

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Zentrum der Inneren Medizin  
Medizinische Klinik II  
Schwerpunkt Gastroenterologie/Hepatology und Pneumologie/Allergologie  
Direktor: Prof. Dr. med. W. F. Caspary

Mechanismen der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase  
(MAPK)-Aktivierung in der  
Pankreasazinuskarzinom-Zelllinie AR42J

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Se-Jong You  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2004

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. S. Zeuzem

Koreferentin: PD Dr. A. Huwiler

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004

Meinen Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. F. Caspary danke ich, mich im Labor seiner Klinik aufgenommen zu haben.

Herrn Prof. Dr. med. S. Zeuzem danke ich für die Überlassung des Themas und die uneingeschränkte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. nat. A. Piiper für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und Aufmerksamkeit bei der Anleitung im Labor und seiner steten Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Dank auch Herrn Dr. med. Dr. phil. nat. R. Elez, Herrn Dr. med. Kronenberger, Frau. Dr. phil. nat. A. Brieger und Frau Dr. phil. nat. B. Ruster für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Auch möchte ich Herrn Dr. phil. nat. G. Plotz, Herrn Dr. phil. nat. C. D. Giannini, Herrn Dr. med. M. v. Wagner und allen Ökotrophologinnen für das freundliche Arbeitsklima im Labor danken.

Allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden bzw. Diplomanden des Labors der Medizinischen Klinik II danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. A. Huwiler, Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, für ihre freundliche Beratung bezüglich des PKC-Translokationsassays bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Freundin Sabine, meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich durch alle Hochs und Tiefs begleitet und unterstützt haben.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
1. Einleitung .....	1
1.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen .....	1
1.2 Rezeptor-Tyrosinkinasen und Mechanismen der Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelten MAPK-Aktivierung .....	1
1.3 EGF-Rezeptor und Bedeutung der RTK-induzierten MAPK-Aktivierung in der Karzinogenese .....	3
1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren .....	4
1.5 GPCR-induzierte MAPK-Aktivierung .....	6
1.6 Cholezystokinin-Rezeptor und Cholezystokinin-Rezeptor vermittelte MAPK- Aktivierung in der Pankreasazinuskarzinom-Zelllinie AR42J .....	7
1.7 GPCR-induzierte EGFR-Transaktivierung .....	8
2. Fragestellung .....	10
3. Materialien .....	11
3.1 Chemikalien .....	11
3.2 Standardchemikalien .....	12
3.3 Antikörper .....	12
3.4 Kits .....	13
3.5 Geräte .....	13
3.6 Puffer .....	15
3.6.1 Zelllyse-Puffer .....	15
3.6.2 MAP-Kinase-Puffer .....	15
3.6.3 Hypotoner Lysispuffer (hypoton buffer, HB) .....	15
3.6.4 Gelelektrophorese-Laufpuffer .....	16
3.6.5 Blot-Puffer .....	16
3.6.6 TBS (10x) .....	16
3.6.7 TBST-Blot-Waschlösung .....	16
3.6.8 Blockpuffer .....	16
3.6.9 Strip-Puffer .....	16
3.6.10 2x Laemmli-Puffer (SDS-Probenpuffer) .....	17
3.7 SDS-Polyacrylamidgele für die Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	17
4. Methoden .....	18
4.1 Kultivierung der Zellen .....	18
4.2 Stimulation der Zellen und Probenaufbereitung für die gelelektrophoretische Untersuchung .....	18
4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	19

---

4.4	Proteintransfer auf Nitrozellulose ("Blot").....	19
4.5	Immunoblot-Detektion mittels Chemiluminiszenz.....	20
4.6	<i>Strippen</i> und <i>Reprobe</i> der Nitrozellulosemembranen.....	21
4.7	Immunpräzipitation.....	21
4.8	ERK1/2-Assay.....	22
4.9	PKC-Translokationsassay.....	23
5.	Ergebnisse.....	24
5.1	Bedeutung der EGFR-Transaktivierung im Mechanismus der CCK- induzierten MAPK-Aktivierung.....	24
5.1.1	Rolle des EGFR im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung.....	24
5.1.2	Beteiligung des EGFR in der CCK-Signaltransduktion.....	26
5.2	Rolle von SFTK im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung.....	30
5.2.1	Effekt des SFTK-Inhibitors PP1 auf die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung.....	30
5.2.2	Rolle von SFTK in der CCK-induzierten EGFR-Transaktivierung.....	31
5.3	Bedeutung der PKC im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung.....	33
5.3.1	Aktivierung von PKC-Isoformen durch CCK in der Zelllinie AR42J.....	33
5.3.2	Rolle der PKC-Isoformen $\alpha$ , $\delta$ und $\epsilon$ in der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung.....	35
5.3.3	Rolle der PKC in der CCK-induzierten EGFR-Transaktivierung.....	38
6.	Diskussion.....	41
7.	Zusammenfassung.....	49
8.	Literatur.....	51
	Lebenslauf.....	63
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	64

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_i$	$\alpha$ -Untereinheit des die Adenylatzyklase hemmenden G-Proteins
$\alpha_{q/11}$	$\alpha$ -Untereinheit des Phospholipase C- $\beta$ stimulierenden G-Proteins
$\alpha_s$	$\alpha$ -Untereinheit des die Adenylatzyklase stimulierenden G-Proteins
1,4,5-IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphat
AG1478	4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazolin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CCK	Cholezystokinin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's modified minimal essential medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor
G $\alpha$	$\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren GTP-bindenden Proteins
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Dimer des heterotrimeren GTP-bindenden Proteins
GDP	Guanosindiphosphat
GF109203X	Bisindolylmaleimid I
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor ("G-protein coupled receptor")
G-Protein	heterotrimeres GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosin 5'-triphosphat
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase

---

MEK	MAPK-Kinase
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonsäure
PP1	4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-( <i>t</i> -butyl)pyrazolo-D-3,4-pyrimidin
PTX	Pertussistoxin
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Na-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFTK	Src family tyrosine kinase
SOS	son of seventhless
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF- $\alpha$	transforming growth factor- $\alpha$
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

# 1. Einleitung

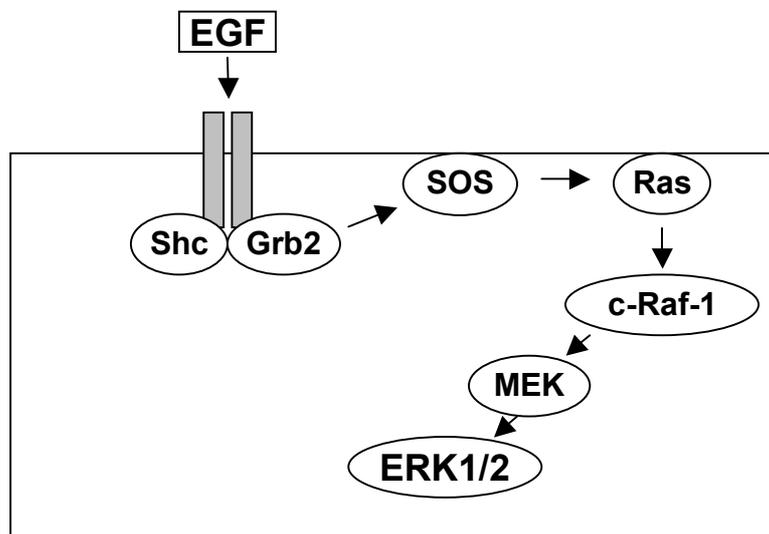
## 1.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Eine Vielzahl externer Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Hormone können über Aktivierung membranständiger Rezeptoren Signaltransduktionswege induzieren, welche zelluläre Vorgänge wie Proliferation und Differenzierung über Regulation von Transkriptionsvorgängen beeinflussen. Unter den intrazellulären Signaltransduktionskaskaden nehmen die Kinasen der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Familie (MAPK) eine zentrale Rolle ein (Treisman, 1996). Die MAPK-Familie beinhaltet eine Reihe von Serin/Threonin-Kinasen, wie z.B. ERK 1 (p44<sup>MAPK</sup>), ERK 2 (p42<sup>MAPK</sup>), Jun N-terminale Kinase und p38<sup>MAPK</sup> (Gutkind, 2000). Stimulation der Zelle durch mitogene Faktoren führt zu einer Erhöhung der MAPK-Aktivität. ERK1 und 2 translozieren daraufhin in den Zellkern und aktivieren Transkriptionsfaktoren, was nachfolgend zur Zellproliferation oder Zelldifferenzierung führt, während eine Hemmung der MAPK beispielsweise mit p44<sup>MAPK</sup>-Antisense RNA diese Zellvorgänge verhindert (Davis et al., 1993; Pages et al., 1993). MAPK kann bei konstitutiver Aktivierung zum unkontrollierten Zellwachstum führen und spielt somit eine wichtige Rolle in der Tumorgenese (Schlessinger, 1993; Mansour et al., 1994). Eine erhöhte ERK-Aktivität wird in einer Reihe von Krebszelllinien, so auch des Pankreas (Licato & Brenner, 1998) gemessen. Untersuchungen an Ratten mit chemisch induzierten kolorektalen Karzinomen zeigen eine Korrelation zwischen dem ERK-Aktivierungsgrad und der Karzinomprogression (Licato et al., 1997). Erhöhte ERK-Aktivität wird auch mit erhöhtem Potential der Tumoren für Invasivität und Metastasenbildung in Verbindung gebracht (Weinstein-Oppenheimer et al., 2000). Die Aktivierung dieser Kinasen kann durch diverse Rezeptorliganden erfolgen, wobei der Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelte Mechanismus der ERK1/2-Aktivierung inzwischen gut charakterisiert ist.

## 1.2 Rezeptor-Tyrosinkinasen und Mechanismen der Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelten MAPK-Aktivierung

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) sind wichtige Mediatoren physiologischer Zellvorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Motilität oder Regulation des Zellüberlebens. Zu den RTK gehört u.a. auch der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Bei Bindung

eines Rezeptorliganden an die spezifische Bindungsstelle des RTK kommt es zu einer Konformationsänderung und nachfolgender Dimerisierung des Rezeptors. Dies führt zu einer Transphosphorylierung der beiden Monomere. Phosphorylierte Tyrosinreste des aktivierten Rezeptors bilden eine Andockstelle für Adapterproteine. Zu diesen Adaptoren gehören u.a. Grb2 (Schlessinger, 1993) und Shc (van der Geer, 1995). Shc wird als Substrat des EGFR tyrosinphosphoryliert, was eine Bindung mit Grb2 ermöglicht (Sasaoka et al., 1994). Die Assoziation von Grb2 mit dem EGFR führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung des p21-Ras-Aktivators SOS an die Zellmembran, welcher an Grb2 bindet. SOS katalysiert die Umwandlung des inaktiven GDP-Ras in aktives GTP-Ras (Downward, 1996) und initiiert dadurch eine Proteinkinase-Kaskade: Ras phosphoryliert und aktiviert die MAPK Kinase Kinase Raf (MAPKKK), welche wiederum die MAPK Kinasen MEK1 und MEK2 (MAPKK) phosphoryliert und aktiviert. Schließlich aktiviert und phosphoryliert die MAPKK ERK1 und ERK2 (MAPK), welche in den Zellkern translozieren, wo sie ihrerseits diverse Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Über diese Regulation von Transkriptionsvorgängen kann schließlich Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Proliferation genommen werden (Davis, 1993). Abbildung 1.1 veranschaulicht diesen "klassischen" MAPK-Aktivierungspfad.



*Abbildung 1.1 Mechanismus der RTK-induzierten MAPK-Aktivierung am Beispiel des EGF-Rezeptors*

### **1.3 EGF-Rezeptor und Bedeutung der RTK-induzierten MAPK-Aktivierung in der Karzinogenese**

Pathophysiologisch ist der RTK-vermittelte Signaltransduktionsweg mit resultierender MAPK-Aktivierung in der Entstehung maligner Tumoren involviert (Levitzki & Gazit, 1995). Dabei spielt die Mutation oder Überexpression der beteiligten Tyrosinkinase-Rezeptoren, insbesondere des EGF-Rezeptors (EGFR) (Woodburn, 1999) bzw. der distalen Effektoren eine wichtige Rolle. Die EGFR-Familie besteht aus vier eng verwandten Rezeptoren: dem eigentlichen EGF-Rezeptor (ErB1), HER2 (ErB2/neu), HER3 (erB3) und HER4 (erB4). So wird der EGFR in einer Reihe von Karzinomen, so auch in 12-46% der Pankreaskarzinome, durch erhöhte Gentranskription überexprimiert (Sirivatanauksorn et al., 1998). Auch der HER2/neu wird in ca. 30% der Mammakarzinome wie auch in Pankreaskarzinomen überexprimiert (Hynes et al., 1989; Sirivatanauksorn et al., 1998). Eine Ko-Expression des EGFR mit den EGFR-Liganden EGF oder TGF- $\alpha$  konnte in 20% der Pankreaskarzinome beobachtet werden und soll mit der Aggressivität der Tumoren korrelieren (Yamanaka et al., 1993).

Das Shc-Gen ist auf dem humanem Chromosom 1q21 lokalisiert, welches gehäuft bei neoplastischen Veränderungen involviert ist (Huebner et al., 1994). Bei Überexpression von Shc in Fibroblasten konnte neben einer erhöhten Zellproliferationsrate nach Wachstumsfaktorstimulation auch eine Induktion maligner Transformationen beobachtet werden (Pelicci et al., 1992). Das Grb2-Gen wird häufig bei humanen Neoplasien, insbesondere beim Mammakarzinom, aberrant exprimiert. Die Grb2-Mutation führt zu einem erhöhten Aktivierungslevel von Raf und der weiteren distalen Kinasenkaskade (Verbeek et al., 1997; Tari et al., 1999), während eine Hemmung der Grb2-Shc-Interaktion durch Aktinomycin D zu einer Reduktion der ERK-Tyrosinphosphorylierung führt (Kim et al., 1999).

Eine erhöhte Expression des Ras-Proteins wird insbesondere bei proliferierenden Zellen beobachtet. Ras-Mutationen sind in ca. 20% aller humanen Karzinomformen zu finden und führen dort zu einer übermäßigen Aktivierung der distalen Effektoren (Khleif et al., 1999). Die höchste Prävalenz aktiver Ras-Mutanten wird beim Pankreaskarzinom gefunden und variiert zwischen 47% und 100% (Friess et al., 1996; Sirivatanauksorn et al., 1998). Das Vorkommen mutierter Ras-Proteine wird mit einer Chemoresistenz der Tumoren assoziiert (Weinstein-Oppenheimer et al., 2000).

Mutierte Formen des Raf-Onkogens konnten ebenfalls in einer Vielzahl neoplastischer Erkrankungen beobachtet werden. Der distal von Raf-1 folgende MAPK-Signaltransduktionsweg scheint bei konstitutiver Aktivierung mit der Ausbildung onkogener Eigenschaften wie Invasion, Metastasierung und Angiogenese verbunden zu sein (Weinstein-Oppenheimer et al., 2000).

Da der Mechanismus der RTK-induzierten MAPK-Aktivierung gut untersucht ist und seine Bedeutung in der Krebserkrankung gut belegt ist, bieten diese Kenntnisse die Basis für eine selektive pharmakologische Intervention gegen "krebsspezifische" molekulare Zielstrukturen. In vielen Arbeitsgruppen wird versucht, diese Zielstrukturen wie Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR, HER-2/neu, VEGFR, FGFR), Ras, Proteinkinase C, Matrix-Metalloproteinasen, aber auch Raf-1 und MEK u.a., welche in Prozessen wie Proliferation, Angiogenese und Metastasierung involviert sind, durch Antisense-Oligonukleotide, Enzym-inhibitoren oder Antikörper selektiv auszuschalten. Dieses Therapieprinzip bedeutet einen Vorteil gegenüber der konventionellen Chemotherapie, in der aufgrund der Zytotoxizität gegenüber entarteten wie auch gesunden Zellen mit erheblichen Nebenwirkungen zu rechnen ist. So wurde der anti-HER2/neu-monoklonale Antikörper Herceptin für die Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms mit Überexpression des HER2/neu-Rezeptors zugelassen (Goldhirsch et al., 1998; McNeil, 1998; Goldenberg, 1999). Weitere neue Wirkstoffe insbesondere auf der Ebene RTK/EGFR wie Tyrosinkinase-Inhibitoren und Ras (Hemmung der posttranslationalen Ras-Modifikation und damit der Ras-Funktion durch Farnesyltransferase-Enzym-(Ftase) Inhibitoren) werden entwickelt und in vitro bzw. am Tiermodell mit z.T. signifikanten Ergebnissen erprobt (Weinstein-Oppenheimer et al., 2000).

#### **1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren**

Die Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bildet mit über 1000 Mitgliedern die größte Klasse von Zelloberflächenrezeptoren, welche im Säugetiergenom kodiert sind. GPCR sind Glykoproteine und nehmen in der Membran eine sieben-transmembranäre  $\alpha$ -Helix-Struktur ein (Dixon et al., 1986; Dohlman et al., 1987). Sie sind in der Lage, externe Stimuli wie Photonen, Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder Ionen über heterotrimere G-Proteine auf intrazelluläre Effektoren zu übermitteln. GPCR sind in einer Vielzahl biologischer Funktionen involviert: Photo- und Chemorezeption, Neurotransmission, Sekretionsregulation endokriner und exokriner Drüsen, Exozytose, Chemotaxis, Blutdruckregulation oder Thrombozytenfunktion.

Wurden zunächst hauptsächlich RTK mit der Vermittlung proliferativer Signale assoziiert, scheinen auch GPCR über Aktivierung von Mitgliedern der MAPK eine wichtige Rolle in Vorgängen wie Embryogenese, Gewebsregeneration, Zellwachstum und Zellproliferation zu spielen (Rozenfurt, 1986; Davis, 1993; Seger & Krebs, 1995; Nagata et al., 1996; Gutkind, 2000). Als Agonisten der GPCR-vermittelten MAPK-Aktivierung dienen Liganden wie Polypeptide, Lipide oder biogene Amine (van Biesen et al., 1996; Gutkind, 1998). Bei konstitutiver Aktivierung besitzt diese Rezeptorklasse sogar onkogenes Potential, wie beispielsweise das *mas*-Onkogen, welches für ein putativen GPCR kodiert und Tumorbildung induzieren kann (Young et al., 1986). In 30% der Schilddrüsenadenomen konnte ein konstitutiv aktiver TSH-Rezeptormutant in Schilddrüsenadenomen identifiziert werden (Parma et al., 1993). Auch DNA-Viren wie das humane Zytomegalievirus (CMV) (Chee et al., 1990; Bankier et al., 1991) oder das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) besitzen transformierendes Potential, indem sie am Beispiel des KSHV für einen konstitutiv aktivierten GPCR/Chemokin-Rezeptor kodieren (Arvanitakis et al., 1997). Häufiger als aktivierte GPCR-Mutanten scheint jedoch die parakrine und autokrine Stimulation diverser GPCR in einer Reihe von malignen Tumoren wie z.B. dem kleinzelligen Lungenkarzinom (Cuttitta et al., 1985), Kolonadenom und Kolonkarzinom (Hoosein et al., 1988) und Magenkarzinom (Tahara, 1990) von Bedeutung zu sein.

Die aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten bestehenden heterotrimeren GTP-bindenden Proteine (G-Proteine) koppeln GPCR an verschiedene Effektoren wie die Adenylatzyklase, Phospholipase C, Phospholipase  $A_2$ , cGMP-Phosphodiesterasen oder Ionenkanäle und führen zur Aktivierung oder auch Hemmung dieser Effektoren (Gutkind, 2000). In Säugerzellen konnten bisher 20 G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten identifiziert werden, welche aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten in vier Gruppen eingeteilt werden:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12}$  (Wilkie et al., 1992). Diese verschiedenen Gruppen aktivieren jeweils unterschiedliche Effektoren und intrazelluläre Signalkaskaden. Des Weiteren konnten 12 verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten und sechs  $\gamma$ -Untereinheiten identifiziert werden. Die Zusammensetzung der heterotrimeren G-Proteine ist für die Rezeptor- und Effektorspezifität von großer Bedeutung. Bestimmte Rezeptoren bzw. Effektoren scheinen dabei bestimmte Kombinationen der G-Protein-Untereinheiten zu bevorzugen (Kleuss et al., 1992 & 1993). Bei konstitutiver Aktivierung können G-Proteine ähnlich den GPCR onkogenes Potential erlangen. So führt die Expression diverser konstitutiv aktivierter  $G\alpha$ -Untereinheiten zur Zelltransformation (Kalinec et al., 1992; Xu et al., 1993 & 1994). Ebenso konnte das Auftauchen natürlicher G-Protein-

Mutanten in verschiedenen neoplastischen Erkrankungen beobachtet werden (Landis et al., 1989; Lyons et al., 1990).

## 1.5 GPCR-induzierte MAPK-Aktivierung

Abhängig vom Rezeptor und Zelltyp können sowohl  $G_q$ -,  $G_i$ - und  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren ligandenabhängig über unterschiedliche intrazelluläre Effektoren die MAPK-Aktivierung vermitteln. So erfolgt die MAPK-Aktivierung durch Stimulation  $G_i$ -gekoppelter Rezeptoren hauptsächlich über  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten unter Beteiligung von Ras (Crespo et al., 1994; Koch et al., 1994; Hawes et al., 1995 & 1996). An verschiedenen Zellsystemen konnte eine GPCR-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Shc und nachfolgende Shc-Grb2-Komplexbildung beobachtet werden, welche nachfolgend in eine Ras-abhängigen MAPK-Aktivierung resultiert (Ohmichi et al., 1994; Cazaubon et al., 1994; van Biesen et al., 1995; Chen et al., 1996; Seva et al., 1996). In diesem Mechanismus sollen Tyrosinkinasen der Src-Familie (SFTK) beteiligt sein, indem SFTK durch  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert werden und nachfolgend eine Shc-Phosphorylierung induzieren (Luttrell et al., 1996; Igishi et al., 1998).

SFTK umfassen u.a. die relativ ubiquitär exprimierten Kinasen Src, Fyn, Yes (Bolen & Brugge, 1997). SFTK werden ebenfalls mit der Entstehung von Neoplasien in Verbindung gebracht. So wurde eine erhöhte Src-Kinaseaktivität im primären Kolonkarzinom beobachtet (Kolibaba & Druker, 1997). Eine Src-Überexpression findet sich auch im menschlichen Pankreaskarzinom (Lutz et al., 1998). Die genaue Rolle und Lokalisation von SFTK im Mechanismus der GPCR-induzierten MAPK-Aktivierung wird abhängig vom Rezeptor und vom Zelltyp insgesamt kontrovers diskutiert. So wird beispielsweise neben der Beteiligung von SFTK in der Shc-Phosphorylierung auch eine direkte Raf-Aktivierung durch Src beschrieben (Stokoe & McCormick, 1997).

Neben SFTK wird auch eine Beteiligung der  $Ca^{2+}$  und PKC-abhängigen Tyrosinkinase Pyk2 in der GPCR-induzierten MAPK-Aktivierung diskutiert (Lev et al., 1995; Dikic et al., 1996; Della Rocca et al., 1997). Pyk2 soll dabei ähnlich wie SFTK eine Shc-Tyrosinphosphorylierung induzieren (Lev et al., 1995).

Insbesondere im Mechanismus der  $G_q$ -vermittelten MAPK-Aktivierung wird eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) beschrieben (Hawes et al., 1995). Die Familie der PKC besteht aus Phospholipid-abhängigen Serin-/Threonin-Kinasen. Die diversen PKC-Isoformen können basierend auf der Struktur und Abhängigkeit von Kalzium, DAG und Phosphatidylserin in

drei Gruppen eingeteilt werden: "conventional" (c) PKCs ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ), "novel" (n) PKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) und "atypical" (a) PKCs ( $\xi$ ,  $\lambda$ ,  $\mu$ ). Alle PKC-Isoformen sind Phosphatidylserin-abhängig. Die Gruppe der cPKC wird durch Kalzium und DAG aktiviert, während nPKCs Kalzium-unabhängig sind. Die Klasse der aPKCs sind Phosphatidylserin-abhängig, aber Kalzium- und DAG-unabhängig (Nishizuka, 1988 & 1992, Casabona, 1997). Eine Überexpression von PKC findet sich in diversen humanen Karzinomen und spielt eine Rolle in der Tumorangio-genese und Resistenzbildung gegen konventionelle Chemotherapeutika (Caponigro et al., 1997). PKC-Inhibitoren induzieren Apoptose und sollen dadurch die Effizienz von konventionellen Chemotherapeutika erhöhen (Schwartz, 1997).

Die Aktivierung der PKC durch GPCR erfolgt über die Vermittlung von  $G\alpha_q$ -Untereinheiten, welche zu einer Stimulation der Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) führt. Diese spaltet Phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphat in die *second messenger* Inositol 1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) (Rhee & Bae, 1997). Diese beiden Spaltprodukte führen wiederum zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration freien Kalziums und Aktivierung der PKC (Berridge & Irvine, 1984; Nishizuka 1984; Berridge, 1993). Der Mechanismus der  $G_q$ -vermittelten und PKC-abhängigen MAPK-Aktivierung wird abhängig vom Zelltyp und Rezeptor insgesamt kontrovers diskutiert. So wird für die  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren wie dem  $M_1$ -muskarinergen Rezeptor oder den  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptor ein Ras- und  $G\beta\gamma$ -unabhängiger MAPK-Aktivierungsmechanismus beschrieben (Hawes et al., 1995). Andererseits ist z.B. an primären Pankreasazinuszellen, welche den  $G_{q/11}$ -gekoppelten Cholezystokinin (CCK)-A-Rezeptor exprimieren, postuliert worden, dass die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung zu einer PKC-abhängigen Tyrosinphosphorylierung von Shc und Komplexbildung mit Grb2 und nachfolgender Ras-Aktivierung führt (Dabrowski et al., 1996). Ähnlich wie bei den  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren war die in CHO-Zellen beobachtete CCK-B-Rezeptor-vermittelte Shc-Phosphorylierung und nachfolgende MAPK-Aktivierung von der SFTK-Aktivität abhängig (Daulhac et al., 1999).

## **1.6 Cholezystokinin-Rezeptor und Cholezystokinin-Rezeptor vermittelte MAPK-Aktivierung in der Pankreasazinuskarzinom-Zelllinie AR42J**

Die zu der GPCR-Superfamilie gehörende CCK-Rezeptor-Familie kann pharmakologisch in zwei Typen unterschieden werden. Der CCK Typ A-Rezeptor (CCK-AR) besitzt eine hohe Selektivität für sulfatierte CCK-Analoga, während der CCK Typ B-Rezeptor (CCK-BR),

welcher mit dem Gastrin-Rezeptor identisch ist (Wank, 1995), eine hohe Affinität für sulfatierte und nicht-sulfatierte Analoga von CCK *und* Gastrin aufweist. CCK reguliert eine Vielzahl verschiedener Funktionen des Pankreas. Neben der Synthese und Sekretion von Pankreasenzymen (Solomon, 1984; Schick et al., 1984) induziert CCK auch das Pankreaswachstum (Solomon et al., 1983; Logsdon & Williams, 1986) und soll auch an der Stimulation des Wachstums des menschlichen Pankreaskarzinoms beteiligt sein (Herrington & Adrian, 1995; Clerc et al., 2002).

In der Pankreaskarzinom-Zelllinie AR42J wird die ERK1/2-Aktivierung von beiden CCK-Rezeptorsubtypen vermittelt (Seva et al., 1996; Dabrowski et al., 1997). Obwohl CCK sowohl zur Stimulation von Pertussistoxin (PTX)-sensitiven G-Proteinen wie  $G_i$  (Schneffel et al., 1990), als auch von PTX-unempfindlichen G-Proteinen vom Typ  $G_{q/11}$  führt (Zeng et al., 1996; Piiper et al., 1997), scheint die CCK-induzierte ERK1/2-Aktivierung in AR42J-Zellen nicht durch PTX-empfindliche G-Proteine vermittelt zu werden (Piiper et al., 2000). Wie in der Pankreasazinuszelle erfolgt auch in AR42J-Zellen eine  $G_q$ -vermittelte Aktivierung der PKC im Rahmen der CCK- bzw. Gastrin-induzierten MAPK-Aktivierung (Daulhac et al., 1997). Ebenso wurde eine durch Gastrin induzierte Tyrosinphosphorylierung von  $p46^{Shc}$  und  $p52^{Shc}$ , eine Komplexbildung von Shc mit Grb2 und nachfolgende MAPK-Stimulation beobachtet (Seva et al., 1996). Über welchen genauen Mechanismus die Shc-Phosphorylierung induziert wird und inwiefern SFTK eine Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt. Ebenso ist unklar, über welche Signaltransduktionspfade PKC zur MAPK-Aktivierung führt und welche PKC-Isoform daran beteiligt ist.

## 1.7 GPCR-induzierte EGFR-Transaktivierung

Neueren Studien zufolge spielen Rezeptor-Tyrosinkinase eine wichtige Rolle in der GPCR-vermittelten MAPK-Aktivierung. So konnte eine GPCR-induzierte EGF-unabhängige Tyrosinphosphorylierung des EGFR gemessen werden (Daub et al., 1996). Der spezifische EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG1478 oder die Expression einer dominant-negativen Rezeptor-mutante zeigten, dass die durch  $G_i$ - wie auch  $G_q$ -gekoppelte Rezeptor-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR, Shc-Phosphorylierung, Shc-Grb2-Komplexbildung und nachfolgende MAPK-Aktivierung von der intrinsischen EGFR-Tyrosinkinaseaktivität abhängig sind (Daub et al., 1997). Über welche Mechanismen GPCR zu einer EGFR-Tyrosinphosphorylierung führen, ist unklar. So wird abhängig vom GPCR-Typ und der untersuchten Zelllinie jeweils eine Rolle von SFTK (Luttrell et al., 1996 & 1997; Daub et al.,

1997; Eguchi et al., 1998; Andreev et al., 2001), G $\beta$  $\gamma$  (Luttrell et al., 1997) oder PKC (Tsai et al., 1997; Li et al., 1998) im Mechanismus der GPCR-induzierten EGFR-Transaktivierung beschrieben.

Neben der GPCR-induzierten EGFR-Transaktivierung über intrazelluläre Mediatoren wurde erst kürzlich die Möglichkeit einer EGFR-Transaktivierung auf extrazellulärem Weg demonstriert. So konnte an Rat-1, COS-7 und PC3-Zellen gezeigt werden, dass die GPCR-induzierte Spaltung des transmembranären proHB-EGF durch Metalloproteinasen zu einer Freisetzung von HB-EGF führt und so auf autokrinen/parakrinen Weg den EGF-Rezeptor aktiviert (Prenzel et al., 1999). Auch an CCKB/Gastrin-Rezeptor-transfizierten epithelialen Magenzellen konnte eine Gastrin-induzierte HB-EGF-Freisetzung in das Medium gemessen werden, was nachfolgend eine EGFR-Tyrosinphosphorylierung induzierte (Miyazaki et al., 1999). Inwiefern die EGFR-Transaktivierung eine Rolle in der Pankreasazinuskarzinom-Zelllinie AR42J spielt, ist unbekannt

## 2. Fragestellung

MAPK-aktivierende Signaltransduktionsmechanismen, die durch Rezeptoren des Tyrosinkinase-Typs wie den EGFR induziert werden, sind mittlerweile gut untersucht. Über die Aktivierung von Ras wird eine Proteinkinase-Kaskade in Gang gesetzt, die über Raf-1 und MEK in einer MAPK-Aktivierung resultiert. Neben diesem "klassischen" MAPK-Aktivierungsweg konnte in den letzten Jahren auch die Beteiligung von G-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) in der MAPK-Aktivierung gezeigt werden. Allerdings werden die verschiedenen Signaltransduktionsmodelle je nach Zell- und Rezeptortyp äußerst kontrovers diskutiert und sind im Detail schlecht verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Mechanismen der Cholezystokinin-induzierten MAPK-Aktivierung untersucht werden. Das zu diesem Zweck verwendete Zellsystem war die Pankreaskarzinom-Zelllinie AR42J der Ratte, in welcher der  $G_{q/11}$ -gekoppelte CCK-Rezeptor exprimiert wird. Die Untersuchungen dieser Arbeit konzentrierten sich dabei auf folgende Punkte:

- a. Es sollte geklärt werden, ob der in einer Reihe von Arbeiten beschriebene Mechanismus der GPCR-induzierten EGFR-Transaktivierung eine Rolle in AR42J-Zellen spielt. Mit Hilfe spezifischer Substanzen, welche die EGFR-Tyrosinkinase hemmen, sollte die Rolle des EGFR in der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung untersucht werden. Ebenso sollte der direkte Effekt von CCK auf die EGFR-Aktivität mittels Immunpräzipitation des EGFR bzw. des Adapterproteins Shc gezeigt werden.
- b. In der Literatur werden SFTK ebenfalls in Zusammenhang mit der GPCR-induzierten MAPK- und EGFR-Aktivierung gebracht. Die Funktion und Lokalisation der SFTK innerhalb der Signaltransduktionsketten wird dabei sehr unterschiedlich diskutiert. Eine diesbezügliche Charakterisierung von SFTK sollte im Rahmen dieser Arbeit erfolgen.
- c. Insbesondere der PKC wird bei  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren eine wichtige Rolle in der MAPK-Aktivierung zugeschrieben. So konnte auch in der AR42J-Zelle eine Beteiligung der PKC gezeigt werden, wobei der Mechanismus der PKC-abhängigen MAPK-Aktivierung unklar ist. Ebenso ist unklar, welche PKC-Isoform an den Mechanismen beteiligt ist. Mit Hilfe eines so genannten PKC-Translokationsassays, mit dem die PKC-Aktivierung gemessen werden kann und durch Anwendung PKC-Isoform-spezifischer Inhibitoren sollten diese Fragen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

## 3. Materialien

### 3.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)-Mischung	Sigma
Adenosin-5´triphosphat (ATP), Mg-Salz	Sigma
Albumin (aus Rinderserum), fettsäurefrei (BSA)	Sigma
4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-( <i>t</i> -butyl)pyrazolo-D-3,4-pyrimidin (PP1)	Calbiochem
Ammoniumperoxydisulfat	Merck
Aprotinin	Sigma
Benzamidin	Sigma
Bisindolylmaleimid I (GF109203X)	Calbiochem
Bradford-Reagenz	BioRad
4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazolin (AG1478)	Calbiochem
Cholezystokinin-Octapeptid (26-33) (CCK-8)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dodecylsulfat, Natrium-Salz (SDS)	ICN Biomedicals
Dulbecco´s modified minimal essential medium (DMEM)	Gibco BRL
ECL-Detektionsreagenz	Amersham
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma
1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Inc.
Glycerin	Roth
Leupeptin	Sigma

Lysis-Puffer (10x)	New England Biolabs
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel de Haen
Milchpulver, fettfrei	Biorad
Molekulargewichtsstandard	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Inc.
Phenylmethansulfonsäure (PMSF)	Sigma
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco BRL
Ponceau S	Sigma
Reinstwasser	Braun
Roti ®-Load1 (4x)	Roth
Salzsäure	Riedel de Haen
Sodiumvanadat	Sigma
12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Calbiochem
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Tris)	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypsin/EDTA Lösung (10x)	Biochrom KG
Tween 20	ICN Biomedicals

### 3.2 Standardchemikalien

Alle Standardchemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Serva (Heidelberg) bzw. Merck (Darmstadt) bezogen.

### 3.3 Antikörper

Monoklonaler anti-PKC $\alpha$ AK (Maus)	Upstate Biotechnology
Monoklonaler anti-PKC $\beta$ AK (Maus)	Transduction Laboratories
Monoklonaler anti-PKC $\gamma$ AK (Maus)	Transduction Laboratories

Polyklonaler anti-PKC $\delta$ AK (Kaninchen)	Santa Cruz
Monoklonaler anti-PKC $\epsilon$ AK (Maus)	Transduction Laboratories
Polyklonaler anti-Phospho-p44/42 <sup>MAPK</sup> AK (Kaninchen)	New England BioLabs Cell Signaling
Polyklonaler anti-HB-EGF AK (Ziege)	Santa Cruz
Polyklonaler anti-HB-EGF AK (Ziege)	R&D
Polyklonaler anti-EGFR AK (Ziege)	Santa Cruz
Monoklonaler anti- $\beta$ -Actin AK (Maus)	Sigma
Monoklonaler anti-Grb2 AK (Maus)	Transduction Laboratories
Monoklonaler anti-v-Src AK (Maus)	Calbiochem
Monoklonaler Shc AK (Maus)	Transduction Laboratories
Polyklonaler Shc AK	Upstate Biotechnology
Anti-pY <sup>418</sup> Src AK	Biosource
Anti-Phosphotyrosin AK, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	Transduction Laboratories
Anti-Maus AK (H+L) (Ziege), konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	Sigma
Anti-Kaninchen AK (H+L) (Ziege), konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	Bio Rad
Anti-Ziege AK, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase	Sigma

### 3.4 Kits

p44/42MAP Kinase Assay Kit	New England Biolabs, Inc.
----------------------------	---------------------------

### 3.5 Geräte

Automatische Pipettierhilfe	FALCON Express
Blot-Apparatur, Multiphor II	Pharmacia Biotech
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus Instruments
Einmalküvetten	Sarstedt

---

Elektrophorese-"power supply", ST 606	Gibco BRL
Elektrophorese-Blot power Pack P23	Biometra
Elektrophoresekammer Horizon 11.14	Gibco
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Filme: Hyperfilm™ MP	Amersham
Filmentwicklermaschine	Kodak/Siemens
Filmkassetten	DuPont NEN
Filterpapier 3 M	Pharmacia
Fotochemikalien: Entwickler und Fixierer	
Gelelektrophorese: Mini-Gelelektrophorese-Einheit	Fuji
Homogenisator: 50ml Glashomogenisationszylinder mit motorgetriebenem Teflonpistill	Biometra O. Glock GmbH & Co KG
Kühlzentrifuge Micro 22 R	Hettich
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich
Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S	DuPont
Nitrozellulose Transfermembran	Schleicher & Schüll
pH-Messgerät	Knick Calimatic 761
Photometer: U-2000 Spektrophotometer mit Wasserbad-thermostatisiertem Küvetten-6-fachwechsler	Hitachi
Pipettierhilfe	Eppendorf
Präzisionswaage Basic MCBB 100	Sartorius
Schüttler, Vortex REAX 2000	Heidolph
Semi-dry Blotter	Pharmacia
Spannungsquelle	LKB, Pharmacia
Sterilarbeitsbank	Heraeus
Sterile Pipetten-Spitzen	Molecular Bio-Products
Tischzentrifuge	Eppendorf
Ultraschall Sonoplus HD-70	Bamdalin
Vertikal-Gelelektrophoresekammer	Protean II, Biorad
Wipptisch WT 12	Biometra

---

Zellinkubation: sterile Zellkultur-Plastikware	Nunc
Zellkulturflaschen (75 und 175 cm <sup>2</sup> )	Falcon
Zellschaber	Costar
Zentrifugenröhrchen	Nalge Company

### **3.6 Puffer**

#### **3.6.1 Zellyse-Puffer**

50 mM Hepes-HCl pH 7,0

100 mM NaCl

0,2 mM MgSO<sub>4</sub>

0,5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

0,4 mM Phenylmethylsulfonylfluorid

1% Triton X-100

10 µg/ml Leupeptin

10 µg/ml Aprotinin

#### **3.6.2 MAP-Kinase-Puffer**

25 mM Tris-HCl pH 7,5

5 mM β-Glycerolphosphat

2 mM DTT

0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

10 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **3.6.3 Hypotoner Lysispuffer (hypoton buffer, HB)**

20 mM Tris-HCl pH 7,4

1 mM EDTA

1 mM EGTA

2 mM DTT

10 mM Benzamidin

1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

1 µg/ml Aprotinin

1 µg/ml Leupeptin

### **3.6.4 Gelelektrophorese-Laufpuffer**

25 mM Tris

200 mM Glycin

1% [w/v] SDS

in Aqua dest.

### **3.6.5 Blot-Puffer**

50 mM Tris-Base pH 8,3

40 mM Glycin

0,0375% [w/v] SDS

20% [v/v] Methanol

in Aqua dest.

### **3.6.6 TBS (10x)**

1,0 M NaCl

0,1 M Tris-Base pH 7,5

in Aqua dest.

### **3.6.7 TBST-Blot-Waschlösung**

10% 10x TBS

0,05% [v/v] Tween-20

in Aqua dest.

### **3.6.8 Blockpuffer**

3,3% Milchpulver (fettfrei) in TBST-Puffer

### **3.6.9 Strip-Puffer**

62,5 mM Tris-HCl pH 6,7

100 mM Mercaptoethanol

2% SDS

### **3.6.10 2x Laemmli-Puffer (SDS-Probenpuffer)**

150 mM Tris-HCl pH 6,8

4% [w/v] SDS

30% [v/v] Glycerin

15% [v/v]  $\beta$ -Mercaptoethanol

0,0025% [w/v] Bromphenolblau

in Aqua dest.

## **3.7 SDS-Polyacrylamidgele für die Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die 5%-Sammelgele (2 ml) enthielten:

5% [v/v] 30% Acrylamid

0,8% Bisacrylamid

0,01% [w/v] SDS

0,01% [w/v] TEMED

125 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8

0,002% [w/v] Ammoniumperoxydisulfat

Die 7,5% Trenngele (6 ml) enthielten:

7,5% [v/v] 30 % Acrylamid

0,8% Bisacrylamid

375 mM Tris/HCl pH 8,8

0,01% [w/v] SDS

0,01% [v/v] TEMED

0,002% [w/v] Ammoniumperoxydisulfat

in Aqua dest.

## 4. Methoden

### 4.1 Kultivierung der Zellen

AR42J-Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (v/v) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% vornehmlich in 80 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Zellkulturmedium diente DMEM (Dulbecco's modified minimal essential medium), welches alle drei Tage gewechselt wurde. Zusätzlich enthielt das Medium 10% fötales Kälberserum (FCS) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 70% erfolgte die Zellpassage mit Trypsin. Nach dem Verwerfen des alten Mediums wurden 8 ml PBS in die Zellkulturflasche pipettiert und leicht geschwenkt, um das PBS auf dem Boden der Flasche zu verteilen. Das darauf folgende Absaugen des PBS entfernte Zellmediumreste und abgestorbene bzw. abgelöste Zellen. Anschließend wurden 8 ml einer 1x Trypsinlösung in die Flasche gegeben und im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Trypsin zerstört die extrazelluläre Matrix der Zellen und bewirkt somit ein Ablösen der Zellen vom Untergrund. Das leichte Schütteln der Zellkulturflasche im Anschluss an die zehnminütige Inkubation im Brutschrank unterstützte die Ablösung der Zellen. Die Kontrolle der vollständigen Zellablösung erfolgte mit dem Mikroskop. Die Gabe von frischem FCS-haltigen Zellkulturmedium (8 ml) stoppte schließlich die Trypsinierung. Die Suspension mit den abgelösten Zellen wurde abzentrifugiert (3 Minuten bei 1000 U/min) und in einer Verdünnung von 1:6 mit frischem DMEM erneut ausgesät.

### 4.2 Stimulation der Zellen und Probenaufbereitung für die gelelektrophoretische Untersuchung

Für die Experimente wurden die Zellen hauptsächlich in 80 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bei einer Konfluenz von etwa 70% über Nacht serumfrei gesetzt und mit den jeweiligen Substanzen versetzt. Nach Entfernen des Zellkulturmediums und anschließender Reinigung der Zellen mit eiskaltem PBS wurden 800 µl Lysispuffer in die Zellkulturflasche pipettiert, die Zellen mit einem Zellschaber gelöst, in Eppendorfgefäße (1,5 ml) überführt und zwecks DNA-Fragmentierung mit Hilfe einer Sonde zweimal für je 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Es folgte die zehnminütige Abzentrifugation (10 000 x g) der Zelllysate bei 4°C und

Bestimmung der Proteinkonzentration des Überstandes mit dem BioRad-Reagenz (Bradford, 1976). Während des gesamten Prozesses wurden die Proben mit Eis gekühlt. Anschließend wurden 5 µl der Proben (je nach Konzentration der Proben 20-40 µg Protein) mit ebenfalls 5 µl des 2x Laemmli-Puffers versetzt, für 3 Minuten bei 95°C unter Schütteln gemischt und nach Abkühlung einer Gelelektrophorese-Untersuchung unterzogen.

### **4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Um die Proteine einer immunologischen Detektion (Immunoblot-Analyse) zugänglich zu machen, wurden diese zunächst entsprechend ihrem Molekulargewicht durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dazu wurden die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben in die Taschen eines 0,8 mm dicken SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen. Das in dem Laufpuffer enthaltene anionische Detergenz SDS und das Reduktans Mercaptoethanol führen zu einer Auflösung der Sulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen, dadurch verlieren die Proteine ihre Sekundär- und Tertiärstruktur. Das SDS maskiert spezifische Proteinladungen, dadurch korreliert die Nettoladung des Proteins seinem Molekulargewicht. Je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins variierte die Acrylamidkonzentration des Trenngels zwischen 7,5% und 12,5%.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25 mA pro Gel und maximal 300V für etwa 70 Minuten über eine Laufstrecke von 7 cm (Mini-Gelelektrophorese-Einheit, Biometra). Die negativ geladenen Proteine wandern dabei in Richtung Anode. Dabei besteht zwischen der relativen Beweglichkeit (RF-Wert) als Quotient aus Lauflänge des jeweiligen Proteins und Gesamtlauflänge und dem Logarithmus des Molekulargewichts ein linearer Zusammenhang. Die Bestimmung der Molekulargewichte wurde mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards mit farbigen Eichproteinen von 200, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 und 10 kDa vorgenommen. Als Sammelgel diente ein 5% Polyacrylamidgel.

### **4.4 Proteintransfer auf Nitrozellulose ("Blot")**

Der Proteintransfer auf Nitrozellulose erfolgte mit Hilfe des *semi-dry*-Blot-Verfahrens. Zwischen zwei horizontal angelegten Graphitplatten als Elektroden in einer *semi-dry*-Blot

Apparatur (Nova Blot, Pharmacia) werden die Proteine aus dem Gel zur Anode hin auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert (Blot-Verfahren).

Hierfür wurden neun Filterpapierlagen in Blotpuffer gelegt, sorgfältig befeuchtet und zwischen die Anoden- und Kathodenplatte der Semi-dry Blot-Apparatur gelegt. Anschließend wurde eine Nitrozellulosemembran und darauf bedeckend das Trenngel in Blot-Puffer eingebracht, auf die Filterpapierlagen gelegt und durch weitere neun, mit Blotpuffer befeuchtete Filterpapierlagen abgedeckt. Dieser "Sandwich" wurde von Luftblasen befreit und der Proteintransfer in 150 Minuten bei 55 mA pro Sandwich und einer Spannung von 100 V durchgeführt. Anschließend erfolgte das Anfärben der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S, um einen erfolgreichen Proteintransfer zu überprüfen. Es schloss sich ein mehrmaliger Waschvorgang mit TBST-Puffer an, was zur Entfärbung der Membranen führte.

#### **4.5 Immunoblot-Detektion mittels Chemiluminiszenz**

Das Immunoblot-Verfahren, auch als "Western-Blot" bezeichnet, ermöglicht eine immunologische Identifizierung der auf Nitrozellulosemembran transferierten Proteine ("Blots") anhand spezifischer Antikörper. Die Nitrozellulosemembranen wurden dabei zunächst für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Wipptisch in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Blots zweimal für 10 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und mit Blockpuffer und den entsprechenden Primärantikörpern versetzt. Diese Primärantikörper, welche spezifisch die zu untersuchenden Proteine binden, wurden mit den Blots in einer Verdünnung von 1:1000 bei Raumtemperatur für 60 Minuten auf dem Wipptisch inkubiert. Es erfolgte ein erneuter zweimaliger Waschgang der Nitrozellulosemembranen mit TBS-T-Puffer für jeweils 10 Minuten, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen.

Anschließend wurden die Blots zweimal für 10 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und erneut mit Blockpuffer versetzt. Zusätzlich erfolgte die Gabe von entsprechenden Primärantikörpern, welche spezifisch die zu untersuchenden Proteine binden. Die einstündige Inkubation der Blots mit den Antikörpern erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 auf dem Wipptisch bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein erneuter zweimaliger Waschgang der Nitrozellulosemembranen mit TBS-T-Puffer zur Entfernung ungebundener Antikörper an.

Die nun gereinigten spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpern (1:4000), welche an die Erstantikörper

binden, und anschließender Reinigung mit TBS-T-Puffer mit Chemilumineszenz-Luminol-Reagenzien sichtbar gemacht. Dabei wurden ECL-Detektionsreagenzien (Enhanced Chemiluminescence System, Amersham) auf die Membran gegeben, 1 Minute inkubiert und in Frischhaltefolie verpackt. Im Dunkeln wurde in einer Filmkassette auf die Folie ein Hyperfilm<sup>TM</sup> MP aufgelegt. Dieser Prozedur liegt folgendes Prinzip zugrunde: Die am Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols, dabei wird eine lichtemittierende Reaktion ausgelöst, welche den Film belichtet. Je nach zu erwartende Signalstärke beträgt die Expositionszeit 1 Sekunde bis 1 Stunde. Die Belichtung ist nach Entwicklung des Films mit Hilfe einer automatischen Entwicklermaschine (Kodak) als Bande zu erkennen

#### **4.6 *Strippen und Reprobe der Nitrozellulosemembranen***

Je nach Fragestellung ist es möglich, die auf den Blots enthaltenen Proteine erneut mit anderen Antikörpern zu detektieren (*Reprobe*). So lässt sich mit diesem Verfahren eine quantitativ gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Bahnen z.B. mit  $\beta$ -Aktin-Antikörpern nachweisen. Dazu müssen aber die an der Membran gebundenen Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden (*Strippen*). Hierzu wurden die Membranen mit Strip-Puffer versetzt und für 30 Minuten bei 50 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal für je 10 Minuten mit TBST-Puffer bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch gewaschen. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie unter Punkt 4.4 beschrieben.

#### **4.7 Immunpräzipitation**

Das Verfahren der Immunpräzipitation erfolgt nach folgendem Prinzip: Die zu untersuchenden zellulären Antigene (z.B. EGFR, Shc) werden durch Inkubation mit entsprechenden spezifischen Antikörpern erkannt und bilden Antigen-Antikörper-Komplexe. Um eine Trennung dieser Komplexe vom restlichen Zellextrakt mittels Zentrifugation zu ermöglichen, wird Protein A/G-Sepharose dazugegeben. Die Antikörper binden an diese Proteine und bilden somit nach erfolgter Zentrifugation das Pellet, welches nach entsprechendem Waschen und Aufbereitung gelektrophoretisch aufgetrennt wird. Die Immunpräzipitation ermöglicht also durch die gezielte Anreicherung eine isolierte Untersuchung vom EGFR bzw. von Shc. Darüber hinaus können mittels Western-Blot-

Analyse auch an EGFR bzw. Shc gebundene Strukturen (Rezeptoren, Proteinkinasen u.a.) identifiziert werden.

Die Inkubation der AR42J-Zellen mit den jeweiligen Substanzen bei 37°C wurde nach bestimmten Zeitpunkten mit eiskaltem PBS und Gabe von Lyse-Puffer abgestoppt. Nach DNA-Fragmentierung durch Ultraschall und Zentrifugation (5 Minuten, 3000 U/min, 4°C) erfolgte die photometrische Quantifizierung der Überstände, so dass alle Proben die Proteinkonzentrationen von 2,5 µg/µl enthielten. Die anschließende Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern (anti-EGFR bzw. anti-Shc) erfolgte bei 4°C und leichtem Schütteln. Nach 2 Stunden wurde unter gleichen Versuchsbedingungen Protein A/G-Sepharose dazugegeben, die Suspension nach weiteren 2 Stunden schließlich abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat dreimal mit Lyse-Puffer gewaschen. Die gereinigten Pellets wurden mit Laemmli-Puffer versetzt, für 3 Minuten auf 95°C erhitzt und nach Abkühlung in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen.

#### **4.8 ERK1/2-Assay**

Diese Methode ermöglicht die Messung der Aktivität von ERK1/2. Phosphoryliertes und damit aktiviertes ERK1/2 wird von immobilisierten Phospho-ERK1/2-Antikörpern gebunden und mit Elk-1 versetzt. Elk-1 wird als Substrat von ERK1/2 phosphoryliert. Somit kann anhand eines anti-phospho-Elk-1-Immunoblots indirekt die ERK1/2-Aktivität bestimmt werden.

AR42J-Zellen wurden nach entsprechender Stimulation und Reinigung mit eiskaltem PBS mit Lysepuffer, der zusätzlich 1mM PMSF enthielt, für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Bei der nachfolgenden Beschallung und Zentrifugation der Zellen wurde wie unter Punkt 4.6 beschrieben verfahren. Die Immunpräzipitation erfolgte durch Gabe des Zelllysates mit Agarose-gekoppelten und damit immobilisierten monoklonalen Phospho-ERK1/2-Antikörpern. Diese Reaktion ermöglicht die Bindung von phosphoryliertem ERK1/2 an die immobilisierten Anti-Phospho-ERK1/2-Antikörpern. Die bei 4°C und unter leichtem Schütteln ablaufende Inkubation dauerte 4 Stunden. Nach erneuter Mikrozentrifugation (30 Sekunden, 4°C) wurden die Pellets zweimal mit Lyse-Puffer und einmal mit Kinasepuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Gabe des ERK1/2-Substrates Elk-1 (2 µg) und des Reaktionsstarters ATP (200 µM) bei 30°C. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit SDS-Puffer beendet und die Proben analog Punkt 4.6 für die folgende Gelelektrophorese aufbe-

reitet. Die immunchemische Detektion im Rahmen des Immunoblots erfolgte mit Phospho-Elk-1-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:1000.

#### **4.9 PKC-Translokationsassay**

Die Aktivierung von so genannten "conventional" und "novel" PKC-Isoformen ist mit einer Verschiebung der PKC-Isoformen vom Zytosol in die Zellmembran verbunden (Kraft & Anderson, 1983). Die PKC-Aktivierung kann also dadurch bestimmt werden, dass Zellen in eine Membran- und Zytosolfraction aufgetrennt und die Fraktionen einer Western-Blot-Analyse mit PKC-Isoenzym-spezifischen Antikörpern unterzogen werden. Bei PKC-Aktivierung werden also die quantitative Zunahme von PKC in der Membranfraktion und die Abnahme im Zytosol gemessen.

AR42J-Zellen wurden dazu in 175cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gezüchtet, für 48 Stunden serumfrei gesetzt und mit den jeweiligen Substanzen versetzt. Nach Reinigung der Zellen mit eiskaltem PBS erfolgte die Gabe von 0,6 ml HB-Puffer. Die Homogenate wurden in Polypropylen-Tubes überführt, für 10 Minuten in flüssigem Stickstoff bei -80°C gefroren und nach dem Auftauen dreimal für je 5 Sekunden beschallt und anschließend zentrifugiert (28 000 U/min, 60 min, 4°C). Der Überstand bildete nun die Zytosolfraction. Diese wurden erneut in flüssigem Stickstoff eingefroren, während das übrig gebliebene Pellet mit 0,5 ml HB-Puffer und 20% Triton X-100 (30 µl) versetzt, mit einer Pipettenspitze grob aufgelöst, erneut beschallt und anschließend für eine weitere Stunde unter gleichen Bedingungen zentrifugiert wurde. Der nun entstandene Überstand bildete die Membranfraktion, welche ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Die beiden Fraktionen wurden anschließend erneut aufgetaut, die Proteinmengen photometrisch quantifiziert (3,0 µg/µl), mit 4x Laemmli-Puffer versetzt, für 3 Minuten auf 95°C erhitzt und schließlich gelelektrophoretisch aufgetrennt

## 5. Ergebnisse

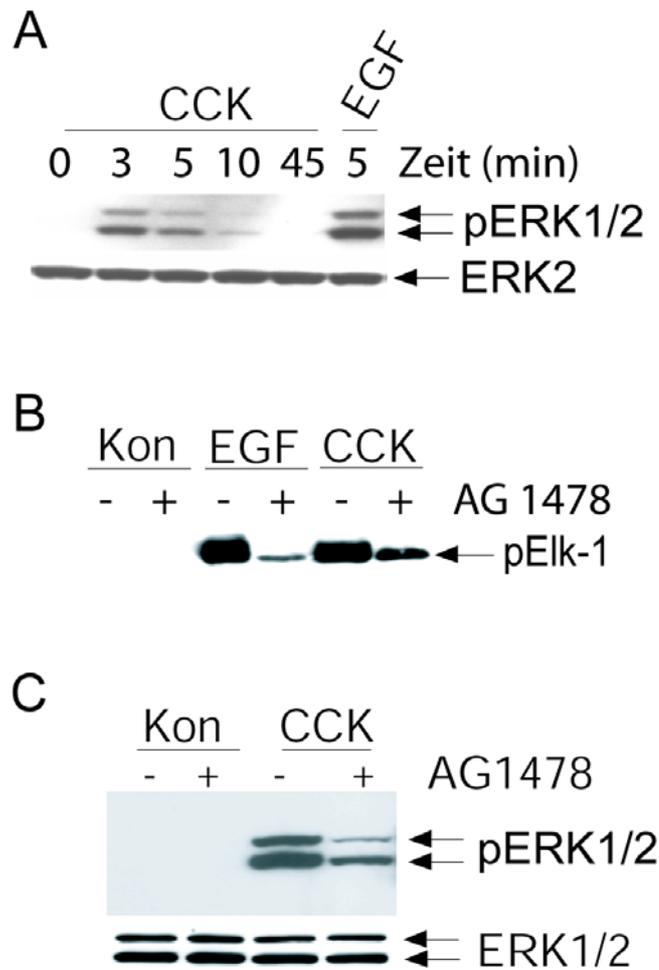
### 5.1 Bedeutung der EGFR-Transaktivierung im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung

In der Pankreasazinuskarzinom-Zelllinie AR42J führt die Aktivierung des CCK-Rezeptors zu einer MAPK-Aktivierung, welche mit einer Tyrosinphosphorylierung von p46<sup>Shc</sup> und p52<sup>Shc</sup> und Komplexierung von Shc mit Grb2 einhergehen (Seva et al., 1996). Neuerdings wird im Mechanismus der GPCR-induzierten MAPK-Aktivierung auch die Möglichkeit einer Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie beispielsweise des EGFR und damit verbundener EGFR-Tyrosinphosphorylierung diskutiert (Daub et al., 1996 & 1997; Li et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern dieser Mechanismus eine Rolle in der pankreatischen Zelllinie AR42J spielt und ob die Shc/Grb2-Effekte mit einer eventuellen EGFR-Transaktivierung im Zusammenhang stehen.

#### 5.1.1 Rolle des EGFR im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung

Um eine eventuelle Beteiligung des EGFR in der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung zu untersuchen, sollte der Effekt des EGFR-Inhibitors AG1478 auf die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung untersucht werden. AG1478 hemmt spezifisch die EGFR-Tyrosinkinasedomäne (Daub et al., 1996 & 1997). Diese Tyrosinkinasedomäne vermittelt die EGF-induzierte Autophosphorylierung und damit einhergehende Aktivierung des EGFR.

Zunächst jedoch sollte die Inkubationszeit von CCK bestimmt werden, welche zu einer maximalen MAPK-Aktivierung führt. Hierfür wurden AR42J-Zellen mit CCK für unterschiedliche Zeiten (0, 3, 5, 10 und 45 Minuten) stimuliert. EGF diente hier als Positivkontrolle. Die Reaktion wurde durch Entfernen des Mediums und anschließende Lyse der Zellen gestoppt und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen wurde mit spezifischen Antikörpern, welche speziell die zweifach phosphorylierte und damit aktivierte Form von ERK1/2 detektieren, eine Immunoblot-Analyse durchgeführt. In Abbildung 5.1A zeigt sich die stärkste Bande unter dreiminütiger CCK-Stimulation, was einer maximalen MAPK-Aktivierung entspricht. Das anschließende *Reprobe*-Verfahren mit anti-ERK2-Antikörpern zeigt die gleichmäßige Beladung der verschiedenen Bahnen mit Zellproteinen, in diesem Fall nachgewiesen durch die Detektion von ERK2.



**Abbildung 5.1 Wirkung des EGFR-spezifischen Tyrosinkinaseinhibitors AG1478 auf die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung**

AR42J-Zellen wurden entsprechend den angegebenen Zeiten mit CCK (10 nM) bzw. EGF (10nM) und in An- bzw. Abwesenheit von AG1478 (250 nM) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert, die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Blots A und C wurden mit Antikörpern inkubiert, welche spezifisch die phosphorylierte und aktivierte Form von ERK1 und ERK2 detektieren. Nach dem Strippen der Nitrozellulosemembranen wurde der Reprobe mit anti-ERK1/2-Antikörpern durchgeführt. Blot B: Nach Zelllyse wurde ERK1/2 immunpräzipitiert und die ERK1/2-Aktivität indirekt mit rekombinantem Elk-1, welches als Substrat von ERK1/2 phosphoryliert wird, anhand einer anti-phospho-Elk-1-Western-Blot-Analyse gemessen.

Unter gleichen Versuchsbedingungen wurden die Zellen anschließend in An- bzw. Abwesenheit von 250 nM AG1478 (fünfminütige Vorinkubation) mit 10 nM CCK für drei Minuten stimuliert. Abbildung 5.1C zeigt eine deutliche Abschwächung des ERK1/2-Signals unter Gabe von AG1478 und CCK. Der *Reprobe* erfolgte mit anti-ERK1/2-Antikörpern.

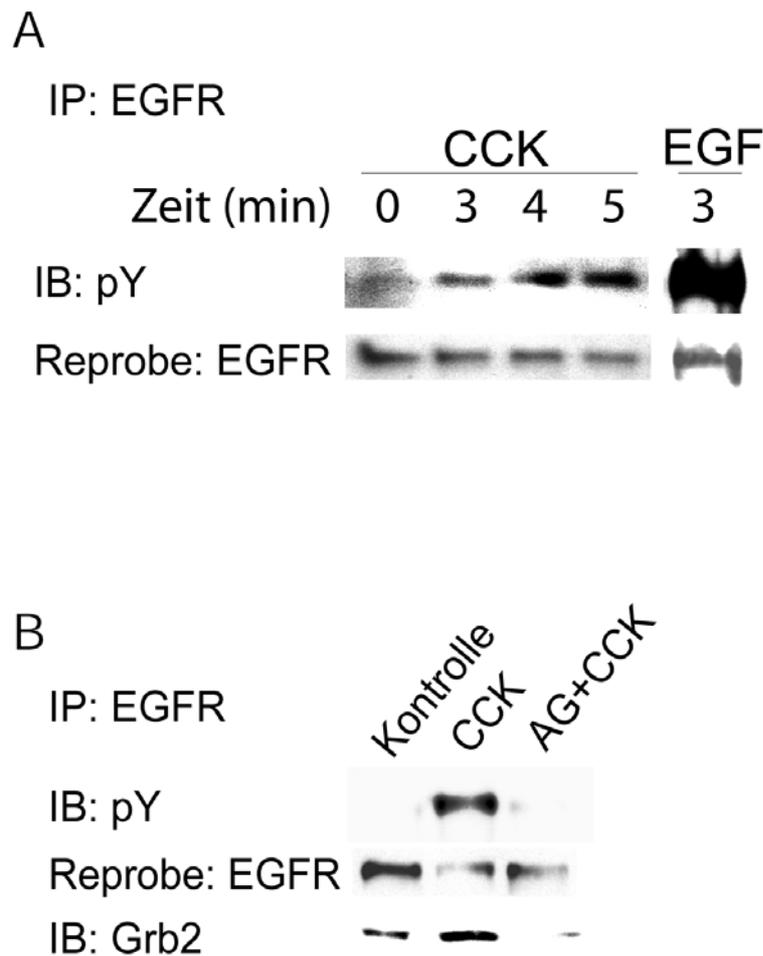
Die Aktivität von ERK1/2 lässt sich auch indirekt durch Zugabe rekombinatem Elk-1 messen, welches als Substrat von ERK1/2 phosphoryliert wird. Die Immunoblot-Analyse erfolgt entsprechend mit Antikörpern, welche die phosphorylierte Form von Elk-1 erkennen. AR42J-Zellen wurden mit CCK bzw. EGF und in An- bzw. Abwesenheit von AG1478 inkubiert. CCK und EGF führten zu vergleichbar starken Ausprägungen der Banden. Erwartungsgemäß führte AG1478 zu einer fast kompletten Hemmung des Phospho-Elk-1-Signals unter EGF-Stimulation (Abbildung 5.1B). AG1478 führte ebenfalls zu einer deutlichen Hemmung des Phospho-Elk-1-Signals unter CCK-Stimulation. Verglichen zum EGF-Effekt war die Signalreduktion jedoch schwächer ausgeprägt.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des EGFR im Rahmen der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung hin.

### 5.1.2 Beteiligung des EGFR in der CCK-Signaltransduktion

Da im Rahmen dieser Arbeit bereits eine Beteiligung des EGFR im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung gezeigt werden konnte, sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden, ob die unter Punkt 5.1.1 beobachteten Effekte tatsächlich auf eine Transaktivierung und Tyrosinphosphorylierung des EGFR zurückzuführen sind.

Dazu wurden die Zellen für die in Abbildung 5.2A angegebenen Zeiten mit CCK bzw. EGF stimuliert und anschließend der EGFR immunpräzipitiert (vgl. Punkt 4.2). Die Immunpräzipitate wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung einer Western-Blot-Analyse mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern unterzogen, um eine eventuelle Tyrosinphosphorylierung des EGFR zu zeigen. Die im anti-Phosphotyrosin-Immunoblot abgebildeten Banden befanden sich bei etwa 180 kDa, was dem Molekulargewicht des EGFR entspricht. Im EGFR-*Reprobe* konnte diese Bande als EGFR klar identifiziert werden (Abbildung 5.2A). CCK bewirkte eine Erhöhung der EGFR-Tyrosinphosphorylierung, die jedoch deutlich geringer ausgeprägt war als unter EGF-Stimulation. Der EGFR-spezifische Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 führte unter gleichen Untersuchungsbedingungen zu einer Hemmung der CCK-induzierten EGFR-Tyrosinphosphorylierung, was zeigt, dass die Tyrosinkinasedomäne des EGFR auch die CCK-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR vermittelt (Abbildung 5.2B).



**Abbildung 5.2 Untersuchung der Wirkung von CCK auf den EGFR am EGFR-Immunpräzipitat**

*Blot A:* AR42J-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit CCK (10 nM) bzw. EGF (10 nM) inkubiert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Immunpräzipitation mit anti-EGFR. Anschließend wurden die Immunpräzipitate mittels Western-Blottings mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern analysiert. Der Reprobe erfolgte mit anti-EGFR.

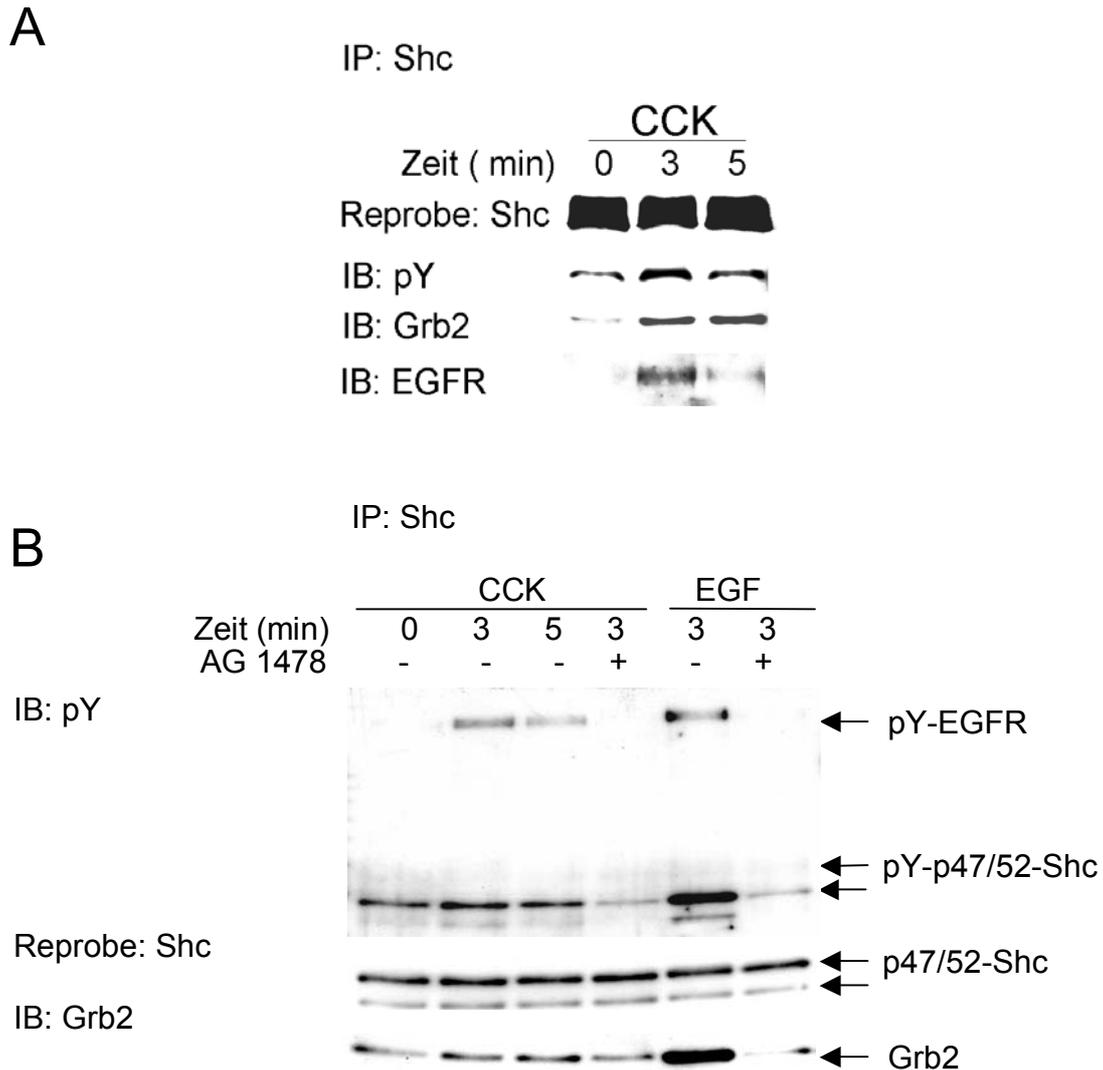
*Blot B:* AR42J-Zellen wurden für 3 Minuten mit CCK (10 nM) und in An- bzw. Abwesenheit von AG1478 (250 nM) inkubiert. Die EGFR-Immunpräzipitate wurden mittels Western-Blottings mit anti-Phosphotyrosin- und anti-Grb2-Antikörpern analysiert. Der Reprobe erfolgte mit anti-EGFR.

Die EGFR-Aktivierung z.B. durch einen Rezeptorliganden wie EGF, beinhaltet neben der EGFR-Tyrosinphosphorylierung eine Rekrutierung der Adaptoren Shc (van der Geer, 1995) und Grb2 (Schlessinger, 1993) an den EGFR sowie eine Komplexbildung von Shc und Grb2 (Sasaoka et al., 1994). Die in der Literatur beschriebene GPCR-induzierte EGFR-Transaktivierung führt ebenfalls zu diesen Vorgängen (Daub et al., 1996 & 1997). In AR42J-Zellen konnte eine Tyrosinphosphorylierung von p46<sup>Shc</sup> und p52<sup>Shc</sup> und Komplexbildung von Shc mit Grb2 beobachtet werden (Seva et al., 1996). In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob diese Shc/Grb2-Effekte mit der in dieser Arbeit beobachteten EGFR-Tyrosinphosphorylierung in Zusammenhang stehen.

Nach Stimulation der AR42J-Zellen mit CCK wurde Shc immunpräzipitiert und mittels Western-Blot mit anti-Phosphotyrosin-, anti-EGFR- und anti-Grb2 Antikörpern analysiert. Wie in Abbildung 5.2B ersichtlich, wurde in den Shc-Immünpräzipitaten unter CCK-Stimulation eine Tyrosinphosphorylierung von drei verschiedenen Proteinen unterschiedlicher Molekulargewichte beobachtet. Durch Vergleich der Bandenhöhen mit dem Molekulargewichtsmarker wurden die Molekulargewichte bestimmt und entsprachen dem EGFR (170 kDa) bzw. Shc (47 und 52 kDa). Der direkte Nachweis von Shc bzw. EGFR erfolgte im Shc-*Reprobe* (Abbildung 5.3B) bzw. EGFR-Immünoblot (Abbildung 5.3A). Des Weiteren konnte unter CCK-Stimulation in den Shc-Immünpräzipitaten eine Verstärkung der Grb2-Bande beobachtet werden (Abbildungen 5.3A und B).

Unter gleichen Versuchsbedingungen wurden die Zellen mit AG1478 vorbehandelt und anschließend mit CCK bzw. EGF stimuliert. Die Daten in Abbildung 5.3B zeigen, dass AG1478 eine signifikante Hemmung der CCK- bzw. EGF-induzierten EGFR-/Shc-Tyrosinphosphorylierung und Komplexbildung von Shc mit Grb2 und dem tyrosinphosphoryliertem EGF-Rezeptor bewirkte. Im Rahmen der bereits unter Punkt 5.1.2 beschriebenen EGFR-Immünpräzipitation konnte unter CCK-Stimulation eine vermehrte Komplexbildung von Grb2 mit dem EGFR beobachtet werden, welche durch AG1478 gehemmt wurde (Abbildung 5.2B).

Insgesamt zeigen diese Resultate, dass CCK zu einer Transaktivierung des EGF-Rezeptors führt, welche analog zur EGF-induzierten EGFR-Aktivierung eine CCK-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Shc und Komplexbildung mit dem ebenfalls tyrosinphosphoryliertem EGFR und Grb2 beinhaltet. Diese unter CCK- wie auch EGF-Stimulation beobachteten Effekte sind von der EGFR-Tyrosinkinaseaktivität abgängig, da sie durch AG1478 hemmbar waren.



**Abbildung 5.3 Untersuchung der Wirkung von CCK auf den EGFR am Shc-Immunpräzipitat**

*Blot A: AR42J-Zellen wurden entsprechend den angegebenen Zeiten mit CCK (10 nM) inkubiert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Immunpräzipitation mit anti-Shc. Anschließend wurden die Immunpräzipitate im Rahmen des Western-Blottings mit anti-Phosphotyrosin-, anti-EGFR und anti-Grb2-Antikörpern analysiert.*

*Blot B: AR42J-Zellen wurden entsprechend der angegebenen Zeiten mit CCK (10 nM) bzw. EGF (10 nM) und in An- bzw. Abwesenheit von AG1478 (250 nM) inkubiert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Immunpräzipitation mit anti-Shc und Western-Blot-Analyse mit anti-Phosphotyrosin- und anti-Grb2-Antikörpern. Der Reprobe erfolgte mit anti-Shc.*

## **5.2 Rolle von SFTK im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung**

Tyrosinkinassen der Src-Familie (SFTK) werden von einer Reihe unterschiedlicher GPCR, zu denen auch der CCK-Rezeptor gehört, aktiviert (Singh et al., 1994; Chen et al., 1994) und sollen sowohl in der Gi-, als auch der Gq-vermittelten MAPK-Aktivierung involviert sein (Igishi et al., 1998; Daulhac et al., 1999). In der GPCR-induzierten EGFR-Transaktivierung sollen SFTK ebenfalls eine Rolle spielen, wobei die genaue Funktion und Lokalisation der Kinasen innerhalb dieser Signaltransduktionskette unterschiedlich bewertet wird. So sollen SFTK die GPCR-induzierte EGFR- (Luttrell et al., 1997; Eguchi et al., 1998; Andreev et al., 2001) und/oder Shc-Tyrosinphosphorylierung (Luttrell et al., 1996; Daulhac et al., 1999) vermitteln und somit nachfolgend eine Ras-Aktivierung bewirken. Im Rahmen dieser Arbeit sollte in AR42J-Zellen die Funktion und Bedeutung der SFTK im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung untersucht werden.

### **5.2.1 Effekt des SFTK-Inhibitors PP1 auf die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung**

In diesem Versuch sollte zunächst anhand des spezifischen SFTK-Inhibitors PP1 (Hanke et al., 1996) untersucht werden, ob die CCK-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung SFTK-abhängig ist. Zellen wurden nach zehnminütiger PP1-Vorinkubation und verschiedenen PP1-Konzentrationen mit CCK bzw. EGF stimuliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels anti-Phospho-ERK1/2-Western-Blot analysiert. Abbildung 5.4A zeigt, dass PP1 in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zu einer deutlichen Hemmung des CCK-induzierten MAPK-Signals führte. Die EGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung wurde dagegen kaum beeinflusst.

Die Aktivierung von SFTK geht mit einer Autophosphorylierung vom Tyrosinrest 418 einher (Kmiecik et al., 1987). Dadurch ist es möglich, eine direkte SFTK-Aktivierung durch Detektion mit anti-pY<sup>418</sup>-Src-Antikörpern nachzuweisen. Um zu zeigen, dass der PP1-Effekt auf die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung tatsächlich auf eine Hemmung der SFTK-Aktivität zurückzuführen ist, wurden im gleichen Experiment die Zelllysate mittels anti-pY<sup>418</sup>-Src-Western-Blotting untersucht. In Abbildung 5.4A ist zu sehen, dass CCK zu einer deutlichen Zunahme des autophosphorylierten Anteils von SFTK, also zu einer SFTK-Aktivierung führte. Dieser Effekt wurde durch PP1 gehemmt. Der inhibitorische Effekt von PP1 auf die CCK-induzierte SFTK-Aktivierung korrelierte stark mit dem PP1-Effekt auf die

CCK-induzierte MAPK-Aktivierung, was stark vermuten lässt, dass die Effekte von PP1 auf die MAPK tatsächlich auf eine Hemmung der SFTK zurückzuführen sind. Eine Aktivierung von SFTK durch EGF konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

Diese Daten zeigen, dass SFTK am Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung beteiligt sind. Eine Rolle von SFTK in der EGF-induzierten MAPK-Aktivierung scheint dagegen eher unwahrscheinlich, da der Effekt des SFTK-Inhibitors PP1 auf die MAPK-Aktivierung gering ausgeprägt war.

### **5.2.2 Rolle von SFTK in der CCK-induzierten EGFR-Transaktivierung**

Da im Rahmen dieser Arbeit eine EGFR- und SFTK-Beteiligung an der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung gezeigt werden konnte, sollte als nächstes untersucht werden, ob durch eine SFTK-Hemmung mit PP1 die CCK-induzierte EGFR-Transaktivierung beeinflussbar ist. Dazu wurden Zellen mit PP1 vorbehandelt und anschließend mit CCK versetzt. Der EGF-Rezeptor wurde immunpräzipitiert und einer anti-Phosphotyrosin-Immunoblot-Analyse unterzogen. In Abbildung 5.4B ist zu sehen, dass die CCK-induzierte EGFR-Tyrosinphosphorylierung nicht durch PP1 gehemmt wurde. Der Effekt von PP1 auf die CCK-induzierte Shc-Phosphorylierung wurde im Shc-Immunpräzipitat mittels anti-Phosphotyrosin-Western-Blot analysiert. Die CCK-induzierte Tyrosinphosphorylierung von Shc konnte im Gegensatz zum EGFR durch PP1 nahezu vollständig gehemmt werden. Die Shc-Phosphorylierung durch EGF blieb dagegen erwartungsgemäß unbeeinflusst (Abbildung 5.4C).

Diese Daten zeigen, dass SFTK an der CCK-induzierten EGFR-Transaktivierung beteiligt sind, indem es zu einer SFTK-abhängigen Tyrosinphosphorylierung von Shc kommt, während die EGFR-Tyrosinphosphorylierung selbst SFTK-unabhängig zu sein scheint. Die EGF-induzierte EGFR-Aktivierung und die nachfolgende Shc-Phosphorylierung scheinen gänzlich unabhängig von SFTK zu sein.



**Abbildung 5.4 Wirkung des SFTK-Inhibitors PP1 auf die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung und EGFR-Transaktivierung**

*Blot A:* AR42J-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des SFTK-Inhibitors PP1 für 3 Minuten vorinkubiert und anschließend jeweils für drei Minuten mit CCK (10 nM) bzw. EGF (10 nM) versetzt. Die Zelllysate wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran mit anti-pY<sup>418</sup>-Src- und anti-phospho-ERK1/2-Blotting analysiert. Der anschließende Reprobe erfolgte mit anti- $\beta$ -Aktin.

*Blot B und C:* Immunpräzipitation erfolgte mit anti-EGFR (B) bzw. anti-Shc (C). Die entsprechenden Immunpräzipitate wurden mit anti-Phosphotyrosin-Immunoblotting untersucht. Der Reprobe erfolgte mit anti-EGFR (B) bzw. anti-Shc (C).

### **5.3 Bedeutung der PKC im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung**

Die Proteinkinase C (PKC) spielt in verschiedenen Zellsystemen eine Rolle in der  $G_{q/11}$ -vermittelten MAPK-Aktivierung (Hawes et al., 1995; Tsai et al., 1997). Auch in AR42J-Zellen konnte unter Gastrin- bzw. CCK-Stimulation eine PKC-abhängige MAPK-Aktivierung beobachtet werden. (Daulhac et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Mechanismus der PKC-abhängigen MAPK-Aktivierung durch CCK näher untersucht werden. Von besonderem Interesse war hierbei die Frage, welche PKC-Isoformen die MAPK-Aktivierung vermitteln. Darüber hinaus sollte die Rolle von PKC in der EGFR-Transaktivierung untersucht werden.

#### **5.3.1 Aktivierung von PKC-Isoformen durch CCK in der Zelllinie AR42J**

Mit diesem Versuch sollte zunächst geklärt werden, welche PKC-Isoformen durch CCK aktiviert werden. In der Literatur konnten bisher in AR42J-Zellen nur die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  nachgewiesen werden (Wilkinson et al., 1993; Martiny-Baron et al., 1993). Da im Rahmen dieser Arbeit neben PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  ebenfalls keine weiteren DAG-sensitiven PKC-Isoformen detektiert werden konnten (ohne Abbildung), wurde das CCK-induzierte PKC-Aktivierungsverhalten auf diese drei Isoformen konzentriert.

Die Aktivierung der PKC ist mit einer Translokation dieser Kinase vom Zytosol in ein Membrankompartiment verbunden (Kraft & Anderson, 1983). So ist es möglich, durch Zellfraktionierung und Western-Blot-Analyse die PKC-Aktivierung anhand der quantitativen Zunahme der PKC im Membrankompartiment zu messen. Dabei wurde wie in Punkt 4.8 beschrieben verfahren.

Nach Stimulation der Zellen mit CCK bzw. TPA wurden die Zellhomogenate durch Zentrifugation in eine Zytosol- und Membranfraktion getrennt. Anschließend wurden beide Fraktionen separat mittels Immunoblot-Analyse mit den entsprechenden anti-PKC-Isoform-Antikörpern auf ihren Gehalt an PKC-Isoformen untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 5.5 zeigen für die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  unter steigender CCK-Stimulationsdauer eine Zunahme der Bandenstärke im Membrankompartiment, also eine verstärkte Verschiebung dieser Isoformen ins Membrankompartiment, während es in den Zytosolfraktionen entsprechend zu einer Abnahme der Bandenstärken kam. Als Positivkontrolle diente TPA, welches direkt Diacylglycerol-sensitive PKC-Isoformen aktiviert.

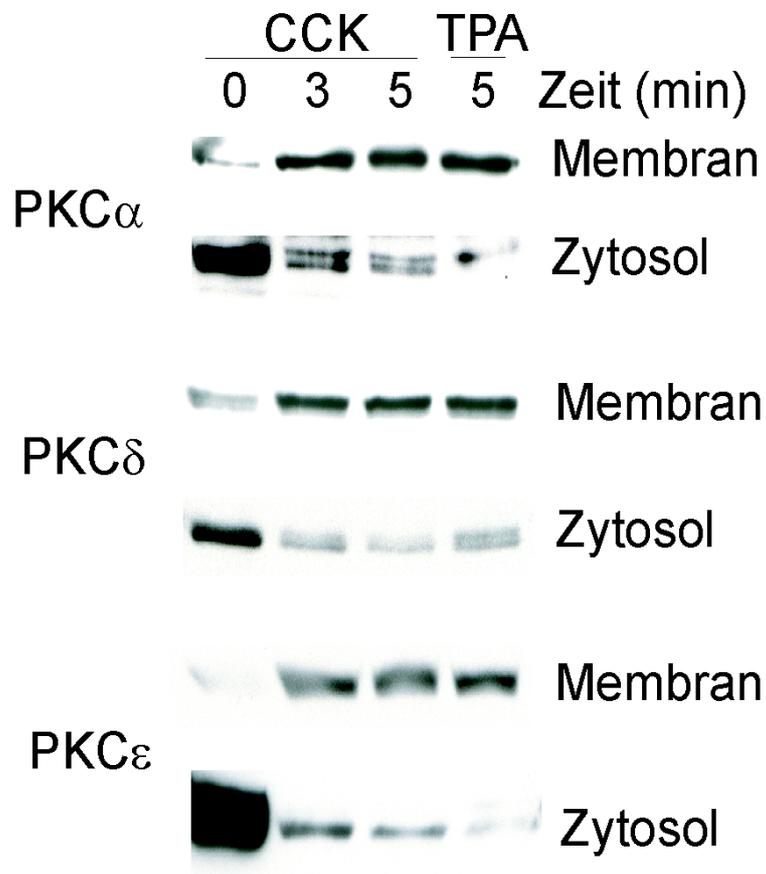


Abbildung 5.5 CCK aktiviert PKC  $\alpha$ , PKC  $\delta$  und PKC  $\epsilon$

AR42J-Zellen wurden 48 Stunden in serumfreiem DMEM inkubiert und anschließend in den angegebenen Zeiten mit CCK (10 nM) bzw. TPA (10 nM) stimuliert. Die Trennung des Zellhomogenates in eine Membran- und Zytosolfraction erfolgte wie in Punkt 4.4 beschrieben. Die Zellfraktionen wurden mit anti-PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  Antikörpern mittels Western-Blot-Verfahrens analysiert.

Diese Daten zeigen eine CCK-induzierte Aktivierung der PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$ , und  $\epsilon$  in der Zelllinie AR42J.

### 5.3.2 Rolle der PKC-Isoformen $\alpha$ , $\delta$ und $\epsilon$ in der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung

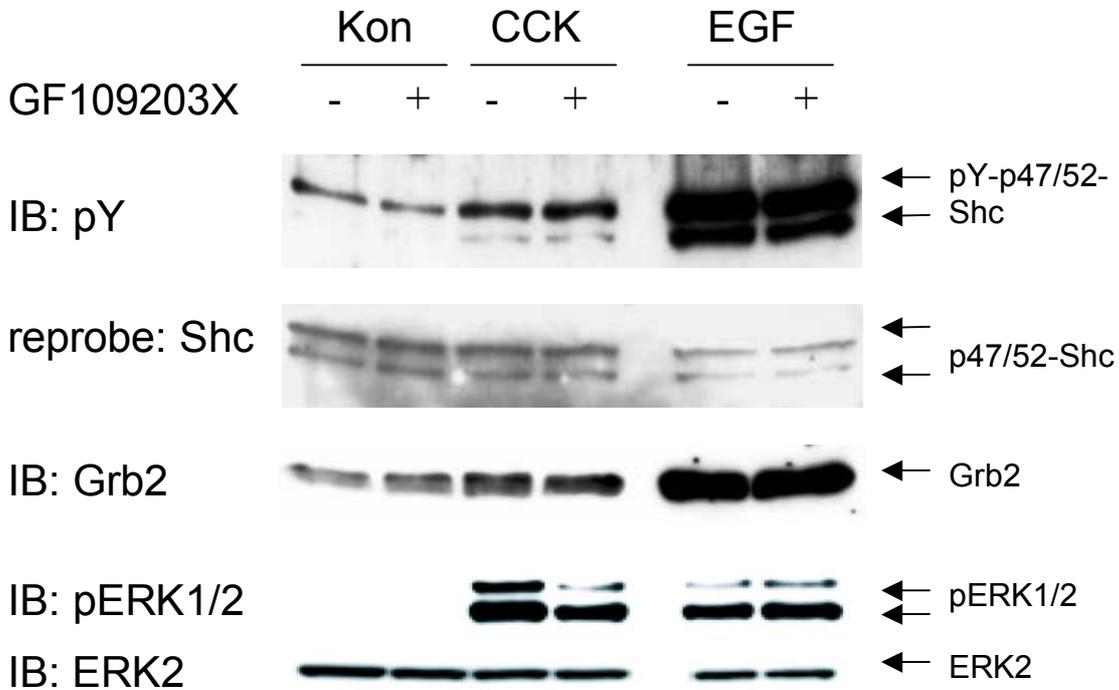
Die Frage, welche PKC-Isoformen die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung vermitteln, sollte mit Hilfe von PKC-Inhibitoren, welche spezifisch bestimmte PKC-Isoformen hemmen, untersucht werden.

Zunächst wurden die in der AR42J-Zelllinie exprimierten und durch CCK aktivierbaren PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  mit der Substanz GF109203X gehemmt und der Effekt auf die CCK-induzierte p44/42<sup>MAPK</sup>-Stimulation mittels anti-Phospho-ERK1/2-Western-Blotting analysiert. Der Inhibitor GF109203X (Bisindolylmaleimid I) führt zur Hemmung der PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  (Toullec et al., 1991). Wie in Abbildung 5.6 ersichtlich, führte GF109203X zu einer partiellen Hemmung der CCK-induzierten MAPK-Phosphorylierung, während der Effekt von EGF auf die MAPK nicht beeinflusst wurde.

Um die in Frage kommenden PKC-Isoformen einzugrenzen, wurden spezifischere PKC-Hemmer benutzt. Go6976 hemmt selektiv die kalziumabhängigen PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  (Martiny-Baron et al., 1993), während Rottlerin PKC $\delta$  hemmt (Gschwendt et al., 1994). In Abbildung 5.7 ist zu erkennen, dass weder Gö6976 noch Rottlerin einen Effekt auf die CCK-induzierte MAPK-Aktivität hatten.

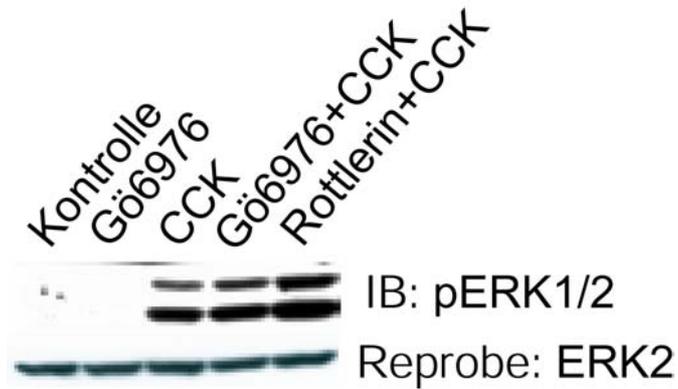
Insgesamt zeigen diese Ergebnisse eine Beteiligung DAG-sensitiver PKC in der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung, wobei eine Hemmung aller exprimierten PKC-Isoformen nur zu einer partiellen Hemmung des MAPK-Signals führt. Eine Beteiligung von PKC $\alpha$  und  $\delta$  erscheint hierbei eher unwahrscheinlich, da die Hemmung dieser Isoformen keinerlei Effekte auf die MAPK-Aktivierung hatte.

IP: Shc



**Abbildung 5.6 Wirkung des PKC-Inhibitors GF109203X auf die CCK-induzierte Shc-Tyrosinphosphorylierung, Shc-Grb2-Komplexbildung und MAPK-Aktivierung**

AR42J-Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von 100 nM GF109203X (zehnminütige Vorbehandlung) mit 10 nM CCK oder 3 nM EGF inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit anti-Shc-Antikörpern. Die Blots wurden einer anti-Phosphotyrosin- und anti-Grb2-Immunoblot-Analyse unterzogen. Um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Bahnen zu überprüfen, wurde ein Reprobe mit anti-Shc-Antikörpern durchgeführt. Parallel zur Immunpräzipitation erfolgte mit den Zelllysaten eine anti-Phospho-ERK1/2-Western-Blot-Analyse.



**Abbildung 5.7 Wirkung der PKC-Inhibitoren Gö6976 und Rottlerin auf die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung**

Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von Gö6976 (10  $\mu$ M) und Rottlerin (10  $\mu$ M) für 3 Minuten mit CCK inkubiert. Die Zelllysate wurden mit anti-Phospho-ERK1/2-Antikörpern analysiert. Der Reprobe erfolgte mit anti-ERK2.



**Abbildung 5.8 Wirkung von AG1478 auf die TPA-induzierte MAPK-Aktivierung**

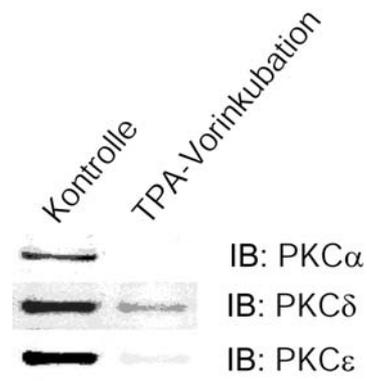
Die Zellen wurden für die Dauer von 3 Minuten mit TPA stimuliert, jeweils in An- oder Abwesenheit von AG1478. Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit anti-phospho-ERK1/2-Antikörpern, der Reprobe mit anti-ERK2-Antikörpern.

### 5.3.3 Rolle der PKC in der CCK-induzierten EGFR-Transaktivierung

Die Frage, ob PKC in der G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptor-induzierten EGFR-Transaktivierung beteiligt ist, wird sehr unterschiedlich diskutiert. Je nach Zell- und Rezeptortyp findet sich ein PKC-abhängiger (Tsai et al., 1997) oder ein PKC-unabhängiger Weg (Herrlich et al., 1998; Adomeit et al., 1999). Es wird sogar die Möglichkeit einer hemmenden Wirkung der PKC auf die GPCR-induzierte EGFR-Transaktivierung diskutiert (Li et al., 1998). An isolierten Pankreasazinuszellen konnte eine Hemmung der CCK-induzierten Shc-Tyrosinphosphorylierung durch den PKC-Hemmer GF109203X beobachtet werden, was eine Beteiligung der PKC im Mechanismus der CCK-induzierten ERK-Aktivierung auf der Ebene von Shc vermuten lässt (Dabrowski et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, in wieweit in AR42J-Zellen die CCK-induzierte EGFR-Transaktivierung von PKC abhängig ist.

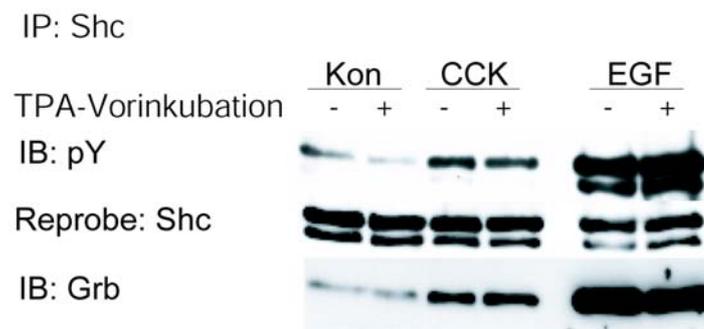
Dazu wurden AR42J-Zellen mit dem PKC-Aktivator TPA stimuliert und der Effekt des EGFR-Tyrosinkinasehemmers AG1478 auf die ERK1/2-Phosphorylierung untersucht. In Abbildung 5.8 ist ersichtlich, dass AG1478 kaum einen Effekt auf die ERK1/2-Phosphorylierung hatte, was die Beteiligung von PKC in diesem Mechanismus unwahrscheinlich macht.

Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurde der Effekt des PKC-Inhibitors GF109203X auf die CCK-induzierte EGFR-Transaktivierung untersucht. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von GF109203X vorbehandelt und anschließend mit CCK bzw. EGF stimuliert. Nach Immunpräzipitation von Shc wurde mittels anti-Phosphotyrosin und anti-Grb2-Western-Blot der Effekt von GF109203X auf die Shc-Tyrosinphosphorylierung und Komplexbildung von Shc mit Grb2 analysiert. Wie in Abbildung 5.6 ersichtlich, hatte eine Behandlung der Zellen mit 0,1 µM GF109203X keinen Effekt auf die CCK-induzierte Shc-Tyrosinphosphorylierung und die Komplexbildung von Shc mit Grb2. Allerdings kam es in dieser Konzentration bereits zu einer mäßigen Hemmung der MAPK-Phosphorylierung. Unter EGF-Stimulation kam es zu keiner Beeinflussung der beschriebenen Effekte und auch zu keiner Hemmung der MAPK-Aktivität.



**Abbildung 5.9** *Langzeitinkubation von TPA führt zur Herunterregulierung der PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$*

AR42J-Zellen wurden mit 10 nM TPA für 18 Stunden inkubiert und mit anti- $\alpha$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Immunoblot-Analyse untersucht. Kontrollvehikel war Dimethylsulfoxid.



**Abbildung 5.10** *Wirkung der TPA-Langzeitinkubation auf die CCK-induzierte EGFR-Transaktivierung*

AR42J-Zellen wurden 24 Stunden mit TPA vorbehandelt und anschließend mit CCK (10 nM) bzw. EGF (3 nM) versetzt. Die Zelllysate wurden mit anti-Shc immunpräzipitiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Es erfolgte anschließend die Western-Blot-Analyse mit anti-Phosphotyrosin- und anti-Grb2-Antikörpern. Der Reprobe erfolgte entsprechend mit anti-Shc.

Vergleichbare Ergebnisse in Hinblick auf Shc und Grb2 ergaben sich auch bei PKC-Herunterregulierung durch Langzeit-Inkubation mit TPA. Eine Langzeitinkubation der Zellen mit Phorbol ester (TPA) über 24 Stunden führte zur Herunterregulierung sämtlicher Diacylglycerol-sensitiver PKC-Isoformen (Nishizuka, 1995), also auch der hier interessierenden PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ . Dies wurde in Abbildung 5.9 mit entsprechenden PKC-Isoform-Western-Blot-Analysen gezeigt. Anschließend wurde Shc immunpräzipitiert und mit anti-Grb2 und anti-Phosphotyrosin-Western-Blot analysiert. Abbildung 5.10 zeigt, dass die CCK-induzierte Shc-Phosphorylierung und Komplexierung mit Grb2 nicht durch TPA gehemmt werden konnte.

Diese Daten zeigen, dass die Proteinkinase C weder in der CCK-, noch in der EGF-induzierten EGFR-Transaktivierung beteiligt zu sein scheint.

## 6. Diskussion

Die Mechanismen der GPCR-induzierten MAPK-Aktivierung werden in der Literatur äußerst kontrovers diskutiert. Je nach untersuchter Zelllinie und insbesondere GPCR-Typ finden sich unterschiedliche Signalkaskaden. Für  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren wird hauptsächlich eine PKC-abhängige MAPK-Aktivierung beschrieben, in der Ras nicht beteiligt sein soll (Hawes et al., 1995). Für den ebenfalls  $G_q$ -gekoppelten CCK-Rezeptor konnte jedoch in primären Pankreasazinuszellen und in pankreatischen AR42J-Zellen sowohl eine Beteiligung von PKC, als auch von Ras gezeigt werden (Seva et al., 1996; Dabrowski et al., 1996; Daulhac et al., 1997). Hierbei führt die Stimulation des CCK-Rezeptors zu einer Shc-Tyrosinphosphorylierung und Komplexierung mit Grb2 und anschließend über SOS1 zur Ras-abhängigen MAPK-Aktivierung. Als weiterer möglicher Mechanismus wird inzwischen auch eine Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie des EGFR im Rahmen der GPCR-induzierten MAPK-Aktivierung beschrieben. Neben der EGFR-Tyrosinphosphorylierung kommt es dabei ebenfalls zur Shc-Phosphorylierung und Komplexbildung zwischen Shc, Grb2 und dem EGFR (Daub et al., 1996 & 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte an AR42J-Zellen eine Beteiligung des EGFR im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung gezeigt werden. Über die Stimulation des  $G_{q/11}$ -gekoppelten CCK-Rezeptors durch CCK kommt es zur Aktivierung des EGFR, wobei die am EGFR ablaufenden Prozesse mit dem Mechanismus der EGF-induzierten EGFR-Aktivierung vergleichbar sind. Diese Prozesse beinhalten die Tyrosinphosphorylierung sowohl des EGFR wie auch von Shc und die Komplexbildung zwischen EGFR, Shc und Grb2. Alle diese Effekte waren von der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität abhängig, da sie durch den EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 gehemmt werden konnten. Das Ausschalten des EGFR durch AG1478 führte zu einer deutlichen Hemmung der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung, was die Bedeutung des EGFR zeigt.

Der Mechanismus der CCK-Rezeptor-induzierten EGFR-Tyrosinphosphorylierung ist unklar. Der hemmende Effekt von AG1478 auf die EGFR-Tyrosinphosphorylierung lässt vermuten, dass die CCK-induzierte EGFR-Tyrosinphosphorylierung auf einer EGFR-Autophosphorylierung beruht. Eine von der intrinsischen Tyrosinkinase abhängige Autophosphorylierung des EGFR wird auch durch den Rezeptorliganden EGF beobachtet. Dies lässt die Frage aufkommen, ob die GPCR-induzierte EGFR-Transaktivierung durch Liganden vermittelt wird. So wird in der Literatur die Möglichkeit einer EGFR-Transaktivierung auf

extrazellulärem Weg beschrieben. Dabei führt die GPCR-Aktivierung zu einem intrazellulären Signal, welches transmembranäre Metalloproteinasen aktiviert, welche wiederum die Spaltung des transmembranären proHB-EGF und die Freisetzung von HB-EGF ermöglichen. Auf autokrinem/parakrinem Weg interagiert HB-EGF mit dem EGF-Rezeptor und führt so zur Tyrosinphosphorylierung und zur Aktivierung des EGFR (Prenzel et al., 1999). Auch an CCK<sub>B</sub>/Gastrin-Rezeptor-transfizierten epithelialen Magenzellen konnte eine Gastrin-induzierte HB-EGF-Freisetzung in das Medium gemessen werden, was nachfolgend eine EGFR-Tyrosinphosphorylierung induzierte (Miyazaki et al., 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings nach CCK-Stimulation kein HB-EGF im Medium gemessen werden (Daten nicht gezeigt). In AR42J-Zellen hatte der HB-EGF-Inhibitor [Glu<sup>52</sup>] *Diphtheria* toxin (CRM 197) keinen Effekt auf die CCK-induzierte ERK1/2-Aktivierung (Piiper et al., 2003). Diese Daten machen in AR42J-Zellen eine HB-EGF-Beteiligung in der CCK-induzierten ERK1/2-Aktivierung unwahrscheinlich. Es ist jedoch denkbar, dass in AR42J-Zellen andere EGFR-Liganden auf autokrinem/parakrinem Wege an der CCK-induzierten ERK1/2-Aktivierung beteiligt sind.

In diversen Arbeiten wird eine Rolle von Kinasen der Src-Familie (SFTK) im Mechanismus der G<sub>q</sub>-vermittelten EGFR-Transaktivierung und MAPK-Aktivierung postuliert. So wird vermutet, dass SFTK eine Tyrosinphosphorylierung des EGFR (Luttrell et al., 1997; Eguchi et al., 1998; Andreev et al., 2001) und/oder Shc (Luttrell et al., 1996; Daulhac et al., 1999; Abram & Courtneidge, 2000) induzieren und über diesen Mechanismus nachfolgend eine Ras-abhängige MAPK-Aktivierung induzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass CCK zu einer Aktivierung der zur SFTK-zugehörigen Src-Kinase führte. Durch den SFTK-Inhibitor PP1 konnte tatsächlich eine Beteiligung von SFTK in der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung gezeigt werden, da das MAPK-Signal unter CCK-Stimulation reduziert werden konnte. Ebenso hemmte PP1 die CCK-induzierte Komplexbildung von Grb2 und Shc mit dem EGFR und die Tyrosinphosphorylierung von Shc. Die CCK-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR war dagegen nicht SFTK-abhängig. Durch weiterführende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte an AR42J-Zellen anhand Shc- bzw. EGFR-Immunpräzipitaten gezeigt werden, dass neben der Src-Kinase auch Yes, ein weiteres Mitglied der SFTK, unter CCK-Stimulation aktiviert wird und mit dem EGFR sowie mit Shc komplexiert (Piiper et al., 2003). Eine GPCR-induzierte Komplexbildung von SFTK mit Shc oder dem EGFR wurde auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Luttrell et al., 1996; Sadoshima & Izumo, 1996; Eguchi et al., 1998; Daulhac et al., 1999). Die Aktivierung des G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelten AT1-

Rezeptors durch Angiotensin II führt in glatten Muskelzellen zur Komplexbildung der aktivierten Src-Kinase mit Shc als auch dem EGFR. Shc wird an den EGFR rekrutiert, wo es anschließend als Substrat der Src-Kinase phosphoryliert wird. Der EGFR dient hier als "Anker", über welchen Src, Shc und Grb2 zusammengeführt werden (Eguchi et al., 1998). Solch ein Mechanismus wäre auch in der AR42J-Zelle denkbar.

Verglichen mit CCK war die EGF-induzierte MAPK-Aktivierung weitaus weniger SFTK-abhängig. So führte PP1 nur zu einer schwachen Hemmung des EGF-induzierten MAPK-Signals. Die EGF-induzierte Shc-Tyrosinphosphorylierung konnte durch PP1 nicht gehemmt werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von Kinase-inaktiven Src-Mutanten keinen Einfluss auf die EGF-induzierte Shc-Tyrosinphosphorylierung, Shc/Grb2-Komplexbildung und die MAPK-Aktivierung in epithelialen Zellen hatte (Boyer et al., 1997). Im Gegensatz zu CCK scheinen SFTK also in der EGF-induzierten MAPK-Aktivierung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Ursachen hierfür sind unklar. Es ist aber beschrieben worden, dass diverse EGFR-Liganden wie EGF, HB-EGF, Betacellulin oder NDF am gleichen Rezeptor unterschiedliche Signalkaskaden mit entsprechend unterschiedlicher Beteiligung von intrazellulären Kinasen aktivieren (Graus-Porta et al., 1997). Obwohl eine Beteiligung von HB-EGF im Rahmen der CCK-induzierten EGFR-Transaktivierung nicht gezeigt werden konnte, ist durchaus eine Beteiligung anderer autokrin/parakrin agierender EGFR-Liganden denkbar, was die unterschiedliche Bedeutung von SFTK erklären könnte.

Neben SFTK wird auch die Beteiligung weiterer zytoplasmatischer Tyrosinkinase in der GPCR-induzierten EGFR-Transaktivierung und MAPK-Aktivierung diskutiert. So soll ähnlich wie SFTK die Tyrosinkinase Pyk2 eine Shc-Tyrosinphosphorylierung induzieren (Lev et al., 1995). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch eine Pyk2-Expression in der AR42J-Zelle anhand von Western-Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sind für die CCK-induzierte EGFR-Transaktivierung und die nachfolgende Ras-abhängige MAPK-Aktivierung folgende Mechanismen denkbar, welche gemeinsam die Effekte am EGFR vermitteln und auf der Ebene des Shc-Grb2-Komplexes konvergieren:

- a. CCK induziert eine SFTK-unabhängige EGFR-Tyrosinphosphorylierung über unbekannte Mechanismen. Denkbar ist eine EGFR-Transaktivierung über autokrin/parakrin agierende EGFR-Liganden, ähnlich dem von Prenzel et al. (1999) beschriebenen Modell mit Beteiligung von HB-EGF/Metalloproteinasen. Dies führt zu einer Autophosphorylierung des EGFR, was ein Andocken von Shc und Grb2 erst ermöglicht.

- b. Parallel dazu aktiviert CCK die SFTK-zugehörige Yes-Kinase, welche mit dem EGFR eine Komplexbindung eingeht. Der EGFR dient hierbei als "Anker", indem er Shc und Yes zusammenführt. Dadurch kann die Yes-Kinase mit ihrem Substrat Shc eine Komplexbildung eingehen und in diesem Rahmen Shc tyrosinphosphorylieren. Dadurch könnte die weitere Signalkaskade über Ras in Gang gesetzt werden.

Die beiden parallel ablaufenden Mechanismen sind voneinander abhängig, da eine jeweilige Hemmung von Yes bzw. der EGFR-Tyrosinkinase auch die EGFR-Shc-Grb2-Komplexbildung bzw. Tyrosinphosphorylierung von Shc und die nachfolgende MAPK-Aktivierung hemmt.

Die Stimulation von AR42J-Zellen mit CCK bzw. EGF führte jeweils zu einer gleichstark ausgeprägten MAPK-Aktivierung. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die unter CCK- bzw. EGF-Stimulation beobachteten Effekte am EGFR nicht gleich stark ausgeprägt waren, wobei die Effekte von CCK signifikant schwächer waren. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine Hemmung des EGFR mit AG1478 nur zu einer partiellen Abschwächung der MAPK-Aktivität führt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass für eine volle CCK-induzierte MAPK-Aktivierung der Mechanismus der EGFR-Transaktivierung alleine nicht ausreicht, sondern weitere Signaltransduktionswege existieren müssen, welche parallel und damit unabhängig vom EGFR lokalisiert sind und so erst eine maximale MAPK-Aktivierung ermöglichen.

So wird neben dem EGFR insbesondere für die PKC eine Rolle im Mechanismus der  $G_{q/11}$ -vermittelten MAPK-Aktivierung beschrieben (Hawes et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Herunterregulierung DAG-sensitiver PKC-Isoformen durch Langzeitinkubation mit Phorbolster bzw. Hemmung durch GF109203X eine partielle Hemmung der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung festgestellt werden, welches eine Beteiligung DAG-sensitiver PKC-Isoformen beweist. Eine Hemmung konnte unter EGF-Stimulation nicht gezeigt werden.

In diversen Arbeiten wurde auch die PKC in der Vermittlung GPCR-induzierter EGFR-Transaktivierung beschrieben (Soltoff, 1998; Tsai et al., 1997). Unter Langzeitinkubation mit Phorbolster bzw. GF109203X konnte allerdings keine Beeinflussung der CCK-induzierten EGFR-Transaktivierung beobachtet werden, welches eine PKC-Beteiligung in diesem Signaltransduktionsweg unwahrscheinlich macht.

In der Zelllinie AR42J sind die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  exprimiert, welche durch CCK aktiviert werden. Durch die Anwendung von PKC-Inhibitoren, welche spezifisch Isoformen hemmen, sollte geklärt werden, welche PKC-Isoform an der Vermittlung der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung beteiligt ist. Dabei zeigte sich, dass eine Hemmung von

PKC $\alpha$  durch Gö6976 bzw. - $\delta$  durch Rottlerin zu keiner Beeinflussung des MAPK-Signals führten. Somit ist wahrscheinlich, dass PKC  $\epsilon$  als verbleibende PKC-Isoform parallel zum EGFR die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung vermitteln könnte.

Über welchen genauen Mechanismus PKC zu einer MAPK-Aktivierung führt, wird kontrovers diskutiert. Für G<sub>q/11</sub>-gekoppelte Rezeptoren wie den M<sub>1</sub>-muskarinergen Rezeptor oder den  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die MAPK-Aktivierung zwar PKC abhängig, aber ohne Ras-Beteiligung abläuft. Auch die durch direkte PKC-Aktivierung mit TPA induzierte MAPK-Aktivierung war Ras-unabhängig (Hawes et al., 1995). Im Gegensatz dazu konnte auch eine Ras-Abhängigkeit in der TPA-induzierten MAPK-Aktivierung beobachtet werden (Thomas et al., 1992). Da im Rahmen dieser Arbeit eine EGFR-Beteiligung in Form einer EGFR-Transaktivierung gezeigt werden konnte, sollte es analog zum Mechanismus der EGF-induzierten ERK-Aktivierung ebenfalls zu einer Ras-abhängigen ERK-Aktivierung unter CCK-Stimulation kommen. Begleitende Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die CCK-induzierte MAPK-Aktivierung tatsächlich Ras-abhängig ist (Piiper et al., 2003). Die CCK-induzierte Ras- und c-Raf-Aktivierung war wiederum von PKC, EGFR und Yes abhängig. Die direkte Aktivierung von PKC mit TPA führte zu einer Ras- und ERK1/2-Aktivierung, welche im Gegensatz zu CCK kaum EGFR-abhängig war. Des Weiteren konnte unter CCK-Stimulation eine Komplexbildung zwischen Raf und PKC $\epsilon$  beobachtet werden. Diese Ergebnisse machen eine Beteiligung der PKC $\epsilon$  im Rahmen der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung auf der Ebene der Ras-Raf-Aktivierung wahrscheinlich. In der gleichen Arbeit wurde eine Ras-Aktivierung durch CCK anhand eines Ras-Assays beschrieben, welche jedoch schwächer ausgeprägt war als unter EGF-Stimulation und zudem EGFR-abhängig war. Die unterschiedlichen Ausmaße der Ras-Aktivierung von CCK und EGF waren interessanterweise vergleichbar mit denen im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Effekte am EGFR. Im Gegensatz dazu war das Ausmaß der Raf-1- und ERK1/2-Aktivierung unter CCK-Stimulation mit dem von EGF vergleichbar, also deutlich stärker ausgeprägt.

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, inwiefern es trotz schwächerer EGFR- und Ras-Aktivierung zu einer nachfolgenden Verstärkung des Raf-1- und ERK-Signals kommt. So wird beschrieben, dass PKC die Ras-abhängige ERK-Aktivierung über eine Feinabstimmung der Ras-Raf-Aktivierung moduliert (Kolch et al., 1993; Burgering & Bos, 1995; Marais et al., 1998; Chiloehes et al., 1999). Für PKC  $\alpha$  und PKC  $\epsilon$  wurde eine direkte Aktivierung von Raf-1 beschrieben (Kolch et al., 1993; Cai et al., 1997). Für die PKC-induzierte Raf-1-Aktivierung wird Ras in Form eines Ras-GTP-Raf-Komplexes benötigt (Marais et al., 1998).

Erst kürzlich wurde eine konstitutive Komplexbildung zwischen Ras, c-Raf-1 und PKC  $\epsilon$  beschrieben. Die Aktivierung von PKC $\epsilon$  durch TPA führt zu einer Komplexaktivierung, welche zu einer Ras-abhängigen Raf-1 und nachfolgender MAPK-Aktivierung führt (Hamilton et al., 2001). Über diesen Komplex könnte PKC $\epsilon$  mit dem EGFR/Ras-Pfad konvergieren und so die Raf-1-Aktivierung verstärken.

Anhand dieser Ergebnisse ist folgender Gesamtmechanismus denkbar (siehe auch Abbildung 6.1):

CCK führt über den G<sub>q</sub>-gekoppelten CCK-Rezeptor zu einer EGFR-Transaktivierung und zur Yes-abhängigen Bildung eines EGFR-Shc-Grb2-Komplexes, welches über SOS-1 zur Ras- und nachfolgenden Raf-1-Aktivierung führt. Parallel zum EGFR kommt es unter CCK-Stimulation im Weiteren zur Aktivierung von PKC $\epsilon$ , welche über den vermutlich konstitutiv formierten Ras-Raf-1-PKC $\epsilon$ -Komplex in Abhängigkeit von Ras ebenfalls Raf-1 aktiviert. Vermutlich findet über die Komplexaktivierung eine Verstärkung der bis dahin relativ schwachen EGFR/Ras-abhängigen Raf-1-Aktivierung statt. Beide Signaltransduktionswege konvergieren also auf der Ras-Raf-1-Ebene. Das nun verstärkte Raf-1-Signal führt über MEK zur vollen MAPK-Aktivierung, wie sie auch unter EGF-Stimulation beobachtet wird.

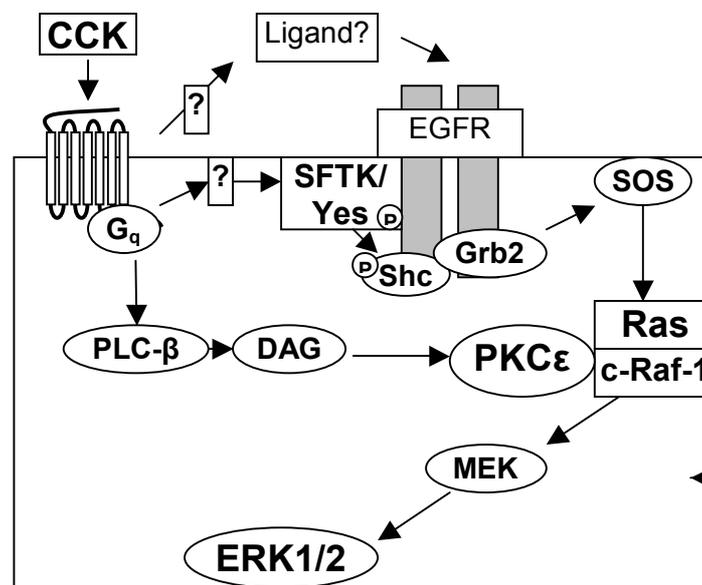


Abbildung 6.1 *Vorgeschlagenes Modell zum Mechanismus der Cholezystokinin-induzierten MAPK-Aktivierung in der AR42J-Zelle*

Dieses Modell lässt jedoch Fragen offen, deren Klärung weiterführende Untersuchungen bedürfen:

- a. Über welchen Mechanismus führt CCK zu einer Tyrosinphosphorylierung des EGFR? Interessant ist hierbei insbesondere die Rolle von Matrix-Metalloproteinasen, welche transmembranäre Prohormone spalten und über autokrine/parakrine Wege zu einer EGFR-Aktivierung führen. In unserer Arbeitsgruppe konnte eine Beteiligung von HB-EGF nicht nachgewiesen werden. Vermutlich spielen andere EGFR-Liganden hier eine Rolle. So werden neben pro-HB-EGF auch andere Vorstufen von Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- $\alpha$  von Metalloproteinasen proteolytisch freigesetzt (Massague & Pandiella, 1993), welche als EGFR-Liganden die EGFR-Transaktivierung vermitteln könnten.
- b. Wie werden SFTK durch GPCR/CCK-Rezeptoren aktiviert? Im Gegensatz zu  $\alpha$ -Untereinheiten von  $G_s$ - und  $G_i$ -Proteinen konnte für  $G_{\alpha_q}$  keine direkte Src-Aktivierung beobachtet werden (Ma et al., 2000). In AR42J-Zellen war die CCK-induzierte Src-Autophosphorylierung nicht von Pertussistoxin (PTX) abhängig, was eine Beteiligung von PTX-sensitiven G-Proteinen wie  $G_i$  unwahrscheinlich macht (Piiper et al., 2003). Kürzlich wurde eine direkte Src-Aktivierung durch den  $G_q$ -gekoppelte Angiotensin II-Rezeptor ohne Beteiligung von G-Proteinen postuliert (Seta et al., 2002). Auch für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor wurde eine direkte Aktivierung von Src durch den Rezeptor im Rahmen einer Rezeptor-Src-Komplexbildung beschrieben. Die Rekrutierung von Src an den EGFR wird durch  $\beta$ -Arrestin vermittelt, welches als Adapterprotein fungiert (Luttrell et al., 1999). Interessant wäre es zu klären, ob eine Rezeptor-Src/SFTK-Komplexbildung auch in AR42J-Zellen eine Rolle spielt. Dies könnte anhand von Ko-Immünpräzipitationsstudien zum Nachweis der Assoziation von SFTK, CCK-Rezeptor und ggf. Arrestin untersucht werden.
- c. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Rolle von PKC $\epsilon$  in der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung beschrieben. Gestützt wurde diese Beobachtung durch den Nachweis einer verstärkten Komplexbildung von PKC $\epsilon$  und Raf-1 (Piiper et al., 2003). Eine selektive Hemmung von PKC $\epsilon$  wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht vollzogen. Die Anwendung von Kinaseinhibitoren ist immer mit dem Risiko einer gewissen Unspezifität verbunden. Erst kürzlich wurde für den PKC $\delta$ -Inhibitor Rottlerin die Spezifität angezweifelt (Soltoff, 2001). Um eine isolierte PKC $\epsilon$ -Ausschaltung zu erreichen, wäre folgendes experimentelles Vorgehen angezeigt: Durch Transfektion von AR42J-Zellen mit "anti-sense"-Oligonukleotiden wird die Expression von PKC $\epsilon$  gehemmt.

Anschließend könnte der Effekt auf die CCK-induzierte Ras-, Raf-1- und MAPK-Aktivierung durch Western-Blot-Analyse untersucht werden.

Die Klärung dieser Punkte könnte neben den Ergebnissen dieser Arbeit zu einer noch genaueren Charakterisierung MAPK-aktivierender Mechanismen beitragen.

Wie einleitend bereits beschrieben, schafft eine detaillierte Kenntnis dieser Mechanismen neue Möglichkeiten für die Entwicklung, Erprobung und Anwendung von Substanzen, welche selektiv gegen "krebsspezifische" molekulare Zielstrukturen agieren. Die Selektivität eines solchen Therapieprinzips sollte mit einer weit schonenderen und eventuell auch effektiveren pharmakologischen Krebsbehandlung, als es die konventionelle Chemotherapie heute zulässt, einhergehen.

## 7. Zusammenfassung

Die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) spielt eine Schlüsselrolle in der Vermittlung proliferativer Effekte sowohl von Rezeptoren vom Tyrosinkinase-Typ (RTK) wie dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), als auch von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die MAPK-Aktivierungsmechanismen durch GPCR sind im Gegensatz zum EGFR unzureichend verstanden und stark von Rezeptor- und Zelltyp abhängig. Ziel dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung der Signaltransduktion des GPCR-zugehörigen Cholezystokinin (CCK)-Rezeptors bezüglich der Aktivierung der MAPK durch Western-Blot-Analysen in der Pankreasazinus-Karzinomzelllinie AR42J der Ratte.

Die Ergebnisse zeigen eine Beteiligung des EGFR im Mechanismus der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung mittels einer EGFR-Transaktivierung. Diese ist mit einer Tyrosinphosphorylierung des EGFR und von Shc sowie einer Komplexbildung der Adapterproteine Shc und Grb2 mit dem EGFR verbunden. Diese Vorgänge sind von der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des EGFR abhängig.

Neben dem EGFR konnte durch weitere Untersuchungen eine Aktivierung und Beteiligung von Tyrosinkinasen der Src-Familie (SFTK) an der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung gezeigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die CCK-induzierte Shc-Tyrosinphosphorylierung und die EGFR-Shc-Grb2-Komplexbildung im Rahmen der EGFR-Transaktivierung SFTK-abhängig sind. Im Gegensatz dazu ist die EGFR-Tyrosinphosphorylierung SFTK-unabhängig. Diese Daten zeigen, dass die CCK-induzierte Signalvermittlung des EGFR die gemeinsame Aktivierung von SFTK und EGFR benötigt.

Neben der EGFR-Transaktivierung konnte im Rahmen der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung ein weiterer Signaltransduktionsweg charakterisiert werden, welcher die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) beinhaltet. Es konnte gezeigt werden, dass CCK in AR42J-Zellen eine Aktivierung der PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  induziert. Eine Hemmung aller drei PKC-Isoformen führte zur Hemmung des MAPK-Signals, während die isolierte Hemmung von PKC  $\alpha$  und  $\delta$  keine Effekte verursachte. Diese Resultate deuten darauf hin, dass PKC $\epsilon$  an der CCK-induzierten MAPK-Aktivierung beteiligt ist. Eine Beteiligung der PKC an der EGFR-Transaktivierung konnte nicht nachgewiesen werden. Demnach scheint der PKC-abhängige MAPK-Aktivierungsmechanismus parallel zum EGFR zu verlaufen und erst distal des EGFR mit dem EGFR/SFTK-abhängigen Signaltransduktionsweg zu konvergieren.

## Summary

Activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) plays a key role in mediating proliferative effects of both receptor tyrosine kinases (RTKs) such as the epidermal growth factor receptor (EGFR) and G-protein coupled receptors (GPCR). Compared to the EGFR pathway the mechanism by which GPCR induce MAPK activation is still poorly understood and depends on receptor and cell type. The aim of the present study was to characterize the CCK-induced signal transduction pathways leading to MAPK activation in the pancreatic acinar carcinoma cell line AR42J using immunoblot analyses.

The results show an involvement of the EGFR in CCK-induced MAPK activation. CCK induces transactivation of the EGFR which includes tyrosine phosphorylation of both EGFR and Shc and complex formation of the docking proteins Shc and Grb2 with the EGFR. These effects depend on the intrinsic tyrosine kinase activity of the EGFR.

Further investigations also demonstrate an involvement of Src family tyrosine kinases (SFTK) in CCK-induced MAPK activation. The data show that CCK-induced EGFR tyrosine phosphorylation is SFTK-independent, whereas CCK-induced complex formation of Shc-Grb2 with the EGFR and Shc tyrosine phosphorylation requires SFTK activity. These results indicate that a concerted action of both EGFR and SFTK is required for CCK-induced EGFR signalling.

Beside of EGFR transactivation, activation of a protein kinase C (PKC) appears to be involved in CCK-induced MAPK activation. CCK was shown to activate PKC $\alpha$  as well as PKC $\delta$  and  $\epsilon$ . Inhibition of all three PKC isoenzymes reduced CCK-induced MAPK activation while specific inhibition of PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  had no effect. These findings suggest an involvement of PKC $\epsilon$  in CCK-induced MAPK activation. On the other hand CCK-induced EGFR transactivation was PKC-independent. Taken together, these results indicate that in addition to the EGFR/SFTK pathway CCK-induced MAPK activation also requires activation of another pathway involving PKC which mediates MAPK activation in an EGFR/SFTK-independent manner and converges with the EGFR-dependent pathway downstream of the EGFR.

## 8. Literatur

- Abram, C.L., Courtneidge, S.A. (2000) Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res.* 254: 1-13
- Adomeit, A., Graness, A., Gross, S., Seedorf, K., Wetzker, R., Liebmann, C. (1999) Bradykinin B(2) receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cell Biol.* 19: 5289-5297
- Andreev, J., Galisteo, M.L., Kranenburg, O., Logan, S.K., Chiu, E.S., Okigaki, M., Cary, L.A., Moolenaar, W.H., Schlessinger, J. (2001) Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J Biol Chem.* 276: 20130-20135
- Arvanitakis, L., Geras-Raaka, E., Varma, A., Gershengorn, M.C., Cesarman, E. (1997) Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature.* 385: 347-350
- Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Chee, M.S., Hutchison, C.A. 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., Preddie, E. (1991) The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq.* 2: 1-12
- Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361: 315-325
- Berridge, M. J., Irvine, R. F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 312: 315-321
- Bolen, J.B., Brugge, J.S. (1997) Leukocyte protein tyrosine kinases: potential targets for drug discovery. *Annu Rev Immunol.* 15: 371-404
- Boyer, B., Roche, S., Denoyelle, M., Thiery, J.P. (1997) Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering. *EMBO J.* 16: 5904-5913
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254
- Burgering, B.M., Bos, J.L. (1995) Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem Sci.* 20: 18-22

- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Rapp, U., Cooper, G.M. (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol.* 17: 732-741
- Caponigro, F., French, R.C., Kaye, S.B. (1997) Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? *Anticancer Drugs.* 8: 26-33
- Casabona, G. (1997) Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 21: 407-425
- Cazaubon, S.M., Ramos-Morales, F., Fischer, S., Schweighoffer, F., Strosberg, A.D., Couraud, P.O. (1994) Endothelin induces tyrosine phosphorylation and GRB2 association of Shc in astrocytes. *J Biol Chem.* 269: 24805-24809
- Chee, M.S., Satchwell, S.C., Preddie, E., Weston, K.M., Barrell, B.G. (1990) Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature.* 344: 774-777
- Chen, Y., Grall, D., Salcini, A.E., Pelicci, P.G., Pouyssegur, J., Van Obberghen-Schilling, E. (1996) Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J.* 15: 1037-1044
- Chen, Y.H., Pouyssegur, J., Courtneidge, S.A., Van Obberghen-Schilling, E. (1994) Activation of Src family kinase activity by the G protein-coupled thrombin receptor in growth-responsive fibroblasts. *J Biol Chem.* 269: 27372-27377
- Chiloeches, A., Paterson, H.F., Marais, R., Clerk, A., Marshall, C.J., Sugden, P.H. (1999) Regulation of Ras.GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J Biol Chem.* 274: 19762-19770
- Clerc, P., Leung-Theung-Long, S., Wang, T.C., Dockray, G.J., Bouisson, M., Delisle, M.B., Vaysse, N., Pradayrol, L., Fourmy, D., Dufresne, M. (2002) Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia. *Gastroenterology.* 122: 428-437
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., Gutkind, J.S.. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature.* 369: 418-420

- Cuttitta, F., Carney, D.N., Mulshine, J., Moody, T.W., Fedorko, J., Fischler, A., Minna, J.D. (1985) Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*. 316: 823-826
- Dabrowski, A., Detjen, K.M., Logsdon, C.D., Williams, J.A. (1997) Stimulation of both CCK-A and CCK-B receptors activates MAP kinases in AR42J and receptor-transfected CHO cells. *Digestion*. 58: 361-367
- Dabrowski, A., VanderKuur, J.A., Carter-Su, C., Williams, J.A.. (1996) Cholecystokinin stimulates formation of shc-grb2 complex in rat pancreatic acinar cells through a protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 271: 27125-2719
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A., Ullrich, A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J*. 16: 7032-7044
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., Ullrich A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*. 379: 557-560
- Daulhac, L., Kowalski-Chauvel, A., Pradayrol, L., Vaysse, N., Seva, C. (1997) Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C-dependent mechanisms involved in gastrin-induced Shc/Grb2 complex formation and P44-mitogen-activated protein kinase activation. *Biochem J*. 325: 383-389
- Daulhac, L., Kowalski-Chauvel, A., Pradayrol, L., Vaysse, N., Seva, C. (1999) Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKB receptors. *J Biol Chem*. 274: 20657-20663
- Davis, R.J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 268: 14553-14556
- Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D.K., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1997) Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem*. 272: 19125-19132
- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A., Schlessinger, J. (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*. 383: 547-550
- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*. 321: 75-79

- Dohlman, H.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry*. 26:2657-2664
- Downward, J. (1996) Control of ras activation. *Cancer Surv.* 27: 87-100
- Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E.D., Kawakatsu, H., Owada, K.M., Hirata, Y., Marumo, F., Inagami, T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 273: 8890-8896
- Friess, H., Berberat, P., Schilling, M., Kunz, J., Korc, M., Buchler, M.W. (1996) Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. *J Mol Med*. 74: 35-42
- Goldenberg, M. M. (1999) Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther*. 21: 309-318
- Goldhirsch, A., Coates, A.S., Castiglione-Gertsch, M., Gelber, R.D. (1998) New treatments for breast cancer: breakthroughs for patient care or just steps in the right direction? *Ann Oncol*. 9: 973-976
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., Hynes, N.E. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*. 16: 1647-1655
- Gschwendt, M., Muller, H.J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., Marks, F. (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 199: 93-98
- Gutkind, J.S. (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*. 17: 1331-1342
- Gutkind, J.S. (2000) Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE*. 2000:RE1
- Hamilton, M., Liao, J., Cathcart, M.K., Wolfman, A. (2001) Constitutive association of c-N-Ras with c-Raf-1 and protein kinase C epsilon in latent signaling modules. *J Biol Chem*. 276: 29079-29090
- Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., Connelly, P.A. (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-

- selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem.* 271: 695-701
- Hawes, B.E., Luttrell, L.M., van Biesen, T., Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem.* 271: 12133-12136
- Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1995) Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 270: 17148-17153
- Herrington, M.K., Adrian, T.E. (1995) On the role of cholecystokinin in pancreatic cancer. *Int J Pancreatol.* 17: 121-138
- Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G., Gudermann, T. (1998) Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 8985-8990
- Hoosein, N.M., Kiener, P.A., Curry, R.C., Rovati, L.C., McGilbra, D.K., Brattain, M.G. (1988) Antiproliferative effects of gastrin receptor antagonists and antibodies to gastrin on human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 48: 7179-7183
- Huebner, K., Kastury, K., Druck, T., Salcini, A.E., Lanfrancone, L., Pelicci, G., Lowenstein, E., Li, W., Park, S.H., Cannizzaro, L. (1994) Chromosome locations of genes encoding human signal transduction adapter proteins, Nck (NCK), Shc (SHC1), and Grb2 (GRB2). *Genomics.* 22: 281-287
- Hynes, N.E., Gerber, H.A., Saurer, S., Groner, B. (1989) Overexpression of the c-erbB-2 protein in human breast tumor cell lines. *J Cell Biochem.* 39: 167-173
- Igishi, T., Gutkind, J.S. (1998) Tyrosine kinases of the Src family participate in signaling to MAP kinase from both Gq and Gi-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 244: 5-10
- Kalinec, G., Nazarali, A.J., Hermouet, S., Xu, N., Gutkind, J.S. (1992) Mutated alpha subunit of the Gq protein induces malignant transformation in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* 12: 4687-4693
- Khleif, S.N., Abrams, S.I., Hamilton, J.M., Bergmann-Leitner, E., Chen, A., Bastian, A., Bernstein, S., Chung, Y., Allegra, C.J., Schlom, J. (1999) A phase I vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors. *J Immunother.* 22:155-165

- Kim, H.K., Nam, J.Y., Han, M.Y., Lee, E.K., Choi, J.D., Bok, S.H., Kwon, B.M. (1999) Actinomycin D as a novel SH2 domain ligand inhibits Shc/Grb2 interaction in B104-1-1 (neu\*-transformed NIH3T3) and SAA (hEGFR-overexpressed NIH3T3) cells. *FEBS Lett.* 453: 174-178
- Kleuss, C., Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G., Wittig, B. (1992) Different beta-subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature.* 358: 424-426
- Kleuss, C., Scherubl, H., Hescheler, J., Schultz, G., Wittig, B. (1993) Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G proteins. *Science.* 259: 832-834
- Kmieciak, T.E., Shalloway, D. (1987) Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell.* 49: 65-73
- Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F., Lefkowitz, R.J. (1994) Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 12706-12710
- Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., Rapp, U.R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* 364: 249-252
- Kolibaba, K.S., Druker, B.J. (1997) Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1333: F217-248
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685
- Landis, C.A., Masters, S.B., Spada, A., Pace, A.M., Bourne, H.R., Vallar, L. (1989) GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature.* 340: 692-696
- Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B., Schlessinger, J. (1995) Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature.* 376: 737-745
- Levitzki, A., Gazit, A. (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 267: 1782-1788
- Li, X., Lee, J.W., Graves, L.M., Earp, H.S. (1998) Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J.* 17: 2574-2583

- Licato, L.L., Brenner, D.A. (1998) Analysis of signaling protein kinases in human colon or colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci.* 43:1454-1464
- Licato, L.L., Keku, T.O., Wurzelmann, J.I., Murray, S.C., Woosley, J.T., Sandler, R.S., Brenner, D.A. (1997) In vivo activation of mitogen-activated protein kinases in rat intestinal neoplasia. *Gastroenterology.* 113: 1589-1598
- Logsdon, C.D., Williams, J.A. (1986) Pancreatic acinar cells in monolayer culture: direct trophic effects of caerulein in vitro. *Am J Physiol.* 250: G440-447
- Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lefkowitz, R.J. (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem.* 272: 4637-4644
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science.* 283: 655-661
- Luttrell, L.M., Hawes, B.E., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lansing, T.J., Lefkowitz, R.J. (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 271: 19443-19450
- Lutz, M.P., Esser, I.B., Flossmann-Kast, B.B., Vogelmann, R., Luhrs, H., Friess, H., Buchler, M.W., Adler, G. (1998) Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 243: 503-508
- Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G., Vallar, L., Grunewald, K., Feichtinger, H., Duh, Q.Y., Clark, O.H., Kawasaki, E., Bourne, H.R. (1990) Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science.* 249: 655-659
- Ma, Y.C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W., Huang, X.Y. (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell.* 102: 635-646
- Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G.F., Ahn, N.G. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science.* 265: 966-970
- Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M.F., Marshall, C.J. (1998) Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science.* 280: 109-112

- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., Schachtele, C. (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem.* 268: 9194-9197
- Massague, J., Pandiella, A. (1993) Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem.* 515-541
- McNeil, C. (1998) Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 90: 882-883
- Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Tsutsui, S., Zushi, S., Higashimoto, Y., Kanayama, S., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Matsuzawa, Y. (1999) Gastrin induces heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in rat gastric epithelial cells transfected with gastrin receptor. *Gastroenterology.* 116: 78-89
- Nagata, A., Ito, M., Iwata, N., Kuno, J., Takano, H., Minowa, O., Chihara, K., Matsui, T., Noda, T. (1996) G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 11825-11830
- Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* 308: 693-698
- Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 334: 661-665
- Nishizuka, Y. (1992) Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signalling. *Neurosci Res.* 15: 3-5
- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9: 484-496
- Ohmichi, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Saltiel, A.R. (1994) Growth factors differentially stimulate the phosphorylation of Shc proteins and their association with Grb2 in PC-12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* 269: 1143-1148
- Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J.C., Meloche, S., Pouyssegur, J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 8319-8323
- Parma, J., Duprez, L., Van Sande, J., Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G. (1993) Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature.* 1993 Oct 14;365(6447):649-51

- Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Pawson, T., Pelicci, P.G. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*. 70: 93-104
- Piiper, A., Elez, R., You, S.J., Kronenberger, B., Loitsch, S., Roche, S., Zeuzem, S. (2003) Cholecystokinin stimulates extracellular signal-regulated kinase through activation of the epidermal growth factor receptor, Yes, and protein kinase C. Signal amplification at the level of Raf by activation of protein kinase C $\epsilon$ . *J Biol Chem*. 278: 7065-7072
- Piiper, A., Gebhardt, R., Kronenberger, B., Giannini, C.D., Elez, R., Zeuzem, S. (2000) Pertussis toxin inhibits cholecystokinin- and epidermal growth factor-induced mitogen-activated protein kinase activation by disinhibition of the cAMP signaling pathway and inhibition of c-Raf-1. *Mol Pharmacol*. 58: 608-613
- Piiper, A., Stryjek-Kaminska, D., Klengel, R., Zeuzem, S. (1997) CCK, carbachol, and bombesin activate distinct PLC-beta isoenzymes via Gq/11 in rat pancreatic acinar membranes. *Am J Physiol*. 272: G135-140
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., Ullrich, A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*. 402: 884-888
- Rhee, S.G., Bae, Y.S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem*. 272: 15045-15048
- Rozengurt E. (1986) Early signals in the mitogenic response. *Science*. 234: 161-166
- Sadoshima, J., Izumo, S. (1996) The heterotrimeric G $_q$  protein-coupled angiotensin II receptor activates p21 ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J*. 15: 775-787
- Sasaoka, T., Langlois, W.J., Leitner, J.W., Draznin, B., Olefsky, J.M.. (1994) The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J Biol Chem*. 269: 32621-32625
- Schick, J., Kern, H., Scheele, G. (1984) Hormonal stimulation in the exocrine pancreas results in coordinate and anticoordinate regulation of protein synthesis. *J Cell Biol*. 99: 1569-1574
- Schlessinger J. (1993) How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci*. 18: 273-275

- Schnefel, S., Profrock, A., Hinsch, K.D., Schulz, I. (1990) Cholecystokinin activates Gi1-, Gi2-, Gi3- and several Gs-proteins in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 269: 483-488
- Schwartz, G.K., Farsi, K., Maslak, P., Kelsen, D.P., Spriggs, D. (1997) Potentiation of apoptosis by flavopiridol in mitomycin-C-treated gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 3: 1467-1472
- Seger, R., Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726-735
- Seta, K., Nanamori, M., Modrall, J.G., Neubig, R.R., Sadoshima, J. (2002) AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol Chem.* 277: 9268-9277
- Seva, C., Kowalski-Chauvel, A., Blanchet, J.S., Vaysse, N., Pradayrol, L. (1996) Gastrin induces tyrosine phosphorylation of Shc proteins and their association with the Grb2/Sos complex. *FEBS Lett.* 378: 74-78
- Singh, P., Narayan, S., Adiga, R. B. (1994) Phosphorylation of pp62 and pp54 src-like proteins in a rat intestinal cell line in response to gastrin. *Am J Physiol.* 267: G235-244
- Sirivatanauksorn, V., Sirivatanauksorn, Y., Lemoine, N.R. (1998) Molecular pattern of ductal pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 383: 105-115
- Solomon, T.E. (1984) Regulation of pancreatic secretion. *Clin Gastroenterol.* 13: 657-678
- Solomon, T.E., Vanier, M., Morisset, J. (1983) Cell site and time course of DNA synthesis in pancreas after caerulein and secretin. *Am J Physiol.* 245: G99-105
- Soltoff, S.P. (1998) Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y2 receptor. Phorbol ester or [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation can substitute for receptor activation. *J Biol Chem.* 273: 23110-23117
- Soltoff, S.P. (2001) Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase Cdelta tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 276: 37986-37992
- Stokoe, D., McCormick, F. (1997) Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *EMBO J.* 16: 2384-2396
- Tahara, E. (1990) Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 116: 121-131

- Tari, A.M., Hung, M.C., Li, K., Lopez-Berestein, G. (1999) Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in ErbB2, cells. *Oncogene*. 18:1325-1332
- Thomas, S.M., DeMarco, M., D'Arcangelo, G., Halegoua, S., Brugge, J.S. (1992) Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell*. 68: 1031-1040
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem*. 266: 15771-15781
- Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*. 8: 205-215
- Tsai, W., Morielli, A.D., Peralta, E.G. (1997) The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *EMBO J*. 16: 4597-4605
- van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1995) Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature*. 376: 781-784
- van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E., Lefkowitz, R.J.. (1996) Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*. 17: 698-714
- van der Geer, P., Wiley, S., Lai, V.K., Olivier, J.P., Gish, G.D., Stephens, R., Kaplan, D., Shoelson, S., Pawson, T. (1995) A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. *Curr Biol*. 5: 404-412
- Verbeek, B.S., Adriaansen-Slot, S.S., Rijksen, G., Vroom, T.M.. (1997) Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J Pathol*. 183:195-203
- Wank, S.A. (1995) Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol*. 269: G628-646
- Weinstein-Oppenheimer, C.R., Blalock, W.L., Steelman, L.S., Chang, F., McCubrey, J.A. (2000) The Raf signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in growth factor-responsive tumors. *Pharmacol Ther*. 88: 229-279

- Wilkie, T.M., Gilbert, D.J., Olsen, A.S., Chen, X.N., Amatruda, T.T., Korenberg, J.R., Trask, B.J., de Jong, P., Reed, R.R., Simon, M.I. (1992) Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet.* 1: 85-91
- Wilkinson, S.E., Parker, P.J., Nixon, J.S. (1993) Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J.* 294: 335-337
- Woodburn, J.R. (1999) The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 82: 241-250
- Xu, N., Bradley, L., Ambdukar, I., Gutkind, J.S. (1993) A mutant alpha subunit of G12 potentiates the eicosanoid pathway and is highly oncogenic in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 6741-6745
- Xu, N., Voyno-Yasenetskaya, T., Gutkind, J.S. (1994) Potent transforming activity of the G13 alpha subunit defines a novel family of oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun.* 201: 603-609
- Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, M.S., Buchler, M., Beger, H.G., Korc, M. (1993) Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res.* 13: 565-569
- Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O., Wigler, M. (1986) Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell.* 45: 711-719
- Zeng, W., Xu, X., Muallem, S. (1996) Gbetagamma transduces  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and  $G_{\alpha q}$  a sustained response during stimulation of pancreatic acinar cells with  $[Ca^{2+}]_i$ -mobilizing agonists. *J Biol Chem.* 271: 18520-18526

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	You
Vorname	Se-Jong
Geburtsdatum	16.04.1976
Geburtsort	Frankfurt am Main
Nationalität	deutsch

## Schulausbildung

1982 - 1986	Besuch der Römerstadt-Grundschule in Frankfurt am Main
1986 - 1995	Besuch des Ziehen-Gymnasiums in Frankfurt am Main
06/1995	Abitur am Ziehen-Gymnasium in Frankfurt am Main

## Freiwilliges Soziales Jahr

09/1995 - 08/1996	Chirurgische Station, Belegarzt-Krankenhaus Rotes Kreuz, Frankfurt am Main
-------------------	--

## Universitäre Ausbildung

10/1996 - 05/2003	Studium der Humanmedizin in Frankfurt am Main
09/1998	Ärztliche Vorprüfung
10/1998 - 02/1999	Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie I/ Klinische Neuroanatomie an der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Betreuung des Kursus der Makroskopischen Anatomie
08/1999	1. Staatsexamen
10/2000 - 09/2003	Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Zentrum der Inneren Medizin II der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Betreuung von klinischen Studien im Rahmen der medikamentösen Behandlung der chronischen Hepatitis B und C
04/2002	2. Staatsexamen
04/2002 - 03/2003	Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken Frankfurt am Main Höchst
08.05.2003	3. Staatsexamen
12.05.2002	Erlaubnis für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum
01.11.2003	Beginn der Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik für Innere Medizin, Ketteler-Krankenhaus, Offenbach am Main

Frankfurt am Main, den 10. Februar 2004

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**Mechanismen der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK)-Aktivierung in der  
Pankreasazinuskarzinom-Zelllinie AR42J**

im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinischen Klinik II, Schwerpunkt Gastroenterologie/ Hepatologie und Pneumologie/ Allergologie unter Leitung von Prof. Dr. med. S. Zeuzem, mit Unterstützung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. nat. A. Piiper ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

J Biol Chem. 278: 7065-7072 (2003)

Frankfurt am Main, den 10. Februar 2004