

# Der epidermale Wachstumsfaktor (Nobel-Vortrag)\*\*

Von Stanley Cohen\*

## 1. Einleitung

Experimentelle Embryologie, Endokrinologie, Zellbiologie, Biochemie und Molekularbiologie lieferten die wesentlichen Ergebnisse, aufgrund derer man allmählich die komplizierten regulatorischen Prozesse während der Embryonalentwicklung zu verstehen beginnt. Während man die Bedeutung der „klassischen“ Hormone für die Kontrolle von Wachstum und Entwicklung schon lange erkannt hat, wissen wir heute, daß noch viel mehr interzelluläre Signale an diesen äußerst komplexen Prozessen beteiligt sind. Die erst kürzlich erzielten Fortschritte auf diesem Gebiet haben überraschenderweise auch Erkenntnisse über Mechanismen erbracht, die zu einem genaueren Verständnis wichtiger biomedizinischer Fragen, wie z.B. des Wachstumsverhaltens maligner Zellen, führen können.

Während der letzten dreißig Jahre richteten sich meine eigenen Bemühungen in diesem Forschungsgebiet darauf, zwei biologische Beobachtungen auf biochemischer Ebene zu verstehen; beide waren zuerst am Institut für Zoologie der Washington University, St. Louis, das damals von Dr. *Viktor Hamburger* geleitet wurde, gemacht worden. Die erste Beobachtung war die von Dr. *Rita Levi-Montalcini*, die feststellte, daß bestimmte Tumoren der Maus nach Implantation in Hühnerembryonen einen Faktor freisetzen, der das Wachstum spezifischer embryonaler Neuronen stimuliert. Die zweite Beobachtung<sup>[1]</sup> machte ich während meiner Untersuchungen am Nervenwachstumsfaktor aus der Unterkieferspeicheldrüse der männlichen Maus. Spritzte man Rohextrakte dieser Speicheldrüsen in neugeborene Mäuse, so stellte man unerwartete „Nebeneffekte“ fest, die in keiner Beziehung zu den Aktivitäten des Nervenwachstumsfaktors standen. Dazu gehörten das vorzeitige Öffnen der Augenlider (6–7 Tage, im Vergleich zu 12–14 Tagen bei den Kontrolltieren) und der vorzeitige Durchbruch der Zähne (5–6 Tage, im Vergleich zu 8–10 Tagen bei den Kontrolltieren).

Nach meinem Wechsel 1959 an das biochemische Institut der Vanderbilt University sollten diese „Nebeneffekte“ der Schwerpunkt meiner Forschungsarbeit werden. Aufgrund meiner Ausbildung in Embryologie hatte ich das Gefühl, daß jede Substanz, die den Zeitplan bestimmter Entwicklungsprozesse ändert, biologisch wichtig sei. Damals konnte ich natürlich noch nicht vorhersehen, daß der biochemische Mechanismus, durch den diese Extrakte das vorzeitige Öffnen der Augenlider induzieren, mit den Mechanismen in Beziehung stehen würde, die an der onkogenen Transformation durch eine bestimmte Klasse von Re-

troviren beteiligt sind. Die folgenden Ausführungen fassen kurz einige der Überlegungen und Schlüsselexperimente zusammen, die zu unserem heutigen Verständnis des epidermalen Wachstumsfaktors (epidermal growth factor, EGF) geführt haben.

## 2. Das erste Jahrzehnt

Ich verwendete das vorzeitige Öffnen der Augenlider als Testsystem und konnte so zu Beginn der sechziger Jahre den Faktor, der für diese Effekte verantwortlich ist, als kleines Protein aus der Speicheldürse der Maus isolieren<sup>[2]</sup>. Die histologische Untersuchung (vgl. Abb. 1) von Kontrolltieren und von Tieren (Mäuse, Ratten, Kaninchen), die mit EGF behandelt worden waren, ergab, daß die frühzeitige Trennung der Augenlider nur die Folge eines allgemeineren biologischen Effekts war, nämlich einer Beschleunigung des epidermalen Wachstums und der Keratinisierung<sup>[3]</sup>. Der scheinbar durch den EGF hervorgerufene vorzeitige Durchbruch der Schneidezähne wurde in Wirklichkeit durch eine schnellere Differenzierung der Lippen der behandelten Tiere verursacht.



Abb. 1. Querschnitte des Gebiets um das Augenlid von Kontroll-Ratten (a) und acht Tage alten behandelten Ratten (b). Die behandelten Tiere hatten täglich Injektionen (1 µg pro Gramm Körpergewicht) des aktiven Proteins erhalten. 100fache Vergrößerung. (Quelle: *J. Invest. Dermatol.* 40 (1963) 1–5.)

Da dies Experimente an lebenden Tieren waren, standen wir vor dem Problem, ob der Faktor direkt auf Epidermalzellen einwirkt, oder ob das Wachstum indirekt induziert wird, vielleicht durch vermehrte Produkten eines „klassischen“ Hormons.

Die Methoden zur Züchtung von Gewebe- und Organkulturen schienen bestens für die Lösung dieses Problems geeignet zu sein. Eine vorläufige Untersuchung mit Organkulturen wurde während eines Freisemesters am Istituto Superiore di Sanità in Rom in Zusammenarbeit mit Dr. *Rita Levi-Montalcini* und Dr. *Domenica Attardi* durchgeführt und später an der Vanderbilt University fortgesetzt. Der Name *epidermal growth factor* wurde zum ersten Mal in den ursprünglichen Veröffentlichungen dieser Studien verwendet<sup>[4]</sup>. Die Ergebnisse zeigten, daß EGF direkt die Proliferation von Epidermalzellen in Organkulturen der

[\*] Prof. Dr. S. Cohen  
Department of Biochemistry, Vanderbilt University  
School of Medicine  
Nashville, TN 37232 (USA)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1987. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Haut von Hühnerembryonen stimuliert. Diese mitogene Wirkung von EGF hing deshalb nicht notwendigerweise von anderen systemischen oder hormonellen Einflüssen ab. Während dieser Experimente fanden wir auch noch andere Tiere, die auf EGF ansprachen, darunter Vögel ebenso wie Säugetiere, so daß wir vermuteten, daß die Kenntnis der evolutionären Ursprünge von EGF einen Beitrag zu unserem Verständnis erbringen würde.

Bis etwa 1970 hatten wir eine Vielfalt an Informationen gesammelt, die viele Teilbereiche der Physiologie des EGFs betrafen:

1. Wir beschrieben eine Reihe von Stoffwechselveränderungen (vermehrte Polysomenbildung, Induktion der Ornithin-Decarboxylase etc.), die mit dem wachstumsfördernden Effekt von EGF auf Epidermalzellen einhergehen. Von vielen dieser Veränderungen weiß man heute, daß sie in recht unterschiedlichen Zellen nach Applikation eines Wachstumstimulus stattfinden.
2. Wir identifizierten die Zellen der Speicheldrüsentubuli, die in der Maus sexuellen Dimorphismus zeigen, als den hauptsächlichen Syntheseort von EGF in dieser Spezies und stellten mit Hilfe eines Radioimmunoassays fest, daß die Synthese von EGF, besonders in der weiblichen Maus, durch die Verabreichung von Testosteron gesteigert wird.
3. Wir konnten zeigen, daß EGF in Rohhomogenaten der Speicheldrüse der Maus als nicht kovalent gebundener Komplex von hohem Molekulargewicht (ca. 75 000 Da) existiert, der aus zwei Molekülen EGF und aus zwei Molekülen eines EGF-Bindungsproteins, das Arginyl-Esteraseaktivität aufweist, besteht.
4. Auf mehr praxisbezogener Ebene fanden wir und andere Gruppen, daß die lokale Applikation von EGF die Reepithelisierung der Hornhaut in Kaninchen mit Hornhautverletzungen fördert.

Der Leser sei auf einige frühere Übersichtsartikel verwiesen, in denen diese Ergebnisse genauer dargestellt sind und wo weitere Literaturhinweise gegeben werden<sup>[6, 7]</sup>. Am Ende dieses ersten Jahrzehnts war ich überzeugt, daß EGF eine normale physiologische Rolle in vielen Spezies entweder während der Embryonalentwicklung oder bei der Homöostase spielt. Für die Zukunft stellte sich aber noch die Aufgabe herauszufinden, was dies für eine Rolle im lebenden Tier ist, und wie EGF auf molekularer Ebene mit Zellen in Wechselwirkung tritt.

### 3. Das zweite Jahrzehnt

In den frühen siebziger Jahren entwickelten wir eine Methode, mit der wir schnell und im wesentlichen in zwei Schritten Milligramm-Mengen an EGF aus der Speicheldrüse der Maus (mEGF) isolieren konnten<sup>[7]</sup>; dies ermöglichte die Reinigung von mEGF in Mengen, die für eine sorgfältige Charakterisierung ausreichten. Dieser technische Fortschritt öffnete die Tür für die Anwendung vieler biochemischer Methoden und damit für die Gewinnung neuer Erkenntnisse. Die Aminosäureanalyse ergab, daß mEGF ein Polypeptid aus 53 Aminosäuren ist, das keine Alanyl-, Phenylalanyl- und Lysylreste enthält<sup>[8]</sup>. Die Pri-

märstruktur von mEGF<sup>[9]</sup> und die Positionen der drei internen Disulfidbrücken<sup>[10]</sup> wurden bestimmt und sind in Abbildung 2 wiedergegeben. Obwohl mEGF noch nicht kristallisiert werden konnte und somit noch keine Röntgenstrukturanalyse vorliegt, spricht doch eine Vielzahl von spektroskopischen Daten dafür, daß das Hormon wenig periodische Sekundärstruktur enthält; β-Faltblattstrukturen sind vorhanden (vgl. Übersicht<sup>[11]</sup>).

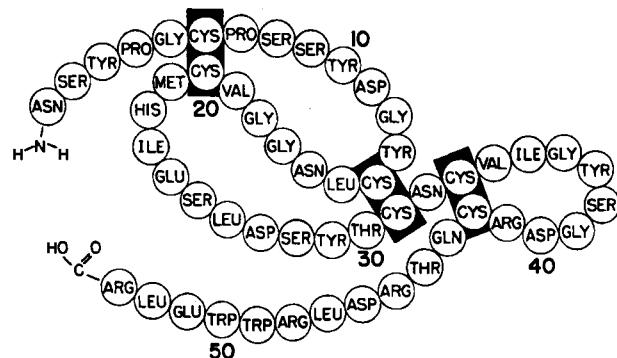


Abb. 2. Die Aminosäuresequenz von EGF mit den Positionen der Disulfidbrücken. (Quelle: *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 7669–7672.)

Ungefähr zu dieser Zeit (1973) entdeckte man einen neuen Aspekt der Biologie von EGF. *Armelin*<sup>[12]</sup> sowie *Hollenberg* und *Cuatrecasas*<sup>[13]</sup> berichteten als erste, daß Fibroblasten in Kultur auf EGF mit gesteigerter DNA-Synthese reagieren. Diese Befunde wurden in unserem Laboratorium an menschlichen Fibroblasten erhärtet<sup>[14, 15]</sup>.

Da also EGF aus der Maus ein starkes Mitogen für menschliche Zellen ist, müssen Rezeptoren für EGF auf menschlichen Zellen vorhanden sein, und man müßte deshalb ein dem EGF ähnliches Polypeptid in menschlichem Gewebe finden. Auf zwei Wegen versuchten wir, EGF-ähnliche Moleküle aus dem menschlichen Urin zu isolieren. Zuerst benützten wir eine Immunoaffinitätssäule (mit Anti-Maus-EGF-Antikörpern), mit der wir aus menschlichem Urin eine Substanz anreicherten, die dem Hormon aus der Maus in ihrer biologischen Aktivität ähnelt<sup>[16]</sup>. Als zweiten Ansatz entwickelten wir einen sensitiven und spezifischen kompetitiven Bindungstest für EGF-ähnliche Polypeptide, wofür wir menschliche Fibroblasten in Kultur und <sup>125</sup>Iod-markierten mEGF verwendeten. Dies ermöglichte die Isolierung von Mikrogramm-Mengen reinen Wachstumsfaktors aus Proteinkonzentraten menschlichen Urins<sup>[17]</sup>. Die biologischen Effekte des gereinigten menschlichen Polypeptids waren qualitativ die gleichen, die zuvor für den Wachstumsfaktor aus der Maus beschrieben wurden. Dazu gehörten sowohl die Stimulation der Proliferation von Fibroblasten und Epithelzellen der Hornhaut *in vitro* als auch die Induktion des vorzeitigen Öffnens der Augenlider bei neugeborenen Mäusen, noch immer der spezifischste biologische Test auf EGF. Die Aminosäurezusammensetzung des menschlichen und des Maus-Polypeptids war unterschiedlich, aber Ähnlichkeiten konnten doch eindeutig festgestellt werden. Beide Polypeptide konkurrierten offensichtlich um dieselbe Bindungsstelle auf der Zellmembran, und Antikörper gegen das Polypeptid aus der Maus zeigten Kreuzreaktion mit dem menschlichen Hormon. Wir folgerten daraus, daß wir das menschliche Gegenstück zum mEGF isoliert hatten.

Wie es oft in den Naturwissenschaften vorkommt, so tauchte auch hier ein unerwarteter und völlig neuer Aspekt der Biologie des EGFs auf, als nämlich *Gregory* veröffentlichte<sup>[18]</sup>, daß Urogastron, ein antisekretorisches Hormon des Magens, das er aus dem menschlichen Urin isoliert hatte, anscheinend identisch mit dem menschlichen EGF und nahe verwandt dem mEGF ist. Man nimmt heute an, daß menschlicher EGF (Urogastron) und mEGF identische Reaktionen in allen Zielzellen hervorrufen. Die Beziehung zwischen menschlichem EGF und Urogastron konnte nur aus einem strukturellen Vergleich dieser Moleküle abgeleitet werden; bis heute gibt es keine Erklärung, die die Inhibition der Säuresekretion und die Stimulation des Zellwachstums miteinander verknüpfen kann.

Als wir nun ein Zellkultursystem (menschliche Fibroblasten) in der Hand hatten, in dem EGF als „Wachstumsfaktor“ wirkte, waren wir 1975 mit einer ungeheuer schwierigen Frage konfrontiert: Auf welche Weise stimuliert EGF das Zellwachstum? Obwohl neuronale Aufnahme und retrograder Transport des Nervenwachstumsfaktors 1974 nachgewiesen worden waren<sup>[19]</sup>, waren doch fast alle Endokrinologen der Meinung, daß Peptidhormone nach Bindung an ihre Rezeptoren auf der Plasmamembran wieder in den extrazellulären Raum abgegeben werden.

Unsere ersten Experimente<sup>[20]</sup> mit <sup>125</sup>I-EGF und menschlichen Fibroblasten bestätigten die Gegenwart von EGF-Rezeptoren auf der Plasmamembran. Außerdem machten wir zwei zusätzliche bedeutsame Beobachtungen. Erstens: Der Bindung von <sup>125</sup>I-EGF an die Zelloberfläche intakter Fibroblasten folgte der schnelle proteolytische Abbau des Wachstumsfaktors durch einen zellvermittelten Prozeß. Zweitens: NRK-Zellen verloren offensichtlich nach Transformation durch das Kirsten-Virus ihre Fähigkeit, <sup>125</sup>I-EGF zu binden. Die erste Beobachtung veranlaßte uns, die Möglichkeit zu untersuchen, daß zellgebundener EGF vor dem Abbau internalisiert wird<sup>[21]</sup>. Die andere Beobachtung wurde später dahingehend verallgemeinert, daß sie eine Vielzahl von Zellen einschloß, die durch Retroviren transformiert werden<sup>[22]</sup>; sie führte schließlich dazu, daß *George Todaro* und andere das dem EGF verwandte Polypeptid  $\alpha$ -transformierender Wachstumsfaktor ( $\alpha$ -transforming growth factor,  $\alpha$ -TGF) isolierten und die „autokrine Hypothese“ formulierten<sup>[22]</sup>.

Ein erster Schritt zur Charakterisierung der biochemischen Vorgänge während und nach der Bindung von EGF an die Zelloberfläche war die Untersuchung des weiteren Weges des gebundenen Hormons im Stoffwechsel. Wir folgerten<sup>[21]</sup>, daß nach der Bindung von <sup>125</sup>I-EGF an spezifische Plasmamembranrezeptoren der EGF-Rezeptorkomplex internalisiert und das Hormon schließlich in den Lysosomen abgebaut wird. Diese Schlußfolgerungen aus den Untersuchungen zur Wechselwirkung von <sup>125</sup>I-EGF mit menschlichen Fibroblasten basierten auf folgenden Beobachtungen:

1. Zellgebundener <sup>125</sup>I-EGF wurde bei 37°C schnell zu [<sup>125</sup>I]Monoiodtyrosin abgebaut. Bei 0°C aber wurde zellgebundener <sup>125</sup>I-EGF nicht abgebaut, sondern wieder langsam von der Zelloberfläche abgespalten.
2. Ließ man <sup>125</sup>I-EGF zuerst bei 37°C an die Zellen binden und inkubierte diese dann bei 0°C, so konnte fast

keine Freisetzung zellgebundener Radioaktivität festgestellt werden.

3. Stoffwechselenergie wurde für den Abbau von <sup>125</sup>I-EGF, aber nicht für seine Bindung benötigt.
4. Der Abbau wurde durch Pharmaka inhibiert, die die lysosomale Funktion beeinträchtigen, z. B. Chloroquin und Ammoniumchlorid.
5. Wurde <sup>125</sup>I-EGF bei 0°C von Zellen gebunden, so war das Hormon leicht für Substanzen zugänglich, die mit EGF auf der Zelloberfläche reagieren konnten, z. B. Trypsin oder Antikörper gegen EGF. Wenn aber das Hormon bei 37°C an die Zellen gebunden wurde, so konnten diese Reagentien nicht im gleichen Ausmaß auf EGF wirken.
6. Wenn man Fibroblasten mit EGF inkubierte, trat ein Verlust an EGF-Rezeptoren ein.

Zusammengenommen lieferten diese Beobachtungen, die später noch von anderen auf eine Vielzahl von Polypeptidhormonen ausgedehnt wurden, einen quantitativen biochemischen Beweis für einen komplexen Mechanismus, über den Zellen mit extrazellulären regulatorischen Signalen in Wechselwirkung treten.

Es war eine Herausforderung, die Internalisierung von EGF direkt sichtbar zu machen; um dies zu erreichen, schlugen wir drei Wege ein: Wir synthetisierten fluoreszierende EGF-Derivate und verfolgten ihren Weg auf und in der Zelle<sup>[23, 24]</sup>; wir spürten dem Schicksal von <sup>125</sup>I-EGF durch elektronenmikroskopische Autoradiographie nach<sup>[25]</sup>, und wir synthetisierten EGF-Ferritin-Konjugate und verfolgten deren Weg elektronenmikroskopisch<sup>[26, 27]</sup>.

Obwohl alle drei morphologischen Ansätze die ursprünglichen biochemischen Untersuchungen mit <sup>125</sup>I-EGF bestätigten<sup>[21]</sup>, so zeigte doch die Verwendung des biologisch aktiven EGF-Ferritin-Konjugats am klarsten und auf direktem Weg das metabolische Schicksal von EGF. Bei 4°C band das Konjugat an die Plasmamembran der Zellen und schien nach einem Zufallsmuster auf spezifische Rezeptorbindungsstellen verteilt zu sein. Erwärmte man die Zellen auf 37°C, so verteilte sich EGF-Ferritin auf der Oberfläche der Plasmamembran neu und bildete innerhalb 1 min viele kleine Cluster. Diese Cluster aus rezeptorgebundenen EGF-Ferritin-Molekülen wurden dann schnell in endocytotische Vesikel internalisiert. Innerhalb von 30 min konnte man ungefähr 84% des Ferritins in multivesikulären Gebilden finden, die offenbar mit den Lysosomen in Beziehung standen. So erhielten wir auch einen morphologischen Beweis für die Hypothese, daß das „Herunterregulieren“ (down regulation) von EGF-Oberflächenrezeptoren die Internalisierung intakter Hormonrezeptorkomplexe mit sich bringt. Unsere Schlußfolgerungen sind in Abbildung 3 dargestellt. Später zeigten Markierungsexperimente und die Immunpräzipitation mit Anti-Rezeptor-Antikörpern, daß die EGF-vermittelte Internalisierung des EGF-Rezeptor-Komplexes nicht nur den Abbau von EGF, sondern auch den beschleunigten Abbau des EGF-Rezeptors zur Folge hat<sup>[28]</sup>.

Wesentlich auf diesem Teilgebiet der Hormonforschung ist die Frage, ob das intrazelluläre Prozessieren der Hormone und ihrer Rezeptoren mit der Erzeugung von biologischen Reaktionen auf das Hormon in Beziehung steht oder sogar dafür notwendig ist. Meiner Meinung nach gibt

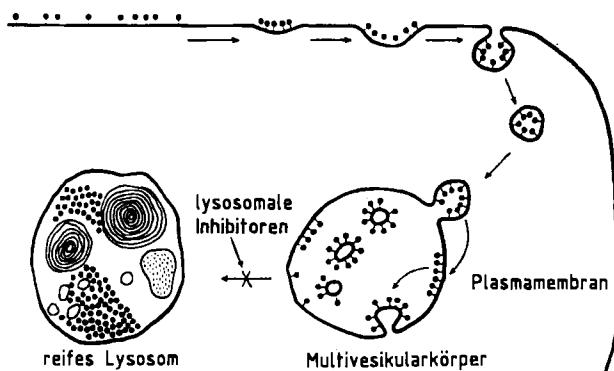


Abb. 3. Schema der Wechselwirkung von Ferritin-EGF mit A-431-Zellen. Ferritin-EGF-Rezeptorkomplexe, die durch die charakteristische räumliche Verteilung der Partikel auf der Membran (4-6 nm Abstand) identifiziert werden können, sind schon nach der ersten Bindung deutlich zu sehen; sie werden während der Umverteilung zu Clustern, der Pinocytose und des Einbaus in Multivesikulärkörper beibehalten. Weitere Inkubation bei 37°C führt zur Spaltung des Ferritin-EGF-Rezeptorkomplexes; dies kann durch den Pool an freiem Ferritin nachgewiesen werden; Anwesenheit von Aminen inhibiert diesen Zerfall. (Quelle: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 5689-5693.)

es keinen experimentellen Hinweis für eine eindeutige Beantwortung dieser wichtigen Frage.

Da wir also nicht in der Lage waren, die Bedeutung der rezeptorvermittelten Internalisierung für die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors genau zu beschreiben, und da wir der Meinung waren, daß die Veränderungen, die EGF in der Zelle induzierte, aus der Vervielfältigung und Fortpflanzung einer Serie von Signalen resultieren, die während der Bindung und Internalisierung des Hormons erzeugt werden, dachten wir gegen Ende der siebziger Jahre daran, ein zellfreies System zu suchen, das *in vitro* auf die Applikation von EGF reagiert. Da auf A-431, einer Hautcarcinom-Zelllinie des Menschen, eine außerordentlich hohe Konzentration an EGF-Rezeptoren ( $2-3 \cdot 10^6$  Rezeptoren/Zelle) nachgewiesen worden war<sup>[29, 24]</sup>, benützten wir eine Membranpräparation dieser Zellen, um nach einer EGF-abhängigen Veränderung der Membranstruktur und/oder -funktion zu suchen. Wie der methodische Wendepunkt der schnellen Reinigung von Milligramm-Mengen an EGF (siehe Beginn dieses Abschnitts), so war auch die Identifizierung der A-431-Zelllinie als eine reichhaltige Quelle von EGF-Rezeptoren wesentlich sowohl für biochemische als auch für molekularbiologische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von EGF.

Erwartungsgemäß konnten Membranen dieser Zellen spezifisch relativ große Mengen an  $^{125}\text{I}$ -EGF binden. Da Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen an der Kontrolle vieler Stoffwechselwege beteiligt sind, und da Membranen endogene Protein-Kinasen und -Phosphatasen enthalten, versuchten wir, die Rolle von EGF als möglichem Modulator dieser regulatorischen Prozesse aufzuklären<sup>[30]</sup>. Teile der A-431-Membranpräparation wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, endogene Membrankomponenten zu phosphorylieren. Außerdem untersuchten wir, ob die Bindung von EGF eine Störung dieses biochemischen Systems zur Folge hatte. Die Inkubation von A-431-Membranen mit  $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP bei 0°C in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  führte zum Einbau von Radioaktivität in Material, das in Trichloressigsäure nicht löslich war. Eine Schlüsselstellung nahm dabei die Entdeckung ein, daß sich die Phosphorylierung von endogenen

membranassoziierten Proteinen auf das Dreifache erhöhte, wenn EGF der Reaktionsmischung zugesetzt wurde (Abb. 4).

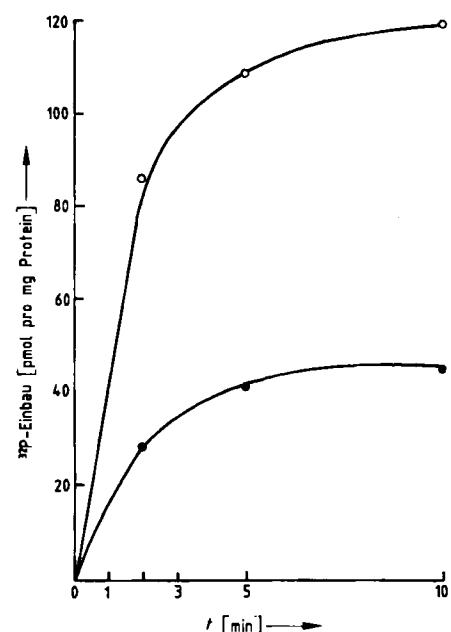


Abb. 4. EGF-stimulierter Einbau von  $^{32}\text{P}$ -Phosphat aus  $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP in Zellmembranen. Die Reaktionsmischung enthielt A-431-Membranen (27  $\mu\text{g}$  Protein), HEPES-Puffer (20 mM, pH 7.4),  $\text{MnCl}_2$  (1 mM),  $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP (15  $\mu\text{M}$ ,  $8 \cdot 10^5$  cpm), EGF (40 ng) und Rinderserumalbumin (7.5  $\mu\text{g}$ ) in einem Endvolumen von 60  $\mu\text{l}$ . Die Reaktionsgefäß wurde auf Eis 10 min mit (○) oder ohne (●) EGF vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von radioaktiv markiertem ATP gestartet und die Inkubation bei 0°C für die angegebenen Zeiten fortgesetzt. Die Reaktion wurde beendet, indem 50  $\mu\text{l}$ -Aliquote auf quadratische (4  $\text{cm}^2$ ) Whatman-Filterpapiere (3 MM) pipettiert wurden. Das Papier wurde sofort in kalter 10proz. Trichloressigsäure in 0.01 M Natriumpyrophosphatpuffer getaucht und nach gründlichem Waschen mit der gleichen Lösung mit Alkohol und Ether extrahiert. Nach Trocknung wurde die Radioaktivität in einem Nuclear-Chicago-Gasflüssigzähler bestimmt (Quelle: *Nature* 276 (1978) 409-410).

Der erhöhte Einbau von  $^{32}\text{P}$  in Membranpräparationen war für EGF spezifisch; als hauptsächliche phosphorylierte Membrankomponenten konnten Proteine mit Molekulargewichten von ca. 170 000 Da und 150 000 Da gefunden werden. EGF stimulierte in den A-431-Membranpräparationen nicht nur die Phosphorylierung endogener Membranproteine, sondern auch die einer Vielzahl exogener Proteinsubstrate.

Damals (1978) wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Phosphorylierung von Membranen oder Membrankomponenten das primäre Ereignis in der Erzeugung intrazellulärer Signale der Wachstumsregulation von Zellen sein könnte. Der Leser sei auf einen Übersichtsartikel verwiesen<sup>[31]</sup>, der unseren Kenntnisstand im Jahre 1979 zusammenfaßt. Am Ende dieses zweiten Jahrzehnts war ich ermutigt und begeistert darüber, daß wir bedeutende Fortschritte beim Verständnis des Wirkungsmechanismus von EGF auf zellulärer und biochemischer Ebene erzielt hatten.

#### 4. Das dritte Jahrzehnt

Die Entdeckung der direkten Beeinflussung einer chemischen Reaktion in einem zellfreien System durch EGF

führte zu einer genaueren biochemischen Charakterisierung dieser Reaktion in A-431-Membranen. Außerdem untersuchten wir auch Membranpräparationen gesunder menschlicher Placenta und menschlicher Fibroblasten in Kultur<sup>[32-34]</sup>. Die EGF-stimulierte Kinaseaktivität der A-431-Membranen ging nicht verloren, wenn die Membranen mit verschiedenen Lösungen, z. B. solchen mit hoher Salz- oder Harnstoffkonzentration extrahiert wurden; Kinase, Rezeptor und Substrate mußten also integrale Membranproteine sein. Zu dieser Zeit kannten wir die Veröffentlichungen verschiedener Laboratorien<sup>[35-37]</sup>, in denen berichtet wurde, daß das Molekulargewicht des mutmaßlichen EGF-Rezeptors, bestimmt durch Quervernetzungsexperimente mit <sup>125</sup>I-EGF, von der gleichen Größenordnung war wie das unserer phosphorylierten Membranglycoproteine (150-170 kDa).

Unsere Untersuchungen lieferten die folgenden Befunde zum Mechanismus, durch den EGF die Proteinphosphorylierung in dem zellfreien A-431-Membransystem reguliert:

1. Aktivierung der membranassoziierten Kinaseaktivität durch EGF ist ein schneller Prozeß, sogar bei 0°C.
2. Dephosphorylierungsreaktionen in der Membran sind ebenfalls sehr schnell, werden aber nicht durch EGF beeinflußt.
3. EGF setzt aus der Membran keine lösliche Protein-Kinase und auch keinen Modulator der Kinase frei.
4. Die EGF-induzierte Aktivierung der Membran-Kinase kann aufgehoben werden, wenn man das Hormon durch Anti-EGF-IgG von der Membran verdrängt; proteolytische Aktivierung findet also nicht statt.

Da es eindeutige Hinweise auf unterschiedliche Hitze-sensitivitäten von Rezeptor und Kinase gab<sup>[32]</sup>, nahmen wir zunächst an, daß mindestens zwei molekulare Spezies vorliegen. Dennoch wurde die Möglichkeit, daß Rezeptor- und Kinaseaktivitäten im gleichen Molekül vereint sind, durch zwei unerwartete Beobachtungen wieder zur Diskussion gestellt. Erstens: A-431-Membranen konnten mit Detergentien solubilisiert werden, ohne daß die durch EGF gesteigerte Phosphorylierungsaktivität oder die Bindungsaktivität für <sup>125</sup>I-EGF verloren gingen. Zweitens: EGF-Rezeptor, EGF-abhängige Kinaseaktivität und das Substrat wurden durch EGF-Affinitätschromatographie zusammen als ein Protein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa gereinigt.

Wir hatten zunächst berichtet<sup>[32]</sup>, daß die durch EGF stimulierte Proteinkinase hauptsächlich Threoninreste phosphoryliert, und daß sie darin und in anderer Hinsicht der Kinaseaktivität des transformierenden Proteins des Rous-Sarcoma-Virus (RSV) ähnlich ist. Bald darauf aber wurde mitgeteilt, daß die RSV-assoziierte Proteinkinase und andere Proteinkinasen aus Tumviren<sup>[38,39]</sup> Tyrosinreste phosphorylieren; diese waren früher fälschlicherweise als Threoninreste identifiziert worden, da die beiden phosphorylierten Aminosäuren in dem damals verwendeten Elektrophoresesystem gleiche Wanderungseigenschaften zeigten. Da wir ein ähnliches Elektrophoresesystem benutzt hatten, untersuchten wir erneut die durch EGF stimulierte Proteinkinasereaktion und fanden, daß die affinitätsgekennzeichnete Rezeptorkinase ebenfalls Tyrosinreste phosphoryliert<sup>[40]</sup>.

Um zu prüfen, ob die mit dem EGF-Rezeptor assoziierte Kinaseaktivität vielleicht von einer geringen Verunreinigung mit pp60<sup>src</sup> herrührt, untersuchten wir eine mögliche Wechselwirkung der EGF-Rezeptorkinasepräparation mit pp60<sup>src</sup>-Antiseren. Obwohl die Rezeptorkinase diese Antisrc-Antikörper spezifisch phosphorylieren konnte, wurde die Rezeptorkinase nicht durch diese Antiseren präzipitiert<sup>[41,42]</sup>. Diese Ergebnisse deuten wir dahingehend, daß die EGF-Rezeptorkinase vielleicht mit pp60<sup>src</sup> verwandt, aber nicht identisch ist.

Danach versuchten wir, den EGF-Rezeptor weiter zu reinigen<sup>[43]</sup>. Als wir die bereits beschriebene Affinitätschromatographie-Methode<sup>[34]</sup> auf A-431-Membranvesikel in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> anwendeten, konnten wir die Rezeptorkinase als ein Protein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa isolieren. Es konnte gezeigt werden, daß das 150 kDa-Rezeptorprotein, das ursprünglich in Membranpräparationen nachgewiesen worden war, ein proteolytisches Fragment der nativen 170 kDa-Spezies war, das durch die Wirkung einer Ca<sup>2+</sup>-abhängigen neutralen Protease entstand<sup>[44,45]</sup>.

Daß sowohl die 170 kDa- als auch die 150 kDa-Präparation Rezeptoreigenschaften hat, konnte nicht nur durch ihre Fähigkeit, <sup>125</sup>I-EGF zu binden, sondern auch durch kovalente Quervernetzung mit <sup>125</sup>I-EGF demonstriert werden. Der wesentliche funktionelle Unterschied der beiden Präparationen war offensichtlich die Fähigkeit einer fünf- bis zehnmal schnelleren „Autophosphorylierung“ bei der 170 kDa-Spezies. Diese Beobachtung können wir verstehen, seit wir wissen, daß sich die meisten autophosphorylierten Tyrosinreste nahe am Carboxyende des 170 kDa-Rezeptors befinden und im proteolytischen 150 kDa-Fragment fehlen.

Wir wollten die Frage, ob die drei Domänen in unserer Rezeptorpräparation – Bindungsstelle, Kinase und Substrat – in einem oder in mehreren Molekülen lokalisiert sind, durch die Anwendung „schärferer“ Reinigungsmethoden entscheiden. Die drei Domänen blieben nicht nur nach EGF-Affinitätschromatographie, sondern auch nach Chromatographie an Linsen-Lektin-Sepharose assoziiert; Rezeptor und Kinase sind also mit lektinreaktiven Kohlenhydratresten verknüpft. Noch entscheidender war der Befund, daß die drei nachweisbaren Domänen auch nach Elektrophorese in nicht denaturierenden Gelen und nach Immunpräzipitation mit Antiseren gegen den gereinigten Rezeptor assoziiert bleiben. Obwohl diese Ergebnisse noch nicht als endgültig angesehen werden konnten, ermutigten sie doch zu der Spekulation, daß alle drei Domänen in einem Molekül vorhanden sind.

Das Problem wurde durch eine Reihe von Experimenten gelöst, die die EGF-stimulierte Kinase durch Affinitätsmarkierung identifizieren sollten<sup>[46,47]</sup>. Die EGF-stimulierte Kinase wurde irreversibel inhibiert, wenn man A-431-Membranvesikel mit 5'-(*p*-Fluorosulfonylbenzyl)adenosin (5'-*p*-FSO<sub>2</sub>BzAdo) behandelte. Diese Verbindung war als Affinitätsmarker für ATP- oder ADP-Bindungsstellen in einer Vielzahl von Enzymen charakterisiert worden. Markierte man A-431-Membranvesikel mit 5'-*p*-FSO<sub>2</sub>Bz-[<sup>14</sup>C]Ado und unterwarf sie dann einer (denaturierenden) Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamid-Gelektrophorese mit anschließender Autoradiographie, so stellte sich heraus, daß der Großteil des kovalent gebunde-

nen Affinitätsmarkers mit dem 170 kDa-Rezeptor und dessen proteolytischem 150 kDa-Fragment wanderte. Die Markierung erfolgte an einer ATP-Bindungsstelle, da sie durch 5'-Adenylylimidodiphosphat (AMP-PNP), einem hydrolyseresistenten ATP-Analogon, aber nicht durch Adenosin, AMP, ADP, GTP oder NAD inhibiert wurde. Markierte man außerdem A-431-Vesikel oder Membranen mit 5'-p-FSO<sub>2</sub>Bz [<sup>14</sup>C]Ado, so konnte der Rezeptor unter Bedingungen gereinigt werden, unter denen bereits früher Rezeptor und Kinase zusammen isoliert worden waren. Der Rezeptor war die einzige Komponente der gereinigten Präparation, die Affinitätsmarker in nachweisbaren Mengen enthielt. Wir folgerten daraus, daß der Rezeptor und die Kinase zwei Domänen auf demselben Polypeptid sind. Inaktivierten wir schließlich die EGF-sensitive Kinaseaktivität durch leichtes Erwärmen oder durch Einwirkung von N-Ethylmaleimid, so konnten die 150 kDa- und 170 kDa-Rezeptorspezies nicht mit dem ATP-Affinitätsmarker gekennzeichnet werden. Der Mechanismus, über den die Bindung von EGF an die externe Domäne des Rezeptors die cytoplasmatische katalytische Domäne aktiviert, ist noch nicht bekannt<sup>[11, 48]</sup>.

Da verschiedene Lektine die Bindung von <sup>125</sup>I-EGF an menschliche Fibroblasten in Kultur<sup>[49]</sup> oder an Membranen der menschlichen Placenta<sup>[50]</sup> inhibieren und da der Rezeptor durch Lektinchromatographie gereinigt werden kann<sup>[51]</sup>, folgerte man schon bald, daß es sich bei dem Rezeptor um ein Glycoprotein handelt. Biosynthese und Glycosylierung des Rezeptors in A-431-Zellen wurden kürzlich mehrfach untersucht; dabei wurden die Stoffwechselwege der Zellen markiert und die Rezeptorspezies durch Immunpräzipitation identifiziert<sup>[48, 52]</sup>.

Ich kann an dieser Stelle nicht die zahllosen Veröffentlichungen erörtern, die EGF und seinen Rezeptor in Biologie und Medizin zum Inhalt haben. Der Leser sei auf einige kürzlich erschienene Übersichtsartikel verwiesen, die verschiedene Gesichtspunkte dieses stetig sich ausweitenden Forschungsgebietes zusammenfassen<sup>[11, 48, 53, 54]</sup>.

Ich möchte jetzt noch kurz auf einige wichtige Ergebnisse hinweisen, die in anderen Laboratorien erarbeitet wurden, und von denen ich glaube, daß sie zu einem besseren Verständnis der Rolle von EGF und seines Rezeptors sowie dessen Kinase in der Wachstumsregulation führen werden.

1. Die Aminosäuresequenz des EGF-Rezeptors wurde aus der Nucleotidsequenz von cDNA-Klonen abgeleitet; dabei entdeckte man, daß sich das Gen des v-erb-B-transformierenden Proteins des Erythroblastose-Virus der Vögel wahrscheinlich vom EGF-Rezeptor-Gen der Vögel ableitet<sup>[55]</sup>.
2. Die Nucleotidsequenz der cDNA des Präpro-EGFs wurde aufgeklärt; sie sagt ein Vorläuferprotein mit einem Molekulargewicht von 128 000 Da vorher<sup>[56, 57]</sup>. Der EGF-Vorläufer könnte ein Protein sein, das sich durch die Membran erstreckt, vielleicht ein Rezeptor für einen bisher nicht bekannten Liganden. Von großem Interesse in diesem Zusammenhang waren die Entdeckung von Präpro-EGF in der Niere, die Entdeckung von zwei mit EGF in Beziehung stehenden Loci (in *Drosophila* und in *Caenorhabditis*), die die Entwicklung regulieren<sup>[59, 60]</sup>, und die Entdeckung einer mit EGF verwandten Se-

quenz im Grippevirus<sup>[61]</sup>. Diese Befunde lassen vermuten, daß EGF während der Evolution schon sehr früh auftrat und für eine Vielzahl von Funktionen benutzt wurde.

3. Sowohl fötale als auch maligne Zellen produzieren ein dem EGF verwandtes Protein ( $\alpha$ -TGF), das anscheinend mit dem EGF-Rezeptor in Wechselwirkung treten kann und die biologische Aktivität von EGF simuliert<sup>[62]</sup>.
4. Die Rezeptoren für Insulin und für eine Vielzahl anderer Wachstumsfaktoren sind ligandenaktivierte Tyrosin-Kinasen<sup>[48, 54]</sup>.

Obwohl wir gegenwärtig davon ausgehen, daß das primäre Signal, das durch EGF übermittelt wird, mit der Tyrosin-Kinaseaktivität seines Rezeptors in Beziehung steht, wissen wir noch nichts über den genauen Weg der Wachstumsaktivierung, besonders zwischen Rezeptor und Zellkern. Das trifft nicht nur auf EGF zu, sondern auch auf die anderen Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren Tyrosin-Kinasen sind, und ebenso auf diejenigen Oncogene, bei deren Produkten es sich auch um Tyrosin-Kinasen handelt.

## 5. Ausblick

Sollen wir jetzt nach spezifischen zellulären Proteinen suchen, deren Funktionen durch Tyrosinphosphorylierung verändert werden? Ist die intrazelluläre Translokation der Protein-Kinasen physiologisch bedeutsam? Ist es möglich, daß autophosphorylierte Rezeptoren oder verwandte Onco-Genproteine eine noch nicht entdeckte regulatorische Rolle spielen? Nach welchem Mechanismus werden stimulierende oder inhibitorische Signale an den Zellkern weitergeleitet? Welches ist die normale physiologische Rolle von EGF während der Entwicklung und bei der Homöostase? Die Antworten auf diese und eine Fülle anderer Fragen müssen noch gefunden werden, ehe wir dieses wichtige regulatorische System vollständig begreifen können.

*Ich bin den vielen Kollegen, Studenten und technischen Assistenten, die an diesen Untersuchungen mitgearbeitet haben, sehr zu Dank verpflichtet. Ebenso bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung durch die National Institutes of Health und die American Cancer Society.*

Eingegangen am 5. März 1987 [A 630]  
Übersetzt von Dr. Heinrich Wiesinger, Tübingen

- 
- [1] S. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46** (1960) 302-311.
  - [2] S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **237** (1962) 1555-1562.
  - [3] S. Cohen, G. A. Elliott, *J. Invest. Dermatol.* **40** (1963) 1-5.
  - [4] S. Cohen, *Dev. Biol.* **12** (1965) 394-407.
  - [5] S. Cohen, J. M. Taylor, *Recent Prog. Horm. Res.* **30** (1974) 533-550.
  - [6] S. Cohen, C. R. Savage, Jr., *Recent Prog. Horm. Res.* **30** (1974) 551-574.
  - [7] C. R. Savage, Jr., S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 7609-7611.
  - [8] J. M. Taylor, W. M. Mitchell, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 5928-5934.
  - [9] C. R. Savage, Jr., T. Inagami, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 7612-7621.
  - [10] C. R. Savage, Jr., J. H. Hash, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **248** (1973) 7669-7672.

- [11] J. V. Staros, S. Cohen, M. W. Russo in S. Cohen, Houslay (Hrsg.): *Molecular Mechanisms of Membrane Signalling*, S. 253–277, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [12] H. Armelin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2702–2706.
- [13] M. D. Hollenberg, P. Cuatrecasas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2964–2968.
- [14] S. Cohen, G. Carpenter, K. J. Lembach, *Adv. Metab. Disord.* 8 (1975) 265–284.
- [15] G. Carpenter, S. Cohen, *J. Cell Physiol.* 88 (1976) 227–237.
- [16] R. H. Starkey, S. Cohen, D. N. Orth, *Science* 189 (1975) 800–802.
- [17] S. Cohen, G. Carpenter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 1317–1321.
- [18] H. Gregory, *Nature London* 257 (1975) 325–327.
- [19] I. A. Hendry, K. Stoeckel, H. Thoenen, L. L. Iverson, *Brain Res.* 68 (1974) 103–121.
- [20] G. Carpenter, K. J. Lembach, M. M. Morrison, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4297–4304.
- [21] G. Carpenter, S. Cohen, *J. Cell Biol.* 71 (1976) 159–171.
- [22] G. J. Todaro, J. E. DeLarco, S. Cohen, *Nature London* 264 (1976) 26–31.
- [23] J. Schlessinger, Y. Shecter, M. C. Willingham, I. Pastan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2659–2663.
- [24] H. T. Haigler, J. F. Ash, S. J. Singer, S. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 3317–3321.
- [25] P. Gordon, J.-L. Carpentier, S. Cohen, L. Orci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 5025–5029.
- [26] H. T. Haigler, J. A. McKenna, S. Cohen, *J. Cell Biol.* 81 (1979) 382–395.
- [27] J. A. McKenna, H. T. Haigler, S. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 5689–5693.
- [28] C. M. Stoscheck, G. Carpenter, *J. Cell Biol.* 98 (1984) 1048–1053.
- [29] R. N. Fabricant, J. E. DeLarco, G. J. Todaro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 565–569.
- [30] G. Carpenter, L. King, Jr., S. Cohen, *Nature London* 276 (1978) 408–410.
- [31] G. Carpenter, S. Cohen, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 193–216.
- [32] G. Carpenter, L. King, Jr., S. Cohen, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 4884–4891.
- [33] L. King, Jr., G. Carpenter, S. Cohen, *Biochemistry* 19 (1980) 1524–1528.
- [34] S. Cohen, G. Carpenter, L. King, Jr., *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 4834–4842.
- [35] M. Das, T. Miyakawa, C. F. Fox, R. M. Pruss, A. Aharonov, H. R. Herschman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 2790–2794.
- [36] M. M. Wrann, C. F. Fox, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 8083–8086.
- [37] R. A. Hock, E. Nexo, M. D. Hollenberg, *Nature London* 277 (1979) 403–405.
- [38] T. Hunter, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1311–1315.
- [39] O. N. Witte, A. Dasgupta, D. Baltimore, *Nature London* 283 (1980) 826–831.
- [40] H. Ushiro, S. Cohen, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 8363–8365.
- [41] M. Chinkers, S. Cohen, *Nature London* 290 (1981) 516–519.
- [42] J. E. Kudlow, J. E. Buss, G. N. Gill, *Nature London* 290 (1981) 519–521.
- [43] S. Cohen, H. Ushiro, C. M. Stoscheck, M. Chinkers, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 1523–1531.
- [44] R. E. Gates, L. E. King, Jr., *Mol. Cell. Endocrinol.* 27 (1982) 263–276.
- [45] D. Cassel, L. Glaser, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 9845–9848.
- [46] S. A. Buhrow, S. Cohen, J. V. Staros, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 4019–4022.
- [47] S. A. Buhrow, S. Cohen, D. L. Garbers, J. V. Staros, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 7824–7827.
- [48] G. Carpenter, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987), im Druck.
- [49] G. Carpenter, S. Cohen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79 (1977) 545–552.
- [50] R. A. Hock, E. Nexo, M. D. Hollenberg, *Nature London* 277 (1979) 403–405.
- [51] S. Cohen, R. A. Fava, S. T. Sawyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6237–6241.
- [52] A. M. Soderquist, G. Carpenter, *J. Membr. Biol.* 90 (1986) 97–105.
- [53] G. Carpenter, J. G. Zendegui, *Exp. Cell. Res.* 164 (1986) 1–10.
- [54] T. Hunter, J. A. Cooper, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 897–930.
- [55] A. Ullrich, L. Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Liberman, J. Schlessinger, J. Downward, E. L. V. Mayes, N. Whittle, M. D. Waterfield, P. H. Seeburg, *Nature London* 309 (1984) 418–425.
- [56] J. Scott, M. Urdea, M. Quiroga, R. Sanchez-Pescador, N. Fong, M. Shelly, W. J. Rutter, G. I. Bell, *Science* 221 (1983) 236–240.
- [57] A. Gray, T. J. Dull, A. Ullrich, *Nature London* 303 (1983) 722–725.
- [58] L. B. Rall, J. Scott, G. I. Bell, R. J. Crawford, J. D. Penschow, H. D. Niall, J. P. Coghill, *Nature London* 313 (1985) 228–231.
- [59] K. A. Wharton, K. M. Johansen, T. Xu, S. Artavanis-Tsakonas, *Cell* 43 (1985) 567–581.
- [60] D. Greenwald, *Cell* 43 (1985) 583–590.
- [61] D. R. Twardzik, J. P. Brown, J. E. Rauchalis, G. J. Todaro, B. Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 5300–5304.
- [62] M. B. Sporn, A. B. Roberts, *Nature London* 313 (1985) 745–747.