

**Neue Aspekte der mitogenen Signaltransduktion des M<sub>2</sub>  
muscarinischen Acetylcholin Rezeptors**

**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 Diplom-Biochemiker Jörg Stirnweiß  
geboren am 20.10.1973 in Sonneberg**

**Gutachter**

- 1. Prof. Dr. Claus Liebmann**
- 2. Prof. Dr. Frank D. Böhmer**
- 3. Prof. Dr. Stefan Offermanns**

**Tag des Rigorosums: 22.09.2005**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.10.2005**

## Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen .....	1
1.1.1. Der EGFR (epidermal growth factor receptor) Signalweg.....	2
1.2. Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	4
1.2.1. Mitogene Signalwege von GPCRs .....	5
1.2.2. Die Regulation der ERK1/2-Aktivität durch G $\alpha$ s-Proteine.....	6
1.2.3. Die Regulation der ERK1/2-Aktivität durch G $\alpha$ i-Proteine .....	6
1.2.4. Die Regulation der ERK1/2-Aktivität durch G $\alpha$ q-Proteine.....	7
1.2.5. $\beta\gamma$ -Komplexe bei der GPCR-vermittelten ERK-Aktivierung.....	8
1.2.6. Der Mechanismus der Transaktivierung von RTKs als Signalintegrationspunkt der GPCR induzierten ERK-Aktivierung.....	9
1.3. Klassifikation und biologische Funktionen muscarinischer Acetylcholin Rezeptoren (mAChR).....	11
1.3.1. Mitogene Signalwege Gq-Protein gekoppelter muscarinischer Acetylcholin Rezeptoren.....	13
1.3.2. Mitogene Signalwege Gi-Protein gekoppelter muscarinischer Acetylcholin Rezeptoren.....	15
1.4. GPCRs als Teile komplexer zellulärer Signalnetzwerke .....	16
1.5. Ziel der Arbeit.....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1. Materialien.....	19
2.1.1. Zelllinien.....	19
2.1.2. Medien und Chemikalien für Zellkultur und Transfektion.....	19
2.1.3. Reagenzien für Stimulation und Lyse der Zellen.....	20

2.1.4. Bakterienstamm und Medien für bakterielle Kultivierung, Transformation und Herstellung kompetenter Zellen.....	20
2.1.5. Antikörper.....	20
2.1.6. Plasmide und Vektoren.....	21
2.1.7. Weitere Reagenzien, Chemikalien und Geräte.....	22
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Transfektionsmethoden.....	23
2.2.1.1. DEAE-Dextran Transfektion.....	23
2.2.1.2. Polyplus-Transfektion.....	24
2.2.1.3. Lipofectamine 2000 Transfektion.....	24
2.2.1.4. Stabile Transfektion von COS-7 Zellen.....	25
2.2.2. Herstellung von Zelllysaten.....	25
2.2.3. Immunpräzipitation.....	25
2.2.4. SDS-PAGE und Immunoblotting.....	26
2.2.5. MAP-Kinase Assay.....	28
2.2.6. Radioligand-Bindungsmessung.....	28
2.2.7. Proliferationstest/ [ <sup>3</sup> H]-Thymidin Einbau.....	29
2.2.8. Herstellung kompetenter Zellen, Transformation von E. coli Zellen und Isolation von Plasmid-DNA.....	29
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1. Expression des M <sub>2</sub> muscarinischen Acetylcholin Rezeptors in COS-7 Zellen....	31
3.1.1. Nachweis des in COS-7 Zellen transient exprimierten M <sub>2</sub> -Rezeptors mittels Radioligand-Bindungsmessung.....	33
3.2. Die MAPK-Aktivierung in M <sub>2</sub> -Rezeptor transfizierten COS-7 Zellen.....	34
3.2.1. Signalproteine der M <sub>2</sub> -Rezeptor induzierten MAPK-Aktivierung.....	36
3.3. Die M <sub>2</sub> R-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B/ Akt.....	39
3.4. Der M <sub>2</sub> -Rezeptor vermittelt die Transaktivierung des EGFR.....	41
3.4.1. Die M <sub>2</sub> R-vermittelte Transaktivierung des EGFR ist Ligand-unabhängig....	43
3.4.2. Der M <sub>2</sub> R-Signalweg ist unabhängig von der Phosphorylierung des EGFR am Src-spezifischen Tyrosin-Rest 845.....	44
3.4.3. Die Transaktivierung des EGFR über den M <sub>2</sub> R resultiert nicht in eine Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ -1.....	47

3.5. Die Rolle von cytoplasmatischen Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie im mitogenen Signalweg des M <sub>2</sub> -Rezeptors.....	49
3.5.1. Die M <sub>2</sub> R-vermittelte ERK- und PKB/Akt-Aktivierung in c-Src, Yes und Fyn defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten (SYF-Zellen).....	50
3.5.2. Der M <sub>2</sub> -Rezeptor induziert die Interaktion zwischen Fyn und EGFR.....	52
3.6. Der M <sub>2</sub> -Rezeptor als Teil von Signaltransduktions-Netzwerken .....	54
3.6.1. Die MAPK-Aktivierung nach Ko-Stimulation des M <sub>2</sub> R mit verschiedenen Gq- Protein gekoppelten Rezeptoren .....	54
3.6.2. Einfluss der Ko-Stimulation des M <sub>2</sub> -Rezeptors und des EGFR auf die MAPK- und PKB/Akt-Aktivierung.....	55
3.6.3. MAPK- und Akt-Aktivierung nach Ko-Stimulation von M <sub>2</sub> -Rezeptor und β <sub>2</sub> -adrenergem Rezeptor.....	57
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>60</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>77</b>
<b>Anhang</b>	

## 1. Einleitung

Rezeptoren ermöglichen den Zellen externe Signale zu empfangen und diese entsprechend weiter zu leiten, d.h. sie verknüpfen die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen mit der intrazellulären Signalverarbeitung. Nach Aktivierung des Rezeptors durch Bindung extrazellulärer Signalmoleküle (z.B.: Proteine, niedermolekulare Botenstoffe) bzw. durch Umsetzung sensorischer Reize (Licht) wird das Signal auf zelluläre Proteine (Enzyme, verschiedene Adaptorproteine) übertragen. Am Ende solcher Signalketten stehen der Zellkern oder andere Kompartimente (endoplasmatisches Retikulum, Cytoskelett, Mitochondrien) und damit die Regulation zellulärer Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung, Bewegung, Zelladhäsion, Apoptose usw..

Sowohl Rezeptor-Tyrosinkinasen **RTKs** (Gruppe der Rezeptoren mit enzymatischer Aktivität) als auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren **GPCRs** (Gruppe der Sieben-Transmembranrezeptoren) sind wichtige Vertreter der membranständigen Rezeptoren. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass GPCRs ähnlich wie Rezeptor-Tyrosinkinasen in der Lage sind, die MAPK/ ERK (mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase) Kaskade zu aktivieren und somit die Zellproliferation zu stimulieren. Häufig interagieren verschiedene Proteine der einzelnen GPCR-bzw. RTK-Signalwege, und es entstehen komplexe Netzwerke mit dem Ergebnis einer Signalverstärkung oder Abschwächung. Diese multiplen Interaktionen bei der Regulation der MAPK-Aktivität sind sowohl in physiologische als auch pathophysiologische Prozesse involviert.

### 1.1. Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Viele Mitogenitätsfaktoren wie EGF, PDGF, FGF oder Insulin sind Liganden von RTKs. Durch die Ligandbindung und damit Aktivierung kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors. Monomere Polypeptide, wie EGF, „dimerisieren“ den Rezeptor in dem sie im Verhältnis 1:1 mit den Untereinheiten interagieren. Im Gegensatz dazu liegen die verschiedenen PDGFs als Dimere vor und können gleichzeitig mit zwei Rezeptor-Monomeren wechselwirken (Liebmann und Böhmer, 2000). Die Rezeptoren der Insulinrezeptor-Familie liegen bereits ohne Interaktion mit dem Liganden als Disulfidbrücken verknüpfte Heterodimere vor. Durch Bindung von Insulin bzw. IGF kommt es zur Anschaltung des entsprechenden Signalweges über das bereits gebildete Dimer (Blakesley *et al.*, 1996).

### 1.1.1. Der EGFR (epidermal growth factor receptor) Signalweg

Der EGFR (auch bezeichnet als HER1/ErbB1) ist ein typischer Vertreter der Rezeptor-Tyrosinkinase und gehört zu den vier Mitgliedern der ErbB Familie (Olayioye *et al.*, 2000). Neureguline sind Liganden, die an HER3/ErbB3 und HER4/ErbB4 Rezeptoren binden und diese aktivieren. HB-EGF (heparin binding EGF-like growth factor) und Epregrulin interagieren mit dem EGFR und HER4 (Hynes und Lane, 2005). EGF (epidermal growth factor), Amphiregulin, TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) und Betacellulin sind Bindungspartner des EGFR (Fischer *et al.*, 2003, Prenzel *et al.*, 2001).

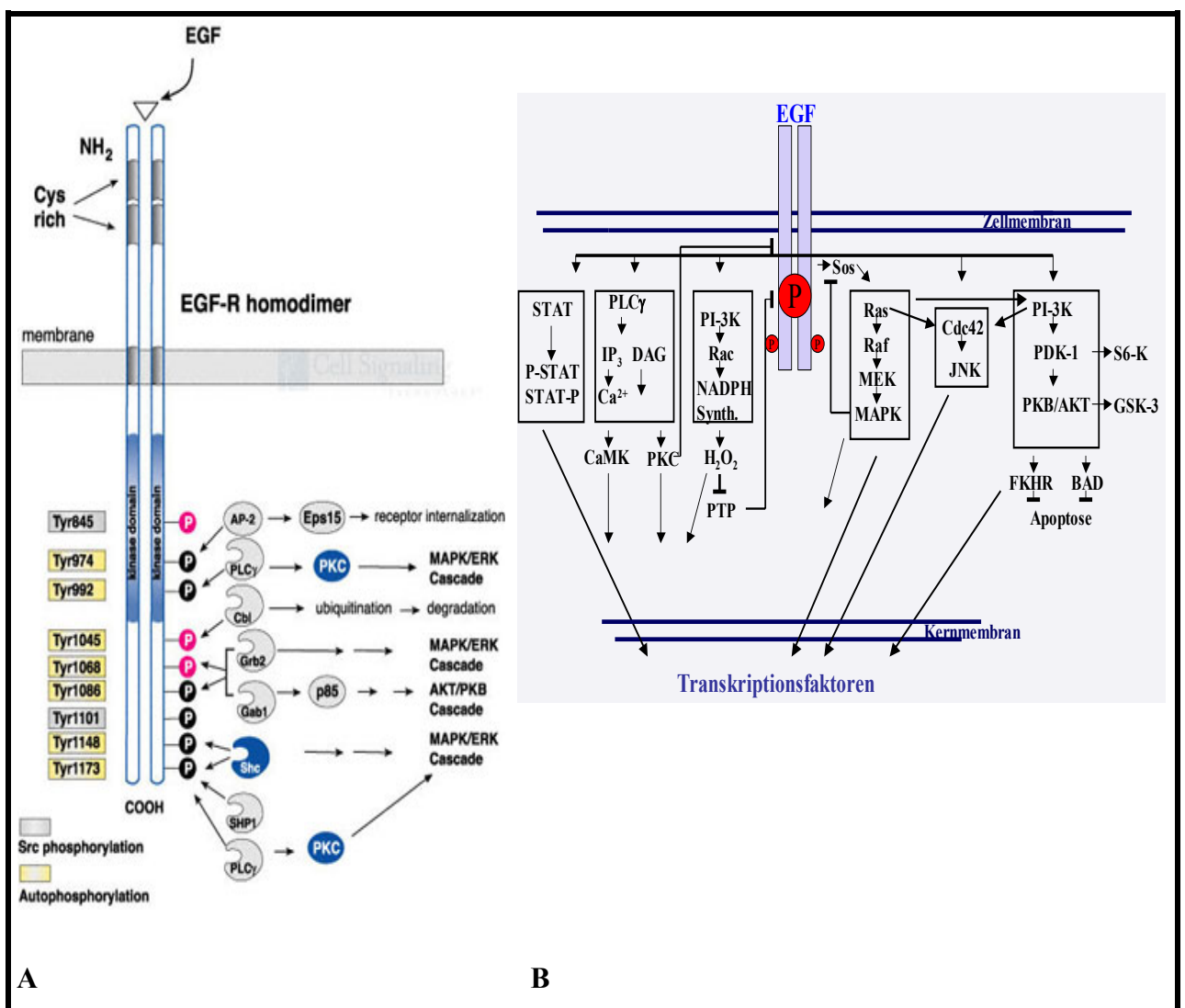


Abb.1.1. A Src- und Auto-Tyrosinphosphorylierungsstellen des aktiven EGFR mit den entsprechenden Adaptorproteinen und Enzymen (Cell Signaling Katalog, 2004) B Signalwege des EGFR (modifiziert nach Schlessinger, 2000)

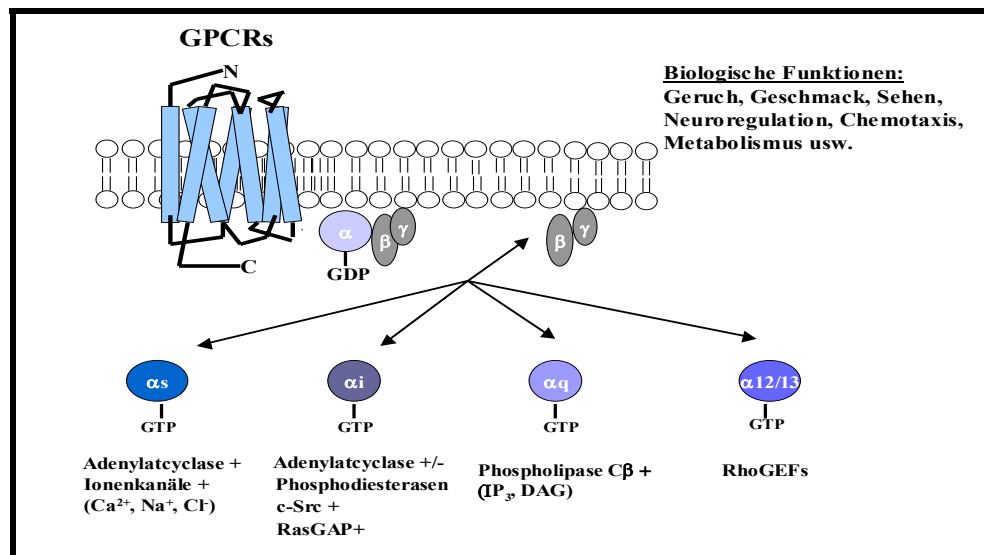
Das 170kDa EGF-Rezeptor Monomer besteht aus einer extrazellulären Ligand-Bindedomäne, einer einzelnen hydrophoben transmembranalen Region und einer cytoplasmatischen Protein-Tyrosinkinase Domäne mit weiteren regulatorischen Sequenzabschnitten. Die Ligandbindung führt zur Dimerisierung und nachfolgend zur Trans-Autophosphorylierung zweier Rezeptormoleküle. Die entstandenen phosphorylierten Tyrosinreste sind Ausgangspunkt verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden (*Abb. 1.1.A*). Nachgeschaltete Effektormoleküle (Enzyme oder kleine Adaptorproteine) binden über SH2 (src homology 2)- bzw. PTB-Domänen an die entstandenen Phosphotyrosine. Die **MAPK-Kaskade** kann über Grb2 (oder indirekt über Shc) aktiviert werden. Der aktivierte transphosphorylierte Rezeptor bildet einen Komplex mit Grb2 und dem Guaninnukleotid –Austauschfaktor Sos für die kleine GTPase Ras. Das aktive GTP beladene Ras bindet über einen Farnesyl-Anker an die Zellmembran und besitzt eine starke Affinität für Raf (MAPK kinase kinase). Das aktive Raf phosphoryliert MEK (MAP/ERK-kinase) an zwei Serin-Resten. Diese dualspezifische Kinase aktiviert die MAPK über Phosphorylierung an einem Threonin- und einem Tyrosin-Rest. In der Folge transloziert diese in den Nukleus und es kommt zur Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren wie c-Myk oder Elk-1 (involviert in Zellteilung und DNA-Replikation) bzw. auch zur Phosphorylierung anderer Signalmoleküle („upstream“) z.B. Sos (Schlessinger, 2000, *Abb. 1.1.B*). Auch die Ras unabhängige **Bmk1** (Big MAP kinase 1 = ERK5) wird über den EGFR stimuliert (Kato *et al.*, 1998). Die Phospholipase C $\gamma$  kann über SH2-Domänen mit dem aktiven EGF-Rezeptor interagieren (Rotin *et al.*, 1992). Die aktivierte Tyrosin phosphorylierte **PLC $\gamma$**  hydrolysiert Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>). Dabei entsteht Diacylglycerol (DAG: Proteinkinase C (PKC) Aktivierung) und Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP<sub>3</sub>: intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung). Die **PKC** selbst kann den Rezeptor an einem Threonin-Rest (Juxtamembran-Domäne) phosphorylieren. Dies führt zu einer Inhibierung der Tyrosinkinase-Aktivität und zur starken Verminderung der EGF-Bindung an die extrazelluläre Domäne des EGFR (Cochet *et al.*, 1984). Verschiedene Klasse I Phosphoinositid 3`-kinase (**PI3-K**)- Isoformen können direkt über ihre regulatorische Untereinheit (p85), die SH2-Domänen enthält oder indirekt über das Adaptorprotein Gab1 an Phosphotyrosine des aktivierten EGFR binden. Über die Lipidkinase-Funktion der PI3-K entsteht Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) bzw. das Abbauprodukt PI(3,4)P<sub>2</sub>. Diese Lipid-Intermediate aktivieren Enzyme mit einer PH-Domäne (pleckstrin homology) wie z.B. die Phosphoinositid abhängige Kinase 1 (PDK-1) und die Proteinkinase B (PKB), die in die Regulation von Zellbewegung, Metabolismus, Proliferation und Apoptose involviert sind (Schlessinger, 2000, *Abb. 1.1.B*). Protein-Tyrosin-Phosphatasen **PTPs** (z.B. SHP-1) sind



bedeutend für die Kontrolle der Kinase-Aktivität des EGFR (Keilhack *et al.*, 1998; Wetzker und Böhmer, 2003). Durch die Dephosphorylierung regulatorischer Tyrosinreste des EGFR kommt es zur Abschaltung der entsprechenden Signalwege. Die EGF induzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors, da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die PTPs oxidiert und damit inaktiviert (Bea *et al.*, 1997). **STATs** und **JNK** sind weitere Signalmoleküle, die über den EGF-Rezeptor aktiviert werden können (Schlessinger, 2000). Die Degradation des EGFR im Proteasom erfolgt nach Polyubiquitinylierung des Rezeptors durch die Ubiquitin-Protein Ligase **c-Cbl** (Huang *et al.*, 2005). Die Endocytose des aktivierten EGF-Rezeptors wird durch die Interaktion mit den Clathrin-Adaptorproteinen **AP-2** und **Eps15** reguliert (Sorkina *et al.*, 1999). Neben den EGFR-Autophosphorylierungsstellen existieren auch Tyrosinreste, die durch cytoplasmatische PTKs (Protein-Tyrosinkinase) phosphoryliert werden. PTKs wie **c-Src** sind dadurch in der Lage, mitogene EGFR-Signalwege zu modulieren (Tice *et al.*, 1999, Biscardi *et al.*, 1999) (*Abb.1.1. A*).

## 1.2. Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Bisher sind über 1000 Mitglieder der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (etwa 1-2% des humanen Genom) bekannt, die eine Vielzahl extrazellulärer Signale übertragen. Zum Ligandenspektrum dieser Sieben-Transmembranrezeptoren gehören biogene Amine, Nucleoside, Eicosanoide, Lipide bzw. Lipidbestandteile, Hormone (Peptide und Glycoproteine), Proteasen und Neurotransmitter (Ji *et al.*, 1998). Die Liganden interagieren mit unterschiedlichen Teilen des Rezeptors (z.B.: N-Terminus, extrazelluläre Schleifen oder transmembranaler Kern des Rezeptors (Bourne, 1997)) und vermitteln so physiologische Funktionen wie Geruchs- und Geschmackssinn, Neurotransmission, Regulation exo- und endokriner Drüsen, Muskelkontraktion und Blutdruckregulation, aber auch die Regulation mitogener zellulärer Prozesse (MAPK-Kaskade) wird von GPCRs entscheidend beeinflusst (Gutkind, 1998, van Biesen *et al.*, 1996). Nach Ligandbindung koppelt der Rezeptor an multiple Subtypen heterotrimerer G-Proteine, die aus einer  $\alpha$ -Untereinheit (besitzt Guanin-Nucleotid Bindestelle und GTPase Aktivität) sowie einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit, die ein Dimer bilden, bestehen. Im inaktiven GDP gebundenem Zustand sind  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit assoziiert. Nach Aktivierung kommt es zum Austausch von GDP zu GTP, damit zur Dissoziation des Trimers in  $\alpha$ -Untereinheit und  $\beta\gamma$ -Komplex, die beide an der Regulation verschiedener nachgeschalteter Effektormoleküle beteiligt sind (*Abb.1.2.*).



**Abb.1.2.**  
**Klassifikation**  
**und Funktion**  
**von**  
**heterotrimeren**  
**G- Proteinen,**  
Diversität der  
Signal-  
transduktion  
von GPCRs  
(modifiziert  
nach Liebmann,  
2004, Gutkind,  
1998)

Bisher wurden 18 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten, die in Abhängigkeit von ihrer Funktion bzw. ihrer „downstream“ Signalwege in vier Subfamilien  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  und  $G_{12/13}$  eingeteilt werden, 5  $\beta$ - und 12  $\gamma$ -Untereinheiten identifiziert (Liebmann, 2004).

### 1.2.1. Mitogene Signalwege von GPCRs

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass GPCRs nicht nur die Regulation metabolischer und neuronaler Prozesse vermitteln sondern auch an der Kontrolle von Zellproliferation und –differenzierung beteiligt sind, deren Disregulation letztendlich die Tumorgenese entscheidend beeinflusst (Luttrell, 2003). In vielen Fällen werden diese Effekte von GPCRs durch die Regulation von MAPK-Kaskaden gesteuert (Pierce *et al.*, 2001). Die Familie der MAPK der Mammalier besteht aus drei Subfamilien: die **ERK**-Familie (extracellular signal-regulated kinases), die vor allem in die Regulation und Promotion des Zellzyklus involviert ist, die **JNK/ SAPK**- (Jun amino-terminal kinases/ stress-activated kinases) und die **p38 MAPK**-Familie, die Wachstumsarrest, Apoptose und Immunantwort kontrollieren (Pearson *et al.*, 2001). Zu den am besten untersuchten Mechanismen gehört die Aktivierung der p44/p42-MAPK Isoformen (**ERK1/2**) durch GPCRs, die in den folgenden Abschnitten näher charakterisiert wird. Der „cross talk“ mit RTKs, die Aktivierung cytoplasmatischer Protein-Tyrosinkinasen wie c-Src, Proteinkinase C Isoformen, das cAMP/Proteinkinase A-System oder auch verschiedene PI-3K Isoformen sind wichtige Modulatoren der Signalwege von GPCRs zur MAPK (Abb.1.3.). Der Rezeptortyp, das koppelnde G Protein bzw. G Proteine und nicht zuletzt der bei den Studien verwendete Zelltyp beeinflussen dabei den Signaltransduktionsmechanismus (Liebmann, 2001).

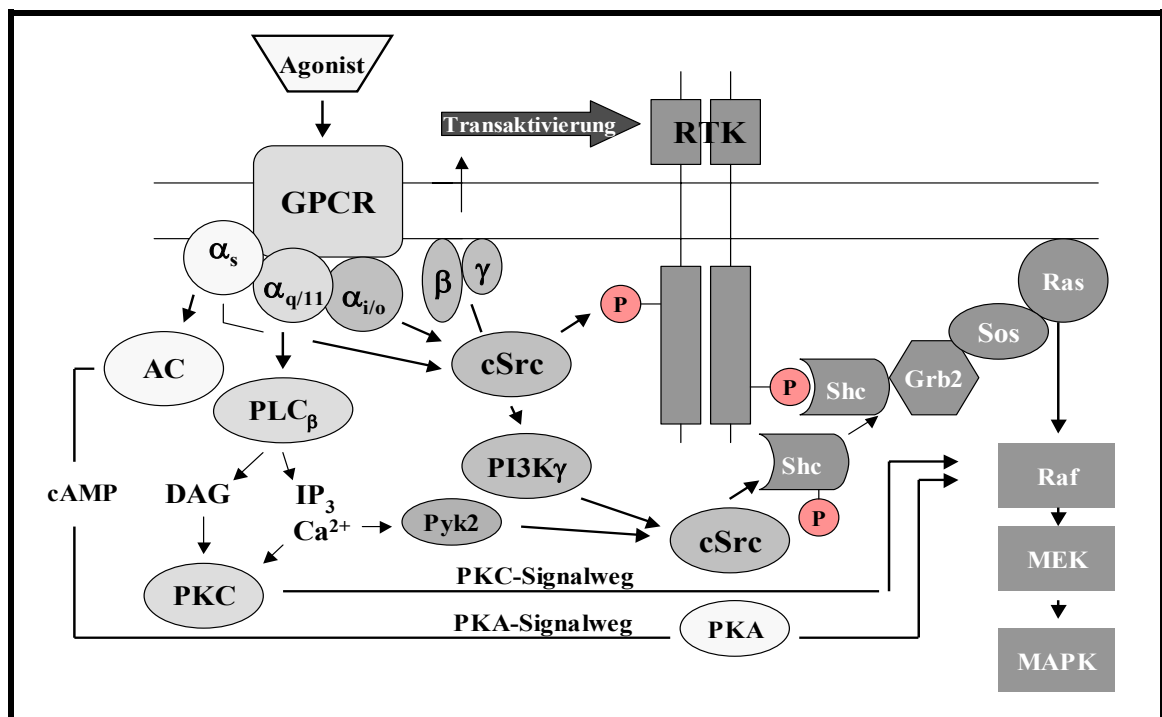
### 1.2.2. Die Regulation der ERK1/2-Aktivität durch G $\alpha$ s-Proteine

Gs-Protein gekoppelte Rezeptoren können die MAPK-Aktivität durch Stimulation der Adenylatzyklase, die Freisetzung von cAMP und die daraus resultierende Aktivierung der PKA zellspezifisch sowohl stimulieren als auch inhibieren. In vielen Zelltypen phosphoryliert die PKA die ubiquitär vorkommende MAPK kinase kinase Raf-1 an verschiedenen Serin-Resten. Dies führt zu einer verringerten Affinität von Raf zu Ras und somit zur Hemmung der MAPK-Kaskade (Häfner *et al.*, 1994). In einigen neuronalen und hämatopoetischen Zellen kommt es nach Aktivierung von Gs zur PKA abhängigen Phosphorylierung der kleinen GTPase Rap-1 und zur Stimulation von B-Raf (Grewal *et al.*, 2000, Vossler *et al.*, 1997). Rap-1 kann auch durch die Bindung von cAMP an dessen GEF Epac direkt aktiviert werden (DeRoos *et al.*, 1998). Bei diesem Signalweg sind „downstream“ der PKA auch cytoplasmatische Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie involviert (Schmitt und Stork, 2002). Die PKA abhängige Phosphorylierung bestimmter Gs-Protein gekoppelter Rezeptoren wie des  $\beta_2$  adrenergen Rezeptors (Daaka *et al.*, 1997) oder des Prostacyclin-Rezeptors (Lawler *et al.*, 2001) verringert deren Kopplung an Gs- und führt zur verstärkten Kopplung von Gi-Proteinen. Dies resultiert in eine Ras-abhängige Aktivierung der MAPK-Kaskade, die durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine vermittelt wird. Dieser Mechanismus wurde für Gs-Protein gekoppelte Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (Lefkowitz *et al.*, 2002). Die direkte Stimulation von Src durch Gs-Proteine könnte über die Transaktivierung des EGFR zur Aktivierung der MAPK führen (Ma *et al.*, 2000).

### 1.2.3. Die Regulation der ERK1/2-Aktivität durch G $\alpha$ i-Proteine

Eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli wird durch die Pertussistoxin- (induziert die ADP-Ribosylierung von  $\alpha_i$  und inhibiert die Aktivierung durch den Rezeptor) sensitive Familie der Gi/o-Proteine vermittelt. Die Modulation der MAPK durch Gi-Aktivierung wird dabei vielfach durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten bzw. eine Inhibierung des cAMP/PKA-Systems vermittelt (Luttrell, 2003). Die PTX sensitive Aktivierung von ERK1/2 über den LPA (lysophosphatidic acid)- bzw.  $\alpha$ -Thrombin-Rezeptor erfolgt durch die Stimulation von Ras und Raf-1 (van Corven *et al.*, 1993, Howe *et al.*, 1993). Der in Rat-1 Fibroblasten exprimierte Gi $_2$ /Gi $_3$ -Protein gekoppelte  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptor stimuliert die MAPK-Aktivität ebenfalls über einen Ras-abhängigen Mechanismus (Alblas *et al.*, 1993). In einigen Zelllinien konnte die direkte

Beteiligung von  $G\alpha_o$ -Untereinheiten an der GPCR vermittelten ERK Aktivierung nachgewiesen werden. In CHO- (chinese hamster ovary) Zellen, die sowohl  $G\alpha_o$ - als auch  $G\alpha_{i2}$ -Proteine exprimieren, ist die PTX-sensitive MAPK-Stimulation über den LPA-Rezeptor nach Expression einer PTX-insensitiven Mutante von  $G\alpha_o$  wieder detektierbar. Die Überexpression einer  $G\alpha_{i2}$ -Mutante zeigt diesen Effekt nicht. Dieser Mechanismus ist Ras-unabhängig, kann allerdings durch die Verwendung von PKC-Inhibitoren moduliert werden (van Biesen *et al.*, 1996b).



**Abb.1.3. Vereinfachtes Modell der Aktivierung der ERK/MAPK-Kaskade durch GPCRs.** Durch die Stimulation des Rezeptors werden verschiedene heterotrimer G-Proteine aktiviert, welche die ERK-Aktivität modulieren. Die Signale werden durch „second messenger“-abhängige Proteinkinasen wie PKA oder PKC und den „cross talk“ zwischen GPCRs und RTKs übertragen. Ein wichtiger Signalintegrationspunkt ist die MAPK kinase kinase Raf. Die einzelnen Signalwege sind vom Rezeptor- und Zelltyp abhängig. (modifiziert nach Liebmann 2001, Luttrell 2003)

#### 1.2.4. Die Regulation der ERK1/2-Aktivität durch $G\alpha_q$ -Proteine

Die Familie der  $G_{q/11}$ -Proteine kann unterschiedliche  $PLC\beta$ -Isoformen stimulieren. Dies führt über die Freisetzung verschiedener Lipid-Intermediate bzw. über die  $IP_3$ -Freisetzung und die Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels zur  $PKC$ -Aktivierung und nachfolgend zur Stimulation von ERK1/2. Raf-1 kann durch die  $PKC\alpha$  direkt phosphoryliert und damit aktiviert werden (Kolch *et al.*, 1993). In Fibroblasten erfolgt die über den  $G_{q/11}$ -Protein gekoppelten  $\alpha_1B$  adrenergen Rezeptor vermittelte ERK-Stimulation über einen Raf-

abhängigen, Ras-unabhängigen Mechanismus, der durch PKC-„Down“-Regulation und durch die Überexpression der PLC $\beta$ 2 reguliert werden kann (Faure *et al.*, 1994, Hawes *et al.*, 1995). In vielen Fällen hat die Hemmung der PKC keinen Einfluss auf die Gq-vermittelte MAPK-Aktivierung (Crespo *et al.*, 1994, Daub *et al.*, 1997).  $\beta\gamma$ -Komplexe und RTKs sind Mediatoren PKC-unabhängiger ERK-Aktivierungswege von Gq-Protein gekoppelten Rezeptoren. In Beispiel hierfür ist die Transaktivierung des PDGF-B Rezeptors über den Gq-Protein gekoppelten Angiotensin AT1a-Rezeptor in Blutgefäßzellen (Linsemann *et al.*, 1995, Heeneman *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu ist die Transaktivierung des EGFR in HEK293-Zellen durch den M1 muscarinischen Acetylcholin Rezeptor PKC-abhängig (Tsai *et al.*, 1997). In Zellen, die den Gq-Protein gekoppelten Bradykinin B2 Rezeptor überexprimieren, sind sowohl PKC als auch EGFR für die Bradykinin induzierte MAPK-Stimulation notwendig (Adomeit *et al.*, 1999). In einigen neuronalen Zellen ist die Gq-vermittelte ERK-Aktivierung Ca<sup>2+</sup>-abhängig. Über Gq-Proteine wird die Autophosphorylierung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen cytoplasmatischen PTK **Pyk2**, einem Mitglied der FAK (focal adhesion kinase)-Familie, stimuliert. Dadurch kann **c-Src** rekrutiert werden. Es folgt die Tyrosin-Phosphorylierung des Adaptorproteins Shc und die Ras-abhängige ERK-Aktivierung (Dikic *et al.*, 1996, Della Rocca *et al.*, 1999).

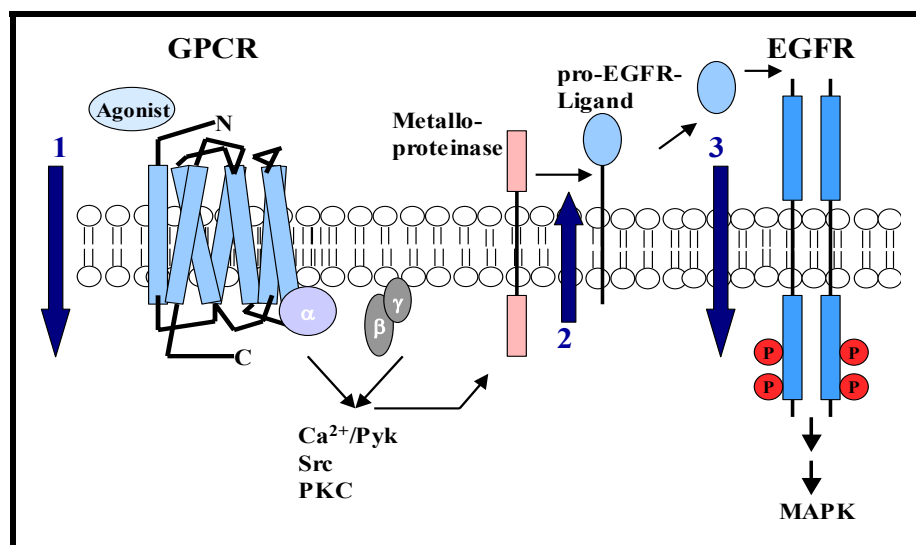
### 1.2.5. $\beta\gamma$ -Komplexe bei der GPCR-vermittelten ERK-Aktivierung

Die Expression von Proteinen, die freie  $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden wie z.B. der C-terminale Teil von GRK2 (G protein receptor kinase) (Koch *et al.*, 1994) inhibiert die GPCR-vermittelte MAPK-Aktivierung in vielen Systemen. Sowohl Gi- als auch Gq-Protein gekoppelte Rezeptoren können ERK über einen  $\beta\gamma$ -abhängigen Mechanismus, der über Stimulation von Protein-Tyrosinkinasen und die kleine GTPase Ras läuft, aktivieren (Crespo *et al.*, 1994, Hawes *et al.*, 1995, van Biesen *et al.*, 1995). Weitere wichtige Mediatoren der  $\beta\gamma$ -abhängigen MAPK-Aktivierung sind verschiedene **PI3-K** Isoformen (Hawes *et al.*, 1996, Lopez-Illasaca *et al.*, 1998, Yart *et al.*, 2002) und cytoplasmatische PTKs der **Src**-Familie (Luttrell *et al.*, 1997, Pierce *et al.*, 2001b). Die Aktivierung verschiedener PLC $\beta$ -Isoformen oder Ionenkanäle scheint für die  $\beta\gamma$ -vermittelte ERK-Stimulation weniger bedeutend zu sein (Luttrell, 2003).

Wie im folgenden Abschnitt näher erläutert wird, sind  $\beta\gamma$ -Komplexe auch an der Integration mitogener Signalwege von RTKs und GPCRs (Carpenter 2000, Gschwind *et al.*, 2001) beteiligt.

### 1.2.6. Der Mechanismus der Transaktivierung von RTKs als Signalintegrationspunkt der GPCR induzierten ERK-Aktivierung

Rezeptor-Tyrosinkinasen (wie EGFR oder PDGFR) sind bedeutende Signalproteine bei der Vermittlung der MAPK-Aktivierung durch GPCRs. Der Begriff „Transaktivierung“, d.h. die Tyrosin-Phosphorylierung und damit Aktivierung von RTKs durch die Stimulation von GPCRs, wurde stark durch die Gruppe von Axel Ullrich geprägt. Daub *et al.* konnten die LPA- und Thrombin induzierte Transaktivierung des EGFR nachweisen.

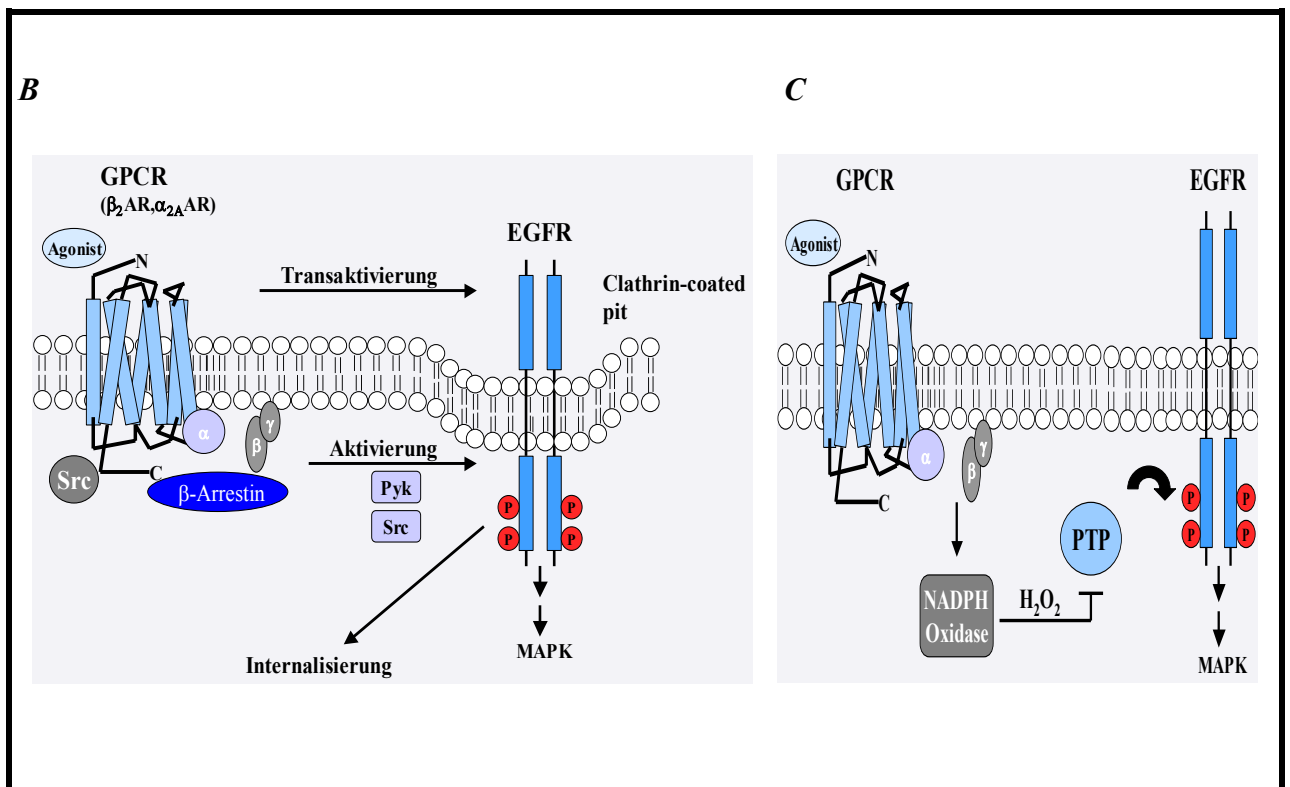


**Abb.1.4.A TMPS-Signalweg der EGFR-Transaktivierung:** Die GPCR-induzierte und über Metalloproteasen vermittelte Prozessierung von EGF-ähnlichen Ligand-Vorstufen führt zur EGFR-Transaktivierung. Dieser Mechanismus führt über 3 Membran-Passagen zur ERK-Aktivierung. (modifiziert nach Gschwind, 2001, Prenzel, 2000)

Für die durch GPCR-Agonisten induzierte EGFR-Transaktivierung, die in der Folge für verschiedene Typen G-Protein gekoppelter Rezeptoren bzw. in unterschiedlichen Zellen gezeigt werden konnte (Zwick *et al.*, 1997, Adomeit *et al.*, 1999), wurde zunächst ein Ligand (EGF)-unabhängiger Mechanismus vermutet. Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass die Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) induzierte, was nachfolgend zur Freisetzung membranständiger EGFR-Ligand-Vorstufen (z.B. TGF- $\alpha$ ) und somit also zur Ligand-abhängigen EGFR-Transaktivierung führte (Prenzel *et al.*, 1999; Wallasch *et al.*, 2002). Jeder der bekannten EGFR-Liganden (außer Crypto, siehe Abschnitt 1.1.1.) wird als membranständige Vorstufe synthetisiert. Durch Proteolyse wird der lösliche Wachstumsfaktor freigesetzt (Riese und Stern, 1998). Für Pro-HB-EGF wurde diese Prozessierung nach GPCR-Stimulation nachgewiesen. Durch freie  $\beta\gamma$ -Komplexe werden MMPs (Matrix-Metalloproteinasen) aktiviert, die letztendlich HB-EGF freisetzen (Prenzel *et al.*, 1999) (Abb.1.4.A). Die MMP ADAM-12 (a disintegrin and metalloprotease) ist eine der Proteasen,

die für die GPCR-induzierte HB-EGF Freisetzung notwendig ist (Asakura *et al.*, 2002). Einige MMPs der ADAM-Familie besitzen SH3-Domänen-ähnliche Bindemotive in ihren intrazellulären Abschnitten, welche die Interaktion mit Src-Kinasen vermitteln könnten (Luttrell, 2003). „Downstream“ des EGFR kommt es nach Bindung der prozessierten Liganden zur Aktivierung der MAPK-Kaskade. Diese Ligand-vermittelte Form der GPCR-induzierten EGFR-Transaktivierung, die drei Membran-Passagen beinhaltet (TMPS triple-membrane-passing-siganling *Abb.1.4.A*), ist das am stärksten etablierte Transaktivierungs-Modell.

Alternativ können auch cytoplasmatische PTKs „downstream“ von GPCRs den EGFR transaktivieren. Für Pyk und Src wurde eine Interaktion mit dem EGFR nachgewiesen (Luttrell *et al.*, 1996, Keely *et al.*, 2000), wobei Src den EGFR direkt phosphorylieren und aktivieren kann (Biscardi *et al.*, 1999).



**Abb.1.4. B Cytoplasmatische PTKs (Src, Pyk) und  $\beta$ -Arrestin bei der GPCR-induzierten EGFR-Transaktivierung.** Die Stimulation von GPCRs kann zur Bildung von Membran-Komplexen führen. Diese bestehen aus aktiviertem G-Protein gekoppeltem Rezeptor mit Src und  $\beta$ -Arrestin. Die nachfolgende Transaktivierung des EGFR in Verbindung mit der Endocytose sind notwendige Voraussetzungen für eine effektive Stimulation der MAPK-Kaskade. **C Bedeutung von PTPs (Protein-Tyrosinphosphatasen) bei GPCR-abhängigen EGFR-Transaktivierung.** Die GPCR-Stimulation führt zur  $H_2O_2$ -Bildung durch die Aktivierung von NADPH-Oxidasen. Dadurch werden PTPs, welche die RTK-Aktivität negativ regulieren, gehemmt, und es kommt zur Transaktivierung de EGFR. (modifiziert nach Wetzker und Böhmer, 2003, Gschwind, 2001, Pierce, 2001)

Ein weiterer Mechanismus zur EGFR-Transaktivierung könnte die Bildung multimerer Proteinkomplexe und spezifischer Membranstrukturen sein.  **$\beta$ -Arrestin** kann an GPCRs binden und die Interaktion mit weiteren Signalmolekülen wie Src oder verschiedenen Mitgliedern der MAPK-Familie vermitteln (Luttrell, 2003, Pierce *et al.*, 2001) (*Abb.1.4.B*). **PTPs** (Protein-Tyrosinphosphatasen) kontrollieren die Aktivität von RTKs (Östman und Böhmer, 2001). Die reversible Inaktivierung von PTPs durch verschiedene reaktive Sauerstoffformen (z.B.:  $H_2O_2$ ) kann RTK-Signalwege positiv regulieren (Schlessinger, 2000). Die Stimulation vieler GPCRs führt zur Freisetzung von  $H_2O_2$ . Die daraus resultierende Hemmung von PTPs kann dann zur Transaktivierung von RTKs und damit letztendlich zur Aktivierung der MAPK-Kaskade bzw. anderer „downstream“-Signalwege führen (Wetzker und Böhmer, 2003) (*Abb.1.4.C*).

Ein denkbarer Mechanismus der Interaktion zwischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinase ist auch die GPCR-induzierte Transinaktivierung von RTKs. In A431-Zellen kommt es nach Bradykinin-Stimulation zur PTP-vermittelten EGFR-Transinaktivierung und zur EGFR-unabhängigen Aktivierung von ERK (Graneß *et al.*, 2000). Neben der Transaktivierung des EGFR wurde auch die GPCR-vermittelte Aktivierung anderer RTKs wie des IGF-1 (insulin-like growth factor) Rezeptors (Rao *et al.*, 1995) oder des FGF- (fibroblast growth factor) Rezeptors (Peng *et al.*, 2002) gezeigt. In L-Zellen konnte die LPA-induzierte ERK-Aktivierung über eine  $\beta\gamma$ -abhängige Transaktivierung des PDGFR nachgewiesen werden (Herrlich *et al.*, 1998).

### **1.3. Klassifikation und biologische Funktionen muscarinischer Acetylcholin Rezeptoren (mAChR)**

Die Familie der humanen G-Protein gekoppelten muscarinischen Acetylcholin Rezeptoren wird in 5 Subtypen aufgegliedert. Dazu gehören die Subtypen 1, 3 und 5 ( $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_5$ ), die bevorzugt an  $G_{q/11}$ -Proteine koppeln und so z.B. die Phospholipasen C und D aktivieren können. Die Subtypen 2 und 4 ( $M_2$ ,  $M_4$ ), deren biologische Funktionen hauptsächlich über  $G_{i/o}$ -Proteine vermittelt werden, inhibieren verschiedene Adenylatzyklase-Isoformen. Nach Bindung von Acetylcholin an transmembranale Domänen (TM III, V, VI, VII) des Rezeptors erfolgt die Kopplung der G-Proteine. Diese wird durch die N-terminalen Anteile der zweiten und dritten intrazellulären Schleifen (i2,i3) der Rezeptoren determiniert (van Koppen und Kaiser, 2003, Wess *et al.*, 1995). Die einzelnen Rezeptorsubtypen sind durch spezifische Agonisten/Antagonisten-Profile charakterisiert (*Tab.1.1*). Muscarinische Acetylcholin



Rezeptoren befinden sich in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, im Herzen und in der glatten Muskulatur aber auch in einer Vielzahl exokriner Drüsen (Caulfield und Birdsall, 1998) (*Tab.1.1.*).

Rezeptor-Subtyp	M <sub>1</sub> R	M <sub>2</sub> R	M <sub>3</sub> R	M <sub>4</sub> R	M <sub>5</sub> R
<b>Agonisten</b>	-----	Muscarin,	Carbachol,	Oxotremorine	-----
<b>Antagonisten</b>	-----	Scopolamin,	Atropin	-----	-----
<b>Subtyp-spezifische Antagonisten</b>	Pirenzepin	AQ-RA 741	4-DAMP	Himbacin	4-DAMP
<b>Aminosäurereste (Mensch)</b>	460	466	590	479	532
<b>G-Protein</b>	Gq/11	Gi/o	Gq/11	Gi/o	Gq/11
<b>Signalwege</b>	IP <sub>3</sub> /DAG Ca <sup>2+</sup> /PKC	AC↓ K <sup>+</sup> -Kanäle↑ Ca <sup>2+</sup> -Kanäle↓	IP <sub>3</sub> /DAG Ca <sup>2+</sup> /PKC	AC↓ Ca <sup>2+</sup> -Kanäle↓	IP <sub>3</sub> /DAG Ca <sup>2+</sup> /PKC
<b>Gewebe</b>	Gehirn, Drüsen, sympathische Ganglien	Herz, Rhombencephalon, glatte Muskulatur	glatte Muskulatur, Drüsen, Gehirn	Vorderhirn, Stratium	Substantia Nigra
<b>Biologische Funktionen</b>	Depolarisation, Relaxation	Verlangsamung des Herzschlags, präsynaptische Ach-Freisetzung↓	Drüsensekretion, präsynaptische Ach- Freisetzung↓	Modulation des dopaminergen Systems	Dilatation cerebraler Blutgefäße

**Tab.1.1. Muscarinische Acetylcholin Rezeptoren:** Liganden, koppelnde G-Proteine, Signalwege, Gewebeverteilung und biologische Effekte; weitere Abkürzungen: AC, Adenylatzyklase; Ach, Acetylcholin; DAG, Diacylglycerol; IP<sub>3</sub>, Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (modifiziert nach Caulfield und Birdsall, 1998; van Koppen und Kaiser, 2003; Liebmann, 1990)

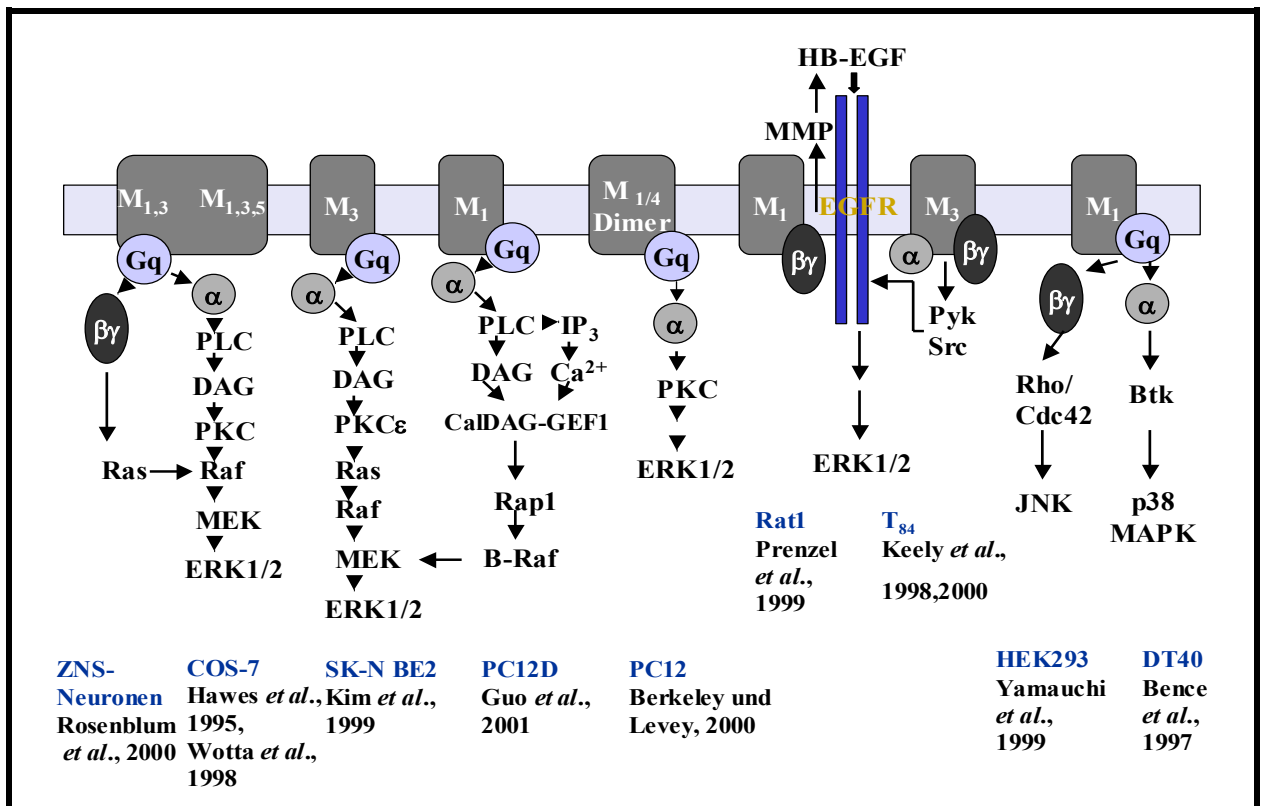
In den letzten Jahren wurde die physiologische Bedeutung der Familie der mAChRs vor allem mit Hilfe von „knockout“-Mausmodellen untersucht. Die Beeinflussung des Erinnerungsvermögens durch M<sub>1</sub>-Rezeptoren (muscarinischer Acetylcholin Rezeptor Subtyp1), die Verlangsamung des Herzschlags über M<sub>2</sub>-Rezeptoren, die Regulation der Nahrungsaufnahme durch M<sub>3</sub>-Rezeptoren oder die Modulation des dopaminergen Systems und damit die Kontrolle der Bewegung über M<sub>4</sub>-Rezeptoren sind einige Beispiele physiologischer Funktionen von mAChRs (van Koppen und Kaiser, 2003, Bymaster *et al.*, 2003). mAChRs sind auch in pathophysiologische Prozesse involviert. Die erhöhte Acetylcholin-Freisetzung aus parasymphatischen Nervenenden aufgrund von Fehlfunktionen präsynaptischer inhibitorischer M<sub>2</sub>-Rezeptoren führt zu einer Hyperaktivität der Atemwege

(Coulson und Fryer, 2003). In der Therapie von Patienten mit Asthma oder chronischer Bronchitis kommen teilweise mAChR-Antagonisten zum Einsatz, welche die Acetylcholin-Freisetzung und damit die Muskelkontraktion regulieren (Nathanson, 2000). Die Disregulation von mAChR im zentralen Nervensystem wurde auch bei Alzheimer- und Parkinson-Patienten nachgewiesen (Piggott *et al.*, 2003). Sowohl bei der Tumorentstehung (Gutkind *et al.*, 1991) als auch bei Autoimmunerkrankungen (z.B. infektionsbedingte Bildung von Antikörpern gegen kardiäre M<sub>2</sub>-Rezeptoren) (Retondaro *et al.*, 1999) können mAChRs involviert sein.

### 1.3.1. Mitogene Signalwege Gq-Protein gekoppelter muscarinischer Acetylcholin Rezeptoren

Die Stimulation mACh-Rezeptoren kann zur Anschaltung verschiedener MAPK-Signalwege führen. Es konnte eine Aktivierung von ERK1/2, JNKs/SAPKs, p38 MAPKinasen und ERK5 durch mAChRs nachgewiesen werden. Die p42/44-MAPK Isoformen können durch alle fünf Rezeptor-Subtypen stimuliert werden (Lanzafame *et al.*, 2003). Die Gq-Protein gekoppelten mACh-Rezeptoren M<sub>1</sub>R, M<sub>3</sub>R und M<sub>5</sub>R aktivieren **ERK1/2** normalerweise über einen PLC/PKC-abhängigen Mechanismus. In humanen Neuroblastom-Zellen erfolgt die M<sub>3</sub>R-vermittelte ERK-Aktivierung über die PKC $\epsilon$ , Ras und Raf (Kim *et al.*, 1999) (*Abb.1.5.*). In CHO-Zellen, die den M<sub>1</sub>R überexprimieren erfolgt die ERK1-Stimulation PKC-abhängig über Go-Proteine (van Biesen *et al.*, 1996b). Eine Beteiligung von Gi/o-Proteinen an der M<sub>1</sub>R-induzierten MAPK-Aktivierung konnte auch in PC12-Zellen gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand ist die Bildung von M<sub>1</sub>-M<sub>4</sub> Rezeptor-Dimeren (Berkeley und Levey, 2000) (*Abb.1.5.*). Eine Ras- und  $\beta\gamma$ - unabhängige vermittelte ERK-Aktivierung durch den M<sub>1</sub>R findet in COS-7 Zellen statt (Hawes *et al.*, 1995). PKC-unabhängige ERK-Aktivierungswege des M<sub>1</sub>R, die teilweise  $\beta\gamma$ -, Src- und PI3K-abhängig sind, konnten in Neuronen und COS-7 Zellen nachgewiesen werden (Rosenblum *et al.*, 2000). In einigen Zelllinien läuft die M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>5</sub>-vermittelte ERK-Aktivierung über mehr als einen Signalweg. So kann z.B. ERK1/2 in NIH-3T3 Zellen durch den M<sub>1</sub>R PKC-abhängig oder -unabhängig aktiviert werden (Crespo *et al.*, 1994). In COS-7 bzw. CHO Zellen kann der über den M<sub>1</sub>R vermittelte Effekt auf die MAPK Ras-abhängig oder -unabhängig sein (van Biesen *et al.*, 1996). Der Anteil der verschiedenen mAChRs an der ERK-Aktivierung wird durch den Rezeptorsubtyp entscheidend beeinflusst. Dies konnte in verschiedenen Zelllinien unter

endogenen Bedingungen bzw. nach Überexpression der entsprechenden Rezeptor-Subtypen gezeigt werden (Wotta *et al.*, 1998, Rosenblum *et al.*, 2000).



**Abb.1.5. Vereinfachtes Modell der Aktivierung verschiedener MAPK-Isoformen durch M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> und M<sub>5</sub> muscarinische Acetylcholin Rezeptoren.** Die MAPK-Aktivität kann in Abhängigkeit vom Rezeptor-Subtyp und der verwendeten Zelllinie über die α-Untereinheiten und/ oder βγ-Komplexe vermittelt werden. Die Signalwege laufen sowohl PKC-abhängig oder -unabhängig bzw. Ras-abhängig oder -unabhängig ab und schließen auch die Transaktivierung des EGFR über unterschiedliche Mechanismen ein. (modifiziert nach Lanzafame, 2003)

Die Transaktivierung des EGFR kann die über mAChRs-induzierte ERK-Aktivität vermitteln (Daub *et al.*, 1997, Keely *et al.*, 1998). In T<sub>84</sub>-Zellen erfolgt die M<sub>3</sub>-Rezeptor abhängige EGFR-Transaktivierung über Pyk und Src (Keely *et al.*, 2000). In Rat-1 Fibroblasten, die den M<sub>1</sub>-Rezeptor stabil überexprimieren, kann nach Stimulation mit dem Subtyp-unspezifischen muscarinischen Rezeptor-Agonisten Carbachol eine MMP-induzierte interzelluläre Freisetzung von HB-EGF und in der Folge die Transaktivierung des EGFR beobachtet werden. βγ-Komplexe scheinen dabei in die Aktivierung von Metalloproteasen involviert zu sein (Prenzel *et al.*, 1999).

Die Aktivierung von JNKs über βγ-Komplexe, Rho und Cdc42 (Yamauchi *et al.*, 1999) und die Gα<sub>q</sub>- und βγ- vermittelte Stimulation der p38 MAPK (Yamauchi *et al.*, 2001) in HEK293 Zellen wurde für den M<sub>1</sub>-Rezeptor gezeigt. In DT40 Zellen ist bei der M<sub>1</sub>-vermittelten p38-Aktivierung die cytoplasmatische PTK Btk (Bruton`s Tyrosin-kinase) involviert (Bence *et al.*,

1997). Der in COS-7 Zellen überexprimierte Gq-Protein gekoppelte  $M_1$ -Rezeptor stimuliert die **ERK5/Bmk1**-Aktivität unabhängig von Ras oder Rho (Fukuhara *et al.*, 2000).

Die Proteinkinase B (**PKB/Akt**) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die durch eine Reihe von RTKs über die PI3-K und PDK-1 (phosphoinositide dependent kinase) aktiviert werden kann (Walker *et al.*, 1998, Coffey *et al.*, 1998). Sie reguliert sowohl proliferative als auch anti-apoptotische Prozesse und spielt eine bedeutende Rolle bei der Tumorentstehung (Testa und Bellacosa, 2001). Die PKB/Akt-Aktivität wird auch durch verschiedene GPCRs moduliert. In 1321N1 Astrocytoma Zellen, die verschiedene mAChRs (z.B. den Gq-Protein gekoppelten  $M_3$ -Rezeptor) endogen exprimieren, wird die PKB über einen PLC-abhängigen Mechanismus, der den ErbB3-Rezeptor und die PI3-K involviert, aktiviert (Tang *et al.*, 2002). Die PI3-K $\beta$  vermittelt die PKB-Stimulation über den  $M_1$ -Rezeptor in NIH-3T3 Zellen (Murga *et al.*, 2000).

### 1.3.2. Mitogene Signalwege Gi-Protein gekoppelter muscarinischer Acetylcholin Rezeptoren

Gi-Protein gekoppelte muscarinische Acetylcholin Rezeptoren induzieren die Aktivierung verschiedener Mitglieder der MAPK-Familie (Rosenblum *et al.*, 2000). In *Tabelle 1.2.* sind diese stimulatorischen Effekte auf **ERK1/2**, **JNKs** und die **p38 MAPK** in verschiedenen Zelllinien für den  $M_2$  muscarinischen Acetylcholin Rezeptor zusammengefasst. Die MAPK-Aktivierung erfolgt sowohl über  $G\alpha_i$  als auch über  $\beta\gamma$ -Komplexe. An den komplexen Aktivierungswegen sind verschiedene Signalproteine beteiligt. Die Transaktivierung des EGFR (Daub *et al.*, 1997), PI3-K und cytoplasmatische PTKs wie Src sind Mediatoren der Signalwege des  $M_2R$  zur MAPK (Lanzafame *et al.*, 2003). Die schwache Aktivierung verschiedener PLC-Isoformen, die über  $\beta\gamma$ -Komplexe von  $M_2R$ s vermittelt werden kann, scheint bei der Stimulation der ERK-Aktivität keine Rolle zu spielen (Lanzafame *et al.*, 2003, Koch *et al.*, 1994). Die Serin-Phosphorylierung und damit die Aktivierung der Proteinkinase B/Akt kann nach Bindung verschiedener muscarinischer Agonisten an den  $M_2$ -Rezeptor über  $G\alpha_i$ -Proteine bzw.  $\beta\gamma$ -Komplexe induziert werden. In vielen Fällen wird dieser Effekt PI-3K-abhängig übertragen (*Tab. 1.2.*). Der Mechanismus der ERK- bzw. PKB-Aktivierung und auch die Kinetik der Aktivierung über entsprechende Acetylcholin-Mimetika scheint Zelltypspezifisch zu sein (Lanzafame *et al.*, 2003). Die Überexpression des Rezeptors, einzelner Mediatoren oder der Zielproteine im zellulären Modell sind Faktoren, die den Signalweg beeinflussen können. Häufig werden verschiedene ERK- oder PKB-Isoformen zusammen mit

dem Rezeptor überexprimiert, um auch geringfügige Veränderungen der Aktivität noch detektieren zu können.

Zelltyp	Mediatoren des Signalweges	„Targets“	Literatur
Rat-1a Fibroblasten	PTX-abhängige Ras-, Raf-, MEK- Aktivierung	ERK1/2	Winitz <i>et al.</i> ,1993
COS-7 Zellen	$\beta\gamma$	ERK1/2	Koch <i>et al.</i> ,1994
COS-7 Zellen	$\beta\gamma$ , Ras	ERK1/2	Crespo <i>et al.</i> , 1994
COS-7 Zellen	$\beta\gamma$ , PI3-K $\gamma$ , Src-Kinasen, Shc, Grb2-Sos	ERK2	Lopez-Illasaca <i>et al.</i> , 1997
COS-7 Zellen	EGFR, Src-Kinasen, PI-3K	ERK2	Daub <i>et al.</i> , 1997
DT40 Zellen	Syk, Src-Kinasen	ERK1/2	Wan <i>et al.</i> , 1996
COS-7, NIH-3T3 Zellen	$\beta\gamma$ , Ras, Rac 1	ERK1/2, JNKs	Gutkind <i>et al.</i> , 1997
COS-7 Zellen	Src-Kinasen	ERK1/2	Igishi <i>et al.</i> , 1998
CHO-Zellen	Ca <sup>2+</sup> , PKC	ERK1/2, JNKs	Wylie <i>et al.</i> , 1999
HEK293T-Zellen	G $\alpha_i$ , Rap1, Ras	ERK1/2	Mochizuka <i>et al.</i> ,1999
Neuronen des ZNS, COS-7 Zellen	$\beta\gamma$ , PI3-K, Src-Kinasen	ERK1/2	Rosenblum <i>et al.</i> , 2000
COS-7 Zellen	Ras, Rac-1	JNKs	Coso <i>et al.</i> , 1996
HEK293 Zellen	$\beta\gamma$	p38 MAPK	Yamauchi <i>et al.</i> , 1997
COS-7 Zellen	G $\alpha_i$ , $\beta\gamma$ , PI3-K	PKB/Akt	Murga <i>et al.</i> , 1998
COS-7 Zellen	$\beta\gamma$ , PI3-K	PKB/Akt	Bommakanti <i>et al.</i> , 2000

**Tab.1.2.** Die M<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelte Aktivierung verschiedener Mitglieder der MAPK-Familie und der Proteinkinase B/ Akt: Zelllinien und am Signalweg beteiligte Proteine (modifiziert nach Lanzafame, 2003)

#### 1.4. GPCRs als Teile komplexer zellulärer Signalnetzwerke

Die „downstream“-Signalwege einzelner GPCRs laufen oft nicht linear und isoliert voneinander ab. Die Ausbreitung der Signale ist vielmehr verzweigt und erfolgt über die Verknüpfung vieler verschiedener Signalwege. Die Regulation der neun bekannten Adenylatzyklase-Isoformen über GPCRs, Ligand-gesteuerte Ionenkanäle und RTKs ist hierfür

ein typisches Beispiel (Jordan *et al.*, 2000). Die Komplexität dieser Netzwerke wird potenziert, wenn man in Betracht zieht, dass die Zellen im Organismus bzw. in den verschiedenen Geweben multiplen Stimuli ausgesetzt sind (Bhalla und Iyengar, 1999). Sowohl der „cross talk“ zwischen unterschiedlichen GPCRs als auch die Interaktion mit anderen Signalwegen ist in zelluläre Signaltransduktionsnetzwerke integriert. Dabei spielt die Dimer- bzw. Oligomerisierung von GPCRs eine bedeutende Rolle. Die Bildung von Multiprotein-Signalkomplexen und die Kompartimentalisierung der Signalwege in „Mikrodomänen“, welche die Ko-Lokalisation oder den direkten Kontakt der Proteine ermöglichen, sind wichtige Integrationspunkte solcher Netzwerke (Hur und Kim, 2002; Cordeaux und Hill, 2002). So konnte z.B. die Bradykinin stimulierte Src vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR und die nachfolgende Translokation der PLC $\gamma$ -1 in Lipid-Mikrodomänen durch den Entzug von Cholesterin unterbrochen werden (Hur *et al.*, 2004).

### 1.5. Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Integration verschiedener GPCR- bzw. auch RTK-Signalwege in ein zelluläres Netzwerk die Regulation mitogener Prozesse entscheidend beeinflusst. In COS-7 Zellen führte die simultane Stimulation des Gq-Protein gekoppelten Bradykinin B<sub>2</sub>-Rezeptors und des Gs-Protein gekoppelten  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors, die beide in der Lage sind die MAPK zu aktivieren, zu einer B<sub>2</sub>R-induzierten Gi-Protein Aktivierung. Die nachfolgende Modulation des cAMP/PKA-Systems verhinderte die multiple Stimulation der ERK-Aktivität und somit ein verstärktes Zellwachstum (Hanke *et al.*, 2001). In anderen Experimenten zeigte sich, dass sich nach Ko-Stimulation von COS-7 Zellen mit Isoproterenol und EGF bzw. der Überexpression des EGFR das Profil des durch den  $\beta$ 2-AR transaktivierten EGF-Rezeptors veränderte. Der  $\beta$ 2-AR selbst war nicht in der Lage, die Phospholipase C $\gamma$ -1 zu aktivieren. Im Gegensatz dazu führte die Isoproterenol-vermittelte und durch EGF-unterstützte Transaktivierung zur Stimulation der PLC $\gamma$ -1 (Dissertation S.Drube, in Vorbereitung).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mitogene Signaltransduktion des Gi-Protein gekoppelten M<sub>2</sub> muscarinischen Acetylcholin Rezeptors vor dem Hintergrund eines einfachen zellulären Netzwerks bestehend aus verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und des EGFR zu charakterisieren. Dazu sollten zunächst die Expression des M<sub>2</sub>-Rezeptors mit geeigneten Methoden detektiert und die teilweise schon in der Literatur beschriebenen Mediatoren der M<sub>2</sub>R-vermittelten MAPK- und Proteinkinase B -Aktivierung (siehe Abschnitt

1.2.3.) unter den gegebenen zellulären und experimentellen Bedingungen untersucht werden. Die Rolle verschiedener Mitglieder der Src-Kinase Familie und der „cross talk“ mit dem EGFR bei der Regulation der mitogenen Signalwege des M<sub>2</sub>-Rezeptors sollten dabei im Vordergrund stehen. Die Stimulation der MAPK- und PKB/Akt-Aktivität innerhalb eines Signal-Netzwerkes sollte durch die simultane Aktivierung des M<sub>2</sub>R und verschiedener anderer Rezeptoren (sowohl GPCRs als auch des EGFR) simuliert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Zelllinien

**COS-7** Zellen, Affennierenzellen, Fibroblasten (afrikanische grüne Meerkatze, ATCC CRL-1651)

**SH-SY5Y** Zellen, humane Neuroblastomzellen, epitheliale Zellen (DSMZ, ACC 209)

**SYF** Zellen, embryonale Maus-Fibroblasten, defizient für Src, Yes und Fyn (ATCC CRL-2459)

**Src++** Zellen, embryonale Maus-Fibroblasten, Expression von Src, defizient für Yes und Fyn (ATCC CRL-2497)

#### 2.1.2. Medien und Chemikalien für Zellkultur und Transfektion

- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4,5g/l Glucose, Natrium Pyruvat und L-Glutamin (Invitrogen life technologies oder PAA laboratories), OPTI-MEM I (Invitrogen life technologies)
- Fötale Kälberserum (PAA laboratories)
- Antibiotika/ Fungizid Lösung (10000units/ml Penicillin G, 10mg/ml Streptomycin Sulfat, 25µg/ml Amphotericin B), Gentamicin (10 mg/ml), Geniticin (G418 10mg/ml) (Invitrogen life technologies)
- Trypsin-EDTA Lösung (PAA laboratories)
- Medium zur Konservierung der Zellen bei -80°C: 1% BSA, 10%DMSO, 89% DMEM (serumfrei)
- Lipofectamine 2000, Transfektionsreagenz (Invitrogen life technologies)
- Polyplus, Transfektionsreagenz (Biomol)
- DEAE-Dextran und Chloroquine für die Transfektion (Sigma)
- PBS (phosphate buffered saline) zum Waschen der Zellen bei der Transfektion und Zellyse: 0.137M NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4
- Verbrauchsmaterialien, wie z.B.: 6-well-Platten, 24-well-Platten, Zellkulturflaschen (Greiner, Fisher Scientific)



### 2.1.3. Reagenzien für Stimulation und Lyse der Zellen

- für die **Zellyse**: PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Serva); Aprotinin, Leupeptin, DTT (Dithiothreitol) und Natriumorthovanadat von Sigma
- für die **Zellstimulation**: mACh-Rezeptor Agonisten: Oxotremorin und Carbachol von Sigma; mACh-Rezeptor Antagonisten: Scopolamin Hydrochlorid (Sigma), AQ-RA 741 (freundlicherweise von Dr. K. Thomae - Chem.-Pharm. Fabrik, Biberach zur Verfügung gestellt); LPA (oleoyl-L- $\alpha$ -lysophosphatidic acid), Isoproterenol, Captopril, Bradykinin und PTX (Pertussistoxin) von Sigma; EGF (epidermal growth factor) human rekombinant, Wortmannin, LY294002, AG1478, AG825, PP2, Bis (Bisindolylmaleimid), GM6001, CRM197 und PD98059 von Calbiochem

### 2.1.4. Bakterienstamm und Medien für bakterielle Kultivierung, Transformation und Herstellung kompetenter Zellen

#### **Escherichia coli** XL-1Blue (Stratagene)

Luria-Bertani (LB) Medium (Sambrook *et al.*, 1989): Bactotrypton – 10 g/l, Hefeextrakt – 5 g/l, NaCl - 10g/l, pH 7.0 versetzt mit den entsprechenden Antibiotika - Ampicillin 100 $\mu$ g/ml oder Kanamycin 50 $\mu$ g /ml; Agar-Platten: LB-Medium mit 15g/l Bactoagar

1x KCM Puffer (0,1 M KCl; 0,03 M CaCl<sub>2</sub>; 0,05 M MgCl<sub>2</sub>) für die Transformation

TSB Puffer zur Herstellung kompetenter Zellen (10% Polyethylenglycol 6000, 5% Dimethylsulfoxid (DMSO), 10mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub> und 10mM MnCl<sub>2</sub> in LB-Medium)

### 2.1.5. Antikörper

Anti-**M<sub>2</sub>R** Antikörper: Kaninchen polyklonal (Santa Cruz Biotechnology) (IP) (WB Verdünnung 1:800), Maus monoklonal (Oncogen) (IP) (WB Verdünnung 1:1000)

Anti-**EGFR** Antikörper: Maus monoklonal 13G8 (Nanotools) (WB Vedünnung 1:333); Maus monoklonal clone 425 (Merck) (IP) und Maus monoklonal clone 528 (Santa Cruz Biotechnology) (IP).

Anti-**pY845 EGFR** Antikörper: Maus monklonal 12A3 (Nanotools) (WB Vedünnung 1:500)

Anti-**PLC $\gamma$ -1** Antikörper: Kaninchen polyklonal (Santa Cruz Biotechnology) (IP) (WB Verdünnung 1:2000)

Anti-**Posphotyrosin** Antikörper: clone 4G10 (Upstate) (WB Verdünnung: 1:3000-1:10000).

Anti-**phospho-(p44/42) ERK1/2** (Thr 202/Tyr204) Antikörper: Maus monoklonal (Cell Signaling) (WB Verdünnung 1:2000).

Anti-**ERK1** and anti-**ERK2** Antikörper: Kaninchen polyklonal (Santa Cruz Biotechnology) (IP) (WB Verdünnung 1:1500-1:4000).

Anti-**pan Ras** Antikörper: Maus monoklonal (Oncogen) (WB Verdünnung 1:1000)

Anti-**phospho-Akt** (Ser473) Antikörper: Kaninchen polyklonal (Cell Signaling) (WB Verdünnung 1:1000).

Anti-**Akt** Antikörper: Kaninchen polyklonal (BD Biosciences Pharmingen) (WB Verdünnung 1:1000).

Anti-**HA.11 tag** Antikörper: Maus monoklonal (BAbCo und Santa Cruz Biotechnology) (IP) (WB Verdünnung 1:1000-1:4000).

Anti-**T7 tag** Antikörper: Maus monoklonal (Novagen) (WB Verdünnung 1:7500)

Anti-**GFP** Antikörper: Maus monoklonal (Santa Cruz Biotechnology) (WB Verdünnung 1:800).

Anti-**Src** Antikörper: Maus monoklonal clone 327 (Oncogene) (WB Verdünnung 1:1000).

Anti-**Fyn** Antikörper: Kaninchen polyklonal (Santa Cruz Biotechnology) (IP) (WB Verdünnung 1:750)

Anti-**Yes** Antikörper: Kaninchen polyklonal (Santa Cruz Biotechnology) (WB Verdünnung 1:500)

**Normal Kaninchen IgG** – (Santa Cruz Biotechnology) (IP).

**Normal Maus IgG** – (Santa Cruz Biotechnology) (IP).

Sekundäre Antikörper: **Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP**, **Ziege-anti-Maus-IgG-HRP** (Santa Cruz Biotechnology) (WB Verdünnung 1:2000-1:8000).

### 2.1.6. Plasmide und Vektoren

**Konstrukte muscarinischer Avetylcholin Rezeptoren:** **M<sub>2</sub>R-WT** human und **M<sub>3</sub>R-WT** Ratte in pcDps (freundlicherweise von Prof. Nürnberg, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf zur Verfügung gestellt); **T7-M<sub>2</sub>R** human in pcDps; **HA-M<sub>2</sub>R** und **HA-M<sub>3</sub>R** human in pcDNA3.1 (Guthrie Resource Center, Sayre, PA, USA)

**EGFR-Konstrukte:** **EGFR-WT**, **EGFR-Y1086F**, **EGFR-Y1068F** in pRK5 (freundlicherweise von Prof. F.D. Böhmer, FSU Jena zur Verfügung gestellt); **EGFR-Y845F**

in pcDNA3 (freundlicherweise von Prof. Dr. S. J. Parsons, University of Virginia, USA zu Verfügung gestellt); **EGFR- $\Delta$ CR1 ( $\Delta$ 242-259)** (Dimerisierungsmutante) in pcDNA3 (freundlicherweise von Prof. A.W. Burgess, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia zur Verfügung gestellt)

**Konstrukte verschiedener Src-Kinasen: c-Src** -dominant negative Mutante (Maus) (**SrcRF-K295R/Y527F** in pcMVS) (freundlicherweise von Dr. Joan Brugge, Harvard Medical School, USA zur Verfügung gestellt); **Fyn-WT**, **Fyn- $\Delta$ SH2**, **Fyn- $\Delta$ SH3**, **Fyn-K299M** (dominant negative Mutante) in pRK5 (freundlicherweise von Dr. Filippo Giancotti, Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, USA zur Verfügung gestellt); **Yes Y535F** (konstitutiv aktiv) in pMIKNeo (freundlicherweise von Dr. Marius Sudol, Weis Center for Research, Danville, PA, USA zur Verfügung gestellt)

**Weitere Konstrukte: HA-ERK2** in pcDNA3 (freundlicherweise von J.S. Gutkind, NIH, Bethesda, USA zur Verfügung gestellt); **CD8- $\beta$ ARK** ( $\beta\gamma$ -Scavenger) in pcDNA3 (freundlicherweise von Prof. Wetzker, FSU Jena zur Verfügung gestellt); **N17-Ha Ras** in pexv 3 (freundlicherweise von Dr. I. Rubio, FSU Jena zur Verfügung gestellt); **T7-PTEN** in pCGT7 (freundlicherweise von Prof. F.D. Böhmer FSU Jena zur Verfügung gestellt); **PKD1-K612W** (dominant negative Mutante) in pEGFP-N1 (freundlicherweise von Dr. A. Hausser, Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt), **pcDNA3** (Invitrogen)

### 2.1.7. Weitere Reagenzien, Chemikalien und Geräte

- ECL (enhanced chemilumineszens) Detektions-Reagenz, [methyl-<sup>3</sup>H]-Thymidin (2 Ci/mmol), 1-[N-methyl-<sup>3</sup>H] Scopolamin Methylchlorid (84Ci/mmol), Protein-A Sepharose CL-4B, Protein-G Sepharose 4 fast flow, PVDF (Polyvinyl Difluorid) Hybond P Blotmembran und Rainbow-Marker (Protein-Molekulargewichts-Marker) von Amersham Pharmacia Biotech
- [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] Adenosine Triphosphat (ATP) (3000 Ci/mmol) von NEN Life Science Products
- weitere Reagenzien und Materialien: Myelin Basic Protein (MBP), BSA (bovine serum albumine), ATP, Sepharose CL-4B, Tween 20, Triton X-100, Glycerol 2-Phosphat, Sodium dodecylsulfat (SDS), EGTA (Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethylether)-N, N, N', N'-tertaacetic acid), Ethidiumbromid, LiCl, Entwickler

und Fixierer von Sigma; Agarose (broad range), Rotiphorese Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30%:0,8%, EDTA (ethylendiamine tetraacetic acid), Tris (Tris -(hydroxymethyl)-aminometan), MOPS (morpholinepropanesulfonic acid), HEPES (N-[2-hydroxy-ethyl]-piperazine-N`-[2-ethansulfonic] acid), NaCl, KCl,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , Glycin,  $\epsilon$ -Aminocapronsäure, Glycerin, Trockenmilch, Methanol und Ethanol von Roth; Bromphenolblau von SERVA; gefärbter Protein-Molekulargewichts-Marker von Fermentas; Szintillatorflüssigkeit-Luma Safe Plus von Lumac LSC.; T-MAT Plus DG Film und Biomax MR Film von Kodak

- Geräte: Zubehör für Polyacrylamid-Gelelektrophorese wie z.B.: Glas- und Keramikplatten, Kämmen, Elektrophoresekammern (Amersham Pharmacia Biotech); Liquid scintillation counter Wallac 1410 (Pharmacia); Neubauer-Zellzählkammer (Brandt); Mikroskop Axiovert25 (Zeiss)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Transfektionsmethoden

#### 2.2.1.1. DEAE-Dextran Transfektion

COS-7 Zellen wurden in DMEM unter Zusatz von 10% fötalem Kälbersreum (FKS) und 1% Antibiotika-Mix oder 15  $\mu$ g/ml Gentamicin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Einen Tag vor der Transfektion wurden 1,2-1,4  $\times 10^6$  Zellen in 10cm-Kulturplatten bzw. 3-4  $\times 10^5$  Zellen in 6-well Platten ausgesät. Die zu 60-80% konfluenten Zellen wurden am nächsten Tag zweimal mit 5ml pro Platte bzw. 2ml pro well sterilem PBS (phosphate buffered saline 0,137M NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM  $Na_2HPO_4$ ; 1,7mM  $KH_2PO_4$  pH 7,4) gewaschen und dann mit 600  $\mu$ l bzw. 200  $\mu$ l des DNA-Mix bestehend aus verschiedenen cDNAs (insgesamt nicht mehr als 300ng DNA/ $10^5$  Zellen) und 0,67mM DEAE-Dextran in PBS 30min bei 37°C inkubiert. Um die gleiche Expression der Proteine in den Experimenten zu Erreichen wurden die Zellen mit den in den Abbildungslegenden angegebenen Mengen der verschiedenen DNA-Konstrukte transfiziert. In den meisten Fällen wurden 180-200ng/ $10^5$  Zellen des M<sub>2</sub>R-Expressionsvektor (M<sub>2</sub>R-WT in pcDps) mit 40- 100ng/ $10^5$  der DNA anderer Konstrukte ko-transfiziert. Um die Effizienz dieser Transfektionsmethode nicht zu verringern, wurde eine Gesamt-DNA Menge von 300ng/ $10^5$ Zellen nicht überschritten. Nach der 30minütigen

Inkubation wurde 6ml pro Platte bzw. 2ml pro well Serum-freies DMEM mit 0,13mM Chloroquine zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 3h bei 37°C wurde das Medium entfernt und durch 10ml pro Platte bzw. 2ml pro Platte DMEM mit 10% FKS und 1% Antibiotika-Mix ersetzt, und die Zellen wurden für 48h weiterkultiviert. Vor der entsprechenden Stimulation und anschließenden Lyse (siehe Abschnitt 2.2.2.) bzw. der Analyse in anderen Experimenten wurden die Zellen 20h (über Nacht) in Serum-freiem Medium kultiviert. Die DEAE-Dextran Methode wurde in vielen Fällen für die transiente Transfektion genutzt. Die Verwendung anderer Transfektionsmethoden ist in den Abbildungslegenden angezeigt.

### **2.2.1.2. Polyplus-Transfektion**

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $3 \times 10^5$  COS-7 Zellen in 2ml DMEM mit 10% FKS ohne Antibiotika pro well einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert. Für jede Transfektion wurden 3µg DNA in 100µl 150mM NaCl-Lösung und 6µl des Polyplus-Reagenz ebenfalls in 100µl 150mM NaCl-Lösung verdünnt. Danach wurde die Polyplus-Lösung in die DNA-Lösung pipettiert und der Mix zur Bildung der DNA-Polyplus Komplexe 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte dann die tropfenweise Zugabe der 200µl des DNA-Polyplus Mix zu den Zellen. Ohne ein weiteres Wechseln des Mediums wurden die Zellen 48h weiterkultiviert und nach weiteren 20h in Serum-freiem Medium lysiert bzw. für andere Analysen verwendet.

### **2.2.1.3. Lipofectamine 2000 Transfektion**

$3 \times 10^5$  COS-7, Src++ oder SYF Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 2ml DMEM mit 10% FKS ohne Antibiotika pro well einer 6-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium bei den COS-7 Zellen nur erneuert und bei den Src++ und SYF Zellen durch 1ml pro well Serum-freies Medium ersetzt. Für jede Transfektion wurden 4µg DNA in 250µl Opti-MEM I bzw. 10µl Lipofectamine2000 ebenfalls in 250µl Opti-MEM verdünnt. Nach 5min bzw. höchstens 30min wurden beide Lösungen zusammengeführt und zur Bildung der DNA-Lipofectamine2000 Komplexe 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der DNA-Lipofectamine2000 Mix zu den Zellen gegeben. Ohne ein weiteres Wechseln des Mediums wurden die COS-7 Zellen 48h weiterkultiviert. Bei den Src++ und SYF Zellen wurde nach 4h 1ml DMEM mit 20% FKS ohne Antibiotika pro well zugegeben und dann

ebenfalls für 48h weiterkultiviert. Vor der Stimulation und Lyse wurden die Zellen 20h in Serum-freiem Medium inkubiert.

#### **2.2.1.4. Stabile Transfektion von COS-7 Zellen**

Für die stabile Transfektion von COS-7 Zellen mit den Vektoren pcDNA3.1-HA-M<sub>2</sub>R oder pcDNA3.1-HA-M<sub>3</sub>R, die für den Hämagglutinin-markierten M<sub>2</sub>- oder M<sub>3</sub>-Rezeptor kodieren wurde die Lipofectamine2000-Methode wie in Abschnitt 2.2.1.3. beschrieben genutzt. Zur Selektion wurden die Zellen nach 48h mit DMEM, das mit 10% FKS, 1% Antibiotika-Mix und 1,5mg/ml Geneticin versetzt wurde, weiterkultiviert. Zur Kontrolle wurden untransfizierte und mit pcDNA3 transfizierte COS-7 Zellen mitgeführt. Ein Mediumwechsel erfolgte dann alle drei bis vier Tage. Nach vier Wochen wurden die resistenten Klone vereinzelt und in DMEM mit 10% FKS, 1% Antibiotika-Mix und 1,5mg/ml Geneticin kultiviert. Der Nachweis der stabil exprimierten Rezeptoren erfolgte mit Hilfe von Radioligand-Bindungsexperimenten bzw. über die durch die Rezeptoren vermittelte Aktivierung der MAPK. Für weitere Untersuchungen wurden die stabil transfizierten COS-7 Zellen in DMEM mit 10% FKS, 1% Antibiotika-Mix und 200µg/ml Geneticin kultiviert.

#### **2.2.2. Herstellung von Zelllysaten**

Vor der Lyse wurden die Zellen, wie in den Abbildungslegenden angegeben, mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert, danach stimuliert und einmal mit eiskaltem PBS (0,137M NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte auf Eis mit folgendem Puffer: 20mM HEPES; pH7,5; 10 mM EGTA; 40mM β-Glycerophosphat; 1% TritonX-100; 2.5mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM Dithiothreitol (DTT); 2mM Natriumvanadat; 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 20µg/ml Aprotinin und 20µg/ml Leupeptin. Durch 10minütige Zentrifugation bei 14.000xg bei 4°C wurden die Lysate von unlöslichen Partikeln getrennt und der Überstand danach bei -80°C gelagert.

#### **2.2.3. Immunpräzipitation**

Die aufgereinigten Zelllysate (aus 1,2-1,4x10<sup>6</sup> Zellen) wurden jeweils mit verschiedenen Antikörpern (z.B.: 1,5-2µg anti-EGFR Antikörper clone 425; 1,5µg anti-Fyn Antikörper; 1µg anti-PLCγ-1 Antikörper; 1,5µg anti-M<sub>2</sub>R Antikörper polyklonal (Santa Cruz) und monoklonal

(Oncogene) – alle Angaben pro Lysatprobe) für 3h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Antikörper gegen EGFR bzw. Fyn wurden in den entsprechenden Kontrollen durch die gleichen Mengen an normal Maus IgG bzw. normal Kaninchen IgG ersetzt. Danach erfolgte die Kopplung der gebildeten Immunkomplexe an Protein-A Sepharose (3mg Sepharose-Beads pro Probe) durch eine einstündige Inkubation auf dem Drehrad bei 4°C. Die an die Beads gebundenen Immunkomplexe wurden dreimal mit PBS (phosphate buffered saline: 25mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ; 80mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ; 100mM NaCl pH7,4), das mit 1% TritonX-100 und 2mM Natriumvanadat versetzt wurde, gewaschen und danach 5min mit 60µl Laemmli-Puffer gekocht. Nach Abtrennung der Sepharose wurde der Überstand durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

#### 2.2.4. SDS-PAGE und Immunoblotting

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde sowohl zur Auftrennung von Proteinen aus Immunpräzipitaten als auch von Proteinen aus Zelllysaten, die direkt mit 1x Laemmli Puffer denaturiert wurden, genutzt. Die Menge des eingesetzten Acrylamid/Bisacrylamidgemisches richtete sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. Die 9-13%igen SDS-Polyacrylamid-Gele wurden wie folgt genutzt: 9% für den EGFR-Nachweis, 10% für den Nachweis von PLC $\gamma$ -1, Src-Kinasen bzw. der Ko-Immunpräzipitierung zwischen EGFR und Src-Kinasen, 10% für den Nachweis des M<sub>2</sub>-Rezeptors, 12% für den Nachweis von phospho-ERK1/2 und phospho-Akt, 13% für den Nachweis der MBP-Phosphorylierung und von Ras. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei einer Stromstärke von konstant 22mA pro Gel und einer Spannung von höchstens 150V. Die Gele und notwendigen Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

- Trenngel: 7,5-13% Acrylamid; 380mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS
- Sammelgel: 4% Acrylamid; 125mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS
- Laufpuffer: 25mM Tris; 200mM Glycin; 0,1% SDS (wurde direkt vor der Verwendung zugegeben)
- Laemmli Puffer (3x): 6%SDS; 4,32M  $\beta$ -Mercaptoethanol; 40% Glycerol; Bromphenolblau.

Die aufgetrennten Proteine wurden zur weiteren vereinfachten Analyse durch “semi dry blotting“ auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurden jeweils vier Whatmann 3MM Filter in Kathoden- bzw. Anodenpuffer gelegt. Das Gel und die kurz in Methanol getauchte

Membran wurden 10min in Kathodenpuffer inkubiert und das „Blot-Sandwich“ wie folgt zusammengesetzt: Anode → Filter in Anodenpuffer → Membran → Gel → Filter in Kathodenpuffer → Kathode. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von konstant 0,8mA pro cm<sup>2</sup> Filterpapierfläche und einer maximalen Spannung von 12V. Die verwendeten Puffer waren wie folgt zusammengesetzt:

- Anodenpuffer: 0,3M Tris; 20% Methanol
- Kathodenpuffer: 25mM Tris; 40mM ε-Aminocaprinsäure; 20% Methanol und 0,05% SDS (wurde erst kurz vor dem Blotten zugesetzt).

Um das Hintergrundsignal so gering wie möglich zu halten, wurden die Membranen mit 5% Trockenmilch (bei Verwendung polyklonaler Antikörper), 1% BSA (bei Verwendung monoklonaler Antikörper, wie anti-pY Antikörper clone 4G10), 5% Trockenmilch bei Verwendung des phospho-ERK1/2 spezifischen Antikörpers oder 5% BSA (bei Verwendung des anti-pS473 Akt und anti-T7 Antikörpers) inkubiert. Die Block-Lösungen wurden mit TBS (tris buffered saline 10mM Tris; pH 7,5; 150mM NaCl) zum Blocken bei 4°C über Nacht bzw. mit TBS und 0,1% Tween20 zum Blocken für 1h bei Raumtemperatur angesetzt. Für den anti-HA Antikörper von BAbCo wurde zur Block-Lösung zusätzlich 0,5M NaCl zugesetzt. Nach dem Blocken wurde dreimal mit TBS mit 0,1% Tween20 gewaschen. Die Inkubation mit den meisten primären Antikörpern (Verdünnungen siehe Abschnitt 2.1.5.) erfolgte 1h bei Raumtemperatur (mit den phospho-spezifischen Antikörpern gegen ERK1/2 und pS473 Akt wurde über Nacht bei 4°C inkubiert). Nach dreimaligem Waschen mit TBS mit 0,1% Tween20 wurden die Membranen 1h bei Raumtemperatur mit den entsprechenden sekundären Antikörpern: Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP und Ziege-anti-Maus-IgG-HRP in einer Verdünnung von 1:2000 bis 1:8000 inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBS-0,1% Tween20 wurden die Membranen mit ECL-Reagenz behandelt und die entstehende Chemilumineszenz auf einem Film festgehalten.

Um weitere Proteine auf der Membran nachweisen zu können, wurde diese zweimal 10min mit TBS-0,1% Tween 20 gewaschen und dann 30min bei 55-70°C in einem denaturierenden Puffer (50mM Tris-HCl; pH 6,8; 2% SDS; 11,5mM β-Mercaptoethanol) inkubiert. Nach mehrmaligem intensiven Waschen mit großen Mengen TBS-0,1% Tween20 kann die Membran dann mit den entsprechenden Antikörpern (wie im oberen Abschnitt beschrieben) behandelt werden.



### 2.2.5. MAP-Kinase Assay

COS-7 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren, die für HA-ERK2, M<sub>2</sub>-Rezeptor und verschiedene andere Proteine (z.B. N17 Ha-Ras, CD8-βARK) kodieren mit der DEAE-Dextran Methode transfiziert. Aus den Lysaten wurde die HA-MAPK mit einem monoklonalen anti-HA Antikörper (12CA5, BAbCo) immunpräzipitiert (1h bei 4°C). Die Immunkomplexe wurden dann an Protein-G Sepharose gekoppelt (30min bei 4°C). Die Immunpräzipitate wurden dreimal mit PBS-Puffer (25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O; 80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O; 100mM NaCl, pH7,4), der mit 1% TritonX-100 und 2mM Natriumvanadat versetzt wurde, einmal mit 0,5M LiCl in 100mM Tris (pH 7,5) und einmal mit Kinasereaktionspuffer (12,5mM MOPS (pH7,5); 12,5mM β-Glycerophosphat; 7,5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5mM EGTA; 0,5mM NaF; 0,5mM Na-Orthovanadat) gewaschen. Die Reaktion wurde für 20min bei 30°C in 30μl Kinasepuffer, der 1μCi [γ-<sup>32</sup>P]-ATP; 20μM umarkiertes ATP; 3,3μM DTT und 40μg Myelin Basic Protein (MBP) enthielt, durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30μl dreifach Laemmli-Puffer gestoppt. Anschließend wurden die Proben 5min gekocht und in einem 13%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der untere Gelteil, der das phosphorylierte MBP enthielt, wurde fixiert (10% Eisessig, 45% Wasser, 45% Methanol), getrocknet und die MBP-Phosphorylierung mittels Autoradiographie visualisiert. Der obere Gelteil wurde für den anti-HA Western Blot verwendet, um die Menge der im Versuch immunpräzipitierten HA-MAPK nachzuweisen.

### 2.2.6. Radioligand-Bindungsmessung

3x10<sup>5</sup> COS-7 Zellen wurden pro well einer 6-well Platte ausgesät und mit verschiedenen Konstrukten, die für den M<sub>2</sub>-Rezeptor kodierten (zur Kontrolle mit pcDNA3), mit der DEAE-Dextran- (siehe Abschnitt 2.2.1.1.) bzw. mit der Polyplus-Methode (siehe Abschnitt 2.2.1.2.) transfiziert. Nach 48h und der Inkubation der Zellen in Serum-freiem Medium über Nacht wurden diese zweimal mit PBS (phosphate buffered saline 20mM HEPES; 0,137M NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) gewaschen. Die Zellen wurden dann mit [<sup>3</sup>H]-N-Methyl-Scopolamin ( [<sup>3</sup>H]-NMS ) und den unmarkierten Liganden (Scopolamin, AQ-RA 741) in PBS-Puffer (Bestandteile wie oben beschrieben) in einem Endvolumen von 1ml pro well für 35min bei 30°C inkubiert. Für Sättigungsexperimente wurde die Konzentration von [<sup>3</sup>H]-NMS zwischen 0,5nM und 5,4nM variiert. Für Konkurrenzexperimente wurden die Zellen mit [<sup>3</sup>H]-NMS (5nM) zusammen mit steigenden

Konzentrationen der unmarkierten Liganden inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10 $\mu$ M unmarkiertem Scopolamin gemessen. Nach 35min wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2N NaOH lysiert. Nach 10min auf Eis erfolgte die Neutralisation mit 2N HCl. Die Proben wurden dann in Szintillationsgefäße überführt, mit Luma Safe Plus (Szintillatorflüssigkeit) versetzt und die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler gemessen.

### **2.2.7. Proliferationstest/ [<sup>3</sup>H]-Thymidin Einbau**

4x10<sup>4</sup> COS-7 Zellen wurden pro well einer 24-well Platte ausgesät und mit Expressionsvektor, der für den M<sub>2</sub>-Rezeptor kodiert, mit der DEAE-Dextran Methode (siehe Abschnitt 2.2.1.1.) transfiziert. Nach 48h erfolgte der Wechsel zu Serum-freiem Medium (für 24h). Danach wurden die Zellen 20h mit EGF oder Carbachol stimuliert und anschließend mit 1 $\mu$ Ci pro well [<sup>3</sup>H]-Td für 4h inkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit eiskaltem PBS (0,137M NaCl; 2,7mM KCl; 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) gewaschen und im Anschluss 30min mit 10% TCA (trichloroacetic acid) inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit 1% TCA und zweimal mit 96%igem Ethanol gewaschen und dann 10min auf Eis unter Schütteln mit 1N NaOH lysiert. Nach der Neutralisierung mit 2N HCl wurden die Proben in Szintillationsgefäße überführt und der [<sup>3</sup>H]-Td Einbau in die neu synthetisierte DNA mit Luma Safe Plus im Flüssigszintillationszähler gemessen.

### **2.2.8. Herstellung kompetenter Zellen, Transformation von E. coli Zellen und Isolation von Plasmid-DNA**

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 3ml LB-Medium ohne Antibiotika mit E.coli XL1-Blue angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1ml dieser Kultur wurde entnommen, in 100ml LB-Medium ohne Antibiotika überimpft und 2-4h auf dem Schüttler (bei 200rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,3-0,6 (bei 600nm) kultiviert. Danach wurde die Kultur für 5min bei 5000rpm zentrifugiert und das Pellet in 10ml TSB (10% PEG 6000, 5% DMSO, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub> und 10mM MnCl<sub>2</sub> in LB-Medium) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Kompetente E.coli Zellen (100 $\mu$ l pro Transformation) wurden auf Eis aufgetaut und zu 10-50ng DNA in 1xKCM Puffer (0,1M KCl; 0,03M CaCl<sub>2</sub>; 0,05M MgCl<sub>2</sub>) pipettiert. Nach dem

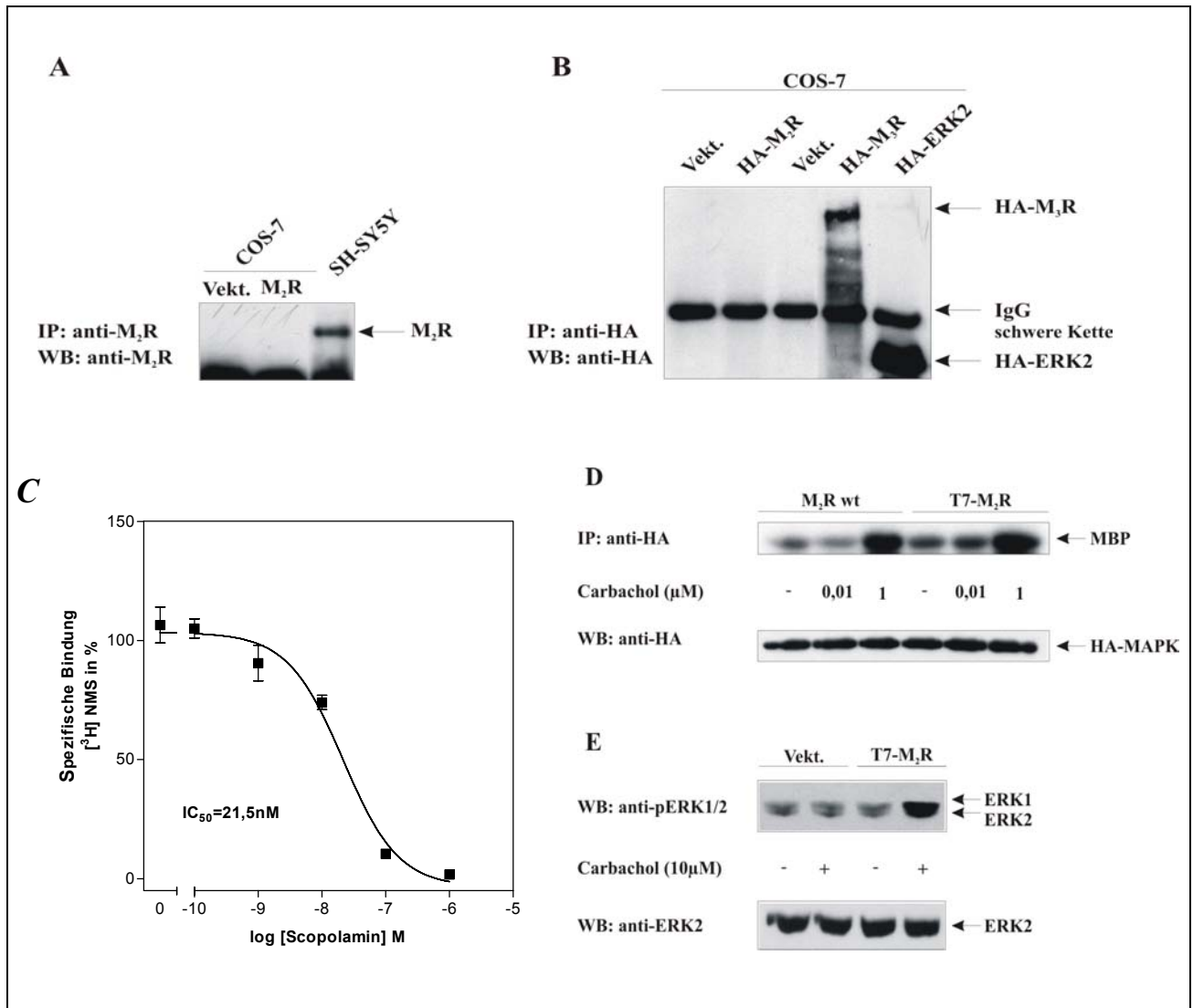
Mischen wurde der Ansatz für 30min auf Eis inkubiert. Nach 10min bei Raumtemperatur wurde 1ml LB-Medium ohne Antibiotika zum Ansatz hinzugegeben und danach 1h bei 37°C inkubiert. Zwischen 10µl und 1ml dieses Ansatzes wurden auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden Einzelkolonien ausgewählt und die Bakterien für eine Plasmid-Maxipräparation in 100ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler (200rpm) kultiviert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 6000xg für 15min bei 4°C geerntet und die Plasmid-Präparation nach dem Protokoll von Quiagen durchgeführt. Das entstandene Pellet wurde in Puffer P1 (50mM Tris-HCl pH8,0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNase A) resuspendiert. Danach wurde der Lysis-Puffer (200mM NaOH; 1% SDS) vorsichtig zugegeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des Neutralisierungspuffer (3M Natriumacetat pH5,5) wurde der Ansatz 20min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann 30min bei 4°C mit 20.000xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nochmals für 15min bei 4°C mit 20.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde auf die mit 750mM NaCl; 50mM MOPS pH7,0; 15% Isopropanol und 0,15% TritonX-100 equilibrierten Säulen gegeben. Danach folgte ein zweimaliges Waschen mit 1M NaCl; 50mM MOPS pH7,0 und 15% Isopropanol und schließlich die Elution der Plasmid-DNA mit 1,25M NaCl; 50mM Tris-HCl pH8,5 und 15% Isopropanol. Die so von bakteriellen Proteinen befreite DNA wurde dann mit Isopropanol präzipitiert und das nach der Zentrifugation (30min bei 4°C mit 15.000xg) entstandene Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das gereinigte und für ca. 5min getrocknete Pellet wurde in 150-250µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Vor der Transfektion von Zellkulturen wurden Konzentration und Reinheit der DNA spektrophotometrisch (bei 260nm/280nm) bestimmt.

Die Elektrophorese der Plasmid-DNA erfolgte mit 1%igen Agarose-Gelen, die mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 2,5µg/ml) versetzt wurden, in 1xTAE Puffer (40mM Tris; Eisessig 1,14ml/l; EGTA 0,03g/l; pH 8) bei einer Spannung von 80V. Für die Elektrophorese wurden die DNA-Proben in Lade-Puffer (10x: 30% Glycerol; 1xTAE; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylen-Glycol) aufgenommen. Um die Größe der Plasmide einzuschätzen, wurde eine 1kb-Leiter (BioLabs) genutzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expression des M<sub>2</sub> muscarinischen Acetylcholin Rezeptors in COS-7 Zellen

Da der M<sub>2</sub>-Rezeptor im zellulären Modell COS-7 nicht endogen exprimiert wird, war für die geplanten Untersuchungen die Transfektion des Rezeptors notwendig. Die immunochemische Kontrolle der Expression des M<sub>2</sub>R erwies sich jedoch als schwierig. Eine Immunpräzipitierung (IP) mit Antikörpern gegen den M<sub>2</sub>R-Wildtyp (Santa Cruz, Oncogene) sowie der anschließende Nachweis im Western Blot (WB) war mit COS-7 Zellen, die den Rezeptor exprimierten, nicht möglich. Im Gegensatz dazu ließ sich der in SH-SY5Y Zellen endogen vorhandene M<sub>2</sub>R unter Verwendung der gleichen Antikörper detektieren (*Abb.3.1.A*). Eine mögliche Ursache könnte die unterschiedliche posttranslationale Prozessierung in den verwendeten Zelltypen sein. Von den in COS-7 Zellen exprimierten amino-terminal Hämagglutinin (HA)-markierten Konstrukten (in pcDNA3.1 Vektor) konnte im Vergleich nach IP mit anti-HA Antikörper nur der M<sub>3</sub>-Rezeptor nachgewiesen werden (Kontrolle: IP von HA-ERK2) (*Abb.3.1.B*). Die Detektion der endogenen bzw. überexprimierten Rezeptor-Subtypen im direkten Western Blot war mit keinem der verwendeten Antikörper möglich (nicht gezeigt). Da der Expressionsnachweis mittels Western Blot auch im Hinblick auf die geplanten Experimente eine einfache und effektive Methode wäre, wurde in COS-7 Zellen ein weiteres Konstrukt (pcDps-T7-M<sub>2</sub>R), das für den amino-terminal T7 markierten humanen M<sub>2</sub>R kodiert, transfiziert. Dieser Rezeptor wurde durch Kompetitions-Bindungsexperimente mit Tritium-markiertem NMS (N-Methyl-Scopolamin) einem mAChR Subtyp-unspezifischen Antagonisten charakterisiert (*Abb.3.1.C*). Auch die M<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelte MAPK-Aktivierung, die in der Literatur beschrieben ist (Winitz *et al.*, 1993), konnte nach der Expression des T7-M<sub>2</sub>R in COS-7 Zellen nachgewiesen werden. *Abb.3.1.D* zeigt die durch das Acetylcholin-Mimetikum Carbachol induzierte ERK2-Stimulation über die Phosphorylierung des Substrats MBP (myelin basic protein). Mittels DEAE-Dextran Transfektion wurde sowohl der Rezeptor als auch die Epitop-markierte p42-MAPK exprimiert. Der mit Hilfe der Polyplus-Transfektion (Biomol) in COS-7 Zellen überexprimierte T7-M<sub>2</sub>R vermittelte die Threonin/Tyrosin Phosphorylierung und damit die Aktivierung der endogen vorkommenden MAPK-Isoformen ERK1/2 (*Abb.3.1.E*). Eine Detektion des Rezeptors mittels eines entsprechenden Antikörpers gegen das T7-Epitop war nicht möglich.



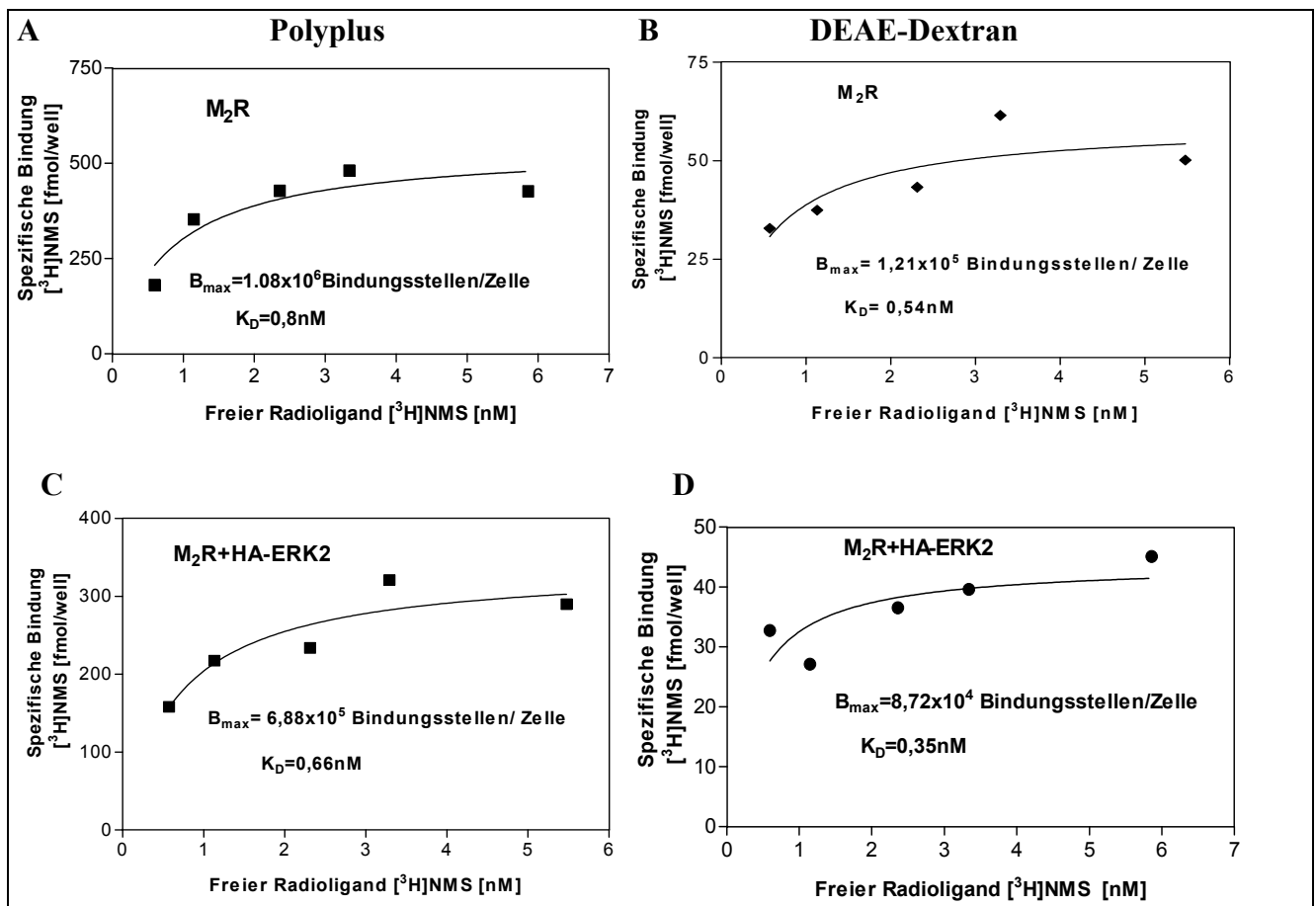
**Abb.3.1. Nachweis der Expression des humanen M<sub>2</sub> muscarinischen Acetylcholin Rezeptors.** COS-7 Zellen wurden mit der DEAE-Dextran Methode **A**, **B**, **C** und **D** bzw. der Polyplus Methode **E** mit **A** leerem Vektor oder pcDps-M<sub>2</sub>Rwt, **B** leerem Vektor, pcDNA3.1-HA-M<sub>2</sub>R, pcDNA3.1-HA-M<sub>3</sub>R oder pcDNA3-HA-ERK2, **C** pcDps-T7-M<sub>2</sub>R, **D** pcDps-M<sub>2</sub>Rwt und pcDNA3-HA-ERK2 bzw. pcDps-T7-M<sub>2</sub>R und pcDNA3-HA-ERK2 und **E** leerem Vektor oder pcDps-T7-M<sub>2</sub>R transfiziert. **A** Aus Lysaten von COS-7 bzw. SH-SY5Y Zellen wurde der M<sub>2</sub>R immunpräzipitiert und im Western Blot durch einen anti-M<sub>2</sub>R Antikörper nachgewiesen. **B** HA-markierte Proteine wurden aus COS-7 Lysaten mit einem Antikörper gegen das Epitop immunpräzipitiert und im Western Blot durch anti-HA Antikörper nachgewiesen. Gezeigt sind in **A** und **B** repräsentative Bilder aus zwei verschiedenen Experimenten. **C** „Displacement“-Bindungsexperiment mit [<sup>3</sup>H]NMS (5nM) und dem Suptyp-unspezifischen muscarinischen Antagonisten Scopolamin. Die Messpunkte stammen aus einem repräsentativen Experiment mit Dreifach-Bestimmung, das einmal wiederholt wurde. Eine Bindung an untransfizierten COS-7 Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. **D** Die transfizierten COS-7 Zellen wurden nach 20h in Serum-freiem Medium für 5min mit Carbachol in den angegebenen Konzentrationen stimuliert und danach lysiert. Die MAPK-Aktivitätsbestimmung erfolgte mit anti-HA Antikörper immunpräzipitierter HA-ERK2 und MBP als Substrat. Die MBP-Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Kontrolle der Immunpräzipitierung erfolgte durch Western Blot mit anti-HA Antikörper. **E** Transfizierte COS-7 Zellen wurden nach 20h in Serum-freiem Medium mit Carbachol (10μM) für 5min stimuliert und danach lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte im direkten Western Blot mit einem phospho-ERK1/2 spezifischen Antikörper und Reblot mit anti-ERK2 Antikörper. Gezeigt sind in **D** und **E** repräsentative Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten.

Zur Untersuchung des Aktivierungsmechanismus der MAPK durch muscarinische Acetylcholin Rezeptoren wurden COS-7 Zellen mit pcDNA3.1-HA-M<sub>2</sub>R bzw. pcDNA3.1-

HA-M<sub>3</sub>R stabil transfiziert. Der durch Radioligand-Bindungsmessung nachweisbare, stabil exprimierte M<sub>3</sub>-Rezeptor war in der Lage, die MAPK zu aktivieren (nicht gezeigt). Die M<sub>3</sub>R-stabil transfizierten COS-7 Zellen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit für verschiedene Experimente verwendet. Die stabile Expression des M<sub>2</sub>-Rezeptors erwies sich als zu gering. Für die weiteren Untersuchungen wurden COS-7 Zellen mit dem Vektor pcDps-M<sub>2</sub>R-wt, der für den Wildtyp-M<sub>2</sub>R kodiert, transient transfiziert.

### 3.1.1. Nachweis des in COS-7 Zellen transient exprimierten M<sub>2</sub>-Rezeptors mittels Radioligand-Bindungsmessung

Die Transfektion der M<sub>2</sub>R-cDNA in COS-7 Zellen wurde mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt.



**Abb.3.2. Sättigungsbinding von [<sup>3</sup>H]NMS an M<sub>2</sub>R transfizierten COS-7 Zellen.** *A* und *C* COS-7 Zellen wurden unter Verwendung von Polyplus mit *A* 1 μg/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R cDNA oder mit *C* 900ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R und 100ng/10<sup>5</sup>Zellen HA-MAPK cDNA und unter Verwendung von DEAE-Dextran mit *B* 200ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R cDNA oder *D* 190ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R cDNA und 40ng HA-MAPK cDNA transfiziert. Die spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]-NMS ist gegen die Konzentration des freien Radioliganden (0,5nM bis 5,4nM) aufgetragen. Eine Bindung von [<sup>3</sup>H]-NMS an untransfizierten COS-7 Zellen konnte nicht detektiert werden. Gezeigt sind Daten eines repräsentativen Experiments mit zweifach Bestimmung der Messwerte. Ähnliche Daten wurden in zwei weiteren Experimenten ermittelt.

Für die Untersuchung des Signaltransduktionsmechanismus des M<sub>2</sub>R war es in vielen Fällen notwendig neben dem Rezeptor weitere Proteine in den Zellen zu exprimieren. Bei der Transfektion des M<sub>2</sub>R mit DEAE-Dextran konnten in Sättigungsexperimenten mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]-N-Methyl-Scopolamin etwa  $1,2 \times 10^5$  Bindungsstellen/Zelle nachgewiesen werden (*Abb.3.2.B*).

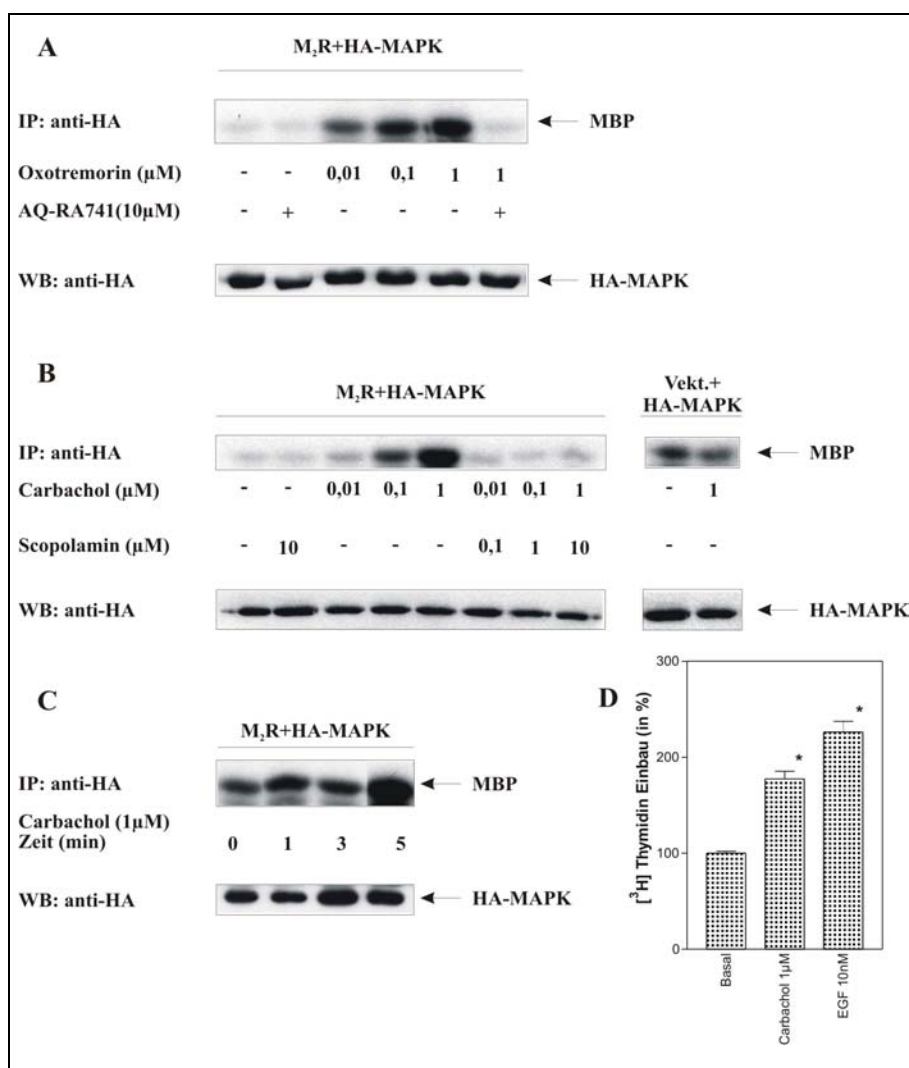
Bei Verwendung von Polyplus (Biomol) als Transfektionsreagenz erhält man ca.  $1,1 \times 10^6$  Bindungsstellen/Zelle (*Abb.3.2.A*). Zur Bildung der kationischen DNA-Komplexe müssen hier allerdings größere DNA-Mengen eingesetzt werden. Der bei der Polyplus-Methode gebildete Polyethylenimin-DNA-Komplex kann durch Endocytose effektiver als entsprechende Dextran-Komplexe in die Zellen transportiert werden. Bei der eingesetzten Dextran-Konzentration (0,3mg/ml) sind die Zellen starkem Stress ausgesetzt. Dies beeinflusst die Expression des Rezeptors ebenfalls negativ. Da die Transfektionseffizienz mit DEAE-Dextran geringer ist, wurde der M<sub>2</sub>R bei Verwendung dieser Methode meist zusammen mit dem zu untersuchenden Zielprotein exprimiert und die auftretenden Effekte mit Hilfe von Enzym-Assays detektiert.

Bei einer Ko-Expression des M<sub>2</sub>R mit anderen Proteinen (HA-ERK2) wurde für beide Transfektionsmethoden eine geringere Zahl an Bindungsstellen pro Zelle nachgewiesen (Polyplus  $6,88 \times 10^5$  Bindungsstellen/Zelle, DEAE-Dextran  $8,72 \times 10^4$  Bindungsstellen/Zelle) (*Abb.3.2.C* und *D*). Es wurden hier allerdings etwas geringere Mengen an M<sub>2</sub>R-cDNA transfiziert, um die vorgeschlagenen optimalen Gesamt-DNA Mengen für die Polyplus- bzw. DEAE-Dextran Methode nicht zu überschreiten und so negative Auswirkungen auf die Expressionseffizienz zu verhindern.

### **3.2. Die MAPK-Aktivierung in M<sub>2</sub>-Rezeptor transfizierten COS-7 Zellen**

Die zusammen mit dem M<sub>2</sub>R überexprimierte HA-p42 MAPK wurde durch das abbaustabile Acetylcholin-Analogon Carbachol und durch den Subtyp-unspezifischen muscarinischen Agonisten Oxotremorin konzentrations-abhängig aktiviert. Die Carbachol und auch die Oxotremorin induzierte ERK-Aktivierung erreichte bei einer Ligand-Konzentration von etwa 1µM ihr Maximum (*Abb.3.3.A* und *B*), wobei Oxotremorin die MAPK schon bei niedrigeren Konzentrationen stärker stimulieren konnte. Bei Carbachol-Konzentrationen von 100µM oder 1mM ist keine weitere Steigerung der MAPK-Aktivität zu beobachten (nicht gezeigt). Die Oxotremorin- bzw. Carbachol-vermittelte ERK-Aktivierung wurde durch den M<sub>2</sub>R Subtyp-spezifischen Antagonisten AQ-RA741 bzw. durch den Subtyp-unspezifischen Antagonisten

Scopolamin inhibiert (*Abb.3.3. A* und *B*). Dieses Ergebnis, sowie die nicht durch Carbachol induzierbare Phosphorylierung des MAPK-Substrates MBP in mit leerem Vektor und HA-MAPK transfizierten COS-7 Zellen, bestätigt, dass die MAPK über den exprimierten M<sub>2</sub>-Rezeptor aktiviert wurde. Eine Ursache für die erhöhte basale MBP-Phosphorylierung in den nur mit HA-ERK2 transfizierten Zellen (*Abb.3.3.B*) könnte die stärkere Expression der MAPK sein. Der Carbachol-stimulierte M<sub>2</sub>R aktivierte ERK nach 5min vollständig (*Abb.3.3.C*). Nach längeren Stimulationszeiten (10min und 15min) war keine Veränderung der MAPK-Aktivität zu beobachten (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse werden durch Daten aus der Literatur unterstützt (Rosenblum *et al.*, 2000).



**Abb.3.3. Konzentrations- und Zeit- abhängige MAPK-Aktivierung durch mAChR-Agonisten.** COS-7 Zellen wurden mit *A* und *C* 190ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R und 40ng/10<sup>5</sup>Zellen HA-MAPK, *B* 190ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R oder 190ng/10<sup>5</sup>Zellen leerem Vektor und 40ng/10<sup>5</sup>Zellen HA-MAPK und *D* 200ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R transfiziert. Die Zellen wurden nach 20h in Serum-freiem Medium mit *A* und *B* den muscarinischen Antagonisten in der angegebenen Konzentration 30min vorinkubiert und danach 5min mit den Agonisten der entsprechenden Konzentration stimuliert und *C* mit 1μM Carbachol für die angegebenen Zeiten stimuliert und danach lysiert. Die MAPK-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach IP der

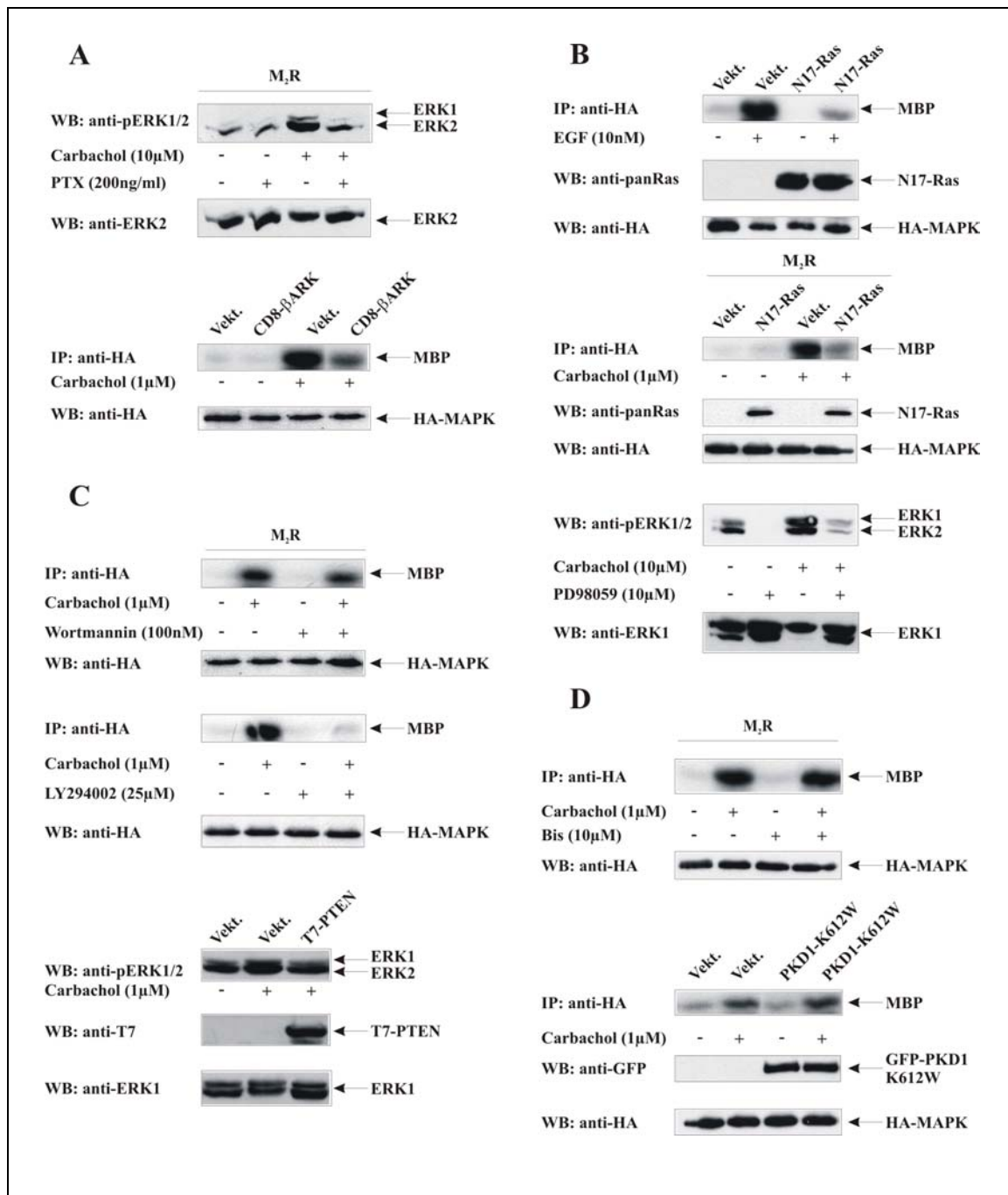
Lysate mit anti-HA Antikörper und MBP als Substrat. Die MBP-Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Kontrolle der IP erfolgte durch WB mit anti-HA Antikörper. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus zwei unabhängigen Experimenten. *D* Nach Inkubation der Zellen in Serum-freiem Medium wurden diese für 20h mit EGF bzw. Carbachol in den angegebenen Konzentrationen stimuliert und dann 4h mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin behandelt. Die Bestimmung des [<sup>3</sup>H]Td Einbau erfolgte durch Messung der TCA-Präzipitate im Flüssigszintillationszähler. Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit jeweils dreifach Bestimmung. \* Statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert (p<0.05, Student's t-Test).



Verschiedene Arbeitsgruppen (Li *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2000) zeigten durch die Verwendung des spezifischen MEK (MAP/ ERK-Kinase)-Inhibitors PD98059 die direkte Beteiligung von ERK1/2 an der Carbachol-vermittelten DNA-Synthese und Zellproliferation. Im [<sup>3</sup>H]-Thymidin Proliferationsassay wurde die über den M<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelte mitogene Wirkung in COS-7 Zellen bestätigt. Die Steigerung der DNA-Synthese nach Carbachol- (1µM) bzw. EGF- (10nM) Stimulation ist allerdings geringer als erwartet. Dies ist durch die Verwendung der für die Zellen teilweise toxischen DEAE-Dextran Transfektion zu erklären (*Abb.3.3.D*).

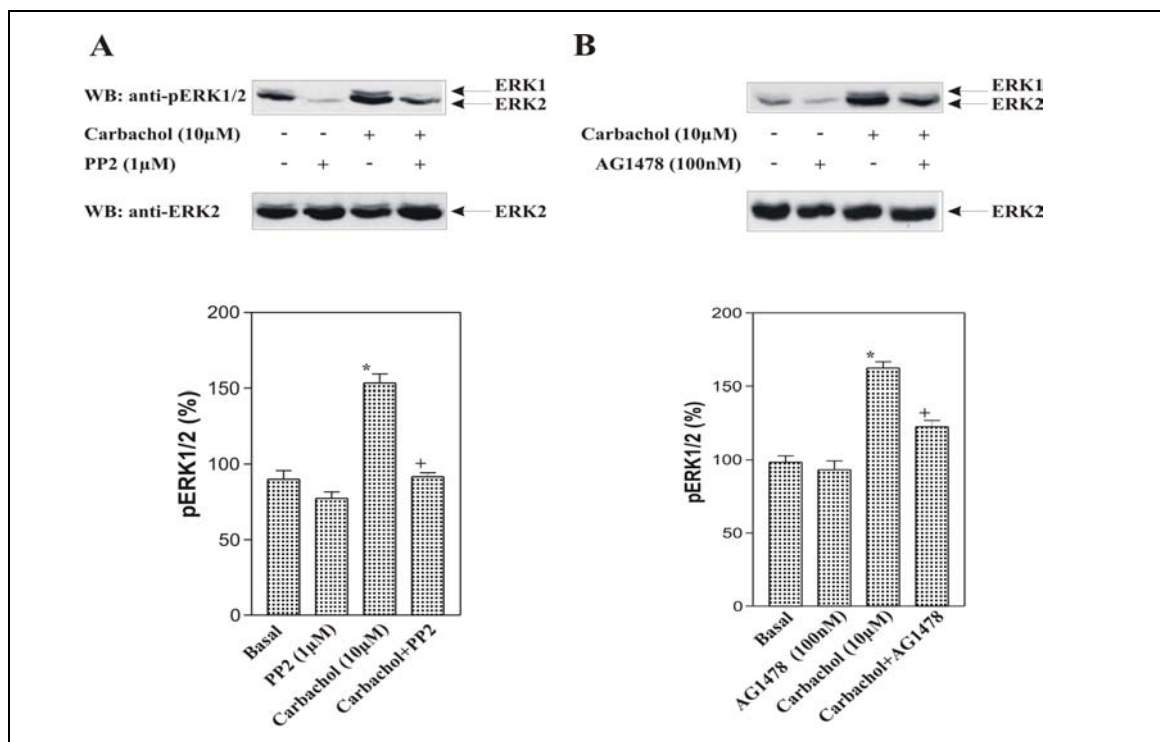
### 3.2.1. Signalproteine der M<sub>2</sub>-Rezeptor induzierten MAPK-Aktivierung

Die durch den Gi-Protein gekoppelten M<sub>2</sub>-Rezeptor induzierte Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 konnte wie erwartet durch Pertussis-Toxin (PTX), das die ADP-Ribosylierung und damit Inaktivierung der meisten α<sub>i</sub>-Untereinheiten katalysiert, inhibiert werden (*Abb.3.4.A*). Die Ko-Expression von M<sub>2</sub>R und CD8-βARK, einer Chimere aus CD8-Rezeptor und Carboxyterminus der β-adrenergen Rezeptorkinase, die vielfach verwendet wird, um βγ-Komplexe zu binden (Crespo *et al.*, 1994), führte ebenfalls zu einer verringerten MAPK-Aktivierung nach Carbachol-Stimulation (*Abb.3.4.A* untere Blots). Damit konnten für das zelluläre Modell COS-7 die aus der Literatur bekannten Daten bestätigt werden. In Signalwegen von RTKs und verschiedenen GPCRs spielt die kleine GTPase Ras für die Anschaltung der MAPK-Kaskade eine wichtige Rolle. Nach Überexpression von N17 Ha-Ras, einer dominant negativen Mutante von Ras, in M<sub>2</sub>R-transfizierten COS-7 Zellen verringerte sich die Phosphorylierung des MAPK-Substrats MBP deutlich (*Abb.3.4.B*). Die starke Ras-Abhängigkeit der M<sub>2</sub>R induzierten ERK-Aktivierung wurde auch im Vergleich mit dem Effekt der dominant negativen Ras-Mutante auf die EGFR-vermittelte MAPK-Aktivität sichtbar (*Abb.3.4.B* obere Blots). „Downstream“ von Ras wurde die Carbachol-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch den MEK-spezifischen Inhibitor PD98059 blockiert (*Abb.3.4.B* untere Blots). Die Behandlung Carbachol-stimulierter, M<sub>2</sub>R-transfizierter COS-7 Zellen mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin bzw. dem auch in hohen Konzentrationen (bis 50µM) noch spezifischen PI3-K-Inhibitor LY294002 führte zu einer verringerten MAPK-Stimulation (*Abb.3.4.C*), was die Beteiligung von PI3-kinasen an der M<sub>2</sub>R-induzierten ERK-Aktivierung bestätigt. Die hemmende Wirkung von LY294002 war deutlich stärker als die des Wortmannin. Eine mögliche Ursache für dieses Resultat könnten die im Experiment verwendeten Konzentrationen sowohl von Carbachol als auch die der beiden verwendeten Inhibitoren sein.



**Abb.3.4. Charakterisierung der M<sub>2</sub>R induzierten MAPK-Aktivierung in COS-7Zellen.** Die Zellen wurden in **A** mit (unter Verwendung von Polyplus) 1µg M<sub>2</sub>R bzw. 150ng M<sub>2</sub>R, 40ng HA-MAPK und 100ng CD8-βARK oder leerem Vektor, in **B** mit 40ng HA-MAPK, 75ng N17-Ras oder leerem Vektor, mit 150ng M<sub>2</sub>R, 40ng HA-MAPK, 75ng N17-Ras oder leerem Vektor und mit 200ng M<sub>2</sub>R, in **C** mit 150ng M<sub>2</sub>R, 40ng HA-MAPK bzw. mit 200ng M<sub>2</sub>R, 75ng T7-PTEN oder leerem Vektor und in **D** mit 150ng M<sub>2</sub>R, 40ng HA-MAPK bzw. mit 150ng M<sub>2</sub>R, 40ng HA-MAPK, 100ng GFP-PKD1-K612W oder leerem Vektor transfiziert (alle Angaben pro 10<sup>5</sup>Zellen). Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen für 30min mit den entsprechenden Inhibitoren in der angegebenen Konzentration vorinkubiert (PTX-Vorinkubation 22h) und dann 5min mit Carbachol der angegebenen Konzentration stimuliert. Die MAPK-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach IP der Lysate mit anti-HA Antikörper und MBP als Substrat. Die MBP-Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Kontrolle der IP erfolgte durch WB mit anti-HA Antikörper. Die Analyse der Lysate erfolgte zum Teil auch im direkten Western Blot mit phospho-ERK1/2 spezifischem Antikörper und Reblot mit anti-ERK1 oder anti-ERK2 Antikörper. Weiterhin wurden die Lysate im direkten Western Blot mit monoklonalen Antikörpern in **B** anti-pan Ras Antikörper, in **C** anti-T7 Antikörper und in **D** anti-GFP Antikörper kontrolliert. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus vier (**A** und **B**), drei (**D**) bzw. zwei (**C**) verschiedenen Experimenten.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der direkten Detektion der ERK1/2-Phosphorylierung nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Ko-Expression einer Epitop-markierten PTEN (phosphatase and tensin homolog), die den PI3-K Signalweg durch Dephosphorylierung membranständiger Phosphatidyl-Inositol- und cytoplasmatischer Inositol-Phosphat-Formen negativ regulieren kann, und des M<sub>2</sub>R führte zu einer Verminderung der Carbachol-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung (*Abb.3.4.C* untere Blots). Der PKC-Inhibitor Bis (Bisindolylmaleimid) zeigte keinen Effekt auf die M<sub>2</sub>R-vermittelte MAPK-Stimulation (*Abb.3.4.D* obere Blots). „Bis“ ist vor allem ein spezifischer Inhibitor der klassischen PKC-Isoformen (Gekeler *et al.*, 1996). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Proteinkinase D (PKD) „downstream“ verschiedener neuer PKC-Isoformen in die Regulation von ERK involviert ist (Brändlin *et al.*, 2002) und die Stimulation einiger GPCRs die Membran-Translokation der PKD vermittelt (Rey *et al.*, 2001). Um die Bedeutung von PKC und PKD für den M<sub>2</sub>R-Signalweg näher zu untersuchen erfolgte die Ko-Transfektion des Rezeptors und einer dominant negativen Mutante der Proteinkinase D1 (PKD1) in COS-7 Zellen.



**Abb.3.5. Einfluss von Src Kinase –und EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die M<sub>2</sub>R vermittelte MAPK-Aktivierung.** COS-7 Zellen wurden mit Polyplus mit 1 $\mu$ g M<sub>2</sub>R pro 10<sup>5</sup>Zellen transfiziert. Nach 20h in Serumfreiem Medium wurden die Zellen für 30min mit den entsprechenden Inhibitoren in der angegebenen Konzentration vorinkubiert und dann 5min mit Carbachol der angegebenen Konzentration stimuliert. Die Analyse der Lysate erfolgte im direkten Western Blot mit einem phospho-ERK1/2 spezifischem Antikörper und Reblot mit anti-ERK2 Antikörper. Die Daten für die Quantifizierung in *A* und *B* (\*statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert; + signifikante Hemmung der Carbachol-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung;  $p < 0.05$ , Student's t-Test) stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

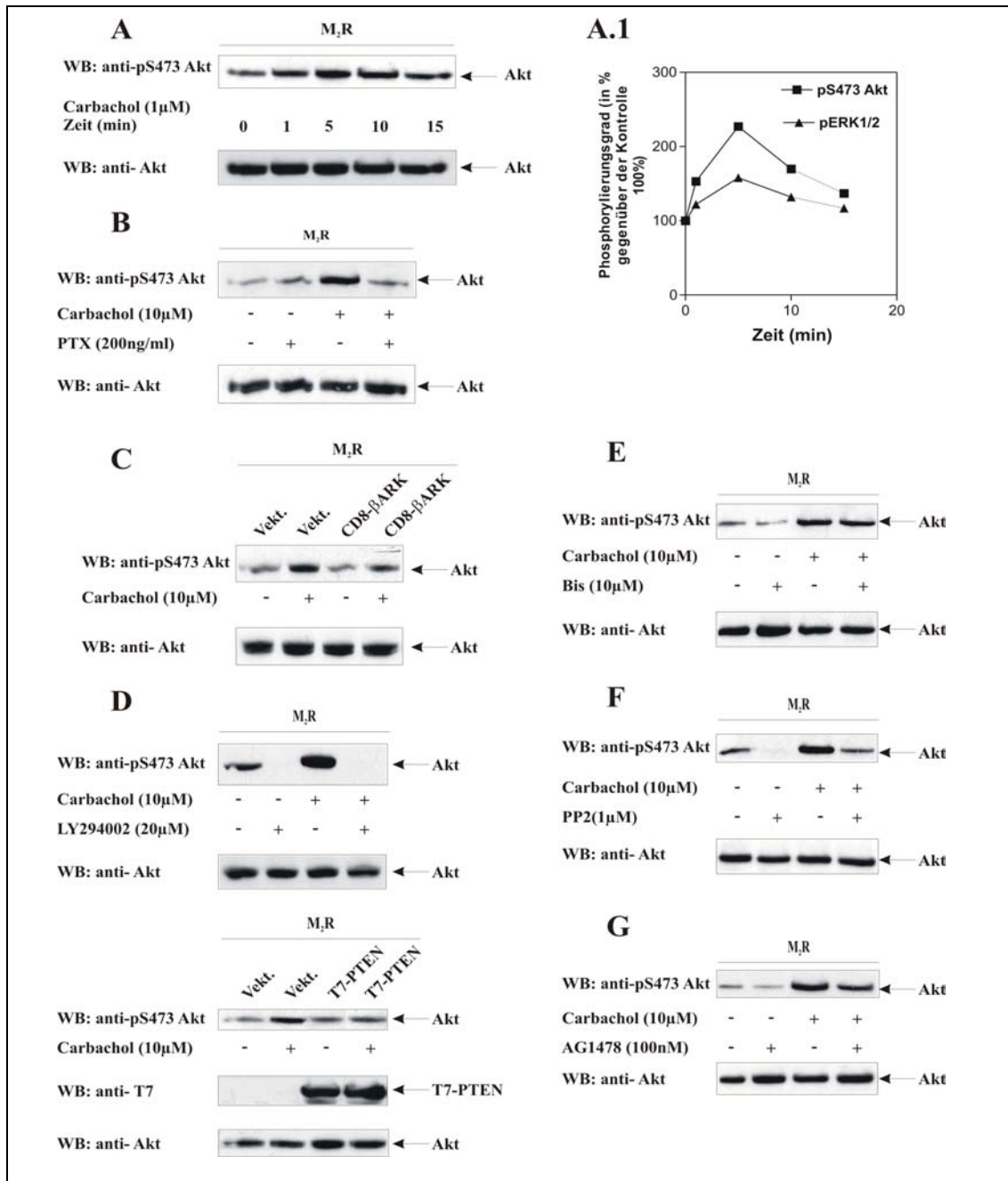
Die Expression der PKD-Mutante hatte keinen Einfluß auf die Carbachol-induzierte ERK-Aktivierung (*Abb.3.4.D* untere Blots). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der Signalweg des M<sub>2</sub>R zur MAPK unabhängig von PKC bzw. PKD abläuft. Die Phosphorylierung von ERK1/2 infolge der Stimulation des M<sub>2</sub>R wurde durch den spezifischen EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 gehemmt (*Abb.3.5.B*), d.h. der in COS-7 Zellen endogen vorkommende EGFR ist an der Carbachol-induzierten ERK-Stimulation beteiligt. Die M<sub>2</sub>R-vermittelte MAPK-Aktivierung konnte durch PP2, einen Inhibitor der Src-Kinase-Familie, gehemmt werden (*Abb.3.5.A*). Dies spricht für eine Beteiligung von Src-Kinasen am Signalweg des M<sub>2</sub>-Rezeptors zur MAPK. Ähnliche Effekte von AG1478 und PP2 auf die Carbachol-stimulierte ERK2-Aktivität konnten auch im MBP-Phosphorylierungsassay nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen eingesetzt, wie sie häufig in der Literatur beschrieben sind (Daub *et al.*, 1997).

Die durch den in COS-7 Zellen exprimierten Gi-Protein gekoppelten M<sub>2</sub>-Rezeptor induzierte MAPK-Aktivierung wurde über  $\beta\gamma$ -Komplexe vermittelt und erfolgte in Ras-abhängiger, PKC unabhängiger Weise. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Daub *et al.* konnte gezeigt werden, dass PI3-Kinasen, cytoplasmatische Src-Kinasen und der EGFR am Signalweg des M<sub>2</sub>R zur MAPK beteiligt sind.

### 3.3. Die M<sub>2</sub>R-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B/ Akt

Die Serin/Threonin-Proteinkinase B/Akt, die in die Regulation von Zellzyklus und Apoptose involviert ist, stellt neben der MAPK ein weiteres wichtiges Zielmolekül der M<sub>2</sub>R-Signaltransduktion dar (Murga *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung des Serin-Restes 473 im carboxyterminalen Teil der Kinasedomäne von Akt, die essentiell für deren Aktivierung ist, wurde bei den Experimenten zur Charakterisierung der M<sub>2</sub>R-induzierten Akt-Aktivierung genutzt. Der verwendete anti-pS473 Antikörper ist in der Lage, die Phosphorylierung entsprechender Serin-Reste der in COS-7 Zellen endogen exprimierten PKB/Akt zu detektieren. Der Carbachol-stimulierte M<sub>2</sub>R konnte die Serin-Phosphorylierung von Akt nach einer Zeit von 5min am stärksten stimulieren (*Abb.3.6.A*). Nach einer Carbachol-Stimulationszeit von 15min war eine Abnahme der Phosphorylierung und damit Akt-Aktivierung zu beobachten. Die Kinetik der M<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten Akt-Aktivierung ist damit in etwa mit der Kinetik der Carbachol-stimulierten ERK1/2-Phosphorylierung (*Abb.3.6.A.1*) vergleichbar. Die M<sub>2</sub>R-induzierte Akt-Aktivierung konnte bei Carbachol-

Konzentrationen von  $1\mu\text{M}$  bzw.  $10\mu\text{M}$ , die auch bei den vorhergehenden Experimenten eingesetzt wurden, nachgewiesen werden. Pertussis-Toxin hemmte die Carbachol-stimulierte Akt Serin-Phosphorylierung nahezu vollständig (*Abb.3.6.B*).



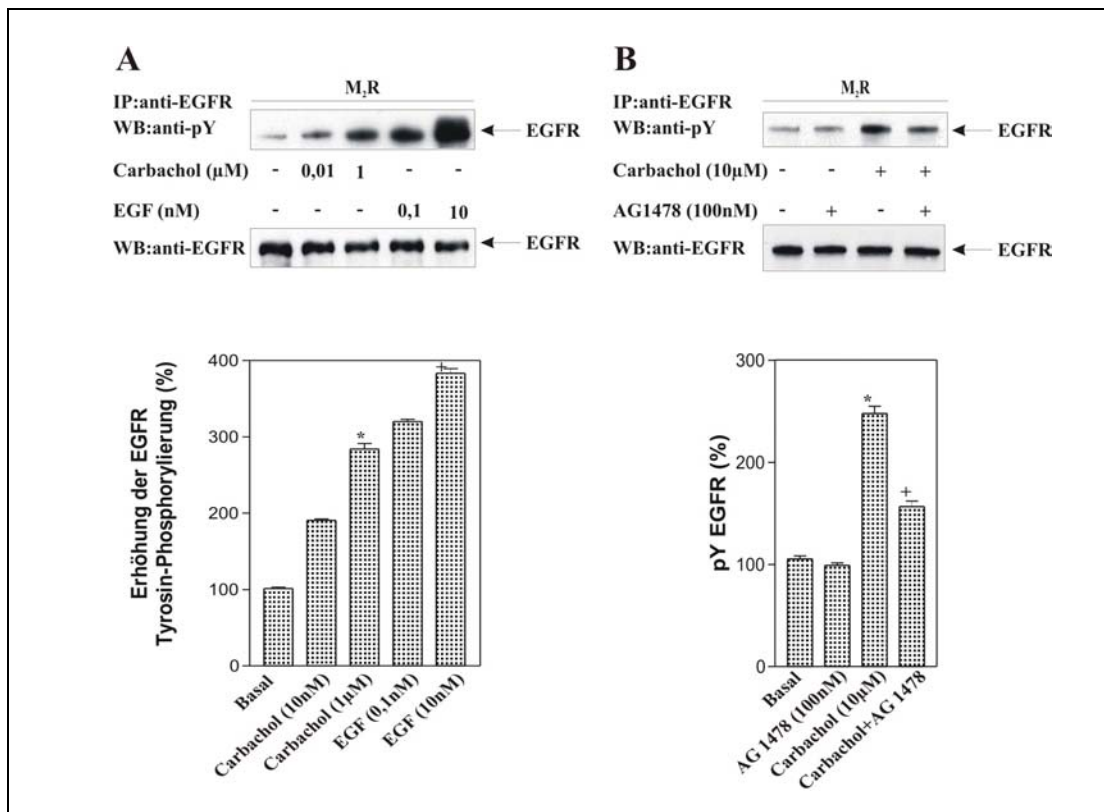
**Abb.3.6. Charakterisierung der M<sub>2</sub>R-vermittelten PKB/Akt-Aktivierung im Expressionsmodell COS-7 Zellen.** Die Zellen wurden **A** mit der Dextran-Methode und **B** bis **G** mit der Polyplus-Methode mit **A** 200ng M<sub>2</sub>R, **B** 1 $\mu\text{g}$  M<sub>2</sub>R, **C** 800ng M<sub>2</sub>R und 200ng leerem Vektor bzw. 800ng M<sub>2</sub>R und 200ng CD8- $\beta$ ARK, **D** 1 $\mu\text{g}$  M<sub>2</sub>R oder 800ng M<sub>2</sub>R und 200ng leerem Vektor bzw. 800ng M<sub>2</sub>R und 200ng T7-PTEN und **E** bis **G** mit 1 $\mu\text{g}$  M<sub>2</sub>R transfiziert (alle Angaben pro  $10^5$  Zellen). Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen mit den Inhibitoren der angegebenen Konzentration 30min (PTX: 22h) vorinkubiert und dann 5min mit Carbachol stimuliert. Die Analyse der Lysate erfolgte im Western Blot mit einem Phospho-Akt Antikörper gegen den Serin-Rest473. Der Reblot wurde mit einem polyklonalen anti-Akt Antikörper durchgeführt. In **D** wurden die Lysate im WB mit einem monoklonalen Antikörper gegen das T7-Epitop kontrolliert. Gezeigt sind in **A** bis **D** repräsentative Daten aus drei verschiedenen Experimenten in **E**, **F** und **G** aus vier verschiedenen Experimenten. In **A.1** ist der Vergleich der Kinetik der Carbachol-induzierten Akt- und ERK1/2-Aktivierung dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei verschiedenen Experimenten.

Dies ist ein Beweis dafür, dass die PKB über den exprimierten Gi-Protein gekoppelten M<sub>2</sub>-Rezeptor aktiviert wurde. Die Ko-Expression von M<sub>2</sub>R und des „βγ-Scavengers“ CD8-βARK in COS-7 Zellen führte zu einer Verminderung der Carbachol-induzierten Akt-Phosphorylierung (*Abb.3.6.C*), d.h. βγ-Komplexe sind am M<sub>2</sub>R-Signalweg zur PKB/Akt-Aktivierung wie auch am Signalweg zur ERK-Aktivierung beteiligt (*Abb.3.4.A*). PI3-Kinasen sind bei der M<sub>2</sub>R vermittelten Akt-Stimulation von entscheidender Bedeutung. Sowohl der eingesetzte spezifische PI3K-Inhibitor LY294002 als auch die Ko-Expression von M<sub>2</sub>R und der Protein- und Lipidphosphatase PTEN, die ein bedeutender negativer Regulator des PI3-K/Akt-Signalweges ist, führte zu einer deutlich verringerten Akt-Phosphorylierung nach Stimulation mit Carbachol (*Abb.3.6.D*). Der eingesetzte PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid zeigte keinen Effekt auf die M<sub>2</sub>R-induzierte Akt-Aktivierung (*Abb.3.6.E*). Die Proteinkinase C scheint also im M<sub>2</sub>R/Akt-Signalweg im verwendeten zellulären Modell COS-7 keine Rolle zu spielen. Bei den Untersuchungen zeigte sich das EGFR und cytoplasmatische Src-Kinasen in die Aktivierung der PKB/Akt durch den M<sub>2</sub>R involviert sind. Der Src-Kinase-Familie Inhibitor PP2 reduzierte die Carbachol-induzierte Akt-Serin-Phosphorylierung nahezu vollständig (*Abb.3.6.F*). Hierbei ist allerdings auch der Eigeneffekt von PP2 bei der eingesetzten Inhibitor-Konzentration von 1 μM zu berücksichtigen. Die M<sub>2</sub>R-induzierte Akt-Aktivierung wurde durch den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 gehemmt (*Abb.3.6.G*). Es zeigte sich, dass der Carbachol-stimulierte Gi-Protein gekoppelte M<sub>2</sub>-Rezeptor die Proteinkinase B/Akt über βγ-Komplexe in PI3K-abhängiger Weise aktiviert. Die M<sub>2</sub>R-induzierte Akt-Phosphorylierung war PKC-unabhängig, wurde aber durch den EGFR und Src-Kinasen vermittelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass PKB/Akt und MAPK (ERK1/2) wichtige Zielmoleküle des in COS-7 Zellen exprimierten M<sub>2</sub>-Rezeptor darstellen. βγ-Komplexe, Src-Kinasen, der EGFR und PI3-Kinasen sind Vermittler der mitogenen Signalwege des M<sub>2</sub>-Rezeptors. Die M<sub>2</sub>R-induzierte Aktivierung von PKB und MAPK wurde auch bei den weiteren Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung verschiedener Mediatoren im M<sub>2</sub>R-Signalweg genutzt.

### **3.4. Der M<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt die Transaktivierung des EGFR**

Wie aus der Literatur bekannt ist (Daub *et al.*, 1997) und in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt werden konnte, ist der EGFR an der M<sub>2</sub>R-induzierten ERK- bzw. PKB/Akt-Aktivierung beteiligt. *Abb.3.7.A* zeigt die Zunahme Tyrosin-Phosphorylierung des in COS-7 Zellen endogen exprimierten EGFR nach Stimulation des M<sub>2</sub>R mit dem

Acetylcholin-Analogen Carbachol. Diese fällt geringer aus als die EGF-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors und dies selbst bei einer EGF-Konzentration von nur 0,1nM. Die M<sub>2</sub>R-induzierte Transaktivierung des EGFR war nach einer Stimulationsdauer von fünf Minuten mit 1µM Carbachol, was der Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der vorhergehenden Experimente entspricht, sichtbar.

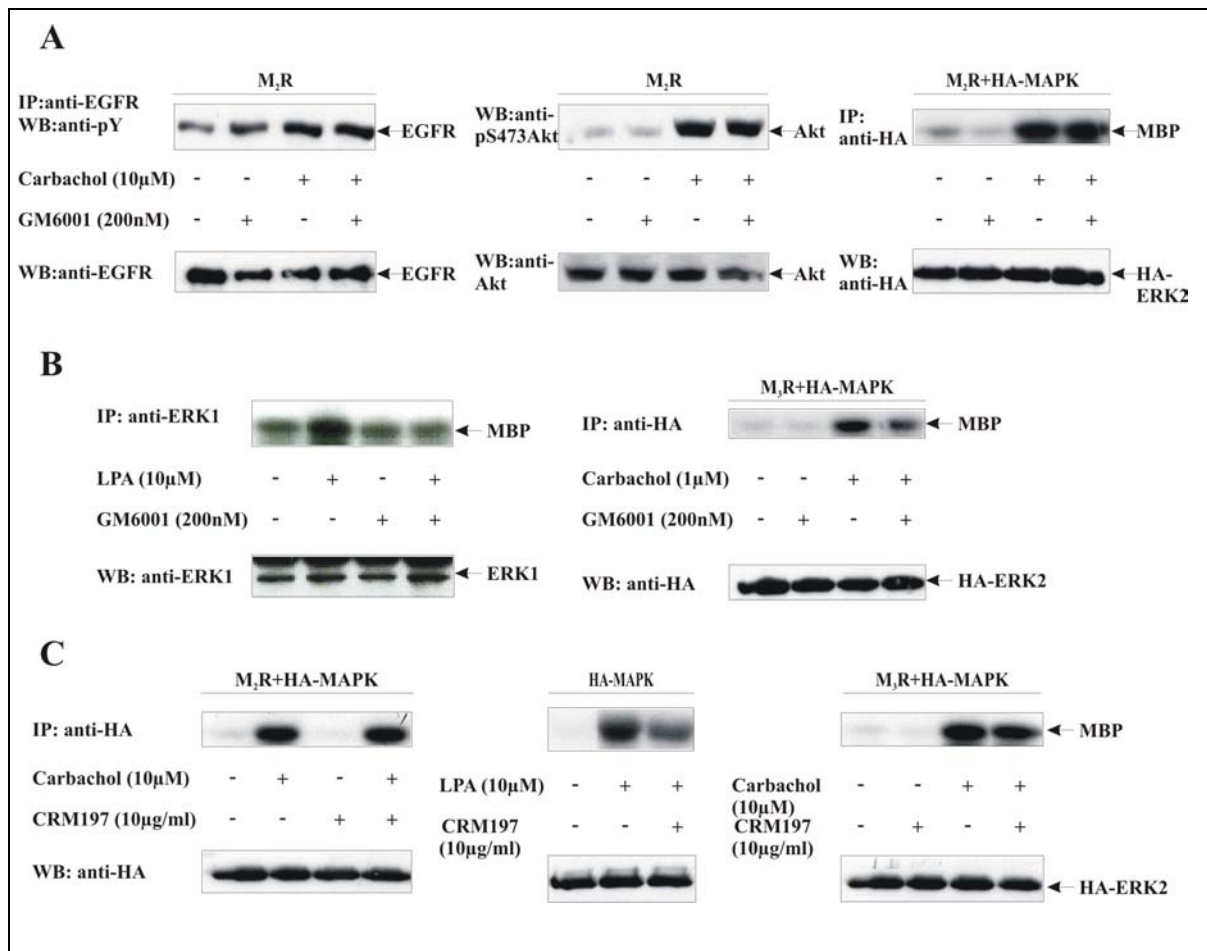


**Abb.3.7. Carbachol-induzierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung in COS-7 Zellen.** Die Zellen wurden mit 200ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen in **B** mit AG1478 der angegebenen Konzentration 30min vorinkubiert und danach in **A** und **B** mit Carbachol bzw. EGF in den entsprechenden Konzentrationen 5min stimuliert. Aus den Lysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper (mAb425 Merck) immunpräzipitiert. Die IP wurde im Western Blot mit einem anti-phospho-Tyr-Antikörper (4G10) analysiert. Die Kontrolle der IP erfolgte mit einem anti-EGFR Antikörper. Die Daten für die Quantifizierung in **A** (\*statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert; + statistisch signifikant höher im Vergleich zur Carbachol-Stimulation; p<0.05, Student's t-Test). und **B** (\*statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert; + signifikante Hemmung der Carbachol-induzierten EGFR Tyrosin-Phosphorylierung; p<0.05, Student's t-Test) stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Dies stimmt im wesentlichen mit den Daten aus der Literatur überein (Daub *et al.*, 1997). Der spezifische EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 war in der Lage die Carbachol-stimulierte EGFR-Tyrosin-Phosphorylierung zu hemmen (Abb.3.7.B).

### 3.4.1. Die M<sub>2</sub>R-vermittelte Transaktivierung des EGFR ist Ligand-unabhängig

Die GPCR-induzierte MMP-Aktivierung und nachfolgend die Freisetzung membranständiger EGFR-Ligand Vorstufen, wie z.B. HB-EGF (Heparin Binding-EGF), ist ein postulierter EGFR-Transaktivierungsmechanismus. GM-6001, ein Breitbandspektrum-Inhibitor von Matrix-Metalloproteinasen (Yoshisue *et al.*, 2004), zeigte keinen hemmenden Effekt auf die Carbachol-induzierte EGFR-Tyrosin-Phosphorylierung sowie die Akt- bzw. MAPK-Aktivierung in COS-7 Zellen, die den M<sub>2</sub>-Rezeptor exprimierten (*Abb.3.8.A*).



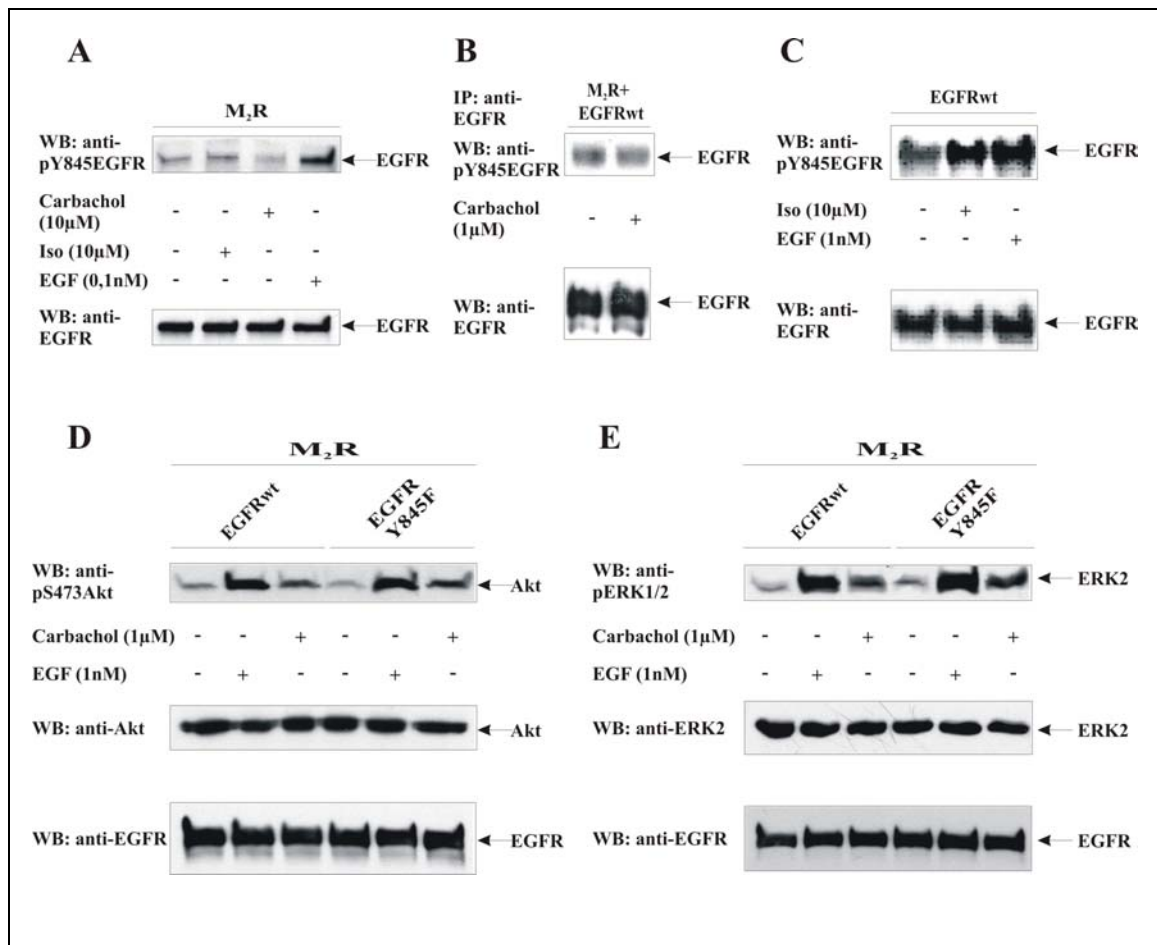
**Abb.3.8. Einfluss von MMPs und HB-EGF bei der M<sub>2</sub>R-induzierten EGFR-Transaktivierung.** COS-7 Zellen wurden mit 200ng M<sub>2</sub>R oder 180ng M<sub>2</sub>R und 40ng HA-MAPK bzw. 180ng M<sub>3</sub>R und 40ng HA-MAPK oder nur 40ng HA-MAPK für die MAPK-Aktivitätsbestimmung transfiziert (alle Angaben pro 10<sup>5</sup>Zellen). Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen mit GM-6001 oder CRM197 der angegebenen Konzentration 30min vorinkubiert und danach mit Carbachol oder LPA 5min stimuliert. Aus den Lysaten wurde in **A** der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper (mAb425 Merck) immunpräzipitiert. Die IP wurde im Western Blot mit einem anti-phospho-Tyr-Antikörper (4G10) analysiert. Die Kontrolle der IP erfolgte mit einem anti-EGFR Antikörper. Die Lysate wurden in **A** mit einem anti-pS473Akt Antikörper analysiert. Der Reblot erfolgte mit einem anti-Akt Antikörper. Die MAPK-Aktivitätsbestimmung (**A**, **B**, **C**) erfolgte nach IP der Lysate mit anti-HA Antikörper und MBP als Substrat. Die MBP-Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Kontrolle der IP erfolgte durch WB mit anti-HA Antikörper. Gezeigt sind in **A** repräsentative Bilder aus vier bzw. in **B** und **C** drei verschiedenen Experimenten. Die Blots in **B**, die den Einfluss von GM-6001 auf die endogene LPA-induzierte ERK1-Aktivität zeigen wurden durch S. Drube zur Verfügung gestellt.



Im Gegensatz dazu wurde die durch den endogenen Gi-Protein gekoppelten LPA- bzw. die durch den überexprimierten Gq-Protein gekoppelten muscarinischen M<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelte MAPK-Aktivierung in COS-7 Zellen durch GM-6001 gehemmt (*Abb.3.8.B*). Daraus kann man schließen, dass die Transaktivierung des EGFR durch den M<sub>2</sub>-Rezeptor in unserem zellulären Modell MMP-unabhängig ist. CRM197, eine nicht toxische Mutante des Diphtherie-Toxin, ist in der Lage, an HB-EGF zu binden und damit dessen mitogene Aktivität spezifisch zu inhibieren (Mitamura *et al.*, 1995). Die M<sub>2</sub>R-vermittelte MAPK-Aktivierung war durch CRM197 nicht hemmbar (*Abb.3.8.C*). Im Vergleich inhibierte das mutierte Diphtherie-Toxin die LPA- und auch die durch den Carbachol-stimulierten M<sub>3</sub>-Rezeptor-induzierte ERK-Aktivierung (*Abb.3.8.C*). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Transaktivierung des EGFR im M<sub>2</sub>R-Signalweg nicht durch HB-EGF vermittelt wird.

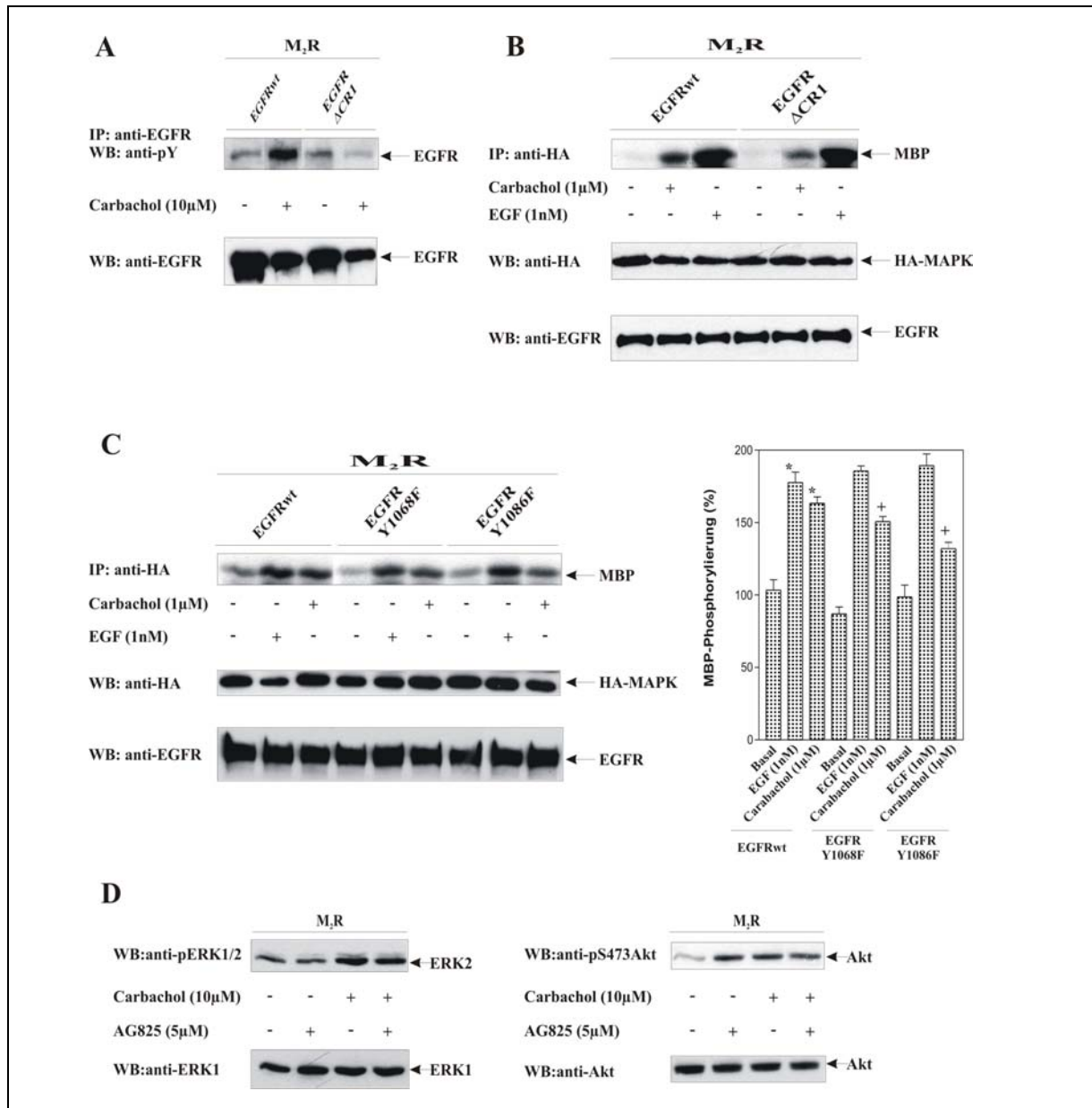
### **3.4.2. Der M<sub>2</sub>R-Signalweg ist unabhängig von der Phosphorylierung des EGFR am Src-spezifischen Tyrosin-Rest 845**

Der Src-Kinase Inhibitor PP2 hemmte die M<sub>2</sub>R-vermittelte ERK- und PKB Aktivierung (siehe Abschnitt 3.2.1. bzw. 3.3.) Um die Rolle von c-Src bei der Carbachol-induzierten EGFR Transaktivierung, die ebenfalls in den mitogenen Signalweg des M<sub>2</sub>R involviert ist, näher zu charakterisieren, wurde der Tyrosin-Rest 845 des EGFR, eine c-Src-spezifische Phosphorylierungsstelle (Biscardi *et al.*, 1999), genutzt. Der Carbachol-stimulierte M<sub>2</sub>-Rezeptor war nicht in der Lage, die Phosphorylierung des EGFR am Tyrosin-Rest 845 zu vermitteln. Dies konnte mit Hilfe eines phospho-spezifischen Antikörpers gegen diesen Tyrosin-Rest nachgewiesen werden. *Abb.3.9.A* zeigt, dass weder Carbachol noch der mit Isoproterenol stimulierte  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptor die Phosphorylierung von Tyrosin 845 des in COS-7 Zellen endogen exprimierten EGFR induzieren konnten. Auch bei einer Ko-Expression des humanen Wildtyp-EGFR und des M<sub>2</sub>R in COS-7 Zellen war keine Carbachol-stimulierte Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 845 des EGFR detektierbar (*Abb.3.9.B*). Im Gegensatz dazu vermittelte der  $\beta$ 2-AR die Phosphorylierung von Tyrosin 845 des überexprimierten EGFR (*Abb.3.9.C*). Die Unterschiede zwischen M<sub>2</sub>R- und  $\beta$ 2-AR-transaktiviertem EGFR und dessen Einfluss auf das weitere mitogene „signaling“ beider Rezeptoren werden in der Diskussion ausführlicher gegenübergestellt. Um die Bedeutung der Phosphorylierung von Y845 des EGFR für die M<sub>2</sub>R-vermittelte Transaktivierung zu charakterisieren, wurde ebenfalls eine EGFR-Mutante genutzt, bei der Tyrosin an Position 845 durch Phenylalanin ersetzt wurde (EGFR Y845F) (Biscardi *et al.*, 1999).



**Abb.3.9. Die Rolle der Src-spezifischen EGFR-Phosphorylierungsstelle Y845 bei der M<sub>2</sub>R-vermittelten EGFR-Transaktivierung bzw. bei der M<sub>2</sub>R-induzierten Akt- und ERK-Phosphorylierung.** Die Zellen wurden mit in **A** 200ng M<sub>2</sub>R, **B** 180ng M<sub>2</sub>R und 20ng EGFRwt, **D** und **E** 10ng EGFRwt und 180ng M<sub>2</sub>R bzw. 100ng EGFR Y845F und 180ng M<sub>2</sub>R (alle Angaben pro 10<sup>5</sup>Zellen) transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen mit Carbachol, Isoproterenol oder EGF der angegebenen Konzentration 5min stimuliert. Aus den Lysaten wurde in **B** der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper (mAb425 Merck) immunpräzipitiert. In **A** und **B** erfolgte die Analyse der Lysate durch Western Blot mit einem phosphospezifischem Antikörper gegen Y845 des EGFR. Die Kontrolle erfolgte im WB mit einem anti-EGFR Antikörper. Die Lysate in **D** und **E** wurden mit anti-phospho ERK1/2 bzw. anti-pS473Akt Antikörper analysiert. Der Reblot erfolgte mit anti-ERK2 bzw. anti-Akt Antikörper. Die Expression des EGFR wurde durch direkten WB mit anti-EGFR Antikörper kontrolliert. Gezeigt sind in **B** Blots aus fünf, in **A**, **D** und **E** aus drei unabhängigen Experimenten. Die Daten in **C** wurden durch S. Drube zur Verfügung gestellt.

Beim Vergleich der Carbachol-stimulierten Akt- und ERK-Aktivität in COS-7 Zellen, die M<sub>2</sub>R und Wiltyp-EGFR bzw. M<sub>2</sub>R und Y845F-EGFR überexprimierten, wurden keine Unterschiede sichtbar (**Abb.3.9. D** und **E**). Zur weiteren Untersuchung der Carbachol-induzierten EGFR-Transaktivierung und deren Rolle im M<sub>2</sub>R-Signalweg wurden die Effekte verschiedener anderer EGFR-Mutanten, die zusammen mit dem muscarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptor in COS-7 Zellen exprimiert wurden, auf die MAPK-Aktivierung getestet. Die EGFR-Dimerisierungsmutante ΔCR1, welche die Tyrosin-Kinase Aktivität und damit auch die weitere Signal-Kompetenz des Rezeptors negativ moduliert (Garrett *et al.*, 2002), verringerte die durch den M<sub>2</sub>R vermittelte Aktivierung der MAPK (**Abb.3.10.B**).



**Abb.3.10. Einfluss verschiedener EGFR-Mutanten auf die Carbachol-induzierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung bzw. MAPK-Aktivierung.** COS-7 Zellen wurden mit in **A** 180ng M<sub>2</sub>R und 10ng EGFRwt bzw. 90ng EGFR ΔCR1, **B** 180ng M<sub>2</sub>R, 40ng HA-MAPK und 10ng EGFRwt bzw. 90ng EGFR ΔCR1, **C** 180ng M<sub>2</sub>R, 40ng HA-MAPK und 20ng EGFRwt bzw. 40ng EGFR Y1068F oder 40ng EGFR Y1086F (alle Angaben pro 10<sup>5</sup> Zellen) transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen mit Carbachol oder EGF der angegebenen Konzentration 5min stimuliert. **A** Aus den Lysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalem Antikörper (mAb425 Merck) immunpräzipitiert. Die IP wurde im Western Blot mit einem anti-phospho-Tyr-Antikörper (4G10) analysiert. Die Kontrolle der IP erfolgte mit einem anti-EGFR Antikörper. **A** und **B** Die MAPK-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach IP der Lysate mit anti-HA Antikörper und MBP als Substrat. Die MBP-Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Kontrolle der IP erfolgte durch WB mit anti-HA Antikörper. Die Expression des EGFR wurde durch direkten WB mit anti-EGFR Antikörper kontrolliert. **D** Hemmung der M<sub>2</sub>R vermittelten ERK/ Akt-Aktivierung durch AG825. COS-7 Zellen wurden mit der Polyplus-Methode mit 1μg/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen mit AG825 der angegebenen Konzentration 30min vorinkubiert und danach mit Carbachol 5min stimuliert. Die Lysate wurden mit anti-phospho ERK1/2 bzw. anti-pS473Akt Antikörper analysiert. Der Reblot erfolgte mit anti-ERK1 bzw. anti-Akt Antikörper. Gezeigt sind in **A**, **B** und **D** Daten aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Daten für die Quantifizierung in **C** (\*statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert; + signifikant niedrigere Carbachol-induzierte MBP-Phosphorylierung in Zellen, die mit EGFR Y1068F bzw. EGFR Y1086F transfiziert wurden, im Vergleich zu Zellen mit EGFRwt; p<0.05, Student's t-Test) stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

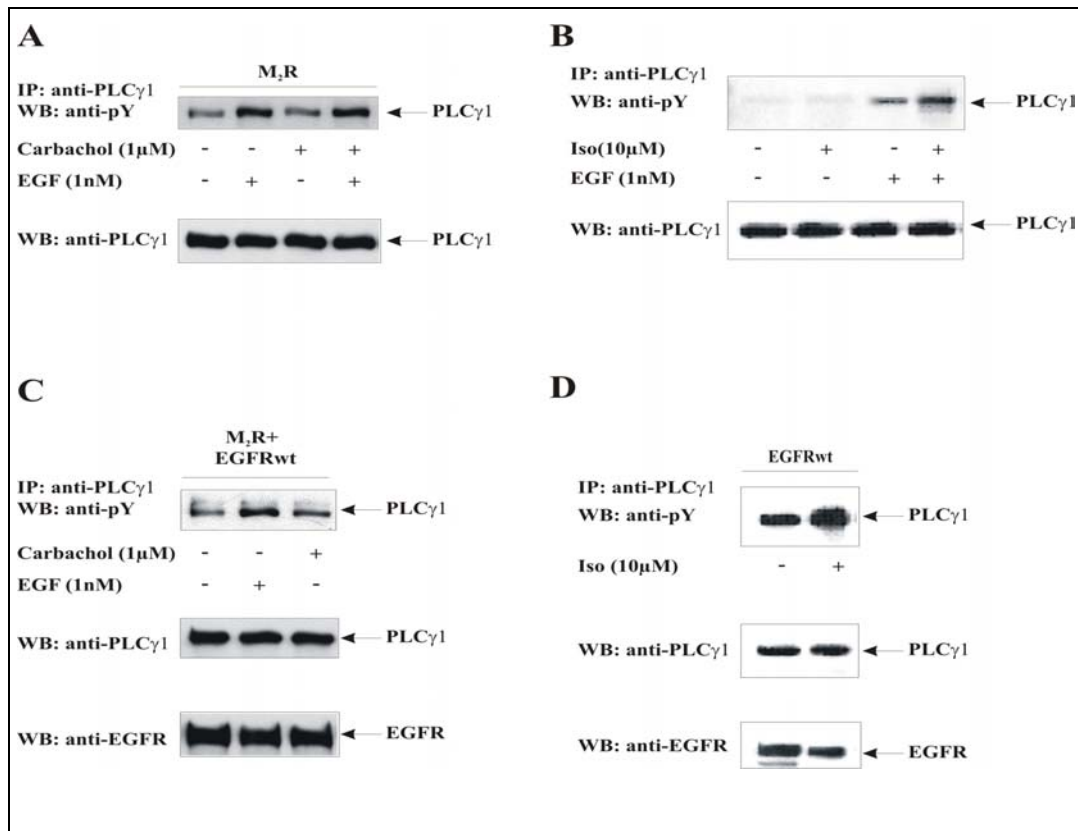
Eine Carbachol-stimulierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung und damit Transaktivierung konnte nach Ko-Expression des M<sub>2</sub>R und der EGFR ΔCR1-Mutante nicht mehr nachgewiesen werden (*Abb.3.10.A*). Dies bestätigt die Bedeutung des EGFR im M<sub>2</sub>R-Signalweg. Die Tyrosin-Reste 1068 und 1086 des EGFR als Andockstellen der SH-2 Domänen-haltigen, in COS-7 Zellen endogen vorkommenden Adaptorproteine Grb2 und Gab1 (Cunnick *et al.*, 2000; Daub *et al.*, 1997), die für die weitere „downstream“ Signalvermittlung wichtig sind (Rodrigues *et al.*, 2000), waren an der Regulation der Signaltransduktion des M<sub>2</sub>-Rezeptors beteiligt. Es zeigte sich eine Verringerung der Carbachol-induzierten MAPK-Aktivität in COS-7 Zellen, welche die EGFR-Mutanten mit Phenylalanin-Resten anstelle der entsprechenden Tyrosine (EGFR Y1068F; EGFR Y1086F) zusammen mit dem M<sub>2</sub>R exprimierten (*Abb.3.10.C*).

Wie in der Literatur beschrieben ist (Hynes und Lane, 2005; Garrett *et al.*, 2003), sind nicht nur EGFR-Homodimere sondern auch Heterodimere, bestehend aus EGFR-Monomeren und anderen Monomeren der HER/ ErbB-Familie, an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Der in COS-7 Zellen endogen exprimierte HER2/ErbB2-Rezeptor (Schaefer *et al.*, 1999), ein bevorzugter Dimerisierungspartner des EGFR, scheint in den M<sub>2</sub>R-Signalweg involviert zu sein. Es zeigte sich, dass der spezifische ErbB2 Tyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin AG825, die Carbachol-stimulierte Phosphorylierung von ERK1/2 bzw. von Akt hemmt (*Abb.3.10.D*). Allerdings hatte AG825 selbst einen stimulatorischen Effekt auf die Akt-Phosphorylierung.

### **3.4.3. Die Transaktivierung des EGFR über den M<sub>2</sub>R resultiert nicht in eine Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ -1**

Aus der Literatur ist bekannt, dass EGF die Translokation der PLC $\gamma$  zur Zellmembran und über ihre SH2-Domänen deren Bindung an spezifische phosphorylierte Tyrosin-Reste des aktivierten EGFR stimuliert. Dies führt letztendlich zur Tyrosin-Phosphorylierung und damit Aktivierung der PLC $\gamma$  durch die Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors. Die PLC $\gamma$ -Aktivierung wurde deshalb als weiteres Werkzeug zur Charakterisierung der M<sub>2</sub>R-vermittelten EGFR Transaktivierung genutzt. Carbachol selbst war nicht in der Lage die PLC $\gamma$ -1 Tyrosin-Phosphorylierung zu stimulieren und zeigte auch keinen Einfluss auf die EGF-induzierte PLC $\gamma$ -1-Aktivierung (*Abb.3.11.A*). Der mit Isoproterenol stimulierte, in COS-7 Zellen endogen exprimierte  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptor aktivierte die PLC $\gamma$ -1 nicht, erhöhte aber im Gegensatz zum M<sub>2</sub>R die EGF-induzierte PLC $\gamma$ -1 Tyrosin-Phosphorylierung (*Abb.3.11.B*). Die

Überexpression des Wildtyp-EGFR, die ähnlich einer Stimulation mit EGF die Aktivität des Rezeptors erhöht, ermöglichte dem  $\beta$ 2-AR die PLC $\gamma$ -1 zu aktivieren (*Abb.3.11.D*). Auch nach Ko-Expression von M<sub>2</sub>R und Wildtyp-EGFR konnte keine Carbachol-induzierte PLC $\gamma$ -1 Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen werden (*Abb.3.11.C*).



**Abb.3.11. Die Carbachol-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung der PLC $\gamma$ -1.** COS-7 Zellen wurden in **A** mit 200ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R bzw. in **C** mit 180ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R und 20ng/10<sup>5</sup>Zellen EGFRwt transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen in **A** und **C** mit Carbachol und /oder EGF (Im Fall der Doppelstimulation erfolgte die EGF-Zugabe 30sec vor der Carbachol-Zugabe.) der angegebenen Konzentration 5min stimuliert. Aus den Lysaten wurde die PLC $\gamma$ -1 mit einem polyklonalen Antikörper (Santa Cruz) immunpräzipitiert. Die IP wurde im Western Blot mit einem anti-phospho-Tyr-Antikörper (4G10) analysiert. Der Reblot erfolgte mit einem anti-PLC $\gamma$ -1 Antikörper. Gezeigt sind repräsentative Daten aus in **A** vier und in **C** drei unabhängigen Experimenten. Die Blots in **B** und **D** wurden durch S. Drube zur Verfügung gestellt.

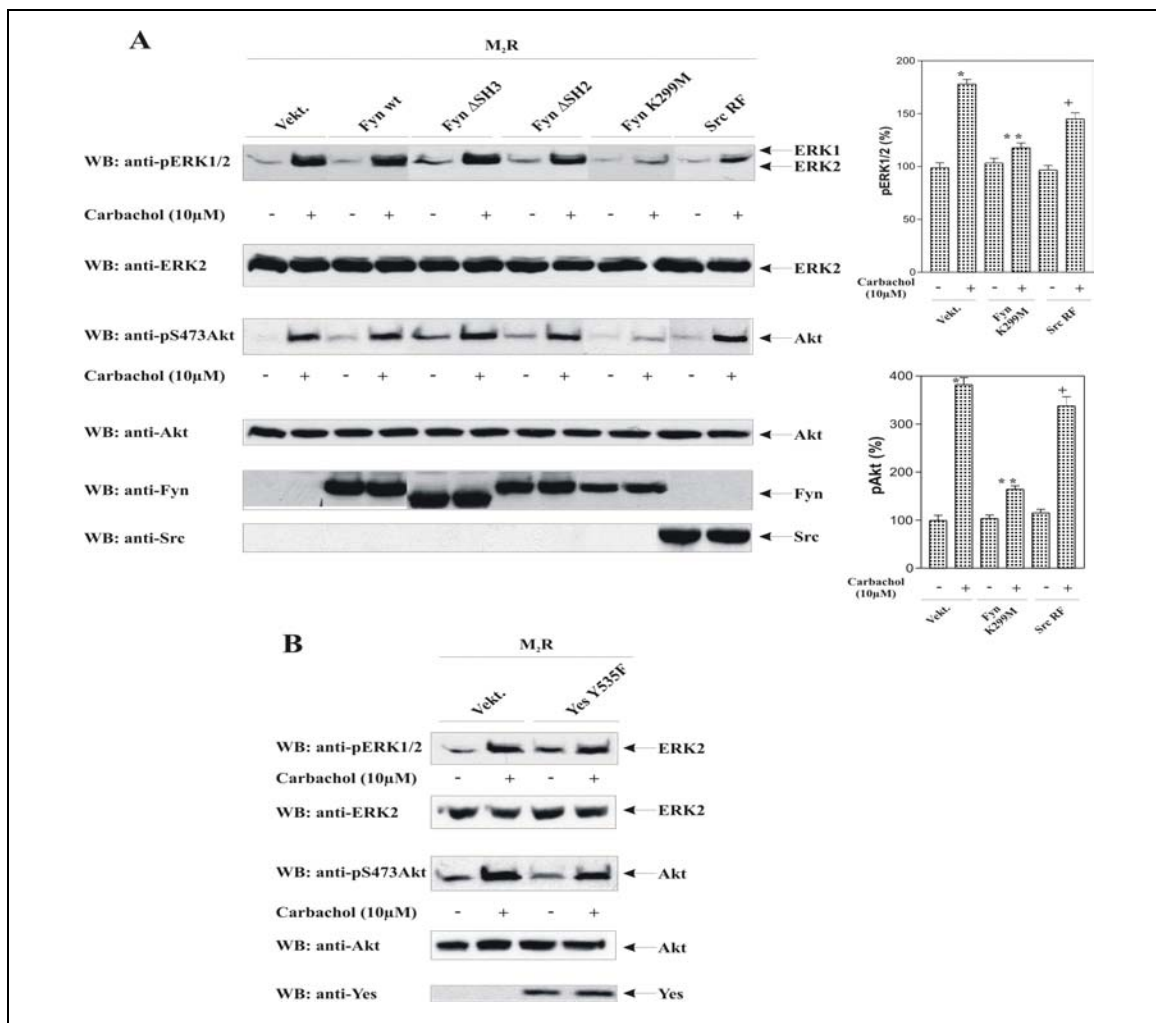
Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der durch den M<sub>2</sub>-Rezeptor transaktivierte EGFR zwar den ERK- und den PI3-K/Akt-Signalweg, aber nicht die PLC $\gamma$ -1 aktiviert.

Der in COS-7 Zellen exprimierte M<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt die Transaktivierung des EGFR unabhängig von MMPs und ohne die extrazelluläre Freisetzung von HB-EGF. Im Gegensatz zum  $\beta$ 2-AR konnte der M<sub>2</sub>R die Phosphorylierung des Src-spezifischen Tyrosin-Restes 845 des EGFR nicht vermitteln, was gegen eine Beteiligung von c-Src an der Carbachol-induzierten EGFR-Transaktivierung spricht. Der durch den Gi-Protein gekoppelten M<sub>2</sub>-Rezeptor transaktivierte EGFR vermittelt die Aktivierung von ERK und PKB, ist aber

Vergleich zum Isoproterenol-transaktivierten EGFR nicht in der Lage, die PLC $\gamma$ -1 zu aktivieren.

### 3.5. Die Rolle von cytoplasmatischen Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie im mitogenen Signalweg des M<sub>2</sub>-Rezeptors

Wie bereits in den Abschnitten 3.2.1. und 3.3. durch die Verwendung des Inhibitors PP2 gezeigt wurde, sind Src-Kinasen in die Vermittlung der M<sub>2</sub>R-induzierten MAPK- und Akt-



**Abb.3.12. Einfluss der Expression verschiedener Mutanten von Fyn, Src und Yes auf die Carbachol-induzierte ERK- und Akt-Phosphorylierung in COS-7 Zellen.** Die Zellen wurden in **A** und **B** mit der Polyplus-Methode mit 600ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R und 300ng/10<sup>5</sup>Zellen leerem Vektor, Wildtyp-Fyn oder den angegebenen Mutanten transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen mit Carbachol der angegebenen Konzentration 5min stimuliert. Die Lysate wurden mit anti-phosphoERK1/2 bzw. anti-pS473Akt Antikörper im direkten Western Blot analysiert. Die Kontrolle erfolgte im Western Blot mit anti-ERK2 bzw. anti-Akt Antikörper. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus in **A** drei und in **B** zwei unabhängigen Experimenten. Die Daten für die Quantifizierung in **A** (\*statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert; \*\* signifikant niedrigere Carbachol-induzierte ERK- und Akt-Phosphorylierung in Zellen die mit Fyn K299M transfiziert wurden; + signifikant verschiedene Carbachol-induzierte ERK- und Akt-Phosphorylierung in Zellen die mit Src RF transfiziert wurden im Vergleich zu Zellen mit Fyn K299M; p<0.05, Student's t-Test) stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

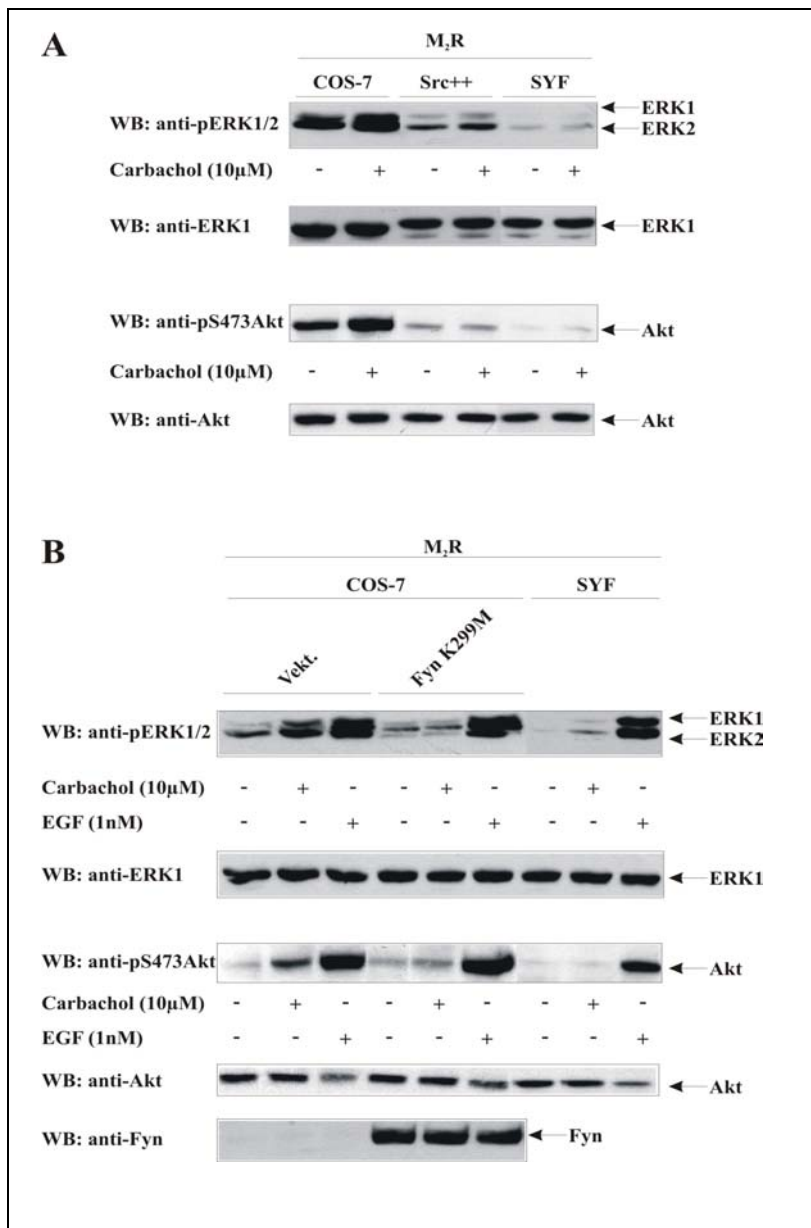
Aktivierung involviert. Um herauszufinden, welche Src-Kinasen am M<sub>2</sub>R-Signalweg beteiligt sind wurde der Rezeptor zusammen mit verschiedenen Mutanten von Fyn bzw. einer dominant negativen Mutante von c-Src (K295R/Y527F; Src RF) in COS-7 Zellen überexprimiert. Zellen, die den M<sub>2</sub>R und eine Fyn-Mutante ohne SH3-Domäne oder eine Fyn-Mutante mit inaktiver SH2-Domäne exprimierten zeigten keine Unterschiede in der Carbachol-induzierten ERK- und Akt-Aktivierung im Vergleich zu Zellen, die nur den M<sub>2</sub>R bzw. den Rezeptor und Wildtyp-Fyn exprimierten (*Abb.3.12.A*). Die Überexpression einer Kinase-inaktiven, dominant negativen Mutante von Fyn (Fyn-K299M) (Mariotti *et al.*, 2001) inhibierte sowohl die M<sub>2</sub>R-vermittelte ERK- als auch die Akt-Aktivierung (*Abb.3.12.A*). Die dominant negative Src-Mutante zeigte eine geringere Hemmung der Carbachol-induzierten ERK-Stimulation als Fyn-K299M und hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung der Proteinkinase B durch den M<sub>2</sub>-Rezeptor (*Abb.3.12.A*).

Die Ko-Expression von M<sub>2</sub>R und einer konstitutiv aktiven Mutante der cytoplasmatischen PTK Yes (Espanel und Sudol, 2001) in COS-7 Zellen beeinflusste weder die Carbachol-stimulierte ERK- noch die Akt-Phosphorylierung (*Abb.3.12.B*). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fyn das Mitglied der Src-Kinase Familie ist, welches für die Vermittlung des mitogenen Signalweges des M<sub>2</sub>R essentiell ist.

### **3.5.1. Die M<sub>2</sub>R-vermittelte ERK- und PKB/Akt-Aktivierung in c-Src, Yes und Fyn defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten (SYF-Zellen)**

Zur weiteren Charakterisierung der Bedeutung cytoplasmatischer Src-Kinasen im M<sub>2</sub>R-Signalweg wurden Maus-Fibroblasten, die weder c-Src, Yes noch Fyn (SYF Zellen) bzw. nur c-Src (Src<sup>++</sup> Zellen) exprimieren, genutzt. Eine Stimulation der MAPK und von Akt durch Carbachol konnte in SYF Zellen, die den M<sub>2</sub>R exprimierten, nicht nachgewiesen werden (*Abb.13.3.A*). In Src<sup>++</sup> Zellen war der M<sub>2</sub>-Rezeptor nicht in der Lage die Proteinkinase B zu aktivieren (*Abb.13.3.B*). Carbachol stimulierte in Src<sup>++</sup> Zellen, die den M<sub>2</sub>R exprimierten, die ERK1/2-Phosphorylierung. Diese ERK-Aktivierung war unter den gleichen Bedingungen allerdings deutlich geringer als in COS-7 Zellen (*Abb.13.3.A*). Die Durchführung des umgekehrten experimentellen Ansatzes, d.h. die Ko-Expression von Fyn-Wildtyp und M<sub>2</sub>-Rezeptor in SYF Zellen zur Bestätigung der Rolle von Fyn im M<sub>2</sub>R-Signalweg, erwies sich als schwierig. Die Menge an exprimiertem Fyn reichte nicht aus, um die M<sub>2</sub>R-vermittelte MAPK- und Akt-Aktivierung in SYF-Zellen zu zeigen. Im direkten Vergleich (*Abb.13.3.B*) zeigte sich, dass Carbachol die MAPK und Akt in COS-7 Zellen, die den M<sub>2</sub>-Rezeptor und

die dominant negative Fyn-Mutante oder in M<sub>2</sub>R-transfizierten SYF Zellen nicht stimulieren konnte.



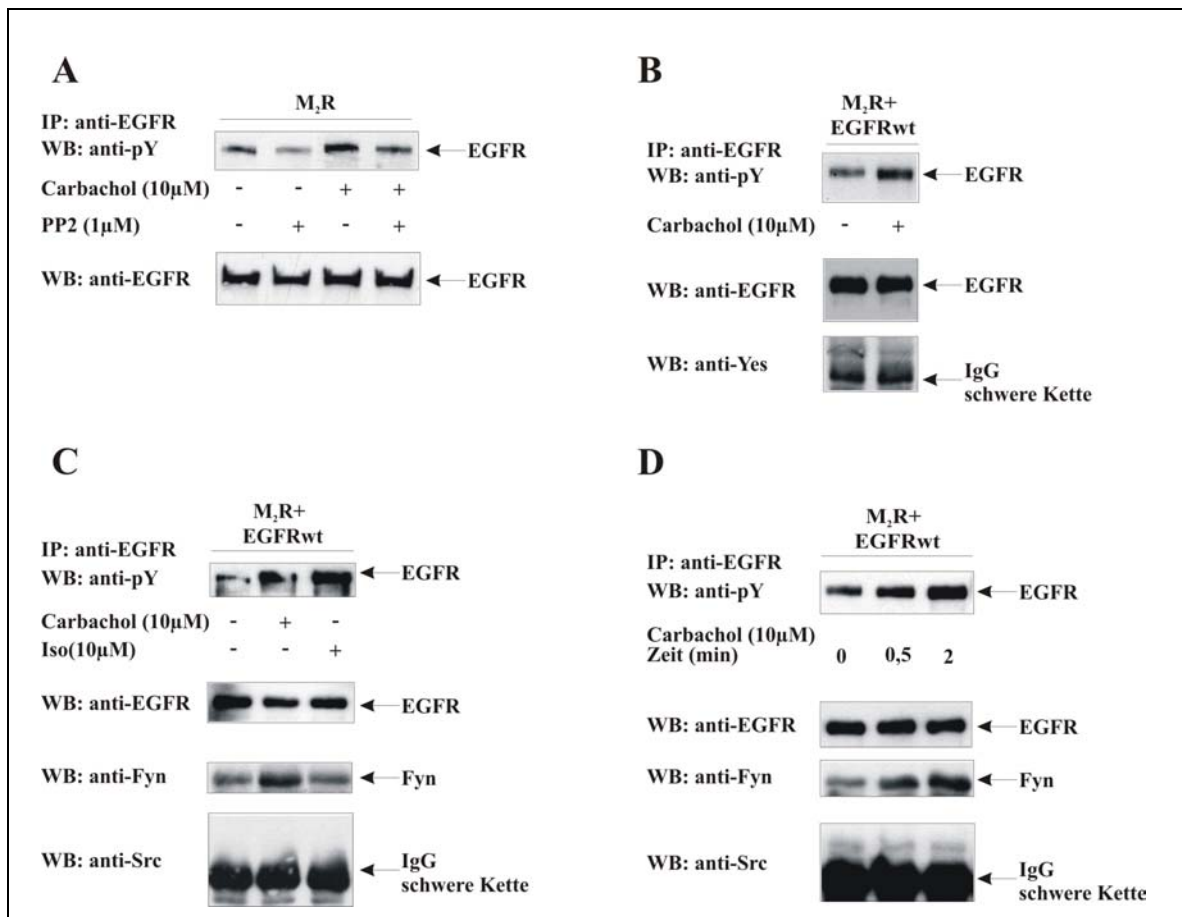
**Abb.3.13. Carbachol-induzierte ERK- und Akt-Phosphorylierung in M<sub>2</sub>R-transfizierten COS-7, Src++ und SYF Zellen.** **A** Die Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 mit 1µg/10<sup>5</sup> Zellen M<sub>2</sub>R transfiziert. **B** COS-7 Zellen wurden mit Polyplus mit 600ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R und 300ng/10<sup>5</sup>Zellen leerem Vektor oder K299M Fyn bzw. SYF Zellen mit 900ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen in **A** und **B** mit Carbachol oder EGF in den angegebenen Konzentrationen 5min stimuliert. Die Lysate wurden mit anti-phosphoERK1/2 bzw. anti-pS473Akt Antikörper im direkten Western Blot analysiert. Die Kontrolle erfolgte im Western Blot mit anti-ERK1 bzw. anti-Akt Antikörper. Gezeigt sind repräsentative Daten aus in **A** aus drei und in **B** aus vier unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz dazu vermittelte EGF die Aktivierung von ERK und der Proteinkinase B sowohl in SYF Zellen als auch in COS-7 Zellen, die dominant negativ Fyn überexprimierten. Diese Resultate unterstreichen die Bedeutung von Fyn im M<sub>2</sub>R-Signaltransduktionsweg. Src scheint neben Fyn in die Carbachol-induzierte Stimulation der MAPK-Aktivität involviert zu sein, spielt aber für die M<sub>2</sub>R-vermittelte Akt-Aktivierung keine Rolle (*Abb.3.12.A*).



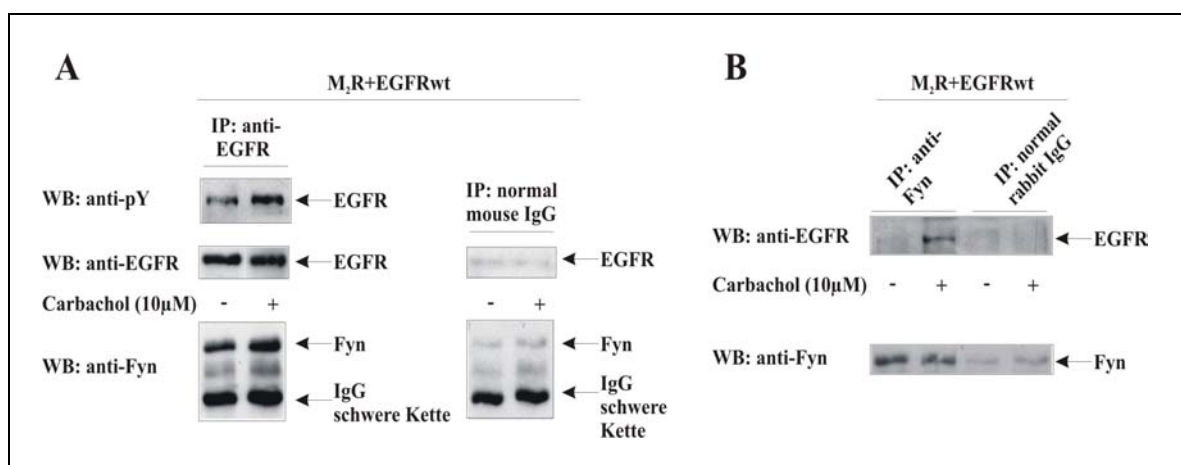
### 3.5.2. Der M<sub>2</sub>-Rezeptor induziert die Interaktion zwischen Fyn und EGFR

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass sowohl die EGFR-Transaktivierung als auch verschiedene Src-Kinase Familie Mitglieder für die Regulation der MAPK und PKB/Akt durch den M<sub>2</sub>-Rezeptor von Bedeutung sind. Wie bereits beschrieben, erfolgte die Carbachol-induzierte Transaktivierung des EGFR über einen Ligand-unabhängigen Mechanismus, deshalb wurde der Einfluss von Src-Kinasen auf die M<sub>2</sub>R-vermittelte Aktivierung des EGFR als alternativer Weg der Transaktivierung untersucht.



**Abb.3.14. Die M<sub>2</sub>R-vermittelte Ko-Immunpräzipitierung zwischen Src, Fyn bzw. Yes und dem EGFR.** COS-7 Zellen wurden in **A** mit Polyplus mit 1μg/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R und in **B**, **C** und **D** mit DEAE-Dextran mit 200ng M<sub>2</sub>R und 20ng EGFRwt/10<sup>5</sup>Zellen transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen in **A** mit PP2 30min vorinkubiert und danach in **A** bis **D** mit Carbachol oder Isoproterenol in den angegebenen Zeiten stimuliert. Aus den Lysaten wurde der EGFR mit einem monoklonalen Antikörper (mAb425 Merck) (1,5μg Antikörper pro Probe) immunpräzipitiert. Die Analyse der IP erfolgte in **A** und **B** im Western Blot mit einem anti-phospho-Tyr Antikörper (4G10) und in **B** zusätzlich mit anti-Yes Antikörper. Die Kontrolle der IP erfolgte mit einem monoklonalem anti-EGFR Antikörper (13G8 nano tools). Die Immunpräzipitate in **C** und **D** wurden geteilt. Ein Teil der IP wurde im Western Blot mit anti-phospho-Tyr Antikörper (4G10) und einem monoklonalem anti-Src Antikörper (#327 oncogene), der andere Teil mit monoklonalem Antikörper gegen den EGFR und einem polyklonalen Antikörper gegen Fyn (Santa Cruz) analysiert. Gezeigt sind repräsentative Blots aus in **A** und **C** drei bzw. **B** und **D** zwei unabhängigen Experimenten.

Die Verringerung der Carbachol-induzierten EGFR Tyrosin-Phosphorylierung nach Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor PP2 (*Abb.3.14.A*) spricht für einen Src-Kinasen abhängigen EGFR-Transaktivierungsmechanismus. In Carbachol-stimulierten COS-7 Zellen, die sowohl den M<sub>2</sub>R als auch den Wildtyp-EGFR exprimierten, konnte die endogen vorkommende PTK Fyn in EGFR-Immünpräzipitaten mittels Western Blot mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (*Abb.3.14.C*). Im Gegensatz dazu wurde Fyn nach Stimulation des endogenen  $\beta$ 2-AR mit Isoproterenol nicht mit dem überexprimierten EGF-Rezeptor ko-immunpräzipitiert (*Abb.3.14.C*). Der M<sub>2</sub>-Rezeptor war nicht in der Lage, die Bildung eines Komplexes zwischen Src und EGFR bzw. Yes und EGFR zu induzieren. Nach Immunpräzipitierung des EGFR aus entsprechend stimulierten COS-7 Lysaten konnte die Carbachol-induzierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung gezeigt werden, Src und Yes wurden im Western Blot allerdings nicht detektiert (*Abb.3.14.B* und *C*). Da sowohl die M<sub>2</sub>R-vermittelte MAPK- als auch Akt-Aktivierung bereits nach fünf Minuten sehr stark war und die Carbachol-induzierte EGFR Transaktivierung „upstream“ in die Regulation von ERK und PKB involviert ist, wurde untersucht, ob die Bildung eines Komplexes zwischen EGFR und verschiedenen Src-Kinasen nach kürzeren Stimulationszeiten zu beobachten ist.



**Abb.3.15. Spezifizierung der Carbachol-induzierten physikalischen Assoziation zwischen EGFR und Fyn bzw. Fyn und EGFR.** COS-7 Zellen wurden mit 200ng M<sub>2</sub>R und 20ng EGFRwt/10<sup>5</sup>Zellen transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen mit Carbachol in der angegebenen Konzentration für 5min stimuliert. **A** Die Lysate wurden mit 1,5μg monoklonalem anti-EGFR Antikörper (mAb425 Merck) bzw. 1,5μg normal mouse IgG inkubiert. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgte im Western Blot mit anti-phospho-Tyr Antikörper (4G10), anti-EGFR Antikörper (13G8) und anti-Fyn Antikörper (Santa Cruz). **B** Die Lysate wurden mit 6,5μg polyklonalem anti-Fyn Antikörper (Santa Cruz) bzw. 6,5μg normal rabbit IgG inkubiert. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgte im Western Blot mit anti-EGFR Antikörper (13G8) und anti-Fyn Antikörper (Santa Cruz). Gezeigt sind repräsentative Bilder aus in **A** zwei bzw. in **B** drei unabhängigen Experimenten.

Bereits nach zwei minütiger Stimulation der Zellen mit Carbachol konnte eine Ko-Immünpräzipitierung zwischen dem überexprimierten EGFR und Fyn nachgewiesen werden (*Abb.3.14.D*). Weder nach 30 Sekunden noch nach zwei Minuten vermittelte der Carbachol-

stimulierte M<sub>2</sub>R die Interaktion zwischen EGFR und Src (*Abb.3.14.D*) bzw. EGFR und Yes (nicht gezeigt). Zur weiteren Bestätigung der Bedeutung von Fyn für die M<sub>2</sub>R-vermittelte Transaktivierung wurden unstimulierte und Carbachol-stimulierte COS-7 Zellen lysiert und Fyn mit einem entsprechenden Antikörper präzipitiert. In den Carbachol-stimulierten Fyn-Immunpräzipitaten konnte der EGFR im Western Blot identifiziert werden (*Abb.3.15.B*). Die Kontrolle der M<sub>2</sub>R-induzierten Ko-Immunpräzipitierung sowohl zwischen EGFR und Fyn als auch Fyn und EGFR erfolgte mit normalem Maus-Immunglobulin G bzw. normalem Kaninchen IgG. Der Nachweis der Ko-Immunpräzipitierung zwischen EGFR und Fyn war nur in Carbachol-stimulierten Proben unter Verwendung der spezifischen Antikörper gegen den EGFR bzw. Fyn möglich (*Abb.3.15. A und B*).

Durch den Einfluss der Überexpression verschiedener dominant negativer Src-Kinase Mutanten auf die M<sub>2</sub>R-stimulierte MAPK- und Akt-Aktivität in COS-7 Zellen, die Untersuchung der Carbachol-induzierten ERK- und Akt Aktivierung in Src-, Yes- und Fyn-defizienten Maus-Fibroblasten und durch die Carbachol-stimulierte Ko-Immunpräzipitierung zwischen EGFR und Fyn konnte gezeigt werden, dass Fyn das Mitglied der Src-Kinase Familie ist, das für die Vermittlung von Signalen vom M<sub>2</sub>-Rezeptor zur MAPK und Proteinkinase B über die Transaktivierung des EGFR verantwortlich ist.

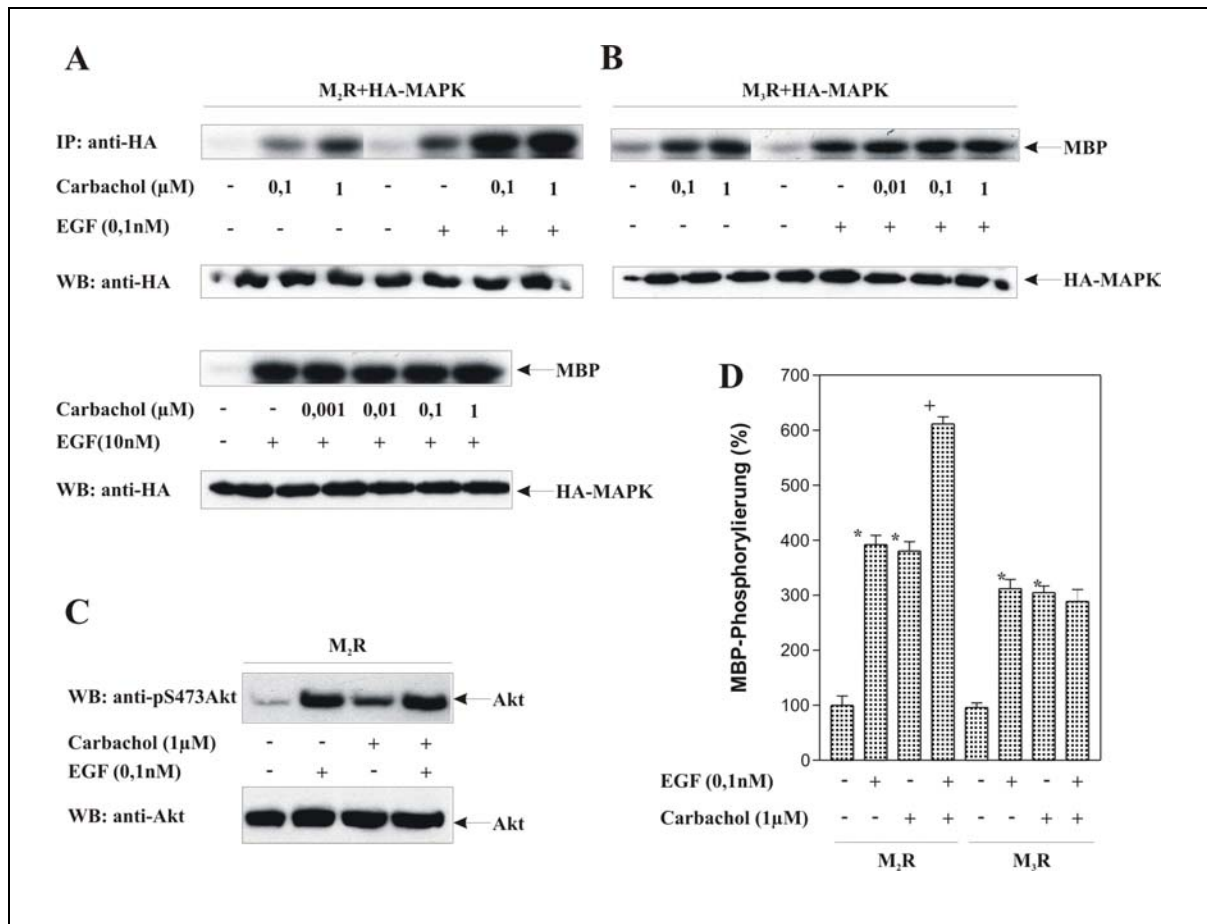
### **3.6. Der M<sub>2</sub>-Rezeptor als Teil von Signaltransduktions-Netzwerken**

#### **3.6.1. Die MAPK-Aktivierung nach Ko-Stimulation des M<sub>2</sub>R mit verschiedenen Gq-Protein gekoppelten Rezeptoren**

Um den einfachsten Fall eines Signal-Netzwerkes zu modellieren, wurde der M<sub>2</sub>-Rezeptor in COS-7 Zellen simultan mit anderen GPCRs bzw. dem EGFR stimuliert und die Auswirkungen dieser Doppelstimulationen auf die ERK- und Akt-Aktivierung untersucht. In COS-7 Zellen, die den M<sub>2</sub>R und den B<sub>2</sub>R als typischen Vertreter der Gq-Protein gekoppelten Rezeptoren überexprimierten, zeigte Carbachol keinen Einfluss auf die Bradykinin induzierte MAPK-Aktivität (*Abb.3.16.A*). Auch bei Inkubation der Zellen mit 1nM Bradykinin, was eine geringere MAPK-Stimulation zur Folge hatte und damit die Detektion geringer Aktivierungsunterschiede ermöglicht, beeinflusste die Doppelstimulation mit Carbachol die ERK-Aktivierung nicht (nicht gezeigt). Die gleichzeitige Aktivierung des Gi-Protein gekoppelten M<sub>2</sub>R und des Gq-Protein gekoppelten M<sub>3</sub>R durch Carbachol veränderte die MAPK-katalysierte MBP-Phosphorylierung im Vergleich zu den Einzeleffekten nicht (*Abb.3.16.B*). Dies geschah unabhängig von der im Experiment verwendeten Konzentration



so stark stimuliert, dass der synergistische Effekt der Doppelstimulation von EGFR und M<sub>2</sub>R nicht mehr detektierbar war (*Abb.3.17.A* untere Blots).



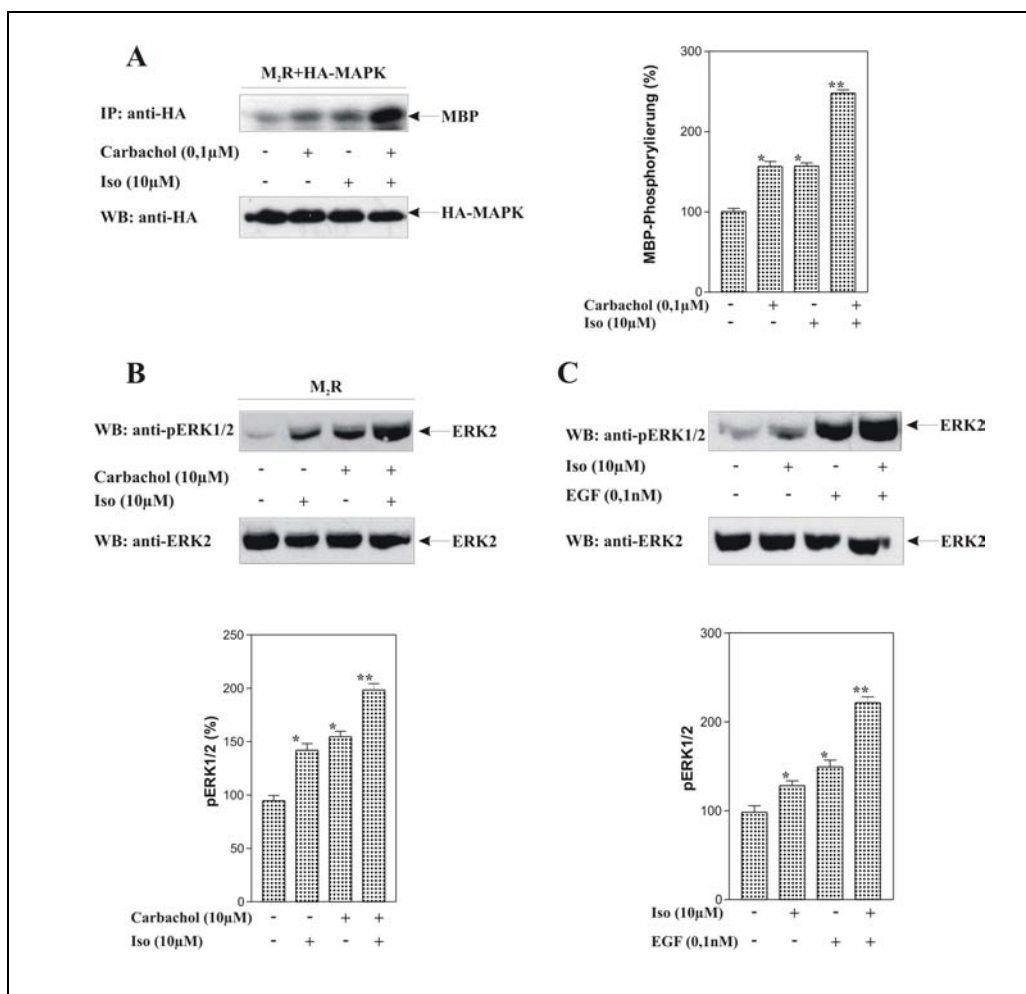
**Abb.3.17. MAPK- und Akt-Aktivierung in COS-7 Zellen nach Ko-Stimulation von EGFR und M<sub>2</sub>R.** Die Zellen wurden in *A* und *B* mit DEAE-Dextran mit 180ng M<sub>2</sub>R und 40ng HA-MAPK bzw. 180ng M<sub>3</sub>R und 40ng HA-MAPK und in *C* mit Polyplus mit 1μg M<sub>2</sub>R (alle Angaben pro 10<sup>5</sup>Zellen) transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen 5min mit Carbachol und EGF wie angegeben stimuliert bzw. ko-stimuliert. Die MAPK-Aktivitätsbestimmung erfolgte in *A* und *B* nach IP der Lysate mit anti-HA Antikörper und MBP als Substrat. Die MBP-Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Kontrolle der IP erfolgte durch WB mit anti-HA Antikörper. Die Analyse der Lysate erfolgte in *C* im Western Blot mit einem Phospho-Akt Antikörper gegen den Serin-Rest 473. Der Reblot wurde mit einem polyklonalen anti-Akt Antikörper durchgeführt. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für in *A* und *B* drei bzw. *C* vier unabhängige Experimente. Die Daten für die Quantifizierung in *D* (\*statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert; + signifikant höhere MBP-Phosphorylierung im Vergleich zu den Einzelstimulationen; p<0.05, Student's t-Test) stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zeigte sich bei der einer Ko-Stimulation von EGFR mit niedrigen EGF-Konzentrationen (0,1nM) und des Gq-Protein gekoppelten M<sub>3</sub>-Rezeptors keine synergistische ERK-Aktivierung (*Abb.3.17.B* und *D*). Die gleichzeitige Aktivierung von M<sub>2</sub>R und EGFR hatte keinen Effekt auf die Akt-Phosphorylierung. Es zeigte sich keine Veränderung der EGF-induzierten PKB-Aktivierung nach simultaner Inkubation der Zellen mit Carbachol (*Abb.3.17.C*). Zusammenfassend kann man feststellen, dass die simultane

Aktivierung des EGFR und des M<sub>2</sub>-Rezeptors einen synergistischen Effekt auf die MAPK-Aktivität hatte, die Akt-Aktivierung allerdings unbeeinflusst blieb.

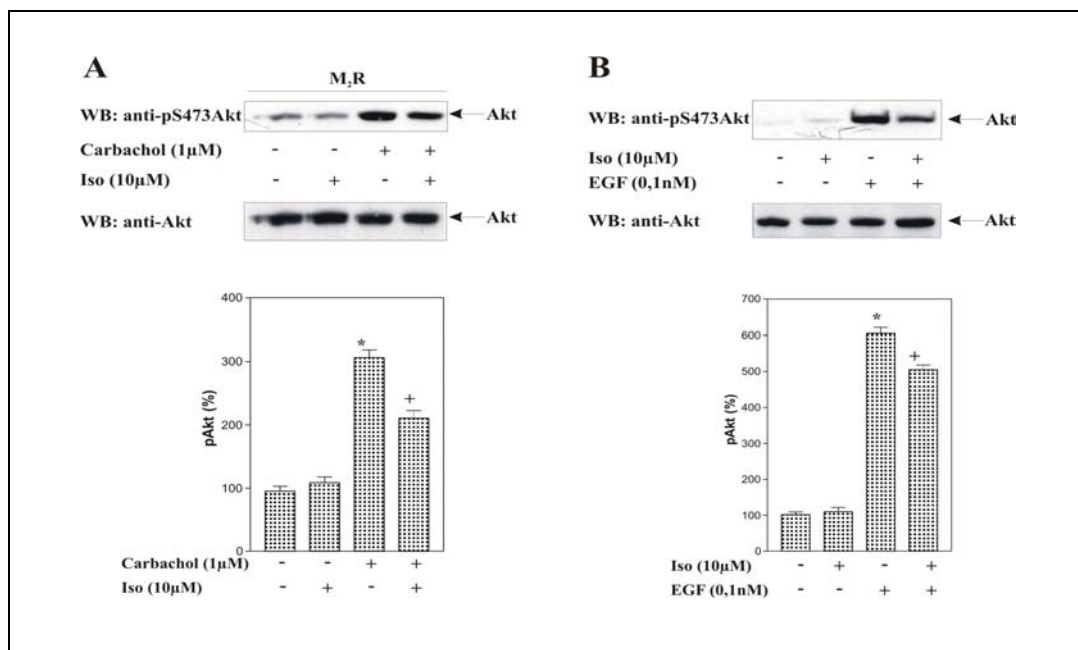
### 3.6.3. MAPK- und Akt-Aktivierung nach Ko-Stimulation von M<sub>2</sub>-Rezeptor und $\beta$ 2-adrenergem Rezeptor

Im Gegensatz zum Gi-Protein gekoppelten M<sub>2</sub>-Rezeptor, der sowohl die Aktivierung von ERK als auch PKB/Akt vermitteln kann, stimuliert der Gs-Protein gekoppelte  $\beta$ 2-AR nur die MAPK-Aktivität.



**Abb.3.18. Einfluss der Ko-Stimulation von M<sub>2</sub>R und  $\beta$ 2-AR auf die MAPK-Aktivierung in COS-7 Zellen.** Die Zellen wurden in **A** mit DEAE-Dextran mit 180ng/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R und 40ng/10<sup>5</sup>Zellen HA-MAPK und in **B** mit Polyplus mit 1 $\mu$ g/10<sup>5</sup>Zellen M<sub>2</sub>R transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen 5min mit Carbachol, EGF und Isoproterenol wie angegeben stimuliert bzw. ko-stimuliert. **A** Die MAPK-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach IP der Lysate mit anti-HA Antikörper und MBP als Substrat. Die MBP-Phosphorylierung wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Kontrolle der IP erfolgte durch WB mit anti-HA Antikörper. **B** und **C** Die Analyse der Lysate erfolgte im direkten Western Blot mit einem phospho-ERK1/2 spezifischem Antikörper und Reblot mit anti-ERK2 Antikörper. Die Daten für die Quantifizierung in **A**, **B** und **C** (\*statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert; \*\* signifikant höhere MBP-Phosphorylierung bzw. ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zu den Einzelstimulationen; p<0.05, Student's t-Test) stammen aus vier unabhängigen Experimenten.

Die Ko-Stimulation des in COS-7 Zellen endogen exprimierten  $\beta_2$ -AR und des  $M_2R$  führte zu einer deutlichen Erhöhung der MBP-Phosphorylierung durch die aktivierte MAPK im Vergleich zu den Einzeleffekten von Isoproterenol und Carbachol (*Abb.3.18.A* und *B*). Der Effekt der Doppelstimulation wurde besonders deutlich, wenn Carbachol in einer relativ geringen Konzentration ( $0,1\mu\text{M}$ ) eingesetzt wurde (*Abb.3.18.A*). Eine synergistische Stimulation der ERK1/2-Phosphorylierung durch den  $M_2R$  und  $\beta_2$ -AR konnte aber auch bei einer Inkubation der Zellen mit  $10\mu\text{M}$  Carbachol, was der in den bisherigen Untersuchungen verwendeten Konzentration des Acetylcholin-Mimetikum entspricht, nachgewiesen werden (*Abb.3.18.B*). Im Vergleich zeigte sich bei einer Ko-Stimulation des EGFR und des  $\beta_2$ -AR ebenfalls eine Erhöhung der ERK-Aktivität (*Abb.3.18.C*). Isoproterenol hemmte die  $M_2R$ -induzierte Aktivierung der Proteinkinase B (*Abb.3.19.A*). Diese Hemmung ist mit dem inhibitorischen Effekt von Isoproterenol auf die EGF-vermittelte Akt-Phosphorylierung vergleichbar (*Abb.3.19.B*).



**Abb.3.19. Einfluss der Ko-Stimulation von  $M_2R$  und  $\beta_2$ -AR auf die Akt-Aktivierung in COS-7 Zellen.** Die Zellen wurden in *A* Polyplus mit  $1\mu\text{g}/10^5$  Zellen  $M_2R$  transfiziert. Nach 20h in Serum-freiem Medium wurden die Zellen 5min mit Carbachol, EGF und Isoproterenol wie angegeben stimuliert bzw. ko-stimuliert. Die Analyse der Lysate erfolgte in *A* und *B* im Western Blot mit einem Phospho-Akt Antikörper gegen den Serin-Rest473. Der Reblot wurde mit einem polyklonalen anti-Akt Antikörper durchgeführt. Die Daten für die Quantifizierung in *A* und *B* (\*statistisch signifikant höher im Vergleich zum Basalwert; + signifikant niedrigere Akt-Phosphorylierung im Vergleich zu den Einzelstimulationen;  $p < 0.05$ , Student's t-Test) stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

Ein mögliche Ursache für dieses Ergebnis könnte die Aktivierung des cAMP-PKA-Systems „downstream“ des  $\beta_2$ -AR sein. So ist zum Beispiel in der Literatur eine cAMP-abhängige

Inhibierung der Zellproliferation über Rap-1 beschrieben (Schmitt und Stork, 2002). In thyroidalen Zellen konnte eine Hemmung der PKB/ Akt über den cAMP-Weg nachgewiesen werden (Lou *et al.*, 2002).

Die Ko-Stimulation des M<sub>2</sub>-Rezeptors und verschiedener GPCRs bzw. des EGFR hatte in Abhängigkeit vom Rezeptortyp unterschiedliche Auswirkungen auf die untersuchten Zielproteine (ERK und PKB): (i) Die simultane Stimulation von M<sub>2</sub>R und des Gq-Protein gekoppelten-B<sub>2</sub>- oder M<sub>3</sub>-Rezeptors zeigte im Vergleich mit den Einzelstimulationen keine Effekte auf die MAPK-Aktivierung. (ii) Eine synergistische Aktivierung von ERK war bei der gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit Carbachol und EGF bzw. Carbachol und Isoproterenol zu beobachten. Ein ähnlicher Synergismus bezüglich der MAPK-Aktivierung zeigte sich nach Ko-Stimulation von EGFR und  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergem Rezeptor. (iii) Die simultane Aktivierung des M<sub>2</sub>R und des EGFR hatte keinen Einfluss auf die PKB/Akt-Aktivierung. Hingegen inhibierte Isoproterenol die M<sub>2</sub>R-vermittelte Akt-Phosphorylierung. Dieser Effekt ist mit  $\beta$ <sub>2</sub>-AR vermittelten Hemmung der EGF-stimulierten PKB-Aktivität vergleichbar.



## 4. Diskussion

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der M<sub>2</sub> muscarinische Acetylcholin Rezeptor neben der Modulation grundlegender physiologischer Prozesse, wie z.B. der Neurotransmitter-Freisetzung im zentralen Nervensystem oder der Kontraktion der glatten Muskulatur in verschiedenen Organen (van Koppen und Kaiser, 2003), auch die Zellproliferation und –differenzierung reguliert bzw. aktiviert. Sowohl die durch den Gi-Protein gekoppelten M<sub>2</sub>-Rezeptor induzierte Aktivierung verschiedener MAPK-Isoformen (Winitz *et al.* 1993; Coso *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 1997) als auch die Stimulierung der Proteinkinase B (Murga *et al.*, 1998), die an der Promotion von Zellwachstum und „cell survival“ beteiligt ist, wurde in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (siehe *Tab.1.2.*, Einleitung). Die in die Vermittlung der mitogenen Signalwege des M<sub>2</sub>R involvierten Proteine konnten in der Folge unter endogenen Bedingungen bzw. im Expressionsmodell zum Teil identifiziert und charakterisiert werden (Daub *et al.*, 1997, Rosenblum *et al.*, 2000). Dabei zeigten sich Unterschiede bei der Signaltransduktion des M<sub>2</sub>R, die durch den bei den Untersuchungen verwendeten Zelltyp und die spezifischen experimentellen Bedingungen beeinflusst wurden (vgl. *Tab.1.2.*, Einleitung). Im Vergleich zu anderen Subtypen muscarinischer Rezeptoren (M<sub>1</sub>R, M<sub>3</sub>R) fällt auf (siehe *Abb.1.5.*, Einleitung), dass der „cross talk“ zwischen M<sub>2</sub>R und EGFR und dessen Rolle im weiteren „mitogenen signaling“ bisher weniger gut untersucht ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Mediatoren der M<sub>2</sub>R-vermittelten MAPK- und PKB/ Akt-Aktivierung im Expressionsmodell COS-7 Zellen vor dem Hintergrund eines zellulären Signal-Netzwerkes genauer zu charakterisieren. Im Mittelpunkt standen dabei der bisher noch unklare Mechanismus der M<sub>2</sub>R-induzierten EGFR-Transaktivierung und die Rolle von Src-Kinasen im mitogenen Signalweg des Rezeptors.

In vielen bisherigen Studien zur Untersuchung von Signalwegen des M<sub>2</sub>R (Lopez-Illasaca *et al.*, 1997; Daub *et al.*, 1997) wurde die Expression des Rezeptors meist nur indirekt, über dessen Fähigkeit ERK1/2 zu aktivieren, nachgewiesen. Das für unsere Experimente verwendete zelluläre Modell COS-7 exprimiert endogen keinen M<sub>2</sub>R, deshalb war die Transfektion entsprechender Vektoren, die für den Rezeptor kodieren, notwendig. Der Nachweis der überexprimierten Rezeptoren erfolgte mit unterschiedlichen Methoden. Die immunochemische Detektion des Wildtyp-Rezeptors und verschiedener amino-terminal, Epitop-markierter M<sub>2</sub>-Rezeptoren war nach Überexpression in COS-7 Zellen unter Verwendung der entsprechenden Antikörper, die gegen den Wildtyp bzw. gegen die Epitope (Hämagglutinin; T7) gerichtet waren, nicht möglich (*Abb.3.1.*). Der zur Kontrolle unter den

gleichen experimentellen Bedingungen exprimierte und immunpräzipitierte Hämagglutinin-markierte M<sub>3</sub>-Rezeptor konnte, wie bereits in der Literatur gezeigt (Zeng *et al.*, 1999), im Western Blot nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass der in der humanen Neuroblastom Zelllinie SH-SY5Y endogen vorkommende M<sub>2</sub>-Rezeptor im Immunoblot detektierbar war, könnte durch Unterschiede in der Glykosylierung und der damit verbundenen Lokalisation des Rezeptors (Schöneberg *et al.*, 1995; van Koppen und Nathanson, 1990) erklärt werden. Im Rahmen der vorgesehenen Arbeiten war die Nutzung dieser Zelllinie als endogenes Modell allerdings schwierig, da neben dem M<sub>2</sub>-Rezeptor vor allem der Gq-Protein gekoppelte M<sub>3</sub>- und der M<sub>1</sub>-Rezeptor exprimiert wird (Lambert *et al.*, 1989; Steel und Buckley, 1993; Baumgartner *et al.*, 1993). Da keiner der verwendeten Antikörper mit positivem Ergebnis getestet werden konnte, wurde der in COS-7 Zellen transient exprimierte Wildtyp-M<sub>2</sub>R mit Hilfe der „klassischen“ Methode der Radioligand-Bindungsstudien nachgewiesen. Durch Sättigungsexperimente mit dem nicht-Membran permeablen Radioliganden [<sup>3</sup>H]-N-Methyl-Scopolamin (*Abb.3.2.*) wurden in Abhängigkeit von der verwendeten Transfektionsmethode etwa  $1 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$  Bindungsstellen pro Zelle ermittelt. Der Nachweis der M<sub>2</sub>R-induzierten ERK-Aktivierung wurde als eine weitere Möglichkeit genutzt, die Expression des Rezeptors im jeweiligen zellulären Modell zu bestätigen und gleichzeitig dessen biologische Funktion zu kontrollieren (Winitz *et al.*, 1993). 1-10µM Konzentrationen der Acetylcholin-Analoga Carbachol und Oxotremorin aktivierten die MAPK nach 5min vollständig (*Abb.3.3.*). Diese Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der ERK-Stimulation ist mit den Daten aus der Literatur (Koch *et al.*, 1994; Rosenblum *et al.*, 2000) gut vergleichbar. Die Hemmung der Oxotremorin-induzierten MAPK-Aktivierung nach Inkubation der Zellen mit einem Subtyp-selektiven Antagonisten bestätigt, dass die ERK-Aktivierung spezifisch über den M<sub>2</sub>R vermittelt wurde (*Abb.3.3.A*). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Sättigungsexperimenten (*Abb.3.2.*) und den Untersuchungen zur M<sub>2</sub>R-vermittelten ERK-Aktivierung (*Abb.3.3.A bis C*) lässt sich feststellen, dass bereits geringe Rezeptorzahlen pro Zelle ( $1 \times 10^5$  Bindungsstellen/ Zelle bei Verwendung der DEAE-Dextran Methode) ausreichen, um die Carbachol-induzierte Stimulation der mit dem M<sub>2</sub>R ko-exprimierten p42-MAPK im Aktivierungs-Assay nachzuweisen. Im Gegensatz dazu erfordert die Detektion der Carbachol-induzierten Aktivierung endogen exprimierter Zielmoleküle (ERK1/2 und PKB/Akt) mittels Phospho-spezifischer Antikörper (*Abb.3.4.A* und *Abb.3.6.B*) mehr Rezeptoren pro Zelle, also die Verwendung der effizienteren Polyplus-Methode.

Die Identifizierung der am Signalweg des M<sub>2</sub>R zur MAPK beteiligten Moleküle erfolgte in den letzten Jahren vor allem durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren und durch die Überexpression des Wildtyps bzw. dominant negativer oder konstitutiv aktiver Mutanten der entsprechenden Proteine. Die bereits aus der Literatur bekannten Daten konnten für unser zelluläres Modell unter den gegebenen experimentellen Bedingungen bestätigt und spezifiziert werden. Die Behandlung M<sub>2</sub>R-transfizierter COS-7 Zellen mit Pertussistoxin und die Überexpression eines „βγ-Scavengers“ (CD8-βARK) bzw. einer dominant negativen Mutante von Ras (N17-Ha Ras) führte zu einer Verminderung der Carbachol-stimulierten MAPK-Aktivität (*Abb.3.4.A* und *B*). Diese Ergebnisse bestätigen in Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur (Winitz *et al.*, 1993; Koch *et al.*, 1994; Crespo *et al.*, 1994), dass die Aktivierung von ERK über den M<sub>2</sub>R, durch βγ-Komplexe von Gi-Proteinen, in Ras-abhängiger Weise vermittelt wird. Die Verminderung der Carbachol-induzierten MAPK-Aktivierung durch die Verwendung spezifischer PI3-K Inhibitoren bzw. durch die Überexpression von PTEN (*Abb.3.4.C*), als negativen Regulator des PI3-K Signalweges, zeigte, dass auch in COS-7 Zellen endogen exprimierte PI3-Kinasen, wie die PI3-K β (Murga *et al.*, 2000) essentiell für die M<sub>2</sub>R-vermittelte MAPK-Aktivierung sind. Durch Lopez-Ilasaca *et al.* wurde bereits 1997 nachgewiesen, dass die mit dem M<sub>2</sub>R ko-exprimierte PI3-Kγ die über den Rezeptor vermittelte ERK2-Aktivierung entscheidend moduliert. Die Proteinkinase C ist am M<sub>2</sub>R-Signalweg zur MAPK nicht beteiligt. Der vor allem für die klassischen PKC-Isoformen spezifische Inhibitor Bis (Gekeler *et al.*, 1996) und die Überexpression einer dominant negativen PKD-Mutante, die „downstream“ neuer PKC-Isoformen in die Regulation von ERK involviert ist (Hausser *et al.*, 2001; Brändlin *et al.*, 2002), hatte keinen Effekt auf die Carbachol-stimulierte MAPK-Aktivität (*Abb.3.4.D*). In Übereinstimmung mit Daub *et al.* (1997) konnte gezeigt werden, dass sowohl der EGFR als auch Mitglieder der Src-Kinase Familie essentiell für die Aktivierung der MAPK über den M<sub>2</sub>-Rezeptor sind. Die Carbachol-stimulierte ERK1/2 Phosphorylierung wurde durch einen spezifischen Inhibitor der Src-Kinase Familie (PP2) komplett und durch den EGFR-Tyrosinkinase Inhibitor AG1478 teilweise gehemmt (*Abb.3.5*).

Die durch das Acetylcholin-Mimetikum Carbachol stimulierte Phosphorylierung und damit Aktivierung der Proteinkinase B, die als weiteres Zielmolekül im mitogenen Signalweg des M<sub>2</sub>R (Murga *et al.*, 1998) identifiziert wurde, erfolgte in unserem zellulären Modell in ähnlicher Zeit- und Konzentrations-abhängiger Weise wie die ERK-Aktivierung (*Abb.3.6.A* und *A.1*). Durch die Verwendung von PTX und die Ko-Expression eines „βγ-Scavengers“ konnte gezeigt werden, dass βγ-Komplexe von Gi-Proteinen nicht nur an der Vermittlung der

M<sub>2</sub>R-induzierten MAPK-Aktivierung, sondern auch an der Vermittlung der Akt-Aktivierung über den M<sub>2</sub>-Rezeptor beteiligt sind (*Abb.3.3.B* und *C*). Inwieweit neben  $\beta\gamma$ -Komplexen auch  $\alpha$ -Untereinheiten in die M<sub>2</sub>R-induzierte Akt-Aktivierung involviert sind, wird in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert (Murga *et al.*, 1998; Bommakanti *et al.*, 2000). In Übereinstimmung mit bereits bekannten Daten (Murga *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, dass PI3-Kinasen für den Signalweg des M<sub>2</sub>R zur PKB/ Akt essentiell sind. Ähnlich wie die Carbachol-vermittelte MAPK-Aktivierung konnte auch die Akt-Phosphorylierung durch einen spezifischen PI3-K Inhibitor (LY294002) bzw. durch die Ko-Expression der Lipid- und Proteinphosphatase PTEN gehemmt werden (*Abb.3.6.D*). Ebenso wie bei der Carbachol-stimulierten ERK-Aktivierung war die Proteinkinase C auch nicht an der M<sub>2</sub>R-vermittelten Akt-Stimulation beteiligt (*Abb.3.6.E*). Das EGFR und Src-Kinasen essentiell für die Regulation der mitogenen Signalwege des M<sub>2</sub>-Rezeptors sind, wird durch die Tatsache bestätigt, dass sowohl der spezifische Inhibitor der Src-kinase Familie PP2 als auch der EGFR Tyrosin-Kinase Inhibitor AG1478 neben der Carbachol-induzierten MAPK Aktivierung auch die M<sub>2</sub>R-vermittelte Akt-Phosphorylierung hemmen (*Abb.3.6.F* und *G*).

In Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur (Daub *et al.*, 1997; Lopez-Illasaca *et al.*, 1997; Murga *et al.*, 1998) konnte gezeigt werden, dass die p42/p44-MAPK Isoformen sowie die Proteinkinase B/ Akt wichtige Zielmoleküle im mitogenen „signaling“ des M<sub>2</sub>-Rezeptors sind, deren Aktivierung über  $\beta\gamma$ -Komplexe und PI3-Kinasen vermittelt wird. Des weiteren wurde nachgewiesen, dass EGFR und Src-Kinasen nicht nur Mediatoren der M<sub>2</sub>R-induzierten ERK-Aktivierung sind (Daub *et al.*, 1997), sondern auch die Carbachol-stimulierte Akt-Aktivierung vermitteln.

Die GPCR-vermittelte Transaktivierung, d.h. die durch GPCR-Agonisten-stimulierte Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR, ist ein grundlegender Mechanismus in den mitogenen Signalwegen vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren (Pierce *et al.*, 2001; Gschwind *et al.*, 2001). Für den in Rat-1 Fibroblasten exprimierten muscarinischen M<sub>1</sub>-Rezeptor konnte erstmals eine Ligand-vermittelte EGFR-Transaktivierung, welche eine Carbachol-induzierte MMP-Aktivierung und die extrazelluläre Freisetzung von HB-EGF beinhaltet, gezeigt (Prenzel *et al.*, 1999) und somit die ursprüngliche Hypothese einer Ligand-unabhängigen Transaktivierung (Daub *et al.*, 1996) weiterentwickelt werden. In weiteren Arbeiten konnte die vor allem durch Gq-Protein gekoppelte muscarinische Rezeptoren vermittelte, Ligand-abhängige EGFR-Transaktivierung im Detail charakterisiert werden (Gschwind *et al.*, 2003). In HEK 293 Zellen wurde für den M<sub>1</sub>R eine Ligand-unabhängige EGFR-Transaktivierung

gefunden, die nachfolgend in die Regulation von Ionenkanälen involviert ist (Tsai *et al.*, 1997). Die Transaktivierung des EGFR durch den in T<sub>84</sub>-Zellen exprimierten M<sub>3</sub> muscarinischen Acetylcholin Rezeptor erfolgt über die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kinase Pyk und c-Src und führt letztendlich zur Aktivierung der MAPK (Keely *et al.*, 2000). Durch die gleiche Arbeitsgruppe (Mc Cole *et al.*, 2002) wurde gezeigt, dass neben der Aktivierung von c-Src auch die MMP-abhängige TGF- $\alpha$ -Freisetzung für die Carbachol-induzierte EGFR-Transaktivierung notwendig ist. Neben der Regulation der MAPK ist die durch muscarinische Rezeptoren vermittelte EGFR-Transaktivierung auch an der Aktivierung der Proteinkinase B beteiligt. In Astrocytoma Zellen wurde die durch muscarinische Rezeptoren induzierte Akt-Aktivierung in Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Weise über den HER3/ ErbB3-Rezeptor nachgewiesen (Tang *et al.*, 2002). Alternative Transaktivierungsmechanismen konnten z.B. für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor, der die Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR über die Bildung multimerer Proteinkomplexe (Rekrutierung von c-Src durch  $\beta$ -Arrestin) und spezifischer Membranstrukturen vermittelt (Luttrell *et al.*, 1999; Maudsley *et al.*, 2000), gezeigt werden. Daub *et al.* beschrieben 1996 neben der Transaktivierung des EGFR durch den LPA- und Thrombin-Rezeptor auch die durch den Gi-Protein gekoppelten muscarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptor stimulierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung. Interessanterweise ist der Mechanismus der M<sub>2</sub>R-vermittelten EGFR-Transaktivierung und deren Rolle im weiteren mitogenen Signalweg noch unklar. Auch in unserem zellulären Modell konnte die Carbachol-stimulierte EGFR-Transaktivierung gezeigt werden (Abb.3.7.). Die fünf minütige Stimulation M<sub>2</sub>R-transfizierter COS-7 Zellen mit 1 $\mu$ M Carbachol führte zu einer Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR, die um 90-100% geringer war als die durch EGF (10nM) stimulierte Phosphorylierung des Rezeptors (Abb.3.7.A). Die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der M<sub>2</sub>R-induzierten EGFR-Transaktivierung und der MAPK bzw. Akt-Aktivierung sind vergleichbar.

Die GPCR-induzierte MMP-Aktivierung und die nachfolgende Freisetzung membranständiger EGFR-Ligand Vorstufen wie HB-EGF ist einer der etabliertesten EGFR-Transaktivierungsmechanismen, der z.B. auch für den Gi-Protein gekoppelten LPA-Rezeptor gezeigt werden konnte (Prenzel *et al.*, 1999). GM-6001, ein Breitbandspektrum-Inhibitor von Matrix-Metalloproteinasen, beeinflusste weder die Carbachol-induzierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung noch die M<sub>2</sub>R-vermittelte MAPK- und Akt-Aktivierung (Abb.3.8.A). Hingegen wurde die als positiv-Kontrolle verwendete LPA stimulierte MAPK-Aktivität durch den MMP-Inhibitor gehemmt (Abb.3.8.B). Eine nicht-toxische Mutante des Diphtherietoxin, die in der Lage ist HB-EGF zu binden und somit dessen mitogene Aktivität inhibiert, verringerte die LPA-induzierte ERK-Aktivierung, hatte aber keinen Effekt auf die

Aktivierung der MAPK durch den M<sub>2</sub>R (*Abb.3.8.C*). Diese Resultate lassen den Schluss zu, dass in unserem zellulären Modell die Stimulierung von MMPs und die Freisetzung von HB-EGF nicht essentiell für die M<sub>2</sub>R-vermittelte Transaktivierung des EGFR sind. Eine Zelltyp-spezifische Abhängigkeit der M<sub>2</sub>R-induzierten EGFR-Transaktivierung von HB-EGF, wie sie z.B. für den Angiotensin II-Rezeptor gezeigt wurde (Shah *et al.*, 2004), lässt sich dennoch nicht vollkommen ausschließen. Denkbar wäre auch die Stimulation der Freisetzung anderer EGFR-Liganden (Fischer *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 2004) über den M<sub>2</sub>R. Dagegen spricht allerdings, dass der spezifische MMP-Inhibitor GM-6001 (Yoshisue *et al.*, 2004) auf die M<sub>2</sub>R-vermittelte EGFR-Transaktivierung in COS-7 Zellen keine Wirkung zeigte.

Im Vergleich zu EGF bzw. LPA, das die Freisetzung von HB-EGF induziert (Prenzel *et al.*, 1999), vermitteln Carbachol oder z.B. auch Isoproterenol nur eine partielle EGFR-Transaktivierung. Während EGF und LPA sowohl die Aktivierung von ERK und Akt als auch die Aktivierung der PLC $\gamma$ -1 vermitteln, werden über den M<sub>2</sub>R nur ERK und die Proteinkinase B/ Akt aktiviert. Das heißt die Art der EGFR-Transaktivierung moduliert den weiteren „downstream“ Signalweg des jeweiligen Rezeptors.

Mitogene Wirkungen verschiedener Wachstumsfaktoren, die auch an der Tumorgenese beteiligt sind, können durch die Phospholipase C $\gamma$ -1 vermittelt werden (Bea *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 2003). So stimuliert z.B. EGF die Translokation der ubiquitär vorkommenden PLC $\gamma$ -1 zur Zellmembran, die über ihre amino-terminale SH2-Domäne an die Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 1173 bzw. über ihre carboxy-terminale SH2-Domäne an die Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 992 des EGFR bindet, was letztendlich zu einer Tyrosin-Phosphorylierung und damit Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ -1 führt (Chattopadhyay *et al.*, 1999). Die PLC $\gamma$ -1, als direkter Interaktionspartner des aktivierten EGFR, wurde zur weiteren Charakterisierung der M<sub>2</sub>R-vermittelten Transaktivierung genutzt. Der LPA-Rezeptor, der den EGFR Ligand-abhängig transaktiviert (Prenzel *et al.*, 1999), ist in der Lage neben ERK und PKB (Schäfer *et al.*, 2004) auch die PLC $\gamma$ -1 zu aktivieren (Hernandez *et al.*, 2000). Für den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor wird in der Literatur Zelltyp-spezifisch sowohl eine Ligand-unabhängige (Kim *et al.*, 2003) als auch eine Ligand-abhängige (Kim *et al.*, 2002) EGFR-Transaktivierung, die nachfolgend in die Stimulation von ERK involviert ist, beschrieben. Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe bestätigen, dass der im zellulären Modell COS-7 Zellen endogen exprimierte  $\beta$ 2-AR den EGFR ebenfalls unabhängig von MMPs transaktiviert (Dissertation S. Drube, in Vorbereitung). Im Vergleich zum LPA-transaktivierten EGFR ist der durch den  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor transaktivierte EGFR nur dann in der Lage die Tyrosin-Phosphorylierung PLC $\gamma$ -1 zu

stimulieren, wenn dieser bereits über eine erhöhte Basalaktivität (durch Ko-Stimulation mit Isoproterenol und EGF oder durch die Überexpression des EGFR) verfügt (*Abb.3.11.B* und *D*; Dissertation S. Drube, in Vorbereitung). Unter den gleichen experimentellen Bedingungen, d.h. auch mit der „Unterstützung“ von EGF, ist die durch den M<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelte EGFR-Transaktivierung, die wie gezeigt unabhängig von MMPs und der Freisetzung von HB-EGF abläuft (*Abb.3.8.A* und *C*), für eine Aktivierung der PLC $\gamma$ -1 nicht ausreichend (*Abb.3.11.A* und *C*). Der Vergleich des M<sub>2</sub>-Rezeptors, der die Aktivierung von ERK und PKB vermittelt, mit dem  $\beta$ 2-AR, der die ERK-Aktivität und unter spezifischen Bedingungen auch die Aktivierung der PLC $\gamma$ -1 induziert bzw. mit dem LPA-R, der neben der Aktivierung von ERK und Akt auch die Tyrosin-Phosphorylierung der PLC $\gamma$ -1 vermittelt, zeigt, dass sowohl der Rezeptortyp als auch die damit verbundene spezifische Art den EGFR zu „transaktivieren“, die Rekrutierung von „downstream“ Effektoren und damit den weiteren Signalweg des jeweiligen Rezeptors entscheidend beeinflussen.

Alternativ zur Ligand-abhängigen Transaktivierung des EGFR können Src-Kinasen, die auch an den mitogenen Signalwegen des M<sub>2</sub>R beteiligt sind (Igishi *et al.*, 1998), die GPCR-induzierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung vermitteln. So zeigten z.B. Keely *et al.*, 2000, dass c-Src in die M<sub>3</sub>R-induzierte EGFR-Transaktivierung involviert ist. Der Tyrosin-Rest 845 in der Kinase-Domäne des EGFR wurde als eine c-Src-spezifische Phosphorylierungsstelle des Rezeptors beschrieben (Biscardi *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002), deren „downstream“ Effektormoleküle (STAT5b und CoxII) synergistische Effekte von c-Src und EGF auf die Zellproliferation vermitteln können (Kloth *et al.*, 2003; Boerner *et al.*, 2004). Mittels verschiedener experimenteller Ansätze, d.h. (i) durch die Untersuchung der M<sub>2</sub>R-vermittelten Phosphorylierung von Tyrosin 845 sowohl des endogenen EGFR als auch des in COS-7 Zellen überexprimierten Wildtyp-EGFR und (ii) durch die Expression der EGFR-Mutante Y845F, konnte gezeigt werden, dass der Tyrosin-Rest 845 des EGFR für den M<sub>2</sub>R-Signalweg keine Rolle spielt. So wurde die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 845 des endogenen EGFR durch Carbachol nicht stimuliert (*Abb.3.9.A*). Die Überexpression der EGFR-Mutante Y845F beeinflusste die Aktivierung von ERK und PKB/ Akt über den M<sub>2</sub>R nicht (*Abb.3.9.D* und *E*). Dies lässt den Schluss zu, dass c-Src für die M<sub>2</sub>R-vermittelte EGFR-Transaktivierung nicht essentiell ist. Um dieses Ergebnis auch im Vergleich mit dem  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor zu bestätigen bzw. zu bewerten, wurde die Phosphorylierung von Tyrosin 845 nach Überexpression des Wildtyp-EGFR untersucht. Auch unter diesen Bedingungen konnte Carbachol die Phosphorylierung des c-Src spezifischen Tyrosin-Restes nicht stimulieren (*Abb.3.9.B*). Im Gegensatz dazu vermittelte Isoproterenol die Phosphorylierung von Tyrosin

845 des überexprimierten EGFR (*Abb.3.9.C*; Dissertation S. Drube, in Vorbereitung), d.h. wie schon für die Aktivierung der PLC $\gamma$ -1 benötigt der  $\beta$ 2-AR gewissermaßen die „Unterstützung von EGF“, die durch die Überexpression des EGFR simuliert wird, um die entsprechende Phosphorylierung induzieren zu können. Dieser für den  $\beta$ 2-AR identifizierte Mechanismus der „EGF-unterstützten“ Transaktivierung spielt im zellulären Modell COS-7 für den M<sub>2</sub>R auch im Hinblick auf das weitere „downstream signaling“ keine Rolle.

Jede Stimulation führt zur Dimerisierung und nachfolgend zur Trans-Phosphorylierung zweier EGFR-Monomere. Die entstandenen phosphorylierten Tyrosin-Reste sind Ausgangspunkte für die Vermittlung der weiteren Signalwege. Wie der Vergleich zwischen M<sub>2</sub>R und  $\beta$ 2-AR bezüglich der Src-spezifischen Phosphorylierungsstelle Tyrosin 845 zeigt, scheint die Phosphorylierung bestimmter Tyrosin-Reste für jede Transaktivierung des EGFR spezifisch zu sein. Um die Bedeutung verschiedener Auto-Phosphorylierungsstellen des EGFR für die M<sub>2</sub>R-vermittelte MAPK zu untersuchen, erfolgte die Ko-Expression des M<sub>2</sub>R mit verschiedenen EGFR Tyrosin-Mutanten. Im Vergleich dazu wurde auch ein EGFR-Monomer mit einer mutierten extrazellulären CR1-Domäne ko-exprimiert, das nicht mehr in der Lage ist zu dimerisieren und somit auch die für die Signalweiterleitung notwendigen phosphorylierten Tyrosin-Reste nicht mehr generieren kann (Garrett *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Carbachol-induzierte Transaktivierung und die folgende Dimerisierung des EGFR in die Aktivierung der MAPK über den M<sub>2</sub>R involviert ist (*Abb.3.10.A* und *B*). Die Auto-Phosphorylierungsstellen Tyrosin 1068 und Tyrosin 1086 des EGFR, die Andockstellen für die Adaptorproteine Grb2 und Gab1 und damit essentielle Mediatoren des Ras- und PI3-K-Signalweges „downstream“ des EGFR (Ward *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 2000) sind, waren an der M<sub>2</sub>R-induzierten MAPK-Aktivierung über den EGFR beteiligt (*Abb.3.10.C*).

Fast man die bisherigen Ergebnisse zusammen, so konnte gezeigt werden, dass die Carbachol-induzierte EGFR-Transaktivierung, die unabhängig von MMPs und der Freisetzung von HB-EGF abläuft, sowohl an der Stimulation der MAPK als auch an der Aktivierung des PI3-K / Akt-Signalweges über den M<sub>2</sub>R beteiligt ist. Der durch den M<sub>2</sub>R-transaktivierte EGFR ist allerdings nicht in der Lage, die Aktivierung der PLC $\gamma$ -1 zu stimulieren. Im Vergleich mit dem LPA-Rezeptor, der den EGFR Ligand-abhängig transaktiviert (Prenzel *et al.*, 1999) und sowohl die Aktivierung MAPK und PKB/ Akt als auch die Phosphorylierung der PLC $\gamma$ -1 induziert (Schäfer *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2000), wird deutlich, dass die spezifische Art der Transaktivierung den weiteren „downstream“ Signalweg des jeweiligen Rezeptors entscheidend moduliert. Im Gegensatz zum  $\beta$ 2-AR, der durch die „Unterstützung von EGF“



die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 845 des EGFR vermitteln und nachfolgend die PLC $\gamma$ -1 aktivieren kann, induziert Carbachol die Phosphorylierung dieses Src-spezifischen Tyrosin-Restes des EGFR nicht. Dies deutet darauf hin, dass c-Src in unserem zellulären Modell offensichtlich nicht an der M<sub>2</sub>R-vermittelten EGFR-Transaktivierung beteiligt ist.

Wie aus der Literatur bekannt ist (Daub *et al.*, 1997; Igishi *et al.*, 1998) und auch in unseren Untersuchungen bestätigt wurde, spielen Src-Kinasen sowohl bei der M<sub>2</sub>R-vermittelten MAPK- (Abb.3.5.A) und PKB-Aktivierung (Abb.3.6.F) als auch bei der Carbachol-induzierten EGFR-Transaktivierung (Abb.3.14.A) eine kritische Rolle. Zelltyp-spezifisch scheinen dabei verschiedene Mitglieder der Src-Kinase Familie in die M<sub>2</sub>R-vermittelte Aktivierung von ERK involviert zu sein. So untersuchten Wan *et al.* (1996) in DT40 Zellen die Rolle der Src-Kinase-Isoform Lyn im M<sub>2</sub>R-Signalweg. c-Src ist sowohl in glattmuskulären Darm-Zellen als auch in neuronalen „precursor“ Zellen in die M<sub>2</sub>R-vermittelte Stimulation der Zellproliferation involviert. (Singer *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). Über die Regulation der Funktion der Lipid- und Proteinphosphatase PTEN scheinen Src-Kinasen den PI3K-Akt-Signalweg zu modulieren (Lu *et al.*, 2003). In vielen Fällen ist allerdings der Mechanismus, über den Src-Kinasen die mitogenen Signalwege G-Protein gekoppelter Rezeptoren regulieren bzw. den „cross talk“ mit RTKs vermitteln, noch unklar (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Yeatman, 2004).

Um die Rolle der in vielen Zellen ubiquitär vorkommenden Src-Kinasen c-Src, Fyn und Yes im mitogenen Signalweg des M<sub>2</sub>R zu charakterisieren, wurden verschiedene experimentelle Strategien angewendet.

Zunächst wurde der Rezeptor mit verschiedenen Mutanten dieser Kinasen in COS-7 Zellen ko-exprimiert. Eine Kinase-inaktive Mutante von Fyn (Fyn K299M), die in der Literatur als dominant negativ beschrieben wird (Mariotti *et al.*, 2001), inhibierte sowohl die Carbachol-induzierte ERK- als auch die Akt-Aktivierung (Abb.3.12.A). Im Vergleich dazu war die Hemmung der M<sub>2</sub>R-vermittelten MAPK-Aktivierung durch die dominant negative c-Src-Mutante K296R/Y528F, welche selektiv die Expression und Aktivierung von c-Src vermindert (Xi *et al.*, 2003), geringer (Abb.3.12.A). Die Stimulierung der PKB über den M<sub>2</sub>R blieb durch die dominant negative Src-Mutante unbeeinflusst (Abb.3.12.A). Die Ko-Expression einer konstitutiv aktiven Yes-Mutante (Espanel und Sudol, 2001) in COS-7 Zellen beeinflusste das mitogene „signaling“ des M<sub>2</sub>R nicht (Abb.3.12.B).

Des Weiteren wurde ein genetischer Ansatz genutzt, um die Rolle von c-Src, Yes und Fyn im mitogenen M<sub>2</sub>R-Signalweg zu charakterisieren bzw. mit der M<sub>2</sub>R-induzierten ERK- und Akt-

Aktivierung in COS-7 Zellen zu vergleichen. Mit ähnlichen experimentellen Strategien, d.h. der Verwendung Src-Kinase-defizienter Zellen, wurde beispielsweise auch die Rolle von c-Src und der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kinase Pyk2 bei der durch verschiedene GPCRs vermittelten EGFR-Transaktivierung untersucht (Andreev *et al.*, 2001). Das Fyn für die Vermittlung der Aktivierung von ERK und PKB/ Akt über den  $\text{M}_2\text{R}$  essentiell ist, konnte auch nach Überexpression des Rezeptors in c-Src-, Yes- und Fyn-defizienten Fibroblasten (SYF Zellen) bzw. in Fibroblasten, die für Yes- und Fyn-defizient sind (Src<sup>++</sup> Zellen) bestätigt werden. In Src<sup>++</sup> Zellen stimulierte Carbachol nur die MAPK, nicht aber die Proteinkinase B (*Abb.3.13.A*). Die Fähigkeit des  $\text{M}_2\text{R}$ , ERK und PKB zu aktivieren, ging in SYF Zellen vollkommen verloren (*Abb.3.13.A und B*).

Sowohl der inhibierende Effekt der dominant negativen Fyn-Mutante auf die Carbachol-stimulierte MAPK- und Akt-Aktivität in COS-7 Zellen als auch die Ergebnisse mit den Src-Kinase-defizienten Zellen unterstreichen die essentielle Rolle von Fyn im mitogenen Signalweg des  $\text{M}_2$ -Rezeptors. Im Vergleich zu Fyn scheint c-Src bei der Vermittlung der ERK-Aktivierung durch den  $\text{M}_2\text{R}$  in unserem zellulären Modell nur eine untergeordnete Rolle zu spielen bzw. an der Carbachol-induzierten Akt-Aktivierung unbeteiligt zu sein (*Abb.3.12.A und Abb.3.13.A*).

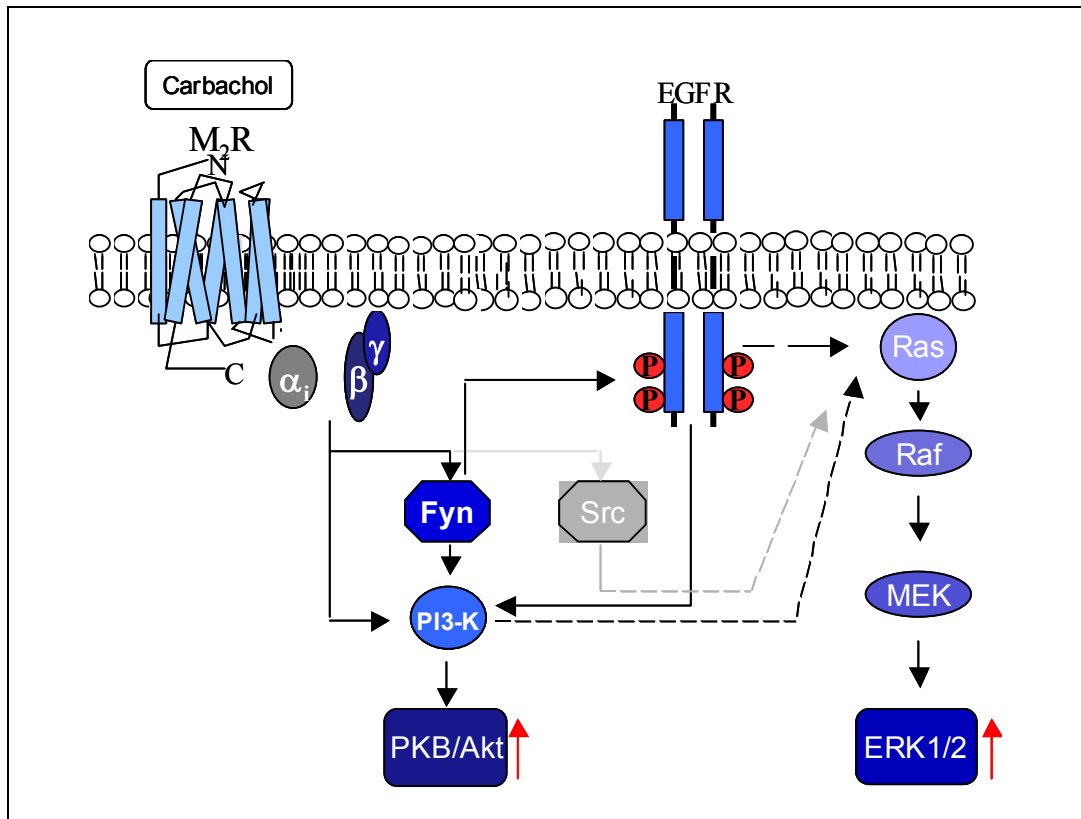
Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich, das EGF im Gegensatz zu Carbachol sowohl in COS-7 Zellen, welche die dominant negative Fyn-Mutante überexprimierten als auch in SYF Zellen in der Lage war, ERK und PKB/ Akt zu aktivieren (*Abb.3.13.B*). Diese Resultate, sowie die Hemmung der Carbachol-induzierten EGFR-Transaktivierung durch einen spezifischen Src-Kinase Inhibitor (*Abb.3.14.A*) weisen auch auf eine Rolle von Fyn bei der  $\text{M}_2\text{R}$ -vermittelten Transaktivierung des EGFR hin. Häufig werden in der Literatur Ko-Immunpräzipitierungs-Experimente verwendet, um eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen zu detektieren. So konnte z.B. aus COS-7 Zellen, die den Flag-markierten- $\beta_2$ -AR,  $\beta$ -Arrestin und c-Src überexprimierten nach Isoproterenol-Stimulation unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers der gegen das Flag-Epitop gerichtet war, ein Komplex bestehend aus Flag- $\beta_2$ -AR,  $\beta$ -Arrestin, c-Src und endogenem EGFR immunpräzipitiert werden (Maudsley *et al.*, 2000). Um die Rolle von Fyn bei der  $\text{M}_2\text{R}$ -vermittelten EGFR-Transaktivierung weiter zu spezifizieren, wurde eine mögliche Interaktion zwischen EGFR und Fyn nach Carbachol-Stimulation untersucht. Dabei zeigte sich eine durch Carbachol-stimulierte Ko-Immunpräzipitierung zwischen Fyn und dem EGFR bzw. dem EGFR und Fyn (*Abb.3.15.A und B*). Im Vergleich konnte Carbachol weder die Bildung eines Komplexes von EGFR und c-Src noch von EGFR und Yes in COS-7 Zellen induzieren

(Abb.3.14.B, C und D). Die Tatsache, dass Isoproterenol die physikalische Assoziation zwischen Fyn und dem EGFR nicht stimulieren konnte (Abb.3.14.C), unterstreicht die spezifische Rolle von Fyn bei M<sub>2</sub>R-vermittelten Transaktivierung des EGFR.

Letztendlich konnte unter Verwendung verschiedener experimenteller Ansätze, d.h. (i) der Ko-Expression des M<sub>2</sub>R und dominant negativer Src-Kinase-Mutanten in COS-7 Zellen, (ii) der Untersuchung der Carbachol-induzierten ERK- und Akt Aktivierung in SYF bzw. Src<sup>++</sup> Zellen und (iii) der durch Carbachol-stimulierten Komplexbildung zwischen EGFR und Fyn gezeigt werden, dass Fyn das Mitglied der Src-Kinase Familie ist, das für die Vermittlung von Signalen vom M<sub>2</sub>-Rezeptor zur MAPK und Proteinkinase B/ Akt „upstream“ des EGFR verantwortlich ist.

Für das Expressionsmodell COS-7 Zellen konnte bestätigt werden, dass der M<sub>2</sub>R die Aktivierung von ERK über  $\beta\gamma$ -Komplexe, PI3-Kinasen, EGFR und Src-Kinasen, in Ras-abhängiger Weise vermittelt (Crespo *et al.*, 1994; Daub *et al.*, 1997) bzw. dass über den M<sub>2</sub>R auch der PI3-K/ Akt-Signalweg aktiviert werden kann (Murga *et al.*, 1998). Neue Aspekte des M<sub>2</sub>R-Signalweges in COS-7 Zellen sind, dass neben der Carbachol-induzierten ERK-Aktivierung Src-Kinasen und EGFR auch die M<sub>2</sub>R-induzierte Akt-Aktivierung vermitteln. Des weiteren zeigte sich, dass der M<sub>2</sub>R die EGFR-Transaktivierung im Expressionsmodell COS-7 Zellen Ligand-unabhängig, d.h. ohne die Aktivierung von MMPs und die Freisetzung von HB-EGF vermittelt. Dies konnte durch die Verwendung des spezifischen MMP-Inhibitors GM-6001 bzw. durch die Benutzung des HB-EGF-Bindungspartners CRM197 gezeigt werden. Im Vergleich zu EGF bzw. LPA, das die Freisetzung von HB-EGF induziert, vermittelt Carbachol nur eine partielle EGFR-Transaktivierung. Während EGF und LPA sowohl die Aktivierung von ERK und Akt als auch die Aktivierung der PLC $\gamma$ -1 vermitteln, werden über den M<sub>2</sub>R nur ERK und Akt aktiviert. Das heißt die Art der EGFR-Transaktivierung beeinflusst den weiteren „downstream“ Signalweg entscheidend. Die Src-spezifische Tyrosin-Rest 845 des EGFR spielt im Signalweg des M<sub>2</sub>R keine Rolle. Durch die Verwendung des Src-Kinase spezifischen Inhibitors PP2, durch Überexpression dominant negativer Mutanten von c-Src und Fyn in COS-7 Zellen und die Nutzung Src-Kinase defizienter Fibroblasten (SYF, Src<sup>++</sup> Zellen) konnte gezeigt werden, dass sowohl die Carbachol-induzierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung als auch die Aktivierung von ERK und Akt als „downstream“ Zielmoleküle des M<sub>2</sub>R-Signalweges spezifisch durch die Src-Kinase-Isoform Fyn vermittelt werden. Ko-Immunpräzipitierungs-Experimente zeigten, dass Carbachol spezifisch eine physikalische Assoziation zwischen Fyn und EGFR induzierte.

Hingegen konnte eine durch Carbachol-vermittelte Komplex-Bildung zwischen EGFR und c-Src oder Yes nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse und die Hemmung der M<sub>2</sub>R-vermittelten EGFR-Transaktivierung durch PP2 lassen die Schlussfolgerung zu, dass Fyn „upstream“ des EGFR in den mitogenen Signalweg des M<sub>2</sub>R involviert ist.



**Abb.4.1. Vereinfachtes Modell der mitogenen Signalwege des M<sub>2</sub>R im Expressionsmodell COS-7 Zellen.** Der durch Carbachol transaktivierte EGFR ist an der Aktivierung von ERK und PKB/ Akt beteiligt. Fyn vermittelt die M<sub>2</sub>R-induzierte EGFR-Transaktivierung.

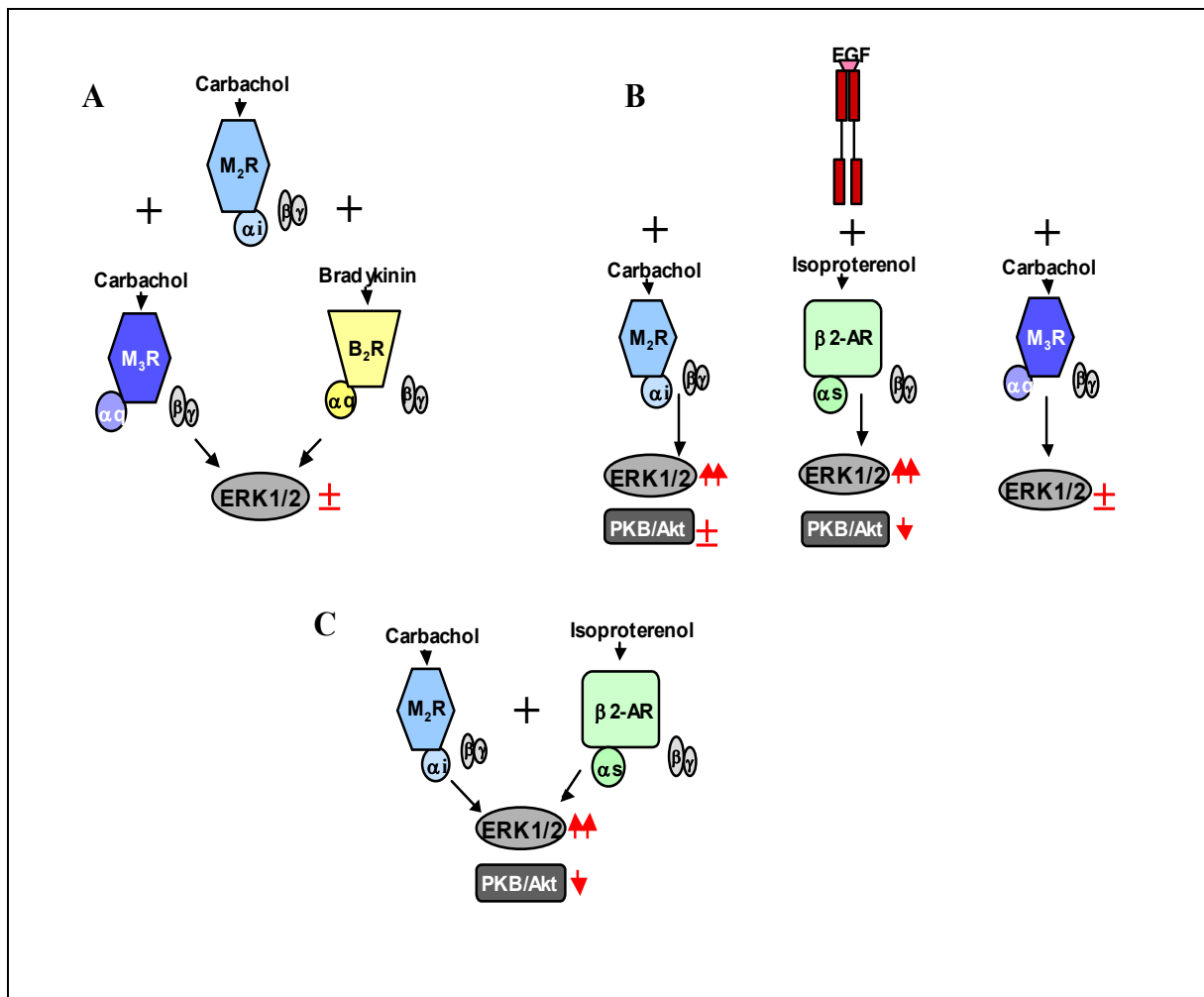
In den letzten Jahren wurde klar, dass die „downstream“ Signalwege verschiedener Rezeptoren nicht voneinander isoliert ablaufen, sondern vielmehr in komplexe Signal-Netzwerke integriert sind. Sowohl die Interaktion der Signalwege verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren als auch der „cross talk“ von GPCRs und RTKs sind an der Regulation der Zellproliferation, z.B. über die Modulation der MAPK, beteiligt (Selbie und Hill, 1998). In unserer Arbeitsgruppe wurde das zelluläre Modell COS-7 genutzt, um den Mechanismus der Integration der Signalwege von B<sub>2</sub>R und β<sub>2</sub>-AR (Hanke *et al.*, 2001) bzw. EGFR und β<sub>2</sub>-AR (Dissertation S. Drube, in Vorbereitung) zu charakterisieren und die Auswirkung der Ko-Stimulation der entsprechenden Rezeptoren auf die MAPK zu untersuchen. Um den M<sub>2</sub>R innerhalb dieses zellulären Signal-Netzwerkes einordnen zu können, wurde er mit verschiedenen anderen Rezeptoren ko-stimuliert. Die simultane Stimulation des M<sub>2</sub>R und des Gq-Protein gekoppelten B<sub>2</sub>R zeigte im Vergleich mit den

entsprechenden Einzelstimulationen keinen Effekt auf die Aktivität der MAPK (*Abb.3.16.A; Abb.4.2.A*). Ein ähnliches Ergebnis bezüglich der ERK-Aktivierung hatte die gleichzeitige Aktivierung des M<sub>2</sub>R und des Gq-Protein gekoppelten M<sub>3</sub>-Rezeptors (*Abb.3.16.B; Abb.4.2.A*). Im Gegensatz dazu, fand man in CHO-Zellen, die den M<sub>2</sub>R und den M<sub>3</sub>R stabil exprimierten eine synergistische ERK-Aktivierung im Vergleich zu Zellen, die jeweils nur einen Rezeptorsubtyp stabil exprimierten (Hornigold *et al.*, 2003). In unserem zellulären Modell hatte Stimulation des M<sub>3</sub>R keinen Effekt auf die EGF-induzierte MAPK-Aktivierung (*Abb.3.17.B; Abb.4.2.B*). Im Vergleich fanden Zhang *et al.* in humanen Neuroblastom-Zellen eine durch den endogenen M<sub>3</sub>R-vermittelte Inhibierung des mitogenen EGF-„signaling“. Diese Ergebnisse deuten auf eine Zelltyp-spezifische Vernetzung der Signalwege verschiedener Rezeptoren hin, was letztendlich eine unterschiedliche Regulation der entsprechenden „downstream targets“ zur Folge hat. Ein weiterer Faktor, der die synergistische Aktivierung verschiedener Zielmoleküle zu beeinflussen scheint, ist die Überexpression der beteiligten Rezeptoren im jeweiligen zellulären Modell.

Synergistische Effekte auf die MAPK-Aktivierung zeigten sich sowohl bei der Ko-Stimulation des M<sub>2</sub>R und des EGFR (*Abb.3.17.A; Abb.4.2B*) als auch bei der simultanen Stimulation des  $\beta$ 2-AR und des EGFR (*Abb.3.18.C; Abb.4.2.B*). Die bisherigen Resultate, die wie beschrieben, einen unterschiedlichen EGFR-Transaktivierungsmechanismus beider G-Protein gekoppelter Rezeptoren zeigen, lassen allerdings die Vermutung zu, dass der Synergismus auf der Ebene der MAPK über eine unterschiedliche Integration der Signalwege von M<sub>2</sub>R und EGFR bzw.  $\beta$ 2-AR und EGFR vermittelt wird. So wäre für den  $\beta$ 2-AR und den EGFR, die durch Isoprotenerol-vermittelte und „EGF-unterstützte“ Transaktivierung des EGFR ein möglicher Signalintegrationspunkt auf dem Weg zur synergistischen Aktivierung von ERK. Wie die Untersuchungen zeigten, ist ein Synergismus zwischen Carbachol und EGF auf der Ebene der EGFR-Transaktivierung unwahrscheinlich. Die Proteinkinase C, die im M<sub>2</sub>R-Signalweg keine Rolle spielt und Src-Kinasen, die im mitogenen EGF-„signaling“ von untergeordneter Bedeutung sind, scheinen als Verküpfungspunkte beider Signalwege wenig geeignet zu sein. Dagegen könnten PI3-Kinasen in die Vermittlung der synergistischen ERK-Aktivierung nach simultaner Stimulation von EGFR und M<sub>2</sub>R involviert sein.

Im Gegensatz zur synergistischen MAPK-Aktivierung nach Ko-Stimulation von M<sub>2</sub>R und EGFR, hatte Carbachol keinen Effekt auf die EGF-induzierte Akt-Aktivierung (*Abb.3.17.C; Abb.4.2.B*). Dies zeigt, dass verschiedene Zielmoleküle durch die Verschaltung von Signalwegen selektiv reguliert werden können. So kann z.B. ERK in CHO-Zellen durch die

simultane Stimulation von  $M_2R$  und  $M_3R$  synergistisch aktiviert werden, JNKs bleiben hingegen unbeeinflusst (Hornigold *et al.*, 2003).



**Abb.4.2. Vereinfachtes Modell eines Signal-Netzwerkes im Expressionsmodell COS-7 Zellen.** Die Ko-Stimulation des  $M_2R$  mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder dem EGFR hat unterschiedliche synergistische Effekte auf die Aktivierung von ERK und PKB/ Akt.

Die gleichzeitige Aktivierung des  $M_2R$  und des Gs-Protein gekoppelten  $\beta 2-AR$  resultierte in eine synergistische Erhöhung der MAPK-Aktivität (Abb.3.18.A und B; Abb.4.2.C). Da c-Src für den mitogenen Signalweg des  $\beta 2-AR$  in COS-7 Zellen essentiell ist und wie gezeigt, neben Fyn zumindest teilweise in die Carbachol-induzierte ERK-Aktivierung involviert ist, könnte die synergistische ERK-Aktivierung nach simultaner Stimulation von  $M_2R$  und  $\beta 2-AR$  möglicherweise über c-Src vermittelt werden. Im Gegensatz zur synergistischen Erhöhung der ERK-Aktivität inhibierte Isoproterenol die Carbachol-stimulierte Proteinkinase B-Aktivierung und im Vergleich auch die EGF-vermittelte Aktivierung der PKB/ Akt (Abb.3.19. A und B, Abb.4.2.B und C). Dieser Effekt könnte über das durch den  $\beta 2-AR$  aktivierte cAMP-PKA-System vermittelt werden. In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass das cAMP-

System „downstream“ Gs-Protein gekoppelter Rezeptoren die über die PKB- bzw. MAPK-vermittelte Zellproliferation hemmt (Hecquet *et al.*, 2002; Lou *et al.*, 2002) und auch in der Lage ist, die über verschiedene Wachstumsfaktoren stimulierte ERK-Aktivität negativ zu modulieren (Schmitt und Stork, 2002). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass im Fall des „cross talk“ zwischen M<sub>2</sub>R und β<sub>2</sub>-AR ähnliche regulatorische Mechanismen wie bei der Interaktion von B<sub>2</sub>R und β<sub>2</sub>-AR (Hanke *et al.*, 2001) bestehen, die eine multiple Stimulierung der Zellproliferation über ERK und PKB/ Akt verhindern.

Der Vergleich unserer Resultate mit den Daten aus der Literatur zeigt, dass die Integration singulärer Signalwege in ein Netzwerk Zelltyp-spezifisch, also in Abhängigkeit von der Expression der beteiligten Signalproteine erfolgt. Rezeptor-Typ-spezifisch werden dabei potentielle „downstream targets“ wie verschiedene MAPK-Isoformen oder die Proteinkinase B unterschiedlich reguliert. Innerhalb von Signal-Netzwerken scheinen multiple regulatorische Mechanismen zu existieren, die nach Ko-Stimulation der Zellen mit verschiedenen Liganden, die über ERK induzierte Zellproliferation auf der einen Seite und das durch die Proteinkinase B vermittelte „Überleben“ der Zellen auf der anderen Seite ausgleichen können.

## 5. Zusammenfassung

GPCRs (G-Protein gekoppelte Rezeptoren) wie der Gi-Protein gekoppelte M<sub>2</sub> muscarinische Acetylcholin Rezeptor sind in der Lage, die Zellproliferation, z.B. über die Aktivierung von ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), zu stimulieren. Am Beispiel des M<sub>2</sub>R wird auch deutlich, dass die Regulation mitogener Prozesse entscheidend durch die Interaktion mit Signalwegen anderer Rezeptoren moduliert wird. In der vorliegenden Arbeit konnten für die M<sub>2</sub>R-vermittelte Aktivierung von ERK und der Proteinkinase B/ Akt im Expressionsmodell COS-7 Zellen sowohl eine Reihe von Literaturdaten (Crespo *et al.*, 1994; Daub *et al.*, 1997) bestätigt als auch wesentlich neue Aspekte aufgezeigt werden. Neue Erkenntnisse sind:

- Der M<sub>2</sub>R vermittelt die Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR (epidermal growth factor receptor) Ligand-unabhängig.
- Fyn konnte als das Mitglied der Src-Kinase-Familie identifiziert werden, dass sowohl für die Aktivierung von ERK und Akt als auch für die Transaktivierung des EGFR über den M<sub>2</sub>R essentiell ist.
- Die Fyn-vermittelte, Carbachol-induzierte EGFR-Transaktivierung hat ein unvollständiges „downstream signaling“ zur Folge.
- Die Ko-Stimulation des M<sub>2</sub>R mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren bzw. mit dem EGFR zeigte unterschiedliche synergistische Effekte auf die Aktivierung von ERK und Akt.

Die durch den M<sub>2</sub>R induzierte Transaktivierung des EGFR läuft ohne die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und die anschließende Freisetzung von HB-EGF ab. Dies konnte durch die Verwendung eines spezifischen MMP-Inhibitors (GM-6001) bzw. eines HB-EGF Agonisten (CRM197) gezeigt werden.

Im Vergleich zu EGF bzw. LPA, das die Freisetzung von HB-EGF induziert, vermittelt Carbachol nur eine partielle EGFR-Transaktivierung. Während EGF und LPA sowohl die Aktivierung von ERK und Akt als auch die Aktivierung der PLC $\gamma$ -1 (Phospholipase C $\gamma$ -1) vermitteln, werden über den M<sub>2</sub>R nur ERK und Akt aktiviert. Das heißt, die Art der EGFR-Transaktivierung beeinflusst den weiteren „downstream“ Signalweg entscheidend.

Mittels verschiedener experimenteller Strategien, d.h. durch die Verwendung des Src-Kinase spezifischen Inhibitors PP2, durch Überexpression dominant negativer Mutanten von c-Src und Fyn in COS-7 Zellen und die Nutzung Src-Kinase defizienter Fibroblasten (SYF, Src<sup>++</sup> Zellen) konnte gezeigt werden, dass sowohl die Carbachol-induzierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung als auch die Aktivierung von ERK und Akt als „downstream“ Zielmoleküle



des M<sub>2</sub>R-Signalweges spezifisch nicht durch c-Src sondern durch die Src-Kinase-Isoform Fyn vermittelt werden.

Ko-Immünpräzipitierungs-Experimente zeigten, dass Carbachol für den EGFR eine spezifische physikalische Assoziation mit Fyn, nicht aber mit c-Src oder Yes, induzierte. Im Gegensatz dazu konnte Isoproterenol die Interaktion von Fyn und EGFR nicht vermitteln. Diese Ergebnisse und die Hemmung der M<sub>2</sub>R-vermittelten EGFR-Transaktivierung durch PP2 lassen die Schlussfolgerung zu, dass Fyn „upstream“ des EGFR in den mitogenen Signalweg des M<sub>2</sub>R involviert ist.

Die Eingliederung des M<sub>2</sub>R in ein zelluläres Signal-Netzwerk wurde durch die simultane Stimulation des M<sub>2</sub>R mit verschiedenen anderen Rezeptoren simuliert. In Abhängigkeit von den interagierenden Rezeptor-Typen konnte gezeigt werden, dass ERK und PKB/ Akt als Zielmoleküle der Signalwege unterschiedlich reguliert werden. Die gleichzeitige Aktivierung des M<sub>2</sub>R und des Gq-Protein gekoppelten B<sub>2</sub>R oder des M<sub>3</sub>R hatte im Vergleich mit den Einzelstimulationen keinen Effekt auf die ERK-Aktivierung. Hingegen führte die Ko-Stimulation des M<sub>2</sub>R und des β<sub>2</sub>-AR bzw. des M<sub>2</sub>R und des EGFR zu einer synergistischen Erhöhung der MAPK-Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei simultaner Aktivierung des M<sub>2</sub>R und des β<sub>2</sub>-AR und im Vergleich auch bei einer Ko-Stimulation des EGFR und des β<sub>2</sub>-AR eine Verringerung der Carbachol- bzw. EGF-stimulierten Akt-Aktivität durch Isoproterenol. Dies lässt die Vermutung zu, dass innerhalb von zellulären Signal-Netzwerken multiple regulatorische Mechanismen bestehen, die bei simultaner Zell-Stimulation sowohl die über ERK-vermittelte Proliferation als auch die Promotion des „cell survival“ über die Proteinkinase B im Gleichgewicht halten können. Die Verschaltung dieser Mechanismen innerhalb eines Netzwerkes und damit letztendlich die Regulation der Zielmoleküle, ist dabei Zell-spezifisch, z.B. durch die Expressionsmuster involvierter Signalproteine aber auch Stimulus-spezifisch, z.B. durch die Konzentration und die Kinetik der eingesetzten Liganden determiniert.

## 6. Literatur

**A. Wells and J.R. Grandis** (2003) Phospholipase C-gamma1 in tumor progression. *Clin.Exp. Metastasis* **20(4)**:285-90

**Adomeit, A., Graneß, A., Gross, S., Seedorf, K., Wetzker, R. and C. Liebmann** (1999) Bradykinin B(2) receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol.Cell.Biol.* **19(8)**:5289-5297

**Alblas, J., van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Milligan, G. and W.H. Moolenaar** (1993) Gi-mediated activation of the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts. *J.Biol.Chem.* **268(30)**:22235-22238

**Andreev, J., Galisteo, M.L., Kranenburg, O., Logan, S.K., Chiu, E.S., Okigaki, M., Cary, L.A., Moolenaar, W.H. and J. Schlessinger** (2001) Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J.Biol.Chem.* **276(23)**:20130-5

**Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M. and S. Higashiyama** (2002) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat.Med.* **8(1)**:35-40

**Bae, S.S., Lee, Y.H., Chang, J.S., Galadari, S.H., Kim, Y.S., Ryu, S.H. and P.G. Suh** (1998) Src homology domains of phospholipase C gamma1 inhibit nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *J. Neurochem.* **71(1)**:178-85

**Baumgartner, M.K., Wie, J. and R.S. Aronstam** (1993) Retinoic acid-induced differentiation of a human neuroblastoma cell line alters muscarinic receptor expression. *Brain Res.Dev. Brain Res.* **72(2)**:305-8

**Bea, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C. Tekle, E., Chock, P.B. and S.G. Rhee** (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J.Biol.Chem.* **272(1)**: 217-221

**Bence, K., Ma, W., Kozasa, T. and X.Y. Huang** (1997) Direct stimulation of Bruton's tyrosine kinase by G(q)-protein alpha-subunit. *Nature* **389(6648)**:296-9

**Bhalla, U.S. and R. Iyengar** (1999) Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* **283(5400)**:381-387

**Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H. and S.J. Parsons** (1999) c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J.Biol.Chem.* **274(12)**:8335-8343

- Blakesley, V.A., Scrimgeour, A., Esposito, D. and D. Le Roith** (1996) Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* **7(2)**: 153-159
- Boerner, J.L., Demory, M.L., Silva, C. and S.J. Parsons** (2004) Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. *Mol.Cell.Biol.* **24(16)**:7059-71
- Bommakanti, R.K., Vinayak, S. and W.F. Simonds** (2000) Dual regulation of Akt/protein kinase B by heterotrimeric G protein subunits. *J.Biol.Chem.* **275(49)**:38870-6
- Brändlin, I., Hubner, S., Eiseler, T., Martinez-Moya, M., Horschinek, A., Hausser, A., Link, G., Rupp, S., Storz, P., Pfizenmaier, K. and F.J. Johannes** (2002) Protein kinase C (PKC) $\eta$ -mediated PKC  $\mu$  activation modulates ERK and JNK signal pathways. *J.Biol.Chem.* **277(8)**:6490-6
- Bymaster, F.P., McKinzie, D.L., Felder, C.C. and J. Wess** (2003) Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem. Res.* **28(3-4)**:437-42
- C. Liebmann** (2001) Regulation of MAPkinase activity by peptide receptor signalling pathway: Paradigms of multiplicity. *Cellular Signalling* **13**: 777-785
- C. Liebmann** (2004) G protein-coupled receptors and their signaling pathways: Classical therapeutical targets susceptible to novel therapeutic concepts. *Current Pharmaceutical Design* **10**: 1937-1958
- C.J. van Koppen and N.M. Nathanson** (1990) Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J.Biol.Chem.* **265(34)**:20887-92
- Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q., Mernaugh, R. and G. Carpenter** (1999) The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C- $\gamma$ 1 with the activated EGF receptor. *J.Biol.Chem.* **274(37)**:26091-7
- Cochet, C., Gill, G.N., Meisenhelder, J., Cooper, J.A. and T.Hunter** (1984) C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J.Biol.Chem.* **259(4)**: 2553-2558
- Coffer, P.J., Jin, J. and J.R. Woodgett** (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem.J.* **335 ( Pt 1)**:1-13
- Cordeaux, Y. and S.J. Hill** (2002) Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors. *Neurosignals* **11(1)**:45-57
- Coso, O.A., Teramoto, H., Simonds, W.F. and J.S. Gutkind** (1996) Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* **271(8)**:3963-6

- Crespo, P., Xu, N., Daniotti, J.L., Troppmair, J., Rapp, U.R. and J.S. Gutkind** (1994) Signaling through transforming G protein-coupled receptors in NIH 3T3 cells involves c-Raf activation. Evidence for a protein kinase C-independent pathway. *J.Biol.Chem.* **269(33)**:21103-9
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F. and J.S. Gutkind** (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **369(6479)**:418-420
- Cunnick, J.M., Dorsey, J.F., Munoz-Antonia, T., Mei, L. and J. Wu** (2000) Requirement of SHP2 binding to Grb2-associated binder-1 for mitogen-activated protein kinase activation in response to lysophosphatidic acid and epidermal growth factor. *J.Biol.Chem.* **275(18)**:13842-8
- Daaka, Y., Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz** (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390(6655)**: 88-91
- Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. and A. Ullrich** (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* **16(23)**:7032-7044
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C. and A. Ullrich** (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* **379(6565)**:557-60
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. and J.L. Bos** (2000) Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J. Biol. Chem.* **275(27)**: 20829-20836
- Della Rocca, G.J., Maudsley, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. and L.M. Luttrell** (1999) Pleiotropic coupling of G protein-coupled receptors to the mitogen-activated protein kinase cascade. Role of focal adhesions and receptor tyrosine kinases. *J.Biol.Chem.* **274(20)**:13978-13984
- Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S.A. and J. Schlessinger** (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* **383(6600)**:547-550
- F.R. Coulson and A.D. Fryer** (2003) Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol.Ther.* **98(1)**:59-69
- Faure, M., Voyno-Yasenetskaya, T.A. and H.R. Bourne** (1994) cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J.Biol.Chem.* **269(11)**:7851-7854
- Fischer, O.M., Hart, S., Gschwind, A. and A. Ullrich** (2003) EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochemical Society Transactions* **31(6)**: 1203-1208
- Fukuhara, S., Marinissen, M.J., Chiariello, M. and J.S. Gutkind** (2000) Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves G $\alpha$ q and G $\alpha$ 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras and Rho-independent pathway. *J.Biol.Chem.* **275(28)**:21730-6

**G. Carpenter** (2000) EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci.STKE*. **2000(15):PE1**

**Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and C. W. Ward** (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* **110**, 763–773

**Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W. and C.W. Ward** (2003) The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol.Cell*. **11(2):495-505**

**Gekeler, V., Boer, R., Uberall, F., Ise, W., Schubert, C., Utz, I., Hofmann, J., Sanders, K.H., Schachtele, C., Klemm, K. and H. Grunicke** (1996) Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Br.J.Cancer*. **74(6):897-905**

**Graneß, A., Hanke, S., Boehmer, F.D., Presek, P. and C. Liebmann** (2000) Protein-tyrosine-phosphatase-mediated epidermal growth factor (EGF) receptor transinactivation and EGF receptor-independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by bradykinin in A431 cells. *Biochem.J*. **347(Pt 2):441-447**

**Grewal, S.S., Horgan, A.M., York, R.D., Withers, G.S., Banker, G.A. and P.J. Stork** (2000) Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*. **275(5):3722-3728**

**Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O.M. and A. Ullrich** (2003) TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J*. **22(10):2411-21**

**Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M. and A. Ullrich** (2001) Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* **20(13):1594-1600**

**Guo, F.F., Kumahara, E. and D. Saffen** (2001) A CalDAG-GEFI/Rap1/B-Raf cassette couples M(1) muscarinic acetylcholine receptors to the activation of ERK1/2. *J.Biol.Chem*. **276(27):25568-81**

**Gutkind, J.S., Crespo, P., Xu, N., Teramoto, H. and O.A. Coso** (1997) The pathway connecting m2 receptors to the nucleus involves small GTP-binding proteins acting on divergent MAP kinase cascades. *Life Sci*. **60(13-14):999-1006**

**Gutkind, J.S., Novotny, E.A., Brann, M.R. and K.C. Robbins** (1991) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A*. **88(11):4703-7**

**H. Yoshisue and K. Hasegawa** (2004) Effect of MMP/ADAM inhibitors on goblet cell hyperplasia in cultured human bronchial epithelial cells. *Biosci.Biotechnol.Biochem*. **68(10):2024-31**

**H.R. Bourne** (1997) How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9(2)**: 134-142

**Häfner, S., Adler, H.S., Mischak, H., Janosch, P., Heidecker, G., Wolfman, A., Pippig, S., Lohse, M., Ueffing, M and W. Kolch** (1994) Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* **14(10)**:6696-6703

**Hanke, S., Nürnberg, B., Groll, D.H. and C. Liebmann** (2001) Cross talk between beta-adrenergic and bradykinin B(2) receptors results in cooperative regulation of cyclic AMP accumulation and mitogen-activated protein kinase activity. *Mol.Cell Biol.* **21(24)**:8452-60

**Hausser, A., Storz, P., Hubner, S., Braendlin, I., Martinez-Moya, M., Link, G. and F.J. Johannes** (2001) Protein kinase C mu selectively activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p42 pathway. *FEBS Lett.* **492(1-2)**:39-44

**Hawes, B.E., Luttrell, L.M., van Biesen, T. and R.J. Lefkowitz** (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J.Biol.Chem.* **271(21)**:12133-12136

**Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz** (1995) Distinct pathways of Gi- and Gq-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J.Biol.Chem.* **270(29)**:17148-17153

**Hecquet, C., Lefevre, G., Valtink, M., Engelmann, K. and F. Mascarelli** (2002) cAMP inhibits the proliferation of retinal pigmented epithelial cells through the inhibition of ERK1/2 in a PKA-independent manner. *Oncogene* **21(39)**:6101-12

**Heeneman, S., Haendeler, J., Saito, Y., Ishida, M. and B.C. Berk** (2000) Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor beta receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J.Biol.Chem.* **275(21)**:15926-15932

**Hernandez, M., Barrero, M.J., Crespo, M.S. and M.L. Nieto** (2000) Lysophosphatidic acid inhibits Ca<sup>2+</sup> signaling in response to epidermal growth factor receptor stimulation in human astrocytoma cells by a mechanism involving phospholipase C(gamma) and a G(alpha) protein. *J.Neurochem.* **75(4)**:1575-82

**Herrlich, A., Daub, H., Knebel, A., Herrlich, P., Ullrich, A., Schultz, G. and T. Gudermann** (1998) Ligand-independent activation of platelet-derived growth factor receptor is a necessary intermediate in lysophosphatidic, acid-stimulated mitogenic activity in L cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A.* **95(15)**:8985-8990

**Hornigold, D.C., Mistry, R., Raymond, P.D., Blank, J.L. and R.A. Challiss** (2003) Evidence for cross-talk between M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors in the regulation of second messenger and extracellular signal-regulated kinase signalling pathways in Chinese hamster ovary cells. *Br.J.Pharmacol.* **138(7)**:1340-50

**Howe, L.R. and C.J. Marshall** (1993) Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1. *J.Biol.Chem.* **268(28)**:20717-20720

- Huang, F. and A.Sorkin** (2005) Growth factor receptor binding protein 2 –mediated recruitment of the RING domain of Cbl to the epidermal growth factor receptor is essential and sufficient to support receptor endocytosis. *Mol.Biol.Cell.* **16(3)**: 1268-1281
- Hur E.M., Park, Y.S., Lee, B.D., Jang, I.H., Kim, H.S., Kim, T.D., Suh, P.G., Ryu, S.H. and K.T. Kim** (2004) Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src. Implications for a role of lipid microdomains. *J.Biol.Chem.* **279(7)**:5852-5860
- Hur, E.M. and K.T. Kim** (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell. Signal.* **14(5)**:397-405
- J. Schlessinger** (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**: 211-225
- J.L. Berkeley and A.I. Levey** (2000) Muscarinic activation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cells. *J.Neurochem.* **75(2)**:487-93
- J.M. Schmitt and P.J. Stork** (2002) PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol. Cell.* **9(1)**: 85-94
- J.S. Gutkind** (1998) The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J.Biol.Chem.* **273(4)** 1839-1842
- J.T. Testa and A. Bellacosa** (2001) Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A.* **98(20)** 10983-10985
- Ji, T.H., Grossmann, M. and I. Ji** (1998) G protein-coupled receptors. I.Diversity of receptor-ligand interactions. *J.Biol.Chem.* **273(28)**: 17299-17302
- Jordan, J.D., Landau, E.M. and R. Iyengar** (2000) Signaling Networks: The origins of cellular multitasking. *Cell* **103**: 193-200
- Kato, Y., Tapping, R.I., Huang, S., Watson, M.H.,Ulevitch, R.J. and J.D.Lee** (1998) Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* **395**: 713-716
- Keely, S.J., Calandrella, S.O. and K.E. Barrett** (2000) Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular Ca(2+), PYK-2, and p60(src). *J.Biol.Chem.* **275(17)**:12619-12625
- Keely, S.J., Uribe, J.M. and K.E. Barrett** (1998) Carbachol stimulates transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T<sub>84</sub> cells. *J.Biol.Chem.* **273(42)** 27111-27117
- Keilhack, H., Tenev, T., Nyakatura, E., Godovac-Zimmermann, J., Nielsen, L., Seedorf, K. and F.D.Böhmer** (1998) Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling. *J.Biol.Chem.* **273(38)**: 24839-24846
- Kim, J., Ahn, S., Guo, R. and Y. Daaka** (2003) Regulation of epidermal growth factor receptor internalization by G protein-coupled receptors. *Biochemistry* **42(10)**:2887-94

**Kim, J., Eckhart, A.D., Eguchi, S. and W.J. Koch** (2002) Beta-adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblasts is dependent on transactivation of the epidermal growth factor receptor and subsequent activation of extracellular signal-regulated kinases. *J.Biol.Chem.* **277(35)**:32116-23

**Kim, J.Y., Yang, M.S., Oh, C.D., Kim, K.T., Ha, M.J., Kang, S.S. and J.S. Chun** (1999) Signalling pathway leading to an activation of mitogen-activated protein kinase by stimulating M3 muscarinic receptor. *Biochem.J.* **337 ( Pt 2)**:275-80

**Kloth, M.T., Laughlin, K.K., Biscardi, J.S., Boerner, J.L., Parsons, S.J. and C.M. Silva** (2003) STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *J.Biol.Chem.* **278(3)**:1671-9

**Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F. and R.J. Lefkowitz** (1994) Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A.* **91(26)**:12706-12710

**Kolch, W.J., Heldecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D. and U. Rapp** (1993) Protein kinase C $\alpha$  activates Raf-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**: 249-255

**L. Zhang and R.S. Jope** (1999) Muscarinic M3 and epidermal growth factor receptors activate mutually inhibitory signaling cascades in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **255(3)**:774-7

**L.A. Selbie and S.J. Hill** (1998) G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol.Sci.* **19(3)**:87-93

**L.M. Luttrell** (2003) "Location, location, location" activation and targeting of MAPkinases by G protein-coupled receptors. *Journal of Molecular Endocrinology* **30**: 117-126

**Lambert, D.G., Ghataorre, A.S. and S.R. Nahorski** (1989) Muscarinic receptor binding characteristics of a human neuroblastoma SK-N-SH and its clones SH-SY5Y and SH-EP1. *Eur.J.Pharmacol.* **165(1)**:71-7

**Lanzafame, A.A., Christopoulos, A. and F. Mitchelson** (2003) Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* **9(4)**:241-60

**Lawler, O.A., Miggin, S.M. and B.T. Kinsella** (2001) Protein kinase A-mediated phosphorylation of serine 357 of the mouse prostacyclin receptor regulates its coupling to G(s)-, to G(i)-, and to G(q)-coupled effector signaling. *J.Biol.Chem.* **276(36)**: 33596-33607

**Lefkowitz, R.J., Pierce, K.L. and L.M. Luttrell** (2002) Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol. Pharmacol.* **62(5)**: 971-974

**Li, B.S., Ma, W., Zhang, L., Barker, J.L., Stenger, D.A. and H.C. Pant** (2001) Activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) and extracellular regulated kinases (Erk1/2) is involved in muscarinic receptor-mediated DNA synthesis in neural progenitor cells. *J.Neurosci.* **21(5)**:1569-79



**Liebmann, C. and F.D. Böhmer** (2000) Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with Receptor tyrosine kinases: lessons from Bradykinin signaling. *Current Medicinal Chemistry* **7**: 911-943

**Liebmann, C., Nawrath, S., Schnittler, M., Schubert, H. and K.H. Jakobs** (1992) Binding characteristics and functional G protein coupling of muscarinic acetylcholine receptors in rat duodenum smooth muscle membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **345(1)**:7-15

**Linseman, D.A., Benjamin, C.W. and D.A. Jones** (1995) Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **270(21)**:12563-12568

**Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, P.G., Gutkind, J.S. and R. Wetzker** (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* **275(5298)**:394-7

**Lopez-Illasaca, M., Gutkind, J.S. and R. Wetzker** (1998) Phosphoinositide 3-kinase gamma is a mediator of Gbetagamma-dependent Jun kinase activation. *J.Biol.Chem.* **273(5)**:2505-2508

**Lou, L., Urbani, J., Ribeiro-Neto, F. and D.L. Altschuler** (2002) cAMP inhibition of Akt is mediated by activated and phosphorylated Rap1b. *J.Biol.Chem.* **277(36)**:32799-806

**Lu, Y., Yu, Q., Liu, J.H., Zhang, J., Wang, H., Koul, D., McMurray, J.S., Fang, X., Yung, W.K., Siminovitch, K.A. and G.B. Mills** (2003) Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J.Biol.Chem.* **278(41)**:40057-66

**Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., van Biesen, T., Luttrell, D.K. and R.J. Lefkowitz** (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J.Biol.Chem.* **272(7)**:4637-4644

**Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G. and R.J. Lefkowitz** (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283(5402)**:655-61

**Luttrell, L.M., Hawes, B.E., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lansing, T.J. and R.J. Lefkowitz** (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* **271(32)**:19443-19450

**M.C. Steel and N.J. Buckley** (1993) Differential regulation of muscarinic receptor mRNA levels in neuroblastoma cells by chronic agonist exposure: a comparative polymerase chain reaction study. *Mol.Pharmacol.* **43(5)** 694-701

**M.P. Caulfield and N.J.M. Birdsall** (1998) International Union of Pharmacology.XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *The American Soc. for Pharm. and Exper. Ther.* **50(2)** 279-290

**Ma, W., Maric, D., Li, B.S., Hu, Q., Andreadis, J.D., Grant, G.M., Liu, Q.Y., Shaffer, K.M., Chang, Y.H., Zhang, L., Pancrazio, J.J., Pant, H.C., Stenger, D.A. and J.L. Barker** (2000) Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. *Eur.J.Neurosci.* **12(4)**:1227-40

**Ma, Y.C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. and X.Y. Huang** (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* **102(5)**: 635-646

**Mariotti, A., Kedeshian, P.A., Dans, M., Curatola, A.M., Gagnoux-Palacios, L. and F.G. Giancotti** (2001) EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J.Cell Biol.* **155(3)**:447-58

**Maudsley, S., Pierce, K.L., Zamah, A.M., Miller, W.E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. and L.M. Luttrell** (2000) The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor. *J.Biol.Chem.* **275(13)**:9572-80

**McCole, D.F., Keely, S.J., Coffey, R.J. and K.E. Barrett** (2002) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in colonic epithelial cells by carbachol requires extracellular release of transforming growth factor-alpha. *J.Biol.Chem.* **277(45)**:42603-12

**Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and E. Mekada** (1995) Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J.Biol.Chem.* **270(3)**:1015-9

**Mochizuka, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T., Kitabatake, A., Nagashima, K. and M. Matsuda** (1999) Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature* **400(6747)**:891-4

**Murga, C., Fukuhara, S. and J.S. Gutkind** (2000) A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase  $\beta$  in signaling from G Protein-coupled receptors to Akt. *J.Biol.Chem.* **275(16)**: 12069-12073

**Murga, C., Laguinge, L., Wetzker, R., Cuadrado, A. and J.S Gutkind** (1998) Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma. *J.Biol.Chem.* **273(30)**:19080-5

**N.E. Hynes and H.A. Lane** (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat.Rev.Cancer* **5(5)**:341-54

**N.M. Nathanson** (2000) A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A* **97(12)**:6245-6247

**Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. and N.E. Hynes** (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19(13)**: 3159-3167

- Östman, A. and F.D. Böhmer** (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell. Biol.* **11(6)**:258-66
- P. Blume-Jensen and T.Hunter** (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411(6835)**:355-65
- P.J. Stork and J.M. Schmitt** (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell. Biol.* **12(6)**:258-66
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and M.H. Cobb** (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr.Rev.* **22(2)**: 153-183
- Peng, H., Myers, J., Fang, .X, Stachowiak, E.K., Maher, P.A., Martins, G.G., Popescu, G., Berezney, R. and M.K. Stachowiak** (2002) Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) pathway mediates activation of the tyrosine hydroxylase gene by angiotensin II, depolarization and protein kinase C. *J.Neurochem.* **81(3)**:506-524
- Pierce, K.L., Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz** (2001) New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* **20(13)**: 1523-1539
- Pierce, K.L., Tohgo, A., Ahn, S., Field, M.E., Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz** (2001b) Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J.Biol.Chem.* **276(25)**:23155-23160
- Piggott, M.A., Owens, J., O'Brien, J., Colloby, S., Fenwick, J., Wyper, D., Jaros, E., Johnson, M., Perry, R.H. and E.K. Perry** (2003) Muscarinic receptors in basal ganglia in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *J.Chem.Neuroana.* **25(3)**:161-73
- Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S. and A. Ullrich** (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer* **8**: 11-31
- Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M. and A. Ullrich** (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res.* **2(3)**:184-190
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. and A. Ullrich** (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402(6764)**:884-888
- Rao, G.N., Delaontaine, P. and M.S. Runge** (1995) Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* **270(46)**:27871-27875
- Retondaro, F.C., Dos Santos Costa, P.C., Pedrosa, R.C. and E. Kurtenbach** (1999) Presence of antibodies against the third intracellular loop of the m2 muscarinic receptor in the sera of chronic chagasic patients. *FASEB J.* **13(14)**:2015-20

**Rey, O., Young, S.H., Cantrell, D. and E.Rozengurt** (2001) Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C. *J.Biol.Chem.* **276(35)**:32616-26

**Riese, D.J. and D.F. Stern** (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* **20(1)**:41-48

**Rodrigues, G.A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S.H. and J. Schlessinger** (2000) A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol.Cell Biol.* **20(4)**:1448-59

**Rosenblum, K., Futter, M., Jones, M., Hulme, E.C. and T.V. Bliss** (2000) ERK1/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J.Neurosci.* **20(3)**:977-85

**Rotin, D., Margolis, B., Mohammadi, M., Daly, R.J., Daum, G., Li, N., Fischer, E.H., Burgess, W.H., Ullrich, A. and J. Schlessinger** (1992) SH2 domains prevent tyrosine dephosphorylation of the EGF receptor: identification of Tyr992 as the high-affinity binding site for SH2 domains of phospholipase C gamma. *EMBO J.* **11(2)**: 559-567

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. and T. Maniatis** (1989) *Molecular Cloning*. Second edition. Cold Spring Harbor Press, USA

**Schaefer, G., Akita, G.W. and M.X. Sliwkowski** (1999) A discrete three-amino acid segment (LVI) at the C-terminal end of kinase-impaired ErbB3 is required for transactivation of ErbB2. *J.Biol.Chem.* **274(2)**: 859-866

**Schäfer, B., Marg, B., Gschwind, A. and A. Ullrich** (2004) Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J.Biol.Chem.* **279(46)**:47929-38

**Schöneberg, T., Liu, J. and J. Wess** (1995) Plasma membrane localization and functional rescue of truncated forms of a G protein-coupled receptor. *J. Biol.Chem.* **270(30)**:18000-6

**Shah, B.H., Yesilkaya, A., Olivares-Reyes, J.A., Chen, H.D., Hunyady, L. and K.J. Catt** (2004) Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Mol. Endocrinol.* **18(8)**:2035-48

**Singer, C.A., Vang, S. and W.T. Gerthoffer** (2002) Coupling of M(2) muscarinic receptors to Src activation in cultured canine colonic smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* **282(1)**:G61-8

**Smith, M.R., Court, D.W., Kim, H.K., Park, J.B., Rhee, S.G., Rhim, J.S. and H.F.Kung** (1998) Overexpression of phosphoinositide-specific phospholipase Cgamma in NIH 3T3 cells promotes transformation and tumorigenicity. *Carcinogenesis* **19(1)**:177-85

**Sorkina, T., Bild, A., Tebar, F. and A. Sorkin** (1999) Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing activated epidermal growth factor receptors. *J.Cell Sci.* **112 ( Pt 3)**:317-27

- T.Igishi and J.S.Gutkind** (1998) Tyrosine kinases of the Src family participate in signaling to MAP kinase from both Gq and Gi-coupled receptors. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **244(1)**:5-10
- T.J. Yeatman** (2004) A renaissance for SRC. *Nat.Rev. Cancer* **4(6)**:470-80
- Tang, X., Batty, I.H. and C.P. Downes** (2002) Muscarinic receptors mediate phospholipase C-dependent activation of protein kinase B via Ca<sup>2+</sup>, ErbB3, and phosphoinositide 3-kinase in 1321N1 astrocytoma cells. *J.Biol.Chem.* **277(1)**:338-44
- Tice, A.T., Biscardi, J.S., Nickles, A.L. and S.J. Parsons** (1999) Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Procl.Natl.Acad.Sci.* **96**: 1415-1420
- Tsai, W., Morielli, A.D. and E.G. Peralta** (1997) The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *EMBO J.* **16(15)**:4597-4605
- van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz** (1995) Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* **376(6543)**:781-784
- van Biesen, T., Hawes, B.E., Raymond, J.R., Luttrell, L.M., Koch, W.J. and R.J. Lefkowitz** (1996b) G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J.Biol.Chem.* **271(3)**:1266-1269
- van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E. and R.J. Lefkowitz** (1996) Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrine Reviews* **17(6)**: 698-714
- van Corven, E.J., Hordijk, P.L., Medema, R.H., Bos, J.L. and W.H. Moolenaar** (1993) Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.* **90(4)**:1257-1261
- van Koppen, C.J. and B. Kaiser** (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther.* **98(2)**:197-220
- Vossler, M.R., Yao, H., York, R.D., Pan, M.G., Rim, C.S. and P.J. Stork** (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* **89(1)**: 73-82
- Walker, K.S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P. and D.R. Alessi** (1998) Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem.J.* **331 ( Pt 1)**:299-308
- Wallasch, C., Crabtree, J.E., Bevec, D., Robinson, P.A., Wagner, H. and A. Ullrich** (2002) Helicobacter pylori-stimulated EGF receptor transactivation requires metalloprotease cleavage of HB-EGF. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **295(3)**:695-701
- Wan, Y., Kurosaki, T. and X.Y. Huang** (1996) Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature* **380(6574)**:541-4

- Ward, C.W., Gough, K.H., Rashke, M., Wan, S.S., Tribbick, G. and J. Wang** (1996) Systematic mapping of potential binding sites for Shc and Grb2 SH2 domains on insulin receptor substrate-1 and the receptors for insulin, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor. *J.Biol.Chem.* **271(10)**:5603-9
- Wess, J., Blin, N., Mutschler, E. and K. Bluml** (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling. *Life Sci.* **56(11-12)**:915-922
- Wetzker, R. and F.D. Böhmer** (2003) Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* **4(8)**:651-657
- Winitz, S., Russell, M., Qiant, N.X., Gardner, A., Dwyer, L. and G.L. Johnson** (1993) Involvement of Ras and Raf in the G<sub>i</sub>-coupled muscarinic m2 receptor activation of mitogen-activated protein(MAP) kinase kinase and MAP kinase. *J.Biol.Chem.* **268(26)**: 19196-19199
- Wotta, D.R., Wattenberg, E.V., Langason, R.B. and E.E el-Fakahany** (1998) M1, M3 and M5 muscarinic receptors stimulate mitogen-activated protein kinase. *Pharmacology* **56(4)**:175-86
- Wu, W., Graves, L.M., Gill, G.N., Parsons, S.J. and J.M. Samet** (2002) Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J.Biol.Chem.* **277(27)**:24252-7
- Wylie, P.G., Challiss, R.A. and J.L. Blank** (1999) Regulation of extracellular-signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase by G-protein-linked muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem. J.* **338 ( Pt 3)**:619-28
- X.Espanel and M.Sudol** (2001) Yes-associated protein and p53-binding protein-2 interact through their WW and SH3 domains. *J.Biol.Chem.* **276(17)**:14514-23
- Xi, S., Zhang, Q., Dyer, K.F., Lerner, E.C., Smithgall, T.E., Gooding, W.E., Kamens, J., and J.R. Grandis** (2003) Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J.Biol.Chem.* **278(34)**:31574-83
- Yamauchi, J., Kaziro, Y. and H. Itoh** (1999) Differential regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and 7 (MKK7) by signaling from G protein beta gamma subunit in human embryonal kidney 293 cells. *J.Biol.Chem.* **274(4)**:1957-65
- Yamauchi, J., Nagao, M., Kaziro, Y. And H. Itoh** (1997) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits. *J.Biol.Chem.* **272(44)**:27771-7
- Yamauchi, J., Tsujimoto, G., Kaziro, Y. and H. Itoh** (2001) Parallel regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) and MKK6 in Gq-signaling cascade. *J.Biol.Chem.* **276(26)**:23362-72
- Yart, A., Roche, S., Wetzker, R., Laffargue, M., Tonks, N., Mayeux, P., Chap, H. and P. Raynal** (2002) A function for phosphoinositide 3-kinase beta lipid products in coupling beta gamma to Ras activation in response to lysophosphatidic acid. *J.Biol.Chem.* **277(24)**:21167-21178

**Zeng, F.Y., Soldner, A., Schöneberg, T. and J. Wess** (1999) Conserved extracellular cysteine pair in the M3 muscarinic acetylcholine receptor is essential for proper receptor cell surface localization but not for G protein coupling. *J.Neurochem.* **72(6)**:2404-14

**Zhao, W.Q., Alkon, D.L. and W. Ma** (2003) c-Src protein tyrosine kinase activity is required for muscarinic receptor-mediated DNA synthesis and neurogenesis via ERK1/2 and c-AMP-responsive element-binding protein signaling in neural precursor cells. *J.Neurosci.Res.* **72(3)**:334-42

**Zwick, E., Daub, H., Aoki, N., Yamaguchi-Aoki, Y., Tinhofer, I., Maly, K. and A. Ullrich** (1997) Critical role of calcium- dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J.Biol.Chem.* **272(40)**:24767-24770

## **Anhang**



## Abkürzungen

β2-AR	β2-adrenerger Rezeptor
Abb.	Abbildung
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
ATP	Adenosintriphosphat
B <sub>2</sub> R	Bradykinin B <sub>2</sub> -Rezeptor
BK	Bradykinin
Bmk1	Big MAP kinase1= ERK5
BSA	Rinderserumalbumin
Btk	Bruton`s Tyrosin-Kinase
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CoxII	Cytochrom c oxidase subunit II
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
DEAE	diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EGF	epidermal growth factor
EGFR	EGF-Rezeptor
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAK	focal adhesion kinase
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FKS	fötales Kälberserum
Fyn, Yes	ubiquitär vorkommende Mitglieder der Src-Kinase Familie
Gab1	Grb2 associated binding protein
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninukleotid Austauschfaktor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Grb2	growth factor receptor binding protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HB-EGF	heparin binding EGF
HRP	horse radish peroxidase
IGF-1	insulin like growth factor-1
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitierung
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
Iso	Isoproterenol
JNK/ SAPK	Jun amino-terminal kinases/ stress-activated kinases
LPA	lysophosphatidic acid
M <sub>2</sub> R	muscarinischer Acetylcholin Rezeptor Subtyp 2
mAChR	muscarinischer Acetylcholin Rezeptor
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MBP	Myelin Basic Protein

MEK	MAP/ERK Kinase
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PDK-1	Phosphoinositid abhängige Kinase
PI3-K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTK	Protein-Tyrosinkinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pyk-2	calcium-dependent tyrosine kinase 2
Ras	rat sarcoma (21kD GTPase)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	Src homology 2
SH3	Src homology 3
Shc	SH containing protein (SH2-domain and collagen like)
Sos	son of sevenless (GEF für Ras)
Src	cytoplasmatische Tyrosinkinase (von Sarcom abgeleitet)
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBS	Tris-buffered saline
TGF $\alpha$	transforming growth factor $\alpha$
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
usw.	und so weiter
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## **Danksagung**

Diese Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Claus Liebmann im Rahmen des SFB 604 Projekt A5 am Institut für Biochemie und Biophysik der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena angefertigt.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Claus Liebmann für die Bereitstellung des interessanten Themas und die mir entgegengebrachte Unterstützung. Er übernahm damit nicht nur die Rolle meines Betreuers, sondern stand mir auch immer mit seinem Rat und seiner Erfahrung zur Seite, wenn es um die Planung und Interpretation der experimentellen Arbeit ging. Mein besonderer Dank gilt ihm auch für die Unterstützung und die anregenden Diskussionen beim Verfassen dieser Dissertation.

Ich danke Carmen Mertens für die Hilfe und freundschaftliche Unterstützung bei der praktischen und theoretischen Arbeit. Mein weiterer Dank gilt Dr. Sabine Hanke, Sebastian Drube, Elizabeth Ziesché, Sabine März und Sigrid Reichhardt für die entgegengebrachte Unterstützung in experimentellen und theoretischen Fragen.

Christina Valkova danke ich für die hilfreichen Diskussionen sowohl bei der Arbeit im Labor als auch bei theoretischen Fragen.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Biophysik und bei Prof. Dr. Siegmund Reißmann für die mir gewährte Unterstützung sowie die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Großeltern, die mir meinen Werdegang ermöglichten, mich in schwierigen Situationen stets unterstützten und mir durch ihre ständige Aufmunterung die Arbeit erleichterten.

## Publikationen

**Stirnweiss, J.**, Böhmer, F.D. and C. Liebmann (2002) The putative somatostatin antagonist, cyclo-(7-aminoheptanoyl-Phe-D-Trp-Lys-Thr[BZL]), may act as potent antiproliferative agonist. *Peptides* (6441): 1-4

**Stirnweiss, J.**, Hartrodt, B., Greksch, G., Stürzebecher, U., Böhmer, F.D., Neubert, K. and C. Liebmann (2003) Tyr-c[D-Orn-Tyr(Bzl)-Pro-Gly]: a novel antiproliferative acting somatostatin receptor agonist with  $\mu$ -opioid receptor-sensitizing properties. *Brit. J. Pharmacol.* (140) : 13-22

Hanke, S., Valkova, C., **Stirnweiss, J.**, Drube, S., and C. Liebmann

In the cellular network EGF receptor dominates ERK activation by affecting counteracting pathways. (in revision *Cell Signal.*)

## Posterbeiträge und Vorträge

05.-07.12. 2002 Annual meeting of SFB 604 "Multi-functional signaling proteins", Jena

Drube, S., Hanke, S., Valkova C., **Stirnweiss, J.** and C. Liebmann (2002) Novel aspects of EGFR transactivation: beta-adrenergic receptor may activate extracellular signal-regulated kinase (ERKs) via both the EGFR/Ras pathway and the phospholipase C gamma/protein kinase C pathway. 6<sup>th</sup> meeting of Signal Transduction Society 07.-09.11., Weimar, Germany. *Signal Transduction Receptors, Mediators and Genes*, 3-4, 146

Hanke, S., Valkova, C., **Stirnweiss, J.**, Drube, S., Fälker, K., Presek, P. and C. Liebmann (2003) Network signaling: Epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation of bradykinin B2 receptor prevents its  $\beta_2$ -adrenergic receptor –assisted coupling to  $G_i$  proteins. 8<sup>th</sup> International Dahlem Symposium on "Cellular signal recognition and transduction", 18.-21.06., Berlin, Germany.

Drube, S., Valkova, Ch., Hanke, S., **Stirnweiss, J.** and C. Liebmann (2003) Cooperative transactivation: ligand-induced priming of EGF receptor enables the  $\beta$ 2-adrenergic receptor to activate ERK via the PLCgamma /PKCepsilon pathway. CellSignals Jena'03, Signaling complexes, 1<sup>st</sup> meeting of the joint research centers SFB604 and GRK768, 25.-27.09., Jena, Germany.

**Stirnweiss, J.**, Hanke, S. and C. Liebmann (2003) Novel aspects of ERK regulation by the muscarinic M2 receptor subtype. CellSignals Jena'03, Signaling complexes, 1<sup>st</sup> meeting of the joint research centers SFB604 and GRK768, 25.-27.09., Jena, Germany.

## Lebenslauf

Name: Stirnweiß

Vorname: Jörg

Anschrift: Kirchstraße 13  
96523 Steinach

Geburtsdatum: 20.10.1973

Geburtsort: Sonneberg

Familienstand: ledig

Schulbildung: Südschule Steinach 01.09.1980-01.07.1990

1. Staatl.Gymnasium Sonneberg 01.09.1990-30.06.1992

Schulabschluß: Abitur im Juni 1992

Wehrdienst: 01.07.1992-30.6.1993

Studienzeiten: 1993-1996 Studium an der Fachhochschule Coburg – Fachrichtung  
Betriebswirtschaft

1996-2001 Studium an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
FSU Jena – Fachrichtung Biochemie

08.10.2001 Abschluss: Diplom-Biochemiker

2002-2005 FSU Jena – Promotion am Institut für Biochemie und  
Biophysik in der Arbeitsgruppe von Prof. Liebmann

Jena, 25.06.05

Jörg Stirnweiß

## **Selbständigkeitserklärung**

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

Jena, 05.07.2005

Jörg Stirnweiß

## **Erklärung zur Bewerbung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des o.g. akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Jena, 05.07.2005

Jörg Stirnweiß