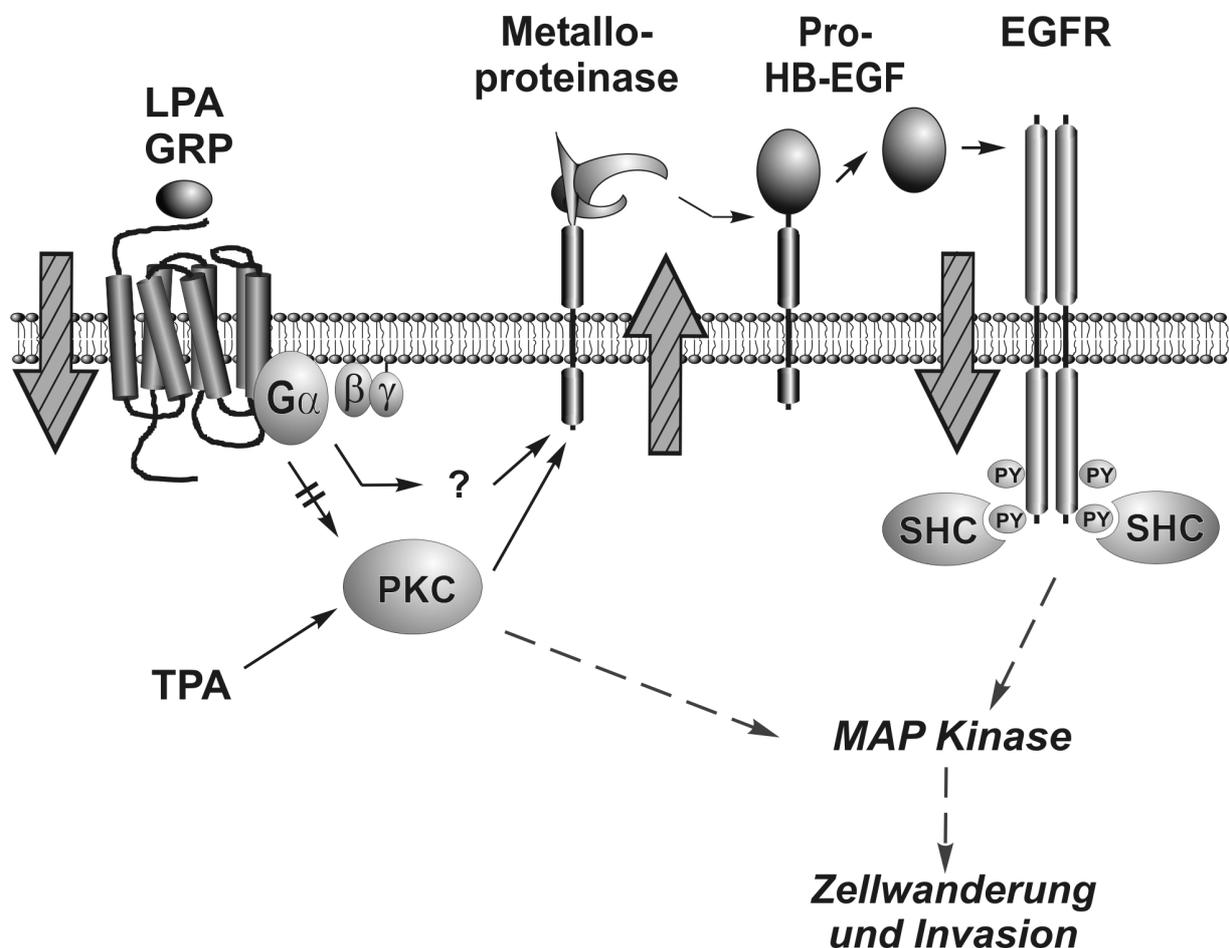
Um einen Einblick in die exprimierten Gene der Prostatakarzinomzellen zu bekommen wurden cDNA Makroarrays herangezogen. Es werden in dieser Arbeit jedoch nicht alle in den Array Expressionsanalysen erfaßten 536 Gene erörtert. Die Diskussion beschränkt sich auf die Analyse relevanter Gene, die sich in den regulierten Signalwegen der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung befinden.

Die Suche nach dem vermittelnden EGF-ähnlichen Liganden konnte durch die cDNA Makroarray Hybridisierungsdaten auf zwei bis vier Kandidaten eingegrenzt werden. In PC3

und PPC1 Zellen konnte nur HB-EGF und Amphiregulin detektiert werden. In TSU Zellen kommen nach dieser Auswertung theoretisch alle vier in Tabelle 5 aufgeführten Liganden in Frage (vgl. 3.6).

Durch den Verlauf über GPCR, EGF-ähnlicher Ligand und EGFR passiert das EGFR Transaktivierungssignal die Zellmembran an drei Stellen. Dieses dreimalige Durchlaufen der Plasmamembran in diesem Signalübertragungsmechanismus wurde als „TMPS“ (Triple Membrane Passing Signal) bezeichnet (Gschwind et al., 2001; Leserer et al., 2000; Prenzel et al., 2000).

An Hand der Ergebnisse der Versuche mit PC3 Zellen soll nun in Abb. 39 der EGFR Signal-Transaktivierungsweg schematisch veranschaulicht werden.



**Abb. 39:** „Triple Membrane Passing Signal“ (TMPS) Mechanismus der EGFR Transaktivierung in PC3 Zellen

Aktivierung einer Metalloprotease durch die GPCR Agonisten LPA und GRP resultiert in Zelloberflächen-Ektodomänenspaltung von pro-HB-EGF. Nach Freisetzung des reifen Liganden wird der EGFR aktiviert, wodurch ein für den EGFR charakteristisches intrazelluläres Signal hervorgerufen wird. GPCR Liganden regeln das proliferative und migratorische Verhalten von PC3 Prostatakrebszellen und FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen via TMPS Signalweg. *Adaptiert aus (Leserer et al., 2000)*

Über die einzelnen Proteine, die an der Transaktivierung des EGFRs in Krebszellen oder Krebszelllinien beteiligt sind, ist noch wenig bekannt. Neben HB-EGF als Vermittler der Transaktivierung wurden zudem Amphiregulin (Gschwind et al., 2003) und TGF- $\alpha$  (Schäfer et al., 2004b) als Liganden in Tumorzellen bestätigt.

In Tabelle 7 sind diverse Tumorzelllinien, bei denen die Vermittler des TMPS Signalweges bekannt sind, zusammengestellt:

<b>Tumorzelllinie</b>	<b>Stimulus</b>	<b>EGFR Ligand</b>	<b>Protease</b>	<b>Referenz</b>
SCC-9 Lunge	LPA, Carbachol	Amphiregulin (AR)	ADAM17/ TACE	(Gschwind et al., 2003)
ACHN Nierenkarzinom	Angiotnesin II	HB-EGF	ADAM17	(Schäfer et al., 2004b)
TCC-Sup Blasenkarzinom	LPA	TGF- $\alpha$	ADAM15	(Schäfer et al., 2004b)
MDA-MB-231 Brustkrebs	LPA, Thrombin	HB-EGF HB-EGF	ADAM17 ADAM15 und -17	(Hart et al., 2005)
MCF-7 Brustkrebs	LPA, Thrombin	HB-EGF HB-EGF	ADAM17 ADAM15 und -17	(Hart et al., 2005)
A498 Nierenkarzinom	Thrombin		ADAM10	Marg, 2005
NCI-H292 Lungenkarzinom	Sorbitol	HB-EGF	ADAM9 und -17	(Fischer et al., 2004b)
PC3 Prostata	LPA	HB-EGF	mögl. Kandidaten: ADAM10, ADAM17, MMP1 oder MMP14	Diese Arbeit
FTC-133 Schilddrüsenkarzinom	ET-1, Bombesin	HB-EGF oder AR	<i>nicht untersucht</i>	Diese Arbeit
MDA-MB 436 Brustkrebs	Bradykinin	HB-EGF oder AR	<i>nicht untersucht</i>	Diese Arbeit

**Tabelle 7: Zellspezifität des TMPS Signalweges in Tumorzellen**

Aufgrund der bekannten Studien zeichnet sich bei Tumorzellen auch im TMPS eine starke Zelltypabhängigkeit ab. Nicht in allen Zelltypen wird die EGFR Transaktivierung von HB-EGF vermittelt, was auch mit der Expression verschiedener EGFR Liganden in Krebszelllinien, die Transaktivierung zeigen, vereinbar ist. Die GPCR-vermittelte Prozessierung der EGF-ähnlichen Liganden durch Metalloproteasen gilt aber mittlerweile als ein zelltypunabhängiger Prozeß, da in allen bekannten Transaktivierungszellsystemen die EGFR Tyrosinphosphorylierung nach GPCR-Stimulation durch einen Metalloprotease-inhibitor wie Batimastat oder Marimastat blockiert wird.

#### **4.4 Pathophysiologische Rolle der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung in Tumorzellen**

In dieser Arbeit wurden die Zellinvasion, die ein Schlüsselement von Krebs darstellt (Hanahan and Weinberg, 2000), und die Zellmigration als Beispiele für einen pathophysiologischen Vorgang erforscht.

In verschiedenen Studien wurden Ergebnisse über diverse physiologische Ereignisse nach GPCR-Stimulation in Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen avisiert. Beispielsweise wird die Migration der hoch kanzerogenen PC3 Zellen von Bombesin beschleunigt (Aprikian et al., 1997; Madarame et al., 2003). Bombesin regt ferner eine Rho-abhängige Migration und Invasion in Isreco-1 Kolonkarzinomzellen an (Saurin et al., 2002).

Kalmes und Kollegen konnten zeigen, daß die Thrombin-induzierte Migration glatter Gefäßmuskelzellen über eine Batimastat-sensitive und HB-EGF-vermittelte EGFR Transaktivierung verläuft (Kalmes et al., 2000).

Weiterhin ist GRP in der Lage eine haptotaktische Migration in LNCaP und TSU-pr1 Prostatakrebszellen zu verstärken (Nagakawa et al., 2001).

Neuere Arbeiten zeigten außerdem an Hand isolierter Mäusearterien, daß eine HB-EGF-vermittelte EGFR Transaktivierung in die physiologische, Endothelin-induzierte Blutgefäßverengung involviert ist. Diese vasokonstriktorische Wirkung von ET-1 war in HB-EGF-defizienten Mäuse verringert. In vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs), die eine partielle Funktionsstörung der EGFR Tyrosinkinaseaktivität hervorrufende Mutation besitzen, war der ET-1-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Peak vergleichbar reduziert wie bei Zellen von HB-EGF/-

Mäusen (Chansel et al., 2006). Dies belegt die Rolle des EGFRs in diesem Signalprozeß und zeigt eine weitere physiologische Rolle der EGFR Transaktivierung auf.

In dieser Arbeit sollte der Einfluß von GPCR Liganden auf die Motilität von Prostatatumorzellen untersucht werden. Es wurde in Wundheilungs-Assays und Invasions-Assays in Matrigel-beschichteten Boyden-Kammern eine Neuropeptid-vermittelte Verstärkung der Migrations- bzw. Invasionseigenschaften von PC3 Prostatakarzinomzellen aufgezeigt.

Erstaunlicher Weise zeigte sich, daß die GPCR Liganden GRP und LPA in Kombination auch einen additiven Effekt auf die Invasionsfähigkeit von PC3 Zellen haben. Während die Stimulation der Zellen mit LPA bzw. GRP alleine nur mit einer geringen Verstärkung der Zellenwanderung durch eine Matrigel-beschichtete Polycarbonatmembran einhergeht, ist eine Kombinationsbehandlung der PC3 Zellen wesentlich wirkungsvoller (siehe 3.9.3). Analog zu den Untersuchungen der „Downstream“ Ereignisse (SHC, MAPK Akt), konnte auch die durch GPCR Liganden-stimulierte Migration und Invasion der Zellen wiederum durch Tyrphostin und Batimastat vermindert werden, und somit ist die Motilität der Zellen abhängig von der Kinaseaktivität des EGFRs und von Metalloproteasen. Dies zeigt in eindrucksvoller Weise, daß die Signaltransduktionswege für die Invasion von Prostatakarzinomzellen nicht monokausal sind, sondern daß mehrere zugleich erfolgende Stimuli dazu beitragen können, einen so komplexen Vorgang wie das Durchbrechen von Zellwänden, wie er bei der Metastasierung von Tumorzellen von statten geht und wie es in diesem zellbiologischen Versuch simuliert wurde, auszulösen. Der EGFR und eine oder mehrerer Metalloproteasen spielen in diesem Zusammenhang ebenfalls eine wesentliche Vermittlerrolle.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Peptide des zentralen Nervensystems in verschiedenen Krebszellen, in Abhängigkeit des EGFR, EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren und Metalloproteasen, mitogene Signale weiterleiten und die Migrations- und Invasionsfunktion der Zellen verstärken. Somit kann ein generelles Konzept der „Neuro/Psycho-Onko“ Verbindung mit weitreichender Bedeutsamkeit postuliert werden, bei der endogene und exogene Faktoren über autokrine und parakrine Stimulation der Zellen und über den Weg der EGFR Transaktivierung auf die Krebsentwicklung Einfluß nehmen.

## 4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das Konzept des dreimal die Zellmembran durchlaufenden GPCR Signals (TMPS), das eine Stimulation der Zellen mit G-Protein Liganden an zentrale Elemente der mitogenen Signalübertragung koppelt, auf diverse Tumorzellen ausgeweitet werden und pathophysiologisch relevante Ereignisse dieses EGFR Transaktivierungssignalwegs aufgezeigt werden.

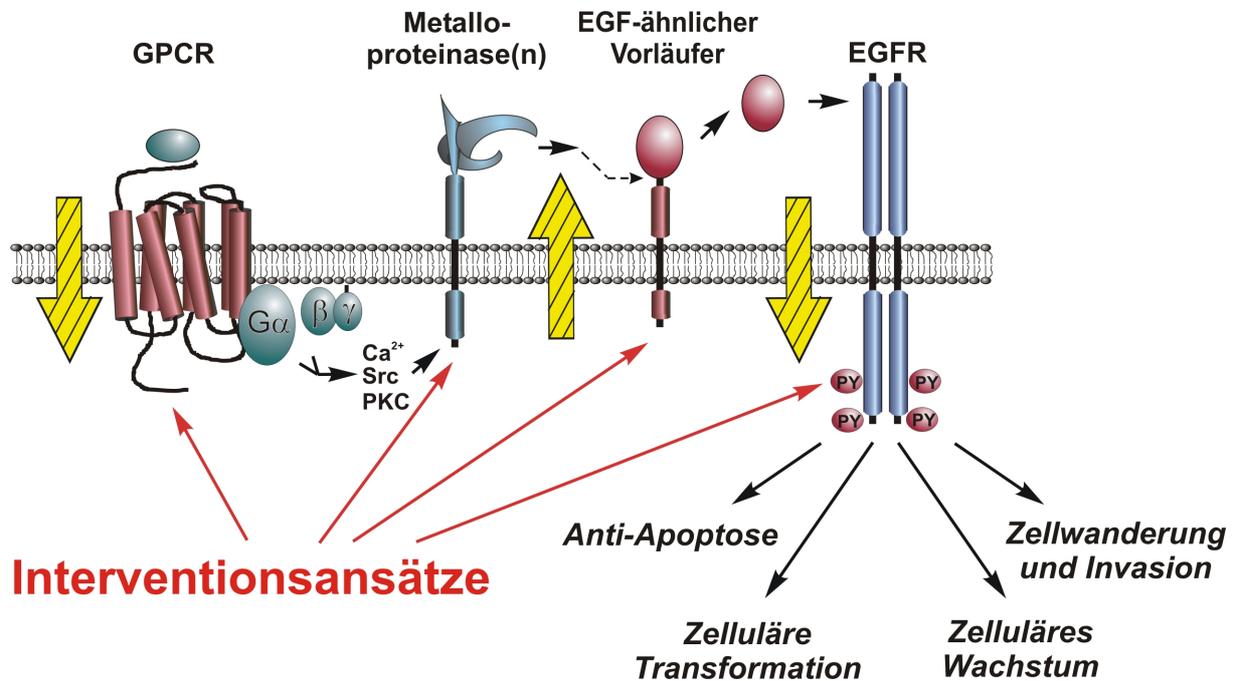
Die Transaktivierung des EGFRs vermittelt in Tumorzellen verschiedene physiologische, zelluläre Antworten wie Zellmigration (*diese Arbeit*) und (Gschwind et al., 2004; Gschwind et al., 2003; Hart et al., 2005), Zellinvasion (*diese Arbeit*) und (Schäfer et al., 2004a), zelluläres Wachstum (Gschwind et al., 2004; Gschwind et al., 2003) und Signale für das Überleben der Zellen (Anti-Apoptose) (Schäfer et al., 2004b).

Somit ist es denkbar, daß durch die Inaktivierung dieses Signalweges das Wachstum oder die Metastasierung von bestimmten Tumorarten, bei denen dieser Signalweg eine Hauptachse der mitogenen Aktivierung darstellt, entscheidend gehemmt werden kann. Der TMPS Signalweg beinhaltet somit mehrere potentielle Interventionsziele für die Entwicklung von Medikamenten und Strategien für sinnvolle, neue Tumorthérapien (Abb. 40):

- ❖ Blockierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors
- ❖ Spezifische Blockade der Membran-assoziierten Metalloprotease/n
- ❖ Hemmung der Prozessierung des EGF-ähnlichen Ligandenvorläufers oder des Vorläufers selbst
- ❖ Blockierung des EGF-ähnlichen Liganden (*durch antagonistische Antikörper*)
- ❖ Inaktivierung der Tyrosinkinaseaktivität des EGFRs (*Medikamente hierfür sind bereits auf dem Markt*)

Dies könnte durch spezifische Inhibition dieser einzelnen Komponenten durch niedermolekulare Inhibitoren oder durch blockierende Antikörper geschehen.

## Potentielle Interventionsziele für die Tumorthherapie



**Abb. 40: Potentielle Interventionsziele für Tumorthherapie im TMPS Signalweg**

Die EGFR Signal-Transaktivierung beinhaltet mögliche Interventionsziele für therapeutische Ansätze in klinischen Krebstherapien. Blockierung des GPCRs, der Metalloprotease, des EGF-ähnlichen Vorläufers, des Liganden selbst oder des EGFRs durch spezifische Medikamente könnte selektiv die Invasion oder das Zellwachstum von Tumorzellen hemmen. (Leserer, 2002)

## 5. Zusammenfassung

Die Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) stellt einen entscheidenden Teil der von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRn) induzierten mitogenen Signalübertragung dar. Die EGFR Transaktivierung ist die Folge GPCR-stimulierter Metalloproteaseaktivität, die eine Spaltung eines EGF-ähnlichen Wachstumsfaktorvorläufers wie z.B. HB-EGF auslöst. Die Blockierung dieser „Precursor“-Prozessierung durch die Metalloproteaseinhibitoren Batimastat (BB94) oder Marimastat (BB2516) verhindern in diversen Zelllinien die schnelle GPCR-induzierte EGFR Tyrosinphosphorylierung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der EGFR Transaktivierung in Tumorzellen, ausgelöst durch GPCR Liganden in physiologischer Konzentration, näher zu charakterisieren. Im Zentrum des Interesses standen vor allem Neurotransmitter. Weiterhin sollten bekannte und mögliche neue Mediatoren, die nach der Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen die EGFR Tyrosinphosphorylierung erhöhen, analysiert und die mechanistischen Grundlagen der GPCR-vermittelten EGFR Transaktivierung in Tumorzellen charakterisiert werden.

Eine große Anzahl von Tumorzelllinien wurde in Hinsicht auf eine funktionelle EGFR Transaktivierung nach Neuropeptid-Stimulation und ihr Verhalten auf BB94 untersucht. Bei acht von 37 getesteten Zelllinien konnte hierbei die Fähigkeit zur Transaktivierung eindeutig nachgewiesen werden.

Zum ersten Mal wurde gezeigt, daß die EGFR Transaktivierung in PC3 Prostatakrebszellen und FTC-133 Schilddrüsenkarzinomzellen durch „gastrin releasing peptide“ (GRP), dem humanen Homolog des amphibischen Neuropeptids Bombesin, vermittelt werden kann.

Die basale Tyrosinphosphorylierung des EGFR wurde durch BB94 in einem breiten Spektrum an Krebszelllinien herabgesetzt, was eine zellübergreifende, entscheidende Rolle der Metalloprotease-Aktivität im EGFR Signalweg demonstrierte, die für höchst unterschiedliche Tumorzelllinien gültig ist.

Zur Untersuchung der EGFR-vermittelten Signalübertragung nach GPCR Stimuli wurde der EGFR durch Vorbehandlung der Tumorzellen mit dem selektiven EGFR Inhibitor Tyrphostin AG1478 inaktiviert. Parallel wurden Metalloproteasen durch BB94 inaktiviert und so die Prozessierung der Vorläufer zu reifen EGFR-Liganden unterbunden. Mit Hilfe dieser Strategien wurde gezeigt, daß die EGFR Transaktivierung ein notwendiger Signalvorgang bei der Neuropeptid-vermittelten SHC Tyrosinphosphorylierung sowie bei der Aktivierung des ERK/MAP Kinase Signalweges in Prostata- und Thyroidkarzinomzellen ist.

Die Aktivierung der Protein Kinase B/Akt wurde in den hoch invasiven PC3 Prototakarzinomzellen durch Neuropeptid-Liganden ebenfalls mit BB94 und AG1478 vermindert.

Im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen, in denen in Nicht-Tumorzellen über eine positive oder negative Rolle der PKC im Transaktivierungssignal berichtet wurde, erwies sich die GPCR-vermittelte Transaktivierung des EGFRs in PC3-, TSU- und FTC-133 Zellen unabhängig von der Proteinkinase C (PKC). Hier wurde erstmals eine klare Abweichung im Signalverhalten der EGFR Transaktivierung bei Krebszellen im Unterschied zu gesunden Zellen aufgezeigt.

Durch Heparin und HB-EGF „Blocking“-Antikörper konnte die EGFR Transaktivierung in PC3 Zellen unterbunden werden, wodurch eine Beteiligung von HB-EGF als Ligand in diesen Zellen gezeigt wurde.

Mit Hilfe von cDNA Makroarray Analysen von verschiedenen Prostatakrebszelllinien konnten Unterschiede in der Expression entscheidender Proteine im EGFR Transaktivierungssignalweg aufgezeigt werden. Die Expression von HB-EGF, Amphiregulin, ADAM12, -17 und -19 fehlte in den schwach kanzerogenen LNCaP Zellen, die keine funktionale EGFR Transaktivierung aufwiesen. Zudem konnte durch die Beobachtung, daß eine Timp-3 sensitive Metalloprotease in die EGFR Signal-Transaktivierung in PC3 Zellen involviert ist, in Kombination mit Markoarray Expressionsdaten, die Anzahl der möglichen Proteasen in diesen Zellen auf ADAM10, ADAM17, MMP 1 und/oder MMP14 beschränkt werden.

Weiterhin liefern diese Studien wissenschaftliche Beweise für die pathophysiologische Bedeutsamkeit der EGFR Transaktivierung in Prostata- und Schilddrüsenkarzinomzellen. Eine Inhibierung der Spaltung des Wachstumsfaktorvorläufers nach Behandlung der Zellen mit Batimastat sowie eine Herabsetzung der EGFR Kinaseaktivität mit dem spezifischen Inhibitor AG1478 resultieren in einer verminderten, GPCR-Liganden-induzierten Motilität, Migration und Invasionsfähigkeit der Krebszellen. Die Ergebnisse belegen eine Einbindung von Neurotransmittern im GPCR-EGFR „Crosstalk“ und konkretisieren den Einfluß des „triple-membrane-passing“ Signals (TMPS) auf die Förderung der Krebsfortschreitung und der Tumorzellinvasion. Diese bisher unklare Verbindung von Neurobiologie und Onkologie kann zum besseren Verständnis von Krebsentwicklung einen wichtigen Beitrag leisten.

Demnach könnte der Signalweg der EGFR Transaktivierung potentielle Interventionsziele für therapeutische Ansätze in klinischen Krebstherapien beinhalten. Die Blockierung der Metalloprotease bzw. EGF-ähnlicher Ligandenvorläufers durch spezifische Medikamente könnte selektiv die Invasion oder das Zellwachstum der Tumorzellen hemmen.

## 6. Summary

Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation is a critical step in G protein-coupled receptor (GPCR)-mediated mitogenic signalling. EGFR transactivation requires a metalloprotease activity for the cleavage of EGF-like growth factor precursors such as proHB-EGF. Blocking of precursor processing by the metalloprotease inhibitors batimastat (BB94) or marimastat (BB2516) prevents rapid GPCR-induced EGFR tyrosine phosphorylation in various cell lines.

One aim of this thesis was the analysis of the role of EGFR transactivation in tumour cells triggered by GPCR agonists in physiological concentrations, with a focus on neurotransmitters. Furthermore, known and potentially novel mediator proteins involved in increased EGFR tyrosine phosphorylation after activation of heterotrimeric G proteins were investigated, to gain further insights into the mechanistic basis of GPCR-induced EGFR transactivation in cancer cells.

Various tumour cell lines were screened for neuropeptide-induced EGFR signal transactivation and sensitivity to BB94 inhibition. GPCR-EGFR crosstalk could be clearly demonstrated in eight out of 37 cell lines.

For the first time it could be shown that gastrin releasing peptide (GRP), the human homologue of the amphibian neuropeptide bombesin, is able to mediate EGFR transactivation in prostate and thyroid cancer cells.

Basal EGFR tyrosine phosphorylation was diminished by BB94 in a broad panel of cancer cell lines, demonstrating the important role of metalloprotease activity for the EGFR signal transduction pathway in cancer cell lines derived from many distinct tumour entities.

Concomitantly, BB94 and the selective EGFR inhibitor tyrphostin AG1478 affected EGFR downstream signalling events such as recruitment of the adaptor protein SHC and activation of the mitogen activated protein kinases (MAP kinases) ERK1/2 after neuropeptide stimulation of prostate and thyroid cancer cells.

In highly invasive PC3 prostate carcinoma cells the activation of the protein kinase B/Akt induced by neuropeptides was also sensitive to BB94 und AG1478.

Previously, EGFR transactivation in non-tumourigenic cells was shown to be PKC-dependent. Contrary to these earlier findings, the results in this study substantiate that EGFR signal transactivation is PKC-independent in PC3-, TSU- and FTC-133 cancer cells.

Usage of Heparin and HB-EGF blocking antibodies diminished EGFR transactivation in PC3 cells, thus establishing HB-EGF is the critical ligand.

Moreover, analysis of cDNA macroarray data in various prostate cancer cell lines revealed different expression levels of proteins critical for EGFR signal transactivation. Expression of HB-EGF, amphiregulin, ADAM12, -17 and -19 was not detected in LNCaP cells, which showed no functional EGFR transactivation and are weakly tumourigenic.

The processing metalloprotease involved in EGFR transactivation in PC3 cells was shown to be Timp-3 sensitive. This observation in combination with cDNA macroarray expression data narrowed down potential proteases to ADAM10, ADAM17, MMP 1 and/or MMP14.

Furthermore, these studies demonstrate the pathophysiological significance of EGFR transactivation in prostate and thyroid cancer cell lines. It could be shown that inhibition of growth factor precursor cleavage by the metalloprotease inhibitor batimastat as well as abolishing the EGFR kinase activity by the specific antagonist AG1478 results in decreased GPCR ligand-induced migratory and invasive capacity of cells. It could also be demonstrated that neurotransmitters are involved in GPCR-EGFR crosstalk thus substantiating the significance of the triple-membrane-passing signal (TMPS) in cancer progression and tumour cell invasion.

These links between neurobiology and oncology have not recognised previously and could contribute to a better understanding of cancer development.

Hence, the signal transduction pathway involved in EGFR transactivation offers potential targets suitable for therapeutic intervention in clinical cancer care. Blocking the metalloprotease or the EGF-like ligand precursor by specific drugs may selectively abolish invasion or cell growth of cancer cells.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adomeit, A., Graness, A., Gross, S., Seedorf, K., Wetzker, R. and 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. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 5289-5297.
- Albini, A., D'Agostini, F., Giunciuglio, D., Paglieri, I., Balansky, R. and De Flora, S. (1995) Inhibition of invasion, gelatinase activity, tumor take and metastasis of malignant cells by N-acetylcysteine. *Int J Cancer*, **61**, 121-129.
- Alroy, I. and Yarden, Y. (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett*, **410**, 83-86.
- Aprikian, A.G., Han, K., Chevalier, S., Bazinet, M. and Viallet, J. (1996) Bombesin specifically induces intracellular calcium mobilization via gastrin-releasing peptide receptors in human prostate cancer cells. *J Mol Endocrinol*, **16**, 297-306.
- Aprikian, A.G., Tremblay, L., Han, K. and Chevalier, S. (1997) Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *Int J Cancer*, **72**, 498-504.
- Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M. and Higashiyama, S. (2002) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*, **8**, 35-40.
- Barnard, D., Diaz, B., Clawson, D. and Marshall, M. (1998) Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene*, **17**, 1539-1547.
- Beerli, R.R., Graus-Porta, D., Woods-Cook, K., Chen, X., Yarden, Y. and Hynes, N.E. (1995) Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol*, **15**, 6496-6505.
- Belcheva, M.M., Haas, P.D., Tan, Y., Heaton, V.M. and Coscia, C.J. (2002) The fibroblast growth factor receptor is at the site of convergence between mu-opioid receptor and growth factor signaling pathways in rat C6 glioma cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **303**, 909-918.
- Biscardi, J.S., Tice, D.A. and Parsons, S.J. (1999) c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv Cancer Res*, **76**, 61-119.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. **411**, 355-365.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A. and Fagni, L. (2003) The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett*, **546**, 65-72.
- Bockaert, J. and Pin, J.P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J*, **18**, 1723-1729.
- Bokemeyer, D., Schmitz, U. and 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.
- Bologna, M., Festuccia, C., Muzi, P., Biordi, L. and Ciomei, M. (1989) Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer*, **63**, 1714-1720.

- Bonfini, L., Migliaccio, E., Pelicci, G., Lanfrancone, L. and Pelicci, P.G. (1996) Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci*, **21**, 257-261.
- Brachmann, R., Lindquist, P.B., Nagashima, M., Kohr, W., Lipari, T., Napier, M. and Derynck, R. (1989) Transmembrane TGF-alpha precursors activate EGF/TGF-alpha receptors. *Cell*, **56**, 691-700.
- Breitwieser, G.E. (2004) G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res*, **94**, 17-27.
- Brognaard, J., Clark, A.S., Ni, Y. and Dennis, P.A. (2001) Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res*, **61**, 3986-3997.
- Brothman, A.R., Lesho, L.J., Somers, K.D., Wright, G.L., Jr. and Merchant, D.J. (1989) Phenotypic and cytogenetic characterization of a cell line derived from primary prostatic carcinoma. *Int J Cancer*, **44**, 898-903.
- Brown, P.D. and Giavazzi, R. (1995) Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity. *Ann Oncol*, **6**, 967-974.
- Buhl, A.M., Johnson, N.L., Dhanasekaran, N. and 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.
- Cao, W., Medvedev, A.V., Daniel, K.W. and 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.
- Cardona, C., Rabbitts, P.H., Spindel, E.R., Ghatei, M.A., Bleeher, N.M., Bloom, S.R. and Reeve, J.G. (1991) Production of neuromedin B and neuromedin B gene expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res*, **51**, 5205-5211.
- Carney, D.N., Cuttitta, F., Moody, T.W. and Minna, J.D. (1987) Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Cancer Res*, **47**, 821-825.
- Carpenter, G. (1999) Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *Journal of Cell Biology*, **146**, 697-702.
- Castagliuolo, I., Valenick, L., Liu, J. and 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.
- Chang, L. and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
- Chansel, D., Ciroidi, M., Vandermeersch, S., Jackson, L.F., Gomez, A.M., Henrion, D., Lee, D.C., Coffman, T.M., Richard, S., Dussaule, J.C. and Tharaux, P.L. (2006) Heparin binding EGF is necessary for vasospastic response to endothelin. *Faseb J*, **20**, 1936-1938.
- Charoenrat, P.O., Rhys-Evans, P. and Eccles, S. (2002) A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor prevents squamous carcinoma cell proliferation by interfering with epidermal growth factor receptor autocrine loops. *Int J Cancer*, **100**, 527-533.
- Chenais, F., Virella, G., Patrick, C.C. and Fudenberg, H.H. (1977) Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A--Sepharose as substrate. *J Immunol Methods*, **18**, 183-192.
- Cho, H.S., Mason, K., Ramyar, K.X., Stanley, A.M., Gabelli, S.B., Denney, D.W., Jr. and Leahy, D.J. (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, **421**, 756-760.
- Chung, C.T. and Miller, R.H. (1993) Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. *Methods Enzymol*, **218**, 621-627.
- Coffer, P.J., Burgering, B.M., Peppelenbosch, M.P., Bos, J.L. and Kruijer, W. (1995) UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene*, **11**, 561-569.

- Cohen, P. (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol*, **4**, E127-130.
- Conklin, B.R. and Bourne, H.R. (1993) Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell*, **73**, 631-641.
- Coughlin, S.R. (1994) Expanding horizons for receptors coupled to G proteins: diversity and disease. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 191-197.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U. and et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**, 1132-1139.
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F. and Gutkind, J.S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **369**, 418-420.
- Crocker, S.J., Pagenstecher, A. and Campbell, I.L. (2004) The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res*, **75**, 1-11.
- Cunnick, J.M., Dorsey, J.F., Standley, T., Turkson, J., Kraker, A.J., Fry, D.W., Jove, R. and Wu, J. (1998) Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 14468-14475.
- Cuttitta, F., Carney, D.N., Mulshine, J., Moody, T.W., Fedorko, J., Fischler, A. and Minna, J.D. (1985) Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*, **316**, 823-826.
- Daaka, Y. (2004) G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci STKE*, **2004**, re2.
- Damstrup, L., Kuwada, S.K., Dempsey, P.J., Brown, C.L., Hawkey, C.J., Poulsen, H.S., Wiley, H.S. and 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.
- Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*, **13**, 2905-2927.
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. and Ullrich, A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *Embo Journal*, **16**, 7032-7044.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. and 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.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and 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.
- Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, **17**, 1447-1455.
- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A. and Schlessinger, J. (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*, **383**, 547-550.
- Dong, J., Opresko, L.K., Dempsey, P.J., Lauffenburger, D.A., Coffey, R.J. and Wiley, H.S. (1999) Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6235-6240.
- Downward, J. (2001) The ins and outs of signalling. *Nature*, **411**, 759-762.
- Eguchi, S., Iwasaki, H., Inagami, T., Numaguchi, K., Yamakawa, T., Motley, E.D., Owada, K.M., Marumo, F. and Hirata, Y. (1999) Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **33**, 201-206.
- Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E.D., Kawakatsu, H., Owada, K.M., Hirata, Y., Marumo, F. and 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. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 8890-8896.
- Ellerbroek, S.M. and 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. and Mills, G.B. (2001) Lysophosphatidic acid and ovarian cancer: a paradigm for tumorigenesis and patient management. *Prostaglandins*, **64**, 63-81.
- Fang, X., Yu, S., LaPushin, R., Lu, Y., Furui, T., Penn, L.Z., Stokoe, D., Erickson, J.R., Bast, R.C., Jr. and Mills, G.B. (2000) Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem J*, **352**, 135-143.
- Fedi P, T.S.a.A.S. (1997) Growth factors. In: *Cancer Medicine. Holland JF Bast RC Morton DL Frei E Kufe DW Weichselbaum RR (eds) pp 41-64. Williams and Wilkins: Baltimore, MD.*
- Festuccia, C., Bologna, M., Gravina, G.L., Guerra, F., Angelucci, A., Villanova, I., Millimaggi, D. and Teti, A. (1999) Osteoblast conditioned media contain TGF-beta1 and modulate the migration of prostate tumor cells and their interactions with extracellular matrix components. *Int J Cancer*, **81**, 395-403.
- Finn, R.S. and Slamon, D.J. (2003) Monoclonal antibody therapy for breast cancer: herceptin. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, **21**, 223-233.
- Fischer, O.M., Giordano, S., Comoglio, P.M. and Ullrich, A. (2004a) Reactive oxygen species mediate Met receptor transactivation by G protein-coupled receptors and the epidermal growth factor receptor in human carcinoma cells. *J Biol Chem*, **279**, 28970-28978.
- Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A., Prenzel, N. and Ullrich, A. (2004b) Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, **24**, 5172-5183.
- Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2003) EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1203-1208.
- Fishman, D.A., Liu, Y., Ellerbroek, S.M. and Stack, M.S. (2001) Lysophosphatidic Acid Promotes Matrix Metalloproteinase (MMP) Activation and MMP-dependent Invasion in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res*, **61**, 3194-3199.
- Fukuhara, S., Chikumi, H. and Gutkind, J.S. (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene*, **20**, 1661-1668.
- Gao, Y., Tang, S., Zhou, S. and Ware, J.A. (2001) The Thromboxane A2 Receptor Activates Mitogen-Activated Protein Kinase via Protein Kinase C-Dependent Gi Coupling and Src-Dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, **296**, 426-433.
- Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W. and Ward, C.W. (2003) The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell*, **11**, 495-505.
- Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Zhu, H.J., Walker, F., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W. and Ward, C.W. (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, **110**, 763-773.
- Geer, P.V., Hunter, T. and Lindberg, R.A. (1994) Receptor Protein-Tyrosine Kinases and their Signal Transduction Pathways. *Annual Review of Cell Biology*, **10**, 251-337.

- Gershoni, J.M. and Palade, G.E. (1982) Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal Biochem*, **124**, 396-405.
- Gershoni, J.M. and Palade, G.E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem*, **131**, 1-15.
- Goetzl, E.J., Dolezalova, H., Kong, Y. and Zeng, L. (1999) Dual mechanisms for lysophospholipid induction of proliferation of human breast carcinoma cells. *Cancer Res*, **59**, 4732-4737.
- Gohla, A., Harhammer, R. and 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. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 4653-4659.
- Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T.M. and Schultz, G. (1999) Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem*, **274**, 17901-17907.
- Goishi, K., Higashiyama, S., Klagsbrun, M., Nakano, N., Umata, T., Ishikawa, M., Mekada, E. and 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.
- Goldman, R., Levy, R.B., Peles, E. and Yarden, Y. (1990) Heterodimerization of the erbB-1 and erbB-2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation. *Biochemistry*, **29**, 11024-11028.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H. and Thorgeirsson, U.P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, **74**, 111-122.
- Grams, F., Crimmin, M., Hinnes, L., Huxley, P., Pieper, M., Tschesche, H. and Bode, W. (1995) Structure determination and analysis of human neutrophil collagenase complexed with a hydroxamate inhibitor. *Biochemistry*, **34**, 14012-14020.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M. and 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. and Gudermann, T. (2000) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase mediates Ras activation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem*, **275**, 12251-12260.
- Gschwind, A., Fischer, O.M. and Ullrich, A. (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **4**, 361-370.
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O.M. and Ullrich, A. (2003) TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J*, **22**, 2411-2421.
- Gschwind, A., Prenzel, N. and Ullrich, A. (2002) Lysophosphatidic Acid-induced Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation and Motility Involves Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transactivation. *Cancer Res*, **62**, 6329-6336.
- Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. and 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.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A. and Carraway, K.L., 3rd. (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8132-8136.
- Hall, R.A., Premont, R.T. and Lefkowitz, R.J. (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol*, **145**, 927-932.

- Hameed, S., Dhillon, W.S. and Bloom, S.R. (2009) Gut hormones and appetite control. *Oral Dis*, **15**, 18-26.
- Hanada, M., Feng, J. and Hemmings, B.A. (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, **1697**, 3-16.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hantschel, O. and Superti-Furga, G. (2004) Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 33-44.
- Harris, R.C., Chung, E. and Coffey, R.J. (2003) EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*, **284**, 2-13.
- Hart, S., Fischer, O.M., Prenzel, N., Zwick-Wallasch, E., Schneider, M., Hennighausen, L. and Ullrich, A. (2005) GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways. *Biol Chem*, **386**, 845-855.
- Hart, S., Fischer, O.M. and Ullrich, A. (2004) Cannabinoids Induce Cancer Cell Proliferation via Tumor Necrosis Factor {alpha}-Converting Enzyme (TACE/ADAM17)-Mediated Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Cancer Res*, **64**, 1943-1950.
- Heasley, L.E. (2001) Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*, **20**, 1563-1569.
- Heijboer, A.C., Pijl, H., Van den Hoek, A.M., Havekes, L.M., Romijn, J.A. and Corssmit, E.P. (2006) Gut-brain axis: regulation of glucose metabolism. *J Neuroendocrinol*, **18**, 883-894.
- Heldin, C.H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, **80**, 213-223.
- Hermans, E. (2003) Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, **99**, 25-44.
- Hermanson, M., Funa, K., Hartman, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.H., Westermarck, B. and Nister, M. (1992) Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res*, **52**, 3213-3219.
- Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G. and Gudermann, T. (1998) Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8985-8990.
- Higashiyama, S. and Nanba, D. (2005) ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim Biophys Acta*, **1751**, 110-117.
- Huang, R.P., Wu, J.X., Fan, Y. and Adamson, E.D. (1996) UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol*, **133**, 211-220.
- Hubbard, S.R. and Till, J.H. (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*, **69**, 373-398.
- Hudziak, R.M., Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1987) Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7159-7163.
- Hunter, T. (1998) The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey Lect*, **94**, 81-119.
- Hunter, T. (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell*, **100**, 113-127.
- Hunter, T. (2002) Tyrosine phosphorylation in cell signaling and disease. *Keio J Med*, **51**, 61-71.
- Hunter, T. (2009) Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 140-146.

- Hutchinson, J., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R. and Muller, W.J. (2001) Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. *Mol Cell Biol*, **21**, 2203-2212.
- Iizumi, T., Yazaki, T., Kanoh, S., Kondo, I. and Koiso, K. (1987) Establishment of a new prostatic carcinoma cell line (TSU-Pr1). *J Urol*, **137**, 1304-1306.
- Imamura, F., Horai, T., Mukai, M., Shinkai, K., Sawada, M. and Akedo, H. (1993) Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun*, **193**, 497-503.
- 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.
- Jarrard, D.F., Blitz, B.F., Smith, R.C., Patai, B.L. and Rukstalis, D.B. (1994) Effect of epidermal growth factor on prostate cancer cell line PC3 growth and invasion. *Prostate*, **24**, 46-53.
- Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W. and Burgess, A.W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*, **284**, 31-53.
- Kalmes, A., Vesti, B.R., Daum, G., Abraham, J.A. and 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. and Watanabe, Y. (2001) Thrombin activates p38 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Life Sci*, **68**, 1989-2000.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-246.
- Kavanaugh, W.M., Turck, C.W. and Williams, L.T. (1995) PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science*, **268**, 1177-1179.
- Keely, S.J., Uribe, J.M. and Barrett, K.E. (1998) Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in t-84 cells - implications for carbachol-stimulated chloride secretion. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 27111-27117.
- King, C.R., Borrello, I., Porter, L., Comoglio, P. and 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.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. and Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J*, **15**, 5314-5325.
- Kodama, H., Fukuda, K., Takahashi, T., Sano, M., Kato, T., Tahara, S., Hakuno, D., Sato, T., Manabe, T., Konishi, F. and Ogawa, S. (2002) Role of EGF Receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **34**, 139-150.
- Konecny, G.E., Wilson, C.A. and Slamon, D.J. (2003) Is there a role for epidermal growth factor receptor inhibitors in breast cancer prevention? *J Natl Cancer Inst*, **95**, 1813-1815.
- Konturek, S.J., Konturek, J.W., Pawlik, T. and Brzozowski, T. (2004) Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol*, **55**, 137-154.

- Kranenburg, O. and Moolenaar, W.H. (2001) Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*, **20**, 1540-1546.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. and 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.
- Kue, P.F., Taub, J.S., Harrington, L.B., Polakiewicz, R.D., Ullrich, A. and Daaka, Y. (2002) Lysophosphatidic acid-regulated mitogenic ERK signaling in androgen-insensitive prostate cancer PC-3 cells. *Int J Cancer*, **102**, 572-579.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lage, A., Crombet, T. and Gonzalez, G. (2003) Targeting epidermal growth factor receptor signaling: early results and future trends in oncology. *Ann Med*, **35**, 327-336.
- Lax, I., Bellot, F., Howk, R., Ullrich, A., Givol, D. and 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, L.F., Guan, J., Qiu, Y. and Kung, H.J. (2001) Neuropeptide-induced androgen independence in prostate cancer cells: roles of nonreceptor tyrosine kinases Etk/Bmx, Src, and focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol*, **21**, 8385-8397.
- Lee, S.Y. and Rasheed, S. (1990) A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques*, **9**, 676-679.
- Lemmon, M.A. and Schlessinger, J. (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*, **19**, 459-463.
- Lengyel, E., Stepp, E., Gum, R. and Boyd, D. (1995) Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promoter activity by c-Ha-ras. *J Biol Chem*, **270**, 23007-23012.
- Leserer, M. (1998) Charakterisierung der G Protein-vermittelten Transaktivierung des EGF Rezeptors in humanen Nierenfibroblasten und Tumorzellen. *Diplomarbeit (LMU München)*.
- Leserer, M., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2000) Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life*, **49**, 405-409.
- Leserer, M., Hart, S. and Ullrich, A. (2002) Metalloproteinase Mediated Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and Cancer Cell Motility. *Chemical Probes in Biology*. NATO Advanced Study Institute, Island of Spetses, Greece, Posterpresentation.
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B. and Schlessinger, J. (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*, **376**, 737-745.
- Li, X., Lee, J.W., Graves, L.M. and 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 Journal*, **17**, 2574-2583.
- Li, Y., Mangasarian, K., Mansukhani, A. and Basilico, C. (1997) Activation of FGF receptors by mutations in the transmembrane domain. *Oncogene*, **14**, 1397-1406.
- Lin, J. and Freeman, M.R. (2003) Transactivation of ErbB1 and ErbB2 receptors by angiotensin II in normal human prostate stromal cells. *Prostate*, **54**, 1-7.
- Linseman, D.A., Benjamin, C.W. and Jones, D.A. (1995) Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **270**, 12563-12568.

- Liu, X., Carlisle, D.L., Swick, M.C., Gaither-Davis, A., Grandis, J.R. and Siegfried, J.M. (2007) Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp Cell Res*, **313**, 1361-1372.
- Logan, S.K., Falasca, M., Hu, P. and 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.
- Luetteke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O. and Lee, D.C. (1993) TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell*, **73**, 263-278.
- Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K. and 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., Lansing, T.J. and Lefkowitz, R.J. (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **271**, 19443-19450.
- Madarame, J., Higashiyama, S., Kiyota, H., Madachi, A., Toki, F., Shimomura, T., Tani, N., Oishi, Y. and Matsuura, N. (2003) Transactivation of epidermal growth factor receptor after heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor shedding in the migration of prostate cancer cells promoted by bombesin. *Prostate*, **57**, 187-195.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
- Mannon, P.J. and 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.
- Marinissen, M.J. and Gutkind, J.S. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 368-376.
- Massague, J. and Pandiella, A. (1993) Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem*, **62**, 515-541.
- Maudsley, S., Pierce, K.L., Zamah, A.M., Miller, W.E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. and 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. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 9572-9580.
- Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A.E., Pelicci, G., Lai, K.M., Superti-Furga, G., Pawson, T., Di Fiore, P.P., Lanfrancone, L. and Pelicci, P.G. (1997) Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-*fos* signalling pathway. *Embo J*, **16**, 706-716.
- Miller, A.D. and Rosman, G.J. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*, **7**, 980-982, 984-986, 989-990.
- Miller, C.C., Hale, P. and Pentland, A.P. (1994) Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem*, **269**, 3529-3533.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. and 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.
- Mischel, P.S. and Cloughesy, T.F. (2003) Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol*, **13**, 52-61.
- Montaner, S., Sodhi, A., Molinolo, A., Bugge, T.H., Sawai, E.T., He, Y., Li, Y., Ray, P.E. and Gutkind, J.S. (2003) Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that

- vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes. *Cancer Cell*, **3**, 23-36.
- Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J. and Wolfman, A. (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*, **260**, 1658-1661.
- Moody, T.W. (1996) Peptides and growth factors in non-small cell lung cancer. *Peptides*, **17**, 545-555.
- Moody, T.W., Pert, C.B., Gazdar, A.F., Carney, D.N. and Minna, J.D. (1981) High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma. *Science*, **214**, 1246-1248.
- Moolenaar, W.H. (1999) Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res*, **253**, 230-238.
- Moolenaar, W.H. (2000) Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. *Ann N Y Acad Sci*, **905**, 1-10.
- Moolenaar, W.H., Kranenburg, O., Postma, F.R. and Zondag, G.C. (1997) Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 168-173.
- Morrison, D.K. and 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. and Andrews, R.C. (2001) TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov Today*, **6**, 417-426.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **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. and 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.
- Nagakawa, O., Ogasawara, M., Murata, J., Fuse, H. and Saiki, I. (2001) Effect of prostatic neuropeptides on migration of prostate cancer cell lines. *Int J Urol*, **8**, 65-70.
- Nakatani, H., Tahara, E., Yoshida, T., Sakamoto, H., Suzuki, T., Watanabe, H., Sekiguchi, M., Kaneko, Y., Sakurai, M., Terada, M. and et al. (1986) Detection of amplified DNA sequences in gastric cancers by a DNA renaturation method in gel. *Jpn J Cancer Res*, **77**, 849-853.
- Neal, D.E., Sharples, L., Smith, K., Fennelly, J., Hall, R.R. and Harris, A.L. (1990) The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer*, **65**, 1619-1625.
- Nicholson, K.M. and Anderson, N.G. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, **14**, 381-395.
- Nicholson, S., Richard, J., Sainsbury, C., Halcrow, P., Kelly, P., Angus, B., Wright, C., Henry, J., Farndon, J.R. and Harris, A.L. (1991) Epidermal growth factor receptor (EGFr); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup. *Br J Cancer*, **63**, 146-150.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, **110**, 775-787.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. and Hynes, N.E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J*, **19**, 3159-3167.
- Ono, K. and Han, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, **12**, 1-13.

- Pandiella, A. and Massague, J. (1991a) Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor alpha is a regulated process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1726-1730.
- Pandiella, A. and Massague, J. (1991b) Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor-alpha precursor. *J Biol Chem*, **266**, 5769-5773.
- Parvathy, S., Karran, E.H., Turner, A.J. and 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.
- Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*, **373**, 573-580.
- Pawson, T. and Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*, **300**, 445-452.
- Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Pawson, T. and Pelicci, P.G. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, **70**, 93-104.
- 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. and Black, R.A. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, **282**, 1281-1284.
- Pierce, K.L., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (2001) New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene*, **20**, 1532-1539.
- Plowman, G.D., Culouscou, J.M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G. and Shoyab, M. (1993) Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1746-1750.
- Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*, **8**, 11-31.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. and 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. and 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 extracellular matrix: membrane-type metalloproteinases make the way. *J Cell Biol*, **149**, 1167-1170.
- Rao, G.N. (1996) Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene*, **13**, 713-719.
- Rao, G.N., Delafontaine, P. and Runge, M.S. (1995) Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **270**, 27871-27875.
- Riese, D.J., 2nd, Bermingham, Y., van Raaij, T.M., Buckley, S., Plowman, G.D. and Stern, D.F. (1996) Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene*, **12**, 345-353.
- Riese, D.J., 2nd and Stern, D.F. (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays*, **20**, 41-48.
- Riese, D.J., 2nd, van Raaij, T.M., Plowman, G.D., Andrews, G.C. and Stern, D.F. (1995) The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol*, **15**, 5770-5776.

- Robinson, D.R., Wu, Y.M. and Lin, S.F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, **19**, 5548-5557.
- Robinson, M.J. and Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 180-186.
- Romijn, J.A., Corssmit, E.P., Havekes, L.M. and Pijl, H. (2008) Gut-brain axis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **11**, 518-521.
- Ropero, S., Menendez, J.A., Vazquez-Martin, A., Montero, S., Cortes-Funes, H. and Colomer, R. (2004) Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, **86**, 125-137.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G. and et al. (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature*, **360**, 689-692.
- Rozengurt, E. (2002) Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 128-134.
- Rusch, V.W., Albain, K.S., Crowley, J.J., Rice, T.W., Lonchyna, V., McKenna, R., Jr., Livingston, R.B., Griffin, B.R. and Benfield, J.R. (1993) Surgical resection of stage IIIA and stage IIIB non-small-cell lung cancer after concurrent induction chemoradiotherapy. A Southwest Oncology Group trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **105**, 97-104; discussion 104-106.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H.J. (1994) Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*, **78**, 963-972.
- Salazar, E.P., Hunger-Glaser, I. and Rozengurt, E. (2003) Dissociation of focal adhesion kinase and paxillin tyrosine phosphorylation induced by bombesin and lysophosphatidic acid from epidermal growth factor receptor transactivation in Swiss 3T3 cells. *J Cell Physiol*, **194**, 314-324.
- Salomon, D.S., Bianco, C. and De Santis, M. (1999) Cripto: a novel epidermal growth factor (EGF)-related peptide in mammary gland development and neoplasia. *Bioessays*, **21**, 61-70.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1990) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA*.
- Saurin, J.C., Fallavier, M., Sordat, B., Gevrey, J.C., Chayvialle, J.A. and Abello, J. (2002) Bombesin stimulates invasion and migration of Isrecol colon carcinoma cells in a Rho-dependent manner. *Cancer Res*, **62**, 4829-4835.
- Schaeffer, H.J. and Weber, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, **19**, 2435-2444.
- Schäfer, B., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2004a) Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene*, **23**, 991-999.
- Schäfer, B., Marg, B., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2004b) Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J Biol Chem*, **279**, 47929-47938.
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B. and Parsons, J.T. (1992) pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5192-5196.
- Schlessinger, J. (1988) Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*, **13**, 443-447.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 211-225.
- Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, **110**, 669-672.

- Schlessinger, J. and Lemmon, M.A. (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE*, **2003**, RE12.
- Schlondorff, J. and Blobel, C.P. (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *Journal of Cell Science*, **112**, 3603-3617.
- Seals, D.F. and Courtneidge, S.A. (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, **17**, 7-30.
- Seethalakshmi, L., Mitra, S.P., Dobner, P.R., Menon, M. and Carraway, R.E. (1997) Neurotensin receptor expression in prostate cancer cell line and growth effect of NT at physiological concentrations. *Prostate*, **31**, 183-192.
- Seth, D., Shaw, K., Jazayeri, J. and 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. and 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**, 2737s-2742s.
- Shaw, G. (1996) The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays*, **18**, 35-46.
- Shawver, L.K., Slamon, D. and Ullrich, A. (2002) Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell*, **1**, 117-123.
- Shelly, M., Pinkas-Kramarski, R., Guarino, B.C., Waterman, H., Wang, L.M., Lyass, L., Alimandi, M., Kuo, A., Bacus, S.S., Pierce, J.H., Andrews, G.C. and Yarden, Y. (1998) Epregrin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J Biol Chem*, **273**, 10496-10505.
- Sibilia, M. and Wagner, E.F. (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, **269**, 234-238.
- Siegfried, J.M., Krishnamachary, N., Gaither Davis, A., Gubish, C., Hunt, J.D. and Shriver, S.P. (1999) Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in non-small cell lung cancer. *Pulm Pharmacol Ther*, **12**, 291-302.
- Siewerts, A.M., Klijn, J.G. and Foekens, J.A. (1997) Assessment of the invasive potential of human gynecological tumor cell lines with the in vitro Boyden chamber assay: influences of the ability of cells to migrate through the filter membrane. *Clin Exp Metastasis*, **15**, 53-62.
- 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. and 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 P2Y2 receptor. Phorbol ester or  $[Ca^{2+}]_i$  elevation can substitute for receptor activation. *J Biol Chem*, **273**, 23110-23117.
- Sridhar, S.S., Seymour, L. and Shepherd, F.A. (2003) Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, **4**, 397-406.
- Stern, D.F. and Kamps, M.P. (1988) EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *Embo J*, **7**, 995-1001.
- Stewart, J.R. and O'Brian, C.A. (2005) Protein kinase C- $\alpha$  mediates epidermal growth factor receptor transactivation in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, **4**, 726-732.

- Strachan, L., Murison, J.G., Prestidge, R.L., Sleeman, M.A., Watson, J.D. and Kumble, K.D. (2001) Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem*, **276**, 18265-18271.
- Su, B. and Karin, M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol*, **8**, 402-411.
- Sun, B., Halmos, G., Schally, A.V., Wang, X. and Martinez, M. (2000) Presence of receptors for bombesin/gastrin-releasing peptide and mRNA for three receptor subtypes in human prostate cancers. *Prostate*, **42**, 295-303.
- Sunnarborg, S.W., Hinkle, C.L., Stevenson, M., Russell, W.E., Raska, C.S., Peschon, J.J., Castner, B.J., Gerhart, M.J., Paxton, R.J., Black, R.A. and Lee, D.C. (2002) Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme (TACE) Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Availability. *J. Biol. Chem.*, **277**, 12838-12845.
- Suzuki, M., Raab, G., Moses, M.A., Fernandez, C.A. and 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.
- Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Kaneko, S. and Sugimachi, K. (1990) Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res*, **50**, 7077-7080.
- Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C. and et al. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, **269**, 230-234.
- Track, N.S. (1983) Regulatory peptides of the gut and brain. *Can J Surg*, **26**, 211-213, 228.
- Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 205-215.
- Tsai, W., Morielli, A.D. and Peralta, E.G. (1997) The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *Embo Journal*, **16**, 4597-4605.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J. and et al. (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. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E. and Lefkowitz, R.J. (1996) Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, **17**, 698-714.
- van Corven, E.J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T. and Moolenaar, W.H. (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, **59**, 45-54.
- van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Medema, R.H., Bos, J.L. and Moolenaar, W.H. (1993) Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1257-1261.
- Venkatakrishnan, G., Salgia, R. and Groopman, J.E. (2000a) 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.
- Venkatakrishnan, G., Salgia, R. and Groopman, J.E. (2000b) 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.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. and Cooper, J.A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205-214.

- Voldborg, B.R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M. and 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., Weiss, F.U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W. and Ullrich, A. (1995) Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *Embo J*, **14**, 4267-4275.
- Warne, P.H., Viciano, P.R. and Downward, J. (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*, **364**, 352-355.
- Wasilenko, W.J., Cooper, J., Palad, A.J., Somers, K.D., Blackmore, P.F., Rhim, J.S., Wright, G.L., Jr. and Schellhammer, P.F. (1997) Calcium signaling in prostate cancer cells: evidence for multiple receptors and enhanced sensitivity to bombesin/GRP. *Prostate*, **30**, 167-173.
- Waskiewicz, A.J. and Cooper, J.A. (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 798-805.
- Weiss, F.U., Daub, H. and Ullrich, A. (1997) Novel mechanisms of RTK signal generation. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 80-86.
- Werb, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, **91**, 439-442.
- Whitehead, I.P., Zohn, I.E. and Der, C.J. (2001) Rho GTPase-dependent transformation by G protein-coupled receptors. *Oncogene*, **20**, 1547-1555.
- Wingens, M., Walma, T., van Ingen, H., Stortelers, C., van Leeuwen, J.E., van Zoelen, E.J. and Vuister, G.W. (2003) Structural analysis of an epidermal growth factor/transforming growth factor- $\alpha$  chimera with unique ErbB binding specificity. *J Biol Chem*, **278**, 39114-39123.
- Wojtowicz-Praga, S.M., Dickson, R.B. and Hawkins, M.J. (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs*, **15**, 61-75.
- Wolfsberg, T.G., Primakoff, P., Myles, D.G. and White, J.M. (1995) ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol*, **131**, 275-278.
- Wong, S.T., Winchell, L.F., McCune, B.K., Earp, H.S., Teixido, J., Massague, J., Herman, B. and Lee, D.C. (1989) The TGF- $\alpha$  precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells, leading to signal transduction. *Cell*, **56**, 495-506.
- Xiao, D., Qu, X. and Weber, H.C. (2003) Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates bombesin-induced mitogenic responses in prostate cancer cells. *Cell Signal*, **15**, 945-953.
- Xu, Y., Gaudette, D.C., Boynton, J.D., Frankel, A., Fang, X.J., Sharma, A., Hurteau, J., Casey, G., Goodbody, A., Mellors, A. and et al. (1995) Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, **1**, 1223-1232.
- Yan, Y., Shirakabe, K. and Werb, Z. (2002) The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol*, **158**, 221-226.
- Yang, S.H., Sharrocks, A.D. and Whitmarsh, A.J. (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*, **320**, 3-21.
- Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, **57**, 443-478.
- Yowell, C.W. and Daaka, Y. (2002) G protein-coupled receptors provide survival signals in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*, **1**, 177-181.

- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. and Schreiber, S.L. (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*, **76**, 933-945.
- Zachary, I. and Rozengurt, E. (1985) Modulation of the epidermal growth factor receptor by mitogenic ligands: effects of bombesin and role of protein kinase C. *Cancer Surv*, **4**, 729-765.
- Zhang, X.F., Settleman, J., Kyriakis, J.M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J., Marshall, M.S., Bruder, J.T., Rapp, U.R. and Avruch, J. (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, **364**, 308-313.
- Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., YamaguchiAoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K. and Ullrich, A. (1997) Critical role of calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 24767-24770.
- Zwick, E., Hackel, P.O., Prenzel, N. and Ullrich, A. (1999a) The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends in Pharmacological Sciences*, **20**, 408-412.
- Zwick, E., Wallasch, C., Daub, H. and Ullrich, A. (1999b) Distinct calcium-dependent pathways of epidermal growth factor receptor transactivation and PYK2 tyrosine phosphorylation in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 20989-20996.

## Publikationen

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. and 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. and Ullrich, A. (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res*, **2**, 184-90. (Übersichtsartikel)

Leserer, M., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2000) Epidermal growth factor receptor signal transactivation. *IUBMB Life*, **49**, 405-9. (Übersichtsartikel)

Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. and Ullrich, A. (2001) Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene*, **20**, 1594-600. (Übersichtsartikel)

## Posterbeiträge

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

Leserer, M., Gschwind, A., Prenzel, N., Zwick, E. and Ullrich, A. (2000) Posterbeitrag: EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Gordon Conference on Proteolytic Enzymes & Their Inhibitors, Colby-Sawyer College, New Hampshire, Bosten, USA, USA*.

Leserer, M., Schäfer, B., Fischer, O., Buschbeck, M. and Ullrich, A. (2000) Posterbeitrag: Metalloprotease Mediated EGFR Transactivation Signal in various tumour cells. *Annual Fall Meeting of the GBM, München, Deutschland*.

Leserer, M., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2000) Posterbeitrag: Metalloprotease Mediated Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transactivation. 2. *Münchner Kongress für Biowissenschaften - BioLog 2000, München, Deutschland.*

Leserer, M., Marg, B. and Ullrich, A. (2002) Posterbeitrag: Metalloprotease Mediated Epidermal Growth Factor Receptor Signal Transactivation - Role in Cancer Cell Motility. *3rd International Conference on Signal Transduction - ICST, Dubrovnik, Kroatien.*

Leserer, M., Hart, S. and Ullrich, A. (2002) Posterbeitrag (*präsentiert von Stefan Hart*): Metalloproteinase Mediated Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation and Cancer Cell Motility. *NATO Advanced Study Institute - Chemical Probes in Biology, Island of Spetses, Greece.*

## Präsentationen

Leserer, M. and Ullrich, A. (2003) Vortrag: Neuropeptide-induced EGFR Transactivation - A Role in Prostate Cancer. *Official Meeting of the Department of Molecular Biology of the MPI of Biochemistry, Schloß Ringberg, BRD.*

## Patente

Titel: "Use of EGFR transactivation inhibitors in human cancer"  
Erfinder: Prof. Dr. Axel Ullrich, Beatrix Schäfer, Oliver Fischer, Andreas Gschwind, Michael Leserer  
Institutsreferenz: Max-Planck-Institut für Biochemie  
Anmeldedatum: 8. März 2002  
GI-Nr.: 2983

## 8. Abkürzungen

'	Minute
"	Sekunde
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
AngII	Angiotensin II
AT-II	Angiotensin II
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BB94	Batimastat (2R,3S)-N4-Hydroxy-N1-[(1S)-2-(methylamino)-2-oxo-1-(phenylmethyl)ethyl]-2-(2-methylpropyl)-3-[(2-thienylthio)methyl]butanediamide
BB2516	Marimastat (2S,3R)-N4-[(1S)-2,2-Dimethyl-1-[(methylamino)carbonyl]propyl]-N1,2-dihydroxy-3-(2-methylpropyl)butanediamide
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder-Serumalbumin
BSN	Bombesin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
d. AG	diese Arbeitsgruppe
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	von extrazellulären Signalen regulierte Kinasen
ET-1	Endothelin-1
FCS	Fötale Kälberserum
Gab1	Grb2-associated binder-1
G-418	Genetecin
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR(n)	G-protein-coupled receptor(s)
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GRP	Gastrin-releasing Peptide
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes deionisiertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER	humaner EGFR
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
JAK(n)	Januskinase(n)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPA	Lysophosphatidylsäure
M1R	M1 muscarinischer Acetylcholinrezeptor
MAP Kinase	von Mitogenen aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
min	Minute
NMB	Neuromedin B
NT	Neurotensin
N/D	nicht durchgeführt (not done)
NSCLC	non-small cell lung cancer
OD	optische Dichte
p.a.	zur Analyse
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEG	Polyethylenglykol
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIA	Phenylisopropyladenosin
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PS	Phosphatidylserin
PTB	Phosphotyrosine binding
PTP(n)	Protein-Tyrosinphosphatase(n)
PTX	Pertussis Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK(n)	Rezeptortyrosinkinase(n)
S1P	Sphingosine-1-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH2, 3-Domäne	Src Homologie 2, 3 Domäne
SHP-2	SH2-containing PTP-2
sog.	sogenannt
Sos	son of sevenless
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases

TM	Transmembranelix
TPA	Tetra-Decanoyl-Phorbol-13-Acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Enzymaktivitätseinheit (Units)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

### Abkürzungen der Aminosäuren

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

## 9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Axel Ullrich für seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei dieser Arbeit in seiner Abteilung für Molekularbiologie des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried bei München bedanken. Zudem gebührt ihm mein besonderer Dank für die Freiräume beim Bearbeiten des Projektes, die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen, die Möglichkeit der Teilnahme an einer Gordon Konferenz in New Hampshire und einer ICST Konferenz in Dubrovnik sowie für seine Großzügigkeit in allen Belangen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Nediljko Budisa für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Technischen Universität München zu vertreten. Zu großem Dank bin ich auch meinem zweiten Gutachter, Herrn Prof. Dr. Michael Groll und dem Vorsitzenden der Prüfungskommission, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Horst Kessler, als Vertreter der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München, verpflichtet.

Für große Hilfe in allen auftretenden praktischen und theoretischen Fragen und für ihre Diskussionsbereitschaft möchte ich Frau Dr. Ester Zwick-Wallasch, Herrn Priv.-Doz. Dr. Henrik Daub, Herrn Dr. Norbert Prenzel, Herrn Dr. Martin Treder sowie Herrn Dr. Stefan Hart danken.

Herrn Dr. Andreas Gschwind danke ich für die Zusammenarbeit an den Übersichtsartikeln.

Dr. Pjotr Knyazev, Tatjana Knyazeva und Dr. Andreas Roidl danke ich im Besonderen für die Einführung in die Welt der cDNA Arrays.

Dr. Irmi Sures danke ich für kritische Diskussionen und Kommentare.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeiter/innen der Abteilung mit denen ich zusammenarbeiten dürfte.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern, die mir meine langjährige Ausbildung durch ihre vielseitige Unterstützung ermöglicht haben.

