

**Der Mechanismus der Phorbol ester-induzierten Ras-Aktivierung in COS7-  
Zellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

von

**Knut Rennert**

Diplom-Biochemiker

geboren am 22. November 1976 in Berlin

**Dissertation eingereicht am**

**15. 9. 2005**

**1. Gutachter**

**Prof. Dr. Reinhard Wetzker**

**2. Gutachter**

**Prof. Dr. Claus Liebmann**

**3. Gutachter**

**Prof. Dr. Bernd Nürnberg**

**Mündliche Prüfung am**

**18. 11. 2005**

**Verteidigung am**

**19. 12. 2005**

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
2.1. DIE RAS -SUPERFAMILIE DER MONOMEREN KLEINEN GTPASEN .....	4
2.1.1. Struktur der kleinen GTPasen .....	5
2.1.2. Posttranslationale Modifikationen der kleinen GTPasen .....	6
2.1.3. Regulation der kleinen GTPasen .....	8
2.2. DIE RAS-SUBFAMILIE .....	10
2.2.1. Ha-,N- und Ki-Ras .....	11
2.2.2. Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEF) für Ras .....	11
2.2.3. GTPase aktivierende Proteine (GAP) für Ras .....	13
2.2.4. Aktivierung von Ras durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen .....	13
2.2.5. Ras und seine Effektoren .....	14
2.2.6. Die Ras-Erk-Kaskade .....	15
2.3. DER PHORBOLESTER 12-O-TETRADECANOYLPHORBOL-13-ACETAT (TPA) .....	17
2.3.1. Die Proteinkinase C- Familie .....	18
2.3.2. Die RasGRP-Familie .....	20
2.3.3. TPA und Ras .....	21
2.4. EGFR-TRANSAKTIVIERUNG .....	22
2.5. ZIELE DER ARBEIT .....	25
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>26</b>
3.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE MATERIALIEN UND METHODEN .....	26
3.1.1. Bakterienstämme .....	26
3.1.2. Plasmide .....	26
3.1.3. Arbeiten mit DNS .....	27
3.1.4. Proteinaufreinigung .....	28
3.2. ZELLBIOLOGISCHE MATERIALIEN UND METHODEN .....	30
3.2.1. Etablierte eukaryotische Zelllinien .....	30
3.2.2. Zellkultur .....	31
3.2.3. Der RasGTP-Pulldown .....	32
3.2.4. Immunpräzipitation (IP) .....	32
3.2.5. Isolation von Heparin-bindenden Proteinen .....	33
3.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot .....	34
3.2.7. Untersuchung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) durch In-Gel-Assays .....	36
3.2.8. Antikörper .....	38
3.2.9. Laborchemikalien .....	39
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>41</b>
4.1. DOSIS- UND ZEITABHÄNGIGKEIT DER TPA-INDUZIERTEN RAS-AKTIVIERUNG .....	42

## I. Inhaltsverzeichnis

---

4.2. TPA TRANSAKTIVIERT DEN EGFR UND FÜHRT ZU SHC-TYROSIN-PHOSPHORYLIERUNG UND ERHÖHTER SHC/GRB2-INTERAKTION.....	43
4.3. DIE ROLLE DES EGFR/SHC-SIGNALWEGES IN DER DURCH TPA-AUSGELÖSTEN RASGTP-AKKUMULATION .....	45
4.4. DER EINFLUSS PROTEOLYTISCH FREIGESETZTER EGF-LIGANDEN AUF DIE TPA-INDUZIERTER RAS-AKTIVIERUNG .....	47
4.5. DIE ROLLE VON REAKTIVEN SAUERSTOFF SPEZIES (ROS) IN DER TPA-BEDINGTEN RAS-AKTIVIERUNG ..	50
4.6. DER EINFLUSS VON PROTEINKINASE C (PKC) AUF BASALES RASGTP .....	53
4.7. PKC-INHIBITION FÜHRT ZUR KOMPLETTEN BLOCKADE DER TPA-INDUZIERTEN RAS-AKTIVIERUNG .....	55
4.8. ZUSAMMENFASSUNG DER EFFEKTE DER EGFR- UND PKC-INHIBITION AUF DIE RASGTP-NIVEAUS .....	58
4.9. DER EINFLUSS INTRAZELLULÄRER $Ca^{2+}$ -SIGNALE AUF DIE TPA-INDUZIERTER RAS-AKTIVIERUNG .....	61
4.10. DER MEK-INHIBITOR PD98059 ERHÖHT DIE TPA-INDUZIERTER RAS-AKTIVIERUNG .....	62
4.11. EINFLUSS VON RSK2 AUF DIE RASGTP-AKKUMULATION AUSGELÖST DURCH TPA.....	65
4.12. DIE ROLLE DER PI3-KINASE UND IHRER SIGNALWEITERGABE IN DER TPA-INDUZIERTER RAS-AKTIVIERUNG .....	67
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
5.1. ZEIT- UND DOSISABHÄNGIGKEIT DER TPA-INDUZIERTEN RAS-AKTIVIERUNG.....	71
5.2. TPA TRANSAKTIVIERT DEN EGFR UND FÜHRT ZU SHC-PHOSPHORYLIERUNG UND ERHÖHTER SHC/GRB2-INTERAKTION. ....	72
5.3. DER EGFR/SHC-SIGNALWEG IST NICHT WICHTIG FÜR DIE TPA-AUSGELÖSTE RASGTP-AKKUMULATION.	73
5.4. PROTEOLYTISCH FREIGESETZTE EGF-LIGANDEN ZEIGEN KEINEN EFFEKT AUF DIE TPA-INDUZIERTER RAS-AKTIVIERUNG. ....	75
5.5. REAKTIVEN SAUERSTOFF-SPEZIES (ROS) SIND NICHT IN DIE RAS-AKTIVIERUNG AUSGELÖST DURCH TPA INVOLVIERT. ....	78
5.6. DER EINFLUSS VON PROTEINKINASE C AUF BASALES RASGTP .....	79
5.7. DIE INHIBITION VON PKC FÜHRT ZUR KOMPLETTEN BLOCKIERUNG DER TPA-INDUZIERTEN RAS-AKTIVIERUNG. ....	80
5.8. INTRAZELLULÄRE $Ca^{2+}$ -KONZENTRATION HABEN NUR EINEN MARGINALEN EINFLUSS AUF DIE TPA-INDUZIERTER RAS-AKTIVIERUNG.....	82
5.9. DER MEK-INHIBITOR PD98059 ERHÖHT DIE TPA INDUZIERTER RAS-AKTIVIERUNG.....	84
5.10. BIM I-SENSITIVE KINASEN NEBEN PKC HABEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE RASGTP-AKKUMULATION AUSGELÖST DURCH TPA.....	86
5.11. TPA INDUZIERT EGFR-ABHÄNGIG DIE SERIN-PHOSPHORYLIERUNG VON AKT.....	86
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>III. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>V</b>
<b>IV. DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>VI</b>
<b>V. LEBENS LAUF .....</b>	<b>VII</b>
<b>VI. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>VIII</b>

## 1. Zusammenfassung

Schnelle und präzise Reaktionen auf extra- und intrazelluläre Signale sind essentiell für das Überleben von Zellen. Diese werden durch ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionswegen integriert und koordiniert. Ein Signalprotein, welches Abschnitte dieses Netzwerks reguliert, ist die kleine GTPase Ras. Diese stellt einen binären molekularen Schalter dar, der im inaktiven GDP-gebundenen und aktiven GTP-gebundenen Zustand vorkommt. Ras kann durch eine Vielzahl extra- und intrazellulärer Stimuli und ihre Analoga aktiviert werden, wobei die Regulation der Ras-Aktivität durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) erfolgt. Der Phorbolester und das DAG-Analogon TPA stellt einen dieser Stimuli dar, für den eine Vielzahl an zum Teil exklusiven Mechanismen der Ras-Aktivierung vorgeschlagen wurde. So gehen einige Arbeitsgruppen davon aus, dass TPA zur RasGAP-Hemmung führt, wogegen andere eine RasGRP- oder Sos-vermittelte erhöhte Guaninnukleotid-Austausch-Rate am Ras nach TPA-Behandlung beobachteten. Untersuchungen, dass TPA zur Transaktivierung des EGFR führt, bestärkten die Annahme, dass der RasGEF Sos die TPA-induzierte Ras-Aktivierung vermittelt. Jedoch ist es schwierig eine RasGEF-Stimulation mit den Daten zu vereinen, die demonstrieren, dass dominant negatives N17-Ras die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung nicht beeinträchtigt. Auch wurde bisher noch keine Verbindung zwischen TPA und der Inaktivierung von RasGAP gefunden.

In dieser Arbeit wurde daher der Mechanismus der TPA-induzierten Ras-Aktivierung in COS7-Zellen näher untersucht und es konnte demonstriert werden, dass TPA-Stimulation in der Freisetzung von endogenen EGF-Liganden und in einer PKC-abhängigen Aktivierung des EGFR-Signalweges und von Ras und Erk resultierte. Erstmals konnte demonstriert werden, dass zwar die basale Ras-Aktivität abhängig vom EGFR und der HB-EGF-Freisetzung ist, die Aktivierung von Ras nach TPA-Behandlung dagegen nicht durch den EGFR und HB-EGF vermittelt wurde. Weiterhin konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass TPA-Stimulation zur Bildung von ROS führte, die in einer Inhibierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen resultierte. Die ROS-Bildung mündete zudem in einer EGFR-Aktivierung, die jedoch nicht die Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung bedingte. Die Untersuchungen der EGFR-, HB-EGF- und ROS-Hemmung entkoppeln somit den EGFR von der TPA-induzierten Ras-Aktivierung. Auch belegen die Beobachtungen, dass die EGFR-, Ras- und Erk-Aktivierung nach TPA-Behandlung PKC-abhängig sind und der EGFR diese Ras- und Erk-Aktivierung

indes nicht vermittelt, eindeutig, dass die Ras-Aktivierung und die Aktivierung des EGFR-Signalweges parallel ablaufende Ereignisse sind, die reine Koinzidenzen darstellen. Welcher Signalweg durch die TPA-bedingte EGFR-Phosphorylierung aktiviert wird, konnte sodann in weiteren Experimenten zum ersten Mal gezeigt werden, als TPA-Stimulation zu PKC-, EGFR- und PI3-Kinase-abhängiger Akt-Phosphorylierung am Serin 473 führte. Als Vermittler der TPA-induzierten Ras- und Erk-Aktivierung kommen dagegen nur PKC in Frage, da diese nicht basales RasGTP, jedoch TPA-induziertes hemmen. Wie Ras nach TPA-Stimulation aktiviert wird, konnte jedoch nicht weiter aufgeklärt werden. Es ist nur bekannt, dass TPA den Guaninnukleotid-Austausch am Ras erhöht, was jedoch nicht durch N17-Ras zu hemmen ist. Eine mögliche Verbindung zwischen TPA und Ras könnte phosphoryliertes Sos darstellen. Sos zeigt nach TPA-Stimulation einen mobility shift in SDS-PAA-Gelen, der EGFR-unabhängig und PKC-abhängig ist. Somit folgt dieser dem gleichen Muster wie die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung. Möglicherweise zeigt phosphoryliertes Sos eine verringerte Affinität für N17-Ras oder es ist in anderen Membrandomänen lokalisiert als N17-Ras und kann daher auch den Guaninnukleotid-Austausch am Ras im Hintergrund einer N17-Ras-Expression erhöhen. Diesen Vermutungen sollte mit weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

## 2. Einleitung

Über Jahrmillionen entwickelte sich auf der Erde Leben vom einzelligen Bakterium bis hin zum multizellulären Organismus wie dem des Säugetiers. Diese Entwicklung war nur möglich, da Zellen die Fähigkeit besitzen, auf eine Vielzahl von extra- wie auch intrazellulären Signalen schnell und präzise zu reagieren. Hierbei werden die Antworten durch ein Netzwerk von Signalübertragungswegen integriert und koordiniert. Sie stellen dabei den Austausch und die Übertragung der Information zwischen verschiedenen Geweben, Zellen und den Zellkompartimenten sicher. So werden Signale zwischen den Zellen durch sezernierte Proteine, wie Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine und innerhalb der Zelle zum Beispiel durch kleine Botenstoffe, wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) übertragen. Diese Liganden binden daraufhin an ihren „Rezeptor“, aktivieren ihn und geben dabei die Information in bzw. durch die Zelle weiter, was in einer Zellantwort, wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung oder Migration, resultieren kann. Die Wichtigkeit der Signaltransduktion für die Zelle und ihre Umgebung spiegelt sich dabei im hohen Anteil der Gene für signalübertragende Proteine im Genom wider.

Heute nimmt man an, dass 12% der humanen Gene für Proteine codieren, die in die Signaltransduktion involviert sind [1]. Die Moleküle der Signalübertragung arbeiten dabei in einer gesunden Zelle gut aufeinander abgestimmt. Wichtig hierfür sind z.B. die richtige zeitlich-räumliche Lokalisation und eine strikt geregelte Aktivierung/Inaktivierung der Proteine. Eine veränderte Lokalisation oder eine verlängerte bzw. verkürzte Aktivierung eines Signalproteins können verheerende Folgen für die Zellfunktion haben. So führt eine Mutation im epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor(EGFR)-Gen zu verlängerter Aktivierung des exprimierten EGFR-Protein [2, 3]. Dies mündet in einem verstärkten Signalfluss, was wiederum in erhöhter Genexpression und Zellproliferation resultiert. Letzteres ist eine der Voraussetzungen für die Entstehung von Krebs [4]. Diese und weitere Studien an Karzinomen, welche EGFR-Überexpression [5] und autokrine EGFR-Stimulation [6] offenbarten, lieferten den Beweis, dass das EGFR-Gen ein Proto-Onkogen ist.

Ein weiteres Proto-Onkogen, das in Säugetieren exprimiert wird und Signaltransduktionsaktivität besitzt, ist die kleine GTPase Ras (von Rat-Sarkoma). Ras gehört zu den am häufigsten aktivierten Onkogenen in Tumoren und war eines der ersten Onkogene, die mit humanem Krebs in Zusammenhang gebracht werden konnten. Die Funktion der Ras-Proteine stellt die koordinierte Weiterleitung der eintretenden Signale in verschiedene

Signalwege der Zelle dar. Ras agiert hier als binärer molekularer Schalter. Dabei ist Ras nicht das einzige Protein mit diesem Charakteristikum. Die Forschung fand in den zwanzig Jahren nach der Entdeckung von Ras eine Vielzahl von Proteinen, die Gemeinsamkeiten mit Ras aufweisen. Diese Proteine teilen die Eigenschaft, dass sie Guaninnukleotid-bindende Proteine (GNBP) darstellen. Es wird geschätzt, dass in einer eukaryotischen Zelle bis zu 150 GNBP exprimiert werden, die in heterotrimere G-Proteine, Ras-verwandte Proteine, Faktoren der Proteinsynthese und weitere weniger abundante Familien unterteilt werden [7]. Die Ras-verwandten Proteine werden in der Ras-Superfamilie der monomeren kleinen GTPasen zusammengefasst.

### ***2.1. Die Ras -Superfamilie der monomeren kleinen GTPasen***

Die Mitglieder dieser Familie kommen, im Gegensatz zu den im Komplex auftretenden heterotrimeren G-Proteinen, als Guanin-Nukleotid bindende Monomere vor. Mit einem Molekulargewicht von 20-35 kDa sind sie, verglichen mit den heterotrimeren G-Proteinen, klein und werden daher als „kleine GTPasen“ bezeichnet. Allen Mitgliedern dieser Superfamilie ist gemein, dass sie eine hohe Affinität für GDP/GTP (Bindekonstanten von bis zu  $10^{11} \text{M}^{-1}$ ) besitzen und als binäre molekulare Schalter in der Zelle fungieren. Zudem weisen viele der „kleinen GTPasen“ eine geringe intrinsische GDP/GTP-Austausch- und GTP-Hydrolyse-Rate [7].

Die Ras-Superfamilie der monomeren kleinen GTPasen umfasst in menschlichen Zellen mehr als 150 Mitglieder, mit während der Evolution konservierten Orthologen in *S.cerevisiae*, *S.pombe*, *Dictyostlium*, *D.melanogaster*, Pflanzen und *C.elegans*, die aufgrund ihrer Struktur, Funktion und Sequenzähnlichkeiten in Subfamilien unterteilt werden [8].

Die Ras-Subfamilie reguliert Proliferation, Differentiation und das Überleben der Zelle [9]. Die Ran-Subfamilie ist essentiell für den nukleo-zytoplasmatischen Transport von Proteinen und RNAs, *nuclear envelope*-Bildung und Assemblierung des mitotischen Spindelapparates [10-13]. Die Organisation des Actin-Zytoskeletts wird durch die Proteine der Rho-Familie reguliert [14, 15]. GTPasen der Rho-Subfamilie sind wie Ras an der Regulation des Zellzykluses in der G1 Phase beteiligt [16]. Die größte Subfamilie der Ras-Superfamilie stellt die der Rab-Proteine dar. Diese umfasst in Säugetier-Zellen mehr als 60 Rab-Proteine. Ihre Aufgabe ist, wie auch die der Sar1/Arf-Subfamilie, die Regulation des intrazellulären Vesikeltransports [10]. Die Funktion der Rad/Gem/Kir-Subfamilie ist noch weitgehend

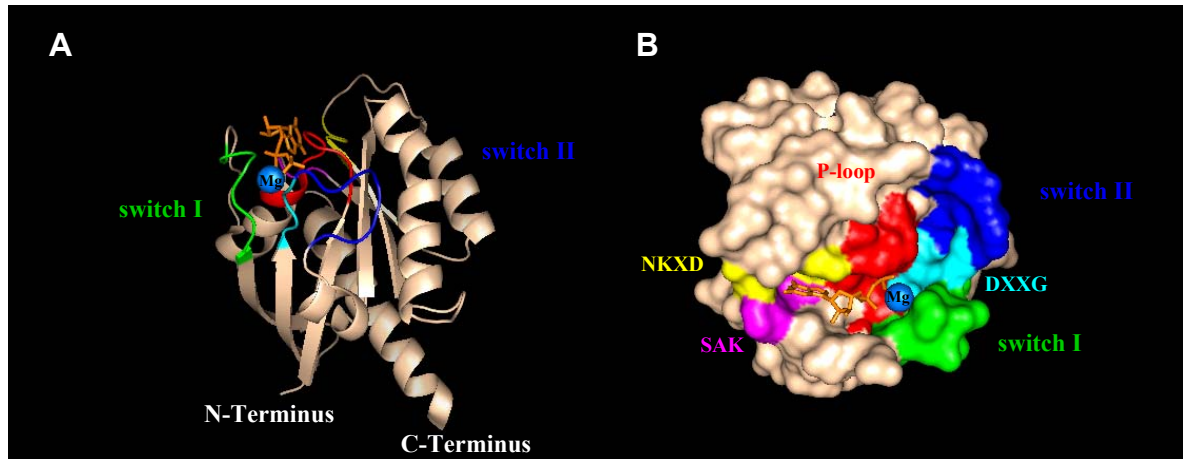


unbekannt. Experimente mit Gem in *S.cerevisiae* gaben einen ersten Hinweis, dass diese Proteine an der Neuordnung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sein könnten. Zudem konnte in Neuroblastoma-Zellen gezeigt werden, dass Gem die Neuriten-Retraktion, die durch Aktivierung von ROCK I ausgelöst wird, umkehren kann [17].

### 2.1.1. Struktur der kleinen GTPasen

Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Ras-Protein-Superfamilie verschiedenartiger Spezies konnten zeigen, dass die Primärstrukturen konserviert sind und die Homologie untereinander zwischen 30-55% beträgt. Innerhalb der Ras-Subfamilie teilen die Proteine eine relativ hohe Aminosäure-Identität von 50-55%, wogegen die Rho- und Rab-Proteine nur zu etwa 30 % mit den Aminosäuresequenzen der Ras-Proteine übereinstimmen [18, 19].

Der Ras-Superfamilie ist eine Domäne eigen, die als grundlegende Funktion die Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse ausführt. Diese ungefähr 20 kDa große Domäne, auch G-Domäne genannt, zeigt unter den kleinen GTPasen universelle Struktur und einen universellen Schaltmechanismus. Kristallographische und NMR-Analysen der GTPasen H-, N-Ras, Rap2A, Ran, Arf1, Rab3 und 7, RhoA und Rac1 offenbarten, dass die G-Domäne dieser Mitglieder der Ras-Superfamilie fünf konservierte Motive besitzen [20]. Diese sind für die GDP/GTP- und Effektor-Bindung und somit für die Funktion der GTPase essentiell. Beginnend am N-Terminus sei zuerst das GXXXXGKS/T-Motiv genannt. Dieser Bereich wird auch als P-Loop (phosphate binding loop) bezeichnet, weil in dieser Region die Aminosäuren für die Bindung des  $\beta,\gamma$ -Phosphats des Guanin-Nukleotids liegen. Das zweite konservierte Motiv liegt in der switch I Region und besteht nur aus einem Threonin. Die Spezifität für Guanin wird durch das dritte konservierte Motiv, DXXG, sichergestellt. Hinzu kommt, dass das N/TKXD-Motiv mit der Nukleotid-Base wechselwirkt. Das SAK-Motiv sorgt zusammen mit DXXG für Guanin-Spezifität. Die Tertiärstruktur der G-Domäne und die räumliche Lage der konservierten Motive sind in Abbildung 1 gezeigt.



**Abbildung 1: Struktur der G-Domäne von Ha-Ras**

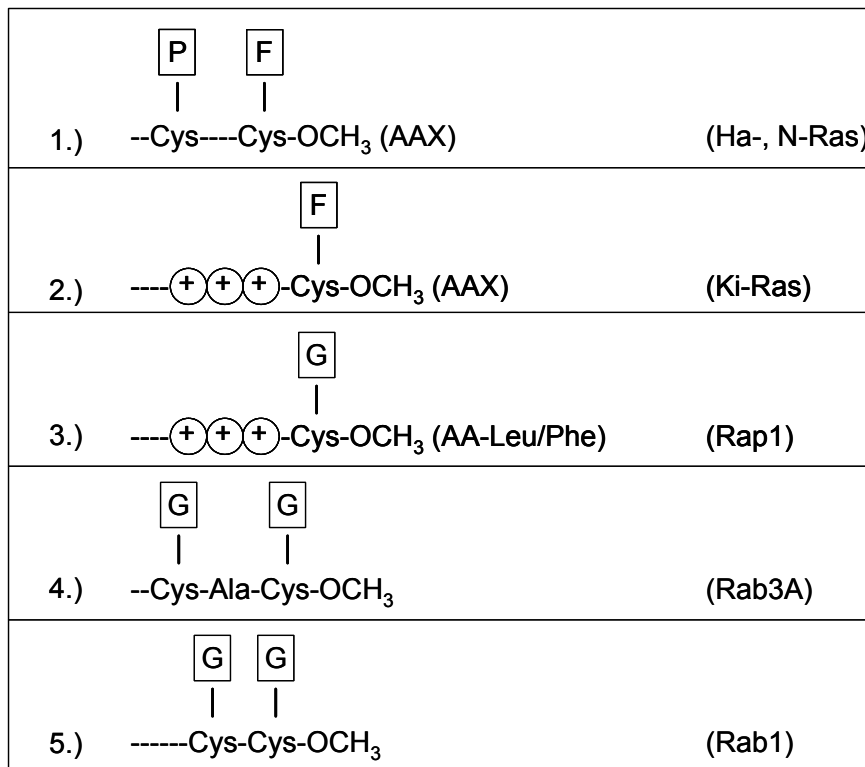
**A:** Tertiärstruktur der G-Domäne von Ha-Ras mit seinen 5 konservierten Regionen

**B:** Blick in die Guaninnukleotid-Bindestelle von Ha-Ras

**Rot:** GXXXXGKS/T-Motiv (P-loop), **Grün:** switch I mit T35, **Hellblau:** DXXG-Motiv, **Blau:** Switch II, **Gelb:** NKXD-Motiv, **Lila:** SAK-Motiv, **Orange:** GDP, Magnesium als blaue Kugel (Mg) dargestellt; G-Domäne aus 1Q21.pdb unter Zuhilfenahme von PyMol dargestellt.

### 2.1.2. Posttranslationale Modifikationen der kleinen GTPasen

Für ihre komplette physiologische Funktionalität benötigt die Mehrzahl der Ras-Superfamilie Proteine ein weiteres Charakteristikum. Hierbei handelt es sich um mit Lipiden posttranslational modifizierte Aminosäurereste. Durch die lipid-bedingte individuell erhöhte Hydrophobizität der Proteine assoziieren diese mit den für ihre biologische Aktivität wichtigen Membrantypen, wie Golgi- und Plasmamembran. Zudem wird durch diese Modifikationen die korrekte subzelluläre Lokalisation dieser Signalproteine sichergestellt. Die Modifizierungen zeigen unter den GTPasen wesentliche Unterschiede. So wird Arf N-terminal am Glycin mit einem Myristoyl-Rest [21] und Ras-, Rap- und Rab-Proteine C-terminal modifiziert. Die C-terminalen Modifikationen werden in fünf verschiedene Gruppen unterteilt, die in Abbildung 2 dargestellt sind. Ran, Sar1, Miro, und Rit benötigen dagegen keine posttranslationalen Modifizierungen für ihre Funktionen.



**Abbildung 2: Die C-terminalen Regionen der Ras-Proteine können in fünf Gruppen unterteilt werden:**

1.) Ha- und N-Ras werden palmitoyliert und farnesyliert, die kurze sich C-terminal anschließende Sequenz AAX wird proteolytisch entfernt und das nun C-terminale Cystein wird carboxymethyliert. 2.) Ki-Ras wird in derselben Art modifiziert wie Ha- und N-Ras, allerdings besitzt es eine polybasische Region vor dem C-terminalen Cystein anstatt des palmitoylierten Cysteins. 3.) Rap1 wird geranylgeranyliert, das kurze C-terminale Peptid AAL/P wird proteolytisch entfernt und das C-terminale Cystein wird carboxymethyliert. Rap1 besitzt wie Ki-Ras eine polybasische Region. 4.) Rab3A besitzt zwei Cysteine die geranylgeranyliert sind und das C-terminale ist carboxymethyliert. 5.) In Rab1 ist die Cys-Cys-Sequenz geranylgeranyliert, das C-terminale Cys ist carboxymethyliert. P: Palmitoylierung, F: Farnesylierung, G: Geranylgeranylierung; OCH<sub>3</sub>: Methylierung, +: polybasische Region, A: aliphatische Aminosäure, X: irgendeine Aminosäure

Am Beispiel von Ras sei ein posttranslativ Modifizierungsprozess demonstriert. Zuerst befestigt die zytoplasmatisch lokalisierte Farnesyltransferase eine Farnesylgruppe am Cystein des CAAX-Motivs [22]. Diese stabile Modifikation führt zur Lokalisation von Ras in der dem Zytoplasma zugewandten Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Die hier lokalisierte Endopeptidase Rce1 (Ras and a-factor converting enzyme) entfernt das Tripeptid AAX [23, 24]. Anschließend wird die  $\alpha$ -Carboxyl-Gruppe des nun C-terminalen Farnesyl-Cysteins durch die Icmt (Isoprenylcystein-Carboxyl-Methyltransferase) mit Hilfe von S-Adenosylmethionin methyliert [25, 26]. Um zur Plasmamembran zu gelangen, nehmen die Ras-Isoformen zwei verschiedene Wege. Ras besitzt dafür Isoform-spezifische Membranzielesequenzen, die direkt N-terminal vom farnesylierten Cystein liegen. H- und N-Ras werden am/an Cystein/en durch die Ras-Palmitoyl-Transferase palmitoyliert [27, 28] und gelangen über exozytotische Mechanismen durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran

[29, 30]. Zudem wurde kürzlich entdeckt, dass ein permanenter Zyklus an De- und Reacylierung die spezifische Lokalisation von palmitoylierten Ras-Isoformen an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat erklärt und den schnellen Austausch zwischen beiden Protein-Pools antreibt [31]. Nach Depalmitoylierung von posttranslational modifizierten Ras, kommt es zu einer schnellen Neuverteilung des noch farnesylierten Ras auf alle zellulären Membranen, wobei die Repalmitoylierung am Golgi-Apparat erfolgt und Ras wieder über exozytotische Mechanismen zur Plasmamembran gelangt [31]. K-Ras, welches eine polybasische Sequenz anstelle von Cysteinen besitzt, umgeht den Golgi und erreicht die Plasmamembran durch einen noch nicht entschlüsselten Mechanismus. Allerdings wurden einige Mechanismen für den K-Ras Transport angeboten. Eine Publikation zeigt, dass die polybasische Sequenz von K-Ras ausreicht, um eine Diffusion des Proteins vom ER entlang eines elektrostatischen Gradienten zur negativ geladenen Plasmamembran anzutreiben [32]. Eine weitere Möglichkeit wäre ein Mikrotubuli-abhängiger Prozess des Ki-Ras-Transports zur Plasmamembran, da Ki-Ras *in vitro* mit Mikrotubuli interagieren kann, wenn es prenyliert und methyliert ist [33].

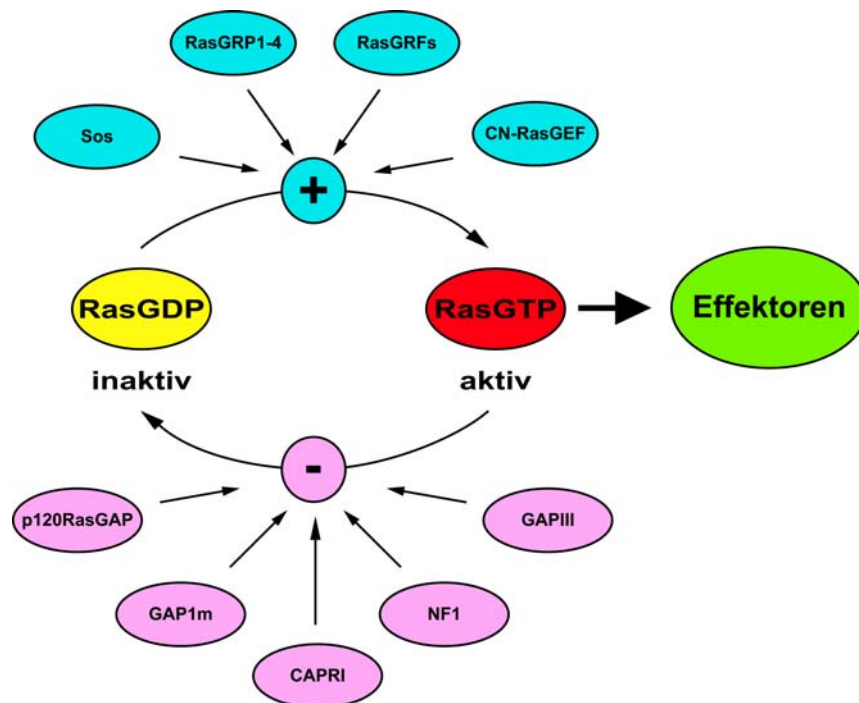
### 2.1.3. Regulation der kleinen GTPasen

Die kleinen GTPasen kommen in zwei verschiedenen Zuständen vor, dem inaktiven, GDP-gebundenen, und dem aktivem, GTP-gebundenem. Die Umwandlung vom inaktiven in den aktiven Zustand wird dabei durch die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) vermittelt. Diese beschleunigen die Freisetzung des gebundenen Guaninnukleotids von der GDP/GTP-Bindestelle der GTPase. Sobald das Guaninnukleotid von Ras dissoziiert, wird GTP aufgrund seiner 50-fach höheren intrazellulären Konzentration gegenüber GDP und der hohen Affinität zur GTPase die GDP/GTP-Bindestelle besetzen [34]. Die GTP-Bindung führt daraufhin zu Konformationsänderungen in den switch I- und II-Regionen, wobei das Effektor-Binde-Motiv exponiert wird [35-37]. Nun kann die aktive GTPase mit Effektoren assoziieren und das Signal an Zielproteine weitergeben. Unter Effektoren versteht man Proteine, die sehr viel stärker mit der GTP-gebundenen Form wechselwirken als mit der GDP-gebundenen der Ras-verwandten GTPase [38].

Zur Terminierung der Signalweiterleitung muss das Protein wieder in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand übergehen. Jede GTPase besitzt dafür eine intrinsische Hydrolase-Aktivität, welche das  $\gamma$ -Phosphat des GTPs abspalten kann. Diese Aktivität variiert jedoch

## 2. Einleitung

stark unter den verschiedenen GTPasen und ist zudem ein langsamer Prozeß mit einer Halbwertszeit im Minuten- bis Stundenbereich. Somit würde der Zelle die Möglichkeit genommen werden, schnell und adäquat auf sich ändernde extra- wie auch intrazelluläre Signale zu reagieren. Hilfe bieten hier GTPase aktivierende Proteine (GAP), welche die intrinsische Hydrolase-Aktivität drastisch erhöhen können (Halbwertszeit von Millisekunden bis Sekunden) und eine strikt geregelte Signalweitergabe sicherstellen [39]. Die erhöhte Hydrolase-Aktivität führt schließlich zur Spaltung von GTP zu GDP und  $P_i$ , was in der Dissoziation des GTPase/Effektor-Komplexes und einer Beendigung der Signalweitergabe resultiert. Die Regulation des GDP/GTP-Zyklus von Ras durch RasGEF und RasGAP ist schematisch in Abbildung 3 gezeigt.



**Abbildung 3: Schematischer Überblick der Regulation des GDP/GTP-Zyklus von Ras**

Ras kann durch eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli aktiviert werden. Vermittelt wird dies durch verschiedene Proteine, wie die Rezeptortyrosinkinasen (RTK), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Integrine und *second messenger*, wie Diacylglycerol (DAG),  $Ca^{2+}$  und cAMP und ihre Analoga. Der Zyklus zwischen inaktivem Ras-GDP und aktivem Ras-GTP wird durch verschiedene gewebetypische Ras-Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (RasGEF; hellblau) und Ras-GTPase-aktivierende Proteine (RasGAP; rosa) reguliert. Aktives Ras interagiert mit seinen Effektoren und stellt somit eine kontrollierte Signalweitergabe sicher.

Das koordinierte Zusammenspiel von GEF und GAP reguliert somit die Aktivität der GTPase. Abweichungen in dieser Balance können schwerwiegende Folgen für die Zelle haben. So führt zum einen der Verlust von beiden Allelen des Ras-GAP NF-1 zur Entwicklung maligner Tumore im Nervensystem [40], zum anderen wirken Mutationen an Aminosäurerest 12, 13

und 61 von Ha-Ras transformierend, da diese die intrinsische GTPase-Aktivität von Ha-Ras stark verringern und somit das aktivierte Ha-Ras länger mit Effektoren interagieren kann, was einer verlängerten Signalweitergabe gleichkommt [41]. Mutierte Formen der drei humanen Ras-Gene wurden in circa 30% aller humanen Krebsarten gefunden. Besonders häufig sind Ras-Gen-Mutationen in Karzinomen der Pankreas (90%), des Dickdarms (50%) und der Lunge (10%) [10].

Mitglieder der Rab- und Rho-Familie werden zudem durch eine weitere Gruppe von Proteinen reguliert, die als Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI) bezeichnet werden. Rho- und Rab-GDI sind dabei aktiv an allen Rho/Rac/Cdc42- und Rab-Proteinen. Ihre Aufgabe ist das Verbergen des Prenylrestes der Rho- und Rab-Proteine, die daraufhin im GDP-beladenen inaktiven Zustand im Zytoplasma verbleiben [42]. Die Dissoziation von Rab-GDI und endosomalen Rab-GTPasen wird katalysiert durch einen GDI-Dissoziations-Faktor (GDF) [43]. Zudem wurde vor kurzem auch ein GDF für Rho entdeckt. Für Rab9 dient das Protein Yip3/Pra1 und für RhoA der intrazelluläre Teil des Neurotrophin-Rezeptors als GDF [44, 45].

### **2.2. Die Ras-Subfamilie**

Die Ras-Subfamilie zählt heute 36 Mitglieder. Zu ihnen gehören unter anderem Ha-, N- und Ki-Ras, die Rap- und Ral-Proteine, R-Ras, TC21, M-Ras, Rit, Rin und Rheb. Die Rap-Proteine zeigen eine Beteiligung an verschiedenen Prozessen, beginnend von der Modulation von Wachstum und Differentiation bis zur Integrin-vermittelten Zelladhäsion und –morphogenese [46]. Ral-Proteine stellen wichtige Komponenten für das Durchlaufen des Zellzykluses und die Ras-abhängige onkogene Transformation dar [47, 48]. R-Ras/TC21/M-Ras tragen ebenfalls zur Zellzyklus-Progression bei [49, 50]. Rheb wurde in genetischen Screens mit *D.melanogaster* als Wachstumspromotor identifiziert. Weiterhin zeigten Überexpressions- und RNA-Interferenz-Experimente eine Funktion von Rheb im G1-S-Phase-Übergang [51, 52]. Die noch recht unerforschten Mitglieder Rerg, Noey2 und D-Ras scheinen als Tumorsuppressoren zu wirken [8]. Die Proteine Ha-, N- und Ki-Ras, ihre Signaltransduktion und die Regulation ihrer Aktivitäten werden in den folgenden Kapiteln näher betrachtet.

### 2.2.1. Ha-,N- und Ki-Ras

In Säugerzellen werden drei Ras-Gene exprimiert. Deren Promotoren besitzen einen hohen GC-Gehalt ohne TATA-Motiv, was charakteristisch für *housekeeping*-Gene ist. Regionen, welche die *ras*-Expression kontrollieren, findet man in den 5'-Bereichen der Gene und im ersten Intron der drei Ras-Gene [53, 54]. Zudem wurde eine negative Regulation der Ras-Expression in *C.elegans* durch Mikro-RNA entdeckt, was vermuten lässt, dass vielleicht auch in Säugerzellen die Ras-Expression durch Mikro-RNA reguliert wird [55]. Die drei Ras-Gene kodieren für vier Ras-Proteine, Ha-, N-Ras und Ki-Ras4A/4B, welche 188/189 Aminosäuren lang und etwa 21 kDa schwer sind. Alternatives Spleißen des vierten Exons vom K-Ras-Gen führt zur Expression von K-Ras4A und 4B, die sich allein in den letzten 25 Aminosäureresten des C-Terminus unterscheiden [56]. Die verschiedenen Aminosäuresequenzen der Ras-Proteine in der C-terminal gelegenen hypervariablen Region führen zu isoform-spezifischer Membranlokalisation der Ras-Proteine. Ki-Ras4B ist unabhängig vom Aktivierungszustand in non-rafts-Mikrodomänen der Plasmamembran anzutreffen. Ha-Ras befindet sich dagegen in einem vom Aktivierungszustand abhängigen dynamischen Gleichgewicht zwischen lipid- und non-rafts. Im GDP-beladenen Zustand findet man circa 50% des zellulären Ha-Ras in lipid-rafts. Nach Aktivierung kommt es zur Verschiebung der Ha-Ras-Verteilung von lipid-rafts zu non-rafts [57, 58]. Überexpression von *Green fluorescent protein(GFP)*-markiertem Ha-, N- und Ki-Ras zeigte, dass alle Isoformen an der Plasmamembran, Ha- und N-Ras allerdings auch im Golgi-Apparat auffindbar sind [29].

*Knockout*-Mäuse von Ras zeigen isoform-spezifische Phänotypen. K-Ras *knockouts* sind nicht lebensfähig. Sie sterben zwischen Tag 12 und 14 ihrer embryonalen Entwicklung an fötalen Leberdefekten und Anämie [59, 60]. Mäuse, die kein N-Ras exprimieren, sind lebensfähig, zeigen aber beeinträchtigte antivirale Immunantwort und T-Zell-Funktion [61, 62] und Ha-Ras *knockouts* zeigen keinen veränderten Phänotyp. Zudem sind Ha-Ras und N-Ras für die Entwicklung und Fertilität der Maus nicht essentiell [63].

### 2.2.2. Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEF) für Ras

Zurzeit sind vier Klassen an GEFs für Ras bekannt, Sos1/2, RasGRP1-4, RasGRF1/2 und CNrasGEF (siehe Abbildung 3) [243]. Dabei sind allen Austauschfaktoren der Ras-Proteine zwei für den Guaninnukleotid-Austausch wichtige konservierte Motive gemein: das REM-

(Ras exchange motif)-Motiv und die Cdc25-Domäne, welche nach dem ersten entdeckten GEF für Ras in *S.cerevisiae* benannt wurde. Der Großteil der RasGEF befindet sich in einer unstimulierten Zelle im Zytoplasma, weit entfernt vom Zielprotein Ras, welches an der Plasmamembran oder an Golgi-Membranen lokalisiert ist. Nur eine geringe Menge an RasGEF stellt den Austausch am Ras und dessen lebenserhaltene Signalweitergabe der Zelle sicher. Verschiedene Stimuli führen zu GEF-Rekrutierung an die Membranen und in die Nähe des Substrates Ras, an dem sie anschließend den Guaninnukleotid-Austausch katalysieren können [9].

Für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) abhängige Aktivierung von Ras ist der GEF Sos zuständig. Dieser ubiquitär exprimierte Austauschfaktor kommt im Komplex mit dem Adapterprotein Grb2 vor, welches über seine SH2-Domänen an phosphorylierte Tyrosine bindet und so Sos zur Plasmamembran rekrutiert. Sos zeigt Austauschaktivität für Ha-, N-, M-Ras und Ki-Ras4A/4B [64]. Zudem besitzt Sos wie auch RasGRF eine DH- (Dbl-homologe) Domäne, welche die Nukleotidaustausch-Domäne für Rho-Proteine darstellt. Sos und RasGRF können demzufolge die GTP-Beladung von Ras- und Rho-GTPasen koordinieren.

Die GEFs Ras-GRF1/2, die hauptsächlich nur im Nervengewebe exprimiert werden, zeichnen sich dadurch aus, dass sie zusätzlich zum REM-Motiv und zur Cdc25-Domäne eine IQ- (Ilimaquinon)Domäne besitzen, über die RasGRF  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin binden kann. Obwohl klar ist, dass die Austauschaktivität dieser Proteine durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert wird, ist der genaue Mechanismus noch unbekannt. Interessanterweise hängt die RasGRF1-Austauschaktivität stark von der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin an das IQ-Motiv ab, wogegen RasGRF2 trotz einer Deletion des IQ-Motivs immer noch Ras aktivieren kann [65, 66].

Eine weitere Gruppe von GEF wird nicht nur durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert, sondern auch durch Diacylglycerol. Es handelt sich hierbei um die Ras-GRP-Proteine, die großteils im Gehirn und hämatopoietischen Zellen exprimiert werden. Eine nähere Betrachtung der RasGRP-Proteine erfolgt in Abschnitt 2.3.2. Der zur vierten Gruppe der GEF gehörende CNrasGEF wird im Gehirn exprimiert und bindet zyklisches AMP (cAMP) oder cGMP über seine cNMP-Bindedomäne. *In vivo* führt eine Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Ras-Aktivierung in Abhängigkeit von CNrasGEF. *In vitro* konnte dagegen keine cAMP-abhängige Erhöhung der CNrasGEF-Austauschaktivität festgestellt werden [67].



### 2.2.3. GTPase aktivierende Proteine (GAP) für Ras

Das erste entdeckte und charakterisierte GAP war p120RasGAP. Es zeigt Aktivität gegenüber Ha-, N-, Ki- und R-Ras und interagiert dabei wie die Effektoren mit der switch I-Region von RasGTP [68, 69]. p120RasGAP besteht aus einer C-terminalen RasGAP-Domäne, zwei Src-Homology 2 (SH2)-Domänen, die eine Src-Homology 3 (SH3)-Domäne flankieren, einer Pleckstrin Homology (PH)- und einer C2-Domäne. Hierbei sind die SH2- und SH3-Domänen erforderlich für die komplette Aktivität von p120RasGAP [70]. Das lässt vermuten, dass dieses GAP mit anderen Proteinen wechselwirken muss, um die Hydrolyse von RasGTP zu stimulieren. Interaktionen mit dem PDGF-, EGF-Rezeptor, dem Protein p62<sup>Dok</sup> und dem p190RhoGAP sind beschrieben worden [71-74].

Das neben p120RasGAP häufigste GAP ist Neurofibromin. Es enthält eine Domäne, die den katalytischen Domänen von p120RasGAP und Ira1/2, zwei RasGAP aus *S.cerevisiae*, homolog ist. Der Verlust der Allele für Neurofibromin hat schwerwiegende Folgen. Er führt zu einer Erhöhung und Verlängerung des RasGTP-Signals, wie es oft in Tumorzellen gefunden wird. Im Phänotyp äußert sich der NF1-Verlust in der Ausbildung gut- und bösartiger Tumore, was nahelegt, dass NF1 ein Tumorsuppressorgen ist [40, 75]. Weitere GTPase aktivierende Proteine wie GAP1m, CAPRI (Ca<sup>2+</sup>-promoted Ras inactivator), Gap1IP4BP, GAP1m p98GAP, GAPIII und p135SYNGAP seien hier nur erwähnt [76].

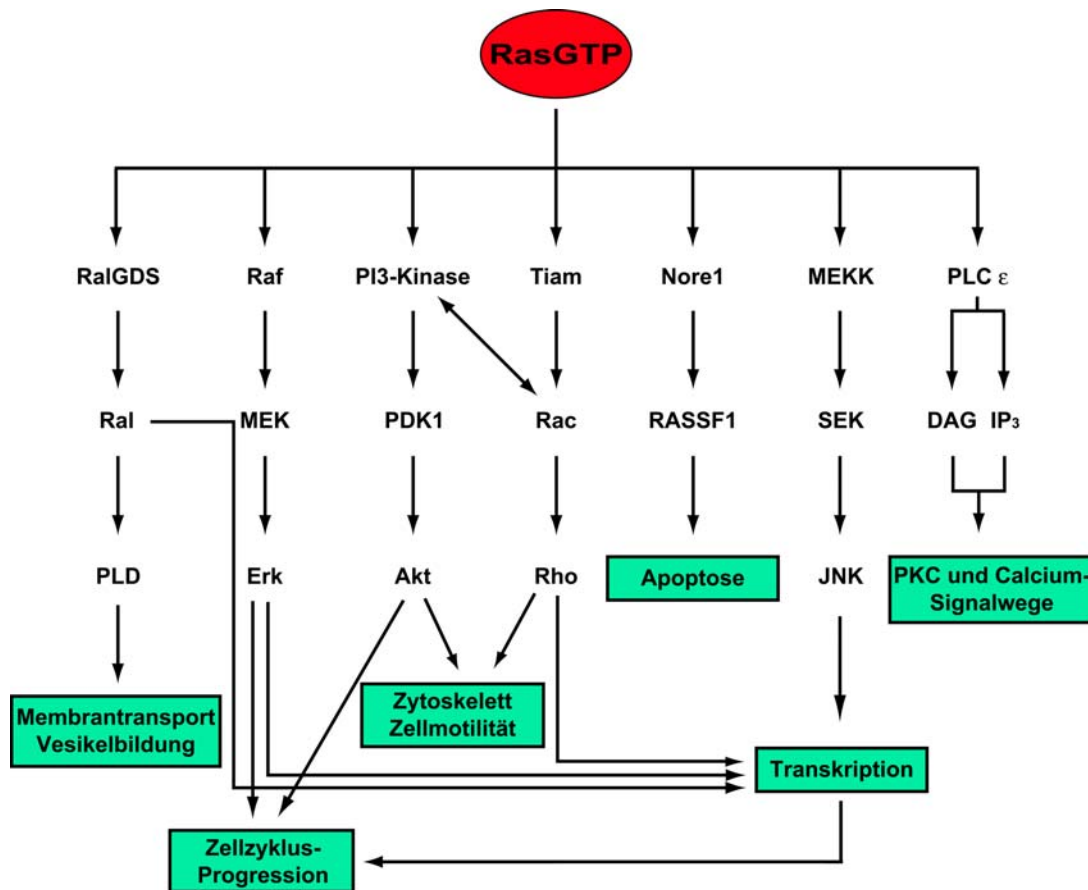
### 2.2.4. Aktivierung von Ras durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Ras wird durch verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), wie Insulin-, PDGF-, EGF-Rezeptor, Flt3 oder TrkA aktiviert. Am Beispiel des EGF-Rezeptors sei diese Aktivierung erklärt. Zuerst kommt es zur Bindung von EGF an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors, was zur Dimerisierung des Rezeptors und Stimulierung seiner intrazellulären Tyrosinkinaseaktivität führt. Anschließend autophosphoryliert die RTK sich an Tyrosinen. An diese binden Proteine mit Src-Homologie 2 (SH2)- oder Phosphotyrosin-bindenden (PTB)-Domänen, die eine hohe Affinität für phosphorylierte Tyrosine besitzen. Hierbei handelt es sich z.B. um Phosphatasen, Untereinheiten der PI3-Kinase, Phospholipasen C und Adaptorproteine wie Shc oder Grb2. Shc wird anschließend durch die Bindung an den EGFR tyrosinphosphoryliert und dient somit auch als Bindestelle für das Adaptorprotein Grb2. Durch seine Src-Homologie 3 (SH3)-Domäne ist Grb2 an den RasGEF Sos gebunden. Auf

diese Weise resultiert die Aktivierung der RTK in einer Rekrutierung des GEF Sos an die Plasmamembran. Da Ras aufgrund seiner posttranslationalen Modifizierungen ebenfalls in der Plasmamembran vertreten ist und nun eine verstärkte Nähe von Sos zu Ras vorliegt, kommt es zur Erhöhung des Nukleotidaustausches an Ras, was in einer Ras-Aktivierung mündet [77-81]. Das aktive Ras ist nun in der Lage mit Effektoren zu wechselwirken und das Signal koordiniert weiterzugeben.

### **2.2.5. Ras und seine Effektoren**

Für verschiedene Säuger-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie Ras GTP-abhängig über die Effektor-Domäne in der switch I-Region von Ras binden können. Zu ihnen gehören die Raf-Proteine, Mitglieder der RalGDS-Familie, die katalytischen Untereinheiten der PI(3)-Kinasen, AF-6, Nore1, MEKK1, Rin1, PKC $\zeta$ , Tiam1 und PLC $\epsilon$  [82, 83]. Sie alle besitzen unterschiedliche Funktionen, wobei einige als Adaptorproteine, wie AF6 und Nore1, oder als GEF, wie RalGDS (für Ral), Rin1 (für Rab5) und Tiam1 (für Rac), fungieren. Andere wiederum, wie die Raf- und PI(3)-Kinasen, sind in der Lage, Proteine oder Lipide zu phosphorylieren. Am besten charakterisiert sind die Effektoren Raf, RalGDS und PI(3)-Kinasen, wobei im Rahmen dieser Arbeit nur auf Raf eingegangen werden soll. Ein kleiner Überblick über die Signalwege, die durch Ras-Effektoren beeinflusst werden, ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Schematischer Überblick über die Effektoren von Ras und ihre Signalweitergabe**

RasGTP kann an seine Effektoren über deren Ras-Binde-Domänen (RBD) oder Ras-Assoziations (RA)-Domänen binden. Die Effektoren leiten das Ras vermittelte Signal durch die Zelle weiter und so kommt es zu vielfältigen zellulären Ereignissen, wie z.B. Transkription, Apoptose, Zellzyklus-Progression und Zellmotilität.

### 2.2.6. Die Ras-Erk-Kaskade

Wie in Abbildung 4 zu sehen, führt die Bindung von RasGTP an die Raf-Kinase zur Signalweitergabe über MEK zu Erk, was in verschiedenen zellulären Antworten resultieren kann. Jedoch ist die Signaltransduktion von Ras zu Erk ein komplex geregeltes Netzwerk, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist. Zur Gruppe der Raf-Proteine zählen A-Raf, B-Raf und C-Raf (auch Raf-1 genannt), die alle einen ähnlichen Aufbau mit drei konservierten Regionen (CR1-3-Domäne) teilen [84]. RasGTP bindet direkt an die N-terminal gelegene Ras-Binde-Domäne (RBD) von Raf, aber es ist auch in der Lage, mit der Cystein-reichen Domäne (CRD) in der CR1-Domäne unabhängig vom GDP/GTP-Zustand, zu wechselwirken. Die Bindung von Raf an Ras führt zur Rekrutierung von Raf aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran und gilt als Startpunkt der Raf-Kinase-Aktivierung [85-88]. Der Vorgang der

Rekrutierung ist sehr komplex, da die verschiedenen Ras-Isoformen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die RBD der einzelnen Raf-Proteine und differierende Membranlokalisationen aufweisen [89].

Eine Regulation der Raf-Aktivierung wird durch verschiedene Phosphorylierungen erreicht. Inaktivierende Phosphorylierungen werden durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und Akt vermittelt. C-Raf wird am S43, S233, S259 durch PKA und ebenso am S259 durch Akt phosphoryliert. Hierbei führen die Phosphorylierungen zu verschiedenen Interaktionen mit anderen Proteinen [90, 91]. S43-Phosphorylierung scheint die Bindung von Ras und dem N-Terminus von Raf sterisch zu behindern [92]. Die Regulation der Bindung von Raf an Ras wird zudem durch die Serin-Phosphorylierungs-abhängigen dimeren Adaptor/Scaffold-Proteine der 14-3-3 Proteine erreicht, die an die CR2-Domäne von C-Raf binden, wenn S233 und S259 am C-Raf phosphoryliert sind. Dabei kommt es zur Beeinträchtigung der Ras/Raf-Interaktion. Für den Fall S259 kann RasGTP *in vitro* 14-3-3 von der CR2-Domäne verdrängen, *in vivo* dagegen wird 14-3-3 aufgrund der Dephosphorylierung von S259 durch die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) von C-Raf dissoziieren [93, 94]. Für die Aktivierung benötigt C-Raf Phosphorylierungen an fünf Aminosäuren innerhalb seiner Kinase-Domäne. Zu ihnen gehören S338, Y341, T491, S491 und S621. Die Kinasen, die diese Reste phosphorylieren sind weitgehend unbekannt. PAK1 kann zwar C-Raf *in vitro* am S338 phosphorylieren, doch stehen dieser Beobachtung weitere Veröffentlichungen *in vivo* gegenüber, in denen die Wachstumsfaktor- und Ras-abhängige S338-Phosphorylierung nicht PAK-abhängig ist. Man konnte bisher nur feststellen, dass Src Y341 phosphorylieren kann [95].

Die Aktivierung von C-Raf und A-Raf folgt einem ähnlichen Mechanismus, da beide über die gleichen konservierten fünf Phosphorylierungsstellen verfügen [96]. B-Raf dagegen besitzt kein Tyrosin ähnlich dem Y341 in C-Raf. Dafür ist diese Position mit einem Aspartat (D448) besetzt, was dazu führt, das B-Raf in dieser Region eine konstante negative Ladung aufweist, die in erhöhter Basalaktivität von B-Raf gegenüber A- und C-Raf resultiert. Es scheint zudem, dass für die B-Raf-Aktivierung die alleinige Rekrutierung von B-Raf durch Ras an die Plasmamembran ausreicht [97].

Für C-Raf wurden einige Substrate bzw. Interaktionen, wie z.B. mit der CDC25C-Phosphatase, mit dem BCL2-assoziierten Athanogene-1 (BAG), beschrieben, jedoch scheint es sicher, dass MEK1 und MEK2 die physiologisch relevanten C-Raf-Substrate darstellen [95].

MEK1 wird durch die aktivierten Raf-Proteine an den Serinen 217 und 221 phosphoryliert und aktiviert [98-100]. Dabei zeigen die Raf-Isoformen unterschiedliche Effizienz der MEK-Phosphorylierung. In Zellfraktionierungs-Studien wurde gezeigt, dass B-Raf und nicht C-Raf die MEK-Kinase darstellt [101, 102]. Beide MEK-Proteine sind dualspezifische Kinasen und phosphorylieren Erk1/2. Die Phosphorylierungsstellen für Erk1 sind T202 und Y204 [103, 104]. Durch Phosphorylierung aktiviert und homodimerisiert, können Erk1/2 ihre Substrate phosphorylieren. Dies geschieht entweder im Zytoplasma, wie z.B. für Sos, p90Rsk2 und PLA<sub>2</sub> oder nach Translokation der aktivierten Erk in den Nukleus, wo z.B. Elk-1, Ets-2, C/EBP oder SMAD phosphoryliert werden können [105, 106]. Der Transkriptionsfaktor Elk1 wird am Serin 383 phosphoryliert, ist beteiligt an der Bildung eines ternären Komplexes am Serum-Response-Element (SRE) und potenziert dadurch die transkriptionelle Aktivität der *ternary complex factors*, die an *fos*-Promotoren binden. Die Dimerisierung von basischen Leuzin-Zipper-Proteinen der Jun- bzw. Fos-Familie führt zur Bildung des Activator Protein-1 (AP-1), welches die Transkription verschiedener Gene reguliert. Zu diesen Genen zählen *cyclin D1*, *p53* und indirekt *p21Cip1* [105, 107, 108].

### **2.3. Der Phorbolster 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)**

TPA ist das meist benutzte Mitglied der Phorbolster, welche wiederum die am häufigsten verwendeten Tumorpromotoren in Untersuchungen zur Karzinogenese sind. Isoliert wurde dieser polyzyklische Ester aus dem Öl der Crotonpflanze (Euphorbiaceae) und seine tumorfördernden Eigenschaften wurden zuerst in Versuchen mit Mäusen untersucht und beschrieben [109, 110]. Die Eigenschaften der Phorbolster als potente Co-Karzinogene oder Tumor-Promotoren beruhen darauf, dass sie den *second messenger* Diacylglycerol (DAG) nachahmen, jedoch nicht metabolisiert werden und dadurch verschiedene Proteine aktivieren können. Es wurde lange angenommen, dass Proteinkinase C (PKC) den Hauptrezeptor für Phorbolster darstellt. Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass es eine Reihe an neuen „Nichtkinase“-Phorbolster-Rezeptoren gibt, zu denen die RacGAPs der Chimärine, die RasGEF der RasGRP-Gruppe und die Proteine der Munc13-Gruppe, die essentiell für die Neurotransmitterfreisetzung sind, gehören [111]. Eine genauere Darstellung soll hier nur der PKC-Familie und der RasGRP-Gruppe zukommen.

### 2.3.1. Die Proteinkinase C- Familie

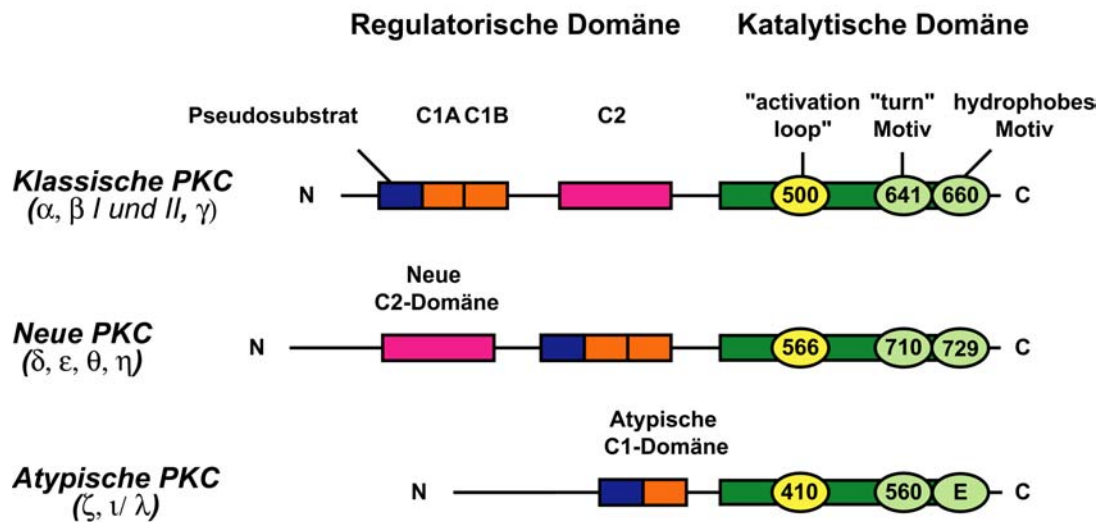
Die ersten entdeckten Phorbolster-Rezeptoren waren die Mitglieder der PKC-Familie, welche aufgrund struktureller und biochemischer Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt wurden, die klassischen, die neuen und die atypischen PKC. Die klassischen PKC ( $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma$ ) werden physiologisch durch DAG und  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert, wogegen die neuen PKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$ ) durch DAG aktiviert werden, aber kein  $\text{Ca}^{2+}$  binden können. Sowohl DAG als auch  $\text{Ca}^{2+}$  zeigen demgegenüber bei den atypischen PKC ( $\zeta$  und  $\lambda/\iota$ ) keinen Effekt [112]. Die Domäne für die erforderliche DAG/TPA-Bindung stellt die C1-Domäne, ein Motiv von 50-51 Aminosäuren lokalisiert im regulatorischen Bereich am N-Terminus der PKC, dar. Diese ist reich an Cysteinen und besitzt das Motiv  $\text{HX}_{12}\text{CX}_2\text{CX}_{13/14}\text{CX}_2\text{CX}_4\text{HX}_2\text{CX}_7\text{C}$ . Abhängig von der PKC-Isoform besteht die C1-Domäne aus einer (atypische PKC) oder zwei (klassische und neue PKC) Zink-Finger-ähnlichen Wiederholung/en, die zwei Histidine und fünf Cysteine beinhalten, die für die genaue Koordination von zwei  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen wichtig sind. Ohne diese Aminosäuren und die zwei  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen wäre eine Ligandenbindung unmöglich. Nur die einzelne C1-Domäne der atypischen PKC bindet kein DAG/TPA und ihre Funktion ist unbekannt [112, 113]. Die Domänenstrukturen der PKC-Isoformen sind in Abbildung 5 gezeigt.

Neusynthetisierte PKC assoziieren in einer offenen Konformation mit zellulären Membranen, in der die Pseudosubstratsequenz die Substratbindestelle freigibt und in der der C-Terminus exponiert wird, was eine PDK-1 Bindung erlaubt. PDK-1 phosphoryliert daraufhin die PKC im *activation loop* und dissoziiert anschließend vom C-Terminus, welcher nach Zugang zur Substratbindestelle durch intramolekulare Mechanismen autophosphoryliert wird. Die phosphorylierte PKC dissoziiert in das Zytosol und wird dort durch Bindung der Pseudosubstratsequenz an die Substrat-Bindestelle in einer inaktiven Konformation gehalten. Bindet nun ein Ligand an die C1- oder C2-Domäne, führt dies zur Translokation der PKC an Zellmembranen, was zur Freisetzung des Pseudosubstrates von der Substrat-Bindestelle führt und eine Substratbindung und Phosphorylierung erlaubt. [112, 114, 115].

Für die Translokation und Aktivierung der neuen PKC ist die DAG/TPA-Bindung ausreichend, die klassischen PKC benötigen dagegen für ihre komplette Aktivierung neben der DAG-Bindung auch  $\text{Ca}^{2+}$  und saure Phospholipide, wie Phosphatidylserin, welches die Membranassoziation der PKC verstärkt [112]. Wie die räumliche Verteilung der PKC in der Zelle erreicht wird, ist unbekannt. Man geht davon aus, dass isoform-spezifische Bindeproteine essentiell für die subzelluläre Lokalisation der PKC und deren Signalkomplexe

## 2. Einleitung

sind. Die räumliche Organisation von PKC und ihren *upstream*-Aktivatoren (Syndecan-4), Substraten (STICKs und RACKs) oder dem Zytoskelettprotein Aktin wird durch diese PKC-Bindeproteine reguliert. Neue Untersuchungen lassen auf weitere Protein-Protein-Interaktionen und mögliche PKC-Scaffoldproteine schließen, denn es konnte demonstriert werden, dass die C2-Domäne der PKC  $\delta$  mit phosphorylierten Tyrosinen wechselwirkt [116].



**Abbildung 5: Domänenstruktur der Mitglieder der Proteinkinase C-Familie**

Primärstrukturen der drei Klassen der PKC-Isoformen. Alle Isoformen besitzen eine regulatorische, eine konservierte katalytische Domäne (dunkelgrün) und eine C-terminale Region, die zwei konservierte Phosphorylierungsstellen, das turn und das hydrophobe Motiv enthält (hellgrün; in atypischen PKC okkupiert ein Glutamat-Rest die Phospho-Akzeptor-Seite). Zudem besitzen alle PKC eine Phospho-Akzeptor-Seite in der katalytischen Domäne, der „activation loop“, welcher durch PDK-1 phosphoryliert wird. Die PKC-Isozyme variieren in ihren regulatorischen Domänen, in der die Bereiche liegen, die für die Membranassoziation essentiell sind. Alle PKC-Isoformen besitzen eine Pseudosubstrat-Sequenz (blau), die N-terminal der C1-Domäne (orange) liegt, welche DAG/Phorbol ester bindet und dadurch PKC zu zellulären Membranen rekrutiert. Atypische PKC binden kein DAG/PE über ihre C1-Domäne. Die C2-Domäne der klassischen PKC dient als  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phospholipid-Sensor, die neue C2-Domäne bindet dagegen phosphorylierte Tyrosine und keine Phospholipide und  $\text{Ca}^{2+}$ .

In dem für diese Arbeit wichtigen Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg konnte eine Involvierung von PKC demonstriert werden, da Phorbol ester-Behandlung zur Erk-Aktivierung führte und konsequenterweise Zellantworten wie Differentiation und Proliferation auslöste [117-119]. Ein direkterer Beweis für die Beteiligung der PKC an diesem Signalweg kam von Forschungsgruppen, die darlegen konnten, dass Raf durch PKC phosphoryliert und die Raf-Kinase-Aktivität stimuliert wird [120-124]. Die Autoren der letztgenannten Veröffentlichung gehen davon aus, dass Ras oberhalb von PKC $\epsilon$  im Erk-Signalweg liegt und PKC $\epsilon$  seine onkogene Aktivität durch erhöhte Raf-1-Aktivierung ausübt. Demgegenüber steht eine Arbeit, nach der PKC oberhalb von Ras liegen. Diese Arbeitsgruppe konnte in COS7 Zellen zeigen,

dass dominant negatives Ras die Aktivierung von Raf-1 durch PKC nicht blockierte und schlossen daraus, dass die Aktivierung von Ras durch PKC über andere Mechanismen verläuft als die RTK-abhängige Ras-Aktivierung [125].

### 2.3.2. Die RasGRP-Familie

Zu dieser Gruppe gehören RasGRP1-4 sowie eine kürzere Spleißvariante von RasGRP2, CalDAG-GEFI genannt. RasGRP1 wurde als erstes Protein dieser Familie bei der Suche nach Proteinen entdeckt, die Fibroblasten transformieren können [126]. Es besitzt, wie alle Mitglieder der RasGRP-Familie beginnend vom N-Terminus ein Ras-exchange-Motif (REM), eine RasGEF-Domäne, zwei EF-Hände und eine C1-Domäne.

Die Bindung von DAG an die cysteinreiche C1-Domäne ist essentiell für die Funktion von RasGRP1, da sie die Rekrutierung des GEF zu Zellmembranen bzw. die Nähe zum Substrat Ras sicherstellt.  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch ein Paar atypischer EF-Hände im RasGRP1 gebunden, jedoch ist der Einfluß dieser Bindung auf die RasGRP1-Austauschaktivität von weit geringerem Ausmaß als die DAG-Bindung. An der Plasmamembran lokalisiertes RasGRP1 führt bei Ha- und R-Ras zur GTP-Beladung [126, 127]. Die prominentesten Funktionen von RasGRP1 stellen seine Wichtigkeit für die Thymozyten-Differentiation und die T-Zell-Rezeptor(TCR)-Signalweitergabe dar [128, 129]. Zudem wurde eine Involvierung der PKC in die RasGRP1-Aktivität auf den Ras-Erk-Signalweg in T-Zellen entdeckt. Hierbei phosphoryliert die PKC RasGRP1 am Thr 184 und benötigt PKC-Aktivität, um aktiviert werden zu können [130].

CalDAG-GEFI, das zweite Mitglied der RasGRP-Gruppe, wird bevorzugt im Gehirn und in Blutzellen exprimiert und synergistisch durch DAG und  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert. Es ist ein zytoplasmatisches Protein, das nach TPA-Stimulation an die Plasmamembran transloziert, aber den Guaninnukleotid-Austausch an Rap1A und N-Ras katalysiert. Experimente mit CalDAG-GEFI-*knockout* Mäusen ließen darauf schließen, dass dieses Protein essentiell für die Blutplättchenaggregation und Thrombus-Bildung ist [131, 132].

RasGRP2 besitzt im Gegensatz zu den anderen RasGRP ein N-terminal gelegenes Acylierungs-Motiv, welches nach Myristoylierung und Palmitoylierung eine Plasmamembranassoziation von RasGRP2 bedingt. RasGRP2 bindet zudem, obwohl es eine C1-Domäne besitzt, kein DAG/TPA.  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu Inhibierung statt zur Aktivierung der Ras-GEF-Aktivität und es aktiviert Rap1A, N- und K-Ras, aber kein H-Ras [133]. Das Mitglied



RasGRP3 zeigt in etwa die gleichen Eigenschaften wie RasGRP1, jedoch katalysiert RasGRP3 bei weit mehr Ras-GTPasen den Nukleotidaustausch (Ha-, R-, M-Ras, TC21, Rap1A/B) und ist im Gegensatz zu RasGRP1 für die B-Zell-Rezeptor (BCR)-Signalübertragung erforderlich [134, 135]. RasGRP3 wird von der neuen PKC  $\theta$  am Thr133 phosphoryliert, was für die Aktivierung des Ras-Erk Signalweges in B-Zellen essentiell ist [130].

RasGRP4 ist das zuletzt entdeckte Mitglied der Familie und wird nur in Mastzellen exprimiert. Sein Aktivierungsprozeß scheint dem von RasGRP1 und 3 ähnlich bzw. gleich zu sein. Allerdings besteht seine Funktion darin, den normalen Reifungsprozeß der Mastzellen auszulösen. Hierbei liegt RasGRP4 unterhalb des Stammzellrezeptors c-Kit und kann durch TPA-Behandlung eine Differentiation der Mastzellen auch ohne c-Kit-Aktivierung bewirken [136-139].

### 2.3.3. TPA und Ras

Die in den letzten Abschnitten beschriebenen Interaktionspartner und Signalwege von Ras und dem Phorbolster TPA lassen vermuten, dass beide in gleichen oder ähnlichen Signalwegen involviert sind. So kann die konstitutiv aktive Form von Ras ebenso wie TPA zur Zelltransformation führen. Eine Aktivierung von Ras durch Phorbolster konnte jedoch nur in einer begrenzten Anzahl an Zelltypen, wie COS7-fibroblastenähnliche Nierenepithelzellen [125], T-Lymphozyten [140], quergestreiften Herzmuskelzellen [141, 142], MCF-7 Brustkrebs-Zellen [143], T24-Blasentumorzellen [144] und Monozyten-Vorläufer-Zellen [145] gezeigt werden. Diese kommt, wie schon in Abschnitt 1.1.3. beschrieben, durch das Zusammenspiel der Aktivitäten von RasGEF und RasGAP zustande, wobei eine RasGEF-Aktivierung oder eine RasGAP-Inhibierung das Gleichgewicht in Richtung Ras-Aktivierung verschieben können. Zudem spielt die basale Nukleotidaustauschrate am Ras eine entscheidende Rolle und diese variiert stark zwischen den verschiedenen Zelltypen. So weisen z.B. Leukozyten, im Gegensatz zu Rat-1 Fibroblasten, einen hoch dynamischen RasGDP/GTP-Zyklus mit hoher resultierender basaler Nukleotidaustauschrate auf [78, 80, 140, 145]. Untersuchungen mit permeabilisierten T-Lymphozyten demonstrierten, dass TPA Ras aktiviert, dies jedoch nicht durch Erhöhung des Nukleotidaustausches am Ras erfolgt. Dies führte zu der Vermutung, dass eine GAP-Hemmung zusammen mit der hohen basalen Nukleotidaustauschrate am Ras die TPA induzierte Ras-Aktivierung in T-Lymphozyten vermittelt [140]. Ähnliche Aussagen wurden

für COS7-Fibroblasten und T24-Blasentumorzellen getroffen, in denen die TPA-induzierte Raf- und Erk-Aktivierung nicht durch das dominant negative Ras (S17N), welches Ras-Austauschfaktoren blockiert, gehemmt wird [125, 144].

Demgegenüber wurde in quergestreiften Herzmuskelzellen und COS7-Fibroblasten eine Stimulation der GEF-Aktivität nachgewiesen [141]. Weiterhin stehen der TPA-induzierten RasGAP-Hemmung neue Veröffentlichungen gegenüber, in denen die Mitglieder der RasGRP-Familie als Vermittler der TPA-ausgelösten Ras-Aktivierung in Lymphozyten charakterisiert wurden. Die TPA-induzierte RasGTP-Akkumulation in Herzmyozyten und COS7-Zellen wird allerdings nicht durch RasGRP-GEF vermittelt, da RasGRP in diesen Zelltypen nicht exprimiert wird (eigene Daten, persönliche Mitteilung von J.Stone). Somit muss ein weiteres RasGEF-System in diesen Zellen bestehen, welches den durch TPA-ausgelösten erhöhten Nukleotidaustausch an Ras erklärt. Der Mechanismus, durch den die TPA-induzierte RasGTP-Akkumulation vermittelt wird, ist daher weitgehend ungeklärt. Es ist nur bekannt, dass in allen genannten Zelltypen die Phorbol ester induzierte Ras-Aktivierung PKC-abhängig ist.

### ***2.4. EGFR-Transaktivierung***

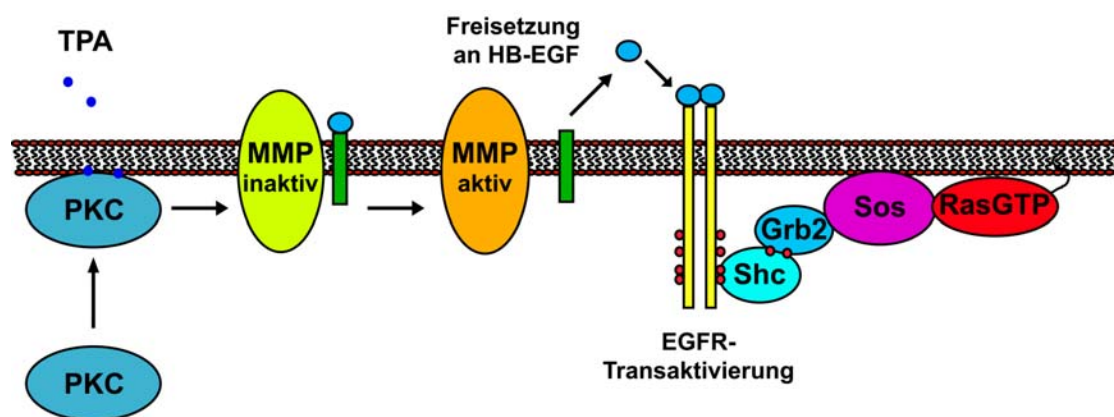
Die Signalweitergabe von der Zelloberfläche durch Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen führt durch die Adaptorproteine Shc/Grb2, den RasGEF Sos, Ras, Raf und MEK zur Aktivierung der Erk, die in erhöhter Zellproliferation resultieren kann. Daneben konnte auch gezeigt werden, dass Agonisten der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) eine Erk-Aktivierung [146] und Zellproliferation induzieren können [147]. Allerdings war die Verbindung zwischen den GPCR und der Erk lange ein Rätsel. Die Arbeitsgruppe um Axel Ullrich war die erste, die eine Involvierung des EGFR in die GPCR vermittelte Erk-Aktivierung beobachtete. Stimulationen von Rat-1 Fibroblasten mit Lysophosphatidsäure (LPA), Thrombin und Endothelin-1 führten zur Tyrosinphosphorylierung vom EGFR und Erk-Aktivierung. Diese konnten durch den spezifischen EGFR-Inhibitor AG1478 und dominant-negativen EGFR blockiert werden, was auf eine wichtige Rolle des EGFR in der GPCR induzierten Stimulation der Erk-Kaskade hindeutete. Dieser Mechanismus wurde daraufhin RTK(EGFR)-Transaktivierung genannt [148]. Weitere Veröffentlichungen in diesem Gebiet erschienen und ihre Autoren interpretierten ihre Daten derart, dass nicht nur der EGFR transaktiviert wird, sondern es sich um einen generellen Mechanismus handelt,

## 2. Einleitung

---

durch den viele Zelltypen die verschiedenen GPCR-Arten in die zelluläre Signaltransduktion integrieren [149-154].

Anfänglich ging man davon aus, dass die Transaktivierung des EGFR nach Stimulation mit GPCR-Agonisten oder Phorbolestern ligand-unabhängig abläuft. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es nach Stimulation der Zellen mit TPA oder GPCR-Agonisten zur Spaltung und Freisetzung von membranassoziierten EGF-Varianten wie heparinbindendem EGF (HB-EGF) kommt [155-157]. Diese binden daraufhin an den Rezeptor und aktivieren die EGFR-Erk-Kaskade. Ein Schema des vorgeschlagenen Mechanismus` der Phorbolster-induzierten Ras-Aktivierung ist in Abbildung 7 gezeigt.



**Abbildung 6: Vorgeschlagenes Modell der Phorbolster-induzierten Ras-Aktivierung**

Stimulation von Zellen mit dem Phorbolster TPA führt zur Rekrutierung der Proteinkinase C (PKC) zur Plasmamembran und deren Aktivierung. PKC phosphoryliert und aktiviert daraufhin eine Matrix-Metalloproteinase (MMP), welche die Spaltung einer membrandurchspannenden latenten Form des EGFs, pro-HB-EGF, vermittelt. Freigesetztes HB-EGF kann nun an den EGF-Rezeptor binden und seine Signalkaskade auslösen, die in einer Ras-Aktivierung mündet.

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von RTK kommt dadurch zustande, dass GPCR und TPA die Bildung von  $H_2O_2$  und *Reactive Oxygen Species* (ROS) induzieren [158, 159]. Diese Radikale sind in der Lage das katalytische Cystein im aktiven Zentrum der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) zu oxidieren und eine transiente, reversible oder auch irreversible Inaktivierung von PTP zu erreichen, was die Tyrosin-Dephosphorylierung der RTK verhindert [160] und in Transaktivierung und verlängerter Signalweitergabe der RTK resultieren kann.

In letzter Zeit gab es jedoch Zweifel an der Allgemeingültigkeit der Transaktivierung von RTK und ihrem Einfluß auf die Signaltransduktion. Diese beruhen auf Widersprüchen, die durch die Veröffentlichungen nicht konsequent ausgeschlossen wurden. So wurde gezeigt,

dass die Ras- und Erk-Aktivierung durch Agonisten der  $G_i$ -gekoppelten GPCR Pertussistoxin (PTX)-sensitiv sind [146, 161, 162], die LPA-induzierte HB-EGF-Freisetzung jedoch nicht durch PTX beeinflusst wird [156]. Hinzu kommt, dass die PTX-Sensitivität der EGFR-Transaktivierung durch LPA kaum erkennbar ist [149]. Zudem ist die Aktivierung von Ras und Erk durch LPA in embryonalen Mausfibroblasten PTX-sensitiv, der EGFR wird auch durch LPA transaktiviert, er ist aber nicht essentiell für die LPA induzierte Ras- und Erk-Aktivierung [163].

Durch pharmakologische Untersuchungen des Nukleotid-Austausches an Ras konnte demonstriert werden, dass der EGFR eher eine permissive Rolle bei der LPA-induzierten Ras- und Erk-Aktivierung in COS7-Zellen und nicht die des Mediators, welche ihm von vielen Arbeitsgruppen zugeschrieben wurde, spielt [164]. Auch über eine Beteiligung der Transaktivierung des EGFR in der TPA-induzierten Ras-Aktivierung gibt es gegenteilige Meinungen. So führt TPA zur Phosphorylierung von EGFR und Shc in HEK293 und Rat1-Zellen, jedoch mündet diese in den genannten Zellen nicht in einem erhöhten Nukleotidaustausch am Ras bzw. in einer Ras-Aktivierung [80, 155, 162, 165]. Da die TPA-induzierte Erk-Aktivierung in COS7-Zellen nicht S17N-Ras-sensitiv ist, jedoch TPA in diesen Zellen eindeutig den Nukleotidaustausch am Ras erhöht, stellt sich die Frage, wie die in diesen Zellen beobachtete Aktivierung von Ras durch TPA mechanistisch zu erklären ist.

### **2.5. Ziele der Arbeit**

Der Phorbolester TPA ist in der Lage, an viele Signalproteine wie PKC, RasGRP und Chimärine zu binden, diese zu rekrutieren und zu aktivieren, und dadurch eine Vielzahl an zellulären Reaktionen auszulösen [111]. Eine dieser Reaktionen stellt die Aktivierung des Onkoproteins Ras in verschiedenen Zelltypen dar, jedoch gibt es hierbei große mechanistische Unterschiede. So wurde für B- und T-Zellen die Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung den RasGEF der RasGRP-Familie zugeschrieben. Diese Proteine zeigen jedoch ein sehr gewebetypisches Expressionsmuster und werden nicht in Epithel- oder Fibroblastenzellen exprimiert [126, 127, 129, 134]. Weitere Möglichkeiten für die TPA-abhängige Ras-Aktivierung, wurden daraufhin vorgeschlagen. Einige Studien ließen vermuten, dass TPA über Transaktivierung des EGFR Ras aktiviert [155, 166]. Jedoch gab es gegenteilige Beobachtungen, wie z.B. dass TPA in HEK293-Zellen und Rat1-Fibroblasten EGFR-/Shc-Tyrosinphosphorylierung induziert, doch wurde von weiteren Arbeitsgruppen gezeigt, dass der Nukleotidaustausch an Ras nach TPA-Behandlung nicht anstieg, was diesen Signalweg als den gesuchten in Frage stellt [80, 155, 162, 165]. Auch in COS-Zellen wurden gegenteilige Beobachtungen derart gemacht, dass TPA und EGF zur EGFR/Shc-Tyrosinphosphorylierung führen [155, 166, 167] und Ras aktivieren [125, 166, 167] doch dass dominant-negatives S17N-Ras, welches RasGEF blockieren kann, die TPA-induzierte Aktivierung des Ras-Erk-Signalweges nicht hemmt [125, 168-172], wogegen die EGF-induzierte Aktivierung des Ras/Erk-Signalweges durch S17N-Ras komplett verhindert wurde [78, 125, 171, 172]. Die Bedeutung von Ras in der TPA-induzierten Erk-Aktivierung wurde jedoch durch Mikroinjektion von spezifischem Ras-Antikörper, welche die Erk-Aktivierung nicht blockiert, bewiesen [125]. Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass TPA Ras in COS7-Zellen durch RasGAP-Hemmung aktiviert [125]. Allerdings konnte in COS7-Zellen gezeigt werden, dass TPA den GDP/GTP-Nukleotidaustausch am Ras erhöhte, was die oben genannte Interpretation in Frage stellte [eigene Diplomarbeit].

Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, die aus Phorbolester-Experimenten erhaltenen Resultate und Interpretationen anderer Arbeitsgruppen zu überprüfen und den Mechanismus der Phorbolester-induzierten Ras-Aktivierung aufzuklären. Hierzu wurden Untersuchungen in COS7-fibroblastenähnlichen Epithelzellen durchgeführt, da in diesem Zelltyp, wie oben beschrieben, verschiedene zum Teil kontroverse Beobachtungen in Hinblick auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung gemacht wurden.

### 3. Material und Methoden

Die Versuche, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurden in einem molekularbiologischen Labor der Sicherheitsstufe 1 mit dafür üblicher Ausstattung durchgeführt. Geräte und Chemikalien, die zur Grundausrüstung eines Labors gehören, werden deshalb nicht im einzelnen aufgeführt. Die benutzten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. bezogen und Lösungen, soweit nicht anders beschrieben, mit Reinstwasser (MilliPore) angesetzt. Bei Verwendung von speziellen Geräten und Chemikalien, deren Verwendung das Versuchergebnis beeinflussen können, wird auf Hersteller bzw. Bezugsquelle hingewiesen.

#### *3.1. Molekularbiologische Materialien und Methoden*

##### **3.1.1. Bakterienstämme**

<i>E.coli</i> XL1-Blue	verwendet zur Plasmidamplifikation
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	verwendet zur Proteinaufreinigung

##### **3.1.2. Plasmide**

###### *Bakterielle Überexpression zur Proteinaufreinigung*

GST-Raf1-RBD in pGEX-5X-1	Dieses GST-Fusionsprotein mit der Ras-Bindedomäne von Raf1, welche aktives Ras bindet, dient zur Extraktion von RasGTP aus Zelllysaten.
---------------------------	---

#### *Eukaryotische Überexpression*

HA-Rsk2 in pcDNA3	erhalten von C. Bjorbaek
HA-N/C-lys-Rsk2 in pcDNA3	erhalten von C. Bjorbaek
Wt-Ha-Ras(human) in pEXV5	erhalten von J. Downward
Wt-Ki-Ras(human) in pEXV5	erhalten von J. Downward

#### **3.1.3. Arbeiten mit DNS**

##### *Transformation nach der KCM-Methode*

##### Herstellung kompetenter Zellen

2 ml LB-Medium wurden mit E.coli XL1-Blue oder E.coli BL21 (DE3) angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C kultiviert. 1 ml der Übernachtskultur wurde in 150 ml LB-Medium überführt und das Wachstum der Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,6 fortgesetzt (2,5-3 Stunden). Die Bakterien wurden bei 5000 rpm zentrifugiert, das entstandene Pellet in 15 ml TSB resuspendiert und nach 10 Minuten auf Eis aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

**TSB:**            10 mM MgCl<sub>2</sub>  
                      10 mM MgSO<sub>4</sub>  
                      5 % DMSO  
                      10 % PEG 4000  
                      in LB-Medium

##### Transformation

20 µl 5x KCM-Puffer und 0,1-10 µg DNS wurden in 80 µl Wasser gelöst und auf Eis gekühlt. Kompetente *E.coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 100 µl von ihnen zum DNS/KCM-Mix dazugegeben, gemischt und für 15-50 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer sich anschließenden Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Bakterien nach Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Von den

### 3. Material und Methoden

---

Bakterien wurden zwischen 10 und 200 µl auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert, über Nacht bei 37°C kultiviert und einzelne Kolonien in Flüssigmedium angeimpft.

<b>KCM (5x):</b>	0.5 M KCl	<b>LB-Medium:</b>	10 g / l Bactotryptone (Peptone)
	0.15 M CaCl <sub>2</sub>		5 g / l bacto yeast extract
	0.25 M MgCl <sub>2</sub>		10 g / l NaCl
			pH-Wert auf 7.0 einstellen
			für Agarplatten 1.5 % Agar dazugeben

5x KCM, LB-Medium und LB-Agar-Medium wurden autoklaviert. TSB wurde steril filtriert (0.2µm).

#### ***Isolation der Plasmid-DNS aus E.coli-Bakterien (Maxiprep)***

Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits wurde die Plasmid-DNS isoliert. Dabei wurde sich an die Angaben des Herstellers gehalten. Für Isolationen im Großmaßstab (Maxiprep) wurden der *Nucleobond AX* (Machery Nagel) oder der *Plasmid Purification Maxi Kit* (QIAGEN) verwendet.

#### **3.1.4. Proteinaufreinigung**

##### ***Aufreinigung vom Fusionsprotein GST-Raf1-RBD***

*E.coli*-BL21 (DE3) wurden mit GST-Raf1-RBD-pGEX-5X-1 nach der KCM-Methode transformiert und auf LB-Agar-Ampicillin-Platten ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden in 10 ml LB-Amp (150 µg/ml) angeimpft, über Nacht unter Schütteln inkubiert und anschließend in 500 ml LB-Amp (150 µg/ml) in einem 2 Liter Erlenmeyerkolben überführt. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.7 bei 37°C weiterkultiviert. Daraufhin wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0.1 mM IPTG induziert und das Medium auf zwei 500ml Erlenmeyerkolben verteilt (je 250 ml). Die Kulturen wurden nun bei Raumtemperatur für 5 Stunden unter Schütteln inkubiert und anschließend bei 4°C, 6000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 4 ml TBN150 mit Proteaseinhibitoren resuspendiert, in ein 50 ml Falcontube überführt und bei -80°C über Nacht eingefroren.

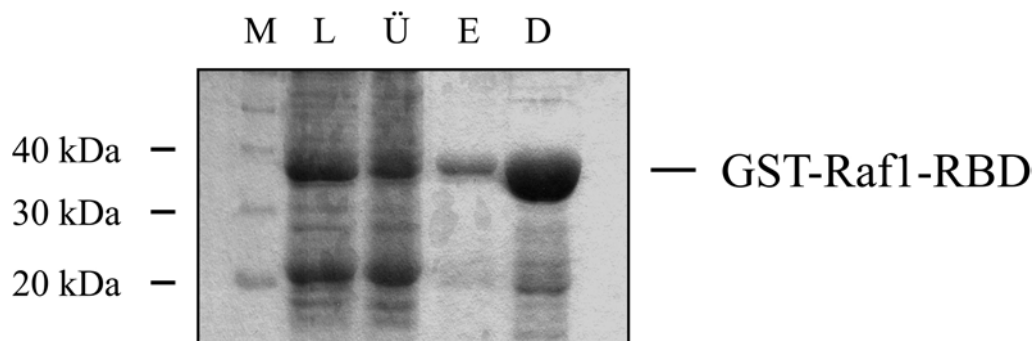
Die Zellen wurden abwechselnd dreimal in Wasser bei 37°C aufgetaut und in Stickstoff eingefroren, was zur Lyse der Zellen führte. Nach Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym wurde das



### 3. Material und Methoden

---

Lysat für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 14 mM EDTA (pH 8.0) und 0.35% TritonX-100 zum Lysat gegeben und weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Diese beiden Inkubationen stellten die komplette Lyse der Zellen sicher. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des Lysates bei 4°C und 30000 rpm für 30 Minuten. Das zentrifugierte klare Bakterienlysat wurde mit TBN150-gewaschenen GSH-Beads für eine Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Dies führte zur Anreicherung des gewünschten GST-Proteins an den GSH-Beads. Nach dem Zentrifugieren der GSH-Beads wurde der Überstand verworfen, und die GSH-Beads wurden viermal mit je 10 ml EQM-Puffer +DTT gewaschen und in eine Säule überführt. Die GST-Raf1-RBD wurde mit 5 ml Elutionspuffer von den GSH-Beads eluiert. Es folgten 3 weitere Elutionsschritte mit je 5 ml Elutionslösung, um eine komplette Elution des GST-Proteins zu erreichen. Das Eluat wurde in einem Dialyseschlauch gegen 1x PBS dialysiert. Es folgte eine Aufkonzentration der GST-Raf1-RBD auf 1 ml in einer 10 kDa Ultrakonzentrationskammer, an die sich eine Proteinbestimmung nach Bradford anschloss. Das Konzentrat wurde aliquotiert, in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das für Ras-Pulldowns zu verwendende Aliquot wurde immer frisch aufgetaut und nur einmal verwendet. In Abbildung 7 ist ein Coomassie gefärbtes SDS-PAA-Gel mit Fraktionen, welche die Abfolge der GST-Raf1-RBD-Aufreinigung darlegen, gezeigt.



**Abbildung 7: SDS-PAA-Gel nach rekombinanter Expression von GST-Raf1-RBD**

Rekombinante GST-Raf1-RBD wurde in *E.coli* BL21 (DE3) exprimiert und anschließend aufgereinigt. Das gereinigte GST-Protein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Eluiert wurde das GST-Protein mit 10 mM Glutathion, dialysiert in 1x PBS, aliquotiert, in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

M: 10 kDa- Marker, L: Bakterienlysat, Ü: Überstand nach Glutathion (GSH)-Beads-Inkubation, E: Eluat, D: Eluat nach Dialyse

### 3. Material und Methoden

---

#### TBN150

25 mM TrisCl pH 7.5  
150 mM NaCl  
10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### EQM-Puffer

50 mM TrisCl pH 8.0  
100 mM NaCl  
10 mM DTT (frisch zugeben)

#### Elutionspuffer

50 mM TrisCl pH 8.0  
100 mM NaCl  
10 mM DTT (frisch zugeben)  
10 mM Glutathion (~)

#### Proteaseinhibitoren

10 $\mu$ g / ml Antipain	10 $\mu$ g / ml Bestain	10 $\mu$ g / ml Aprotinin	10 $\mu$ g / ml Leupeptin
10 $\mu$ g / ml Pepstatin	10 mM Pefabloc	1 mM PMSF	2 mM EGTA
0.2 mM EDTA pH 8.0			

#### 1x PBS

100 mM NaCl  
20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

#### Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue G250 bildet mit Proteinen Komplexe, die spektroskopisch nachweisbar sind. Zur Proteinbestimmung wurden 1ml eines 1:1 Gemisches aus Bradford-Lösung und Wasser mit 20  $\mu$ l Probe gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Kalibrierung mit einer IgG-Lösung bekannter Konzentration ermittelt.

### 3.2. Zellbiologische Materialien und Methoden

#### 3.2.1. Etablierte eukaryotische Zelllinien

COS-7 Zellen	SV40 transformierte	fibroblastenähnliche	Affennieren-
	Epithelzellen ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )		

#### **3.2.2. Zellkultur**

COS7-Zellen wurden in DMEM mit 10 % Fötalem Kälberserum (FCS) in Abwesenheit von Antibiotikum bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gehalten. Um ein zu dichtes Wachstum der Zellen zu vermeiden, wurden diese alle 2-3 Tage passagiert. Nach 15-20 Passagen wurden neue COS7-Zellen aufgetaut und in Kultur genommen. Zum Passagieren und Aussäen für Experimente wurde das Zellkultur-Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA bedeckt. Nach 3 Minuten bei 37°C wurde die Trypsin-Reaktion mit 18 ml DMEM/10 % FCS gestoppt und die abgelösten Zellen resuspendiert. Zum Weiterführen der COS7-Zellen wurden 4-5 ml der Zellsuspension in einer neuen Zellkulturflasche vorgelegt und mit DMEM/10 % FCS auf 20 ml aufgefüllt. Für Experimente ohne Transfektion wurden 2-3\*10<sup>6</sup> Zellen, bei Experimenten mit Transfektion 1,5\*10<sup>6</sup> Zellen pro 100 mm Schälchen ausgesät. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zellzählkammer bestimmt.

#### ***Transfektion***

##### **Polyfect (Qiagen)**

Die Transfektion der COS7-Zellen erfolgte mit polykationischen Dendrimeren, die in liposomaler Form vorliegen. Polyfect (QIAGEN) ist ein aktiviertes Dendrimer, das mit der DNS kompakte Strukturen bildet. Der positiv geladene Komplex aus Polyfect und DNS bindet über negativ geladene „Rezeptoren“ wie sialylierte Glycoproteine an die eukaryotischen Zellen und wird internalisiert. Der Abbau der DNS in den Endosomen durch lysosomale Nukleasen wird durch Polyfect verhindert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die COS7-Zellen auf 100 mm Schälchen ausgesät. Kurz vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium durch 7 ml frisches DMEM/10% FCS ausgetauscht. 2.5 µg DNS und 20 µl Polyfect wurden in 300 µl DMEM verdünnt. Das Gemisch wurde 15 Minuten inkubiert, anschließend zu 1ml DMEM/10% FCS gegeben und vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach 24 Stunden wurde DMEM/10% FCS gegen DMEM getauscht und die Zellen weitere 24 h später zum Experiment verwendet.

#### **3.2.3. Der RasGTP-Pulldown**

Diese Methode dient zur Detektion von aktivem Ras aus Zelllysaten und wurde von Taylor et al. und de Rooij et al. entwickelt [173, 174]. Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass die Raf1-RBD nur mit aktiven Ras interagieren kann und als Fusionsprotein Glutathion-S-Transferase-Raf1-RBD (GST-Raf1-RBD) an Glutathion-SepharoseB-Beads(GSH-Beads) bindet, wodurch nach Zentrifugation und Waschen der Beads RasGTP angereichert wird (pulldown). Um eine verfälschte RasGTP-Signalstärke aufgrund postlytischen Guaninnukleotid-Austausches zu vermeiden, wurde ein Überschuss an GDP zum Lysepuffer dazugegeben.

Die COS7-Zellen wurden bis zu 70-80 % Konfluenz kultiviert und 24 Stunden in DMEM ohne FCS ausgehungert. Vor Experimentbeginn wurde das alte DMEM abgesaugt und durch frisches ersetzt. Nach Stimulation wurden die Zellen mit 1,5 ml eiskaltem Lysepuffer, welcher 20 µg/ml GST-Raf1-RBD enthält, lysiert und 20 Minuten bei 4°C, 14000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurden die GSH-Beads dreimal mit Lysepuffer ohne GST-Raf1-RBD gewaschen. Der Überstand der Zelllysate wurde zusammen mit 40 µl der gewaschenen GSH-Beads auf dem Drehrad bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die GSH-Beads abzentrifugiert, 100 µl des Überstandes als Zelllysate in einem neuen Reaktionsgefäß mit 20 µl 6x Lämmli-Probenpuffer versetzt, gemischt und für 10 Minuten gekocht. Der restliche Überstand wurde für Immunpräzipitationen weiterverwendet. Die GSH-Beads wurden zweimal mit 250 µl eiskaltem Lysepuffer ohne GST-Raf-RBD gewaschen und abschließend mit 40 µl 2x Lämmli-Probenpuffer versetzt, gemischt und 10 Minuten gekocht. Die Analyse des RasGTP-Pullouts erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot.

#### **3.2.4. Immunpräzipitation (IP)**

Hierfür wurden 1,3 ml des RasGTP-Pulldown-Überstandes genutzt. Nach Zugabe von 1 µg des jeweiligen Antikörpers erfolgte auf dem Drehrad eine Inkubation von zwei Stunden bei 4°C, in denen sich Protein-Antikörper-Komplexe bilden konnten. Anschließend wurden die Proben mit 40 µl einer 1:4-Mischung an gamma-Bind bzw. ProteinA-Sepharose CL 4B-Beads versetzt und über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Proben dreimal mit 1 ml eiskaltem Lysepuffer gewaschen und nach Zugabe von 40 µl 2x

Lämmli-Probenpuffer für 10 Minuten gekocht. Die Analyse der Immunpräzipitationen erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot.

#### 3.2.5. Isolation von Heparin-bindenden Proteinen

Nach Stimulation von serum-gehungerten COS7-Zellen wurde das Zellkulturmedium (10 ml) mit einer Pipette abgesaugt, in ein Falcontube überführt und auf Eis gelagert. Die Zugabe von 200  $\mu$ M PMSF und je 20  $\mu$ g/ml an Aprotinin und Leupeptin verhinderte eine Proteolyse der im Medium enthaltenen Proteine. Die Zellen wurden in 1 ml eiskaltem Lysepuffer lysiert und für 20 Minuten bei 14000rpm, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l des Überstandes als Zellysate mit 20  $\mu$ l 6x Lämmli-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten gekocht. Der Rest des Überstandes wurde für etwaige spätere Nutzung bei -20°C eingefroren und gelagert. Zum Medium im Falcontube wurden 50  $\mu$ l in Lysispuffer gewaschener Heparin-Agarose dazugegeben und es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 4°C auf dem Drehrad. Nach Zentrifugation der Proben wurde das Medium bis auf 1 ml abgesaugt, die Heparin-Agarose-Beads mit dem verbliebenen Medium in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert, Medium abgesaugt und einmal mit 250  $\mu$ l Lysispuffer gewaschen. Abschließend wurden 50  $\mu$ l 2x Lämmli-Probenpuffer zu den Heparin-Agarose-Beads dazugegeben und diese für 10 Minuten gekocht. Die Analyse der isolierten Heparin-bindenden Proteine erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot.

#### Lösungen und Puffer für den RasGTP-Pullout, die IP und die Isolation der Heparin-bindenden Proteine

<b>Lysepuffer (LB)</b>	<b>Proteaseinhibitoren</b>	<b>Phosphataseinhibitoren</b>
50 mM TrisCl pH 7.5	10 $\mu$ g / ml Pepstatin	100 $\mu$ M Natriumvanadat
150 mM NaCl	10 $\mu$ g / ml Pefabloc	3.7 $\mu$ g / ml Microcystin
5 mM MgCl <sub>2</sub>	20 $\mu$ g / ml Leupeptin	1 mM NaF
1 mM EGTA	100 $\mu$ M PMSF	
1 % NP40	10 $\mu$ g / ml Benzamidin	
1 mM DTT (frisch)	20 $\mu$ g / ml Aprotinin	

	<b>LB + RBD</b>	<b>6x Lämmli-Probenpuffer</b>
LB	+ 20 µg GST-Raf1-RBD	3 ml 20% SDS
	+ 100 µM GDP	3 ml β-Mercaptoethanol
		4 ml Glyzerin
		Bromphenolblau

Zur Herstellung von 2x Lämmli-Probenpuffer verdünnen.

#### **3.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot**

Die Separierung der zu analysierenden Proteine wurde mit Hilfe der SDS-PAGE nach Standardprotokoll durchgeführt. Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts dieser Proteine variierten die jeweiligen Polyacrylamidkonzentrationen der Gele. Speziell zur Untersuchung des Sos mobility shifts wurde ein 6%-iges SDS-PAA-Gel über Nacht bei  $U=50$  V,  $I=3$  mA laufengelassen. Die Identifikation der separierten Proteine erfolgte durch Western Blot.

Das geschnittene Gel wurde für 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. PVDF-Membran und Whatman-Papier wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 5 Sekunden in Methanol, dann 30 Sekunden in Wasser und zuletzt 10 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Das "Blotsandwich" wurde zusammengesetzt, überschüssige Feuchtigkeit mit Zellstoff abgesaugt und Luftblasen innerhalb des Blotsandwiches ausgewalzt. Der Transfer lief für 1 Stunde bei, je nach Gel-und/oder Proteingröße, variabler Stromstärke.

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran für 30 Minuten mit, je nach später zu verwendendem Antikörper, 1 % Trockenmilch in TBS-Tween (TBS-T) oder 1 % BSA in TBS-T geblockt. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit dem gewünschten primären Antikörper über Nacht in 1 % Trockenmilch/TBS-T bzw. in 1 % BSA/TBS-T inkubiert. Es wurde dreimal mit TBST für 10 Minuten gewaschen und die Inkubation des sekundären Antikörpers für 30 Minuten in 1 % Trockenmilch/TBS-T oder 1 % BSA/TBS-T durchgeführt. Es folgten 4-6 Waschschrte für jeweils 10 Minuten mit TBS-T. Aufgrund der Kopplung der Meerettich-Peroxidase an den sekundären Antikörper ist ein Nachweis des gesuchten Proteins mit Hilfe von ECL durch Chemilumineszenz möglich.

### 3. Material und Methoden

---

#### ***Coomassie Färbung***

Diese Methode wurde zur Anfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen verwendet. Das Gel wurde hierbei für 30 Minuten unter Schütteln mit der Färbelösung inkubiert und anschließend mehrmals mit Entfärbelösung behandelt. Ungebundener Farbstoff wurde durch das Waschen entfernt und die gefärbten Proteine wurden sichtbar. Abschließend wurde das Gel in Wasser gewaschen, unter Vakuum getrocknet und verwahrt.

#### **Trenngele**

	<u>13-prozentig (10ml)</u>	<u>10-prozentig (10 ml)</u>	<u>6-prozentig (10ml)</u>
Rotiphorese 30	4.33 ml	3.3 ml	2 ml
2M TrisCl pH 8.8	1.9 ml	1.9 ml	1.9 ml
20 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl
Aqua bidest	3.77 ml.	4.8 ml	6.1 ml
Ammoniumpersulfat	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

#### **Sammelgel**

	<u>4 prozentig 5 ml</u>
Rotiphorese 30	0.66 ml
0.5 M TrisCl pH 6.8	1.25 ml
20 % SDS	25 µl
Ammoniumpersulfat	40 µl
TEMED	4 µl

#### **Transferpuffer**

48 mM TrisCl
39 mM Glycin
0.037 % SDS
150 ml/l Methanol

#### **Elektrophoresepuffer**

250 mM Tris
2 M Glycin
35 mM SDS

#### **TBS**

20 mM TrisCl
137 mM NaCl
0.1% (v/v) Tween-20

#### **Coomassie-Färbelösung**

2.5 g/l Coomassie R-250
25 % Ethanol
10 % Essigsäure

#### **Entfärbelösung**

10 % Essigsäure
40 % Ethanol

pH-Wert auf 7.6 einstellen

#### **3.2.7. Untersuchung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) durch In-Gel-Assays**

Diese Methode beruht auf Arbeiten von Meng et. al., die durch B.Markova modifiziert wurden [160, 175].

##### *Markieren des Substrates mit radioaktivem $^{32}\text{P}$*

Ein Milligramm an Poly(Glu<sub>4</sub>-Tyr) wurde mit 60 units rekombinanter humaner pp60<sup>c-src</sup> (in *E.coli* als GST-Fusionsprotein exprimiert) in 500 µl Kinase-Puffer und 200 µCi [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (3000 Ci/mmol) über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20% (v/v) Trichloressigsäure gestoppt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Src-Kinase wurde durch diese Reaktion inaktiviert und das Poly(Glu<sub>4</sub>Tyr) präzipitiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 12000 rpm für 10 Minuten. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl 2M Tris-Base gelöst. Nicht inkorporiertes ATP wurde entfernt, indem die Probe auf eine 1.5x12 cm Biorad-Säule, die mit 10 ml Sephadex G50 (äquilibriert mit 50 mM Imidazol pH 7.2) gefüllt war, gegeben wurde. Es wurden 20 Fraktionen (500 µl) mit 50 mM Imidazol eluiert und auf Radioaktivität untersucht (Szintillations-Counter). Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt, wobei eine spezifische Aktivität von 1-2.5x10<sup>8</sup> CPM/mg üblich war, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

##### *Probenpräparation*

Konfluente COS7-Zellen wurden mit Wasserstoffperoxid und TPA behandelt. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl PTP-Lysepuffer lysiert. Der PTP-Lysepuffer wurde zuvor für 6 Stunden bei 4°C im Vakuum entgast, bevor Iodessigsäure und Proteaseinhibitoren vorsichtig hinzugegeben wurden. Die Lyse der Zellen wurde vorsichtig durchgeführt, um das Lösen von Luftsauerstoff in den Lysaten zu verhindern. Die Zelllysate wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, um eine komplette Alkylierung zu gewährleisten. Zudem wurden Kontrollzellen mit PTP-Lysepuffer ohne Iodessigsäure lysiert. Von jeder Probe wurden 10 µl auf ein SDS-PAA-Gel aufgetragen und anschließend in einem In-Gel-Assay analysiert.



#### *SDS-PAGE und Detektion der reversiblen PTP-Oxidation durch modifizierte In-Gel-Assays*

10% SDS-PAA-Gele wurde nach Standardmethode, allerdings unter Zugabe von  $^{32}\text{P}$ -markiertem Poly(Glu<sub>4</sub>Tyr) mit einer Aktivität von  $2 \times 10^5$  CPM/ml Gel zum Polymerisierungsmix, gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden aufgetragen und das Gel lief unter Standardbedingungen. Radioaktivität wurde kaum oder nicht aus dem Gel eluiert. Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in 100 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8 und 20% Isopropanol inkubiert, um das SDS herauszuwaschen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 100 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8 und 0.3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol für jeweils 30 Minuten, zweifache Inkubation für je 40 Minuten im gleichen Puffer mit 6M Guanidinhydrochlorid und 1 mM EDTA und dreifacher Inkubation für je 1 Stunde mit Renaturierungspuffer. Komplette Renaturierung wurde durch Inkubation des Gels im gleichen Puffer über Nacht erreicht. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie nach Standardmethode gefärbt/entfärbt, getrocknet und bei  $-80^\circ\text{C}$  mit hochempfindlichen Film und einem *intensifying screen* exponiert.

#### **Lösungen und Puffer für die Untersuchung von PTP durch In-Gel-Assays**

<b>Kinase-Puffer</b>	<b>Renaturierungspuffer</b>	<b>PTP-Lysepuffer</b>
50 mM HEPES, pH7.4	50 mM Tris-HCl, pH 7.4	25 mM Essigsäure, pH 5.5
2 mM DTT	0.3% $\beta$ -Mercaptoethanol	150 mM NaCl
10 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM EDTA	1% Nonidet P40
1 mM MnCl <sub>2</sub>	0.04 % Tween 20	10% Glyzerin
0.2 mM ATP		10 mM Iodessigsäure
0.1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		

#### 3.2.8. Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden als primäre Antikörper in Immunoblot-Analysen oder in Immunpräzipitationsexperimenten verwendet.

<i>Antikörper</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Quelle</i>	<i>Katalog-Nr.</i>
anti-pan-Ras	Maus	Oncogene	OP41-100UG
anti-Ha-Ras	Maus	Santa Cruz	SC-29
anti-Ki-Ras	Maus	Santa Cruz	SC-30
anti-N-Ras	Maus	Santa Cruz	SC-31
anti-Phospho-p44/42-Erk (T202/Y204)	Maus	Cell Signaling	9106
anti-pan44/42-Erk	Maus	BD Transduction Laboratories	610123
anti-pY(4G10)	Maus	AG F.D.Böhmer	
anti-EGFR	Schaf	Upstate	06-129
anti-Shc	Kaninchen	Upstate	06-203
anti-Shc	Maus	BD Transduction Laboratories	S68020
anti-Grb2	Maus	Upstate	05-372
anti-Grb2	Kaninchen	Santa Cruz	C-23
anti-proHB-EGF	Ziege	Santa Cruz	C-18
anti-HB-EGF	Ziege	R&D Systems	AF-259-NA
anti-phospho-MARCKS	Kaninchen	Cell Signaling	2741
anti-phospho-Serin-PKCsubstrat	Kaninchen	Cell Signaling	2261
anti-phosphoSerin473 Akt	Kaninchen	Cell Signaling	9271
anti-pan-Akt	Kaninchen	Cell Signaling	9272
anti-HA	Maus	AG F.D.Böhmer	
anti-Sos	Kaninchen	Upstate	nicht mehr verfügbar

### 3. Material und Methoden

---

Anti-pan44/42-Erk wurde 1:5000, anti-pY und anti-HA wurden 1:10000, alle anderen primären Antikörper, außer die anti-Ras-Antikörper, wurden 1:1000 in TBS-T, 1% BSA verdünnt. Die anti-Ras-Antikörper wurden 1:1000 in TBS-T, 1% Trockenmilch verdünnt.

Außer den Maus-Antikörper sind alle primären Antikörper polyklonaler Natur.

Für Western Blot wurden Meerrettich-Peroxidase konjugierte sekundäre Antikörper verwendet.

#### ***Sekundäre Antikörper***

<i>Antikörper</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Quelle</i>	<i>Katalog-Nr.</i>
anti-Maus-IgG-HRP	Kaninchen	KPL	074-1806
anti-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	KPL	074-1506
anti-Schaf-IgG-HRP	Kaninchen	Upstate	12-342
anti-Ziege-IgG-HRP	Esel	Santa Cruz	SC-2033

Die sekundären Antikörper wurden je nach zuvor verwendetem Antikörper 1:10000 in TBS-T, 1% BSA oder 1:10000 in TBS-T, 1% Trockenmilch verdünnt.

#### **3.2.9. Laborchemikalien**

##### *Zellkultur und Transfektion*

DMEM	PAA Laboratories
Fötale Kälberserum	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Polyfect Transfection Reagent	QIAGEN

##### *Stimulantien*

Ionomycin	Alexis Biochemicals
TPA	Alexis Biochemicals

### 3. Material und Methoden

---

#### *Hemmstoffe*

AG1478	Calbiochem
BAPTA/AM	Alexis Biochemicals
Bisindolylmaleimid I (BIM I)	Sigma
CRM197	Sigma
LY294002	Alexis Biochemicals
N-Acetyl-L-Cystein (LNAC)	Sigma
PD98059	Alexis Biochemicals

#### *Sonstige Materialien*

Ampicillin	Sigma
DMSO	Sigma
ECL	Perkin Elmer Life Sciences
Filme	Kodak
GammaBind-Sepharose	Amersham Biosciences
GDP	Sigma
Glutathion-Sepharose	Amersham Biosciences
Heparin-Agarose	Sigma
IPTG	Applichem
Lysozym	Sigma
prestained protein marker	New England Biolabs
unstained protein marker	New England Biolabs
ProteinA-Sepharose	Amersham Biosciences
PVDF-Membran	Millipore
Rotiphorese 30	Roth
Sepharose CL 4B	Sigma
Iodessigsäure	Sigma
pp60 <sup>c-src</sup>	von B.Markova erhalten
Poly(Glu <sub>4</sub> Tyr)	Sigma

## 4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Aktivierung der kleinen GTPase Ras durch den Phorbolster TPA aufzudecken. Als Zellsystem dienten die COS7-Fibroblasten-ähnlichen Epithelzellen, in denen eine Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation beschrieben wurde [125, 166]. Zudem wurden weitere interessante Beobachtungen nach TPA-Behandlung sowohl in COS7- als auch in dem COS7-Zellen ähnlichen COS1-Zelltyp gemacht. Erstens transaktiviert TPA den EGFR, was zur Tyrosinphosphorylierung von Shc und vermehrter Interaktion zwischen Shc und Grb2 führt [155, 166, 167], zweitens erhöht TPA den Guaninnukleotid-Austausch am Ras [eigene Diplomarbeit], drittens ist die TPA-induzierte Ras-Aktivierung sensitiv gegenüber PKC-Inhibitoren [125], viertens konnte gezeigt werden, dass TPA Ras durch die direkte Aktivierung von RasGRP1 aktiviert [176] und viertens wird die TPA-ausgelöste Ras-/Erk-Aktivierung nicht durch dominant-negatives Ras inhibiert [125, 168, 170-172]. Die letztgenannte Beobachtung wiederum führte zur Vermutung, dass TPA die RasGTP-Akkumulation durch RasGAP-Hemmung ermöglicht [144], was wiederum in Kontrast zu den Guaninnukleotid-Austausch-Daten steht. Zudem gibt es widersprüchliche Aussagen über die Expression von RasGRP-Isoformen in diesem Zellsystem. M. Philips konnte RasGRP1 durch RT-PCR in diesen Zellen nachweisen, Proteinexpression von RasGRP1 kann jedoch nicht in COS1- und COS7-Zellen detektiert werden (eigene Daten, J.Stone, persönliche Kommunikation).

Obwohl eine Vielzahl an Mechanismen für die Phorbolster-induzierte Ras-Aktivierung vorgeschlagen wurde, konnte bisher für keinen Zelltyp ein Mechanismus enthüllt werden, der alle Beobachtungen in Einklang zusammenführt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation einer systematischen Untersuchung unterworfen, um Licht in deren Mechanismus in COS7-Zellen zu bringen.

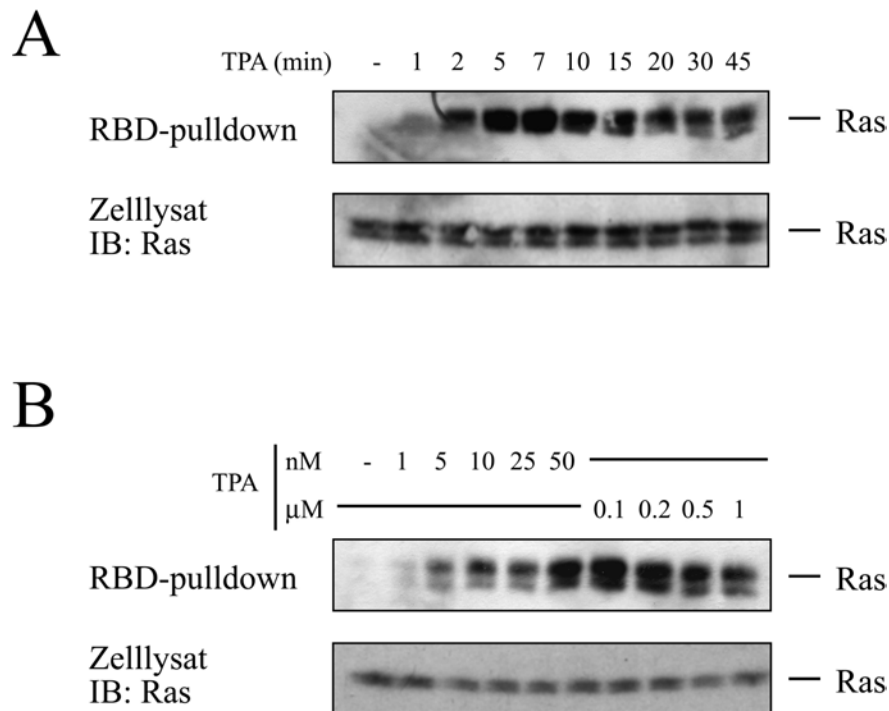
In allen sich anschließenden Versuchen wurde mit subkonfluenten, serum-gehungerten COS7-Zellen gearbeitet, daher wird dies nicht weiter erwähnt. Endogenes als auch überexprimiertes aktives Ras wurde immer nach der Methode von Taylor et al. mit der GST-Raf1-RBD aus dem Zelllysate extrahiert und durch Immunoblot mit pan-Ras-Antikörper analysiert [173, 174] (siehe „Material und Methoden“). Immunpräzipitationen (IPs) wurden immer, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, durchgeführt. Zudem wurden immer zur Kontrolle gleicher Mengen an Protein in EGFR- und Shc-IPs die anti-pY-

Antikörper-inkubierten Membranen mit einem reduzierendem Puffer inkubiert, der zur Denaturierung und Dissoziation der Antikörper von den PVDF-Membranen führte. Nach mehrmaligem Waschen wurden diese Membranen mit Antikörper gegen EGFR oder Shc behandelt und deren immunpräzipitierte Proteinmenge analysiert. Die Analyse der Proteine aus dem Zelllysat erfolgte ebenso, wie in Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben. Die Durchführung dieser Protein-Analysen wird in den folgenden Abschnitten nicht näher erwähnt und ist für das jeweilige Experiment nur kurz in der Legende der dazugehörigen Abbildung angegeben.

### ***4.1. Dosis- und Zeitabhängigkeit der TPA-induzierten Ras-Aktivierung***

Für die Untersuchung der Ras-Aktivierung durch Phorbol ester ist es von großer Wichtigkeit, die optimale Dosis und Zeitlänge der Stimulation zu benutzen. Daher wurden zuerst COS7-Zellen mit 100 nM TPA für verschiedene Zeiträume (Abb. 8A) oder für 5 Minuten mit verschiedenen TPA-Konzentrationen (Abb. 8B) stimuliert.

Die Phorbol ester-Inkubation resultierte in einer langen und starken Ras-Aktivierung in COS7-Zellen und die Analyse der Zeitabhängigkeit demonstrierte, dass Ras innerhalb von zwei Minuten aktiviert und dass die höchste RasGTP-Akkumulation nach 5-7 Minuten TPA-Stimulation erreicht wurde (Abb. 8A). Nach 10 Minuten nahm das RasGTP-Signal langsam ab und erreichte nach etwas mehr als 60 Minuten wieder das basale RasGTP-Niveau (Daten nicht gezeigt). Die hier gewonnenen Daten stehen im Einklang mit Daten einer anderen Arbeitsgruppe, die ebenso die Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation in COS7-Zellen beobachteten (Abb. 8) [125]. Außerdem ist zu erkennen, dass eine Konzentration von 100 nM TPA das stärkste RasGTP-Signal nach 5 Minuten induzierte (Abb. 8B). Eine Erhöhung der TPA-Konzentration brachte dagegen keinen weiteren Anstieg der Ras-Aktivierung.



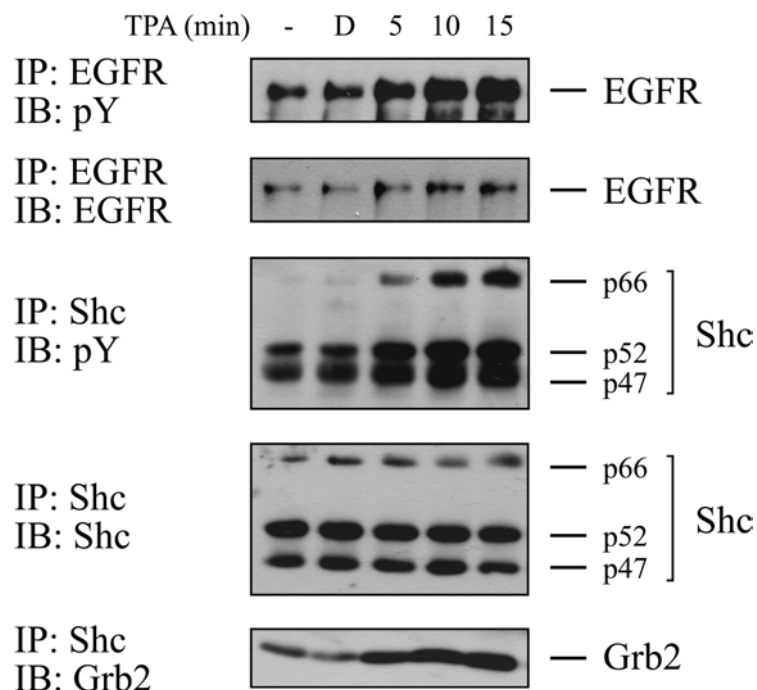
**Abbildung 8: TPA aktiviert Ras in COS7-Zellen.** **A**, COS7-Zellen wurden mit 100 nM TPA stimuliert. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden die Zellen in Gegenwart von GST-Raf1-RBD lysiert und wie in Abschnitt 3.2.3. beschrieben, behandelt. **B**, COS7-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an TPA für 5 Minuten stimuliert. Die Lysatbehandlung erfolgte wie in A.

#### ***4.2. TPA transaktiviert den EGFR und führt zu Shc-Tyrosin-Phosphorylierung und erhöhter Shc/Grb2-Interaktion***

Der bestcharakterisierte Signalweg, der zur Ras-Aktivierung führt, geht vom EGFR aus. Untersuchungen der Ras-Aktivierung nach EGF-Stimulation zeigten, dass der EGFR nach Ligandenbindung dimerisiert, sich autophosphoryliert und so das Adaptorprotein Shc über SH2-Domänen an ihn bindet und phosphoryliert wird. Shc dient auf diese Weise als Bindestelle für die SH2-Domänen von Grb2, welches mit dem RasGEF Sos interagiert. Sos kommt dadurch in die Nähe von Ras, erhöht dessen Guaninnukleotid-Austausch und führt somit zur Ras-Aktivierung [78-81, 177]. Nun konnte in COS-Zellen gezeigt werden, dass nach TPA-Stimulation der EGFR und Shc tyrosinphosphoryliert wurden [155, 166, 167]. Um herauszufinden, ob diese Beobachtungen auch in unseren Händen gemacht werden können, wurde untersucht, welchen Effekt TPA auf den EGFR-Signalweg besitzt. Dafür wurden COS7-Zellen mit 100 nM TPA für verschiedene Zeiträume stimuliert und anschließend analysiert. In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass TPA die EGFR- und Shc-Phosphorylierung

und die Shc/Grb2-Interaktion nach 5 Minuten induziert. Zudem zeigt die Zeitabhängigkeit, dass die EGFR- und Shc-Phosphorylierung mit der Stimulationslänge ansteigt und teilweise mit der Ras-Aktivierung in Abbildung 8 korreliert. Aufgrund des oben beschriebenen Signalweges scheint es daher möglich, dass auch die TPA-induzierte EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung über Sos-Rekrutierung zur Ras-Aktivierung führt.

Ein Vergleich der hier erhaltenen Daten mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von A. Ullrich zeigt, dass trotz der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen an TPA die Resultate übereinstimmen [155]. Weiterhin ist besonders in Abbildung 9 und zum Teil in den Resultaten von Prenzel et al., Tebar et al. und Grosse et al. zu erkennen [155, 166, 167], dass COS7-Zellen bereits geringe Mengen an tyrosinphosphorylierten EGFR und Shc im unstimulierten Zustand aufweisen. Diese basale Tyrosinphosphorylierung könnte durch geringe Mengen an EGFR-Liganden, welche die COS7-Zellen im serum-gehungerten Zustand sezernieren, bedingt sein.



**Abbildung 9: TPA induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von EGFR, Shc und die Shc/Grb2-Interaktion.** COS7-Zellen wurden mit DMSO (D) für 15 Minuten oder 100 nM TPA für die angegebenen Zeiten inkubiert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden nacheinander einer EGFR- und Shc-Immunopräzipitation unterworfen. Tyrosinphosphorylierungen von EGFR und Shc, als auch die Shc/Grb-Interaktion wurden durch Immunoblot mit anti-Phospho-Tyrosin(pY)- und anti-Grb2-Antikörper analysiert. Die anti-pY-Antikörper inkubierten Membranen wurden „gestrippt“ und mit anti-EGFR- und anti-Shc-Antikörper behandelt.



### ***4.3. Die Rolle des EGFR/Shc-Signalweges in der durch TPA-ausgelösten RasGTP-Akkumulation***

In Abschnitt 4.2. wurde die TPA-induzierte EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung in COS-Zellen nachgewiesen, die auch andere Arbeitsgruppen schon beschrieben hatten [155, 166, 167]. Aufgrund der Tatsache, dass EGF Ras durch den EGFR/Shc/Grb2/Sos-Weg aktiviert, lag die Vermutung nahe, dass die TPA-induzierte Tyrosinphosphorylierung von EGFR und Shc ebenso in einer Ras-Aktivierung resultiert. Um aufzuklären, ob der EGFR-Signalweg in die TPA-induzierte Ras-Aktivierung involviert ist, wurde die Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR mit dem spezifischen Inhibitor AG1478 blockiert. Dafür blieben COS7-Zellen unbehandelt oder wurden mit 200 nM AG1478 präinkubiert und anschließend mit 100 nM TPA stimuliert und analysiert.

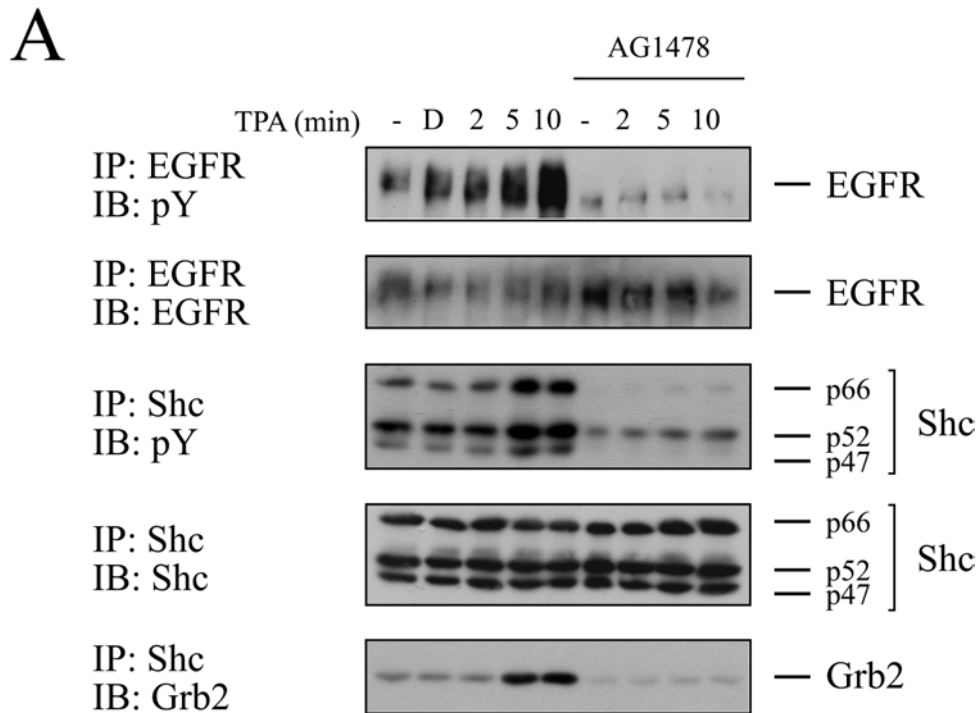
Die Inhibierung der Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR durch AG1478 führte zur kompletten Hemmung der basalen als auch der TPA-induzierten Phosphorylierung von EGFR und Shc (Abb. 10A). Zudem resultierte die AG1478-Behandlung im Verschwinden der basalen als auch der Phorbol-ester-ausgelösten Shc/Grb2-Interaktion (Abb. 10A). Die Beobachtungen, dass AG1478 die TPA-induzierte EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung hemmen, stimmen mit Daten früherer Publikationen überein [155, 167]. Die in Abbildung 10 A gezeigten Resultate deuten daraufhin, dass die Inhibierung der basalen und der TPA-induzierten EGFR-Aktivität durch AG1478 zum Zusammenbruch der Signalweitergabe durch das Shc/Grb/Sos-Guaninnukleotid-Austausch-Systems in serum-gehungerten als auch in TPA-behandelten COS7-Zellen führt. Aufgrund der konventionellen Meinung, dass Ras nach EGFR-Aktivierung in COS7-Zellen durch den RasGEF Sos aktiviert wird, sollte die EGFR-Hemmung nicht nur zum Verschwinden der Shc/Grb2-Interaktion führen, sondern auch die Ras-Aktivierung und die basalen RasGTP-Niveaus inhibieren. Um zu überprüfen, ob diese Vermutung zutrifft, wurde ein RasGTP-Pulldown durchgeführt. Betrachtet man die RasGTP-Signale in Abbildung 10B, fällt auf, dass AG1478 die basalen RasGTP-Niveaus fast komplett hemmt. Aufgrund der in Abbildung 10A gemachten Beobachtungen der kompletten Hemmung der basalen Shc/Grb2-Assoziation und Tyrosin-Phosphorylierung von EGFR und Shc deutet dies darauf hin, dass der EGFR, Shc und der Shc/Grb2-Komplex für den Erhalt der basalen RasGTP-Niveaus essentiell sind. Allerdings führte AG1478 nur zu einer geringen Reduktion der TPA-induzierten Ras-Aktivierung (Abb. 10B). Hierbei erreichte die Ras-Aktivierung jedoch nie die Signalstärke, die TPA allein ohne EGFR-Hemmung induzierte (Abb. 10B). Der Aktivierungszustand der im Signalweg unterhalb von Ras gelegenen Erk

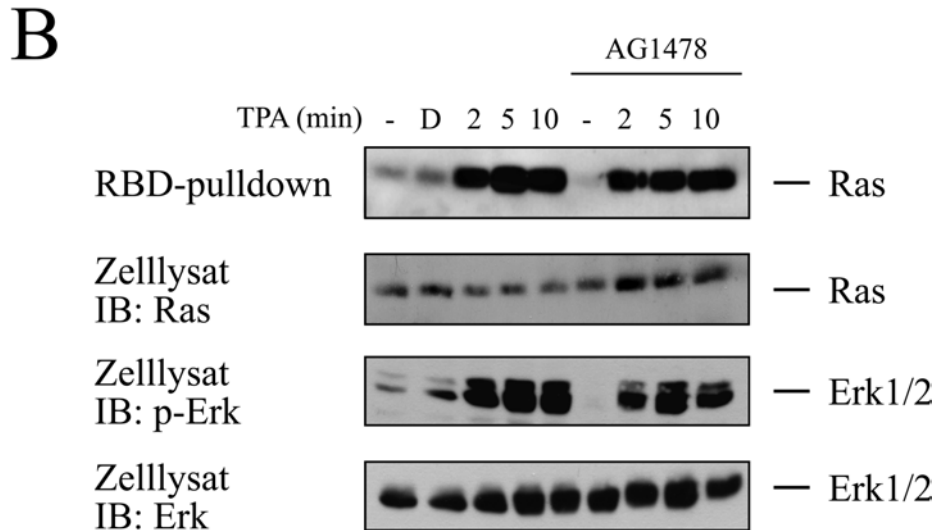
## 4. Ergebnisse

---

zeigt ein ähnliches Bild. AG1478 hemmte die basale Erk-Aktivität, aber nur ein schwacher Rückgang der TPA-induzierten Erk-Aktivierung war nach AG1478-Behandlung zu beobachten (Abb. 10B).

Diese Daten führten zu der Vermutung, dass der EGFR nicht die TPA-induzierte Ras-Aktivierung vermittelt, aber für den Erhalt der basalen RasGTP-Niveaus und Erk-Phosphorylierung wichtig ist.





**Abbildung 10: A, Die Hemmung des EGFR blockiert die basale und die TPA-induzierte EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung und Shc/Grb2-Interaktion.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit DMSO (D) oder mit 200 nM AG1478 für 15 Minuten präinkubiert, anschließend mit 100 nM TPA für die angegebenen Zeiträume stimuliert und lysiert. Die Lysate wurden zuerst einer EGFR- und anschließend einer Shc-Immunopräzipitation unterworfen. Tyrosinphosphorylierungen von EGFR und Shc, als auch die Shc/Grb-Interaktion wurden durch Immunoblot mit anti-Phospho-Tyrosin(pY)- und anti-Grb2-Antikörper analysiert. Die anti-pY-Antikörper inkubierten Membranen wurden „gestrippt“ und mit anti-EGFR- und anti-Shc-Antikörper behandelt.

**B, Die Hemmung des EGFR blockiert basales, aber nicht TPA-induziertes RasGTP.** Die Zellen wurden wie in A behandelt und die Menge an aktivem Ras wurde, wie in Abschnitt 3.2.3. beschrieben, determiniert. Zellysate wurden auf Ras-Expression und Erk-Phosphorylierung analysiert. Die pErk-Membran wurde „gestrippt“ und mit anti-Erk-Antikörper inkubiert.

#### ***4.4. Der Einfluss proteolytisch freigesetzter EGF-Liganden auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung***

Verschiedene Forschungsgruppen dokumentieren, dass TPA Matrix-Metallo-Proteinasen aktiviert, welche die Ektodomäne von in der Plasmamembran lokalisierten EGF-ähnlichen Liganden spalten [143, 156, 157]. Die proteolytische Freisetzung eines solchen Liganden wie Heparin-bindendem EGF (HB-EGF) führt zur Liganden-Rezeptor-Interaktion, was in der Aktivierung des EGFR-Rezeptors und seinem Signalweg, in dem Ras eine wichtige Komponente darstellt, resultiert [155, 156].

Um zu überprüfen, ob TPA in der Lage ist, die Freisetzung von HB-EGF zu induzieren, wurden COS7-Zellen für verschiedene Zeiträume mit 100 nM TPA behandelt und das Zellkulturmedium auf freigesetztes HB-EGF analysiert. Dabei wurde die Tatsache, dass HB-EGF an Heparin binden kann, zur Affinitätsaufreinigung dieser Liganden an Heparin-Agarose

genutzt. Die zu verschiedenen Zeitpunkten freigesetzten Mengen an endogenem HB-EGF sind in Abbildung 11A dargestellt. Man stellt fest, dass ohne Stimulation keine Menge an HB-EGF im Medium zu detektieren ist. Erste Mengen an HB-EGF erscheinen nach 7-10 Minuten und die Freisetzung dieses Liganden steigt bis zum Ende der Versuchsreihe weiter an (Abb. 11A). Ähnliche Beobachtungen wurden von anderen Arbeitsgruppen gemacht, die allerdings proHB-EGF in COS7- und Vero-H-Zellen überexprimierten [155, 156] und welche eine Freisetzung an HB-EGF erst nach 10-30 Minuten untersuchten. Vergleicht man das freigesetzte HB-EGF mit dem in der Plasmamembran verbliebenen proHB-EGF und *tail-fragment*, fällt auf, dass es zu keiner detektierbaren Anhäufung des *tail-fragments* kommt und proHB-EGF keine Mengenabnahme im Zelllysate zeigt (Abb. 11A). Dies steht im Kontrast zu den Daten von Umata et al. und Prenzel et al., in denen eine eindeutige *tail-fragment*-Akkumulation zu beobachten ist [155, 156]. Anscheinend sind die in COS7-Zellen freigesetzten Mengen an endogenem HB-EGF so gering, dass die Anhäufung des *tail-fragments* im Zelllysate mit dem verwendeten Antikörper nicht feststellbar oder dieser unspezifisch ist.

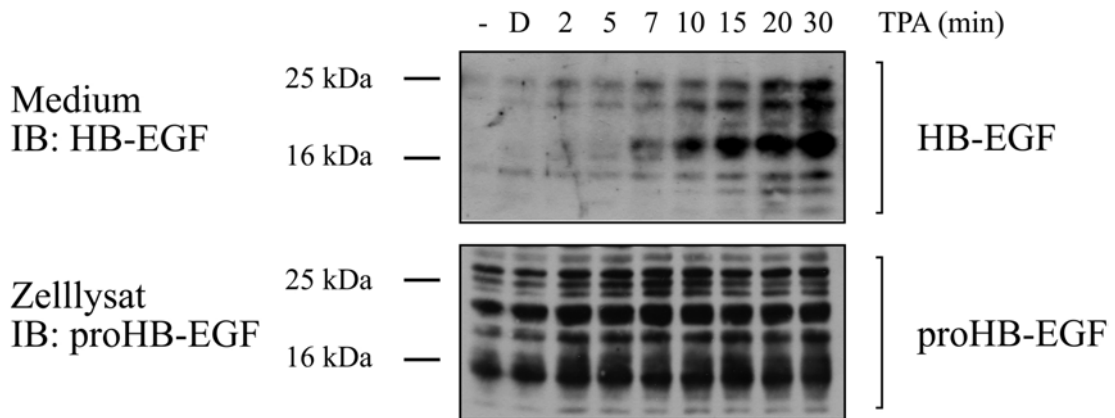
Ein Vergleich der Kinetiken der HB-EGF-Freisetzung (Abb. 11A) und Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation (Abb. 8A) zeigt zudem widersprüchliche Ergebnisse. Die Freisetzung von HB-EGF tritt erst nach 7 Minuten zu spät für das TPA-induzierte RasGTP-Signal auf, welches schon nach 2 Minuten zu erkennen ist und sein Maximum zwischen 5-7 Minuten erlangt. Dies lässt vermuten, dass HB-EGF nicht essentiell für die Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung ist. Jedoch ist es möglich, dass die per Western Blot nicht detektierten Mengen an HB-EGF ausreichen, den EGFR und auch Ras zu aktivieren. HB-EGF könnte somit einen potentiellen Vermittler der TPA-induzierten Ras-Aktivierung darstellen, dessen Einfluss durch weitere Experimente untersucht werden musste.

Um die Rolle proteolytisch freigesetzten HB-EGFs auf die Phorbol-ester-ausgelöste Ras-Aktivierung aufzuklären, wurde eine nichttoxische Mutante des Diphtherietoxins, CRM197, verwendet, welche freigesetztes HB-EGF „einfängt“ und seine Rezeptor-Bindung und -Aktivierung verhindert. COS7-Zellen wurden deshalb mit 5 µg/ml CRM197 inkubiert oder blieben unbehandelt und wurden daraufhin mit 100 nM TPA stimuliert und anschließend analysiert.

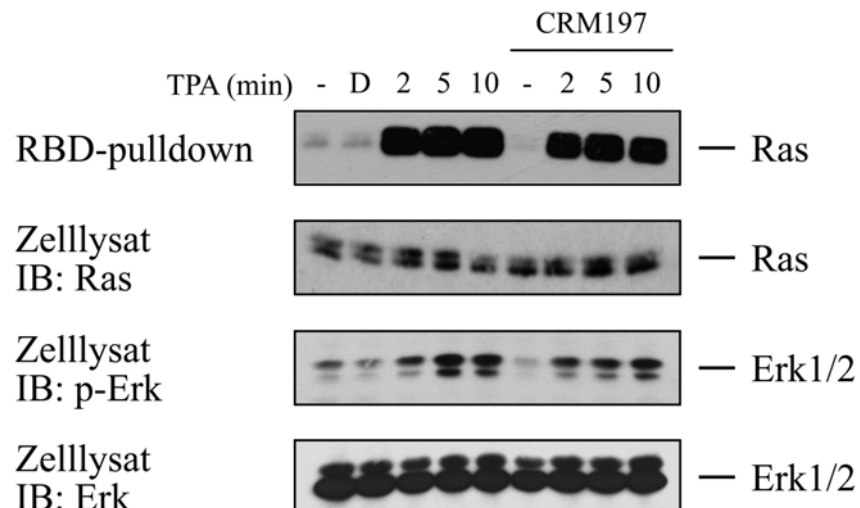
Die Behandlung der Zellen mit CRM197 führte, verglichen mit unbehandelten Zellen, zu verringerten basalen RasGTP-Niveaus (Abb. 11B). Der Einfluss von CRM197 auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung ist dagegen als gering zu betrachten, da die RasGTP-Niveaus sich nach Inhibitorbehandlung kaum verringerten. Betrachtet man den Aktivierungszustand von

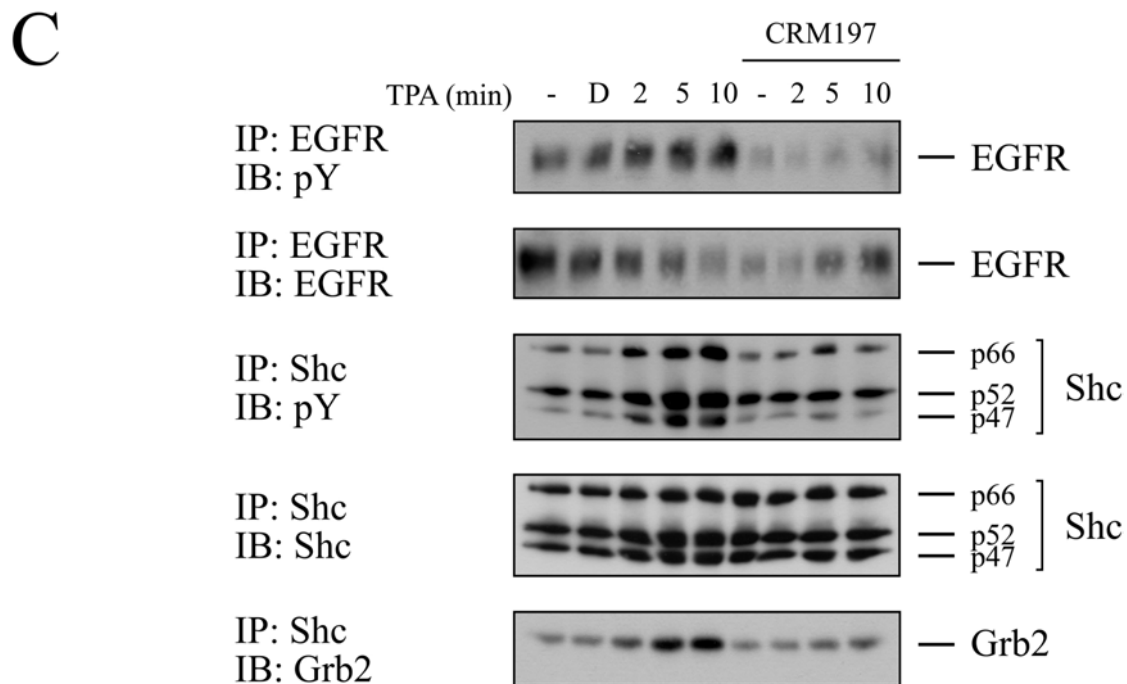
Erk, fällt auf, dass dieser dem Muster des RasGTP-Signals folgt. CRM197 hemmt basale Erk-Aktivität, jedoch keine TPA-induzierte Erk-Aktivierung (Abb. 11B), was schon in einer früheren Veröffentlichung gezeigt wurde [178]. Korrelierend mit den Literaturdaten führt die Blockade des HB-EGF zur Hemmung der EGFR-Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc, als auch zu verminderter Shc/Grb2-Interaktion (Abb. 11C) [155]. Vergleicht man diese Beobachtungen mit dem RasGTP-Pulldown aus Abbildung 11B, zeigt sich somit ein divergentes Bild, wie es schon nach AG1478-Behandlung zu beobachten war (Abb. 10). Die Hemmung der EGFR-Aktivierung durch AG1478 und CRM197 führt zum Zusammenbruch des postulierten Signalweges vom EGFR zu Ras und zur Reduktion der basalen Ras- und Erk-Aktivität, allerdings kann TPA im Hintergrund der AG1478- und CRM197-Behandlung Ras und Erk aktivieren. Beide Untersuchungen demonstrieren somit, dass der EGFR-Signalweg zwar den Erhalt der basalen Ras- und Erk-Aktivität, jedoch nicht die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung vermittelt.

**A**



**B**





**Abbildung 11: A, TPA induziert die Freisetzung des EGFR-Liganden HB-EGF.** COS7-Zellen wurden mit DMSO (D) für 30 Minuten oder für die angegebenen Zeiträume mit 100 nM TPA stimuliert. Freigesetztes HB-EGF wurde mit 50 µl/Probe Heparin-Agarose aus dem Zellkulturmedium extrahiert und mit anti-HB-EGF-Antikörper determiniert. Zellysate wurden auf das membranständige proHB-EGF analysiert. **B, Die Hemmung der HB-EGF-Bindung an den EGFR blockiert basales RasGTP, aber nicht die Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 5 µg/ml CRM197 für 15 Minuten präinkubiert und anschließend mit DMSO (D) für 10 Minuten oder mit 100 nM TPA für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Menge an aktivem Ras wurde, wie oben beschrieben, verifiziert. Zellysate wurden auf Ras-Expression und Erk-Phosphorylierung analysiert. Die pErk-Membran wurde gestriipt und mit anti-Erk-Antikörper inkubiert. **C, Die Hemmung der HB-EGF-Bindung an den EGFR blockiert die basale und die TPA-induzierte EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung und Shc/Grb2-Interaktion.** Es wurde derselbe Versuchsaufbau wie in B verwendet. EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung und Shc/Grb2-Interaktion wurden durch IP von EGFR und Shc analysiert, gefolgt von Immunblotting mit anti-Phosphotyrosin (pY)- und anti-Grb2-Antikörpern. Die pY-Membranen wurden gestriipt und mit anti-EGFR- und anti-Shc-Antikörper determiniert.

#### ***4.5. Die Rolle von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) in der TPA-bedingten Ras-Aktivierung***

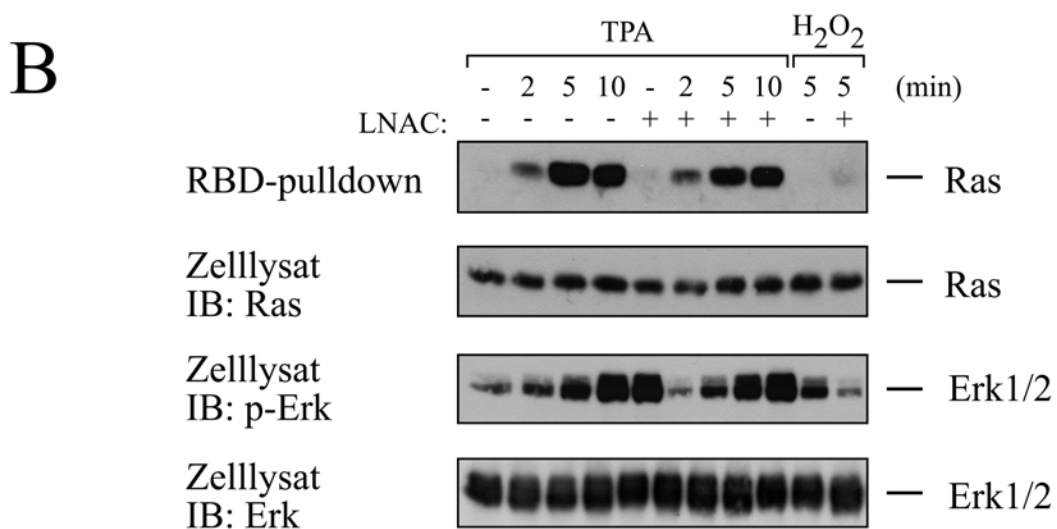
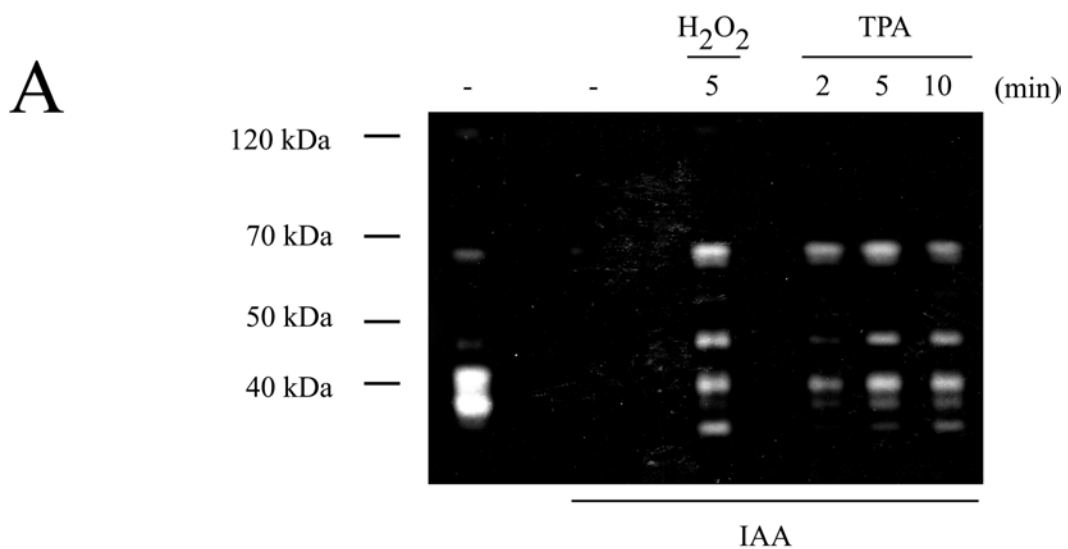
Phorbolster sind bekannte Auslöser von Reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Makrophagen und Neutrophilen und stehen im Verdacht, die Bildung von ROS auch in epithelialen, endothelialen Zellen und Fibroblasten zu induzieren [158, 179, 180]. Einige Arbeiten beschreiben zudem, dass die ROS-Bildung durch Phorbolster durch PKCs vermittelt wird [158, 181-183]. Nun wurde gezeigt, dass reaktive freie Radikale Ras aktivieren können [184]. Es ist demzufolge möglich, dass die TPA-induzierte Ras-Aktivierung durch

ROS bedingt ist. Viele der von ROS ausgelösten zellulären Effekte können durch die Inhibierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) erklärt werden, welche durch die Oxidation des konservierten und für die Funktion der PTP essentiellen Cystein-Restes im katalytischen Zentrum der Phosphatase zustande kommen [185]. Die PTP-Inhibierung kann daraufhin in verlängerter Tyrosinphosphorylierung der PTP-Substrate und in einer Aktivierung verschiedener Signalwege resultieren [181].

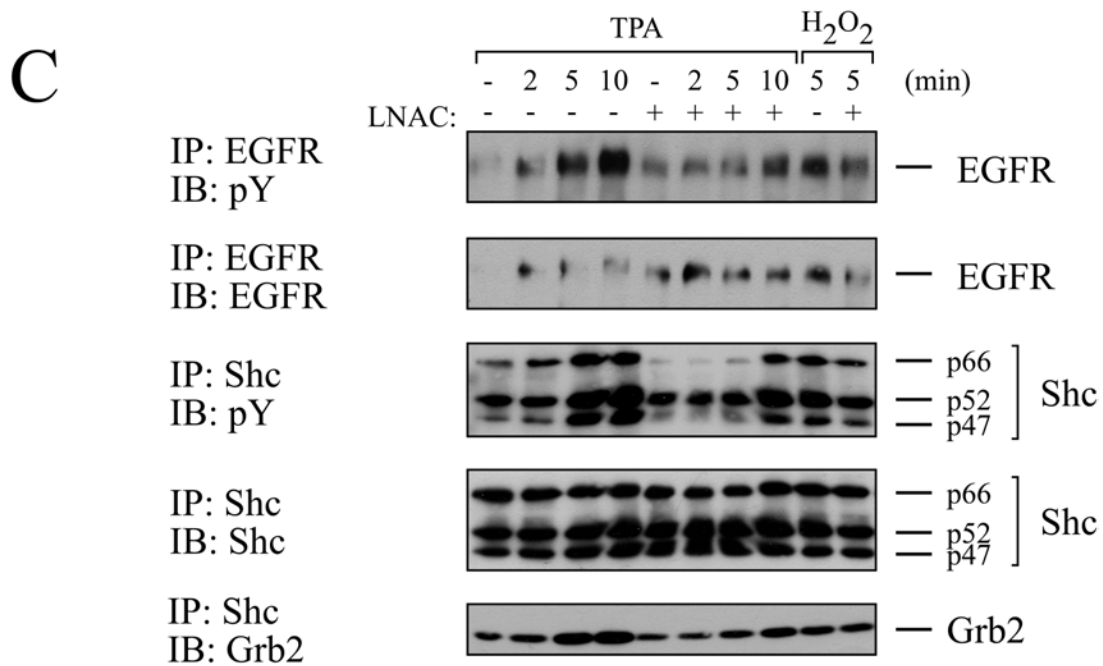
Um herauszufinden, ob ROS oder die ROS-abhängige PTP-Inhibierung an der TPA-induzierten EGFR- oder Ras-, Erk-Aktivierung beteiligt sind, wurde eine kürzlich entwickelte Methode, welche die reversible Oxidation/Inhibition der PTPs sichtbar macht, verwendet [160, 175]. Hierbei wurden Zelllysate von TPA-behandelten COS7-Zellen in der Anwesenheit von Iodessigsäure hergestellt, welches zur irreversiblen Alkylierung der nicht-oxidierten Cysteine im katalytischen Zentrum der PTPs führt. Die transient reversibel oxidierten PTPs waren gegen Iodessigsäure geschützt und wurden nicht alkyliert. Die Zelllysate wurden anschließend einer SDS-PAGE unterworfen, gefolgt von einer im Gel stattfindenden Renaturierung der PTPs und einem In-Gel-Phosphatase-Assay. Sichtbar wurden nur die zuvor transient reversibel gehemmten und nun renaturierten, aktiven PTPs, die sich als helle Banden vom schwarzen,  $^{32}\text{P}$ -bedingten Hintergrund abhoben.

Behandelte man COS7-Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und TPA führte dies zur reversiblen transienten PTP-Inhibierung (Abb. 12A). Dies kann eine verlängerte Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Signalproteine zur Folge haben, welche daraufhin den Grb2/Sos-Komplex binden, ihn in die Nähe von Ras bringen und somit zur Ras-Aktivierung führen. Dieser Verdacht besteht zudem, weil die Inhibierung der PTPs der Kinetik der EGFR- und Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung gleicht (Abb. 8A, 10A, 11C und 12A). Zur weiteren Untersuchung, ob TPA über ROS-Bildung die EGFR- oder/und die Ras-Aktivierung in COS7-Zellen induziert, wurden die Zellen vor der Stimulation mit ROS-hemmenden, thiol-basierten Antioxidanzien wie N-Acetyl-L-Cystein (LNAC) behandelt. Zum Vergleich wurden die Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches zur Oxidation des katalytischen Cysteins im aktiven Zentrum der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) führt und dadurch PTP hemmt, inkubiert. Bei einer Involvement von ROS in die PTP-Inhibierung, die in einer Ras-Aktivierung resultiert, sollte der Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und TPA durch LNAC hemmbar sein. Es zeigte sich, dass 20 mM LNAC die TPA-induzierte Ras-Aktivierung nicht hemmt (Abb. 12B). Zudem fällt auf, dass 0,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  Ras in COS7-Zellen nicht aktivieren kann, was einen Einfluss von ROS auf Ras in diesen Zellen als fraglich erscheinen lässt (Abb. 12B). Betrachtet man den Aktivierungszustand von Erk, so fällt auf, dass LNAC die basale Erk-Aktivierung hemmt, jedoch nicht die TPA-induzierte und

dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung in einer schwachen LNAC-sensitiven Erk-Aktivierung resultierte (Abb.12B). Die Behandlung der Zellen mit TPA und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zur Transaktivierung des EGFR, welche durch LNAC gehemmt wurde (Abb. 12C). Das gleiche Muster kann für die Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Shc und die Interaktion zwischen Shc und Grb2 beschrieben werden (Abb. 12C). Aufgrund der Tatsachen, dass die TPA- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte EGFR-, Shc-Phosphorylierung und Shc/Grb2-Interaktion LNAC-sensitiv sind, die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung durch LNAC nicht inhibiert werden konnten und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu keiner Ras-Aktivierung führte, kann man davon ausgehen, dass die TPA- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte ROS-Bildung zwar den EGFR und seinen Signalweg aktiviert, dies jedoch nicht essentiell für die Ras-Aktivierung ist. Der EGFR scheidet somit auch hier als Vermittler der TPA-induzierten Ras-Aktivierung aus.







**Abbildung 12 : A, TPA und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzieren transiente reversible Protein-Tyrosin-Phosphatase(PTP)-Inaktivierung.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 100 nM TPA oder 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Iodessigsäure lysiert, welche zur irreversiblen Alkylierung von nicht-oxidierten PTPs führt. Die Lysate wurden anschließend einem In-Gel-Phosphatase-Assay [175] zur Detektion von PTPs unterworfen. Renaturierte, nicht alkylierte (vor der Renaturierung transient reversibel oxidierte) PTPs hydrolysieren das <sup>32</sup>P-gelabelte Substrat und sind als weiße Banden zu erkennen. **B, Die TPA-induzierte Ras-Aktivierung ist nicht durch Antioxidantien hemmbar.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 20 mM N-Acetyl-L-Cystein (LNAC) für 10 Minuten präinkubiert und anschließend mit 100 nM TPA oder 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Menge an aktivem Ras wurde, wie oben beschrieben, verifiziert. Zelllysate wurden auf Ras-Expression und Erk-Phosphorylierung analysiert. Die pErk-Membran wurde gestrippt und mit anti-Erk-Antikörper inkubiert. **C, Die TPA- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung und Shc/Grb2-Interaktion ist durch Antioxidantien hemmbar.** Es wurde derselbe Versuchsaufbau wie in B verwendet. EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung und Shc/Grb2-Interaktion wurden durch IP von EGFR und Shc analysiert, gefolgt von Immunblotting mit anti-Phosphotyrosin (pY)-und anti-Grb2-Antikörpern. Die pY-Membranen wurden gestrippt und mit anti-EGFR- und anti-Shc-Antikörper determiniert.

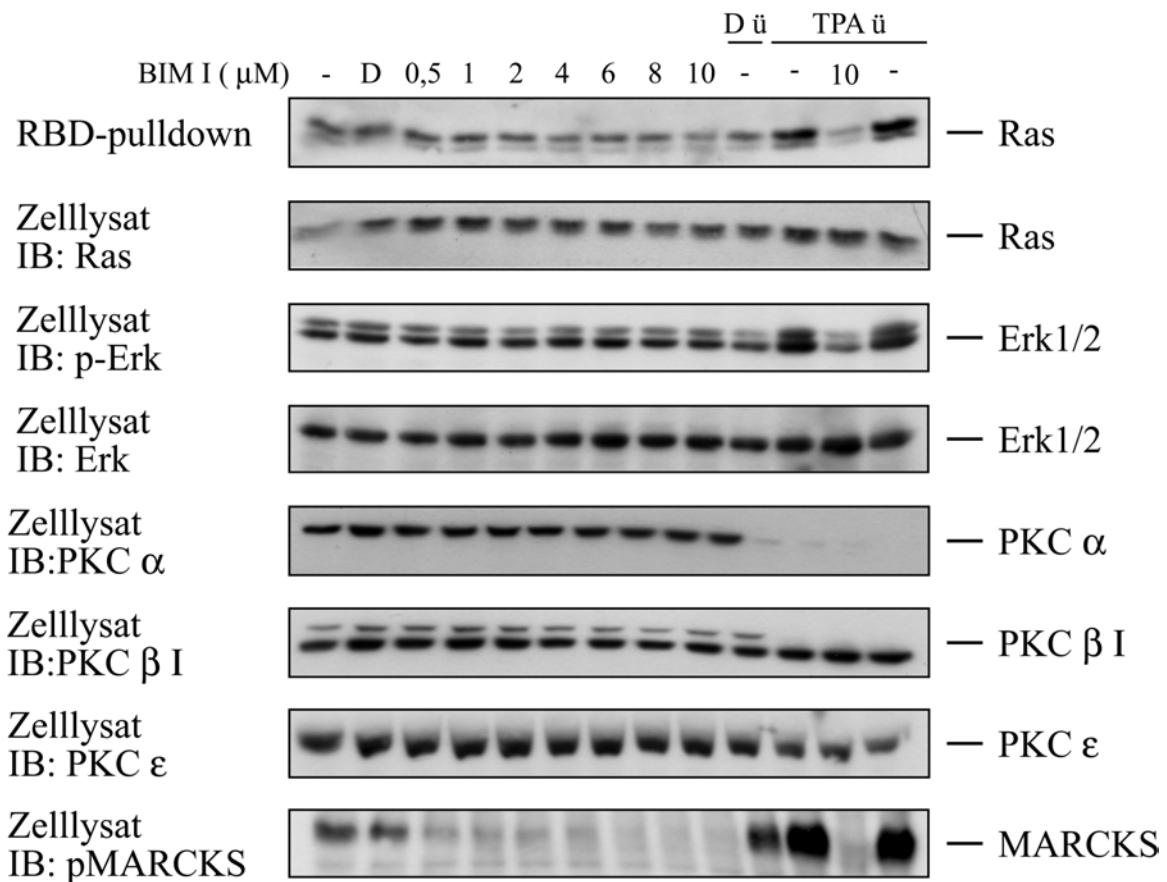
#### 4.6. Der Einfluss von Proteinkinase C (PKC) auf basales RasGTP

In den von vielen Arbeitsgruppen untersuchten Zellsystemen, in denen Ras durch TPA aktiviert wird, ist dies durch PKC-Inhibitoren blockierbar [125, 140, 141, 144, 145]. PKCs stellen einen ubiquitär exprimierten Rezeptor für DAG und sein Analogon den Phorbol ester TPA dar [112]. Durch die oben beschriebenen Ergebnisse, dass Ras durch TPA aktiviert wird, stellt sich die Frage, inwieweit PKC hierin beteiligt sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurde zuerst der Einfluss der PKC auf die basale Ras-Aktivität überprüft. Hierfür wurden

COS7-Zellen mit steigenden Konzentrationen des PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I) behandelt [186].

Die basale Ras-Aktivität wurde ab einer Konzentration von 4-6  $\mu\text{M}$  des PKC-Hemmers BIM I inhibiert (Abb. 13). Zur Kontrolle, dass die PKC durch BIM I gehemmt wurden, ist der Phosphorylierungszustand des PKC-Substrates MARCKS analysiert worden (Abb. 13). Eine Behandlung der Zellen ab einer Konzentration von 500 nM BIM I führt zur kompletten Blockade der MARCKS-Phosphorylierung (Abb.13). *In vitro*-Inhibitorstudien demonstrierten, dass schon bei einer BIM-I-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nicht nur PKC $\alpha$ , sondern auch weitere Signalproteine wie Rsk2, S6K, GSK-3 und Msk1 gehemmt werden [187, 188]. Eine PKC-spezifische Hemmung kann ab diesen Konzentrationen ausgeschlossen werden. Untersuchungen mit BIM I-Konzentrationen zwischen 50 und 200 nM zeigten ebenso keinen Effekt auf die basale Ras-Aktivität, allerdings war die Phosphorylierung von MARCKS komplett blockiert (Daten nicht gezeigt), womit ein Einfluss von PKC auf den Erhalt von basalen RasGTP ausgeschlossen werden kann. Zudem ist die basale Erk-Phosphorylierung nicht PKC-abhängig (Abb.13).

Weiterhin wurde der Einfluss der PKC-Herunterregulation durch TPA untersucht (Abb. 13). Hierfür wurden die COS7-Zellen zusammen mit DMSO oder 100 nM TPA für 24h ausgehungert. Anschließend blieben diese entweder unbehandelt oder wurden mit 10  $\mu\text{M}$  BIM I für 15 Minuten, 100 nM TPA für 5 Minuten inkubiert. Es zeigte sich, dass Ras nach 24h-Behandlung mit TPA nicht mehr durch TPA aktivierbar war und durch hohe Konzentrationen an BIM I inhibierbar blieb. Allerdings waren Ras-GTP und der Phosphorylierungszustand von MARCKS nach 24-stündiger TPA-Inkubation gegenüber den basalen Niveaus dieser beiden Proteine erhöht. Analysen der Zelllysate in Abbildung 13 zeigen, dass die klassischen PKC (hier nur  $\alpha$ ,  $\beta$  I gezeigt) herunterreguliert, die neuen PKC (nur  $\varepsilon$  gezeigt) allerdings fast unverändert exprimiert wurden. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass klassische PKC wichtig für die TPA induzierte Ras-Aktivierung sind.



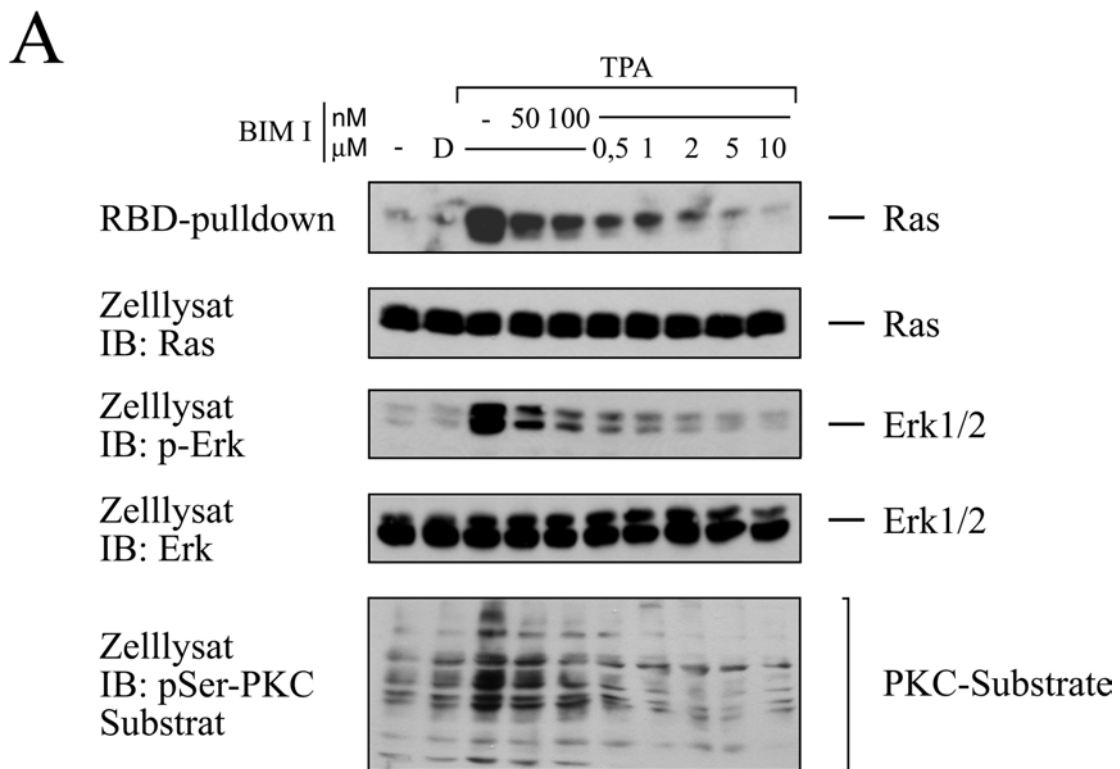
**Abbildung 13 : Die Hemmung der PKC führt nicht zur Erniedrigung des basalen RasGTP.** Unbehandelte, DMSO (D  $\ddot{u}$ ) oder 100 nM TPA (TPA  $\ddot{u}$ ) behandelte COS7-Zellen wurden ohne Serum für 24 h gehungert. Diese COS7-Zellen wurden wie angegeben mit verschiedenen Konzentrationen an BIM I für 15 Minuten behandelt. Inkubationen mit DMSO (D) erfolgten für 15 Minuten, mit TPA für 5 Minuten. Die Menge an aktivem Ras wurde, wie oben beschrieben, determiniert. Zelllysate wurden auf Ras-, PKC  $\alpha$ -,  $\beta$  I- und  $\epsilon$ -Expression und MARCKS- und Erk-Phosphorylierung analysiert. Die pErk-Membran wurden gestriipt und mit anti-Erk-Antikörper inkubiert.

#### ***4.7. PKC-Inhibition führt zur kompletten Blockade der TPA-induzierten Ras-Aktivierung***

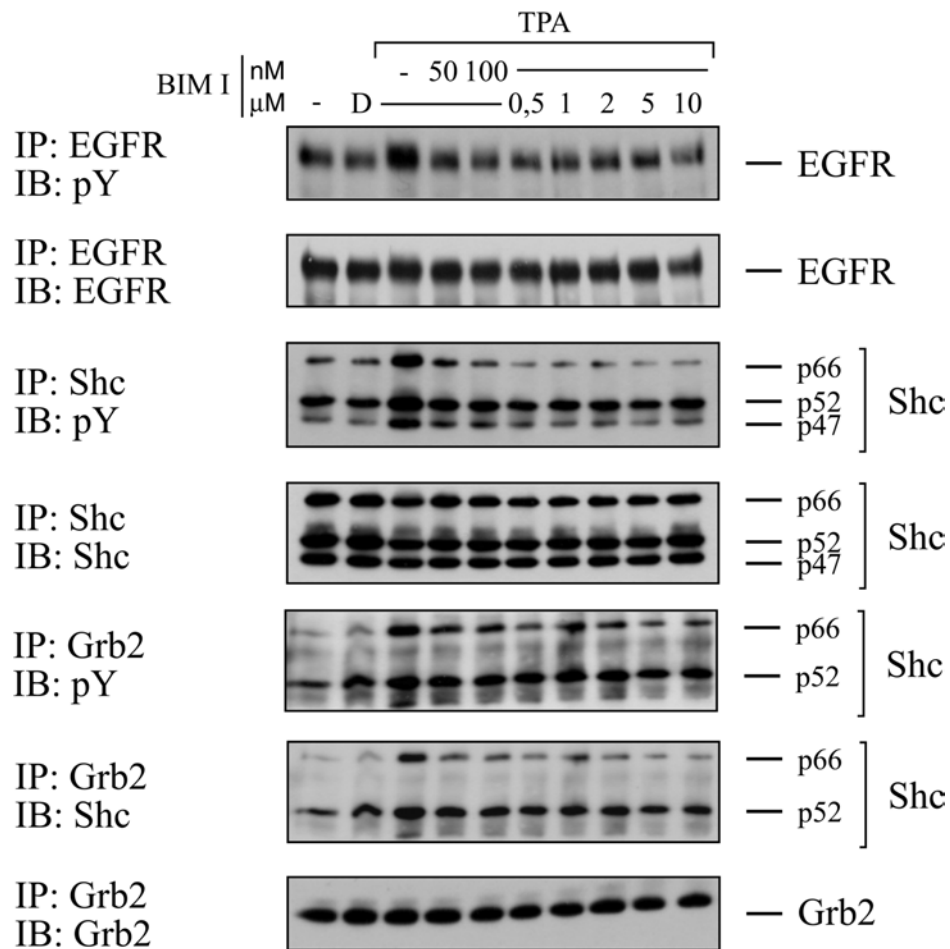
Nachdem ersichtlich war, dass die basale Ras-Aktivität in COS7-Zellen nicht PKC-abhängig war, wurde der Einfluss von PKC auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung in diesen Zellen untersucht. Daher wurden COS7-Zellen mit steigenden Konzentrationen an BIM I und diese anschließend mit 100 nM TPA inkubiert und danach analysiert.

Es zeigte sich, dass die Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation PKC-abhängig war (Abb. 14A). Schon eine PKC-Inhibitorkonzentration von 50 nM führte zu einer mehr als 50%igen Hemmung des TPA-induzierten RasGTP-Signals (Abb. 14A). Bei dieser Inhibitorkonzentration kann von PKC-spezifischer Hemmung ausgegangen werden, da erste

Hemmeffekte auf andere Signalproteine erst ab einer Konzentration von 170 nM beschrieben wurden [188]. Die Inhibierung der PKC führte dabei nicht nur zur Blockade der Ras-Aktivierung nach Phorbol ester-Behandlung, sondern auch zur Hemmung der Tyrosinphosphorylierungen von EGFR und Shc, zu verringerter Shc/Grb2-Wechselwirkung und zur Blockade der Phosphorylierung von Erk (Abb. 14A, B). Dabei zeigen alle untersuchten Signalproteine das gleiche Hemmmuster wie die TPA-induzierte Ras-Aktivierung nach PKC-Inhibierung. Aufgrund des oben beschriebenen Nachweises, dass der EGFR-Signalweg nicht in die TPA-induzierte Ras-Aktivierung involviert ist, kann davon ausgegangen werden, dass PKC sowohl die EGFR/Shc-Phosphorylierung als auch die Aktivierung von Ras durch TPA vermittelt, was jedoch auf unterschiedlichen Signalwegen geschieht. Der Immunoblot für das Phospho-Serin-PKC-Substrat wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die PKC durch BIM I gehemmt wurde (Abb 14A).



## B

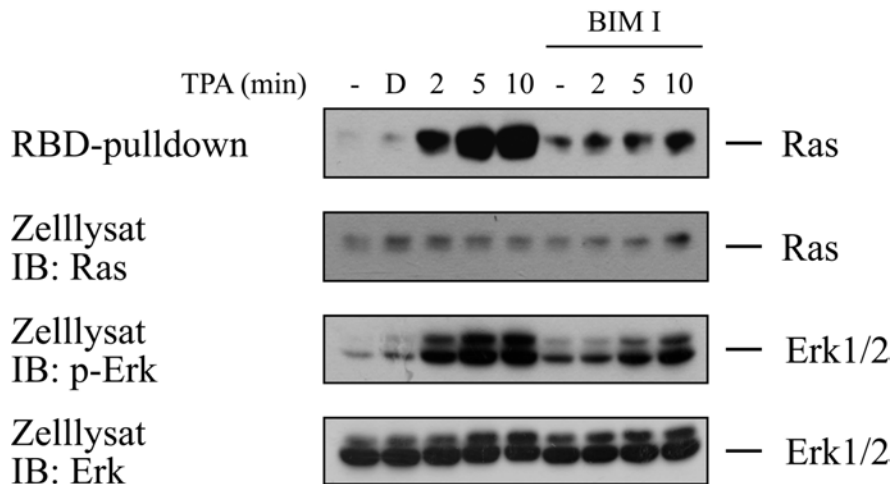


**Abbildung 14 : A, Die Hemmung der PKC blockiert die TPA-induzierte Ras-Aktivierung.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit DMSO (D) oder mit steigenden Konzentrationen des PKC-Inhibitor BIM I für 15 Minuten präinkubiert, wie angegeben mit 100 nM TPA für 5 Minuten stimuliert und anschließend lysiert. Die Menge an aktivem Ras wurde, wie weiter oben beschrieben, verifiziert. Zelllysate wurden auf Ras-Expression, pSerin-PKC-Substrat und Erk-Phosphorylierung analysiert. Die pErk-Membran wurde gestrippt und mit anti-Erk-Antikörper inkubiert. **B, Die Hemmung der PKC blockiert die TPA-induzierte EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung und Shc/Grb2-Interaktion.** Der Versuchsaufbau ist dergleiche wie in A. EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung wurden durch IP von EGFR und Shc analysiert, gefolgt von Immunblotting mit anti-Phosphotyrosin (pY)-Antikörpern. Die pY-Membranen wurden gestrippt und mit anti-EGFR- und anti-Shc-Antikörper behandelt. Die Shc/Grb2-Interaktion wurde durch IP von Grb2 analysiert. Für das Immunblotting wurden anti-pY- und anti-Grb2-Antikörper verwendet. Die pY-Membran wurde gestrippt und mit anti-Shc-Antikörper analysiert.

Um die Daten, dass BIM I nicht die basalen RasGTP-Niveaus hemmt, sondern nur TPA-induzierte, direkt vergleichen zu können, wurde der Experimentaufbau verändert. So blieben COS7-Zellen entweder unbehandelt oder wurden mit 1  $\mu$ M BIM I präinkubiert, woran sich eine 100 nM TPA-Stimulation über verschiedene Zeiträume anschloss.

Es zeigte sich, dass BIM I basale RasGTP- und Phospho-Erk-Niveaus nicht verringert und nur die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung blockiert (Abb. 15). Dieses Muster bleibt auch

dann bestehen, wenn nur 200 nM BIM I verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). Gegenüber den EGFR-, HB-EGF- und ROS-Hemmungen, die keine oder nur eine geringe Abnahme der TPA-induzierten Ras-Aktivierung zeigten, stellt die Wirkung der Inhibierung der PKC somit ein Spiegelbild dar. Die Hemmung der PKC verringerte keine basalen RasGTP- und Erk-Phosphorylierungsniveaus, sondern nur TPA-induzierte, was demonstriert, dass die PKC einen „wahren“ Vermittler der TPA-induzierten Ras- und Erk-Aktivierung darstellen.



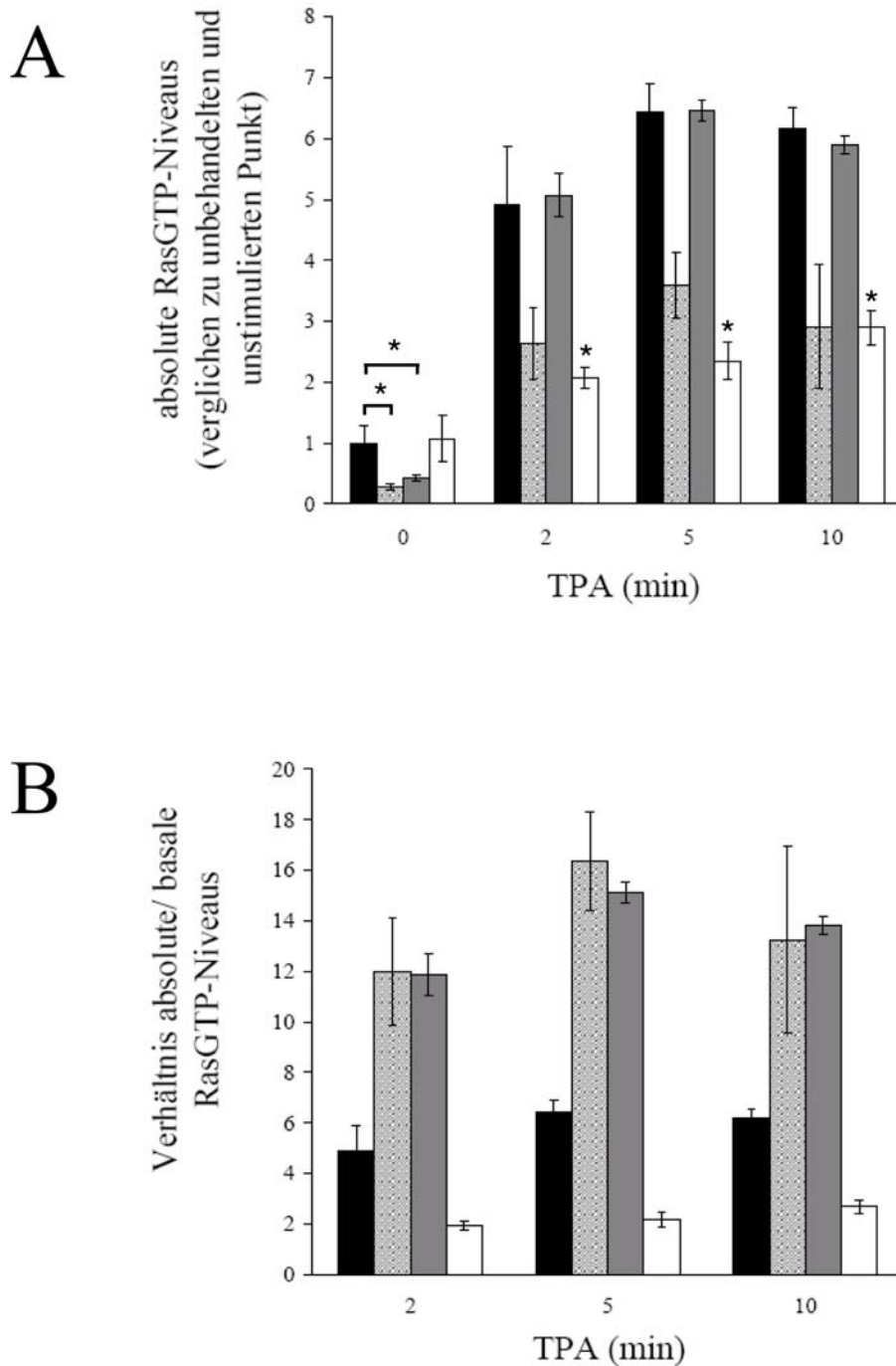
**Abbildung 15: Die Hemmung der PKC blockiert die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung, aber nicht basales RasGTP und basal phosphorylierte Erk.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit DMSO (D) oder mit 1  $\mu$ M PKC-Inhibitor BIM für 15 Minuten präinkubiert, mit 100 nM TPA für die angegebenen Zeiträume stimuliert und anschließend lysiert. Die Menge an aktivem Ras wurde, wie oben beschrieben, determiniert. Zelllysate wurden auf Ras-Expression und Erk-Phosphorylierung analysiert. Die pErk-Membran wurde gestrippt und mit anti-Erk-Antikörper behandelt.

#### ***4.8. Zusammenfassung der Effekte der EGFR- und PKC-Inhibition auf die RasGTP-Niveaus***

Um eine bessere Übersicht über die Ergebnisse der TPA-induzierten Ras-Aktivierung, die nach EGFR-, HB-EGF- und PKC-Inhibierung beobachtet wurden, zu erhalten, sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen je Inhibitor als Quantifizierungen zusammengefasst worden. Hierbei stellt Abbildung 16A die densitometrische Analyse der absoluten RasGTP-Niveaus der behandelten gegenüber den unbehandelten Zellen und Abbildung 16B das Verhältnis der absoluten gegenüber den basalen RasGTP-Niveaus dar. Aus Abbildung 16A ist ersichtlich, dass AG1478 basales RasGTP hemmt. Zudem scheint es eine Hemmung der TPA-induzierten RasGTP-Akkumulation nach AG1478-Behandlung zu

geben (Abb. 16A). Fasst man die Daten der densitometrischen Analyse der absoluten RasGTP-Niveaus nach TPA-Stimulation im Hintergrund der EGFR-Hemmung (Abb. 16A) und die Korrekturen der absoluten gegenüber den basalen RasGTP-Werten (Abb. 16B) zusammen, zeigt sich, dass AG1478 die Netto-Akkumulation an TPA-induziertem RasGTP nicht hemmt. Eine ähnliche Situation ist bei der Behandlung der COS7-Zellen mit CRM197 zu beobachten. CRM197 führt zu einer starken Verringerung des basalen RasGTP und zu einer sehr geringen Abnahme der TPA-induzierten Ras-Aktivierung (Abb. 16A). Der Vergleich von Abbildung 16A und 16B zeigt indes, wie bei AG1478 zuvor, dass die Netto-Akkumulation an RasGTP nach TPA-Gabe durch CRM197 nicht inhibiert wird. Jedoch ist in Abbildung 16B deutlich zu erkennen, dass die TPA-induzierte Netto-Ras-Aktivierung nach EGFR- und HB-EGF-Hemmung verglichen mit alleiniger TPA-Behandlung erhöht ist. Dies würde bedeuten, dass der EGFR und HB-EGF einen negativen Einfluss auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung haben, was indes aufgrund der erhaltenen Daten unwahrscheinlich ist.

Im Gegensatz zu diesen beiden Inhibitoren zeigt der PKC-Hemmstoff BIM I eine andere Wirkung. BIM I führt zu keiner Hemmung der basalen aber zur Inhibierung der TPA-induzierten RasGTP-Niveaus (Abb. 16A). Vergleicht man wieder die Daten der densitometrischen Analyse der TPA-induzierten absoluten RasGTP-Niveaus nach BIM I-Hemmung (Abb. 16A) und die Korrekturen der absoluten gegenüber den basalen RasGTP-Werten (Abb. 16B), zeigt sich, dass BIM I die TPA-induzierte Ras-Aktivierung inhibiert. PKC stellen somit den Vermittler der Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation dar, wogegen der EGFR und HB-EGF nicht in diese involviert sind.



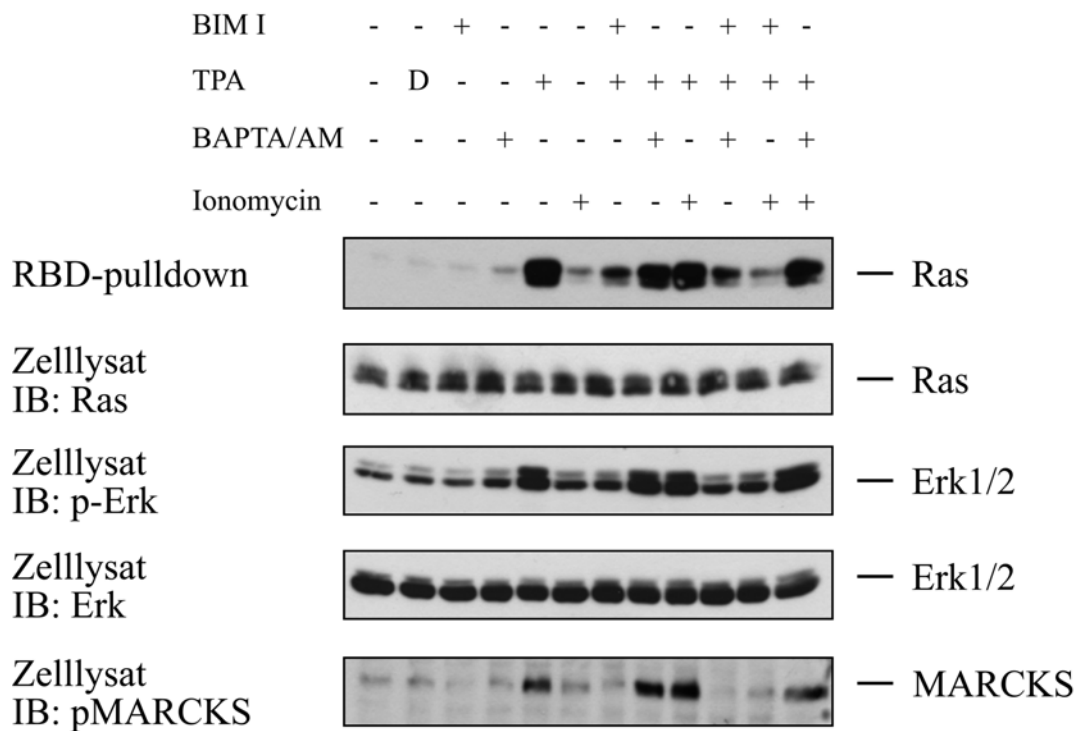
**Abbildung 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der EGFR-, HB-EGF- und PKC-Hemmung auf RasGTP.** **A**, Absolute RasGTP-Niveaus aus den Abbildungen 10B, 11B und 15 wurden per densitometrischer Analyse quantifiziert. Der Wert der unbehandelten und unstimulierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. Es wurde ein Student' t-Test durchgeführt und  $P < 0,05$  ist als \* gekennzeichnet. Die Daten repräsentieren den Durchschnittswert mit Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Versuchen. **B**, Die Werte wurden durch basales RasGTP korrigiert und als Verhältnis von absoluten/basalen RasGTP-Niveaus dargestellt. Die Daten repräsentieren den Durchschnittswert mit Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Versuchen. Schwarze Balken: TPA allein; graumeliert: AG1478,TPA; grau: CRM197,TPA; weiß: BIM I, TPA



#### ***4.9. Der Einfluss intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Signale auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung***

Aufgrund der Beobachtung, dass die Herunterregulation der klassischen PKC die TPA-induzierte Ras-Aktivierung supprimierte, sollte der Einfluss der klassischen PKC, die Ca<sup>2+</sup>-Ionen zur kompletten Aktivierung benötigen [112], durch Manipulation intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Spiegel untersucht werden. Hierfür wurde der zellpermeable Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA/AM und das Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin verwendet. COS7-Zellen wurden mit 100 nM TPA, 200 nM BIM I, 10 µM BAPTA/AM, 50ng/ml Ionomycin und Kombinationen aus diesen inkubiert (Abb. 17).

Wie erwartet, führt TPA-Behandlung zur Ras- und Erk-Aktivierung. Außerdem ist zu erkennen, dass die Erhöhung und Erniedrigung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel zu einer sehr schwachen Ras-Aktivierung führen, die jeweilige Kombination von BAPTA/AM oder Ionomycin mit TPA nur eine Verringerung des RasGTP-Levels, verglichen zu TPA allein, bewirkt (Abb. 17). Diese Kombinationen sind BIM I sensitiv, wobei die Kombination aus TPA/Ionomycin BIM I-sensitiver als die aus TPA/BAPTA/AM ist, und dass die gemeinsame Inkubation von BAPTA/AM, Ionomycin und TPA die gleiche RasGTP-Signalstärke wie TPA alleine ergibt (Abb.17). Die Erk-Aktivierung folgt dabei dem RasGTP-Muster. Die Analyse des PKC-Substrates MARCKS zeigte, dass sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel zusammen mit TPA zu leicht verstärkter MARCKS-Phosphorylierung führte, dies jedoch nicht in erhöhter Ras- oder Erk-Aktivierung nach TPA-Behandlung resultierte (Abb. 17). Man kann daher sagen, dass die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel nicht essentiell für die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung sind bzw. dass der Einfluss der klassischen PKC auf diese Reaktion nicht konkret nachweisbar ist.



**Abbildung 17: Ca<sup>2+</sup>-Inhibition und Stimulation zeigen eher marginale Effekte auf die Ras-Aktivierung.** COS7-Zellen blieben unbehandelt oder wurden, wie oben angegeben, mit DMSO (D) oder mit 200 nM BIM oder 10 mM BAPTA/AM für 15 Minuten präinkubiert, mit 100 nM TPA oder 50 ng/ml Ionomycin für 5 Minuten stimuliert und anschließend lysiert. Die Menge an aktivem Ras wurde, wie oben beschrieben, verifiziert. Zellysate wurden auf Ras-Expression, MARCKS- und Erk-Phosphorylierung analysiert. Die pErk-Membran wurde gestrippt und mit anti-Erk-Antikörper inkubiert.

#### **4.10. Der MEK-Inhibitor PD98059 erhöht die TPA-induzierte Ras-Aktivierung**

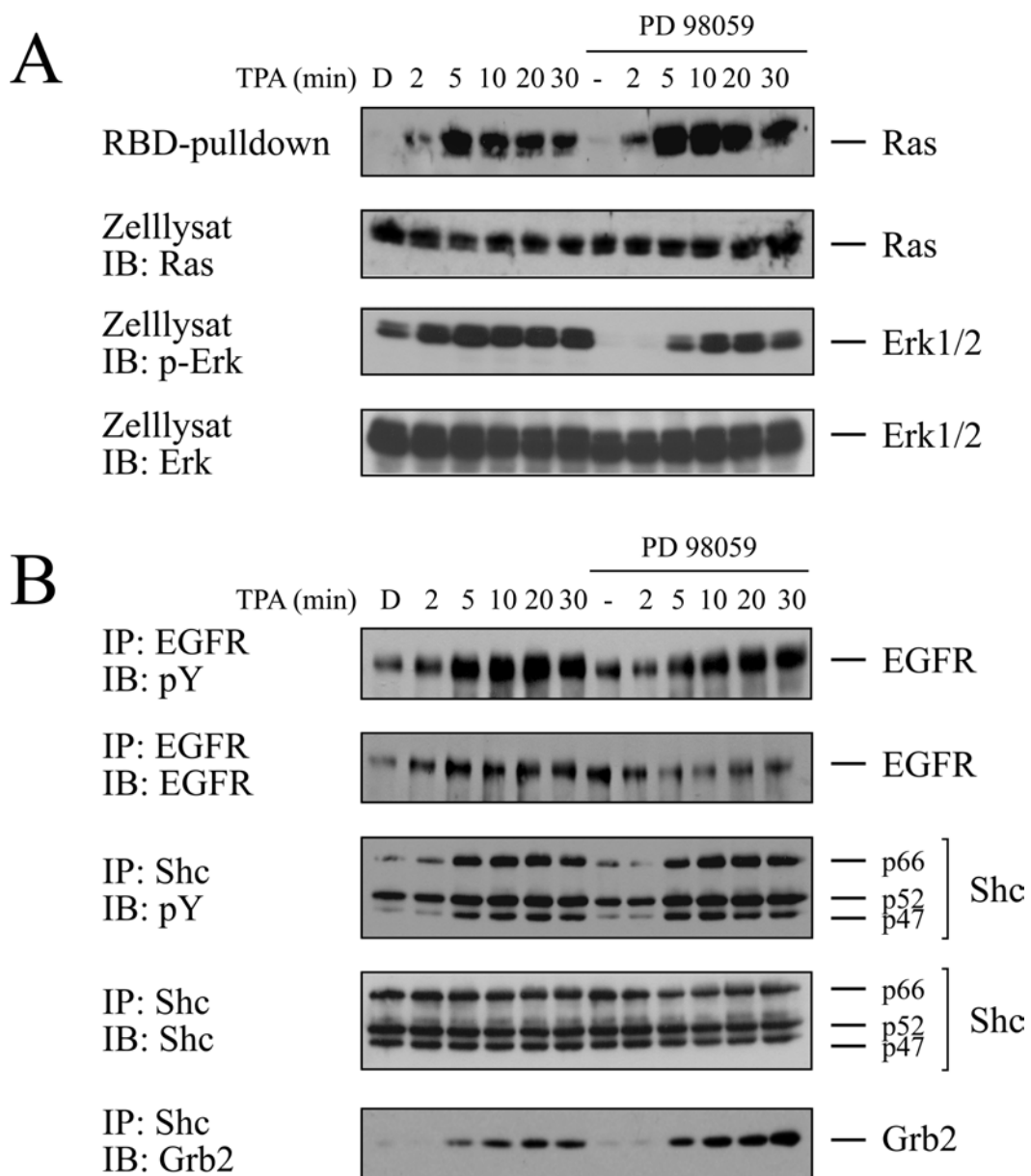
Zahlreiche Arbeitsgruppen demonstrierten, dass die Aktivierung von Ras durch EGF und Insulin über einen Feedback-Mechanismus gehemmt wird [189-192], dem die Serin-Phosphorylierung des RasGEF Sos zugrunde liegt, welche sich in verringerter Mobilität in SDS-Polyacrylamid-Gelen offenbart [193-196]. Resultate, die mit spezifischen Inhibitoren für MEK erhalten wurden, ließen darauf schließen, dass Erk für die Sos-Phosphorylierung verantwortlich ist. Zudem ging in diesen Veröffentlichungen die MEK-Hemmung mit erhöhter Ras-Aktivierung einher [189, 190]. Weiterhin konnte in PC12-Zellen demonstriert werden, dass die EGF-induzierte Sos-Phosphorylierung nicht nur durch Erk sondern auch durch Rsk2 bedingt ist [197]. Beide Kinasen phosphorylieren jedoch unterschiedliche Regionen im C-terminalen Bereich von Sos [197]. Daneben gibt es unterschiedliche Daten

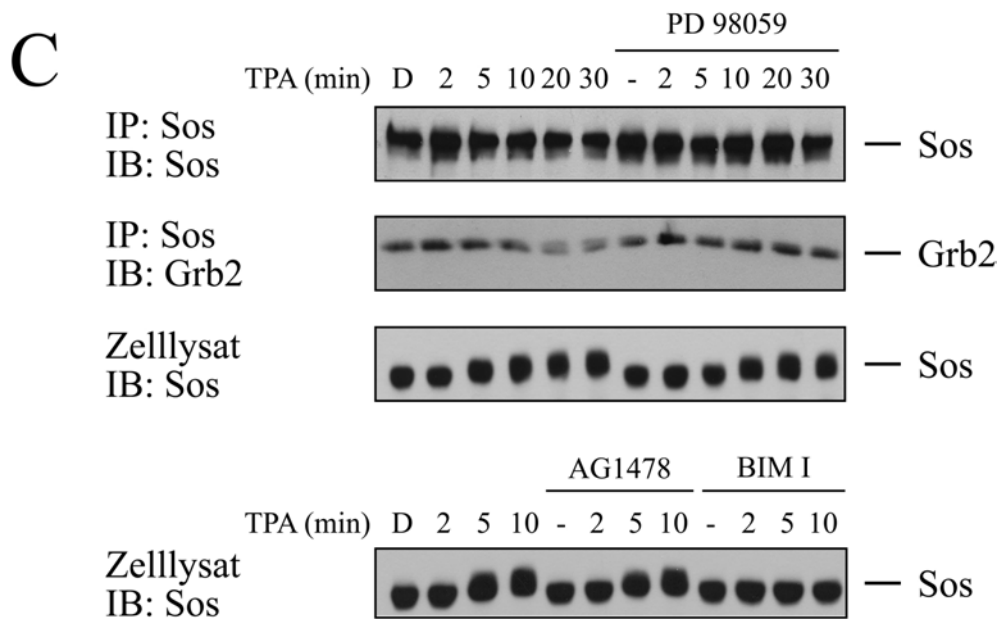
darüber, wie der durch Sos-Phosphorylierung bedingte Ras-Inaktivierungsmechanismus nach Stimulation mit Insulin, EGF und TPA abläuft. Die Behandlung mit Insulin und TPA resultierte in der Dissoziation des Grb2/Sos-Komplexes [191, 192, 198-200], wogegen die EGF-Stimulation verschiedene Resultate erbrachte. So führte EGF in einer Publikation ebenso zur Dissoziation von Sos und Grb2 [189], doch konnten andere Arbeitsgruppen keine Verringerung der Menge an Grb2/Sos-Komplexen detektieren [198, 199, 201, 202]. Die letztgenannten Publikationen schlagen allerdings vor, dass der Grb2/Sos-Komplex nach Sos-Phosphorylierung aufgrund verringerter Affinität für tyrosinphosphorylierten EGFR und Shc von diesen dissoziiert [198, 199, 201, 202].

Um zu prüfen, welche der für EGF, Insulin und TPA erhaltenen Daten auch auf COS7-Zellen übertragbar sind, wurden diese Zellen entweder nicht oder mit 50  $\mu$ M des MEK-Inhibitors PD98059, welcher die Aktivierung von Erk blockiert, behandelt. PD98059 ist bei dieser Konzentration MEK-spezifisch und hemmt keine weiteren Kinasen [187].

Die Hemmung von MEK führte zur Erhöhung der TPA-induzierten Ras-Aktivierung (Abb. 18A), was die Beteiligung eines Signalproteins unterhalb von MEK in die Aktivierung von Ras vermuten lässt. Die stark verringerte Aktivierung von Erk stellt die Kontrolle für die erfolgreiche Hemmung von MEK dar (Abb. 18A). Fehlende Änderungen des Tyrosinphosphorylierungs-Musters von EGFR und Shc demonstrieren die Irrelevanz dieser beiden Proteine für die RasGTP-Erhöhung nach der MEK-Inhibierung (Abb. 18B). Allerdings ist eine leichte Erhöhung der Interaktion von Grb2 mit Shc nach MEK-Hemmung auszumachen, die durch erhöhte Sos-Rekrutierung zu Ras eine vermehrte und verlängerte Ras-Aktivierung erlauben könnte (Abb.18B). Dies steht im Einklang mit Daten, die eine verringerte Affinität des Grb2/Sos-Komplexes aufgrund der Sos-Phosphorylierung gegenüber tyrosinphosphorylierten Shc oder EGFR offenbarten [198, 199, 201, 202]. Die Untersuchung der Interaktion zwischen Sos und Grb2 demonstriert, dass die MEK-Inhibierung keinen Einfluss auf die Grb2/Sos-Wechselwirkung besitzt (Abb. 18). Somit kann hier davon ausgegangen werden, dass die verlängerte Assoziation des Grb2/Sos-Komplexes durch die MEK-Hemmung als Ursache für erhöhte RasGTP-Niveaus ausschließt. Um zu überprüfen, ob die MEK-Inhibierung auch den Sos mobility-shift verringert, wurde Sos aus dem Zelllysate analysiert. Es zeigte sich, dass die Hemmung der MEK nicht zum Verschwinden des TPA-induzierten Sos mobility-shifts führt (Abb. 18C). Diese Daten stehen im Kontrast zu den Insulin-Daten von Langlois et al. und Waters et. al die zwar genauso eine Erhöhung der Ras-Aktivierung beobachteten, die jedoch nach Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor das Verschwinden des Sos mobility shifts beobachteten [189, 190]. Um zu überprüfen, welche

Kinase bzw. welcher Signalweg unterhalb einer Kinase die TPA-induzierte Sos-Phosphorylierung vermittelt, wurden COS7-Zellen mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 und dem PKC-Hemmer BIM I präinkubiert und anschließend mit TPA behandelt. Der Sos mobility shift verschwindet dabei nur nach PKC-Inhibierung und ist nicht EGFR-abhängig (Abb. 18C). Die TPA-induzierte Sos-Phosphorylierung folgt somit dem gleichen Muster, wie die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung. Daher könnte die Phorbol-ester-ausgelöste Sos-Phosphorylierung die EGFR-unabhängige Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung bedingen. Ob diese Sos-Phosphorylierung einen Einfluss auf die Ras-Aktivierung besitzt, konnte jedoch in dieser Arbeit nicht belegt werden.



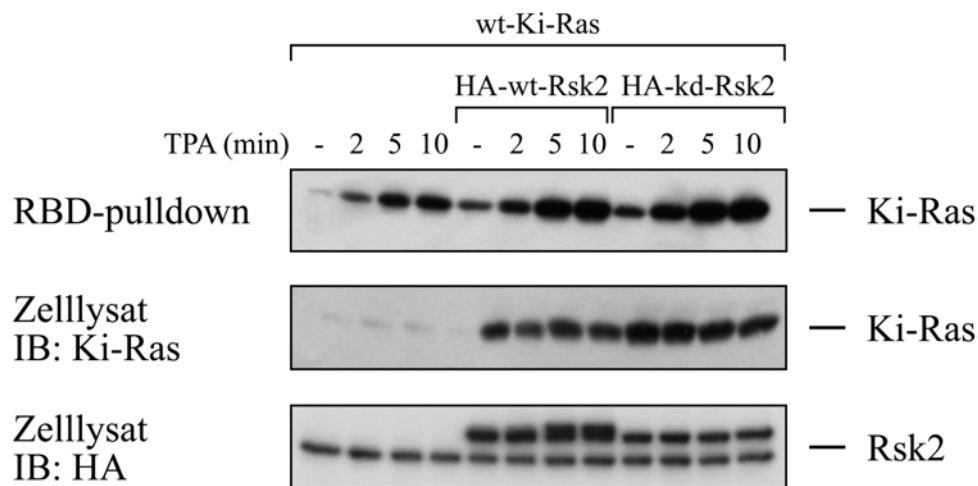


**Abbildung 18 : A, Der MEK-Inhibitor PD98059 erhöht die TPA-induzierte Ras-Aktivierung.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit der Kontrolle DMSO (D) oder mit 50  $\mu$ M des MEK-Inhibitors PD98059 für 15 Minuten präinkubiert, mit 100 nM TPA für die angegebenen Zeiten stimuliert und anschließend lysiert. Die Menge an aktivem Ras wurde, wie oben beschrieben, verifiziert. Zelllysate wurden auf Ras-Expression und Erk-Phosphorylierung analysiert. Die pErk-Membran wurde gestrippt und mit anti-Erk-Antikörper behandelt. **B, MEK-Inhibierung führt nicht zu veränderter Tyrosinphosphorylierung von EGFR und Shc, jedoch zu geringfügig verstärkter Shc/Grb2-Assoziation.** Es wurde derselbe Versuchsaufbau wie in A verwendet. Die Lysate wurden nacheinander einer EGFR- und Shc-Immunopräzipitation unterworfen. Tyrosinphosphorylierungen von EGFR und Shc, als auch die Shc/Grb-Interaktion wurden durch Immunoblot mit anti-Phospho-Tyrosin(pY)- und anti-Grb2-Antikörper analysiert. Die pY-Membranen wurden gestrippt und mit anti-EGFR- und Shc-Antikörper inkubiert. **C, Der Sos mobility shift ist MEK- und EGFR-unabhängig, PKC-abhängig und führt nicht zur Grb2/Sos-Komplex-Dissoziation.** Für die Sos-IP und die Untersuchung des Sos mobility shifts nach MEK-Hemmung wurde derselbe Versuchsaufbau wie in A verwendet. Die Sos/Grb2-Interaktion wurde durch IP von Sos analysiert. Für das Immunoblotting wurden anti-Grb2- und anti-Sos-Antikörper verwendet. Aus dem Zelllysate wurde Sos mit anti-Sos-Antikörper analysiert, welches mit steigender TPA-Stimulationslänge eine Abnahme der Mobilität im SDS-PAA-Gel aufweist. Die Sos mobility shift-Analyse nach EGFR- und PKC-Inhibition erfolgte aus dem Zelllysate mit anti-Sos-Antikörper.

#### 4.11. Einfluss von Rsk2 auf die RasGTP-Akkumulation ausgelöst durch TPA

In den Abschnitten 4.6. und 4.7. konnte demonstriert werden, dass BIM I PKC hemmt, was keinen Einfluss auf die basale Ras- und Erk-Aktivierung hatte, jedoch die TPA-induzierte PKC-Aktivierung und deren vermittelte Signalweitergabe inhibierte. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen an BIM I verwendet, von denen bekannt ist, dass sie in *in vitro*-Versuchen nicht nur PKC sondern auch weitere Kinasen hemmen können. Zu diesen potentiellen BIM-I-sensitiven Kinasen zählen Rsk2, GSK-3, Msk1, p70S6K und PDK1 [187, 188, 203]. Die BIM-I-Konzentrationen bei denen diese Kinasen gehemmt werden, variieren

stark. PDK1 wird ab 9  $\mu\text{M}$ , Rsk2, Msk1 und p70S6K ab 1  $\mu\text{M}$  und GSK-3 ab 170 nM inhibiert [187, 188, 203]. Das Verwenden von 1  $\mu\text{M}$  BIM I, wie in Abschnitt 4.7., könnte demzufolge auch Rsk2, Msk1, GSK-3 und p70S6K gehemmt haben und stellt den der PKC-zugedachten Effekt auf die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung in Frage. Der mögliche Hemmeffekt von BIM I auf Msk1 kann hierbei vernachlässigt werden, da Msk1 nur im Nukleus vorkommt [204] und die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung nicht im Zellkern stattfindet. Zur Untersuchung inwieweit Rsk2 einen Einfluss auf die Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung hat, wurden COS7-Zellen mit Wildtyp-Ki-Ras, Wildtyp-Rsk2 oder eine nicht-aktivierbare Rsk2-Mutante transient co-transfiziert und mit diesen Zellen ein RasGTP-Pulldown durchgeführt. Die co-transfizierten Zellen wurden mit 100 nM TPA für die angegebenen Zeiträume inkubiert und daraufhin analysiert. Aufgrund der erhaltenen Daten, dass die nicht-aktivierbare Rsk2-Mutante keinen Einfluss auf die Phorbol-ester-induzierte Ras-Aktivierung zeigt, kann Rsk2 als Effektor für die BIM I-vermittelte Hemmung der TPA-abhängigen Ras-Aktivierung ausgeschlossen werden. (Abbildung 19). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit COS7-Zellen erhalten, in denen Wildtyp-Ha-Ras statt Wildtyp-Ki-Ras co-transfiziert wurde (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 19: Die BIM-sensitive Kinase Rsk2 zeigt keinen Effekt auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung.**

COS7-Zellen wurden, wie oben angegeben, transient mit Wildtyp-Ki-Ras, Wildtyp-HA-Rsk2 oder HA-N/C lysRsk2 co-transfiziert, für 24h wachsen gelassen, für 24 h ohne Serum gehungert und blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 100 nM TPA für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Menge an aktivem Ras, wurde wie oben beschrieben, verifiziert. Zellysate wurden auf Expression von Ki-Ras und HA-markierter Rsk2 und N/C lysRsk2 analysiert.

Weiterhin wurde in Abschnitt 4.10. untersucht, ob Signalproteine unterhalb von MEK Ras über einen Feedback-Mechanismus regulieren. Rsk2 stellt eines dieser möglichen

Signalproteine dar, da es erstens ein Erk-Substrat ist und zweitens in PC12-Zellen Sos zusammen mit Erk phosphorylieren kann [197]. Aufgrund der Beobachtungen in COS7-Zellen, dass die Inhibierung von MEK zwar die Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation erhöhte, diese jedoch nicht den Sos mobility shift verschwinden ließ, liegt die Vermutung nahe, dass weder Erk noch Rsk2 die TPA-induzierte Ras-Aktivierung durch diesen Feedback-Mechanismus regulieren. Diese Annahme wurde dadurch bestärkt, dass die nicht-aktivierbare Rsk2-Mutante keinen Einfluss auf die Ras-Aktivierung nach TPA-Gabe offenbarte (Abb.19).

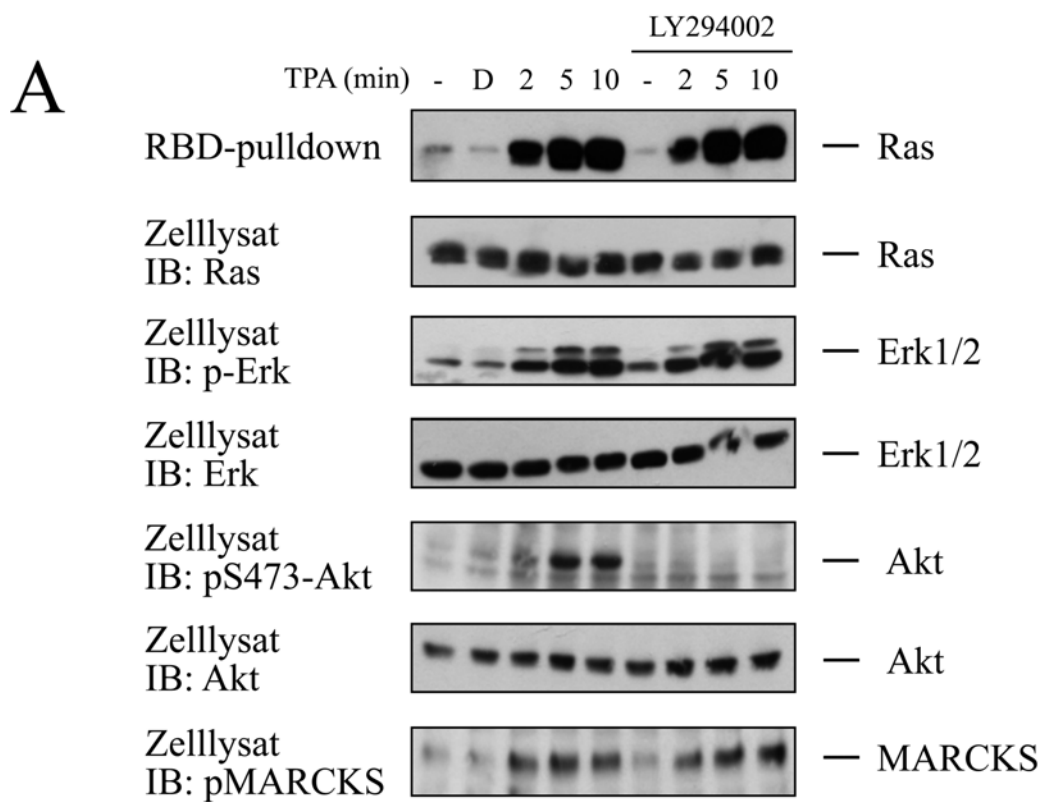
### ***4.12. Die Rolle der PI3-Kinase und ihrer Signalweitergabe in der TPA-induzierte Ras-Aktivierung***

Wennström et al. konnten in COS7-Zellen eine Involvierung der PI3-Kinase in die Aktivierung von Ras und Erk durch geringe Konzentrationen an EGF beobachten [205]. Um aufzuklären, ob die PI3-Kinase durch TPA aktiviert und in die RasGTP-Akkumulation nach TPA-Behandlung involviert ist, wurden COS7-Zellen unbehandelt gelassen oder mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 inkubiert und anschließend mit TPA stimuliert.

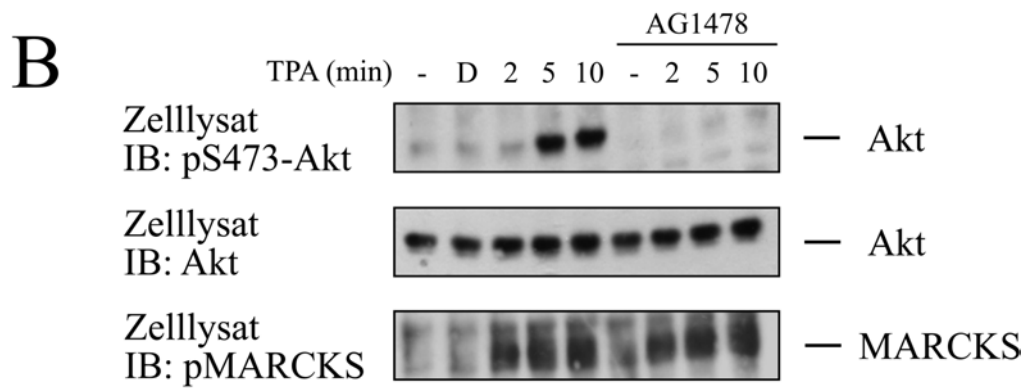
Es war zu beobachten, dass die TPA-Stimulation zur erhöhten Phosphorylierung von Akt am Serin473 führte und diese durch Inkubation mit dem PI3-Kinase-Hemmer LY294002 verschwand (Abb. 20A). Zudem zeigte sich, dass die Hemmung der PI3-Kinase keinen Einfluss auf die TPA-ausgelöste RasGTP-Akkumulation besitzt (Abb. 20A). Der Aktivierungszustand von Erk folgte dabei dem gleichen Muster der Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation (Abb. 20A). Ein weiterer Grund zur Untersuchung des Einflusses der PI3-Kinase auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung war, dass der PI3-Kinase-Signalweg durch PDK1, p70S6Kinase und GSK-3 potentiell BIM I-sensitiv ist und diese Kinasen Kandidaten für die BIM I-sensitive Ras-Aktivierung darstellen [187, 188, 203]. Da die Hemmung der PI3-Kinase jedoch keine Änderung der Ras-Aktivierung nach Phorbolster-Behandlung aufwies, scheiden alle drei Kinasen als Vermittler der BIM I-Hemmung aus.

Aufgrund der Beobachtung der Akt-Phosphorylierung nach TPA-Stimulation stellte sich die Frage, welches Signalprotein diese vermittelt. Ein möglicher Kandidat stellt der EGFR dar, da TPA zu ROS und zur Transaktivierung des EGFRs führt und nach dessen Aktivierung die PI3-Kinase über ihre regulatorische Untereinheit an den Rezeptor rekrutiert werden und somit in die Nähe ihres Substrates PI(4,5)-P<sub>2</sub> gelangen könnte [206]. Dies führt zur Akkumulation von PI(3,4,5)-P<sub>3</sub> in der Plasmamembran, PDK1-Rekrutierung und zweifacher

Phosphorylierung von Akt, wobei die Serin-Phosphorylierung von Akt erst vollzogen werden kann, wenn PDK1 Akt am Threonin 308 phosphoryliert hat [207]. Behandelte man COS7-Zellen mit AG1478, war zu beobachten, dass die TPA-induzierte Akt-Phosphorylierung blockiert wurde, was darauf schließen lässt, dass der EGFR die Akt-Phosphorylierung nach TPA-Stimulation vermittelt (Abb. 20B). Die TPA-induzierte Akt-Phosphorylierung war zudem BIM I-sensitiv (Daten nicht gezeigt), was eine Involvierung der PKC in diese Reaktion beweist. Der Phosphorylierungszustand vom PKC-Substrat MARCKS wurde untersucht, um eine Beeinträchtigung der PKC-Aktivierung durch den PI3-Kinase- oder den EGFR-Hemmer auszuschließen (Abb.20 A/ B).







**Abbildung 20 :A, Hemmung der PI3-Kinase zeigt keinen Effekt auf die TPA-induzierte Ras und Erk-Aktivierung.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit DMSO (D) oder mit 10  $\mu$ M PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 für 15 Minuten präinkubiert, mit 100 nM TPA für die angegebenen Zeiträume stimuliert und anschließend lysiert. Die Menge an aktivem Ras wurde, wie oben beschrieben, determiniert. Zelllysate wurden auf Ras-Expression, Akt-, Erk- und MARCKS-Phosphorylierung analysiert. Die pERK und pAkt-Membranen wurden gestrippt und mit anti-Erk- und anti-Akt-Antikörper behandelt. **B, Hemmung des EGFR blockiert die TPA induzierte Akt-Phosphorylierung.** COS7-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit DMSO (D) oder mit 200 nM AG1478 für 15 Minuten präinkubiert, mit 100 nM TPA für die angegebenen Zeiträume stimuliert und anschließend lysiert. Zelllysate wurden auf Akt-Phosphorylierung analysiert. Die mit anti-pSerin473-Akt-Antikörper behandelten Membranen wurden gestrippt und mit anti-Akt-Antikörper behandelt.

## 5. Diskussion

Der Phorbolster TPA stellt ein langsam-metabolisierbares Diacylglycerol-Analogon dar, welches an verschiedene „Rezeptoren“ binden, diese rekrutieren und aktivieren kann. Zu diesen Rezeptoren zählen neben Proteinkinase C-Isoformen und RacGAPs der  $\beta$ -Chimärine auch RasGEF der RasGRP-Gruppe [111, 126]. Diese können Ras nach Diacylglycerol/TPA-Bindung aktivieren. Dabei müssen RasGRP1 und 3 zum Erhalt ihrer vollen Aktivität nicht nur DAG/TPA binden, sondern auch durch PKC phosphoryliert werden [130]. Die Mitglieder der RasGRP-Gruppe zeigen jedoch ein gewebsspezifisches Expressionsmuster und können daher nicht als universelle TPA-Ras-Aktivierungsvermittler auftreten [126, 127, 129]. Die Stellung als Mediatoren scheinen die PKC einzunehmen, da in vielen untersuchten Zelltypen, die eine TPA-induzierte Ras-Aktivierung zeigen, diese Reaktion durch PKC-Inhibitoren hemmbar ist. Zu den PKC-sensitiven Zelltypen zählen COS7-fibroblastenähnliche Nierenepithelzellen, U937-Monozyten-Vorläuferzellen, Herzmyozyten, T-Zellen und T24-Blasentumorzellen [125, 140, 141, 144, 145]. Im Gegensatz zu ihrer Gemeinsamkeit der PKC-Sensitivität unterscheiden sich die vorgeschlagenen Mechanismen zur TPA-induzierten RasGTP-Akkumulation unter diesen Zelltypen sehr deutlich. In Herzmyozyten, azinären Pankreas- und COS7-Zellen führt TPA-Stimulation zur Erhöhung des Ras-Nukleotidaustausches [141, 208], dagegen wurde in peripheren T-Zellen von einer GAP-Hemmung durch TPA-aktivierte PKC als Vermittler für die RasGTP-Akkumulation ausgegangen [140]. Diese Daten wurden jedoch nie bestätigt und man geht vielmehr davon aus, dass Ras-Aktivierung in T-Zellen über erhöhte GEF-Aktivität erfolgt, PKC-unabhängig über Sos und PKC-abhängig über RasGRP1 [129, 209, 210]. Weiterhin wurde angenommen, dass eine RasGAP-Hemmung zur TPA-induzierten Ras-Aktivierung in T24-Blasentumorzellen und COS-Zellen führt, da in beiden Zelltypen die Expression von dominant-negativem S17N-Ras, welches die physiologische Funktion von RasGEF verhindert, die Ras-abhängige Raf1- bzw. Erk-Aktivierung nach TPA-Stimulation nicht blockiert [125, 144, 168, 170-172]. Allerdings stehen diese Annahmen im Kontrast zu Daten in COS7-Zellen, die eindeutig zeigen, dass TPA zur Erhöhung des Guaninnukleotid-Austausches am Ras führt [eigene Diplomarbeit].

Dies sind jedoch nicht die einzigen gegensätzlichen Beobachtungen bei der Aufklärung des Mechanismus' der TPA-induzierten Ras-Aktivierung. Kontrovers sind zudem Daten, die demonstrieren, dass der Phorbolster TPA die Tyrosinphosphorylierung von EGFR und Shc in COS7-, HEK293-Zellen und Rat1-Fibroblasten induziert [155, 162], doch führt TPA-

Stimulation nur in COS7-Zellen zur RasGTP-Akkumulation [80, 125, 155, 162, 165]. Aufgrund der Tatsache, dass Ras nach TPA-Stimulation in COS7-Zellen aktiviert wird und nur unzureichende mechanistische Daten vorliegen, wurden diese als Zellsystem ausgewählt, um die Aufklärung des Mechanismus' der Phorbol-ester-induzierten Ras-Aktivierung voranzutreiben. Dabei wurde auf eine systematische pharmakologische Untersuchung der Zellen zurückgegriffen. Zu Beginn der Untersuchung wurden die optimale Zeit und Dosis der TPA-Stimulation gesucht, die zum stärksten RasGTP-Signal führte.

### ***5.1. Zeit- und Dosisabhängigkeit der TPA-induzierten Ras-Aktivierung***

Die Behandlung der COS7-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an TPA zeigt, dass 100 nM TPA das stärkste RasGTP-Signal nach 5 Minuten induziert (Abb. 8A). Eine Steigerung der TPA-Konzentration bringt nur eine Verringerung des RasGTP-Signals mit sich (Abb. 8B), was darauf schließen lässt, dass der „TPA-Rezeptor“ bei 100 nM TPA seine höchste Aktivität besitzt. Eine weitere Erhöhung der TPA-Konzentration führt möglicherweise zur Bindung von TPA an Domänen von Proteinen, die hemmende Aktivitäten auf die RasGTP-Akkumulation besitzen, oder es könnte die durch zu hohe Dosen an TPA ausgelöste „Hyperaktivierung“ des „TPA-Rezeptors“ seine eigene Hemmung auslösen. Der Zeitpunkt des stärksten RasGTP-Signals liegt zwischen 5-7 Minuten (Abb. 8A). Längere TPA-Stimulationen führen wieder zur Verringerung des RasGTP-Signals, was auf eine Gegenregulation zur Ras-Aktivierung zurückzuführen sein kann. Diese Daten stimmen mit denen von Marais et al. und Montessuit et al. zum Teil überein [125, 141]. Bei diesen Arbeitsgruppen führte die TPA-Behandlung der COS7- Zellen bzw. Herzmyozyten ebenso zur Ras-Aktivierung. Allerdings beobachten diese einen Anstieg des RasGTPs innerhalb von 60 Minuten [125] bzw. das RasGTP blieb über den Zeitraum von 10- 60 Minuten gleich [141]. Eine RasGTP-Abnahme nach 10 Minuten, wie in Abbildung 8A war bei ihnen nicht auszumachen. Weiterhin unterscheiden sich die verwendeten TPA-Konzentrationen. Marais wählt 40 nM, wogegen Montessuit 1  $\mu$ M TPA zur Stimulation der Zellen benutzt. Die Behandlung der in dieser Arbeit verwendeten COS7-Zellen mit 40 nM und 1 $\mu$ M TPA zeigten eine ähnliche Kinetik wie die Behandlung mit 100 nM TPA, jedoch waren die RasGTP-Signale schwächer (Daten nicht gezeigt).

Wie in meiner Diplomarbeit demonstriert, kommt die TPA-induzierte Ras-Aktivierung in COS7-Zellen durch eine Erhöhung des Guaninnukleotid-Austausches am Ras zustande (eigene Diplomarbeit). Diese Beobachtung wurde auch in Herzmyozyten und azinären

Pankreaszellen gemacht [141, 208] und die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um die Rekrutierung und Aktivierung eines RasGEF der RasGRP-Gruppe durch TPA handelt. Jedoch wurde die Expression eines oder mehrerer Mitglieder dieser Gruppe in COS7-Zellen bisher nicht bestätigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die RasGRP-abhängige Erk-Aktivierung durch dominant-negatives N17-Ras blockiert wurde [127], wogegen die Ras- und Erk-Aktivierung nach TPA-Stimulation in COS-Zellen nicht durch Expression von N17-Ras gehemmt wird [125, 168, 170-172]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass RasGRP die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung in COS7-Zellen vermitteln. Nur der RasGEF Sos wird in COS7-Zellen exprimiert und ist daher in diesen Zellen in der Lage den Nukleotidaustausch am Ras nach TPA-Stimulation zu vermitteln [211]. Sos wird durch Aktivierung des EGFR/Shc/Grb2-Signalweges in die Nähe von Ras gebracht und kann es daraufhin aktivieren. Nun konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass TPA-Behandlung in COS-Zellen in einer EGFR- und Shc-Tyrosinphosphorylierung mündet [155, 166, 167]. Somit besteht die Möglichkeit, dass nach der TPA-induzierten Phosphorylierung von EGFR und Shc Sos, welches mit dem Adaptorprotein Grb2 interagiert, rekrutiert wird und den Guaninnukleotid-Austausch am Ras vermitteln kann. Daher wurden COS7-Zellen zur Prüfung dieser Daten mit TPA behandelt und der Phosphorylierungszustand von EGFR und Shc nach TPA-Stimulation überprüft.

### ***5.2. TPA transaktiviert den EGFR und führt zu Shc-Phosphorylierung und erhöhter Shc/Grb2-Interaktion.***

Die TPA-Stimulation von COS-Zellen führte zur Phosphorylierung von EGFR und Shc, was zudem in erhöhter Shc/Grb2-Interaktion resultierte (Abb. 9). Die Daten der anderen Arbeitsgruppen konnten somit bestätigt werden [155, 166, 167]. Weitere Arbeitsgruppen zeigten ebenso TPA-induzierte Shc-Phosphorylierung in Rat1-Fibroblasten [162] oder Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR in Prostata-Krebs-(PC3-) und epidermale Maus-(JB6CL41)-Zellen [212, 213]. Zudem konnte in Fao-Ratten-Hepatomzellen eine Aktivierung von den EGFR-Familien-Mitgliedern Erb2/Erb3 und ihren nachgeschalteten Signalwegen nach TPA-Behandlung beobachtet werden [214].

Die in diesem Experiment erhaltenen Daten und die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen bestärken die Annahme, dass durch die TPA-induzierte Aktivierung des EGFR-Signalweges Sos in die Nähe von Ras gelangt und dieses aktiviert. Sos scheint somit der gesuchte RasGEF

zu sein, der den Nukleotidaustausch am Ras nach TPA-Behandlung erhöht. Im Widerspruch dazu wurden Daten veröffentlicht, die demonstrieren, dass die Expression von dominant-negativem Ras, welches RasGEFs, wie Sos, blockiert, in COS7-Zellen trotzdem zur Ras-, Raf- und Erk-Aktivierung führt [125, 170]. Außerdem stellt sich die Frage, wieso es in Rat1-Fibroblasten und HEK293-Zellen zur Aktivierung des EGFR/Shc-Signalweges nach TPA-Stimulation kommt, dies jedoch nicht den Nukleotidaustausch an Ras bzw. die RasGTP-Akkumulation erhöht [80, 155, 162, 165].

Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate, dass in COS7-Zellen die Tyrosin-Phosphorylierung von EGFR und Shc kontinuierlich innerhalb der 15 Minuten TPA-Stimulation ansteigt, wogegen RasGTP schon nach 10 Minuten wieder abnimmt, lassen zudem vermuten, dass es zur Gegenregulation der TPA-induzierten RasGTP-Level kommt. Möglicherweise führt die EGFR-Phosphorylierung zur Rekrutierung von einem RasGAP in die Nähe von Ras, an dem es die GTP-Hydrolyse beschleunigen kann. Eine Verringerung des Guaninnukleotid-Austausches nach 10 Minuten TPA-Stimulation wurde zudem nicht in diesen Zellen beobachtet [245]. Um zu überprüfen, ob die Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation durch den EGFR-Signalweg oder durch einen anderen Signalweg vermittelt wird, wurde der EGFR mit einem spezifischen Inhibitor gehemmt.

### ***5.3. Der EGFR/Shc-Signalweg ist nicht wichtig für die TPA-ausgelöste RasGTP-Akkumulation.***

Die Behandlung der COS7-Zellen mit dem spezifischen EGFR-Inhibitor AG1478 und anschließender TPA-Stimulation führte zur kompletten Hemmung des EGFR/Shc/Grb2-Signalweges, die Ras- und Erk-Aktivierung war dagegen kaum blockiert (Abb. 10). Zudem ist zu erkennen, dass die basalen RasGTP-, Phospho-Erk-Level und der Tyrosin-Phosphorylierungsstatus von EGFR und Shc durch AG1478 gehemmt wurden (Abb. 10). Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die basale Aktivität des EGFR essentiell für den Erhalt der basalen Shc-Phosphorylierung, der Shc/Grb2-Interaktion sowie der basalen Ras- und Erk-Aktivierung ist, der EGFR jedoch nicht bedeutend für die Vermittlung der TPA induzierten Ras- und Erk-Aktivierung ist. Stellt man zudem die absoluten RasGTP-Niveaus (Abb. 16A) dem Verhältnis der TPA-induzierten zu dem basalen RasGTP (Abb. 16B) gegenüber, fällt auf, dass AG1478 die absoluten RasGTP-Niveaus leicht hemmt. Jedoch wird bei Berücksichtigung der basalen Ras-Aktivität in der TPA-induzierten Ras-Aktivierung keine

Hemmung durch AG1478 sichtbar und die Netto-Akkumulation an TPA-induziertem RasGTP ist nicht beeinträchtigt (Abb. 16B). Dies bestärkt die oben genannte Annahme, dass der EGFR nicht der entscheidende Mediator der RasGTP-Akkumulation nach TPA-Behandlung ist.

Ein Vergleich dieser Daten mit den in der Literatur beschriebenen zeigt gewisse Parallelen, aber auch kontroverse Daten. So machte Roudabush et al. die Beobachtung, dass die basale Erk-Phosphorylierung AG1478- und CRM197-sensitiv ist, jedoch die TPA-induzierte Erk-Aktivierung in COS7-Zellen nicht durch AG1478 und CRM197 zu hemmen ist, was mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten übereinstimmt [178]. Zudem wurde in COS-1-Zellen beobachtet, dass die Basalaktivität von EGFR und von Erk, sowie ihre TPA-induzierte Aktivierung AG1478-sensitiv sind [167]. Der Autor argumentiert, dass der EGFR die TPA-induzierte Erk-Aktivierung vermittelt und beachtet nicht die Hemmung der basalen EGFR- und Erk-Aktivität durch AG1478. Zudem ist die Aussagekraft dieser Arbeit vermindert, da Kontroll-Blots fehlen und die verwendeten AG1478-Konzentrationen zu hoch sind (5  $\mu\text{M}$ ) als dass hier von Effekten spezifischer EGFR-Hemmung gesprochen werden kann. Eine Publikation in Prostata-Karzinom (PC-3) Zellen zeigt, dass die TPA-induzierte EGFR- und Erk-Aktivierung durch AG1478 komplett gehemmt wird, dagegen sind Aussagen über basale EGFR- und Erk-Aktivitäten nicht möglich, da diese nicht sichtbar sind [215]. Diese Arbeit steht im Kontrast zu den in dieser Arbeit erhaltenen Daten, was möglicherweise auf den unterschiedlichen Zelltyp und damit unterschiedliche Signaltransduktion zurückzuführen sein kann. Eine weitere Arbeit mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 demonstriert, dass der EGFR keinen Einfluss auf die Ras- und Erk-Aktivierung nach TPA-Behandlung in AR42J Pankreas-Zellen besitzt [216]. Die Hemmung des EGFR mit AG1478 in  $\alpha\text{T3-1}$  Zellen führt dagegen zur starken Abnahme der TPA-induzierten Ras- und Erk-Aktivierung [217], in einer anderen Veröffentlichung der gleichen Arbeitsgruppe ist der AG1478-Hemmeffekt auf die TPA-induzierte RasGTP-Akkumulation jedoch nicht signifikant, außerdem fehlt die Untersuchung der Wirkung von AG1478 auf basales RasGTP [166]. Weitere Arbeiten mit steigenden Konzentrationen von AG1478 zeigen in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) von Ratten keine Inhibierung [218] und in epidermalen JB6  $\text{P}^+1-1$ -Mauszellen eine komplette Blockierung der Erk-Aktivität nach TPA-Stimulation. Auch führt in EGFR-defizienten JB6  $\text{P}^+1-1$ -Mauszellen TPA-Stimulation nicht zur Erk-Aktivierung [212]. Besonders bestätigend zu den Beobachtungen, dass AG1478 die basalen RasGTP-Niveaus verringert, sind Daten in COS7-Zellen, die eindeutig belegen, dass die basale Guaninnukleotid-Austausch-Rate am Ras durch AG1478 gehemmt wird [164]. Weiterhin konnte in COS7-Zellen gezeigt werden, dass der TPA-induzierte Guaninnukleotid-Austausch am Ras nicht durch AG1478 gehemmt wurde

[245]. Die letztgenannten Daten liefern somit den Beweis, dass der EGFR nicht wichtig für die TPA-induzierte Ras-Aktivierung ist und dass TPA Ras über einen RasGEF aktiviert, der nicht durch den EGFR/Shc/Grb2-Weg rekrutiert wird.

Anhand der Vielfalt an verschiedenen Beobachtungen kann man darauf schließen, dass die Mechanismen der TPA-induzierten Ras-Aktivierung in diversen Zelltypen variieren bzw. dass bei der Interpretation der Daten nicht zwischen basaler und induzierter Ras-Aktivität unterschieden wurde. Zudem wird aufgrund anderer zu untersuchender Problematiken und der Verwendung der TPA-Stimulation nur als Kontrolle in vielen dieser Veröffentlichungen die Aufklärung des dahinterliegenden Mechanismus` nicht weiter vorangetrieben. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit nicht nur ein oder zwei, sondern eine Vielzahl an Signalproteinen des EGFR/Erk-Weges analysiert, um mehr Licht in den Mechanismus der RasGTP-Akkumulation nach Phorbol ester-Behandlung zu bringen. Wie schon weiter oben beschrieben, präsentierten sich nach einem umfassenderen Blick auf den EGFR/Erk-Weg einige Daten anderer Arbeitsgruppen zum Teil als nicht konsequent untersucht und nicht evident. Somit erstaunt es nicht, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate der Unwichtigkeit des EGFR bei der TPA-induzierten Ras- und Erk-Aktivierung auch in starkem Kontrast zu Literaturdaten stehen, die zeigen, dass TPA zur proteolytischen Freisetzung von EGF-Liganden und daraufhin zur EGFR-Aktivierung führt, die in RasGTP-Akkumulation und/oder Phosphorylierung von Erk resultieren soll [155, 167, 212].

### ***5.4. Proteolytisch freigesetzte EGF-Liganden zeigen keinen Effekt auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung.***

Einige Arbeitsgruppen präsentierten Ergebnisse, nach denen TPA zur Freisetzung von EGF-Liganden führt, die in der Lage sind, den EGF-Rezeptor und seinen Signalweg zu transaktivieren [155-157]. In der vorliegenden Arbeit wurde die TPA-induzierte Freisetzung von HB-EGF bestätigt, jedoch zeigte sich, dass die ersten nachweisbaren Mengen an HB-EGF nach 7 Minuten auftraten, zu welchem Zeitpunkt die Ras-Aktivierung schon ihr stärkstes Signal erreicht hatte und danach schnell wieder abnahm (Abb. 11A). Die im Medium vorhandene Menge an HB-EGF stieg kontinuierlich mit der Zeit an (Abb. 11A), wohingegen RasGTP sich nach 10 Minuten verringerte (Abb. 8A). Diese Tatsache steht im Kontrast zu der Vermutung, dass proteolytisch freigesetzte HB-EGF-Liganden die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung vermitteln [155, 156, 167]. Allerdings ist es möglich, dass die durch Western

Blot nicht detektierten Mengen an HB-EGF ausreichen, um den EGFR zu aktivieren und so in einer Ras-Aktivierung resultieren können. Zur weiteren Untersuchung, welchen Einfluss diese proteolytisch freigesetzten Liganden besitzen, wurde CRM197, eine nichttoxische Diphtherietoxin-Mutante, verwendet, welches als HB-EGF-*Scavenger* diente und eine EGFR-Signalweg-Aktivierung verhindern sollte. Die Behandlung der Zellen mit CRM197 resultierte in der Hemmung der basalen RasGTP-, Phospho-Erk-, EGFR-, Shc-Level und Shc/Grb2-Interaktion und der TPA-induzierten EGFR-, Shc-Tyrosinphosphorylierung und des Shc/Grb2-Komplexes. Zudem zeigte sich, dass TPA-induziertes RasGTP und Phospho-Erk nicht durch CRM197 hemmbar sind (Abb. 11B/ C). Auch der Vergleich der absoluten RasGTP-Level nach TPA-Inkubation gegenüber dem Verhältnis der TPA-induzierten zu den basalen RasGTP demonstriert, dass die proteolytisch freigesetzten HB-EGF-Liganden nicht als die gesuchten Mediatoren der TPA-induzierten Aktivierung von Ras und Erk in Frage kommen (Abb. 16A/B). Hierbei ist jedoch auffällig, dass die TPA-induzierte Netto-Ras-Aktivierung nach EGFR- und HB-EGF-Hemmung verglichen mit alleiniger TPA-Behandlung erhöht ist. Der EGFR und HB-EGF haben jedoch keinen negativen Einfluss auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung (Abb. 3, 4, 16A). Eine mögliche Erklärung dieser Erhöhung könnte darin liegen, dass TPA die Aktivierung einer Ras-Population veranlasst, die nicht auf die basale EGFR-Aktivität angewiesen ist. Eine AG1478- als auch eine CRM197-Behandlung führt daher zur starken Erniedrigung des gesamten basalen RasGTP, jedoch ist die TPA-induzierte RasGTP-Akkumulation dadurch nicht beeinträchtigt, was in einer „zu stark“ erhöhten Ras-Aktivierung gegenüber dem basalen RasGTP resultiert.

Vergleicht man die Aussagen der Versuche mit AG1478 und CRM197, so fällt auf, dass die proteolytisch freigesetzten EGF-Liganden für den Erhalt der basalen Aktivitäten des EGFR- und seines Signalweges zuständig sind.

Betrachtet man die Literaturdaten, stellt sich heraus, dass in vielen Arbeiten wieder nur der EGFR, Shc oder Erk nach TPA-Inkubation untersucht wurden, wogegen Ras kaum Beachtung fand [155, 213, 215]. Prenzel et al. zeigten, dass die Tyrosinphosphorylierung von EGFR in HEK293 als auch vom EGFR und Shc in COS7-Zellen durch CRM197 hemmbar sind [155], Chen demonstriert das Gleiche für den EGFR in COS-1-Zellen [213] und Stewart präsentiert eine Hemmung der basalen Erk-Aktivität und der TPA-induzierten Erk-Aktivierung durch CRM197 in PC3-Zellen [215]. Die Daten von Prenzel et al. und Chen et al. stimmen mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen überein, doch unterscheiden sich die Schlussfolgerungen [155, 213]. Prenzel et al. geht davon aus, dass die TPA-induzierte Transaktivierung des EGFR durch freigesetzte HB-EGF-Liganden bedingt ist und dies zur Auslösung der EGFR-



Signalkaskade führt. Allerdings fehlen in seiner Arbeit Beweise, dass die Signalproteine dieser linearen EGFR-Erk-Kaskade, wie Ras, aktiviert bzw. durch CRM197 gehemmt werden. Wie weiter oben für AG1478 beschrieben, verringert auch CRM197 in COS7-Zellen den basalen Guaninnukleotid-Austausch am Ras [164], was wiederum die im Rahmen dieser Arbeit präsentierten Daten, dass CRM197 basales RasGTP hemmt, weiter stützt. Zudem zeigt CRM197-Behandlung keinen Einfluss auf den TPA-induzierten Guaninnukleotid-Austausch am Ras [245], was die Annahme bestärkt, dass proteolytisch freigesetzte EGF-Liganden und ebenso der EGFR nicht in die TPA-induzierte Ras-Aktivierung involviert sind. Weitere Daten aus Veröffentlichungen bestärken jedoch die Annahme, dass Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP) an der TPA-induzierten Ras-Aktivierung beteiligt sind. So wurde in COS7-, JB6CL41-, COS1- und PC-3-Zellen, die mit MMP-Hemmern, wie Batimastat behandelt wurden, eine komplette Hemmung der EGFR- und/oder Shc-Phosphorylierung beobachtet [155, 212, 213]. Eine Hemmung von aktiviertem Ras und MEK durch Batimastat ist in COS1-Zellen und von aktivierter Erk in JB6CL41-Zellen [167, 212] gezeigt worden. Jedoch fällt bei der Arbeit von Tebar et al. auf, dass die Hemmung der basalen Ras-Aktivität durch Batimastat nicht beachtet wird, obwohl es diese zweifellos inhibiert. Gegenteilige Ergebnisse zu den in COS1- und JB6CL41-Zellen präsentierten Daten wurden in  $\alpha$ T3-1-Zellen erhalten, in denen Batimastat die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung nicht hemmt [217]. Jedoch konnte in PC3-Zellen demonstriert werden, dass die Inhibierung des EGFR bzw. das Blockieren von HB-EGF mit einem spezifischen Antikörper mit dem Verschwinden der TPA-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der Aktivierung von Erk einhergeht [212]. Die Wirkung von Batimastat auf die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung in COS7-Zellen konnte in dieser Arbeit leider nicht untersucht werden, da der Vertreiber dieser Substanz diese nicht zur Verfügung stellen konnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten, dass Ras und Erk nach Phorbol ester-Behandlung aktiviert wurden, obwohl das proHB-EGF-*processing* und die EGFR-Kinase-Aktivität gehemmt wurden, deuten daraufhin, dass beide nicht in die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung involviert sind. Nur basale RasGTP-Niveaus und die basale Erk-Phosphorylierung sind AG1478- und CRM197-sensitiv. Diese Daten und die Resultate, dass AG1478 und CRM197 zwar die basale Guaninnukleotid-Austausch-Rate am Ras hemmen, die TPA-induzierte durch diese Inhibitoren indes nicht berührt wird [245], bestätigen die Annahmen, dass der EGFR wichtig für den Erhalt der basalen Signaltransduktion durch Ras und Erk ist, jedoch die TPA-induzierte Aktivierung dieser Proteine nicht vermittelt. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit, dass die hier erhaltenen Ergebnisse zu falschen Schlussfolgerungen

führen geringer als in anderen Veröffentlichungen, da in dieser Arbeit der komplette Signalweg vom EGFR bis Ras analysiert wurde.

### ***5.5. Reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) sind nicht in die Ras-Aktivierung ausgelöst durch TPA involviert.***

Aufgrund der nun bewiesenen Annahme, dass EGF-Liganden und der EGFR nicht in die RasGTP-Akkumulation nach TPA-Behandlung involviert sind, wurden weitere mögliche Aktivierungsmechanismen geprüft. Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben TPA-induzierte Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)-Bildung und Ras-, Erk-Aktivierung durch ROS [158, 183, 184, 219, 220]. Diese mögliche Verbindung wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Es zeigte sich, dass TPA in der Lage ist, genau wie Wasserstoffperoxid, Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) transient reversibel zu inaktivieren (Abb. 12A). Somit besteht die Möglichkeit, dass die TPA-induzierte Ras-Aktivierung über Hemmung von PTPs durch ROS vermittelt wird. Die erhaltenen Resultate demonstrieren, dass die Inaktivierung der PTP durch TPA-induzierte ROS-Bildung nicht wichtig für die Ras-Aktivierung ist (Abb. 12). Betrachtet man die Aktivierungszustände der verschiedenen Signalproteine des EGFR/Erk-Weges nach TPA- und Wasserstoffperoxid-Stimulation mit und ohne ROS-Inhibierung, bestätigt sich diese Annahme. Der EGFR, Shc und die Shc/Grb2-Wechselwirkung werden durch beide Stimuli aktiviert/ausgelöst und sind sensitiv gegenüber ROS-Inhibierung (Abb. 12C). Dagegen wird die TPA-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung nicht durch ROS-Hemmung beeinträchtigt. Zudem führt Wasserstoffperoxid nicht zu Ras-, sondern nur zu schwacher LNAC-sensitiver Erk-Aktivierung (Abb. 12B). Das Fehlen der Ras-Aktivierung nach Wasserstoffperoxid-Behandlung und die Insensitivität der TPA-induzierten RasGTP-Akkumulation gegenüber der ROS-Hemmung demonstrieren, dass ROS in der Ras-Aktivierung nach Phorbolster-Inkubation nicht involviert sein können. Nur in Jurkat-Zellen wurde eine Ras-Aktivierung nach Wasserstoffperoxid-Behandlung beobachtet, doch aktiviert TPA Ras in Jurkat-Zellen wohl eher durch den RasGEF RasGRP1 als durch ROS-Bildung sodass hier eine Verbindung zweifelhaft ist [129, 184].

Fasst man alle Daten der vorangegangenen Kapitel zusammen, stellt man fest, dass der EGFR kein Bestandteil der Signalwege von TPA zu Ras und Erk darstellt. Die Versuche mit EGFR-, HB-EGF- und ROS-Inhibitoren demonstrieren, dass der EGFR durch TPA transaktiviert wird, dies jedoch nicht zur Ras- und Erk-Aktivierung führt. Die durch jeden Inhibitor verursachte

EGFR-Hemmung führte nur zu einer sehr geringen Abnahme des TPA-induzierten RasGTP-Signals. Zudem zeigte sich, dass in allen drei Untersuchungen die Phorbolster-ausgelöste Shc-Tyrosinphosphorylierung und Shc/Grb2-Assoziation ebenso wie die EGFR-Transaktivierung durch die Inhibitoren gehemmt wurde. Aufgrund der Tatsache, dass TPA auch nach Hemmstoffgabe in der Lage war, die Ras-Aktivierung zu induzieren, muß dies über einen anderen Signalweg als durch den EGFR, Shc und die Shc/Grb2-Assoziation vermittelt werden. Nun konnten zudem einige Arbeitsgruppen beobachten, dass die Phorbolster-ausgelöste EGFR-Transaktivierung und Ras-Aktivierung in COS7-Zellen durch PKC-Inhibitoren gehemmt wurde [125, 155]. Diese Daten wurden dahingehend interpretiert, dass TPA zur Ras-Aktivierung via PKC und transaktivierten EGFR führt. Die im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Daten zeigen jedoch, dass der EGFR nicht in die TPA-induzierte Ras-Aktivierung involviert ist. Ferner wurden in einer dieser Arbeiten die Zellen mit hohen Konzentrationen eines PKC-Inhibitors behandelt, die auch andere Kinasen hemmen können, was die gemachten Beobachtungen in Frage stellt [125, 187, 188, 203]. Aus diesem Grund wurden COS7-Zellen mit verschiedenen PKC-Inhibitor-Konzentrationen behandelt, um aufzulösen, welche Effekte wirklich der PKC-Hemmung zugeordnet werden können.

### ***5.6. Der Einfluss von Proteinkinase C auf basales RasGTP***

Konzentrationen des PKC-Inhibitors BIM I im nanomolaren Bereich, welche als PKC-spezifisch gelten, resultierten in keiner Erniedrigung des basalen Niveaus an RasGTP und stellen damit einen Gegensatz zu den Daten, die mit AG1478 und CRM197 erhalten wurden, dar (Abb. 13, 10B, 11B). Die erst ab 4 - 6  $\mu\text{M}$  auftretende Hemmung des basalen RasGTP kann als PKC-unspezifisch angesehen werden, da schon 1  $\mu\text{M}$  BIM I mindestens vier weitere Kinasen, wie Rsk2, Msk1, p70S6K und GSK-3 inhibiert, die möglicherweise einen Einfluss auf die basale Ras-Aktivität haben könnten [187, 188]. Eine Herunterregulation der PKC durch verlängerte TPA-Behandlung [221] führte zu leicht erhöhter Ras-Aktivität, welche durch hohe BIM I-Konzentrationen hemmbar blieb, jedoch war Ras nicht mehr durch TPA aktivierbar. Die Analyse der Lysate der Zellen, welche mit TPA für 24h inkubiert wurden, zeigte, dass nur klassische PKC (cPKC) nicht detektierbar waren (Abb. 13). Die Protein-Level der neuen (nPKC) und der einen atypischen PKC (nicht gezeigt), die in COS7-Zellen exprimiert werden, waren kaum oder nicht im Zelllysat verringert, was zum Teil in Kontrast zu einer Publikation steht, in der alle in COS7-Zellen exprimierten c- und nPKC-Isoformen

zwischen 70 und 100 Prozent herunterreguliert wurden [221]. Die Beobachtungen der PKC-Herunterregulation ließen darauf schließen, dass cPKC in die TPA-induzierte Ras-Aktivierung involviert sind. Jedoch ist zu sagen, dass TPA-Behandlung über 24 Stunden zu morphologischen und demzufolge massiven zellulären Veränderungen führt. Die Zellen wurden schmaler und bildeten stark verlängerte Zellfortsätze. Diese Beobachtung demonstriert zudem, dass die verlängerte TPA-Inkubation zu einer starken Umstrukturierung des Zytoskeletts führt. Diese könnte dadurch zustande kommen, dass das RacGAP  $\beta$ -Chimärin durch TPA zu Phospholipid-Membranen transloziert wird [222] und dies zu Zytoskelettänderungen [223] oder Lamellipodien/Filopodien-Formierung [224] führt. Weiterhin kann auch genau das Gegenteil eintreten, dass TPA nicht nur in einer Herunterregulation von cPKC mündet, sondern, dass auch die zellulären Chimärin-Level verringert werden. Diese Vermutung liegt deshalb nahe, da auch für den RasGEF RasGRP wie für PKC nach Phorbolster-Behandlung eine Herunterregulation demonstriert wurde [225, 226]. Es steht zu vermuten, dass noch weitere Proteine in ihren physiologischen Funktionen durch die lange TPA-Behandlung beeinträchtigt wurden und die Signaltransduktion der COS7-Zelle derart verändert haben, als dass der Effekt des „Nicht-Aktivierens“ von Ras nach TPA-Behandlung nur dem Fehlen der cPKC zukommt. Der Gegensatz der Wirkung von PKC- gegenüber der EGFR-Tyrosinkinase- und proHB-EGF-*shedding*-Inhibierung auf die basale Ras-Aktivität konnte dann auf die TPA-induzierte RasGTP-Akkumulation ausgedehnt werden.

### ***5.7. Die Inhibition von PKC führt zur kompletten Blockierung der TPA-induzierten Ras-Aktivierung.***

Untersuchungen mit BIM I offenbarten, dass nanomolare Konzentrationen dieses PKC-Inhibitors zu einer über 50%igen Hemmung der Aktivitäten der Signalproteine des EGFR-Ras-Erk-Signalweges nach TPA-Behandlung führten (Abb. 14A). Diese Beobachtungen verglichen mit der fehlenden Hemmung der basalen Ras-Aktivität bestätigen, dass PKC die „wahren“ Vermittler der TPA-induzierten Ras-Aktivierung sind. Weiterhin bestärken diese Tatsache Daten, die demonstrieren, dass geringe Konzentrationen an PKC-Hemmer den basalen Nukleotidaustausch am Ras nicht blockieren, der TPA-induzierte GDP/GTP-Nukleotidaustausch sehr wohl PKC-abhängig ist [245]. Vergleicht man die erhaltenen Daten mit der Literatur, zeigt sich, dass im Großteil der Publikationen dieselben Effekte für die

PKC-Abhängigkeit der TPA-induzierten Aktivierung von EGFR/Shc, Ras und Erk beobachtet bzw. beschrieben werden [125, 140, 141, 143-145, 155, 166]. Jedoch wurden in einigen Publikationen Inhibitor-Konzentrationen über 1  $\mu\text{M}$  verwendet, was wiederum die Frage der Spezifität und Glaubwürdigkeit aufwirft. Zudem wird in allen Publikationen der Effekt des PKC-Hemmers auf die basale Ras-Aktivität nicht beachtet. In dem hier vorliegenden Fall ist dies vernachlässigbar, da nur die Phorbolster-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung gehemmt wird, doch kann ein Fehlen dieser Kontrollpunkte zu falschen Interpretationen der erhaltenen Daten und nicht evidenten Schlussfolgerungen, wie bei AG1478 und CRM197, führen.

Diese Fehler wurden in dieser Arbeit nicht begangen und es konnte aufgrund der Ergebnisse mit AG1478, CRM197 und BIM I zum ersten Mal gezeigt werden, dass die EGFR- und Ras-Aktivierung nach TPA-Stimulation zwar PKC-abhängig, jedoch beide parallel ablaufende Begebenheiten sind, die reine Koinzidenzen darstellen. Bisher wurde davon ausgegangen, dass TPA-Stimulation zum Auslösen einer linearen Signalkaskade via PKC führt, die über EGFR-Transaktivierung in einer RasGTP-Akkumulation resultiert [166].

Daneben lassen diese Daten und die Beobachtungen, dass dominant-negatives Ras nicht die TPA-ausgelöste sondern nur die EGF-induzierte Ras-Aktivierung blockiert, vermuten, dass es verschiedene Ras-Populationen in COS7-Zellen gibt [244, Daten nicht gezeigt]. Eine Ras-Population wird über den EGFR nach EGF-Stimulation, die andere durch PKC-Aktivierung nach Phorbolster-Behandlung aktiviert. Diese Theorie wird auch dadurch bestärkt, dass die basale EGFR-Aktivität für die LPA-induzierte Ras-Aktivierung eine permissive Funktion besitzt [164], wogegen die TPA-induzierte EGFR-unabhängig ist. Welche Signalproteine PKC phosphoryliert oder mit denen es interagiert, die den Guaninnukleotid-Austausch am Ras erhöhen, ist für COS7-Zellen nicht bekannt. Es konnte nur für RasGRP-Isoformen gezeigt werden, dass deren Phosphorylierung durch PKC die Aktivität dieser RasGEFs erhöhte [130]. Da diese Austauschfaktoren jedoch nicht in COS7-Zellen exprimiert werden, bleibt die Frage weiter offen, welcher Austauschfaktor die TPA-induzierte Ras-Aktivierung vermittelt. Auch können die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten und die Resultate von Rennert et al. nicht ausschließen [245], dass ebenso RasGAP durch TPA-Stimulation inaktiviert werden und mit dem Phorbolster-bedingten erhöhten Guaninnukleotid-Austausch zur Ras-Aktivierung führen.

Um die Identität der PKC-Isoform einzugrenzen, welche die Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung vermittelt, müssten sich Arbeiten mit siRNA anschließen. Diese Experimente könnten sich allerdings als schwierig erweisen, da innerhalb der PKC-Familie hohe funktionelle Redundanz besteht [227, 228]. Doch sollten Kombinationen an verschiedenen

PKC-Isoform-siRNAs, die für die TPA-induzierte Ras-Aktivierung essentielle/n PKC zutage fördern. Nach Erhalt der speziellen PKC bestünde die Möglichkeit, deren Interaktionspartner und Substrate auf deren Einfluss in der Ras-Aktivierung nach Phorbolster-Inkubation weiter zu untersuchen. Aufgrund des zu hohen experimentellen Aufwandes wurde von diesen Möglichkeiten Abstand genommen und diese nicht durchgeführt. Kostengünstigere und zeitsparende Untersuchungen mit Kinase-inaktiven PKC-Isoformen hätten hier im Gegensatz zur Verwendung von siRNA wenig oder keine Aussagekraft, da die gebrauchten Konzentrationen an TPA ausreichen würden, die überexprimierten Kinase-inaktiven PKC als auch die endogenen Wildtyp-PKC zu zellulären Membranen zu rekrutieren und eine normale PKC-Aktivierung zu gewährleisten.

Eine billige und wenig zeitaufwendige Analyse, welche PKC-Isoform-Gruppe in die TPA-induzierte Ras-Aktivierung involviert ist, stellt die Untersuchung des Einflusses der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel dar. Die klassischen PKC benötigen  $\text{Ca}^{2+}$  zur vollen Aktivierung, die neuen dagegen nicht [112]. Da die Herunterregulation der klassischen PKC zu starken Änderungen der Signaltransduktion der Zelle führt, wurde der Hinweis auf eine Involvierung der klassischen PKC in die Phorbolster induzierte Ras-Aktivierung mit Hilfe von  $[\text{Ca}^{2+}]$ -Änderungen, die weniger aggressiv für die Zelle sind, näher untersucht.

### ***5.8. Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration haben nur einen marginalen Einfluss auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung.***

Eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel haben kaum einen Einfluss auf die RasGTP-Akkumulation nach Phorbolster-Behandlung. Die RasGTP-Niveaus waren nicht signifikant niedriger als nach alleiniger TPA-Stimulation. Demzufolge ist eine Rolle der klassischen PKC-Isoformen in der Phorbolster-induzierten Ras-Aktivierung eher unwahrscheinlich. Dies wiederum steht im Kontrast zu den Daten, die aus der PKC-Herunterregulation erhalten wurden. Die Frage bleibt somit offen, welche PKC-Isoform/en den/die Vermittler der Ras-Aktivierung durch TPA darstellt/en.

Weiterhin stellt sich bei Betrachtung des Einflusses der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Frage, ob Diacylglycerol, das physiologische Analogon zu den Phorbolstern, die gleichen zellulären Effekte auslöst wie TPA. Aufgrund der Tatsache, dass DAG-Bildung eng verbunden mit der Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels ist und beide second messenger bezüglich der Gesamtreaktion zusammenwirken, ist es sehr wahrscheinlich, dass bei TPA-Behandlung

eventuelle modulatorische Einflüsse der „Ca<sup>2+</sup> - Seite fehlen. Diese scheinen allerdings nicht von großer Bedeutung für die Ras-Aktivierung zu sein, da BAPTA/AM und 50 ng/ml an Ionomycin die TPA-induzierte Ras-Aktivierung nicht beeinträchtigten. Jedoch führte eine zehnfach höhere Konzentration an Ionomycin zur Abnahme des RasGTP-Signals (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung könnte sich dadurch erklären, dass die stark erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Spiegel zur Rekrutierung und Aktivierung des RasGAP CAPRI (Ca<sup>2+</sup>-promoted Ras-inhibitor) führt, welches in der Umsetzung von aktivem in inaktives Ras resultiert [229]. Eine eingehendere Untersuchung des Einflusses der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel zusammen mit DAG-Stimulation ist daher wichtig, um weitere Einblicke in die physiologischen Funktionen der beiden second messenger zu ermöglichen, die zur Ras-Aktivierung führen.

Ferner müsste untersucht werden, welche physiologischen Stimuli in COS7-Zellen zur Entstehung von DAG führen und auch Ras aktivieren. Eine Involvierung der PLC $\gamma$ , welche durch EGFR-Autophosphorylierung nach EGF-Ligandenbindung rekrutiert und aktiviert wird [230-232], kann höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, da der EGFR nicht an der TPA-induzierten Ras-Aktivierung beteiligt ist. Mögliche Kandidaten, die eine Bildung von DAG und die daraus resultierende Aktivierung von Ras ermöglichen können, stellen die PLC $\beta$ -Isoformen dar, welche durch  $\alpha$ -Untereinheiten der G<sub>q</sub>-Klasse der G-Proteingekoppelten Rezeptoren aktiviert werden [233]. Diese Annahme wird durch Daten bestärkt, in denen Gonadotropin releasing hormone (GRH) über seinen G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptor in  $\alpha$ T3-1-Zellen zur Aktivierung von Ras und Erk führt, die jedoch, wie nach TPA-Stimulation in COS7-Zellen, nicht AG1478- aber PKC-Inhibitor-sensitiv sind. Zudem wird GRH-induzierte Erk-Aktivierung nicht durch Expression von dominant negativen EGFR und nur zu 30% durch die Expression von N17-Ras geblockt [234]. Ebenso konnte die Aktivierung von Erk durch Stimulation von G<sub>q</sub>-gekoppelten  $\alpha$ 1B-adrenergen oder M1 muscarin-cholinergen Rezeptoren in COS7-Zellen beobachtet werden, die nicht durch N17-Ras, aber durch PKC-Inhibitoren zu hemmen sind [169]. Allerdings gibt es auch Daten aus COS7- und HEK293-Zellen, die zeigen, dass die Erk-Aktivierung nach Stimulation des  $\alpha$ 1B-adrenergen Rezeptors durch N17-Ras und die GRH-induzierte Ras- und Erk-Aktivierung durch AG1478 und N17-Ras hemmbar sind [166, 235]. Somit kann keine klare, wie für TPA erhaltene, Aussage darüber gemacht werden, ob die Stimulation von G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren zur EGFR-unabhängigen Ras- und Erk-Aktivierung führt. Aus diesem Grund sollten sich weitere Untersuchungen anschließen, um aufzuklären, ob physiologische Stimuli, die zur DAG-Bildung führen, durch die gleiche Signaltransduktion wie TPA Ras und Erk aktivieren können.

### **5.9. Der MEK-Inhibitor PD98059 erhöht die TPA-induzierte Ras-Aktivierung.**

Die Ras-Aktivierung wird nach Insulin- und EGF-Stimulation durch einen Feedback-Mechanismus durch Erk gehemmt [189-192]. Nun stellte sich die Frage, ob die Ras-Aktivierung nach TPA-Zugabe ebenso einen der vorgeschlagenen Mechanismen durchläuft [191, 192, 198-200]. Die COS7-Zellen wurden daher mit einem MEK-Inhibitor behandelt, der die Aktivierung der Erk und seines Substrates Rsk2, welche beide als „Sos-Kinasen“ beschrieben wurden, hemmen sollte [197].

Die Daten zeigen eindeutig, dass dieselbe Feedback-Hemmung am Ras nach TPA-Behandlung auftritt (Abb. 18A). Nach Inhibierung von MEK ist keine Beteiligung des EGFRs und Shc an der erhöhten Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung zu erkennen, nur die Shc/Grb2-Interaktion ist leicht erhöht (Abb. 18B), wie dies auch andere Arbeitsgruppen schon beobachteten [192, 198, 199, 201, 202]. Diese geringe Erhöhung der Shc/Grb2-Interaktion könnte zur erhöhten RasGTP-Akkumulation führen. Die Untersuchung der Interaktion zwischen Sos und Grb2 demonstriert, dass die MEK-Inhibierung keinen Einfluss auf die Grb2/Sos-Wechselwirkung besitzt, was einen Unterschied zu mehreren Publikationen darstellt (Abb. 18C) [189, 191, 192, 198, 200]. Im Gegensatz zu Daten anderer Arbeitsgruppen führt die MEK-Inhibierung zwar zu erhöhter RasGTP-Akkumulation, jedoch ist diese nicht auf verringerte Sos-Phosphorylierung zurückzuführen, da der Sos mobility shift trotz MEK-Hemmung weiter besteht [189, 190]. Demzufolge kann die von vielen Arbeitsgruppen beschriebene verringerte Affinität des Grb2/Sos-Komplexes aufgrund des phosphorylierten Sos gegenüber Shc und EGFR nicht die Feedback-Hemmung am Ras bedingen [192, 198, 199, 201, 202]. Sehr interessant ist zudem, dass der EGFR nicht die TPA-induzierte Sos-Phosphorylierung und Ras-Aktivierung vermittelt (Abb. 18C und 3B), wogegen PKC das Spiegelbild zum EGFR darstellen (Abb. 15 und 18C). Deren Inhibierung führt zur Verlust des Sos mobility shifts und der TPA-induzierten Ras-Aktivierung. Demzufolge könnte die PKC-vermittelte Sos-Phosphorylierung die Ras-Aktivierung nach Phorbolster-Behandlung bewirken. Wie PKC die Sos-Phosphorylierung vermittelt, ist unbekannt, indes konnte beobachtet werden, dass PKC Sos nicht phosphorylieren können [202]. Die gesuchte Kinase müsste zudem eine Phosphorylierung der gesamten Sos-Population bewirken, da in Abbildung 18C zu erkennen ist, dass Sos nur eine Bande im SDS-PAA-Gel ergibt. Eine mögliche „Sos-Kinase“ stellt Abl dar, welche in COS7-Zellen zur Tyrosinphosphorylierung von Sos führt, allerdings wurden diese Beobachtungen nach EGF-Stimulation gemacht [236]. Um einen größeren Einblick zu bekommen, welche Sos-Aminosäure-Reste nach TPA-



Stimulation phosphoryliert werden, könnte man eine tryptische Phosphopeptid-Auftrennung (mapping), wie sie von Corbalan-Garcia et al. durchgeführt wurde, vornehmen [194].

Zur Prüfung, ob Sos in die TPA-induzierte Ras-Aktivierung involviert ist, könnte man die Zellen parallel mit AG1478 und PD98059 behandeln. Eine Erhöhung des RasGTP-Niveaus würde darauf hindeuten, dass Sos involviert ist, jedoch durch andere Signalwege als den EGFR/Shc/Grb2-Weg rekrutiert wird. Ein möglicher Kandidat wäre die Fokale Adhäsionskinase (FAK), die z.B. in Swiss 3T3-Fibroblasten und humanen Hepatomzellen nach TPA-Behandlung an Tyrosinen phosphoryliert wird und als Plattform für Grb2 dienen könnte [237]. Eine weitere mögliche Plattform für eine Grb2/Sos-Komplex-Interaktion könnten tyrosinphosphorylierte PKC darstellen. In COS7-Zellen konnte gezeigt werden, dass PKC nach Wasserstoffperoxid-Behandlung an Tyrosinen phosphoryliert werden [238-240]. Allerdings führte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in COS7-Zellen nicht zur Ras-Aktivierung. Indes könnte TPA auch diese Phosphorylierung an PKC stimulieren. Die Aktivierung von Ras nach TPA-Behandlung könnte daher über diesen unkonventionellen Mechanismus vermittelt werden. Jedoch bleibt die wichtige Frage bestehen, welcher RasGEF die TPA-induzierte Ras-GTP-Akkumulation ausführt. Die Mitglieder der RasGRP- und RasGRF-Gruppe scheiden aufgrund fehlender Expression in diesen Zellen aus [126, 127, 129, 211]. Sos ist somit der einzige in COS7-Zellen exprimierte RasGEF und die Ähnlichkeit der Muster der TPA-induzierten Sos-Phosphorylierung und Ras-Aktivierung aus Abbildung 10B, 15 und 18C lassen vermuten, dass phosphoryliertes Sos die TPA-induzierte Ras-Aktivierung bedingt. Möglicherweise führt die Phosphorylierung von Sos zu verringerter Affinität gegenüber dominant negativem N17-Ras oder seine Lokalisation unterscheidet sich von der des N17-Ras, sodass phosphoryliertes Sos nicht durch N17-Ras blockiert wird und Ras aktiviert werden kann. Um die Rolle von Sos in der Ras-Aktivierung nach Phorbolster-Stimulation weiter aufzuklären, müsste untersucht werden, ob dominant negatives Ras den Guaninnukleotidaustausch am Ras nach TPA-Behandlung beeinträchtigt. Dies gäbe Auskunft darüber, ob RasGTP immer noch aufgrund eines RasGEF akkumuliert oder die Hemmung eines RasGAPs die RasGTP-Akkumulation bedingt.

Eine Veröffentlichung von Matallanas et al. legt nahe, dass S17N-Ha-Ras die Aktivierung aller drei Ras-Isoformen durch EGF blockiert, da es zusammen mit ihnen dieselbe Membranlokalisierung aufweist und dort den einzigen in COS7-Zellen bisher nachgewiesenen RasGEF Sos blockiert [211, 241, 242]. Möglicherweise sorgt aber auch TPA dafür, dass ein großer Teil vom Ras nicht mehr in den Membrandomänen wie S17N-Ha-Ras lokalisiert ist und nun von einem RasGEF, möglicherweise Sos, aktiviert werden kann. Um dies zu

überprüfen, könnte man Sos und S17N-Ras mit einem Fluoreszenzmarker koppeln, beide transient co-transfizieren und FRET-Messungen nach EGF- und TPA-Stimulation vergleichen.

### ***5.10. BIM I-sensitive Kinasen neben PKC haben keinen Einfluss auf die RasGTP-Akkumulation ausgelöst durch TPA.***

Aufgrund der Tatsache, dass in *in vitro*-Studien gezeigt wurde, dass BIM I nicht nur PKC hemmen kann, sondern auch Rsk2, Msk1, p70S6K, PDK1 und GSK-3, wurden deren Einfluss auf die TPA-induzierte Ras-Aktivierung sowohl pharmakologisch als auch mit Hilfe von Überexpression untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass Rsk2, p70S6K, GSK-3 und PDK1 nicht in diese Reaktion involviert sind. Somit ist die PKC-Spezifität für die TPA-induzierte Ras-Aktivierung gesichert und PKC stehen als einzige, „wahre“ Vermittler dieser Reaktion fest.

### ***5.11. TPA induziert EGFR-abhängig die Serin-Phosphorylierung von Akt.***

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass TPA in der Lage ist die Phosphorylierung des Serin473 der Kinase Akt in COS7-Zellen zu induzieren. Akt wird durch PDK1 am Threonin 308 und durch den rictor/mTOR-Komplex am Serin473 phosphoryliert [241, 242]. Damit diese Reaktionen ablaufen können, muss die PI3-Kinase aktiv sein, PI(4,5)-P<sub>2</sub> zu PI(3, 4, 5)-P<sub>3</sub> phosphorylieren, welches durch die PH-Domäne der PDK1 gebunden werden kann, woraufhin PDK1 Akt phosphoryliert. Anschließend kann rictor/mTOR das Serin 473 von Akt phosphorylieren.

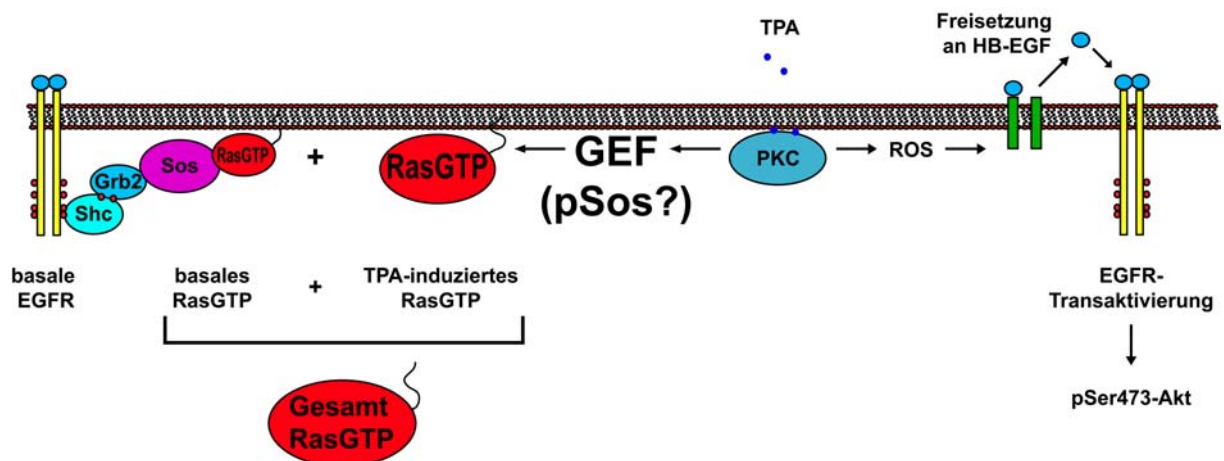
Die Inhibierung der PI3-Kinase durch LY294002 hemmte nicht die TPA-induzierte Ras-Aktivierung, aber führte zur Hemmung der Akt-Phosphorylierung nach Phorbol ester-Stimulation (Abb. 20A). Weiterhin resultierte die Hemmung von PKC und vom EGFR in der kompletten Inhibierung der TPA-induzierten Akt-Phosphorylierung am Serin 473 (Abb. 20B, Daten nicht gezeigt). Diese Resultate demonstrieren, dass die PKC, der EGFR und die PI3-Kinase die TPA-induzierte Serin-Phosphorylierung am Akt vermitteln und stehen somit im Kontrast zu der TPA-induzierten Ras-Aktivierung, die EGFR- und PI3-Kinase unabhängig ist und durch PKC vermittelt wird. Zudem sind diese Beobachtungen insofern interessant, da sie

vermuten lassen, dass eine TPA-induzierte Ras-Aktivierung nicht zur PI3-Kinase-Aktivierung in COS7-Zellen führt, da nach AG1478-Behandlung der Zellen TPA zwar in einer Ras-Aktivierung, aber nicht in einer Serin-Phosphorylierung von Akt resultiert.

Abschließend kann man sagen, dass die Daten dieser Arbeit zwar nicht zur Aufklärung des Mechanismus` der TPA-induzierten Ras-Aktivierung führte, jedoch liefert sie einen sehr wertvollen Beitrag zum Verständnis der EGFR-Transaktivierung und der TPA-induzierten Ras- und Erk-Aktivierung. Die Ergebnisse zeigen, dass eine eingehendere Untersuchung von Signalwegen vonnöten ist, um nicht falschen Schlussfolgerungen aufzuliegen.

TPA führt zwar, wie auch andere Arbeitsgruppen beobachteten, zur EGFR-Aktivierung, jedoch konnten die drei Untersuchungen in Kapitel 4.3., 4.4. und 4.5. belegen, dass der EGFR die TPA-induzierte Ras-Aktivierung nicht vermittelt und der EGFR nur für den Erhalt an basalem RasGTP essentiell ist. Ebenso demonstrieren diese Daten und die aus den Kapiteln 4.6. und 4.7., dass die TPA-induzierten Aktivierungen von EGFR und Ras via PKC verlaufen, es sich hierbei aber um parallele Ereignisse handelt. Diese Daten stehen im Kontrast zum allgemeinen Bild TPA-bedingten EGFR-Transaktivierung, welche daher neu interpretiert werden muss.

In serum-gehungerten COS7-Zellen ist die basale EGFR-Aktivität wichtig für den Erhalt eines konstitutiven RasGEF-Systems, welches für die LPA-induzierte Ras-Aktivierung eine permissive Funktion erfüllt, für die TPA-ausgelöste jedoch nicht essentiell ist. TPA führt via PKC zur Aktivierung einer Ras-Population, die sich von der durch EGF- und LPA-aktivierten unterscheidet. Diese Daten werden dadurch unterstützt, dass dominant negatives N17-Ras nicht die TPA-induzierte, indes die EGF-bedingte Ras- und Erk-Aktivierung in diesen Zellen hemmen kann. Zudem ist die Ras-Aktivierung nach TPA-Behandlung kein Resultat der PKC-abhängigen, MMP-vermittelten EGFR-Transaktivierung. Es handelt sich hier nur um das Zusammentreffen zweier parallel ablaufender Reaktionen. Die EGFR-Transaktivierung führt somit nicht zur Aktivierung des Ras/Erk-Signalweges, dagegen vermittelt diese die Phosphorylierung von Akt am Ser473. Welches Signalprotein außer PKC die Ras-Aktivierung vermittelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden, jedoch scheint phosphoryliertes Sos an dieser Reaktion beteiligt zu sein. In Abbildung 21 sind die Daten dieser Arbeit und der Veröffentlichung von Rennert et al. noch einmal schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung der TPA-induzierten Signaltransduktion zu Ras und dem EGFR in COS7-Zellen.** Wegen der Übersichtlichkeit sind zwei EGFR-Populationen gezeigt. Die eine wird durch TPA via PKC, ROS und Freisetzung an HB-EGF transaktiviert, die andere ist für den Erhalt des basalen RasGTP wichtig. TPA führt daneben via PKC und einen RasGEF (möglicherweise phosphoryliertes Sos) zur Ras-Aktivierung. Basales und TPA-induziertes RasGTP vereinen sich dann zum gemessenen Gesamt-RasGTP. Zudem führt EGFR-Transaktivierung zur Phosphorylierung von Akt am Ser473. Einen Beweis für verschiedene EGFR-Populationen liefert diese Arbeit allerdings nicht. Auch ist nicht bekannt wie TPA zur RasGEF-Aktivierung führt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
2. Humphrey, P.A., et al., *Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(11): p. 4207-11.
3. Jungbluth, A.A., et al., *A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(2): p. 639-44.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Arteaga, C.L., *Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia*. Semin Oncol, 2002. **29**(5 Suppl 14): p. 3-9.
6. Sizeland, A.M. and A.W. Burgess, *Anti-sense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(11): p. 1235-43.
7. Vetter, I.R. and A. Wittinghofer, *The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1299-304.
8. Colicelli, J., *Human RAS superfamily proteins and related GTPases*. Sci STKE, 2004. **2004**(250): p. RE13.
9. Reuther, G.W. and C.J. Der, *The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(2): p. 157-65.
10. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 153-208.
11. Dasso, M., *Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle*. Cell, 2001. **104**(3): p. 321-4.
12. Clarke, P.R. and C. Zhang, *Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle?* Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 366-71.
13. Nakielnny, S. and G. Dreyfuss, *Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus*. Cell, 1999. **99**(7): p. 677-90.
14. Ridley, A.J., *Rho family proteins: coordinating cell responses*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(12): p. 471-7.
15. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
16. Coleman, M.L., C.J. Marshall, and M.F. Olson, *RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 355-66.
17. Olson, M.F., *Gem GTPase: between a ROCK and a hard place*. Curr Biol, 2002. **12**(14): p. R496-8.
18. Valencia, A., et al., *The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids*. Biochemistry, 1991. **30**(19): p. 4637-48.
19. Hall, A., *The cellular functions of small GTP-binding proteins*. Science, 1990. **249**(4969): p. 635-40.
20. Geyer, M. and A. Wittinghofer, *GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(6): p. 786-92.

21. Moss, J. and M. Vaughan, *Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12327-30.
22. Reiss, Y., et al., *Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAAX tetrapeptides*. Cell, 1990. **62**(1): p. 81-8.
23. Boyartchuk, V.L., M.N. Ashby, and J. Rine, *Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1796-800.
24. Kim, E., et al., *Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8383-90.
25. Hrycyna, C.A., et al., *The Saccharomyces cerevisiae STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and RAS proteins*. Embo J, 1991. **10**(7): p. 1699-709.
26. Dai, Q., et al., *Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1998. **273**(24): p. 15030-4.
27. Bartels, D.J., et al., *Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6775-87.
28. Lobo, S., et al., *Identification of a Ras palmitoyltransferase in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41268-73.
29. Choy, E., et al., *Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi*. Cell, 1999. **98**(1): p. 69-80.
30. Apolloni, A., et al., *H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2475-87.
31. Rocks, O., et al., *An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms*. Science, 2005. **307**(5716): p. 1746-52.
32. Roy, M.O., R. Leventis, and J.R. Silvius, *Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B*. Biochemistry, 2000. **39**(28): p. 8298-307.
33. Thissen, J.A., et al., *Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30362-70.
34. Boriack-Sjodin, P.A., et al., *The structural basis of the activation of Ras by Sos*. Nature, 1998. **394**(6691): p. 337-43.
35. Schlichting, I., et al., *Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis*. Nature, 1990. **345**(6273): p. 309-15.
36. Pai, E.F., et al., *Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation*. Nature, 1989. **341**(6239): p. 209-14.
37. Milburn, M.V., et al., *Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins*. Science, 1990. **247**(4945): p. 939-45.
38. Marshall, C.J., *Ras effectors*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(2): p. 197-204.
39. Scheffzek, K., M.R. Ahmadian, and A. Wittinghofer, *GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(7): p. 257-62.
40. Feldkamp, M.M., L. Angelov, and A. Guha, *Neurofibromatosis type 1 peripheral nerve tumors: aberrant activation of the Ras pathway*. Surg Neurol, 1999. **51**(2): p. 211-8.
41. Scheffzek, K., et al., *The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants*. Science, 1997. **277**(5324): p. 333-8.

42. Seabra, M.C. and C. Wasmeier, *Controlling the location and activation of Rab GTPases*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(4): p. 451-7.
43. Dirac-Svejstrup, A.B., T. Sumizawa, and S.R. Pfeffer, *Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI*. *Embo J*, 1997. **16**(3): p. 465-72.
44. Sivars, U., D. Aivazian, and S.R. Pfeffer, *Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes*. *Nature*, 2003. **425**(6960): p. 856-9.
45. Yamashita, T. and M. Tohyama, *The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI*. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(5): p. 461-7.
46. Bos, J.L., J. de Rooij, and K.A. Reedquist, *Rap1 signalling: adhering to new models*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(5): p. 369-77.
47. Urano, T., R. Emkey, and L.A. Feig, *Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation*. *Embo J*, 1996. **15**(4): p. 810-6.
48. White, M.A., et al., *A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(28): p. 16439-42.
49. Rosario, M., H.F. Paterson, and C.J. Marshall, *Activation of the Raf/MAP kinase cascade by the Ras-related protein TC21 is required for the TC21-mediated transformation of NIH 3T3 cells*. *Embo J*, 1999. **18**(5): p. 1270-9.
50. Self, A.J., et al., *Analysis of R-Ras signalling pathways*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 7): p. 1357-66.
51. Patel, P.H., et al., *Drosophila Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 17): p. 3601-10.
52. Stocker, H., et al., *Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(6): p. 559-65.
53. Jeffers, M. and A. Pellicer, *Identification of multiple promoters within the N-ras proto-oncogene*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1219**(3): p. 623-35.
54. Paciucci, R. and A. Pellicer, *Dissection of the mouse N-ras gene upstream regulatory sequences and identification of the promoter and a negative regulatory element*. *Mol Cell Biol*, 1991. **11**(3): p. 1334-43.
55. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. *Cell*, 2005. **120**(5): p. 635-47.
56. Lowy, D.R. and B.M. Willumsen, *Function and regulation of ras*. *Annu Rev Biochem*, 1993. **62**: p. 851-91.
57. Prior, I.A., et al., *GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(4): p. 368-75.
58. Chen, X. and M.D. Resh, *Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(37): p. 34617-23.
59. Johnson, L., et al., *K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras*. *Genes Dev*, 1997. **11**(19): p. 2468-81.
60. Koera, K., et al., *K-ras is essential for the development of the mouse embryo*. *Oncogene*, 1997. **15**(10): p. 1151-9.
61. Umanoff, H., et al., *The murine N-ras gene is not essential for growth and development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(5): p. 1709-13.
62. de Castro, I.P., et al., *Mice deficient for N-ras: impaired antiviral immune response and T-cell function*. *Cancer Res*, 2003. **63**(7): p. 1615-22.
63. Esteban, L.M., et al., *Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(5): p. 1444-52.

64. Nielsen, K.H., et al., *Sensitivity of wild type and mutant ras alleles to Ras specific exchange factors: Identification of factor specific requirements*. *Oncogene*, 2001. **20**(17): p. 2091-100.
65. Farnsworth, C.L., et al., *Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF*. *Nature*, 1995. **376**(6540): p. 524-7.
66. de Hoog, C.L., et al., *Ras binding triggers ubiquitination of the Ras exchange factor Ras-GRF2*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(6): p. 2107-17.
67. Pham, N., et al., *The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP*. *Curr Biol*, 2000. **10**(9): p. 555-8.
68. Boguski, M.S. and F. McCormick, *Proteins regulating Ras and its relatives*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 643-54.
69. Garrett, M.D., et al., *Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(1): p. 10-3.
70. Gawler, D.J., et al., *CaLB: a 43 amino acid calcium-dependent membrane/phospholipid binding domain in p120 Ras GTPase-activating protein*. *Oncogene*, 1995. **10**(5): p. 817-25.
71. Kazlauskas, A., et al., *Binding of GAP to activated PDGF receptors*. *Science*, 1990. **247**(4950): p. 1578-81.
72. Soler, C., L. Beguinot, and G. Carpenter, *Individual epidermal growth factor receptor autophosphorylation sites do not stringently define association motifs for several SH2-containing proteins*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(16): p. 12320-4.
73. Ellis, C., et al., *Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases*. *Nature*, 1990. **343**(6256): p. 377-81.
74. Cooper, J.A. and A. Kashishian, *In vivo binding properties of SH2 domains from GTPase-activating protein and phosphatidylinositol 3-kinase*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(3): p. 1737-45.
75. Cichowski, K. and T. Jacks, *NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 593-604.
76. Donovan, S., K.M. Shannon, and G. Bollag, *GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1602**(1): p. 23-45.
77. Pelicci, G., et al., *A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction*. *Cell*, 1992. **70**(1): p. 93-104.
78. Medema, R.H., et al., *Ras activation by insulin and epidermal growth factor through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21ras*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(1): p. 155-62.
79. Buday, L. and J. Downward, *Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 611-20.
80. Buday, L. and J. Downward, *Epidermal growth factor regulates the exchange rate of guanine nucleotides on p21ras in fibroblasts*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(3): p. 1903-10.
81. Aronheim, A., et al., *Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway*. *Cell*, 1994. **78**(6): p. 949-61.
82. Shields, J.M., et al., *Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'*. *Trends Cell Biol*, 2000. **10**(4): p. 147-54.
83. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(1): p. 11-22.
84. Marais, R. and C.J. Marshall, *Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf*. *Cancer Surv*, 1996. **27**: p. 101-25.
85. Wittinghofer, A. and N. Nassar, *How Ras-related proteins talk to their effectors*. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(12): p. 488-91.



86. Stokoe, D., et al., *Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1463-7.
87. Leever, S.J., H.F. Paterson, and C.J. Marshall, *Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane*. Nature, 1994. **369**(6479): p. 411-4.
88. Hu, C.D., et al., *Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30274-7.
89. Weber, C.K., et al., *Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes*. Oncogene, 2000. **19**(2): p. 169-76.
90. Dumaz, N., Y. Light, and R. Marais, *Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3717-28.
91. Zimmermann, S. and K. Moelling, *Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)*. Science, 1999. **286**(5445): p. 1741-4.
92. Wu, J., et al., *Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate*. Science, 1993. **262**(5136): p. 1065-9.
93. Ory, S., et al., *Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites*. Curr Biol, 2003. **13**(16): p. 1356-64.
94. Dhillon, A.S., et al., *Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3237-46.
95. Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais, *The RAF proteins take centre stage*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(11): p. 875-85.
96. Marais, R., et al., *Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4378-83.
97. Mason, C.S., et al., *Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation*. Embo J, 1999. **18**(8): p. 2137-48.
98. Kyriakis, J.M., et al., *Raf-1 activates MAP kinase-kinase*. Nature, 1992. **358**(6385): p. 417-21.
99. Dent, P., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro*. Science, 1992. **257**(5075): p. 1404-7.
100. Alessi, D.R., et al., *Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1*. Embo J, 1994. **13**(7): p. 1610-9.
101. Jaiswal, R.K., et al., *The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6944-53.
102. Catling, A.D., et al., *Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 30014-21.
103. Kosako, H., et al., *Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation*. Embo J, 1992. **11**(8): p. 2903-8.
104. Gomez, N. and P. Cohen, *Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases*. Nature, 1991. **353**(6340): p. 170-3.
105. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 180-6.
106. Treisman, R., *Regulation of transcription by MAP kinase cascades*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(2): p. 205-15.
107. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways*. J Mol Med, 1996. **74**(10): p. 589-607.

108. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. E131-6.
109. Boutwell, R.K., *The function and mechanism of promoters of carcinogenesis*. CRC Crit Rev Toxicol, 1974. **2**(4): p. 419-43.
110. DiGiovanni, J., et al., *Further genetic analyses of skin tumor promoter susceptibility using inbred and recombinant inbred mice*. Carcinogenesis, 1992. **13**(4): p. 525-31.
111. Ron, D. and M.G. Kazanietz, *New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors*. Faseb J, 1999. **13**(13): p. 1658-76.
112. Newton, A.C., *Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 2): p. 361-71.
113. Mellor, H. and P.J. Parker, *The extended protein kinase C superfamily*. Biochem J, 1998. **332** ( Pt 2): p. 281-92.
114. Newton, A.C., *Regulation of protein kinase C*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 161-7.
115. Dutil, E.M. and A.C. Newton, *Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10697-701.
116. Benes, C.H., et al., *The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain*. Cell, 2005. **121**(2): p. 271-80.
117. Finkenzeller, G., D. Marme, and H. Hug, *Inducible overexpression of human protein kinase C alpha in NIH 3T3 fibroblasts results in growth abnormalities*. Cell Signal, 1992. **4**(2): p. 163-77.
118. Mischak, H., et al., *Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6090-6.
119. Mischak, H., et al., *Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta*. J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20110-5.
120. Sozeri, O., et al., *Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation*. Oncogene, 1992. **7**(11): p. 2259-62.
121. Perletti, G.P., et al., *Protein kinase Cepsilon is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway*. Oncogene, 1998. **16**(25): p. 3345-8.
122. Kolch, W., et al., *Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation*. Nature, 1993. **364**(6434): p. 249-52.
123. Cacace, A.M., et al., *PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase*. Oncogene, 1996. **13**(12): p. 2517-26.
124. Cai, H., et al., *Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(2): p. 732-41.
125. Marais, R., et al., *Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C*. Science, 1998. **280**(5360): p. 109-12.
126. Ebinu, J.O., et al., *RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs*. Science, 1998. **280**(5366): p. 1082-6.
127. Tognon, C.E., et al., *Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 6995-7008.
128. Dower, N.A., et al., *RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 317-21.
129. Ebinu, J.O., et al., *RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3199-203.

130. Zheng, Y., et al., *Phosphorylation of RasGRP3 on threonine 133 provides a mechanistic link between PKC and Ras signaling systems in B cells*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3648-54.
131. Kawasaki, H., et al., *A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13278-83.
132. Crittenden, J.R., et al., *CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 982-6.
133. Clyde-Smith, J., et al., *Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32260-7.
134. Yamashita, S., et al., *CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25488-93.
135. Oh-hora, M., et al., *Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1841-51.
136. Yang, Y., et al., *RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Identification of defective variants of this signaling protein in asthma, mastocytosis, and mast cell leukemia patients and demonstration of the importance of RasGRP4 in mast cell development and function*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25756-74.
137. Li, L., Y. Yang, and R.L. Stevens, *Cloning of rat Ras guanine nucleotide releasing protein 4, and evaluation of its expression in rat mast cells and their bone marrow progenitors*. Mol Immunol, 2002. **38**(16-18): p. 1283-8.
138. Li, L., Y. Yang, and R.L. Stevens, *RasGRP4 regulates the expression of prostaglandin D2 in human and rat mast cell lines*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4725-9.
139. Gordon, J.R. and S.J. Galli, *Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced development of functionally active mast cells in W/W<sup>v</sup> but not Sl/Sld genetically mast cell-deficient mice*. Blood, 1990. **75**(8): p. 1637-45.
140. Downward, J., et al., *Stimulation of p21ras upon T-cell activation*. Nature, 1990. **346**(6286): p. 719-23.
141. Montessuit, C. and A. Thorburn, *Activation of Ras by phorbol esters in cardiac myocytes. Role of guanine nucleotide exchange factors*. FEBS Lett, 1999. **460**(1): p. 57-60.
142. Chiloeches, A., et al., *Regulation of Ras.GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras*. J Biol Chem, 1999. **274**(28): p. 19762-70.
143. Liu, J.F., et al., *FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(4): p. 1174-82.
144. Shu, X., et al., *Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(22): p. 7758-68.
145. Rubio, I. and R. Wetzker, *A permissive function of phosphoinositide 3-kinase in Ras activation mediated by inhibition of GTPase-activating proteins*. Curr Biol, 2000. **10**(19): p. 1225-8.
146. Howe, L.R. and C.J. Marshall, *Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1*. J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 20717-20.
147. Faure, M., T.A. Voyno-Yasenetskaya, and H.R. Bourne, *cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 7851-4.

148. Daub, H., et al., *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors*. Nature, 1996. **379**(6565): p. 557-60.
149. Daub, H., et al., *Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor*. Embo J, 1997. **16**(23): p. 7032-44.
150. Asakura, M., et al., *Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 35-40.
151. Herrlich, A., et al., *Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8985-90.
152. Lee, F.S. and M.V. Chao, *Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3555-60.
153. Linseman, D.A., C.W. Benjamin, and D.A. Jones, *Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12563-8.
154. Peng, H., et al., *Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) pathway mediates activation of the tyrosine hydroxylase gene by angiotensin II, depolarization and protein kinase C*. J Neurochem, 2002. **81**(3): p. 506-24.
155. Prenzel, N., et al., *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF*. Nature, 1999. **402**(6764): p. 884-8.
156. Umata, T., et al., *A dual signaling cascade that regulates the ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30475-82.
157. Izumi, Y., et al., *A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor*. Embo J, 1998. **17**(24): p. 7260-72.
158. Zor, U., et al., *Reactive oxygen species mediate phorbol ester-regulated tyrosine phosphorylation and phospholipase A2 activation: potentiation by vanadate*. Biochem J, 1993. **295 ( Pt 3)**: p. 879-88.
159. Rhee, S.G., et al., *Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation*. Sci STKE, 2000. **2000**(53): p. PE1.
160. Meng, T.C., T. Fukada, and N.K. Tonks, *Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 387-99.
161. van Corven, E.J., et al., *Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(4): p. 1257-61.
162. Luttrell, L.M., et al., *G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31648-56.
163. Andreev, J., et al., *Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20130-5.
164. Rubio, I., et al., *Ras activation in response to lysophosphatidic acid requires a permissive input from the epidermal growth factor receptor*. Biochem J, 2003. **376**(Pt 3): p. 571-6.
165. Lorenzo, P.S., et al., *Phorbol esters modulate the Ras exchange factor RasGRP3*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 943-9.

166. Grosse, R., et al., *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase mediates Ras activation by gonadotropin-releasing hormone*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 12251-60.
167. Tebar, F., A. Llado, and C. Enrich, *Role of calmodulin in the modulation of the MAPK signalling pathway and the transactivation of epidermal growth factor receptor mediated by PKC*. FEBS Lett, 2002. **517**(1-3): p. 206-10.
168. Howe, L.R., et al., *Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf*. Cell, 1992. **71**(2): p. 335-42.
169. Hawes, B.E., et al., *Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17148-53.
170. Palomero, T., et al., *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, 1998. **53**(4): p. 613-22.
171. Ueda, Y., et al., *Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23512-9.
172. Stewart, S. and K.L. Guan, *The dominant negative Ras mutant, N17Ras, can inhibit signaling independently of blocking Ras activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8854-62.
173. Taylor, S.J. and D. Shalloway, *Cell cycle-dependent activation of Ras*. Curr Biol, 1996. **6**(12): p. 1621-7.
174. de Rooij, J. and J.L. Bos, *Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras*. Oncogene, 1997. **14**(5): p. 623-5.
175. Markova, B., et al., *Investigation of protein-tyrosine phosphatases by in-gel assays*. Methods, 2005. **35**(1): p. 22-7.
176. Bivona, T.G., et al., *Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1*. Nature, 2003. **424**(6949): p. 694-8.
177. Pronk, G.J., et al., *Involvement of Shc in insulin- and epidermal growth factor-induced activation of p21ras*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(3): p. 1575-81.
178. Roudabush, F.L., et al., *Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22583-9.
179. Robertson, F.M., et al., *Production of hydrogen peroxide by murine epidermal keratinocytes following treatment with the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. Cancer Res, 1990. **50**(18): p. 6062-7.
180. Stevenson, M.A., et al., *X-irradiation, phorbol esters, and H2O2 stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates*. Cancer Res, 1994. **54**(1): p. 12-5.
181. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
182. Datta, R., et al., *Phorbol ester-induced generation of reactive oxygen species is protein kinase cbeta -dependent and required for SAPK activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41000-3.
183. Bankers-Fulbright, J.L., et al., *Regulation of human eosinophil NADPH oxidase activity: a central role for PKCdelta*. J Cell Physiol, 2001. **189**(3): p. 306-15.
184. Lander, H.M., et al., *p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21195-8.
185. Denu, J.M. and K.G. Tanner, *Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation*. Biochemistry, 1998. **37**(16): p. 5633-42.
186. Toullec, D., et al., *The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C*. J Biol Chem, 1991. **266**(24): p. 15771-81.

187. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.
188. Hers, I., J.M. Tavaré, and R.M. Denton, *The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity*. FEBS Lett, 1999. **460**(3): p. 433-6.
189. Langlois, W.J., et al., *Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25320-3.
190. Waters, S.B., et al., *Desensitization of Ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 20883-6.
191. Waters, S.B., K. Yamauchi, and J.E. Pessin, *Insulin-stimulated disassociation of the SOS-Grb2 complex*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2791-9.
192. Cherniack, A.D., J.K. Klarlund, and M.P. Czech, *Phosphorylation of the Ras nucleotide exchange factor son of sevenless by mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4717-20.
193. Rozakis-Adcock, M., et al., *The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1*. Nature, 1993. **363**(6424): p. 83-5.
194. Corbalan-Garcia, S., et al., *Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5674-82.
195. Gale, N.W., et al., *Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras*. Nature, 1993. **363**(6424): p. 88-92.
196. Burgering, B.M., et al., *cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor*. Embo J, 1993. **12**(11): p. 4211-20.
197. Douville, E. and J. Downward, *EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2*. Oncogene, 1997. **15**(4): p. 373-83.
198. Klarlund, J.K., A.D. Cherniack, and M.P. Czech, *Divergent mechanisms for homologous desensitization of p21ras by insulin and growth factors*. J Biol Chem, 1995. **270**(40): p. 23421-8.
199. Holt, K.H., et al., *Epidermal growth factor receptor targeting prevents uncoupling of the Grb2-SOS complex*. J Biol Chem, 1996. **271**(14): p. 8300-6.
200. Fucini, R.V., S. Okada, and J.E. Pessin, *Insulin-induced desensitization of extracellular signal-regulated kinase activation results from an inhibition of Raf activity independent of Ras activation and dissociation of the Grb2-SOS complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18651-8.
201. Porfiri, E. and F. McCormick, *Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by phosphorylation of the ras exchange factor hSOS1*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5871-7.
202. Buday, L., P.H. Warne, and J. Downward, *Downregulation of the Ras activation pathway by MAP kinase phosphorylation of Sos*. Oncogene, 1995. **11**(7): p. 1327-31.
203. Komander, D., et al., *Interactions of LY333531 and other bisindolyl maleimide inhibitors with PDK1*. Structure (Camb), 2004. **12**(2): p. 215-26.
204. Deak, M., et al., *Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB*. Embo J, 1998. **17**(15): p. 4426-41.
205. Wennstrom, S. and J. Downward, *Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4279-88.
206. Wang, X., et al., *Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14624-31.

207. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. *Curr Biol*, 1997. **7**(4): p. 261-9.
208. Duan, R.D., et al., *Activation of MAP kinase kinase (MEK) and Ras by cholecystokinin in rat pancreatic acini*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(6 Pt 1): p. G1060-5.
209. Li, B., et al., *Catalytic activity of the mouse guanine nucleotide exchanger mSOS is activated by Fyn tyrosine protein kinase and the T-cell antigen receptor in T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(3): p. 1001-5.
210. Ravichandran, K.S., et al., *Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation*. *Science*, 1993. **262**(5135): p. 902-5.
211. Matallanas, D., et al., *Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 4572-81.
212. Chen, N., et al., *Transactivation of the epidermal growth factor receptor is involved in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced signal transduction*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(50): p. 46722-8.
213. Chen, X. and M.D. Resh, *Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49631-7.
214. Emkey, R. and C.R. Kahn, *Cross-talk between phorbol ester-mediated signaling and tyrosine kinase proto-oncogenes. II. Comparison of phorbol ester and sphingomyelinase-induced phosphorylation of ErbB2 and ErbB3*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(49): p. 31182-9.
215. Stewart, J.R. and A. O'Brian C, *Protein kinase C- $\alpha$  mediates epidermal growth factor receptor transactivation in human prostate cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(5): p. 726-32.
216. Piiper, A., et al., *Cholecystokinin stimulates extracellular signal-regulated kinase through activation of the epidermal growth factor receptor, Yes, and protein kinase C. Signal amplification at the level of Raf by activation of protein kinase Cepsilon*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(9): p. 7065-72.
217. Roelle, S., et al., *Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 47307-18.
218. Eguchi, S., et al., *Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(11): p. 7957-62.
219. Brown, G.E., et al., *A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase*. *Mol Cell*, 2003. **11**(1): p. 35-47.
220. Aikawa, R., et al., *Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(7): p. 1813-21.
221. Miranti, C.K., S. Ohno, and J.S. Brugge, *Protein kinase C regulates integrin-induced activation of the extracellular regulated kinase pathway upstream of Shc*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10571-81.
222. Caloca, M.J., et al., *Beta2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(42): p. 26488-96.
223. Herrera, R. and B.D. Shivers, *Expression of alpha 1-chimaerin (rac-1 GAP) alters the cytoskeletal and adhesive properties of fibroblasts*. *J Cell Biochem*, 1994. **56**(4): p. 582-91.

224. Kozma, R., et al., *The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 5069-80.
225. Ehrhardt, A., et al., *Distinct mechanisms determine the patterns of differential activation of H-Ras, N-Ras, K-Ras 4B, and M-Ras by receptors for growth factors or antigen*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(14): p. 6311-23.
226. Rambaratsingh, R.A., et al., *RasGRP1 represents a novel non-protein kinase C phorbol ester signaling pathway in mouse epidermal keratinocytes*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52792-801.
227. Yin, L., N. Bennani-Baiti, and C.T. Powell, *Phorbol ester-induced apoptosis of C4-2 cells requires both a unique and a redundant protein kinase C signaling pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5533-41.
228. Tan, S.L. and P.J. Parker, *Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling*. Biochem J, 2003. **376**(Pt 3): p. 545-52.
229. Lockyer, P.J., S. Kupzig, and P.J. Cullen, *CAPRI regulates Ca(2+)-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway*. Curr Biol, 2001. **11**(12): p. 981-6.
230. Meisenhelder, J., et al., *Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro*. Cell, 1989. **57**(7): p. 1109-22.
231. Nishibe, S., et al., *Increase of the catalytic activity of phospholipase C-gamma 1 by tyrosine phosphorylation*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1253-6.
232. Vega, Q.C., et al., *A site of tyrosine phosphorylation in the C terminus of the epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(1): p. 128-35.
233. Taylor, S.J., et al., *Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins*. Nature, 1991. **350**(6318): p. 516-8.
234. Benard, O., Z. Naor, and R. Seger, *Role of dynamin, Src, and Ras in the protein kinase C-mediated activation of ERK by gonadotropin-releasing hormone*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4554-63.
235. Della Rocca, G.J., et al., *Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19125-32.
236. Sini, P., et al., *Abl-dependent tyrosine phosphorylation of Sos-1 mediates growth-factor-induced Rac activation*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(3): p. 268-74.
237. Tu, L.C., et al., *Protein kinase C-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase requires cytoskeletal integrity and is uncoupled to mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells*. J Biomed Sci, 2001. **8**(2): p. 184-90.
238. Yamamoto, T., et al., *H(2)O(2)-induced tyrosine phosphorylation of protein kinase cdelta by a mechanism independent of inhibition of protein-tyrosine phosphatase in CHO and COS-7 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(3): p. 960-6.
239. Konishi, H., et al., *Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H2O2-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6587-92.
240. Konishi, H., et al., *Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H2O2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11233-7.
241. Alessi, D.R., et al., *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase I (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro*. Curr Biol, 1998. **8**(2): p. 69-81.
242. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.



243. Rubio, I., et al., *Ras activation revisited*. *Signal Transduction*, 2001.: p. 11–24
244. Augsten, M., et al., *Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane*  
EMBO reports, submitted
245. Rennert, K., et al., *Ras activation in response to phorbol ester proceeds independently of the EGFR via an unconventional nucleotide exchange factor system in COS-7 cells*  
In preparation, planned to be published in *Journal of Biological Chemistry*

## II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CalDAG-GEFI	<i>Calcium-Diacylglycerol-guanine nucleotide exchange factor I</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
CPM	<i>Counts per minute</i>
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	1, 2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Erk	<i>Extracellular regulated kinase</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GSH	Glutathion
GSK-3	Glycogensynthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GST-Raf1-RBD	Glutathion-S-Transferase-Raf1-Ras-Bindedomäne
GTP	Guanosintri-phosphat
GTPase	Guanosintri-phosphatase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

## II. Abkürzungsverzeichnis

---

IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
KCM	Kalium-Calcium-Magnesium (Puffer-Mix)
kDa	Kilo-Dalton
MARCKS	<i>Myristoylated alanin rich C-kinase substrate</i>
MEK	MAP/Erk-kinase
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDK-1	<i>3-Phosphoinositide dependent protein kinase 1</i>
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RACK	<i>Receptor for activated C kinase</i>
RalGDS	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>Sodium (Na<sup>+</sup>) dodecylsulfate</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
Sos	<i>Son of sevenless</i>
STICK	<i>Substrates that interact with C kinase</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline + Tween 20</i>
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat

### **III. Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre,

... dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

... dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität Jena bekannt ist.

... dass ich weder die vorliegende Doktorarbeit noch Teile dieser für eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Jena, den 15.9.2005

Knut Rennert

## **IV. Danksagungen**

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für ihre Unterstützung, Kritik und Hilfe bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. I. Rubio für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und bei Rico Pusch und Ute Wittig für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Freunden und Kollegen Cornelius und Anja Fritsch, Dirk Schmidt-Arras und Sandy Mosig für nicht-endende stimulierende wissenschaftliche Gespräche und andere Arten der Sichtweise.

Ferner danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“, die mich immerwährend in meiner Arbeit unterstützt haben. Das sehr gute Arbeitsklima in dieser Arbeitsgruppe war zudem sehr wichtig für das Gelingen dieser Arbeit.

Ich danke ebenso Prof. Dr. Reinhard Wetzker, Prof. Dr. Claus Liebmann und Prof. Dr. Bernd Nürnberg, die sich bereit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden, die nicht müde wurden, sich meine Probleme anzuhören und konstruktive Kritik zu üben.

## V. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

Name	Rennert
Vorname	Knut
Geburtsdatum:	22.11.1976
Geburtsort:	Berlin

### Schulische Ausbildung

---

1983-1985	POS „Martin Weise“, Berlin-Lichtenberg
1985-1991	POS „Hans und Hilde Coppi“, Berlin-Lichtenberg
1991-1996	Gymnasium „Hans und Hilde Coppi“, Berlin-Lichtenberg

### Akademische Laufbahn

---

1996-2001	Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Diplom mit „gut“ (1,9)
2001	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“, Medizinische Fakultät der FSU-Jena unter Betreuung von Dr. I. Rubio Thema der Diplomarbeit: „Aktivierung des Signalproteins Ras durch den Phorbolster 12-O-Tetradecanoyl-13-Acetat (TPA)“
2001 bis 2005	Promotion in der Forschungsgruppe „Molekulare Zellbiologie“, Medizinische Fakultät der FSU Jena unter Betreuung von Prof. Dr. R. Wetzker und Dr. I. Rubio Titel der Promotion: „Der Mechanismus der Phorbolster-induzierten Ras-Aktivierung in COS7-Zellen“

## VI. Publikationen

Rubio I, **Rennert K**, Wittig U, Wetzker R.

*Ras activation in response to lysophosphatidic acid requires a permissive input from the epidermal growth factor receptor.*

Biochem J. 2003 Dec 15;376(Pt 3):571-6.

Augsten M<sup>1</sup>, Pusch R<sup>1</sup>, Biskup C, **Rennert K**, Wittig U, Beyer K, Blume A, Wetzker R, Friedrich KH, Rubio I

*Live-cell imaging of endogenous Ras-GTP illustrates predominant Ras activation at the plasma membrane*

EMBO reports, submitted

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

**Rennert K**, Wittig U, Wetzker R and Rubio I

*Ras activation in response to phorbol ester proceeds independently of the EGFR via an unconventional nucleotide exchange factor system in COS-7 cells*

In preparation, planned to be published in Journal of Biological Chemistry

## Posterpräsentationen

**Rennert K**, Rubio I, Wetzker R

Unconventional Ras activation induced by phorbol ester

FEBS Lecture Course on Cellular Signaling and 4<sup>th</sup> Dubrovnik Signaling Conference 2004

**Rennert K**, Rubio I, Wetzker R

A cell- free assay to study Ras-activation

6<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) 2002