

Diss. ETH No 13767

**Negative regulation of
epidermal growth factor receptor function
by Mig-6**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
Peter Oliver Hackel
Dipl. Natw. ETH
born: 16. 10. 1969
citizen of Sempach, canton Lucerne, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Timothy J. Richmond, examiner
Dr. Axel Ullrich, co-examiner

28/05/2000

Summary

Over the past fifteen years much progress has been made in the elucidation of the activation of receptor tyrosine kinases (RTKs), the characterization of their signal transduction pathways and the identification of substrates. In contrast, the mechanisms of the attenuation and negative regulation of RTKs are only poorly described. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is both, a physiologically as well as pathophysiologically relevant system for the investigation of RTK-signaling. To identify proteins which are involved in the negative regulation of the EGFR, a yeast two-hybrid screen with the intracellular, kinase active part of the receptor was performed. Among the identified interaction partners was the mitogen inducible protein 6 (Mig-6) which was subsequently shown to have an antagonistic effect on epidermal growth factor (EGF)-signaling. Mig-6 consists of 462 amino acids, has a potential Cdc 42 and Rac interaction binding (CRIB) motif, a number of SH3 and WW-domain binding sites and a serine- and proline-rich carboxy terminal domain. The carboxy terminus exhibits, within a sequence of 134 amino acids (amino acid 271 – 405 of Mig-6), a 71% homology with the cytoplasmic tyrosine kinase ACK1.

In vivo, Mig-6 binds the EGFR in an EGF inducible manner and in the yeast two-hybrid system, Mig-6 does not bind to a kinase impaired receptor mutant. It was shown that amino acids 985 – 995 of the human receptor are essential for binding Mig-6. The replacement of the only tyrosine ⁹⁹²Y within amino acids 985 – 995 does not abolish binding of Mig-6 to the wild type receptor. Together this shows, that binding is dependent on kinase activity but not directly on tyrosine phosphorylation. EGF stimulation does not induce any tyrosine phosphorylation of Mig-6, but the protein is constitutively phosphorylated on serine and threonine residues.

Overexpression of Mig-6 accelerates the dephosphorylation of the EGF-stimulated EGFR and decreases the number of EGF-binding sites on the cell surface upon stimulation. In addition, Mig-6 reduces phosphorylation of EGFR substrates such as the adaptor protein Shc and impairs the activation of the ERK2 mitogen activated protein (MAP) kinase upon stimulation with EGF or the G protein-coupled receptor agonists LPA and thrombin. Transactivation of the EGFR is essential for activation of ERK2 MAP kinase upon LPA and thrombin stimulation. Activation of ERK2 MAP kinase induced by fibroblast growth factor (FGF) was not influenced by expression of Mig-6 whereas activation was slightly increased upon stimulation with platelet-derived growth factor (PDGF). Together these results show, that Mig-6 is a potent and specific negative regulator of the EGFR. The biological significance of this antagonistic activity was investigated in focus formation assays. Mig-6 inhibits the formation of EGFR-induced foci, whereas it has no influence on transformation by other oncogenes.

Activation of the EGFR transiently induces transcription of Mig-6 mRNA. For the induction of Mig-6 mRNA upon EGF and LPA or thrombin stimulation, the EGFR kinase activity is essential. Upon stimulation with serum, inhibition of the kinase activity does significantly but not completely inhibit the transcription of Mig-6. The activation of other RTKs such as the FGFR or the PDGFR did not induce the expression of Mig-6 mRNA. Furthermore, it was shown that activation of the Ras/ERK MAP kinase pathway is essential for induction of Mig-6 mRNA expression upon EGF stimulation. Together with the antagonistic activity of Mig-6, these results show that Mig-6 is part of a novel negative feedback loop in EGFR-signaling.

Immunofluorescence microscopy shows a punctuate staining of Mig-6 in the perinuclear region of Rat-1 fibroblasts, similar to the localization of the internalized EGFR. Stimulation with EGF did not influence the staining pattern of Mig-6. This suggests that Mig-6 and the EGFR interact in the perinuclear region after the internalization of the receptor. Mig-6 could thus function as an adaptor that recruits to the EGFR proteins such as phosphatases and/or molecules involved in downregulation of the receptor. Alternatively, Mig-6 could segregate the receptor itself to compartments where it is excluded from signaling and gets rapidly dephosphorylated.

The activity of the EGFR as well as the amplification of its gene are closely linked to oncogenesis and tumour formation. The negative influence on EGFR-signaling and the inhibition of foci formation makes Mig-6 an interesting target for cancer research. The mechanistic elucidation of this novel, negative regulating feedback loop is of special interest and may eventually lead to new approaches for cancer therapies.

Zusammenfassung

Während die Mechanismen der Aktivierung und der Signalübertragung wie auch die Substrate von Rezeptortyrosinkinasen in den letzten Jahren detailliert beschrieben wurden, ist ihre negative Regulation und Inaktivierung weitgehend unbekannt. Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) ist ein wichtiges physiologisches wie auch pathophysiologisches System in der Erforschung der Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen. Um neue Proteine, die den EGFR negativ regulieren, zu identifizieren, wurde mit dem intrazellulären, kinase-aktiven Teil des Rezeptors ein *yeast two-hybrid screen* durchgeführt. Unter den identifizierten positiven Klonen war auch das Mitogen-induzierte Protein 6 (Mig-6). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mig-6 die Signaltransduktion des EGFRs negativ reguliert. Das Protein besteht aus 462 Aminosäuren und enthält ein potentiell Cdc42 und Rac bindendes (CRIB) Motif, mehrere SH3 und WW Domänen Bindungsstellen sowie eine Serin- und Prolin-reiche Region im Carboxyterminus. Innerhalb von 134 Aminosäuren weist diese Region eine 71%-ige Sequenzhomologie mit der zytoplasmatischen Tyrosinkinase ACK1 auf.

Die Interaktion zwischen Mig-6 und dem EGFR ist *in vivo* stimulationsabhängig. Im *yeast two-hybrid system* bindet Mig-6 eine kinase-inaktive Rezeptormutante nicht. Für die Interaktion sind die Aminosäuren 985-995 des humanen Rezeptors essentiell. Der Austausch des einzigen Tyrosins ⁹⁹²Y in dieser Bindungsstelle hat keinen Einfluss auf die Interaktion. Dies zeigt, dass die Bindung zwar von der Kinaseaktivität des Rezeptors, aber nicht direkt von seiner Tyrosinphosphorylierung abhängig ist. Durch Stimulation mit *epidermal growth factor* (EGF) konnte keine Tyrosinphosphorylierung von Mig-6 induziert werden, das Protein ist allerdings konstitutiv an Serin- und Threoninresten phosphoryliert.

Überexpression von Mig-6 beschleunigt die Dephosphorylierung des EGFRs nach dessen Aktivierung und führt zu einer Abnahme der EGF-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche nach Stimulierung mit EGF. Dies zeigt, dass Mig-6 in der *downregulation* des Rezeptors involviert ist. Zusätzlich reduziert Mig-6 die Phosphorylierung von EGFR Substraten wie z. B. dem Adaptorprotein Shc und die Aktivierung der ERK2 Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase nach EGF Stimulation. Für die Aktivierung der ERK2 MAP Kinase durch G Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. dem LPA- oder Thrombin-Rezeptor, ist die Kinaseaktivität des EGFR essentiell. Durch seine antagonistische Wirkung auf den EGFR reduziert Mig-6 ebenfalls die Aktivierung der ERK2 MAP Kinase durch diese G Protein-gekoppelten Rezeptor Agonisten. Auf die Aktivierung der ERK2 MAP Kinase durch andere Rezeptortyrosinkinasen wie dem *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) keinen und *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) hat Mig-6 keinen negativen Einfluss. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mig-6 ein potenter und spezifischer

negativer Regulator des EGFRs ist. Die biologische Relevanz dieser antagonistischen Funktion im EGF-Signaltransduktionsweg wurde mit Hilfe von *focus formation assays* untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Mig-6 die Bildung von EGFR induzierten Foci inhibiert, während es keinen Effekt auf die Transformation durch andere Onkogene wie z. B. *v-fms* hat.

Die Aktivierung des EGFRs führt zu einer transienten Transkription von Mig-6 mRNA. Dieser Effekt wurde ebenfalls nach Stimulation mit Serum oder den G Protein-gekoppelten Rezeptor Agonisten LPA und Thrombin erreicht. Die Kinaseaktivität des EGFRs ist dabei für die Induktion von Mig-6 mRNA durch LPA und Thrombin essentiell, während die Inhibierung des EGFRs die Induktion nach Serum Stimulation stark aber nicht vollständig unterdrückt. Die Aktivierung von dem FGFR oder PDGFR hat keinen Effekt auf die Expression von Mig-6 mRNA. Für die Induktion der Mig-6 mRNA Expression durch den EGFR ist der Ras/ERK MAP Kinase Signalweg essentiell. Diese Resultate zeigen, dass Mig-6 Teil eines neuen, negativ regulierenden Rückkopplungsmechanismus für den EGFR ist.

Die intrazelluläre Lokalisation von Mig-6 wurde in der Immunfluoreszenz Mikroskopie untersucht. In Fibroblasten ist Mig-6 punktförmig in der perinukleären Region verteilt, was der Verteilung des internalisierten EGFRs entspricht. Stimulation mit EGF hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Mig-6. Der Rezeptor und Mig-6 interagieren deshalb wahrscheinlich erst nach der Internalisierung des Rezeptors. Mig-6 könnte somit als Adaptorprotein dienen, das andere Proteine wie z.B. Phosphatasen oder Proteine, die an der Internalisierung des Rezeptors beteiligt sind zum EGFR rekrutiert. Eine Alternative dazu wäre die Rekrutierung des Rezeptors in ein intrazelluläres Kompartiment, indem der Rezeptor dephosphoryliert und seine Signalweiterleitung gestoppt wird.

Die Aktivität des EGFR und die Amplifikation des EGFR-Gens sind eng mit der Entstehung von Tumoren verknüpft. Die antagonistische Wirkung auf den EGFR sowie die Unterdrückung von EGFR-induzierten Foci machen Mig-6 zu einem interessanten Protein für die Krebsforschung. Die detaillierte Erforschung dieses negativen regulierenden Rückkopplungsmechanismus ist deshalb von grossem Interesse und könnte neue Wege und Ansätze für zukünftige Krebstherapien zeigen.