



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5966B

**Hemmung von Protein-Tyrosin-  
Phosphatasen als Mechanismus  
der Wachstumsfaktor-Rezeptor-  
Aktivierung durch UV, oxidativen  
Stress und Organometalle**

**A. Knebel**  
Institut für Genetik

**Juli 1997**

---



Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 5966 B

Hemmung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen als  
Mechanismus der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Aktivierung durch  
UV, oxidativen Stress und Organometalle

Axel Knebel

Institut für Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1997

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

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

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

**ISSN 0947-8620**

### Zusammenfassung

UV-Bestrahlung oder Tributylzinn-Behandlung von Säugetier-Zellen induziert innerhalb von Sekunden Tyrosin-Phosphorylierung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und deren Aktivierung. Als Konsequenz dieser Rezeptor-Aktivierung werden Signaltransduktionswege angeschaltet, die die frühe genetische Antwort der Zellen auf diese Stress-Faktoren regulieren. In der vorliegenden Arbeit wird der Mechanismus identifiziert, dem die UV-induzierte Rezeptor-Phosphorylierung zugrunde liegt. Als repräsentative Beispiele werden zwei Wachstumsfaktor-Rezeptoren: der  $\beta$ -PDGF-Rezeptor und insbesondere der EGF-Rezeptor untersucht.

Die UV-induzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors erfolgt in einer liganden-unabhängigen Weise, denn eine Rezeptor-Mutante, die keine Liganden-Binde-Domäne besitzt, kann immer noch durch UV-Strahlung aktiviert werden. An der UV-induzierten Wachstumsfaktor-Rezeptor-Aktivierung sind reaktive, oxidative Intermediate (ROI's) beteiligt. Dafür spricht, daß die Behandlung von Zellen mit Oxidanzien wie  $H_2O_2$  oder Kalium-Permanganat ebenfalls Wachstumsfaktor-Rezeptor-Aktivierung verursacht und daß die Oxidanzien- und UV-induzierte Rezeptor-Aktivierung durch Antioxidanzien wirkungsvoll gehemmt wird. Besonders thiolhaltige Antioxidanzien sind wirksam, ein Hinweis darauf, daß Thiolgruppen bei der Aktivierung beteiligt sein könnten. Diese Hypothese wird durch den Befund unterstützt, daß die Behandlung von Zellen mit Jodazetamid, einer Substanz, die sehr effektiv Thiolgruppen alkyliert, ebenfalls wirkungsvoll zur Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren führt. Die Ursache für die UV-,  $H_2O_2$ -, Jodazetamid- und Tributylzinn-induzierte Rezeptor-Phosphorylierung ist eine Hemmung der Rezeptor-Dephosphorylierung und wahrscheinlich nicht die Aktivierung der Rezeptor-Kinase. Die UV-induzierte Dephosphorylierungs-Hemmung wird durch ROI's vermittelt, denn sie wird durch die Behandlung der Zellen mit Antioxidanzien aufgehoben.

Mit Hilfe von isolierten Membranen wird gezeigt, daß die Hemmung der Dephosphorylierung auf der Inaktivierung einer oder mehrerer Protein-Tyrosin-Phosphatasen beruht. Die Hinweise dafür liefert ein Experiment, bei dem der an Tyrosinen phosphorylierte EGF-Rezeptor in einer Membranfraktion, in der die Phosphatasen inaktiviert sind, durch eine andere Membranfraktion dephosphoryliert werden kann, solange diese nicht mit UV-bestrahlt worden ist. In dieser Arbeit wird ein neuer Mechanismus der Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren durch Inaktivierung von Rezeptor-spezifischen

## Zusammenfassung

---

Tyrosin-Phosphatasen vorgestellt. Dieser Mechanismus impliziert eine hohe konstitutive Tyrosin-Kinase-Aktivität von Wachstumsfaktor-Rezeptoren.

## Abstract

Inhibition of protein tyrosine phosphatases as a mechanism of growth factor receptor activation by UV, oxidativ stress and organometals

Irradiation of mammalian cells with UV induces within seconds tyrosine phosphorylation and activation of receptor tyrosine kinases (RTK). As a consequence of this phosphorylation signal transduction pathways are activated regulating the immediate early UV-response.

The aim of this work is to identify the mechanism of UV-induced RTK-phosphorylation. To illustrate this mechanism the receptors for platelet derived growth factor (PDGFR) and particularly for epidermal growth factor (EGFR) are investigated.

In this study it is shown that the UV-induced tyrosine phosphorylation of the EGFR occurs independently of ligand binding, since a receptor-mutant, lacking the ligand binding domain is still UV-inducible. Evidence has accumulated for the involvement of reactive oxidative intermediates in the UV-induced phosphorylation of growth factor receptors, such that oxidants as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or potassium permanganate are capable of inducing phosphorylation of these receptors. Furthermore the pretreatment of cells with antioxidants can efficiently inhibit UV induced growth factor receptor phosphorylation. Of particular interest thiol-containing antioxidants are efficient inhibitors of UV, suggesting thiolgroups to be involved in this process. Further evidence for the involvement of thiolgroups arose from the fact, that treatment of cells with the thiol-alkylating agent, iodoacetamide efficiently induces tyrosine phosphorylation of growth factor receptors.

Since the structures of these inducers are very different and these agents possess strong enzyme inhibiting activity, it was tested, whether the increase in receptor phosphorylation is a consequence of the inhibition of tyrosine phosphatases. Indeed it was shown that UV, oxidants and iodoacetamide are potent inhibitors of growth factor receptor dephosphorylation. Reactive oxidative intermediates appear to play a crucial role in this process, as pretreatment with antioxidants efficiently prevented the inhibition of receptor dephosphorylation.

Using isolated membranes I could show, that the inhibition of dephosphorylation by UV is the result of the inactivation of one or several protein tyrosine phosphatase(s). Evidence arose from an experiment, where the tyrosine phosphorylated EGFR in isolated membrane, containing no active

## Abstract

---

tyrosine phosphatases, was dephosphorylated by another membrane batch, containing active tyrosine phosphatase as long as it was not UV-irradiated. Here is presented a novel mechanism of growth factor receptor activation by inactivation of tyrosine phosphatases. This mechanism implies the existence of a high constitutive activity of growth factor receptor tyrosine kinases.



### Abkürzungen

|          |  |
|----------|--|
| $\alpha$ | anti (im Zusammenhang mit Antikörpern)   |
| Abb.     | Abbildung  |
| ADH      | Alkohol-Dehydrogenase (aus Hefe)   |
| AP-1     | Aktivator-Protein-1  |
| APS      | Ammonium-Persulfat   |
| ATF-2    | Aktivierender Transkriptions-Faktor-2  |
| ATP      | Adenosin-Triphosphat   |
| BSA      | Rinder-Serum-Albumin   |
| CRE      | C-AMP Reguliertes Element  |
| CREB     | CRE-bindendes Protein  |
| DAG      | Diacylglycerol   |
| DMEM     | Dulbeccos-Modified-Eagles-Medium   |
| DMSA     | Dimercaptobernsteinsäure   |
| DMSO     | Dimethylsulfoxid   |
| DNA      | Desoxyribonukleinsäure   |
| DTNB     | 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure   |
| DTT      | Dithiothreitol   |
| ECL      | "Enhanced Chemoluminescence"   |
| EDTA     | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EGF      | epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)                                  |
| EGFR     | EGF-Rezeptor   |
| Erk      | extrazellulär regulierte Kinase  |
| FCS      | Fötale Kälberserum   |
| x g      | fache Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ )                         |
| GAPDH    | Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase   |
| Grb-2    | Wachstumsfaktor-Rezeptor bindendes Protein<br>(growth factor receptor binding protein) |
| GTP      | Guanosin-5'-Triphosphat  |
| HEPES    | N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure  |
| hSos     | menschliches Homolog des Drosophila Proteins "Son of sevenless"                        |
| IC50     | Konzentration, bei der 50% der Enzymaktivität gehemmt ist                              |
| IP3      | Inositol-Triphosphat   |
| J        | Joule  |
| JNK      | Jun-N-Terminale Kinase   |
| mRNA     | Boten-Ribonukleinsäure   |

## Abkürzungen

---

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| m <sup>2</sup>                  | Quadratmeter  |
| mA                              | Milliampere   |
| Mapk                            | Mitogen-aktivierte Protein-Kinase   |
| MED                             | minimale Erythem auslösende Dosis   |
| MEK                             | Mapk/Erk-Kinase   |
| MEKK                            | Mapk/Erk-Kinase-Kinase  |
| min                             | Minuten   |
| ml                              | Milliliter  |
| mM                              | Millimolar  |
| MW                              | Molekulargewicht  |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> | Na-Orthovanadat   |
| NAC                             | N-Acetylcystein   |
| NAD <sup>+</sup>                | Nikotinamid-Adenosin-Dinukleotid (oxidierte Form)                               |
| NADH                            | Nikotinamid-Adenosin-Dinukleotid (reduzierte Form)                              |
| nm                              | Nanometer   |
| PAGE                            | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| PBS                             | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung  |
| PDGF                            | Blut-Plättchen-sezernierter Wachstumsfaktor<br>(platelet derived growth factor) |
| PI-3-K                          | Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase  |
| PI-4,5-P <sub>2</sub>           | Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat   |
| PI-4-P                          | Phosphatidyl-Inositol-4-Monophosphat  |
| PKB                             | Protein-Kinase-B  |
| PKC                             | Protein-Kinase-C  |
| PLA-2                           | Phospholipase-A-2   |
| PLC- $\gamma$                   | Phospholipase-C-gamma   |
| PMSF                            | Phenylmethylsulfonylflourid   |
| PTB                             | Protein-Tyrosin-Bindedomäne   |
| PTK                             | Protein -Tyrosin-Kinase   |
| PTPase                          | Protein-Tyrosin-Phosphatase   |
| PVDF                            | Poly-Vinyl-Di-Fluorid   |
| PY                              | Phosphotyrosin = Tyrosinphosphatrest  |
| RIPA                            | "Radio-Immunoprecipitation Assay"   |
| RK                              | reaktivierende Kinase   |
| Rsk90                           | p90 Ribosomale Kinase   |
| RSV                             | Rous-Sarcom-Virus   |
| RT                              | Raumtemperatur  |

## Abkürzungen

---

|               |  |
|---------------|--|
| RTK (s)       | Rezeptor-Tyrosin-Kinase (en)                                     |
| SAPK          | Stress aktivierte Protein-Kinase                                 |
| SDS           | Natrium-Lauryl-Sulfat (sodium dodecyl sulfate)                   |
| sek           | Sekunden   |
| SEK1          | SAPK/Erk Kinase-1  |
| Ser           | Serin  |
| SH2           | Src-Homologie-2  |
| Shc           | Src-Collagen-Homolog   |
| SRE           | Serum reguliertes Element (serum responsive element)             |
| SRF           | Serum regulierter Faktor (serum responsive factor)               |
| TBT           | Tri-N-Butylzinn  |
| TCF           | Ternärer-Komplex-Faktor (ternary complex factor)                 |
| TEMED         | N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin                                 |
| Thr           | Threonin   |
| TRIS          | Trishydroxymethylaminomethan                                     |
| tRNA          | Transfer-Ribonukleinsäure  |
| Tyr           | Tyrosin  |
| U             | Unit   |
| UV            | ultraviolette Strahlung  |
| UVA           | ultraviolette Strahlung A ( $\lambda = 320$ bis $400\text{nm}$ ) |
| UVB           | ultraviolette Strahlung B ( $\lambda = 280$ bis $320\text{nm}$ ) |
| UVC           | ultraviolette Strahlung C ( $\lambda = 100$ bis $280\text{nm}$ ) |
| wt            | Wildtyp  |
| $\mu\text{l}$ | Mikroliter   |
| $\mu\text{M}$ | Mikromolar   |

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Einleitung .....  | 1         |
| <b>Der EGF-Rezeptor und seine Signaltransduktion .....</b>  | <b>1</b>  |
| Aktivierung des EGF-Rezeptors durch EGF .....   | 1         |
| Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase .....  | 3         |
| Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$ .....   | 3         |
| Aktivierung des Ras-Raf-Erk-1,2-Signaltransduktionsweges .....                                      | 4         |
| Signaltransduktionswege zur p38/RK und zu JNK/SAPK .....  | 5         |
| EGF stimuliert die Expression des c-jun und c-fos-Gens .....  | 6         |
| <b>UV-Strahlung als Umweltreiz .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Tributylzinn als Umweltgift .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>Die UV-Antwort in Säugetierzellen .....</b>  | <b>12</b> |
| UV induziert Genexpression .....  | 12        |
| c-Fos hat eine Schutzfunktion für UV-bestrahlte Zellen .....  | 12        |
| Mechanismus der UV-induzierten Aktivierung des c-jun-<br>Promoters .....                            | 13        |
| Aktivierung des c-fos Promoters in UV-bestrahlten Zellen .....                                      | 15        |
| UV-Bestrahlung führt zur Aktivierung des EGF-Rezeptors .....  | 16        |
| UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung des Insulin-Rezeptors<br>und der ZAP-70-Tyrosin-Kinase ..... | 17        |
| <b>Zielsetzung .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>Material und Methoden</b>  |           |
| <b>Material .....</b>   | <b>19</b> |
| Bezugsquellen .....   | 19        |
| Antikörper .....  | 21        |
| Zellen .....  | 22        |
| UV-Lampen .....   | 22        |

|   |           |
|---|-----------|
| cDNA-Fragmente zur Hybridisierung von mRNA im Northern-Blot.....  | 24        |
| <b>Methoden.....</b>  | <b>25</b> |
| Zellkultur.....   | 25        |
| Behandlung der Zellen.....  | 26        |
| Herstellung von Proteinlysaten.....   | 26        |
| Herstellen der Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> -Stammlösung.....  | 26        |
| Immunpräzipitation.....   | 27        |
| Immunkomplex-Kinase-Experiment zur Untersuchung der JNK/SAPK-Aktivität.....   | 27        |
| Membran-Präparation.....  | 28        |
| Membran-Dephosphorylierung.....   | 29        |
| SDS Gel Elektrophorese.....   | 29        |
| Transfer von Proteinen auf Membranen und "Western Blot"-Analyse.....  | 30        |
| Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen.....  | 31        |
| Messungen der Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität und der Menge von Thiolgruppen.....   | 31        |
| Poly (A) <sup>+</sup> -RNA Präparation mit der Proteinase K Methode.....  | 31        |
| Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....   | 32        |
| Northern Blotting und Hybridisierung.....   | 32        |
| <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>Mechanismus der UV-induzierten Wachstumsfaktor-Rezeptor-Aktivierung.....</b>   | <b>35</b> |
| Der Grad der Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors in UV-bestrahlten Zellen ist abhängig von der Dosis und der Wellenlänge der verwendeten Strahlung.....  | 35        |
| Oxidativer Stress führt in sehr kurzer Zeit zu einer Zunahme von Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor. Dies hat eine verstärkte Assoziation des Brückenproteins Shc mit dem Rezeptor zur Folge..... | 36        |
| Die UV und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzierte Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor ist ligandenunabhängig.....  | 37        |
| Wechselwirkungen zwischen dem EGF-Rezeptor und ErbB2 in UV-bestrahlten oder H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -behandelten Zellen.....  | 40        |

|   |           |
|---|-----------|
| Die UV- und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung wird durch thiolhaltige Antioxidanzien stark gehemmt.....       | 43        |
| Die Modifikation von Thiolgruppen induziert Tyrosin-Phosphorylierung an Kinase-Substraten.....  | 43        |
| Na-Vanadat hat eine starke synergistische Wirkung auf die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch UV, Oxidationsmittel oder Jodazetamid..... | 46        |
| UV-, Oxidanzien- und Jodazetamid-Behandlung von Zellen induzieren eine Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung des $\beta$ -PDGF-Rezeptors.....     | 48        |
| UV, oxidativer Stress und Jodazetamid hemmen die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors .....   | 50        |
| UV-Strahlung verursacht eine Verzögerung der Dephosphorylierung des $\beta$ -PDGF-Rezeptors .....   | 53        |
| Die Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung kann durch Vorbehandlung mit N-Acetylcystein verhindert werden .....                                | 56        |
| Die Tyrosin-Dephosphorylierungsaktivität ist membranständig.....  | 58        |
| UV und Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> hemmen die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors auch in isolierten Membranen.....                            | 61        |
| Die durch UV-Bestrahlung eingeführte Verzögerung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung ist mit N-Acetylcystein revertierbar.....                      | 62        |
| Die Verzögerung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung ist eine Folge der UV-induzierten Hemmung einer Protein-Tyrosin-Phosphatase .....               | 64        |
| <b>Das Umweltgift Tributylzinn aktiviert EGF-Rezeptor-Signaltransduktion.....</b>   | <b>66</b> |
| Tributylzinn-Behandlung verursacht eine Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung und induziert EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung .....       | 66        |
| TBT-aktiviert Erk-1,2, JNK/SAPK und p38/RK- Mapkinasen.....   | 70        |
| Tributylzinn induziert c-jun und c-fos-mRNA-Akkumulation .....  | 73        |
| Die TBT-induzierte Aktivierung der Erk-1,2 wird zum Teil durch den EGF-Rezeptor vermittelt .....  | 74        |
| Erk-1,2 und p38/RK-Mapkinasen vermitteln die TBT-induzierte Genexpression .....   | 75        |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Die Hefe-Alkohol-Dehydrogenase als in vitro-Modell-System für UV-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, Jodacetamid, und Tributylzinn-vermittelter Enzymhemmung</b> ..... | 79  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - und Jodacetamid-Behandlung einer ADH-Lösung führen zur Hemmung der katalytischen ADH-Aktivität.....                                  | 80  |
| TBT hemmt revertierbar die Alkohol-Dehydrogenase und reagiert mit Dithiolen .....  | 81  |
| UVB und UVC-Strahlung hemmt in sehr hohen Dosen die Enzymaktivität der ADH und führt zu einem leichten Verlust von Thiol-Gruppen.....                                | 83  |
| Die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - oder Jodacetamid-Behandlung, sowie die UV-Bestrahlung von ADH führen zu einem Verlust von Thiolgruppen an der ADH.....           | 85  |
| <b>Diskussion</b> .....  | 90  |
| Zellulärer Stress induziert Rezeptor-Phosphorylierung .....  | 90  |
| Hemmung der Dephosphorylierung.....  | 92  |
| Stress hemmt PTPasen.....  | 94  |
| Mechanismus der Stress-induzierten PTPase-Hemmung.....   | 98  |
| Die Rolle der Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> -Vorbehandlung.....  | 101 |
| Rezeptor-Dimerisierung .....   | 102 |
| Bedeutung der Stress-induzierten EGF-Rezeptor-Aktivierung.....   | 103 |
| <b>Literaturverzeichnis</b> .....  | 106 |

## Einleitung

Eukaryontische Zellen sind ständig einer Vielzahl von Reizen ausgesetzt, die sie registrieren und beantworten müssen. Zu diesen Reizen zählen Signalmoleküle des Organismus, z. B. Gewebshormone (Mediatoren), Hormone, Wachstumsfaktoren, sowie elektrische Signale des Nervensystems. Für die Signalmoleküle des Organismus, welche die Aufgabe haben das Schicksal der Zelle zu regulieren, gibt es spezifische Rezeptoren.

Diese Rezeptoren vermitteln die Liganden-induzierte Regulation von genetischen Programmen wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. Ihre Aktivierung wird über spezifische Signaltransduktionswege durch das Zytoplasma zum Zellkern weitergeleitet, wo Transkriptionsfaktoren die Genexpression steuern.

In den letzten Jahren wurden unter anderem die Rezeptoren für unterschiedliche Hormone (Insulin, Steroide, Hypothalamushormone), für mitogene Faktoren (LPA = Lysophosphat-Säure, EGF = epidermaler Wachstumsfaktor und PDGF = Blut-Plättchen-sezernierter Wachstumsfaktor) und für Mediatoren ( $\text{TNF}\alpha$  = Tumor-Nekrosis-Faktor- $\alpha$ , Interleukine und NO) identifiziert. Der EGF-Rezeptor ist einer der Rezeptoren, bei dem sowohl die Mechanismen der Aktivierung durch die Liganden, die Signaltransduktion als auch die Mechanismen der Genaktivierung detailliert charakterisiert worden sind oder zur Zeit aufgeklärt werden.

### **Der EGF-Rezeptor und seine Signaltransduktion**

#### Aktivierung des EGF-Rezeptors durch EGF

Der EGF-Rezeptor gehört zusammen mit ErbB2, ErbB3 und ErbB4 zu einer Familie von Transmembran-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die untereinander in Sequenz und Struktur ähnlich sind. Sie besitzen zwei extrazelluläre cysteinreiche Domänen, eine kurze Transmembran-Domäne, eine intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne, und eine regulatorische Domäne, die fünf Substrat-Tyrosinreste umfasst. Sechs verschiedene Liganden aktivieren Mitglieder der EGF-Rezeptor-Familie durch Bindung an die extrazelluläre Domäne. Amphiregulin, Betacellulin, EGF, HB-EGF (Heparin-bindendes EGF) und TGF- $\alpha$  binden an und aktivieren den EGF-Rezeptor. ErbB3 oder ErbB4



werden durch die Bindung von Heregulin aktiviert. Für ErbB2 wurde bisher noch kein Ligand identifiziert.

Der EGF-Rezeptor bildet nach der Aktivierung Homodimere oder Heterodimere mit ErbB2 oder ErbB3. In diesen Dimeren findet eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung in Form von intermolekularer Autophosphorylierung statt. Die Rezeptoren sind also gleichzeitig Kinase und Substrat für ihre Nachbarn.

ErbB2 ist die einzige Rezeptor-Tyrosin-Kinase aus der EGF-Rezeptor-Familie, die mit allen anderen Mitgliedern, also mit dem EGF-Rezeptor, ErbB3 und ErbB4 heterodimerisieren kann. In diesen Heterodimeren wird ErbB2 an Tyrosinen phosphoryliert und aktiviert, wenn koexprimierter EGF-Rezeptor, ErbB3 oder ErbB4 durch Ligandenbindung aktiviert werden (Ullrich und Schlessinger, 1990; Fantl *et al.*, 1993; Lemmon und Schlessinger, 1994 und Heldin, 1995).

Eine direkte Folge der gesteigerten Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ist die Assoziation mit einer Reihe von Signal-Proteinen (Kazlauskas, 1994). Diese Signal-Proteine verfügen über spezifische Tyrosin-Phosphat-Erkennungsdomänen. SH2-Domänen (Src-Homologe-Domäne-2) erkennen Tyrosin-Phosphate durch einige carboxyterminal des Tyrosin-Phosphats gelegene Aminosäuren. PTB-Domänen (Protein-Tyrosin-Binde-Domänen) binden ebenfalls an Tyrosin-Phosphate, unterscheiden sich jedoch strukturell von SH2-Domänen und erzielen Bindespezifität durch die Erkennung von vier Aminosäuren, die N-terminal des Tyrosinphosphats lokalisiert sind (Guan, 1994; Johnson und Vaillancourt, 1994; van den Geer und Pawson, 1995).

Tyrosin-Phosphat-bindende Signalproteine sind Startpunkte unterschiedlicher Signaltransduktionswege. An den an Tyrosinen phosphorylierten EGF-Rezeptor binden Shc (Src-Collagen-Homolog) und Grb-2 (growth factor receptor binding protein-2), PLC- $\gamma$  (Phospholipase C- $\gamma$ ), PI3-K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase), SH-PTP2 (Src-Homologe-Protein-Tyrosin-Phosphatase-2) und p91-Stat (Margolis und Skolnik, 1994).

### Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase

Die PI3-K besteht aus einer 85kD großen regulatorischen Untereinheit (p85 PI3-K) und einer 110kD großen katalytischen Untereinheit (p110 PI3-K), die aktiviert wird, wenn die p85 PI3-K an den tyrosinphosphorylierten Rezeptor bindet. p110 PI3-K kann die D-3-Position von Phosphatidyl-Inositol (PI), Phosphatidyl-Inositol-4-Phosphat (PI-4-P) oder Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PI-4,5-P<sub>2</sub>) phosphorylieren (Kapeller und Cantley, 1994; Kazlauskas, 1994; Fry, 1994). Die D-3-phosphorylierten Phosphatidyl-Inositole sind wiederum Botenstoffe, die nach einer noch umstrittenen Hypothese an Protein-Kinase B-Homodimere (PKB/c-Akt) binden und deren Dissoziation auslösen (Bos, 1995). Offensichtlich ist für die Aktivierung der PKB/c-Akt auch die Phosphorylierung von Thr-308 und Ser-473 durch eine noch nicht identifizierte Proteinkinase notwendig (Alessi *et al.*, 1996). Die aktivierte PKB/c-Akt phosphoryliert wiederum unbekannte Mitglieder einer Kinasekaskade, in die unter anderem p70<sup>S6</sup>-Kinase involviert ist. Die nukleären Zielproteine dieses Signaltransduktionsweges müssen noch aufgeklärt werden. Es gibt Hinweise, daß die PI3-K eine wichtige Rolle bei der Wachstumsfaktor-induzierten Proliferation spielt (Vartikovski *et al.*, 1994). Bei einer Zelllinie, deren mitogene Antwort auf PDGF durch die Mutation der fünf wichtigsten Tyrosine des  $\beta$ -PDGF-Rezeptors ausgeschaltet worden war, konnte die Transfektion einer  $\beta$ -PDGF-Rezeptor-Mutante, die nur die PI-3-K binden konnte, die mitogene Antwort auf PDGF wieder herstellen. Im Gegensatz dazu, konnte die Transfektion einer Mutante, die nur Ras-GAP oder nur SH-PTP2 binden konnte, die PDGF-induzierte Proliferation nicht vermitteln. Für eine entscheidende Rolle der PI-3-K bei der zellulären Antwort auf Mitogene spricht außerdem, daß der PI-3-K-Inhibitor Wortmannin die Wachstums-stimulierende Wirkung des Hepatozyten-Wachstumsfaktors und von Erythropoetin hemmt (Damen *et al.*, 1995; Skouteris *et al.*, 1996).

### Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$

In vielen EGF-stimulierten Zelllinien bindet PLC- $\gamma$  mittels SH2-Domänen an das EGF-Rezeptor-Tyrosinphosphat-992 und wird dann selbst verstärkt an Tyr-783 phosphoryliert, was zur Aktivierung beiträgt (Nishibe *et al.*, 1990; Vega *et al.*, 1992). Die aktivierte PLC- $\gamma$  spaltet Phosphatidyl-Inositol-4,5-

Bisphosphat (PI-4,5-P<sub>2</sub>) in Inositol-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diazylglyzerol (DAG), welche beide sehr potente sekundäre Botenstoffe sind. IP<sub>3</sub> bindet an seine Rezeptoren, eine Familie von Ca<sup>++</sup>-Kanälen, die durch IP<sub>3</sub>-Bindung geöffnet werden und den Fluß von Ca<sup>++</sup>-Ionen aus intrazellulären Ca<sup>++</sup>-Speichern ins Zytosol steuern. DAG aktiviert die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . PKC ist unter anderem in der Lage die Protein-Kinase Raf-1 zu phosphorylieren und so zur Erk-1,2-Aktivierung beizutragen (Nishizuka, 1992; Berridge, 1993; Kazlauskas, 1994; Noh *et al.*, 1995).

### Aktivierung des Ras-Raf-Erk-1,2-Signaltransduktionsweges

Der Hauptteil der EGF-Rezeptor-vermittelten Aktivierung der Raf-MEK-Erk-1,2-Protein-Kinase-Kaskade wird durch p21Ras vermittelt.

Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an den Aminosäuren Tyr-992, Tyr-1148 und Tyr-1173 führt zur Bindung und Tyrosin-Phosphorylierung der Shc-Isoformen p46-, p52- und p66-Shc, während Grb-2 an die phosphorylierten Tyr-1068 und Tyr-1086 bindet (Batzer *et al.*, 1994, Okayabashi *et al.*, 1994). Vermutlich bindet Shc sowohl mit der SH2-Domäne als auch mit der PTB-Domäne an den EGF-Rezeptor (van den Geer und Pawson, 1995). Grb-2 verfügt über zwei SH3-Domänen (Src-Homologe-Domäne-3), die von prolinreichen Regionen des Guanin-Austausch-Faktors hSos (human Son of Sevenless) gebunden werden. Dies führt dazu, daß hSos an die Plasmamembran gebracht wird und dort die GTPase p21Ras aktiviert (Khosravi-Far und Der, 1994). p21Ras wiederum rekrutiert die Proteinkinase Raf-1 an die Membran, wo sie durch noch unbekannte Kinasen phosphoryliert und aktiviert wird (Avruch *et al.*, 1994; Daum *et al.*, 1994; Pronk and Bos, 1994).

Ein weiteres an Tyr-992 bindendes, für die Aktivierung von p21Ras notwendiges Signalprotein ist die Protein-Tyrosin-Phosphatase SH-PTP2, die auch PTP1D, Syp, SH-PTP3 oder PTP2C heißt (Lechleider *et al.*, 1993; Milarski und Saltiel, 1994; Xiao *et al.*, 1994; Bennett *et al.*, 1996; Roche *et al.*, 1996). Möglicherweise dephosphoryliert und aktiviert SH-PTP2 ein Mitglied der Src-Tyrosin-Kinase Familie. Mitglieder der Src-Kinase Familie spielen bei der p21Ras-Aktivierung eine Rolle (Qureshi *et al.*, 1992). Raf-1 ist die erste Kinase einer Protein-Kinase-Kaskade und phosphoryliert die Mapkinase-Kinasen MEK-1 und MEK-2 (Mapk/Erk-Kinase (Blumer und Johnson, 1994; Marshall, 1995)). Diese Kinasen sind bispezifisch, das heißt, sie katalysieren

sowohl Tyrosin- (Tyr 185) als auch Threonin-Phosphorylierung (Thr 183) von Erk-1,2 = p44/p42Mapkinasen.

Erk-1 und Erk-2 gehören zur Familie der prolangerichteten Mapkinasen und scheinen in vielen Aspekten die gleichen Eigenschaften zu haben und bisher konnten keine unterschiedlichen Funktionen für diese beiden Kinasen gefunden werden. So können mehrere Transkriptionsfaktoren (c-Myc, c-Fos, NF-IL6, p62<sup>TCF</sup>, TAL-1 und ATF-2) phosphoryliert werden, nachdem die Erk-1,2 in den Zellkern transloziert ist. Außerdem kann die zytosolische Erk-1,2 auch Proteine phosphorylieren, die in der eigenen Aktivierungskaskade liegen, wie den EGF-Rezeptor, hSos, Raf-1 und MEK-1 (Übersicht in Johnson und Vaillancourt, 1994). Diese Phosphorylierungen haben zum Teil inhibitorische Auswirkungen und können Teil einer Rückkopplungs-Regulation sein. Erk-1,2 phosphoryliert auch die Zytoskelett-Proteine Tau und MAP-2.

Außerdem aktiviert Erk-1,2 die zytosolische Phospholipase A-2 durch Phosphorylierung von Serin-505 (Lin *et al.*, 1993). Es ist allerdings notwendig, daß neben dieser Phosphorylierung auch eine intrazelluläre Erhöhung des Ca<sup>++</sup>-Spiegels erfolgt, damit eine effiziente Liganden-stimulierte PLA-2-Aktivierung erfolgen kann (Schalwijk *et al.*, 1996). Zellen, in denen die Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen nicht nur zur Aktivierung der Erk-1,2 führt, sondern auch zur PLC $\gamma$  vermittelten Ca<sup>++</sup>-Freisetzung, reagieren besonders mit PLA-2-Aktivierung und Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden sowohl in das Zytosol als auch in die Umgebung der Zelle (Dennis, 1987; Shimizu, 1990).

### Signaltransduktionswege zur p38/RK und zu JNK/SAPK

Neben der Erk-1,2 werden durch EGF auch andere prolangerichtete Mapkinasen, d.h. die Jun-N-terminalen-Kinasen/Stress-aktivierte Protein-Kinasen (JNK/SAPK = SAPK-1) und die p38/RK-Mapkinase (p38/RK = SAPK-2) stimuliert. Während die Erk-1,2 in EGF-behandelten Zellen sehr stark aktiviert wird, ist die EGF-induzierte Aktivierung der JNK/SAPK bzw. der p38/RK wesentlich schwächer und wird durch andere Stimulatoren, wie z.B. osmotischen Schock, UV-Strahlung oder oxidativen Stress weit übertroffen (Cano *et al.*, 1995; Rosette und Karin, 1996; Cano *et al.*, 1996). Die Signaltransduktionswege, die die EGF-stimulierte Aktivierung der JNK/SAPK oder p38/RK vermitteln, sind bisher nur zum Teil identifiziert.

Die JNK/SAPK transloziert nach Aktivierung in den Zellkern und phosphoryliert dort die Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2 (Hibi *et al.*, 1993; Dérijard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994, Gupta *et al.*, 1996). p38/RK wandert ebenfalls in den Zellkern und phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren ATF-2 und p62<sup>TCF</sup>.

### EGF stimuliert die Expression des *c-jun* und *c-fos*-Gens

C-Jun und c-Fos gehören zu den Proteinen, die innerhalb von Minuten nach der Aktivierung von Zellen mit Wachstumsfaktoren verstärkt exprimiert werden. Sie sind Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (Aktivierendes Protein-1), die jeweils mehrere Mitglieder der Jun- und der Fos/Fra-Familien umfasst. Sowohl *c-jun* als *c-fos* sind als Proto-Onkogene identifiziert worden und spielen bei der Regulation der Proliferation und der Transformation eine wichtige Rolle (Angel *et al.*, 1987b; Lee *et al.*, 1987a,b). Ihre Promotoren werden selbst von Mitgliedern der AP-1-Familie reguliert.

Am Promoter des *c-jun*-Gens sind an den Elementen jun1 (Position: -71 bis -64) und jun2 (-190 bis -180) konstitutiv Homodimere von c-Jun oder Heterodimere von c-Jun/ATF-2 gebunden (Übersicht in: Rahmsdorf, 1996). Die Transaktivierungs-Fähigkeit von c-Jun wird unter anderem durch die Phosphorylierung der N-terminalen Serine 63 und 73 durch JNK/SAPK gesteigert. ATF-2 kann durch sowohl durch Erk-1,2 (Livingstone *et al.*, 1995), JNK/SAPK (van Dam *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1996) als auch durch p38/RK phosphoryliert und aktiviert werden (Cuenda *et al.*, 1997) (zusammengefasst in Rahmsdorf, 1996; Bender *et al.*, 1997).

Der Promoter des *c-fos*-Genes wird durch mindestens vier Elemente reguliert (Treisman, 1994; Jahnknecht *et al.*, 1995). Am SRE (Serum-Reguliertes Element, Position: -320 bis -300) bindet ein Komplex von zwei SRF-Proteinen (Serum-Regulierter Faktor) und einem p62<sup>TCF</sup>-Protein (Ternärer Komplex Faktor). p62<sup>TCF</sup> wird durch aktivierte Erk-1,2, durch JNK/SAPK und durch die p38/RK phosphoryliert und aktiviert (Jahnknecht *et al.*, 1993; Cavigelli *et al.*, 1995; Whitmarsh *et al.*, 1995; Hazzalin *et al.*, 1996). Das CRE (Cyclisches-Adenosin Monophosphat reguliertes Element, Position: -64 bis -57) wird durch den Transkriptionsfaktor CREB (CRE-bindendes Protein) reguliert. CREB kann in Wachstumsfaktor-behandelten Zellen, durch die RSK-2 an Serin-133 phosphoryliert und dadurch aktiviert werden, wie erst kürzlich gefunden wurde. RSK-2 wiederum wird durch Erk-2 aktiviert (Xing *et al.*, 1996). Am

SIE (Sis induzierbares Element, Position -345) binden Transkriptionsfaktoren der Stat-Familie ("signal transducer and activator of transcription"). p91<sup>Stat</sup> wird durch direkte Bindung an den EGF-Rezeptor aktiviert und danach auf noch nicht geklärte Weise in den Zellkern transloziert, wo es transkriptionelle Aktivierung durchführt. Ein weiteres induziertes Promoter-Element wurde an der Position +18 bis +38 gefunden. Dieses Element wird nicht von Wachstumsfaktoren induziert, sondern durch UV-Bestrahlung. Die an dieses Element bindenden Transkriptionsfaktoren sind bis jetzt noch nicht identifiziert worden (Härtig *et al.*, 1991).

### UV-Strahlung als Umweltreiz

Auch zellschädigende Agenzien, wie Alkylanzien oder Oxidanzien bzw. physikalische Reize wie osmotischer Schock, Temperaturschock oder Strahlung erfordern eine Regulation der Genexpression, um eine Adaption an diese Bedingungen zu ermöglichen.

Ein Umweltreiz, dem fast alle Lebewesen ausgesetzt sind, ist die UV-Strahlung der Sonne. UV-Strahlung teilt man in die UVC- (100-280 nm), UVB- (280-320 nm) und UVA-Strahlung (320-400 nm) ein. Durch die Ozonschicht in der Stratosphäre der Erde wird ein sehr großer Teil der energiereichen, kurzwelligen UV-Strahlung absorbiert, so daß nur UVB-Strahlung mit mehr als 290 nm und vor allem UVA-Strahlung den Erdboden erreicht (Madronich, 1993). Die Strahlungsstärke von UVB (300 nm) auf der Erdoberfläche ist ca. 100- bis 1000-fach geringer als die von UVA (330 nm) (Seckmeyer und McKenzie, 1992).

Die UV-Strahlung hat für den Menschen positive und negative Auswirkungen. Eine bekannte positive Wirkung von UVB ist die Beteiligung an der Synthese von Vitamin D in der Haut. Vitamin D wird für den Aufbau und die Erhaltung des Skeletts benötigt (Zusammengefasst in Webb, 1993).

UV-Strahlung verursacht aber auch schwere Zellschäden, wenn die Strahlungs-dosis so hoch ist, daß die zellulären Schutzsysteme versagen. Die Art der Zellschädigung und die Konsequenzen für das Schicksal der Zelle hängen davon ab, welche Moleküle die Strahlung absorbieren. UVB-Strahlung wird von DNA absorbiert. Dabei entstehen im wesentlichen Pyrimidindimere und 4-6-Photoaddukte (Freeman *et al.*, 1989; Quate *et al.*, 1992). Dadurch entstehen Mutationen, die das Absterben der Zelle oder eine Fehlregulation der Proliferation und damit Krebs zur Folge haben können.

In der Tat ist UVB-Strahlung ein Vollkarzinogen, denn neben der Tumor-Initiation, induziert sie auch molekulare Vorgänge, die Tumorpromotion und Progression zur Folge haben. UVB-Strahlung induziert die Gen-Expression der Proto-Onkogene *c-fos* (Hollander *et al.*, 1989; Brunet *et al.*, 1990; Shah *et al.*, 1993; Roddey *et al.*, 1994) und *c-myc* (Ronai *et al.*, 1988). Es wurde gefunden, daß in UVB-induzierten Tumoren das *ras*-Proto-Onkogen als Folge von Genamplifikation überexprimiert wurde (Husain *et al.*, 1990). In UV-induzierten Melanomen wurden Mutationen im *N-ras*-Gen (van't Veer *et al.*, 1989) und in Haut-Karzinomen UV-induzierte Mutationen des Tumor-Suppressor-Gens *p53* festgestellt (Brash *et al.*, 1991; Kress *et al.*, 1992). Außerdem wird die Etablierung von UV-induzierten Tumoren durch lokale und systemische Immunsuppression gefördert (Übersichtartikel: Streilein *et al.*, 1994; Vermeer und Hurks, 1994; Yarosh und Kripke, 1996).

Ob DNA-Schäden auch ursächlich für die UV-induzierte Immunsuppression sind, ist noch strittig. Hinweise für eine Beteiligung von UV-induzierten DNA-Schäden bei der Entstehung der Immunsuppression, erhielt man von Experimenten, bei denen die Nachbehandlung von UV-bestrahlter Haut mit T4N5-Liposomen der Immunsuppression entgegen wirkte (Kripke, 1994). T4N5-Liposomen enthalten gereinigte, aktive, bakterielle T4-Endonuklease-V, ein Pyrimidin-Dimer-spezifisches Exzisions-Reparatur-Enzym. Diese Nachbehandlung hemmt auch die Freisetzung der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-10, die die UVB-induzierte Immunsuppression vermitteln (Kripke, 1994; Yarosh und Kripke, 1996). Aber auch trans-Urocaninsäure auf der Haut absorbiert sehr gut 300 nm-UVB-Strahlung. Dabei wird trans-Urocaninsäure (trans-UCA) in cis-UCA umgewandelt. Trans-UCA entsteht durch Histidin-Amoniak-Lyase-katalysierte Desaminierung von Histidin im Schweiß. Die Applikation von cis-UCA führt auch ohne UV-Bestrahlung zu einer Immunsuppression. Mäuse, die eine inaktivierende Mutation im Histidin-Amoniak-Lyase-Gen tragen und nur 10 % der normalen trans-UCA-Menge produzieren, werden durch UV-Bestrahlung wesentlich schwächer immunsupprimiert als Wildtyp-Mäuse (Norval *et al.*, 1989; Noonan und De Fabo, 1992). Es ist auch noch nicht klar, welche Zellschäden für die Auslösung von Sonnenbrand verantwortlich sind. Möglicherweise spielt die Schädigung verschiedener Zielmoleküle eine Rolle, da ein breites Wellenlängen-Spektrum Sonnenbrand auslösen kann. Die minimale Erythem-auslösende Dosis (MED), die bei 50 % der Bestrahlten zum Sonnenbrand führt, ist etwas vom Hauttyp und sehr stark von der Wellenlänge abhängig. Die dunkleren Hauttypen III und

IV sind besonders vor UVA-Strahlung besser geschützt als die Hauttypen I und II. Für 300 nm-UVB ist die MED etwa  $270 \text{ J/m}^2$ , für 320 nm etwa  $1900 \text{ J/m}^2$  und für 350 nm etwa  $20000 \text{ J/m}^2$  (McKinlay und Diffey, 1987; Diffey, 1994). Da der UVA-Anteil des Sonnenlichtes 100 bis 1000-fach höher ist als der UVB-Anteil, könnten sowohl DNA-Schädigung als auch UVA-induzierte reaktive, oxidative Intermediate eine Rolle spielen (z.B. Tyrrell, 1991; Negre-Salvayre *et al.*, 1992; Godar *et al.*, 1993; Miyachi, 1995; Tyrrell, 1995).

In vielen Labors wird mit künstlich erzeugter UVC-Strahlung aus Quecksilberlampen mit einem sehr steilen Emissionsmaximum bei  $254 \pm 2 \text{ nm}$  gearbeitet, obwohl diese Strahlung nicht auf die Erdoberfläche durchdringt und im Stratum Corneum und den obersten Zellschichten der Haut vollständig absorbiert wird. Um mit 254 nm-UVC-Strahlung DNA-Schäden zu erzeugen, sind wesentlich niedrigere Strahlungsstärken notwendig als mit UVB. Dabei ist die Art der DNA-Schädigung der durch UVB-Strahlung verursachten ähnlich (Wulff, 1963; Rosenstein und Mitchell, 1987). UVC-Strahlung wird von vielen Biomolekülen sehr effizient absorbiert und es verwundert daher nicht, daß sie in niedrigen Dosen  $< 50 \text{ J/m}^2$  mannigfaltige biologische Reaktionen in Zellkultur auslöst. Der Vorteil mit UVC-Lampen zu arbeiten, besteht darin, daß nur kurz bestrahlt werden muß, um zelluläre Antworten auszulösen und daß das Emissionsspektrum der UVC-Lampen sehr eng ist, so daß die Interpretation der Ergebnisse erleichtert wird. Jedoch können Ergebnisse, die mit UVC-Strahlung erzielt wurden nicht ohne weiteres auf UVB- und UVA-Strahlung extrapoliert werden. Zum Beispiel induziert UVC- aber nicht UVA-Strahlung sehr effizient die Akkumulation von *c-fos*-mRNA (Angel *et al.*, 1985).

UV-Bestrahlung hat neben wichtigen, positiven medizinischen Effekten also offensichtlich auch erhebliche negative medizinische Auswirkungen. Deshalb ist es wichtig die molekularen Vorgänge in UV-bestrahlten Zellen zu verstehen.



## Tributylzinn als Umweltgift

Die Eigenschaften von Tributylzinn (TBT), eines anderen toxischen Agens, dessen zelluläre Wirkungen in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sollen im folgenden Abschnitt zusammengefasst werden.

TBT gehört zu der Substanzklasse der Organoschwermetalle, die im großen Maßstab in der Industrie hergestellt und für vielerlei Anwendungen benutzt werden. Die Substanz wird seit über 40 Jahren eingesetzt, wobei besonders ihre hohe Toxizität das Anwendungsspektrum bestimmt. TBT ist aktiver Bestandteil von Antifaul-Anstrichen an Schiffsrümpfen, Holzkonservierungsmitteln, Pestiziden, Farben und sogar in Konservierungsmitteln für Papier, Textilien und Leder enthalten (Maguire, 1987; WHO, Tributylcompounds, 1990; Fent, 1996). Zusätzlich findet es Verwendung als Stabilisator für Poly-Vinyl-Chloride (PVC). Wegen seiner dramatischen Auswirkungen auf die Fauna sowohl von marinen Gewässern als auch von Süßwasser-Biotopen, ist TBT allerdings in den letzten Jahren in Verruf gekommen. TBT hat z.B. sexualhormonartige Wirkungen auf Meeresschnecken, in denen es in sehr niedrigen Konzentrationen die Vermännlichung von Weibchen auslöst und dadurch zur Gefährdung ganzer Arten führt. In höheren Konzentrationen ist es sehr toxisch und wird dafür verantwortlich gemacht, daß in einigen Gewässern die Fauna praktisch ausgestorben ist (Maguire *et al.*, 1987; Schebek *et al.*, 1991; Becker *et al.*, 1992; Fent und Hunn, 1995; Fent, 1996). Wegen seiner starken Auswirkungen auf die marine Umwelt ist die Verwendung von TBT in Schiffsanstrichen mittlerweile in vielen Industrie-Nationen reguliert oder völlig untersagt. Durch die mannigfaltigen, industriellen Verwendungen ist der Kontakt mit TBT fast unvermeidbar. Obwohl TBT ursprünglich mit der Absicht auf den Markt gebracht wurde, als effizientes Fungizid und Pestizid mit niedriger Toxizität für Säugetiere zu wirken, sind, motiviert durch die offensichtlichen, umweltschädigenden Auswirkungen, eine ganze Reihe TBT-induzierte, pathologische Effekte bei Säugetieren untersucht worden. Von TBT-Vergiftungen betroffene Organe sind die Haut, die Leber, das Nervensystem und das Immunsystem (Fent, 1996).

- Bei Arbeitsunfällen und in Tierversuchen ist schon sehr bald nach der Einführung von TBT entdeckt worden, daß es zu sehr starken Hautreizungen bis hin zu chemischen Verbrennungen führt (Pelikan and Cerny, 1969; Middleton, 1982, Goh, 1985; Corsini *et al.*, 1996). Bewohner

von Wohnungen in denen TBT-haltige Innenanstriche verwendet wurden, klagten über Schleimhaut-Irritationen (Wax und Dockstadter, 1995).

- TBT ist sehr stark immuntoxisch, was hauptsächlich damit erklärt wird, daß es zur massiven Apoptose von Thymuszellen und B-Lymphozyten führt (Aw *et al.*, 1990; Ghoneum *et al.*, 1990; Smialowicz *et al.*, 1990; Raffray and Cohen, 1993; Raffray *et al.*, 1993). Die TBT-induzierte Freisetzung von intrazellulärem Calcium wurde für die apoptotische Wirkung verantwortlich gemacht (Aw *et al.*, 1990; Viviani *et al.*, 1995).
- TBT ist weniger neurotoxisch als andere Vertreter dieser Substanzklasse, wie z.B. Trimethylzinn oder Triethylzinn. Dennoch wurde bei Tierversuchen beobachtet, daß eine akute TBT-Vergiftung von Ratten zu charakteristischen Verhaltensänderungen führt. So sinkt die spontane Aktivität der Ratten und die Fähigkeit bedingte Reflexe zu erlernen deutlich in Abhängigkeit von der applizierten TBT-Dosis (Ema *et al.*, 1991).
- In Langzeit-Versuchen wurde eine erhöhte Inzidenz von Tumoren endokrinen Ursprungs festgestellt (Boyer, 1989). Es wurde gefunden, daß TBT in Lymphozyten Aneuploidie verursacht (Jensen *et al.*, 1991). TBT besitzt mutagene Wirkungen (Hamasaki *et al.*, 1993). Zusammen mit der immunsuppressiven Wirkung von TBT erwartet man also, daß TBT krebserregend oder zumindest krebserregend ist.

Sowohl Entzündungsreaktionen in der Haut als auch die TBT-induzierte Apoptose von Thymozyten deuten darauf hin, daß TBT in der Lage ist, genetische Programme anzuschalten. Dafür muß, genau wie im Fall von UV-Strahlung, s.u., gewährleistet sein, daß TBT von den betroffenen Zellen registriert werden kann und daß Signaltransduktion ausgelöst werden kann. In den letzten Jahren wurde gefunden, daß Tributylzinn zur Aktivierung der Erk-1,2 führt und dadurch die Phospholipase A2 aktiviert wird (F. Zaucke, pers. Mitteilung). Es ist bisher nicht bekannt, über welche zellulären Komponenten die Hautreizungen, die neurologischen Auswirkungen oder eine eventuelle TBT-induzierte Tumorpromotion vermittelt werden. Daher ist es sinnvoll die Signaltransduktionswege zu ermitteln, die in TBT-behandelten Zellen aktiviert werden.

## Die UV-Antwort in Säugetierzellen

Zellen, die mit UV bestrahlt werden, sind den Folgen der Schädigung nicht hilflos ausgeliefert, sondern reagieren mit einem umfassenden, genetischen Programm. Man bezeichnet diese zellulären Reaktionen als UV-Antwort. Eine UV-Antwort kann nur ausgelöst werden, wenn die Zellen in der Lage sind, den Auslöser zu detektieren und Signaltransduktionswege zu aktivieren, die mit der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Genexpression steuern.

### UV induziert Genexpression

In eukaryontischen Zellen wurden bisher mehr als 100 UV-induzierbare Gene identifiziert (Holbrook und Fornace, 1991; Herrlich *et al.*, 1992; Keyse, 1993). Zu den Genen, die in Säugetieren innerhalb von Minuten nach UV-Bestrahlung verstärkt exprimiert werden, gehören *c-fos* und *c-jun* (Angel *et al.*, 1985; Büscher *et al.*, 1988; Hollander *et al.*, 1989; Brunet *et al.*, 1990; Stein *et al.*, 1989a; Devary *et al.*, 1991, 1992; Stein *et al.*, 1992). Für die schnelle UV-induzierte Genaktivierung von *c-jun* und *c-fos* ist keine Protein-Neusynthese erforderlich. Die Aktivierung wird durch Transkriptionsfaktoren vermittelt, die auch an Wachstumsfaktor-induzierten Signalwegen beteiligt sind. (zusammengefasst in Fornace *et al.*, 1992; Herrlich *et al.*, 1992; Herrlich und Rahmsdorf, 1994; Rahmsdorf, 1994; Bender *et al.*, 1997)

### c-Fos hat eine Schutzfunktion für UV-bestrahlte Zellen

Die naheliegendste Frage, betreffend der UV-induzierten Genaktivierung, ist die nach der Funktion der Gen-Produkte. Welchen Sinn macht es, in gestressten Zellen eine Pseudo-Wachstumsfaktor-Antwort auszulösen ?

Von den mehr als 100 UV-induzierbaren Genen in Säugetierzellen, sind nur sehr wenige an der DNA-Reparatur beteiligt, wie O<sup>6</sup>-Methyl-Guanin-Transferase, DNA-Polymerase, DNA-Ligase und Ribonukleotidreduktase (Elledge und Davis, 1989; Kaina *et al.*, 1990; Herrlich *et al.*, 1992). Die meisten bisher gefundenen DNA-Reparaturgene in Säugerzellen werden konstitutiv exprimiert (Herrlich *et al.*, 1992). In der Tat wurden bisher überhaupt keine UV-induzierbaren Genprodukte außer c-Jun und c-Fos selbst identifiziert, die Zellen weniger empfindlich gegenüber UV-Bestrahlung machen. Erst als Fibroblasten aus Mäusen zur Verfügung standen, bei denen

das endogene *c-fos* inaktiviert worden ist, konnte untersucht werden, ob c-Fos überhaupt eine Funktion in UV-bestrahlten-Zellen erfüllt. In zwei Studien wurde nachgewiesen, daß Zellen von *fos*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich schlechter überleben als Wildtyp-Zellen (Haas und Kaina, 1995; Schreiber *et al.*, 1995). Außerdem wurde bei *c-fos*<sup>-/-</sup>-Zellen eine erheblich stärkere Zunahme von Chromosomen-Aberrationen und Doppelstrangbrüchen sowie eine stärkere Hemmung der DNA-Replikation nach UV-Bestrahlung als Wildtyp-Zellen gefunden (Haas und Kaina, 1995). Etwa dreimal soviel *c-fos*<sup>-/-</sup>-Zellen als Wildtyp-Zellen gehen nach UV in Apoptosis (Schreiber *et al.*, 1995). Beide Studien kommen zu dem Ergebnis, daß die Fähigkeit der Zellen zur DNA-Reparatur in *c-fos*<sup>-/-</sup>-Zellen nicht vermindert ist. Wie *c-fos* Zellen vor der schädigenden Wirkung von UV-Strahlung schützt, ist somit noch unbekannt. Da auch *c-jun*<sup>-/-</sup>-Zellen UV-sensitiv sind (Peter Angel, pers. Mitteilung), hängt die Antwort wahrscheinlich davon ab, ob die für das Überleben relevanten, AP-1-regulierten Gene identifiziert werden können.

#### Mechanismus der UV-induzierten Aktivierung des *c-jun*-Promoters

In UV-bestrahlten Zellen wird der *c-jun*-Promoter über die AP-1 ähnlichen Elemente jun1 und jun 2 reguliert. Dort werden die konstitutiv gebundenen c-Jun-Homodimere oder c-Jun/ATF-2-Heterodimere durch Phosphorylierung durch Mapkinasen, die in den Zellkern transloziert sind, aktiviert.

Die Phosphorylierung von ATF-2 in UV-bestrahlten Zellen wird hauptsächlich durch die JNK/SAPK und die p38/RK katalysiert (Livingstone *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995; Hazzalin *et al.*, 1996). Erk-1,2 kann ATF-2 ebenfalls phosphorylieren, aber die Bedeutung dieser Fähigkeit bei der UV-induzierten Aktivierung von ATF-2 ist unklar (Livingstone *et al.*, 1995).

Das c-Jun-Protein wird in UV-bestrahlten Zellen durch einige der mindestens zehn Isoformen der JNK/SAPK phosphoryliert (Hibi *et al.*, 1993; Dérijard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996).

Bei der Aktivierung des *c-jun*-Promoters spielen also die JNK/SAPK und die p38/RK eine wichtige Rolle. Deswegen ist UV ein erheblich besserer Induktor der *c-jun*-Genexpression als Wachstumsfaktoren, die diese beiden Mapkinasen nur schwach aktivieren. Einige der in UV-bestrahlten Zellen an der Aktivierung der JNK/SAPK beteiligten Komponenten wurden in den letzten beiden Jahren identifiziert. So wurde in verschiedenen Labors eine JNK/SAPK-spezifische Kinase gefunden, die als JNK-Kinase (JNKK) oder auch

als SEK-1 oder MKK4 bezeichnet wird. Die bispezifische Protein-Kinase JNKK phosphoryliert ein Thr-Pro-Tyr-Motiv der JNK/SAPK (Lin *et al.*, 1995; Moriguchi *et al.*, 1995; Derijard *et al.*, 1995; Meier *et al.*, 1996). Diese JNKK wird wiederum von MEKK phosphoryliert und aktiviert (Minden *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995). Dieser Signalweg könnte über die Protein-Kinase PAK von den kleinen GTPasen Rac1/2 und Cdc42HS reguliert werden (Minden *et al.*, 1995; Vojtek und Cooper, 1995). Oberhalb dieser GTPasen agiert unter anderem die kleine GTPase p21Ras, die in die Signaltransduktion von Tyrosin-Kinasen involviert ist (siehe unten). In manchen Zelllinien scheint die Protein-Tyrosin-Kinase Pyk-2 die UV-Signaltransduktion zu diesem Jun-Kinase-Signalweg zu vermitteln (Tokiwa *et al.*, 1996).

Zwar ist der Protein-Kinase-Signalweg identifiziert, der zur UV-induzierten Aktivierung von JNK/SAPK führt, aber wo das Signal für diesen Signalweg entsteht, ist noch unklar. Einige Daten sprechen dafür, daß DNA-Schäden an der Aktivierung der Signaltransduktion nach c-Jun beteiligt sind. So konnte die Kinase-Aktivität von gereinigter JNK/SAPK durch Zugabe von geschädigter DNA erhöht werden (Adler *et al.*, 1995). Dabei korreliert die Bestrahlungsdosis, d.h. die Menge an eingeführten DNA-Schäden, gut mit der JNK/SAPK Aktivierung. Wellenlängen größer als 300nm sind sehr uneffizient in der Aktivierung der JNK/SAPK. Andere fanden, daß in entkernten Zellen immer noch eine UV-Induktion der JNK/SAPK möglich ist (Devary *et al.*, 1993, Wilhelm *et al.*, 1997). Offensichtlich sind p21Ras und die Protein-Kinase Raf-1, die auch bei der Aktivierung von Erk-1,2 beteiligt sind, in die Signaltransduktion nach c-Jun involviert (Devary *et al.*, 1992, 1993; Radler-Pohl *et al.*, 1993).

Die UV-Induktion eines *c-jun*-Reporter-Konstruktes wurde durch eine dominant-negative Mutante der Protein-Tyrosin-Kinase c-Src gehemmt (Devary *et al.*, 1992). Das selbe Labor veröffentlichte jedoch später, daß die JNK/SAPK in NIH3T3-Zellen, bei denen das endogene c-src-Gen ausgeschaltet ist, genauso UV-aktivierbar ist, als in Wildtyp-NIH3T3-Zellen. Dies würde bedeuten, daß nicht c-Src selbst die UV-induzierte Signaltransduktion zur JNK/SAPK vermittelt, sondern eine Tyrosin-Kinase, die auch durch dominant-negatives Src gehemmt werden kann (Liu *et al.*, 1996).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß UV-induzierter oxidativer Stress an der Plasmamembran zur Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivierung führt. Hinweise für diese Hypothese lieferten Experimente, aus denen hervorging, daß das

Antioxidanz N-Acetylcystein die UV-induzierte Src-Aktivierung und die Aktivierung des *c-jun*-Gens hemmte (Devary *et al.*, 1992).

### Aktivierung des *c-fos* Promoters in UV-bestrahlten Zellen

An der UV-induzierten Aktivierung des *c-fos*-Promoters sind drei Elemente, das SRE, das CRE und ein UVC-induzierbares Promoter-Element an der Position +18 bis +38 beteiligt (Büscher *et al.*, 1988; Härtig *et al.*, 1991; Jordanov *et al.*, 1997).

Die Aktivierung des SRE erfolgt durch UV-induzierte Phosphorylierung von p62<sup>TCF</sup>. Mehrere Mapkinasen vermitteln die Phosphorylierung von p62<sup>TCF</sup> in UV-bestrahlten Zellen. So wurde veröffentlicht, daß p62<sup>TCF</sup> sowohl durch die Erk-1,2 (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1996), durch die p38/RK (Clifton *et al.*, 1996; Price *et al.*, 1996) als auch durch die JNK/SAPK (Cavigelli *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1996) phosphoryliert werden kann. Für eine Beteiligung von p62<sup>TCF</sup> an der UVC-induzierten Aktivierung des *c-fos*-Promoters gibt eine Reihe von Hinweisen.

1. Ein *c-fos*-Promoter- und ein SRE-Promoter-Konstrukt, denen die p62<sup>TCF</sup>-Bindestelle fehlte, war nur noch schwach UVC-induzierbar (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1996).
2. Die UV-induzierte Aktivierung eines SRE-Reporter-Konstrukts wurde durch eine carboxy-terminale Deletionsmutante des p62<sup>TCF</sup> gehemmt (Sachsenmaier *et al.*, 1994).
3. UVC induziert eine Bindung von p62<sup>TCF</sup> an eine ETS-bindende DNA-Sequenz (Sachsenmaier *et al.*, 1994).
4. P62<sup>TCF</sup> aus UVC-bestrahlten Zellen ist verstärkt phosphoryliert (Price *et al.*, 1996).
5. Dominant negative Mutanten der Erk-2, die aufgenommene Signale nicht weitergeben können, interferieren mit der UVC-Induktion eines -711/+45 *fos* Promoter-Konstruktes (Sachsenmaier *et al.*, 1994).

Der an das CRE bindende Transkriptionsfaktor CREB wird nach Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels an Serin-133 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Auch UV-Strahlung führt zur Phosphorylierung von Serin 133. Die UVC- und auch UVB- (eigene unveröffentlichte Daten) induzierte Phosphorylierung von CREB kann durch eine noch nicht klonierte p108-CREB-Kinase oder durch Mapkap-Kinase-2 vermittelt werden (Derijard *et al.*,

1995; Iordanov, 1996; Iordanov *et al.*, 1997). Die Aktivität dieser beiden Kinasen hängt von der UV-induzierten Aktivierung von p38/RK ab (Raingeaud *et al.*, 1995; Cuenda *et al.*, 1997; Iordanov *et al.*, 1997).

Die Transkriptionsfaktoren, die an das bei Position +18 bis +38 gelegene Element binden, sind bis jetzt noch nicht identifiziert worden (Härtig *et al.*, 1991).

Die Aktivierung des *c-fos*-Promoters in UV-bestrahlten Zellen ist also offensichtlich sehr ähnlich zu der Wachstumsfaktor-induzierten Aktivierung.

### UV-Bestrahlung führt zur Aktivierung des EGF-Rezeptors

Wenn also die UV-induzierte Aktivierung des *c-jun*- und *c-fos*-Gens von Signaltransduktionswegen vermittelt wird, die auch an der Wachstumsfaktor-Antwort beteiligt sind, dann liegt die Vermutung nahe, daß die Signaltransduktion durch die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren ausgelöst wird. Tatsächlich ist der früheste, bekannte Schritt in der UV-Antwort die Induktion der Phosphorylierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren an Tyrosinen. Am besten untersucht ist die UV-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors. Sowohl UVA als auch UVB und UVC-Bestrahlung induzieren in Bruchteilen von Minuten die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors in einer Reihe von verschiedenen Zelllinien (Zheng *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Sachsenmaier *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996; diese Arbeit). Verschiedene experimentelle Ansätze lieferten Hinweise, daß diese Tyrosinphosphorylierung zur Aktivierung des EGF-Rezeptors und der EGF-Rezeptor-abhängigen Signaltransduktion führt.

1. Ähnlich, wie bei der Stimulation mit EGF, assoziieren in UV-bestrahlten Zellen, die Proteine Grb-2, Shc, Sos und PLC $\gamma$  mit dem EGF-Rezeptor (Huang *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse wurden veröffentlicht, während diese Arbeit durchgeführt wurde.
2. Eine dominant-negative Mutante des EGF-Rezeptors hemmt sowohl die UV-Induktion eines *fos*-Promoter-Konstruktes als auch die eines EGR-1-("early growth response")-Promoter-Konstruktes (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1996).

3. Eine 4-stündige Vorbehandlung von Zellen mit EGF verhindert eine nachfolgende Phosphorylierung der Erk-2 durch UV-Bestrahlung in HeLa-Zellen und die UV-induzierte Transkription des *c-fos*-Gens (Iordanov, 1996; Sachsenmaier *et al.*, 1994).
4. Suramin, eine polyanionische Substanz, die extrazelluläre Proteinwechselwirkungen wie die Aktivierung von Transmembran-Rezeptoren stört, interferiert mit der UV-induzierten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung, der Erk-1,2-Aktivierung und der *c-fos*-Induktion (Sachsenmaier *et al.*, 1994).

### UVC-induzierte Tyrosinphosphorylierung des Insulin-Rezeptors und der ZAP-70-Tyrosin-Kinase

Einige Labors haben beobachtet, daß nicht nur der EGF-Rezeptor sondern auch andere Protein-Tyrosin-Kinasen und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in UVC-bestrahlten Zellen aktiviert sind. So wurde gefunden, daß aus UV-bestrahlten Zellen immunpräzipitiertes c-Src und c-Fyn, beides Mitglieder der Src-Tyrosin-Kinase-Familie, verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert waren (Devary *et al.*, 1992).

Einige Beobachtungen sprechen für eine UVC-induzierte Aktivierung der Insulin-Rezeptor-Signaltransduktion. So war die, aus UV-bestrahlten NIH3T3 A14-Zellen, die den Insulin-Rezeptor überexprimieren, immunpräzipitierte  $\beta$ -Untereinheit des Insulin-Rezeptors verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert. Weiterhin wurde gefunden, daß bei diesen Zellen die Shc-Isoformen p46 und p52 und das Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS-1) tyrosinphosphoryliert waren und daß die Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase aktiviert war (Coffer *et al.*, 1995). UVC induziert offensichtlich auch hemapoetische Signaltransduktionswege. In T-Lymphozyten wurde UVC-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von mindestens fünf nicht identifizierten Proteinen und der ZAP-70-Tyrosin-Kinase gefunden (Schieven *et al.*, 1994). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors in UV-bestrahlten Zellen ist also nur ein gut untersuchtes Beispiel von UV-induzierter Aktivierung von Tyrosin-Kinasen oder besser gesagt UV-induzierter Steigerung von Tyrosinphosphorylierung.



## Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Mechanismus zu finden, dem die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch UV-Strahlung zugrunde liegt und festzustellen, ob TBT die zelluläre Signaltransduktion über die gleichen Mechanismen kontrolliert. Wie kann eine elektromagnetische Strahlung Rezeptoren aktivieren, die normalerweise Peptidliganden binden und dadurch aktiviert werden? Wie können Strahlung oder chemische Substanzen, von denen man weiß, daß sie schädigend sind, Enzyme aktivieren und Signaltransduktionswege anschalten? Für die Analyse des Mechanismus wurde der EGF-Rezeptor als repräsentatives und gut untersuchtes Beispiel einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase gewählt. Dabei wurden folgende Fragen gestellt:

- Wie hängt die Effizienz der durch UV-Strahlung induzierten EGF-Rezeptor-Aktivierung von der Wellenlänge der Strahlung ab?
- Ist die Bindung von Liganden an der Aktivierung des EGF-Rezeptors durch UV-Strahlung beteiligt?
- Wird die UV-induzierte EGF-Rezeptor-Aktivierung durch reaktive oxidative Intermediate vermittelt und welche Rolle spielen Thiolgruppen?
- Wird die Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors erhöht oder wird seine Dephosphorylierung verlangsamt?
- Werden Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch UV-Strahlung geschädigt?
- Ist der, von UV-Strahlung benutzte Mechanismus auch für chemische Substanzen, wie etwa Tributylzinn gültig?

## Material und Methoden

### Material

#### Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q Reinstwassersystem der Firma Millipore entsalzt wurde, angesetzt.

|                                      |                        |
|--------------------------------------|------------------------|
| Acrylamid-Bisacrylamid (Rotiphorese) | Roth, Karlsruhe        |
| AG1296                               | Calbiochem, Bad Soden  |
| AG1478                               | A. Levitzki, Jerusalem |
| Agarose                              | AGS, Heidelberg        |
| Alkohol-Dehydrogenase (Hefe)         | Sigma, München         |
| Ammoniumpersulfat (APS)              | Sigma, München         |
| Aprotinin                            | Sigma, München         |
| Blotting Papier GB002                | Migge, Heidelberg      |
| Bromphenolblau                       | Serva, Heidelberg      |
| Dithiothreitol (DTT)                 | Serva, Heidelberg      |
| DMEM                                 | Gibco, Eggenstein      |
| DMSA                                 | Serva, Heidelberg      |
| DMSO (für Zellkultur)                | Fluka, Buchs           |
| DNA-Markierungs-Kit (Ready-Prime)    | Amersham, Braunschweig |
| DTNB                                 | Sigma, München         |
| ECL-Lösung                           | Amersham, Braunschweig |
| EDTA                                 | Roth, Karlsruhe        |
| EGF, rekombinant, menschlich         | Sigma, München         |
| Ethidium-Bromid                      | Sigma, München         |
| FCS                                  | BioWhittaker, Verviers |
| Ficoll                               | Sigma, München         |
| Formaldehyd                          | Merck, Darmstadt       |
| Formamid                             | Merck, Darmstadt       |
| G-50-Sepharose                       | Pharmacia, Freiburg    |
| Glutathion                           | Sigma, München         |
| Glycerin                             | Merck, Darmstadt       |
| Glycin                               | Roth, Karlsruhe        |
| Hybond N <sup>+</sup> -Membran       | Amersham, Braunschweig |
| Immobilon PVDF-Membran               | Millipore, Eschborn    |
| Jodazetamid                          | Sigma, München         |
| Kalium-Permanganat                   | Merck, Darmstadt       |
| L-Cystein                            | Sigma, München         |
| Leupeptin (Hemisulfat)               | Sigma, München         |
| Magnesiumchlorid                     | Merck, Darmstadt       |

---

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Manganchlorid                                     | Merck, Darmstadt      |
| Methanol (technisch)                              | Roth, Karlsruhe       |
| MOPS, Puffer                                      | Roth, Karlsruhe       |
| N-Acetylcystein                                   | Sigma, München        |
| NAD   | Boehringer, Mannheim  |
| Natrium-Azetat                                    | Merck, Darmstadt      |
| Natrium-Desoxycholat                              | Roth, Karlsruhe       |
| Natrium-Orthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) | Sigma, München        |
| Natriumchlorid                                    | Roth, Karlsruhe       |
| Natriumfluorid                                    | Merck, Darmstadt      |
| NP 40   | Sigma, München        |
| Oligo-(dT)-Zellulose                              | Pharmacia, Freiburg   |
| PD98059   | Calbiochem, Bad Soden |
| PDGF-BB, rekombinant, menschlich                  | Biomol, Hamburg       |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung (Zellkultur)       | Gibco, Eggenstein     |
| PMSF  | Sigma, München        |
| Polyvinylpyrrolidon (PVP-360)                     | Sigma, München        |
| Protein A Sepharose                               | Pharmacia, Freiburg   |
| Protein G+ Agarose                                | Dianova, Hamburg      |
| Protein-Marker (vorgefärbt für SDS-PAGE)          | Sigma, München        |
| Proteinase K                                      | Sigma, München        |
| SB203580  | M. Gaestel, Berlin    |
| SDS   | Roth, Karlsruhe       |
| Sperma-DNA (Hering)                               | Boehringer, Mannheim  |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                          | Roth, Karlsruhe       |
| tRNA aus Hefe                                     | Boehringer, Mannheim  |
| TEMED   | Bio-Rad, München      |
| TPA   | Sigma, München        |
| Tributylzinn-Chlorid                              | Merck, Darmstadt      |
| Tris  | Roth, Karlsruhe       |
| Triton-X-100                                      | Bio-Rad, München      |
| Trypsin (Zellkultur)                              | Difco, Detroit        |
| Wasserstoff-Peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )    | Merck, Darmstadt      |
| Zellkultur-Artikel                                | Greiner, Nürtingen    |

Antikörper

|   |                           |
|---|---------------------------|
| anti-EGF-Rezeptor<br>monoklonal, Isotyp:IgG2a, Klon 528, gegen<br>humanen EGF-Rezeptor aus A431-Zellen.<br>Für EGF-Rezeptor-Immunpräzipitation.       | Dianova, Hamburg          |
| anti-EGF-Rezeptor<br>polyklonal, IgG, gegen ein EGF-Rezeptor-<br>Peptid Aminosäuren:1005-1016.<br>Für v-erbB-Immunpräzipitation.                      | Santa Cruz, Kalifornien   |
| anti-EGF-Rezeptor<br>monoklonal, Isotyp IgG2b, gegen ein EGF-<br>Rezeptor-Peptid Aminosäuren: 996-1022.<br>Für EGF-Rezeptor-Nachweis im Western-Blot. | Transduction Labs, Exeter |
| anti-ErbB2 „toby“ polyklonal  | Nancy Hynes, Basel        |
| anti-Erk-1,2 (polyklonal IgG, K-23, gegen die<br>Aminosäuren 305-327 des Ratten-Erk-1   | Santa Cruz, Kalifornien   |
| anti-Kaninchen-Immunglobuline, gekoppelt an<br>Peroxidase aus Meerrettich (polyklonal, IgG, aus<br>Ziege, gegen Kaninchen-Immunglobuline)             | Dako, Hamburg             |
| anti-Maus-Immunglobuline, gekoppelt an<br>Peroxidase aus Meerrettich (polyklonal, IgG, aus<br>Kaninchen, gegen Maus-Immunglobuline)                   | Dako, Hamburg             |
| anti-PDGF-Rezeptor<br>monoklonal, Isotyp IgG2b, gegen die<br>Aminosäuren 1-187 des humanen PDGF-<br>Rezeptors.  | Transduction Labs, Exeter |
| anti-Phospho-Tyrosin „PY20“<br>monoklonal, Isotyp: IgG2b  | Transduction Labs, Exeter |
| anti-Shc<br>polyklonal, gegen die Aminosäuren 359-473 des<br>humanen Shc-Proteins.  | Transduction Labs, Exeter |
| anti JNK 1 (C17),<br>polyklonal, gegen die Aminosäuren 368-384<br>der humanen JNK/SAPK (p54 $\gamma$ )  | Santa Cruz, Kalifornien   |
| anti JNK-2 (N-18)<br>polyklonal, gegen die Aminosäuren 5-22 der<br>humanen JNK/SAPK (p54 $\alpha$ )   | Santa Cruz, Kalifornien   |

### Zellen

A431 ist eine menschliche epidermale Karzinom-Zelllinie (Ullrich *et al.*, 1984), die aufgrund einer Chromosomentranslokation und Genamplifikation sehr hohe Mengen an EGF-Rezeptor exprimiert. Erhalten von J. van Zoelen, Nijmegen.

B82-Zellen sind Derivate von Maus-L-Zellen. Parentale B82-Zellen, sowie mit dem humanen EGF-Rezeptor oder einer Kinase-defizienten Mutante stabil transfizierte (Chen *et al.*, 1987) wurden von G. Gill, San Diego zur Verfügung gestellt.

HeLa tk- (in der vorliegenden Arbeit als HeLa bezeichnet) ist eine menschliche Kervixkarzinom-Zelllinie. Diese Zelllinie wurde von Y. C. Chun, Durham, zur Verfügung gestellt.

NIH3T3-ES4-Zellen, die mit einem retroviralen Vektor für das v-erbB Onkogen transfiziert sind, wurden von A. Ullrich, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

NIH3T3-Fibroblasten, die mit dem humanen  $\beta$ -PDGF-Rezeptor stabil transfiziert sind, wurden von A. Ullrich, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

Rat-1-HER ist eine Ratten-Fibroblasten-Zelllinie, die mit einem retroviralen Expressionsvektor für den humanen EGF-Rezeptor stabil transfiziert ist (Wasilenko *et al.*, 1991). Die Zelllinie wurde von M. J. Weber, Charlottesville zur Verfügung gestellt.

### UV-Lampen

Alle UV-Lampen waren von Vetter, Wiesloch. Im Labor von M. Tevini, Institut für Pflanzenphysiologie, Universität Karlsruhe wurde von den Lampen ein Emissionsspektrum aufgenommen.

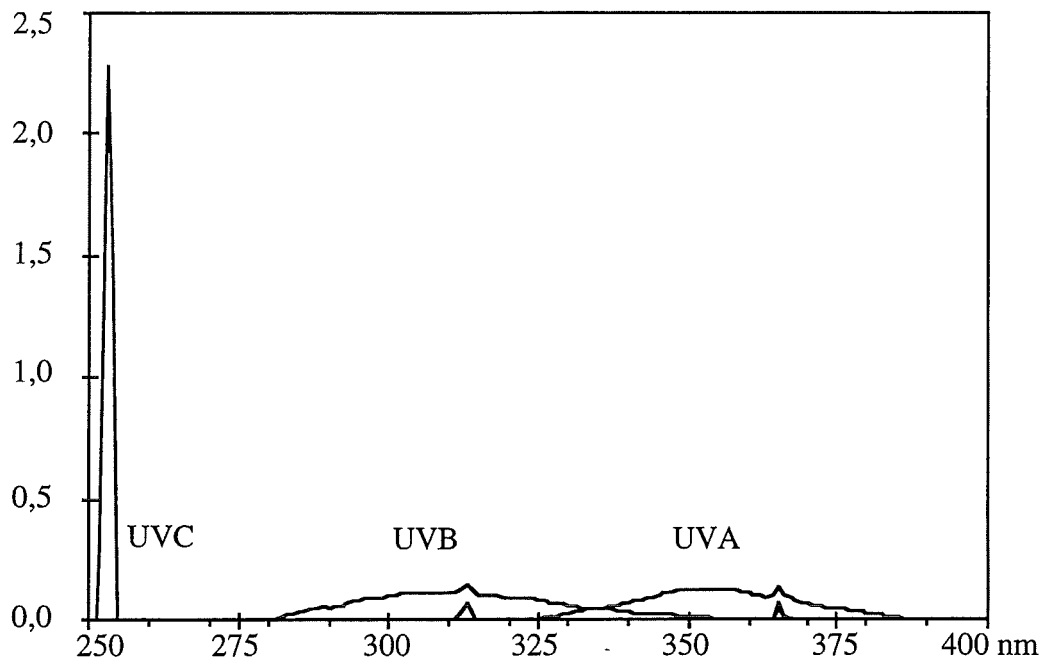
Die UVC-Lampe war mit einer G15T8-10R-Röhre (NIS, Japan) und einem Filter (UG-5), der sichtbares Licht filtert, ausgestattet. Sie strahlte in 16 cm Abstand von der Messzelle mit einer Gesamtleistung von ca.  $4,5 \text{ W/m}^2$  einen sehr kleinen Wellenlängenbereich zwischen 252 und 255 nm ab.

Die UVB-Lampe strahlte mit einer Philips TL20/12-Röhre durch einen Filter (UG-5) mit  $4,2 \text{ W/m}^2$ . Die halbmaximale Strahlung wurde zwischen 285 nm und 330 nm mit einem Maximum bei 312 nm emittiert.

Die F15T8-BL-Röhre (NIS, Japan) der UVA-Lampe strahlte durch einen UVC-Filter (UG-1) mit  $4,5 \text{ W/m}^2$  halbmaximal zwischen 335 nm und 370 nm, wobei das Emissionsmaximum bei 353 nm lag.

Zur Veranschaulichung sind die Emissionsspektren der UV-Lampen grafisch dargestellt.

a)  $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$



b)  $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$

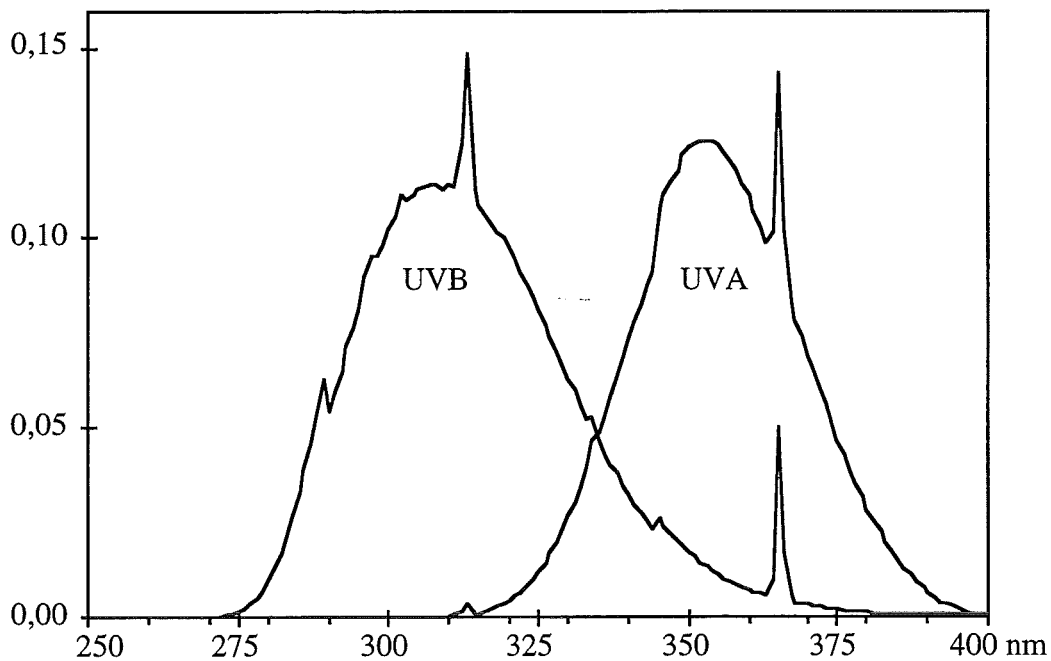


Abb. 1) Emissionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten UV-Lampen.

- Die Strahlungsstärke der UVA, UVB und UVC-Lampen wurden als Funktion der Wellenlänge aufgetragen.
- Die Strahlungsstärke der UVA und UVB-Lampen wurde zur besseren Veranschaulichung mit einer feineren Ordinatenkala als in a) aufgetragen.

cDNA-Fragmente zur Hybridisierung von mRNA im Northern-Blot.

v-fos (Maus): PstI-Fragment aus dem Plasmid pUC9-v-fos (Curran *et al.*, 1982; Rahmsdorf *et al.*, 1987).

c-jun (Mensch): HindIII/PstI-Fragment des Plasmids RSV-c-jun (Angel *et al.*, 1988).

GAPDH (Ratte): PstI-Fragment des Plasmids pGAPDH-13 (Fort *et al.*, 1985).

## Methoden

Die verwendeten Standard-Methoden sind z.B. in Ausubel *et al.*, 1987 beschrieben. Spezielle Methoden sind mit Referenzen versehen.

### Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 6 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchte und 37°C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Manipulationen an den Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Medien, Puffer und Glaswaren waren steril. Alle verwendeten Zellen wurden in Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit 10 % FCS (fötales Kälber Serum) und 100 U/ml Penicillin / Streptomycin kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen Kunststoff-Zellkultur-Flaschen oder Zellkultur-Schalen. Um die Zellen zu passagieren wurden sie einmal mit einer Trypsinlösung (0.25 % in 15 mM Na-Zitrat, 134 mM KCl, 0.001 % Phenolrot, pH 7.6) gewaschen, und für einige Minuten mit 0.5 ml bis 1.5 ml Trypsinlösung inkubiert (trypsinieren). Durch Klopfen an den Rand des Zellkultur-Gefäßes wurde das Ablösen erleichtert. Das Ablösen der Zellen wurde mit einem Mikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden mit Medium gesammelt und gut suspendiert. Ein Tropfen der Suspension wurden mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden dann in der gewünschten Verdünnung ausplattiert.

Um die Zellen einzufrieren, wurden sie trypsinisiert und bei 330 x g für 3 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in kaltem Einfrier-Medium (DMEM mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert, in Einfrier-Röhrchen verteilt und sofort für eine Stunde auf Eis gestellt. Dann wurden sie in einem isolierten Gefäß auf -20°C und danach auf -80°C abgekühlt. Nach ein paar Tagen wurden die Einfrier-Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Einfrier-Röhrchen für wenige Minuten in einem 37°C-Wasserbad erwärmt und die Zellen wurden in 10 ml Zellkultur-Medium überführt. Um das DMSO auszuwaschen, wurden die Zellen bei 330 x g für 3 min sedimentiert und vorsichtig in 37°C warmem Zellkultur-Medium resuspendiert und dann ausplattiert.



### Behandlung der Zellen

Für die meisten Experimente wurden die Zellen für 6 Stunden in serumfreien Medium gehungert, um zu vermeiden, daß Serum-Komponenten durch das Bewegen der Schalen während des Versuchs zur Rezeptor-Stimulation führten. Die Agenzien wurden aus 100-fachen oder 1000-fachen Stammlösungen zugesetzt. Insbesondere Agenzien, die in nichtwäßrigen Lösungen gelöst waren, also entweder in DMSO oder in Methanol wurden aus 1000-fachen Stammlösungen zugesetzt. In DMSO waren die Kinase-Inhibitoren AG1296, AG1478, PD98059, SB203580 gelöst, während Tributylzinn mit Methanol verdünnt war.

Die UV-Bestrahlung erfolgte durch eine etwa 2 bis 3 mm dicke Schicht phenolrotfreiem MEM-Medium (Gibco, Eggenstein), um bei längerer Bestrahlungsdauer das Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Die Zellen wurden 6 Stunden in diesem Medium vorinkubiert.

### Herstellung von Proteinlysaten

Gleichmäßig ausplattierte, konfluente Zellen wurden nach der Behandlung durch Zugabe von 350 µl bis 1 ml zweifachem Protein-Probenpuffer (20 % Glycerol, 4 % SDS, 0.16 M Tris pH 6.8, 4 % β-Mercaptoethanol, 0.05 % Bromphenolblau) auf der Platte lysiert. Die Proteinextrakte wurden in Reaktionsgefäße überführt und mit Ultraschall sonifiziert, um die DNA zu zerkleinern. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und konnten dann auf ein Proteingel geladen werden.

### Herstellen der Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Stammlösung (Kypta *et al.*, 1988)

0.183 g Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (100 mM) wurde in 10 ml H<sub>2</sub>O gelöst und mit 150 µl 37 % HCl auf pH 10 eingestellt, wobei ein Farbumschlag nach gelb erfolgte. Danach wurde die Lösung im kochenden Wasserbad erhitzt, bis die gelbe Färbung wieder verschwand; der pH-Wert wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur bestätigt. Die Stammlösung konnte für maximal 6 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

### Immunpräzipitation

Gleichmäßig ausplattierte, konfluente Zellen wurden nach der Behandlung mit eiskaltem  $\text{Ca}^{++}$ - und  $\text{Mg}^{++}$ -freiem PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) gewaschen und durch Zugabe von eiskaltem Kopräzipitations-Puffer (30 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100, 0.5 % Na-Desoxycholat, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin und 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) auf der Platte lysiert. Dieser Lysis-Puffer lysiert zwar die Zellmembran, aber nicht die Zellkerne und er ist so mild, daß er Protein-Wechselwirkungen, wie z.B. SH2-Tyrosinphosphat-Bindungen nicht zerstört. Dies ermöglichte die Assoziation von Shc-Protein mit dem EGF-Rezeptor zu untersuchen. Nach 10 min Inkubation im Kühlschrank wurden die Lysate in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und die Zellkerne wurden durch 10 min Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 3 - 5  $\mu\text{l}$  polyklonalem Antiserum oder 0.5 - 1  $\mu\text{g}$  monoklonalen Antikörpern versetzt. Dann wurden 35  $\mu\text{l}$  Protein-A-Sepharose, bei Verwendung von polyklonalen Seren, oder 35  $\mu\text{l}$  Protein-G<sup>+</sup>-Agarose bei monoklonalen Antikörpern dazupipettiert. Jeweils 6 Reaktionsgefäße wurden in ein 50 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und die Immunpräzipitation wurde für zwei Stunden bei 4°C rotiert. Die Immunpräzipitation wurde 4 mal mit eiskaltem Kopräzipitations-Puffer und 1 mal mit 1 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7.5 gewaschen. Dazu wurde die Immunpräzipitation mit 500  $\mu\text{l}$  dieser Puffer resuspendiert und wieder pelletiert (10 sek, 13000 x g). Der Überstand wurde jeweils mit Hilfe einer Spritze abgezogen.

### Immunkomplex-Kinase-Experiment zur Untersuchung der JNK/SAPK-Aktivität

10 cm Schalen mit HeLa-Zellen wurden nach der Behandlung mit eiskaltem PBS gewaschen in Lysis-Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 10 % Glycerin, 2 mM Natriumpyrophosphat, 25 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin und 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Leupeptin) lysiert. Es wurde eine Immunpräzipitation der JNK/SAPK-Formen  $\alpha$  und  $\gamma$  durchgeführt. Dabei wurden die Antikörper C-17 und N-18 simultan verwendet. Die über die spezifischen Antikörper an

die Protein-A-Sepharose gekoppelten Protein-Kinasen wurden zweimal mit 450 µl Lysis-Puffer und einmal mit 400 µl Kinase-Puffer (25 mM HEPES pH 7.4, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM β-Glycerophosphat, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) gewaschen. Die Kinase-Reaktion wurde mit 2 µg rekombinanten GST-Jun-Protein, 5 µCi [<sup>32</sup>P]-γATP, in einem Endvolumen von 25 µl in Kinase-Puffer direkt an den Immunkomplexen bei 30°C für 20 min durchgeführt. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, der Überstand mit dem phosphorylierten Substrat in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und 25 µl Protein-Probenpuffer (20 % Glycerol, 4 % SDS, 0.16 M Tris pH 6.8, 4 % β-Mercaptoethanol, 0.05 % Bromphenolblau) zupipettiert. Die Proben wurden 5 min auf 95°C erhitzt und in einem 12 %-SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in Waschpuffer (5 % Trichloressigsäure, 10 mM Natriumpyrophosphat) geschwenkt, getrocknet und für die Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm exponiert.

#### Membran-Präparation (Modifiziert nach Bar-Sagi *et al.*, 1988)

5 bis 10 15 cm Schalen A431-Zellen wurden für eine Stunde mit 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> inkubiert und dann für 5 min mit 20 ng/ml EGF behandelt. Alle weiteren Präparationsschritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Platten wurden zweimal mit kaltem Ca<sup>++</sup>- und Mg<sup>++</sup>-freiem PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen, von den Platten abgeschabt und in Ca<sup>++</sup>- und Mg<sup>++</sup>-freiem PBS aufgenommen. Die Zellen wurden bei 330 x g sedimentiert, in 10 ml hypotonem Puffer (20 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF) resuspendiert und für 25 min mit 4 ml Hypolysis auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann durch 50 Hübe mit dem einem Glas-Homogenisator (Typ: "tight fitting dounce") aufgebrochen. Die Zellkerne wurden durch 5 min Zentrifugation bei 2000 x g bei 4°C sedimentiert. Der membranhaltige, trübe Überstand wurde in Polyallomer-Ultrazentrifugen-Röhrchen aliquotiert und für 25 min bei 100000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Membran-Sediment wurde mit Hilfe einer Spritze (0,6 mm-Kanüle) in hypotonem Puffer ohne oder mit 0,5 % Triton-X-100 resuspendiert. In dieser Suspension fand keine Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors statt, vermutlich weil kein ATP vorhanden war.

### Membran-Dephosphorylierung

Um die Tyrosin-Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors in A431-Membranen zu messen, wurden Aliquots der Membranen mit oder ohne NAC für 0, 5 oder 15 min bzw. 0, 3 oder 10 min bei 37°C in einem Rüttler inkubiert. Die Dephosphorylierungs-Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens zweifachen Protein-Probenpuffer gestoppt. Die Tyrosin-Phosphorylierung wurde mittels Western-Blot untersucht.

### SDS Gel Elektrophorese

Zwei gut gereinigte Gel-Glasplatten wurden mit 1 mm Abstandshaltern (Spacern) und einem Silikon-Dichtungsschlauch mit Hilfe von Federblechklammern zusammengesetzt. Zwischen die Glasplatten wurden das Trenngel gegossen, so daß noch 4 cm Höhe für das Sammelgel blieben.

Für die Analyse der Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung wurde meistens 7,5 %iges und für die Mapkinase 10 %iges Trenngel verwendet. Für die Auftrennung bei Koimmunpräzipitations-Experimenten wurden 7.5 % - 20 %ige Gradientengele gegossen. Die Trenngele wurden wie folgt angesetzt:

|                        | 50 ml 7.5 % | 50 ml 10 % | 15 ml 7.5 %<br>für Gradient | 15 ml 20 %<br>für Gradient |
|------------------------|-------------|------------|-----------------------------|----------------------------|
| Gelstock (Rotiphorese) | 12.5 ml     | 16.65 ml   | 3.75 ml                     | 10 ml                      |
| 1.5 M Tris pH 8.8      | 12.5 ml     | 12.5 ml    | 3.75 ml                     | 3.75 ml                    |
| 20 % SDS               | 0.25 ml     | 0.25 ml    | 75 µl                       | 75 µl                      |
| H <sub>2</sub> O       | 24.25 ml    | 20.1 ml    | 7.4 ml                      | 20.1 ml                    |
| TEMED                  | 0.5 ml      | 0.5 ml     | 40 µl                       | 40 µl                      |
| APS                    | 30 µl       | 30 µl      | 6 µl                        | 6 µl                       |

Die Gradienten wurden gegossen, indem die Trenngel-Lösungen in zwei kommunizierende Plexiglas-Säulen gegeben wurden. Die Säule mit der 20 %igen Gel-Lösung war durch einen Silikon Schlauch mit einer Pumpe verbunden, die die Gel-Lösung langsam zwischen die Glasplatten pumpte. Durch das Absinken des Flüssigkeits-Spiegels lief 7.5 %iges Gel nach, das mit der 20 %-Gel-Lösung vermischt wurde, wobei die Konzentration dieses Gemisches sich fortlaufend bis auf fast 7.5 % erniedrigte.

Nach der Polymerisation wurden die Trenngele mit 10 ml Sammelgel (5.1 % Acrylamid/Bisacrylamid (1.7 ml Rotiphorese), 0.125 M Tris pH 6.8, 0.2 % SDS, 1 % APS, 0.1 % TEMED) überschichtet und mittels geeigneter Teflonkämme wurden Probenfächer gegossen. Das polymerisierte Gel wurde in eine Gelkammer eingespannt, die mit Laufpuffer (25 mM Tris pH 8.3, 0.2 M Glycin, 0.1 % SDS) gefüllt wurde. Die in Protein-Probenpuffer denaturierten Proteinextrakte wurden mit einer 100 µl-Haemilton Glasspritze aufgetragen. Die Gele liefen mit 30 mA konstantem Strom.

### Transfer von Proteinen auf Membranen und "Western Blot" Analyse

Nach dem Gellauf wurde ein Teil des Gels mit Coomassie gefärbt, um sicherzustellen, daß gleiche Protein-Mengen geladen worden waren. Der Teil des Gels, der mit Antikörpern gefärbt werden sollte, wurde luftblasenfrei auf eine Immobilon PVDF-Membran transferiert ("geblottet"). Dieser Protein-Transfer erfolgte in 25 mM Tris-Base pH 8.3, 250 mM Glycin, 20 % Methanol in einer Biorad-Blotkammer bei einer Stromstärke von ca. 450 mA für 4 bis 16 Stunden.

Die Immobilon PDVF-Membran wurde noch feucht vom "Blotten" in 10 % Milch (10 % w/v Trockenmilch-Pulver, 0.1 % Tween-20 in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0.6 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 6.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)) für 1 Stunde geschwenkt, um die unspezifischen Protein-Bindungsstellen abzusättigen. Dann wurde die Membran in 0.2 mm dicke PE-Folie eingeschweißt. Der Antikörper gegen Tyrosinphosphat oder gegen das zu untersuchende Protein wurde in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:10000 v/v in 5-10 ml 10 % Milch, dazu gegeben.

Nach einstündigem Schwenken des Filters wurde er dreimal für 5 min in PBS mit 0.1 % Tween gewaschen und wieder in eine Folie eingeschweißt. Nun wurde ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper (Anti-Kaninchen gegen polyklonales Serum) oder (Anti-Maus gegen monoklonale Antikörper) zugegeben, der 1:2000 in 10 % Milch verdünnt war. Nach erneuter einstündiger Inkubation unter Bewegung, wurde die Membran dreimal für 10 min in PBS mit 0.1 % Tween gewaschen. Dann wurde die Membran für 1 min in 5 ml eines 1:1 Mix der Amersham ECL Lösungen 1 und 2 inkubiert. Sofort danach wurden ECL-Filme für einige Minuten exponiert und entwickelt.

### Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Das Proteingel wurde in Coomassie-Blau-Färbelösung (0.25 % Serva-Blau G250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure) 2 Stunden geschwenkt und danach in Coomassie-Entfärber-I (50 % Methanol, 10 % Essigsäure) und Entfärber-II (5 % Methanol, 7 % Essigsäure) solange entfärbt, bis deutliche Banden zu sehen waren. Das Gel wurde dann auf Blotting-Papier gezogen und getrocknet.

### Messungen der Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität und der Menge von Thiolgruppen

1 ml-Aliquots einer Hefe-Alkohol-Dehydrogenase-Lösung (0,5  $\mu$ M = 35 U/ml ADH, 50 mM Tris pH 8.8) wurden mit NAC, DTT, DMSA behandelt oder nicht und daraufhin mit UV-bestrahlt oder mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Jodazetamid oder mit TBT behandelt oder nicht. 50  $\mu$ l-Aliquots davon wurden mit 450  $\mu$ l einer Substrat-Lösung (1 mM NAD, 0.2 % Ethanol, 50 mM Tris pH 8.8) gemischt und die Kinetik der NAD-Reduktion wurde durch permanente Messung der OD<sub>340</sub> über 50 sek verfolgt. Die relative Thiolgruppen-Konzentration an der ADH wurde gemessen, indem die ADH-Lösung mit 1 mM DTNB versetzt wurde. DTNB reagiert mit Thiolgruppen. Dies führt zu einer Steigerung der Extinktion bei 412 nm (OD<sub>412</sub>).

### Poly (A)<sup>+</sup>-RNA Präparation mit der Proteinase K Methode

$2 \times 10^7$  HeLa-Zellen von 15 cm Zellkulturschalen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 10 ml denaturierendem Proteinase-K-Mix (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS, 0.3 mg/ml Proteinase-K) lysiert. Das Lysat wurde in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit dem Ultraturax 10 Sekunden homogenisiert um die DNA zu zerkleinern. Das Lysat inkubierte 30 Minuten bei 37° C, um die Proteine zu verdauen. Das Lysat wurde in ein 12 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 5 M NaCl und 1 ml Oligo-(dT)-Zellulose (ca. 100 mg Oligo-(dT) in HSB (300 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.1 % SDS) versetzt. Die poly-(A)<sup>+</sup>-RNA wurde über Nacht auf einer Rotationsapparatur an die Oligo-(dT)-Zellulose gebunden. Die Zellulose wurde durch 2 min zentrifugieren bei 800 x g sedimentiert und dreimal mit je 1 ml HSB und einmal mit 0.5 ml H<sub>2</sub>O

gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgte durch viermaliges Aufnehmen der Oligo-(dT)-Zellulose in je 1 ml autoklaviertem Wasser und anschließendes Abzentrifugieren und Abtrennen des Sediments. Bei jedem Schritt wurden 950 µl des Überstandes in einem Glasröhrchen auf Eis gesammelt. Die 3,8 ml Gesamteluat wurden noch einmal bei 3300 x g für 10 min abzentrifugiert. Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurden 400 µl entnommen und die OD<sub>260nm</sub> bestimmt. Die anderen 3,4 ml wurden in ein 12 ml-Reaktionsgefäß dekantiert und mit 235 µl 3 M Na-Acetat, 10 µg Hefe-tRNA und 9 ml eiskaltem Ethanol versetzt und gemischt. Die RNA wurde binnen 15 min bei -80° C gefällt und danach für 45 min bei 12000 Upm und 4°C in der Hermle Swingout-Zentrifuge pelletiert. Des Pellet wurde im Exsikator getrocknet und in einer Konzentration von 1 µg/µl in H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen.

#### Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration der Nukleinsäuren (RNA) in wäßriger Lösung wurde spektroskopisch durch die Messung ihrer Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm durchgeführt. Der Quotient aus OD<sub>260nm</sub> /OD<sub>280nm</sub> soll bei RNA etwa 2:1 betragen. Eine OD<sub>260nm</sub> von 1 entspricht bei RNA etwa 40µg/ml Nukleinsäure.

#### Northern Blotting und Hybridisierung

10 µg/ 10 µl poly-(A)<sup>+</sup>- mRNA wurden mit 20 µl Formamid-Denaturierungspuffer (50 % umkristallisiertes Formamid, 6.5 % Formaldehyd, 10 µg/ml Ethidium-Bromid, 1 x MOPS-Puffer (1 Liter 10 x MOPS-Puffer: 41.8 g MOPS, 16.6 ml 3 M Na-Azetat pH 7, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8)) versetzt und für 10 min bei 65°C denaturiert und danach sofort auf Eis abgeschreckt.

Um das 1,2 %ige Agarose-Gel herzustellen, wurden 1.44 g Agarose in 100 ml 1.2 x MOPS aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf etwa 60°C mit 20 ml 37 % Formaldehyd versetzt. Das Gel wurde dann unter dem Abzug gegossen, auf Raumtemperatur abgekühlt, in die Laufkammer eingebaut und mit 1 x MOPS als Laufpuffer überschichtet.

Die denaturierte RNA wurde mit 3 µl 10-fach konzentriertem RNA-Ladepuffer (50 % Formamid, 6.5 % Formaldehyd, 1 x MOPS-Puffer, 5 % Glycerin, 0.05 % Bromphenolblau) vermischt und auf das 1.2 %ige Agarose-Gel geladen.

Die RNA wurde für 3 Stunden mit 150 Volt aufgetrennt, so daß sich die Bromphenolblau-Bande etwa 7 cm von den Probenfächerchen entfernt hatte. Nachdem durch Bestrahlung des Gels mit 302 nm UV-Strahlung sichergestellt worden ist, daß die Proben gleichmäßig viel RNA enthielten, die nicht degradiert war, wurde die RNA auf Hybond N<sup>+</sup>-Membran transferiert.

Dazu wurde in eine Plastikwanne 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na<sub>3</sub>Citrat x 2 H<sub>2</sub>O) gefüllt, ein Kunststoffständer in diese Wanne gestellt und darüber eine Glasplatte mit drei Lagen Blotting-Papier gelegt, die in 20 x SSC getränkt waren und auf beiden Seiten in das 20 x SSC hineinragten. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt und mit Parafilm<sup>®</sup> umrandet, so daß die 20 x SSC-Lösung nur durch das Gel aufsteigen konnte. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Hybond N<sup>+</sup>-Membran gelegt, darüber drei Blotting-Papiere, einen Stapel Kleenex<sup>®</sup>-Papiertücher und eine Glasplatte, welche schließlich noch beschwert wurde. Nach 16-stündigen Blotten wurde die RNA durch UVC-Bestrahlung und zweistündigen Backen bei 80°C an der Membran fixiert. Die Membran wurde vorhybridisiert, indem sie 2 Stunden bei 65°C in Vorhybridisierungslösung (4 x SSC, 0.02 % Rinder-Serum-Albumin, 0.02 % Ficoll, 0.02 % Polyvinylpyrrolidone, 16.5 mM Na-Phosphat pH 7.3, 0.05 % Na-Pyrophosphat) schwenkte, wobei nach einer Stunde 20 µg/ml Herings-Sperma-DNA zur unspezifischen Absättigung der Membran zugegeben wurde.

Die DNA-Probe wurde indessen mit dem "DNA-Markierungs-Kit (Ready-Prime)" Kit nach der Random-Primer Methode radioaktiv markiert.

Dazu wurden 50 ng der DNA-Probe in 45 µl H<sub>2</sub>O für 5 min bei 95°C denaturiert, abgekühlt und mit dem Primer/Klenowenzym-Lyophilisat aus dem Kit gemischt. Es wurde 30 µCi [<sup>32</sup>P] α-dCTP zugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5 min Erhitzen auf 95°C und anschließendem Abschrecken auf Eis gestoppt.

Mittels Säulenzentrifugation wurden die nicht eingebauten Nukleotide von denen, die in die DNA eingebaut waren abgetrennt. Das Säulenmaterial Sephadex-G-50 fraktioniert Moleküle von 1500 bis 30000 Dalton. Es wurde in 1 x TE (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA) aufgequollen und dann autoklaviert. In ein 1.5 ml Reaktionsgefäß wurde mit einer kleinen glühenden Kanüle ein feines Loch gestochen. In das Gefäß wurde eine Spatelspitze Quarzsand gegeben und das Reaktionsgefäß wurde autoklaviert. In das Gefäß wurde etwa 1.4 ml des gequollenen Sephadex-G-50 gefüllt. In einem 12 ml-Reaktionsgefäß wurde ein geschlossenes 1.5 ml Reaktionsgefäß, darüber ein geöffnetes, um die Probe aufzufangen und darüber das Säulengefäß an



angeordnet. Die Säule wurde 1 min bei 3300 x g abzentrifugiert. In die Mitte der Säule wurde 30 µl Herings-Sperma-DNA (1 mg/ml) pipettiert und erneut abzentrifugiert. Die Säule wurde dann mit 1 ml 1 x TE gewaschen. Dann wurde die radioaktive Probe in die Mitte der Säule geladen und abzentrifugiert. Im Durchfluß befand sich nun die gereinigte Probe, während die freien Nukleotide in der Säule zurückblieben. 1 µl der Probe und die Säule wurden dann im Szintillationszähler ohne Szintillationsflüssigkeit gemessen, um die Einbaueffizienz zu bestimmen.

Die Membran wurde in eine Folie eingeschweißt und die Hybridisierungslösung (4 x SSC, 10 mM EDTA, 0.1 % SDS), sowie die DNA-Probe, die zusammen mit 20 µg/ml f.c. Herings-Sperma-DNA denaturiert worden war, wurden zugegeben.

Dabei wurde das Hybridisierungsvolumen nach der Membranfläche bestimmt.

Dazu wurde die empirische Formel:

Membranfläche [cm<sup>2</sup>] · 13 + 30 % = X µl Gesamtvolumen angewendet.

Die Membran wurde für 24 Stunden bei 65°C mit diesem Hybridisierungsmix inkubiert. Danach wurde sie jeweils 30 min in den Waschlösungen A, B, C und D gewaschen und schließlich autoradiografiert.

Northern Filterwaschlösungen:

|                          | A     | B und C | D     |
|--------------------------|-------|---------|-------|
| SSC                      | 2 x   | 1 x     | 0,5 x |
| 0.5 M Na-Phosphat pH 7,3 | 3,3 % | 3,3 %   | 3,3 % |
| 1,5 % Na-Pyrophosphat    |       |         |       |
| SDS                      | 0,1 % | 0,1 %   | 0,1 % |

Um die Membran erneut zu hybridisieren, wurde sie für 30 min in 0,5 % SDS gekocht, um die DNA-Probe zu entfernen. Danach konnte sie wieder vorhybridisiert und hybridisiert werden.

## Ergebnisse

### **Mechanismus der UV-induzierten Wachstumsfaktor-Rezeptor-Aktivierung**

#### Der Grad der Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors in UV-bestrahlten Zellen ist abhängig von der Dosis und der Wellenlänge der verwendeten Strahlung

In mehreren Publikationen wurde berichtet, daß die Bestrahlung von Säugetierzellen in Zellkultur mit ultravioletter Strahlung eine Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung von verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Protein-Tyrosin-Kinase-Substraten hervorruft. So ist die Tyrosin-Kinase c-Src (Devary *et al.*, 1992), die ZAP-70-Tyrosin-Kinase (Schieven *et al.*, 1994) und der Insulin-Rezeptor (Coffer *et al.*, 1995) nach UV-Bestrahlung verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert. Eine Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-Rezeptors) wurde in mehreren Zelllinien mit allen drei Wellenlängenbereichen der ultravioletten Strahlung nachgewiesen: (Zheng *et al.*, 1993; Schieven *et al.*, 1994; Sachsenmaier *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; Coffer *et al.*, 1995; Knebel *et al.*, 1996). Um herauszufinden, welcher Wellenlängen-Bereich am effizientesten die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ausgelöst, wurden jeweils drei Strahlungsdosen ( $50 \text{ J/m}^2$ ,  $500 \text{ J/m}^2$  und  $5000 \text{ J/m}^2$ ) von UVA, UVB und UVC in einem Experiment miteinander verglichen. Dieses Experiment könnte einen Hinweis auf die, durch die UV-Strahlung modifizierten Zielmoleküle geben. Das Überleben der Zellen nach UV-Bestrahlung ist stark von der verwendeten Wellenlänge abhängig.  $5000 \text{ J/m}^2$  UVA fügt den Zellen keinen morphologisch sichtbaren Schaden zu, während  $5000 \text{ J/m}^2$  UVB oder  $50 \text{ J/m}^2$  UVC ein bis zwei Tage nach der Bestrahlung zum Absterben der Zellen führt (Vile *et al.*, 1995). DNA hat bei 260 nm ein Absorptionsmaximum und der, durch kurzwellige UV-Strahlung erzeugte DNA-Schaden kann bei diesen Dosen nicht mehr repariert werden.

Um die Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors zu untersuchen, wurden Ratten-Fibroblasten (Rat-1-HER), die stabil den menschlichen EGF-Rezeptor exprimierten, nicht behandelt, mit UV bestrahlt oder mit EGF behandelt. Die Steigerung der UV-induzierten EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung war im verwendeten Bereich dosisabhängig und wurde in UVC-bestrahlten Zellen

etwa dreimal so stark induziert wird wie in UVB-bestrahlten Zellen (Abb. 2a: Spur 7 und Spur 10). In UVB-bestrahlten Zellen war die Tyrosinphosphorylierung wiederum 2 bis 3 mal so effizient induziert wie in UVA-bestrahlten Zellen. Die durch  $5000 \text{ J/m}^2$  UV-Strahlung induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung entsprach ungefähr derjenigen, die durch  $2 \text{ ng/ml}$  EGF hervorgerufen wurde. Der Unterschied zwischen UVC- und UVA-induzierter EGF-Rezeptor-Phosphorylierung korreliert nicht gut mit der Zellabtötung. Dies deutet darauf hin, daß unterschiedliche Zellkomponenten und Mechanismen für EGF-Rezeptor-Phosphorylierung und Zellabtötung verantwortlich sind.

Oxidativer Stress führt in sehr kurzer Zeit zu einer Zunahme von Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor. Dies hat eine verstärkte Assoziation des Brückenproteins Shc mit dem Rezeptor zur Folge

Die Bestrahlung von Zellen mit UVA führt zu einer Zunahme von reaktiven, oxidativen Intermediaten (ROI's) (z.B. Tyrrell, 1991; Negre-Salvayre *et al.*, 1992; Godar *et al.*, 1993; Miyachi, 1995; Tyrrell, 1995). Diese UV-induzierten ROI's könnten die Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor vermitteln. Um dies zu untersuchen, wurden Zellen mit oxidativen Agenzien behandelt und die Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde bestimmt.

Der Mechanismus für die UV-induzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors war zu Beginn dieser Arbeit völlig unklar und die Beteiligung des EGF-Rezeptors an der UV-induzierten Genaktivierung ein nicht erwarteter Befund. Umso wichtiger war es Experimente durchzuführen, die neben den wenigen bereits veröffentlichten Hinweisen für eine funktionelle Aktivierung des EGF-Rezeptors (Sachsenmaier *et al.*, 1994) weitere Evidenzen für Funktionalität liefern konnten. Eine physiologische Reaktion der EGF-induzierten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung ist die Bindung von SH2-Domänen-Proteinen, z.B. Shc-Isoformen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, an den Rezeptor (Batzer *et al.*, 1994; Okabayashi *et al.*, 1994; Pronk *et al.*, 1994).

Um Hinweise auf den Mechanismus der durch UV-Strahlung induzierten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung und ihrer Funktionalität zu erhalten, wurde der EGF-Rezeptor immunpräzipitiert und die Menge an kopräzipitierten Shc-Isoformen mittels Western-Blot bestimmt (Abb. 2b). Neben EGF- und UVC-verstärkte auch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung der Zellen die Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor deutlich (Abb. 2b). Nach allen drei Behandlungen wurde

auch eine verstärkte Bindung von Shc-Isoformen beobachtet. Diese Resultate unterstützen die Annahme, daß ROI's bei der funktionellen Aktivierung des EGF-Rezeptors in UV-bestrahlten Zellen eine Rolle spielen.

### Die UV und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor ist ligandenunabhängig

Um zu untersuchen, ob die UV-induzierte EGF-Rezeptor-Aktivierung ligandenabhängig ist, wurden NIH3T3-Zellen bestrahlt, die mit einem retroviralen Vektor, der für ein onkogenes Mitglied der EGF-Rezeptor-Familie ohne Liganden-Bindedomäne (ES4-v-ErbB) kodiert, transfiziert waren. Auch diese Mutante war verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert, wenn die Zellen mit UV oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt worden waren (Abb. 2c: v-erbB). Dieses Ergebniss schließt eine Beteiligung der extrazellulären Domäne bei der Aktivierung durch UV-Strahlung aus.

Bei diesem Experiment wurde nicht nur die Immunpräzipitation des v-ErbB-Proteins auf Tyrosin-Phosphorylierung untersucht, sondern auch ein Aliquot des Gesamtprotein-Extraktes aus diesen NIH3T3-Zellen. Diese Phosphotyrosin-Analyse des Gesamtzell-Extraktes diente in allen Experimenten als Kontrolle für die Effizienz der Behandlung. Dabei fiel besonders auf, daß ein 190 kD-Protein in UV- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten NIH3T3-ES4-Zellen verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert war (ohne Abb.). Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase ErbB2 ist ein weit verbreitetes Mitglied der EGF-Rezeptor-Familie mit einem Molekulargewicht von 190 kD. Es lag also nahe, mit diesen Extrakten eine ErbB2-Immunpräzipitation durchzuführen und zu überprüfen, ob das immunpräzipitierte Protein an Tyrosinen phosphoryliert ist. ErbB2 war in nicht behandelten Zellen deutlich an Tyrosinen phosphoryliert, Diese Phosphorylierung wurde durch eine UV-Bestrahlung oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung der Zellen verstärkt (Abb. 2c: ErbB2).

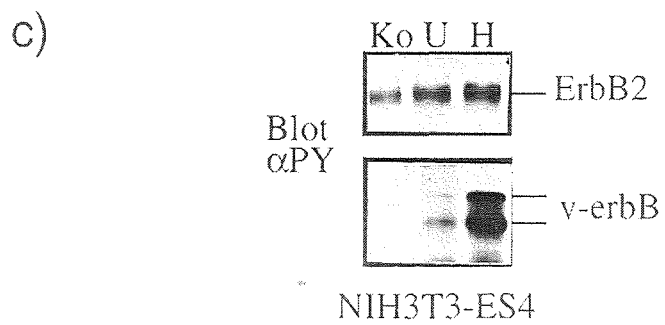
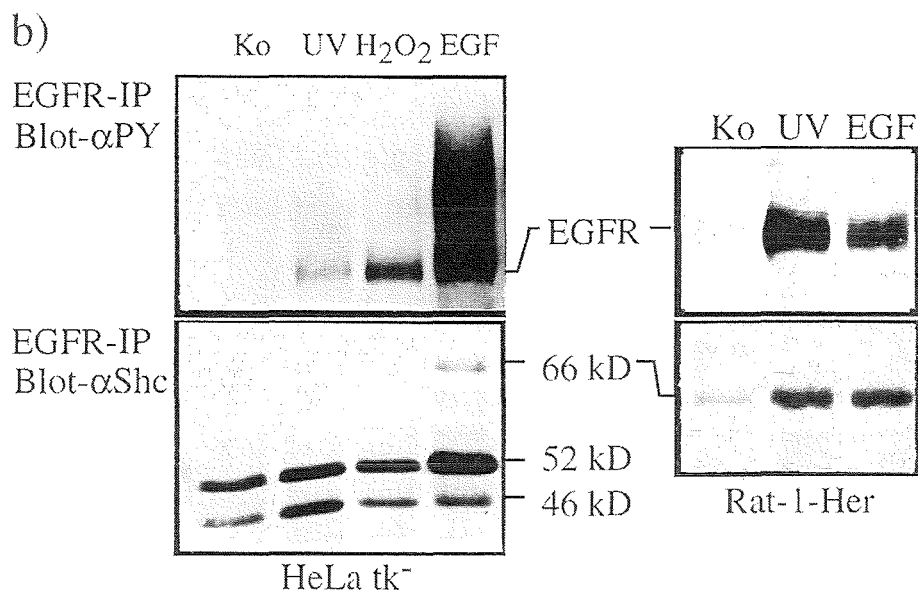
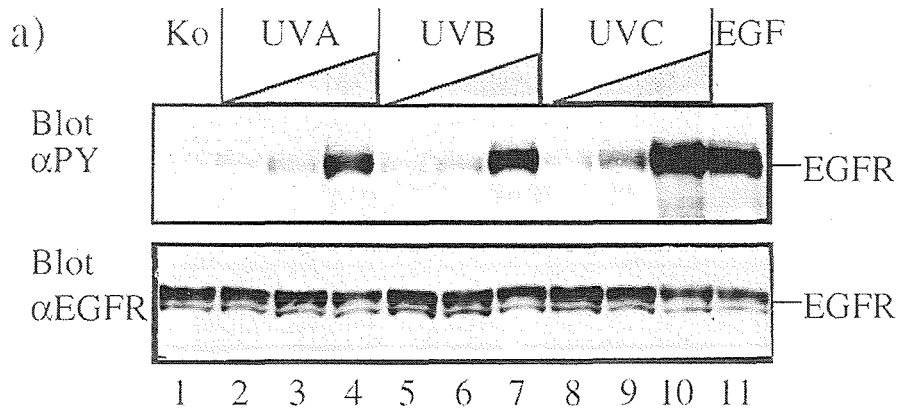


Abb. 2) UV und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung.

- a) Dosis- und Wellenlängen-Abhängigkeit der UV-induzierten EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung. Rat-1-Her Zellen wurden für 6 Stunden in FCS- und phenolrotfreiem Medium inkubiert und für 1 Stunde mit 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorbehandelt. Die Zellen wurden nicht behandelt (Spur 1) oder durch eine dünne Schicht Medium mit 50 J/m<sup>2</sup> (Spuren 2, 5 & 8), 500 J/m<sup>2</sup> (Spuren 3, 6 & 9) oder 5000 J/m<sup>2</sup> (Spuren 4, 7 & 10) UVA, UVB oder UVC bestrahlt oder mit 2ng/ml EGF behandelt (Spur 11) und 5 min nach Beginn der Behandlung geerntet. Die Zellen wurden auf der Platte mit 2 x SDS-Probenpuffer lysiert und die Lysate wurden auf EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung untersucht (Blot αPY). Die PVDF-Membran mit den Proteinproben wurde "gestrippt" und die Menge an EGF-Rezeptor Protein wurde kontrolliert (Blot αEGFR).
- b) UV und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führen zur verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und zur Assoziation von Shc-Protein an den EGF-Rezeptor. HeLa tk<sup>-</sup>-Zellen und Rat-1-HER-Zellen wurden für 6 Stunden in FCS- und phenolrotfreiem Medium inkubiert und für eine Stunde mit 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorbehandelt. HeLa-Zellen wurden für 5 min nicht behandelt (Ko), mit 1500 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt (UV), mit 150 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 10 ng/ml EGF behandelt. Rat-1-HER-Zellen wurden für 5 min mit 3000 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt (UV), mit 10 ng/ml EGF behandelt oder nicht behandelt (Ko). Die Zellen wurden in Kopräzipitationspuffer lysiert und der endogene EGF-Rezeptor aus HeLa-Zellen bzw. der transfizierte EGF-Rezeptor aus Rat-1-HER-Zellen immunpräzipitiert. Der immunpräzipitierte EGF-Rezeptor wurde im Western Blot auf Tyrosin-Phosphorylierung untersucht (Blot αPY). Mit Hilfe eines αShc-Antikörpers wurde die Menge an koimmunpräzipitierten Shc-Isoformen bestimmt (Blot αShc).
- c) Die UV- oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung ist ligandenunabhängig. NIH3T3-ES4-Zellen, die mit einem retroviralen Vektor stabil transfiziert sind, der für das virale v-ErbB-Protein kodiert, wurden 6 Stunden lang in FCS- und phenolrotfreiem Medium inkubiert und für 1 Stunde mit 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min nicht behandelt (Ko), mit 5000 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt (U) oder mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H) inkubiert. Das v-erbB Protein wurde mit dem polyklonalen Antiserum "1005", das gegen eine intrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors gerichtet ist und die ErbB2-Rezeptor-Tyrosin-Kinase mit dem polyklonalen Serum "Toby" immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden im Western Blot auf Tyrosin-Phosphorylierung untersucht.

### Wechselwirkungen zwischen dem EGF-Rezeptor und ErbB2 in UV-bestrahlten oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen

Die EGF-Behandlung von Zellen, die sowohl den EGF-Rezeptor als auch ErbB2 exprimieren, führt neben der EGF-Rezeptor-Phosphorylierung auch zu einer Phosphorylierung von ErbB2 (Stern und Kamps, 1988; Wada *et al.*, 1990; Qian *et al.*, 1992). Da EGF nicht an ErbB2 bindet, muß ein intermolekularer Phosphorylierungs-Mechanismus zwischen den Mitgliedern der EGF-Rezeptor-Familie in Heterodimeren vorliegen.

Der Befund, daß ErbB2 in UV- oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen an Tyrosinen phosphoryliert war (Abb. 2c), machte es möglich zu untersuchen, ob eine kinasedefiziente Mutante des EGF-Rezeptors durch ErbB2 phosphoryliert werden kann. Eine solche Mutante kann nicht mehr autophosphorylieren, sondern nur als Substrat für andere Kinasen fungieren. Es wurden B82-L-Zellen mit unterschiedlichen Rezeptor-Kombinationen benutzt:

- Parentalen B82-Zellen exprimierten endogenes ErbB2, aber keinen EGF-Rezeptor (B82-untransfiziert).
- B82-EGFR-K721M war mit einem Plasmid, das für eine kinasedefiziente EGF-Rezeptor-Mutante kodiert, stabil transfiziert
- und B82-EGFR-wt war mit einem Plasmid, das für den Wildtyp-EGF-Rezeptor kodiert, stabil transfiziert worden (Chen *et al.*, 1987).

Auch in diesen drei Zelllinien konnte eine UV- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte-ErbB2-Tyrosin-Phosphorylierung beobachtet werden, die mit der ErbB2-Autophosphorylierungs-Aktivität erklärt werden kann (Abb. 3: ErbB2-IP Blot- $\alpha$ PY).

Unerwartet war der Befund, daß EGF auch in der Zelllinie, die den kinasedefizienten EGF-Rezeptor exprimierte, zur Phosphorylierung von ErbB2 führt. (Abb. 3: B82-EGFR K721M, EGFR-IP Blot- $\alpha$ PY, EGF-Spur). Das war deshalb nicht zu erwarten, weil EGF nicht an ErbB2 binden und der durch EGF stimulierte EGF-Rezeptor ErbB2 nicht phosphorylieren kann. Entweder phosphorylieren sich ErbB2-Moleküle, stimuliert durch Heterodimerisierung mit dem EGF-Rezeptor, selbst in einer intramolekularen Reaktion oder es werden durch EGF stimulierte Oligomere erzeugt, die mehrere ErbB2 Moleküle umfassen. Der gleiche Befund wurde auch in einem anderen Labor gefunden (Wright *et al.*, 1995).

In einer EGF-Rezeptor-Immunpräzipitation aus den parentalen Zellen konnte erwartungsgemäß keine tyrosinphosphorylierte Bande bei 180 kD

nachgewiesen werden (Abb. 3: B82-untransfiziert, EGFR-IP Blot- $\alpha$ PY). Dagegen wurde in den EGF-Rezeptor-Immunpräzipitaten, sowohl aus den B82-EGFR-K721M- als auch aus den B82-EGFR-wt-Zellen, eine verstärkte Phosphorylierung an Tyrosinresten des EGF-Rezeptors gefunden, wenn die Zellen mit UV-Strahlung, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder EGF behandelt worden waren (Abb. 3: EGFR-IP Blot- $\alpha$ PY). Die naheliegendste Erklärung für die Tyrosin-Phosphorylierung des kinasedefizienten EGF-Rezeptors ist die Phosphorylierung durch die ErbB2-Tyrosin-Kinase-Aktivität.

Um die Funktionalität der, durch ErbB2 vermittelten und durch UV-oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung nachzuweisen, wurde untersucht, ob Isoformen von Shc mit dem EGF-Rezeptor interagieren. Die Assoziation von Shc mit dem EGF-Rezeptor korreliert sehr gut mit der Menge an Tyrosin-Phosphorylierung (Abb. 3: B82-EGFR K721M, EGFR-IP Blot- $\alpha$ Shc). Offensichtlich führt die, durch ErbB2 vermittelte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung zur Aktivierung von Signaltransduktion. Auffällig ist, daß in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Isoformen von Shc mit dem EGF-Rezeptor kopräzipitieren. Während man bei HeLa-Zellen alle drei Formen findet (Abb. 2b), dominiert in Rat-1-Her-Zellen die 66 kD-Isoform (Abb. 2b) und in Maus-B82-Zellen die 52 kD-Isoform von Shc (Abb. 3), obwohl in allen Zelllinien alle drei Formen exprimiert werden (ohne Abb.). Dies könnte darauf beruhen, daß verschiedene Isoformen des murinen Shc bzw. des Shc der Ratte sich in ihrer Affinität zum menschlichen EGF-Rezeptor unterscheiden.



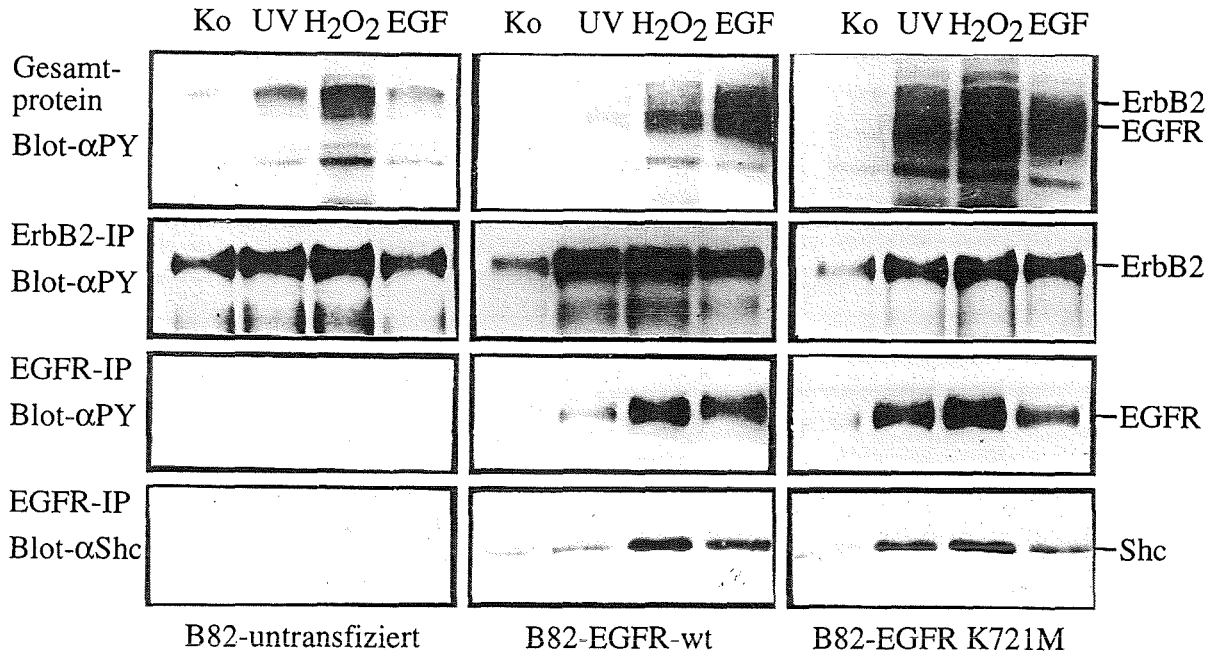


Abb. 3) UV,  $H_2O_2$  und EGF stimulieren die Tyrosin-Phosphorylierung von ErbB2, EGF-Rezeptor und einer kinasedefizienten Mutante des EGF-Rezeptors. Shc assoziiert mit dem Wildtyp und dem kinasedefizienten EGF-Rezeptor in stimulierten Zellen.

B82-Maus-L-Zellen, die entweder mit einem Plasmid, das für den Wildtyp-EGF-Rezeptor (B82-EGFR-wt) oder für eine kinasedefiziente EGF-Rezeptor-Mutante (B82-EGFR K721M) kodiert, stabil transfiziert waren oder nicht transfizierte Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 mM  $Na_3VO_4$  für 1 Stunde inkubiert, danach für 5 min entweder nicht behandelt (Ko), mit 1500  $J/m^2$  UVC bestrahlt (UV), mit 150  $\mu M$   $H_2O_2$  oder mit 2 ng/ml EGF behandelt. Die Zellen wurden in Kopräzitationspuffer lysiert. Parallel wurde eine Immunpräzitation gegen den EGF-Rezeptor und gegen ErbB2 durchgeführt. Die Gesamtzellextrakte, die EGF-Rezeptor- und die ErbB2-Immunopräzitation wurden im Western Blot auf Tyrosinphosphat untersucht (Blot- $\alpha$ PY). Bei der Tyrosin-Phosphat-Analyse der Gesamtprotein-Extrakte (oberste Reihe) wurden u.a. Banden bei 180 kD und 190 kD detektiert, die mit EGF-Rezeptor bzw. ErbB2 kolokalisieren und in gleicher Weise phosphoryliert werden (mit EGFR bzw. ErbB2 bezeichnet). Ferner wurde die Menge an p52-Shc bestimmt, das in der EGF-Rezeptor-Immunpräzitation kopräzitiert worden war (Blot- $\alpha$ Shc).

### Die UV- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung wird durch thiolhaltige Antioxidanzien stark gehemmt

Wenn die Vermutung stimmt, daß die UV-induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung durch ROI's vermittelt wird, dann sollte eine kurze Vorbehandlung der Zellen mit Antioxidanzien diese Phosphorylierung hemmen oder verhindern.

Tatsächlich hemmte eine fünfminütige Vorbehandlung der Zellen mit N-Acetylcystein (NAC), reduziertem Glutathion oder L-Cystein die, durch UV und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hervorgerufene EGF-Rezeptor-Phosphorylierung deutlich (Abb. 4a). Dies ist ein Hinweis für eine Beteiligung von ROI's an der UV-induzierten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung. Interessanterweise wurde auch die durch EGF hervorgerufene Phosphorylierung deutlich gehemmt. Dies war nicht zu erwarten, da EGF-vermittelte Rezeptor-Aktivierung bis jetzt nicht mit oxidativen Vorgängen in Verbindung gebracht worden ist (siehe Diskussion). Weitere Evidenz für den kausalen Zusammenhang zwischen der UV- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung und der verstärkten Assoziation von Shc mit dem EGF-Rezeptor liefert ein Experiment, bei dem eine kurze Vorbehandlung der Zellen mit NAC nicht nur die EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung hemmt, sondern auch die Bindung von Shc (Abb.4b). Es sei angemerkt, daß NAC die UVC-Absorption des Mediums nur etwa 1,4-fach erhöht und daher die Hemmwirkung nicht allein durch einen Sonnenschirm-Effekt erklärt werden kann. Die UVB- und UVA-Absorption des Mediums wird durch NAC überhaupt nicht erhöht.

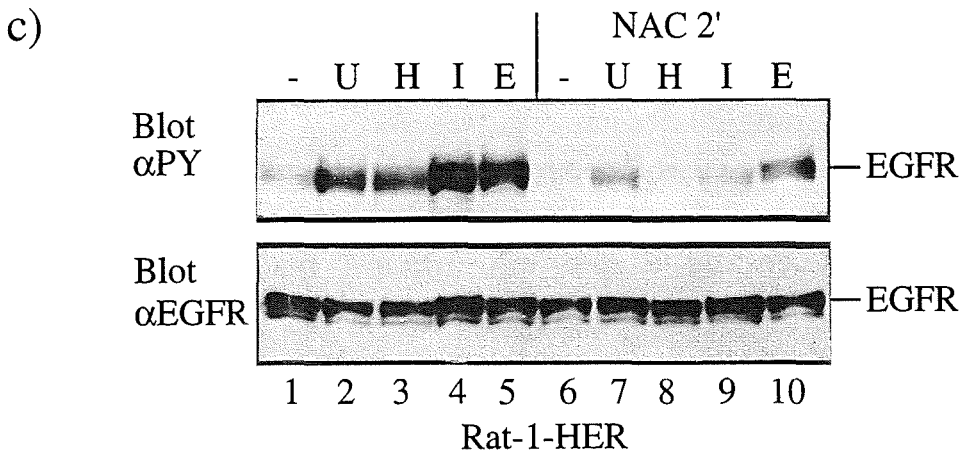
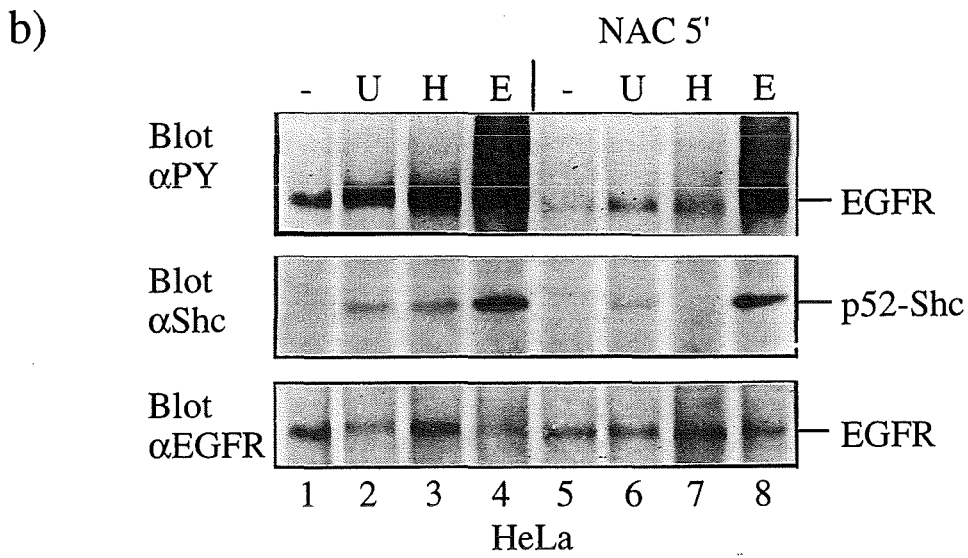
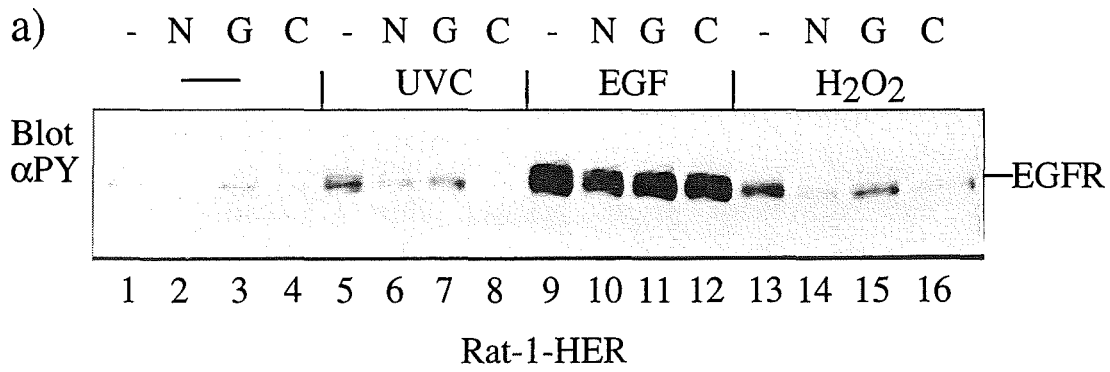
### Die Modifikation von Thiolgruppen induziert Tyrosin-Phosphorylierung an Kinase-Substraten

Ein offensichtliches Zielmolekül für oxidative Modifikationen ist die Thiol-Gruppe von Cysteinseitenketten. Die Bildung von neuen Disulfidbrücken innerhalb des EGR-Rezeptors würde zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führen. Eine solche neue Konformation könnte die Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors steigern oder die Tyrosinreste exponieren und zu besseren Substraten werden lassen. Außerdem könnten intermolekulare Disulfidbrücken die Oligodimere stabilisieren und dadurch zu einer erhöhten Aktivität führen. Die Maskierung von Thiolgruppen durch alkylierende Agenzien, wie zum Beispiel Jodazetamid bietet eine gute Möglichkeit die Bildung von

Disulfidbrücken zu verhindern und zu untersuchen, ob die UV- oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung dadurch gehemmt werden kann. Dazu wurden Rat-1-HER-Zellen vor der UV-Bestrahlung bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder Jodazetamid-Behandlung mit NAC vorinkubiert und die Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde untersucht. Das unerwartete Ergebnis des Experimentes war, daß Jodazetamid selbst sehr effizient die Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors induzierte (Abb. 4c). Diese Induktion wurde durch kurze NAC-Vorbehandlung fast vollständig gehemmt, weil NAC direkt das Jodazetamid im Medium inaktiviert.

Abb. 4) Thiolhaltige Reduktionsmittel hemmen die Induktion der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung und die Assoziation des Rezeptors mit p52-Shc.

- a) N-Acetylcystein, Glutathion und L-Cystein hemmen die UV-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und EGF-induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung. Rat-1-Her-Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium inkubiert und 1 Stunde mit 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorinkubiert. Die Zellen wurden für 5 min entweder nicht behandelt (-) oder mit 10 mM N-Acetylcystein (N), 10 mM reduziertem Glutathion (G) oder 10 mM L-Cystein (C) vorinkubiert. Sie wurden dann für 5 min nicht behandelt (-), mit 1000 J/m<sup>2</sup> UVC, 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 10 ng/ml EGF behandelt. Die Zellen wurden in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert und die Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde im Western Blot untersucht (Blot αPY).
- b) N-Acetylcystein hemmt die UV-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und EGF-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und die Assoziation des Rezeptors mit Shc. HeLa-Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium inkubiert und für 1 Stunde mit 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorinkubiert. Die Zellen wurden für 5 min ohne Zusatz oder mit 30 mM N-Acetylcystein (NAC 5') vorinkubiert. Sie wurden für 5 min nicht behandelt (-), mit 3000 J/m<sup>2</sup> UVC bestrahlt (U), 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt (H) oder mit 20 ng/ml EGF behandelt (E). Die Zellen wurden in Kopräzitationspuffer lysiert und der EGF-Rezeptor wurde immunpräzipitiert. Das Immunpräzipitat wurde im Western Blot auf EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung (Blot αPY) und Kopräzitation von p52-Shc (Blot αShc) untersucht. Auch die Menge an präzipitiertem EGF-Rezeptor wurde überprüft (Blot αEGFR).
- c) Jodazetamid induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung wird durch N-Acetylcystein-Vorbehandlung gehemmt. Rat-1-Her-Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium inkubiert und 1 Stunde mit 0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorinkubiert. Die Zellen wurden nicht (-) oder mit 30 mM N-Acetylcystein (NAC 2') vorinkubiert und danach nicht behandelt oder mit 1000 J/m<sup>2</sup> UVC (U), 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM Jodazetamid (I) oder mit 2 ng/ml EGF (E) behandelt. Die Zellen wurden in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert und die Menge an EGF-Rezeptor-Tyrosinphosphat (Blot αPY) und EGF-Rezeptor (Blot αEGFR) wurde im Western Blot bestimmt.



### Na-Vanadat hat eine starke synergistische Wirkung auf die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch UV, Oxidationsmittel oder Jodazetamid

Die Bestrahlung von Zellen mit UV führt zu einer relativ schwachen Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor, aber einer deutlichen Aktivierung von EGF-Rezeptor-abhängiger Signaltransduktion (Abb. 5: UVC, linke Spur; Sachsenmaier *et al.*, 1994). Die UV-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor war wesentlich besser detektierbar, wenn die Zellen mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  vorbehandelt wurden (Sachsenmaier *et al.*, 1994; pers. Mitteilung). Dies könnte darauf beruhen, daß die UV-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor aufgrund aktiver Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen) sehr kurzlebig ist und daß  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  diese Phosphorylierung durch PTPase-Hemmung stabilisiert (siehe Diskussion), denn  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ist ein unspezifischer Hemmstoff für PTPasen (Swarup *et al.*, 1982). Um zu untersuchen, wie sich unterschiedliche  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Konzentrationen auf die induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung auswirken, wurden Rat-1-HER-Zellen vor der Stimulation mit UV,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder EGF mit verschiedenen  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Konzentrationen zwischen 100 nM und 1 mM vorbehandelt. Es stellte sich heraus, daß weniger als 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  keine EGF-Rezeptor-Phosphorylierung auslöste, aber sehr stark mit einer UV-Dosis, die eine relativ schwache EGF-Rezeptor-Phosphorylierung auslöste, kooperierte (Abb. 5: - und UVC).

Die Rezeptor-Aktivierung durch Bindung des Liganden beruht auf einer Stabilisierung von Rezeptor-Dimeren (Schlessinger und Ullrich, 1992; Lemmon und Schlessinger, 1994), die, solange die Dimere stabil bleiben, zu einer gesteigerten Kinase-Aktivität führen. Dem entsprechend hatten auch niedrige  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Konzentrationen keinen positiven kooperativen Effekt auf die EGF-induzierte Rezeptor-Phosphorylierung (Abb. 5: EGF). Einzig die Behandlung mit einer 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Dosis steigerte die EGF-Induzierte Rezeptor-Phosphorylierung zusätzlich.

Die Behandlung von Rat-1-HER-Zellen mit 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte eine deutliche Zunahme der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung auslösen, die erheblich gesteigert wurde, wenn die Zellen mit 100 nM bis 100  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$  vorinkubiert worden waren (Abb. 5:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Es ist bekannt, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  chemisch mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  reagieren kann. Dabei entsteht eine oxidierte Vanadat-Form, das Pervanadat. Pervanadat induziert wesentlich effizienter Protein-Tyrosin-Phosphorylierung als Vanadat (Heffetz *et al.*, 1990; 1992).

Somit beruht die EGF-induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung auf einem grundsätzlich anderen Mechanismus, als die UV oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Rezeptor-Phosphorylierung.

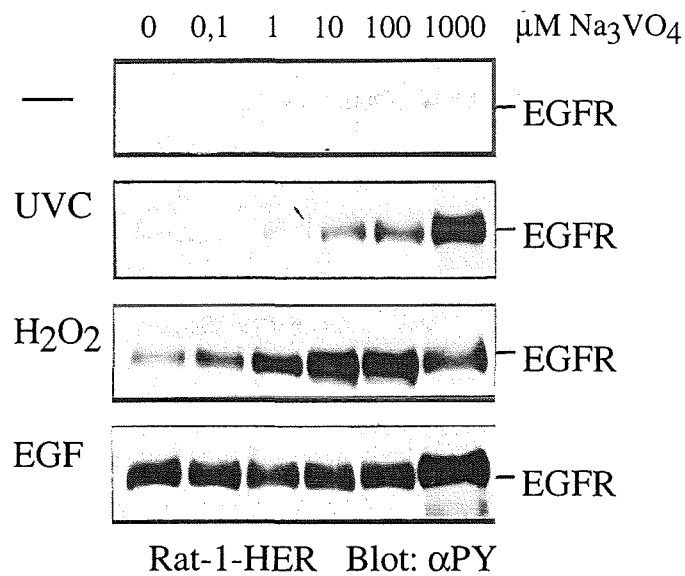


Abb. 5) Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> verstärkt kooperativ die UV- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, nicht aber die EGF-induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung. Rat-1-Her-Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium inkubiert und 1 Stunde mit 0,1  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorinkubiert. Die Zellen wurden für 5 min nicht behandelt (-), mit 3000 J/m<sup>2</sup> UVC, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 2 ng/ml EGF behandelt. Anschliessend wurden sie in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert und die EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung wurde untersucht.

### UV-, Oxidanzien- und Jodazetamid-Behandlung von Zellen induzieren eine Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung des $\beta$ -PDGF-Rezeptors

Um zu untersuchen, ob auch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aus anderen Rezeptor-Familien durch UV-Strahlung, oxidativen Stress oder Thiol-alkylierende Agenzien aktiviert werden können, wurden NIH3T3-Maus-Zellen, die den menschlichen PDGF-Rezeptor überexprimieren mit UVA, UVB oder UVC bestrahlt bzw. mit  $H_2O_2$ , Kaliumpermanganat oder Jodazetamid behandelt. Protein-Extrakte aus diesen Zellen wurden benutzt, um die Tyrosin-Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors zu bestimmen.

Es stellte sich heraus, daß der PDGF-Rezeptor in UVA-, UVB- und UVC-bestrahlten Zellen an Tyrosinen phosphoryliert wurde, wobei, ähnlich wie bei der Aktivierung des EGF-Rezeptors, der kurzwellige UV-Bereich effizienter die Tyrosin-Phosphorylierung induzierte als der langwellige. Sowohl  $H_2O_2$ - als auch Kalium-Permanganat-Behandlung steigerten die Tyrosin-Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors. Für die Induktion der Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung ist die oxidative Wirkung ausreichend, denn Kaliumpermanganat induziert keine Radikale. Ein wichtiges Ergebnis aus diesem Experiment war, daß auch Jodazetamid die Tyrosin-Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors zu induzieren vermochte. Auch in diesen Zellen konnte die Induktion der Rezeptor-Tyrosin-Kinase durch eine kurze Vorbehandlung mit NAC sehr stark gehemmt werden.

Die Befunde aus diesem Experiment lassen vermuten, daß die Mechanismen der ligandenunabhängigen EGF-Rezeptor- und PDGF-Rezeptor-Phosphorylierung identisch oder sehr ähnlich sind.

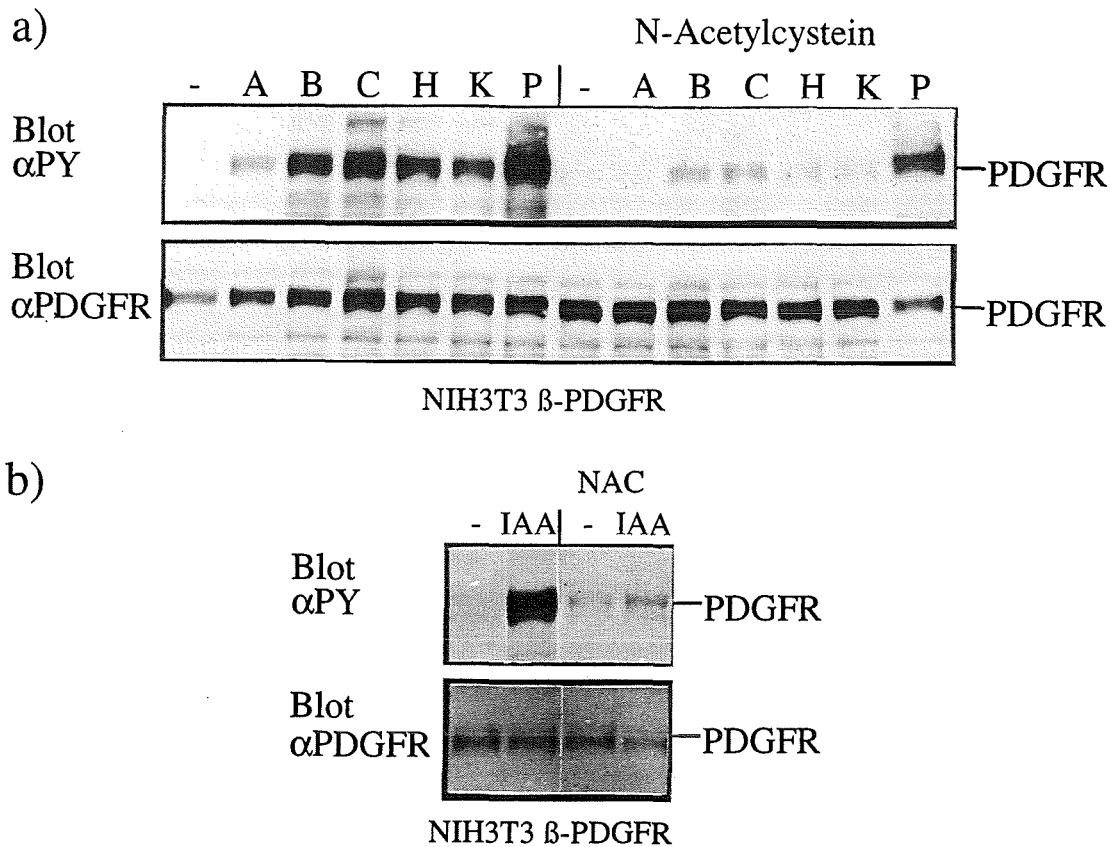


Abb. 6a & b) NAC hemmt die durch UV, oxidativen Stress und Jodazetamid induzierte PDGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung. NIH3T3-Zellen, die den menschlichen  $\beta$ -PDGF-Rezeptor überexprimieren, wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium und für eine Stunde mit 0,1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  vorinkubiert. Sie wurden für 5 min ohne Zusatz oder mit 30 mM N-Acetylcystein (NAC) vorinkubiert. Die Zellen wurden für 5 min nicht behandelt (-), mit 5000  $\text{J}/\text{m}^2$  UVA (A), UVB (B), oder UVC (C) bestrahlt oder mit 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (H), 1 mM Kaliumpermanganat (K), 20 ng/ml PDGF-BB (P) oder 1 mM Jodazetamid (IAA) behandelt. Sie wurden in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert und die Menge an PDGF-Rezeptor-Tyrosinphosphat (Blot  $\alpha$ PY) und PDGF-Rezeptor (Blot  $\alpha$ PDGFR) wurde im Western Blot bestimmt.



### UV, oxidativer Stress und Jodazetamid hemmen die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors

Es ist unwahrscheinlich, daß sehr unterschiedliche Agenzien an unterschiedlichen Rezeptoren die gleiche aktivierende Modifikation hervorrufen. Da sowohl UV-Strahlung als auch oxidativer Stress proteinschädigend sind, besitzen sie eher inaktivierende als aktivierende Eigenschaften. So ist denkbar, daß durch UV-, Oxidanzien- oder Jodazetamid-Behandlung Enzyme gehemmt werden, die dafür sorgen, daß die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen inaktiviert, das heißt dephosphoryliert, werden. PTPasen könnten aufgrund ihrer Struktur und ihres katalytischen Wirkungsprinzips durchaus das Ziel der hier untersuchten schädigenden Agenzien sein. Es sind bereits mehr als 100 verschiedene PTPasen bekannt, die eine Thiolgruppe im enzymatischen Zentrum besitzen (Guan und Dixon, 1991; Denu *et al.*, 1996). Diese Thiolgruppe, die mit der Tyrosin-Phosphatgruppe des Substrates eine Phosphothioesterbindung eingeht und damit entscheidend für die Katalyse der Dephosphorylierung ist, kann durch  $H_2O_2$  oder Kaliumpermanganat oxidiert und durch Jodazetamid alkyliert werden. Man könnte sich vorstellen, daß durch UV-Bestrahlung erzeugte ROI's ebenso mit der Thiolgruppe der PTPasen reagieren und sie modifizieren.

Pervanadat-induzierte PTPase-Hemmung führt zur Akkumulation von Tyrosinphosphat an Proteinen, die in der Insulin-Rezeptor-Signaltransduktion involviert sind (Heffetz *et al.*, 1990; 1992).

Die direkteste Methode zu überprüfen, ob eine PTPase ein Zielprotein der untersuchten Agenzien ist, wäre sie nach der Behandlung zu isolieren und das enzymatische Zentrum auf Modifikationen zu untersuchen. Bis jetzt wurden jedoch weder die EGF-Rezeptor- noch die PDGF-Rezeptor-spezifischen Phosphatasen identifiziert. Eine alternative Möglichkeit, die genannte Hypothese zu überprüfen, stellt die Messung der Dephosphorylierungs-Kinetiken der jeweiligen Rezeptoren und die Auswirkungen der schädigenden Agenzien auf diese Kinetiken dar.

Um eine Liganden-induzierte Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung zu erreichen, wurden die Zellen zuerst für einige Minuten mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren vorbehandelt. Daraufhin wurden die Zellen zusätzlich mit den schädigenden Agenzien inkubiert. Durch die Applikation von sehr potenten Kinase-Inhibitoren (AG1478 hemmt den EGF-Rezeptor und AG1296 den PDGF-Rezeptor) wurde dann die Tyrosin-Phosphorylierungs-Aktivität der

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen schnell und vollständig gehemmt. Aus den Zellen wurde nun nach aufeinanderfolgenden Zeitpunkten Proteinlysate hergestellt. Wegen der Gefahr der Dephosphorylierung während einer Immunpräzipitation wurden die Protein-Extrakte im Western-Blot auf Tyrosinphosphorylierung untersucht. Es ist sehr wahrscheinlich, daß das tyrosinphosphorylierte Protein, das mit EGFR markiert ist, tatsächlich der EGF-Rezeptor ist, weil die Rat-1-Her-Zellen den EGF-Rezeptor stabil überexprimieren, die Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors durch EGF induziert wird und durch AG1478, das sehr spezifisch die EGF-Rezeptor-Kinase hemmt (Levitzki und Gazit, 1995) gehemmt wird.

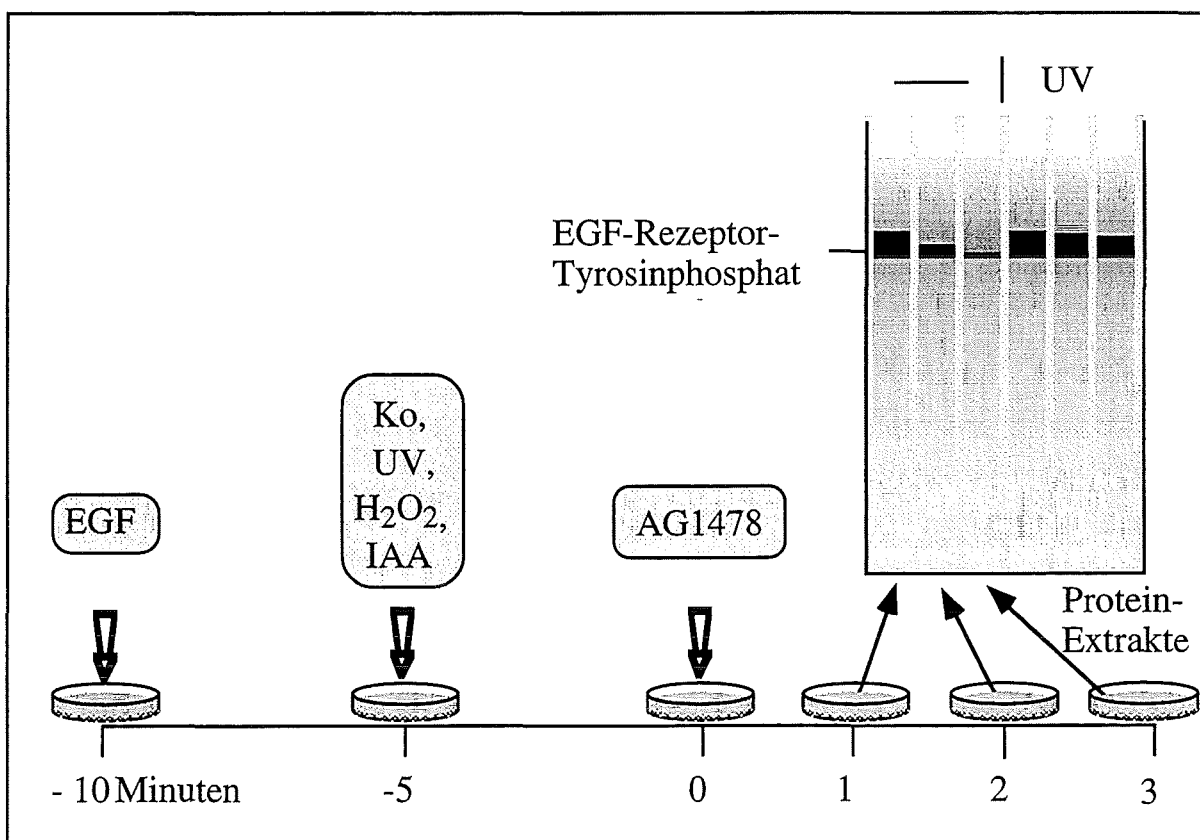


Abb. 7) Messung der Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors in Zellkultur. Die Zellen wurden für 5 min mit EGF vorbehandelt und dann für weitere 5 min nicht (Ko), mit UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Jodazetamid (IAA) behandelt. Die EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Aktivität wurde zum Zeitpunkt 0 durch Zugabe des EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 gehemmt. Die Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten in SDS-Ladepuffer geerntet und die Proteinextrakte wurden mittels Western-Blot-Analyse mit einem Tyrosinphosphat-spezifischen Antikörper untersucht. Das Gel zeigt schematisiert die Stärke der Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors von Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von AG1478 geerntet worden waren.

Es stellte sich heraus, daß der EGF-Rezeptor in unbehandelten Rat-1-HER-Zellen sehr schnell dephosphoryliert wurde (Abb. 8a: EGF). Außerdem ist das Molekulargewicht mit etwa 180 kD im erwarteten Bereich. Die Dephosphorylierung erfolgte so schnell, daß es unter den gewählten Bedingungen (1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 37°C) nicht möglich war, die Tyrosinphosphat-Halbwertszeit des EGF-Rezeptors genau zu bestimmen. Eine Minute nach Zugabe des Kinase-Inhibitors war bereits der größte Teil der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung entfernt worden, was auf eine sehr starke PTPase-Aktivität hinweist. Wenn die Zellen jedoch vor der Zugabe des EGF-Rezeptor-Kinase-Inhibitors mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Jodazetamid behandelt worden waren, blieb die Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor für mindestens drei Minuten detektierbar. Auch in den UV-bestrahlten Zellen war die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors erheblich verlangsamt. UVC-Bestrahlung führte zu einer deutlicheren Verzögerung der Dephosphorylierung als UVB- und insbesondere als UVA-Bestrahlung (Abb. 8a: rechte Hälfte). Diese Ergebnisse lassen zwei sehr wichtige Schlüsse zu.

1. Um die oft beobachtete basale Phosphorylierung des EGF-Rezeptors zu erreichen (Abb. 2a, 2b, 3, 4), muß der EGF-Rezeptor selbst eine deutliche Basalaktivität aufweisen, falls die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors nicht durch seinen Liganden induziert wurde, sondern konstitutiv erfolgte.
2. Die Hemmung der Dephosphorylierung könnte, unter der Voraussetzung, daß der EGF-Rezeptor eine signifikante Basalaktivität aufweist, zur Akkumulation von Tyrosinphosphat führen. Dies erklärt die Beobachtung, daß unterschiedlich wirkende Agenzien eine Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung an verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen verursachen.

Um nachzuweisen, daß die Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung durch UV und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht zelltypspezifisch ist oder auf der Überexpression des Rezeptors beruht, wurde ein Dephosphorylierungs-Experiment mit HeLa-Zellen, die endogenen EGF-Rezeptor exprimieren, wiederholt. Auch in diesen Zellen verursachte UVB, UVC oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine deutliche Verzögerung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung (Abb. 8b).

### UV-Strahlung verursacht eine Verzögerung der Dephosphorylierung des $\beta$ -PDGF-Rezeptors

Um zu überprüfen, ob auch die UV-induzierte  $\beta$ -PDGF-Rezeptor-Phosphorylierung mit einer Hemmung der Rezeptor-Dephosphorylierung korreliert, wurde ein ähnliches Dephosphorylierungs-Experiment mit NIH3T3-Zellen durchgeführt, welche den menschlichen PDGF-Rezeptor stabil überexprimieren. In diesen Zellen wurde die Dephosphorylierung des PDGF-Rezeptors schon durch  $100 \mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$  gehemmt (ohne Abb.). Der PDGF-Rezeptor wurde deutlich langsamer dephosphoryliert als der EGF-Rezeptor in Rat-1-HER oder HeLa-Zellen. Die Halbwertszeit des Tyrosinphosphats am PDGF-Rezeptor betrug etwa drei Minuten. UVC führte, stärker als UVB oder UVA zu einer Verzögerung der  $\beta$ -PDGF-Rezeptor-Dephosphorylierung, wenn die Zellen mit  $10 \mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$  vorbehandelt worden waren (Abb. 8c).

Ohne  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Vorbehandlung war die Verzögerung der Dephosphorylierung nicht detektierbar. Dies könnte bedeuten, daß die UV-induzierte Hemmung von PTPasen sehr kurzlebig ist und durch  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  stabilisiert wird.

Die erhöhte Hemmbarkeit durch  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und die längere Dephosphorylierungs-Kinetik des  $\beta$ -PDGF-Rezeptor im Vergleich zum EGF-Rezeptor, sind Hinweise darauf, daß sich die PDGF-Rezeptor-spezifische PTPase von einer EGF-Rezeptor-spezifischen PTPase unterscheidet.

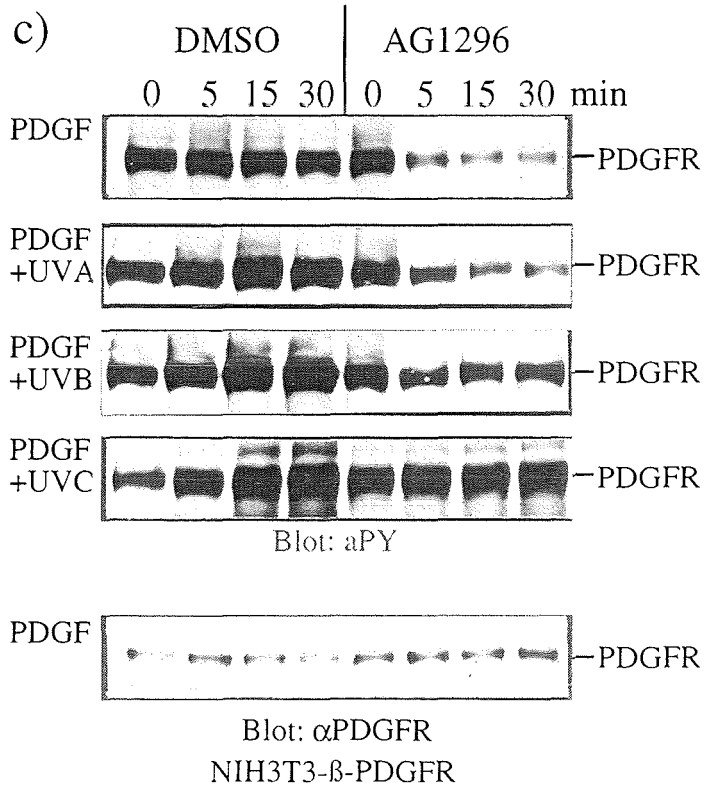
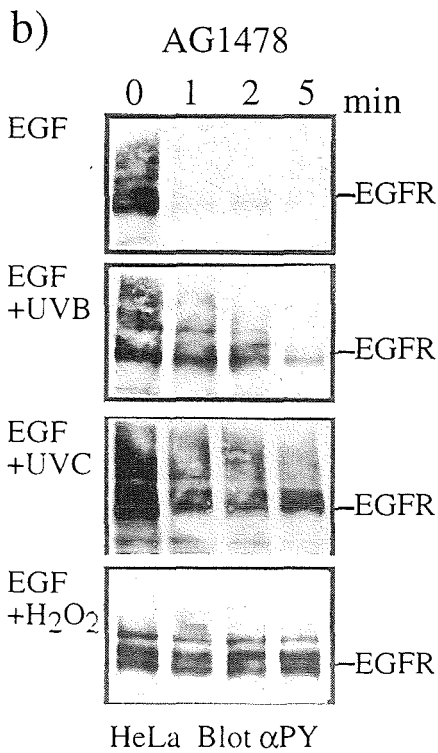
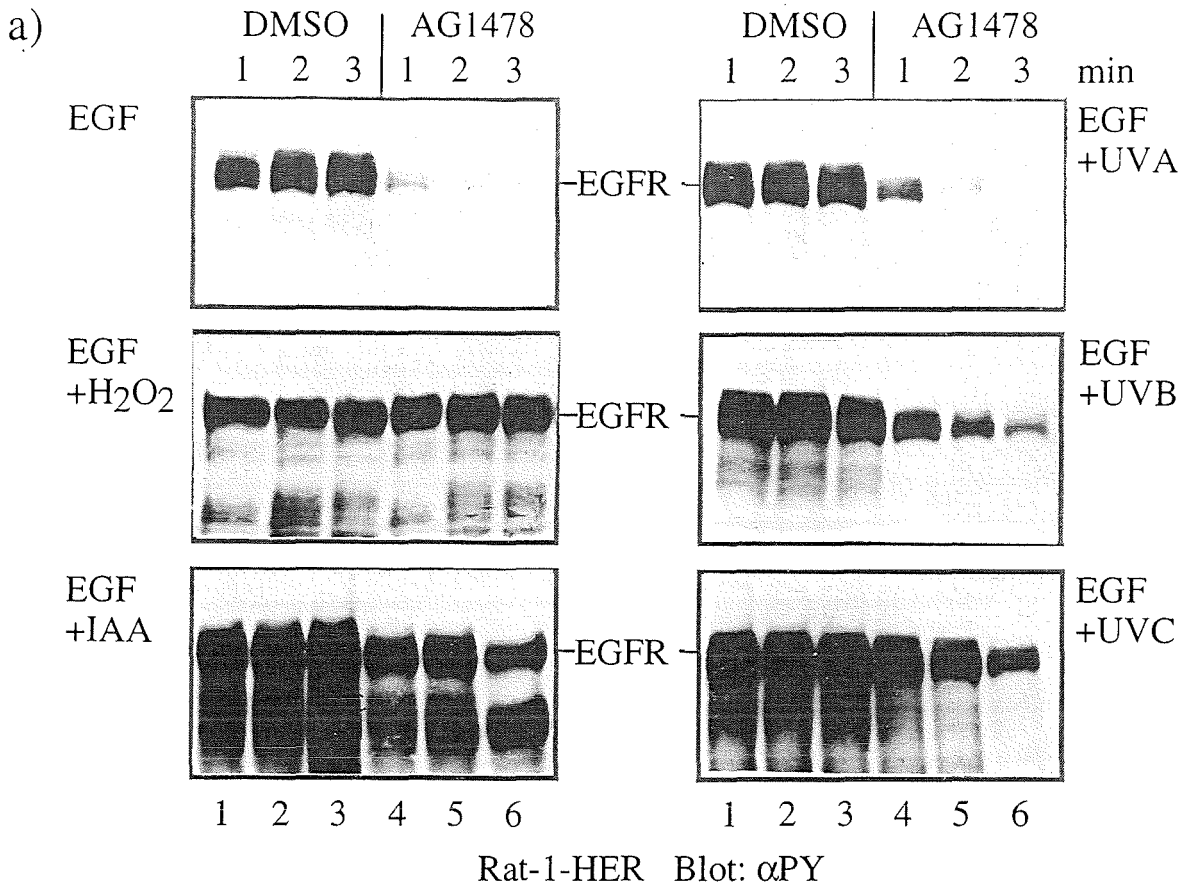


Abb. 8) UV-Strahlung, oxidativer Stress und Jodazetamid hemmen die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors und des PDGF-Rezeptors.

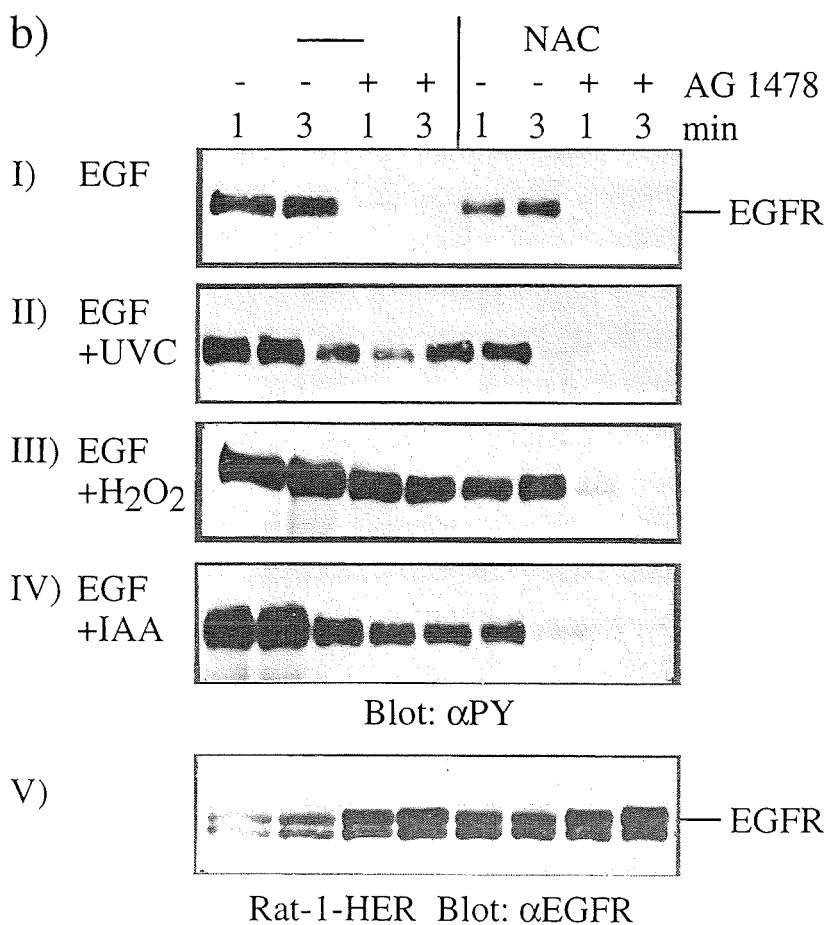
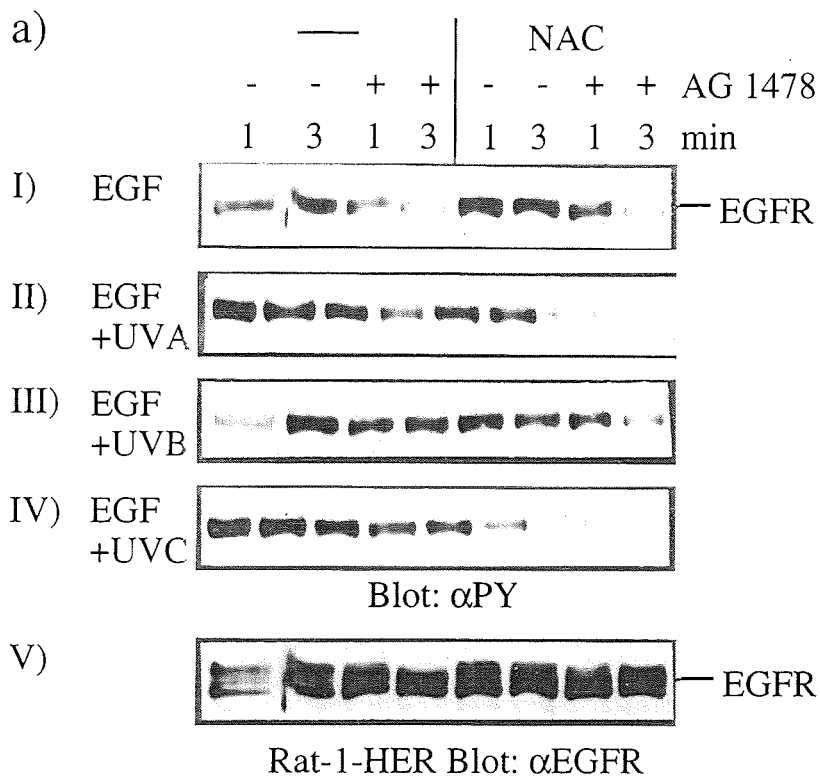
- a) Die schnelle Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors ist in UV-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Jodazetamid-behandelten Zellen stark verzögert. Rat-1-Her-Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium und 1 Stunde mit 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> inkubiert und anschliessend für 5 min mit 2 ng/ml EGF behandelt. Dann wurden sie in Abwesenheit oder in Anwesenheit von 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 mM Jodazetamid, 4000 J/m<sup>2</sup> UVA, UVB oder UVC für weitere 5 min inkubiert. Die Zellen wurden dann für 1 min, 2 min oder 3 min (EGF, EGF+UVA, EGF+UVB und EGF+UVC) oder für 1 min, 2 min bzw. 10 min (EGF+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EGF+IAA) mit DMSO (0,1 % f.c.) oder 100 nM AG1478 in DMSO behandelt. Durch Lysis in 2 x SDS-Ladepuffer wurde die Dephosphorylierungs-Reaktion abgebrochen und die Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors im Western-Blot bestimmt.
- b) UV-Bestrahlung und oxidativer Stress induzieren eine Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium inkubiert, für 1 Stunde mit 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und für 5 min mit 20 ng/ml EGF vorbehandelt. Die Zellen wurden dann für 5 min nicht behandelt (EGF), mit 3000 J/m<sup>2</sup> UVB (EGF+UVB) oder UVC (EGF+UVC) bestrahlt oder mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (EGF+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt. Es wurde für 5 min DMSO zugegeben (0) oder für 1, 2 oder 5 min mit AG1478 behandelt, wie angezeigt. Die Zellen wurden in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert und die Extrakte wurden auf Tyrosin-Phosphorylierung untersucht.
- c) UV-Bestrahlung hemmt die Dephosphorylierung des PDGF-Rezeptors. NIH3T3-Zellen, die den menschlichen β-PDGF-Rezeptor überexprimieren, wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium gehungert und für eine Stunde mit 10 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorinkubiert. Anschliessend wurden Sie für 17 min mit 10 ng/ml PDGF-BB vorinkubiert und weitere 3 min inkubiert (PDGF) oder mit jeweils 3000 J/m<sup>2</sup> UVA (PDGF+UVA), UVB (PDGF+UVB) oder UVC (PDGF+UVC) bestrahlt. Die Zellen wurden dann für 0, 5, 15 oder 30 min mit DMSO (0,1 % f.c.) oder AG1296 in DMSO behandelt. Die Zellen wurden in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert. Die Proteinextrakte wurden auf PDGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung (Blot αPY) untersucht. Die PVDF-Membranen wurden gestrippt und mit einem Antikörper gegen den PDGF-Rezeptor inkubiert, um zu kontrollieren, daß gleiche Proteinmengen geladen wurden (Blot αPDGFR). Nur die Kontrolle der unbestrahlten Zellen ist als repräsentatives Beispiel abgebildet.

### Die Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung kann durch Vorbehandlung mit N-Acetylcystein verhindert werden

Die Vorbehandlung der Zellen mit NAC oder anderen Antioxidanzien, die Thiole enthalten, verhindert die Phosphorylierung der Rezeptoren durch UV, Oxidanzien oder Jodazetamid (Abb. 4 und 6). Wenn die Hemmung der Tyrosin-Dephosphorylierung der Mechanismus der Steigerung der Rezeptor-Phosphorylierung ist, dann würde man erwarten, daß NAC diese Hemmung verhindern kann. Dies könnte im EGF-Rezeptor-Dephosphorylierungs-Experiment untersucht werden. NAC wurde entweder vor der Zugabe von EGF (Abb. 9b) oder nach der EGF-Zugabe kurz vor dem Beginn der UV-Bestrahlung (Abb. 9a) in das Kulturmedium gegeben. Für beide Variationen des Experiments ergab sich, daß NAC offensichtlich einen schützenden Einfluß ausübt. NAC verhindert nahezu vollständig eine durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -, Jodazetamid- oder UV-induzierte Verzögerung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung. Auch für dieses Experiment gilt, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Jodazetamid direkt im NAC-haltigen Medium inaktiviert werden, so daß diese beiden Substanzen nicht mehr mit voller Aktivität an PTPasen oder anderen Zielmolekülen wirken können.

Abb. 9) Die Hemmung der Dephosphorylierung wird durch Vorbehandlung der Zellen mit N-Acetylcystein verhindert.

- a) N-Acetylcystein-Vorbehandlung verhindert die UV-induzierte Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung. Rat-1-Her-Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium inkubiert und 1 Stunde mit 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  vorinkubiert. Die Zellen wurden für 4 min mit 2 ng/ml EGF behandelt. Dann wurden sie für 2 min nicht behandelt (-) oder mit 30 mM N-Acetylcystein behandelt (NAC). Es folgte eine 4 min Inkubation (I) oder 4 min Bestrahlung mit 3000  $\text{J}/\text{m}^2$  UVA (II), UVB (III) oder UVC (IV). Die Zellen wurden dann für 1 min bzw. für 3 min mit DMSO (0,1 % f.c.) (-) oder 100 nM AG1478 in DMSO (+) inkubiert. Sie wurden in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert und die Proteinextrakte wurden auf EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung untersucht (I bis IV). Außerdem wurde die Menge an EGF-Rezeptor bestimmt (Blot:  $\alpha\text{EGFR}$ ). (Abb. 9a-V) als repräsentative Überprüfung von (Abb. 9a-I).
- b) Die UVC,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Jodazetamid induzierte Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung kann durch N-Acetylcystein-Vorbehandlung verhindert werden. Rat-1-Her-Zellen wurden für 6 Stunden in phenolrotfreiem Medium inkubiert, eine Stunde mit 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  vorinkubiert und für 2 min nicht (-) oder mit 30 mM N-Acetylcystein behandelt (NAC). Die Zellen wurden für 5 min mit 2 ng/ml EGF behandelt. Es folgte 5 min Inkubation (I) oder eine 5 min Bestrahlung mit 3000  $\text{J}/\text{m}^2$  UVC (II), eine Behandlung mit 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (III) oder 1 mM Jodazetamid (IV). Die weitere Behandlung wurde wie in Abb. 9a durchgeführt.





### Die Tyrosin-Dephosphorylierungsaktivität ist membranständig

Verschiedene Möglichkeiten können in Betracht gezogen werden, um den Mechanismus der durch UV-Strahlung-, Oxidanzien-, und Jodacetamid-induzierten Hemmung der Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors zu erklären. Die oben bereits erwähnte Modifikation im katalytischen Zentrum der Protein-Tyrosin-Phosphatase ist eine Möglichkeit. Man könnte sich aber auch vorstellen, daß der EGF-Rezeptor selbst durch die Agenzien modifiziert wird, so daß eine Konformationsänderung eintritt, durch die die EGF-Rezeptor-Tyrosinphosphate für PTPasen weniger gut zugänglich sind. Prinzipiell galt es also zu unterscheiden, ob das Zielprotein der EGF-Rezeptor selbst ist oder die entsprechende(n) PTPase(n). Um diese Unterscheidung treffen zu können, wurde versucht die Phosphatase vom EGF-Rezeptor zu trennen. Dazu wurden Membranen aus EGF-behandelten A431-Zellen präpariert und die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors in diesen Membranpräparationen untersucht. Die schnell wachsenden A431-Zellen wurden aus technischen Gründen gewählt, da für die Membranpräparation sehr viele Zellen gebraucht wurden und A431-Zellen extrem viele EGF-Rezeptoren ( $2,5 \cdot 10^6$  / Zelle) (Haigler *et al.*, 1978) exprimieren. Die relativ einfache Präparationsmethode (Modifiziert nach Bar-Sagi *et al.*, 1988; siehe Material und Methoden) führte allerdings nicht zu einer Trennung der verschiedenen Kompartimente, so daß wahrscheinlich neben der Plasmamembran auch Bestandteile des Golgi und des Endoplasmatischen Retikulums zu finden waren. Trotzdem reicht diese Präparationsmethode aus, um die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors *in vitro* zu untersuchen und letztendlich die Phosphatase-Aktivität unabhängig vom EGF-Rezeptor mit UV zu bestrahlen.

In den ersten Experimenten wurden die Parameter eingestellt, die für eine Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors *in vitro* notwendig waren. Wurde die Membranpräparation in Anwesenheit von 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol durchgeführt, dann konnte eine schwache Tyrosin-Dephosphorylierungs-Aktivität gemessen werden (Abb.10a: Membranen). Diese wurde nicht durch die Zugabe von löslichem, zytosolischem Extraktüberstand aus der Präparation verstärkt. Dies deutet darauf hin, daß die Dephosphorylierungsaktivität unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht im Zytosol gelöst war (Abb.10a: Membranen+Zytosol). Interessanterweise beschleunigte die Solubilisierung der Membranpräparation in 0,5 % Triton-X-100 die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors erheblich (Abb.10a:

Membranen+Triton). Dies deutet darauf hin, daß eine EGF-Rezeptor-Phosphatase membranständig oder membranassoziiert ist, aber bei der Präparation in einer Weise vom EGF-Rezeptor getrennt wird, die durch die Zugabe von Triton-X-100 wieder rückgängig gemacht werden kann.

Die Zellkultur-Experimente hatten schon einen Hinweis gegeben, daß Thiolhaltige Antioxidanzien eine positive Wirkung auf die Dephosphorylierungsaktivität haben. Es stellte sich die Frage, welchen Einfluss die Thiolkonzentration auf die EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung in isolierten Membranen hat. A431-Membranpräparationen wurden ohne oder mit 1 mM bzw. 30 mM NAC oder 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol einer Dephosphorylierungsreaktion unterzogen. Während bei den Membranen, die ohne oder mit 1 mM NAC versetzt waren, eine langsame Abnahme von Tyrosinphosphat am EGF-Rezeptor mit einer Halbwertszeit von etwa 8 bis 10 min festgestellt wurde, war in den Membranen, die auf eine 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol eingestellt waren, der EGF-Rezeptor nach 3 min bereits vollständig dephosphoryliert (Abb.10b). Somit erhöht eine hohe Thiolkonzentration nicht nur die Dephosphorylierungs-Geschwindigkeit, sondern ist sogar obligatorisch für die enzymatische Wirksamkeit der PTPasen ist.

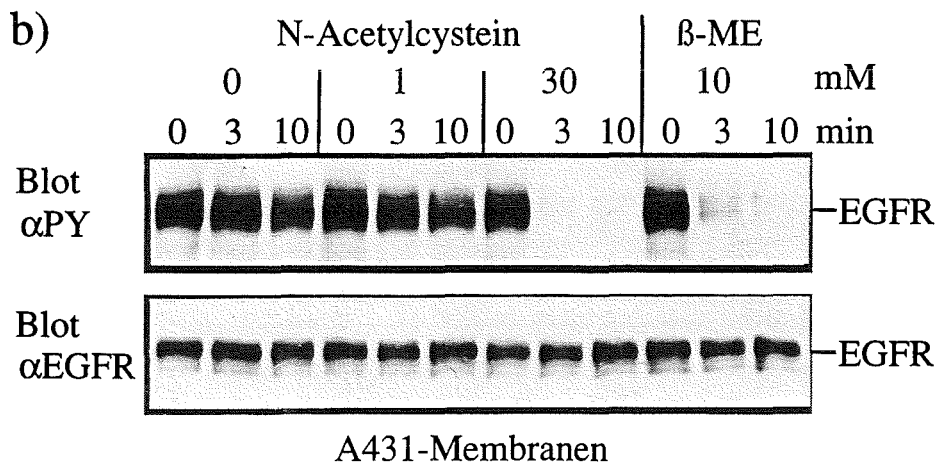
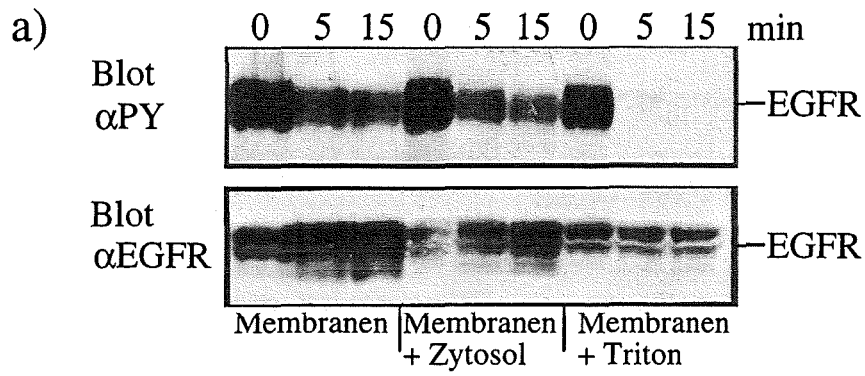


Abb. 10) Der EGF-Rezeptor wird auch in isolierten Membranen dephosphoryliert.

- a) Die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors in isolierten Membranen bedarf der Anwesenheit von Triton-X-100. 10 konfluente 15 cm Zellkulturschalen mit A431-Zellen wurden 1 Stunde mit 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und 10 min mit 20 ng/ml EGF behandelt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 5 ml hypotonen Lysispuffer incl. 15 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen. Es wurden Membranen präpariert (siehe Mat. & Met.). 500  $\mu\text{l}$  Membranen wurden in drei 150  $\mu\text{l}$  Fraktionen aliquotiert und mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  hypotonen Puffer (Membranen), 500  $\mu\text{l}$  zytosolischen Überstand aus der Präparation (Membranen + Zytosol) oder 500  $\mu\text{l}$  hypotonen Puffer mit 0,5 % Triton-X-100 (Membranen + Triton) versetzt. Die Membranen wurden jeweils in drei 200  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt und für 0, 5 oder 15 min bei 37°C inkubiert. Der Mangel an ATP verhinderte eine Kinase-Reaktion, so daß die *in vitro*-Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors beobachtet werden konnte. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 50  $\mu\text{l}$  5 x SDS-Ladepuffer und 5 min Kochen gestoppt. Die Membranpräparation wurden mittels Western-Blot einer Tyrosinphosphat- (Blot  $\alpha\text{PY}$ ) und EGF-Rezeptor-Analyse (Blot  $\alpha\text{EGFR}$ ) unterzogen.
- b) Die *in vitro*-Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors ist von einer hohen Thiol-Konzentration abhängig. 15 konfluente 15cm Zellkulturschalen A431-Zellen wurden für 1 Stunde mit 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und 10 min mit 20 ng/ml EGF behandelt. Es wurden Membranen präpariert und in 1200  $\mu\text{l}$  hypotonem Lysispuffer mit 0,5 % Triton-X-100 resuspendiert. Die Membranen wurden in vier 300  $\mu\text{l}$  Fraktionen aliquotiert und mit 0, 1 oder 30 mM N-Acetylcystein oder mit 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) versetzt. Die Membranen wurden jeweils in drei 100  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt und für 0, 3 oder 10 min bei 37°C inkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 25  $\mu\text{l}$  5 x SDS-Ladepuffer und 5 min Kochen gestoppt. Die Membranpräparation wurden mittels Western-Blot einer Tyrosinphosphat- (Blot  $\alpha\text{PY}$ ) und EGF-Rezeptor-Analyse (Blot  $\alpha\text{EGFR}$ ) unterzogen.

### UV und $\text{Na}_3\text{VO}_4$ hemmen die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors auch in isolierten Membranen

Um die, in den Membranen vorhandene physiologische EGF-Rezeptor-PTPase-Aktivität für eine biochemische Aufreinigung ausnutzen zu können, mußte zuerst sichergestellt werden, das dieses *in vitro*-System ähnliche Eigenschaften aufweist wie die Zellkultur-Systeme.

Daher wurde untersucht, ob die EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung in den isolierten Membranen ebenfalls durch UV-Strahlung oder  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  gehemmt werden kann. Die Membran-Fraktion war auf eine NAC-Konzentration von 5 mM eingestellt worden. Dies ermöglichte eine beinahe vollständige Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors innerhalb von drei Minuten (Abb.11a: die ersten drei Spuren). Die Bestrahlung der Membranen mit UVC oder die Zugabe von  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  verzögerten meßbar die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors (Abb. 11a: UVC,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  / - ). Die Behandlung mit  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und

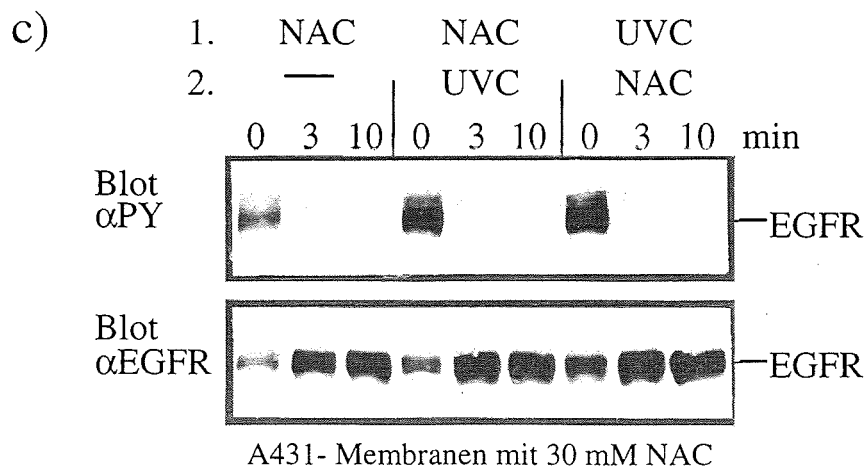
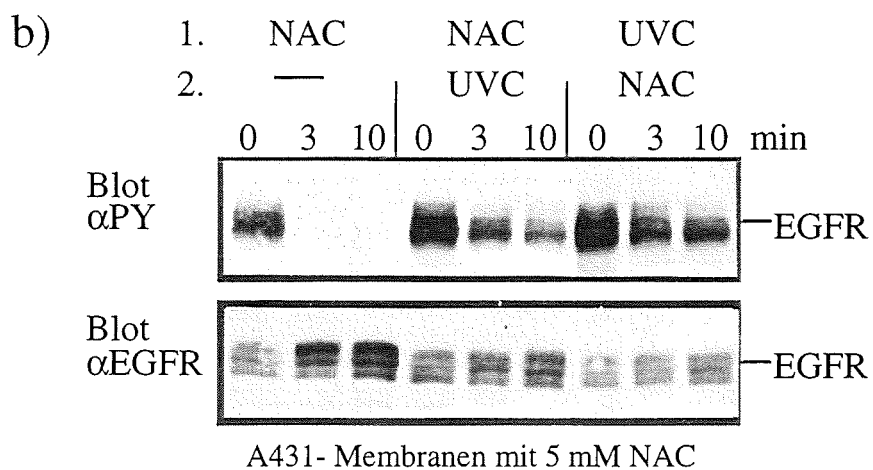
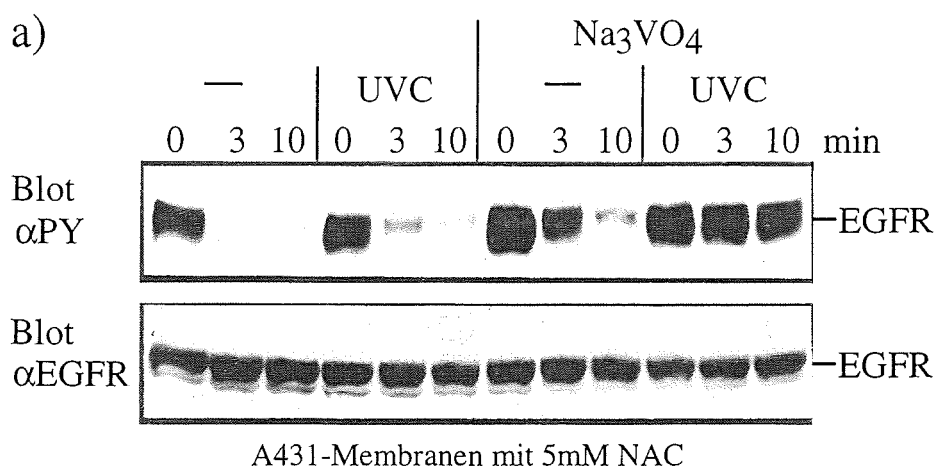
nachfolgende UVC-Bestrahlung störte die Dephosphorylierung so stark, daß nach 10 Minuten noch keine Abnahme von EGF-Rezeptor-Tyrosinphosphat beobachtet werden konnte (Abb. 11:  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  / UVC). Diese Ergebnisse korrelieren mit den in Zellkultur beobachteten Befunden. Durch diese Membran-Experimenten kann ebenfalls ausgeschlossen werden, daß der durch UV-Strahlung eingeführte DNA-Schaden ursächlich an der Hemmung der Dephosphorylierung beteiligt ist.

### Die durch UV-Bestrahlung eingeführte Verzögerung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung ist mit N-Acetylcystein revertierbar

Um zu untersuchen, ob die durch UV-Strahlung induzierte Hemmung mit einer Nachbehandlung von NAC wieder aufgehoben werden kann, wurden A431-Membranen, bevor oder nachdem die Thiolkonzentration auf 5 mM oder 30 mM NAC eingestellt worden war, mit UVC bestrahlt (Abb. 11b & c). Eine Behandlung der Membranen mit 5 mM NAC nach der Bestrahlung führte nicht zu einer Wiederherstellung der schnellen Dephosphorylierung, wie sie in unbestrahlten Membranen beobachtet wurde (Abb. 11b). Diese Thiolkonzentration ist also offensichtlich nicht in der Lage die Menge an UV-induzierten ROI's ausreichend zu reduzieren. Eine Thiolkonzentration von 30 mM verhinderte durch Vorbehandlung vollständig die UV-induzierte Hemmung der Dephosphorylierung bzw. hob sie durch Nachbehandlung wieder auf (Abb. 11c).

Abb. 11) UVC-Bestrahlung und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Behandlung von A431-Membranen hemmt die Tyrosin-Dephosphorylierungsaktivität. Die UVC-induzierte Hemmung kann mit einer hohen Thiolkonzentration revertiert werden.

- a) UV und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  hemmen synergistisch die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors in A431-Membranen. Triton-lysierte A431-Membranen wurden auf 5 mM N-Acetylcystein eingestellt und nicht behandelt (-) oder mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$  versetzt. Die Membranen wurden für 3 min inkubiert (-) oder mit 3000  $\text{J}/\text{m}^2$  UVC bestrahlt. Die Dephosphorylierungs-Kinetiken des EGF-Rezeptors wurde, wie in Abb. 10b beschrieben, bestimmt.
- b) & c) Die UV-induzierte Dephosphorylierungshemmung kann durch eine Nachbehandlung mit 30 mM aber nicht mit 5 mM N-Acetylcystein wieder aufgehoben werden. Triton-lysierte A431-Membranen wurden auf 5 mM (die ersten 6 Spuren von b) oder 30 mM N-Acetylcystein (die ersten 6 Spuren von c) eingestellt oder nicht eingestellt (jeweils die letzten drei Spuren). Die Membranen wurden dann für 3 min inkubiert (-) oder mit 3000  $\text{J}/\text{m}^2$  UVC bestrahlt (wie angezeigt). Die Membranen der letzten drei Spuren wurden nach der UVC-Bestrahlung mit N-Acetylcystein behandelt (5 mM in b; 30 mM in c). Die Dephosphorylierungs-Kinetiken des EGF-Rezeptors wurde, wie in Abb. 10b beschrieben, bestimmt.



Die Verzögerung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung ist eine Folge der UV-induzierten Hemmung einer Protein-Tyrosin-Phosphatase

Mit Hilfe eines experimentellen Tricks gelang es, die Phosphatase-Aktivität vom Substrat, dem tyrosinphosphorylierten EGF-Rezeptor zu trennen, ohne die beiden Komponenten tatsächlich aufzureinigen. Mit der etablierten Membran-Präparations-Methode wurden "Phosphatase-Membranen" hergestellt, deren PTPase(n) den phosphorylierten EGF-Rezeptor in einer zweiten Membran-Präparation "Substrat-Präparation" dephosphorylieren konnten. Die "Phosphatase-Membranen" wurden aus unbehandelten A431-Zellen hergestellt, während "Substrat-Membranen" aus A431-Zellen isoliert wurden, die mit 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und 1 mM Jodazetamid, zur Hemmung der PTPasen, und mit EGF, zur Verstärkung der Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor, vorbehandelt worden waren.

Der EGF-Rezeptor war in den Phosphatase-Membranen, wie erwartet, nicht an Tyrosinen phosphoryliert (Abb. 12, Spuren 13, 14 & 15). Bei den Substrat-Membranen wurde in den ersten 10 Minuten der Inkubation bei 37°C keinerlei Dephosphorylierungs-Aktivität festgestellt, obwohl alle Membranen auf 5 mM NAC eingestellt worden sind (Abb. 12, Spuren 1, 2 & 3). Wurden jedoch die Phosphatase-Membranen zu gleichen Teilen mit den Substrat-Membranen inkubiert, war eine fast vollständige Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors zu beobachten (Spuren 4, 5 & 6). Offensichtlich war der EGF-Rezeptor aus der Substrat-Membran-Präparation für die Phosphatasen aus der Phosphatase-Membran-Präparation zugänglich. Dies ermöglichte es die Phosphatase-Membranen mit UVB (Spuren 7, 8 & 9) oder UVC (Spuren 10, 11 & 12) zu bestrahlen und nachzuweisen, daß diese Bestrahlung die Phosphatase-Aktivität sehr stark hemmt. Also ist eine EGF-Rezeptor spezifische PTPase ein Detektor für UV-Strahlung und oxidativen Stress.

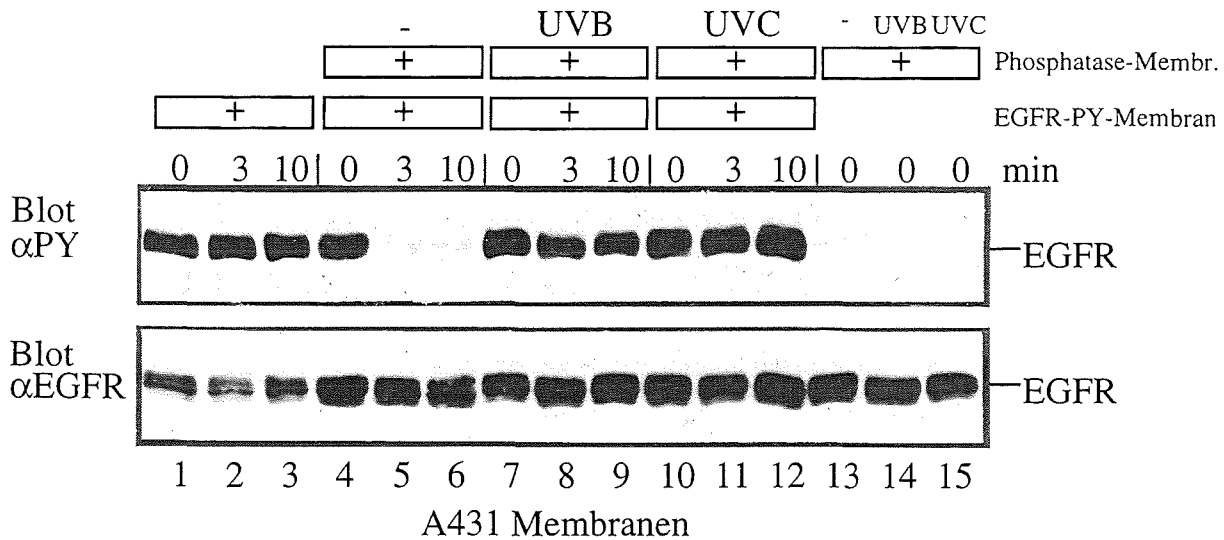


Abb. 12) Die UV-Bestrahlung von A431-Membranen hemmt eine membrangebundene Protein-Tyrosin-Phosphatase, die den EGF-Rezeptor dephosphorylieren kann.

Von fünf 15 cm Petri-Schalen mit unbehandelten A431-Zellen wurden Membranen präpariert, in Triton lysiert und mit 5 mM N-Acetylcystein versetzt (Phosphatase-Membranen). Eine zweite Membranpräparation (EGFR-PY-Membranen) wurde von fünf 15 cm Petri-Schalen A431-Zellen hergestellt, die für 1 Stunde mit 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und für 20 min mit 1 mM Jodacetamid und 50 ng/ml EGF behandelt waren, um die Tyrosinphosphatasen zu inaktivieren und eine starke EGF-Rezeptor-Phosphorylierung zu induzieren. Auch diese „Substrat-Membranen“ wurden Triton-lysiert und auf 5 mM N-Acetylcystein eingestellt. Die EGFR-PY-Membran-Präparation wurde in 4 gleiche Aliquots aufgeteilt und ein Aliquot wurde einer Dephosphorylierungsuntersuchung unterzogen (Spuren 1, 2 und 3). Der EGF-Rezeptor wurde innerhalb der ersten 10 min nicht dephosphoryliert. Ein weiteres Aliquot der EGFR-PY-Membranen wurden zu gleichen Teilen mit Phosphatase-Membranen gemischt und untersucht (Spuren 4 bis 6). Der EGF-Rezeptor wurde dephosphoryliert. Aliquots der Phosphatase-Membranen wurden mit  $3000 \text{ J/m}^2$  UVB (Spuren 7 bis 9) oder UVC (Spuren 10 bis 12) bestrahlt und mit EGFR-PY-Membranen gemischt und untersucht. Die EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung war gehemmt. Die Phosphatase-Membranen enthielten keine messbaren Mengen an tyrosinphosphoryliertem EGF-Rezeptor (Spuren 13 bis 15).



## **Das Umweltgift Tributylzinn - aktiviert EGF-Rezeptor-Signaltransduktion.**

Tributylzinn (TBT) ist ein starkes Zellgift. Bei den, in der vorliegenden Arbeit verwendeten HeLa-Zellen hatte die Applikation von 1  $\mu\text{M}$  TBT keine Auswirkungen auf das Überleben der Zellen. 2,5 oder 5  $\mu\text{M}$  TBT verursachten nach 2-6 Stunden das Abrunden der Zellen und vermehrtes Ablösen von den Zellkultur-Schalen. Diese Reaktion war nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  TBT deutlicher und schneller zu beobachten. Die Zellen starben danach in den nächsten 24-36 Stunden ab. Bei einer kleinen, noch nicht quantifizierten Fraktion der HeLa-Zellen traten typische Merkmale von Apoptose auf (Übersicht über Apoptose in: Corcoran et al., 1994; Pieters et al., 1994; Alison und Sarraf, 1995). Hinweise für TBT-induzierte Apoptose waren das Auftreten einer DNA-Leiter und die proteolytische Fragmentierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase. Die toxische Wirkung von TBT kann durch Thiol-Antioxidanzien gehemmt werden. Bis zu einer Stunde nach der Applikation von 2,5  $\mu\text{M}$  TBT konnte das Absterben der Zellen durch Waschen mit Medium, das 50  $\mu\text{M}$  Dithiothreitol enthielt, verhindert werden (Zaucke und Knebel, Manuskript in Vorbereitung). Auch die TBT-induzierte Hämolyse von Erythrozyten wurde durch thiolhaltige Antioxidanzien, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol, Dithiothreitol und Dimercapto-Bernsteinsäure inhibiert (Gray *et al.*, 1986). N-Acetylcystein-Behandlung verminderte die TBT-induzierte Freisetzung von Interleukin-1 $\alpha$ , ein Zytokin, daß bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen in der Haut beteiligt ist. Die Autoren vermuteten, daß die TBT-induzierte Hemmung der Atmungskette in Mitochondrien zum Anstieg von ROI's führt, die dann Signaltransduktion zum IL-1 $\alpha$ -Promoter aktiviert (Corsini *et al.*, 1996).

### Tributylzinn-Behandlung verursacht eine Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung und induziert EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung

Die bei der Untersuchung des Mechanismus der UV-induzierten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung erhaltenen Befunde implizierten, daß Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die eine ständige Kinase-Aktivität aufweisen, prinzipiell durch Agenzien aktiviert werden, die die Zellmembran passieren können und Thiolgruppen modifizieren. TBT hemmt *in vitro* die Alkohol-Dehydrogenase, ein Enzym, das Thiolgruppen für seine katalytische Aktivität benötigt. Diese

Hemmung kann durch Dithiothreitol oder Dimercaptobernsteinsäure wieder aufgehoben werden (Abb. 18). Dies lässt vermuten, daß TBT mit Thiolgruppen interagiert, also potentiell eine PTPase hemmen kann. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob TBT-Behandlung die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an Tyrosinen verursacht und ob dies eine Folge von Dephosphorylierungs-Hemmung ist.

Bei der Untersuchung der EGF-Rezeptor-Phosphorylierung stellte sich heraus, daß der, aus TBT-behandelten HeLa-Zellen immunpräzipitierte EGF-Rezeptor verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert war (Abb. 13a: Blot  $\alpha$ PY). Außerdem wurde eine verstärkte Kopräzipitation von Shc-Protein mit dem EGF-Rezeptor festgestellt, ein Hinweis für TBT-induzierte funktionelle Aktivierung des Rezeptors (Abb. 13a: Blot  $\alpha$ Shc).

In Anlehnung an die Experimente zur Aufklärung der UV-induzierten EGF-Rezeptor-Aktivierung wurde untersucht, ob TBT-Behandlung von Rat-1-HER-Zellen zu einer Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung führt. Bereits 1  $\mu$ M TBT führte zu einer deutlichen Verzögerung der Dephosphorylierung. In Zellen, die mit 10  $\mu$ M TBT behandelt worden sind, konnte innerhalb von drei Minuten kaum eine Abnahme von EGF-Rezeptor-Tyrosinphosphat gemessen werden (Abb. 13b: Blot  $\alpha$ PY). Auch in diesem Experiment wurden die Zellen mit 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  vorbehandelt. Ohne diese Vorbehandlung konnte eine Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung nicht festgestellt werden, vielleicht, weil sie nicht ausgeprägt genug war, um sie unter den gegebenen experimentellen Bedingungen messen zu können.

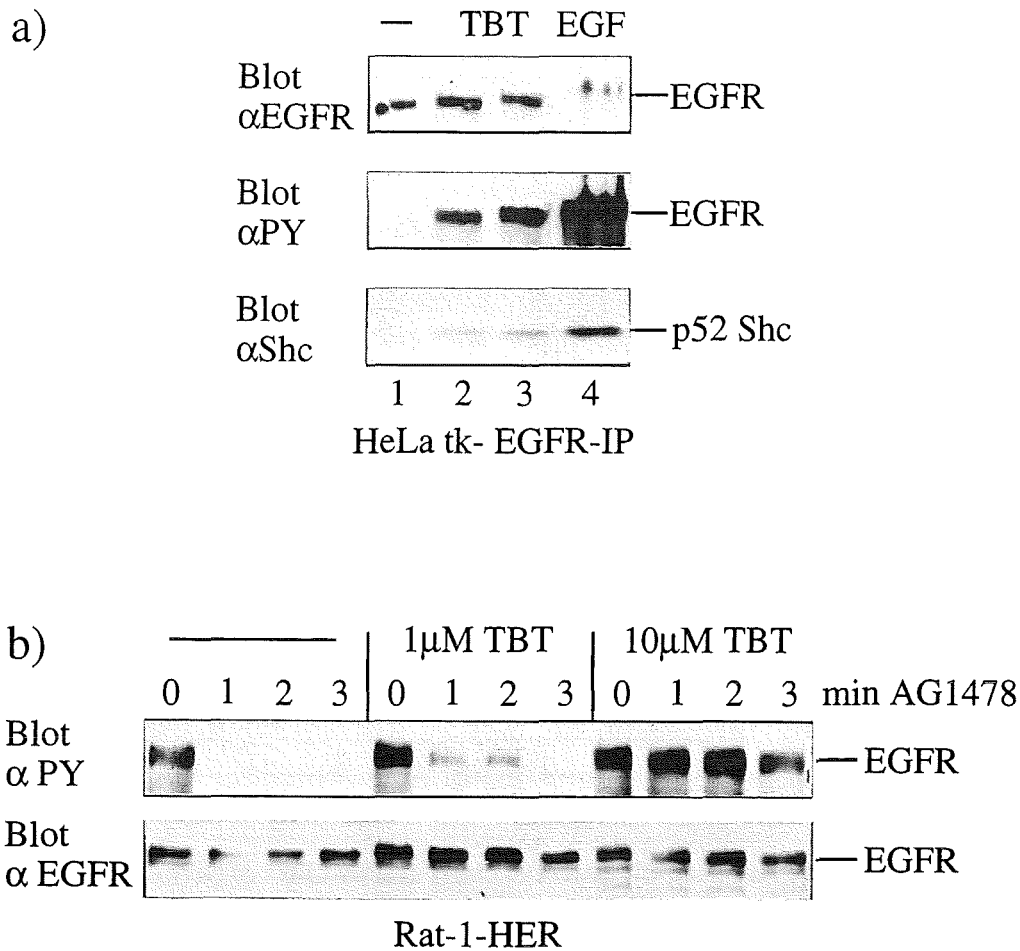


Abb. 13) EGF-Rezeptor-Phosphorylierung durch Tributylzinn

- a) Tributylzinn induziert Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und die Assoziation des Rezeptors mit Shc. Serumfrei gehungerte HeLa-Zellen wurden für 1 Stunde mit 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  inkubiert und für 5 min nicht behandelt (Spur 1) oder mit 1  $\mu$ M (Spur 2) oder 10  $\mu$ M (Spur 3) TBT oder mit 20 ng/ml EGF (Spur 4) behandelt. Der EGF-Rezeptor wurde aus Zellysaten immunpräzipitiert und die EGF-Rezeptor-Menge (Blot  $\alpha$ EGFR), die EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung (Blot  $\alpha$ PY) und die Menge an kopräzipitiertem p52-Shc (Blot  $\alpha$ Shc) wurde im Western-Blot bestimmt.
- b) Tributylzinn hemmt die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors. Rat-1-HER-Zellen wurden für 6 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und für eine Stunde mit 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und anschliessend für 10 min mit 5 ng/ml EGF vorbehandelt, bevor für 5 min 0,1 % Methanol (–), 1  $\mu$ M Tributylzinn (1  $\mu$ M TBT) oder 10  $\mu$ M Tributylzinn in Methanol (10  $\mu$ M TBT) zugegeben wurde. Anschliessend wurden die Zellen für 3 min mit DMSO (0), oder für 1, 2 oder 3 min mit AG1478 behandelt. Die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde, wie in Abb. 8 beschrieben, bestimmt.

Da es nicht sehr wahrscheinlich ist, daß TBT nur eine EGF-Rezeptor-spezifische PTPase hemmt, wurde eine TBT-Kinetik angefertigt und untersucht, ob auch andere Tyrosin-Kinase-Substrate verstärkt phosphoryliert waren. Eine 180 kD-Bande, die mit dem EGF-Rezeptor kolokalisiert, wird bereits fünf Minuten nach TBT-Behandlung sichtbar, und tritt nach einer Stunde verstärkt hervor. Es wurden tatsächlich noch zwei Banden gefunden, die nicht mit dem EGF-Rezeptor kolokalisieren. Ein nicht identifiziertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 160 kD war ebenfalls nach fünf minütiger Behandlung der Zellen verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert. Auch diese Phosphorylierung blieb mindestens eine Stunde erhalten. Diese 160 kD-Bande war allerdings weniger ausgeprägt, weil dieses Protein in geringeren Mengen exprimiert wird und/oder weniger stark phosphoryliert wird, als das 180 kD-Phospho-Protein. Die Phosphorylierungs-Kinetik einer etwa 140 kD großen Protein-Bande fällt besonders auf, weil bereits fünf Minuten nach TBT-Behandlung eine sehr starke Zunahme zu sehen ist, die für 30 Minuten stabil bleibt und nach 60 Minuten wieder schwächer wird (Abb. 14a: Blot  $\alpha$ PY). Die Proteine "Focal-adhesion-kinase" oder "p130-GAP" werden verbreitet exprimiert, haben etwa die Größe des gesuchten Proteins und werden nach diversen Stimuli an Tyrosinen phosphoryliert. Mit Hilfe von Western-Blots konnte aber festgestellt werden, daß die 140 kD-Bande nicht mit diesen Proteinen identisch ist.

Um die Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierung zu erklären, sind mehrere Hypothesen denkbar:

1. Die Proteine sind Substrate des EGF-Rezeptors oder in der EGF-Rezeptor-Signaltransduktion beteiligt.
2. Die Tyrosin-Kinasen, die diese Proteine phosphorylieren, besitzen eine deutliche Basalaktivität, und durch Hemmung der Dephosphorylierung akkumulieren Phosphotyrosine an den Proteinen.
3. Durch einen unbekanntem Mechanismus werden die Tyrosin-Kinasen dieser Proteine in TBT-behandelten Zellen aktiviert.

### TBT-aktiviert Erk-1,2, JNK/SAPK und p38/RK- Mapkinasen

Mapkinasen werden durch Phosphorylierung jeweils eines Threonin- und eines Tyrosin-Restes in einem Thr-X-Tyr-Motiv (Erk: Thr-Glu-Tyr, JNK/SAPK: Thr-Pro-Tyr oder p38/RK: Thr-Gly-Tyr) durch bispezifische Kinasen aktiviert (Derijard *et al.*, 1995; Raingeaud *et al.*, 1995; Seger und Krebs, 1995). Die Phosphorylierung von Erk-1,2 an Threonin 183 und Tyrosin 185 ist unter geeigneten Bedingungen als scheinbare Zunahme ihres Molekulargewichts in der SDS-Gelelektrophorese festzustellen. Um diese Molekulargewichtszunahme zu detektieren, wurden Proteinextrakte aus TBT-behandelten HeLa-Zellen in einem 10 %-SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Western-Blot-Analyse wurde Erk-1,2 und ihre phosphorylierten Formen sichtbar gemacht. In der Abbildung erkennt man insgesamt vier Banden (Abb. 14a: Blot  $\alpha$ Erk1,2). Die unterste Bande entspricht der nicht phosphorylierten Erk-2. Je mehr Erk-2-Moleküle phosphoryliert werden, desto schwächer wird die unterste Bande und desto stärker wird die Bande darüber, die Phospho-Erk-2 repräsentiert (Blot  $\alpha$ Erk-1,2: Erk-2). Die zweite Bande von oben entspricht der nicht phosphorylierten Erk-1, während die oberste Bande die phosphorylierte und aktivierte Erk-1 repräsentiert (Blot  $\alpha$ Erk-1,2, Erk-1). Diese Nachweismethode hat den Vorteil, daß man das Verhältnis von aktivierten zu nicht aktivierten Erk-1,2-Molekülen in den Zellen untersuchen kann. Die Phosphorylierung von Erk-1 und Erk-2 nahm bereits fünf Minuten nach TBT-Behandlung deutlich zu. 20 Minuten nach TBT-Behandlung waren mehr als 90 % der Erk-1,2-Moleküle phosphoryliert. Ein Teil dieser Erk-1,2-Moleküle wurde später wieder dephosphoryliert, so daß eine Stunde nach TBT-Behandlung noch etwa die Hälfte der Erk-1,2-Moleküle phosphoryliert war. Die Aktivierung von Erk-1,2 in TBT-behandelten Zellen wurde mit Hilfe von Immunkomplex-Kinase-Experimenten, bei denen immunpräzipitierte Erk-1,2 *in vitro* das Substrat MBP (Myelin-Basic-Protein) phosphorylierte, bestätigt (ohne Abb.).

Die TBT-induzierte Aktivierung von JNK/SAPK wurde in einem Immunkomplex-Kinase-Experiment untersucht, bei dem ein GST-Jun (Glutathion-S-Transferase-jun)-Fusions-Protein *in vitro* durch immunpräzipitierte JNK/SAPK phosphoryliert wurde. Die JNK/SAPK-Aktivität stieg mit der TBT-Behandlungsdauer an (Abb. 14b). Diese Kinetik korreliert mit der, relativ zur UV-Induktion langsamen und stetigen, *c-jun*-Geninduktion in TBT-behandelten Zellen (Abb. 15).

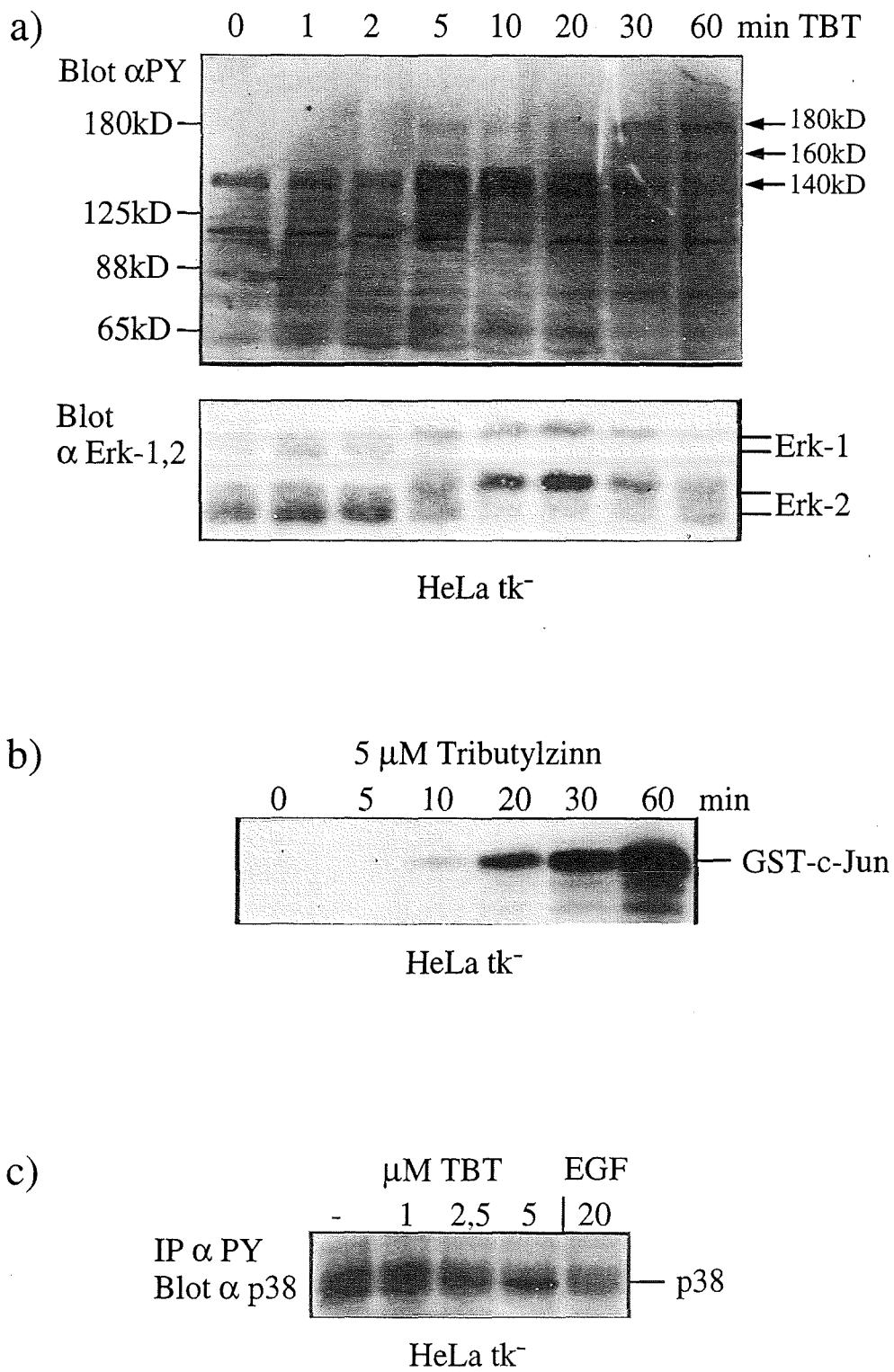
Um einen Hinweis auf eine TBT-induzierte Aktivierung von p38/RK zu bekommen, wurde eine Immunpräzipitation gegen tyrosinphosphorylierte Proteine aus TBT-behandelten HeLa-Zellen durchgeführt. Mittels Western-Blot wurde dann nachgewiesen, daß auch p38/RK an Tyrosinen phosphoryliert wurde.

5  $\mu$ M TBT induzierte eine, im Vergleich zu 20 ng/ml EGF, wesentlich stärkere p38/RK-Tyrosin-Phosphorylierung (Abb. 14c).

TBT induziert also Mitglieder aus allen drei bekannten Mapkinase-Familien.

Abb. 14) Tributylzinn induziert Tyrosin-Phosphorylierung und die Aktivierung von prolangerichteten Mapkinasen.

- a) Tributylzinn induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von 180 kD, 160 kD und 140 kD großen Proteinen und die Erk-1,2-Phosphorylierung. HeLa-Zellen wurden für 1 bis 60 min nicht behandelt (0) oder mit 2,5  $\mu$ M TBT behandelt und in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert. Die Tyrosin-Phosphorylierung der zellulären Proteine (Blot  $\alpha$ PY) und die Phosphorylierung der Erk-2 und Erk-1 (Blot  $\alpha$ Erk-1,2) wurde bestimmt. Die Phosphorylierung der Erk-2 bzw. Erk-1 ist als scheinbare Zunahme des Molekulargewichts im 10 %-SDS-Protein-Gel sichtbar.
- b) TBT-Behandlung führt zur Aktivierung der JNK/SAPK. HeLa-Zellen wurden nicht behandelt (0) oder für 5 bis 60 min mit 5  $\mu$ M TBT behandelt und lysiert. Die JNK-1 und JNK-2 wurden immunpräzipitiert und in einem Immunkomplex-Kinase-Experiment mit GST-Jun als Substrat auf ihre Aktivität untersucht. Die Schwärzung des Autoradiogramms entspricht dem Einbau von radioaktiven Phosphat in das GST-Jun-Protein. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dagmar Wilhelm und Frank Zaucke durchgeführt.
- c) TBT induziert Tyrosin-Phosphorylierung der p38/RK. HeLa-Zellen wurden 24 Stunden in serumfreien Medium gehungert, für 1 Stunde mit 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  vorbehandelt und anschliessend für 10 min nicht behandelt (-) oder mit 1, 2.5 oder 5  $\mu$ M TBT oder 20 ng/ml EGF behandelt und lysiert. Tyrosinphosphorylierte Proteine wurden mit Hilfe des PY20-Antikörpers immunpräzipitiert und einer p38/RK-Western-Blot-Analyse unterzogen (IP  $\alpha$ PY Blot  $\alpha$ p38).



### Tributylzinn induziert *c-jun* und *c-fos*-mRNA-Akkumulation

Da TBT zur Aktivierung von EGF-Rezeptor-abhängiger Signaltransduktion führt, ist zu erwarten, daß auch *c-jun* oder *c-fos* durch TBT-Behandlung induziert werden. Tatsächlich führte die Behandlung von HeLa-Zellen mit einer verhältnismäßig niedrigen Dosis von 0,5  $\mu\text{M}$  TBT zu einer Steigerung der *c-fos*-Expression in HeLa-Zellen (Abb. 15: Spur 3). Höhere TBT-Dosierung oder längere Einwirkdauer führten zu einer sehr starken Akkumulation von *c-fos*-mRNA. So erhöhte eine zweistündige Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  TBT die *c-fos*-mRNA-Menge um das 30-fache (Abb. 15: *c-fos*: Spur 9). Die Aktivierung des *c-jun*-Promoters wird durch JNK/SAPK und p38/RK vermittelt (siehe Einleitung). Wie erwartet, kommt es aufgrund der TBT-induzierten Aktivierung dieser Kinasen zu einer starken Akkumulation der *c-jun*-mRNA in TBT-behandelten Zellen (Abb. 15: *c-jun*: Spuren 2-9).

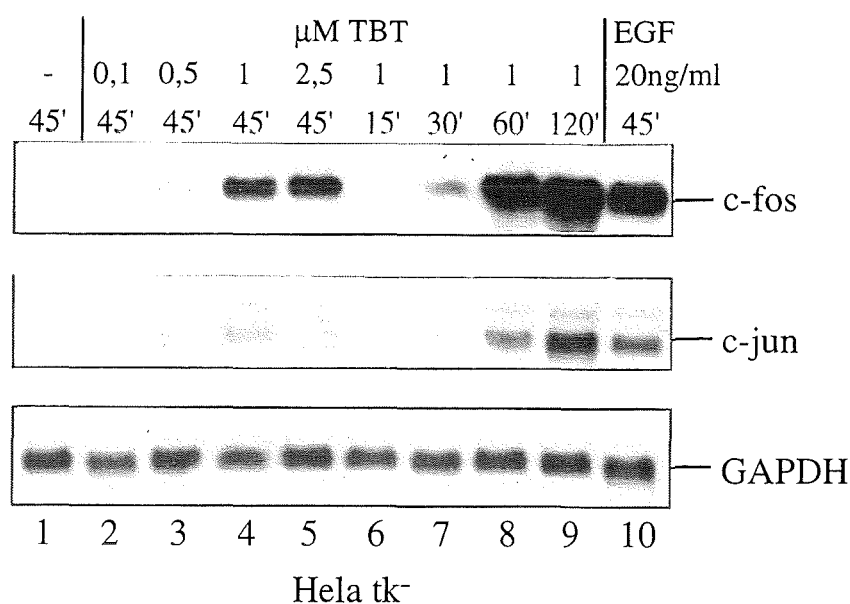


Abb. 15) Tributylzinn induziert die Akkumulation von *c-fos*- und *c-jun*-mRNA. HeLa -Zellen wurden für 36 Stunden in 0,5 % Serum gehungert und anschliessend für 45 min nicht behandelt (-) oder mit verschiedenen Konzentrationen von TBT (Spuren 2-5) oder mit 20 ng/ml EGF (Spur 10) inkubiert oder sie wurden mit 1  $\mu\text{M}$  TBT für 15 min bis 120 min (Spuren 6 bis 9) behandelt. Nach Präparation von poly-(A)<sup>+</sup>-mRNA wurde die Menge an spezifischer *c-fos*- und *c-jun*-mRNA in einer Northern-Blot-Analyse durch Standardisierung mittels GAPDH-mRNA bestimmt.



### Die TBT-induzierte Aktivierung der Erk-1,2 wird zum Teil durch den EGF-Rezeptor vermittelt

Mit Hilfe von Kinase-Inhibitoren sollte geklärt werden, ob die durch TBT induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung ursächlich für die Erk-1,2-Aktivierung ist. Die Substanz PD98059 verhindert die Aktivierung der für die Phosphorylierung und Aktivierung der Erk-1,2 verantwortlichen Protein-Kinasen MEK-1 und MEK-2 (Alessi *et al.*, 1995; Dudley *et al.*, 1995; siehe Einleitung). PD98059 fixiert MEK-1 und MEK-2 sehr spezifisch in einer dephosphorylierten, inaktiven Form. Aktivierte MEK's können durch PD98059 nicht gehemmt werden. Aus diesem Grund ist die Hemmung der Erk-1,2 durch PD98059 bei sehr potenten Aktivatoren weniger effizient als bei schwachen Aktivatoren (Philip Cohen, pers. Mitteilung).

Die Applikation von PD98059 15 Minuten vor der TBT-Behandlung zu HeLa-Zellen konnte die TBT-induzierte Erk-1,2-Aktivierung kaum, die EGF-induzierte etwas besser hemmen (Abb. 16a: Blot  $\alpha$ Erk-1,2). Falls der EGF-Rezeptor der einzige Vermittler TBT-induzierter Erk-1,2-Aktivierung ist, würde man erwarten, daß PD98059 die TBT-induzierte Erk-1,2-Modifikation besser hemmen kann als die EGF-induzierte, da die EGF-induzierte Rezeptor-Phosphorylierung stärker war als die TBT-induzierte (Blot  $\alpha$ PY). Der EGF-Rezeptor vermittelt also die TBT-induzierte Erk-1,2-Aktivierung nicht alleine. Wie erwartet, wurde die TBT- oder die EGF-induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung durch PD98059-Vorbehandlung nicht reduziert (Abb. 16a: Blot  $\alpha$  PY).

Der spezifische Inhibitor der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase (AG1478) hemmte die TBT- und EGF-induzierte Rezeptor-Phosphorylierung (Abb. 16a: Blot  $\alpha$ PY) und die EGF-induzierte Erk-1,2-Aktivierung deutlich, während die TBT-induzierte Erk-1,2-Aktivierung nur leicht gehemmt wurde (Abb. 16a: Blot  $\alpha$ Erk-1,2). Somit kann der EGF-Rezeptor nicht der einzige Vermittler der TBT-induzierten Erk-1,2-Aktivierung sein.

Obwohl die Inhibitoren in den verwendeten Konzentrationen allein die TBT-induzierte Erk-1,2-Aktivierung nicht effizient hemmten, konnte durch die simultane Applikation beider Inhibitoren eine starke Hemmwirkung erzielt werden. Es blieben jedoch nach wie vor etwa 30 % der Erk-1,2-Moleküle phosphoryliert (Abb. 16a: Blot  $\alpha$  Erk-1,2: 2. Spur von rechts).

Neben dem EGF-Rezeptor könnten noch andere Tyrosin-Kinasen die TBT-induzierte Aktivierung der Erk-1,2 vermitteln.

Auch Proteinkinase-C-Isoformen sind an der Aktivierung der Erk-1,2 beteiligt (siehe Einleitung). Es wurde untersucht, ob die Hemmung der PKC durch den spezifischen Inhibitor GF109203x (Toullec *et al.*, 1991) mit der TBT-induzierten Erk-1,2 interferiert. In der Tat wurde gefunden, daß GF109203x diese Modifikation zum Teil hemmt. Außerdem wird die Erk-1,2 in TPA-vorbehandelten Zellen durch TBT nur schwach modifiziert (ohne Abb.). Es ist noch nicht untersucht, ob die PKC durch TBT-Behandlung aktiviert wird und was der Mechanismus für diese Aktivierung sein könnte. Eine Möglichkeit wäre, daß die Phospholipase-C $\gamma$ , die durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert werden kann und zur Freisetzung von DAG führt, (siehe Einleitung) in TBT-behandelten Zellen die Aktivierung der PKC vermittelt.

### Erk-1,2 und p38/RK-Mapkinasen vermitteln die TBT-induzierte Genexpression

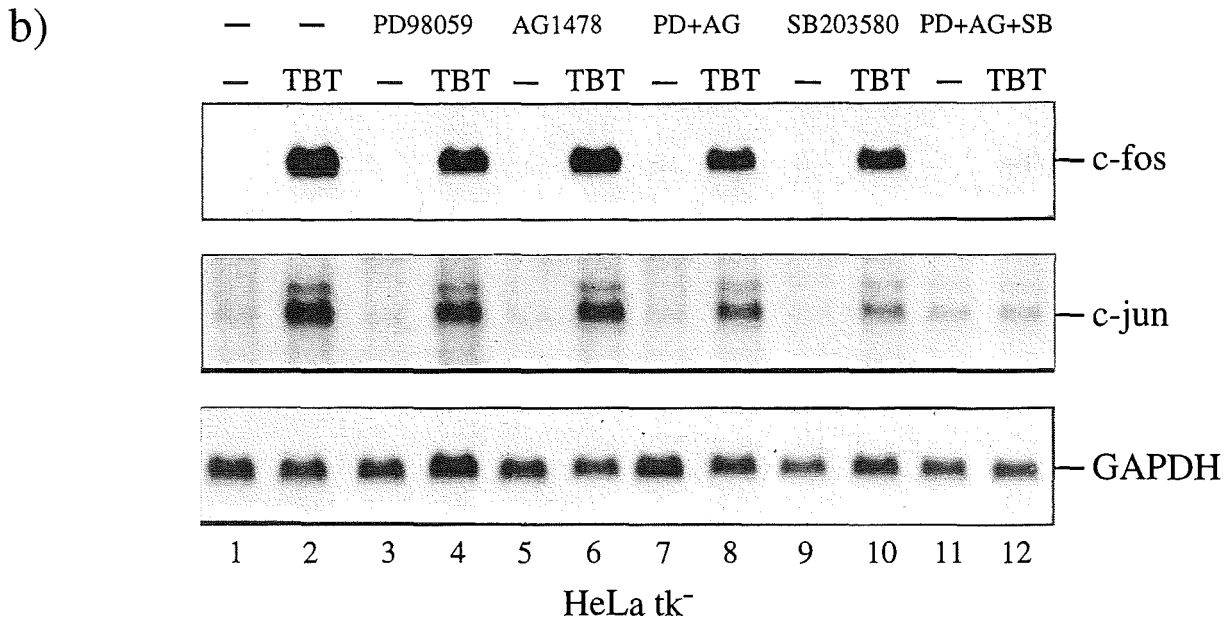
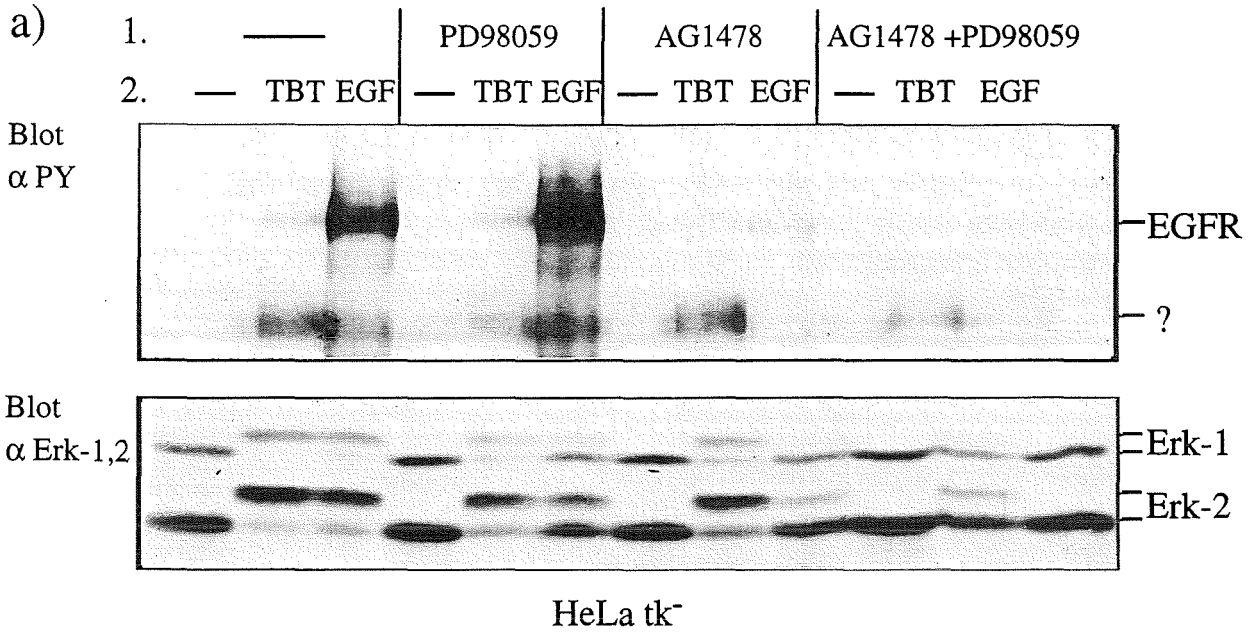
Um Evidenzen zu sammeln, daß die TBT-induzierte Mapkinase-Aktivierung und die Gen-Induktion nicht nur korrelieren, sondern im kausalen Zusammenhang stehen, wurde die Signaltransduktion zur Erk-1,2 bzw. die p38/RK-Aktivierung mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren unterbrochen und die Auswirkungen auf die Geninduktion untersucht. Dabei wurden der MEK-Inhibitor PD98059, der EGF-Rezeptor-Inhibitor AG1478 und der p38/RK-Kinase-Inhibitor SB203580 verwendet (Lee *et al.*, 1994; Cuenda *et al.*, 1995). Um die Effizienz der Erk-1,2-Hemmung zu verbessern, wurde auch die Kombination von PD98059 mit AG1478 eingesetzt. Ebenso wurde untersucht, welche Auswirkungen die simultane Hemmung der Erk-1,2 und der p38/RK auf die TBT-induzierte Akkumulation von *c-fos*- und *c-jun*-mRNA hat.

Während die Vorbehandlung mit PD98059 oder AG1478 die TBT-induzierte Akkumulation von *c-fos* und *c-jun* nur zu etwa 30 % hemmen konnte, war die kombinierte Applikation etwas effizienter und hemmte zu ca. 50 % (Abb. 16b: Spuren 4, 6, 8). Dieses Ergebnis korreliert mit den Befunden an der Erk-1,2 (Abb. 16a: Blot  $\alpha$ Erk-1,2). Die Vorbehandlung mit SB203580 allein konnte die TBT-induzierte Geninduktion etwa zur Hälfte hemmen (Abb. 16b: Spur 10). Sehr effizient bei der Hemmung der TBT-induzierten *c-fos*-Induktion war die kombinierte Behandlung mit AG1478, PD98059 und SB203580. Dieser Inhibitor-Cocktail hemmte die TBT-induzierte Akkumulation der *c-fos*-mRNA beinahe vollständig. Auch die Akkumulation der *c-jun*-mRNA wurde durch diesen Inhibitor-Cocktail sehr stark gehemmt (Abb. 16b: Spur 12). Diese

Ergebnisse lassen vermuten, daß sowohl die Erk-1,2 als auch die p38/RK an der TBT-induzierten Akkumulation der *c-fos*- und der *c-jun*-mRNA beteiligt sind.

Abb. 16) Rolle des EGF-Rezeptors und der Mapkinasen Erk-1,2 und p38/RK bei der TBT-induzierten Gen-Aktivierung

- a) Die TBT-induzierte Erk-Phosphorylierung ist zum Teil von EGF-Rezeptor-Aktivierung abhängig. HeLa-Zellen wurden für 10 min mit 0,2 % DMSO (-), 50  $\mu$ M PD98059, 100 nM AG1478 oder der Kombination von beiden behandelt. Die Zellen wurden dann für 15 min ohne Zusatz (-), mit 2,5  $\mu$ M Tributylzinn (TBT) oder 10 ng/ml EGF (EGF) behandelt. Die Tyrosin-Phosphorylierung der zellulären Proteine (Blot  $\alpha$ PY) und die Phosphorylierung der Erk-2 und Erk-1 (Blot  $\alpha$ Erk-1,2) wurde im Western-Blot bestimmt.
- b) Erk-1,2 und p38/RK vermitteln die TBT-induzierte Akkumulation von *c-fos*- und *c-jun*-mRNA. HeLa -Zellen wurden für 36 Stunden in 0,5 % Serum gehungert. Sie wurden dann jeweils 15 min mit 0,1 % DMSO (1 + 2), 50  $\mu$ M PD98059 (Spuren 3 + 4), 100 nM AG1478 (5 + 6), 50  $\mu$ M PD98059 und 100 nM AG1478 (7 + 8), 25  $\mu$ M SB203580 (9 + 10) oder mit PD98059 und AG1478 und SB203580 (11 + 12) behandelt. Die Zellen wurden dann mit Methanol (0,1 % f.c.) oder 2,5  $\mu$ M TBT für 1 Stunde inkubiert. Aus den Zellen wurde poly (A)<sup>+</sup>-mRNA isoliert, welche für eine Northern-Blot-Analyse verwendet wurde. Die Menge an spezifischer *c-fos*- und *c-jun*-mRNA wurde mit der Menge an GAPDH-mRNA, die als Standard diente, verglichen.



Da bereits beschrieben war, daß TBT zum Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels führt (Chow *et al.*, 1990; Oyama *et al.*, 1994; Viviani *et al.*, 1995) und die Kombination von erhöhtem Calciumspiegel und Erk-1,2-Aktivierung zu einer Aktivierung der zytosolischen Phospholipase-A2 (PLA-2) führt (Lin *et al.*, 1993; Sa *et al.*, 1995; Schalkwijk *et al.*, 1996), wurde untersucht, ob TBT PLA-2 aktiviert. Aktivierte PLA-2 katalysiert die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden. In der Tat folgen sowohl die TBT-induzierte PLA-2-Aktivierung als auch die Freisetzung von Arachidonsäure einer sehr ähnlichen Kinetik, wie die Erk-1,2-Aktivierung. AG1478 und PD98059 hemmen die TBT-induzierte PLA-2-Aktivierung in ähnlicher Weise wie die Erk-1,2-Aktivierung (Zaucke und Knebel, Manuskript in Vorbereitung). Es wurden also einige Komponenten eines TBT-induzierten Signaltransduktionsweges identifiziert, der von der Signalentstehung durch Dephosphorylierungs-Hemmung über Tyrosin-Kinasen zur Erk-1,2 und weiter, durch die Aktivierung von PLA-2 und der Freisetzung von Arachidonsäure, zur Erzeugung von sekundären Botenstoffen (second messenger) führt. Arachidonsäure ist eine Vorstufe von Prostaglandinen, die bei Entzündungsreaktionen der Haut eine Rolle spielen (Higgins, 1985; Sondergaard *et al.*, 1985). Diese Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges könnte also möglicherweise für die Eigenschaft von TBT, Hautirritationen auszulösen, verantwortlich sein.

## Die Hefe-Alkohol-Dehydrogenase als *in vitro*-Modell-System für UV-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, Jodazetamid-, und Tributylzinn-vermittelter Enzymhemmung

Die Untersuchung der Auswirkungen von Protein-Modifikationen auf die Aktivität zellulärer Enzyme ist aufgrund der Komplexität einer Zelle sehr schwierig. Um den Wirkungsmechanismus der UV-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, Jodazetamid-, und TBT-induzierten Phosphatasehemmung besser zu verstehen, wurde ein *in vitro*-System etabliert, bei dem die Rolle von Thiolgruppen bei der Inaktivierung eines Enzyms untersucht wurde. Als Test-Enzym fungierte keine gereinigte PTPase, sondern die Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe (ADH), ein Enzym, das ebenso wie eine PTPase Thiolgruppen benötigt, um katalytisch aktiv zu sein. Die Verwendung der ADH in diesem Test-System hat folgende technische Vorteile:

- Ihre Aktivität kann einfach bestimmt werden. Dabei wird die Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH bei der ADH katalysierten Oxidation von Ethanol zu Azetaldehyd verfolgt. NADH hat im Gegensatz zu NAD<sup>+</sup> ein Absorptionsmaximum bei 340nm.
- Die Messungen können recht schnell durchgeführt werden.
- ADH ist als reines Protein in beliebigen Mengen und sehr günstig kommerziell erhältlich.
- Die ADH ist gut charakterisiert und der enzymatische Mechanismus gut untersucht (Rabin und Whitehead, 1962; Eklund, 1976). ADH benötigt sechs Thiol-Gruppen um zwei Zinkatome zu binden. Da die Hefe-ADH als Tetramer funktionell ist, werden 24 Thiol-Gruppen für eine funktionelle Einheit gebraucht (Nozaki *et al.*, 1988).
- Eine sehr nützliche Eigenschaft dieses *in vitro*-Systems ist es, daß sich die relative Menge an Thiolgruppen an der ADH sich mit 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) messen lässt.

Ein deutlicher Nachteil bei der Verwendung der ADH ist, daß alle Rückschlüsse auf UV-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, Jodazetamid-, und TBT-induzierte PTPase-Hemmung nur indirekt gezogen werden können.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und Jodazetamid-Behandlung einer ADH-Lösung führen zur Hemmung der katalytischen ADH-Aktivität

Um zu untersuchen, ob Oxidanzien oder Thiol-Alkylanzien die ADH hemmen können, wurde eine 0,5  $\mu\text{M}$  ADH-Lösung (0,5  $\mu\text{M}$  bezieht sich auf die Monomere und entspricht 70  $\mu\text{g/ml}$ ) mit verschiedenen Dosen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Jodazetamid inkubiert und die ADH-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer gemessen. Sowohl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- als auch Jodazetamid-Behandlung führten zu einem vollständigen Verlust der ADH-Aktivität (Abb.17). Diese Enzymhemmung war sowohl von der Konzentration der Agenzien abhängig als auch von der Einwirkdauer (ohne Abb.). So mußte ADH für vier Stunden mit 2 mM Jodazetamid inkubiert werden, um sie vollständig zu hemmen. Eine 50 %ige Hemmung der katalytischen Aktivität (IC<sub>50</sub>) wurde mit etwa 50  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 120  $\mu\text{M}$  Jodazetamid erreicht. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung hemmte effizienter als Jodazetamid, vielleicht, weil H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht nur Thiol-Gruppen angreifen kann, sondern auch oxidative Schäden an anderen Seitengruppen verursacht.

% relative ADH-Aktivität

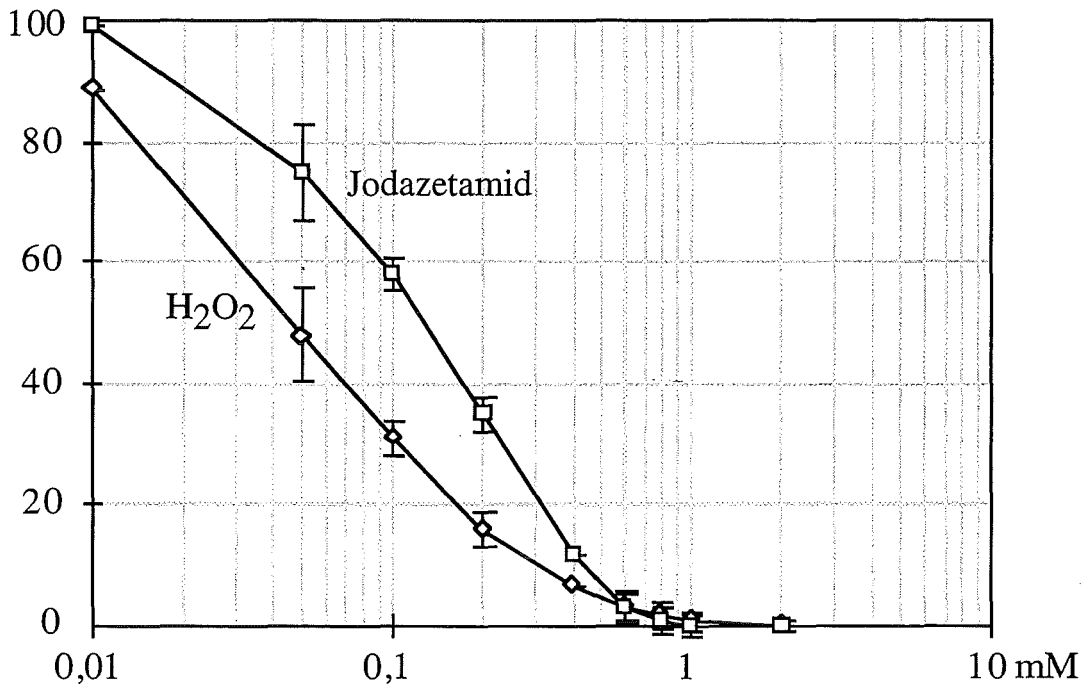


Abb. 17) Jodazetamid oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hemmen die enzymatische Aktivität der Hefe-Alkohol-Dehydrogenase vollständig. Aliquots einer 0,5  $\mu\text{M}$  ADH-Lösung wurden für 4 Stunden mit 0 bis 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Jodazetamid inkubiert und die enzymatische Aktivität der Aliquots wurde bestimmt. Die Aktivität der ADH ist als Funktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Jodazetamid-Konzentration aufgetragen. Da die Konzentration logarithmisch aufgetragen ist, kann die Kontrolle (Dosis = 0 mM), entsprechend 100 % Aktivität nicht dargestellt werden. Die Messergebnisse von drei unabhängigen Experimenten wurden ausgewertet.

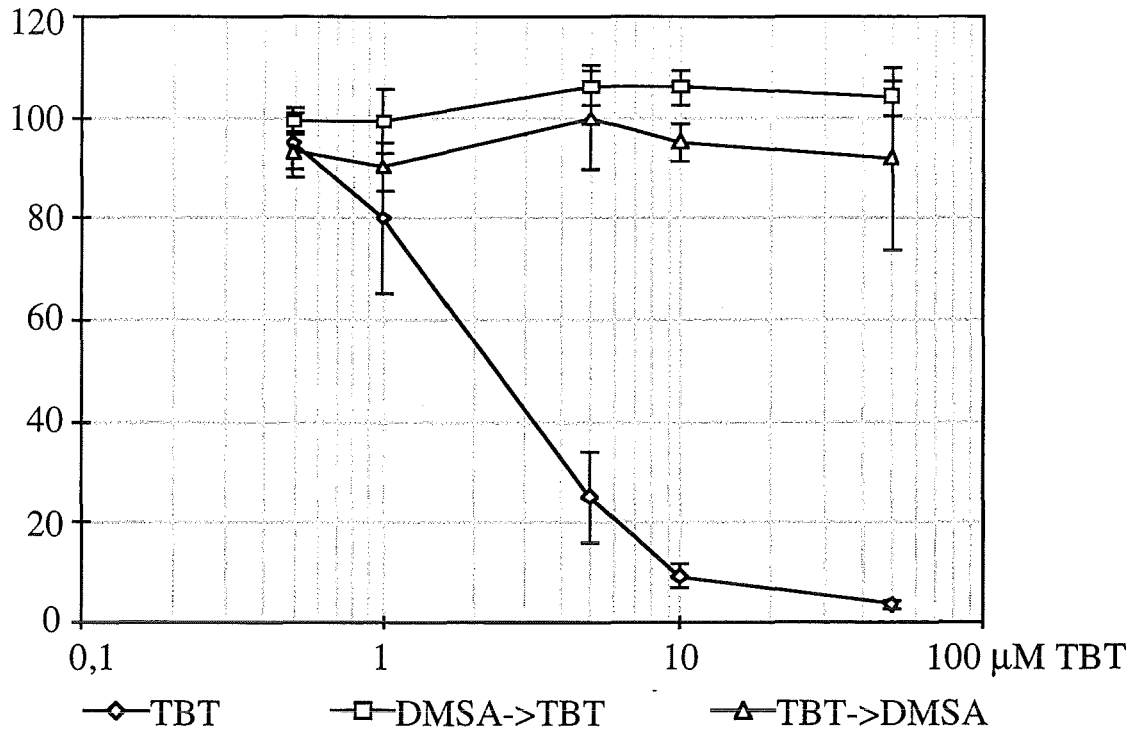
### TBT hemmt revertierbar die Alkohol-Dehydrogenase und reagiert mit Dithiolen

Um zu untersuchen, ob TBT ADH direkt hemmt, wurde eine 0,5  $\mu\text{M}$  ADH-Lösung mit verschiedenen TBT-Konzentrationen inkubiert und die Enzym-Aktivität bestimmt. Bereits 2  $\mu\text{M}$  TBT hemmte die ADH-Aktivität zu etwa 50 %. Durch die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  TBT war nur noch eine ADH-Restaktivität von etwa 7 % messbar (Abb. 18). Die TBT-induzierte ADH-Hemmung konnte nicht mit Mono-Thiolgruppen-Antioxidanzien, wie z.B. NAC, Glutathion oder  $\beta$ -Mercaptoethanol verhindert oder aufgehoben werden (ohne Abb.). Aber Antioxidanzien, bei denen zwei Thiol-Gruppen benachbart angeordnet sind, wie Dimercapto-Bernsteinsäure (DMSA) (Abb. 18a) oder Dithiothreitol (DTT) (Abb. 18b) konnten die ADH bei Vorbehandlung nicht nur effizient vor TBT schützen, sondern sogar bei Nachbehandlung die ADH-Aktivität wiederherstellen. Diese Dithio-Agenzien komplexieren TBT offensichtlich, denn die Mischung mit TBT führt sofort zu einem sichtbaren Niederschlag. Da DTNB ebenfalls ein Dithio-Reagenz ist und bei Vermischung mit TBT ausfällt, ist es nicht möglich, die Menge an Thiol-Gruppen an der ADH mit DTNB zu bestimmen. Diese Befunde lassen vermuten, daß TBT mit funktionellen Thiol-Gruppen der ADH in einer reversiblen Weise interagiert. Diese Ergebnisse lieferten Hinweise, daß TBT direkt oder indirekt PTPasen hemmen kann, konnten es aber nicht beweisen.

Soweit bekannt ist, besitzen PTPasen nur eine für die katalytische Aktivität obligatorische Thiolgruppe im enzymatischen Zentrum (Fischer *et al.*, 1991; Barford *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1994; Denu *et al.*, 1996). In jeder ADH-Untereinheit liegen dagegen die Thiol-Gruppen in zwei Zentren vor, die jeweils ein Zinkatom binden. Im katalytischen Zentrum wird das Zinkatom von den Cysteinen an den Positionen 46 und 174 mit Hilfe des Histidins an der Position 67 und des Serins an der Position 48 gebunden. Das zweite Zinkatom, das sich nicht im katalytischen Zentrum befindet, wird durch die Cysteine an den Positionen 97, 100, 103 und 111 gebunden (Eklund *et al.*, 1976). Es ist also denkbar, daß TBT mit jeweils einem Paar dieser Cysteine komplexiert und dadurch ADH inaktiviert.



a) % relative ADH-Aktivität



b) % relative ADH-Aktivität

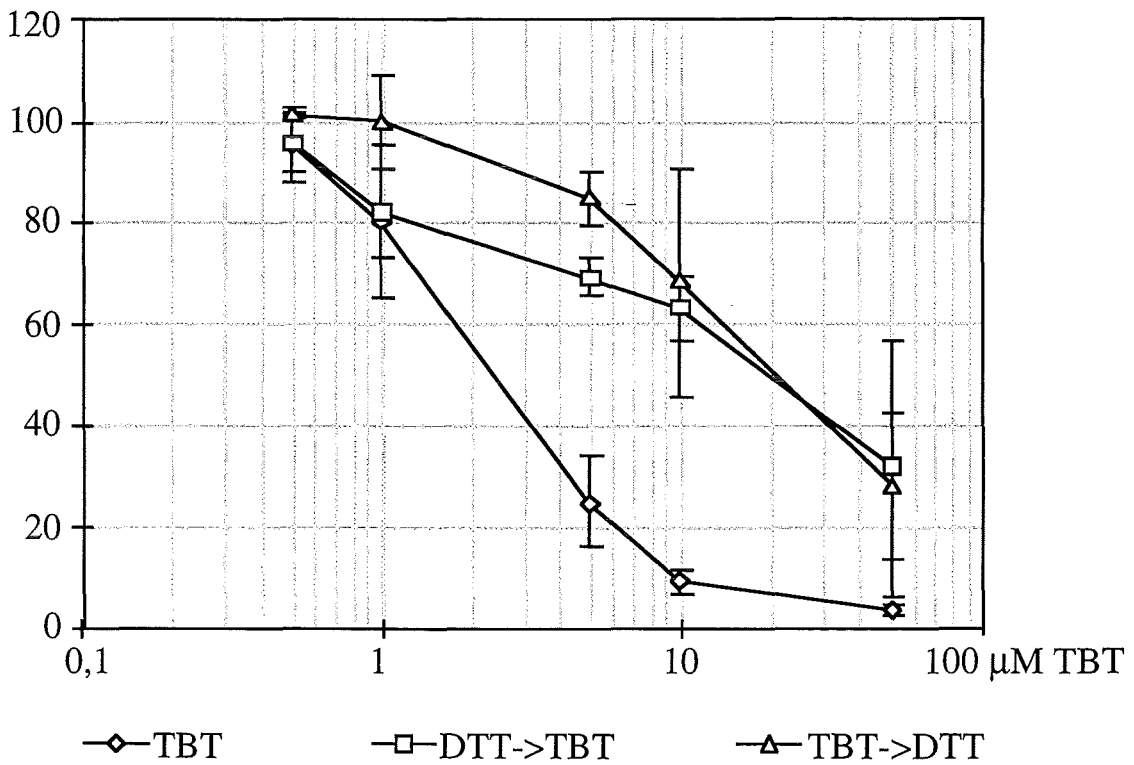


Abb. 18) TBT-induzierte Hemmung der ADH kann durch Behandlung mit Dimercapto-Bernsteinsäure oder Dithiothreitol verhindert und wieder aufgehoben werden.

- a) Eine  $0,5 \mu\text{M}$  ADH-Lösung wurde ohne (TBT) oder mit  $1 \text{ mM}$  DMSA (DMSA->TBT) für  $2 \text{ min}$  vorbehandelt und anschliessend mit  $0,5$  bis  $50 \mu\text{M}$  TBT behandelt. Die Aktivität der ADH wurde gemessen. Nach der Messung wurde die nicht DMSA-behandelten Aliquots mit  $1 \text{ mM}$  DMSA nachbehandelt und erneut gemessen (TBT->DMSA).
- b) Das Experiment wurde wie in a) durchgeführt außer, daß  $50 \mu\text{M}$  DTT anstatt DMSA verwendet wurden. Eine höhere DTT-Konzentration führte selbst zur Hemmung der ADH (ohne Abb.).

### UVB und UVC-Strahlung hemmt in sehr hohen Dosen die Enzymaktivität der ADH und führt zu einem leichten Verlust von Thiol-Gruppen

Die ADH-Experimente waren bedingt geeignet, um herauszufinden, ob die UV-induzierte Hemmung von Enzymen, die Thiolgruppen benötigen, durch direkte Absorption vermittelt wird, oder ob Intermediate beteiligt sein müssen. Nur die Wellenlängen der UV-Strahlung, die auch absorbiert werden, können zur Modifikation bzw. zur Inaktivierung von Enzymen führen. Um das Absorptions-Spektrum der ADH mit dem Inaktivierungs-Spektrum zu vergleichen, wurde von einer  $0,5 \mu\text{M}$  ADH-Lösung ein UV-Spektrum von  $240 \text{ nm}$  bis  $400 \text{ nm}$  gemessen:

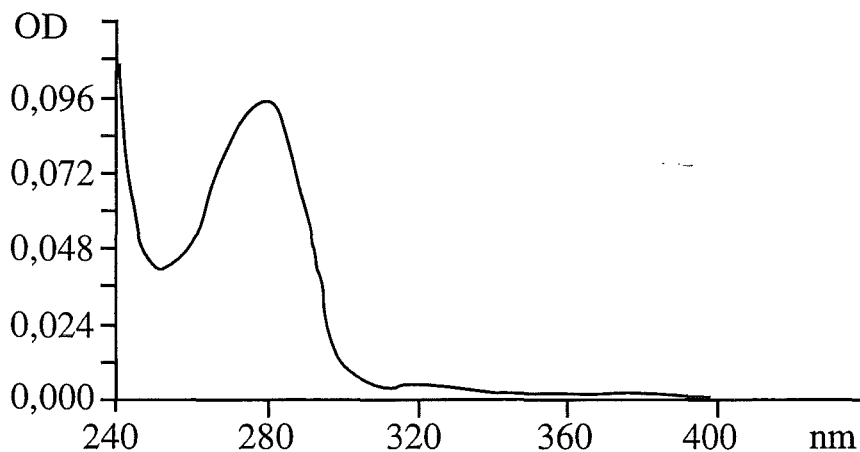


Abb. 19) UV-Absorptions-Spektrum der Hefe-Alkohol-Dehydrogenase ( $0,5 \mu\text{M}$ ). Aufgetragen ist die optische Dichte (OD) als Funktion der Wellenlänge in nm.

So wie die meisten Proteine, besitzt die ADH ein Absorptionsmaximum bei  $280 \text{ nm}$ .  $254 \text{ nm}$ -UVC-Strahlung wird etwa halb so stark absorbiert wie  $280 \text{ nm}$ -UVB-Strahlung. Wellenlängen, über  $300 \text{ nm}$ , werden erheblich

schlechter absorbiert. Der Vergleich dieses Absorptions-Spektrums mit den Emissions-Spektren der von mir benutzten UV-Lampen lässt vermuten, daß die Strahlung der UVC-Lampe am besten absorbiert wird. Die Strahlung der UVB-Lampe wird von ADH nur noch schwach absorbiert, da diese vor allem über 300 nm emittiert (siehe Material und Methoden). UVA-Strahlung wird ein bis zwei Größenordnungen schlechter absorbiert als UVB-Strahlung.

Aliquots der ADH-Lösung wurden mit verschiedenen UV-Dosen und Wellenlängen bestrahlt und deren Aktivität bestimmt (Abb. 20). Um zu messen, ob NAC die UV-Effekte beeinflusst, wurden zusätzlich ADH-Aliquots bestrahlt, die mit NAC vorbehandelt waren. Dazu wurde eine NAC-Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) gewählt, die das Absorptionsspektrum der ADH nicht beeinflusst. Wesentlich höhere NAC-Konzentrationen absorbieren die UV-Strahlung messbar und können daher als Sonnenschirm wirken und die chemischen Effekte überdecken. Die Thiol-Gruppen des NAC sind gegenüber den Thiol-Gruppen der ADH deutlich im Überschuß, denn 0,5  $\mu\text{M}$  ADH-Monomere entsprechen 3  $\mu\text{M}$  Thiol-Gruppen.

Wie erwartet, hemmte UVC die Aktivität der ADH im Vergleich zu UVB und UVA am effizientesten (Abb. 20 UVC). Die ADH war nach der Bestrahlung mit etwa 3  $\text{kJ}/\text{m}^2$  UVC zur Hälfte gehemmt. Eine 50 % Hemmung der ADH mit UVB wurde erst bei einer Dosis von 20  $\text{kJ}/\text{m}^2$  erreicht (Abb. 20 UVB). Die Vorbehandlung mit 100  $\mu\text{M}$  NAC konnte zwar die Hemmung etwas mildern, aber nicht verhindern (Abb. 20: NAC->UVC, NAC->UVB). Dies lässt vermuten, daß Thiolgruppen nicht die einzigen, durch die UV-Strahlung geschädigten Seitengruppen der ADH sind. UVA-Bestrahlung bis 40  $\text{kJ}/\text{m}^2$  führte zu keiner deutlichen Hemmung der Enzymaktivität. Dies korreliert mit der niedrigen UVA-Absorption (ohne Abb.).

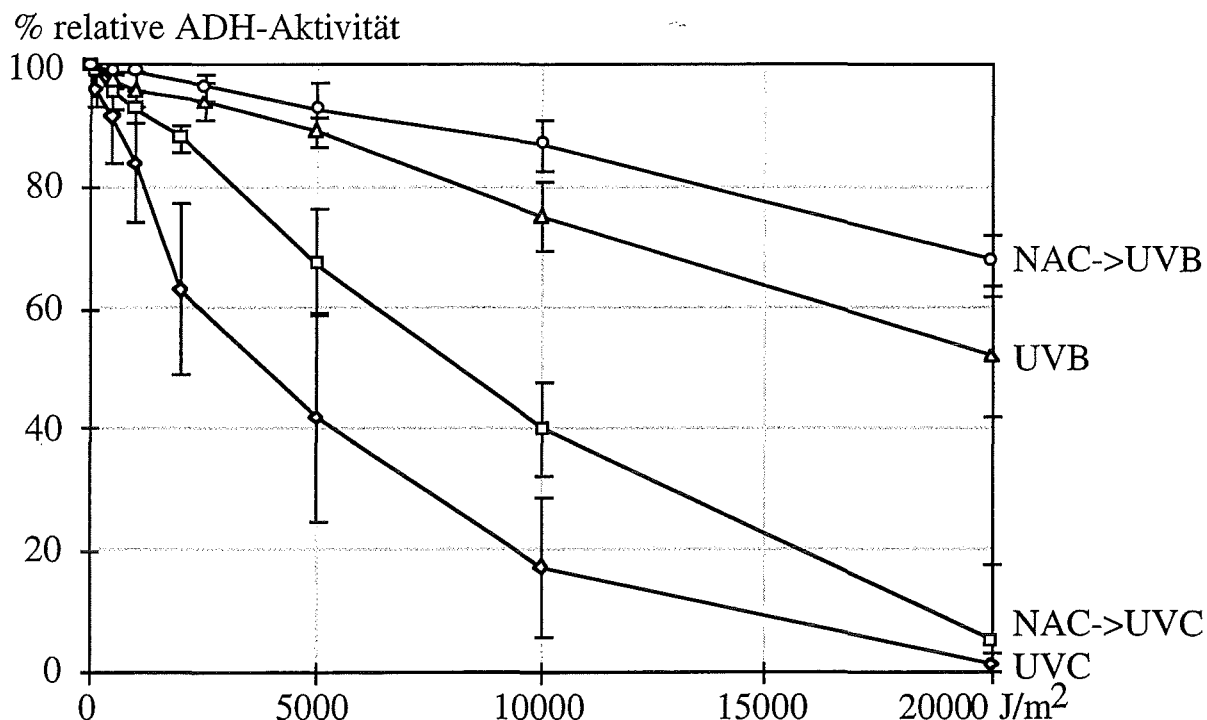


Abb. 20) N-Acetylcystein-Vorbehandlung von Alkohol-Dehydrogenase vermindert eine UVB- und UVC-induzierte Enzyminaktivierung. Eine 0,5  $\mu\text{M}$  Hefe-Alkoholdehydrogenase-Lösung in 50 mM Tris pH 8,8 wurde ohne oder mit 100  $\mu\text{M}$  NAC inkubiert und mit verschiedenen UVB- und UVC-Dosen von 100 bis 20000  $\text{J}/\text{m}^2$  bestrahlt, wie angezeigt. Die enzymatische Aktivität der ADH wurde bestimmt. Aufgetragen ist die relative Enzymaktivität (unbestrahlt = 100 %) als Funktion der UV-Dosis. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten wurden verwendet.

### Die $\text{H}_2\text{O}_2$ - oder Jodazetamid-Behandlung, sowie die UV-Bestrahlung von ADH führen zu einem Verlust von Thiolgruppen an der ADH

Um die Abnahme von Thiol-Gruppen zu bestimmen, wurden die ADH-Aliquots für 1 Stunde mit 1 mM DTNB inkubiert. Dieses Reagenz besitzt selbst zwei reaktive Thiol-Gruppen, die mit Cysteinresten reagieren können. Dabei steigt die Absorption von DTNB bei 412 nm ( $\text{OD}_{412}$ ) stark an. Die  $\text{OD}_{412}$  dient somit als Indikator für die relative Menge an Thiol-Gruppen.

Da DTNB selbst Thiol-Gruppen besitzt, musste gemessen werden, ob die Mischung von DTNB mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder mit Jodazetamid zu einer Änderung der  $\text{OD}_{412}$  führt. Die  $\text{OD}_{412}$  wurde jedoch nicht beeinträchtigt, wenn die DTNB-Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Jodazetamid behandelt worden war. Die Menge der Thiol-Gruppen in den ADH-Aliquots nahm, in Abhängigkeit von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw. Jodazetamid-Dosis, stark ab (Abb. 21). Jodazetamid modifizierte deutlich mehr Thiolgruppen als  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die DTNB-Absorption nach vierstündiger

Behandlung der ADH mit 10 mM Jodacetamid, wurde deshalb als Basalwert betrachtet. Jodacetamid lag in einem mindestens 500-fachen Überschuss gegenüber den ADH-Thiol-Gruppen vor und sollte deshalb alle Thiol-Gruppen alkyliert haben. Bei dieser Auswertungsmethode ergab sich, daß durch 120  $\mu\text{M}$  Jodacetamid die Hälfte der Thiol-Gruppen modifiziert worden sind. Dies stimmte sehr gut mit der Enzymhemmung ( $\text{IC}_{50} = 120 \mu\text{M}$ ) überein.  $\text{H}_2\text{O}_2$  dagegen, führte erst in einer Dosis von 250  $\mu\text{M}$  zu einem Verlust von 50 % der Thiol-Gruppen. Die  $\text{IC}_{50}$  lag aber schon bei 50  $\mu\text{M}$ . Dies lässt vermuten, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht alle Thiol-Gruppen oxidiert hat oder daß es durch andere Reaktionen weggefangen wurde.

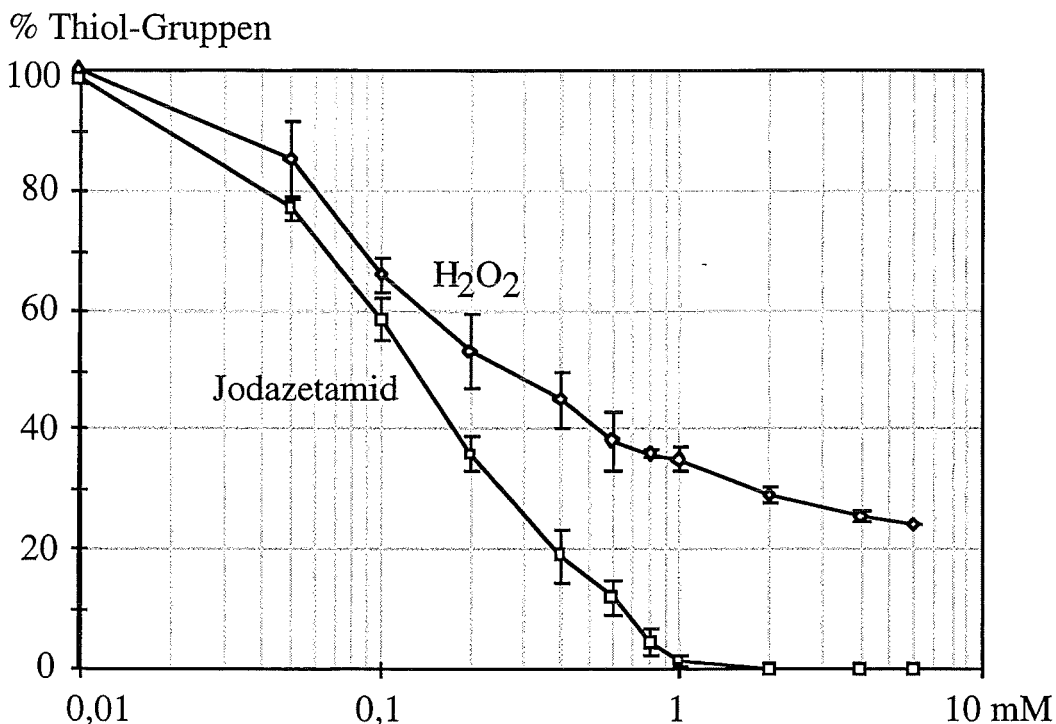


Abb. 21) Jodacetamid- oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung von ADH führt zu einem Verlust von Thiol-Gruppen. Von den ADH-Aliquots aus Abb. 17 wurden je 450  $\mu\text{l}$  abgenommen und mit 50  $\mu\text{l}$  einer 10 mM DTNB-Lösung versetzt und für 1 Stunde inkubiert. Die relative Menge an Thiol-Gruppen wurde bestimmt und als Funktion der Agens-Dosis aufgetragen. Es wurden die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten verrechnet.

Bei der Bestimmung der Thiol-Gruppen der UV-bestrahlten ADH wurde nur eine leichte, dosisabhängige Abnahme gefunden (Abb. 22). Im Falle der UVB-bestrahlten ADH konnte eine deutliche Abnahme von Thiol-Gruppen überhaupt erst bei Dosen über 5000  $\text{J}/\text{m}^2$  gemessen werden. Dies lässt vermuten, daß ein signifikanter Anteil der UV-induzierten Schädigung der ADH nicht durch

Thiol-Modifikation verursacht wird, sondern durch photochemische Reaktionen an anderen Aminosäure-Seitenresten.

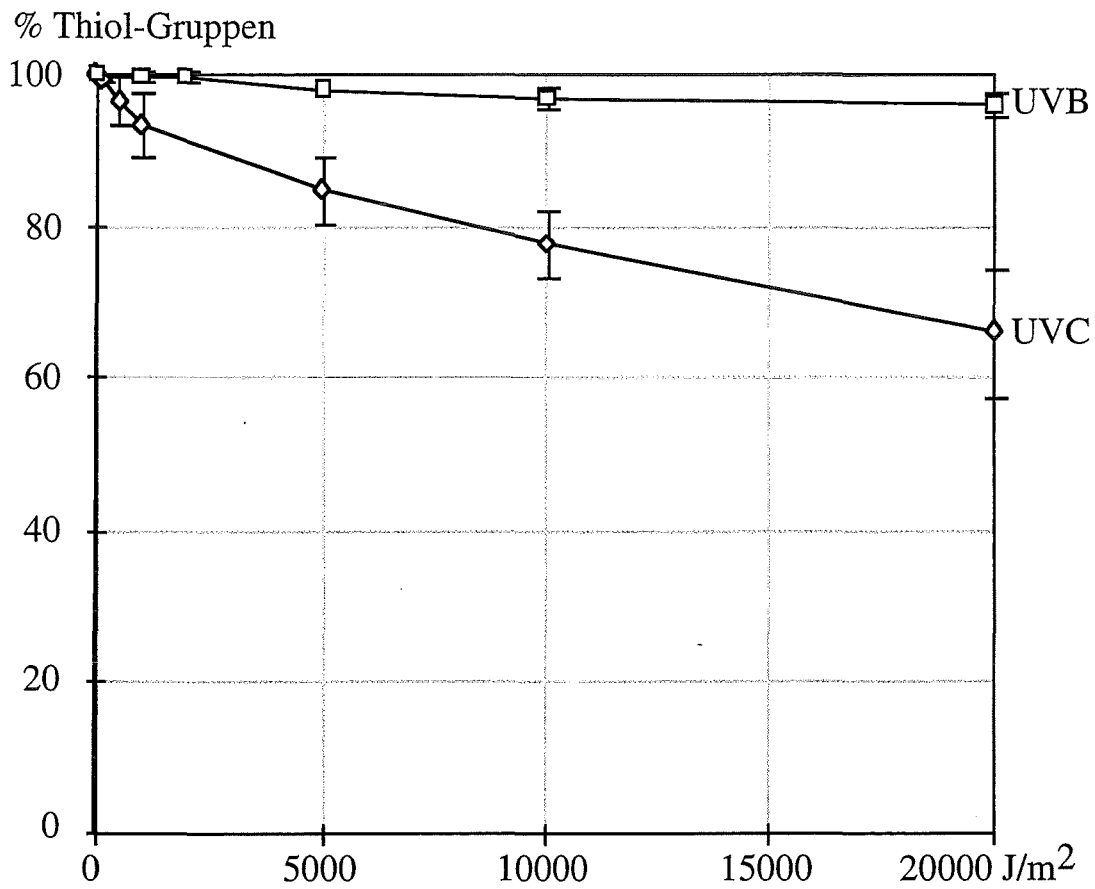


Abb. 22) UVC und UVB-Bestrahlung von ADH *in vitro* verursachen einen Verlust von Thiol-Gruppen am Protein. Aliquots der ADH aus Abb. 20 wurden mit DTNB inkubiert und die  $OD_{412}$  wurde bestimmt. Die relative Menge an Thiol-Gruppen wurde als Funktion der UV-Dosis aufgetragen. Es wurden die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten verrechnet.

Wenn man die ADH-Aktivität als Funktion der Thiol-Gruppen aufträgt, bekommt man eine Vorstellung davon, wie streng die Zerstörung von Thiolgruppen mit der ADH-Inaktivierung korreliert.

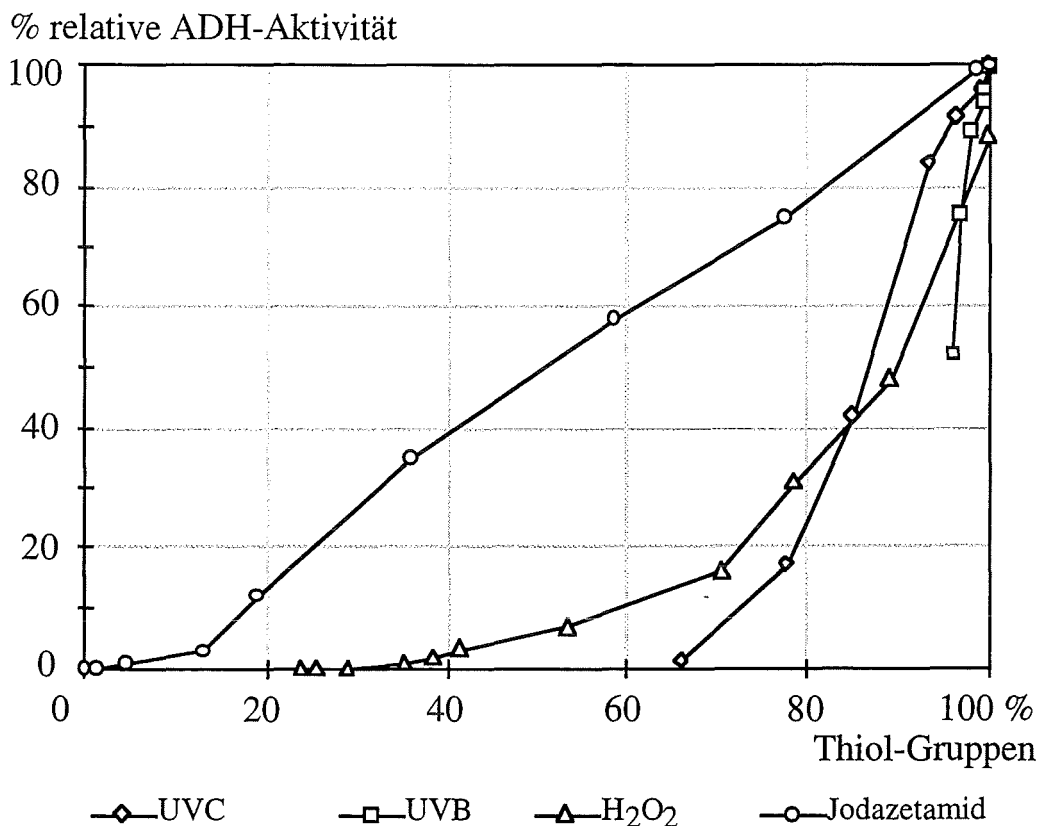


Abb. 23) Enzymatische Aktivität der ADH als Funktion der Thiol-Gruppen nach Inkubation mit UVC, UVB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Jodazetamid. Die ADH-Aktivitätswerte (Abb. 17 und Abb. 20) wurden gegen die relative Menge der Thiol-Gruppen (Abb. 21 und Abb. 22) aufgetragen. Die durch 4-stündige Inkubation mit 10 mM Jodazetamid erhaltene OD<sub>412</sub> wurde als Basalwert gesetzt, weil nicht reagiertes DTNB bereits eine basale, signifikante OD<sub>412</sub> nm aufweist.

Die durch Jodazetamid verursachte Inaktivierung der ADH kann durch die Modifikation von Thiol-Gruppen vollständig erklärt werden, während die ADH-Aktivität nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung komplett gehemmt ist, schon bevor alle Thiol-Gruppen modifiziert sind. Dies deutet darauf hin, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> noch andere funktionelle Gruppen schädigt, die für die Enzymaktivität wichtig sind. UVC-Strahlung scheint präferenziell solche funktionellen Gruppen zu schädigen, da die ADH schon vollständig gehemmt ist, obwohl nur 35 % der Thiol-Gruppen für DTNB unzugänglich sind. Es ist bekannt, daß aromatische Aminosäuren, wie Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin UVC-Strahlung absorbieren und dadurch photochemische Reaktion der Aminosäuren ausgelöst werden (Sober,

1973). Dies stört vermutlich die Struktur und Funktion der ADH. Für diese Hypothese spricht auch, daß NAC-Vorbehandlung nicht vollständig gegen UVC-Strahlung schützt.

Diese Befunde zeigen, daß nur die von ADH absorbierte UV-Strahlung diese auch schädigt und daß oxidative Zwischenprodukte in einer Proteinlösung an der UV-induzierten Enzymhemmung beteiligt, aber nicht die einzigen Faktoren für Enzymhemmung sind. Desweiteren lassen die Ergebnisse es unwahrscheinlich erscheinen, daß direkte Absorption von UVA- oder UVB-Strahlung durch Proteine zur Aktivierung von Signalketten in Zellkultur beitragen, da sehr hohe Dosen eingestrahlt werden müssen, um effiziente Hemmung von Enzymen in einer Proteinlösung zu erhalten. Außerdem unterscheidet sich die Wellenlängen-Abhängigkeit der ADH-Hemmung *in vitro* deutlich von der UV-induzierten EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierungs-Hemmung (Abb. 2a und 20). UVA wird von den meisten Proteinen nicht absorbiert, aber führt zu einer effizienten Tyrosin-Phosphorylierung am EGF-Rezeptor. Dies lässt vermuten, daß andere Komponenten der Zelle diese Strahlung absorbieren und dabei ROI's gebildet werden, die an Thiolgruppen angreifen.



## Diskussion

Säugetier-Zellen reagieren auf chemischen oder physikalischen Stress mit der Aktivierung von genetischen Programmen, die eine Anpassung an die ungünstigen Bedingungen erleichtern sollen. Reguliert werden diese Programme durch Transkriptionsfaktoren, die am Ende von Signaltransduktionswegen stehen, welche ursprünglich als Vermittler von Wachstumsfaktor-Stimulation identifiziert wurden. Die Rezeptoren, die diese Signaltransduktionswege, sowohl durch Liganden-Bindung als auch durch diverse Formen von zellulärem Stress, aktivieren, gehören zur Überfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. In der vorliegenden Arbeit wird am Beispiel des EGF-Rezeptors ein Mechanismus der Stress-induzierten Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen identifiziert und untersucht.

### Zellulärer Stress induziert Rezeptor-Phosphorylierung

Säugetierzellen, die chemischem oder physikalischem Stress ausgesetzt werden, reagieren innerhalb von Sekunden mit einer Steigerung der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung. Sowohl die Substrate von zytosolischen Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) als auch von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) werden in gestressten Zellen verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert.

Besonders viele, unterschiedliche Stress-Faktoren modulieren die Aktivität der Src-PTK-Familie. Die Aktivierung von Mitgliedern der Src-Familie bzw. ihre Beteiligung an Signaltransduktionswegen wurde z.B. nach Stimulation von Zellen mit Oxidanzien (Lander *et al.*, 1992), Orthovanadat (Kmiezik *et al.*, 1988), Quecksilberchlorid (Lander *et al.*, 1992), UV-Strahlung (Devary *et al.*, 1992), ionisierender Strahlung (Uckun *et al.*, 1993), Hypo-Osmotischem Schock (Tilly *et al.*, 1993) und Hypoxia (Koong *et al.*, 1994) festgestellt. Src steht nicht am Beginn von Signaltransduktionswegen, sondern wird durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes in der katalytischen Domäne und durch Dephosphorylierung eines C-terminalen Tyrosinrestes positiv reguliert. Außerdem binden andere regulatorische Proteine an die SH2- und die SH3-Domäne des Src (Brown und Cooper, 1996). Es ist daher möglich, daß Src in gestressten Zellen als Folge der Anschaltung verschiedener Signaltransduktionswege über unterschiedliche Mechanismen aktiviert wird. Daher war es zum Beginn der vorliegenden Arbeit nicht sinnvoll, die

Mechanismen der Stress-aktivierten PTK-Aktivierung an Hand von Src zu untersuchen.

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) stehen im Unterschied zu Src am Anfang von Signaltransduktionswegen und werden durch Ligandenbindung und anschließende Phosphorylierung an Tyrosinen aktiviert. Das Spektrum der Stress-Faktoren, die zu einer Verstärkung der Tyrosin-Phosphorylierung an RTK führen, ist dem der Src-Aktivierung ähnlich, aber nicht identisch. So gibt es bis jetzt keine Hinweise darauf, daß ionisierende Strahlung, Hypoxia und Hypo-Osmotischer Schock zur gesteigerten Tyrosin-Phosphorylierung von RTK führen. Folgende Stress-Faktoren, die RTK-Phosphorylierung verursachen, sind identifiziert worden:

| Rezeptoren<br>Induktoren | EGF-Rezeptor,<br>ErbB2         | PDGF-Rezeptor | Insulin-Rezeptor,<br>IGF-Rezeptor |
|--------------------------|--------------------------------|---------------|-----------------------------------|
| Oxidanzien               | 5, 7, 8, 9, 13                 | 4, 7          | 3                                 |
| Pervanadat               |                                |               | 3, 6                              |
| Thiol-Alkylanzien        | 1, 7                           | 7             | 1                                 |
| Tributylzinn             | 7                              |               |                                   |
| UV-Strahlung             | 2, 7, 8, 10,<br>11, 12, 14, 15 | 7, 11         | 2                                 |

IGF-Rezeptor = Insulin-ähnlicher-Wachstums-Faktor-Rezeptor

- |   |  |
|---|--|
| 1) Clark und Konstantopoulos, 1993;           | 9) Rao <i>et al.</i> , 1996            |
| 2) Coffey <i>et al.</i> , 1995;               | 10) Sachsenmaier <i>et al.</i> , 1994; |
| 3) Heffetz <i>et al.</i> , 1989; 1990;        | 11) Sachsenmaier, 1994;                |
| 4) Gonzales-Rubio <i>et al.</i> , 1996;       | 12) Schieven <i>et al.</i> , 1994;     |
| 5) Gamou und Shimizu; 1995;                   | 13) Sullivan <i>et al.</i> , 1994      |
| 6) Kadota <i>et al.</i> , 1987;               | 14) Warmuth <i>et al.</i> , 1994;      |
| 7) Knebel <i>et al.</i> , 1996; diese Arbeit; | 15) Zheng <i>et al.</i> , 1993;        |
| 8) Miller <i>et al.</i> , 1994;               |  |

Einige der Stress-Faktoren, wie UV-Strahlung, ionisierende Strahlung,  $H_2O_2$  und Tributylzinn, sind genotoxisch, andere, wie Pervanadat, Thiol-Alkylanzien, Hypo-Osmotischer Schock oder Hypoxia verursachen keine DNA-Schäden.

Eine andere Gruppe von genotoxischen Stress-Faktoren, die DNA-alkylierenden Agenzien N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) und Methyl-Methan-Sulfonat (MMS) moduliert nicht die Aktivität von RTK (eigene unveröffentlichte Beobachtung). Auch für eine Aktivierung von Src durch MMS und MNNG gibt es bisher keine Hinweise.

### Hemmung der Dephosphorylierung

Die Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung könnte durch zwei unterschiedliche Mechanismen verursacht werden.

1. Die Stress-Faktoren könnten die Aktivität der Tyrosin-Kinasen steigern.
2. Die Dephosphorylierung der Rezeptoren könnte gehemmt werden.

Die untersuchten Stress-Faktoren könnten mit den Rezeptoren in einer Weise interagieren, die eine Stabilisierung von spontan entstehenden Rezeptor-Dimeren oder eine aktivierende Rezeptor-Konformations-Änderung, die der durch Liganden-Bindung erzeugten ähnlich ist, induziert. Man könnte sich auch vorstellen, daß die Wechselwirkung der Rezeptoren mit Liganden, die in geringen Mengen vorliegen könnten, von den Stress-Faktoren verbessert wird. Es ist aber eher unwahrscheinlich, daß schädigende Stress-Faktoren mit fünf verschiedenen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder deren Liganden in einer ähnlichen, positiven und aktivierenden Weise interagieren. Gegen eine direkte Rezeptor-Aktivierung spricht, daß bei isolierten Membranen von A431-Zellen, die mit ATP und  $MgCl_2$  supplementiert waren und mit UV bestrahlt worden waren, keine Steigerung der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (ohne Abb.). Gegen eine Beteiligung von Liganden an der Stress-induzierten Rezeptor-Phosphorylierung spricht, daß die Tyrosin-Phosphorylierung einer Mutante des EGF-Rezeptors, bei der u.a. die Ligandenbinde-Domäne fehlt, durch  $H_2O_2$ -Behandlung oder UV-Bestrahlung induziert werden konnte (Abb. 2c)

Alle Stress-Faktoren, die zur Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung führen, haben gleichzeitig die Eigenschaft die Dephosphorylierung der Rezeptoren zu hemmen.

So hemmen Pervanadat oder  $H_2O_2$ , die in Fa0-Zellen ein ähnliches Tyrosin-Phosphorylierungs-Muster wie Insulin erzeugen, die Gesamt-PTPase-Aktivität in diesen Zellen (Heffetz *et al.*, 1989; 1990).  $H_2O_2$  induziert auch EGF-Rezeptor-Phosphorylierung (Sullivan *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1996; diese Arbeit: Abb. 2b, 3, 4 und 5) und hemmt gleichzeitig die Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors (Sullivan *et al.*, 1994; diese Arbeit: Abb. 8a, 8b). Die durch UVA-, UVB- und UVC-Strahlung induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung (Zheng *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Sachsenmaier *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; diese Arbeit: Abb. 2a, 2b, 3, 4 und 5) wird ebenfalls von einer UV-induzierten Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung begleitet (Abb. 8a und 8b). UVA, UVB und UVC verursachen auch eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung des PDGF-Rezeptors (Abb. 6a) und hemmen gleichzeitig dessen Dephosphorylierung (Abb. 8c). Die Thiol-alkylierenden Substanzen N-Ethylmaleimid und Jodazetamid induzieren die Tyrosin-Phosphorylierung des Insulin-Rezeptors, des EGF-Rezeptors und des PDGF-Rezeptors (Clark und Konstantopoulos, 1993; diese Arbeit: Abb. 4c und 6b). Für Jodazetamid wurde gefunden, daß es die EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung sehr effizient verzögert (Abb. 8a). Auch ein Vertreter der Organometalle, Tributylzinn induziert EGF-Rezeptor-Phosphorylierung und hemmt die Dephosphorylierung effizient (Abb. 13). Die Eigenschaft der Stress-Faktoren, Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung auszulösen, korreliert also in jedem untersuchten Fall mit ihrer Fähigkeit, die Rezeptor-Dephosphorylierung zu hemmen.

Außerdem wurde gefunden, daß Antioxidans-Behandlung nicht nur die UV-,  $H_2O_2$ - und Jodazetamid-induzierte EGF-Rezeptor-Phosphorylierung deutlich verminderte (Abb. 4 und 6), sondern auch die Hemmung der Rezeptor-Dephosphorylierung.

Diese Befunde lassen vermuten, daß die Dephosphorylierungs-Hemmung ein Grund für die Steigerung der Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung ist.

Vorraussetzung für die, durch Dephosphorylierungs-Hemmung verursachte, Akkumulation von Tyrosin-Phosphorylierung, ist eine konstitutiv hohe Basalaktivität der Rezeptoren. Eine konstitutiv hohe Basalaktivität könnte durch die ständige Bewegung der Rezeptoren in der Membran zustande kommen. Dadurch könnten transient Rezeptor-Dimere gebildet werden, die zu der basalen Tyrosin-Phosphorylierung führen. Die Behandlung von Rat-1-HER Zellen mit dem Protein-"Crosslinker" 1-Ethyl-3-(3-Di-Methylamino-Propyl)-Carbo-Diimid (EDAC) erzeugt in wenigen Minuten eine starke Induktion der

EGF-Rezeptor-Phosphorylierung (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Dies könnte darauf beruhen, daß kurzlebige Rezeptor-Dimere stabilisiert werden und sich verstärkt gegenseitig phosphorylieren.

Die Mechanismen der Liganden-induzierten und der Stress-Faktor-induzierten Rezeptor-Phosphorylierung sind verschieden, denn die Dephosphorylierungsgeschwindigkeit des EGF-Rezeptors und des PDGF-Rezeptors mit gebundenem Liganden ist wesentlich höher als in gestressten Zellen, obwohl die Liganden erheblich effizienter Rezeptor-Phosphorylierung auslösen (Böhmer *et al.*, 1995; diese Arbeit Abb. 2a, 6 und 8). Also wird die Liganden-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung nicht durch Dephosphorylierungshemmung verursacht.

Diese Schlußfolgerung wird allerdings durch kürzlich veröffentlichte Befunde in Frage gestellt. Die Behandlung von Zellen mit PDGF führt zu einem PDGF-Rezeptor-abhängigen Anstieg der intrazellulären  $H_2O_2$ -Konzentration. Sowohl dieser Anstieg der  $H_2O_2$ -Konzentration als auch PDGF-induzierte Zunahme an Tyrosin-Phosphorylierung und Erk-1,2-Aktivierung konnte durch Überexpression von Katalase, die  $H_2O_2$  vernichtet oder durch die Behandlung mit NAC verhindert werden (Sundaresan *et al.*, 1995). Die Autoren folgern, daß die PDGF-induzierte Produktion von  $H_2O_2$  zu einer lokalen Hemmung der PTPasen führt und dadurch die PDGF-Rezeptor-Phosphorylierung zunimmt. Der Befund aus der vorliegenden Arbeit, daß UV-Strahlung die Dephosphorylierung des PDGF-Rezeptors hemmt, obwohl die Zellen vorher mit PDGF behandelt worden waren (Abb. 8c), deutet darauf hin, daß die Dephosphorylierung durch UV-Strahlung stärker gehemmt wird als durch PDGF-Behandlung induziertes  $H_2O_2$ .

### Stress hemmt PTPasen

Die Dephosphorylierung-Experimente mit PTPasen konnten nicht klären, ob die Verzögerung der Dephosphorylierung durch eine PTPase-Hemmung oder durch eine Konformationsänderung an den Rezeptoren, durch die die Zugänglichkeit der Tyrosinphosphate für PTPasen vermindert ist, verursacht wurde. Um dies zu überprüfen, mußte die PTPase unabhängig vom EGF-Rezeptor mit UV bestrahlt werden. Es hat sich herausgestellt, daß die in dieser Arbeit benutzte Methode der Membran-Präparation nicht ausreichte, um die PTPase vom EGF-Rezeptor zu trennen, da der EGF-Rezeptor unter den gewählten Bedingungen (5 mM NAC, 37°C) immer noch, innerhalb weniger

Minuten dephosphoryliert wurde (Abb. 10 und 11). Es war nicht möglich zu überprüfen, ob die Dephosphorylierung in der Membranpräparation durch die gleichen PTPasen katalysiert wird, die in intakten Zellen Rezeptor-spezifisch sind, da diese noch nicht identifiziert sind. Mit Hilfe eines „Membran-Mix-Experimentes“ gelang es aber zu zeigen, daß die membranständige Phosphatase-Aktivität durch UV-Bestrahlung sehr effizient gehemmt wird (Abb. 12). Dies liefert eine hinreichende Erklärung für die *in vivo* beobachtete Dephosphorylierungs-Hemmung.

Da PTPase-Hemmung zu einer schnellen Steigerung der Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung führt, werden die Rezeptoren offenbar sehr stringent durch PTPasen reguliert. Diese PTPasen sollten an der Plasma-Membran in enger Nachbarschaft mit den Rezeptoren lokalisiert sein, damit sie die basale Aktivität der Rezeptoren regulieren können. Die Frage ist nun, welche PTPasen natürlicherweise die Aktivität der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen regulieren und durch Stress-Faktoren gehemmt werden. Der EGF-Rezeptor wurde diesbezüglich am besten untersucht. Zur Zeit sind etwa 50 PTPasen kloniert, von denen drei mit dem EGF-Rezeptor wechselwirken (zusammengefasst in Streuli, 1996). Die SH-PTP1 und die PTP-1B können den EGF-Rezeptor nach Überexpression dephosphorylieren. Die SH-PTP2 bindet zwar an den EGF-Rezeptor, dephosphoryliert ihn aber nicht, sondern spielt eine positiv regulierende Rolle bei der Rezeptor-induzierten Signaltransduktion.

SH-PTP1, die auch PTP1C, HCP oder SHP heißt, wird im wesentlichen in Zellen hemopoetischen Ursprungs aber auch in A431-Zellen exprimiert (Tomik *et al.*, 1995; Streuli, 1996). SH-PTP1 besitzt zwei SH2-Domänen mit denen sie an Protein-Tyrosinphosphate binden kann. SH-PTP1 ist in B-Zellen mit dem B-Zell-Rezeptor-Komplex assoziiert und hat negativ regulierende Funktion bei der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors (Streuli, 1996).

Die EGF-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung eines, in 293-Fibroblasten transfizierten EGF-Rezeptors, war deutlich verringert, wenn die Zellen zusätzlich mit einem Plasmid transfiziert waren, das für die SH-PTP1 kodiert (Tomik *et al.*, 1995). SH-PTP1 kann mittels SH2-Domänen an den tyrosinphosphorylierten EGF-Rezeptor binden. Die Autoren schliessen, daß die SH-PTP1 eine Rolle bei der physiologischen Dephosphorylierung und der Regulation der Aktivität des EGF-Rezeptors spielen könnte.

SH-PTP1 ist nicht EGF-Rezeptor-spezifisch, sondern hat eine ganze Reihe von Substraten, die in der Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors, des IL-3-

Rezeptors, der c-Kit-Tyrosin-Kinase, der Tyk-2-Tyrosin-Kinase und des Erythropoetin-Rezeptors eine Rolle spielen (DeFranco und Law, 1995; Streuli, 1996). Da die SH-PTP1 im wesentlichen in hemapoetischen Zellen exprimiert wird, kann sie in vielen anderen Zelllinien nicht die PTPase sein, die für die EGF-Rezeptor-Regulation verantwortlich ist.

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase-1B (PTP-1B) ist ein weiterer Kandidat für eine Rezeptor-regulierende PTPase. Auch die PTP-1B ist nicht substratspezifisch (Fischer *et al.*, 1991). Die Überexpression von (PTP-1B) erniedrigt die basale und die Liganden-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors, des  $\alpha$ PDGF- und  $\beta$ PDGF-Rezeptors, aber auch des Insulin-Rezeptors und des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptors (IGF-R) (Lammers *et al.*, 1993). Diese Befunde sind etwas schwierig zu verstehen, weil die Rezeptoren plasmamembranständig sind, aber die PTP-1B mit einer C-terminalen Aminosäure-Sequenz in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist (Frangioni *et al.*, 1992). Die PTP1B kann daher nicht die EGF-Rezeptor-spezifische PTPase sein, deren Hemmung zur Stress-induzierten Akkumulation von Tyrosinphosphat führt.

Noch nicht veröffentlicht ist, daß auch die Überexpression der PTP $\sigma$  die EGF-induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung vermindert (F. Böhmer, pers. Mitteilung). Es sind also einige PTPasen bekannt, die den EGF-Rezeptor dephosphorylieren können. Dennoch fehlt der Beweis, daß eine dieser PTPasen für die natürliche Regulation des EGF-Rezeptors verantwortlich und damit das Ziel der hier untersuchten Steß-Faktoren ist.

Eine strukturell mit der SH-PTP1 verwandte PTPase, die ebenfalls zwei SH2-Domänen besitzt, aber in vielen Zelllinien exprimiert wird, reguliert im Unterschied zu den bisher genannten Phosphatasen als notwendiger Signalvermittler die Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Die Überexpression von SH-PTP2 führt nicht zu einer Erniedrigung der EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung. Mehrere Arbeitsgruppen haben gefunden, daß die SH-PTP2 für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase-abhängige Stimulation von Ras bedeutsam ist. Dabei spielt die SH-PTP2 eine Rolle als Adaptor, indem sie mittels ihrer SH2 Domäne an den tyrosinphosphorylierten PDGF-Rezeptor (Feng *et al.*, 1993; Bennett *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994; Roche *et al.*, 1996), den EGF-Rezeptor (Feng *et al.*, 1993; Lechleider *et al.*, 1993; Milarski *et al.*, 1993; Vogel *et al.*, 1993; Tomic *et al.*, 1995; Bennett *et al.*, 1996) oder das Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (Kuhne *et al.*, 1993; Milarski und Saltiel, 1994; Noguchi *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1994) bindet, selbst

tyrosinphosphoryliert und aktiviert wird und als Bindestelle für Grb2-Sos-Komplexe fungiert. Offensichtlich ist die Phosphatase-Aktivität der SH-PTP2 für die Rezeptor-Signaltransduktion entscheidend, denn eine katalytisch inaktive Mutante inhibiert die Insulin-induzierte Aktivierung der Erk-1,2 und den Insulin-induzierten Thymidin-Einbau (Milarski und Saltiel, 1994). Eine katalytisch inaktive Mutante hemmt auch die EGF-induzierte Erk-1,2- und Elk-1-Aktivierung sowie das EGF-induzierte Eintreten der Zellen in die S-Phase (Bennett *et al.*, 1996). Auch mikroinjizierte  $\alpha$ SH-PTP2-Antikörper hemmen PDGF-induzierte c-fos-Gen-Expression und die EGF-, Insulin- und IGF-induzierte DNA-Synthese (Xiao *et al.*, 1994; Roche *et al.*, 1996).

Wenn SH-PTP2 in UV-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, TBT- oder Jodazetamid-behandelten Zellen gehemmt werden würde, sollten die Signale der Rezeptoren nicht oder nur geschwächt weitergeleitet werden können. Offenbar wird SH-PTP2 nicht oder nur zum Teil durch die hier untersuchten Stress-Faktoren inhibiert, denn sie induzieren sowohl Erk-1,2-Aktivierung als auch c-fos-Gen-Expression. Der einzige Stress-Faktor, der EGF-Rezeptor-Phosphorylierung verursacht, aber keine Erk-1,2-Aktivierung oder c-fos-Gen-Expression induziert, ist UVA (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Es ist noch nicht untersucht, ob sich die UVA-induzierte Phosphorylierung am EGF-Rezeptor von der, durch die anderen Stress-Faktoren- oder EGF-induzierten unterscheidet und dadurch nicht aktivierend ist, oder ob UVA als einziger Stress-Faktor die SH-PTP2 hemmt.

Der Befund, daß Thiol-modifizierende Stress-Faktoren das katalytische Zentrum von PTPasen angreifen, lässt vermuten, daß nicht nur Rezeptor-spezifische PTPasen gehemmt werden. Trotzdem muß es, wie schon das Beispiel SH-PTP2 zeigt, eine gewisse Spezifität geben. Erk-1,2 und JNK/SAPK werden in UV-bestrahlten Zellen transient, d.h. für etwa eine Stunde, an Tyrosinen phosphoryliert und aktiviert und anschliessend wieder dephosphoryliert (Radler-Pohl *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995; Cavigelli *et al.*, 1996; Price *et al.*, 1996). Das bedeutet, daß die PTPasen, die für diese Mapkinasen spezifisch sind, durch UV-Strahlung nicht oder uneffizient gehemmt werden. Behandelt man UV-bestrahlte Zellen zusätzlich mit der Substanz Arsenit, die selbst auch JNK/SAPK-Aktivierung verursacht, dann bleibt die Aktivität der JNK/SAPK für mindestens vier Stunden erhalten. Außerdem verhinderte die Zugabe von Arsenit zu einem Zellextrakt, daß dieser die gereinigte JNK/SAPK inaktivierte (Cavigelli *et al.*, 1996). Diese



Befunde lassen vermuten, daß Arsenit im Unterschied zu UV-Strahlung ein effizienter Inhibitor für eine PTPase ist, die JNK/SAPK dephosphoryliert.

### Mechanismus der Stress-induzierten PTPase-Hemmung

Um den Mechanismus der Stress-induzierten PTPase-Hemmung zu verstehen, muß man wissen, welche Moleküle mit den Stress-Faktoren wechselwirken oder von ihnen modifiziert werden. Alle, in dieser Arbeit untersuchten Stress-Faktoren wurden durch Anti-Oxidanzien in ihrer Fähigkeit, Rezeptor-Phosphorylierung auszulösen, gehemmt. Die verwendeten Anti-Oxidanzien L-Cystein, NAC, GSH,  $\beta$ -Mercaptoethanol, DTT und DMSA besitzen Thiol-Gruppen, die leicht oxidierbar sind. Sie konnten nicht nur die induzierte Rezeptor-Phosphorylierung hemmen (Abb. 4 und 6) und die Hemmung der Dephosphorylierung verhindern, sondern auch die durch alle untersuchten Stress-Faktoren verursachte Inaktivierung der Hefe-Alkohol-Dehydrogenase *in vitro* hemmen oder vollständig verhindern. Alkohol-Dehydrogenase benötigt für die Katalyse mehrere Thiolgruppen und wird deswegen durch Thiol-Alkylanzien, wie Jodazetamid effizient gehemmt. Thiol-Gruppen spielen also bei dem Wirkmechanismus der Stress-Faktoren eine kritische Rolle.

Cystein-Seitenreste, die Thiol-Gruppen tragen, sind am katalytischen Mechanismus von vielen verschiedenen Enzymen beteiligt (Friedman, 1973). Auch Protein-Tyrosin-Phosphatasen tragen in ihrem katalytischen Zentrum ein konserviertes Cystein mit einer Thiolgruppe, die für die Katalyse notwendig ist. PTPasen benötigen die Thiol-Gruppe, um mit dem Tyrosinphosphat eine Phosphothioester-Bindung aufzubauen (Guan und Dixon, 1991; Fischer *et al.*, 1991). Diese Bindung destabilisiert die Phosphatesterbindung zum Tyrosin und ermöglicht die Dephosphorylierung des Substrats. Der Austausch dieses Cysteins gegen eine andere Aminosäure inaktiviert die PTPase und führt zu einer dominant-negativen Form des Enzyms (Bennett *et al.*, 1996). Diese Thiol-Gruppe von PTPasen könnte ein offensichtliches Ziel von Stress-Faktoren sein. Während die Oxidation durch  $H_2O_2$  und  $KMnO_4$ , sowie die Alkylierung durch Jodazetamid, offensichtliche Modifikationen der Thiol-Gruppen sind, ist es unklar, welche Modifikationen durch UV-Strahlung oder Tributylzinn verursacht werden.

Die Alkohol-Dehydrogenase (ADH) benötigt, wie die PTPasen, Thiol-Gruppen für ihre katalytische Aktivität (Rabin und Whitehead, 1962; Eklund, 1976), so daß, unter gewissen Vorbehalten, mechanistische Schlussfolgerungen aus dem

Vergleich der PTPase-Hemmung in Zellen und der ADH-Hemmung *in vitro* gezogen werden konnten. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Jodazetamid hemmten die ADH-Aktivität *in vitro* effizient (Abb. 17) und zerstörten in gleichem Maße die Thiol-Gruppen der ADH (Abb. 21 und 23). Dies impliziert, daß diese Agenzien auch die Thiol-Gruppen von PTPasen in Zellen direkt modifizieren können.

Besonders UVA-Strahlung und UVB-Strahlung > 300 nm wird von ADH nicht absorbiert (Abb. 19), führt also nicht durch direkte Absorption zur Enzym-Hemmung, sondern über einen indirekten Mechanismus. Die UVC-induzierte ADH-Hemmung konnte mit NAC nur zum Teil verhindert werden (Abb. 20), und der UV-induzierte Verlust an Thiol-Gruppen erklärt die Inaktivierung nicht vollständig (Abb. 22 und 23). Wenn noch 70 % der Thiolgruppen unmodifiziert sind, ist die ADH-Aktivität schon auf 2 % des Kontrollwertes gehemmt (Abb. 20, 21 und 23). UV-Absorption durch andere Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) (Sober *et al.*, 1973) scheint zur Inaktivierung beizutragen.

Der unvollständige Schutz der ADH durch Antioxidanzien im Unterschied zum fast vollständigen Schutz der PTPasen *in vivo* und *in vitro*, und der Befund, daß langwellige UV-Strahlung zwar zur Inaktivierung von PTPasen *in vivo* und *in vitro*, aber nicht zur Inaktivierung der ADH führt, läßt den Schluß zu, daß im Unterschied zur Situation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Jodazetamid bei UV-Strahlung die Situation *in vivo* bzw. in komplexen Membran-Präparationen anders ist als mit gereinigter ADH. Diese Befunde sprechen dafür, daß bei der Bestrahlung isolierter ADH eine UV-absorbierende Komponente fehlt, die in Zellen vorhanden ist, und die effiziente UVA-, UVB- und UVC-induzierte PTPase-Hemmung verursacht. Bei der Bestrahlung von Zellen müssen also UV-induzierte Intermediate entstehen, die die Hemmung der PTPasen vermitteln und durch Anti-Oxidanzien abgefangen werden. Diese Intermediate könnten UV-induzierte ROI's sein, die bei der Bestrahlung von Zellen oder von zellulären-Komponenten entstehen (Miyachi, 1995; Tyrell, 1995). Dafür spricht besonders, daß NAC die UV-induzierte PTPase-Hemmung sehr effizient verhindert, obwohl es sehr schwach UVC (1,4-fache Steigerung der UVC-Absorption des Mediums mit 10 mM NAC) und überhaupt nicht UVB oder UVA absorbiert (Abb. 9).

Warum wird die Aktivität bestimmter, aber wahrscheinlich nicht sämtlicher PTPasen durch UV gehemmt, aber nicht die Aktivität vieler anderer Enzyme z. B. diejenige von G-Proteinen, Tyrosin oder Serin/Threonin-Kinasen und Transkriptionsfaktoren? Und warum scheint die Modifikation anderer Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin) *in vivo* keine Rolle zu spielen ?

In einer Zelle werden die Moleküle wesentlich besser gegen UVC abgeschirmt als in einer Proteinlösung, da in der Zelle sehr viele unterschiedliche UVC-absorbierende Moleküle vorliegen. Vermutlich muß wegen dieser Abschirmung die Bestrahlungsdosis zur völligen Inaktivierung eines zellulären Enzyms, das keine Thiolgruppen benötigt, also nicht gegen oxidative Intermediate empfindlich ist, erheblich höher gewählt werden als in einer Proteinlösung. So wurde die Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors mit steigender UVC-Dosis, bis mindestens bis  $10000 \text{ J/m}^2$ , immer weiter erhöht, weil die PTPasen im Gegensatz zu Kinase immer effizienter gehemmt wurden. Dagegen reichte eine niedrigere UVC-Dosis als in einer Proteinlösung aus, um zelluläre Enzyme zu inaktivieren, die Thiolgruppen benötigen, vermutlich weil UV-induzierte ROI's besonders Thiolgruppen angreifen ( $500 \text{ J/m}^2$  UVC induziert effiziente EGF-Rezeptor-Phosphorylierung, hemmt aber nur sehr schwach die ADH (Abb. 2a und 20). UVA und UVB  $> 300\text{nm}$  werden so schwach von Proteinen absorbiert, daß der EGF-Rezeptor, der keine Thiol-Gruppen für seine Kinase-Aktivität benötigt, durch diese Wellenlängen wahrscheinlich nicht meßbar gehemmt wurde. Noch schwieriger ist es zu erklären, warum bestimmte thiolhaltige Proteine *in vivo* durch UV-Strahlung inaktiviert werden (wie z.B. die PTPase, die den EGF-Rezeptor dephosphoryliert), andere aber nicht (z.B. die PTPase SH-PTP2). Eine plausible Erklärung wäre, daß schützende thiolhaltige Moleküle nicht gleichmäßig in der Zelle verteilt sind, und daß besonders die thiolhaltigen Enzyme durch UV-Strahlung inaktiviert werden, die natürlicherweise an Plätzen mit niedriger Thiol-Konzentration lokalisiert sind.

Wie in der Einleitung dargestellt, führt UV-Strahlung (und wahrscheinlich auch TBT) nicht nur zur Phosphorylierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, sondern auch zu Weiterleitung des Signals zu den antwortenden Genen. Tributylzinn induzierte ADH-Hemmung wird durch Dithiole, wie DTT oder DMSA sehr effizient (Abb. 18), durch Mono-Thiol-Verbindungen, wie NAC oder  $\beta$ -Mercaptoethanol aber nicht verhindert oder aufgehoben (ohne Abb.). Vermischt man Dithiole mit TBT, fallen sie sofort als unlöslicher Niederschlag

aus. Es bleibt zu erklären, warum das katalytische Zentrum von PTPasen, das nur eine Thiol-Gruppe enthält (Fischer *et al.*, 1991; Barford *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1994; Denu *et al.*, 1996), von TBT gehemmt wird. Möglicherweise wird auch die TBT-induzierte PTPase-Hemmung durch ROI's vermittelt.  $\beta$ -Mercaptoethanol-Behandlung verhindert die TBT-induzierte Hämolyse von Erythrozyten (Gray *et al.*, 1986). Die TBT-induzierte Freisetzung von Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) konnte durch NAC effizient gehemmt werden. Daraus folgerten die Autoren, daß ROI's beteiligt sind, die durch TBT-induzierte Hemmung der Atmungskette in Mitochondrien entstehen (Corsini *et al.*, 1996).

### Die Rolle der Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Vorbehandlung

Natrium-Orthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) ist ein unspezifischer Hemmstoff für PTPasen (Swarup *et al.*, 1982). Es hängt von der Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Dosis ab, ob eine Vorbehandlung der Zellen zu einer meßbaren Zunahme der EGF-Rezeptor-Phosphorylierung führt oder nicht (Abb. 5). Die UV- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung kann in Zellen nachgewiesen werden, die nicht mit Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorbehandelt worden sind (Schieven *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Gamou und Shimizu, 1995; Huang *et al.*, 1996; Rao, 1996; Abb. 5). In dieser Arbeit wurden die Zellen mit Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> vorbehandelt, um die Agenzien-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung zu stabilisieren und die Extrakte während der Präparation unempfindlich gegen Dephosphorylierung zu machen.

Die UV-induzierte Hemmung der EGF-Rezeptor-Dephosphorylierung in Membranen ist revertierbar (Abb. 11b). Dies lässt vermuten, daß Schäden an der katalytischen Thiolgruppe einer PTPase möglicherweise recht kurzlebig sind, und durch Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> stabilisiert werden. Es gibt aber keine Hypothese, wie ein solcher Stabilisierungsprozess funktionieren soll. Angesichts der Beobachtung, daß die verwendeten Stress-Faktoren PTPasen hemmen, muß in Betracht gezogen werden, daß sie mit Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> interagieren und die Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Wirkung verstärken. Niedrige Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Konzentration verursachen alleine keine meßbare EGF-Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung aber sie verstärken die UV- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Phosphorylierung (Abb. 5) und Dephosphorylierungs-Hemmung (Abb. 11a). Es ist bekannt, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> direkt reagiert und es in Pervanadat umwandelt, welches ein besserer PTPase-Hemmer ist als Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Heffetz *et al.*, 1990). Es ist nicht wahrscheinlich, daß

UV-Strahlung zur Erzeugung von Pervanadat führt, da die Behandlung von Zellen mit UV-bestrahltem  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -haltigem Medium, keine Tyrosin-Phosphorylierung induziert (eigene, unveröffentlichte Ergebnisse).

Außerdem wird die Wirkung von  $\text{KMnO}_4$ , Jodazetamid und Tributylzinn ebenfalls verstärkt. Diese Agenzien induzieren keine Peroxide. Daraus würde man schliessen, daß  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -induzierte Hemmung von PTPasen unabhängig und gleichzeitig mit der Hemmung durch die anderen verwendeten Agenzien stattfindet.

### Rezeptor-Dimerisierung

Auch ein EGF-Rezeptor, der in seiner ATP-Bindestelle (K721M) mutiert und daher kinasedefizient ist, wird in UV-bestrahlten und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -behandelten Zellen verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert. Dies wurde in NIH3T3-Zellen und in B82-Zellen beobachtet, die den EGF-Rezeptor stabil überexprimieren (Abb. 3: B82-EGFR-K721M, EGFR-IP Blot- $\alpha$ PY). Wenn nur EGF-Rezeptor-Homodimere vorliegen würden, könnte keine Tyrosin-Phosphorylierung durch die kinasedefizienten Rezeptoren katalysiert werden. Es muß also andere Tyrosin-Kinasen geben, die den EGF-Rezeptor phosphorylieren. Sowohl NIH3T3-Zellen als auch B82-Zellen exprimieren endogenes ErbB2 in solchen Mengen, daß man es leicht durch Western-Blot-Analyse nachweisen kann. Es ist bereits bekannt, daß ErbB2 mit dem EGF-Rezeptor Heterodimere bilden kann, in denen sich die Rezeptoren gegenseitig an Tyrosinen phosphorylieren. Nachgewiesen wurde dies, indem man Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren, mit EGF behandelte und die Tyrosin-Phosphorylierung am ErbB2, das EGF nicht bindet, gefunden hat (Stern und Kamps, 1988; Wada *et al.*, 1990, Qian *et al.*, 1992). Eine basale ErbB2-Aktivität in diesen Zellen könnte also für die EGF-Rezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung verantwortlich sein, wenn EGF-Rezeptor spezifische PTPasen durch UV-Strahlung oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  gehemmt sind. Der Befund, daß ErbB2 in UV-bestrahlten und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -behandelten Zellen an Tyrosinen phosphoryliert ist, läßt vermuten, daß auch die ErbB2-spezifischen PTPasen gehemmt werden.

EGF induziert die Tyrosin-Phosphorylierung des kinasedefizienten EGF-Rezeptors und von ErbB2 (Abb. 3: B82-EGFR K721M; siehe auch Wright *et al.*, 1995). Dieser unerwartete Befund impliziert eine interessante Hypothese über den Mechanismus der EGF-induzierten EGF-Rezeptor-Phosphorylierung. Die Bindung von EGF an den Rezeptor könnte eine Konformationsänderung

hervorrufen, die bewirkt, daß der EGF-Rezeptor verstärkt mit ErbB2 interagiert. Die Beobachtung, daß auch ErbB2 verstärkt an Tyrosinen phosphoryliert wird, wenn der kinasedefiziente EGF-Rezeptor EGF bindet (Abb. 3: B82-EGFR-K721M, ErbB2 IP Blot- $\alpha$ PY), kann mit der Anwesenheit von Heterodimeren nicht erklärt werden. Möglicherweise bilden sich nach Stimulation durch Liganden-Bindung Rezeptor-Oligomer-Gruppen, in denen mehrere ErbB2 und EGF-Rezeptor-Moleküle vorliegen und sich gegenseitig an Tyrosinen phosphorylieren.

### Bedeutung der Stress-induzierten EGF-Rezeptor-Aktivierung

Die durch UV-Strahlung oder TBT erzeugten Zwischenprodukte hemmen offensichtlich die anderen Komponenten der Signaltransduktionswege nicht. Die EGF-Rezeptor-abhängige Signaltransduktion in UVC- und UVB-bestrahlten Zellen ist sehr ähnlich zu der Signaltransduktion in EGF-behandelten Zellen (Bender *et al.*, 1997; siehe Einleitung der vorliegenden Arbeit).

Auch in TBT-behandelten Zellen werden viele Komponenten der EGF-Rezeptor-abhängigen Signaltransduktion aktiviert. So werden Tyrosin-Kinasen und die Mapkinasen Erk-1,2, p38/RK und JNK/SAPK aktiviert (Abb. 14). Offensichtlich hemmt TBT, so wie niedrige UV-Dosen, auch nicht die Komponenten des Transkriptions-Komplexes und Transkriptionsfaktor-Aktivierung, denn *c-jun*- und *c-fos*-mRNA wird in TBT behandelten Zellen sehr stark akkumuliert (Abb. 15). Diese mRNA-Akkumulation beruht auf der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren an den Promotoren, denn die Unterbrechung der Erk-1,2- und der p38/RK-Signaltransduktion hemmt die TBT-induzierte *c-jun*- und *c-fos*-Gen-Induktion sehr effizient (Abb. 16). Welche Transkriptionsfaktoren im einzelnen die TBT-induzierte Gen-Induktion vermitteln, muß mit Hilfe von Promoter-Mutanten ermittelt werden. Aufgrund der vorliegenden Daten ergibt sich folgendes Schema für die schnelle Aktivierung von *c-fos* in UV-bestrahlten-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, TBT- und Jodazetamid-behandelten Zellen.

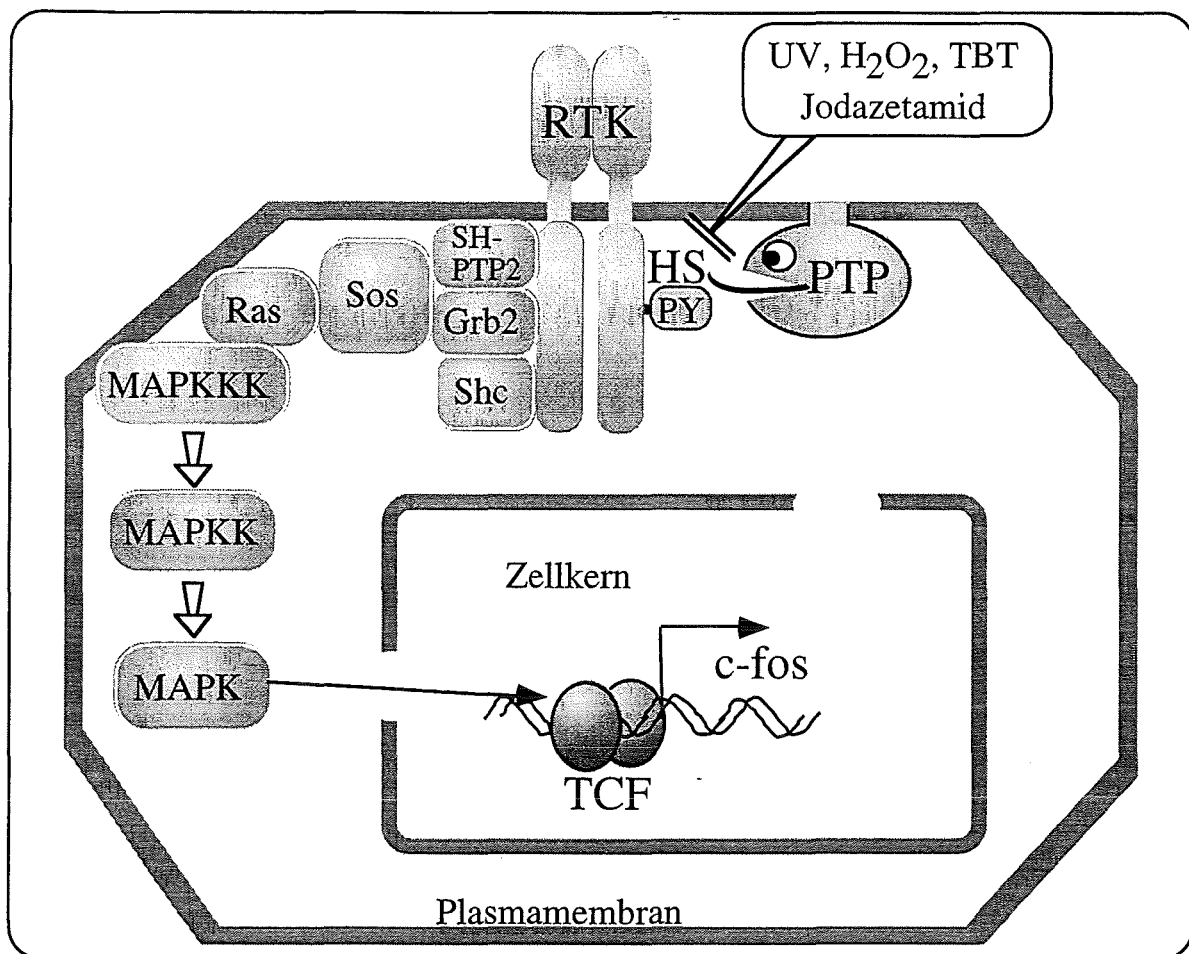


Abb. 24) Schematische Darstellung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-vermittelten Stress-Faktor-Signaltransduktion zum Ternären-Komplex-Faktor am *c-fos*-Promoter. Die Rolle der SH-PTP2 bei der Stress-induzierten Aktivierung der EGF-Rezeptor-Signaltransduktion wurde bisher noch nicht untersucht. MAPK steht repräsentativ für Erk-1,2, p38/RK oder JNK/SAPK. MAPKK repräsentiert MEK, JNKK oder MKK3 / MKK6. MAPKKK steht für Raf-1 im Falle des Erk-1,2-Signalweges und für MEKK für den JNK/SAPK-Signalweg. Die MAPKKK für p38/RK ist noch nicht identifiziert. PY = Tyrosinphosphat, HS = Thiolgruppe des katalytischen PTPase-Zentrums, PTP = Protein-Tyrosin-Phosphatase, RTK = Rezeptor-Tyrosin-Kinase, TCF = Ternärer Komplex Faktor.

Es ist wahrscheinlich, daß die UV-induzierte Genaktivierung eine Rolle bei der Entstehung einer Reihe von pathologischen Erscheinungen, wie Immunsuppression, Sonnenbrand oder Hautkrebs, spielt. Dafür spricht auch, daß die Verminderung von UV-induzierten ROI's einige der pathologischen Folgen hemmen kann. Z.B. hemmte die Applikation von NAC auf die Haut von Mäusen die UV-induzierte systemische Immunsuppression (van der Broeke *et al.*, 1995). Außerdem verminderte die NAC-Vorbehandlung die DNA-

Synthese-Hemmung in der Haut von UV-bestrahlten Ratten (van der Broeke *et al.*, 1994).

UV-induzierte EGF-Rezeptor-Aktivierung wurde auch für die Aktivierung der Phospholipase-A2 verantwortlich gemacht (Miller *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996). Auch TBT führt zur EGF-Rezeptor-vermittelten Aktivierung von PLA-2 (Zaucke und Knebel in Vorbereitung). Die PLA-2 katalysiert die Freisetzung von Arachidonsäure, einem wichtigen Mediator bei Entzündungsreaktionen (Higgins, 1985; Sondergaard *et al.*, 1985). Die Vermutung liegt nahe, daß der EGF-Rezeptor oder andere Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wichtige Vermittler bei der UV- und TBT-induzierten Entstehung von Hautentzündungen sind.

*Jun* und *fos* wurden ursprünglich als Onkogene identifiziert (Miller *et al.*, 1984; Bohmann *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1988). In Zellen, bei denen das *c-fos*- oder das *c-jun*-Gen inaktiviert wurde, wurde eine Erhöhung der Zahl von UV-induzierten Chromosomen-Aberrationen und Doppelstrangbrüchen sowie eine stärkere Hemmung der DNA-Replikation nach UV-Bestrahlung als in Wildtyp-Zellen gefunden (Haas und Kaina, 1995). Weil TBT die Inzidenz von Tumoren endokrinen Ursprungs erhöht und außerdem gefunden wurde, daß TBT mutagene Wirkung besitzt und Aneuploidien verursacht (Boyer, 1989; Jensen *et al.*, 1991; Hamasaki *et al.*, 1993), wurde als Konsequenz der in dieser Arbeit erzielten Resultate, ein Tierexperiment begonnen, bei dem getestet werden soll, ob die Applikation von TBT auf die Haut von Mäusen zur Entstehung von Tumoren führt oder zumindest tumorfördernd ist. Die Ergebnisse aus diesem Experiment liegen zur Zeit noch nicht vor.

Diese Experimente könnten insofern relevant sein, weil die TBT-Dosis für die Erzeugung endogener Tumore recht hoch und die Wahrscheinlichkeit einer chronischen, systemischen Intoxikation mit derartig hohen Dosen gering ist, aber chronischer, dermalen Kontakt bei beruflich exponierten Personen oder bei der Verwendung von TBT in der Kleidung vorkommen könnte.



## Literaturverzeichnis

- Adler, V., Fuchs, S. Y., Kim, J., Kraft, A., King, M. P., Pelling, J. und Ronai, Z. (1995). Jun-NH2-terminal kinase activation mediated by UV-induced DNA lesions in melanoma and fibroblast cells. *Cell. Growth Diff.*, **6**, 1437-1446.
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. und Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27489-27494.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. und Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase b by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, **15**, 6541-6551.
- Alison, M. R. und Sarraf, C. E. (1995). Apoptosis: regulation and relevance to toxicology. *Hum. Exp. Toxicol.*, **14**, 234-247.
- Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Pötting, A. und Herrlich, P. (1985). c-fos mRNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle. *Cancer Cells*, **3**, 315-319.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1987). 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2256-2266.
- Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. und Karin, M. (1988). Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature*, **332**, 166-171.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1987). Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- Avruch, J., Zhang, X. F. und Kyriakis, J. M. (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 279-283.
- Aw, T. Y., Nicotera, P., Manzo, L. und Orrenius, S. (1990). Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys*, **283**, 46-50.
- Bar-Sagi, D., Suhan, J. P., Mc Cormic, F. und Feramisco, J. R. (1988). Localization of PLA2 in normal and ras-transformed cells. *J. Cell Biol.*, **106**, 1649-1658.
- Barford, D., Flint, A. J. und Tonks, N. (1994). Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science*, **263**, 1397-1403.
- Batzer, A. G., Rotin, D., Urena, J. M., Skolnik, E. Y. und Schlessinger, J. (1994). Hierachy of binding sites for Grb-2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5192-5201.
- Becker, K., Merlini, L., de Bertrand, N., de Alencastro, L. F. und Tarradellas, J. (1992). Elevated levels of organotins in Lake Geneva: bivalves as sentinel organism. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **48**, 37-42.

- Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Jordanov, M., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1997). UV-induced signal transduction. *J. Photochem. Photobiol. B* in press,
- Bennett, A. M., Tang, T. L., Sugimoto, S., Walsh, C. T. und Neel, B. G. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor-receptor- $\beta$  to Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7335-7339.
- Bennett, A. M., Hausdorff, S. F., O'Reilly, A. M., Freeman Jr., R. M. und Neel, B. G. (1996). Multiple requirements for SHPTP2 in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1189-1202.
- Berridge, M. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Blumer, K. J. und Johnson, G. L. (1994). Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *TIBS*, **19**, 236-240.
- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. und Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, **238**, 1386-1392.
- Bos, J. L. (1995). A target for phosphoinositide 3-kinase: Act/PKB. *TIBS*, **20**, 441-442.
- Boyer, I. J. (1989). Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, **55**, 253-298.
- Böhmer, F.-D., Böhmer, A., Obermeier, A. und Ullrich, A. (1995). Use of selective tyrosine kinase blockers to monitor growth factor receptor dephosphorylation in intact cells. *Analytical Biochem.*, **228**, 267-273.
- Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. und Ponten, J. (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 10124-10128.
- Brown, M. T. und Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1287**, 121-149.
- Brumell, J. H., Burkhardt, A. L., Bolen, J. B. und Grinstein, S. (1996). Endogenous reactive oxygen intermediates activate tyrosine kinases in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **271**, 1455-1461.
- Brunet, S. und Giacomoni, P. U. (1990). Specific mRNAs accumulate in long-wavelength UV-irradiated mouse epidermis. *J. Photochem. Photobiol. B*, **6**, 431-441.
- Büscher, M., Rahmsdorf, H. J., Litfin, M., Karin, M. und Herrlich, P. (1988). Activation of the c-fos gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene*, **3**, 301-311.
- Cano, E., Hazzalin, C. A., Kardalidou, E., Buckle, R. S. und Mahadevan, L. C. (1995). Neither ERK nor JNK/SAPK MAP kinase subtypes are essential for histone H3/HMG-14 phosphorylation or c-fos and c-jun induction. *J. Cell Sci.*, **108**, 3599-3609.
- Cano, E., Doza, Y. N., Ben-Levy, R., Cohen, P. und Mahadevan, L. C. (1996). Identification of anisomycin-activated kinases p45 and p55 in murine cells as MAPKAP kinase-2. *Oncogene*, **12**, 805-812.

- Cavigelli, M., Dolfi, F., Claret, F.-X. und Karin, M. (1995). Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.*, **14**, 5957-5964.
- Cavigelli, M., Li, W. W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K. und Karin, M. (1996). The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *EMBO J.*, **15**, 6296-6279.
- Chen, W. S., Lazar, C. S., Poenie, M., Tsien, R. Y., Gill, G. N. und Rosenfeld, M. G. (1987). Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature*, **328**, 820-823.
- Chen, X., Gresham, A., Morrison, A. und Pentland, A. P. (1996). Oxidative stress mediates synthesis of cytosolic phospholipase A2 after UVB injury. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1299**, 23-33.
- Chow, S. C., Kass, G. E., McCabe, M. J. j. und Orrhenius, S. (1992). Tributyltin increases cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca<sup>2+</sup>, activating a Ca<sup>2+</sup> entry pathway, and inhibiting Ca<sup>2+</sup> efflux. *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**, 143-149.
- Clark, S. und Konstantopoulos, N. (1993). Sulphydryl agents modulate insulin- and epidermal growth factor (EGF)-receptor kinase via reaction with intracellular receptor domains: differential effects on basal versus activated receptors. *Biochem. J.*, **292**, 217-223.
- Clifton, A. D., Young, P. R. und Cohen, P. (1996). A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett.*, **392**, 209-214.
- Coffer, P. J., Burgering, B. M., Peppelenbosch, M. P., Bos, J. L. und Kruijer, W. (1995). UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene*, **11**, 561-569.
- Corcoran, G. B., Fix, L., Jones, D. P., Moslen, M. T., Nicotera, P., Oberhammer, F. A. und Buttyan, R. (1994). Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 169-181.
- Corsini, E., Bruccoleri, A., Marinovich, M. und Galli, C. L. (1996). Endogenous interleukin-1 alpha associated with skin irritation induced by tributyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **138**, 268-274.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R. und Lee, J. C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.*, **364**, 229-233.
- Cuenda, A., Cohen, P., Buée-Scherrer und Michel, G. (1997). Activation of stress activated protein kinase 3 (SAPK-3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); compariso of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.*, **16**, 295-305.
- Curran, T., Peters, G., Van Beveren, C., Teich, N. M. und Verma, I. M. (1982). FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J. Virol.*, **44**, 674-682.
- Damen, J. E., Cutler, R. L., Jiao, H., Yi, T. und Krystal, G. (1995). Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23402-23408.

- Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H. W., Tröppmair, J. und Rapp, U. R. (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 474-480.
- DeFranco, A. L. und Law, D. A. (1995). Tyrosine phosphatases and the antibody response. *Science*, **268**, 263-264.
- Dennis, E. A. (1987). Phospholipase A2 mechanism: Inhibition and role in arachidonic acid release. *Drug Dev. Res.*, **10**, 205-220.
- Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A. und Dixon, J. E. (1996). Form and function in protein dephosphorylation. *Cell*, **87**, 361-364.
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F. und Karin, M. (1991). Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 2804-2811.
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Smeal, T. und Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell*, **71**, 1081-1091.
- Devary, Y., Rosette, C., DiDonato, J. A. und Karin, M. (1993). NF- $\kappa$ B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science*, **261**, 1442-1445.
- Dérjard, B., Hibi, M., Wu, I.-H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davies, 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.
- Dérjard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.-H., Han, J., Ulevitch, R. J. und Davis, R. J. (1995). Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, **267**, 682-685.
- Diffey, B. L. (1994). Observed and predicted minimal erythema doses: A comparative study. *Photochem. Photobiol.*, **60**, 380-382.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S., Bridges, A. und Saltiel, A. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7686-7689.
- Eklund, H., Branden, C. I. und Jornvall, H. (1976). Structural comparisons of mammalian, yeast and bacillar alcohol dehydrogenases. *J. Mol. Biol.*, **102**, 61-73.
- Elledge, S. J. und Davis, R. W. (1989). DNA-damage induction of ribonucleotide reductase. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 4932-4940.
- Ema, M., Itami, T. und Kawasaki, H. (1991). Behavioural effects of acute exposure to tributyltin chloride in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, **13**, 489-493.
- Fantl, W. J., Johnson, D. E. und Williams, L. T. (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, **62**, 453-481.
- Feng, G.-S., Hui, C.-C. und Pawson, T. (1993). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein tyrosine kinases. *Science*, **259**, 1607-1610.
- Fent, K. und Hunn, J. (1995). Organotins in freshwater harbors and rivers: temporal distribution, annual trends and fate. *Envir. Toxicol. Chem.*, **14**, 1123-1132.

- Fent, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, **26**, 1-117.
- Fischer, E. H., Charbonneau, H. und Tonks, N. K. (1991). Protein Tyrosine Phosphatases: A diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*, **253**, 401-406.
- Fornace Jr., A. J. (1992). Mammalian genes induced by radiation; activation of genes associated with growth control. *Ann. Rev. Genet.*, **26**, 507-526.
- Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., Elsabrouty, S., Dani, C., Jeanteur, P. und Blanchard, J. M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1431-1442.
- Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A. und Neel, B. G. (1992). The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell*, **68**, 545-560.
- Freeman, S. E., Hacham, H., Gange, R. W., Maytum, D. J., Sutherland, J. C. und Sutherland, B. M. (1989). Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc. Natl. Sci. USA*, **86**, 5606-5609.
- Friedman, M. (1973). The chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group in amino acids, peptides and proteins. Vieweg & Sohn, Braunschweig. 349-374
- Fry, M. J. (1994). Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1226**, 237-268.
- Gamou, S. und Shimizu, N. (1995). Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *FEBS-Letters*, **357**, 161-164.
- Ghoneum, M., Hussein, A. E., Gill, G. und Alfred, L. J. (1990). Suppression of murine natural killer cell activity by tributyltin: in vivo and in vitro assessment. *Environ. Res.*, **52**, 178-186.
- Godar, D. E. und Beer, J. Z. (1992). UVA1-induced nuclear damage in mammalian cells. in: F. Urbach, Biological responses to ultraviolet A radiation, Valdenmar Publishing Company, Overland Park, Kansas. 65-73
- Godar, D. E., Thomas, D. P., Miller, S. A. und Lee, W. (1993). Long-wavelength UVA radiation induces oxidative stress, cytoskeletal damage and hemolysis. *Photochem. Photobiol.*, **57**, 1018-1026.
- Goh, C. L. (1985). Irritant dermatitis from tri-N-butyl tin oxide in paint. *Contact Dermatitis*, **12**, 161-163.
- Gonzalez-Rubio, M., Voit, S., Rodriguez-Puyol, D., Weber, M. und Marx, M. (1996). Oxidative stress induces tyrosine phosphorylation of PDGF alpha-and beta-receptors and pp60c-src in mesangial cells. *Kidney Int.*, **50**, 164-173.
- Gray, B. H., Porvaznik, M., Lee, L. H. und Flemming, C. (1986). Inhibition of tributyltin mediated hemolysis by mercapto compounds. *J. Appl. Toxicol.*, **6**, 363-370.
- Guan, K. L. und Dixon, J. E. (1991). Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine phosphate intermediate. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17026-17030.

- Guan, K. L. (1994). The mitogen activated protein-kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell. Sign.*, **6**, 581-589.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B. und Davis, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.*, **15**, 2760-2770.
- Haas, S. und Kaina, B. (1995). c-Fos is involved in the cellular defence against the genotoxic effects of UV radiation. *Carcinogenesis*, **16**, 985-991.
- Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J. und Cohen, S. (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalisation of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3317-3321.
- Hamasaki, T., Sato, T., Nagase, H. und Kito, H. (1993). The mutagenicity of organotin compounds as environmental pollutants. *Mutation Res.*, **300**, 265-271.
- Hazzalin, C. A., Cano, E., Cuenda, A., Barratt, M. J., Cohen, P. und Mahadevan, L. C. (1996). p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **6**, 1028-1031.
- Härtig, E., Loncarevic, I. F., Büscher, M., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1991). A new cAMP response element in the transcribed region of the human c-fos gene. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4153-4159.
- Heffetz, D. und Zick, Y. (1989). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potentiates phosphorylation of novel putative substrates for insulin receptor kinase in intact Fao-cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 10126-10132.
- Heffetz, D., Bushkin, I., Dror, R. und Zick, Y. (1990). The insulinomimetic agents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 2896-2902.
- Heffetz, D., Rutter, W. J. und Zick, Y. (1992). The insulinomimetic agents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem. J.*, **288**, 631-635.
- Heldin, C.-H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, **80**, 213-223.
- Herrlich, P., Ponta, H. und Rahmsdorf, H. J. (1992). DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev. of Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **119**, 187-223.
- Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994). Transcriptional and post-transcriptional responses to DNA-damaging agents. *Curr. Opinion Cell Biol.*, **6**, 425-431.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. und Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.*, **7**, 2135-2148.
- Higgins, A. J. (1985). The biology, pathophysiology and control of eicosanoids in inflammation. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **8**, 1-18.
- Hollander, M. C. und Fornace, A. J., Jr. (1989). Induction of fos RNA by DNA-damaging agents. *Cancer Res.*, **49**, 1687-1692.

- Huang, P. R., Wu, J. X., Fan, Y. und Adamson, E. D. (1996). UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J. Cell Biol.*, **133**, 211-220.
- Husain, Z., Yang, Q. M. und Biswas, D. K. (1990). cHa-ras proto-oncogene. Amplification and overexpression in UV-B-induced mouse skin papillomas and carcinomas. *Arch. Dermatol.*, **126**, 324-330.
- Iordanov, M. (1996). The cAMP responsive element binding protein (CREB) as a Participant in the mammalian UVC Response and as a target for repression by the activated glucocorticoid receptor. Dissertation. FZKA-Bericht Nr. 5763. Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften, Universität Karlsruhe.
- Iordanov, M., Bender, K., Ade, T., Schmid, W., Sachsenmaier, C., Engel, K., Gaestel, M., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1997). CREB is activated by UVC through a p38/HOG-1 dependent protein kinase. *EMBO J.*, in press.
- Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V. und Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO J.*, **12**, 5097-5104.
- Janknecht, R., Cahill, M. A. und Nordheim, A. (1995). Signal integration at the c-fos promoter. *Carcinogenesis*, **16**, 443-450.
- Jensen, K. G., Andersen, O. und Ronne, M. (1991). Organotin compounds induce aneuploidy in human peripheral lymphocytes in vitro. *Mutation Res.*, **246**, 109-112.
- Johnson, G. L. und Vaillancourt, R. R. (1994). Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 230-238.
- Jornvall, H., Eklund, H. und Branden, C. I. (1978). Subunit conformation of yeast alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **253**, 8414-8419.
- Kadota, S., Fantus, I. G., Deragon, G., Guyda, H. J. und Posner, B. I. (1987). Stimulation of insulin-like growth factor II receptor binding and insulin receptor kinase activity in rat adipocytes. Effects of vanadate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, **262**, 8252-8256.
- Kaina, B., Lohrer, H., Karin, M. und Herrlich, P. (1990). Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agents. *Proc. Natl. Sci. USA*, **87**, 2710-2714.
- Kapeller, R. und Cantley, L. C. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays*, **16**, 565-576.
- Kazlauskas, A. (1994). Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **4**, 5-14.
- Keyse, S. M. (1993). The induction of gene expression in mammalian cells by radiation. *Semin. Cancer Biol.*, **4**, 119-128.
- Khosravi-Far, R. und Der, C. J. (1994). the Ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev.*, **13**, 67-89.
- Kmieciak, T. E., Johnson, P. J. und Shalloway, D. (1988). Regulation by the autophosphorylation site in overexpressed pp60c-src. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4541-4546.

- Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. und Herrlich, P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.*, **15**, 5314-5325.
- Koong, A. C., Chen, E. Y., Mivechi, N. F., Denko, N. C., Stambrook, P. und Giaccia, A. J. (1994). Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2). *Cancer Res.*, **54**, 5273-5279.
- Kress, S., Sutter, C., Strickland, P. T., Mukhtar, H., Schweizer, J. und Schwarz, M. (1992). Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res.*, **52**, 6400-6403.
- Kripke, M. L. (1994). Ultraviolet radiation and immunology: something new under the sun--presidential address. *Cancer Res.*, **54**, 6102-6105.
- Kuhne, M. R., Pawson, T., Lienhardt, G. E. und Feng, G.-S. (1993). The insulin receptor substrate-1 associates with the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase *Syp*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11479-11481.
- Kypta, R. M., Hemming, A. und Courtneidge, S. A. (1988). Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.*, **7**, 3837-3844.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. und Woodgett, J. R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of cJun kinases. *Nature*, **369**, 156-160.
- Lammers, R., Bossenmaier, B., Cool, D. E., Tonks, N. K., Schlessinger, J., Fischer, E. H. und Ullrich, A. (1993). Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22456-22462.
- Lander, H. M., Levine, D. M. und Novogrodsky, A. (1992). Stress stimuli-induced lymphocyte activation. *Cell. Immunol.*, **145**, 146-155.
- Lechleider, R. J., Freeman Jr., R. M. und Neel, B. G. (1993). Tyrosyl phosphorylation and growth factor receptor association of the human corkscrew homologue, SH-PTP2. *J. Biol. Chem.*, **268**, 13434-13438.
- Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R. (1987a). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, **49**, 741-752.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. und Tjian, R. (1987b). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*, **325**, 368-372.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L. und Young, P. R. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **372**, 739-746.
- Lemmon, M. A. und Schlessinger, J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *TIBS*, **19**, 459-463.



- Levitzki, A. und Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: An approach to drug development. *Science*, **267**, 1782-1788.
- Li, W., Nishimura, R., Kashshian, A., Batzer, A. G., W.J.H., K., Cooper, J. A. und Schlessinger, J. (1994). A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking Grb-2/Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 509-517.
- Lin, L.-L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. und Davis, R. J. (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP Kinase. *Cell*, **72**, 269-278.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.-X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G. L. und Karin, M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-MpK2. *Science*, **268**, 286-290.
- Liu, Y., Gorospe, M., Yang, C. und Holbrook, N. J. (1995). Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8377-8380.
- Liu, Z. G., Baskaran, R., Lea-Chou, E. T., Wood, L. D., Chen, Y., Karin, M. und Wang, J. Y. J. (1996). Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress. *Nature*, **384**, 273-276.
- Livingstone, C., Patel, G. und Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.*, **14**, 1785-1797.
- Madronich, S. (1993). The atmosphere and UV-B radiation at ground level. in: A. R. Young, L. O. Björn, J. Moan and W. Nultsch, *Environmental UV Photobiology*, Plenum Press, New York. 1-39
- Maguire, R. J. (1987). Review: environmental aspects of tributyltin. *Appl. Organomet. Chem.*, **1**, 475-498.
- Margolis, B. und Skolnik, E. Y. (1994). Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **5**, 1288-1299.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**, 179-185.
- McKinlay, A. F. und Diffey, B. L. (1987). A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin. *CIE J.*, **66**, 17-22.
- Meier, R., Rouse, J., Cuenda, A., Nebreda, A. R. und Cohen, P. (1996). Cellular stresses and cytokines activate multiple mitogen-activated-protein kinase kinases in PC12 and KB cells. *Eur. J. Biochem.*, **236**, 796-805.
- Meister, A. und Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760.
- Middleton, M. C. (1982). Early metabolic changes in rat epidermis and dermis following cutaneous application of irritant doses of tributyltin. *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 163-166.
- Milarski, K. L., Zhu, G., Pearl, C. G., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., MacLean, D., Thieme-Seffler, A., Zhang, Z. Y., Sawyer, T., Decker, S. J., Dixon, J. E. und Saltiel, A. R. (1993). Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23634-23639.

- Milarski, K. L. und Saltiel, A. R. (1994). Expression of catalytically inactive Syp phosphatase in 3T3 cells blocks stimulation of MAPK by insulin. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21239-21243.
- Miller, A. D., Curran, T. und Verma, I. M. (1984). c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell*, **36**, 51-60.
- Miller, C. C., Hale, P. und Pentland, A. P. (1994). Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase dependent pathway. *J. Bio. Chem.*, **269**, 3529-3533.
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R., Johnson, G. L. und Karin, M. (1994 a). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, **266**, 1719-1723.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.-X., Abo, A. und Karin, M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, **81**, 1147-1157.
- Miyachi, Y. (1995). Photoaging from an oxidative standpoint. *J. Dermato. Sci.*, **9**, 79-86.
- Moriguchi, T., Kawasaki, H., Matsuda, S., Gotoh, Y. und Nishida, E. (1995). Evidence for multiple activators for stress-activated protein kinases/c-jun amino-terminal kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12969-12972.
- Negre-Salvayre, A., Paillous, N., Dousset, N., Bascoul, J. und Salvayre, R. (1992). Wavelength dependence of photoinduced peroxidation and cytotoxicity of human low density lipoproteins. *Photochem. Photobiol.*, **55**, 197-204.
- Nishibe, S., Wahl, M. I., Hernández-Sotomayor, S. M. T., Tonks, N. K., Rhee, S. G. und Carpenter, G. (1990). Increase of the catalytic activity of phospholipase C-g1 by tyrosine phosphorylation. *Science*, **250**, 1253-1256.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, **258**, 607-614.
- Noguchi, T., Matozaki, T., Horita, K., Fujioka, Y. und Kasuga, M. (1994). Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in Insulin-stimulated Ras activation. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6674-6682.
- Noh, D.-Y., Shin, S. H. und Rhee, S. G. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1242**, 99-114.
- Noonan, F. P. und De Fabo, E. C. (1992). Immunosuppression by ultraviolet B radiation: initiation by urocanic acid. *Immunol. Today*, **13**, 250-254.
- Norval, M., Simpson, T. J. und Ross, J. A. (1989). Urocanic acid and immunosuppression. *Photochem. Photobiol.*, **50**, 267-275.
- Nozaki, M. (1988). Dehydroxynases. in: S. Otsuka and T. Yamanaka, Metalloproteins, Kodansha LTD, Elsevier, Tokyo. 385-388
- Okabayashi, Y., Kido, Y., Okutani, T., Sugimoto, Y., Sakaguchi, K. und Kasuga, M. (1994). Tyrosines 1148 and 1173 of activated human epidermal growth factor receptors are binding sites of Shc in intact cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18674-18678.

- Oyama, Y., Ueha, T., Hayashi, A. und Chikahisa, L. (1994). Effect of tri-n-butyltin on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of mouse thymocytes under Ca<sup>2+</sup> -free condition. *Eur. J. Pharmacol.*, **270**, 137-142.
- Pelikan, Z. und Cerny, E. (1969). Toxic effects of bis(tri-n-butyltin)oxide on the skin of rats. *Berufs Dermatosen*, **17**, 305-316.
- Pieters, R. H., Bol, M. und Penninks, A. H. (1994). Immunotoxic organotins as possible model compounds in studying apoptosis and thymocyte differentiation. *Toxicology*, **91**, 189-202.
- Price, M. A., Cruzalegui, F. H. und Treisman, R. (1996). The p38 and Erk Map kinase pathways cooperate to activate ternary complex factors and c-fos transcription in response to UV-light. *EMBO J.*, **15**, 6552-6563.
- Pronk, G. J. und Bos, J. L. (1994). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1198**, 131-147.
- Pronk, G. J., de Vries-Smits, A. M., Buday, L., Downward, J., Maassen, J. A., Medema, R. H. und Bos, J. L. (1994). Involvement of Shc in Insulin- and epidermal growth factor-induced activation of p21ras. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1575-1581.
- Qian, X., Decker, S. J. und Greene, M. (1992). p185neu and epidermal growth factor receptor associate into a structure composed of activated kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1330-1334.
- Quaite, F. E., Sutherland, B. M. und Sutherland, J. C. (1992). Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature*, **358**, 576-578.
- Qureshi, S. A., Alexandropoulos, K., Rim, M., Joseph, C. K., Bruder, J. T., Rapp, U. R. und Foster, D. A. (1992). Evidence that Ha-Ras mediates two distinguishable intracellular signals activated by v-src. *J. Biol. Chem.*, **267**, 17635-17639.
- Rabin, B. R. und Whitehead, E. P. (1962). Mechanism of action of yeast alcohol dehydrogenase. *Nature*, **196**, 658-660.
- Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H.-P., Bruder, J. T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H. J. und Herrlich, P. (1993). UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.*, **12**, 1005-1012.
- Raffray, M., McCarthy, D., Snowden, R. T. und Cohen, G. M. (1993). Apoptosis as a mechanism of tributyltin cytotoxicity to thymocytes: relationship of apoptotic markers to biochemical and cellular effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **119**, 122-130.
- Raffray, M. und Cohen, G. M. (1993). Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy in vivo. *Arch. Toxicol.*, **67**, 231-236.
- Rahmsdorf, H. J. (1994). Modulation of Fos and Jun in response to adverse environmental agents. in: P. Angel and P. Herrlich, The Fos and Jun families of transcription factors, CRC-press, Boca Raton. 169-189
- Rahmsdorf, H. J. (1996). Jun: transcription factor and oncoprotein. *J. Mol. Med.*, **74**, 725-747.

- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J. und Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, **270**, 7420-7426.
- 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.
- Roche, S., McGlade, J., Jones, M., Gish, G. D., Pawson, T. und Courtneidge, S. A. (1996). Requirement of phospholipase C gamma, the tyrosine phosphatase Syp and the adaptor proteins Shc and Nck for PDGF-induced DNA-synthesis: evidence for the existence of Ras-dependent and Ras-independent pathways. *EMBO J.*, **15**, 4940-4948.
- Roddey, P. K., Garmyn, M., Park, H. Y., Bhawan, J. und Gilchrest, B. A. (1994). Ultraviolet irradiation induces c-fos but not c-Ha-ras proto-oncogene expression in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **102**, 296-299.
- Ronai, Z. A., Okin, E. und Weinstein, I. B. (1988). Ultraviolet light induces the expression of oncogenes in rat fibroblast and human keratinocyte cells. *Oncogene*, **2**, 201-204.
- Rosenstein, B. S. und Mitchell, D. L. (1987). Action spectra for the induction of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.*, **45**, 775-780.
- Rosette, C. und Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*, **274**, 1194-1197.
- Sa, G., Murugesan, G., Jaye, M., Ivashchenko, Y. und Fox, P. L. (1995). Activation of cytosolic phospholipase A2 by basic fibroblast growth factor via a p42 mitogen-activated-protein-kinase-dependent phosphorylation pathway in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2360-2366.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*, **78**, 963-972.
- Sachsenmaier, C. (1994). Wachstumsfaktor-Rezeptoren als Vermittler UVC-induzierter Genexpression. Dissertation, Institut für Biochemie, Angfertigt im Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe, Universität Innsbruck, Österreich
- Schalkwijk, C. G., van der Heijden, M. A. G., Bunt, G., Maas, R., Tertoolen, L. G. J., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., van den Bosch, H. und Boonstra, J. (1996). Maximal EGF-induced cytosolic phospholipase A2 activation in vivo requires phosphorylation followed by an increased intracellular calcium concentration. *Biochem. J.*, **313**, 91-96.
- Schebek, L., Andreae, M. O. und Tobschall, H. J. (1991). Methyl- and butyltin compounds in water and sediments of the rhine river. *Environ. Sci. Technol.*, **25**, 871-874.
- Schieven, G. L., Mittler, R. S., Nadler, S. G., Kirihara, J. M., Bolen, J. B., Kanner, S. B. und Ledbetter, J. A. (1994). ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T-cell receptor involvement in UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20718-20726.
- Schlessinger, J. und Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*, **9**, 383-391.

- Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P. und Wagner, E. F. (1995). Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.*, **14**, 5338-5349.
- Seckmeyer, G. und McKenzie, R. L. (1992). Increased ultraviolet radiation in New Zealand (45°S) relative to Germany (48°N). *Nature*, **359**, 135-137.
- Seeger, R. und Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, **9**, 726-735.
- Shah, G., Ghosh, R., A., A. P. und Cerutti, P. A. (1993). Mechanism of induction of c-fos by ultraviolet B (290-320 nm) in mouse JB6 epidermal cells. *Cancer Res.*, **53**, 38-45.
- Shimizu, T. und Wolfe, L. S. (1990). Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J. Neurochem.*, **55**, 1-15.
- Skouteris, G. G. und Georgakopoulos, E. (1996). Hepatocyte growth factor-induced proliferation of primary hepatocytes is mediated by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 229-233.
- Smialowicz, R. J., Riddle, M. M., Rogers, R. R., Leubke, R. W., Copeland, C. B. und Ernst, G. G. (1990). Immune alterations in rats following subacute exposure to tributyltin oxide. *Toxicology*, **64**, 169-178.
- Sober, H. A. (1973). Handbook of Biochemistry. CRC Press, Cleveland, Ohio. B72-B75
- Sondergaard, J., Bisgaard, H. und Thorsen, S. (1985). Eicosanoids in skin UV inflammation. *Photodermatol.*, **2**, 359-366.
- Stein, B., Rahmsdorf, H. J., Steffen, A., Litfin, M. und Herrlich, P. (1989a). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5169-5181.
- Stein, B., Krämer, M., Rahmsdorf, H. J., Ponta, H. und Herrlich, P. (1989b). UV-induced transcription from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat and UV-induced secretion of an extracellular factor that induces HIV-1 transcription in nonirradiated cells. *J. Virol.*, **63**, 4540-4544.
- Stein, B., Angel, P., van Dam, H., Ponta, H., Herrlich, P., van der Eb, A. und Rahmsdorf, H. J. (1992). Ultraviolet-radiation induced c-jun gene transcription: two AP-1 like binding sites mediate the response. *Photochem. Photobiol.*, **55**, 409-415.
- Stern, D. F. und Kamps, M. P. (1988). EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *EMBO J.*, **7**, 995-1001.
- Streilein, J. W., Taylor, J. R., Vincek, V., Kurimoto, I., Richardson, J., Tie, C., Medema, J. P. und Golomb, C. (1994). Relationship between ultraviolet radiation-induced immunosuppression and carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, **103**, 107S-111S.
- Streuli, M. (1996). Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**, 182-188.
- Su, X.-D., Taddel, N., Stefani, M., Ramponi, G. und Nordlund, P. (1994). The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase. *Nature*, **370**, 575.

- Sullivan, S. G., Chiu, D. T. Y., Errasfa, M., Wang, J. M., Qi, J. S. und Stern, A. (1994). Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on protein tyrosine phosphatase activity in HER 14 cells. *Free Rad. Biol. Med.*, **16**, 399-403.
- Sundaresan, M., Yu, Z.-X., Ferrans, V. J., Irani, K. und Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, **270**, 296-299.
- Swarup, G., Cohen, S. und Garbers, D. L. (1982). Inhibition of membrane phosphotyrosyl phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **107**, 1104-1109.
- Tilly, B. C., van den Berghe, N., Tertoolen, L. G., Edixhoven, M. J. und de Jonge, H. R. (1993). Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J. Biol. Chem.*, **268**, 19919-19922.
- Tokiwa, G., Dikic, I., Lev, S. und Schlessinger, J. (1996). Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science*, **273**, 792-794.
- Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitonov, A., Imyanitov, E., Ullrich, A. und Böhmer, F.-D. (1995). Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatase with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 21277-21284.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D. und Kirilovsky, J. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15771-15781.
- Treisman, R. (1994). Ternary complex factors: Growth factor regulated transcriptional activators. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **4**, 96-101.
- Tyrrell, R. M. (1991). UVA (320-380 nm) radiation as an oxidative stress. In: "Oxidative Stress Oxidants and Antioxidants". Sies, H. (Ed.) Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, London, pp. 57-83,
- Tyrrell, R. M. (1995). Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem. Soc. Symp.*, **61**, 47-53.
- Uckun, F. M., Schieven, G. L., Tuel-Ahlgren, L. M., Dibirdik, I., Myers, D. E., Ledbetter, J. A. und Song, C. W. (1993). Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signaling pathway in human B-lymphocyte precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 252-256.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Downward, J., Mayes, E. L. V., Whittle, N., Waterfield, M. D. und Seeburg, P. H. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**, 418-425.
- Ullrich, A. und Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. und Angel, P. (1995). ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.*, **14**, 1798-1811.

- van den Broeke, L. T., Beijersbergen, G. M. und van Henegouwen, B. (1994). The effect of N-acetylcysteine on the UVB-induced inhibition of epidermal DNA synthesis in rat skin. *J. Photochem. Photobiol. B*, **26**, 271-276.
- van den Broeke, L. T. und Beijersbergen van Henegouwen, G. M. (1995). UV radiation protecting efficacy of cysteine derivatives, studies with UVA-induced binding of 8-MOP and CPZ to rat epidermal biomacromolecules in vivo. *Int. J. Radiat. Biol.*, **67**, 411-420.
- van der Geer, P. und Pawson, T. (1995). The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 277-280.
- van't Veer, L. J., Burgering, B. M., Versteeg, R., Boot, A. J., Ruiters, D. J., Osanto, S., Schrier, P. I. und Bos, J. L. (1989). N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3114-3116.
- Varticovski, L., Harrison-Findik, D., Keeler, M. L. und Susa, M. (1994). Role of PI 3-kinase in mitogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1226**, 1-11.
- Vega, Q. C., Cochet, C., Filhol, O., Chang, C.-P., Rhee, S. G. und Gill, G. N. (1992). A site of tyrosine phosphorylation in the c-terminus of the epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 128-135.
- Vermeer, B. J. und Hurks, M. (1994). The clinical relevance of immunosuppression by UV irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B*, **24**, 149-154.
- Vile, G. F., Iliitschew, A. T. und Tyrrell, R. (1995). Activation of NFkB in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochem. Photobiol.*, **62**, 463-468.
- Viviani, B., Rossi, A. D., Chow, S. C. und Nicotera, P. (1995). Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology*, **16**, 19-25.
- Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. und Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science*, **259**, 1611-1613.
- Vojtek, A. B. und Cooper, J. A. (1995). Rho family members: activators of MAP kinase cascades. *Cell*, **82**, 527-529.
- Wada, T., Qian, X. und Greene, M. I. (1990). Intermolecular association of the p185neu Protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell*, **61**, 1339-1347.
- Warmuth, I., Harth, Y., Matsui, M. S., Wang, N. und DeLeo, V. A. (1994). Ultraviolet radiation induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.*, **54**, 374-376.
- Wasilenko, W. J., Payne, D. M., Fitzgerald, D. L. und Weber, M. J. (1991). Phosphorylation and activation of epidermal growth factor receptors in cells transformed by the src oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 309-321.
- Wax, P. M. und Dockstadter, L. (1995). Tributyltin use in interior paints: a continuing health hazard. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **33**, 239-241.
- Webb, A. R. (1993). Vitamin D Synthesis under changing UV spectra. in: A. R. Young, L. O. Björn, J. Moan and W. Nultsch, Environmental UV Photobiology, Plenum Press, New York. 185-202.

- Whitmarsh, A. J., Shore, P., Sharrocks, A. D. und Davis, R. J. (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science*, **269**, 403-407.
- WHO (1990). Tributyltin Compounds. 273,
- Wilhelm, D., Bender, K., Knebel, A. und Angel, P. (1997). The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including p38 and JNK/SAPK kinases by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.* eingereicht.,
- Wright, J. D., Reuter, C. W. und Weber, M. J. (1995). An incomplete program of cellular tyrosine phosphorylations induced by kinase-defective epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12085-12093.
- Wulff, D. L. (1963). Kinetic of thymine photodimerization in DNA. *Biophys. J.*, **3**, 355-362.
- Xiao, S., Rose, D. W., Sasaoka, T., Maegawa, H., Burke, T. R., Roller, P. P., Shoelson, S. E. und Olefsky, J. M. (1994). Syp (SH-PTP2) is a positive mediator of growth factor-stimulated mitogenic signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21244-21248.
- Xing, J., Ginty, D. D. und Greenberg, M. E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, **273**, 959-963.
- Yan, M., Dai, T., Deak, J. C., Kyriakis, J. M., Zon, L. I., Woodgett, J. R. und Templeton, D. J. (1994). Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature*, **372**, 798-800.
- Yarosh, D. B. und Kripke, M. L. (1996). DNA repair and cytokines in antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat. Res.*, **350**, 255-260.
- Zhang, Z. Y., Wang, Y., Wu, L., Fauman, E. B., Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Saper, M. A. und Dixon, J. E. (1994). The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis. *Biochemistry*, **33**, 15266-15270.
- Zheng, Z. S., Chen, R. Z. und Prystowsky, J. H. (1993). UVB radiation induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor, decrease EGF binding and blocks EGF induction of ornithine decarboxylase gene expression in SV40-transformed human keratinocytes. *Exp. Dermatol.*, **2**, 257-265.