

Aus dem
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Thomas Gudermann

Signaltransduktion des $G_{q/11}$ -gekoppelten GnRH-Rezeptors

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Höhn
aus Mainz

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 11.9.2003.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. Gudermann

Korreferent: Prof. Dr. Lill

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rezeptortyrosinkinasen	2
1.1.1	Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen	2
1.1.2	Substrate der Rezeptortyrosinkinasen	4
1.1.3	Die Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen)	7
1.2	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	10
1.2.1	Heterotrimere G-Proteine	12
1.2.2	Regulationsmechanismen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	13
1.2.3	Zelluläre Effektorsysteme G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	15
1.2.3.1	Adenylylzyklasen	16
1.2.3.2	Phospholipasen C	17
1.2.3.3	Ionenkanäle	17
1.2.4	Aktivierung der MAP-Kinasen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	18
1.2.5	Der GnRH-Rezeptor	21
2	Zielsetzung	24
3	Material	25
3.1	Verwendete Chemikalien und Zubehör, Hersteller bzw. Lieferfirmen	25
3.2	Medien, Puffer und Lösungen	29

4	Methoden	31
4.1	Zelllinien und Zellkultur	31
4.1.1	Zelllinien	31
4.1.2	Umsetzen von Zellen	31
4.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	31
4.1.4	Behandlung von Zellen	32
4.1.5	Methodik der Transfektion	33
4.1.5.1	Transfektion eukaryoter Zellen mit CaCl ₂	33
4.1.5.2	Transfektion eukaryoter Zellen mit FuGENE®	33
4.2	Proteinchemische Methoden	34
4.2.1	Herstellung von Proteinlysaten	34
4.2.2	SDS-Gel-Elektrophorese	34
4.2.3	Färbung von Proteingelen	35
4.2.4	Westernblotting	36
4.2.5	Immunoblotting (Immundetektion)	36
4.2.6	Entfernung gebundener Antikörper von der Blot-Membran und Durchführung eines neuen immunologischen Nachweises	37
4.2.7	Immunopräzipitation	37
4.3	DNA-Methoden	39
4.3.1	Handhabung von Bakterien-Medien und Kulturplatten	39
4.3.2	Herstellung kompetenter Zellen	39
4.3.3	Transformation kompetenter Zellen	40
4.3.4	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	41
4.3.5	Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA	42
4.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	42

4.4	Funktionelle Studien	43
4.4.1	Messung der Mitogen-Aktivierten-Protein-Kinase (MAPK)- Aktivität	43
4.4.2	Immunpräzipitation einzelner Signalkomponenten	45
4.4.3	Messung der Ras-Aktivierung	46
4.4.3.1	GST-RBD Expression in <i>E.coli</i> -DH5 α	46
4.4.3.2	Ras-Assay	47
5	Ergebnisse	48
5.1	Zeitabhängigkeit der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in αT3-1-Zellen	48
5.2	Mechanismus der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in αT3-1-Zellen	51
5.3	Mechanismus der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in transient transfizierten COS-7-Zellen	53
5.4	Komponenten der GnRH-abhängigen Signaltransmission in COS-7- und αT3-1-Zellen	60
5.4.1	Charakteristika der GnRH-stimulierten EGFR-Aktivität in α T3-1- und COS-7-Zellen	60
5.4.2	Charakteristika der GnRH-stimulierten Shc- Tyrosinphosphorylierung in COS-7-Zellen	63
5.4.3	Die GnRH-induzierte Aktivierung von Ras in α T3-1- und COS-7- Zellen	66
5.4.4	Die funktionelle Aktivierung der ERK-MAPKs durch GnRH in α T3-1-Zellen	71

6	Diskussion	74
6.1	Die Regulation der ERK-MAPKs durch den GnRH-Rezeptor	75
6.1.1	Charakteristika des GnRH-Rezeptors und der $G_{q/11}$ -Kopplung	75
6.1.2	Die Bedeutung der PLC- β -Effektorsysteme	76
6.1.3	Die Funktion von Ras	78
6.1.4	Die Bedeutung von Src	79
6.2	Die Bedeutung der EGFR-Transaktivierung	81
7	Zusammenfassung	84
8	Anhang	87
8.1	Abkürzungen	87
8.2	Literaturverzeichnis	89
8.3	Veröffentlichungshinweis	104
8.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	105
8.5	Danksagung	106

1 Einleitung

Die Koordination von Wachstum, Differenzierung und Metabolismus in einem multizellulären Organismus sowie die Wahrnehmung spezifischer zellulärer Funktionen durch die einzelne Zelle innerhalb komplexer Gewebeverbände basieren auf der Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation. Die Aufnahme extrazellulärer Signale und die Signaltransduktion durch die Zelle sind Voraussetzungen für die Aktivierung spezifischer zellulärer Programme und bilden die Grundlage für eine adäquate Reaktion auf verschiedenste Umgebungsreize. Dabei kann ein Signal sowohl schnelle zelluläre Antworten, z.B. Kontraktion oder Sekretion, hervorrufen als auch langsame Reaktionen wie Proliferation oder Differenzierung bewirken.

Der Übermittlung von Signalen können Liganden wie Hormone, Neurotransmitter, Zytokine und Wachstumsfaktoren dienen, aber auch physikalische Reize wie Licht oder Duftstoffe. Die meisten Signale werden durch Bindung interzellulärer Botenstoffen an spezifische Oberflächenrezeptoren der Plasmamembran in die Zelle übermittelt. Die Oberflächenrezeptoren werden in zwei strukturell verschiedene Proteinklassen unterteilt: intramolekular gekoppelte Rezeptor-Effektor-Systeme und intermolekular gekoppelte Rezeptor-Effektor-Systeme (Kaplan, 1981; Birnbaumer *et al.*, 1990). Die erste Klasse vereint dabei eine extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne und eine intrazelluläre Effektordomäne auf *einem* Molekül (Abbildung 1). Diese Klasse der membranständigen Rezeptoren kann nach der Funktion der Effektordomäne wiederum in zwei Subgruppen unterteilt werden: die Gruppe der ligandenoperierten Ionenkanäle, deren Effektordomäne ein Ionenkanal ist wie bei den nikotinischen Acetylcholinrezeptoren oder den Glycin-, Glutamat- und GABA_A-Rezeptoren (Jan und Jan, 1992; Unwin, 1993) sowie die Gruppe der Enzym-gekoppelten Rezeptoren wie die Rezeptortyrosinkinasen und -phosphatasen (Marshall, 1995).

Die Klasse der intermolekular gekoppelten Rezeptor-Effektor-Systeme hingegen überträgt extrazelluläre Signale über ein G-Protein-gekoppeltes, transmembranäres Dreikomponenten-System ins Zellinnere. Die *drei* Systemkomponenten sind der Rezeptor, der der Signalerkennung dient, ein G-Protein, welches die Amplifikation und die Weiterleitung des Signals ins Zellinnere übernimmt (Transduktion) und schließlich ein Effektor (Abb.1). Die Interaktion der Komponenten erfolgt dabei nacheinander und reversibel. Als Effektoren werden verschiedene Enzyme, Ionenkanäle oder Transporter in ihrer Aktivität beeinflusst, was Konzentrationsänderungen intrazellulärer Botenstoffe

(„second messenger“) wie dem zyklischen AMP, Ca^{2+} , Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-trisphosphat bewirkt (Birnbaumer *et al.*, 1990; Hepler und Gilman, 1992; Schultz, 1994). Die Mehrheit der interzellulären Signale aktiviert solche dreiteiligen Transduktionssysteme.

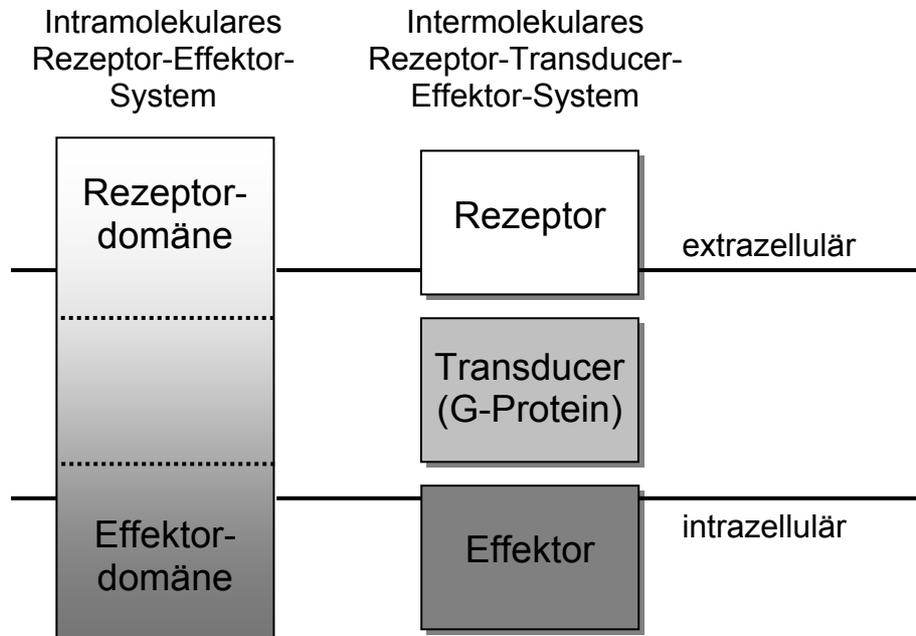


Abb. 1: Transmembranäre Signaltransduktion.

Schematische Darstellung zweier Grundprinzipien der transmembranären Signaltransduktion.

1.1 Rezeptortyrosinkinasen

1.1.1 Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen

Die Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) bilden eine Hauptklasse der Zelloberflächenrezeptoren. Ihre Familie umfaßt mehr als 50 verschiedene Polypeptide und ungefähr 20 Subgruppen, die strukturelle und funktionelle Analogien aufweisen (van der Geer *et al.*, 1994). Mit Ausnahme des Insulinrezeptors sind alle RTKn monomere Polypeptidketten, die die Zellmembran einmal durchspannen. Sie lassen sich in drei strukturelle Regionen unterteilen: ein glykosyliertes, extrazelluläres Segment, welches den aminoterminalen Bereich repräsentiert, eine kurze Transmembranhelix und eine zytoplasmatische Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist für die spezifische Bindung der Liganden, Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) oder Hormone wie Insulin, verantwortlich. Das transmembranäre Segment dient zum einen

der Verankerung der RTKn in der Plasmamembran, andererseits kann es die Rezeptorfunktion und damit die Transduktion des Signals beeinflussen. Das zytoplasmatische Segment übermittelt das biologische Signal an intrazelluläre Zielproteine. Es enthält eine konservierte katalytische Proteintyrosinkinase-Domäne, deren intrinsische Aktivität bei der Signalübermittlung in die Zelle von entscheidender Bedeutung ist, und verschiedene Sequenzen, die für die positive und negative Rezeptorregulation verantwortlich sind (Schlessinger und Ullrich, 1992).

Die Dimerisierung von zwei RTK-Monomeren nach der initialen Bindung des Rezeptor-spezifischen Liganden ist der entscheidende Schritt bei der Aktivierung von RTKn. Der Insulinrezeptor bildet eine Ausnahme, da er auch in Abwesenheit von Insulin in dimerisierter Form vorliegt. Der Mechanismus der Rezeptor-Dimerisierung ist für viele RTKn noch nicht geklärt. Man vermutet aber, daß eine ligandenabhängige Konformationsänderung der monomeren RTKn die Bildung stabiler Rezeptordimere begünstigt. Die Dimerisierung bewirkt die räumliche Annäherung zweier Rezeptormoleküle und ermöglicht so die sog. Autophosphorylierung. Dabei katalysieren die beiden Rezeptormoleküle mittels ihrer intrinsischen Proteintyrosinkinase-Domäne die Phosphorylierung verschiedener zytoplasmatischer Tyrosinreste ihres Partners (Ullrich und Schlessinger, 1990; Schlessinger und Ullrich, 1992; Lemmon und Schlessinger, 1994). Die Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der katalytischen Domäne stabilisiert die Tyrosinkinase-Aktivierung. Die Phosphorylierung von Tyrosinresten außerhalb der katalytischen Region führt zur Generierung von Bindungsstellen für zytoplasmatische Zielproteine, die an der intrazellulären Transduktion des Signals beteiligt sind (Pawson, 1995).

Parallel zur ligandenabhängigen Homodimerisierung können auch Heterodimere innerhalb einer Subfamilie von RTKn gebildet werden (z.B. zwischen Mitgliedern der EGFR-Familie, Wallasch *et al.*, 1995). Homo- bzw. Heterodimerisierung bewirken die Rekrutierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalmoleküle, so daß die Rezeptor-Oligomerisierung einen einfachen Mechanismus zur Divergenz der Signalwege darstellt (Lemmon und Schlessinger, 1994; Olayioye *et al.*, 2000).

Neben der ligandeninduzierten Aktivierung können RTKn über verschiedene Mechanismen auch ligandenunabhängig aktiviert werden. So ist beispielsweise eine Inaktivierung der Proteintyrosin-Phosphatasen (PTPasen), die als Antagonisten der Proteintyrosinkinase agieren, ausreichend, um die Tyrosinphosphorylierung von RTKn zu induzieren (Jallal *et al.*, 1992). Auch eine Exposition der Zellen gegenüber UV-

Strahlung, Radioaktivität oder osmotisch wirksamer Substanzen bewirkt eine Tyrosinphosphorylierung von RTKs (King *et al.*, 1989; Sachsenmaier *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Knebel *et al.*, 1996; Carpenter, 1999). Ein weiterer Mechanismus der ligandenunabhängigen Aktivierung von RTKs ist die sogenannte Transaktivierung dieser Rezeptorklasse durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) (Herrlich *et al.*, 1998; Luttrell *et al.*, 1999a; Hackel *et al.*, 1999; Gschwind *et al.*, 2001).

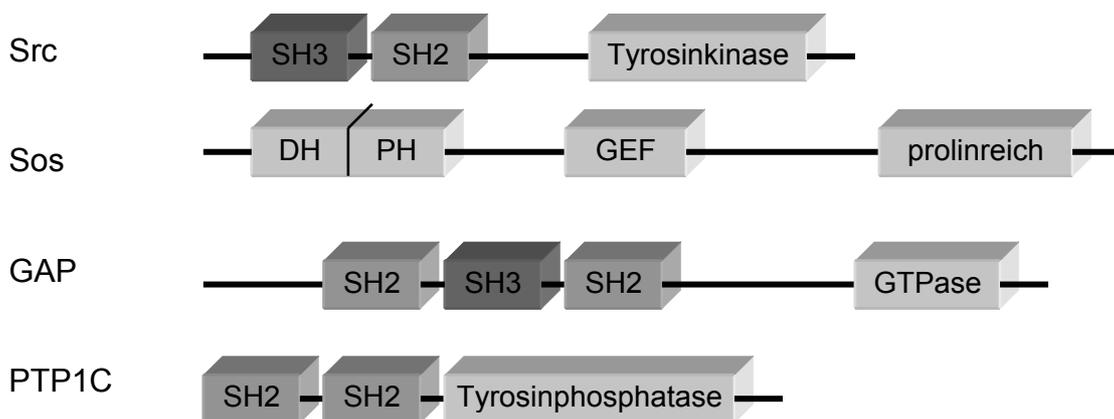
1.1.2 Substrate der Rezeptortyrosinkinasen

Die durch Autophosphorylierung entstandenen tyrosinphosphorylierten Regionen auf der zyttoplasmatischen Domäne der RTKs stellen hochaffine Bindungsstellen für verschiedene zelluläre Signalmoleküle dar. Diese Zielproteine besitzen ihrerseits bestimmte konservierte Domänen für die Interaktion mit dem Rezeptor. Derartige Proteindomänen, die an Phosphotyrosinreste innerhalb einer spezifischen Sequenz binden können, werden in verschiedene Klassen unterteilt. Als erste Klasse wurde die SH2 (src-homology)-Domäne beschrieben (Koch *et al.*, 1991; Heldin, 1991; Margolis, 1992). Es handelt sich bei dieser um eine konservierte Region von ungefähr 100 Aminosäuren. Diese Domänen finden sich auf vielen zyttoplasmatischen Proteinen, oft auch mehrmals auf demselben Molekül (Abb. 2). Nach der SH2-Domäne wurde mit der PBT (Phosphotyrosin-bindende)-Domäne ein weiteres Proteinmotiv charakterisiert, das spezifisch an Phosphotyrosinreste bindet, sich aber in Struktur und Mechanismus von den SH2-Domänen unterscheidet (Kavanaugh und Williams, 1994; Gustafson *et al.*, 1995). Viele Signalproteine, die über SH2-Domänen verfügen, besitzen auch SH3-Domänen, welche prolinreiche Sequenzen anderer Proteine binden können (Schlessinger, 1994; Sudol, 1996). Eine vierte Bindungsdomäne, die PH (pleckstrin homology)-Domäne, tritt ebenfalls oft gemeinsam mit SH2- und SH3-Domänen auf (Mayer *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1994). Die Zielstrukturen für PH-Domänen sind noch nicht vollständig identifiziert. Eine physiologische Bedeutung konnte bis heute eindeutig nur für die Interaktion mit membranären Phosphoinositiden nachgewiesen werden (Lemmon und Ferguson, 2000). Mittlerweile sind noch weitere Proteinmotive eingehend charakterisiert worden: die EH-, PDZ-, EVH1- und WW-Domänen (Stricker *et al.*, 1997; Sudol, 1998; Macias *et al.*, 2002).

Alle bekannten Protein-Domänen setzen sich aus 40-150 Aminosäuren zusammen und bilden kompakte Tertiärstrukturen aus, die von den umgebenden Proteinbereichen weitgehend unbeeinflusst sind. Sie können somit als funktionell unabhängige Module

angesehen werden, deren komplexe Interaktion mit einem oder mehreren Liganden spezifische Antworten hervorruft (Pawson, 1995; Helmreich, 2001). Die Verteilung dieser Domänen auf den verschiedenen Signalkomponenten und die durch sie vermittelten Protein-Protein-Interaktionen dienen der Modifizierung der enzymatischen Aktivität sowie der Rekrutierung bestimmter Proteine zu spezifischen Komplexen. So finden sich die beschriebenen Domänen nicht nur auf Kinasen, sondern auch auf vielen anderen Enzymen, einigen Transkriptionsfaktoren und den sogenannten Adaptorproteine. Bei letztgenannten handelt sich um Proteine ohne katalytische Aktivität, deren Aufgabe darin besteht, zwei oder mehrere Signalmoleküle in räumliche Nähe zueinander zu bringen und so Signalkomplexe zu formieren.

I. Proteine mit enzymatischer Aktivität



II. Proteine ohne enzymatische Aktivität

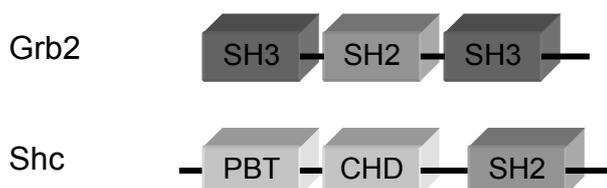


Abb. 2: Strukturmerkmale einiger Signaltransduktionsproteine.

Die Kästen repräsentieren verschiedene funktionelle Domänen, die in ihrer Aminosäuresequenz konserviert sind: (I) Proteine, die neben den Bindungsdomänen über enzymatische Aktivität verfügen; (II) Proteine ohne intrinsische Aktivität, die als Adapter fungieren. **Abkürzungen:** DH, DBL-Homologie-Domäne; GEF, katalytische Domäne von Guaninnukleotidaustauschfaktoren; GAP, GTPase-aktivierendes Protein zur negativen Regulation von Ras; CDH, Glycin-/Prolinreiche Domäne mit Homologie zu Kollagen (weitere Abkürzungen im Text).

Viele der zellulären Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der mitogenen Signaltransduktionskaskade über RTKs erfolgen über die benannten Proteindomänen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Adapterprotein Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2). Grb2 enthält eine SH2-Domäne, die von zwei SH3-Domänen flankiert wird (Lowenstein *et al.*, 1992). Über seine SH2-Domäne kann Grb2 sowohl mit tyrosinphosphorylierten RTKs, wie z.B. dem EGF-Rezeptor (EGFR), als auch mit anderen Adaptorproteinen wie Shc und Gab1 (Grb2-associated binder-1) assoziieren. Seine SH3-Domäne ermöglicht es ihm andererseits, den Guaninnukleotidaustauschfaktor Sos (Son of sevenless) an die Plasmamembran zu rekrutieren (Rozakis-Adcock *et al.*, 1992; Egan *et al.*, 1993; Rozakis-Adcock *et al.*, 1993), wo auch die kleine zytoplasmatische GTPase Ras lokalisiert ist. Die Funktion von Sos ist es, den GDP/GTP-Austausch an Ras zu katalysieren und dieses so zu aktivieren. Ras ist ein zentrales Signalmolekül bei der Regulation der RTK-vermittelten Proliferation (Downward, 1997) und kann als solches wiederum verschiedene Zielproteine aktivieren. Die Ras-Aktivierung stößt eine Phosphorylierungskaskade an, die über die Aktivierung der MAPK (durch Mitogene aktivierte Proteinkinasen)-Familie verlaufen und mit der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Zellkern enden (Egan *et al.*, 1993).

Weitere wichtige Adapterproteine stellen die drei Isoformen des Shc-Proteins (46 kD, 52 kD und 66 kD) dar. Allen Isoformen sind eine carboxyterminale SH2-Domäne, ein zentraler kollagenhomologer Bereich und eine aminoternale PTB-Domäne gemein (Pellici *et al.*, 1992; Migliaccio *et al.*, 1997). Nach der Aktivierung von RTKs können Shc-Proteine mit Hilfe ihrer SH2- bzw. PTB-Domänen an Phosphotyrosine der RTKs binden und werden von diesen an mehreren Stellen tyrosinphosphoryliert (van der Geer *et al.*, 1996). Tyrosinphosphorylierte Shc-Proteine assoziieren mit der SH2-Domäne des Adaptorproteins Grb2. RTKs, die keine Bindungsstellen für Grb2 besitzen, dafür aber eine Shc-Bindungsstelle aufweisen, können über den „Umweg“ der Rekrutierung eines Shc-Grb2-Komplexes eine Signaltransduktion zwischen RTK und Ras vermitteln (Rozakis-Adcock *et al.*, 1992).

Die beschriebenen Substratproteine interagieren oft mit mehreren Mitgliedern der RTK-Familie. Allerdings variiert die Affinität zwischen Substrat und Rezeptor beträchtlich, wenn verschiedene RTKs untereinander verglichen werden (Obermeier *et al.*, 1996). Auch das unterschiedliche Expressionsniveau der einzelnen RTKs und das ihrer Substrate, die subzelluläre Lokalisation der beteiligten Moleküle sowie der negativ

regulatorische Einfluß z.B. der Proteintyrosin-Phosphatasen (PTPn) tragen dazu bei, daß derselbe RTK-Ligand in verschiedenen Zielzellen spezifische zelluläre Programme zu aktivieren vermag.

1.1.3 Die Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen)

Eine große Anzahl biologischer Prozesse in eukaryoten Zellen wird durch die MAP-Kinasen (MAPKn) kontrolliert. Dazu zählen sowohl komplexe zelluläre Programme wie Embryogenese, Differenzierung, Proliferation und Apoptose als auch kurzfristige Veränderungen, die die Transkription von Genen, die Organisation des Zytoskeletts und die metabolische Homöostase betreffen (Lewis *et al.*, 1998). Aus Säugetierzellen konnte bis jetzt die komplementäre DNA von fast 20 MAPKn isoliert werden. MAPKn stellen die distalen Segmente in verschiedenen Kinasenkaskaden dar, die aus mindestens drei Proteinkinasen bestehen und extrazelluläre Signale in den Zellkern übermitteln (Marshall, 1995; Treisman, 1996; Widmann *et al.*, 1996) (Abb. 3).

In Säugetierzellen werden mindestens vier unterschiedlich regulierte MAPK-Gruppen exprimiert: die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERK 1/2), die c-jun N-terminal-phosphorylierenden Kinasen (JNK1, 2, 3), die p38MAPK-Isoformen (p38 α , β , γ , δ) und ERK5 (Chen *et al.*, 2001). MAPKn werden durch eine duale Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrestes von den MAPK-Kinasen (MEKn oder MKKn) hochspezifisch transient aktiviert. Die MEKn ihrerseits können durch duale Phosphorylierung von verschiedenen MEK-Kinasen (MEKKn oder MAPKKKn) aktiviert werden, wodurch die Komplexität und Diversität der Signalübermittlung gesteigert wird (Abb. 3).

Eine der am besten untersuchten Funktionen der MAPK-Signalwege ist die Regulation der Genexpression als Antwort auf extrazelluläre Stimuli (Treisman, 1996; Chang und Karin, 2001). Dazu translozieren die MAPKn im Anschluß an ihre Aktivierung in den Zellkern, wo sie durch eine duale Serin/Threoninphosphorylierung bestimmte Transkriptionsfaktoren (u.a. Elk-1, c-Myc, c-Fos und c-Jun) aktivieren (Pagès *et al.*, 1993; Lavoie *et al.*, 1996; Robinson und Cobb, 1997). Obwohl Transkriptionsfaktoren wichtige Zielstrukturen der MAPKn darstellen, verbleibt ein Teil nach Aktivierung außerhalb des Zellkerns, wo sie mit zytosolischen und membranären Proteinen sowie Bestandteilen des Zytoskeletts interagieren (Chen *et al.*, 2001).

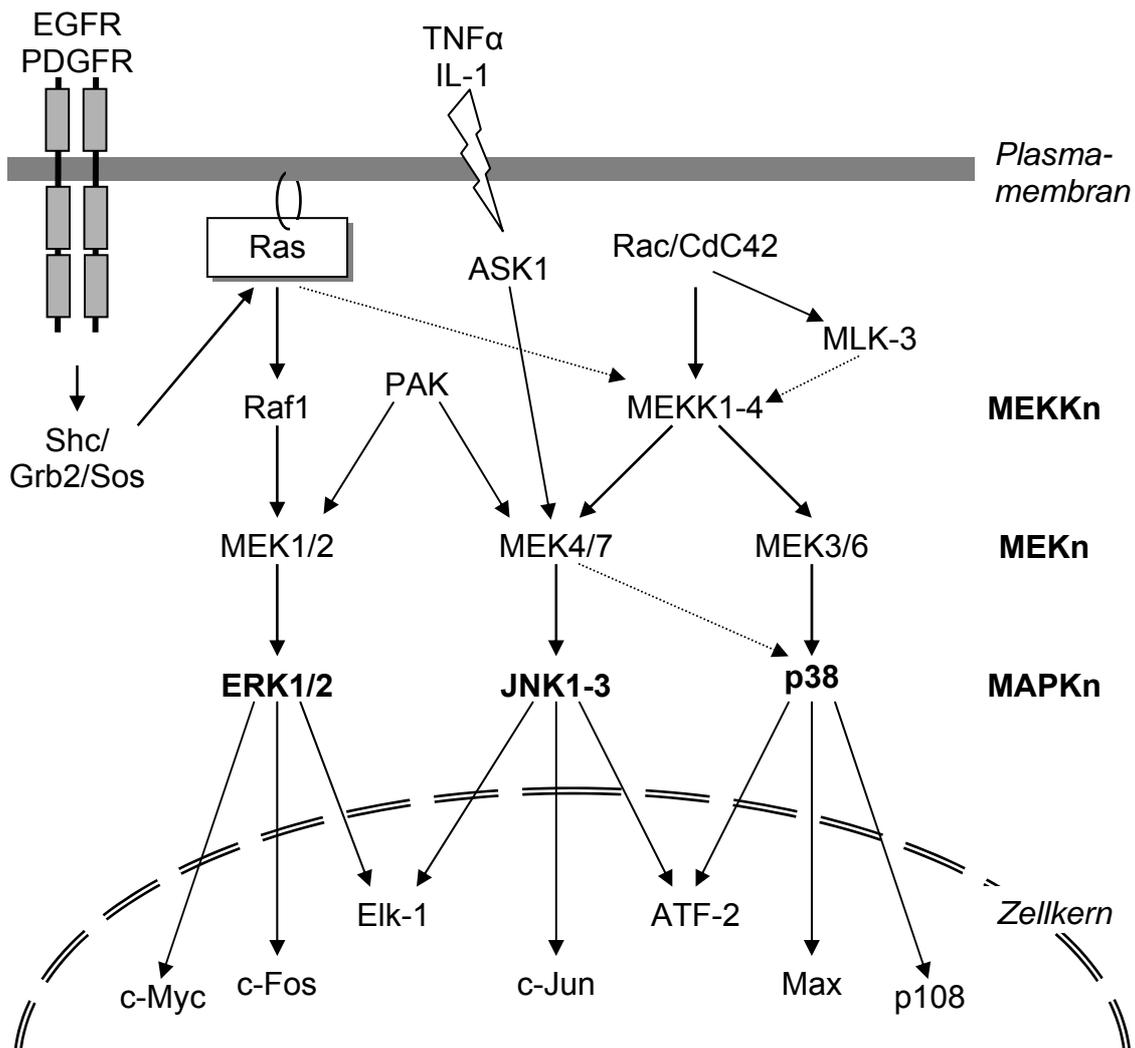


Abb. 3: Schematische Darstellung der MAPK_n-Signalwege.

Schema der transmembranären Signaltransduktionswege zur Aktivierung der MAPK_n ERK1/2 sowie der streßaktivierten MAPK_n JNK1/2 und der p38-Isoformen. Auf die Darstellung aller Verbindungen zwischen den verschiedenen MAPK-Kaskaden wurde verzichtet. **Abkürzungen:** PAK, p21-activated protein kinase; MLK3, mixed lineage kinase 3; ASK1, apoptosis regulating kinase 1; ATF-2, activating transcription factor 2. Weitere Abkürzungen: s. Text.

Neben den genannten Gemeinsamkeiten der Unterfamilien existieren aber auch wichtige Unterschiede. So werden die MAPK_n ERK1/2 klassischerweise durch einen Wachstumsfaktor-induzierten Signaltransduktionsweg aktiviert: Nach der Stimulation von RTK_n durch Wachstumsfaktoren kommt es zur Bildung eines membranständigen Signalkomplexes, der neben der zytoplasmatischen Rezeptordomäne die Adapterproteinen Shc und Grb2 sowie den Ras-Guaninnukleotidaustauschfaktor Sos umfaßt. Im Anschluß an die Sos-vermittelte Aktivierung der membrangebundenen kleinen GTPase Ras kommt es zur Ras-induzierten Translokation der zytoplasmatischen

Serin/Threoninkinase Raf1 an die Plasmamembran (Morrison und Cutler, 1997). Raf1 bildet als MEK-Kinase im aktivierten Zustand stabile Komplexe mit den Threonin/Tyrosinkinasen MEK1 und MEK2 und stimuliert sie durch die Phosphorylierung zweier Serinreste (Haung *et al.*, 1993; Marais und Marshall, 1996). MEK1/2 aktivieren dann ihrerseits die MAPK_n ERK1/2. Es ist nicht bekannt, daß MEK1/2 weitere Proteine außer den MAPK_n ERK1/2 phosphorylieren, somit zählen sie zu den selektivsten bekannten Proteinkinasen. Die MAPK_n ERK1/2 aktivieren im folgenden v.a. die Transkriptionsfaktoren Elk-1, c-Myc und c-Fos (Davis, 1995). Die Stimulation der MAPK_n ERK1 und 2 durch Mitogene nimmt bei der Regulation von Zellproliferation und Zelldifferenzierung eine zentrale Rolle ein (Downward, 1997).

Die JNK_n werden ubiquitär exprimiert, obwohl JKN 3 bevorzugt in neuronalen Geweben vorkommt. Ein Synonym für die JNK_n ist der Begriff der streßaktivierten Proteinkinasen (SAPK_n), da ihre Aktivität als Reaktion auf zelluläre Streßfaktoren wie z.B. UV-Bestrahlung, ionisierende Strahlung, Hyperosmolarität, oder inflammatorische Zytokine (v.a. TNF α) (Derijard *et al.*, 1994) zunimmt. Wachstumsfaktoren und die Liganden einiger GPGR_n bewirken in den meisten Zellarten eine geringere Aktivierung der JNK_n. Zu den Funktionen der JNK_n gehören modulatorische Einflüsse auf das Immunsystem, speziell die Regulation der Entzündungsreaktion (u.a. der Zytokin-Produktion), Aktin-Reorganisation, Apoptose und Zelltransformation (Ip und Davis, 1998; New *et al.*, 1998; Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis und Avruch, 2001). Die phosphorylierten JNK1/2 aktivieren im Zellkern primär den Transkriptionsfaktor c-Jun durch Phosphorylierung zweier Serinreste (Hibi *et al.*, 1993).

MEK4 und 7 sind die dominanten MEK_n im JNK-Signalweg. Ihre Substratspezifität ist im Vergleich zu MEK1/2 geringer, so phosphorylieren sie *in vitro* auch p38-MAPK_n (Meier *et al.*, 1996). Die Identifikation der weiter proximal in der JNK/SAPK-Proteinkinasenkaskade lokalisierten MEKK_n und kleinen G-Proteine ist zur Zeit noch nicht abgeschlossen, da weitaus mehr Proteine an der Regulation der JNK-Aktivierung beteiligt sind als in der ERK-Signalkaskade. Die Regulation der JNK_n in Abhängigkeit vom Zelltyp erfolgt über die Proteine Ras, Rac und Cdc42, die alle zur Familie der kleinen GTPasen gehören, sowie die MEKK_n 1-4 (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2001).

Vier Mitglieder der p38-MAPK_n-Familie (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) konnten bisher geklont und charakterisiert werden. Ihre Aktivierung erfolgt ähnlich wie bei den JNK1/2 in Reaktion auf entzündungsauslösende Zytokine oder Hyperosmolarität. Die p38-Isoformen

unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expressionsmuster, ihrer Aktivierung und ihrer Substratspezifität, so daß sie in verschiedenen zellulären Kontexten unterschiedliche physiologische Funktionen auszuüben scheinen (Chang und Karin, 2001).

Man geht heute davon aus, daß in differenzierten Zellen die spezifischen Zellfunktionen über die Balance zwischen den konkurrierend aktivierten MAPK-Signalwegen kontrolliert werden (Lin *et al.*, 1995; Robinson und Cobb, 1997).

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPGRn) bilden die bei weitem größte Familie der Zelloberflächenrezeptoren (Watson und Arkistall, 1994). Derzeit sind cDNA-Sequenzen von mehr als 1000 eukaryoten GPGRn bekannt (Flower, 1999). Mehr als 1 % der Gene des menschlichen Genoms kodieren für Mitglieder dieser Rezeptorenfamilie. So vielfältig wie die GPGRn selbst sind auch ihre Liganden, zu denen so strukturell unterschiedliche Moleküle wie biogene Amine, Peptide und Glykoproteine gehören. Aufgrund des großen Spektrums der durch sie regulierten Effekte stellen GPGRn bedeutende pharmakologische Zielstrukturen dar. Es wird geschätzt, daß mehr als 60 % aller klinisch relevanten Pharmaka ihre Wirkung über die Interaktion mit GPGRn entfalten (Leurs *et al.*, 1998).

Trotz ihrer Vielfalt besitzen alle GPGRn einen heptahelikalen Aufbau als gemeinsames strukturelles Grundprinzip. Dieser Aufbau ist durch sieben hydrophobe, 20–25 Aminosäuren lange Abschnitte charakterisiert, die die Membran als weitgehend α -helikale Strukturen durchspannen. Diese Transmembranhelices (TM1-7) sind untereinander durch alternierend intra (i1-i3)- und extrazellulär (e1-e3) verlaufende Peptidschleifen verbunden (Baldwin, 1993; Schertler *et al.*, 1993). Der glykosylierte Aminoterminus der heptahelikalen Rezeptoren befindet sich an der TM1 und liegt extrazellulär. Der zytoplasmatische Carboxyterminus an TM7 ist über eine Palmitoylgruppe an der Plasmamembran verankert, so daß eine vierte intrazelluläre Schleife entsteht (Abb. 4).

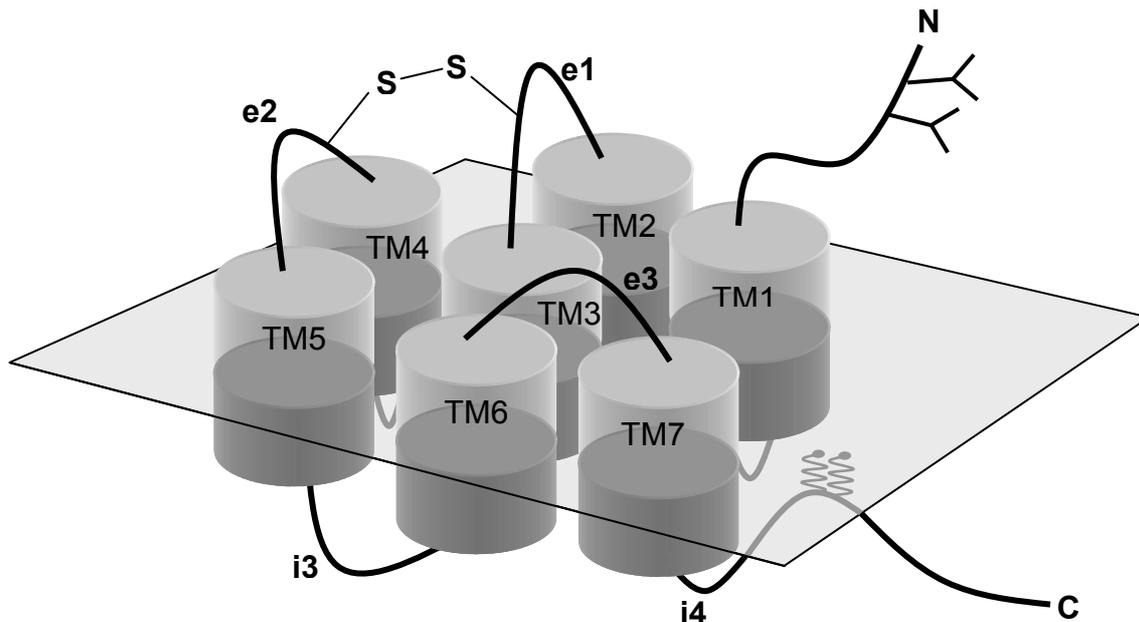


Abb. 4: Die schematische Anordnung der Transmembrandomänen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.

Die Abbildung lehnt sich an das Modell von Baldwin (1994) an. Abkürzungen im Text.

Basierend auf der Sequenzanalyse des Photorezeptors Rhodopsin und anderer GPGRn entwickelte Baldwin 1994 ein Strukturmodell für diese Rezeptorfamilie, nach dem die Transmembrandomänen TM1-7 (TMD) beim Blick auf die Zelle ringförmig entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet sind. Aufgrund der engen Packung der TMD in der Plasmamembran, wurden Wechselwirkungen zwischen den Helices postuliert (Grigorieff *et al.*, 1996; Gether und Kobilka, 1998). Die erst kürzlich gelungene Darstellung der dreidimensionalen Struktur des bovinen Rhodopsins in einer Auflösung von 2,8 Å bestätigt das von Baldwin vorgeschlagene Strukturmodell weitgehend (Palczewski *et al.*, 2000).

Nach vorherrschender Meinung induziert die Agonistenbindung eine Konformationsänderung des Rezeptors, die auf einer relativen Bewegung der Transmembranhelices zueinander basiert. Diese Bewegung der TMD verursacht eine Veränderung der zytoplasmatischen Oberfläche des GPGR, durch die im inaktiven Zustand verdeckte Bindungsstellen für heterotrimere G-Proteine exponiert werden (Gether und Kobilka, 1998; Wonerow *et al.*, 1998; Gershengorn und Osman, 2001). Auch die hohe Auflösung der Kristallstruktur des Rhodopsins legt eine solche dynamische Konformationsänderungen der TMD nahe (Palczewski *et al.*, 2000).

Da die Länge der sieben Transmembranhelices und der drei extrazellulären Schleifen sowie die Lokalisation bestimmter hochkonservierter Aminosäurereste bei den meisten Mitgliedern der GPGR-Familie annähernd gleich zu sein scheint, könnten Variationen in anderen Regionen die Spezifität eines Rezeptors für einen Liganden bzw. ein G-Protein reflektieren (Ballosteros *et al.*, 2001).

1.2.1 Heterotrimere G-Proteine

Die heterotrimeren G-Proteine werden der Superfamilie der GTPasen zugerechnet, die auch die kleinen GTP-bindenden Proteine wie Ras und Rho umfaßt (Macara *et al.*, 1996). Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus drei verschiedenen Polypeptiden zusammen, der α -, β -, und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit ist am größten (39-46 kD). Sie interagiert mit dem GPGR, bindet und hydrolysiert GTP. Bislang wurden 23 verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten identifiziert, die sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Funktion in vier Klassen unterteilen lassen: α_s , α_i , $\alpha_{q/11}$ und α_{12} (Simon *et al.*, 1991; Offermanns und Schultz, 1994). Daneben sind sechs verschiedene $G\beta$ -Untereinheiten (35-36 kD) und 12 $G\gamma$ -Untereinheiten (ca. 8 kD) bekannt (Clapham und Neer, 1997; Hurowitz *et al.*, 2000). Die β - und γ -Untereinheit formen stabile, nicht-kovalente Komplexe miteinander und stellen ein funktionelles Dimer dar. Das heterotrimere G-Protein liegt in inaktiver Form vor, wenn die $G\alpha$ -Untereinheit GDP gebunden hat und infolgedessen mit dem $G\beta\gamma$ -Heterodimer assoziiert ist. Eine Rezeptoraktivierung katalysiert in der $G\alpha$ -Untereinheit den Austausch von GDP gegen GTP, was zu einer Konformationsänderung in der $G\alpha$ -Untereinheit führt. Daraufhin erfolgt die Dissoziation des aktivierten G-Proteins und die Freilegung von Effektor-Bindungsstellen des $G\beta\gamma$ -Heterodimers. Die Hydrolyse von GTP durch die GTPase der $G\alpha$ -Untereinheit beendet die intrazelluläre Signalübermittlung. Die $G\alpha$ -Untereinheit und der $G\beta\gamma$ -Komplex regulieren jeweils unterschiedliche zelluläre Effektorsysteme (Clapham und Neer, 1993; Conklin und Bourne, 1993; Hamm und Gilchrist, 1996; Schwindiger und Robishaw, 2001). Diese Signaldivergenz wird noch verstärkt, da die meisten GPGRn mit mehreren G-Protein-Klassen interagieren können (Laugwitz *et al.*, 1996). Auf der Ebene der G-Proteine werden also einerseits verschiedene extrazelluläre Stimuli integriert, andererseits kann ein G-Protein nach dem Prinzip der Signaldiversität verschiedene Effektorsysteme aktivieren. Die Spezifität und Selektivität der Rezeptor/G-Protein-Interaktion scheint dabei von der zell- und gewebespezifischen Expression (Nürnberg *et al.*, 1995) und der subzellulären

Kompartimentalisierung von Rezeptoren und G-Proteinen abhängig zu sein, wodurch die Wahrscheinlichkeit bestimmter Interaktionen stark beeinflusst werden kann (Neubig, 1994).

1.2.2 Regulationsmechanismen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Einen wichtigen Mechanismus bei der Regulation von GPGRn stellt die Rezeptor-Desensibilisierung dar. Man versteht unter dem Begriff der Desensibilisierung die abnehmende Reaktion einer Zelle auf einen langanhaltenden Stimulus (Hausdorff *et al.*, 1990; Ferguson *et al.*, 1996). Der Prozeß der GPGR-Desensibilisierung kann über verschiedene Mechanismen erfolgen: durch eine Phosphorylierung des Rezeptors, durch Rezeptor-Sequestration oder eine Verminderung der Anzahl der Oberflächenrezeptoren (Down-Regulation). Die Desensibilisierung findet auf transkriptionaler und translationaler Ebene sowie auf Proteinebene statt. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen einer initialen, schnellen Desensibilisierung, die innerhalb von Sekunden bis Minuten erfolgt, und einer verzögerten Desensibilisierung, die erst nach Stunden bis Tagen auftritt. Die schnelle Desensibilisierung wird auf der Proteinebene durch regulatorische Moleküle wie Proteinkinasen, Rezeptorkinasen und Arrestine kontrolliert. Die verzögerte Desensibilisierung hingegen wird über die Gentranskription der GPGRn und/oder entsprechender Proteine gesteuert (Ferguson, 2001).

Der initialen, schnellen GPGR-Desensibilisierung liegen zwei Regulationsmechanismen zugrunde: die heterologe oder nicht-agonistenspezifische Desensibilisierung und die homologe, agonistenspezifische Desensibilisierung. Eine Phosphorylierung der GPGRn stellt bei beiden Formen der schnellen Desensibilisierung den entscheidenden Schritt dar.

Das Prinzip der heterologen Desensibilisierung basiert auf einer Feedback-Regulation der GPGRn durch die beiden „second messenger“-regulierten Serin/Threoninkinasen Proteinkinase A (PKA) und C (PKC). Die PKA wird über einen Zwischenschritt durch G_s -gekoppelte Rezeptoren aktiviert, indem die $G\alpha$ -Untereinheit durch eine Aktivierung der Adenylylzyklase einen Anstieg der intrazellulären Konzentration des „second messenger“ cAMP vermittelt. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt dann eine Aktivierung der PKA.

$G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren aktivieren durch ihre α -Untereinheiten die Phospholipase C (PLC) und stimulieren so die Bildung der beiden intrazellulären Botenstoffe IP_3 und DAG. Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen des „second messenger“ DAG stimulieren

die PKC. Eine Aktivierung der Schlüsselenzyme PKA und PKC bewirkt nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung eine Phosphorylierung des G_s - bzw. $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptors, wodurch die Rezeptorkonformation derart verändert wird, daß eine weitere Interaktion mit dem korrespondierenden G-Protein nicht mehr möglich ist.

Als heterolog oder nicht-agonistenspezifisch wird dieser Mechanismus der Desensibilisierung bezeichnet, da jede Erhöhung der DAG- bzw. cAMP-Konzentration eine Phosphorylierung und Desensibilisierung jedes GPGR bewirken kann, der eine entsprechende PKA- und/oder PKC-Phosphorylierungsstelle besitzt. Das bedeutet, daß die heterologe Desensibilisierung weder ligandenabhängig noch rezeptorspezifisch ist.

Im Gegensatz dazu wird bei der schnellen, agonistenspezifischen oder homologen Desensibilisierung ausschließlich der ligandenaktivierte Rezeptor in einem zweistufigen Prozeß desensibilisiert. Dabei wird der agonistenbesetzte Rezeptor zunächst durch eine G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase (GRK) phosphoryliert. Die Phosphorylierung des GPGR erhöht seine Bindungsfähigkeit für β -Arrestine, welche stereometrisch eine Interaktion mit dem korrespondierenden G-Protein behindern (Lefkowitz, 1993; Pitcher *et al.*, 1998). Die Enzymfamilie der G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKn) umfaßt momentan sieben Mitglieder (GRK 1-7), von denen die Rhodopsinkinase (GRK1) und β -adrenerge Rezeptorkinase, β ARK1, (GRK2) am besten untersucht sind. Es handelt sich bei den GRKn 1-3 um zytosolische Enzyme, die bei Aktivierung der GPGRn an die Plasmamembran translozieren. Die GRKn 3-6 sind über die Palmitoylierung eines C-terminalen Cysteinrestes an der Plasmamembran verankert (Stoffel *et al.*, 1998).

GPGRn werden durch GRKn dual an einem Serin- und einem Threoninrest phosphoryliert, die entweder innerhalb der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors oder an seinem Carboxyterminus lokalisiert sind (Brannock *et al.*, 1999). Durch die GRK-abhängige Phosphorylierung des GPGR und die daraus resultierende vermehrte Bindung von β -Arrestin werden, neben der Abkopplung des GPGR von seinem korrespondierenden G-Protein, Endozytose, Internalisierung oder Sequestration des Rezeptormoleküls eingeleitet (Ferguson, 2001). Es konnte gezeigt werden, daß die β -Arrestine 1 und 2 direkt und mit hoher Affinität an Clathrin binden (Goodman *et al.* 1996; Laporte *et al.*, 2000). Dies läßt vermuten, daß β -Arrestine als eine Art Adaptor die Endozytose von GPGRn durch Clathrin-bedeckte Vesikel vermitteln.

Infolge neuerer Erkenntnisse löst man sich mehr und mehr von der Vorstellung, die Moleküle, die am Prozeß der Rezeptor-Internalisierung beteiligt sind, dienen lediglich

der Beendigung eines Signals. In bestimmten Zusammenhängen nehmen sie vielmehr eine zentrale Rolle bei der Übermittlung von Rezeptorsignalen ein (Lefkowitz, 1998). So wurde für den β_2 -adrenergen Rezeptor gezeigt, daß die β -Arrestin-abhängige Internalisierung des Rezeptors eine Voraussetzung für die Aktivierung der MAPKs ERK1/2 ist (Luttrell, 1999b). Ein weiteres Beispiel stellt der GPGR-Regulationsmechanismus dar, der als „signal switching“ bezeichnet wird. Daaka *et al.* (1997) wiesen für den β_2 -adrenergen Rezeptor, der klassischerweise an G_s -Proteine koppelt und die Adenylylzyklase aktiviert, auch eine Interaktion mit G_i -Proteinen nach, die überraschenderweise durch den PKA-Inhibitor H89 blockiert werden konnte. Die oben beschriebene Phosphorylierung des Rezeptors durch die PKA reduziert die Kopplungsrate des β_2 -adrenergen Rezeptors an G_s -Proteine, während die G_i -Kopplung zunimmt. Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese abgeleitet, daß nach der initialen Kopplung des Rezeptors an G_s -Proteine, der Aktivierung der PKA und der Phosphorylierung des Rezeptors eine „Umschaltung“ des Rezeptors auf G_i -Proteine und somit andere Signalwege stattfindet, die teilweise sogar die G_{α_s} -vermittelte Signalkaskade inhibiert (Lefkowitz, 1998).

Im Falle der langsamen Desensibilisierung konnten McKinnon *et al.* (1997) zeigen, daß eine langanhaltende Carbachol-Stimulation kultivierter Myozyten eine Reduktion der mRNA-Synthese des m2- und m4-Acetylcholinrezeptors in diesen Zellen bewirkt. Die Forschung konzentriert sich gegenwärtig auf die Identifikation der GPGR-Promotoren und die Aufklärung ihrer Regulationsmechanismen. Auch gilt es zu klären, inwieweit die translationale Modifikation die Regulation der Rezeptorfunktion beeinflusst und welche Rolle die intrazellulären GPGR-Transporte dabei spielen.

1.2.3 Zelluläre Effektorsysteme G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Vielzahl der durch GPGRn vermittelten Signalmechanismen unterstreicht die Bedeutung dieser Rezeptormoleküle in der Zellphysiologie. Einige der wichtigsten Aspekte der GPGR-induzierten Signaltransduktion werden im folgenden vorgestellt. Allerdings ist anzunehmen, daß in Zukunft noch weitere durch GPGRn direkt regulierte Effektorsysteme identifiziert werden können.

G-Protein-gekoppelter Rezeptor

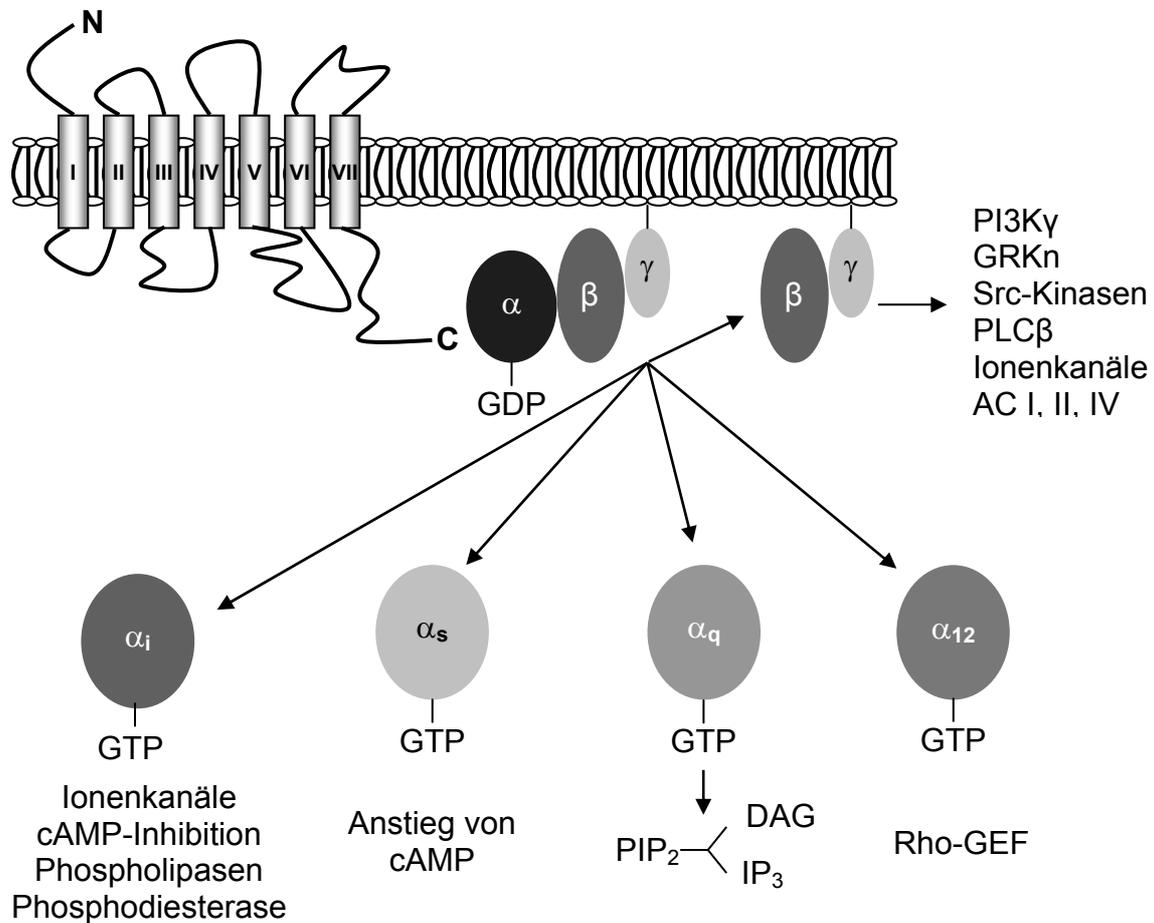


Abb. 5: Schematische Darstellung verschiedener durch heptahelmale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren regulierte Signaltransduktionssysteme.

Abkürzungen: PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; GRK, G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase; PLC, Phospholipase C; AC, Adenylylzyklase; GEF, Guaninnukleotide exchange factor cAMP, zyklisches Adenosin-3';5'-monophosphat; PIP₂, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; DAG, Diacylglycerol; IP₃, Inositol-1,4,5-trisphosphat.

1.2.3.1 Adenylylzyklasen

Die Isoformen der großen Familie der Adenylylzyklasen (AC) werden ubiquitär exprimiert und katalysieren die Umwandlung von ATP zu dem klassischen „second messenger“ cAMP, welcher wiederum die Aktivität der PKA reguliert (Robinson *et al.*, 1968). Adenylylzyklasen integrieren zahlreiche physiologische Signale, die die zytosolische cAMP-Konzentration modulieren. Mittlerweile sind neun verschiedene Adenylylzyklase-Isoformen bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Verteilungsmuster in den Geweben unterscheiden.

Alle Adenylylzyklasen-Isoformen werden durch $G\alpha_s$ stimuliert und, mit Ausnahme von AC II, durch $G\alpha_i$ -Untereinheiten inhibiert (Simonds, 1999). Die AC-Isoformen II und IV werden direkt durch $\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert, während AC I durch $\beta\gamma$ -Dimere inhibiert wird (Schwindinger und Robishaw, 2001). Darüber hinaus wurde in bestimmten Zellsystemen und für verschiedene Isoformen eine Aktivierung auch durch Proteinkinasen wie PKA und PKC, Phosphatasen und Ca^{2+} /Calmodulin beschrieben (Hanoune und Defer, 2001).

1.2.3.2 Phospholipasen C

Die Isoenzyme dieser Superfamilie hydrolysieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu den beiden Signalmolekülen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Der „second messenger“ IP_3 bindet an den intrazellulären, homotetrameren IP_3 -Rezeptor, wodurch Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol freigesetzt wird (Berridge, 1993). Das fettlösliche DAG aktiviert die PKC (Nishizuka, 1992). Die Phospholipase C (PLC)-Isoformen lassen sich aufgrund ihrer Größe und Aminosäuresequenz in die vier Subtypen PLC- β , PLC- γ , PLC- δ und PLC- ϵ einteilen (Exton, 1997). Während die zwei PLC- γ -Isoenzyme durch Thyrosinphosphorylierung und durch Interaktion mit RTKs über eine SH2-Domäne stimuliert werden, findet die direkte Aktivierung der vier PLC- β -Isoenzymen durch $G\alpha$ -Untereinheiten der Pertussistoxin-insensitiven $G_{q/11}$ -Familie und durch $\beta\gamma$ -Komplexe statt (Singer *et al.*, 1997). Zur Aktivierung der PLC- β -Isoformen sind 10-100fach höhere Konzentrationen an $G\beta\gamma$ -Dimeren als an $G_{q/11}$ nötig (Smrcka und Sternweis, 1993).

1.2.3.3 Ionenkanäle

Weitere zelluläre Effektoren, die von G-Proteinen teils direkt teils indirekt moduliert werden, sind die Ionenkanäle, über die die Membrandurchlässigkeit für Na^+ , K^+ , Ca^{2+} - und Cl^- -Ionen reguliert wird (Jan und Jan, 1997).

Ein Beispiel für die Öffnung eines Ionenkanals infolge der direkten Interaktion mit einem G-Protein gibt der m2-Acetylcholin-Rezeptor. Seine Aktivierung bewirkt die Dissoziation von G_i -Proteinen, was eine direkte Bindung freier $G_i\beta\gamma$ -Komplexe an K^+ -Kanäle der sogenannten GIRK-Klasse (G-Protein Gated Inwardly Rectifying K^+ Channel) und einen verstärkten K^+ -Efflux aus der Zelle nach sich zieht (Reuveny *et al.*, 1994; Wickman *et al.*, 1994; Kunkel und Peralta, 1995). Auch eine Regulation spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle durch G-Proteine ist bekannt. Eine Interaktion von

G $\beta\gamma$ -Heterodimeren mit der G α -Untereinheit von P/Q-Typ und N-Typ Ca²⁺-Kanälen resultiert in einer Inhibition dieser Kanäle (Herlitze *et al.*, 1996; DeWaard *et al.*, 1997). Die Identifikation des DAG als direkter Aktivator der nichtselektiven Kationenkanäle TRPC3 und TRPC6 (Transient Receptor Potential) ist ein Beispiel für die indirekte Regulation von Ionenkanälen durch G-Proteine, da die Bildung dieses „second messenger“ durch ein Effektorenzym der G-Proteine, der PLC, katalysiert wird (Hofmann *et al.*, 1999).

1.2.4 Aktivierung der MAP-Kinasen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Während die Effekte von GPGRn und G-Proteinen im intermediären Stoffwechsel schon seit langem intensiv studiert wurden, ist erst seit kurzem bekannt, daß die GPGRn und G-Proteine neben den Rezeptortyrosinkinasen eine zentrale Stellung bei der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und auch der Zelltransformation einnehmen (Gutkind, 1998; Farfel *et al.*, 1999; Gudermann *et al.*, 2000). Ein wichtiger Mechanismus zur Transduktion mitogener Signale von der Zellmembran in den Zellkern ist die Kopplung der GPGRn an die ERK/MAPK-Kaskade. Die Signalübermittlung zu den MAPKs basiert auf einem komplexen Netzwerk von Signalen, die verschiedenen Klassen von Oberflächenrezeptoren entstammen und letztlich auf der Ebene der ERK/MAPK-Kaskade konvergieren, die durch eine relativ kleine Gruppe zentraler Signalmoleküle repräsentiert wird (Abb. 6).

Die Interaktion der G-Proteine mit der MAPK-Kaskade ist vielfältig und verflochten. So induzieren GTP-gebundene α -Untereinheiten und $\beta\gamma$ -Komplexe unterschiedliche Signaltransduktionswege und entfalten mitunter sogar gegensätzlichen Wirkungen. Darüber hinaus besteht eine erhebliche Abhängigkeit vom untersuchten Zellsystem (Lowe *et al.*, 2002). Dies zeigt sich am Beispiel von G_s-gekoppelten Rezeptoren: in NIH 3T3-Zellen, einer Fibroblasten-Zelllinie aus der Maus, antagonisiert eine cAMP-vermittelte Aktivierung der PKA die onkogene Wirkung eines konstitutiv aktiven Ras durch Inhibition der Raf-Kinase-Aktivität. Hingegen ist in PC12-Zellen, einer Phäochromozytom-Zelllinie, die Wirkung einer G α_s -induzierten Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels gegenteilig und führt zu einer Aktivierung der Raf-Kinase. Dies ist darauf zurückzuführen, daß in neuronalen Geweben eine Raf-Isoform namens B-Raf exprimiert wird, welche nicht durch die PKA inhibiert, sondern durch die kleine GTPase Rap1 selektiv aktiviert wird (Chen *et al.*, 2001, Abb. 6).

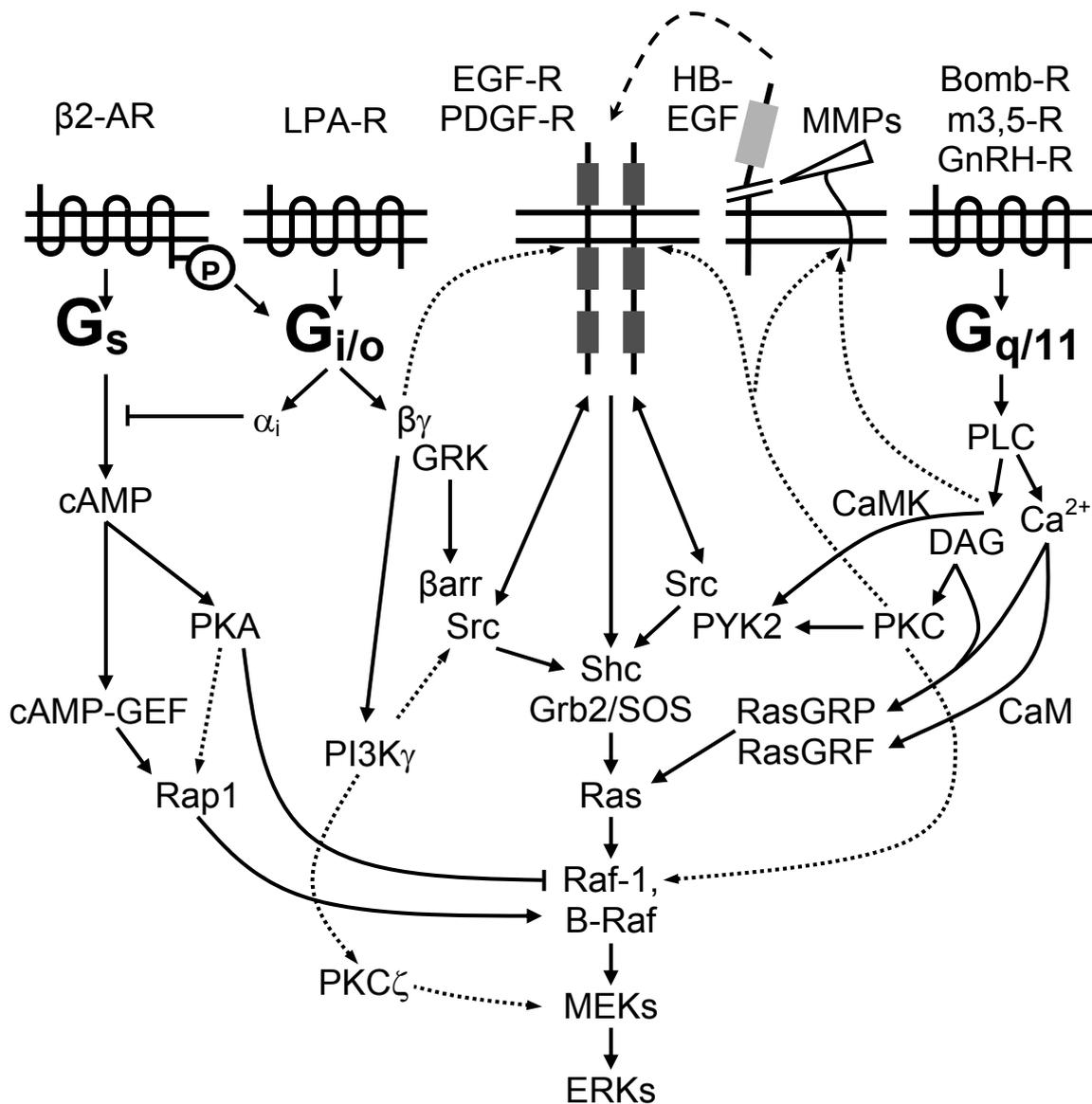


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivierung der ERK-MAPKs durch G_s -, $G_{i/o}$ - und $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren

Dargestellt ist die Signaltransduktion zwischen den verschiedenen Klassen von G-Proteinen und den ERK-MAPKs. Durchgezogene Linien repräsentieren nachgewiesene direkte Interaktionen zwischen Signalkomponenten, gestrichelte Linien hingegen stehen für mutmaßliche oder indirekte Verbindungen zwischen verschiedenen Signalproteinen. Details s. Text. **Abkürzungen:** β_2 -AR, β_2 -adrenerger Rezeptor; β arr, β -Arrestin Bomb-R, Bombesin-Rezeptor; CaM, Calmodulin; CaMK, Calmodulin-Kinase; cAMP-GEF, cAMP-aktivierter Guaninnukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor); cAMP-Kinase, cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA); HB-EGF, heparin-binding EGF-like growth factor; GAP, GTPase aktivierendes Protein; Grb2/SOS, Komplex aus dem Adapterprotein Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) und dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (Son-of-sevenless); GRK, G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase; LPA, Lysophosphatidsäure; MEK, Mitogen aktivierte Proteinkinase/ durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase Kinase; m3,5R, m3 und m5 muskarinerges Acetylcholinrezeptor; MMP, Matrix-Metalloprotease; PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase; PLC, Phospholipase C; PYK2, prolinreiche Tyrosinkinase 2, RasGRP/RasGRF, Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Ras.

Mitogene Signale, die über G_i -gekoppelte Rezeptoren eine Stimulation der MAPKs bewirken, scheinen hauptsächlich durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt zu werden (Gutkind, 1998). Luttrell *et al.* (1999b) zeigten am Beispiel des β_2 -adrenergen Rezeptors, daß die membrangebundenen $\beta\gamma$ -Dimere aus G_i -Proteinen durch die Rekrutierung von GRKs und β -Arrestine eine Translokation der zytosolischen Tyrosinkinase Src an den Rezeptor vermitteln können. Die derart eingeleitete Internalisierung des Rezeptormoleküls und die Src-vermittelte Tyrosinphosphorylierung des Adapterproteins Shc bildeten die Voraussetzung für eine Aktivierung der Ras/MAPK-Signalkaskade (Abb. 6). Allerdings scheint die β -Arrestin-vermittelte GPGR-Internalisierung einen möglichen, aber keinen generell gültigen Mechanismus für eine G_i -induzierte ERK-Aktivierung darzustellen.

Eine Hauptrolle bei der Verbindung der $G_{q/11}$ -Familie der G-Proteine mit der ERK-Signalkaskade übernehmen die PKC-Isoenzyme. Die direkte Aktivierung der PKC durch Phorbolster führt zu einer massiven ERK-Aktivierung. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch Gegenstand der Forschungsbemühungen. Eine Modellvorstellung leitet sich aus der Beobachtung ab, daß die PKC α in NIH 3T3-Zellen Raf1 direkt aktiviert (Gutkind, 1998). Während die mitogene Signaltransduktion über G_i -gekoppelte Rezeptoren übereinstimmend als Ras-abhängig betrachtet wird, sind die Ergebnisse bei $G_{q/11}$ -koppelnden Rezeptoren uneinheitlich (Crespo *et al.*, 1994; Hawes *et al.*, 1995; Marais *et al.*, 1998). So ist bekannt, daß Raf1 zu seiner Aktivierung mit GTP-beladenem Ras assoziiert sein muß und Phorbolster eine Akkumulation von GTP-Ras induzieren (Marais *et al.*, 1998). Allerdings konnten Marais *et al.* (1998) durch den Einsatz einer dominant negativen Ras-Mutante, N17-Ras, welche spezifische Guaninnukleotid-Austauschfaktoren des Ras (z.B. Sos) sequestriert, die Raf-Aktivierung durch die PKC nicht unterbinden.

Eine weitere zentrale Stellung bei der Signaltransduktion von GPGRs zu den MAPKs nehmen RTKs wie der PDGF- und der EGF-Rezeptor ein (Daub *et al.*, 1996; Herrlich *et al.*, 1998; Zwick *et al.*, 1999). Der molekulare "Crosstalk" zwischen diesen verschiedenen Familien von Oberflächenrezeptoren wird als ligandenunabhängige Aktivierung oder Transaktivierung der RTKs bezeichnet. Man ging lange Zeit von einer Ligandenunabhängigkeit und einer rein intrazellulären Vermittlung der RTK-Transaktivierung aus, da in Zellkulturmedien keine GPGR-induzierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren detektiert werden konnte (Eguchi *et al.*, 1998). Der Mechanismus der Transaktivierung ist derzeit immer noch nicht vollständig verstanden. Er scheint

aber in vielen Zellen und bei verschiedenen G_i- und G_{q/11}-koppelnden Rezeptoren ein generelles Prinzip darzustellen.

Einige neuere Studien zeigen eine Transaktivierung des EGFR nach GPGR-Stimulierung durch die Freisetzung membranverankerter EGF-ähnlicher Wachstumsfaktoren (Prenzel *et al.*, 1999; Kalmes *et al.*, 2000). Die proteolytische Prozessierung der membrangebundenen Vorläufermoleküle zum löslichen Wachstumsfaktor erfolgt durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPn) (Raab und Klagsbrun, 1997). Die MMPn bilden eine große Enzymfamilie. Es handelt sich um zinkabhängige Endopeptidasen, die durch einen kontrollierten enzymatischen Abbau der extrazellulären Matrix die Matrixzusammensetzung und den Zell-Matrix-Kontakt regulieren. Aufgrund dieser Funktion sind sie auch bei pathologischen Prozessen wie der Invasion und Metastasierung maligner Zellen von entscheidender Bedeutung (Westermarck und Kähäri, 1999).

Der EGFR-Transaktivierungsmechanismus, der in den zitierten Studien favorisiert wird, setzt somit eine dreimalige transmembranäre Signaltransmission voraus: die ligandenabhängige Aktivierung eines GPGR und die nachfolgende Interaktion des Rezeptors mit einem G-Protein produzieren ein intrazelluläres Signal, das seinerseits die Aktivierung transmembranärer MMPn bedingt. Die MMP-Aktivierung führt zur extrazellulären Prozessierung und Freisetzung transmembranärer Wachstumsfaktoren, welche dann mit der Ektodomäne des EGFR interagieren und ein intrazelluläres Signal induzieren. Dieser Transaktivierungsmechanismus reflektiert die klassische RTK-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren, und obwohl die Identifizierung der beteiligten MMPn noch lange nicht abgeschlossen ist, stellen membranäre Proteinasen bereits heute wichtige Zielstrukturen für Therapeutika dar (Coussens *et al.*, 2002).

1.2.5 Der GnRH-Rezeptor

Innerhalb der GPGR-Familie wird eine große und strukturell heterogene Untergruppe, die aus mehr als 60 bekannten Rezeptortypen besteht, durch Peptidliganden aktiviert (Watson und Arkininstall, 1994). Die Gewebsexpression von Peptidhormonrezeptoren ist meist charakteristisch und hochspezifisch. Ein Vertreter der Peptidhormonrezeptoren ist der Rezeptor für das Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH oder Gonadoliberin). Seine physiologische Aufgabe besteht v. a. in der Regulation der Gonadenfunktion.

Bei GnRH handelt es sich um ein Dekapeptid, das in den diffus verteilten Neuronen des vorderen und mittleren Hypothalamus gebildet und aus den neuronalen

Axonterminalien in das Portalvenensystem sezerniert wird. Die Hormonsekretion erfolgt pulsatorisch etwa alle 60-90 Minuten. Über den Portalkreislauf gelangt das GnRH in die Adenohypophyse, wo es an seinen spezifischen Oberflächenrezeptor bindet, über den es die Synthese und Sekretion der Gonadotropine LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) reguliert. Die Hormone Östrogen, Progesteron und Testosteron haben im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus einen modulatorischen Effekt auf Pulsamplitude und -frequenz der GnRH-Sekretion.

Der GnRH-Rezeptor ist mit 328 Aminosäuren einer der kleinsten GPGRn. Er gehört zur Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPGRn und weist einige besondere Rezeptorcharakteristika auf (Chi *et al.*, 1993). Das wohl bemerkenswerteste Strukturmerkmal ist, daß dem GnRH-Rezeptor von Säugern als einzigem GPGR der funktionell bedeutsame zytoplasmatischen C-Terminus vollkommen fehlt. Dieser zytoplasmatische C-Terminus bildet bei den meisten heptahelikalen Rezeptoren die vierte intrazelluläre Schleife (Abb. 4). Da auf diesem Rezeptorabschnitt oftmals die spezifischen Phosphorylierungsstellen für GRKs lokalisiert sind, unterliegt der GnRH-Rezeptor keiner schnellen homologen Desensibilisierung (<10 min) infolge einer Agonistenstimulation und weist außergewöhnlich langsame Internalisierungsraten auf (Heding *et al.*, 1998; Willars *et al.*, 1999). Weiterhin konnte durch einen systematischen Vergleich mit dem hypophysären TRH (Thyreotropin-Releasinghormon)-Rezeptor gezeigt werden, daß die Expression des Säuger-GnRH-Rezeptors an der Plasmamembran β -Arrestin-unabhängig reguliert wird (Vrecl *et al.*, 1998). Eine weitere Besonderheit des GnRH-Rezeptors ist seine ausschließliche Kopplung an $G_{q/11}$ -Proteine (Grosse *et al.*, 2000).

Ein Schlüsselenzym für die durch den GnRH-Rezeptor vermittelten Effekte ist die PLC- β , deren Aktivierung durch heterotrimere G-Proteine der $G_{q/11}$ -Familie erfolgt. Das dabei entstehende Signalmolekül IP_3 bewirkt einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Die etwa 10-15 Sekunden später folgende, niedrigere und minutenlange Plateauphase wird in $\alpha T3-1$ -Zellen, einer Hypophysentumorzelllinie der Maus (Windle *et al.*, 1990), durch spannungsabhängige L-Typ-Kalzium-Kanäle vermittelt. Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen vermittelt die GnRH-induzierte Sekretion von LH und FSH (Stojilkovic *et al.*, 1994; van Goor *et al.*, 2001). Das zweite Produkt der PLC- β , das Signalmolekül DAG, ist neben der Arachidonsäure, Ca^{2+} und Phorbolestern ein potenter PKC-Aktivatoren und induziert die Translokation des Enzyms an die Plasmamembran (Nishizuka *et al.*, 1995). Als ubiquitär exprimierte

Serin/Threoninkinase phosphoryliert die PKC ein großes Spektrum von Proteinen. Zum Aufgabenfeld der PKC gehören die heterologe Desensibilisierung von Rezeptoren und Modulation von Ionenkanälen. In gonadotropen Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die Expression von Differenzierungsmarkern wie den Glykoproteinormon-Untereinheiten α und β sowie dem GnRH-Rezeptor von einer PKC-vermittelten Aktivierung (Sundaresan *et al.*, 1996; Reiss *et al.*, 1997) der MAPK-Kaskade abhängig war (Roberson *et al.*, 1995; Call *et al.*, 1999; White *et al.*, 1999). Ein Ca^{2+} -abhängiger, indirekter aber spezifischer Signalweg des GnRH-Rezeptors führt zur Aktivierung der Adenylylzyklase Typ I (AC I). Die AC I wird durch Ca^{2+} /Calmodulin stimuliert und primär in neuronalen und neuroendokrinen Geweben exprimiert (Mons *et al.*, 1995; Antoni *et al.*, 1995). Da die komplexe Signaltransduktion des GnRH-Rezeptors entscheidend von den distal der PLC- β vorhandenen Effektorsystemen beeinflußt wird, variiert sie stark zwischen verschiedenen Zellsystemen.

Wie von anderen Spezies schon seit längerem bekannt, existieren auch bei Säugetieren eine oder zwei strukturelle Varianten des GnRH. Eine dieser Varianten, GnRH II, ist in ihrer Struktur in der evolutionären Entwicklung zwischen Fisch und Mensch komplett konserviert (White *et al.*, 1998; Urbanski *et al.*, 1998). Es gelang daraufhin, einen Typ-II GnRH-Rezeptor zu klonieren, der hochselektiv mit GnRH II interagiert und ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert wird (Millar *et al.*, 2001; Neill *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum Typ-I GnRH-Rezeptor besitzt der Typ-II Rezeptor einen cytoplasmatischen C-Terminus und unterliegt einer schnellen Desensibilisierung und Internalisierung. Die Funktion des Typ-II GnRH-Rezeptors ist noch unbekannt, eine Beteiligung an der Gonadotropin-Sekretion und auch Tumorwachstum jedoch wahrscheinlich (Neill, 2002).

2 Zielsetzung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind ubiquitäre Bestandteile transmembranärer Signaltransduktion in fast allen Spezies. Schon seit 1993 (Pagès *et al.*, 1993) ist bekannt, daß eine Stimulation GPGR zur Aktivierung der MAP-Kinasen führen kann. Allerdings sind auch heute noch in vielen Fällen der exakte Signalweg und die Identität der beteiligten Signalkomponenten unzureichend bekannt. Besonders die Untersuchung $G_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren lieferte in Abhängigkeit vom Studiendesign unterschiedliche Ergebnisse.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Einsichten in die zellulären Mechanismen der MAPK-Aktivierung durch $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren am Beispiel des GnRH-Rezeptors zu gewinnen. Im Vordergrund stand die Identifizierung und Charakterisierung beteiligter Signalmoleküle. Gegenstand der Untersuchungen war der $G_{q/11}$ -gekoppelte GnRH-Rezeptor, der über einige strukturelle und funktionelle Rezeptorbesonderheiten verfügt. Aufgrund dieser besonderen Charakteristika des GnRH-Rezeptors konnten einige Paradigmen, die zur Erklärung der MAPK-Aktivierung durch GPGRn herangezogen werden, im voraus ausgeschlossen werden.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf folgende Fragen:

1. Welche Signalkomponenten sind an der GnRH-induzierten Aktivierung der MAP-Kinasen beteiligt?
2. Kann die Abfolge der funktionellen Aktivierung der Signalkomponenten innerhalb der GnRH/MAPK-Signalkaskade festgestellt werden?
3. Erfolgt die GnRH-induzierte Aktivierung der ERK-Isoformen über
 - a. die Ras/MAPK-Signalkaskade oder werden
 - b. alternative Signalwege genutzt?
4. Ist eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors Bestandteil der Signaltransduktion zwischen dem GnRH-Rezeptor und den MAP-Kinasen?

3 Material

3.1 Verwendete Chemikalien und Zubehör, Hersteller bzw. Lieferfirmen

Chemikalien	Hersteller/Lieferanten
10 x Roti-Block®-Lösung	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, Deisenhofen
Agar-Agar	Serva, Heidelberg
Agarose	Life Technologies, Berlin
Ameisensäure	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Biotrace PVDF-Membran	Pall, Dreieich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Serva-Blau G250	Serva, Heidelberg
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
Desoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Fetales Rinderserum (FCS)	Life Technologies, Berlin
FuGENE Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycerol	Serva, Heidelberg

Glycin	Roth, Karlsruhe
Hybond N ⁺ -Membran (Nitrocellulose)	Amersham Buchler, Braunschweig
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumacetat	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol (technisch)	Serva, Heidelberg
N-2-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Aldrich, Steinheim
Nonidet P-40	Serva, Heidelberg
Penicillin G	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Calbiochem, Bad Soden
Phosphorsäure	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Protein A-/Protein G-Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Protein-Molekulargewichtsmarker (vorgefärbt, für SDS-PAGES)	Gibco, Eggenstein
Salzsäure (HCl)	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Sulfosalicylsäure	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Biochrom, Berlin
Trypton	Difco, Hamburg
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Whatman Papier 3MM	Whatman, Kent (UK)

Radioaktiv markierte Substanzen	Hersteller/Lieferanten
[γ - ³² P] Desoxyadenosin-5'-triphosphat ([γ - ³² P]dATP)	NEN Life Science Products, Zaventem (B)

Restriktionsendonukleasen

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs, Schwalbach, bezogen.

Agonisten	Hersteller/Lieferanten
Carbachol	Sigma, Deisenhofen
EGF, human, rekombinant	Sigma, Deisenhofen
Forskolin	Sigma, Deisenhofen
GnRH	Calbiochem, Bad Soden
Lysophosphatidsäure (LPA)	Sigma, Deisenhofen
Phorbolster (TPA)	Calbiochem, Bad Soden

Antagonisten	Hersteller/Lieferanten
AG1296	Calbiochem, Bad Soden
AG1478	Calbiochem, Bad Soden
BAPTA/AM	Molecular Probes, Leiden (NL)
BB94	Roche Diagnostics, Mannheim
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
PD98059	Calbiochem, Bad Soden
PKA-Inhibitor, Fragment 6-22 Amid	Sigma, Deisenhofen
PP2	Calbiochem, Bad Soden
Staurosporin	Calbiochem, Bad Soden

Antikörper	Hersteller/Lieferanten
Anti-c-Fos (K25), polyklonal, Ziege	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-EGFR 108.1, monoklonal	A.Ullrich
Anti-ERK2 (C14), polyklonal, Kanninchen	Santa Cruz, Heidelberg

Anti-Hämagglutinin(HA)-Immunglobuline, monoklonal 12CA5	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Jun, Maus	Transduction Laboratories
Anti-Kanninchen-Immunglobuline, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, polyklonal, IgG,Ziege	Sigma, Deisenhofen
Anti-MAP Kinase, monoklonal, aktiviert/monophosphoryliert, Maus	Sigma, Deisenhofen
Anti-Maus-Immunglobuline, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, polyklonal, IgG,Ziege	Sigma, Deisenhofen
Anti-pan-Ras, monoklonal	Oncogene, Cambridge (USA)
Anti-Phospho-p44/42-MAPK, monoklonal, Maus	New England Biolabs, Schwalbach
Anti-Phospho-p44/42-MAPK, polyklonal, Kanninchen	New England Biolabs, Schwalbach
Anti-Phosphotyrosin 4G10, monoklonal, Maus	Upstate Biotechnology, New York (USA)
Anti-Shc, polyklonal, Kanninchen	Transduction Laboratories, Exceter (UK)
Anti-Ziege-Immunglobuline, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, polyklonal	Sigma, Deisenhofen

Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

Hersteller/Lieferanten

<i>E.coli</i> K12-Stämme: DH5 α	BioRad, München
COS-7-Zellen/Affennierenzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC), Bethesda (USA)
α T3-1-Zellen/Maushypophysenzelllinie	P.L. Mellon

cDNA-Konstrukte

Literatur/Herkunft

pcDNA3 (Expressionsvektor)	Promega via Serva, Heidelberg
pLXSN (Expressionsvektor)	Miller und Roseman, 1989
pRSV (Expressionsvektor)	H. Bos
pcDNA3-HA-ERK2	Daub et al., 1997
pcDNA3-HA-hGnRH-R	R. Grosse, 1999
pGEX-2T/GST-RBD	A. Wittinghofer
pLXSN-Csk	B. Howell

pLXSN-Csk222	B. Howell
pcDNA3-CD8	Crespo <i>et al.</i> , 1995
pcDNA3-CD8-βARK-Ct	Crespo <i>et al.</i> , 1995
pRSV-N17Ras	H. Bos
pRK5-HER1-CD533	Redemann <i>et al.</i> , 1992
pRK5-HER1Na8	Sachsenmeyer
pMT2-Shc-Y317F	

Filmmaterial	Hersteller/Lieferanten
Röntgenfilm XAR 5, 203 x 254 mm	Kodak, Berlin
Röntgenfilm XOMAT S, 200 x 400 mm	Kodak, Berlin

Sonstige Materialien	Hersteller/Lieferanten
ECL-Western Blotting Detection System	Amersham Buchler, Braunschweig
Quiagen Plasmid Maxi-Kit	Quiagen, Hilden
Wizard-Miniprep-Kit	Promega via Serva, Heidelberg
Myelin Basic Protein (MBP)	Sigma, Deisenhofen

3.2 Medien, Puffer und Lösungen

Medien zur Bakterienkultur:

LB-Flüssigmedium:

10g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

SOB-Flüssigmedium:

20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 NaCl; 2,5 mM KCl; direkt vor Gebrauch sind noch 5 ml einer 2 M MgCl₂-Lösung zuzusetzen.

SOC-Flüssigmedium:

Das SOC-Medium ist mit dem SOB-Medium identisch. Es enthält nur zusätzlich 20 mM Glukose.

Stammlösungen für häufig verwendete Puffer:

PBS-Lösung (Phosphate-buffered saline):

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂HPO₄; pH 7,4

PBST-Lösung:

0,05–0,1 % Tween 20 in PBS

HBS-Puffer (HEPES-buffered saline)

21 mM HEPES; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na₂HPO₄; 5,5 mM
Glukose; pH 7,1

TBE-Puffer:

88 mM Tris/HCl pH 8,0; 88mM Borsäure, 5 mM EDTA

SSC-Puffer:

150 mM NaCl; 15 mM Natriumcitrat

4 Methoden

4.1 Zelllinien und Zellkultur

4.1.1 Zelllinien

α T3-1-Zellen sind gonadotrope Hypophysen-Zellen aus der Maus, die den GnRH-Rezeptor endogen exprimieren. Sie waren ein Geschenk von P.L. Mellon. Als Kulturmedium diente DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 4,5 g/l Glukose, je 5 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum und Pferdeserum, 50 units/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin sowie 2 mM Glutamin.

Die Zelllinie wurde bei 37° Celsius und einer Begasung mit 5% CO₂ gehalten.

COS-7 sind immortalisierte Nierenfibroblasten der Grünen Meerkatze, die mit dem „large T-antigen“ transformiert wurden. Sie wurden von ATTC geliefert. Als Kulturmedium benötigten sie DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 1 g/l Glukose, dem 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, Penicillin (50 units/ml), Streptomycin (50 μ g/ml) und Glutamin 2 mM zugesetzt wurde. Die Zellen wurden bei 37° Celsius mit 7 % CO₂ begast. Die Luftfeuchtigkeit in den Brutschränken betrug 95 %. Alle Arbeiten in der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen.

4.1.2 Umsetzen von Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurde 0,25 %iges Trypsin zugegeben (1,5 ml/175 cm²-Zellkulturflasche) und die für Zellen einige Minuten im Brutschrank inkubiert, bis sie sich ablösten. Die abgelösten Zellen wurden in frisches, warmes Zellkulturmedium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Wenn Zellen für Versuche ausgesetzt werden mußten, wurden sie in der Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend der gewünschten Dichte ausgesetzt (ca. 2 Millionen Zellen/100 mm Schale).

4.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Sie wurden dazu zunächst mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben trypsinisiert. Danach wurden sie in 10 ml warmes Wachstumsmedium aufgenommen, in ein

Reaktionsgefäß (Falcon®-tube) überführt und abzentrifugiert (300 x g, 5 min). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml Gefriermedium (90 % fetales Kälberserum und 10 % DMSO) resuspendiert und danach in entsprechende Einfrierampullen aliquotiert (1 ml/Ampulle). Diese wurden für 45 min auf Eis abgekühlt, anschließend für einen Tag bei -80° C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff (-196° C) zur Langzeitaufbewahrung verbracht.

Sollten Zellen aufgetaut werden, wurden sie für wenige Minuten in ein 37° C warmes Wasserbad gehalten. Dann wurden sie zur Verdünnung des DMSO in ein Falcon®-Gefäß mit 10 ml warmen Wachstumsmedium überführt und erneut abzentrifugiert (s.o.). Das Pellet wurde in warmes Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche verbracht. 24 Stunden später wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

4.1.4 Behandlung von Zellen

Für die meisten Experimente wurden Zellen in subkonfluenter Dichte verwendet, die gleichmäßig in 100 mm Zellkulturschalen ausplattiert worden waren. Um eine Stimulation der Zellen durch Serumkomponenten (z.B. Wachstumsfaktoren) zu verhindern, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte, wurden die Zellen in serumfreiem Medium „gehungert“ (COS-7-Zellen: 18 Stunden, α T3-1-Zellen: 8 Stunden).

Alle Hormone und Agenzien wurden in entsprechenden Verdünnungen aus 100-1000fachen Stammlösungen angesetzt und dazu frisch aufgetaut. Die Stammlösung der Tyrphostine AG1478, AG1296, PP1, TPA (Phorbol ester) und der PKC-Inhibitor GF109203X (Bisindolylmaleimid) wurde mit DMSO angesetzt. Die Zellen wurden in der Regel 20 min vor der Agonistenstimulation mit den Inhibitoren vorinkubiert. Das Peptidhormon GnRH sowie Carbachol wurden in H₂O oder PBS (pH 7,4) mit 0,1 % fettsäurefreiem BSA (bovines Serumalbumin) aufgelöst. LPA wurde in PBS mit BSA aufgenommen. Die Stimulationszeit mit den Agonisten betrug, falls nicht anders angegeben, 5 min. Kontrollbehandelte Zellen wurden ausschließlich mit den jeweiligen Lösungsmitteln behandelt. Die Basalwerte entstanden durch alleinige Behandlung mit serumfreiem Medium. Auf Besonderheiten bei der Behandlung der Zellen wird bei der Darstellung der einzelnen Methoden und Experimente eingegangen.

4.1.5 Methodik der Transfektion

4.1.5.1 Transfektion eukaryoter Zellen mit CaCl₂

Zur transienten Transfektion von COS-7-Zellen wurde eine Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode verwendet. Diese eignete sich v. a. für Kotransfektionen, bei denen mehrere Plasmide in einem bestimmten Verhältnis zueinander in die Zellen eingebracht werden sollten. Zur Transfektion der subkonfluenten Zellen in 100 mm Schalen wurden 20 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Dabei enthielt die Transfektionsmischung stets konstante Mengen der GnRH-Rezeptor-cDNA (5 µg/100 mm Schale) und anderer cDNA-Konstrukte, um die Menge an Gesamtplasmid bei 20 µg zu halten.

Zunächst wurde eine gepufferte Salz-Phosphat-Lösung angesetzt, die aus 1 x HBS-Puffer und 2 mg/ml Lachssperma-DNA bestand. Dieser Lösung gab man die zu transfizierende cDNA in definierter Menge zu. Dann wurde tröpfchenweise und unter Schütteln CaCl₂ zugesetzt und die Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit bildeten sich feine Präzipitate aus Kalziumphosphat und DNA. Das Präzipitat wurde dann auf die Zellen pipettiert. Während der folgenden Inkubationszeit (bei 37 ° C im Brutschrank) nahmen die Zellen diese Präzipitate durch Endozytose oder Phagozytose auf. Nach 12 Stunden wurde den Zellen frisches Wachstumsmedium zugegeben und diese darin einen weiteren Tag belassen. Die Versuche wurden 48 Stunden nach der Transfektion gestartet.

Ansatz für eine CaCl₂-Transfektion(100 mm Zellkulturschale):

850 µM 1 x HBS

4,25 µl Lachssperma-DNA (2 mg/ml)

42 µl 2,5 M CaCl₂

4.1.5.2 Transfektion eukaryoter Zellen mit FuGENE®

Die transienten Transfektionen in αT3-1-Zellen wurden bei 70 % Konfluenz mit dem auf Liposomen basierenden Transfektionsreagenz FuGENE® (Roche) durchgeführt. Dazu wurde serumfreiem Medium zuerst das Liposom und danach die zu transfizierende cDNA zugesetzt (z.B. 6 µg FuGENE®-Transfektionsreagenz und 2 µg DNA in 100 µl Medium für eine 60 mm Schale). Die Lösung wurde dann für 30-45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unter Schwenken der Schale

tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Da ein erneuter Mediumwechsel nicht erforderlich war, konnten die Versuche nach den angemessenen „Hungerzeiten“ gestartet werden.

Für alle Transfektionen wurden die Zellen am Vortag in der gewünschten Dichte in Schalen ausgesetzt.

4.2 Proteinchemische Methoden

4.2.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die Behandlung der Zellen entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll erfolgte in der Regel in 100 mm Zellkulturschalen, in denen die Zellen gleichmäßig ausplattiert und zu subkonfluenter Dichte gewachsen waren. Nach der Behandlung wurden die Zellen zum Abstoppen der Reaktion einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 2x Protein-Probenpuffer nach Laemmli (auf 100 ml H₂O: 125 mM Tris, 2 % SDS, 25 g Glycerin, 20 mM DTT, Bromphenolblau ad lib., pH 6,8; Zusatz von 500 µl 2 x Protein-Probenpuffer/100 mm Zellkulturschale) denaturiert. Die Proteinextrakte wurden dann sofort in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und auf Eis gekühlt. Danach wurden die Proben zur DNA-Verkleinerung mit Ultraschall sonifiziert oder alternativ 5 x durch eine 21G Nadel gezogen, für 5 min bei 95° C aufgeköcht und schließlich 20 µl Proteinlysate pro Geltasche eines SDS-Gels geladen.

4.2.2 SDS-Gel-Elektrophorese

Die Mini-Polyacrylamid-Gele (PAGE, Laemmli 1970) wurden mit Hilfe von Gelgießständen gegossen. In diese wurden zwei gut mit Ethanol gereinigte Glasplatten mit zwei dünnen Abstandshaltern („Spacer“) zusammengesetzt und in einem entsprechenden Halter befestigt. Die Länge der Gele betrug 9 cm. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, das zur Auftrennung der Proteine anhand ihrer Laufgeschwindigkeit diente. Nach dem Polymerisieren des Trenngels konnte es mit dem Sammelgel überschichtet werden. In dieses wurden dann geeignete Probenkämme eingeführt, so daß nach der Polymerisation des Sammelgels und dem Ziehen des Kammes die Probenkämme im Gel zurückblieben. Bei dem Trenngel betrug die Acrylamidkonzentration in der Regel 9 %, bei dem Sammelgel 6 %. Trenn- und Sammelgel wurden angesetzt wie aus unten stehender Tabelle ersichtlich.

Das Gel-Glas-Sandwich wurde nach der vollständigen Polymerisation des Gels mit dem Gelgießständer in die zugehörige Gelkammer gestellt und diese mit Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Der Probenkamm wurde vorsichtig entfernt und dann die Proteinlysate mit einer 100 µl Haemilton-Glasspritze in die Probentaschen eingefüllt (in der Regel 20 µl/Tasche). Die Elektrophorese erfolgte dann bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA.

	Trenngel 9 %	Sammelgel 6%
Gelstock 30 %* (ml)	4,5	2
4 x Trenngelpuffer pH 8,8 / 2 x Sammelgelpuffer pH 6,8 (ml)	3,75	5
H ₂ O (ml)	6,75	2,9
10 % Ammoniumpersulfat APS (µl)	180	150
TEMED (µl)	20	16

* Gelstock 30 % = 30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid

Verwendete Elektrophorese-Puffer:

4 x Trenngelpuffer pH 8,8:

1,5 M Tris, 0,4 % SDS

Sammelgelpuffer pH 6,8:

0,25 M Tris, 0,2 % SDS

Laemmli-Laufpuffer:

0,025 M Tris, 0,19 M Glycin, 0,1 % SDS; vor Gebrauch Verdünnung 1:10

4.2.3 Färbung von Proteingelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnten die Proteine in den Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Proteingel in einer Coomassie Blau-Färbefixierlösung (0,25 % Serva-Blau G250, 50 % Methanol) eine Stunde lang auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gefärbt und danach in einer

Entfärbelösung (5 % Methanol, 10 % Essigsäure), die mehrfach gewechselt wurde, bei Raumtemperatur solange inkubiert, bis deutliche Proteinbanden zu erkennen waren.

4.2.4 Westernblotting

Im Anschluß an die SDS-Gel-Elektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf Nitrocellulosemembranen (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurde meist das Tank- bzw. Naßzellen-Blotting-Verfahren mit einer kommerziellen Mini-Apparatur von Biorad angewandt, bei dem der elektrophoretische Transfer in einem Puffertank erfolgt. Das Gel-Transfermembran-Sandwich wurde in einer Kassette unter Vermeidung von Luftblasenbildung gepackt und die Kassette dann so in die Pufferkammer eingehängt, daß das Gel mit den negativ geladenen Proteinen auf der Kathodenseite und die Membran in Laufrichtung der Proteine zur Anode lag. Es wurde dann in Westernblotpuffer (0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; 0,2 % (w/v) SDS und 20 % Methanol) bei 240 mA und unter Verwendung eines Kühlelementes zwischen 1-2 Stunden geblottet.

4.2.5 Immunoblotting (Immundetektion)

Die nach Molekulargewicht aufgetrennten und auf eine Nitrocellulosemembran transferierten Proteine konnten nun durch spezifische Antikörper identifiziert werden. Zunächst wurde die Membran mit Ponceau-Reagenz (2 % Ponceau S (w/v), 30 % Trichloressigsäure, 30 % Sulfosalicylsäure) reversibel angefärbt, um zum einen die Transfereffizienz und zum anderen die Korrelation des Gesamtproteinmusters mit den Signalen der nachfolgenden immunchemischen Detektion spezifischer Antigene zu kontrollieren. Die Banden des Molekulargewichtstandards wurden markiert. Dann mußten die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert bzw. abgesättigt werden. Zu diesem Zweck konnten ein Blockierungspuffer (10 % (w/v) fettarmes Trockenmilchpulver und 0,1 % Tween 20 in PBS) oder eine Roti-block®-Lösung (10x Roti-block® als 1:10-Verdünnung in H₂O) verwandt werden, in denen die Nitrocellulosemembranen bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert wurden. Anschließend wurden die Primärantikörper in Blockierungspuffer verdünnt (entsprechend den Empfehlungen der Hersteller), die Membran mit der Lösung in Folie eingeschweißt und bei 4° C über Nacht in einem sog. Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Blot-Membran dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem kommerziell erhältlichen,

Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper erneut in Blockierungspuffer geschüttelt wurde. Bei den Sekundär-Antikörpern handelte es sich um meist polyklonale, speziesspezifische, gegen die Klasse oder Subklasse des Primär-Antikörpers gerichtete und markierte Anti-Ig-Antikörper. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Blot-Membran erneut dreimal mit PBST (0,05–0,1 % Tween 20 in PBS) gewaschen. Da die Sekundär-Antikörper Peroxidase-gekoppelt waren, konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe durch ein luminometrisches Nachweisverfahren (ECL-Kit, Amersham) detektiert werden. Die Peroxidase katalysiert eine Oxidation des Substrates Luminol, wodurch Lichtquanten emittiert werden. Diese sog. Chemilumineszenz wurde zur Belichtung eines Röntgenfilms genutzt, was eine dauerhafte Dokumentation der Ergebnisse ermöglichte („hard copies“).

4.2.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Blot-Membran und Durchführung eines neuen immunologischen Nachweises

Da die mit ECL gebildeten Konjugate recht stabil sind, mußten vor jedem weiteren immunologischen Nachweis mit neuen Antikörpern die gebundenen Antikörper zunächst entfernt werden. Dazu wurde die Membran bei 55° C mit Stripping-Puffer (100 mM 2-Mercaptoethanol; 2 % SDS; 62,5 mM Tris-HCl; pH 6,5) unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Blot-Membran zuerst mit H₂O gespült und dann dreimal für 10 min in viel PBST gewaschen. Vor der Inkubation mit dem nun gewünschten Primär-Antikörper mußte die Membran wieder eine Stunde lang mit der Blockierungslösung behandelt werden. Das weitere Vorgehen entsprach dann dem unter 4.2.5. dargestellten. Das Verfahren diente der respektiven Kontrolle, ob gleiche Mengen an Protein in alle Geltaschen geladen worden waren. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, daß unterschiedlich starke Signale auf einem Röntgen-Film nur Ergebnis einer unterschiedlichen Proteinmenge in den verschiedene Proben waren.

4.2.7 Immunopräzipitation

Gleichmäßig ausplattierte, subkonfluente Zellen (in der Regel in 100 mm Zellkulturschalen) wurden nach der experimentellen Behandlung mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 600 µl eiskaltem 1 % Triton-Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % Triton X-100, frisch zugegeben wurden die Proteasen-Inhibitoren: 1 mM DTT; 500 µM Natrium-Orthovanadat [Na₃VO₄]; 1 mM PMSF; 0,1 µM Aprotinin und 1 µM Leupeptin) pro 100 mm

Zellkulturschale lysiert. Der Triton-Lysispuffer ist ein vergleichsweise milder Lysispuffer, der Zellmembranen, nicht jedoch die Zellkernmembranen lysiert. Protein-Protein-Wechselwirkungen, wie z.B. SH2-Domänen-Tyrosinphosphat-Interaktionen, werden nur in geringem Maße beeinflusst. Dadurch war es möglich, solche Assoziationen wie die des Shc-Proteins mit dem EGFR zu untersuchen. Die Zellen wurden dann in ihren Schalen bei 4° C für 20 min inkubiert und der Lysispuffer währenddessen durch wiederholtes Schwenken der Schalen gleichmäßig verteilt. Im Anschluß wurden die Lysate von den Zellkulturschalen in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Um unlösliches Zellmaterial wie Zellkerne und Zytoskelett zu entfernen, wurden die Lysate bei 12.000 x g und 4° C 10 min lang zentrifugiert und der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthielt, in neue Reaktionsgefäße pipettiert. Dann wurde den Lysaten noch einmal dasselbe Volumen eines 0,1 %-Tritonpuffers (Ansatz entsprechend dem 1 % Triton-Puffer, s. o., bis auf die 10-fach geringere Triton-Konzentration) zugesetzt, um die Triton X-100 Konzentration zu verdünnen, und anschließend der entsprechende Antikörper hinzupipettiert. Die Proben wurden bei 4° C für mindestens 2 Stunden, meist aber über Nacht im Überkopf-Rotator inkubiert. Als nächstes wurden jedem Probengefäß bei 4° C 100 µl einer 12,5 % (w/v) Protein A-Sepharoselösung zugesetzt und die Proben wiederum für mindestens 2 Stunden bei 4° C auf dem Rotator inkubiert. Es handelt sich bei Protein A um bakterielle Ig-Rezeptoren aus *Staphylococcus aureus*, die an den F_c-Teil von vielen Immunglobulinen binden und durch Kopplung an Sepharose-Partikel zur Isolierung von Immunkomplexen aus Zellysaten genutzt werden können. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Sepharose bei 4° C (12.000 x g, 10 sek) pelletiert, der Überstand verworfen und durch Zugabe von 500 µl des eiskalten 0,1 %-Triton-Waschpuffers ersetzt. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet mit einer Haemilton-Nadel trockengelegt, in 40 µl 2 x Protein-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95° C aufgeköcht. Danach wurden gleiche Mengen des löslichen Überstandes in die Geltaschen eines SDS-Polyacrylamid-Gels geladen.

4.3 DNA-Methoden

4.3.1 Handhabung von Bakterien-Medien und Kulturplatten

Zur Kultivierung von Bakterien wurde LB-Flüssigmedium und SOC-Flüssigmedium verwendet. Alle Bakterienkulturmedien wurden bei einem Druck von 1 bar für 45 min in einem Autoklaven hitzesterilisiert. Danach wurden sie steril verschlossen und bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch gelagert. Ampicillin (in einer Endkonzentration von 100 µg/ml), das der Selektion der transformierten Bakterienzellen dient, wurde dem LB-Medium erst bei Gebrauch frisch aus einer sterilen 10 mg/ml Stocklösung zugesetzt.

Für das Gießen von Agarplatten wurde das LB-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar versetzt. Das Ampicillin durfte erst nach Abkühlen der autoklavierten Mischung auf ca. 50° C hinzupipettiert werden, da es nicht hitzestabil ist. Das fertige Medium wurde nun auf sterile Petrischalen verteilt und nach Abkühlen und Erhärten des Agars bei 4° C bis zum Gebrauch gelagert.

4.3.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Behandlung von *E. coli*-Bakterien mit CaCl₂ (Cohen et al., 1970) kann diese vorübergehend in den Zustand der „Kompetenz“ versetzen, in dem sie cDNA-Plasmide besser aufnehmen können (= Transformation). Bei den Plasmiden handelt es sich um kleine DNA-Moleküle, also um Minichromosomen, die nicht an das Hauptchromosom der Bakterienzelle gekoppelt sind und sich autonom vermehren können. Plasmide tragen meist Gene, die Resistenz gegen Antibiotika verleihen. Sie sind doppelsträngig und liegen in zirkulärer Form vor.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde der *E. coli*-Stamm DH5α verwendet. Dazu mußte zunächst eine kleine Menge eines bei -80° C gelagerten DH5α-Stocks aufgetaut werden. Mit diesen Zellen wurden dann 3 ml LB-Medium angeimpft und bei 37° C über Nacht behutsam geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 100 ml LB-Medium 1 ml der Übernachtskultur zugesetzt und dieser neue Ansatz ca. eine Stunde lang wiederum bei 37° C geschüttelt. Dabei mußte wiederholt die optische Dichte gemessen werden. Die Inkubation wurde bei einer OD₅₅₀=0,5 abgebrochen und die Kultur für 15 min auf Eis gestellt. Danach wurde die Bakteriensuspension bei 4° C und 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet in 20 ml einer sterilen, eiskalten CaCl₂-Lösung resuspendiert. Danach wurden die Bakterienzellen erneut abzentrifugiert und nach erneuter Resuspension in 5 ml der CaCl₂-Lösung eine weitere

Stunde auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen entweder nach dem Zusatz von 1 ml 87-%igem Glycerol aliquottiert und bei -80°C als Glycerol-Stock gelagert oder direkt zur DNA-Transformation eingesetzt.

4.3.3 Transformation kompetenter Zellen

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Das rekombinierte Plasmid dient hierbei als Transportvehikel, d.h. als Vektor, für ein spezifisches, fremdes DNA-Fragment. Da die Vektoren zusätzlich Gene für eine Ampicillinresistenz enthalten, wachsen nach dem Ausplattieren auf dem antibiotikahaltigem Agar nur plasmidhaltige Bakterien; d.h. sie besitzen einen Selektionsvorteil gegenüber nicht-transformierten *E. coli*-Zellen. Aus jedem resistenten Bakterium entsteht eine Kolonie und somit eine Sammlung klonierter DNA-Fragmente, die man auch als cDNA-Bibliothek bezeichnet.

Zunächst mußten kompetente DH5 α -Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und vorsichtig resuspendiert werden. Danach wurden 50-100 μl der Bakterien-Lösung mit 10-100 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA, die immer auch ein Ampicillin-Resistenz-Gen enthielt, in einem sterilen Gefäß vorsichtig gemischt und danach für 30 min auf Eis gestellt. Während dieser Zeit lagert sich die DNA den Zellwänden an. Als nächstes wurde die Mischung für 90 sec bei 42°C erhitzt („heat-shock“). In dieser Phase kommt es zum Aufbrechen der Peptidoglykan-Wand der Bakterien und so zur Aufnahme eines Teils der angelagerten DNA in die Zellen. Anschließend wurden die Transformationsansätze für 2 min erneut auf Eis gestellt, danach in 400 μl vorgewärmtes SOC-Medium eingebracht und für 1 Stunde bei 37°C vorsichtig (120 Upm) geschüttelt. Das SOC-Medium ist ein besonders reichhaltiges Medium, in dem die Zellen während der Inkubationszeit gut wachsen und β -Lactamase synthetisieren konnten. Nun wurde die Transformationslösung mit einer ausgeglühten und zu L-Form gebogenen Pasteur-Glaspipette auf ampicillinhaltigen, vorgewärmten Agarplatten ausplattiert, kurz luftgetrocknet und bis zum Erscheinen makroskopisch sichtbarer Kolonien bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Zur Amplifikation des in die Bakterienzellen transformierten Plasmids wurde ein großer Einzelklon ausgewählt, mit Hilfe einer Pipettenspitze aufgenommen, in 400 ml Selektionsmedium (LB-Medium, 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) verbracht und bei 37°C mit 220 Upm über Nacht geschüttelt.

Alle im Folgenden beschriebenen DNA-Präparationen wurden mit Hilfe des Quiagen Plasmid Maxi-Kit® (Quiagen) bzw. des Wizard-Miniprep-Kit® (Promega) durchgeführt.

Zur Extraktion der amplifizierten Vektoren aus den Bakterienzellen wurde die Bakteriensuspension zunächst bei 4° C und 5000 x g für 20 min sedimentiert. Nach dem vorsichtigen Abgießen des Überstandes wurde das Bakterien-Pellet in 20 ml Puffer P1 (50 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Danach wurden die Bakterienwände durch den Zusatz von 10 ml Puffer P2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) lysiert. Dieser Vorgang sollte nicht länger als maximal 5 min dauern, da ansonsten die Plasmid-DNA ebenfalls denaturiert wird. Im Anschluß an die Lyse wurde sofort Puffer P3 (3 M Kalium-Acetat) zugegeben, der zur Neutralisation des Bakterienlysates innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur führte. Dies bewirkte die Bildung von Präzipitaten des SDS mit denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und Zelldetritus. Das Ausfallen dieser Salzkomplexe ließ das Bakterienlysat trüb und viskös werden. Nun wurde das Lysat für 20 min auf Eis inkubiert und im Anschluß die präzipitierte genomische DNA und der Zelldetritus bei 7200 x g, 4° C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Filterpapier auf die zuvor mit 10 ml Äquilibrations-Puffer (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15 % Ethanol) äquilibrierten Säulen (Quiagen-Tip500®-Säulen) gegossen, wobei die negativ geladene Plasmid-DNA an den an positiven Ladungen des Anionenaustauschers „hängenblieb“. Nach der Bindung der Plasmid-DNA an das Säulenmaterial wurden Verunreinigungen mit 2 x 30 ml Waschpuffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7, 15 % Ethanol) ausgewaschen. Zur Eludierung der Plasmid-DNA wurden dann 15 ml Elutions-Puffer (1,25 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 8,5; 15 % Ethanol) zugesetzt. Die eludierte Plasmid-DNA wurde dann durch den Zusatz des 0,8-fachen Volumens (10,5 ml) Isopropanol gefällt und anschließend bei 15.000 x g, 4° C für 30 min zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 70-%igem Ethanol gewaschen, erneut für 10 min abzentrifugiert und vakuumgetrocknet. Nach der Resuspension des Pellets in 500 µl H₂O konnte nun die Nukleinsäurekonzentration und der Reinheitsgrad bestimmt werden.

4.3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration der DNA wurde in wäßriger Lösung spektroskopisch (Spektrometer: Spekol UV VIS, Carl Zeiss Jena) durch die Extinktion bei 260 nm in zwei Verdünnungen mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{VF} = \frac{\text{mg/ml}}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

OD = Optical Density; VF = Verdünnungsfaktor (51 und 101)

Der Grad der Reinheit wurde bestimmt, indem der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ($\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$) genommen wurde. Wenn er zwischen 1,8-2,0 lag, konnte von einem hohen Reinheitsgrad der DNA ausgegangen werden.

4.3.5 Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA

Bei einer Restriktionsanalyse wird die Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch geschnitten. Alle zur Restriktionsanalyse verwandten Produkte stammten von New England Biolaborities (NEB). Zu Beginn wurde ein Reaktionsvolumen von 20 μl angesetzt. Dieser Reaktionsansatz bestand aus 0,5-1 μg der zu analysierenden Plasmid-DNA, jeweils 1 μl der benötigten Restriktionsenzyme, entsprechend der Enzyme einzusetzende 10-fach konzentrierte Puffer und bei manchen Enzymen zusätzlich BSA. Die Differenz bis zum Gesamtvolumen von 20 μl wurde mit H_2O aufgefüllt. Die mit den Restriktionsenzymen kommerziell erhältlichen Enzympuffer bestehen in der Regel aus Tris als Puffersubstanz sowie MgCl_2 und DTT als Oxidationsschutz für das Enzym. Der wesentliche Unterschied zwischen den verschiedenen Puffern liegt in ihrem Salzgehalt, da bei den einzelnen Restriktionsenzymen das Wirkoptimum von unterschiedlichen Salzkonzentrationen abhängt. So existieren Puffer, die kein NaCl enthalten, sowie „medium-salt“-Puffer (=50 mM NaCl) und „high-salt“-Puffer (=100 mM NaCl). Der Restriktionsansatz wurde dann 1 Stunde bei 37° C inkubiert (falls vom Hersteller für das spezielle Enzym nicht anders empfohlen). Während dieser Zeit zerschnitten die Endonukleasen die Plasmid-DNA sequenzspezifisch, so daß definierte Fragmente entstanden. Die enzymatische Reaktion wurde nach 1 Stunde durch den Zusatz von 6 x DNA-Probenpuffer (final: 10 mM EDTA; 10 % Glycin; 0,1 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau) abgestoppt.

4.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld erfolgte nach einer Methode von Aaji und Borst (1972). Dabei wandern größere DNA-Moleküle im

Agarosegel aufgrund ihrer höheren Reibungskräfte langsamer durch die Gelporen als kleinere Fragmente. Dies bewirkt eine Auftrennung der DNA-Bruchstücke nach ihrer Größe. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente (zwischen 100-4000 Basenpaaren [bp]) wurden 0,8-1,5-%ige Agarosegele gegossen. Meistens betrug das Volumen des Gels 50 ml. Es wurden also 50 ml TBE-Puffer mit der gewünschten Menge Agarose vermischt und aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden 10 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und die Mischung in eine vorbereitete Kammer gegossen. Der Probenkamm wurde eingesetzt. Nach vollständigem Erstarren wurde das Gel mit 100 ml TBE-Puffer überschichtet, der Probenkamm gezogen und 20 µl der mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzten Verdauungen in die Geltaschen geladen. Die Proben liefen dann bei 80 V aus den Taschen in das Gel ein und wurden bei 120-150 V aufgetrennt. Die Auftrennung bzw. die Größe der entstandenen Fragmente wurde schließlich unter UV-Licht (302 nm) kontrolliert und zur Dokumentation photographiert.

4.4 Funktionelle Studien

4.4.1 Messung der Mitogen-Aktivierten-Protein-Kinase (MAPK)-Aktivität

Die MAPK-Aktivität wurde mittels verschiedener Methoden direkt nachgewiesen:

Nachweis der Aktivierung endogen exprimierter MAPKs in α T3-1-Zellen durch phosphospezifische ERK-Antikörper:

Da die MAP-Kinasen durch eine Phosphorylierung an Tyrosin- und Threonin-Resten in ihren aktivierten Zustand übergehen, kann der Grad ihrer Aktivierung als Antwort auf eine Behandlung mit bestimmten Stimulatoren bzw. Inhibitoren mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern gemessen werden, die nur gegen die phosphorylierte Form der MAPK gerichtet sind.

Zur Untersuchung bestimmter Signalwege zur MAPK wurden α T3-1-Zellen für 6 Stunden in serumfreien Medium gehungert und anschließend mit entsprechenden Aktivatoren und Inhibitoren der Signalkomponenten behandelt. Aus den verschiedenen Proben wurden einfache Proteinlysate gewonnen und die Proteine mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran durch Westernblotting wurde diese über Nacht mit einem Antikörper inkubiert, der gegen die phosphorylierte/aktivierte Form der ERK-MAPKs

(ERK1/2) gerichtet war. Im Anschluß wurde die Blotmembran mit einem zweiten Antikörper inkubiert, der zum einen gegen die Spezies der ersten gerichtet war und zum anderen Peroxidase gekoppelt. Durch eine enzymatische Chemilumineszenz-Reaktion wurden die Signale dann auf einem Röntgenfilm visualisiert.

Kotransfektions-Assays mit HA-Epitop-markierter ERK:

Der Zweck der Kotransfektions-Experimenten in COS-7-Zellen war es, den Einfluß transfizierter DNA-Konstrukte auf die Aktivierung von gleichfalls transfizierten Hämagglutinin-Epitop-markierten („getaggten“) ERK2 (HA-ERK2) zu untersuchen. Das HA-ERK2-Konstrukt wurde dabei in 1:3-1:5-fach geringerer Konzentration als das kotransfizierte DNA-Konstrukt zur Transfektion eingesetzt. So sollte statistisch sichergestellt werden, daß in jede erfolgreich mit HA-ERK2 transfizierten Zelle auch das kotransfizierte Konstrukt aufgenommen worden war. Nach Stimulation und Lyse der Zellen wurde die HA-ERK2 mit einem Anti-HA-Antikörper (clone 12CA5, Roche) immunopräzipitiert. Der Aktivitätszustand des Konstrukts konnte nun mittels phosphospezifischer MAPK-Antikörper oder in einem *in vitro*-Kinase-Assay bestimmt werden.

***In vitro*-Kinase Assay mit MBP (myelin basic protein) als Substrat:**

Mit diesem Assay konnte die Aktivität der ERK-MAPK_n direkt gemessen werden, da das MBP als Substrat der aktivierten MAPK_n unter Verbrauch von radioaktiv markiertem ATP phosphoryliert wird. Die endogenen ERK-Isoformen bzw. HA-ERK2 wurden aus totalen Zellysaten mit einem Anti-ERK2-Antikörper (C-14, Hase, polyklonal, Santa Cruz) oder einem Anti-HA-Antikörper (s. o.) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden von der zugesetzten Protein A-Sepharose gebunden. Die Sepharose-Präzipitate wurden daraufhin 3 x mit dem 0,1 % Triton-Lysispuffer und 2 x mit einem Kinase-Puffer (40 mM HEPES, pH 7,5; 5 mM Magnesiumacetat; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 200 µM Na₃VO₄) gewaschen. Die Immunkomplexe wurden trockengelegt und in 80 µl Kinasepuffer pro Probe resuspendiert. Um ausschließen zu können, daß eine Aktivierung der MAPK_n auf eine über die PKA verlaufende Signalkaskade zurückgehen könnte, wurden jeder Probe 2 µM eines PKA-Inhibitors (fragment 6-22 amide, Sigma) zugesetzt. Danach wurde jede Probe geteilt, so daß Duplikate entstanden. In jedes Reaktionsgefäß wurden dann 250 µg/ml des ERK-Substrates MBP pipettiert. Die Kinase-Reaktion wurde gestartet, indem jeder Probe 5 µl

einer 500 μM ATP-Lösung zugesetzt wurden, die 2 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ enthielt. Die Proben wurden anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion nach Ablauf der Zeit durch den Zusatz von 5 μl einer 88 %-igen Ameisensäure gestoppt. Die Reaktionsmischung wurde nun auf ca. 3 x 3 cm^2 große Quadrate aus Whatman P81 Chromatographie-Papier aufgebracht. Bei dem P81-Papier handelt es sich um eine Ionen-Austauscher-Matrix, die bei den meisten pH-Werten negativ geladen ist. Das Protein, das als Substrat für die Kinase genutzt wird, wird an das P81-Papier adsorbiert. Dabei ist die Adsorption basischer Proteine erfolgreicher als die von sauren Proteinen. Freies $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurde durch viermaliges Waschen der Papierquadrate in einer Wanne mit 150 mM Phosphorsäure entfernt. Die in das MBP inkorporierte Radioaktivität, die als Maß für die Aktivierung der ERK-MAPKs diente, wurde in einem Szintillationszähler gemessen.

4.4.2 Immunpräzipitation einzelner Signalkomponenten

Immunpräzipitation des EGFR:

Für die direkte Immunpräzipitation des EGFR wurde der $\alpha\text{-EGF-Fc.108.1}$ -Antikörper, Maus, monoklonal (A.Ullrich) verwendet. Die Immunkomplexe wurden mit Protein A-Sepharose präzipitiert. Um ausschließlich die phosphorylierte Form des EGFR in der Immundetektion zu erfassen, wurden die nach dem SDS-PAGE und Western-Blotting-Verfahren auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper inkubiert und auf diese Weise auf dem Röntgenfilm nur die phosphorylierten EGF-Rezeptoren visualisiert.

Um zu erfahren, ob diese Tyrosinphosphorylierung auch eine funktionelle Aktivierung des EGFR zur Folge hatte, wurde die Tyrosinphosphorylierung des Adapterproteins SHC untersucht. SHC wird durch den aktivierten EGFR phosphoryliert und bildet danach über seine SH2-Domäne einen engen Komplex mit dem EGFR. So wurde bei der Immunpräzipitation des SHC-Proteins der EGFR ko-immunpräzipitiert. Die anschließende Inkubation mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper ermöglichte auch hier eine Immundetektion der phosphorylierten/aktivierten Formen von SHC und des EGFR.

Immunpräzipitation der Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun:

Die Regulation der Transkription der *c-fos*- und *c-jun*-Gene wird durch die MAPKs ERK und JNK kontrolliert. Die Transkription beider Gene wird innerhalb von wenigen

Minuten nach der Stimulation der Zellen induziert. Die Experimente wurden in dem vergleichsweise physiologischen Zellmodell der α T3-1-Zellen vorgenommen. So diente die Immunpräzipitation der Genprodukte c-Fos und c-Jun dem Nachweis, daß die phosphorylierten ERK-MAPKs auch funktionell aktiviert wurden.

Nach der Behandlung der Zellen mit Stimulatoren und Inhibitoren wurden aus den Proben einfache Proteinlysate hergestellt. Diese wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Blotting-Membranen transferiert. Die Membranen wurden im Folgenden mit Antikörpern gegen die Transkriptionfaktoren c-Fos oder c-Jun (c-Fos: k-25, Ziege, polyklonal, Santa Cruz; Anti-Jun: Maus, Transduction Lab) und nachfolgend mit entsprechenden Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörpern inkubiert. Durch das Chemilumineszenz-Nachweisverfahren wurden die immundetektierten Proteinsignale dann auf Röntgenfilm visualisiert.

4.4.3 Messung der Ras-Aktivierung

Die Ras-Aktivierung wurde mit einer Methode gemessen, bei der das Fusionsprotein Glutathion-S-Transferase (GST) an die Ras-bindende Domäne (RBD) von Raf1 gekoppelt war (Rooij und Bos, 1997). Diese RBD bindet das kleine, membrangebundene G-Protein Ras nur in der GTP-gebundenen, aktivierten Form.

4.4.3.1 GST-RBD Expression in *E.coli*-DH5 α

Nach der Transformation eines kompetenten *E.coli*-Stammes DH5 α mit dem pGEX-2T/GST-RBD Konstrukt (A. Wittinghofer) wurden 100 ml LB-Medium mit einer transformierte Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37° C und 220 rpm im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde diese Bakterienkultur 1:10 mit LB-Medium verdünnt und weiter inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 0,6-1 erreicht wurde. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch den Zusatz von 0,1 mM IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid, Sigma) induziert, in dem die Bakterienzellen für weitere 2 Stunden bei 37° C und 220 rpm inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 7700 x g, 4° C) pelletiert. Das Pellet wurde in eiskaltem PBS resuspendiert. Dieser PBS-Puffer enthielt zusätzlich 1,2 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,1 μ M Aprotinin und 1 μ M Leupeptin. Die Zellen wurden nun dreimal für 1 min auf Eis sonifiziert und dem Lysat anschließend Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Das Lysat wurde dann unter vorsichtigem Rühren für 30 min bei 4° C inkubiert und danach für 10 min (12000 x g, 4° C)

abzentrifugiert. Dem Überstand wurde Glycerol bis zu einer finalen Konzentration von 10 % zugesetzt. Nun wurde das GST-RBD-Lysat aliquotiert und bei -80° C höchstens für 4 Wochen gelagert, da nach diesem Zeitraum die Bindungseffizienz stark nachläßt.

4.4.3.2 Ras-Assay

Im Anschluß an die Stimulation der Zellen in 100 mm Zellkulturschalen wurden sie mit eiskaltem PBS gewaschen und nach der Zugabe von 600 µl eiskaltem Ras-RIPA-Puffer (s.u.) für 15 min lysiert. Die Zellysate wurden dann für 15 min (4° C, 14000rpm) zentrifugiert. Dem Überstand wurden zunächst 50 µl Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) und danach 150 µl des GST-RBD zugesetzt. Die Proben wurden für 30 min bei 4° C inkubiert. Die Sepharose-Kügelchen wurden 3 x mit 300 µl Ras-RIPA-Puffer gewaschen, mit einer Haemilton-Nadel trockengelegt und die Proteine in 2 x Proteinproben-Puffer für 10 min bei 95° C denaturiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE in 12,5 oder 15%igen Acrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen tranferiert. Das gebundene Ras konnte dann im Immunoblot mit einem monoklonalen Anti-Pan-Ras-Antikörper (Oncogene) nachgewiesen werden. Als Sekundär-Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper verwendet. Die Visualisierung erfolgte wie oben beschrieben.

Ras-RIPA-Puffer	
50 mM Tris/HCl, pH 8,0	0,1 % SDS
150 mM NaCl	0,1 µM Aprotinin
0,5 mM MgCl ₂	1 µM Leupeptin
0,5 % Natrium-Desoxycholat	1 mM PMSF
1 % Nonidet P-40	

5 Ergebnisse

5.1 Zeitabhängigkeit der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in α T3-1-Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß sowohl Pertussistoxin-sensitive als auch Pertussistoxin-insensitive heterotrimere G-Proteine eine ERK-Aktivierung vermitteln können. Ziel dieser Arbeit war es, den der $G_{q/11}$ -vermittelten ERK-Aktivierung zugrunde liegenden Signalweg zu ermitteln. Aufgrund seiner besonderen strukturellen Eigenschaften (siehe 1.2.5.) war der heptahelikale GnRH-Rezeptor Objekt der Untersuchungen. Die Studien wurden in α T3-1-Zellen, einer Hypophysentumorzelllinie der Maus, die den GnRH-Rezeptor endogen exprimiert, und in transfizierten COS-7-Zellen vorgenommen.

Grundlage weiterer Untersuchungen bildete die Zeitkinetik der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in α T3-1-Zellen. Die Analyse der ERK-Aktivierung erfolgte sowohl im *in vitro*-Kinase-Assay als auch im Westernblot unter Verwendung Phospho-ERK-spezifischer Antikörper (siehe 4.4.1.). In beiden Fällen wurden die Zellen für unterschiedlich lange Zeitintervalle mit dem Agonisten GnRH inkubiert und die resultierende ERK-Aktivierung mit Hilfe der jeweiligen Untersuchungstechnik gemessen. Im *in vitro*-Kinase-Assay zeigte sich eine schnelle GnRH-abhängige ERK-Aktivierung, die bereits 1 Minute nach Agonistenzusatz detektierbar war und ihr Maximum, einen mehr als zweifachen Anstieg der ERK-Aktivität, nach einer 5-10minütigen Agonistenstimulation erreichte (Abb. 7 A). Die ERK-Aktivität blieb bei einer GnRH-Vorbehandlung bis zu 30 min erhöht und kehrte nach einer GnRH-Stimulation von 1 Stunde zu Basalwerten zurück. Auch bei der Immundetektion der aktivierten ERK-Isoformen durch einen phosphospezifischen Anti-ERK1/2-Antikörper konnte eine frühe ERK-Aktivierung nach einer Inkubation der Zellen mit GnRH für 5 min nachgewiesen werden, die maximale ERK-Aktivierung wurde nach 30minütiger Agonisten-Inkubation erreicht, und nach einer GnRH-Behandlung von einer Stunde zeigte sich eine erhebliche Reduktion der ERK-Aktivierung (Abb. 7 B). Da in beiden Versuchsansätzen zwei verschiedene intrazelluläre Vorgänge betrachtet werden, ergeben sich gewisse Unterschiede hinsichtlich der Kinetik, die sich mit den Ergebnissen anderer Publikationen decken.

Es existierten zahlreiche Hinweise darauf, daß die durch GPGR-vermittelte Aktivierung der ERK-MAPKs über eine Regulation der Tyrosinkinase-Aktivität erfolgt. Obwohl die Identität und Funktion der beteiligten Tyrosinkinasen teilweise noch ungeklärt war und eine erhebliche Abhängigkeit vom untersuchten Zellsystem konstatiert werden mußte, schienen RTKs bei diesem Prozeß von großer Bedeutung zu sein (Zwick *et al.*, 1999; Luttrell *et al.*, 1999a). Es wurde vermutet, daß die ligandenunabhängige Aktivierung (Transaktivierung) des EGFR ein generelles Phänomen zahlreicher G_i- und G_{q/11}-gekoppelter Rezeptoren in verschiedenen Zellsystemen darstellt. Daraus leitete sich die Frage ab, ob die EGFR-Tyrosinkinase auch an der schnellen GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in gonadotropen Zellen beteiligt sei. Um dies zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen Experimente wiederholt und um eine 20minütige Vorinkubation der Zellen mit einem EGFR-spezifischen Inhibitor, dem Tyrphostin AG1478 (Levitzki und Gazit, 1995), erweitert (Abb. 7 A und B). Eine Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität durch 100 nM des Tyrphostins AG1478 konnte die GnRH-induzierte ERK-Aktivierung zwar nicht vollständig unterdrücken, bewirkte aber eine signifikante Verminderung sowie eine veränderte Kinetik der agonistenabhängigen ERK-Aktivierung, so daß im *in vitro*-Kinase-Assay die maximale ERK-Aktivierung erst nach 10 min erreicht wurde. Diese Ergebnisse indizierten, daß die Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase in gonadotropen α T3-1-Zellen primär für die frühe GnRH-induzierte ERK-Aktivierung von Bedeutung ist.

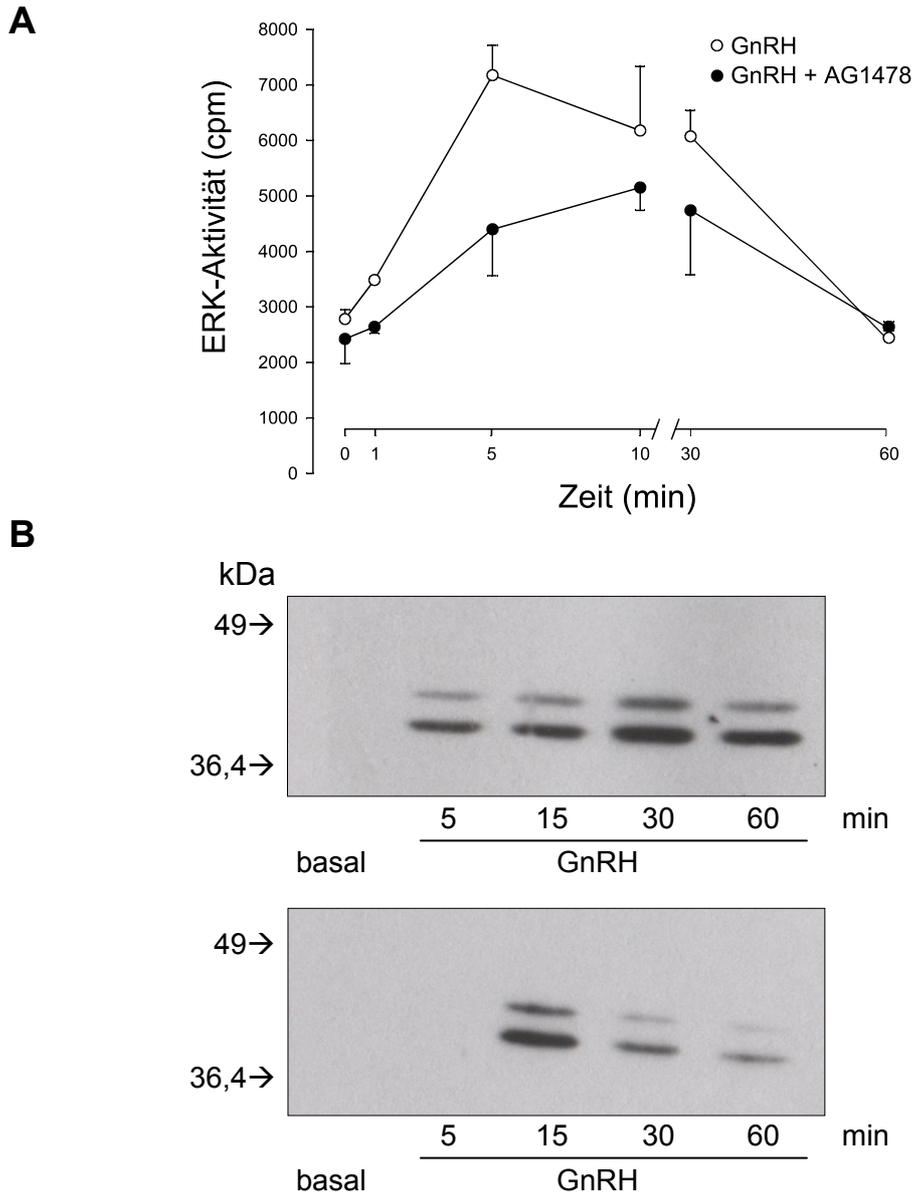


Abb. 7: Effekt des EGFR-Kinase-spezifischen Inhibitors AG1478 auf die Kinetik der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in aT3-1-Zellen. Semikonfluente Zellen in 100 mm-Zellkulturschalen wurden für 8 Stunden in serumfreien Medium inkubiert.

A: Nach 20 min Vorinkubation der Zellen mit 100 nM des Tyrphostins AG1478 wurden die Zellen für die angegebenen Zeitintervalle mit 200 nM GnRH stimuliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt. Die Immunpräzipitation erfolgte durch den Anti-ERK-Antikörper aus totalen Zellysaten. Die Aktivität der präzipitierten endogenen ERK gegenüber seinem Substrat MBP wurde in einem *in vitro*-Kinase-Assay bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils mit Duplikaten durchgeführt wurden.

B: Die Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 1 μ M GnRH stimuliert. Bei der unteren Abb. erfolgte vor der GnRH-Stimulation eine 20minütige Inkubation mit 100 nM AG1478. Der Basalwert wurde durch eine 60minütige Inkubation mit serumfreien Medium ermittelt. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Westernblotting-Verfahren wurden die Nitrozellulose-Membranen über Nacht bei 4 ° C mit einem Anti-Phospho-p44/42-MAPK-Antikörper inkubiert. Die phosphorylierten MAPKs wurden durch einen weiteren Antikörper detektiert, der gegen die Spezies des ersten gerichtet und POD-gekoppelt war. Die Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind auf der linken Seite der Abb. angegeben.

5.2 Mechanismus der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in α T3-1-Zellen

Um weitere Signalkomponenten zu identifizieren, die an der Übermittlung des mitogenen Signals vom GnRH-Rezeptor zu den MAPK α ERK1/2 beteiligt waren, wurden pharmakologische Experimente mit verschiedenen Inhibitoren bzw. Stimulatoren unternommen. Zu diesem Zweck wurden α T3-1-Zellen 20 min vor der fünfminütigen GnRH-Stimulation mit einem der Inhibitoren vorinkubiert. Zellkulturmedium mit Zusatz von 0,1 % DMSO diente als Positivkontrolle, serumfreies Medium als Negativkontrolle. Der Grad der ERK-Aktivierung wurde im *in vitro*-Kinase-Assay ausgelesen.

Die Threonin/Tyrosinkinase MEK1/2 sind innerhalb der MAPK-Signalkaskade weit distal gelegene Komponenten, die die ERK-MAPK α direkt phosphorylieren. Eine Vorbehandlung der Zellen mit 5 μ M des MEK-Inhibitors PD98059 führte daher erwartungsgemäß zu einem Abbrechen der Signaltransmission vom GnRH-Rezeptor zu den ERK-MAPK α (Abb. 8).

Weiterhin hatten bereits frühere Untersuchungen ergeben, daß die Behandlung von α T3-1-Zellen mit Phorboläster (TPA), einem potenten Aktivator der PKC, zu einer massiven Aktivierung von ERK führte (Sundaresan *et al.*, 1996; Reiss *et al.*, 1997). Phorboläster sind Tumor-Promotoren, die die PKC *in vitro* aktivieren. Sie stellen ein weitverbreitetes pharmakologisches Werkzeug zur funktionellen Untersuchung der zellulären PKC dar. Phorboläster besitzen exzellente Bindungseigenschaften und konkurrieren mit DAG um dieselbe Bindungsstelle an der PKC. Da die DAG-abhängige Aktivierung der PKC ein wichtiges Effektorsystem G $_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren darstellt, lag die Vermutung nahe, daß die PKC an der Transmission des mitogenen Signals vom GnRH-Rezeptor zu den MAPK α beteiligt sei. Die signifikante Inhibition der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung durch eine Vorinkubation der Zellen mit 5 μ M des selektiven PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid I (GF109203X) bestätigten diese Annahme (Abb. 8).

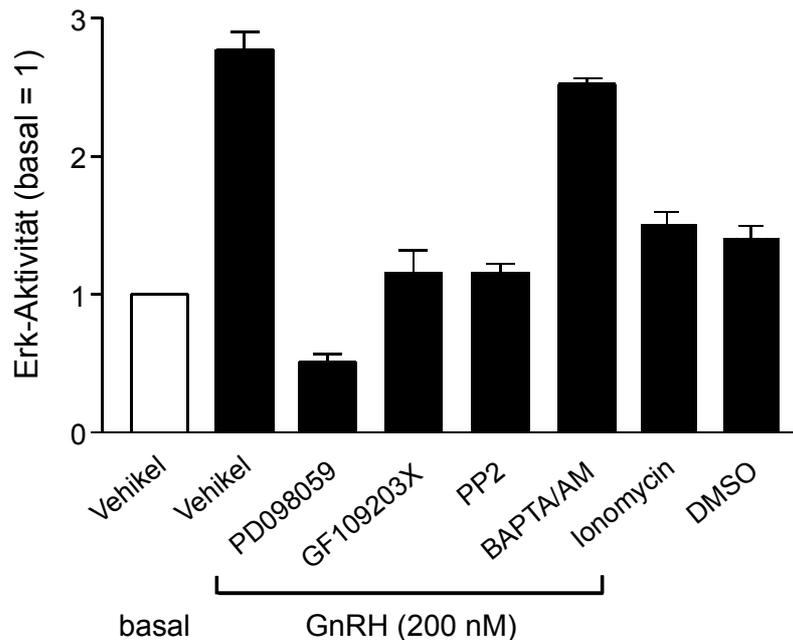


Abb. 8: Charakteristika der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in α T3-1-Zellen.

Subkonfluente Zellen wurden nach einer 8stündigen Inkubation mit serumfreiem Medium für 5 min entweder mit Medium (Vehikel), 200 nM GnRH, 1 μ M Ionomycin oder 0,1 % DMSO-haltigem Medium behandelt. Vor der GnRH-Stimulation erfolgte eine 20minütige Vorinkubation der Zellen mit verschiedenen Inhibitoren: PD098059 (5 μ M), GF109203 (1 μ M), PP2 (1 μ M) oder BAPTA/AM (1 μ M). Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde die endogene ERK mit Hilfe eines Anti-ERK-Antikörpers aus den einfachen Zellysaten immunpräzipitiert und die Kinaseaktivität der ERK-Isoformen in einem *in vitro*-Kinase-Assay gemessen (s. Methoden). Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils mit Duplikaten durchgeführt wurden.

Das zweite Produkt der $G\alpha_{q/11}$ -aktivierten PLC- β neben DAG ist das Signalmolekül IP_3 , das einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vermittelt. In PC12-Zellen, einer Phäochromozytom-Zelllinie, verlief eine GPGR-induzierte ERK-Aktivierung ebenfalls über die Aktivierung der PKC und der EGFR-Tyrosinkinase. Darüber hinaus bewirkte in diesen neuroendokrinen Zellen auch ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Stimulation der ERK-Aktivität (Soltoff, 1998). Um den Einfluß des Kalziums auf die GnRH-induzierte ERK-Aktivierung in gonadotropen α T3-1-Zellen beurteilen zu können, wurden die Zellen vor der GnRH-Stimulation mit 1 μ M des Kalzium-Ionophor Ionomycin vorbehandelt. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle hatte die globale $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung nur einen marginalen stimulatorischen Effekt auf die ERK-Aktivität (Abb. 8). Im übrigen war die Zunahme der ERK-Aktivität durch Ionomycin dem durch DMSO-haltiges Medium erreichten stimulatorischen Effekt nahezu gleich und somit als eher unspezifisch zu werten. Anschließend wurde in der Gegenprobe untersucht, ob eine Verminderung des zytosolischen Kalziums einen

negativen Einfluß auf die GnRH-vermittelte ERK-Aktivierung besitze. Dazu wurden α T3-1-Zellen mit dem Plasmamembran-permittierenden Chelatbildner BAPTA/AM (1 μ M) vorbehandelt, der durch Komplexbildung mit intrazellulären Ca^{2+} -Ionen einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg unterbindet. Wie in Abb. 7 dargestellt, hatte eine verminderte zytosolische Kalziumkonzentration keinen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die GnRH-induzierte ERK-Stimulation. Diese Ergebnisse führten zu der Aussage, daß die zytosolische Kalziumkonzentration keinerlei Einfluß auf die schnelle GnRH-induzierte ERK-Aktivierung in gonadotropen α T3-1-Zellen hat.

Der in Abb. 8 dargestellte, ausgeprägte Effekt des spezifischen Src-Inhibitors PP2 (1 μ M) legte eine Beteiligung der Src-Tyrosinkinase an der Transmission des GnRH-Signals zu den ERK-MAPKn nahe. Die ubiquitär exprimierten Src-Tyrosinkinasen gehören zur Gruppe der zytosolischen Tyrosinkinasen. Sie können sowohl durch RTKn als auch durch GPGRn aktiviert werden. Dabei ist die Interaktion zwischen dem EGFR und c-Src bidirektional, d.h. nicht nur der Rezeptor phosphoryliert und aktiviert die zytoplasmatische Tyrosinkinase, sondern auch umgekehrt. Es existieren starke Hinweise auf eine Beteiligung der Src-Familie bei mitogenen Signaltransduktion über G_i -gekoppelte Rezeptoren. Für COS-7-Zellen wurde ein Modell postuliert, nach dem c-Src nach einer β -Arrestin-vermittelten Rekrutierung an die Plasmamembran das Adapterprotein Shc phosphoryliert und so einen Eintrittspunkt in die Ras/ERK-Signalkaskade schafft (Luttrell *et al.*, 1999; Abb. 6). Da der GnRH-Rezeptor aufgrund seiner Strukturbesonderheiten über keine Bindungsstelle für β -Arrestin verfügt, war dieses Modell auf α T3-1-Zellen nicht übertragbar.

5.3 Mechanismus der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung in transient transfizierten COS-7-Zellen

Ein weitergehendes Studium des GnRH-Rezeptor/ERK-Signalweges erforderte die effektive Manipulation einzelner Signalkomponenten. Aufgrund der höheren Transfektionseffizienz wurden die folgenden Experimente in COS-7-Zellen vorgenommen. Die Zellen exprimierten nach der Transfektion vorübergehend den humanen GnRH-Rezeptor (hGnRHR), die Hämagglutinin-Epitop-markierte ERK2-Isoform, HA-ERK2 (Coso *et al.*, 1995), sowie eine im einzelnen angegebene dominant negative Mutante des zu betrachtenden Signalproteins (siehe 4.1.5.). Nach der GnRH-Stimulation der COS-7-Zellen wurde HA-ERK2 mit einem anti-HA-Antikörper

immunpräzipitiert und die Aktivität der Kinase im *in vitro*-Kinase Assay gemessen. Die G_i -Proteinen entstammenden mitogenen Signale werden über $G_i\beta\gamma$ -Dimere unter Beteiligung der Src-Tyrosinkinase vermittelt (Luttrell *et al.*, 1996). Um eine potentielle Beteiligung der freien $G\beta\gamma$ -Untereinheiten aus GnRH-aktivierten $G_{q/11}$ -Proteinen an der ERK-Aktivierung beurteilen zu können, wurden die Zellen außer mit der hGnRHR- und HA-ERK2-cDNA zusätzlich mit einem CD8- β ARK-Konstrukt (Crespo *et al.*, 1995) transfiziert. Dieses Minigenkonstrukt ist eine Chimäre aus der C-terminale $G\beta\gamma$ -Bindungsdomäne der β -adrenergen Rezeptorkinase (β ARK) und der extrazellulären und transmembranären Domäne des lymphozytenspezifischen CD8-Rezeptors. Die CD8-Komponente des Konstruktes dient der Membranverankerung, das β ARK-ct-Protein bindet freigesetzte $G\beta\gamma$ -Dimere und entfernt sie so aus der Signaltransduktionskaskade (Koch *et al.*, 1994). Zur Kontrolle unspezifischer Effekte wurden die Zellen entweder mit dem CD8- β ARK-Konstrukt oder lediglich mit der CD8-cDNA transfiziert.

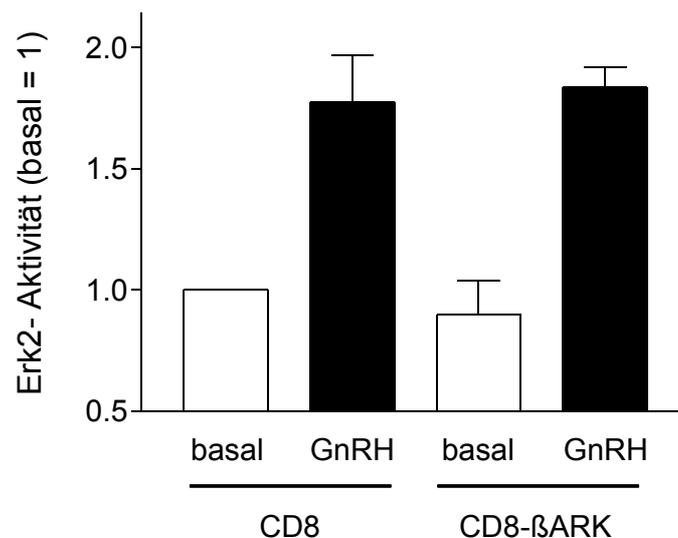


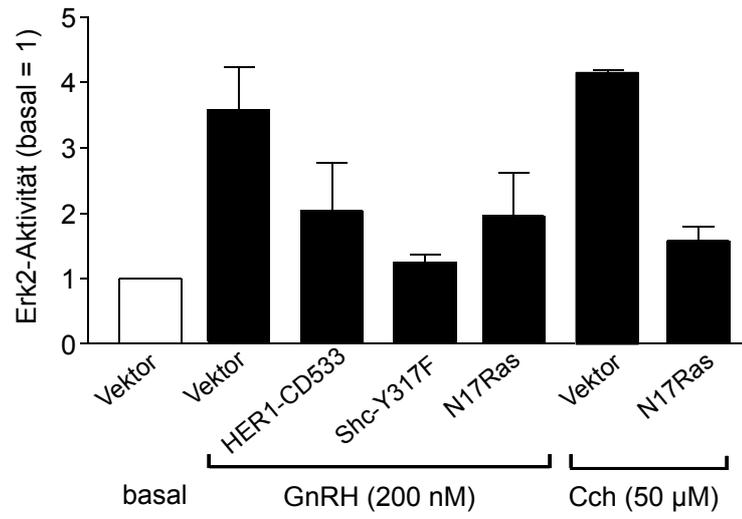
Abb. 9: Effekt der transienten Expression des $G\beta\gamma$ -Untereinheiten-bindenden β ARK-Minigenkonstruktes auf die $G_{q/11}$ - und G_i -vermittelte HA-ERK2-Aktivität in COS-7-Zellen.

COS-7-Zellen wurden transient mit jeweils 5 μ g cDNA einer Hämagglutinin-Epitop-markierten-ERK2 (HA-ERK2) und des menschlichen GnRH-Rezeptors sowie mit 10 μ g der Plasmid-DNA für CD8 oder dem CD8- β ARK-Minigenkonstrukt kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert. Nach der 18stündiger Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium erfolgte für 5 min eine Stimulation der COS-7-Zellen mit 1 μ M GnRH oder Medium als Kontrolle (basal). Die Kinaseaktivität von HA-ERK2 gegenüber dem Substrat MBP wurde durch einen *in vitro*-Kinase-Assay bestimmt (s. Methoden). Die Daten stellen die Mittelwerte \pm S.D. aus drei unabhängigen Experimenten dar, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

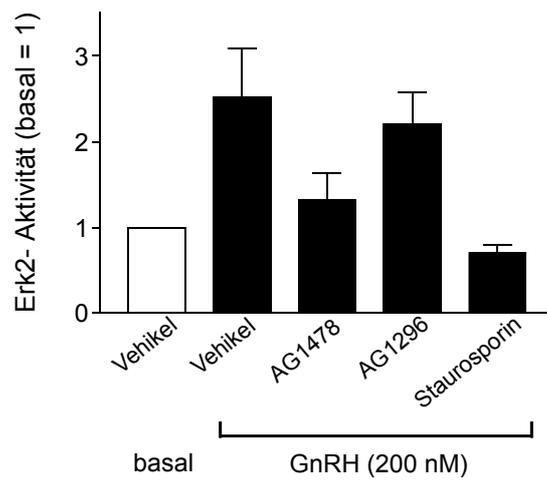
Wie in Abb. 9 dargestellt zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle, die das CD8-Peptid exprimierte, keine Veränderung der basalen oder GnRH-stimulierten ERK2-Aktivität durch die Expression des β ARK-Proteins. Ein detektierbarer Einfluß der $G_q\beta\gamma$ -Dimere auf die GnRH-induzierte ERK2-Aktivierung in COS-7-Zellen konnte somit ausgeschlossen werden. Die Signalisierung des GnRH-Rezeptors zu den ERK-MAPKn wird demnach ausschließlich über $G\alpha_{q/11}$ -Untereinheiten vermittelt.

In weiteren Experimenten dieser Reihe wurde in COS-7-Zellen eine trunkierte, kinasedefiziente EGFR-Mutante, HER1-CD533 (Kashles *et al.*, 1991; Redemann *et al.*, 1992), überexprimiert, was eine signifikante Suppression der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung zur Folge hatte (Abb. 10 A). Ein zusätzlicher Beleg für eine GnRH-vermittelte funktionelle Aktivierung des EGFR in COS-7-Zellen war die Suppression der GnRH-abhängigen ERK-Aktivierung durch den EGFR-Kinase-spezifischen Inhibitor AG1478 (Abb. 10 B). Die inhibitorische Wirkung war der in α T3-1-Zellen gemessenen vergleichbar. Andere Tyrosinkinase-Inhibitoren wie z.B. der PDGFR-Kinase-spezifische Inhibitor AG1296 (Kovalenko *et al.*, 1994) zeigten hingegen keine Hemmeffekte (Abb. 10 B). Eine andere Möglichkeit, die funktionelle Bedeutung der EGFR-Aktivierung für die GnRH-vermittelte MAPK-Stimulation zu überprüfen, bestand in der Untersuchung des EGFR-Substrates Shc. Die Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc und seine anschließende Assoziation mit dem Grb2/Sos-Komplex sind essentielle Schritte bei der Ras-abhängigen Aktivierung der MAPKn durch RTKn (Heldin, 1996). Der dominant negativen Shc-Mutante, Shc-Y317F, fehlt eine Phosphorylierungsstelle zur Interaktion mit der SH2-Domäne von Grb2, so daß die Bildung des Signalkomplexes aus Shc, Grb2 und Sos am EGFR nicht möglich ist. Eine Überexpression des Shc-Y317F-Konstruktes (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997) in COS-7-Zellen verminderte die GnRH-induzierte ERK-Stimulation massiv (Abb. 10 A).

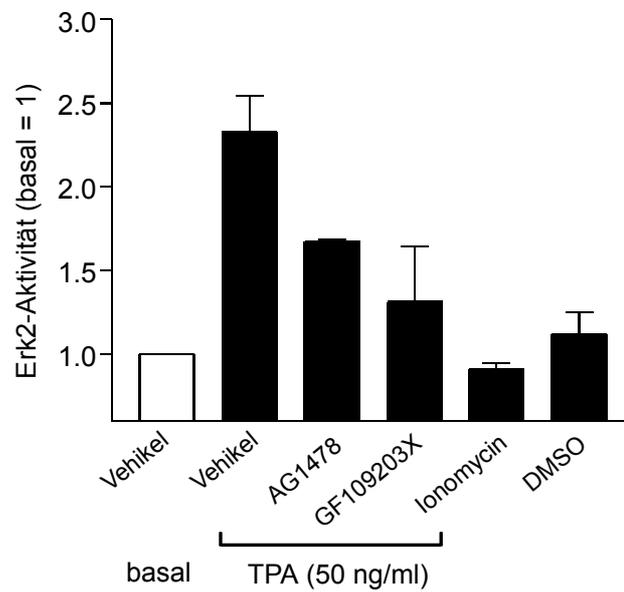
A



B



C



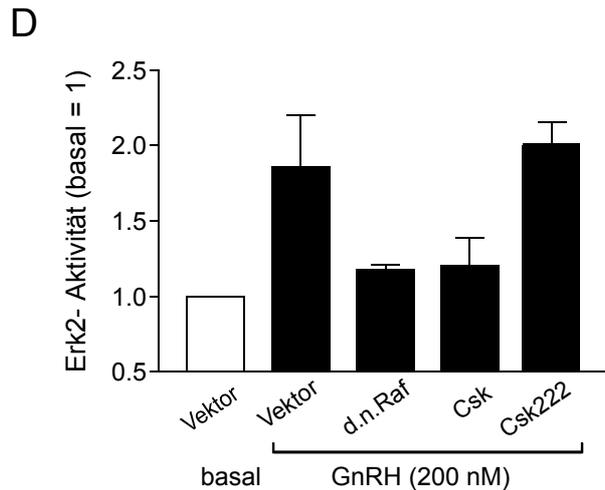


Abb. 10: HA-ERK2-Aktivierung nach GnRH-Stimulation in COS-7-Zellen.

(A+D) COS-7-Zellen wurden transient mit HA-ERK und dem menschlichen GnRH-Rezeptor (A+D) bzw. dem m3-Acetylcholinrezeptor (A) kotransfiziert. Zusätzlich wurden wie angegeben verschiedene andere Minigenkonstrukte transfiziert (s. Text). Danach wurden die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert. Nach einer 18stündigen Inkubation der subkonfluenten COS-7-Zellen in serumfreiem Medium erfolgte die 5minütige Stimulation mit 200 nM GnRH oder Zellkulturmedium (basal).

(B+C) Für die Kotransfektion der COS-7-Zellen wurde die cDNA eines HA-ERK2-Konstruktes und des menschlichen GnRH-Rezeptor verwandt. Im Anschluß an die Transfektion wurden die Zellen weitere 48 Stunden kultiviert und danach für 18 Stunden in serumfreiem Medium „gehungert“. Die COS-7-Zellen wurden für 5 min entweder mit Medium (basal), 200 nM GnRH oder 50 ng/ml TPA stimuliert. Die Behandlung der Zellen mit 1 μ M Ionomycin bzw. 0,1 % Dimethylsulfoxid (DMSO) erfolgte ebenfalls für 5 min. Die Vorinkubation mit den verschiedenen verwandten Inhibitoren (s. Text) wurde 15 min vor der Zellstimulation bei 37° C durchgeführt. Das weitere Vorgehen war bei allen dargestellten Experimente dasselbe: Die Zellen wurden lysiert und die Zellysate über Nacht mit einem Anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die Aktivierung der HA-ERK2 wurde in einem *in vitro*-Kinase-Assay gemessen (s. Methoden). Die Daten stellen die Mittelwerte \pm S.D. aus drei unabhängigen Experimenten dar, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

Da die EGFR-Tyrosinkinase und das Adapterprotein Shc wichtige Signalkomponenten bei der RTK-abhängigen Aktivierung der Ras/MAPK-Signalkaskade sind, galt das Hauptinteresse nun der Frage, ob auch Ras an der Signaltransmission zwischen GnRH-Rezeptor und den ERK-MAPK beteiligt sei. Hinsichtlich der Ras-Abhängigkeit der Signaltransduktion zu den ERK1/2 via $G_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren waren verschiedene Studien zu kontroversen Resultaten gelangt (Crespo *et al.*, 1994; Hawes *et al.*, 1995; Marais *et al.*, 1998). Um diesbezüglich weitere Einblicke zu gewinnen, wurde in COS-7-Zellen eine dominant negative Ras-Mutante, N17-Ras (Crespo *et al.*, 1994), exprimiert. Diese Mutante stabilisiert die GDP-Konformation von Ras und behindert die endogene Ras-Funktion durch die Bindung Ras-spezifischer Austauschfaktoren. Wie in Abb. 10 A dargestellt, bewirkte die

transiente Expression von N17-Ras eine massive Suppression der $G_{q/11}$ -induzierten ERK-Aktivierung in COS-7-Zellen.

Es galt nun zu prüfen, ob die Ras-Abhängigkeit der GnRH-induzierten Signaltransmission zu den MAPKs ein Spezifikum des GnRH-Rezeptors darstellte oder ob dieser Befund auch auf andere $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren übertragbar sei. Zu diesem Zweck wurden COS-7-Zellen, die den $G_{q/11}$ -gekoppelten muskarinischen m3-Acetylcholinrezeptor (Offermanns *et al.*, 1994) sowie das dominant negative Ras-Konstrukt transient exprimierten, mit dem Agonisten Carbachol stimuliert. Auch hier zeigte sich ein starker inhibitorischer Effekt auf die agonisteninduzierte ERK-Aktivierung (Abb. 10 A). Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, daß in COS-7-Zellen exprimierte $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren über einen Ras-abhängigen Signalweg mit den ERK-Isoformen in Verbindung stehen.

Die im vorhergehenden Kapitel dieser Arbeit dargestellten Beobachtungen in $\alpha T3-1$ -Zellen sprachen für eine Beteiligung der PKC an der Signaltransduktion zwischen dem GnRH-Rezeptor und den ERK-MAPKs. Die Funktion und Lokalisation der PKC sollte nun im COS-7-Zellmodell näher charakterisiert werden. Dazu wurden die Zellen 20 min vor der GnRH-Stimulation zunächst mit dem Serin/Threoninkinasen-Inhibitor Staurosporin behandelt, einem unspezifischen Inhibitor der PKC. Das Ergebnis war eine vollständige Suppression der GnRH-vermittelten ERK-Aktivierung (Abb. 10 B). Eine entsprechende Vorbehandlung der Zellen mit dem PKC-selektiven Inhibitor Bisindolylmaleimid (GF109203X) zeigte einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt auf die ERK-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die ausgeprägte inhibitorische Wirkung einer pharmakologischen PKC-Blockade auf die ERK-MAPKs indizierte eine zentrale Stellung der PKC innerhalb der GnRH-Rezeptor/ERK-Signaltransduktionskaskade. Die essentielle Bedeutung der PKC für die GnRH-induzierte ERK-Aktivierung wurde noch durch einen weiteren Befund belegt: eine direkte Aktivierung der PKC mittels des Phorbolesters TPA (50 ng/ml, 5 min) führte zu einer starken ERK-Stimulation, die der ERK-Aktivierung infolge einer fünfminütigen Stimulation mit 200 nM GnRH entsprach (Abb. 10 C).

Durch die fünfminütige TPA-Behandlung der COS-7-Zellen wurde darüber hinaus die PKC-Abhängigkeit weiterer Signalproteine deutlich (Abb. 10 C). Die deutliche Abnahme der phorbolesterinduzierten ERK-Aktivierung nach Inkubation der Zellen mit Bisindolylmaleimid schloß die Signaltransmission über andere phorbolesterbindende Proteine aus und unterstrich die Wichtigkeit der PKC innerhalb der GnRH-

Rezeptor/ERK-Signalkaskade. Besonders bemerkenswert war die 50%ige Inhibition der durch TPA hervorgerufenen ERK-Aktivierung durch eine Vorinkubation der Zellen mit dem spezifischen EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 (100 nM). Dies war ein Indiz dafür, daß der EGFR in der Signalkaskade distal der PKC lokalisiert sein mußte. Demnach wäre die PKC ein Bindeglied zwischen dem agonistenbesetzten GnRH-Rezeptor und der EGFR/Ras/MAPK-Signaltransduktionskaskade.

Da in einigen Publikationen postuliert wird, daß die GnRH-abhängige ERK-Aktivierung distal der PKC über eine oder mehrere nicht näher charakterisierte Ca^{2+} -aktivierte Signalkomponenten vermittelt wird (Reiss *et al.*, 1997; Mulvaney *et al.*, 1999), wurde der potentielle Einfluß des Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin auf die TPA-induzierte ERK-Aktivierung in COS-7-Zellen untersucht. In Übereinstimmung mit den in $\alpha\text{T3-1}$ -Zellen erhobenen Befunden konnte durch eine fünfminütige Behandlung der COS-7-Zellen mit 1 μM Ionomycin keine Anhebung der ERK-Aktivität über das Basalniveau erreicht werden.

Es stellte sich also weiterhin die Frage nach den distal der PKC gelegenen Signalkomponenten. Die transiente Expression des ΔRaf -Minigenkonstruktes, einer dominant negativen Raf1-Mutante, welcher potentielle regulatorische Phosphorylierungsstellen fehlen (Cai *et al.*, 1993), führte zu einer deutlichen Inhibition der ERK-Aktivierung in GnRH-behandelten COS-7-Zellen (Abb. 10 D). Es gab zwei mögliche Erklärungen für diese Beobachtung: (a) das GnRH-induzierte Signal wird über eine direkte, Ras-unabhängige Raf1-Phosphorylierung und -Aktivierung durch die PKC (Kolch *et al.*, 1993) an die MAPKs übermittelt oder (b) das GnRH-induzierte Signal führt PKC-abhängig zu einer Transaktivierung der EGFR-Tyrosinkinase und bedient sich so der Ras/MAPK-Kaskade. Gegen die erstgenannte Möglichkeit sprach die GnRH-vermittelte Aktivierung des EGFR, sowie der EGFR-Substrate Shc und Src.

Um die Beteiligung von c-Src an GnRH-vermittelten ERK-Aktivierung in COS-7-Zellen genauer zu untersuchen, wurden die Zellen transient mit dem Enzym C-terminale Src-Kinase (Csk) transfiziert. Das Csk-Protein phosphoryliert einen inhibitorischen Tyrosinrest im C-terminalen Bereich von Src und stellt den stärksten physiologischen Inaktivator der Src-Kinasen dar (Nada *et al.*, 1993). Die Überexpression des Csk-Proteins hatte eine starke Inhibition der GnRH-vermittelten ERK-Aktivierung zur Folge, wohingegen die Überexpression der nicht-funktionellen Csk-Mutante Csk222 die ERK-Aktivierung nicht verminderte (Abb. 10 D). Die in $\alpha\text{T3-1}$ -Zellen erhobenen

Befunde hinsichtlich einer Beteiligung von Src an der GnRH-Rezeptor/ERK-Signalkaskade konnten somit in transfizierten COS-7-Zellen bestätigt werden.

5.4 Komponenten der GnRH-abhängigen Signaltransmission in COS-7- und α T3-1-Zellen

5.4.1 Charakteristika der GnRH-stimulierten EGFR-Aktivität in α T3-1- und COS-7-Zellen

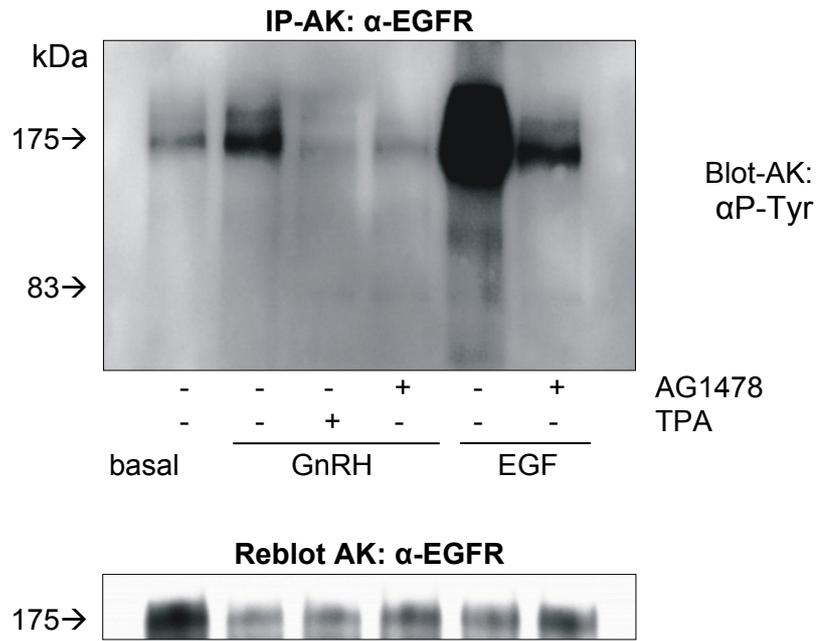
Die ausgeprägte Suppression der GnRH-vermittelten ERK-Aktivierung durch den spezifischen EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 sowohl in α T3-1-Zellen als auch in transfizierten COS-7-Zellen sowie die Hemmung der ERK-Aktivierung durch die transiente Expression einer dominant negativen EGFR-Mutante, HER-CD533, und einer dominant negativen Mutante des EGFR-Substrates Shc, Shc-Y317F, in COS-7-Zellen waren starke Hinweise auf eine funktionelle Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase im Sinne einer Transaktivierung der RTK durch den GnRH-Rezeptor. Um weitere Anhaltspunkte für diese Annahme und für die Lokalisation des EGFR innerhalb der Signaltransduktionskaskade zwischen GnRH-Rezeptor und der ERK-MAPKs zu erhalten, wurde nun die Auswirkung der Aktivierung des GnRH-Rezeptors auf den Phosphorylierungs-/Aktivierungszustand der EGFR-Tyrosinkinase direkt betrachtet.

Dazu wurden aus COS-7-Zellen, die den menschlichen GnRH-Rezeptor vorübergehend überexprimierten, nach der Agonisten-Stimulation der endogene EGFR mittels eines spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert und die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors durch Immunoblotting mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper detektiert. Abb. 11 A zeigt, daß eine fünfminütige Stimulation der Zellen mit physiologischen GnRH-Konzentrationen eine schnelle Tyrosinphosphorylierung des EGFR bewirkt. Das Ausmaß der EGFR-Phosphorylierung war hierbei weniger ausgeprägt als nach einer Stimulation mit 10 ng/ml des Rezeptorliganden EGF, allerdings wurde EGF zur Positivkontrolle in sehr hoher Konzentration eingesetzt.

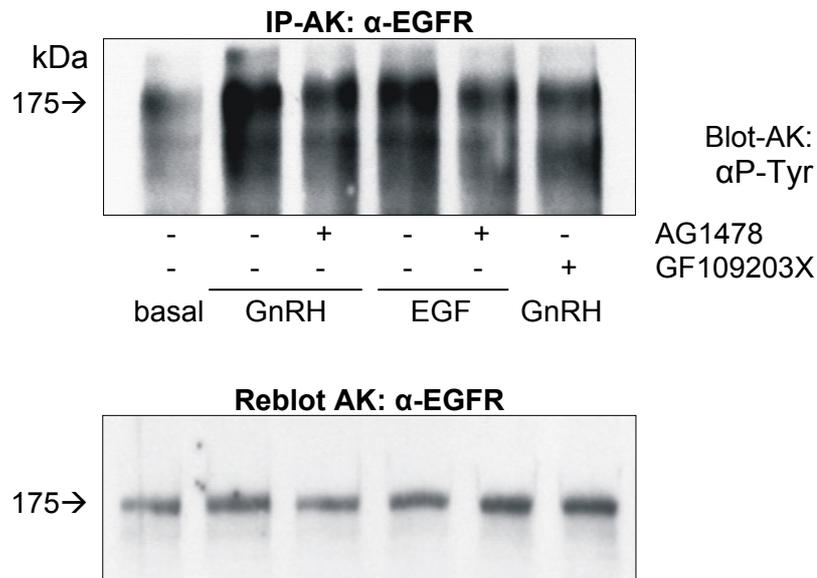
Um den Einfluß der PKC auf die EGFR-Aktivierung zu untersuchen, wurden die Zellen für 18 Stunden mit dem Phorbolster TPA inkubiert. Die so erzielte Down-Regulation der PKC-Isoformen führte genauso wie die 20minütige Vorbehandlung der COS-7-Zellen mit dem selektiven EGFR-Kinase-Inhibitor AG1478 zu einer totalen Blockade der GnRH-abhängigen EGFR-Transaktivierung (Abb. 11 A). Die maximale

EGFR-Tyrosinphosphorylierung durch 10 ng/ml EGF konnte durch die geringe Konzentration des AG1478 (100 nM) erwartungsgemäß nicht vollständig unterdrückt werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen durch den GnRH-Rezeptor tatsächlich zu einer Transaktivierung des EGFR führt. Dieser Transaktivierungsprozeß ist darüber hinaus, so läßt sich folgern, von einer Aktivierung der PKC abhängig und repräsentiert eine gesteigerte Autophosphorylierung der RTK.

A



B



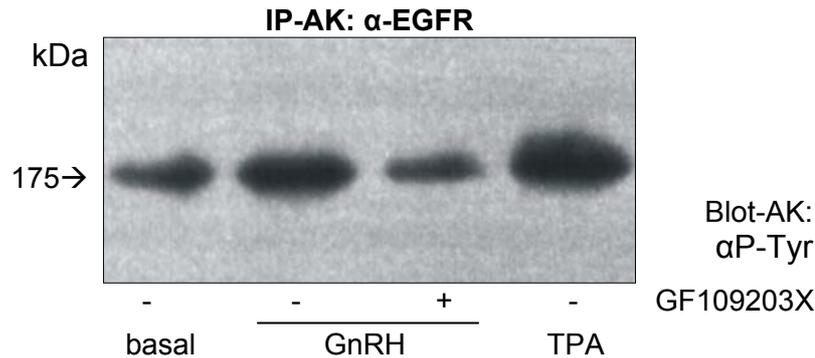
C

Abb. 11: Die GnRH-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR in COS-7-Zellen und α T3-1-Zellen.

(A) COS-7-Zellen wurden transient mit dem menschlichen GnRH-Rezeptor transfiziert. Die Langzeit-Behandlung der Zellen mit 100 ng/ml TPA erfolgte parallel zu der 18stündigen Inkubation in serumfreiem Medium. Die Vorbehandlung der COS-7-Zellen mit dem EGFR-spezifischen Inhibitor AG1478 (100 nM) wurde 10 min vor der Zellstimulation mit 200 nM GnRH oder 10 ng/ml EGF durchgeführt. Aus den Zellysaten wurden die EGFR-Proteine mittels eines monoklonalen Anti-EGFR-Antikörpers (IP-AK: α -EGFR) über Nacht immunpräzipitiert. Nach der Auftrennung der Präzipitate durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Transfer der Proteine auf Nitrozellulosefilter erfolgte das Immunoblotting mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (Blot-AK: α P-Tyr). Zur Kontrolle der Immunpräzipitation des EGFR wurde die Membran „gestriped“ und mit einem polyklonalen Anti-EGFR-Antikörper erneut immungeblottet (Reblot-AK: α -EGFR, unteres Bild).

(B) Konfluente α T3-1-Zellen wurden für 8 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min mit 100 nM AG1478 und dem selektiven PKC-Inhibitor GF109203X (1 μ M) vorinkubiert. Die 5minütige Stimulation wurde mit 1 μ M GnRH oder 3 ng/ml EGF durchgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter (A) dargestellten.

(C) Konfluente, in 100mm-Zellkulturschalen ausplattierte α T3-1-Zellen wurden 8 Stunden lang in serumfreiem Medium „gehungert“. Die Zellen wurden für 5 min entweder mit 200 nM GnRH oder 100 ng/ml TPA stimuliert. Vor der GnRH-Stimulation erfolgte eine 15minütige Vorinkubation mit 1 μ M GF109203X. Die Reaktionen wurden mit eiskaltem PBS gestoppt und die Zellysate wie unter (A) ausgeführt behandelt. Die Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind in allen Abbildungsteilen auf der rechten Seite angegeben.

Die Überprüfung der Befunde erfolgte im physiologischeren Modell der α T3-1-Zellen. Hier wurde die EGF-Konzentration mit 3 ng/ml deutlich geringer gewählt. In Abb. 9 B ist dargestellt, daß auch in α T3-1-Zellen eine kurzzeitige GnRH-Stimulation (5 min) zu einem Anstieg der EGFR-Tyrosinphosphorylierung führte. Dabei entsprach die durch GnRH hervorgerufene Phosphorylierung des EGFR in ihrem Ausmaß etwa der Stimulation mit 3 ng/ml EGF. Diese vermehrte Tyrosinphosphorylierung des EGFR war in beiden Fällen durch geringe Konzentrationen von AG1478 hemmbar. Ein vergleichbarer inhibitorischer Effekt konnte durch eine Vorinkubation der GnRH-behandelten Zellen mit dem hochselektiven PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid, GF109203X, erzielt werden. Eine direkte Aktivierung der PKC mittels einer 5minütigen

Stimulation der Zellen mit dem Phorbolster TPA bewirkte eine vermehrte EGFR-Phosphorylierung, die der GnRH-induzierten gleichkam (Abb. 11 C). Anhand dieser Ergebnisse kann für die gonadotropen α T3-1-Zellen folgende Aussage getroffen werden: Die GnRH-Behandlung bewirkt eine Aktivierung der ERK/MAPK-Kaskade via einer PKC-vermittelten Transaktivierung des EGFR.

5.4.2 Charakteristika der GnRH-stimulierten Shc-Tyrosinphosphorylierung in COS-7-Zellen

Um zu überprüfen, ob die GnRH-abhängige vermehrte Phosphorylierung des EGFR auch eine funktionelle Aktivierung des Rezeptors bedeutet, wurde die Tyrosinphosphorylierung des EGFR-Substrates Shc infolge einer GnRH-Stimulation betrachtet. Zu diesem Zweck wurden COS-7-Zellen, die den GnRH-Rezeptor transient exprimierten, mit 200 nM GnRH oder 10 ng/ml EGF stimuliert. Die Shc-Proteine wurden danach mittels eines spezifischen Antikörpers aus COS-7-Zellysaten immunpräzipitiert und die phosphorylierten/aktivierten Proteine durch einen anti-Phosphotyrosin-Antikörper detektiert. Wie in Abb. 12 gezeigt, führte die GnRH-Behandlung der Zellen tatsächlich zu einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung aller drei Shc-Isoformen. Zusätzlich wurde ein 110 kDa großes Protein mit Shc ko-immunpräzipitiert, das durch die GnRH- oder EGF-Behandlung ebenfalls an Tyrosinresten phosphoryliert wurde (Abb. 12). Dieses war von Daub *et al.* (1997) als Gab1, ein weiteres Substrat des EGFR, identifiziert worden.

Für die mitogene Signaltransmission sowohl über G_i - als auch über $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren wurde postuliert, daß die zytosolische Tyrosinkinase Src für die GPGR-abhängige Shc-Phosphorylierung verantwortlich sei (Luttrell *et al.*, 1996; Dikic *et al.*, 1996; Schlaepfer *et al.*, 1999). Luttrell *et al.* (1996) beobachteten eine transiente Assoziation von Src und Shc, die mit einer vermehrten Tyrosinphosphorylierung von Shc einherging. Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese abgeleitet, Shc diene als Konvergenzpunkt für Signale, die sowohl RTKn als auch GPGRn entstammen könnten.

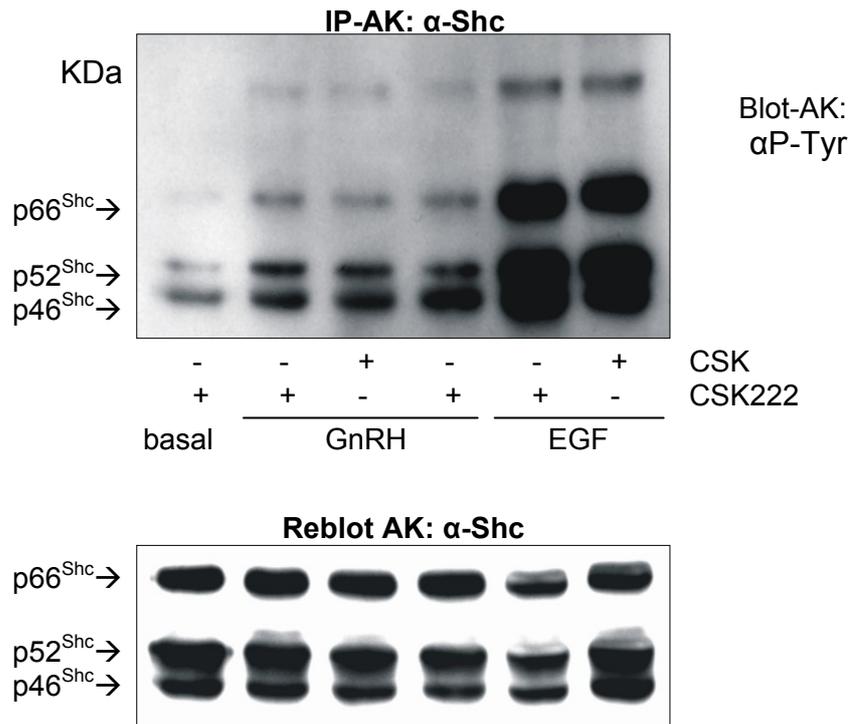


Abb. 12: Shc-Phosphorylierung nach GnRH-Stimulation in COS-7-Zellen.

COS-7-Zellen wurden transient mit 5 µg Plasmid-DNA des menschlichen GnRH-Rezeptors und 15 µg der cDNA für CSK oder CSK222 (s. Text) kotransfiziert. Nach einer 18stündigen Inkubation in serumfreiem Medium wurden die Zellen für 5 min entweder mit 200 nM GnRH oder zur Positivkontrolle mit 10 ng/ml EGF stimuliert und anschließend lysiert. Aus den Zellysaten wurden die Shc-Isoformen mit Hilfe eines Anti-Shc-Antikörpers immunpräzipitiert (IP-AK: α-Shc). Die Auftrennung der Präzipitate erfolgte durch SDS-PAGE. Nach dem Transfer der Shc-Proteine auf Nitrozellulosefilter konnte die Zunahme der Protein-Tyrosinphosphorylierung mittels Immunoblotting mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (Blot-AK: αP-Tyr) detektiert werden. Zur Kontrolle der Immunpräzipitation der Shc-Isoformen wurde die Membran „gestriped“ und mit einem Anti-Shc-Antikörper erneut immungeblottet (Reblot-AK: α-Shc, unteres Bild). Die Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind in beiden Abbildungsteilen auf der rechten Seite angegeben. Drei unabhängige Versuche ergaben jeweils ähnliche Ergebnisse.

Da eine Src-Abhängigkeit der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung durch die vorliegende Arbeit sowohl für das COS-7- als auch für das αT3-1-Zellmodell nachgewiesen worden ist, lag es nahe, daß auch das mitogene Signal des G_{q/11}-gekoppelten GnRH-Rezeptors eine Src-vermittelte Aktivierung des Adapterproteins Shc bewirke. Allerdings hatte die transiente Expression des Src-inaktivierenden Enzyms Csk keinen inhibitorischen Effekt auf die GnRH-induzierte Shc-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 12). Und auch die prononcierte Phosphorylierung der Shc-Isoformen durch eine Zellstimulation mit 10 ng/ml EGF blieb durch die Überexpression des Csk-Proteins unbeeinflußt (Abb. 12). Diese Daten indizierten, daß

Src weder an der GnRH- noch an der EGF-induzierten Shc-Aktivierung beteiligt ist, obwohl eine Aktivierung der Src-Kinase für die GnRH-vermittelte ERK-Aktivierung nötig ist (Abb. 8 und Abb. 10 D).

Um eine weitergehende Charakterisierung der Tyrosinphosphorylierung des Shc-Proteins im Verlauf der $G_{q/11}$ -PKC-abhängigen ERK-Aktivierung vornehmen zu können, wurden die Zellen mit verschiedenen Agonisten stimuliert (Abb.13).

Lysophosphatidsäure (LPA) ist ein Agonist des G_i -Protein-gekoppelten LPA-Rezeptors und ein potentes Mitogen, das die MAPKs über einen Pertussis-toxin-sensiblen, durch $\beta\gamma$ -Dimere vermittelten Signalweg aktiviert (Daub *et al.*, 1997; Abb. 6). Die Stimulation der COS-7-Zellen mit EGF und LPA führte demnach erwartungsgemäß zu einer vermehrten Shc-Tyrosinphosphorylierung. Diese ist in Abb. 13 am besten an der p66Shc-Isoform erkennbar. Forskolin stimuliert mit der Adenylzyklase den wichtigsten Effektor von G_s -gekoppelten Rezeptoren und induziert so eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und die Aktivierung der PKA. Die Forskolin-Stimulation der Zellen hatte keinen meßbaren Effekt auf den Phosphotyrosin-Gehalt von Shc. Der Phorbol-ester TPA aktiviert die PKC und somit ein wichtiges Effektorsystem $G_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren. Eine 5minütige TPA-Behandlung resultierte in einer deutlichen Zunahme der phosphorylierten Shc-Form (Abb. 13). Neben der bereits beschriebenen 110 kDa-Bande wurde ein weiteres ca. 180 kDa Protein kopräzipitiert, das infolge einer LPA-, EGF und TPA-Stimulation ebenfalls eine vermehrte Tyrosinphosphorylierung aufwies (Abb. 13). Das Protein wurde aufgrund seiner Reaktion mit dem anti-EGFR-Antikörper im Westernblot als der EGFR identifiziert (Daten nicht gezeigt). Es konnte somit gezeigt werden, daß in COS-7-Zellen eine Stimulation mit Phorbol-ester für die Tyrosinphosphorylierung des EGFR-Adapterproteins Shc ausreichend ist und darüber hinaus die Assoziation mit dem phosphorylierten EGFR induziert.

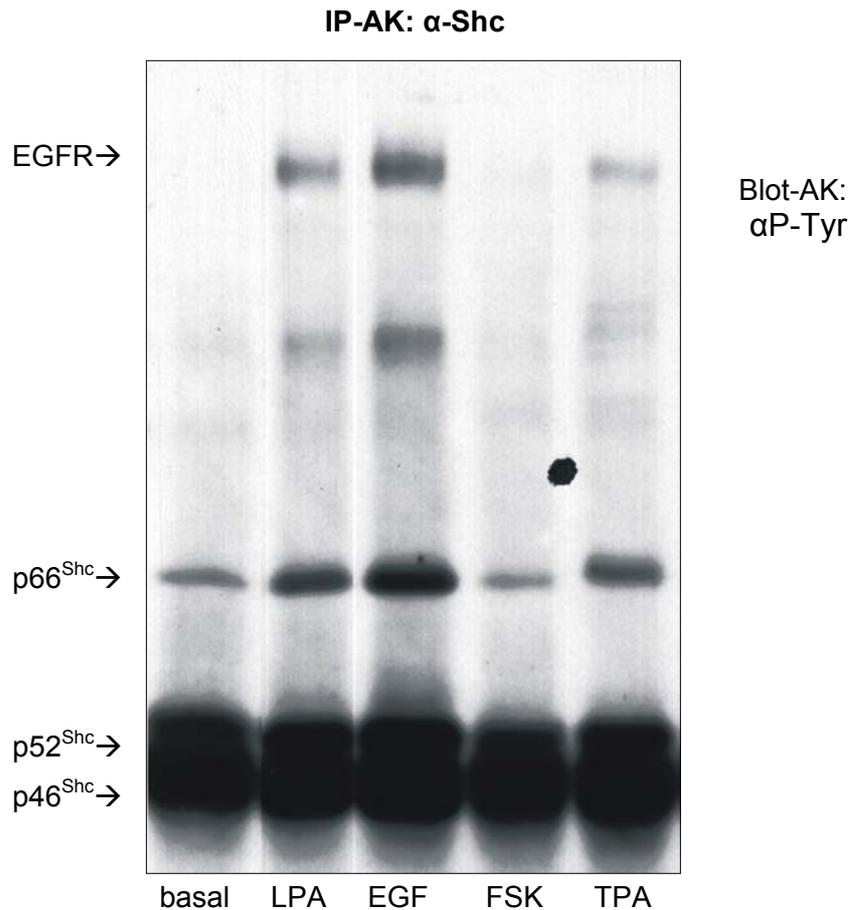


Abb. 13: Effekt von TPA auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFR und Shc in COS-7-Zellen.

COS-7-Zellen wurden im Anschluß an eine 18stündige Inkubation in serumfreiem Medium für 5 min entweder mit Medium (basal), 25 μ M Lysophosphatidsäure (LPA), 3 ng/ml EGF, 100 μ M Forskolin (FSK) oder 100 ng/ml TPA stimuliert. Aus den Zellysaten wurden die Shc-Isoformen mit Hilfe eines Anti-Shc-Antikörpers immunpräzipitiert (IP-AK: α -Shc). Dabei kam es zur Ko-Immünpräzipitation des EGFR durch den Anti-Shc-Antikörper. Nach der Auftrennung der Präzipitate durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Transfer der Proteine auf Nitrozellulosefilter erfolgte das Immunoblotting mit einem Antiphosphotyrosin-Antikörper (Blot-AK: α P-Tyr). Die Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind in beiden Abbildungsteilen auf der rechten Seite angegeben. Drei unabhängige Versuche ergaben jeweils ähnliche Ergebnisse.

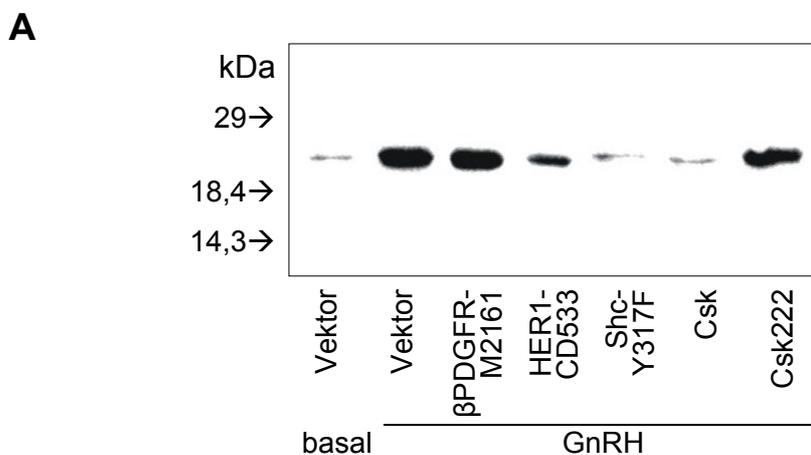
5.4.3 Die GnRH-induzierte Aktivierung von Ras in α T3-1- und COS-7-Zellen

Nach dem Nachweis einer Beteiligung von Shc und des EGFR an der GnRH-induzierten Signaltransmission galt das Hauptinteresse nun der eingehenderen Charakterisierung der GnRH-induzierten Ras-Aktivierung. Um diese direkt betrachten zu können, wurde ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein eingesetzt, das die minimale Ras-Bindungsdomäne des Raf1-Proteins (GST-RBD) enthält (siehe 4.4.3.). Das GST-RBD-Konstrukt stellte ein geeignetes Werkzeug zur direkten Präzipitation der

aktivierten/GTP-gebundenen Ras-Form aus Zellysaten dar (de Rooij *et al.*, 1997). Wie in Abb. 14 A dargestellt bewirkte die GnRH-Stimulation transient mit der hGnRHR-cDNA transfizierter COS-7-Zellen eine Zunahme der GTP-gebundenen Ras-Präzipitate. Eine zusätzliche Expression dominant negativer Mutanten des EGFR (HER1-CD533) sowie von Shc (Shc-Y317F) verursachten jeweils eine signifikante Suppression der GnRH-abhängigen Ras-Aktivierung (Abb. 14 A). Diese Resultate ließen darauf schließen, daß der EGFR und Shc innerhalb des GnRH-induzierten mitogenen Signaltransduktionweges proximal der kleinen GTPase Ras lokalisiert seien. Zur Kontrolle der Spezifität der verwandten Konstrukte wurde eine unfunktionale Mutante des PDGF- β -Rezeptors in COS-7-Zellen überexprimiert. Diese dominant negative Mutante, PDGF- β -R-CD504, ist C-terminal trunziert und Kinase-defizient (Strawn *et al.*, 1994). Sie besaß keinerlei inhibitorischen Effekt auf das Ausmaß der Ras-Aktivierung durch GnRH (Abb. 14 A).

Die Inaktivierung der Src-Kinase durch eine Überexpression von Csk hingegen führte zu einer komplette Unterdrückung der GnRH-vermittelten GTP-Beladung von Ras (Abb. 14 A). Auch dieser Effekt war spezifisch, da die Expression der Kinase-defizienten Csk-Mutante, Csk222, keinen Einfluß auf die Ras-GTP-Formation hatte.

Dieser Befund bedeutete im Zusammenhang mit den im vorhergehenden erläuterten Ergebnissen, daß die Shc-Tyrosinphosphorylierung, die die Formation des Ras-Aktivierungskomplexes Shc-Grb2/Sos initiiert, unabhängig von der Src-Kinase-Aktivität erfolgt, wohingegen die GnRH-abhängige Ras-Aktivierung selbst wie auch die Aktivierung von ERK essentiell Src-abhängig sind.



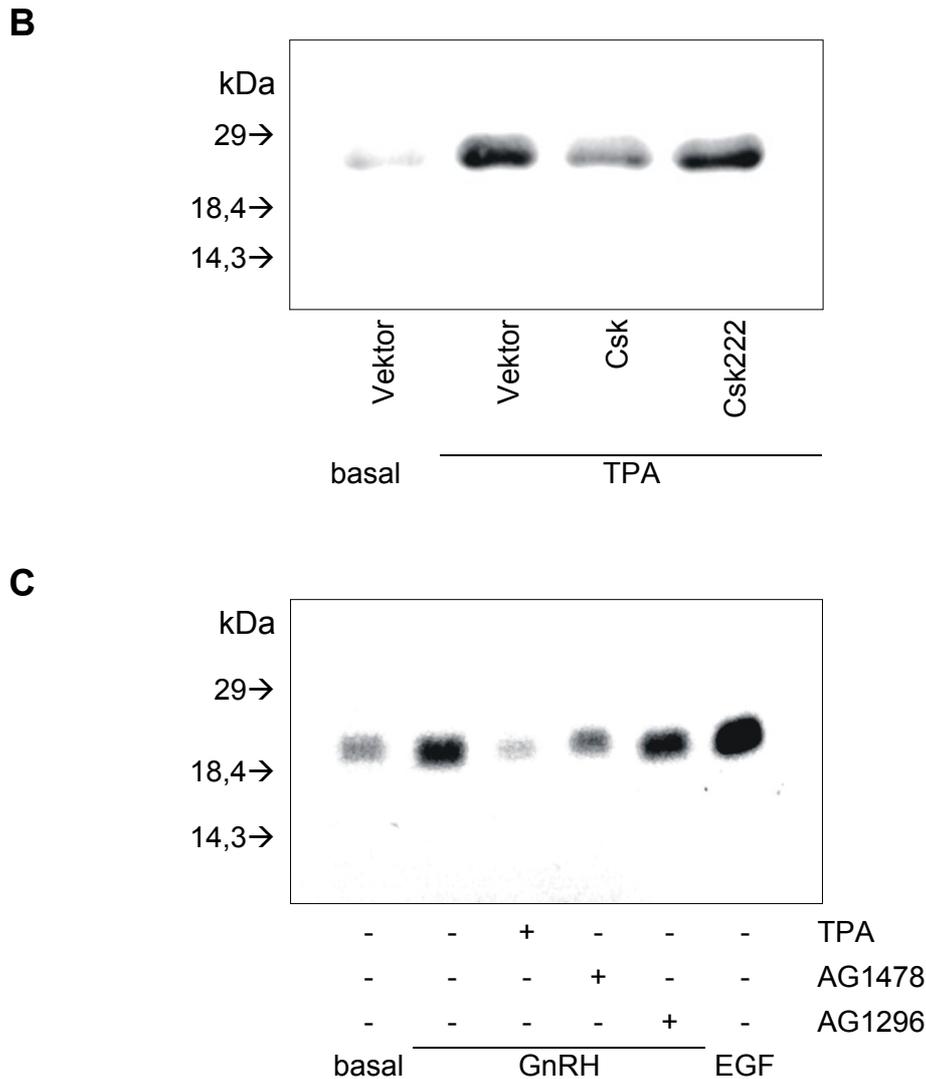


Abb. 14: GnRH-induzierte Ras-Aktivierung in COS-7-Zellen (A). Effekt von TPA auf die Ras-Aktivierung in COS-7-Zellen (B). Effekt einer Inhibition der Proteinkinase C auf die Ras-Aktivierung in COS-7-Zellen (C).

COS-7-Zellen wurden transient mit der cDNA des menschlichen GnRH-Rezeptors transfiziert. Für die Experimente in (A) und (B) erfolgte zusätzlich die Kotransfektion mit verschiedenen cDNA-Konstrukten (s. Text). Die Zellen wurden für 18 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Im Falle von (B) wurde dem Medium dabei 100 ng/ml TPA zugesetzt. Die COS-7-Zellen wurden im Anschluß daran für 5 min mit den Agonisten GnRH (200 nm), EGF (50 ng/ml) oder TPA (50 ng/ml) stimuliert. Die Vorinkubation der Zellen mit 100 nM des EGFR-Kinase-spezifischen Inhibitors AG1478 bzw. 1 µM des PDGFR-Kinase-spezifischen Inhibitors AG1296 erfolgte 15 min vor der Agonisten-Stimulation (C). Die Reaktionen wurden durch Zusatz von eiskaltem PBS gestoppt und die Zellen auf Eis lysiert. Die Zellysate wurden für 30 min bei 4°C mit dem an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-RBD-Konstrukt inkubiert (s. Methoden). Gebundene GTP-Ras-Proteine wurden durch SDS-PAGE in 15% (A) und (B) oder 12,5% (C) Acrylamidgelen aufgetrennt. Das gebundene Ras konnte dann im Immunoblot mit einem monoklonalen Anti-Pan-Ras-Antikörper nachgewiesen werden. Die Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind in allen Abbildungsteilen auf der rechten Seite angegeben.

In dieser Arbeit wurde bereits auf ERK-Ebene demonstriert, daß durch die direkte Aktivierung der PKC mittels Phorbol ester das vom GnRH-Rezeptor ausgehende mitogene Signal vollständig nachgeahmt werden kann (Abb. 10 C). In Übereinstimmung damit bewirkte eine 5minütige TPA-Stimulation der COS-7-Zellen eine Zunahme der GTP-gebundenen Ras-Präzipitate (Abb. 14 B). Eine weitergehende Charakterisierung der Src-abhängigen Ras-Aktivierung erfolgte durch die zusätzliche Expression von Csk, wodurch die TPA-vermittelte vermehrte Ras-GTP-Formation unterdrückt werden konnte (Abb. 14 B). Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, daß sowohl die PKC als auch die Src-Kinase Effektoren des ligandenbesetzten GnRH-Rezeptors sind und weiterhin Src distal der PKC agiert.

Dementsprechend bewirkte eine Langzeit-Stimulation (18 Stunden) der COS-7-Zellen mit TPA und konsekutiver Down-Regulation der PKC-Isoformen eine nahezu vollständige Unterdrückung der GnRH-abhängigen Ras-Aktivierung (Abb. 14 C). Eine der Agonistenstimulation vorrangige Behandlung der Zellen mit dem EGFR-selektiven Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 bewirkte eine Verminderung der Ras-GTP-Formation. Dasselbe Vorgehen unter Verwendung des PDGFR-spezifischen Hemmstoffes AG1296 hatte hingegen keinen inhibitorischen Effekt auf die GnRH-induzierte Ras-Aktivierung (Abb. 14 C). Die in Abb. 14 C ebenfalls dargestellte maximale Ras-Aktivierung wurde durch eine Stimulation der COS-7-Zellen mit 50 ng/ml EGF verursacht. Sie diente als Positivkontrolle.

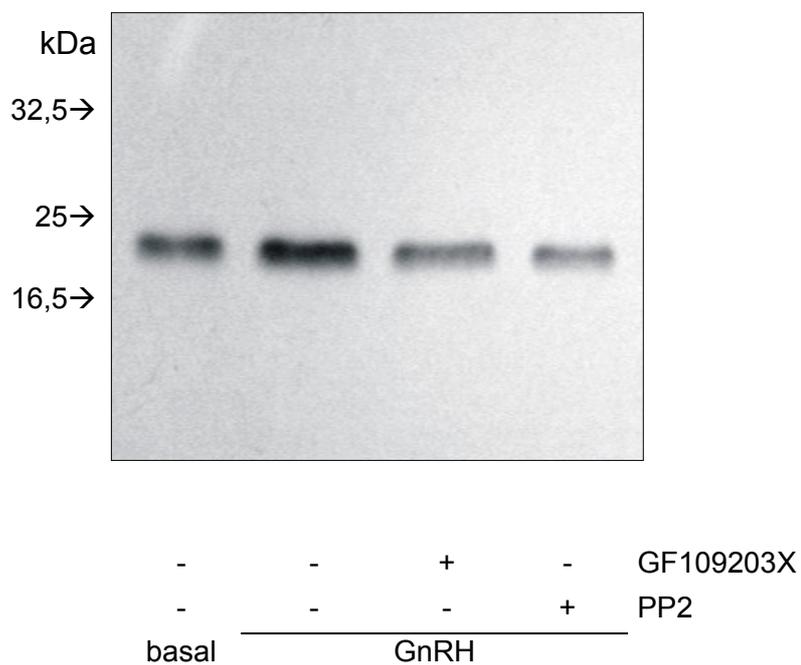
Durch die Präzipitation des GTP-gebundenen Ras-Proteins unter Verwendung des GST-RBD-Konstruktes in α T3-1-Zellen konnten die in COS-7-Zellen gewonnenen Ergebnisse bestätigt werden. Abb. 15 A stellt die Aktivierung des endogenen Ras infolge GnRH-Stimulation der Zellen dar. Durch eine vorhergehende Behandlung der gonadotropen Zellen mit einem spezifischen Inhibitor der PKC, GF109203X, oder der Src-Kinase, PP2, konnte diese vermehrte GTP-Beladung des Ras unterdrückt werden (Abb. 15 A). Die Zunahme der GTP-gebundenen Ras-Form durch eine fünfminütige TPA- oder GnRH-Stimulation der Zellen war in beiden Fällen durch die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität mittels AG1478 partiell hemmbar (Abb. 15 B).

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität für die GnRH-vermittelte Ras-Aktivierung im physiologischen Zellmodell der α T3-1-Zellen konnte mit Hilfe der Expression zweier verschiedener dominant negativer EGFR-Mutanten, des HER1-CD533- sowie des HER1Na8-Konstruktes (Sachsenmaier *et al.*,

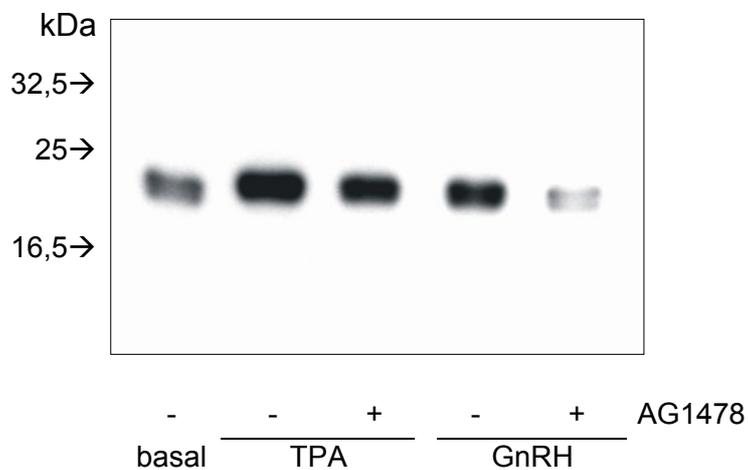
1994), gewonnen werden. Beide Konstrukte bewirkten eine Inhibition der TPA-induzierten Ras-Aktivierung (Abb. 15 C).

Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten sprachen insgesamt für eine zentrale Stellung der kleinen GTPase Ras bei der Übermittlung mitogener Signale vom ligandenbesetzten GnRH-Rezeptor an die ERK-MAPK. Weitere wichtige Signalschritte schienen bei der GnRH-abhängigen Ras-Aktivierung die PKC, Src und der EGFR zu sein, wobei sowohl Src als auch die EGFR-Tyrosinkinase distal der PKC lokalisiert waren.

A



B



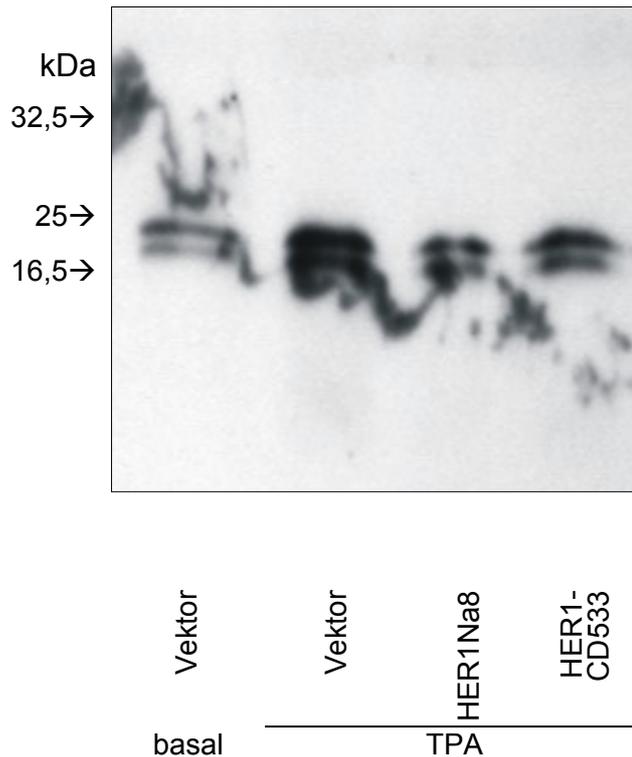
C

Abb. 15: Einfluß der Proteinkinase C und des EGFR auf die GnRH-induzierte Ras-Aktivierung in α T3-1-Zellen.

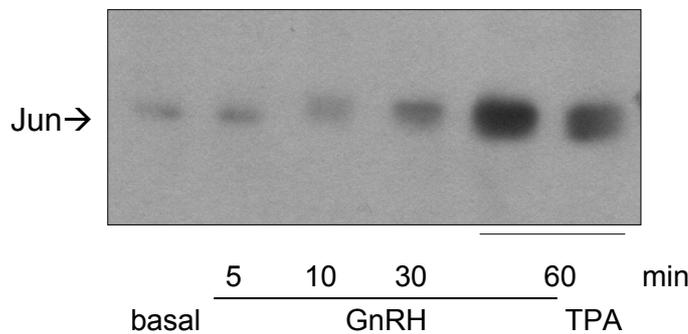
Für die Experimente in (A) und (B) wurden die α T3-1-Zellen nicht transfiziert, für (C) wurden transiente Transfektionen entweder mit Vektor-DNA oder mit einem der beiden angegebenen dominant negativen EGFR-Mutanten (s. Text) durchgeführt. Zellen wurden für 8 Stunden in serumfreiem Zellkulturmedium „gehungert“ und anschließend für 5 min mit 200 nM GnRH oder 100 ng/ml TPA stimuliert. Die Vorinkubation mit 1 μ M GF109203X oder 1 μ M PP2 (A) und mit 100 nM AG1478 (B) wurde für 20 min vor dem Agonistenzusatz durchgeführt. Die Zellysate wurden für 30 min bei 4°C mit dem an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-RBD-Konstrukt inkubiert (s. Methoden). Gebundene GTP-Ras-Proteine wurden durch SDS-PAGE in 15%igen Acrylamidgelen aufgetrennt. Das gebundene Ras konnte dann im Immunoblot mit einem monoklonalen Anti-Pan-Ras-Antikörper nachgewiesen werden. Die Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind in allen Abbildungsteilen auf der rechten Seite angegeben.

5.4.4 Die funktionelle Aktivierung der ERK-MAPK α n durch GnRH in α T3-1-Zellen

Die Regulation der Transkription der *c-fos*- und *c-jun*-Gene erfolgt über die ERK und JNK/MAP-Kinasekaskade. Die beiden Gene werden der Gruppe der sogenannten „unmittelbar frühen Gene“ zugerechnet, da sie innerhalb der ersten Stunde nach einer Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Sie kodieren für die Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun, deren Aufgabe es ist, nach ihrer MAPK α n-abhängigen Phosphorylierung/Aktivierung den nächsten Satz von Genen innerhalb des

durch das extrazelluläre Signal ausgelösten Programms zu aktivieren oder zu reprimieren. Die Analyse einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun in α T3-1-Zellen nach GnRH-Stimulation erschien daher eine geeignete Methode zur Untersuchung der Frage, ob die Serin/Threoninphosphorylierung der ERK-Isoformen über den GnRH-induzierten Signalweg auch eine funktionelle Aktivierung dieser MAPKs bedeutete und erlaubte gleichzeitig eine Bewertung der physiologischen Relevanz dieses Phänomens.

A



B

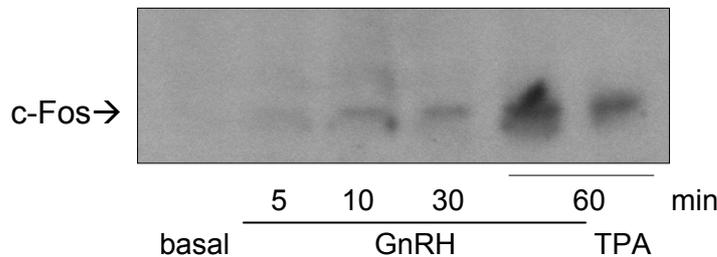


Abb. 16: Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos durch GnRH und TPA in α T3-1-Zellen.

Semikonfluente α T3-1-Zellen wurden in 100 mm-Zellkulturschalen für 8 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen für die angegebenen Zeitintervalle mit 1 μ M GnRH bzw. 100 nM TPA stimuliert. Der Basalwert wurde durch eine 60minütige Inkubation mit serumfreiem Medium ermittelt. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Westernblotting-Verfahren wurden die Nitrozellulose-Membranen über Nacht bei 4 ° C mit einem gegen die aktivierte Form von c-Jun (**A**) bzw. c-Fos (**B**) gerichteten Antikörper inkubiert. Die Proteine wurden durch einen weiteren Antikörper detektiert, der gegen die Spezies des ersten gerichtet und POD-gekoppelt war. Abgebildet ist eines von drei separat durchgeführten Experimenten.

Wie in Abb. 16 dargestellt wurden die Zellen zu diesem Zweck während unterschiedlich langer Zeitintervalle mit GnRH inkubiert und die Fos- bzw. Jun-Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nach dem Westernblotting immundetektiert. Eine Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren konnte bereits nach einer 10 min langen GnRH-Stimulation detektiert werden. Eine längere Agonisten-Stimulation bis zu einer Stunde bewirkte eine Zunahme der detektierbaren c-Fos- und c-Jun-Proteinmengen. Auch eine 60-minütige Stimulation der gonadotropen Zellen mit dem Phorbolster TPA führte zu einer vermehrten Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren (Abb. 16 A und B). Dies war ein weiterer Hinweis dafür, daß die direkte Aktivierung der PKC das durch den ligandenbesetzten GnRH-Rezeptor induzierte mitogene Signal in α T3-1-Zellen ersetzen konnte.

6 Diskussion

Das Dekapeptid GnRH spielt durch die Interaktion mit seinem Rezeptor bei der hormonellen Regulation der Gonadenfunktion eine entscheidende Rolle. Der Effekt des GnRH auf den Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Gonaden ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der reproduktiven Funktion verantwortlich. Darüber hinaus ist eine Expression des GnRH-Rezeptors auch in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, sowie für einige extraneuronale und neoplastische Gewebe beschrieben (Stojilkovic *et al.*, 1994; Gründker *et al.*, 2002). So konnte für manche Mamma-, Ovarial-, Endometrium- und Prostata-Karzinome eine Expression des GnRH-Rezeptors nachgewiesen und durch die therapeutische Anwendung von GnRH-Analoga antiproliferative Effekte erzielt werden (Conn und Crowley, 1994; Vacher, 1995; Huirne und Lambalk, 2001). Dabei scheint GnRH das Wachstumsverhalten verschiedener Zellarten über einen autokriner/parakriner Regulationsmechanismus zu beeinflussen.

Abgesehen von der klassischen Funktion des GnRH innerhalb der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse gibt es zunehmend Beweise für die Existenz auto- und parakriner GnRH-Systeme in den Geweben der menschlichen Geschlechtsorgane, darunter Mamma-, Plazenta-, Endometrium-, Ovarial- und Testisgewebe (Gründger *et al.*, 2002). Allerdings ist die physiologische Bedeutung des GnRH-Rezeptors in diesen Geweben zum jetzigen Zeitpunkt nur wenig bekannt. Ein besseres Verständnis der extrahypophysären Bedeutung dieses GnRH/GnRH-Rezeptor-Systems würde große Fortschritte auf dem Gebiet der reproduktiven Medizin und auch der Tumorbilogie bedeuten.

In den meisten Zellen werden Proliferations- und Differenzierungsprozesse über die ERK-Subfamilie der MAPKs reguliert. Es gehört zu den neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen, daß neben den klassischen Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF auch Liganden der GPGRs durch die Aktivierung der ERK-MAPKs zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und auch Transformation initiieren können. Es sind Mutationen sowohl der GPGRs als auch der $G\alpha$ -Untereinheiten und weiterer GPGR-abhängigen Signalkomponenten bekannt, die ein autonomes Zellwachstum zur Folge haben und die Ursache menschlicher Erkrankungen darstellen können (Dhanasekaran *et al.*, 1995; Gudermann *et al.*, 2000). Massive Forschungsbemühungen richteten sich daher in den letzten Jahren auf die Untersuchung GPGR-induzierter

Signaltransduktionswege zu den MAPKs. Die Charakterisierung von Rezeptor-, G-Protein- und Tyrosinkinase-spezifischen Beteiligungen an mitogenen Signalwegen in einer bestimmten Zelle eröffnet die Möglichkeit zur Entwicklung spezifischer und selektiver pharmakologischer Therapeutika zur Behandlung von Krankheiten, die aus einer unkontrollierten Zellproliferation resultieren. Allerdings erwies sich die Charakterisierung insbesondere von Signalwegen, die von $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren ausgehen, als schwierig.

6.1 Die Regulation der ERK-MAPKs durch den GnRH-Rezeptor

6.1.1 Charakteristika des GnRH-Rezeptors und der $G_{q/11}$ -Kopplung

Mehrere Studien konnten eine GnRH-vermittelte Aktivierung der ERK-MAPK-Kaskade belegen, die für die Regulation der Gen-Expression in gonadotropen Zellen von großer Bedeutung ist (Roberson *et al.*, 1995; Sundaresan *et al.*, 1996; Call *et al.*, 1999; White *et al.*, 1999). Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, den Signalweg zwischen dem $G_{q/11}$ -gekoppelten GnRH-Rezeptor und den ERK1/2 anhand des physiologischen Zellmodells der α T3-1-Zellen zu analysieren und so weitere Einblicke in die intrazelluläre Umsetzung gonadotroper Stimuli und ihre potentielle Störung zu erhalten.

Der Mechanismus der ERK-Aktivierung über den $G_{q/11}$ -gekoppelten GnRH-Rezeptor war zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unbekannt. Für den β_2 -adrenergen Rezeptor war ein Modell postuliert worden, nach dem die Signalübermittlung an die ERK-Isoformen über die Internalisierung des Rezeptors erfolgt, die durch eine Komplexbildung zwischen β -Arrestin und der zytoplasmatischen Tyrosinkinase Src eingeleitet wird (Lefkowitz, 1998). Dieses Konzept war auf den GnRH-Rezeptor nicht übertragbar, da dieser aufgrund einiger besonderer Rezeptorcharakteristika weder einer schnellen homologen Rezeptor-Internalisierung nach Agonisten-Stimulation noch einer β -Arrestin-abhängigen Rezeptor-Expression unterliegt (Heding *et al.*, 1998; Vrecl *et al.*, 1998; McArdle *et al.*, 2002). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß bereits eine kurze Agonistenstimulation (5-10 min) zu einer gesteigerten ERK-Aktivierung führt. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu dem Konzept von Luttrell *et al.* (1999a), nach dem die Endozytose bzw. Internalisierung des aktivierten GPGR eine notwendige Voraussetzung für die ERK-Aktivierung darstellt.

Die Identifizierung und Charakterisierung der Signalkomponenten in der Signaltransduktionskaskade zwischen $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren und den ERK-

MAPKs wurde häufig durch den Umstand in Frage gestellt, daß viele G_q -gekoppelte Rezeptoren die Fähigkeit besitzen, ebenfalls mit G_i -Proteinen zu interagieren. Diese multiple G-Protein-Kopplung tritt insbesondere bei einer Überexpression der Rezeptoren in heterologen Zellsystemen auf (Gudermann *et al.*, 1996). Die in der Literatur beschriebene Beteiligung von $G\beta\gamma$ -Komplexen an der ERK-Aktivierung über G_q -gekoppelte Muskarin-Rezeptoren (Crespo *et al.*, 1994) und den TRH-Rezeptor (Palomero *et al.*, 1998) könnte demnach auch auf die konkurrierende Aktivierung von G_i -Proteinen zurückzuführen sein, deren Expressionsrate die der G_q -Proteine beträchtlich übertrifft. Die in dieser Arbeit vorgenommenen Experimente mit dem freien $\beta\gamma$ -Untereinheiten sequestrierenden Konstrukt CD8- β ARK zeigten, daß die ERK-Aktivierung über den GnRH-Rezeptor durch die $G_{\alpha_{q11}}$ -Untereinheiten vermittelt wird und eine meßbare Beteiligung von $G\beta\gamma$ -Dimeren fehlt.

Der GnRH-Rezeptor war weiterhin insofern ein geeignetes Untersuchungsobjekt, da sowohl der menschliche GnRH-Rezeptor bei transienter Expression in CHO- und COS-7-Zellen als auch die endogen exprimierte Form in α T3-1-Zellen einer ausschließlichen Kopplung an G_{q11} -Proteine unterliegt (Grosse *et al.*, 2000). Die Fähigkeit des GnRH-Rezeptors auf unterschiedliche zelluläre Effektoren Einfluß zu nehmen, wird demnach erst distal der Rezeptor/G-Protein-Interaktion determiniert.

6.1.2 Die Bedeutung der PLC- β -Effektorsysteme

Von neuroendokrinen PC12-Zellen ist bekannt, daß allein eine vorübergehende Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration ausreichend ist, um die ERK-Aktivierung zu stimulieren (Zwick *et al.*, 1997; Swanson *et al.*, 1998). An der Vermittlung der ERK-Aktivierung scheint in diesem Zellmodell die prolinreiche Tyrosinkinase PYK2 beteiligt zu sein, die durch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und durch Phorbolster unabhängig aktiviert wird. Die tyrosinphosphorylierte PYK2 induziert eine Ras-abhängige ERK-Aktivierung durch die direkte Interaktion mit der zytoplasmatischen Tyrosinkinase c-Src, welche die nachfolgende Phosphorylierung des Adapterproteins Shc und die Formation des Shc-Grb2/Sos-Signalkomplexes vermittelt (Schlaepfer *et al.*, 1999). Die GnRH-Stimulation gonadotroper Zellen bewirkt einen charakteristischen biphasischen Anstieg des zytosolischen Kalziums. Die Initialphase des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieges wird durch das PLC-Produkt IP_3 vermittelt. Es kommt zum schnellen, bis zu 10-fachen Anstieg des zytosolischen Kalziums durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Auf diese Initialphase folgt eine niedrigere, anhaltende Plateauphase, die durch den Einstrom

extrazellulären Kalziums durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle getragen wird. Mulvaney *et al.* (1999) postulierten, daß dieser Einstrom extrazellulären Kalziums eine notwendige Bedingung für die GnRH-vermittelte ERK-Aktivierung in $\alpha\text{T3-1}$ -Zellen sei und der Wirkungsort des Kalziums distal der PKC liege. Allerdings war eine ERK-Aktivierung in dieser Studie erst zu relativ späten Zeitpunkten (15-30 min) detektierbar. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte frühe ERK-Aktivierung (nach 5-10minütiger Agonistenstimulation) in $\alpha\text{T3-1}$ -Zellen war im Gegensatz dazu von der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unabhängig. Weder konnte durch eine globale Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration mit dem Ionophor Ionomycin eine signifikante ERK-Aktivierung erzielt werden, noch hatte die Bindung zytosolischer Kalziumionen durch den Ca^{2+} -Chelator BAPTA/AM eine Suppression der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung zur Folge.

Hinsichtlich der Stellung der PKC-Isotypen innerhalb des Signalweges von $\text{G}_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren zu den MAPK n ERK1/2 existieren wiederum verschiedene Auffassungen, die teils eine PKC-abhängige (Hawes *et al.*, 1995; Soltoff, 1998) teils eine PKC-unabhängige (Charlesworth und Rozengurt, 1997; Berts *et al.*, 1999) oder auch partiell PKC-abhängige (Crespo *et al.*, 1994) Signaltransduktionskaskade favorisieren. In den für diese Arbeit vorgenommenen Experimenten unterband eine PKC-Inhibition sowohl mit dem unspezifischen Serin/Threoninkinase-Inhibitor Staurosporin als auch mit einem spezifischen Inhibitor der PKC, dem Bisindolylmaleimid, die via den GnRH-Rezeptor vermittelte ERK-Aktivierung. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß eine kurze Behandlung von COS-7- und $\alpha\text{T3-1}$ -Zellen mit Phorbolestern einen der Behandlung mit dem Rezeptoragonisten GnRH gleichwertigen Stimulus für die ERK-Aktivität darstellt. Die PKC-Isoformen sind demnach zentrale Signalmoleküle in der Signalkette zwischen dem $\text{G}_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptor und den ERK-MAPK n .

Es ist bekannt, daß in den meisten Zellarten eine direkte Aktivierung der PKC durch Phorbolster eine starke ERK-Aktivierung bewirkt (Mochly-Rosen und Kauvar, 1998). Der diesem Effekt zugrunde liegende Mechanismus ist unbekannt. Eine Hypothese zum Mechanismus der ERK-Aktivierung durch die PKC leitet sich aus der Beobachtung ab, daß die PKC α -Isoform die Serin/Threoninkinase Raf1 *in vitro* direkt phosphoryliert und aktiviert (Gutkind, 1998). Ein anderes Modell basiert auf der Beobachtung, daß Phorbolster eine Akkumulation der Ras-GTP-Form bewirkt. Die Aktivierung von Raf1 ist von seiner Translokation an die Plasmamembran und der Assoziation mit Ras-GTP

abhängig (Marais *et al.*, 1998). Die Funktion der PKC für die Raf-Aktivierung könnte also in der Aktivierung von Ras bestehen, welches seinerseits als Membranverankerung für Raf dient. Marais *et al.* (1998) stellten jedoch keinen inhibitorischen Effekt von N17-Ras auf die Raf-Aktivierung durch die PKC fest. Hingegen verhindert die Expression dieses dominant negativen Konstruktes eine Aktivierung von Raf1 durch RTKn. Daraus folgte man, daß die Aktivierung von Ras durch die PKC einem anderen Mechanismus unterliege als dem von RTKn genutzten. Ein solcher Aktivierungsweg würde nicht über Sos, sondern über einen anderen, unidentifizierten Guaninnukleotid-Austauschfaktor verlaufen. Diese Arbeit bestätigt, daß eine dominant negative Raf-Mutante oder eine pharmakologische Blockade des Raf die G_q /PKC-abhängige Signalübermittlung an die ERK-MAPKn erheblich stört. Dies impliziert eine essentielle Bedeutung des Raf für diesen Signaltransduktionsweg.

6.1.3 Die Funktion von Ras

Die zentrale Stellung des kleinen G-Proteins Ras bei der $G_i\beta\gamma$ -vermittelten ERK-Aktivierung ist unumstritten (van Biesen *et al.*, 1996; Gutkind *et al.*, 1998), im Hinblick auf die Beteiligung von Ras an der Signaltransduktion zwischen $G_{q/11}$ -gekoppelten Rezeptoren und den MAPKn hingegen existieren widersprüchliche Ergebnisse (Crespo *et al.*, 1994; Hawes *et al.*, 1995). Für eine Partizipation von Ras an der $G_{q/11}$ -vermittelten Aktivierung der ERK-MAPKn spricht, daß Signalkomponenten wie die Adapterproteine Shc und Grb2 sowie der Ras-GDP/GTP-Austauschfaktor Sos, Signalproteine also, die direkt mit Ras interagieren, eine wichtige Rolle bei der $G_{q/11}$ -vermittelten ERK-Aktivierung in verschiedenen Zellsystemen spielen (Lev *et al.*, 1995; Dikic *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996). Zur Untersuchung der Bedeutung von Ras in diesem Zusammenhang wurde von verschiedenen Gruppen das dominant negative Konstrukt N17-Ras eingesetzt, welches Guaninnukleotid-Austauschfaktoren des Ras, wie u. a. Sos, sequestriert. Marais *et al.* konnten in einer früheren Arbeit (1998) keinen Einfluß der dominant negativen Ras-Mutante, N17-Ras, auf die $G_{q/11}$ -induzierte ERK-Aktivierung feststellen. Im Widerspruch dazu stehen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde, nach denen die ERK-Aktivierung über zwei $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren, den GnRH-Rezeptor und den m_3 -muskarinergen Rezeptor, durch die Expression des N17-Ras in COS-7-Zellen einer signifikanten Inhibition unterlag. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz des GST-RBD-Minigenkonstruktes der direkte Beweis erbracht werden, daß die Aktivierung von G_q -Proteinen eine Zunahme der GTP-beladenen

Fraktion der Ras-Proteine in COS-7-Zellen und gonadotropen α T3-1-Zellen zur Folge hat. Eine mögliche Fehlerquelle, die zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Beteiligung von Ras an der $G_{q/11}$ -induzierten Signaltransduktion zu den MAPKs in COS-7-Zellen herangezogen werden könnte, stellt die signifikante Überexpression der G_q -gekoppelten Rezeptoren in einem heterologen Zellsystem dar. Durch diese könnten alternative Ras-unabhängige Signalwege zu den ERK-Isoformen eröffnet werden. Bei den für diese Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen überschreitet die Rezeptordichte an der Zellmembran nie Werte von 400 fmol/mg Protein (Grosse *et al.*, 1997), was eng mit den physiologischen B_{max} -Werten korreliert, die in Hypophysen von Mäusen und Ratten gemessen wurden (Horn *et al.*, 1991).

Es konnte weiterhin sowohl auf der Ebene von Ras als auch auf ERK-Ebene gezeigt werden, daß dominant negative Konstrukte von Signalkomponenten wie Shc (Shc-Y317F) oder dem EGFR (HER1-CD533) die Signaltransduktion des agonistenbesetzten GnRH-Rezeptors behindern. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Signalkomponenten, die proximal von Ras lokalisiert sind. Die GnRH-Stimulation von transient transfizierten COS-7-Zellen bewirkte eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung von Shc und eine PKC-abhängige funktionelle Aktivierung des EGFR.

6.1.4 Die Bedeutung von Src

Es existieren zahlreiche Studien, die der Src-Familie der zytosolischen Tyrosinkinase eine große Bedeutung bei der Übermittlung mitogener Signale durch G_i -gekoppelte Rezeptoren beimessen (Igishi und Gutkind, 1998). Für das Zellsystem transient transfizierter COS-7-Zellen wurde postuliert, daß c-Src durch eine direkte Assoziation die GPGR-induzierte Shc-Phosphorylierung vermittelt und auf diese Weise eine Verbindung zwischen GPGR und der Ras/ERK-Signalkaskade herstellt (Luttrell *et al.*, 1999b). In Übereinstimmung mit diesem Konzept standen die Befunde, nach denen sowohl in α T3-1-Zellen als auch im COS-7-Modell der Einsatz des spezifischen Src-Kinase-Inhibitors PP2 eine starke Hemmung der GnRH-induzierten ERK-Aktivierung zur Folge hatte. Die Expression des Csk-Minigenkonstruktes, welches die Src-Kinase inaktiviert, hatte in COS-7-Zellen einen vergleichbar starken inhibitorischen Effekt auf die GnRH-vermittelte ERK-Aktivität, der durch Expression der nicht funktionalen Csk-Mutante Csk222 nicht eintrat. Auch die GnRH-bedingte Akkumulation von Ras-GTP konnte durch die Csk-Mutante nahezu vollständig unterdrückt werden. Hingegen hatte die Src-Inaktivierung durch Csk keinen negativen Einfluß auf die Shc-

Tyrosinphosphorylierung, und zwar weder auf die Shc-Phosphorylierung durch den agonistenstimulierten GnRH-Rezeptor noch auf die EGF-abhängige Shc-Tyrosinphosphorylierung.

Benard *et al.* (2000) untersuchten ebenfalls die Signaltransduktion der GnRH-Rezeptor und vertreten eine Hypothese, nach der die ERK-Aktivierung durch GnRH zwei verschiedene Signalwege involviert, die auf der Ebene von Raf1 konvergieren. Der Hauptsignalweg verlief dabei über die direkte Aktivierung von Raf1 durch die PKC, und dieser Aktivierungsschritt sei partiell abhängig von einem zweiten Signalweg, der unter der Beteiligung von Src zu einer Ras-Aktivierung führe. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit eine GnRH-abhängige Tyrosinphosphorylierung des EGFR und des Adapterproteins Shc belegt werden, und der EGFR-Tyrosinkinase-spezifische Inhibitor AG1478 unterband die GnRH-induzierte ERK-Aktivierung fast vollständig. Würde der primäre Signaltransduktionsweg vom aktivierten GnRH-Rezeptor über die PKC und direkt zur Raf/MEK/ERK-Signalkaskade verlaufen, dürfte die Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase und die Expression einer dominant negativen EGFR-Mutante (HER1-CD533) keinen ausgeprägten negativen Effekt auf die ERK-Aktivierung durch GnRH zeigen.

Die zytoplasmatische Tyrosinkinase c-Src ist an so wichtigen zellulären Prozessen wie mitogener Signaltransduktion und Organisation des Zytoskeletts beteiligt (Belsches *et al.*, 1997). Zu den bekannten Substraten von Src gehören der EGFR, Shc, Komponenten des Zytoskeletts, Proteine des Endozytose-Apparates wie Dynamin und Clathrin sowie bestimmte Transkriptionsfaktoren (Wilde *et al.*, 1999). Die Ko-Expression des EGFR und von c-Src und der funktionelle Synergismus beider Tyrosininasen tragen zur zellulären Proliferation, Invasivität und Tumorförmation bei (Mae *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang wurde auch demonstriert, daß Src direkt an den EGFR bindet und zwei Tyrosinreste phosphoryliert, die außerhalb der Autophosphorylierungsstelle liegen und von denen einer entscheidend an der EGF-induzierten mitogenen Antwort in murinen Fibroblasten beteiligt ist (Biscardi *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 1999).

Die hier vorgestellten Befunde werden von Beobachtungen verschiedener anderer Forschungsgruppen unterstützt: (a) In vaskulären glatten Muskelzellen konnte die Angiotensin II (AT II)-induzierte EGFR-Tyrosinphosphorylierung durch Einsatz von PP1, einem Inhibitor der Src-ähnlichen Kinasen, blockiert werden (Bokemeyer, 2000). (b) Die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch das Neuropeptid YY (PYY) in

verschiedenen Zelltypen war von der Aktivierung sowohl der EGFR-Tyrosinkinase als auch der Src-Kinase abhängig (Mannon und Mele, 2000).

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist die Src-Kinase-Aktivität für die GnRH-vermittelte Aktivierung der ERK-Isoformen und von Ras von essentieller Bedeutung, die Shc-Aktivierung hingegen erfolgt Src-unabhängig. Dies läßt vermuten, daß Src in diesem System Ras unabhängig von Shc aktiviert. Trotzdem konnte die genaue Lokalisation der zytosolischen Tyrosinkinase innerhalb des Signalweges nicht geklärt werden. Allerdings handelt es sich bei der Übermittlung von extrazellulären Signalen von der Zellmembran in den Nukleus auch nicht um strikt linear verlaufende Prozesse. Die hier vorgelegten Daten dürfen somit nicht dahingehend interpretiert werden, daß die RTK-Transaktivierung der einzige Mechanismus ist, über den eine G_q /PKC-abhängige ERK-Aktivierung stattfindet. Vielmehr scheint die Funktion der EGFR-Transaktivierung in differenzierten gonadotropen Zellen in einer Modulation der Kinetik der mitogenen Signaltransmission zu bestehen.

6.2 Die Bedeutung der EGFR-Transaktivierung

Die hier vorgestellten Daten legen einen Signaltransduktionsmechanismus nahe, der vom $G_{q/11}$ -gekoppelten GnRH-Rezeptor über die Aktivierung der PKC bis zur Aktivierung der ERK-Isoformen verläuft und dazu die klassische EGFR-Ras-ERK-Kaskade nutzt. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Transaktivierung der EGFR-Tyrosinkinase für die Übermittlung GnRH-induzierter Signale in $\alpha T3-1$ -Zellen und transfizierten COS-7-Zellen von essentieller Bedeutung ist.

Obwohl mittlerweile vielfach gezeigt werden konnte, daß verschiedene G_i - und $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren über eine Tyrosinphosphorylierung von RTKs die MAPK-Signalkaskade aktivieren und so Proliferation und/oder Differenzierung der Zelle induzieren (Daub *et al.*, 1996; Zwick *et al.*, 1997; Schwartz und Baron, 1999; Gao *et al.*, 2001), ist der genaue molekulare Mechanismus der EGFR-Transaktivierung weiterhin unbekannt. Allerdings besteht kein Zweifel daran, daß GPGRn in Prozesse wie Mitogenese und zelluläre Transformation involviert sind, und Mutationen von GPGRn werden mit der Tumorfornation in vielen verschiedenen Zelltypen in Verbindung gebracht (Dhanasekaran *et al.*, 1995; Gudermann *et al.*, 2000).

Einige neuere Studien zeigen, daß für die EGFR-Transaktivierung durch verschiedene GPGR-Liganden (Thrombin, Endothelin, Carbachol und Bombesin) die Prozessierung

einer Vorstufe eines membranverankerten, EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors („heparin-binding EGF-like growth factor“, HB-EGF), des proHB-EGF, notwendig ist. Durch eine Inhibition der proHB-EGF-Prozessierung mittels eines potenten, nichtselektiven MMP-Inhibitors, dem Batimastat, konnte sowohl die GPGR-abhängige EGFR-Aktivierung als auch die Aktivierung der ERK-MAPKs blockiert werden (Prenzel *et al.*, 1999; Eguchi *et al.*, 2000; Kalmes *et al.*, 2000).

HB-EGF wird als membrangebundenes Vorläuferprotein (proHB-EGF) synthetisiert und setzt sich aus einer Signalpeptid-, Heparin-Bindungs-, EGF-ähnlichen-transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen (Higashiyama *et al.*, 1991). Nach der proteolytischen Abspaltung der Ektodomäne des proHB-EGF durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) bindet HB-EGF als löslicher Wachstumsfaktor an den EGFR und stimuliert dessen Phosphorylierung. Das lösliche HB-EGF stellt ein potentes Mitogen für verschiedene Zellarten dar (Higashiyama *et al.*, 1991) und agiert in einem autokrinen/parakrinen System. Neben dem HB-EGF sind noch andere EGF-ähnliche Faktoren in der Lage, direkt an den EGFR-Rezeptor zu binden: TGF α (transforming growth factor α), Amphiregulin, Betacellulin und Epiregulin (Riese und Stern, 1998). Jedes dieser Moleküle wird als transmembranärer Vorläufer synthetisiert und bei Expression in der Plasmamembran durch die proteolytische Freisetzung seiner Ektodomäne zum löslichen Wachstumsfaktor.

Regelmäßig erfolgt auf die Zellstimulation mit dem Phorbolster TPA eine rasche Konversion transmembranärer EGF-ähnlicher Vorläufermoleküle zu löslichen Wachstumsfaktoren. Diese Beobachtung legte eine Beteiligung der PKC an der Regulation der MMP-Aktivität nahe (Pandiella und Massagué, 1991; Goishi *et al.*, 1995). Izumi *et al.* gelang es 1998, die PKC δ als die PKC-Isoform zu identifizieren, die an der Regulation der HB-EGF-Abspaltung beteiligt ist. Derselben Gruppe gelang der Nachweis, daß ADAM9/MDC9, ein Mitglied der transmembranären ADAM-Familie (A disintegrin and metalloprotease), die eine Subgruppe der MMP bildet, eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit der PKC δ eingeht und so die PKC-abhängige Freisetzung des HB-EGF vermittelt. Jedoch blockierte die Expression einer dominant negativen Form von ADAM9/MDC9 die GPGR-induzierte Freisetzung von HB-EGF nicht (Prenzel *et al.*, 1999).

Obwohl in diesem Zusammenhang noch ein großer Forschungsbedarf besteht, da momentan weder die Gewebe- und Substratspezifität der beteiligten Metalloproteasen bekannt ist noch die Frage nach zusätzlichen Elementen des Signalweges, über den die

GPGR-induzierte Aktivierung der MMPn erfolgt, beantwortet werden kann (Gschwind *et al.*, 2001; Lowes *et al.*, 2002), mehren sich die Hinweise darauf, daß die Aktivierung von MMPn und die daraus resultierende Freisetzung potentieller EGFR-Liganden einen generellen Mechanismus vieler GPGRn in unterschiedlichen Zellsystemen darstellt. Bedeutung hat dieser Mechanismus der EGFR-Transaktivierung dabei sowohl in physiologischen (Eguchi *et al.*, 2000) als auch in pathologischen Zusammenhängen. So transaktiviert Prostaglandin E₂ (PGE₂) über den G_s-gekoppelten EP4-Rezeptor und die konsekutive Freisetzung des EGFR-Liganden TGF α den EGFR und induziert einen Anstieg der ERK2-Aktivität, der c-Fos mRNA-Expression und der Zellproliferation. Die PGE₂-induzierte EGFR-Tyrosinphosphorylierung und ERK-Aktivierung waren durch den MMI GM6001 inhibierbar. Darüber hinaus wurde durch den Einsatz des spezifischen Src-Inhibitors PP2 eine signifikante Reduktion der PGE₂-induzierten Aktivierung des EGFR und von ERK2 erreicht. Da in Proben aus kolorektalen Karzinomen erhöhte Konzentrationen an PGE₂ nachgewiesen werden konnten, ist ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen erhöhten lokalen PGE₂-Spiegeln und der Entstehung von Kolonpolyphen und -karzinomen denkbar (Pai *et al.*, 2002). Ein weiteres Beispiel ist die G_{q/11}-vermittelte Hypertrophie von Kardiomyozyten (Offermanns, 2001). So konnte bei chronischer Herzinsuffizienz ein Missverhältnis bei der Expression von MMPn und MMIn festgestellt werden (Spinale, 2002) und die progressive Hypertrophie der Herzmuskelzellen durch die Antagonisierung der ADAM12-vermittelten HB-EGF-Freisetzung gehemmt werden (Asakura *et al.*, 2002).

Aufgrund der zahlreichen Analogien könnte dieser Mechanismus der EGFR-Transaktivierung, der eine dreifache transmembranäre Signaltransmission voraussetzt (Prenzel *et al.*, 2000), auch dem hier dargestellten Signalweg zwischen GnRH-Rezeptor und den ERK-MAPKn zugrunde liegen. Die Transaktivierung von Mitgliedern der EGFR-Familie auch durch Zytokine und Integrine ist ein genereller Mechanismus in zahlreichen physiologischen und pathologischen zellulären Kontexten. Die Charakterisierung des exakten molekularen Mechanismus wird sowohl für die Grundlagenforschung als auch für klinisch-therapeutische Belange von großem Interesse sein.

7 Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPGRn) bilden die größte Familie von Zelloberflächenrezeptoren. Durch die Interaktion mit G-Proteinen transduzieren sie extrazelluläre Signale ins Zellinnere und kontrollieren durch die direkte oder indirekte Regulation verschiedener zellulärer Effektoren zahlreiche physiologische und pathophysiologische zelluläre Vorgänge. Ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle essentieller Prozesse wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und zelluläre Transformation verläuft dabei über die Aktivierung der ERK (extracellular signal-regulated kinase) -Subfamilie der MAPKs (Mitogene-aktivierte Proteinkinasen). Es sind mittlerweile viele Signalwege bekannt, die eine Verbindung zwischen GPGRn und der MAPK-Signalkaskade herstellen. Die Signaltransduktion der GPGRn entspricht einem komplexen intrazellulären Netzwerk, das auf den Prinzipien von Divergenz und Konvergenz basiert. So werden Signale, die verschiedenen Klassen oder Subtypen von Oberflächenrezeptoren entstammen, durch eine relativ kleine Anzahl zentraler Signalproteine integriert. Andererseits bewirkt die Aktivierung eines GPGR die Beeinflussung mehrerer verschiedener Effektorsysteme.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Signaltransmission $G_{q/11}$ -gekoppelter Rezeptoren zu den ERK-MAPKs am Beispiel des GnRH-Rezeptors. Der GnRH-Rezeptor gehört zu den Peptidhormonrezeptoren, die eine große und heterogene Gruppe innerhalb der heptahelikalen GPGRn bilden. Ziel dieser Arbeit war es, mit proteinchemischen und molekularbiologischen Methoden eine Charakterisierung der beteiligten Signalkomponenten vorzunehmen und Proteine zu identifizieren, die Konvergenzpunkte innerhalb der GnRH-induzierten Signalkaskade zu den ERK-Isoformen darstellen. Besonderes Interesse galt dabei der Partizipation und Lokalisation von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und zytosolischen Tyrosinkinasen. Der GnRH-Rezeptor wurde aufgrund einiger struktureller und funktioneller Rezeptorbesonderheiten für die Untersuchungen ausgewählt:

a) In gonadotropen Hypophysen-Zellen ist die Expression von Differenzierungsmarkern wie den α - und β -Untereinheiten der Glykoproteinhormone LH und FSH und des GnRH-Rezeptors von einer Aktivierung der ERK/MAPK-Kaskade abhängig.

b) Durch das unter allen GPGRn einmalige Fehlen des intrazellulären C-Terminus unterliegt der GnRH-Rezeptor keiner schnellen Rezeptordesensibilisierung. Dadurch

erfolgt die Rezeptor-Internalisierung außergewöhnlich langsam und dürfte auf die Expressionsrate an der Zelloberfläche während einer 5-10minütigen Agonistenstimulation von zu vernachlässigender Bedeutung sein.

c) Sowohl für den rekombinanten menschlichen GnRH-Rezeptor bei Expression in CHO- und COS-7-Zellen als auch für den endogenen GnRH-Rezeptor der Maus in α T3-1-Zellen war eine ausschließliche Kopplung an $G_{q/11}$ -Proteine nachgewiesen worden. Eine zusätzliche Aktivierung von G_i -Proteinen und ihnen nachgeordneten Effektorsystemen konnte somit ausgeschlossen werden, was die Interpretation der funktionellen Daten erleichterte.

Die Experimente wurden in zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt: in α T3-1-Zellen, einer immortalisierten Hypophysen-Zelllinie aus der Maus, in der die Zellen den GnRH-Rezeptor endogen exprimieren und in COS-7-Zellen, einer Nierenfibroblasten-Zelllinie, die sich durch ihre hohe Transfektionseffizienz auszeichnet. Als erstes sollte eine Charakterisierung der GnRH-abhängigen Aktivierung der ERK-MAPKs im physiologischem Zellmodell der α T3-1-Zellen erfolgen.

(1) Die Quantifizierung der schnellen GnRH-induzierten ERK-Aktivierung wurde in einem *in vitro*-Kinase-Assay vorgenommen. Durch den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren wurden verschiedene Signalproteine und sekundäre Botenstoffe gehemmt und der Effekt auf die ERK-Aktivierung gemessen. Es konnte festgestellt werden, daß die EGFR-Tyrosinkinase, die PKC, die zytosolische Tyrosinkinase Src und die Serin/Threonin-Kinase MEK an der Übermittlung des GnRH-induzierten Signals zu den ERK-Isoformen beteiligt waren. Ein Einfluß der intrazellulären Konzentration des „second messenger“ Ca^{2+} auf die ERK-Aktivität, der für andere Zellsysteme beschrieben ist, konnte in diesem spezifischen Zellmodell nicht bestätigt werden.

(2) Die effektive Manipulation einzelner Komponenten des GnRH-Rezeptor/ERK-Signalweges machte Transfektionsexperimente erforderlich. Diese wurden zunächst in der leichter transfizierbaren COS-7-Zelllinie durchgeführt, in der verschiedene dominant negative Signalproteine und der menschliche GnRH-Rezeptor transient exprimiert wurden. Diese Versuche ließen vermuten, daß die Signaltransmission des GnRH-Rezeptor zu den ERK-Isoformen ausschließlich durch G_α -Untereinheiten der $G_{q/11}$ -Proteine erfolgt. Eine Beteiligung der Src-Kinase und der EGFR-Tyrosinkinase an der ERK-Aktivierung durch GnRH war auch in dieser Versuchsanordnung nachweisbar.

Weiterhin schienen folgende Proteine Bestandteil der Signalkette zwischen dem aktivierten GnRH-Rezeptor und ERK2 zu sein: die Serin/Threonin-Kinase Raf, das kleine zytosolischen G-Protein Ras und das Adapterproteins Shc. Durch den spezifischen EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 konnte die GnRH-induzierte ERK-Aktivierung sowohl in α T3-1-Zellen als auch in transient transfizierten COS-7-Zellen signifikant unterdrückt werden.

(3) Da insbesondere die Rolle von Ras innerhalb der $G_{q/11}$ -abhängigen ERK-Aktivierung in der Literatur umstritten war, sollte eine weitergehende Charakterisierung der GnRH-stimulierten Ras-Aktivität in beiden Zellsystemen unternommen werden. Zu diesem Zweck wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem das Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein an die Ras-Bindungsdomäne von Raf1 gekoppelt ist. Dieses Konstrukt bietet die Möglichkeit die GTP-gebundene und damit aktivierte Form von Ras aus Zellysaten zu präzipitieren. Mit Hilfe dieser Methode konnte der direkte Beweis erbracht werden, daß eine GnRH-Behandlung der Zelllinien eine vermehrte Aktivierung von Ras zur Folge hat. Darüber hinaus konnten Signalproteine identifiziert werden, die an der Übermittlung des GnRH-induzierten Signals an Ras mitwirken. Dazu zählen die PKC, Src, die EGFR-Tyrosinkinase und Shc. Nach direkter Aktivierung der PKC durch eine kurze Stimulation der Zellen mit dem Phorbolster TPA konnte eine ERK- und Ras-Aktivierung festgestellt werden, die in ihrem Ausmaß dem GnRH-induzierten Aktivierungsgrad entsprach. Die Beobachtung, daß durch den EGFR-Tyrosinkinase-spezifischen Hemmstoff AG1478 eine Inhibition der TPA-abhängigen Ras-Aktivierung zu erreichen war, ließ eine Lokalisation der PKC proximal des EGFR vermuten.

(4) Weitere Untersuchungen in COS-7-Zellen zeigten eine GnRH- und TPA-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR und des Adapterproteins Shc.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, daß die Aktivierung von Ras und ERK in COS-7-Zellen wie auch in gonadotropen α T3-1-Zellen von der Aktivität der EGFR- und der Src-Tyrosinkinase abhängen und daß beide Kinasen funktionell distal der PKC agieren. Die GnRH-abhängige Transaktivierung des EGFR in gonadotropen Zellen erfolgt sehr schnell und führt zur Aktivierung der klassischen ERK/MAPK-Kaskade.

In der EGFR-Transaktivierung durch den $G_{q/11}$ -gekoppelten GnRH-Rezeptor in gonadotropen Zellen verdeutlicht sich die physiologische Bedeutung des „Crosstalk“ zwischen verschiedenen Familien von Zelloberflächenrezeptoren.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent (volume/volume)
% (w/v)	Gewichtsprozent (weight/volume)
βARK	β-adrenerge Rezeptorkinase
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Phosphat
Blot-AK	Immunoblot-Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
Csk	C-terminale Src-Kinase
d-	Desoxy-
DAG	Diacylglycerin
dd-	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	EGF-Rezeptor
ERK	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase
FCS	Fötale Kälberserum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon/ Gonadoliberin
GPGR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP-AK	Immunpräzipitations-Antikörper
JNK	c-jun N-terminal phosphorylierende Kinase
kDa	Kilodalton
LH	luteinisierendes Hormon
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Mol pro Liter
mA	Milliampère

MAPK	durch Mitogene aktivierte Proteinkinase
MBP	myelin basic protein
MEK	MAPK/ERK Kinasen
MMI	Matrixmetalloproteinase-Inhibitor
MMP	Matrixmetalloproteinase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat-buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbolster (12-myristat-13-acetat)
POD	Peroxidase
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-bindende-Domäne
PTPase	Proteintyrosin-Phosphatase
PTX	Exotoxin von <i>Bordetella pertussis</i> („Pertussistoxin)
P-Tyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
RBD	Ras-bindende Domäne
Reblot-AK	Re-Immunblot-Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S.D.	Standardabweichung (standard deviation)
SAPK	streßaktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SH2-Domäne	Src-homology 2-Domäne
Sos	Son of sevenless
TGF-α	transforming growth factor- α
TM	Transmembranhelix
TMD	Transmembrandomänen
TNFα	Tumor necrosis factor- α
TPA	Tumor promoter activator
TRH	Thyreotropin-Releasinghormon, Thyreoliberin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

8.2 Literaturverzeichnis

Anderson, L., Hoyland, J., Mason, W.T., Eidne, K.A. (1992): Characterization of the gonadotropin-releasing hormone calcium response in single α T3-1 pituitary gonadotroph cells. *Mol. Cell Endocrinol.* **86**: 167-175

Antoni, F.A., Barnard, R.J.O., Shipston, M.J., Smith, S.M., Simpson, J., Paterson, J.M. (1995): Calcineurin feedback inhibition of agonist-evoked cAMP formation. *J. Biol. Chem.* **270**: 28055-28061

Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M., Higashiyama, S. (2002): Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.* **8**: 35-40

Baldwin, J.M. (1993): The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**: 1693-1703

Baldwin, J.M. (1994): Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 180-190

Belsches, A.P., Haskell, M.D., Parsons, S.J. (1997): Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Frontiers in Biosciences* **2**: 501-518

Benard, O., Naor, Z., Seger, R. (2000): Role of dynamin, src and ras in the PKC-mediated activation of by the gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* **276**: 4554-4563

Berridge, M.J. (1993) : Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* **361**: 315-325

Berts, A., Zhong, H., Minneman, K.P. (1999): No role for Ca^{++} or protein kinase C in alpha-1A adrenergic receptor activation of mitogen-activated protein kinase pathways in transfected PC12 cells. *Mol. Pharmacol.* **55**: 296-303

Biesen, T. van, 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

Biesen, T. van, Luttrell, L.M., Hawes, B.E., Lefkowitz, R.J. (1996): Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **17**: 698-714

Birnbaumer, L., Abramowitz, J., Brown, A.M. (1990) : Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1031**: 163-224

- Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, L.E., Leu, T.H., Parsons, S.J. (1999): c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyr845 and tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J. Biol. Chem.* **274**: 8335-8343
- Bokemeyer, D., Schmitz, U., Kramer, H.J. (2000): Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor. *Kidney International* **58**: 549-558
- Brannock, M.T., Weng, K., Robinson, P.R. (1999): Rhodopsin's carboxyl-terminal threonines are required for wild-type arrestin-mediated quench of transducin activation in vitro. *Biochemistry* **38**: 3770-3777
- Cai, H., Erhardt, P., Troppmair, J., Diaz-Meco, M.T., Sithanandam, G., Rapp, U.R., Moscat, J., Cooper, G.M. (1993). Hydrolysis of phosphatidylcholine couples Ras to activation of Raf protein kinase during mitogenic signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7645-7651
- Call, G.B., Wolfe, M.W. (1999): Gonadotropin-releasing hormone activates the equine luteinizing hormone beta promoter through a protein kinase C/mitogen-activated kinase pathway. *Biol. Reprod.* **61**: 715-723
- Carpenter, G. (1999): Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J. Cell Biol.* **146**: 697-707
- Chang, L., Karin, M. (2001): Mamalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40
- Charlesworth, A., Rozengurt, E. (1997): Bombesin and neuromedin B stimulate the activation of p42 (mapk) and p74 (raf-1) via a protein kinase C-independent pathway in Rat-1 cells. *Oncogene* **14**: 2323-2329
- Chen, Y., Gral, L.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, Z., Beers Gibson, T., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.H. (2001): MAP Kinases. *Chem Rev.* **101**: 2449-2476
- Chi, L., Zhou, W., Prikhozhan, A., Flanagan, C., Davidson, J.S., Golembo, M., Illing, N., Millar, R.P., Sealfon, S.C. (1993) : Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Mol. Cell Endocrinol.* **90**: R1-R6
- Clapham, D.E., Neer, E.J. (1993): New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**: 403-406
- Clapham, D.E., Neer, E.J. (1997): G protein beta gamma subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 167-203
- Coffer, P.J., Burgering, B.M., Peppelenbosch, M.P., Bos, J.L., Kruijer, W. (1995): UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene* **11**: 561-569
- Conklin, B.R., Bourne, H.R. (1993): Structural elements of G α -subunits that interact with G $\beta\gamma$ receptors and effectors. *Cell* **73**: 631-641

- Conn, P.M., Crowley, W.F. Jr. (1994): Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu. Rev. Med.* **45**: 391-405
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Gutkind, J.S. (1995): The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146
- Coussens, L.M., Fingleton, B., Matrisian, L.M. (2002): Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* **295**: 2387-2392
- Crespo, P., Cachero, T.G., Xu, N., Gutkind, J.S. (1995): Dual effect of β -adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 25259-25265
- 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
- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1997): Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **379**: 557-560
- 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, U., Wallasch, C., Ullrich, A. (1996): Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379**: 557-560
- Davis, R.J. (1995): Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Reprod. Dev.* **42**: 459-467
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., Davis, R.J. (1994): JNK1: a protein kinase stimulated by UV-light and HA-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-1037
- DeWaard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E.S., Gurnett, C.A., Campell, K.P. (1997): Direct binding of g-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* **385**: 446-460
- Dhanasekaran, N., Heasley, L.E., Johnson, G.L. (1995): G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. *Endocrin. Rev.* **16**: 259-270
- 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
- Downward, J. (1997): Cell cycle: routine role for Ras. *Curr. Biol.* **7**: 258-260
- Egan, S.E., Giddings, B.W., Brooks, M.W., Buday, L., Sizeland, A.M., Weinberg, R.A., (1993): Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363**: 45-51
- Eguchi, S., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Motley, E.D., Inagami, T. (2000): Activation of MAP kinases by Angiotensin II in vascular smooth muscle cells: metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAP kinase, but not for JNK. *J. Biol. Chem.* **276**: 7957-62

- Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakava, T., Utsunomiya, H., Motley, E.K., Kawakatsu, H., Owada, K.N., Hirata, Y., Murumo, 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
- Emons, G., Ortmann, O., Pahwa, G.S., Hackenberger, R., Oberheuser, F., Schulz, K.D. (1992): Intracellular actions of gonadotropic and peptide hormones and the therapeutic value of GnRH-agonists in ovarian cancer. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* **155**: 31-38
- Exton, J.H. (1997): Regulation of phosphoinositide phospholipases by G-proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **400A**: 3-8
- Fan, H., Derynck, R., (1999): Ectodomain shedding of TGF- α and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *EMBO J.* **18**: 6962-6972
- Farfel, Z., Bourne, H.R., Iiri, T (1999): The expanding spectrum of G protein diseases. *N. Engl. J. Med.* **340**: 1012-1020
- Ferguson, S.S.G. (2001): Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitisation and signalling. *Pharmacol. Rev.* **53**: 1-24
- Ferguson, S.S.G., Barak, L.S., Zhang, J., Caron, M.G. (1996): G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled kinases and arrestins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**: 1095-1110
- Flower, D.R. (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**: 207-234
- Gao, Y., Thang, S., Zhou, S., Ware, J.A. (2001): The thromboxane A₂ receptor activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C-dependent G_i coupling and Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**: 426-433
- Geer, P. van der, Hunter, T., Lindberg, R.A. (1994): Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **10**: 251-337
- Geer, P. van der, Wiley, S., Gish, G.D., Pawson, T. (1996): The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions. *Curr. Biol.* **6**: 1435-1444
- Gershengorn, M.C., Osman, R. (2001): Insight into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* **142**: 2-10
- Gether, U., Kobilka, B.K. (1998): G-protein-coupled receptors. II. Mechanisms of agonist activation. *J. Biochem Chem.* **273**: 17979-17982
- Gibson, T.J., Hyvonen, M., Musacchio, A., Saraste, M. (1994): PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 349-353

- Goishi, K., Higashiyama, S., Klagsbrun, M., Nakano, N., Umata, T., Ishikawa, M., Mekada, E., taniguchi, N. (1995): Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. *Mol. Biol. Cell* **6**: 967-980
- Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., Benovic, J.L. (1996): Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *Nature* **383**: 447-450
- Goor, F. van, Zivadinovic, D., Martinez-Fuentes, A.J., Stojilkovic, S.S. (2001): Dependence of pituitary hormone secretion on the pattern of spontaneous voltage-gated calcium influx. *J. Biol. Chem.* **276**: 33840-33846
- Grigorieff, N., Ceska, T.A., Downing, K.H., Baldwin, J.M., Henderson, R. (1996): Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **259**: 393-421
- Grosse, R., Schmid, A., Schöneberg, T., Herrlich, A., Muhn, P., Schultz, G., Gudermann, T. (2000): Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G_{q/11}. *J. Biol. Chem.* **275**: 9193-9200
- Grosse, R., Schöneberg, T., Schultz, G., Gudermann, T. (1997): Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor. *Mol. Endocrinol.* **11**: 1305-1318
- Gründker, C., Günthert, A.R., Westphalen, S., Emons, G. (2002): Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *European J. Endocrin.* **146**: 1-14
- Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., Ullrich, A. (2001): Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as a paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* **20**: 1594-1600
- Gudermann, T., Grosse, R., Schultz, G. (2000): Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **361**: 345-362
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F., Schultz, G. (1996): Diversity and selectivity of receptor-G-protein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**: 429-459
- Gustafson, T.A., He, W., Craparo, A., Schaub, C.D., O'Neill, T.J. (1995): Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol. Cell Biol* **15**: 2500-2508
- Gutkind, J.S. (1998): Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* **17**: 1331-1342
- Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N., Ullrich, A. (1999): Epidermal growth factor receptor: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 184-189
- Hamm, H.E., Gilchrist, A. (1996): Heterotrimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**: 189-196

- Hanoune, J., Defer, N. (2001): Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 145-174
- Haug, W., Alessandrini, A., Crews, C.M., Erikson, R.L. (1993): Raf1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10947-10951
- Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990): Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J.* **4**: 2881-2889
- Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, J.W., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (1995): Distinct pathways of G_i- and G_q-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem* **270**: 17148-17153
- Heding, A., Vrecl, M., Bogerd, J., McGregor, A., Sellar, R., Taylor, P.L., Eidne, A.E. (1998): Gonadotropin-releasing hormone receptors with intracellular carboxyl-terminal tails undergo acute desensitization of total inositol phosphat production and exhibit accelerated internalization kinetics. *J. Biol. Chem.* **273**: 11472-11477
- Heldin, C.H. (1991): SH2 domains: elements that control protein interactions during signal transduction. *Trends Biol. Sci.* **16**: 450-452
- Heldin, C.H. (1996): Protein tyrosine kinase receptors. *Cancer Surv.* **27**: 7-24
- Helmreich, E.J.M. (2001): *The Biochemistry of Cell Signalling*. Oxford
- Hepler, J.R., Gilman, A.G. (1992): G proteins. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 383-387
- Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., Catterall, W.A. (1996): Modulation of Ca²⁺ channels by G protein beta gamma subunits. *Nature* **380**: 258-262
- Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G., Gudermann, T. (1998): Ligand-independent activation of the PDGF receptor is a necessary intermediate in LPA-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**: 8985-8990
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M. (1993): Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-jun activation domain. *Genes Dev.* **7**: 2135-2148
- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., Schultz, G. (1999): Direct activation of human TRP6 and TRP9 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**: 259-263
- Horn, F., Bilezikjian, L.M., Perrin, M.H., Bosma, M.M., Windle, J.J., Huber, K.S., Bount, A.L., Hille, B., Vale, W., Mellon, P.L. (1991): Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage. *Mol. Endocrinol.* **5**: 347-355
- Huirne, J.A., Lambalk, C.B. (2001): Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet* **358**: 1793-803
- Hurowitz, E.H., Melnyk, J.M., Chen, Y.J., Kouros-Mehr, H., Simon, M.I., Shizuya, H. (2000): Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes. *DNA Res.* **7**: 111-120

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. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **244**: 5-10

Ip, Y.T., Davis, R.J. (1998) : Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)- from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**: 205-219

Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S. (1998): A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- γ /ADAM9 and PKC δ are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membran-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17**: 7260-7272

Jallal, B., Schlessinger, J., Ullrich, A. (1992): Tyrosine phosphatase inhibition permits analysis of signal transduction complexes in p185HER2/neu-overexpressing human tumor cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 4357-4363

Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1992): Tracing the routes of ion channels. *Cell* **69**: 715-718

Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1997): Receptor-regulated ion channels. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**: 155-160

Kaiser, U.B., Conn, P.M., Chin, W.W. (1997): Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr. Rev.* **18**: 46-70

Kalmes, A., Vesti, B.R., Daum, G., Abraham, J.A., Clowes, A.W. (2000): Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of EGF receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ. Res.* **87**: 92-98

Kaplan, J. (1981): Polypeptid-binding membrane receptors: analysis and classification. *Science* **212**: 14-20

Kashles, O., Yarden, Y., Fischer, R., Ullrich, A., Schlessinger, J. (1991): A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1454-1463

Kavanaugh, W.M., Williams, L.T. (1994): An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* **266**: 1862-1865

King, C.R., Borrello, I., Porter, L., Comoglio, P., Schlessinger, J. (1989): Ligand-independent tyrosine phosphorylation of EGF receptor and the erbB-2/neu proto-oncogene product is induced by hyperosmotic shock. *Oncogene* **4**: 13-18

Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A., Herrlich, P. (1996): Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as a target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15**: 5314-5325

Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F. (1991): SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmatic signaling proteins. *Science* **252**: 668-674

Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F., Lefkowitz, R.J. (1994): Direct evidence that G_i-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by Gβγ activation of p21ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **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

Kovalenko, M., Gazit, A., Bohmer, A., Rorsman, C., Ronnstrand, N., Heldin, C.H., Waltenberger, J., Bohmer, F.D., Levitzki, A. (1994): Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation. *Cancer Res.* **54**: 6106-6114

Kunkel, M.T., Peralta, E.G. (1995): Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels. *Cell* **83**: 443-449

Kyriakis, J.M., Avruch, J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**: 807-869

Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G. (2000): The interaction of β arrestin with the AP-2 adaptor, rather than clathrin, is required for the clustering of β2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* **275**: 23120-23126

Laugwitz, K.L., Allgeier, A., Offermanns, S., van Sande, J., Spicher, K., Dumont, J.E., Schultz, G. (1996): The human tyrotropin receptor: a heptahelical receptor stimulating members of all four G protein families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 116-120

Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, Rolf, Pouyssegur, J. (1996) : Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/44^{MAPK} and negatively by the p38/HOG^{MAPK} pathway. *J. Biol. Chem* **271**: 20608-20616

Lefkowitz, R.J. (1998) : G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem* **273**: 18677-18680

Lefkowitz, R.J. (1993): G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74**: 409-412

Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. (2000): Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* **350**: 1-18

Lemmon, M.A., Schlessinger, J. (1994): Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 459-463

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 Ca²⁺-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

Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* **74**: 49-139

Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., Karin, M. (1995): Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* **268**: 286-290

Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S., Wetzker, R. (1997): Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI3-kinase gamma. *Science* **275**: 394-397

Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., Schlessinger, J. (1992): The SH2 and SH3 domain-containing protein Grb2 links receptor tyrosine kinases to Ras signaling. *Cell* **70**: 431-442

Lowes, V.L., Ip, N.Y., Wong, Y.H. (2002): Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals* **11**: 5-19

Luttrell, L. M., Hawes, B. E., van Biesen, T., Luttrell, D. K., Lansing, T. J., Lefkowitz, R. J. (1996): Role of c-Src tyrosin kinase in G protein-coupled receptor- and G $\beta\gamma$ subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 19443-19450

Luttrell, L.M., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. (1999a): Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 177-183

Luttrell, L.M., Ferguson, S.S.G., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F.T., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1999b): β -arrestin-dependent formation of β_2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**: 655-616

Maa, M.C., Leu, T.H., McCarley, D.J., Schatzman, R.C., Parsons, S.J. (1995): Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6981-6985

Macara, I.G., Lounsbury, K.M., Richards, S.A., McKiernan, C., Bar-Sagi, D. (1996) : The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J.* **10**: 625-630

Macias, M.J., Wiesner, S, Sudol, M. (2002): WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.* **513**: 30-37

Mannon, P.J., Mele, J.M. (2000): Peptide YY Y1 receptor activates mitogen-activated protein kinase and proliferation in gut epithelial cells via the epidermal growth factor receptor. *Biochem. J.* **350**: 655-661

Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M.F., Marshall, C.J. (1998): Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf1 by protein kinase C. *Science* **280**: 109-112

Marais, R., Marshall, R.J. (1996): Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv.* **27**: 101-125

Margolis, B. (1992): Proteins with SH2 domain: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth Differ.* **3**: 73-80

- Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-188
- Mayer, B.J., Ren, R., Clark, K.L., Baltimore, D. (1993): A putative modular domain present in diverse signalling molecules. *Cell* **73**: 629-630
- McArdle, C.A., Franklin, J., Green, L., Hislop, J.N. (2002): Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *J. Endocrinol.* **173**: 1-11
- McKinnon, L.A., Rosoff, M., Hamilton, S.E., Schlador, M.L., Thomas, S.L., Nathanson, N.M. (1997): Regulation of muscarinic receptor expression and function in cultured cells and in knock-out mice. *Life Sci.* **60**: 1101-1104
- Meier, R., Rouse, J., Cuenda, A., Nebreda, A.R., Cohen, P. (1996): *Eur. J. Biochem.* **236**: 796
- Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A.E., Pelicci, G., Lai, K.M., Superti-Furga, G., Pawson, T., Di Fiore, P.P., Lanfrancone, L., Pelicci, P.G. (1997): Opposite effects of the p52/p46shc and p66shc splicing isoforms of the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J.* **16**: 706-716
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A., Karin, M. (1995): Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**: 1147-1157
- Mochly-Rosen, D., Kauvar, L.M. (1998): Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv. Pharmacol.* **44**: 91-145
- Mons, N., Decorte, L., Jaffard, R., Cooper, D.M. (1995): Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sci.* **62**: 1647-1652
- Morrison, D.K., Cutler, R.E. (1997): The complexity of Raf1 activation. *Curr. opin. Cell. Biol.* **9**: 174-179
- Mulvaney, J.M., Zhang, T., Fewtrell, C., Roberson, M.S. (1999): Calcium influx through L-type channels is required for selective activation of extracellular signal-regulated kinase by gonadotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* **274**: 29796-29804
- Nada, S., Yagi, T., Takeda, H., Tokunaga, T., Nakagawa, H., Ikawa, Y., Okada, M., Aizawa, S. (1993): Constitutive activation of Src family kinases in mouse embryos that lack Csk. *Cell* **73**: 394-397
- Neubig, R.R. (1994): Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.* **8**: 939-946
- Nishizuka, Y. (1995): Protein kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **7**: 484-496
- Nishizuka, Y. (1992): Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-614

Nürnberg, B., Gudermann, T., Schultz, G. (1995): Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: Structure and function. *J. Mol. Med.* **73**: 123-132

Obermeier, A., Tinhofer, I., Grunicke, H.H., Ullrich, A. (1996): Transforming potentials of epidermal growth factor and nerve growth factor receptors inversely correlate with their phospholipase C gamma affinity and signal activation. *EMBO J.* **15**: 73-82

Offermanns, S. (2001): Der G_q/G₁₁-vermittelte zelluläre Signalweg und seine Bedeutung für kardiale Erkrankungen. *Z. Kardiol.* **90**: 601-606

Offermanns, S., Schultz, G. (1994): Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**: 329-338

Offermanns, S., Wieland, T., Homann, D., Sandmann, J., Bombien, E., Spicher, K., Schultz, G., Jakobs, K.H. (1994): Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to G_i-type G proteins and G_{q/11}. *Mol. Pharmacol.* **45**: 890-898

Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E. (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19**: 3159-3167

Pagès, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J., Meloche, S., Pouyssegur, J. (1993): Mitogen-activated protein kinases p42^{mapk} and p44^{mapk} are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8319-8329

Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I.L., Pavelka, M., Baatar, D., Tarnawski, A.S. (2002): Prostaglandin E₂ transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nature Medicine* **8**: 289-293

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Miyano, M. (2000): Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-745

Palomero, T., Barros, F., del Camino, D., Vilorio, C.G., de la Pena, P. (1998): A G protein beta gamma dimer-mediated pathway contributes to mitogen-activated protein kinase activation by thyrotropin-releasing hormone receptors in transfected COS-7 cells. *Mol. Pharmacol.* **53**: 613-622

Pandiella, A., Massagué, J. (1991): Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor- α precursor. *J. Biol. Chem.* **266**: 5769-5773

Pawson, T. (1995): Protein modules and signaling networks. *Nature* **373**: 573-380

Pellicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T., Pellicci, P.G. (1992): A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* **70**: 93-104

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

Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M., Ullrich, A. (2000): Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res.* **2**: 184-190

Raab, G., Klagsbrun, M. (1997): Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**: F179-F199

Redemann, N., Holzmann, B., von Ruden, T., Wagner, E.F., Schlessinger, J., Ullrich, A. (1992): Anti-oncogenic activity of signalling-defective epidermal growth factor receptor mutants. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 491-498

Reiss, N., Llevi, L.N., Shacham, S., Harris, D., Seger, R., Naor, Z. (1997): Mechanism of mitogen-activated protein kinase activation by gonadotropin-releasing hormone in the pituitary of alphaT3-1 cell line: differential roles of calcium and protein kinase C. A role for mitogen-activated kinase in mediating activation of the glykoprotein hormone α -subunit promoter by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **138**: 1673-1682

Reuveny, E., Slesinger, P.A., Inglese, J., Morales, J.M., Iniguez-Lluhi, J.A., Lefkowitz, R.J., Bourne, H.R., Jan, Y.N., Jan, L.Y. (1994): Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature* **14**: 143-146

Riese, D.J. II, Stern, D.F. (1998): Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *BioEssays* **20**: 41-48

Roberson, M.S., Misra-Press, A., Laurance, M.E., Stork, P.J., Maurer, R.A. (1995): A role for mitogen-activated protein kinase in mediating activation of the glycoprotein hormone alpha-subunit promoter by gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Cell Biol.* **15** : 3531-3539

Robinson, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W. (1968): Cyclic AMP. *Ann. Rev. Biochem.* **37**: 149-174

Robinson, M.J., Cobb, M.H. (1997) : Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**: 180-186

Rooij, J. de, Bos, J.L. (1997): Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* **14** : 623-625

Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L. (1994) : Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* **371**: 252-254

Rozakis-Adcock, M, McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G. (1992): Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing protein is implicated in the activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* **360**: 689-692

Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T., Bowtell, D. (1993): The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* **363**: 83-85

Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J. (1994): Involvement of growth factor receptor in the mammalian UVC response. *Cell* **78**: 963-972

Schertler, G.F.X., Villa, C., Henderson, R. (1993): Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362**: 770-772

Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., Sieg, D.J. (1999): Signaling through focal adhesion kinase. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **71**: 435-478

Schlessinger, J. (1994): SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 25-30

Schlessinger, J., Ullrich, A. (1992): Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* **9**: 383-391

Schultz, G. (1994): G-proteins involved in hormonal regulations of the cytoplasmatic calcium concentrations. Berlin.

Schwartz, M.A., Baron, V. (1999): Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 197-202

Schwindinger, W.F., Robishaw, J.D. (2001): Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**: 1653-1660

Simon, M.I., Strathmann, M.P., Gautam, N. (1991): Diversity in G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802-808

Singer, W.D., Brown, H.A., Sternweis, P.C. (1997): Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Ann. Rev. Biochem.* **66**: 475-509

Smrcka, A.V., Sternweis, P.C. (1993): Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* **268**: 9667-9674

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 P_{2Y2} receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 23110-23117

Spinale, F.G. (2002): Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ. Res.* **90**: 520-30

Stoffel, R.H., Inglese, J., Macrae, A.D., Lefkowitz, R.J., Premont, R.T. (1998): Palmitoylation increases the kinase activity of the G protein-coupled receptor kinase, GRK6. *Biochemistry* **37**: 16053-16059

Stojilkovic, S.S., Reinhart, J., Catt, K.J. (1994): Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr. Rev.* **15**: 462-499

Strawn, L.M., Mann, E., Elliger, S.S., Chu, L.M., Germain, L.L., Niederfellner, G., Ullrich, A., Shawver, L.K. (1994): Inhibition of glioma cell growth by a truncated platelet-derived growth factor- β -receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 21215-21222

Stricker, N.L., Christopherson, K.S., Yi, B.A., Schatz, P.J., Raab, R.W., Dawes, G., Basset, D.E., Bredt, D.S., Li, M. (1997): PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognition novel C-terminal peptide sequences. *Nature Biotech.* **15**: 336-342

- Su, B., Karin, M. (1996): Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 402-411
- Sudol, M. (1998): From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the "protein recognition code". *Oncogene* **17**: 1469-1474
- Sundaresan, S., Colin, I.M., Pestell, R.G., Jameson, J.L. (1996): Stimulation of the mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence of the involvement of protein kinase C. *Endocrinology* **137**: 304-311
- Swanson, K.D., Reigh, C., Landreth, G.E. (1998): ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2 purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *J. Biol. Chem.* **273**: 19965-19971
- Taussig, R., Gilman, A.G. (1995): Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **270**: 1-4
- Tice, D.A., Bscardi, J.S., Nickles, A.L., Parson, S.J. (1999): Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1415-1420
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
- Treisman, R. (1996): Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**: 205-215
- Ullrich, A., Schlessinger, J. (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**: 203-212
- Unwin, N. (1993): Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Neuron* **10**: 31-41
- Vacher P. (1995): Gn-RH agonists in the treatment of prostatic carcinoma. *Biomed. Pharmacother.* **49**: 325-331
- Vrecl, M., Anderson, L., Hanyaloglu, A., McGregor, A.M., Groarke, A.D., Milligan, G., Taylor, P.L., Eidne, K.A. (1998) : Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotroin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics. *Mol. Endocrinol.* **12**: 1818-1829
- Wallasch, C., Weiss, F.U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W., Ullrich, A. (1995): Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J.* **14**: 4267-4275
- Watson, S., Arkistall, S. (1994): *The G-Protein-Receptor-Facts book*. London.
- Westermarck, J., Kähäri, V.-M. (1999): Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* **13**: 781-792

White, B.R., Duval, D.L., Mulvaney, J.M., Roberson, M.S., Clay, C.M.. (1999): Homologous regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene is partially mediated by protein kinase C activation of an activator protein-1 element. *Mol. Endocrinol.* **13**: 566-577

Wickman, K.D., Iniguez-Lluhi, J.A., Davenport, P.A., Taussig, R., Krapivinsky, G.B., Linder, M.E., Gilman, A.E., Clapham, D.E. (1994): Recombinant G-protein $\beta\gamma$ subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel. *Nature* **368**: 255-257

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999): Mitogen activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**: 143-180

Wilde, A., Beattie, E.C., Lem, L., Riethof, D.A., Liu, S.H., Mobley, W.C., Soriano, P., Bridsky, F.M. (1999): EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* **96**: 677-687

Willars, G.B., Heding, A., Vrecl, M., Sellar, R., Blumenröhr, M., Nahorski, S.R., Eidne, K.A. (1999): Lack of a C-terminal tail in the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor confers resistance to agonist-dependent phosphorylation and rapid desensitization. *J. Biol. Chem.* **42**: 30146-30153

Windle, J.J., Weiner, R.I., Mellon, P.L. (1990): Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* **4**: 597-603

Wonerow, P., Schöneberg, T., Schultz, G., Gudermann, T., Paschke, R. (1998): Deletions in the third intracellular loop of the thyrotropin receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 7900-7905

Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K., Ullrich, A. (1997): Critical role of calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cells membrane depolarization and bradykinin signaling. *J. Biol. Chem.* **272**: 24767-24770

Zwick, E., Hackel, P.O., Prenzel, N., Ullrich, A. (1999): The EGF receptor as a central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**: 408-412

8.3 Veröffentlichungshinweis

Aus den in dieser Arbeit vorgestellten Daten resultierte folgende Veröffentlichung:

Grosse, R., Roelle, S., Herrlich A., Höhn, J., Gudermann, T. (2000): Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Mediate Ras Activation by Gonadotropin-releasing Hormone. *J. Biol. Chem.* **275**: 12251-12260.

8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Berlin

Ahrens	Hahn	Schiffter
Arastéh	Helmchen	Schimmelpfennig
Bauknecht	Marx	Schultz
Brennecke	Orfanos	Stein
Buhr	Reutter	Studt
Foerster	Rothschild	Waldschmidt
Gaedicke	Rüden	Weber

Marburg

Gudermann

Oldenburg

Baer

Hoffmann

Potsdam

Kursawe

8.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit in Berlin und Marburg.

Ich danke meiner Familie. Ihr habt mich immer und jeder auf seine besondere Art unterstützt und alle einen Anteil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle sagen, wie wichtig ihre konstruktive Kritik und liebevolle Anteilnahme für mich gewesen sind.

Michael, Dir danke ich für Dein Verständnis, Deine Geduld, Deinen Glauben an mich und für die Mediation bei manchem Computer-Anwender-Konflikt.

Gedankt sei Herrn Prof. Dr. Günther Schultz für die wertvollen Erfahrungen, die mir in seinem Institut zuteil wurden und für seine persönliche Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Robert Grosse für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit sowie Susanne Roelle und Thomas Hofmann für die Zusammenarbeit und das Lösen vieler kleinerer und größerer praktischer Probleme danken.

Ulrich Severin hat in hohem Maße dazu beigetragen, daß ich meine „Laborzeit“ als eine gute in Erinnerung behalten werde und mir bewiesen, daß es tatsächlich Menschen gibt, die noch schlechter rechnen können als ich.