Abteilung Innere Medizin I
der
Medizinischen Klinik und Poliklinik
der
Universität Ulm
(Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. G. Adler)

Die Rolle von Rap1 bei der cAMP-vermittelten Hemmung des Zellwachstums in Pankreaskarzinomzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Richard Lorenz
geboren in Ulm

Ulm 2005

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD. Dr. Christoph K. Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Nikolaus Marx
Tag der Promotion:	20.10.2005

Meiner lieben Familie in Dankbarkeit

Teile meiner Doktorarbeit wurden bereits früher veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

1. Lorenz R, Adler G, Knobel B, Weber CK: Interconnectivity of Ras- and Rap1-signaling in Pancreatic Cancer. Gastroenterology A544 (2002) *(Abstract) Poster AGA*

2. Lorenz R, Adler G, Slupsky J, Weber CK: Regulation von Rap1-Signalwegen im Pankreaskarzinom. *Poster DGVS-Kongress*

3. Lorenz R, Mihailovic T, Wagner M, Weber CK: The cAMP/Epac1/Rap1 Pathway regulates Growth in Pancreatic Carcinoma. *Zur Veröffentlichung eingereicht.*

4. Lorenz R, Slupsky JR, Greten FR, Weber CK: Rap1 effector loop mutants show differences in the activation of the MAPK pathway and the adhesion to ICAM-1/VCAM-1. *Zur Veröffentlichung eingereicht.*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis..... III

1. Einleitung..... 1

1.1 Das Pankreaskarzinom..... 1
1.2 Zelluläre Signaltransduktion..... 1
1.2.1 Der MAPK-Signalweg..... 2
1.2.2 Der ERK-Signalweg..... 3
1.3 Die Ras-Superfamilie..... 5
1.3.1 Gliederung der Ras-Superfamilie..... 5
1.3.2 Ras..... 6
1.3.3 Die kleine GTPase Rap1..... 7
1.3.3.1 Die Aktivierung von Rap1..... 8
1.3.3.2 Die Inaktivierung von Rap1..... 10
1.3.3.3 Rap1-Effektoren..... 10
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit..... 12

2. Material und Methoden..... 13

2.1 **Material**..... 13
2.1.1 Zellkultur..... 13
2.1.2 Eukaryontische Zelllinien..... 13
2.1.3 Antikörper..... 14
2.1.4 Chemikalien und andere Materialien..... 15
2.2 **Methoden**..... 16
2.2.1 Zellkultur..... 16
2.2.2 Molekularbiologische Methoden..... 17
2.2.3 Auswertung..... 30

3. Ergebnisse..... 32

3.1 Forskolin inhibiert das Wachstum von MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen..... 32

3.2 Die Gabe eines PKA-Inhibitors führt zu keiner Beeinflußung der durch Forskolin induzierten Hemmung des Zellwachstums..... 34
3.3 Forskolin aktiviert Rap1 aber nicht Ras in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen..... 37
3.4 Epac-mRNA ist in MiaPaCa-2- und Panc1-Zellen überexpremiert..... 38
3.5 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP aktiviert Rap1 in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen..... 39
3.6 Inhibition des Zellwachstums durch 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP..... 40
3.7 ERK-Aktivität in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen bei Gabe von Forskolin..... 42
3.8 ERK-Aktivität in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen bei Gabe von 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP..... 43
3.9 Durch die Transfektion von Epac-wt kommt es zu keiner Abnahme der ERK-Aktivität..... 44
3.10 Die Überexpression von aktivem Rap1 hat keinen Einfluß auf die Aktivität von ERK..... 45

4. Diskussion..... 47

4.1 Inhibition des Zellwachstums durch Forskolin..... 48
4.2 Die Gabe eines PKA-Inhibitors führt zu keiner signifikanten Änderung der durch Forskolin induzierten Hemmung des Zellwachstums..... 49
4.3 Der Einfluß von Forskolin auf Ras-Rap1-Signalwege im Pankreaskarzinom.... 50
4.4 Erhöhung der Rap1-Aktivität durch Epac..... 51
4.5 Inhibition des Zellwachstums durch 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP..... 52
4.6 Unterschiede der ERK-Aktivität in MiaPaCa-2- und Panc-1 Zelllinien bei Gabe von Forskolin und 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP..... 53
4.7 Die Rolle von Rap1: Funktion abhängig vom Zelltyp..... 56
4.8 Schlussfolgerung..... 58

5. Zusammenfassung..... 59

6. Literaturverzeichnis..... 60

7. Danksagung..... 76

8. Lebenslauf..... 77

Abkürzungsverzeichnis

8-pCPT-2'-O-Me-cAMP	8- (4- Chlorophenylthio)- 2'- O- methyl-adenosine- 3', 5'- cyclic monophosphate
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ARIA	Activated Rap1 Interaction Assay
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C3G	GEF von Rap1
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy DNA
CMF-PBS	Calcium- und magnesiumfreie phosphatgepufferte Saline
Da	Dalton
DAG	Diacylglyzerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	[ethylendinitrilo]tetraessigsäure EGF epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor Receptor)
Epac	GEF von Rap1
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälberserum

g	Gramm
GAP	GTPase activating protein (GTPase aktivierendes Protein)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor)
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
Grb2	Growth Factor Receptor Bound Protein-2
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosin-Triphosphatase
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HRP	Horse Radish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Jak	Janus kinase
Jnk	c-Jun N-terminal kinase
k	Kilo
l	Liter
Leu	Leucin
M	molar
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase (mitogen aktivierte Proteinkinase) = ERK
MAPKAPK	MAPK- activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase = MEK
MAPKKK	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase = Raf
MEK	Mitogen Activated ERK Activating Kinase
MEKK	MEK-kinase
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PTK	Protein Tyrosin Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	eine MAPKKK
RalGDS	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator
RBD	Ras-Bindungsdomäne
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sp-8-Br-cAMPS	8-Bromoadenosine- 3', 5'-cyclic monophosphor-othioate
SOS	GEF von Ras
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalz-lösung)
TBST	TBS mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
wt	wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom geht zu über 90% aus duktalen Zellen des exokrinen Pankreas hervor. Es ist das fünfthäufigste Malignom in den westlichen Ländern (Landis et al. 1999). Wegen der späten Diagnosestellung und eingeschränkten Therapiemöglichkeiten hat es eine schlechte Prognose. Chemotherapeutische Ansätze zeigen Ansprechraten von 12-27% (Burris et al. 1997; Rothenberg et al. 1996), die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt unter 5% (Landis et al. 1999). Neue Strategien zielen darauf ab, Wirkstoffkombinationen in das Therapieschema zu integrieren. Dabei werden vor allem Wachstumsfaktor-vermittelte Signalwege inhibiert. Die meisten dieser Therapien haben das Ziel, die durch EGF/VEGF-Rezeptoren vermittelten intrazellulären Signalwege einschließlich den von Ras aktivierten MAP-Kinasen-Signalwegs zu inhibieren (Seufferlein u. Adler 2003; Rosenberg u. Lipsett 2003).

1.2 Zelluläre Signaltransduktion

Der Informationsfluß von der Zelloberfläche zum Zellkern ist einer der elementarsten Vorgänge lebender Zellen. 90% aller eukaryontischen Gene werden auf Transkriptionsebene reguliert (Smith u. Hager 1997; Karin u. Smeal 1992). Die auf die Zelloberfläche einwirkenden Reize werden über zahlreiche Signalmoleküle wie Rezeptoren, G-Proteine, second messenger und Enzyme (Kinasen, Phosphatasen, Lipasen) an den Zellkern weitergeleitet (Hunter 2000).

Die Verarbeitung der Informationen geschieht über hochdifferenzierte, evolutionär konservierte Signalkaskaden (Hunter 2000). Sie erlauben es der Zelle, auf die Anforderungen der Umwelt angemessen zu reagieren. Man unterscheidet mehrere Signaltransduktionswege, welche ein ineinander verflochtenes Netzwerk der Informationsverarbeitung bilden.

Mutationen im Bereich wichtiger Signalproteine führen zur unkontrollierten Verarbeitung extrazellulärer Signale, was z.B. in einer gesteigerten Proliferation bzw. malignen Entartung der Zelle enden kann.

Viele Signalkaskaden und deren Aktivierungsmechanismen konnten bisher charakterisiert werden. Die genaue Zuordnung einzelner Signalwege zu bestimmten Krankheiten ist bisher aber noch unvollständig und bedarf weiterer intensiver Forschung.

1.2.1 Der MAPK-Signalweg

Unter dem "Mitogen Activated Protein Kinase" (MAPK)-Signalweg versteht man eine von Wachstumsfaktoren abhängige Signalkaskade, welche extrazelluläre Signale in den Zellkern weiterleitet (Hunter et al. 1997; Vojtek et al. 1998). Zu diesem Signalweg gehören Serin/Threonin-Kinasen, welche durch Übertragung von Phosphatresten reguliert werden können. Der evolutionär konservierte Signalweg ist u.a. für die Augenentwicklung bei Drosophila, das Pheromon induzierte "mating" haploider Zellen in der Hefe Saccharomyces cerevesiae oder die Vulvaentwicklung bei Caenorhabditis elegans zuständig (Caffrey et al. 1999). Folge der Aktivierung ist ein Informationsfluß von der Zellmembran zum Zellkern. Den Signalweg bilden paralelle Proteinkinasekaskaden, die jeweils nach ihrer Zielkinase benannt werden (siehe Abb. 1):

- der Jun aminoterminal kinase- (JNK) (Gupta et al. 1995),
- der p38- (Han et al. 1994),
- und der extracellular regulated kinase (ERK)-Signalweg (Derijard et al. 1995).

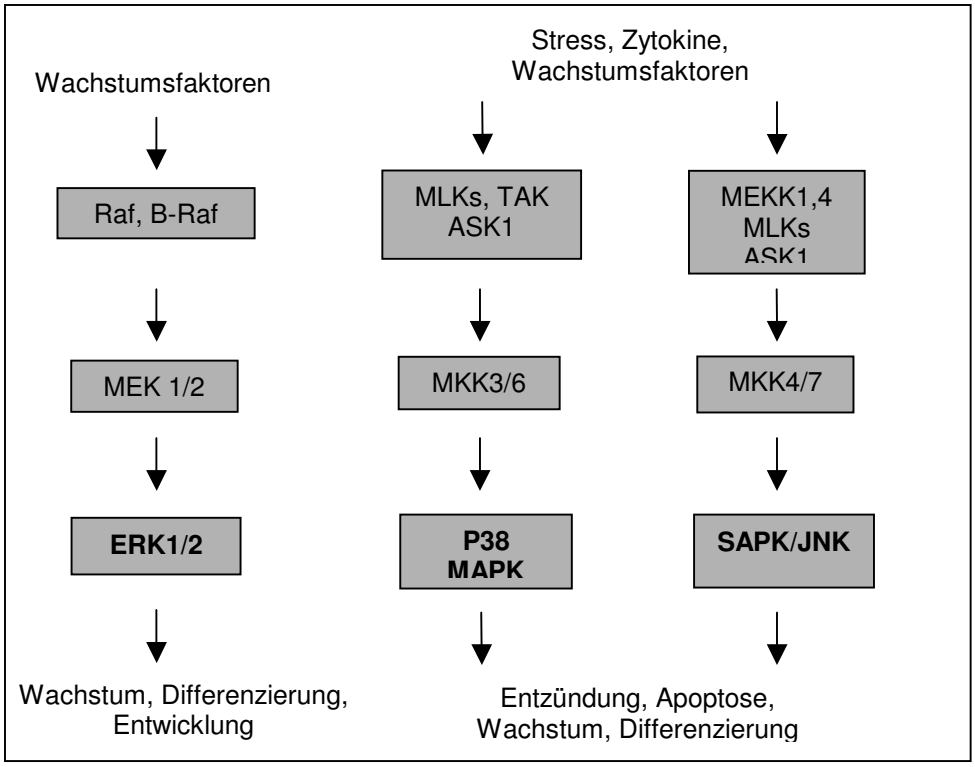


Abb. 1: Der MAPK-Signalweg. Extrazelluläre Signale werden von außen nach innen geleitet. Die Funktion des MAPK-Signalwegs ist die Regulation des Wachstums und der Differenzierung (ERK-Signalweg), sowie die zelluläre Reaktion auf Zytokine und Stress (JNK- und p38-Signalweg).

1.2.2 Der ERK-Signalweg

Folgende Signalproteine sind Bestandteil des ERK-Signalwegs und in aufgeführter Reihenfolge hintereinandergeschaltet:

- Raf (rapid fibrosarcoma)-Kinasen (Isoformen: A-Raf, B-Raf, C-Raf1) (=**MAPK**inase **K**inase**K**inase)
- MEKs (MAPK/ERK-Kinasen 1 und 2) (=**MAPK**inase**K**inase)
- sowie ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase) (=**MAPK**inase)

Durch externe Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) oder PDGF (platelet derived growth factor) kommt es zur Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) (siehe Abb. 2). Dies führt zur Bindung mit Grb2 (growth factor receptor binding 2), einem Adaptorprotein, welches in Verbindung mit Sos (son of sevenless), einem Aktivator (GEF: **G**uanine nucleotide **e**xchange **f**actor) von Ras, steht. Über einen Nukleotidaustausch wird Ras zu Ras-GTP überführt und kann nun Raf (MAPKKK= Membran Shuttle Kinase) aktivieren. Raf aktiviert MEK (MAPKK) über eine Phosphorylierung. MEK wiederum aktiviert ERK (MAPK = Nuclear Shuttle Kinase). ERK1/2 haben als Substrate unter anderem Mnk (MAP kinase interacting kinase) bzw. aktivieren nach Translokation in den Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren, sog. "Early Response Genes". Darunter fallen vor allem c-Jun, c-fos und als Hauptsubstrat ELK-1 (Shields et al. 2000).
Ras kann auch noch andere Effektoren binden. Durch die Bindung von Ral-GEF kommt es z.B. zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, mit der Folge einer Änderung der Proliferation (Wolthuis u. Bos 1999). Durch das Zusammenspiel mit der PI-3-Kinase kann auch Apoptose induziert werden (Downward 1998).

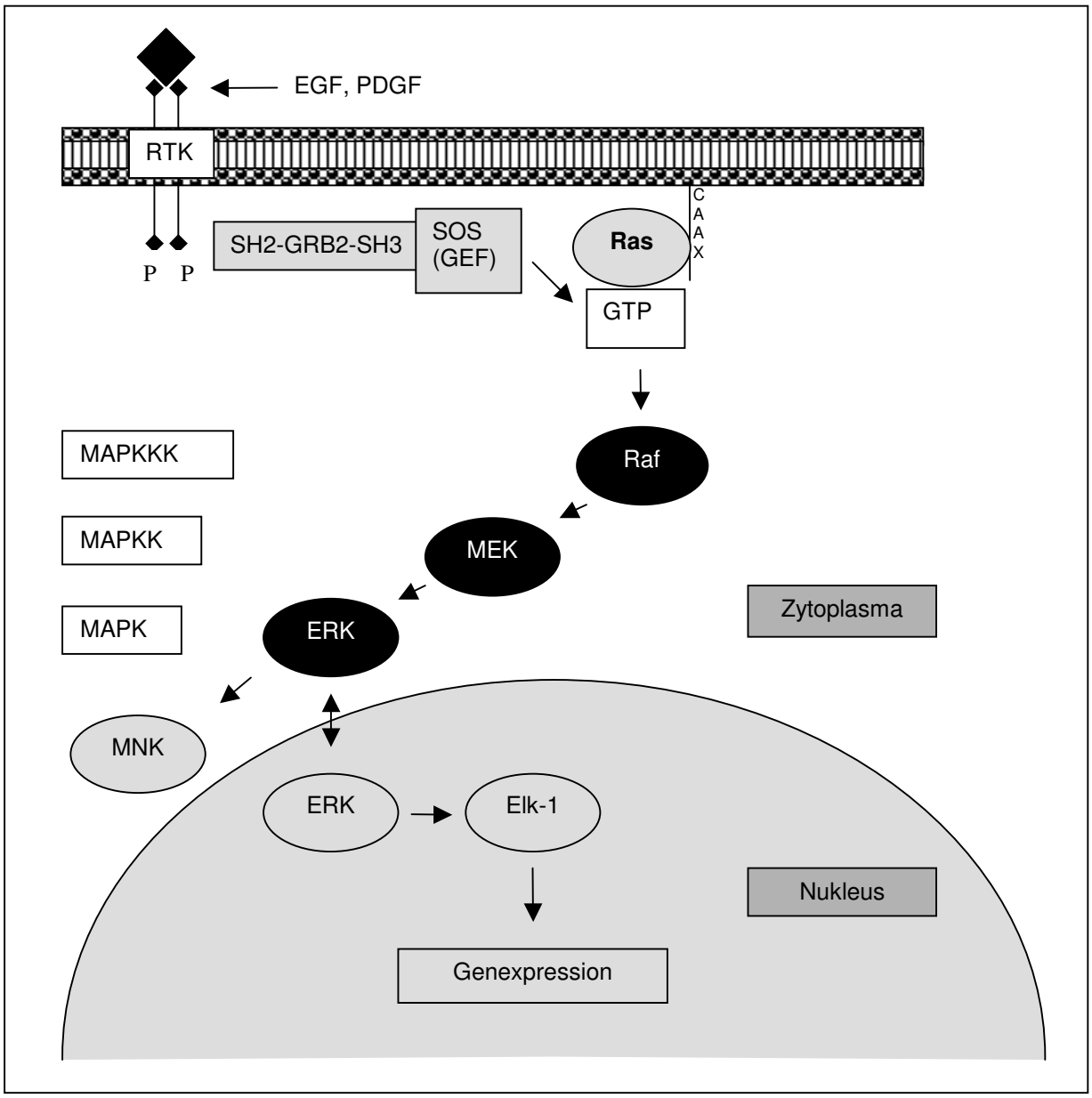


Abb. 2: Der ERK-Signalweg. Über die Bindung eines spezifischen Liganden kommt es zur Aktivierung der GTPase Ras über den Austauschfaktor Sos. Ras aktiviert nun die "membran-shuttle-kinase" Raf (MAPKKK). Raf (MAPKKK) aktiviert durch Phosphorylierung MEK (MAPKK). Dieses aktiviert ERK (MAPK), welches als "nuclear shuttle kinase" Transkriptionsfaktoren im Nukleus aktiviert (In Anlehnung an Vojtek 1998).

1.3 Die Ras-Superfamilie

Ras-Proteine bilden eine heterogene Gruppe von Proteinen, die durch die Bindung von GTP aktiviert werden (Campbell 1998). Diese Proteine, sog. GTPasen, wechseln zwischen zwei Formen: einer aktiven, GTP-beladenen und einer inaktiven, GDP-beladenen Form (siehe Abb. 3). Die Aktivierung wird durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, GEFs, reguliert. Die Bindung der GTPase an das Substrat kann nur im GTP-beladenen Zustand erfolgen. Die Interaktion mit dem Effektor wird durch Hydrolyse des GTPs zu GDP beendet. Die Raumstruktur der GTPase wird dadurch so verändert, daß die Fähigkeit zur Bindung mit den Effektoren nicht mehr möglich ist. Regulatorisch wirken hier sog. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs). Diese beschleunigen die Hydrolyse des GTPs.

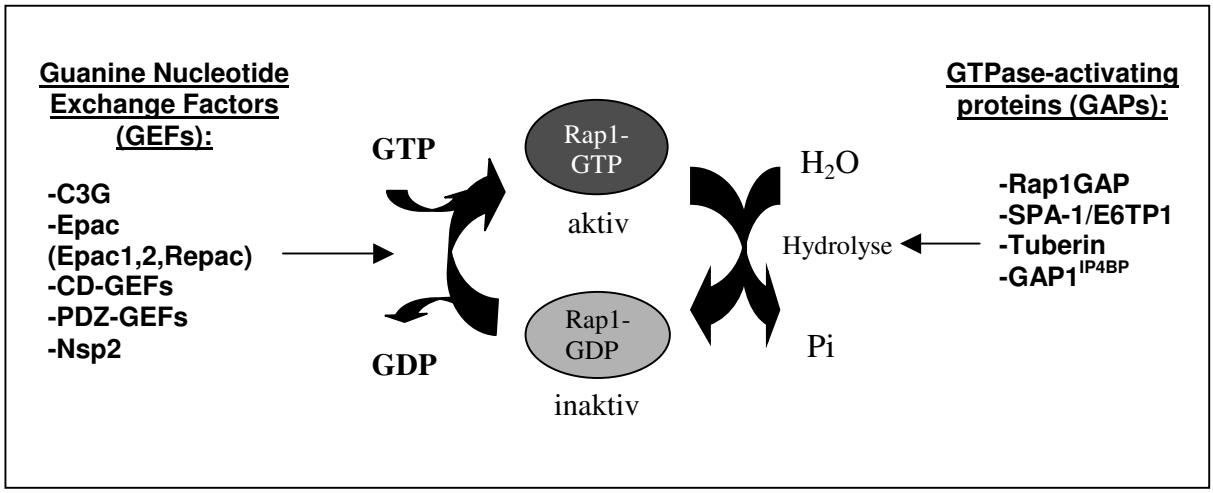


Abb. 3: Aktivierung der GTPase am Beispiel von Rap1. Über GEFs wird die aktive, GTP-beladene Form induziert. Die Überführung in die inaktive, GDP-beladene Form geschieht durch GAPs.

1.3.1 Gliederung der Ras-Superfamilie

Die Ras-Superfamilie wird in mehrere Subfamilien untergliedert (siehe Abb. 4). Dies sind die Ras/Rap-, Rho/Rac-, die Ran-, die Rab-, die Arf-, die Rin/Rit und die Rad/Gem-Subfamilie (Campbell 1998). Die Ras/Rap-Proteine spielen eine Rolle in der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung. Rho/Rac sind wichtig für den Aufbau des Zytoskeletts. Die Rab/Arf-Familie kontrolliert den vesikulären Transport. Eine bedeutende Funktion beim nukleären Im- und Export kommt der Ran-Familie zu.

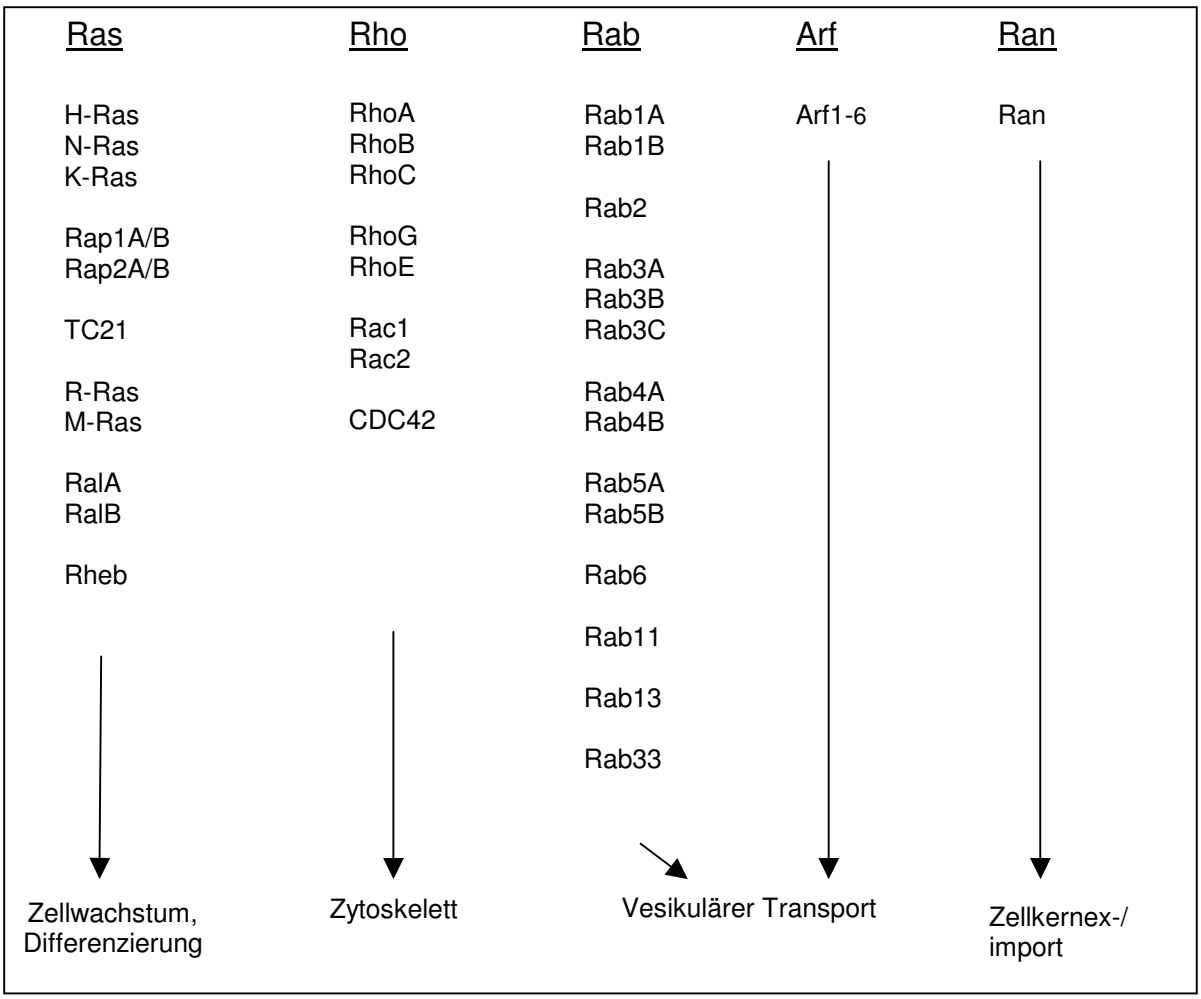


Abb. 4: Die Ras-Superfamilie

1.3.2 Ras

Das Ras-Protein wurde zuerst bei Retroviren entdeckt (Feig und Cooper 1988). Diese verursachten in Ratten Tumore vom Sarkomtyp (Ras= rat sarcoma). Bekannt sind vier verschiedene Ras-Gene: H(arvey)-ras, Ki(rsten)-rasA, Ki-rasB und das N(euroblastoma)-ras-Gen. Sie unterscheiden sich lediglich im C-Terminus. In ca. 30% der menschlichen Tumore werden Punktmutationen im Ras-Protein entdeckt (AS-Position 12,13 oder 61). Entscheidend für das onkogene Potential ist die durch die Mutation verzögerte Hydrolyse des gebundenen GTPs. Hierdurch kommt es zu einer verlängerten Aktivierung des Ras-Proteins (Bos 1989). Eine K-Ras-Mutation liegt in 50% aller Adenokarzinome des Kolons, in 90% des Pankreas vor.

Ras hat mehrere Funktionen in der Zelle. Zum einen spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung. Andererseits kann es als Onkogen

zur Transformation von Zellen führen. Ein wichtiger Signalweg, der durch das Ras-Protein aktiviert wird, ist unter anderem der ERK-Signalweg (siehe Abb. 5).

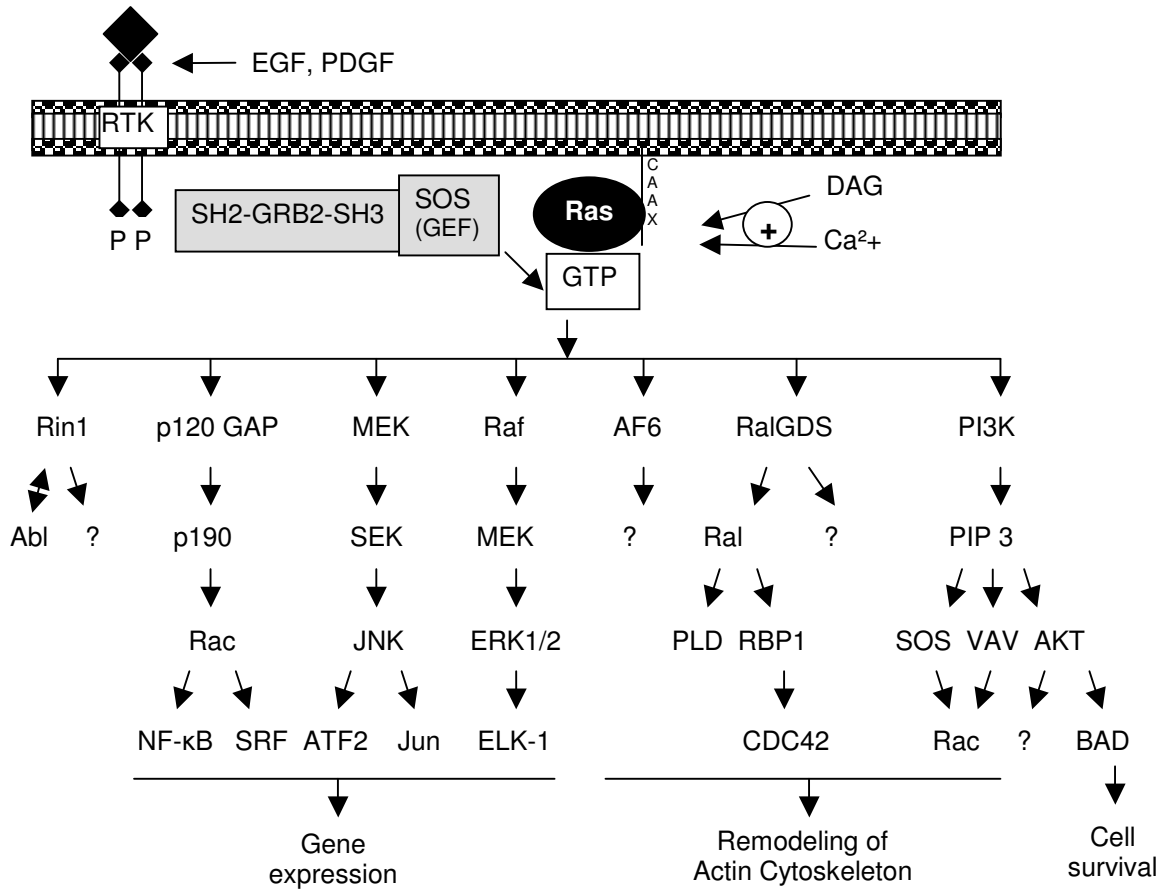


Abb. 5: Räumliche Lokalisation, Aktivierung und Effektoren von Ras. (In Anlehnung an Vojtek 1998).

1.3.3 Die kleine GTPase Rap1

Ein enger Verwandter von Ras mit hoher Sequenzhomologie ist Rap („Ras proximate“) (Pizon et al. 1988). Die Ähnlichkeit mit der Proteinstruktur von Ras ist vor allem in der Effektordomäne hoch. Ein wichtiger Unterschied zwischen Ras und Rap ist eine unterschiedliche Aminosäure an Stelle 61 der AS-Sequenz: Glutamin ist durch Threonin im Rap-Protein ersetzt. Folge dieses Austausches ist eine 10-fach verminderte Aktivität der GTPase Rap (Bos 1998).

Das Protein Rap kommt in vier Isoformen vor: Rap1A, Rap1B, Rap2A und Rap2B. Rap2 teilt weniger Sequenzhomologie mit Ras als Rap1. Rap1 war zuerst unter dem Namen Krev-1 (Kirsten-Ras revertant-1) bekannt. Es besaß die Fähigkeit, K-Ras-transformierte Zellen wieder in ein normales Zellwachstum überzuführen (Kitayama et al. 1989). Im Gegensatz zu Ras, welches an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, findet sich Rap1 hauptsächlich an intrazellulären Membranen des Zytosols wieder (Golgi-Apparat, Lysosomen, endozytotische Vesikel) (Beranger et al. 1991; Maridonneau-Parini und deGunzburg 1992; Quinn et al. 1992; Pizon et al. 1994). Rap1 wird ubiquitär exprimiert, läßt sich aber vor allem in Nervenzellen, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten finden (Bos 1998; Bos et al. 2001). Die Fähigkeit von Rap1 die Aktivierung der Ras-MAPK-Kaskade zu inhibieren, wurde bereits 1993 beschrieben (Cook et al. 1993 a u. b). Eine direkte Hemmung von Ras durch Rap1 konnte jedoch noch nicht gezeigt werden (Zwartkruis et al. 1998).
Während Rap1 in PC12-Zellen zur Zelldifferenzierung beitragen kann (Vossler et al. 1997; York et al. 1998), wirkt es in anderen Zelltypen (u.a. Swiss 3T3) als Mitogen (Altschuler u. Ribeiro-Neto 1998; Yoshida et al. 1992). In T-Lymphozyten kommt es über die Aktivierung des Antigen-Rezeptors zur Stimulation von Rap1. Dies führt dazu, daß die Zelle anergisch, also unempfindlich gegenüber äußeren Reizen wird (T-Zell-Anergie). Es kommt zur Reduktion des Zytokins IL-2 in den T-Zellen (Boussiotis et al. 1997).

1.3.3.1 Die Aktivierung von Rap1

Die exogenen Stimuli, welche zur Aktivierung von Rap1 führen sind Zelltyp-abhängig (Bos 1998). So verursacht Thrombin in Thrombozyten eine starke Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration, was zur Aktivierung von Rap1 führt. In Lymphozyten kommt es bei Aktivierung des B- oder T-Zellrezeptors ebenfalls zu einer Erhöhung von GTP-beladenem Rap1.
Die Aktivierung von Rap1 wird sowohl durch Rezeptortyrosinkinasen wie auch über second messenger (cAMP, DAG, und Ca^{2}+) gesteuert (Franke et al. 1997; McLeod et al. 1998; Altschuler et al. 1995). Von entscheidender Bedeutung sind dabei spezielle GEFs (Bos et al. 2001) (siehe Abb. 6):

- C3G:

C3G wurde als erstes GEF von Rap1 beschrieben (Crk-SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor). Nach Aktivierung der RTKs induziert es die Bildung von aktivem Rap1 (Gotoh et al. 1995).

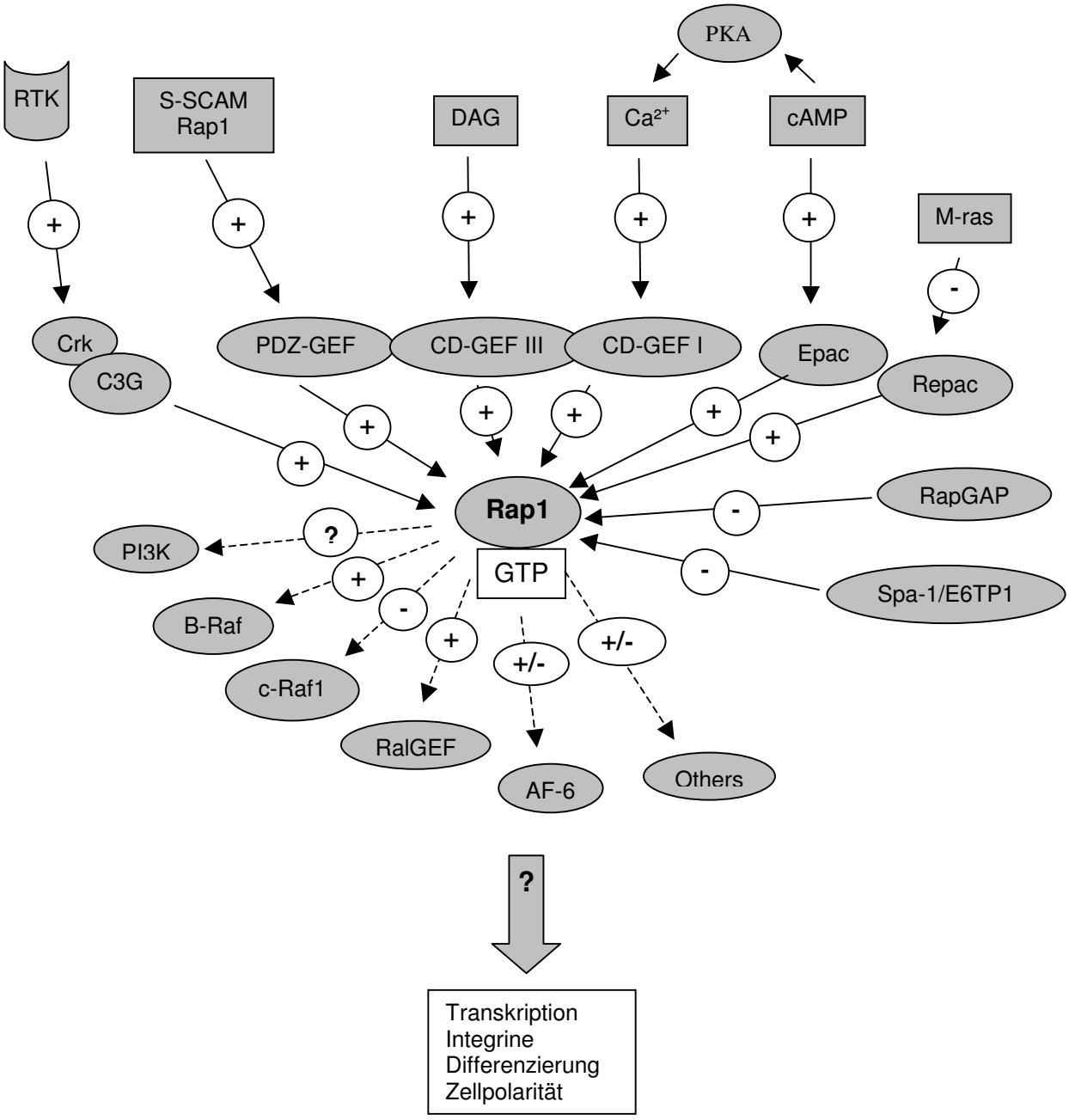


Abb. 6: Aktivatoren und Inhibitoren von Rap1. PTP: Protein tyrosine phosphatase; C3G: Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor; Crk: SH2- and SH3-domain-containing adaptor protein; DAG: diacylglycerol; PKA: protein kinase A; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; RTK: receptor tyrosine kinase; S-SCAM: synaptic scaffolding molecule. ?: fragliche Interaktion, - : wirkt hemmend, +: wirkt aktivierend, ---: Rap1-vermittelte Signalwege (In Anlehnung an Bos 2001).

- Epac:

Als weitere wichtige GEF-Gruppe ist die Epac-Familie zu nennen. Sie besteht aus Epac I, Epac II und aus Repac (de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998a). Vor ihrer Entdeckung war schon bekannt, daß eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle zur Aktivierung von Rap1 führt. Epac I + II wurden 1998 unabhängig voneinander gefunden. Sie werden über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration aktiviert und katalysieren daraufhin den Nukleotidaustausch von Rap1-GDP zu Rap1-GTP. Epac II hat im Vergleich zu Epac I eine zweite cAMP-Bindungsstelle. Repac weist dagegen keine cAMP-Bindungsstelle auf. Es verlangsamt nur im Zusammenspiel mit M-Ras den Nukleotidaustausch. Ohne M-Ras führt es zur Aktivierung.

- PDZ-GEFs (de Rooij et al. 1999; Liao et al. 1999; Ohtsuka et al. 1999; Rebhun et al. 2000):

Die PDZ-GEFs sind mit der Epac-Familie verwandt. Sie verfügen über eine PDZ-Domäne, eine RA-Domäne (Ras-associating) und eine Domäne, welche Ähnlichkeit mit einer cAMP-Bindungsdomäne aufweist. Sie kann jedoch kein cAMP binden.

- CD-GEFs (Kawasaki (b) et al. 1998; Yamashita et al. 2000; Ebinu et al. 1998):

Die GEFs CalDAG-GEF I und III werden durch Ca^{2+} und DAG aktiviert.

1.3.3.2 Die Inaktivierung von Rap1

Die Inaktivierung von Rap1 wird über sog. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert (siehe Abb. 3). Diese überführen Rap1-GTP zu Rap1-GDP. Bekannt sind bisher fünf Proteine: Rap1GAP I (Polakis et al. 1991) und II (Mochizuki et al. 1999), Spa-1 (Kurachi et al. 1997), E6TP1 (Gao et al. 1999), Tuberin (Wienecke et al. 1995) und $GAP1^{IP4BP}$ (Cullen et al. 1995).

1.3.3.3 Rap1-Effektoren

Rap1 kann über seine, mit der von Ras identischen, Effektorregion mit mehreren Proteinen interagieren. Eine Bindung von Rap1 an c-Raf1 konnte bereits in vitro nachgewiesen werden (Hermann et al. 1996; Okada et al. 1999). Ob Rap1 eher antagonistisch im Sinne einer Verdrängung von Ras, oder zu einer Aktivierung der weiteren Signalkette führt, ist noch nicht

ganz klar. Experimente zeigen, daß aktives Rap1 zu einer Inhibierung des ERK-Signalwegs führt (Cook et al. 1993 a u. b). Nach Stimulation mit LPA und EGF vermochte es eine Aktivierung von ERK abzuschwächen (Cook et al. 1993 a u. b). Andere Raf-Kinasen, vor allem B-Raf, sind ebenfalls Effektoren von Rap1. B-Raf wird aber durch Rap1 aktiviert und führt zur Phosphorylierung von ERK (Ohtsuka et al. 1996). Bei einer Überexpression von Rap1GAP und RapS17N konnte gezeigt werden, daß die Aktivierbarkeit des B-Raf/ERK-Signalwegs herabgesetzt war (York et al. 1998; Vossler et al. 1997).

Die Inhibierung des c-Raf1-ERK Signalwegs ist Zelltyp-abhängig. So fehlt in Fibroblasten die Inhibierung des ERK-Signalwegs (Zwartkruis et al. 1997). In Nervenzellen hingegen kommt es über B-Raf zur Aktivierung von ERK (Zwartkruis et al. 1997; Vossler et al. 1997; Schmitt u. Stork 2000). Weiterhin erschwert wird die genaue Analyse der Effektoren von Rap1 durch andere Proteine wie PKA. PKA wird durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration aktiviert. Es vermag Rap1 und dessen Effektoren zu aktivieren (z.B. B-Raf) (Zanassi et al. 2001), bzw. c-Raf1 zu hemmen. Die Schwierigkeit liegt nun darin, zwischen einem PKA- oder einem Rap1-vermittelten Effekt zu unterscheiden.

Weitere mögliche Bindungspartner von Rap1 sind GEFs der GTPase Ral, wie RalGDS, Rlf und Rgl (Bos et al. 2001). Bei einer Überexpression von Rap1 kommt es zur Ral-Stimulation. Wird hingegen endogenes Rap1 aktiviert, fällt diese Aktivierung weg (Zwartkruis et al. 1998). Ein anderes potentielles Effektorprotein ist AF-6, welches über eine PDZ-Domäne und eine Aktin-Bindungsstelle verfügt. Durch den Besitz zweier RBDs (Ras-Bindungsdomäne) kann es sowohl Rap1 als auch Ras binden (Linnemann et al. 1999).

Die Bedeutung der Bindung anderer Proteine wie PI-3-Kinase, RasGAP, Nore1 und Krit (Krev interaction trapped) ist bis heute noch nicht ganz geklärt (Serebriiskii et al. 1997; Bos et al. 2001).

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung cAMP-abhängiger Aktivierung von Rap1 in den Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1. Insbesondere die Rolle von Rap1 bei der Regulation des Zellwachstums sollte untersucht werden.
Bisher wurde fast ausschließlich ein Modell beschrieben, in dem die Aktivierung der Proteinkinase PKA zu einem vermindertem Zellwachstum führt. Es stellte sich für uns die Frage, ob in den Pankreaskarzinomzelllinien noch andere Signalwege für das Zellwachstum entscheidend sind. Neben Wachstumsversuchen mit Forskolin wurden Aktivitätsmessungen cAMP-abhängiger Signalproteine durchgeführt, da cAMP noch eine Vielzahl anderer Proteine, wie z.B. Epac, aktiviert, welches zu einer Aktivitätssteigerung von Rap1 führt. Die Expression dieser Austauschfaktoren ist Zelltyp-spezifisch. Ihre Rolle bei der Regulation des Zellwachstums ist ebenfalls noch nicht geklärt (Kawasaki et al. 1998, Bos et al. 2001).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

6/24/48-well Platten flat-bottom with lid	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Cryo Tube Vials	Nalge Nunc Internat., Denmark
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe
Einmal Impfschlingen und Nadeln	Nalge Nunc Internat., Denmark
Falcon Röhrchen	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Filtereinheit FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schnell, Dassel
Fötales Kälberserum	Seromed Biochrom KG, Berlin
Gewebekulturplatten 10 cm	Greiner, Nürtingen
Phosphat buffered saline (PBS)	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL, Eggenstein
Transfast Reagenz	Promega, Madison, WA
Trypsin-EDTA	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe
Zellschaber	Sarstedt Inc., Newton
Zeocin	Invitrogen Life Technology, Karlsruhe

2.1.2 Eukaryontische Zelllinien

Tab. 1: Zelllinien

Name	Zelltyp	Verwendung	Bezugsquelle
MiaPaCa-2	Humane epitheliale Pankreaskarzinomzelllinie (Referenz: Yunis, 1977)	Rap1-Stimulations-versuche, MTT-Wachstumsassays	ATCC Number: CRL-1420
Panc-1	Humane epitheliale Pankreaskarzinomzelllinie (Referenz: Lieber et al. 1975)	Rap1-Stimulations-versuche, MTT-Wachstumsassays	ATCC Number: CRL-1469

2.1.3 Antikörper

Tab. 2: Erstantikörper

Name	Typ	Verdünnung	Hersteller/Best.-Nr.
Rap1	polyklonal, rabbit	1:1000	Stressgen #KAP-GP120
Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204)	polyklonal, rabbit	1:1000	New England BioLabs #9101S
ERK1	polyklonal, rabbit	1:1000	Santa Cruz #C-16, SC-93
ERK2	polyklonal, rabbit	1:1000	Santa Cruz #C-14, SC-154
Epac	polyklonal, goat	1:500	Santa Cruz #C-17, SC-8880
Anti-hemaglutinine (HA)	polyklonal, mouse	1:10000	PD. Dr. Weber, Hybridomüberstand Klon 12-CA5

Tab. 3: Zweitantikörper

Name	Typ	Verdünnung	Hersteller
anti mouse IgG	konjugiert mit Meerrettichperoxidase	1:3000	Amersham Pharmacia Biotech
anti rabbit IgG	konjugiert mit Meerrettichperoxidase	1:3000	Amersham Pharmacia Biotech
anti goat IgG	konjugiert mit Meerrettichperoxidase	1:30000	Amersham Pharmacia Biotech

2.1.4 Chemikalien und andere Materialien

8-pCPT-2`-O-Me-cAMP	Biolog, Bremen
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Blotmembran PVDF (Polyvinyliden Difluorid)	Millipore GmbH, Eschborn
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Serva, Heidelberg
Coomassie blue R250	Merck,Darmstadt
Complete-Mini Protease-Inhibitoren Cocktail	Roche, Mannheim
Cornex Röntgenfilmkassette	DuPont, Bad Homburg
ECL-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA
Einmalküvetten	Mikroküvetten Nr.1201, Ratiolab
Epac-Primer	Thermo Electron GmbH, Ulm
Filmmaterial	Hyperfilm^{TM}ECL^{TM},Amersham International, Buckinghamshire, England
Glutathione Sepharose Beads TM4B	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford,USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	J.T. Baker
Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, WA
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Protein Kinase A Inhibitor 6-22 Amide	Calbiochem, Schwalbach
Sp-8-Br-cAMPS	Biolog, Bremen
TEMED	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA
Tris	Amersham Pharmacia Biotech, Bedford, USA
Rainbow coloured protein molecular weight marker	New England BioLabs
RNAeasy Kit	Qiagen, Hilden

Alle übrigen Materialien wurden von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Subkultivierung der MiaPaCa-2/Panc-1-Zellen

Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C und einer CO_2-Konzentration von 7% im Brutschrank kultiviert. Das Subkultivieren der Zellen wurde alle zwei bis drei Tage nach folgendem Schema durchgeführt: Nach Absaugen des Mediums wurden die adhärenten Zellen mit CMF-PBS kurz gewaschen. Die Lösung der Zellen von der Kulturschale erfolgte durch Inkubation mit 1 ml Trypsinlösung aus CMF-PBS mit 0,1% Rinderpankreastrypsin und 0,05 mM EDTA. Nach etwa zehn Minuten wurden 9 ml Wachstumsmedium zur Beendigung der Enzymreaktion hinzugegeben. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurden sie in einer Verdünnung von 1:5 wieder ausgesät.

Medien und Lösungen:

Komplettes Medium:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
	10% FCS
	100 U/ml Penicillin
	100 U/ml Streptomycin
Serumfreies Medium:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
	0,5% FCS
	100 U/ml Penicillin
	100 U/ml Streptomycin
Medium zur Kryokonservierung:	FCS
	10% DMSO

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Um die Zellen vor Verunreinigungen und zellmorphologischen Veränderungen durch die Subkultivierung zu schützen, wurden diese bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu vermengte man 2 x 10^6 Zellen mit 1 ml Kryomedium bei 4°C (Verhältnis von Zellpellet zu Kryomedium sollte etwa 1:10 betragen), und lagerte dieses in einer Styroporbox bei -80°C im

Tiefgefrierschrank für ca. 24 Stunden. Die Abkühlung der Zellen erfolgte hier mit ca. 1°C pro Minute. Danach setzte man die Zellen in den Flüssigstickstoffbehälter um.
Beim Auftauen wurden die Kryoröhrchen sofort im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. War nur noch eine kleines Eiskügelchen sichtbar, desinfizierte man das Röhrchen außen kurz mit 70% Isopropanol und überführte die aufgetauten Zellen in ein Falcon Röhrchen mit 10 ml Komplettmedium. Danach wurden die Zellen bei 1000 U/min für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen wiederum mit 10 ml Komplettmedium in eine Gewebekulturplatte (10 cm) gegeben. Für die nächsten 48 Stunden ließ man die Zellen darin unbehandelt wachsen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA

Bei diesem Vorgang wird Plasmid-DNA in kompetente Bakterien eingeschleußt, um das gewünschte Expressionsplasmid zu vervielfältigen. Damit eine Selektion der plasmidtragenden Bakterien möglich ist, wird auf das Plasmid ein Antibiotikumresistenzgen kloniert. Bakterien, welche das gewünschte Plasmid tragen, sind nun gegen ein Antibiotikum, in unserem Fall Ampicillin, resistent. Wir verwendeten zwei verschiedene transformationskompetente E.-coli-Zellstämme: XL1-Blue (Stamm für die Plasmidamplifikation), welcher in den Transfektionen zum Einsatz kam, und den BL-21 Stamm, in welchem wir das Ral-GDS-Protein amplifizierten (für den Rap1-Aktivitätsassay; *siehe ARIA*).
Die kompetenten Zellen (bei -80°C gelagert) wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 1-3 µl des Plasmids vermischt. Der Transformationsansatz wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert, 2 Minuten in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad gegeben (Hitzeschock) und anschließend wieder 2 Minuten auf Eis gestellt. Im folgenden wurden dann 50 µl des Transformationsansatzes auf einer Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Brothagarplatte ausgestrichen. Es konnten also nur die Bakterien wachsen, welche die enstprechende Plasmid-DNA enthielten. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert und bis zur Weiterverarbeitung (Präparation der Plasmid-DNA bzw. Gewinnung des Ral-GDS-Proteinkonstrukts) im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Medien und Lösungen:

kompetente Zellen:	E.-coli-Zellstämme:	XL1-Blue
		BL-21
Plasmide:	pTracer-CMV2 mit den jeweiligen Mutanten	
LB-Medium:	1% Tryptone 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl mit Aqua bidest. auffüllen; umgehend autoklavieren	
LB-Platten mit Ampicillin:	zusätzlich 15 g Bactoagar pro Liter LB-Medium autoklavieren, 100 µg/ml Ampicillin zugeben bei 50°C	

2.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA (großer Maßstab) mit QIAGEN EndoFree™ Plasmid Maxi Kit

Um DNA für die Zelltransfektionen zu gewinnen, verwendeten wir den QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit. "EndoFree" bedeutet in diesem Zusammenhang eine endotoxinreduzierte Gewinnung der Plasmid-DNA. Das in den E.coli-Bakterien enthaltene Endotoxin, auch unter dem Namen Lipopolysaccharid oder LPS bekannt, wird bei der Plasmid-DNA Gewinnung zusätzlich zur DNA mitaufgereinigt. Dadurch sinkt die Transfektionseffektivität. Um dem vorzubeugen, werden die LPS Moleküle durch einen speziellen "Endotoxin Removal Buffer" entfernt. Puffer und Lösungen stammten aus dem Kit und waren bereits gebrauchsfertig.

Durchführung: Bei der Plasmid-DNA-Gewinnung wurden 200 ml LB-Medium, nach Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin, mit einer Kolonie des Bakterienstammes, welcher das gewünschte Plasmid enthielt, angeimpft, und bei 37°C über Nacht auf dem Luftschüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation in einem 250 ml GSA-Becher für 10 Minuten bei 4000 U/min in einer Sorvall R5-CB pelletiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet mit 10 ml P1-Puffer des QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kits klumpenfrei aufgelöst. Dem P1-Puffer wurde vorher RNase A in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugegeben. Durch Zugabe von 10 ml des Puffers P2 erreichte man eine alkalische Lyse der Bakterien.

Nach 5-minütiger Inkubation wurden 10 ml Puffer 3 (Kaliumazetatpuffer) hinzupipettiert, um eine Präzipitation von genomischer DNA, Zelltrümmern, Proteinen und SDS zu bewirken. Das ganze wurde dann nach sanftem Durchmischen in eine QIAfilter Cartridge umgeschüttet und 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Dabei bildeten sich weißliche Flocken, welche an der Oberfläche der Lösung schwammen. Nach Aufsetzen eines Stempels wurde das ganze in ein 50 ml Falcon gepreßt, mit 2,5 ml ER Puffer versetzt und anschließend 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach goß man das Lysat auf eine mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte QIAGEN-Säule, die die Plasmid-DNA unter Niedrigsalz- und pH-Bedingungen bindet. Die Qiagen Säule wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 15 ml des Puffers QN mit hohem Salzgehalt. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol, Zentrifugation bei 5000 U/min für 30 Minuten (4°C) wurde die DNA pelletiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, das Ethanol abpipettiert, das Pellet in ca. 500 µl TE Puffer gelöst und in ein 1,7 ml Eppi überführt.

2.2.2.3 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmug der Plasmid-DNA

Aufgrund der Eigenschaft aromatischer Ringsysteme, Licht niedriger Wellenlänge zu absorbieren, können wir, eine doppelsträngige DNA vorausgesetzt, dadurch indirekt über die Absorption bei konstanter Wellenlänge die DNA-Konzentration der Probe bestimmen. Dabei wird bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette ein Aliquot der DNA vermessen. Die Konzentration der DNA ergibt sich folgendermaßen:

$$K = OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

wobei K: Konzentration [µg/ml]
OD_{260}: Optische Dichte bei 260 nm

Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, wird das Verhältnis aus den beiden Absorptionsmessungen der Wellenlängen 260 und 280 nm berechnet. Werte zwischen 1,8 und 2,4 bedeuten ausreichende Reinheit der DNA.

2.2.2.4 Transfektion der Zellen

Um Aussagen über die Aktivierung verschiedener Signalwege durch Rap1 machen zu können, wurden MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen mit den verschiedenen DNA-Konstrukten transient transfiziert. Die Zellen wurden hierfür zu je 2 x 10^5-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und mit 1-2 µg der jeweilgen DNA gemäß dem Transfast-Transfektionsprotokoll transfiziert. Nach 36 Stunden konnten die Zellen für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.2.5 Herstellung von Proteinlysaten

Bei Erreichen einer Konfluenz zwischen 80 und 90% wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums zweimal mit PBS bei 4°C gewaschen. Das PBS wurde entfernt und 1 ml PBS hinzupipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgeschabt und in ein vorgekühltes 1,7 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der ganze Vorgang wurde auf Eis durchgeführt. Nach kurzem Abzentrifugieren bei 10000 Upm wurden die Zellen mit 200 µl Lysepuffer versetzt, 20 Minuten im Kühlraum auf dem Rocker durchmischt und dann in 100 µl 2x Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Nachdem man die Proben für 5 Minuten bei 95°C gekocht hatte, bewahrte man diese bei -20°C auf.

Material und Lösungen:

Lysepuffer:	25 mM HEPES, pH 7,5 150 mM NaCl 1% NP-40 0,25% Nadeoxycholate 10% Glycerol 10 mM $MgCl_2$ 1 mM EDTA ad 500 ml Aqua bidest (1 Tablette Complete-Mini Proteasen-Inhibitor-Cocktail für 50 ml Lysepuffer)
2x Lämmli-Pobenpuffer:	120 mM Tris-HCL pH 6,8 20% (v/v) Glycerol 6% (w/v) SDS

10% (v/v) ß-Mercaptoethanol
0,01% (w/v) Bromphenol Blau
ad 10 ml Aqua bidest

2.2.2.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Elektrophoresetechnik werden die Proteine nach ihrem jeweiligen Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurden die Proteine vorher in SDS-Probenpuffer (2x Lämmli-Probenpuffer) hitzedenaturiert, wobei die Eigenladungen der Polypeptide durch das SDS abgedeckt wurden, so daß SDS-Protein-Mizellen entstanden. Diese haben äquivalente Konformationen und eine gleiche Ladungsdichte pro Längeneinheit bzw. ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die Proteine im elektrischen Feld auf ihrer Wanderstrecke zur Anode hin gemäß ihrer Molekülgröße durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix aufzutrennen. Die Auftrennung der Protein-Lysate erfolgte nach dem Prinzip der kontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970). Diese beinhaltet eine Zweiteilung des Gels: eine großporige Sammelzone und eine feinporige Trennzone. Die Porengröße wird dabei durch das Verhältnis der Konzentration des Acrylamidmonomers zu der des Quervernetzungsreagenzes bestimmt. Ein Gel mit 30% Acrylamid hat also eine kleinere Porengröße als ein Gel mit 3%. Die Erstarrung des Gels zu einem dreidimensionalen Netzwerk wird durch freie Radikale getriggert, welche bei der Wechselwirkung von APS mit dem tertiären aliphatischen Tetramethylethylendiamin (TEMED) entstehen. Die Zuordnung der Proteinbanden zu ihrem Molekulargewicht war durch einen parallel laufenden Molekulargewichtsstandard möglich.

Medien und Lösungen :

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

10% (w/v)Ammoniumpersulfat-Lösung: (Lagerung bei 4°C)	1 g Ammoniumperoxodisulfat ad 10 ml Aqua bidest

10% (w/v) SDS:	1 g SDS ad 10 ml Aqua bidest
10x Laufpuffer:	121 mM Tris-HCl 288 mM SDS 75 mM Glycin

Durchführung: Hierbei fand das Mini-Protean II System von Biorad seine Anwendung. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegeben, welche vor dem Einbau gründlich mit einem fusselfreien, in Ethanol getränkten Tuch gereinigt wurden. Das 2 cm bis zum oberen Glasrand gegossene Trenngel überdeckte man noch mit H_2O-gesättigtem Butanol um eine flache, luftblasenfreie Grenzfläche zu gewährleisten. Nach einer Polymersationsdauer von etwa 30 Minuten kippte man das Butanol-Gemisch ab, entfernte die Flüssigkeitsreste mit einem Filterpapier und überschichtete das nun erstarrte Trenngel mit der Sammelgellösung bis zum oberen Glasrand. Unmittelbar dannach setzte man den Probenkamm mit ca. 5 mm Abstand zum Trenngel zwischen die Glasplatten ein. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich keine Luftblasen am unteren Ende der Probentaschen festsetzen. Diese können zu Artefakten in den Proteinbanden führen. Nachdem man das Gel weitere 45 Minuten polymerisieren ließ, zog man den Kamm vorsichtig heraus und spülte die nun entstandenen Probentaschen mit H_2O aus. Anschließend fixierte man die Gelplatten in der mit Laufpuffer aufgefüllten Elektrophoreseapparatur. Trenngel (siehe Tab. 4) und Sammelgel (siehe Tab. 5) setzten sich folgendermaßen zusammen:

Tab. 4: Trenngel

Acrylamidkonzentration	7,5%	9%	10%	12%
H_2O	4,9 ml	4,7 ml	4,1 ml	3,4 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
30% Acrylamid	2,5 ml	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tab. 5: Sammelgel

H_2O	3,0 ml
Sammelgelpuffer	1,3 ml
30% Acrylamid	750 µl
10% SDS	50 µl
10% APS	30 µl
TEMED	10 µl

Die Proteinlysate wurden vor der Elektrophorese auf Eis aufgetaut, kurz auf dem Vortexer durchmischt und anschließend bei 14000 U/min eine Minute lang zentrifugiert. Das Auftragen der Proben (15-20 µl) in die Probentaschen erfolgte nachdem man 3 µl des Molekulargewichtstandards (Rainbow molecular weight marker) in die erste Tasche vorgelegt hatte. Leere Probentaschen wurden jeweils mit der gleichen Menge Lämmli-Probenpuffer beladen, um Verzerrungen beim Gellauf zu vermeiden. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Übertrat die Spannung aber einen Wert von 180 V, wurde die Stromstärke entsprechend nach unten korrigiert. Nach einer Laufzeit von etwa 90 Minuten, bzw. wenn die Farbfront des Lämmli-Probenpuffers die untere Gelgrenze erreicht hatte, wurde das Gel im elektrophoretischen Proteintransfer weiterverwendet.

2.2.2.7 Elektrophoretischer Transfer im Semi-Dry-Verfahren

Dabei werden die zuvor nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine spezielle, proteinbindende Membran (PVDF-Membran) überführt (Blotting). Dies geschieht durch Anlegen von elektrischer Spannung. Die Proteine wandern hierbei entlang des sich zwischen den Elektroden ausbildenden elektrischen Feldes (siehe Abb. 7).

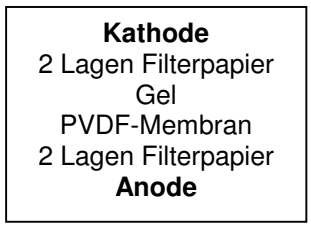


Abb. 7: Aufbau der Semi-Dry-Blot-Apparatur

Bei den Experimenten wurde das Semi-Dry-Verfahren angewendet, welches sich durch einen schnellen Proteintransfer auszeichnet (50 Minuten). Hierbei wurde das Gel mit der Membran, von 2 Lagen Filterpapier umgeben, zwischen zwei Graphitelektroden gelegt.

Durchführung: Es wurden zwei in Transferpuffer vorgetränkte Filterpapiere auf die Elektrodenplatten vorgelegt. Als nächstes folgte die PVDF-Membran, welche man in 100% Methanol einige Sekunden lang aktivierte und anschließend in Transferpuffer äquilibrierte. Das Gel wurde aus der Elektrophoreseapparatur entnommen, mit einem scharfen Gegenstand das Sammelgel entfernt und das Trenngel in den Transferpuffer überführt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 3 Minuten wurden nun nacheinander PVDF-Membran, Gel und 2 Lagen Filterpapier auf die 2 vorbereiteten Filterpapiere gelegt. Luftblaseneinschlüße konnten durch vorsichtiges Rollen einer Glaspipette entfernt werden. Das Aufsetzen der oberen Elektrodenplatte erfolgte unter leichtem Druck nach unten, so daß eine nahtlose Kontaktfläche der Blotkomponenten untereinander sichergestellt war.
Der Blottingvorgang dauerte 50 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA. Dieser Wert bezieht sich auf eine Gelgröße von 8,5 x 5,5 cm. Beim Blotten von zwei Gelen verdoppelte man die Stromstärke.

Puffer und Lösungen:

Transferpuffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	10% (v/v) Methanol
	ad 1 L mit H_2O bidest, pH 8,3

2.2.2.8 Immunodetektion von Proteinen durch spezifische Antikörper

Das zu untersuchende Protein wurde durch die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Dies ist möglich, da jedes Protein ein für sich typisches Antigenmuster trägt. Zum Einsatz kamen sowohl monoklonale (erkennen ein Epitop) wie auch polyklonale Antikörper (erkennen mehrere Epitope). Bei den Experimenten wurde ein Primär-Sekundärantikörpersystem eingesetzt. Der Primärantikörper bindet an das spezifische Epitop, der Sekundärantikörper an den Primärantikörper (siehe Abb. 8). Da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können, erfolgt hier eine

Signalverstärkung. An den Sekundärantikörper war das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt (HRP), welches später nach Zugabe des entsprecheden Substrates Licht emittiert (Chemilumineszenz).

Puffer und Lösungen:

TBST-Puffer:	20 mM TrisHCl, pH 7,6
	137 mM NaCl
	0,05% Tween 20
5% Blockpuffer:	2,5 g Skim-Milk-Powder
	ad 50 ml TBST-Puffer

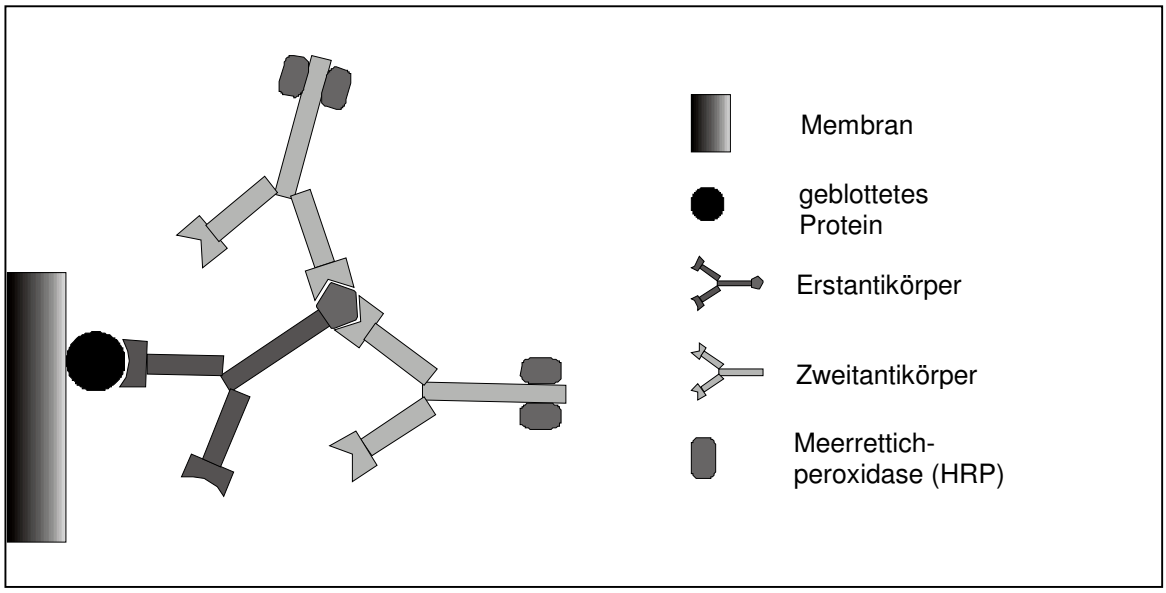


Abb. 8: Schematische Darstellung der Immunodetektion von Proteinen. Durch die Bindung von Sekundärantikörpern an den hochspezifischen Primärantikörper kommt es zur Signalgebung des gewünschten Proteins.

Durchführung: Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese in 50 ml Blockpuffer eine Stunde lang bei Raumtemperatur geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Dieser wurde in 5 ml Blockpuffer verdünnt und mit der Membran zusammen in einen Polyethylenbeutel eingeschweißt. Am nächsten Morgen wurden durch drei 15-minütige Waschschritte in TBST restliche, nicht gebundene Antikörper entfernt. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Zweitantikörper (anti-mouse, -rabbit oder -goat), der spezifisch die Spezies des Erstantikörpers erkannte. Dieser wurde wiederum in drei 15-minütigen Waschschritten

entfernt, so daß letztendlich nur die Stellen markiert wurden, an denen das gewünschte Protein vorlag. Anschließend wurde die Membran für eine Minute in das ECL-Reagenz (ECL-Kit; Amersham) überführt, kurz abgetrocknet und in eine Filmkassette gelegt. Die endgültige Auswertung erfolgte nach Auflegen eines hochempfindlichen Filmes (Hyperfilm^{TM}ECL^{TM}). Es zeigten sich nur dort geschwärzte Banden, wo der Film durch die Peroxidase-Reaktion belichtet wurde.

2.2.2.9 Aktivitätsmessung der kleinen GTPasen Rap1 und Ras über ARIA (Activated Rap1/Ras Interaction Assay)

Aktives, GTP-beladenes Rap1 bindet an RalGDS, welches an GST fusioniert, in E.coli exprimiert, aufgereinigt und als Substrat eingesetzt wurde. Durch die Fusion an GST bindet das Substrat an Glutathionbeads und kann so abgetrennt werden. Die Messung von aktivem Ras erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Als Bindungspartner diente hierzu aber nicht RalGDS, sondern die RBD von c-Raf1. Durch die Bindung an die Glutathionkügelchen über das Substrat konnte das aktive Rap1(Ras) durch Zentrifugation vom übrigen Zelllysat getrennt werden. Das in einem pGEX-Plasmidvektor (pGEX-2T) exprimierte RalGDS (RBD), gekoppelt mit Schistosoma japonicum GST, konnte über einen tac-Promotor durch das Lactose-Analogon IPTG aktiviert werden. Die mit IPTG induzierten Kulturen exprimierten das GST-Fusionsprotein für mehrere Stunden. Nach der Lyse der Bakterien konnte das Lysat zusammen mit den Glutathion-Sepharose Kügelchen inkubiert werden. Da die Konformität des Glutathions komplementär zur Bindungsstelle der Glutathion S-Transferase ist, entstand hieraus ein Komplex, mit dem man später die aktive Form von Rap1, Rap-1-GTP (Ras-GTP), selektiv aus dem Gewebslysat gewinnen konnte.

Der Arbeitsvorgang gliederte sich in mehrere Schritte:

1. Amplifikation und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins
2. Bindung des GST-Fusionsproteins mit den Glutathion-Sepharose-Kügelchen
3. Inkubation der an die Glutathionbeads gebundenen GST Proteine mit dem Zelllysat

zu 1:

Amplifikation und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins:

250 ml LB-Medium (+Ampicillin) wurden mit transformierten Bakterien angeimpft, die das gewünschte pGEX-2T-Konstrukt exprimierten, und über Nacht bei 37°C und 222 U/min kultiviert. Am nächsten Tag verdünnte man die Bakteriensuspension mit LB-Medium im Verhältnis 1:4. Angestrebt wurde eine optische Dichte zwischen 0,6 und 0,8, gemessen bei 600 nm. Die Expression der GST-Proteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach zwei stündiger Inkubation im Schüttler bei 222 U/min und 37°C wurden die Bakterien schließlich in einem 250 ml GSA-Becher für 10 Minuten bei 4000 U/min in einer Sorvall R5-CB Zetrifuge abzentrifugiert. Die weitere Behandlung erfolgte auf Eis. Nach Verwerfen des Überstandes resuspendierte man die Bakterienpellets in 10 ml HBS-Puffer, zentrifugierte den Ansatz wiederum 10 Minuten bei 5000 U/min und 4°C und schüttete den Überstand ab. Die so gewonnenen Bakterienpellets konnte man bei -70°C für längere Zeit lagern oder gleich weiterverarbeiten.

zu 2:

Bindung des GST-Fusionsproteins mit den Glutathion-Sepharose-Kügelchen:

Zur Lyse der Bakterien wurden diese in 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen und mit einem Sonicator 3 mal 15 Sekunden auf Eis bei 100% duty cycle sonifiziert. Die Zelltrümmer zentrifugierte man anschließend bei 5000 U/min für 10 Minuten bei 4°C ab und verwendete den Überstand weiter. Die in kaltem HBS-Puffer 3 mal gewaschenen Glutathionkügelchen (ca. 800 µl) inkubierte man nun mit dem gewonnenen Lysat unter Zugabe von final 0,5% NP-40 und inkubierte den Ansatz für 2 Stunden bei 4°C auf dem Roller. Anschließend sedimentierte man die mit den Fusionsproteinen gekoppelten Sepharosekügelchen kurz bei 500 U/min und wusch den Ansatz 6 bis 8 mal in ARIA-Lysepuffer.

zu 3:

Inkubation der an Glutathion Beads gebundenen GST Proteine mit dem Zelllysat:

Die Zellpellets der Versuchsproben wurden auf Eis in 1 ml ARIA-Lysepuffer lysiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C auf dem Rocker sonifizierte man das Lysat 2 mal 10 Sekunden bei 50% duty cycle und zentrifugierte die Zellreste bei 14000 U/min und 4°C für 20 Minuten ab. Vom Überstand überführte man 60 µl als Kontrolle für das Gesamtlysat in 1,7 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, der Rest wurde mit den GST-Fusionsproteinen bei 4°C für 2 Stunden auf dem Rocker inkubiert (siehe Abb. 9). Danach wurden die Beads 3 mal in

Lysepuffer gewaschen, so daß das ungebundene, inaktive Rap1 im Überstand entfernt wurde. Die Beads wurden mit 60 µl Lämmli 5 Minuten lang bei 95°C denaturiert und per Western Blot analysiert.

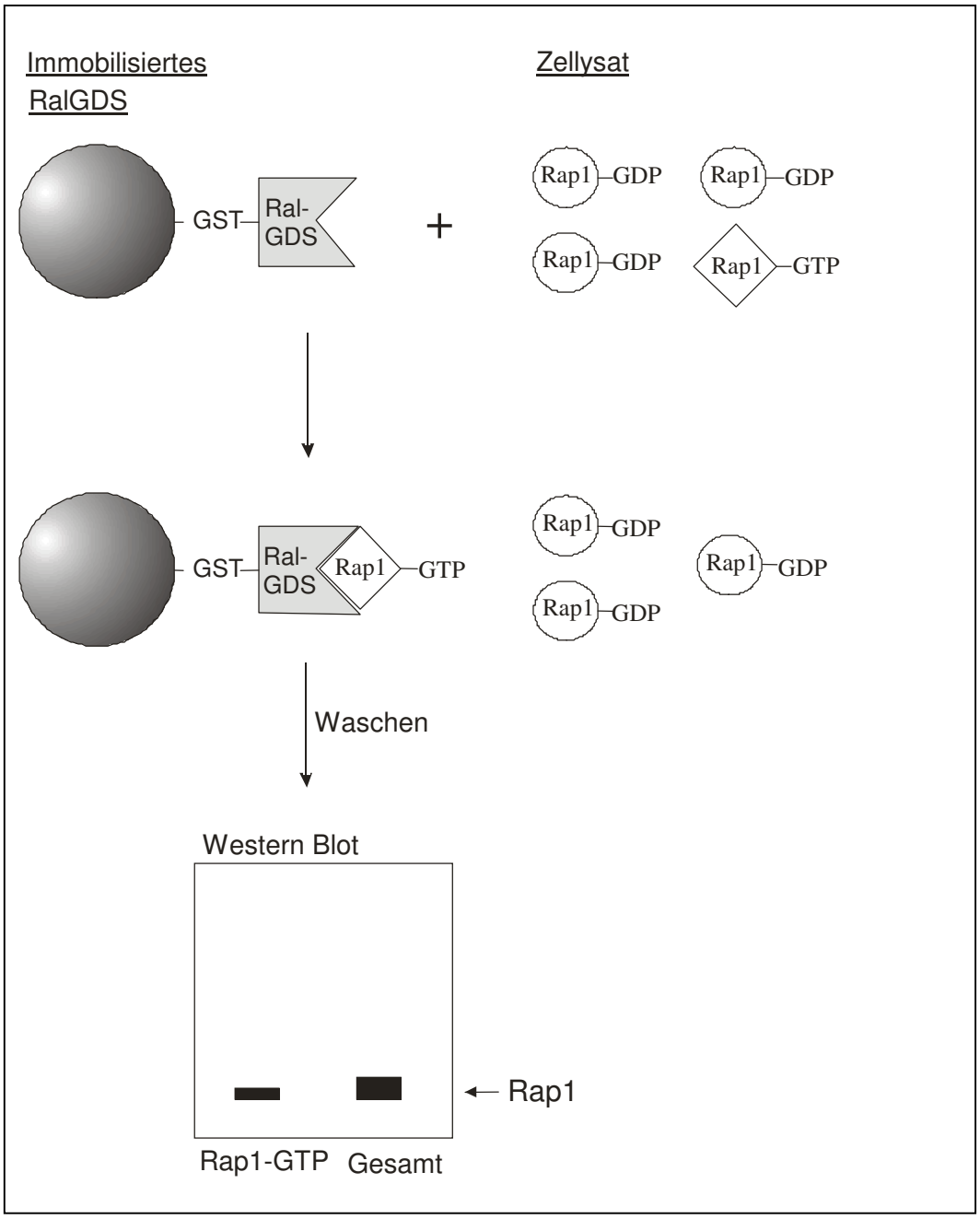


Abb. 9: Detektion von aktivem Rap1 über ARIA. Aktives, GTP-beladenes Rap1 bindet an das Substrat RalGDS, welches über GST an Sepharose-Beads gekoppelt ist. Durch mehrmaliges Abzentrifugieren und Waschen der Beads wird das aktive Rap1 vom inaktiven getrennt. Das aufgereinigte aktive Rap1-Lysat wird gegen das Gesamtlysat im Western Blot aufgetrennt. Analog das Verfahren zur Messung von aktivem Ras. Anstelle von RalGDS verwendet man RBD, die Ras Bindungsdomäne von c-Raf1.

Puffer und Lösungen:

HBS-Puffer:	25 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl
Resuspensionspuffer:	20 mM HEPES pH 7,5 120 mM NaCl 10% (v/v) Glycerol 2 mM EDTA 1 Tablette Complete-Mini-Protease-Inhibitor
ARIA-Lysepuffer:	25 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 1% (v/v) Glycerol 10 mM $MgCl_2$ 1 mM EDTA 1 Tablette Complete-Mini-Protease-Inhibitor

2.2.2.10 Bestimmung der MiaPaCa-2/Panc-1-Zellproliferation mittels MTT-Test

Dieser Test beruht unter anderem darauf, daß die in intakten Mitochondrien vorhandene Succinatdehydrogenase das gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) in ein violettes, wasserunlösliches MTT-Formazan umwandelt.
1000 bzw. 2000 Zellen wurden 12 Stunden vor ihrer Inkubation mit den verschiedenen Stimulatoren in 96-Well-Platten ausgesät. Forskolin (50 µM), 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP (100 µM), Sp-8-Br-cAMPS (100 µM) und der Protein Kinase A Inhibitor 6-22 Amide (10 µM) wurden jeweils 24 bzw. 48 Stunden vor der Messung aufgebracht. Nach Ende der Inkubationszeit (0, 24 und 48 Stunden) wurden pro Well 20 µl der MTS/PMS-Mischung, wie im Herstellerprotokoll angegeben, hinzugegeben (Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WA). Nach einer Inkubationszeit von ca. 2 Stunden bei 37°C und 7% CO2 wurden die 96-Well-Platten in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät spektrophotometrisch bei 490 nm ausgewertet (Referenzwellenlänge 690 nm). Da die Aktivität der Succinatdehydrogenase vom physiologischen Status der Zellen abhängig ist, kann eine Aussage über deren Vitalität getroffen werden. Eine erhöhte Adsorption bei 490 nm korreliert mit einer höheren Anzahl an

wachsenden, stoffwechselaktiven Zellen. Wenn die Zelle durch Inkubation mit einer zytotoxischen Verbindung geschädigt wurde, verliert sie unter anderem die Membranintegrität ihrer Kompartimente. Die mitochondrial lokalisierte Dehydrogenase kann unter diesen Bedingungen nicht mehr arbeiten. Es wird wenig oder kein Formazan gebildet.

2.2.2.11 RNA-Extraktion und Real Time PCR

Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNAeasy Kits gemäß Herstellerprotokoll (Qiagen, Hilden Germany) isoliert. Die Expression der Epac-mRNA wurde anhand der Real Time PCR quantitativ ermittelt (TaqMan, PE Applied Biosystems, Norwalk CT). 2 µg der erhaltenen Gesamt-RNA wurden in die reverse Transkription eingesetzt.
Für die cDNA-Synthese wurde die cDNA der verschiedenen Zelllinien bzw. des Tumorgewebes und die unten angegebenen Primerkombinationen eingesetzt. Endogene Cyclophilin-mRNA wurde als Kontrolle verwendet und die Menge der Target-mRNA dazu in Relation gesetzt. Die folgenden Primer wurden in den angegebenen Konzentrationen verwendet: Epac-forward primer (FP) (900 nM) 5‘-G G C A G G A A C C G G T A T A C A G T G A-3‘, Epac-reverse primer (RP) (50 nM) 5‘-G A A T C T G G T C C C A T G G C C T-3‘, cyclophilin-FP (300 nM) 5‘-A T G G T C A A C C C C A C C G T G T-3‘, cyclophilin-RP (300 nM) 5‘-T T C T T G C T G T C T T T G G A A C T T T G T C-3‘.

2.2.3 Auswertung

2.2.3.1 Stoffwechselaktive Zellen im MTT-Assay

Der Anteil an stoffwechselaktiven Zellen zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurde als Prozentsatz der unstimulierten Zellen angegeben, welche gleich 100% gesetzt wurden.

2.2.3.2 Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden mittels WinStat für Microsoft Excel Version 2001.1 durchgeführt. Der Student t-Test wurde eingesetzt um die statistische Signifikanz zwischen

den stimulierten Zellen und der Kontrolle zu berechnen. Die Standardabweichung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

wobei	s:	Standardabweichung
	$\bar{x}$:	arithmetisches Mittel
	n:	Merkmalsträger
	x_i:	die beim i-ten Merkmalsträger beobachtete Merkmalsausprägung des Merkmals X
	$x_1,..., x_n$:	Beobachtungswerte oder Merkmalswerte

3. Ergebnisse

3.1 Forskolin inhibiert das Wachstum von MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen

Durch Forskolin läßt sich die intrazelluläre Konzentration von cAMP über die Aktivierung der Adenylatzyklase erhöhen. Bei diesem Versuch verwendeten wir gehungerte (0,5% FCS) und mit normalem Serum kultivierte Zellen (10% FCS). Abbildung 10 zeigt das Wachstumsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1. Eine Inhibierung des Zellwachstums war vor allem nach 24 Stunden in beiden Zelllinien deutlich sichtbar ($p<0,05$). Bei den mit Serum stimulierten Zellen zeigte sich keine Änderung des Ergebnisses (Abb. 10 B). In der Kontrollgruppe (DMSO) zeigte sich tendenziell ein eher verstärktes Zellwachstum. Dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant ($p>0,05$). Ein Mitwirken von DMSO an der antiproliferativen Wirkung von Forskolin ist damit unwahrscheinlich.

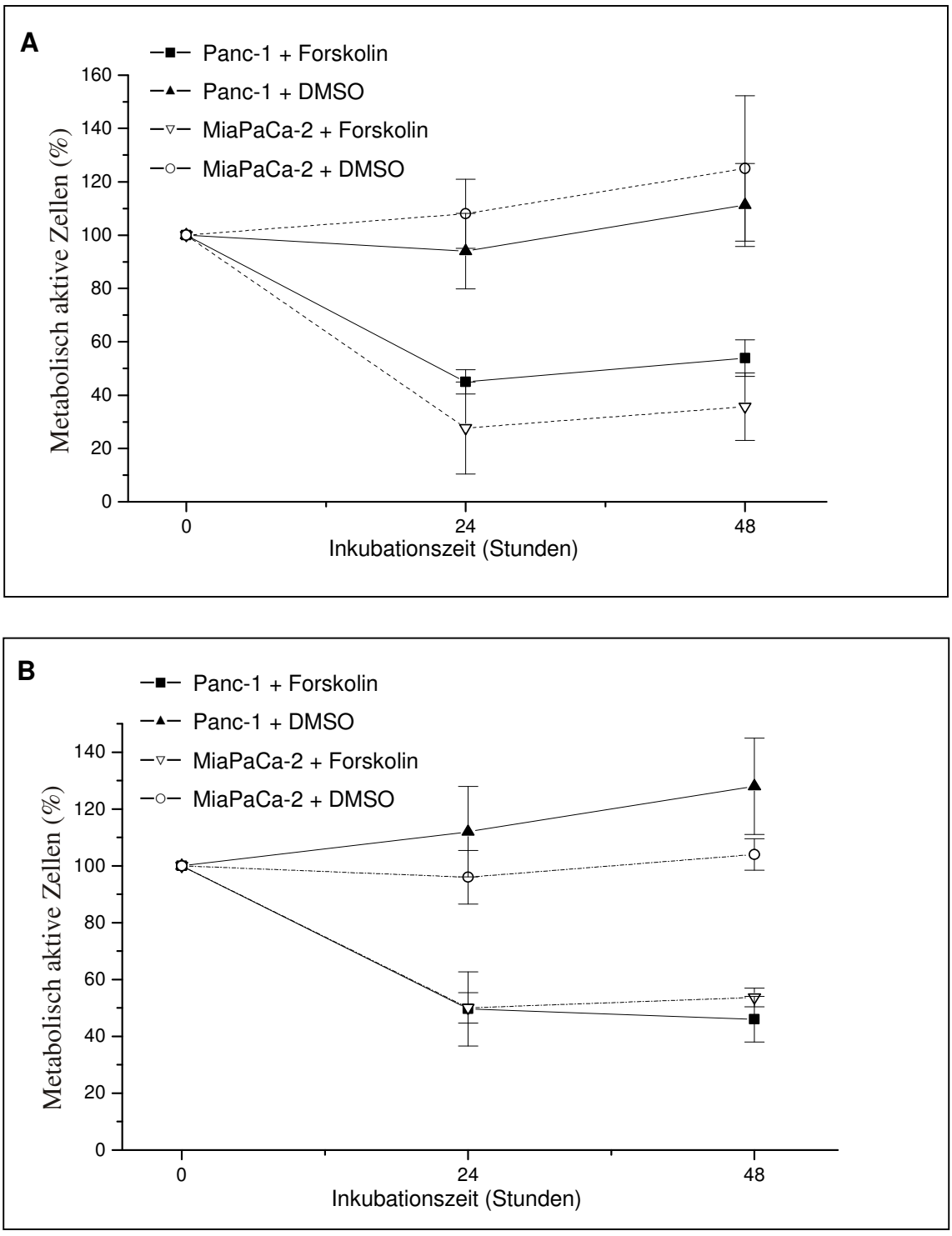


Abb. 10: Auswirkung von Forskolin auf das Zellwachstum der MiaPaCa-2- und Panc-1 Zelllinien. Die Messung der Proliferation erfolgte nach 0, 24 und 48 Stunden. Stimuliert wurden die Zellen mit Forskolin (50 mM) und dem Lösungsmittel DMSO. **A:** Zellen in serumfreiem Medium (0,5% FCS). **B:** Kontrolle des Wachstumsverhaltens bei Serumgabe (10% FCS). Die mit Forskolin stimulierten Zellen sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe, die mit DMSO stimulierten Zellen zu den unstimulierten Zellen angegeben. Jeder Messpunkt stellt einen Mittelwert aus 9 Versuchsreihen mit den dazugehörigen Standardabweichungen dar. Die unstimulierten Zellen wurden als 100% gesetzt.

3.2 Die Gabe eines PKA-Inhibitors führt zu keiner Beeinflußung der durch Forskolin induzierten Hemmung des Zellwachstums

Um ein mögliches Mitwirken von PKA bei der Regulation des Zellwachstums auszuschließen, verwendeten wir neben dem spezifischen Rap1-Aktivator auch einen PKA-Inhibitor. Die Zellen wurden damit 30 Minuten vor ihrer Stimulation mit Forskolin inkubiert. Um den wachstumssteigernden Effekt von FCS darzustellen, verwendeten wir „ungehungerte“ (10% FCS) und „gehungerte“ Zellen (0,5% FCS). Wie die Abbildungen 11 und 12 zeigen, spielt PKA keine signifikante Rolle bei der durch Forskolin induzierten Hemmung des Zellwachstums ($p>0,05$). Falls cAMP vorwiegend über PKA antiproliferativ wirken würde, dann wäre durch die Hemmung der PKA bei Forskolingabe ein verstärktes Zellwachstum zu erwarten. Abbildung 11 zeigt, daß es eher zu einem verminderten Zellwachstum bei Gabe des Inhibitors kommt. Dies bestätigt die Hypothese, daß es noch andere, PKA-unabhängige Signalwege geben muß, die zu einer Wachstumshemmung in Pankreaskarzinomzellen führen. Die Gabe von Serum hatte keinen statistisch signifikanten Effekt (Abb. 12).

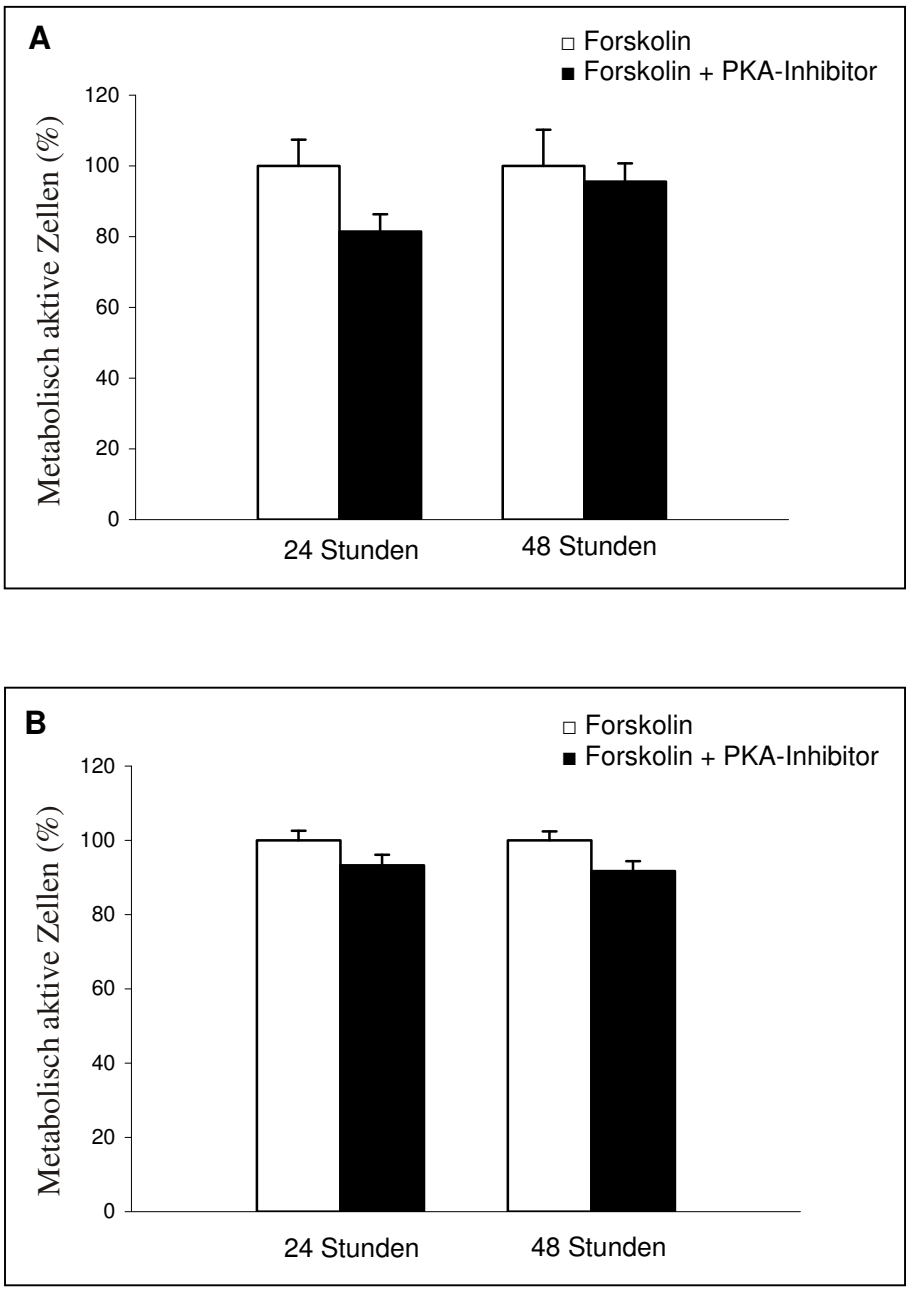


Abb. 11: Messung des Zellwachstums bei Gabe von Forskolin, bzw. Forskolin + PKA-Inhibitor (0,5% FCS). Die Zellen wurden vor ihrer Stimulation mit Forskolin (50 mM) und dem PKA-Inhibitor 16 Stunden in serumfreiem Medium (0,5% FCS) gehungert. Jeder Messpunkt stellt einen Mittelwert aus 9 Versuchsreihen dar. Die nur mit Forskolin stimulierten Zellen dienten als Kontrolle und wurden gleich 100% gesetzt. **A:** MiaPaCa-2-Zellen; **B:** Panc-1-Zellen.

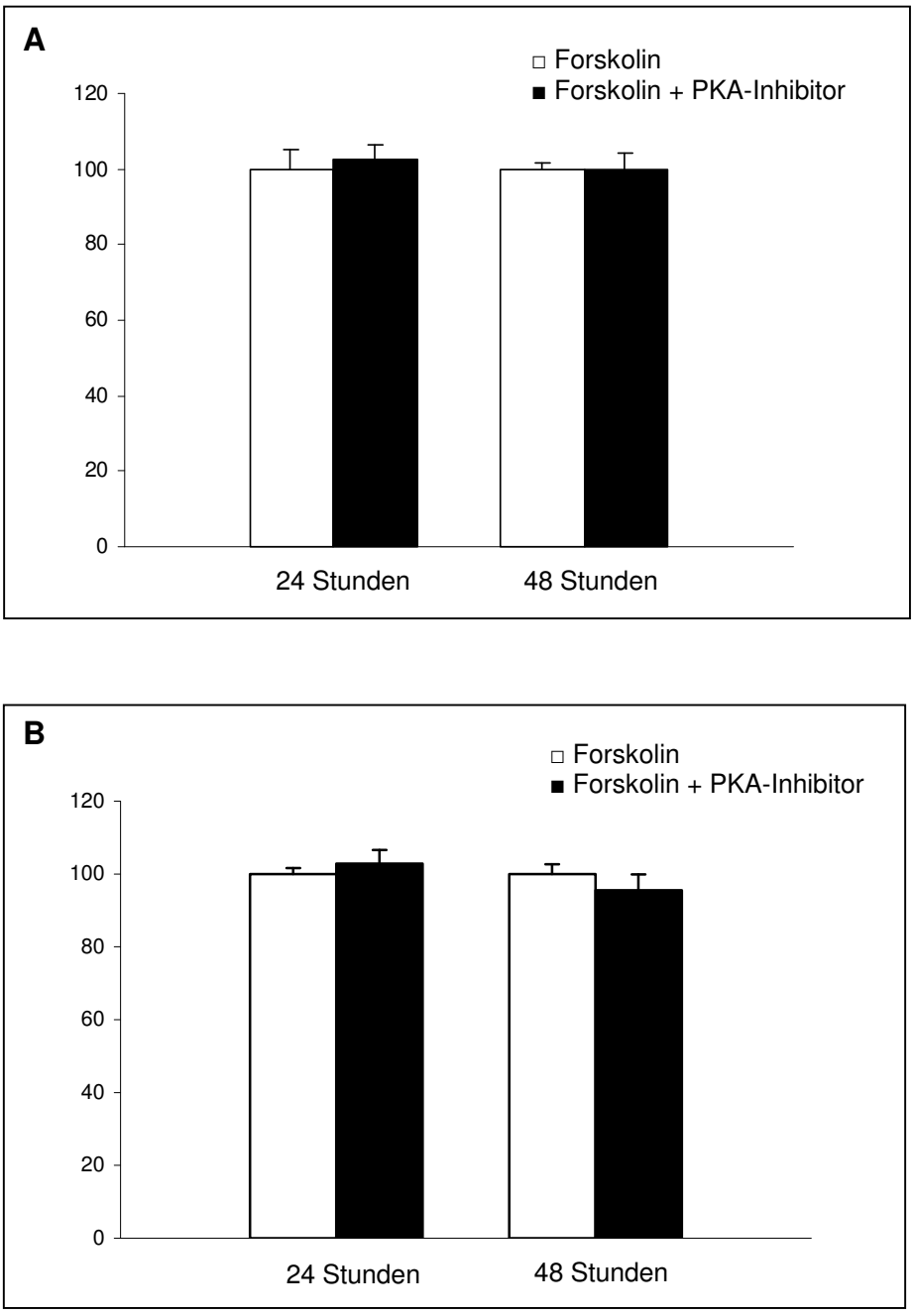


Abb. 12: Messung des Zellwachstums bei Gabe von Forskolin bzw. Forskolin + PKA-Inhibitor (10% FCS). Die Zellen wurden in serumhaltigem Medium (10% FCS) gehalten. **A:** MiaPaCa-2-Zellen; **B:** Panc-1-Zellen.

3.3 Forskolin aktiviert Rap1 aber nicht Ras in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen

Um eine Beteiligung des Ras-Signalwegs an der Regulation des Zellwachstums auszuschließen, haben wir neben der Aktivität von Rap1 auch die von Ras gemessen. Abbildung 13 zeigt die Aktivität von Rap1 in MiaPaCa-2- und Panc1-Zellen. Die Aktivität der GTPasen wurde mittels ARIA bestimmt. Rap1 ließ sich durch TPA, FCS und Forskolin stimulieren. Die Aktivitätssteigerung war maximal zwischen 5 und 20 Minuten. Bei Ras ergab sich ein anderes Bild. Lediglich die Gabe von 10% FCS/TPA führte zu einer Steigerung der Aktivität. Bei Forskolin hingegen war dies nicht der Fall (Abb. 14).

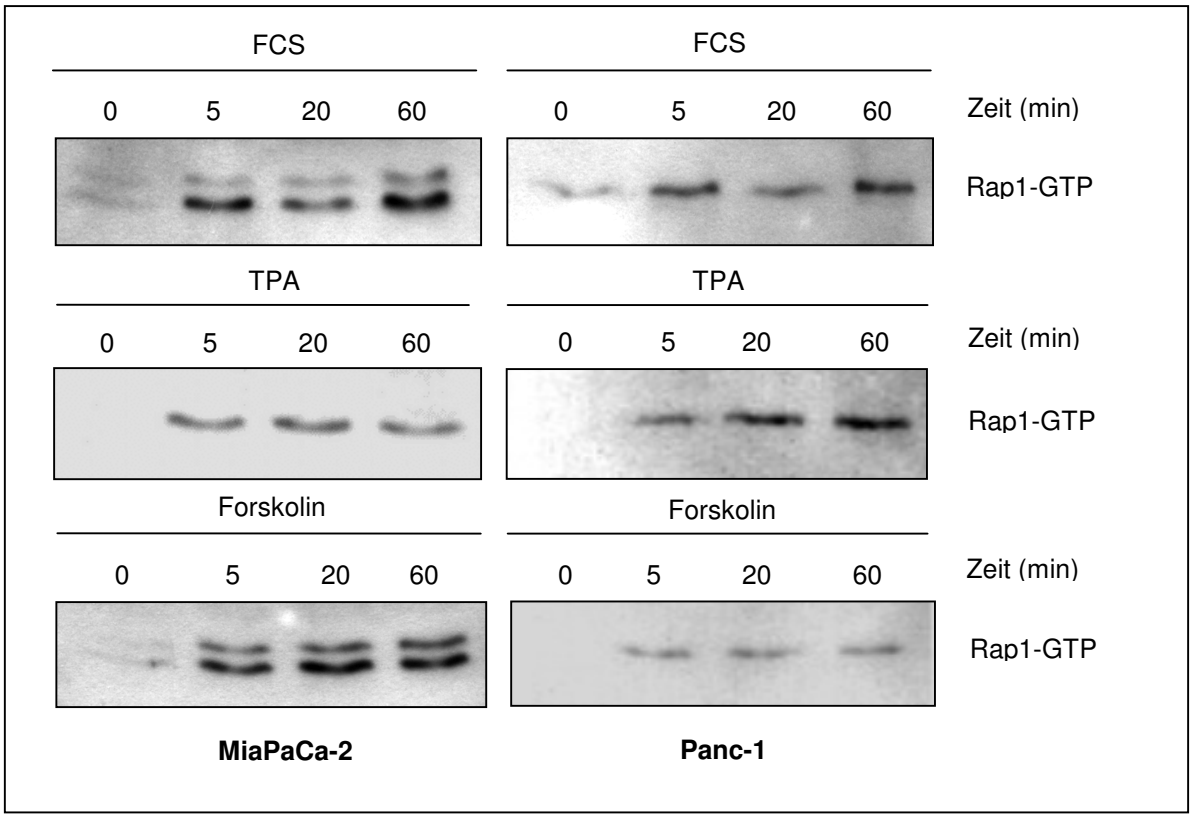


Abb. 13: Messung der Aktivität von endogenem Rap1 bei Stimulation mit FCS, TPA und Forskolin. MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen vor und nach Stimulation mit FCS/TPA bzw. Forskolin. Die Pankreaszelllinien wurden über Nacht in serumfreiem Medium (0,5%) kultiviert und jeweils mit FCS (10%), TPA (100 nM) oder Forskolin (50 mM) stimuliert.

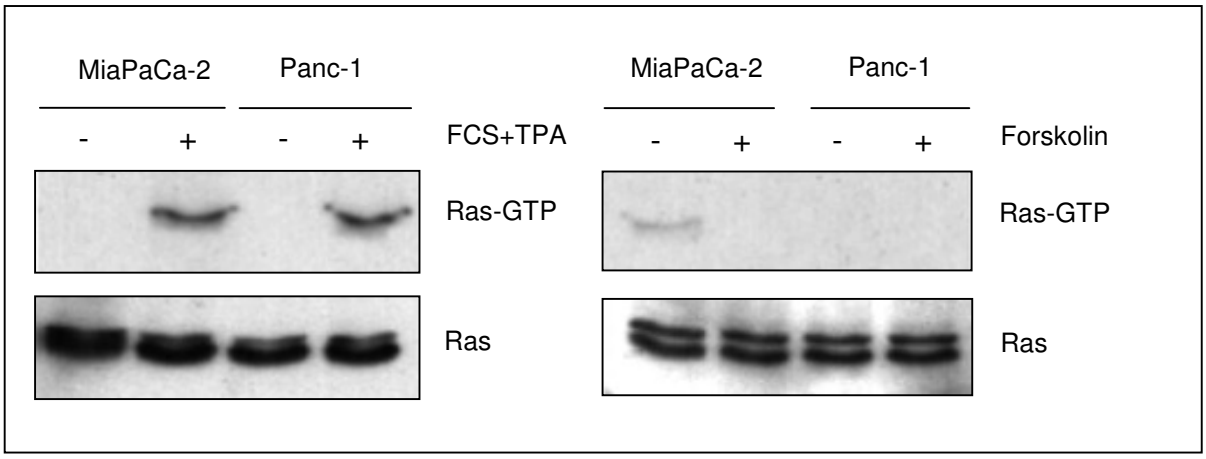


Abb. 14: Messung der Aktivität von endogenem Ras bei Stimulation mit FCS, TPA bzw. Forskolin. MiaPaCa-2-und Panc-1-Zellen vor und nach Stimulation mit FCS/TPA oder Forskolin.

3.4 Epac-mRNA ist in MiaPaCa-2- und Panc1-Zellen überexpremiert

cAMP führte in unseren Pankreaskarzinomzelllinien zu einer Beeinflußung des Zellwachstums. Ein Protein, welches durch cAMP aktiviert wird, ist Epac, ein GEF von Rap1. Die Epac-mRNA Konzentration, welche wir durch RT-PCR gemessen haben, war um das 32- bis 38-fache erhöht im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe (siehe Abb. 15). Diese Beobachtungen sprechen für eine Aktivierung von Rap1 durch cAMP über den GEF Epac in den Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1.

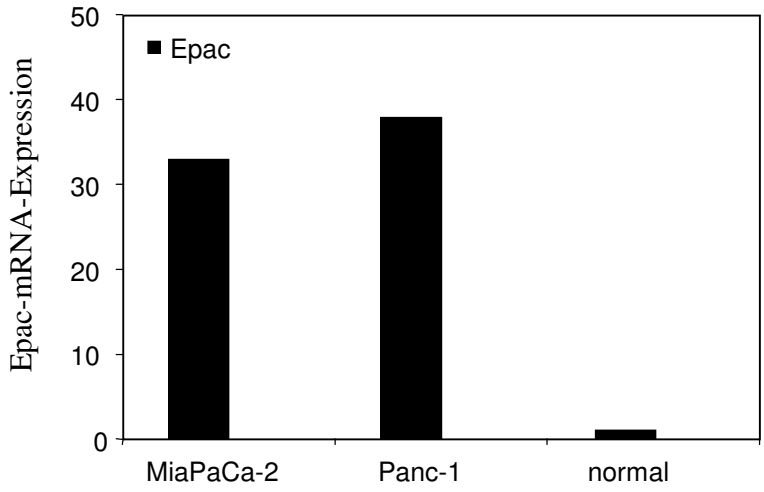


Abb. 15: Messung der mRNA-Expression von Epac in MiaPaCa-2-, Panc-1-Zellen und normalem Pankreasgewebe. Normales Pankreasgewebe wurde gleich 1 gesetzt. Jeder Messpunkt stellt einen Mittelwert aus 3 Versuchsreihen dar.

3.5 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP aktiviert Rap1 in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen

Um die Frage zu beantworten, ob die Inhibition des Zellwachstums nur unter Forskolingabe auftritt, verwendeten wir einen spezifischen Rap1-Aktivator, ein cAMP-Analogon. 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP bindet ausschließlich Epac und dies mit einer 3-fach höheren Affinität als herkömmliches cAMP. Nach der Stimulation mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP sahen wir eine Steigerung der Rap1-Aktivität bereits bei 10 µM in Panc-1-Zellen bzw. ab 1 µM in MiaPaCa-2-Zellen (Abb. 16). Neben 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP benutzten wir Sp-8-Br-cAMPS, ein nicht selektives cAMP-Analogon, welches auch andere Signalwege außerhalb des Epac-Rap1-Signalkaskade aktivieren kann, wie z.B. den PKA-Signalweg. Hier beobachteten wir bereits ab einer Konzentration von 1 µM eine Steigerung der Rap1-Aktivität in beiden Zelllinien.

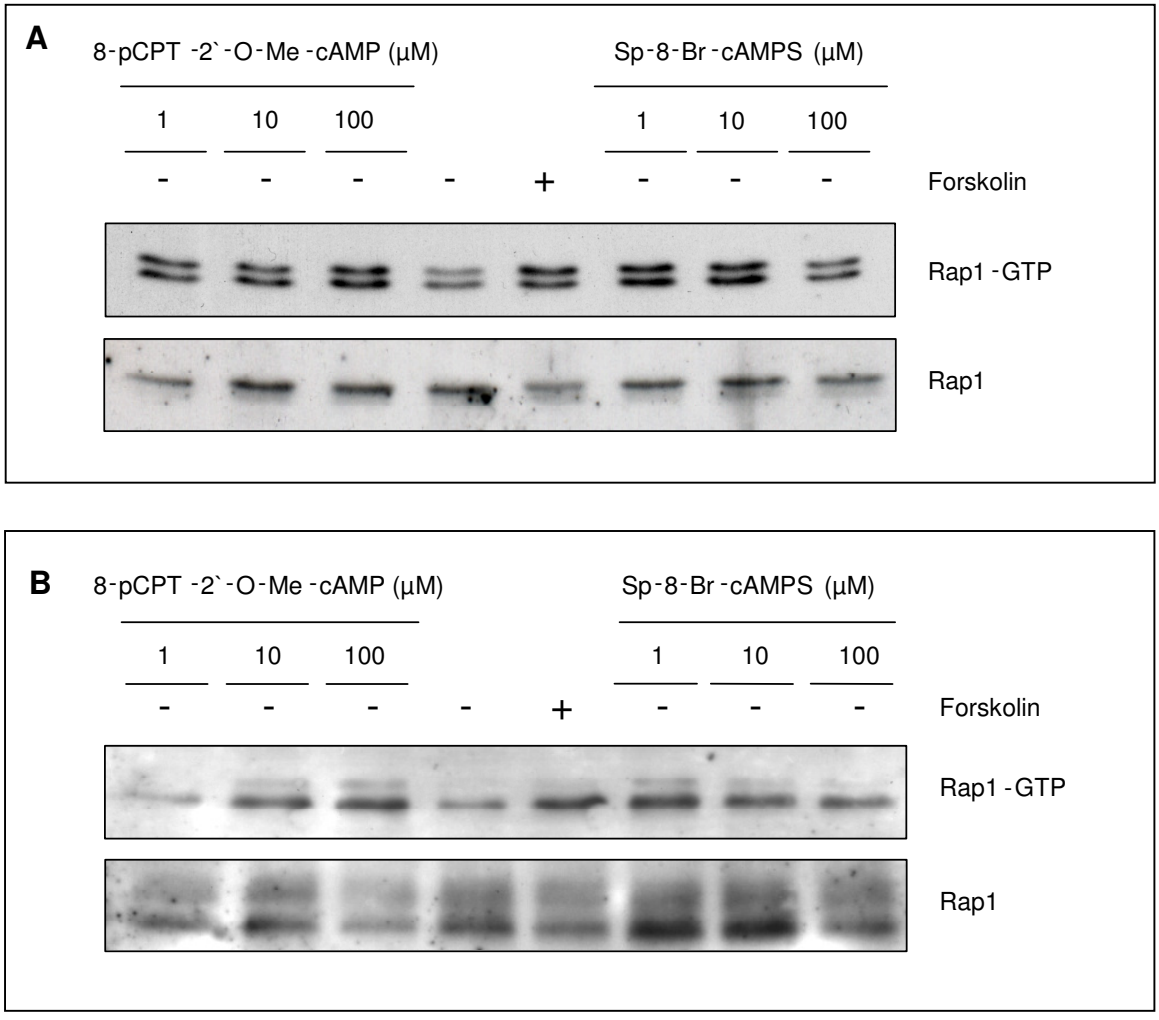


Abb. 16: Messung der Aktivität von endogenem Rap1 bei Stimulation mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP, Forskolin (50 mM) und Sp-8-Br-cAMPS. Die Pankreaszelllinien wurden über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend für 20 Minuten stimuliert. **A:** MiaPaCa-2-Zellen; **B:** Panc-1-Zellen.

3.6 Inhibition des Zellwachstums durch 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP

Die Frage inwieweit Rap1 an der durch cAMP induzierten Hemmung des Zellwachstums beteiligt ist, ließ sich elegant durch Verwendung des spezifischen Rap1-Aktivators 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP lösen. Als Kontrolle verwendeten wir das unspezifische cAMP-Analogon Sp-8-Br-cAMPS, welches zusätzlich PKA aktivieren kann. Die Zellen mußten während des Beobachtungszeitraums mehrmals mit den cAMP-Analoga behandelt werden, da die Halbwertszeit der spezifischen Stimulatoren gegenüber der von Forskolin kürzer ist. Bei einer zu hohen Zelldichte (ab 6000/well) war keine Inhibition des Zellwachstums im MTT-Test mehr sichtbar. Entweder erfolgte hier eine Wachstumshemmung der Zellen untereinander oder die Nährstoffe im Medium wurden zu schnell aufgebraucht. Dadurch war auch die unstimulierte Kontrollgruppe in ihrem Wachstum gehemmt. Erst bei 2000 Zellen pro Well erhielten wir aussagekräftige Ergebnisse. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Stimulatoren setzten wir auch den Beobachtungszeitraum auf 24 Stunden herunter.

Bei den MiaPaCa-2-Zellen zeigte sich bei einer Stimulation mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, deren Stoffwechselaktivität wir gleich 100% setzten, tendenziell eine verringerte metabolische Aktivität (siehe Abb.17). Der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant (2000 Zellen: $p=0,13$; 1000 Zellen: $p=0,14$). Die mit Sp-8-Br-cAMPS stimulierten Zellen zeigten sich in ihrem Wachstum stärker gehemmt. Hier zeigte sich aber bei der höheren Zellzahl auch nur eine grenzwertige Signifikanz (2000 Zellen: $p=0,08$; 1000 Zellen: $p<0,05$).

Bei den Panc-1-Zellen zeigte sich sowohl nach Stimulation mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP als auch mit Sp-8-Br-cAMPS eine stärkere und signifikante ($p<0,05$) Hemmung des Zellwachstums als bei den MiaPaCa-2-Zellen. Sp-8-Br-cAMPS führte auch hier wieder zu einer stärkeren Wachstumshemmung als das unspezifische cAMP-Analogon.

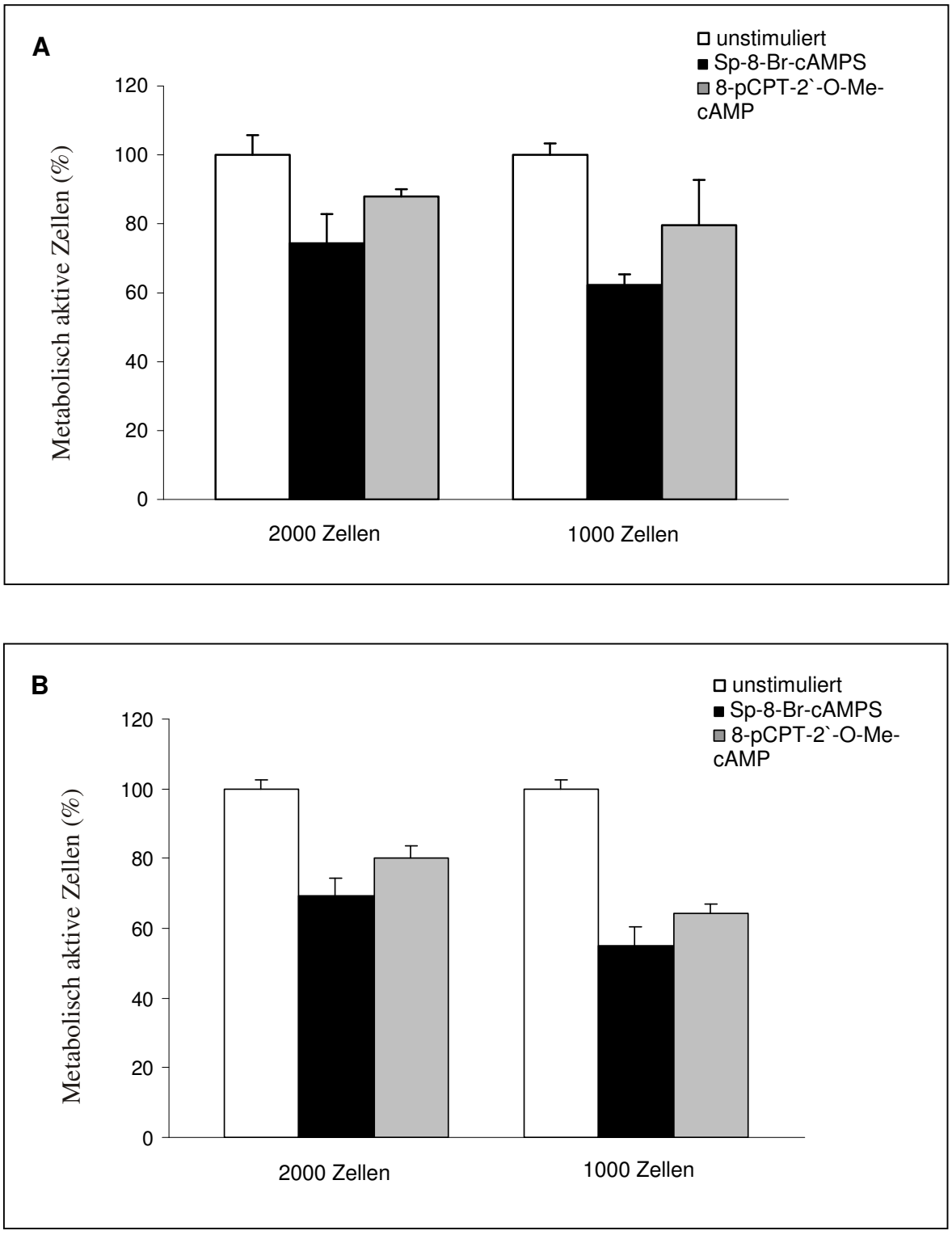


Abb. 17: Messung des Zellwachstums nach Stimulation mit Sp-8-Br-cAMPS bzw. 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP.** Stimulation mit Sp-8-Br-cAMPS (100 µM) und 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP (100 µM). Die Messung des Wachstums erfolgte nach 24 Stunden. Die Zellen wurden vorher in serumfreiem Medium (0,5%) gehungert. Jeder Messpunkt stellt einen Mittelwert aus 3 Versuchsreihen dar. Die unstimulierten Zellen wurden als 100% gesetzt. **A: MiaPaCa-2-Zellen; **B:** Panc-1-Zellen.

3.7 ERK-Aktivität in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen bei Gabe von Forskolin

Es sollte zunächst der Einfluß Forskolins auf die Aktivität von ERK in den Pankreaskarzinomzellen analysiert werden, um den Wirkungsmechanismus, der hinter der Forskolin induzierten Hemmung des Zellwachstums steht, besser verstehen zu können. Es zeigte sich, daß die Aktivität von endogenem ERK1/2 analog zur Aktivität von Ras durch Serum und TPA erhöht werden kann. Die Gabe von Forskolin führte jedoch zu einer Abnahme von phosphoryliertem, aktivem ERK (siehe Abb. 18)

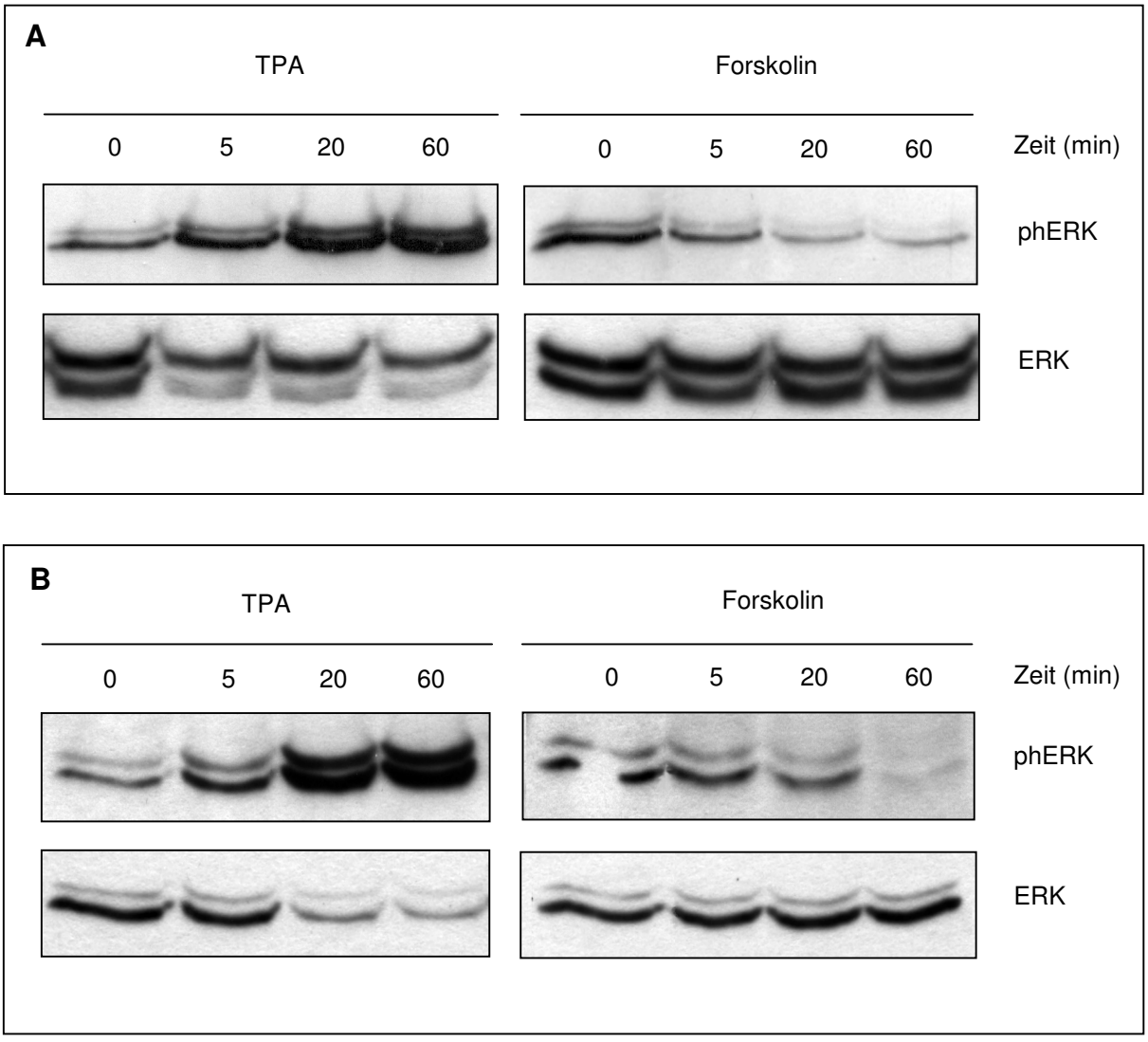


Abb. 18: Bestimmung der endogenen ERK-Aktivität nach Stimulierung mit TPA/ Forskolin. Messung der ERK-Aktivität nach 0, 5, 20 und 60 Minuten. Als Kontrolle dienten Western Blots auf Gesamt-ERK1/2. Die Pankreaszelllinien wurden über Nacht in serumfreien Medium kultiviert und jeweils mit TPA (100 nM) oder Forskolin (50 mM) stimuliert. **A:** MiaPaCa-2-Zellen; **B:** Panc-1-Zellen.

3.8 ERK-Aktivität in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen bei Gabe von 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP

Unter Gabe von Forskolin kommt es wie oben bereits gezeigt zu einer Abnahme der ERK-Aktivität. Inwiefern dies ein Rap1-spezifischer Effekt ist oder nur im Rahmen der Stimulation mit Forskolin auftritt, sollte in diesem Versuch gezeigt werden. Interessanterweise zeigte sich unter Stimulation mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP eher eine Zunahme der ERK-Aktivität (Abb. 19). Forskolin hingegen bewirkte wieder eine Abnahme der Phosphorylierung von ERK.

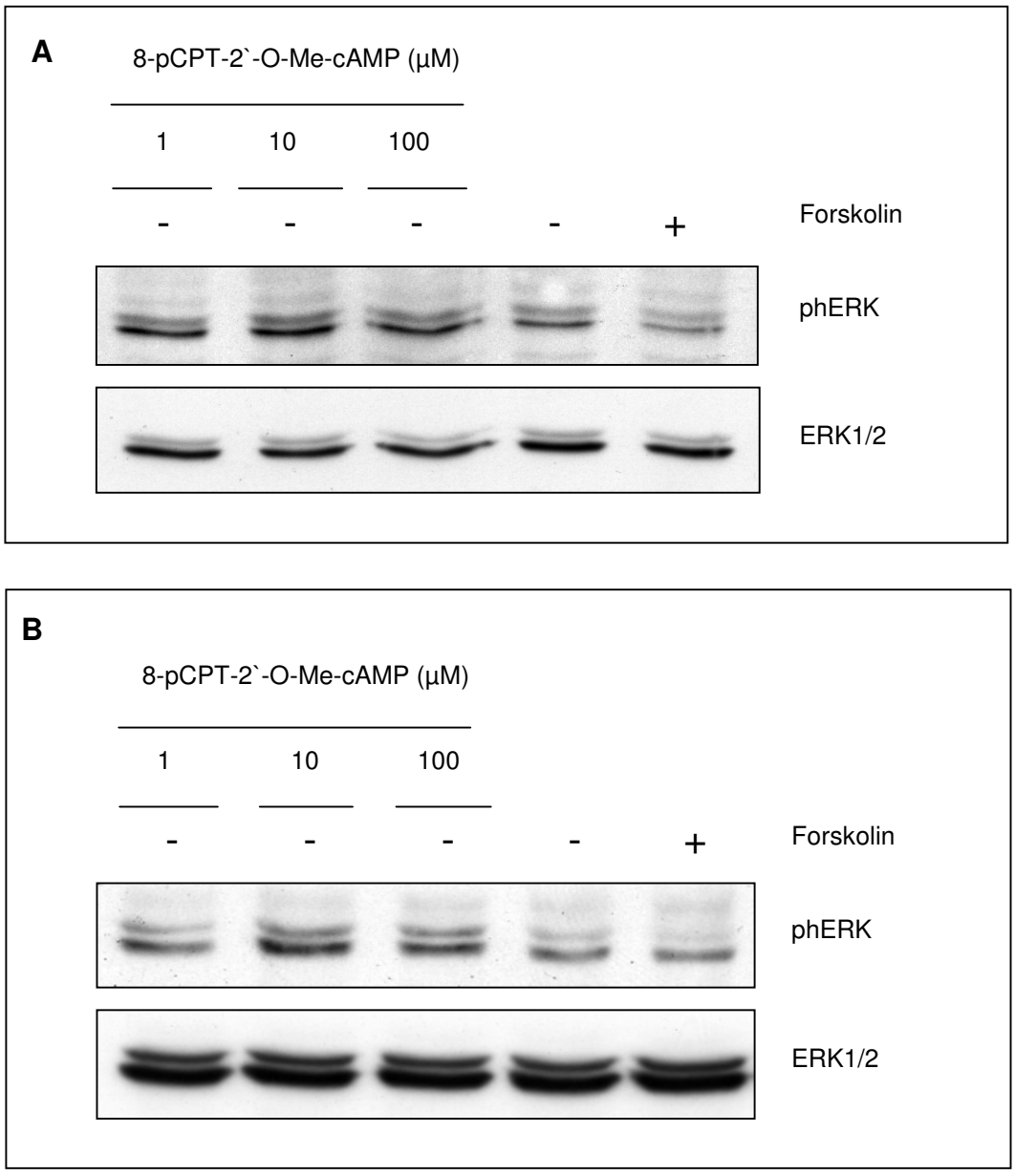


Abb. 19: Bestimmung der endogenen ERK-Aktivität nach Stimulation mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP und Forskolin.** Stimulation mit dem spezifischen Epac-Aktivator 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP (1, 10, 100 µM) und Forskolin (50 mM). Die Zellen wurden 20 Minuten stimuliert. Als Kontrolle dienten Western Blots mit Gesamtzelllysat von ERK1/2. **A: MiaPaCa-2-Zellen, **B:** Panc-1 Zellen.

3.9 Durch die Transfektion von Epac-wt kommt es zu keiner Abnahme der ERK-Aktivität

Auch bei einer Transfektion mit Epac-Wildtyp-DNA zeigte sich keine Inhibierung der ERK-Aktivität (Abb. 20). Forskolin bewirkte wieder eine leichte Abnahme, TPA hingegen eine starke Aktivierung von ERK in MiaPaCa-2-Zellen. In Panc-1-Zellen war nur bei Stimulation mit TPA eine ERK-Phosphorylierung sichtbar.

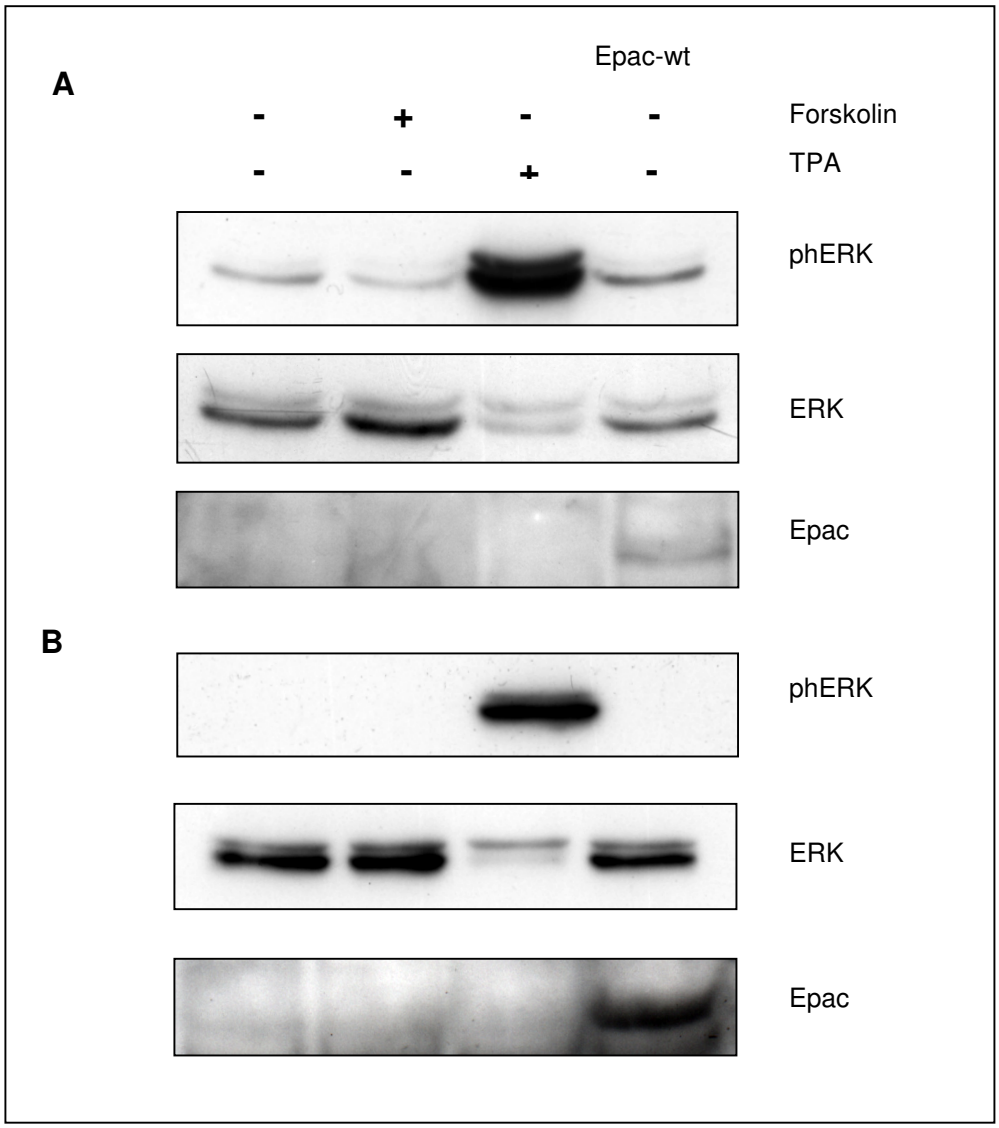


Abb. 20: Bestimmung der ERK-Aktivität nach Stimulation mit Forskolin, TPA bzw. Transfektion mit Epac-Wildtyp. Die Pankreaszelllinien wurden über Nacht in serumfreiem Medium (0,5% FCS) kultiviert und jeweils mit TPA (100 nM) oder Forskolin (50 mM) stimuliert. Als Kontrolle dienten Western Blots auf Gesamt-ERK1/2. **A:** MiaPaCa-2-Zellen; **B:** Panc-1 Zellen.

3.10 Die Überexpression von aktivem Rap1 hat keinen Einfluß auf die Aktivität von ERK

Bei Überexpression von aktivem Rap1 (Rap1-G12V-pcDNA) in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen zeigte sich keine Änderung der ERK-Aktivität (Abb. 21). Lediglich bei den mit aktivem Ras (H-RASV12) transfizierten Zellen konnte eine Steigerung beobachtet werden. Dies bestätigt die Vermutung, daß Rap1 zu keiner Hemmung des ERK-Signalwegs führt. Seine antiproliferative Eigenschaft muß über andere Signalwege vermittelt weden.

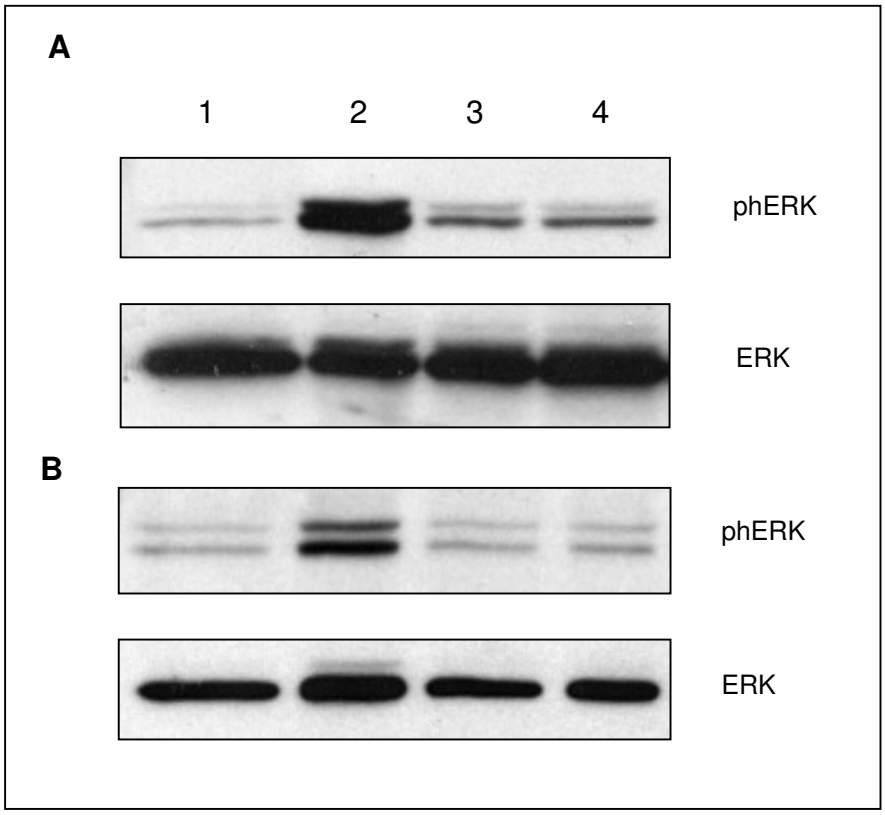


Abb. 21: Bestimmung der endogenen ERK-Aktivität. Überexpression einer aktiven Ras (H-RasV12) und Rap1 (Rap1G12V)-Mutante. Als Kontrolle dienten Western Blots auf Gesamt-ERK1/2. **1**= pcDNA3, **2**= H-RasV12pcDNA, **3**= KRSPA (eukaryotic expression vector), **4**= Rap1-G12V-pcDNA. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und analysiert. **A:** MiaPaCa-2-Zellen; **B:** Panc-1 Zellen.

Zusammenfassend läßt sich aus den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen sagen, daß eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cAMP in den Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 zu einem verlangsamten Zellwachstum führt. Dies kann durch die Gabe eines PKA-Inhibitors nicht wesentlich beeinflußt werden. Eine Kultivierung der Zellen in serumhaltigem Medium führt zu keiner Änderung der Ergebnisse. Die Gabe von Forskolin führt zu keiner Ras-, jedoch zu einer Rap1-Stimulation. Durch Epac kommt es in den Pankreaskarzinomzelllinien zu einer Aktivierung von Rap1. Dieses wird in den verwendeten Zelllinien exprimiert. Die spezifische Aktivierung von Rap1 ist für den Hauptteil der cAMP-bedingten Wachstumshemmung in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 verantwortlich. Bei den MiaPaCa-2-Zellen zeigt sich eine ähnliche Tendenz, diese ist aber statistisch nicht signifikant. Die durch Rap1 vermittelte Hemmung des Zellwachstums wird nicht durch eine Hemmung der ERK-Kinase vermittelt.

4. Diskussion

Die Rolle von second-messengern bei der Regulation des Zellwachstums von Pankreaskarzinomzelllinien ist bekannt (Boucher et al. 2001). cAMP führt zu einer verminderten Proliferation. Welche Signalwege darin involviert sind, konnte bis heute noch nicht vollständig aufgedeckt werden.

Ziel dieser Versuchsreihen war es, cAMP-abhängige Signalkaskaden auf ihre Funktion hin bei der Regulation des Zellwachstums in Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen.

Ein wichtiges Signalprotein, welches unter anderem über intrazelluläres cAMP reguliert wird, ist PKA. Die Aktivierung von PKA führt zur Abschwächung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs. Ob die Inhibierung des Zellwachstums durch die Protein Kinase A (PKA) mitgetragen wird, oder ob es alternative Wege gibt, wie z.B. den Epac/Rap1-Signalweg, sollte ebenfalls gezeigt werden. Ein Beispiel für die wachstumsinhibierende Wirkung von Rap1 ist die bei einer Überexpression auftretende Reversion eines Ras-transformierten Phänotyps (Kitayama et al. 1989) in Fibroblasten.

Ein Angriffspunkt für die proliferationshemmende Wirkung von cAMP könnte der MAPK-Signalweg sein. Er ist unter anderem wichtig für die Regulation der Proliferation. Die endständige Proteinkinase ERK, welche mitunter die für die Steuerung des Zellzyklus wichtigen Signalproteine Cyclin D1 und p27 in ihrer Expression beeinflußt, zeigte sich in unseren Versuchsreihen bei einer Stimulation mit Forskolin in seiner Aktivität vermindert. Bei einer Inkubation mit dem speziellen Epac-Aktivator 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP kam es jedoch zu keiner Änderung der ERK-Aktivität. Untersucht wurden die Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1.

4.1 Inhibition des Zellwachstums durch Forskolin

Bei der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung sind second-messenger von besonderer Bedeutung (Schwede et al. 2000; Mahloogi et al. 2003). So hemmt cyclisches adenosine 3`, 5`-monophosphate (cAMP) das Wachstum von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, lymphoiden Zellen, neuronalen Zellen und Gliazellen (Hollenberg u. Cuatrecasas 1973; Nilsson u. Olsson 1984; Blomhoff et al. 1988; Mark u. Storm 1997; Dugan et al. 1999).

cAMP wird als intrazellulärer second-messenger als Antwort auf eine ganze Reihe von extrazellulären Signalen, wie Hormonen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern produziert. Epinephrine, Prostaglandine, Adenosine, vasointestinale Peptide, Glukagon und Parathormon wirken so inhibierend auf das Zellwachstum über eine Aktivierung von PKA durch cAMP. Ebenso ist cAMP an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie der Steuerung des Zellstoffwechsels, der Zellteilung, des Wachstums, Differenzierung, Sekretion und neoplastischer Transformation von Zellen beteiligt (Mei et al. 2002). Eine Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel durch die Aktivierung der Adenylatzyklase führte in unseren Versuchsreihen zu einer verminderten Proliferation der Zellen. Der dazugehörige Mechanismus ist bisher aber noch unzureichend erforscht. Man geht davon aus, daß es unter einer Erhöhung der cAMP-Konzentration zu einer Phosphorylierung an mehreren Residuen, S43, S233, S259 und S621 an Raf-1 kommt (Dumaz et al. 2002; Dhillon et al. 2002). Folge ist unter anderem eine erschwerte Bindung von Ras-GTP an Raf-1.

Die meisten der Funktionen von cAMP werden durch PKA vermittelt. PKA besteht aus zwei Untereinheiten: der katalytischen und der regulatorischen Einheit. Durch die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit wird PKA aktiviert. PKA kann zu einer Phosphorylierung von Raf-1 an S43 und S621 (Dhillon et al. 2002; Hafner et al. 1994; Mischak et al. 1996; Wu J et al. 1993) bzw. S259 (Dhillon et al. 2002) führen. Durch die Phosphorylierung von S43 kommt es möglicherweise zu einer erschwerten Bindung von Ras-GTP. (Dumaz et al. 2002; Wu J et al. 1993; Dhillon et al. 2002; Chuang et al. 1994; Ramstad et al. 2000; Wu J et al. 1993) und dementsprechend auch zu einer Hemmung des ERK-Signalwegs mit verlangsamtem Zellwachstum (Dumaz et al. 2002; Avruch et al. 2001; Houslay et al. 2000; Kolch 2000). Die Raf-1 induzierte ERK-Aktivierung wird hauptsächlich durch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung an S259 gehemmt (Dhillon et al. 2002; Michaud et al. 1995; Morrison et al. 1993; Tzivion et al. 1998; Zimmermann et al. 1999).

Es existiert noch ein anderer Mechanismus, bei dem PKA die zytoplasmatische Kinase Src phosphoryliert, was wiederum über C3G, einem GEF, Rap1 aktiviert. Aktives Rap1 führt dann zur Hemmung des ERK-Signalwegs (Schmitt u. Stork 2002).
cAMP stimuliert aber auch die GEFs Epac1 und Epac2, welche zu einer direkten Aktivierung von Rap1 und Rap2 führen (Kawasaki et al 1998; de Rooij et al. 1998). Bei Überexpression von Rap1 beobachtete man eine Inhibierung von Raf-1, die der durch cAMP induzierten sehr ähnlich ist. Bei der Aktivierung von endogenem Rap1 trat diese Eigenschaft aber nicht auf (Dumaz et al. 2002; Bos et al. 2001). In einem von F.J.T. Zwartkruis veröffentlichten Paper zeigt dieser, daß Rap1 nicht zu einer Hemmung der PDGF bzw. EGF vermittelten ERK-Aktivierung durch Ras führt (Zwartkruis et al. 1998).
Raf-1 scheint aber nicht das einzige Ziel cAMPs zu sein. Man vermutet, daß es noch eine Reihe weiterer Interaktionspartner gibt, welche das Zellwachstum regulieren (Dumaz et al. 2002).
Es gibt mehrere Hinweise darauf, daß die Inhibition des Zellwachstums durch cAMP vornehmlich in Zellen mit aktiven Ras-Mutationen möglich ist. Die in unseren Experimenten verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2- und Panc-1 Zellen beinhalten eine Ras-Mutation auf Codon 12. Warum diese Zellen empfindlicher auf cAMP reagieren ist bis jetzt noch nicht geklärt. Ob die Wirkung von cAMP, bzw. die von Epac-Rap1 oder PKA von der Ras-Mutation abhängt, bedarf weiterer Untersuchungen.
MiaPaCa-2 und Panc-1 Zellen konnten in ihrem Wachstum durch cAMP gehemmt werden. Um herauszufinden, ob neben PKA-abhängigen Signalwegen noch andere eine Rolle spielen, untersuchten wir den Einfluß von cAMP auf die kleinen GProteine Ras und Rap1.

4.2 Die Gabe eines PKA-Inhibitors führt zu keiner signifikanten Änderung der durch Forskolin induzierten Hemmung des Zellwachstums

Wie oben erwähnt, kommt es durch die Stimulation von PKA zu einer Inhibierung von Raf-1. Bis heute ist der genaue Mechanismus, über welchen cAMP zur Abschwächung des Zellwachstums führt, noch nicht vollständig aufgedeckt (Budillon et al. 1999; Caraglia et al. 1999). Eine Möglichkeit besteht in der Aktivierung von PKA. Diese führt zur Abschwächung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs über eine Phosphorylierung der c-Raf1-Kinase (Wu J et al. 1993). Ob PKA letztendlich alleine für das verlangsamte Zellwachstum verantwortlich ist, oder ob noch andere Signalwege in diesem Prozeß involviert sind, konnte bis heute noch nicht

vollständig geklärt werden (Sidovar et al. 2000). Vor allem in Tumorzellen besteht die Vermutung, daß noch andere, PKA-unabhängige Mechanismen in die Regulation des Wachstums eingreifen (Hecquet et al. 2002; Fujita et al. 2002). Um ein Mitwirken der PKA bei der Regulation des Zellwachstums durch Forskolin ausschließen zu können, präparierten wir die Zellen vor ihrer Stimulation mit einem PKA-Inhibitor. Wir konnten letztendlich feststellen, daß Forskolin auch bei Gabe eines PKA-Inhibitors seine wachstumshemmende Wirkung entfalten konnte. Damit konnten wir annehmen, daß es noch andere PKA-unabhängige Signalwege geben mußte. Die nächste Fragestellung war, ob es möglich ist, in den Pankreaskarzinomzelllinien die kleinen GTPasen Rap1 bzw. Ras durch Forskolin aktivieren zu können und wenn ja, welche Aktivatoren darin eine Rolle spielten.

4.3 Der Einfluß von Forskolin auf Ras-Rap1-Signalwege im Pankreaskarzinom

Im folgenden soll die Möglichkeit einer Ras-Aktivierung durch cAMP sowie deren Auswirkung auf das Zellwachstum diskutiert werden.

Zusätzlich zu der Regulation wichtiger zellulärer Funktionen beeinflußt cAMP weitere intrazelluläre Signalwege wie die MAPK-Signalkaskade (Frodin et al. 1994; Burgering et al. 1993; Wu J et al. 1993; Graves et al. 1993; Cook et al. 1993 a u. b), die Cyclin dependent kinase (Grieco et al. 1996), Ca^{2+}- abhängige Signalwege (DeBernadi et al. 1996; Rogue et al. 1998) und den Jak/Stat Signalweg (David et al. 1996).

Da neben Rap1 und PKA Ras ebenso zu einer Beeinflußung des Zellwachstums führen kann, war es notwendig, dessen Aktivität bei der Stimulation mit Forskolin zu messen.

In Schilddrüsenzellen kommt es über eine TSH-Stimulierung zu einer Erhöhung intrazellulären cAMPs. Beachtenswert dabei ist der sofortige Anstieg von aktivem, GTP-beladenem Ras. Dies wird über cAMP-abhängige Faktoren vermittelt (Tsygankova et al. 2000). In einer anderen Publikation wurde darüber berichtet, daß es durch die Erhöhung der cAMP-Konzentration zwar zu einer Hemmung des ERK-Signalwegs kommt, die Aktivierung von PKA jedoch die Bildung eines PI3K-Ras-Komplexes, welcher zu einer verstärkten Proliferation führt, gefördert wird (Ciullo et al. 2001; Rodriguez-Viciana et al. 1997). In Melanozyten kommt es über cAMP zu einer ERK-Aktivierung durch Ras (Busca et al. 2000).

Es gibt weitere Signalwege, bei dem Ras selbst Proliferation inhibiert. Ras aktiviert Raf-1, welches wiederum MEK und ERK stimuliert. Raf-1 greift bei der Steuerung des Zellzyklus an

mehreren Stellen ein. Eine Steigerung der CyclinD-Expression und damit des Zellwachstums wird unter anderem durch die Aktivierung des ERK und PI-3K Signalwegs beobachtet. ERK kann außerdem noch p27kip phosphorylieren, worauf dieses in der Zelle abgebaut wird. p27kip inhibiert G1 cyclin-CDKs, wirkt also antiproliferativ. Diese sind für den geregelten Ablauf des Zellzyklus wichtig (Marshall 1999; McMahon u. Woods 2001).
Neben der Interaktion mit Cyclin D ist das Zusammenspiel mit p21waf/kip ebenso von Bedeutung (Marshall 1999; McMahon u. Woods 2001). Dieses CKI inhibiert cyclinE-CDK2 und cyclinD-CDK4. Bei einer Überexpression von Raf-1 führte die erhöhte Aktivität von ERK über p21wav/cip zu einem Zellzyklusstopp. Dies könnte einen Schutzmechanismus darstellen, der die Zelle vor einer Ras-induzierten Transformation bewahrt. In Zellen denen p53 oder p21waf/cip fehlt, führt Raf-1 hingegen zu einer verstärkten Proliferation wie auch Differenzierung der Zellen (Roper et al. 2001). Die p21waf/cip Aktivierung kann durch p53 induziert werden.
So führt die Raf-1 Stimulation nicht immer nur zu einer verstärkten Proliferation. In SCLC-Zelllinien kommt es so zu einer Wachstumsinhibierung, welche über p21waf/cip und p27kip vermittelt wird (Ravi et al. 1998).
In unseren Experimenten führte lediglich die Gabe von FCS zu einer Steigerung der Aktivität von Ras. Bei Forskolin hingegen war dies nicht der Fall. Rap1 dagegen war durch Forskolin in den MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen stimulierbar. In Pankreaskarzinomzellen führte cAMP also zu einer Aktivierung von endogenem Rap1, jedoch nicht von Ras. Ein Einfluß von Ras auf die Rap1 Aktivität ist somit unwahrscheinlich.

4.4 Erhöhung der Rap1-Aktivität durch Epac

In unseren Experimenten zeigte sich daß Epac in den Pankreaskarzinomzelllinien überexprimiert wird. Epac, ein Rap1-Aktivator, ist in mehreren Zelltypen exprimiert (de Rooij et al. 1998). Durch die Entdeckung von Epac konnte das Wissen über cAMP-vermittelte Signalwege erweitert werden. Andere PKA-unabhängige Signalwege werden damit möglich. Epac besitzt ebenfalls eine cAMP-bindende Domäne, die homolog zu der R-Untereinheit von PKA ist. Ebenso verfügt sie über eine GEF-Domain (de Rooij et al. 1998; Kawasaki et al. 1998a). Durch die Bindung von cAMP aktiviert Epac Rap1. Rap1 wird neben cAMP auch durch eine Vielzahl anderer Stimulatoren aktiviert (Altschuler et al. 1995; Vossler et al. 1997; Bos et al. 2001). Komplizierend ist, daß PKA ebenfalls Rap1 über eine Phosphorylierung an

seinem C-terminalen Ende aktivieren kann (Vossler et al. 1997). Fehlt diese, läßt sich Rap1 aber immer noch über cAMP stimulieren (de Rooij et al. 1998).

4.5 Inhibition des Zellwachstums durch 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP

Um die Auswirkungen von 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP auf das Zellwachstum näher zu untersuchen, inkubierten wir die Pankreaskarzinomzelllinien in einer Dosierung, welche zu einer ausreichend nachweisbaren Aktivierung von Rap1 führte. Unter Verwendung von 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP kam es zu einer etwas geringeren Hemmung des Wachstums als unter der Stimulation mit herkömmlichem, nicht Epac-spezifischem cAMP. Ob diese leicht verminderte Hemmung des Wachstums durch die fehlende Aktivierung von PKA bedingt war, läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen nicht sicher bestimmen. Wie oben beschrieben, kann PKA den Raf/MEK/ERK-Signalweg inhibieren und somit zu einer Verringerung des Zellwachstums führen, oder aber es fällt der Rap1-aktivierende Effekt von PKA weg (Dugan et al. 1999; Grewal et al. 2000; Schmitt u. Stork 2000; Vossler et al.1997).
Neben den oben beschriebenen Möglichkeiten, wie Rap1 zu einer Hemmung des Zellwachstums führen kann, muß es auch noch andere, vom ERK-Signalweg unabhängige Regulationsmechanismen geben, über die Rap1 eingreifen kann. Möglich wäre eine Hemmung der PI3-Kinase. Wie oben bereits erwähnt, kommt es im Verbund der PI3-Kinase mit Ras zu einem verstärkten Wachstum. In einem Nebenversuch sahen wir bei einer Stimulation mit Forskolin eine erniedrigte Phosphorylierung von AKT, einem Substrat der PI3-Kinase. Ob dies nun durch Rap1 oder andere Signalproteine, wie z.B. der PKA bedingt ist, läßt sich nicht genau sagen.
Bei einer Stimulation von Rat C6 glioma-Zellen durch cAMP zeigte sich eine Inhibierung des ERK und PI3K/Akt-Signalwegs. Weder PKA noch Epac waren an der cAMP-abhängigen Inaktivierung von ERK und Akt beteiligt (Wang et al. 2001). Dies deutet darauf hin, daß die Wirkung von cAMP Zelltyp-abhängig ist.

4.6 Unterschiede in der ERK-Aktivität in MiaPaCa-2- und Panc-1 Zelllinien bei Gabe von Forskolin und 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP

Wie oben bereits erwähnt, kann es durch die Erhöhung der cAMP-Konzentration zu einer Hemmung des ERK-Signalwegs kommen, wie es sich in unserem Stimulationsversuch mit Forskolin auch gezeigt hat. Bei Gabe von 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP war dies aber nicht zu beobachten.

Der ERK-Signalweg stellt die Endstrecke vieler Proto-Onkogene dar. ERK spielt eine wichtige Rolle bei der Wachstumsfaktor-vermittelten Regulation des Zellwachstums in vielen Zelllinien und Tumoren (Hecquet et al. 2002). Er wird durch die klassischen Wachstumsfaktoren sowie die Rezeptoronkogene aktiviert, wie z.B. Platelet-derived growth factor B (PDGF-B; v-Sis), EGFR/Erb-b1 (v-Erb), Erb-2/Her-2 (v-Neu) und Met (v-Met). Als intrazelluläre Signalüberträger dienen Ras und Raf, welche über weitere Kinasen Fos und Myc als nukleäre Faktoren aktivieren (Lewis et al. 1998; Robinson et al. 1997). Es verwundert nicht, daß dieser Signalweg in 30% aller menschlichen Tumoren aktiv ist (Hoshino et al. 1999). Hauptsächlich daran beteiligt sind Ras-Mutationen, Myc-Amplifikationen sowie EGF und Neu-Rezeptor Überexpressionen. Mutationen im Ras-Gen treten in 90% der Pankreaskarzinome, 50% der Kolonkarzinome, 40% der Lungenkarzinome, 20% der Leukämien und zu einem geringeren Anteil in anderen Tumoren auf. Eine Her-2 Überexpression tritt gewöhnlich bei Mamma- und Kolonkarzinomen auf. Veränderungen im myc-Gen finden sich bei einer ganzen Reihe von Tumoren, vor allem aber in Gliomen und beim Kolonkarzinom (Savelyeva u. Schwab 2001).

Besonders in endokrinen und neuronalen Zellen führt eine Erhöhung cAMPs zur Aktivierung von ERK (Bouschet et al. 2003). Im Gegensatz hierzu führt eine Erhöhung von cAMP in Fibroblasten und Myozyten zu einer Inhibierung der Wachstumsfaktor-vermittelten Aktivierung von ERK (Grbovic et al. 2002; Macchia et al. 2002).

Rap1, früher als Krev-1 (Kirsten-Ras revertant-1) bezeichnet, ist ein Protein, welches aufgrund seiner antagonistischen Wirkung bezüglich Ras in 3T3 Zellen als möglicher Inaktivator des ERK-Signalwegs diskutiert wird. Eine Interaktion von Rap1 mit den beiden Raf-Isoformen cRaf1 und B-Raf, welche die Hauptsubstrate von aktivem Ras darstellen, konnte bereits nachgewiesen werden. Im folgenden sollen nochmal mögliche Ansatzpunkte für eine Inhibierung des ERK-Signalwegs dargestellt werden:

1. cAMP-aktiviertes PKA phosphoryliert Rap1, welches nun durch Bindung von GTP aktiviert wird. Dies führt zu einem Antagonismus mit Ras an der RBD von Raf1.

Insgesamt kommt es zu einer verminderten Aktivierung von Raf1 durch Ras (Schmitt u. Stork 2001; Vossler et al. 1997).

2. Eine direkte Phosphorylierung von Raf-1 durch PKA verhindert eine Interaktion mit Ras sowie die Aktivierung von Raf-1 (Wu et al. 1993; Mischak et al. 1996; Hafner et al. 1994; Dumaz et al. 2002; Dhillon et al. 2002).
3. cAMP inhibiert ERK über eine Inaktivierung von B-Raf (Qiu et al. 2000).

In anderen Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, daß cAMP auch zu einer ERK-Aktivierung führen kann. Dies geschieht paradoxerweise durch die Aktivierung von Rap1 über cAMP, welches wiederum B-Raf aktiviert. Folge ist eine ERK-Aktivierung (Vossler et al. 1997; Seidel et al. 1999).

In unseren Stimulationsversuchen mit Forskolin kam es zu einer Inaktivierung von ERK. Ob diese durch Rap1 vermittelt wurde, versuchten wir durch die Gabe von 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP herauszufinden, welches Epac spezifisch stimuliert. In unseren Experimenten zeigte sich jedoch, daß es durch die Aktivierung von Rap1 zu keiner Abnahme der ERK-Aktivität kam. Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen von Enserink (Enserink et al. 2002). In seinen Experimenten kam es ebenfalls bei einer Stimulation mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP in NIH-3T3-A14-Zellen zu keiner Inhibition der ERK-Aktivität. Enserink spricht sich für eine PKA-vermittelte Inaktivierung von ERK aus.

Wie bereits erwähnt kommt es in Rat C6 glioma Zellen durch cAMP zu einer Inhibierung des ERK und PI3K/Akt-Signalwegs. Weder PKA noch Epac waren aber an der cAMP-abhängigen Inaktivierung von ERK und Akt beteiligt (Wang et al. 2001).

In einigen Zelllinien kommt es, wie oben bereits erwähnt, durch Rap1 zu einer ERK-Inaktivierung. Ein möglicher Erklärungsversuch für die unterschiedlichen Ergebnisse ergibt sich durch Betrachtung der Bindungsdomänen für Rap1 an Raf-1. Möglicherweise kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen den aktivierenden und hemmenden Kräften von Rap1.

Raf-1 besitzt an seinem N-terminalen Ende zwei Domänen: die Ras-binding domain (RBD; amino acids 55-131) und die Cystein-rich domain (CRD; amino acids 139-184) (Brtva et al. 1995; Hu et al. 1995). Die RBD ist unter anderem notwendig für die Translokation von Raf-1 aus dem Zytosol zur Zellmembran. Die CRD wird für eine effiziente Aktivierung von Raf-1 benötigt (Hu et al. 1997; Luo et al. 1997; Roy et al. 1997). Punktmutationen in der CRD beeinflußen die Affinität der Bindung zu Ras, haben Einfluß auf die Basalaktivität wie auch auf die Ras-induzierte Aktivierung von Raf-1 (Winkler et al. 1997; Daub et al. 1998). Gegensätzlich zu den Ergebnissen unserer Experimente wird ein Mechansimus diskutiert, bei

dem es bei einer Überexpression von Rap1 zu einer Hemmung der Eas-bedingten Raf-1-Aktivierung kommt. Rap1 soll durch die Bindung an die Raf-1-CRD Ras von seiner Bindungsstelle verdrängen. Bei einer Kostimulation von Ras und Rap1 konnte gezeigt werden, daß Raf-1 in einem inaktiven Zustand verharrt (Hu et al. 1997). B-Raf hingegen ist durch Rap1 aktivierbar. Es besitzt ebenso eine CRD, welche eine geringere Bindungsaffinität aufweist. Wenn man nun die Raf-1-CRD durch die B-Raf-CRD ersetzt, stimuliert Rap1 plötzlich Raf-1. Die Raf-1-CRD führt bei B-Raf unter Stimulation mit Rap1 zu keiner nennenswerten Steigerung der B-Raf-Aktivität (Okada et al. 1999).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in unseren Versuchen gezeigte Hemmung des Zellwachstums durch 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP möglicherweise von ERK unabhängig ist. Die in der Literatur beschriebene Hemmung von ERK durch cAMP konnte nur bei einer Stimulation mit Forskolin beobachtet werden. Der stärkere wachstumsinhibierende Effekt von Forskolin gründet sich wahrscheinlich auf die zusätzliche Aktivierung der PKA und ihrem hemmenden Effekt auf ERK. Abbildung 22 zeigt nochmal Rap1 und PKA bei ihrer Interaktion mit dem ERK-Signalweg.

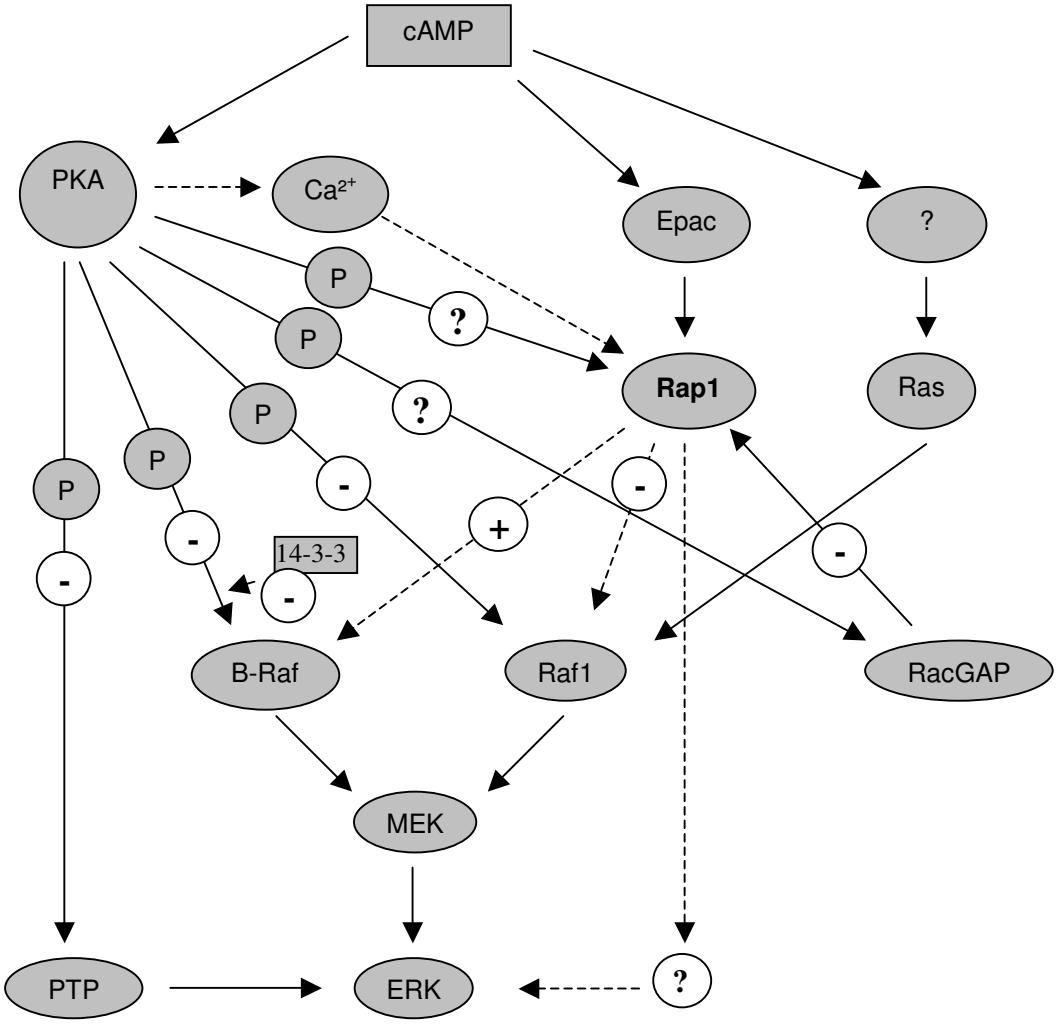


Abb. 22: Die Rolle von Rap1 in cAMP-vermittelten Signalwegen. P: Phosphorylierung, PTP: Protein tyrosine phosphatase, ?: fragliche Interaktion, - : wirkt hemmend, +: wirkt aktivierend, ---: Rap1-vermittelte Signalwege (In Anlehnung an Bos 2001).

4.7 Die Rolle von Rap1: Funktion abhängig vom Zelltyp

Aufgrund der Sequenzhomologie seiner Effektordomäne mit der von Ras diskutierte man es lange als möglichen Ras-Antagonisten, welcher um die gleichen Substrate konkurierte (Bos et al. 2001; Zwartkruis et al. 1999). Es wird nahezu überall im Körper exprimiert. In T-Lymphozyten kommt es bei einer Überexpression von Rap1 zu einer T-Zell-Anergie mit einer verminderten ERK-Aktivität (Boussiotis et al. 1997; Katagiri et al. 2002). Wie für cAMP gilt auch für Rap1 die Zelltyp-abhängige Inhibierung des Raf-MEK-ERK-Signalwegs (Cook et al. 1993 a u. b; Bouschet et al. 2003). Rap1 kann so auch zu einem vermehrten Zellwachstum

führen (Yoshida et al. 1992). Ebenso kann es über B-Raf ERK aktivieren (Ohtsuka et al. 1996). Die genaue Rolle von Rap1 ist noch nicht genau erforscht. In Lymphozyten beeinflußt es unter anderem die Adhäsion an die EZM (Caron et al. 2000; Rangarajan et al. 2003).

Mäuse, denen der Rap1-spezifische Inhibitor Spa-1 fehlt, entwickelten in einem Drittel der Fälle myelodysplatische bzw. myeloproliferative Krankheiten (Ishida et al. 2003). Mögliche Erklärungsversuche sind einmal die durch Rap1 erhöhte Integrinexpression mit verstärktem "outside-in signaling" bei dem mitogene Signale durch die verstärkte Adhäsion induziert werden und die Zelle dadurch besser überleben kann (Ishida et al. 2003; Abraham 2002). Zum anderen wird der durch Rap1 aktivierte B-Raf/MEK/ERK-Signalweg diskutiert (Ishida et al. 2003).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, daß die Wirkung von Rap1 auf das Wachstumsverhalten vom Zelltyp abhängig ist. Ebenso von Bedeutung ist die intrazellulär räumlich verschiedene Aktivierung von Rap1 durch die GEFs (Ohba et al. 2003; Enserink et al. 2002; York et al. 1998). So gibt es Hinweise dafür, daß es nur dann zu einem Antagonismus mit Ras kommt, wenn Rap1 an der Plasmamembran aktiviert wird (Ohba et al. 2003). Analog hierzu vollzieht sich auch die Aktivierung von B-Raf durch Rap1 an den Endosomen der Zelle, die ebenfalls räumlich zueinander in Verbindung stehen (Wu C et al. 2001; Carey et al. 2003). Es bedarf weiterer Studien, die diese Komplexität der intrazellulären Signalverarbeitung weiter offenlegen.

4.8 Schlussfolgerung

Um neue wirksame therapeutische Ansätze beim Pankreaskarzinom entwickeln zu können, ist neben einem sensitiven Screening und Staging auch das Wissen über die molekularen Signalwege von entscheidender Bedeutung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion der kleinen GTPase Rap1. Dabei wurde vor allem klar, daß es neben seiner möglichen Rolle als Ras-Antagonist auch eigene Signalwege aktiviert oder inhibiert. Wie es zu der verminderten Zellproliferation kommt bleibt weiterhin unbeantwortet. Am Beispiel von Rap1 zeigt sich aber, wie komplex und mehrschichtig die intrazelluläre Signalverarbeitung ist, und daß noch viele Anstrengungen unternommen werden müssen, um die Natur dieser molekularen Zusammenhänge weiter aufzuklären und so vielleicht mehr Licht in das noch weitreichend unerforschte Netzwerk Zelle bringen zu können.

5. Zusammenfassung

Die Untersuchung von Signalkaskaden, welche durch cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) aktiviert werden und zu einer Beeinflussung des Zellwachstums in MiaPaCa-2- und Panc-1-Zellen führen, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Dabei sollte vor allem die Rolle der GTPase (Guanosin-Triphosphatase) Rap1 (Ras-related protein) näher untersucht werden. Eine Abgrenzung gegen andere, ebenfalls durch cAMP induzierte Signalwege, erreichten wir durch einen PKA-Inhibitor (Protein Kinase A) bzw. einen spezifischen Rap1-Aktivator.

Es zeigte sich, daß Rap1 für den größten Teil der wachstumsinhibitorischen Wirkung von cAMP in Panc-1-Zellen verantwortlich ist. Bei einer Stimulation mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP, einem spezifischen Epac-Aktivator, kam es bzgl. der Inhibierung des Zellwachstums im Vergleich zu dem unspezifischen cAMP-Analogon Sp-8-Br-cAMPS zu keiner wesentlichen Änderung des Ergebnisses. Epac (Exchange protein directly activated by cyclic AMP), ein Rap1-Aktivator, wird sowohl in MiaPaCa-2- wie auch in Panc-1-Zellen exprimiert. Bei einer Stimulation der Zellen mit Forskolin hat die Verwendung eines PKA-Inhibitors keinen signifikanten Einfluß auf die Zellproliferation.

Ras (Rat sarcoma), welches wir aufgrund seiner Sequenzhomologie zu Rap1 und seiner möglichen Aktivierbarkeit durch cAMP ebenfalls untersuchten, war weder durch Forskolin noch durch 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP oder Sp-8-Br-cAMPS aktivierbar.

Ein Erklärungsversuch für die wachstumsinhibierende Wirkung von Rap1 könnte die Hemmung des ERK-Signalwegs (Extracellular-signal Regulated Kinase) sein. Die unter Forskolin beobachtete Hemmung von ERK trat bei der spezifischen Aktivierung mit 8-pCPT-2`-O-Me-cAMP jedoch nicht auf. Dies läßt darauf schließen, daß die durch Rap1 induzierte Hemmung des Zellwachstums noch andere ERK-unabhängige Signalwege miteinschließt.

Der Epac/Rap1-Signalweg ist ein weiterer wichtiger Baustein für das Verständnis der cAMP-abhängigen Inhibierung des Zellwachstums. Durch neu entwickelte Substanzen, welche ausschließlich Rap1 aktivieren, ist es gelungen, zwischen den verschiedenen cAMP-abhängigen Signalwegen zu differenzieren. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Verbindung zwischen dem second-messenger cAMP und der kleinen GTPase Rap1 auf, welche größtenteils für die Wachstumsinhibierung in den Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1 verantwortlich ist.

Der cAMP/Epac/Rap1-Signalweg könnte die Basis für die Entwicklung neuer Medikamente beim Pankreaskarzinom darstellen.

6. Literaturverzeichnis

Abraham RT: Antigen receptors rap to integrin receptors. Nature Immunology 3: 212-213 (2002)

Altschuler DL, Peterson SN, Ostrowski MC, Lapetina EG: Cyclic AMP-dependent Activation of Rap1b. J Biol Chem 270: 10373-10376 (1995)

Altschuler DL, Ribeiro-Neto F: Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein Rap1b. Proc Natl Acad Sci USA 95: 7475-7479 (1998)

Anneren C, Reedquist KA, Bos JL, Welsh M: GTK, a Src-related tyrosine kinase, induces nerve growth factor-independent neurite outgrowth in PC12 cells through activation of the Rap1 pathway. Relationship to Shb tyrosine phosphorylation and elevated levels of focal adhesion kinase. J Biol Chem 275: 29153-29161 (2000)

Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, Zhang XF: Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. Recent Prog Horm Res 56: 127–155 (2001)

Beranger F, Goud B, Tavitian A, deGunzburg J: Association of the Rasantagonistic Rap1/Krev-1 proteins with the Golgi complex. Proc Natl Acad Sci USA 88: 1606-1610 (1991)

Blomhoff HK, Blomhoff R, Stokke T, deLange Davies C, Brevik K,Smeland EB, Funderud S, Godal T: cAMP-mediated growth inhibition of a B-lymphoid precursor cell line Reh is associated with an early transient delay in G2/M, followed by an accumulation of cells in G1. J Cell Physiol 137: 583–587 (1988)

Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA: Rap1 signalling: Adhering to new models. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2: 369-377 (2001)

Bos JL: All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. EMBO J 17: 6776-6782 (1998)

Bos JL: Ras oncogenes in human cancer - a review. Cancer Res 49: 4682-4689 (1989)

Boucher MJ, Duchesne C, Laine J, Morisset J, Rivard N: cAMP protection of pancreatic cancer cells against apoptosis induced by ERK inhibition. Biochem Biophys Res Commun 285: 207-216 (2001)

Bouschet T, Perez V, Fernandez C, Bockaert J, Eychene A, Journot L: Stimulation of the ERK pathway by GTP-loaded Rap1 requires the concomitant activation of Ras, protein kinase C, and protein kinase A in neuronal cells. J Biol Chem 278: 4778-4785 (2003)

Boussiotis VA, Freeman GJ, Berezovskaya A, Barber DL, Nadler LM: Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. Science 278: 124–128 (1997)

Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S, Terrell RS, Campbell Burk S, Bell RM, Der CJ: Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. J Biol Chem 270: 9809-9812 (1995)

Budillon A, Di Gennaro E, Caraglia M, Barbarulo D, Abbruzzese A, Tagliaferri P: 8-Cl-cAMP antagonizes mitogen-activated protein kinase activation and cell growth stimulation induced by epidermal growth factor. Br J Cancer 81: 1134-1141 (1999)

Burgering BM, Pronk GJ, van Weeren PC, Chardin P, Bos JL: cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. EMBO 12: 4211–4220 (1993)

Burris H, Storniolo AM: Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. Eur J Cancer 33: 18-22 (1997)

Busca R, Abbe P, Mantoux F, Aberdam E, Peyssonnaux C, Eychene A, Ortonne JP, Ballotti R: Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. EMBO J 19: 2900-2910 (2000)

Caffrey DR, O'Neill LA, Shields DC: The evolution of the MAP Kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. J Mol Evol 49: 567-582 (1999)

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ: Increasing complexity of ras signaling. Oncogene 17: 1395-1413 (1998)

Caraglia M, Di Gennaro E, Barbarulo D, Marra M, Tagliaferri P, Abbruzzese A, Budillon A: Upregulated EGF receptors undergo to rapid internalization and ubiquitindependent degradation in human cancer cells exposed to 8-Cl-cAMP. FEBS Lett 447: 203-208 (1999)

Carey KD, Watson RT, Pessin JE, Stork PJ: The requirement of specific membrane domains for Raf-1 phosphorylation and activation. J Biol Chem 278: 3158-3196 (2003)

Caron E, Self AJ, Hall A: The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin alphaMbeta2 by LPS and other inflammatory mediators. Curr Biol 10: 974-978 (2000)

Chuang E, Barnard D, Hettich L, Zhang XF, Avruch J, Marshall MS: Critical binding and regulatory interactions between Rasand Raf occur through a small, stable N-terminal domain of Raf and specific Ras effector residues. Mol Cell Biol 14: 5318–5325 (1994)

Ciullo I, Diez-Roux G, Di Domenico M, Migliaccio A, Avvedimento EV: cAMP signaling selectively influences Ras effectors pathways. Oncogene 20: 1186-1192 (2001)

Cook SJ, Rubinfeld B, Albert I, McCormick F: Rap1 V12 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF-1 in Rat-1 fibroblasts. EMBO J 12: 3475-3485 (1993)

Cook SJ, McCormick F: Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. Science 262: 1069–1072 (1993)

Cox AD, Hisaka MM, Buss JE, Der CJ: Specific isoprenoid modification is required for function of normal, but not oncogenic, Ras protein. Mol Cell Biol 12: 2606-2615 (1992)

Cullen PJ, Hsuan JJ, Truong O, Letcher AJ, Jackson TR, Dawson AP, Irvine RF: Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P4-binding protein as a member of the GAP1 family. Nature 376: 527-530 (1995)

Daub M, Jockel J, Quack T, Weber CK, Schmitz F, Rapp UR, Wittinghofer A, Block C: The RafC1 cysteine-rich domain contains multiple distinct regulatory epitopes which control ras-dependent raf activation. Mol Cell Biol 18: 6698-6710 (1998)

David M, Petricoin E, Larner AC: Activation of protein kinase A inhibits interferon induction of the Jak/Stat pathway in U266 cells. J Biol Chem 271: 4585–4588 (1996)

DeBernardi MA, Brooker G: Single cell Ca2+/cAMP cross-talk monitored by simultaneous Ca2+/cAMP fluorescence ratio imaging. Proc Natl Acad Sci USA 93: 4577–4582 (1996)

Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu I-H, Han J, Ulevitch J, Davis RJ: Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. Science 267: 682-685 (1995)

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL: Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. Nature 396: 474–477 (1998)

de Rooij J, Boenink NM, vanTriest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL: PDZ-GEF, a Guanine Nucleotide Exchange Factor Specific for Rap1 and Rap2. J Biol Chem 274: 38125-38130 (1999)

Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W: Cyclic AMP-Dependent Kinase Regulates Raf-1 Kinase Mainly by Phosphorylation of Serine 259. Mol Cell Biol 22: 3237–3246 (2002)

Downward J: Ras signalling and apoptosis. Curr Opin Gen Dev 8: 49-54 (1998)

Dugan LL, Kim JS, Zhang Y, Bart RD, Sun Y, Holtzman DM, Gutmann DH: Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. J Biol Chem 274: 25842–25848 (1999)

Dumaz N, Light Y, Marais R: Cyclic AMP Blocks Cell Growth through Raf-1-Dependent and Raf-1-Independent Mechanisms. Mol Cell Biol 22: 3717-3728 (2002)

Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP: The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. Trends Biochem Sci 14: 67–71 (1989)

Ebinu J, Bottorff D, Chan EY, Stang SL, Dunn RJ, Stone JC: RasGRP, a Ras Guanyl Nucleotide-Releasing Protein with Calcium- and Diacylglycerol-Binding Motifs. Science 280: 1082-1086 (1998)

Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL: A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. Nat Cell Biol 4: 901-906 (2002)

Feig LA, Cooper GM: Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. Mol Cell Biol 8: 3235-3243 (1988)

Franke B, Akkerman JW, Bos JL: Rapid Ca2+-mediated activation of Rap1 in human platelets. EMBO J 16: 252-259 (1997)

Frodin M, Peraldi P, Van Obberghen E: Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. J Biol Chem 269: 6207–6217 (1994)

Fujita T, Meguro T, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M: New signaling pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. Checkpoint of modulation by cyclic AMP. J Biol Chem 277: 22191-22200 (2002)

Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, Wazer DE, Band V: The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. Mol Cell Biol 19: 733-744 (1999)

Genieser HG, Døskeland SO, Blank JL, Bos JL: A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. Nature Cell Biol 4: 901-906 (2002)

Gotoh T, Hattori S, Nakamura S, Kitayama H, Noda M, Takai Y, Kaibuchi K, Matsui H, Hatase O, Takahashi H, Kurata T, Matsuda M: Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. Mol Cell Biol 15: 6746-6753 (1995)

Graves LM, Bornfeldt KE, Raines EW, Potts BC, Macdonald SG, Ross R, Krebs EG: Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10300–10304 (1993)

Grbovic O, Jovic V, Ruzdijic S, Pejanovic V, Rakic L, Kanazir S: 8-Cl-cAMP affects glioma cell-cycle kinetics and selectively induces apoptosis. Cancer Invest 20: 972-982 (2002)

Grewal SS, Fass DM, Yao H, Ellig CL, Goodman RH, Stork PJS: Calcium and cAMP Signals Differentially Regulate cAMP-responsive Element-binding Protein Function via a Rap1-Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. J Biol Chem 275: 34433–34441 (2000)

Grieco D, Porcellini A, Avvedimento EV, Gottesman ME: Requirement for cAMP-PKA pathway activation by M phase-promoting factor in the transition from mitosis to interphase. Science 271: 1718–1723 (1996)

Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ: Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. Science 267: 389-393 (1995)

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

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ: A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science 265: 808-811 (1994)

Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell 100: 57-70 (2000)

Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F: cAMP inhibits the proliferation of retinal pigmented epithelial cells through the inhibition of ERK1/2 in a PKA-independent manner. Oncogene 21: 6101-6112 (2002)

Herrmann C, Horn G, Spaargaren M, Wittinghofer A: Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. J Biol Chem 271: 6794-6800 (1996)

Hollenberg MD, Cuatrecasas P: Epidermal growth factor: receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. Proc Natl Acad Sci USA 70: 2964–2968 (1973)

Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M: Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. Oncogene 18: 813-822 (1999)

Houslay MD, Kolch W: Cell-type specific integration of crosstalk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. Mol Pharmacol 58: 659–668 (2000)

Hu CD, Kariya K, Kotani G, Shirouzu M, Yokoyama S, Kataoka T: Coassociation of Rap1A and Ha-Ras with Raf-1 N-terminal region interferes with Rasdependent activation of Raf-1. J Biol Chem 272: 11702-11705 (1997)

Hu CD, Kariya K, Tamada M, Akasaka K, Shirouzu M, Yokoyama S, Kataoka T: Cysteine-rich region of Raf-1 interacts with activator domain of post-translationally modified Ha-Ras. J Biol Chem 270: 30274-30277 (1995)

Hunter T: Oncoprotein networks. Cell 88: 333-346 (1997)

Hunter T: Signaling—2000 and Beyond. Cell 100: 113–127 (2000)

Ishida D, Kometani K, Yang H, Kakugawa K, Masuda K, Iwai K, Suzuki M, Itohara S, Nakahata T, Hiai H, Kawamoto H, Hattori M, Minato N: Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated Rap1 activation in SPA-1-deficient mice. Cancer Cell 4: 55-65 (2003)

Karin M, Smeal T: Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. TIBS 17: 418-422 (1992)

Katagiri K, Hattori M, Minato N, Kinashi T: Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. Mol Cell Biol 22: 1001-1015 (2002)

Kawasaki (a) H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM: A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1. Science 282: 2275-2279 (1998)

Kawasaki (b) H, Springett GM, Toki S, Canales JJ, Harlan P, Blumenstiel JP, Chen EJ, Bany IA, Mochizuki N, Ashbacher A, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM: A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. Proc Natl Acad Sci USA 95: 13278-13283 (1998)

Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M: A ras-related gene with transformation supressor activity. Cell 56: 77-84 (1989)

Kolch W: Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J 351: 289-305 (2000)

Kurachi H, Wada Y, Tsukamoto N, Maeda M, Kubota H, Hattori M, Iwai K, Minato N: Human SPA-1 gene product selectively expressed in lymphoid tissues is a specific GTPase-

activating protein for Rap1 and Rap2 - Segregate expression profiles from a rap1GAP gene product. J Biol Chem 272: 28081-28088 (1997)

Lacabaratz-Porret C, Corvazier E, Kovacs T, Bobe R, Bredoux R, Launay S, Papp B, Enouf J: Platelet sarco/endoplasmatic reticulum Ca2+ATPase isoform 3b and Rap1b: interrelation and regulation in physiopathology. Biochem J 332: 173-181 (1998)

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin 48: 6-29 (1999)

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG: Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res 74: 49-139 (1998)

Liao Y, Kariya K, Hu CD, Shibatohge M, Goshima M, Okada T, Watari Y, Gao X, Jin TG, Yamawaki Kataoka Y, Kataoka T: RA-GEF, a novel Rap1A guanine nucleotide exchange factor containing a Ras/Rap1A-associating domain, is conserved between nematode and humans. J Biol Chem 274: 37815-20 (1999)

Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL: Pancreatic cancer. Lancet 363: 1049-1057 (2004)

Linnemann T, Geyer M, Jaitner BK, Block C, Kalbitzer HR, Wittinghofer A, Herrmann C: Thermodynamic and kinetic characterization of the interaction between the Ras binding domain of AF6 and members of the Ras subfamily. J Biol Chem 274: 13556-13562 (1999)

Lu L, Anneren C, Reedquist KA, Bos JL, Welsh M: NGF-dependent neurite outgrowth in PC12 cells overexpressing the Src homology 2-domain protein shb requires activation of the Rap1 pathway. Exp Cell Res 259: 370-377 (2000)

Luo Z, Diaz B, Marshall MS, Avruch J: An intact Raf zinc Finger is required for optimal binding to processed Ras and for Ras-dependent Raf activation in situ. Mol Cell Biol 17: 46-53 (1997)

Macchia V, Gargiulo M, Terracciano D, Di Carlo A, Mariano A: Cyclic AMP-dependent secretion of Ca 19-9 by LS174T human colon carcinoma cells. Oncol Rep 9: 387-391 (2002)

Mahloogi H, Gonzalez-Guerrico AM, Lopez De Cicco R, Bassi DE, Goodrow T, Braunewell KH, Klein-Szanto AJ: Overexpression of the calcium sensor visinin-like protein-1 leads to a cAMP-mediated decrease of in vivo and in vitro growth and invasiveness of squamous cell carcinoma cells. Cancer Res 63: 4997-5004 (2003)

Maltese WA: Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian-cells. FASEB Journal 4: 3319-3328 (1990)

Maridonneau-Parini I, deGunzburg J: Association of Rap1 and Rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils - Translocation to the plasma membrane during cell activation. J Biol Chem 267: 6396-6402 (1992)

Mark MD, Storm DR: Coupling of epidermal growth factor (EGF) with the antiproliferative activity of cAMP induces neuronal differentiation. J Biol Chem 272: 17238–17244 (1997)

Marshall C: How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? Curr Opin Cell Biol 11: 732-736 (1999)

McLeod SJ, Ingham RJ, Bos JL, Kurosaki T, Gold MR: Activation of the Rap1 GTPase by the B cell antigen receptor. J Biol Chem 273: 29218-29223 (1998)

McMahon M, Woods D: Regulation of the p53 pathway by Ras, the plot thickens. Biochim Biophys Acta 2: 63-71 (2001)

Mei FC, Qiao J, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Quilliam LA, Cheng X: Differential Signaling of Cyclic AMP. J Biol Chem 277: 11497- 11504 (2002)

Michaud NR, Fabian JR, Mathes KD, Morrison DK: 14-3-3 is not essential for Raf-1 function: identification of Raf-1 proteins that are biologically activated in a 14-3-3- and Ras-independent manner. Mol Cell Biol 15: 3390–3397 (1995)

Mischak H, Seitz T, Janosch P, Eulitz M, Steen H, Schellerer M, Philipp A, Kolch W: Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. Mol Cell Biol 16: 5409–5418 (1996)

Mochizuki N, Ohba Y, Kiyokawa E, Kurata T, Murakami T, Ozaki T, Kitabatake A, Nagashima K, Matsuda M: Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). Nature 400: 891-894 (1999)

Morrison DK, Heidecker G, Rapp UR, Copeland TD: Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. J Biol Chem 268: 17309–17316 (1993)

Nilsson J, Olsson AG: Prostaglandin E1 inhibits DNA synthesis in arterial smooth muscle cells stimulated with platelet-derived growth factor. Atherosclerosis 53: 77–82 (1984)

Ohba Y, Kurokawa K, Matsuda M: Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. EMBO J 22: 859-869 (2003)

Ohtsuka T, Shimizu K, Yamamori B, Kuroda S, Takai Y: Activation of brain B-Raf protein kinase by Rap1B small GTP- binding protein. J Biol Chem 271: 1258-1261 (1996)

Ohtsuka T, Hata Y, Ide N, Yasuda T, Inoue E, Inoue T, Mizoguchi A, Takai Y: nRap GEP: a novel neural GDP/GTP exchange protein for rap1 small G protein that interacts with synaptic scaffolding molecule (S-SCAM). Biochem Biophys Res Commun 265: 38-44 (1999)

Okada T, Hu CD, Jin TG, Kariya K, Yamawaki-Kataoka Y, Kataoka T: The strength of interaction at the Raf cysteine-rich domain is a critical determinant of response of Raf to Ras family small GTPases. Mol Cell Biol 19: 6057-6064 (1999)

Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S: cAMPGEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. Nature Cell Biology 2: 805-811 (2000)

Pizon V, Chardin P, Lerosey I, Olofsson B, Tavitian A: Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. Oncogene 3: 201-204 (1988)

Pizon V, Desjardins M, Bucci C, Parton RG, Zerial M: Association of Rap1A and Rap1B proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2A with the Golgi complex. J Cell Sci 107: 1661-1670 (1994)

Polakis PG, Rubinfeld B, Evans T, McCormick F: Purification of a plasma membrane-associated GTPase-activating protein specific for Rap1/Krev-1 from HL60 cells. Proc Natl Acad Sci USA 88: 239-243 (1991)

Qiu W, Zhuang S, von Lintig FC, Boss GR, Pilz RB: Cell type-specific regulation of B-Raf kinase by cAMP and 14-3-3 proteins. J Biol Chem 275: 31921–31929 (2000)

Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis AJ, Linner JG: Subcellular distribution of the Rap1A protein in human neutrophils - colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. Blood 79: 1563-1573 (1992)

Ramstad C, Sundvold V, Johansen HK, Lea T: cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway. Cell Signal 12: 557–563 (2000)

Rangarajan S, Enserink JM, Kuiperij HB, de Rooij J, Price LS, Schwede F, Bos JL: Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. J Cell Biol 160: 487-493 (2003)

Ravi RK, Weber E, McMahon M, Williams JR, Baylin S, Mal A, Harter ML, Dillehay LE, Claudio PP, Giordano A, Nelkin BD, Mabry M: Activated Raf-1 causes growth arrest in human small cell lung cancer cells. J Clin Invest 101: 153-159 (1998)

Rebhun JF, Castro AF, Quilliam LA: Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MRGEF by M-Ras-GTP interaction. J Biol Chem 275: 34901-34908 (2000)

Robinson MJ, Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr Opin Cell Biol 9: 180-186 (1997)

Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J: Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. Cell 89: 457-67 (1997)

Rogue PJ, Humbert JP, Meyer A, Freyermuth S, Krady MM, Malviya AN: cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca2+-ATPase. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9178–9183 (1998)

Roper E, Weinberg W, Watt FM, Land H: p19ARF-independent induction of p53 and cell cycle arrest by Raf in murine keratinocytes. EMBO J 2: 145-150 (2001)

Rosenberg L, Lipsett M: Biotherapeutic approaches to pancreatic cancer. Expert Opin Biol Ther 3: 319-337 (2003)

Rothenberg ML, Moore MJ, Cripps MC, Andersen JS, Portenoy RK, Burris HA 3rd, Green MR, Tarassoff PG, Brown TD, Casper ES, Storniolo AM, Von Hoff DD: A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. Ann Oncol 7: 347-353 (1996)

Roy S, Lane A, Yan J, McPherson R, Hancock JF: Activity of plasma membrane-recruited Raf-1 is regulated by Ras via the Raf zinc finger. J Biol Chem 272: 20139-20145 (1997)

Savelyeva L, Schwab M: Amplification of oncogenes revisited: from expression profiling to clinical application. Cancer Lett 167: 115-123 (2001)

Schmitt JM, Stork PJ: b2-Adrenergic Receptor Activates Extracellular Signal-regulated Kinases (ERKs) via the Small G Protein Rap1 and the Serine/Threonine Kinase B-Raf. J Biol Chem 275: 25342-25350 (2000)

Schmitt, JM, Stork PJ: Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. Mol Cell Biol 21: 3671–3683 (2001)

Schmitt JM, Stork PJ: PKA Phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. Mol Cell 9: 85-94 (2002)

Schwede F, Maronde E, Genieser H, Jastorff B: Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. Pharmacol Ther 87: 199-226 (2000)

Seidel MG, Klinger M, Freissmuth M, Holler C: Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. J Biol Chem 274: 25833–25841 (1999)

Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golemis EA: Association of Krev-1/rapla with Krit1, a novel ankyrin repeat- containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. Oncogene 15: 1043-1049 (1997)

Seufferlein T, Adler G: Gastrointestinal cancer: towards a tailored tumour therapy. Scand J Gastroenterol Suppl 237: 22-25 (2003)

Sevetson BR, Kong X, Lawrence JC: Increasing cAMP attenutes activation of mitogen activated protein kinase. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10305-10309 (1993)

Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ: Understanding ras: 'it ain't over 'til it's over'. Trends Cell Biol 10: 147-154 (2000)

Sidovar MF, Kozlowski P, Lee JW, Collins MA, He Y, Graves LM: Phosphorylation of Serine 43 is not required for inhibition of c-Raf kinse by the cAMP dependent protein kinase. J Biol Chem 275: 28688-28694 (2000)

Smith CL, Hager GL: Transcriptional regualtion of mammalian genes in vivo. J Biol Chem 272: 27493-27496 (1997)

Tsygankova OM, Kupperman E, Wen W, Meinkoth JL: Cyclic AMP activates Ras. Oncogene 19: 3609-3615 (2000)

Tzivion G, Luo Z, Avruch J: A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. Nature 394: 88–92 (1998)

Vojtek AB, Der CJ: Increasing Complexity of the Ras Signaling Pathway. J Biol Chem 273: 19925-19928 (1998)

Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ: cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. Cell 89: 73-82 (1997)

Wang L, Liu F, Adamo ML: Cyclic AMP Inhibits Extracellular Signal-regulated Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathways by Inhibiting Rap1. J Biol Chem 276: 37242-37249 (2001)

Wienecke R, Konig A, DeClue JE: Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity. J Biol Chem 270: 16409-16414 (1995)

Winkler DG, Cutler RE Jr, Drugan JK, Campbell S, Morrison DK, Cooper JA: Identification of residues in the cysteine-rich domain of Raf-1 that control Ras binding and Raf-1 activity. J Biol Chem 273: 21578-21584 (1998)

Wolthuis RM, Bos JL: Ras caught in another affair: the exchange factors for Ral. Curr Opin Genet Dev 9: 112-117 (1999)

Wu C, Lai CF, Mobley WC: Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. J Neurosci 21: 5406-5416 (2001)

Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW: Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. Science 262: 1065–1069 (1993)

Yamashita S, Mochizuki N, Ohba Y, Tobiume M, Okada Y, Sawa H, Nagashima K, Matsuda M: CalDAG-GEFIII Activation of Ras, RRas, and Rap1. J Biol Chem 275: 25488-25493 (2000)

York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ: Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. Nature 392: 622-626. (1998)

Yoshida Y, Kawata M, Miura Y, Musha T, Sasaki T, Kikuchi A, Takai Y: Microinjection of smg/rap1/Krev-1 p21 into Swiss 3T3 cells induces DNA synthesis and morphological changes. Mol Cell Biol 12: 3407-3414 (1992)

Zachary I, Masters SB, Bourne HR: Increased mitigenic responsiveness of Swiss 3T3 cells expressing constitutively active Gsa. Biochem Biophys Res Commun 168: 1184-1193 (1990)

Zanassi P, Paolillo M, Feliciello A, Avvedimento EV, Gallo V, Schinelli S: Cyclic AMP-dependent protein kinase induces CREB phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. J Biol Chem 276: 11487-11495 (2001)

Zimmermann S, Moelling K: Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science 286: 1741–1744 (1999)

Zwartkruis FJ, Bos JL: Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function. Exp Cell Res 253: 157-165 (1999)

Zwartkruis FJ, Wolthuis RM, Nabben NM, Franke B, Bos JL: Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. EMBO J 17: 5905-5912 (1998)

7. Danksagung

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. Weber und Herrn Prof. Dr. Schmid für die gute Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere gilt mein Dank:

PD. Dr. Christoph Weber für die Überlassung des Themas der vorgelegten Arbeit, den vielen Diskussionen und Ratschlägen bei der Versuchsplanung. Seine unermüdliche Geduld und Hilfsbereitschaft verdienen höchste Anerkennung.

Prof. Dr. Guido Adler für die Bereitstellung eines sehr gut ausgestatteten Labors in der Abteilung Innere Medizin I.

Beate Knobel für ihre vielen Hilfestellungen, welche mir sowohl bei der Einarbeitung in die biochemischen Methoden wie auch bei der späteren Planung und Ausführung der Experimente sehr geholfen haben.

Alexander Fingerle, Dorothee Baur und Tamara Mihailovic für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen Diskussionen.

Joseph R. Slupsky, Prof. J. Bos und Prof. T. Gress für die Bereitstellung von Plasmiden und anderen biochemischen Materialien.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, welche mir nicht nur beim Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit sehr hilfreich zur Seite stand.

8. Lebenslauf

Name:	Richard Lorenz
Geburtsdatum/-ort:	20.10.1975, Ulm
Anschrift:	Siedlungsstr.1
	89275 Elchingen
Familienstand:	ledig
Schulausbildung:	Grundschule in Elchingen 1982 - 1986
	Volksschule in Elchingen 1986 - 1987
	Bertha - von - Suttner - Gymnasium, Pfuhl 1987 - 1996
Zivildienst:	Kinderklinik des Universitätsklinikums Ulm 1996 - 1997
Studium:	Medizinstudium an der Universität Ulm seit 1997
	Ärztliche Vorprüfung 1999
	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2000
	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2003
	Dritter Abschnitt der Ärtzlichen Prüfung 2004