Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
der Heinrich-Heine-Universität
Geschäftsführender Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Stahl

Modulation Gap Junction vermittelter Zell-Zell-Kommunikation durch Selen

Rolle in der Tumor-Stroma-Interaktion

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Bernhard Wendlandt

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt

mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ. -Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan: Univ. -Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Brenneisen

Koferent: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Modulation Gap Junction vermittelter Zell-Zell-Kommunikation durch Selen Rolle in der Tumor-Stroma-Interaktion

Abstract

Das Spurenelement Selen sowie andere Mikronährstoffe haben mittlerweile aufgrund der prognostisch günstigen Auswirkungen einen Platz in Therapiekonzepten gegen Tumorerkrankungen gefunden. Im Kontext der Tumorprogression und der Tumor-Stroma-Interaktion liefern epidemiologische Studien Anhaltspunkte für eine Wirksamkeit dieser Therapiekonzepte, ohne dass die molekularen Mechanismen der Tumorprogression und der Wirkung der Mikronährstoffe vollständig geklärt wurden.

Tumorzellen weisen aufgrund verschiedener dysplastischer Mutationen eine genetische Heterogenität auf, so dass die Möglichkeit der Therapieresistenz besteht. Vorherige Untersuchungen konnten zeigen, dass die Interaktionen zwischen Tumorzellen und den umliegenden stromalen Zellen hinsichtlich der Progression des Tumors eine entscheidende Rolle spielen. In verschiedenen *in vitro* Zellmodellen konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen Botenstoffe in ihr Nährmedium (konditioniertes Medium) sezernieren, die parakrin auf stromale Zellen wirken. Stromale Zellen haben den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu Tumorzellen genomische Stabilität aufweisen, so dass der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Behandlung stromaler Zellen als Therapieansatz zur Verhinderung der Tumorprogression liegt.

In der vorliegenden Studie konnte in einem *in vitro* Modell gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Form von Lipidhydroperoxiden in stromalen Fibroblasten provoziert wird und dies die homologe Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) über *gap junctions* von stromalen Fibroblasten vermindert. In dem Prozess der Verminderung der ZZK von Fibroblasten durch konditioniertes Medium von Tumorzellen ist neben den ROS und speziell den Lipidhydroperoxiden auch die NAD(P)H-Oxidase und die Phospholipase A2 involviert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem Spurenelement Selen durch Stimulation der Glutathionperoxidase cGPx und phGpx die ZZK-vermindernden Effekte von konditioniertem Medium von Tumorzellen auf Fibroblasten aufhebt.

Dieses neue Konzept der stromalen Therapie, die den Schutz stromaler Zellen vor dem Einfluss von Tumorzellen durch den Einsatz von Antioxidantien und Mikronährstoffen beinhaltet, könnte einen weiteren Schritt für die Chemoprävention gegen Tumorinvasion darstellen.

1. Einleitung und Fragestellung 1
1.1 Einleitung 1
1.1.1.1. Selen – allgemeine Aspekte 1
1.1.1.2. Bildung von Selenoproteinen 2
1.1.1.3. Epidemiologische Auswirkungen von Selenüberschuss und -mangel 4
1.1.2.1 Glutathionperoxidasen 6
1.1.2.2 Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen 8
1.1.3 Oxidativer Stress und Antioxidantien 8
1.1.4 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut 11
1.1.5 Das Plattenepithelkarzinom 13
1.1.6 *Gap Junctions* und Zell-Zell-Kommunikation 15
1.1.7.1 Tumorprogression und Tumor-Stroma-Interaktion 16
1.1.7.2 Tumorinvasion und direkte Zell-Zell-Kommunikation 19
1.2 Fragestellung 20
2. Material und Methoden 21
2.1 Versuchsmaterialien 21
2.2 Puffer und Lösungen 22
2.3 Enzyme und Primer (PCR) 23
2.4 Verbrauchsmaterialien 24
2.5 Geräte 24
2.6 Software 25
2.7 Charakteristika der verwendeten Zelllinien 25
2.8 Isolation von Fibroblasten aus Biopsien 26
2.9 Stammhaltung und Anzucht der Zellen 26
2.10 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen 27
2.11 Herstellung von konditioniertem Medium 28
2.12 Mykoplasmentest 28
2.13 Vitalitätsbestimmung von Zellen – MTT-Test 29
2.14 Proteinbestimmung 30
2.15 Allgemeine Versuchsbedingungen 30
2.16 Kommunikationsassay (Mikroinjektion) 31
2.17 Nachweis von Glutathion 32
2.18 Herstellung von Phosphatidylcholinhydroperoxid 35
2.19 Aktivitätsmessung der zytosolischen und membranständigen Glutathionperoxidase 35
2.20 Lipidperoxidationsassay 37
3. Ergebnisse 39
3.1 Selen regeneriert die homologe Zell-Zellkommunikation von Fibroblasten 40
3.2 Lipidhydroperoxide vermindern die homologe ZZK von Fibroblasten 44
3.3 Konditioniertes Medium von Tumorzellen erzeugt in Fibroblasten Lipidhydroperoxide 47
3.4 Die NAD(P)H-Oxidase als Quelle der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies 48
3.5 Einfluss der Phospholipase A_2 auf die Verminderung der ZZK 49
3.6 Die Wirkung von Selen auf die ZZK ist glutathionabhängig 51
3.7 Expression der cGPx und phGPx in Hautfibroblasten 55
3.8 Die Aktivität der cGPx und phGPx steigt zeitabhängig nach Seleninkubation an 57
3.9 Glutathionperoxidasen vermitteln die ZZK-regenerierende Wirkung von Selen 58
4. Diskussion 60
4.1 Konditioniertes Medium von Tumorzellen erzeugt Lipidhydroperoxide in Fibroblasten 62

4.2 Die Verminderung der homologen Zell-Zell-Kommunikation von Fibroblasten entsteht durch Lipidhydroperoxide 63
4.3 Die Verminderung der ZZK durch das konditionierte Medium von Tumorzellen wird durch die Enzyme Phospholipase A_2 und NAD(P)H-Oxidase vermittelt 64
4.4 Antioxidantien heben die ZZK-vermindernde Wirkung des konditionierten Mediums von Tumorzellen auf 66
4.5 Die cGPx und phGPx sind für die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kommunikation von Selen bei der Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen verantwortlich 67
5. Perspektiven 71
6. Zusammenfassung 72
7. Literaturverzeichnis 73
8. Abkürzungen 83

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

1.1.1.1. Selen – allgemeine Aspekte

Das nach der griechischen Mondgöttin Selene benannte Spurenelement Selen wurde 1817 vom schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius erstmals beschrieben.
Selen ist ein Halbmetall mit der Ordnungszahl 34 und steht an der Position VIa im Periodensystem. Selen kann in den Oxidationszuständen –2 als Selenid, 0 als Selen, +4 als Selenit und +6 als Selenat vorkommen (siehe Tabelle 1).
Selen und Schwefel haben aufgrund ihrer Hauptgruppenzugehörigkeit viele ähnliche Eigenschaften wie Atomradien, Elektronegativitäten und Bindungslängen. Dadurch kann Selen anstelle von Schwefel in Proteine eingebaut werden, wodurch eine Vielzahl verschiedener organischer Selenverbindungen in der Zelle entstehen.

Selenform	Oxidationsstufe	Chemische Formel
Selen	± 0	Se
Selenige Säure	+IV	H_2SeO_3
Selensäure	+VI	H_2SeO_4
Natriumselenid	-II	Na_2Se
Natriumselenit	+IV	Na_2SeO_3
Natriumselenat	+VI	Na_2SeO_4
Hydrogenselenid	-II	H_2Se
Selenocystein	-II	SeCys
Selenomethionin	-II	SeMet
Selenodiglutathion	±0	GSSG
Selenmethylselenocystein	-II	CH_3SeH
Dimethylselenid	-II	$(CH_3)_2Se$
Trimethylselenonium	-II	$(CH_3)_3Se_+$

Tabelle 1: Verschiedene Verbindungen und Oxidationsstufen von Selen.

Die in der Natur am häufigsten vorkommenden Selenverbindungen sind Selenat (SeO_4^{2-}) und Selenit (SeO_3^{2-}). Der Mensch nimmt Selen über die Nahrung in Form von Nüssen, Getreide, Hülsen- und Zwiebelgewächsen auf. Die Selenversorgung von Pflanzen und Mikrorganismen wird vor allem durch den Bodenvorrat bestimmt. Ähnlich wie Iod wird Selen aus dem Boden gewaschen, selenarme Regionen sind viele Küstenregionen wie Skandinavien und Japan, aber auch Deutschland. Die Verfügbarkeit von Selen wird weiterhin maßgeblich durch den Boden-pH-Wert beeinflusst.

Bei steigendem pH-Wert des Bodens, also in alkalischen Böden, nimmt die Bodensorption ab und die Löslichkeit und konsekutiv die Bioverfügbarkeit steigt [Gissel-Nielsen, 1993; Bruss et al, 1997].

Selenat kann nur von Pflanzen und Mikroorganismen aufgenommen und verstoffwechselt werden. Dies geschieht durch eine der Schwefelreduktion analoge Reaktion. Selenit und Selenid können von allen Organismen aufgenommen und verstoffwechselt werden, und - ausgehend vom Selenid in Form von Hydrogenselenid- in die meisten Selenmetabolite überführt werden. Selenit wird nicht-enzymatisch durch eine glutathionabhängige Reaktion oder in Säugetierzellen in der Leber enzymatisch durch die Thioredoxin-Reduktase zu Selenid reduziert.

Selen liegt als metabolisch aktive Form in Proteinen als Selenocystein vor. Selenocystein ist eine proteinogene Aminosäure mit struktureller Ähnlichkeit zum Cystein. Anstatt des Schwefels im Cystein befindet sich im Selenocystein ein Selenatom.

Selenocystein unterscheidet sich von dem normalen schwefelhaltigen Cystein durch einen niedrigeren pK von 5,24 im Gegensatz zu einem pK von 8,25. Dies bedeutet, dass bei physiologischem pH Selenocystein deprotoniert, Cystein hingegen vorwiegend protoniert vorliegt. Ein höheres Redoxpotential des Selens in Selenoproteinen führt bei Redox-Reaktionen zu einer höheren Reaktivität im Vergleich zu deren entsprechenden Schwefel-analoga.

1.1.1.2. Bildung von Selenoproteinen

Allerdings wird kein intaktes Selenocystein aus der Nahrung oder aus dem Abbau von Selenoproteinen in die Peptidkette eingebaut, vielmehr wird Selenocystein ausgehend von der Aminosäure Serin schrittweise gebildet. Dies erfolgt über eine spezifische tRNA, deren Seryl-Rest cotranslational modifiziert wird [Low et al, 1996].

Danach wird durch die Selenocystein-Synthase der Seryl-Rest mit Selen in Form eines aktiven Selendonors, meistens durch Selenophosphat, beladen und es entsteht ein Selenocysteylrest (Abb. 1). Die Selenophosphatsynthethase katalysiert die Synthese von Selenophosphat aus Selenid und ATP.

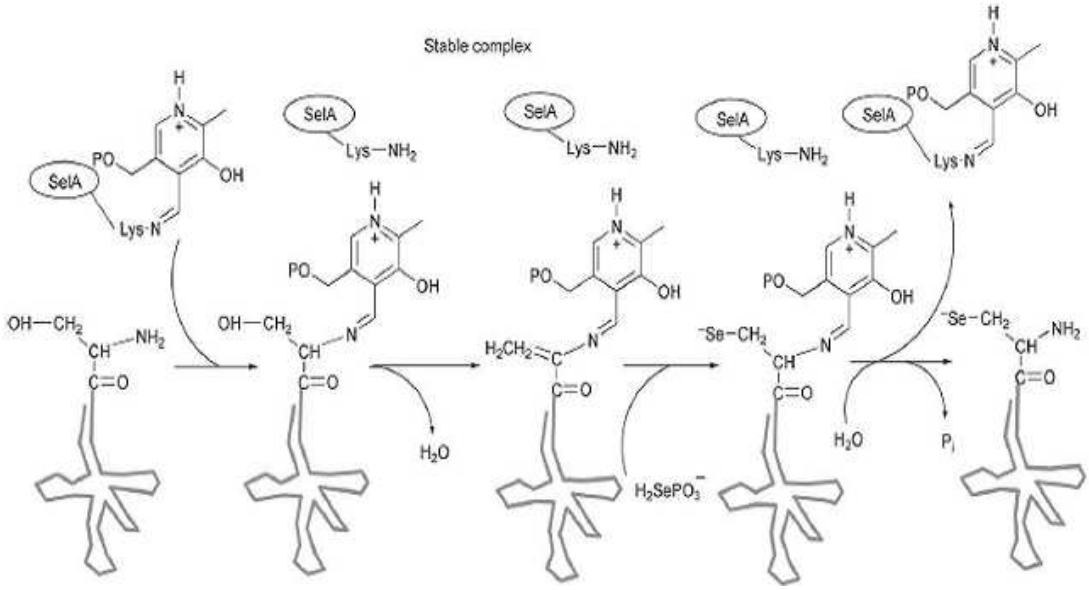


Abb. 1 Transformation der Seryl-tRNA in Selenocysteyl-tRNA durch die Selenocystein Synthase (modifiziert nach Commans und Böck).

Eine Besonderheit des Selenocysteins ist, dass durch das Codon UGA codiert wird, welches eigentlich ein Stop-Codon ist und normalerweise zum Kettenabbruch der Proteinsynthese führt.

Die tRNA besitzt ein zum UGA komplementäres Anticodon. Das Rekodieren des UGA Codons vom Stop-Codon zum Codon für Selenocystein wird durch eine spezifische Schleifenstruktur in der Selenoprotein-mRNA, SECIS-Element für *Se*leno*c*ysteine *I*nsertion *S*equence, determiniert. Bei Eukaryoten befinden sich diese SECIS-ELemente in der 3´-untranslatierten Region. Für den Einbau wird ein für die tRNAsec spezifischer Elongationsfaktor eEFsec benötigt. Auf der Ebene der Ribosomen ist für die Inkorporation von Selenocystein in die Aminosäurekette ein weiteres Protein, das SBP2, für SECIS-bindendes Protein 2, erforderlich. Es findet eine Bindung von SBP2 an das Secis-Element statt, gefolgt von einer tRNAsec-eEFsec-Bindung. Dieser Komplex bewirkt dann den Einbau von Selenocystein an das UGA-Codon.

Die für die Selenoproteinsynthese wichtige Aminosäure Selenocystein kann wegen der oben erwähnten molekularen Ähnlichkeit zwischen Schwefel und Selen aus Acetylserin und Hydrogenselenid durch die Cysteinsynthase auch direkt synthetisiert, aber nicht direkt in Selenoproteine als katalytisch aktive Form eingebaut werden.
Eine andere mögliche Darreichungsform von Selen für den Menschen ist Selenomethionin. Selenomethionin kann unspezifisch anstelle der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin in Proteine (z.B. Hämoglobin und Albumin) eingebaut werden. Selenomethionin wird aber nur dann bevorzugt, wenn nur ein geringes Angebot an Methionin besteht [Whanger et al, 1988]. Außerdem besitzt das so verstoffwechselte Selen in Form von Selenomethionin keine katalytische Aktivität und muss erst durch den Abbau von Selenomethionin zu Selenocystein, analog dem Abbau von Methionin zu Cystein, in eine Form gebracht werden, die katalytisch aktiv ist [Combs, 1986]. Dieser Vorgang kann aber erst nach der Degradation der Proteine und Aminosäuren erfolgen.

1.1.1.3. Epidemiologische Auswirkungen von Selenüberschuss und -mangel

Die potentiell toxische Wirkung von Selen wurde schon anhand von Vergiftungssymptomen im 13. Jahrhundert von Marco Polo beschrieben, ohne dass das Selen als Element identifiziert war.
Im Laufe der Zeit wurden in Gegenden mit hohen Selenbodenkonzentrationen viele Krankheiten wie die Alkalikrankheit bei Pferden oder die Blindataxie bei Rindern beschrieben, deren Pathogenese lange Zeit nicht erklärt werden konnte.
Die damals beschriebenen Krankheiten standen in Zusammenhang mit einer Selenose, einer chronischen Übersupplementierung von Selen.
Erklärt werden diese Krankheiten durch einen hohen Selengehalt und hohen pH-Wert im Boden. Selen wird konsekutiv über Mikroorganismen und Pflanzen in der Nahrungskette angereichert und es kommt zu toxischen Dosen von Selen.
Die Symptome einer Selenose beim Menschen treten ab einer Zufuhr von über 400 µg pro Tag auf und führen unter anderem zu Übelkeit, Erbrechen, Haarverlust, Nagelveränderungen, peripherer Neuropathie und Erschöpfung. Des weiteren wurde die Teratogenität von Selen bei Tieren nachgewiesen und beim Menschen diskutiert.
Die Ansicht, dass Selen nur toxisch sei, änderte sich im Laufe des zwanzigsten Jahrhundert, als sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei einigen Tiermodellen beobachtet wurde, dass eine

Selensupplementation positive Wirkungen sowohl auf das Wachstum von Bakterienkulturen als auch auf den allgemeinen Gesundheitszustand von höheren Organismen erzeugte.
1957 entdeckten K. Schwarz und C.M. Foltz Selen als einen Faktor, der eine durch Vitamin E-Mangel induzierte Lebernekrose verhindern konnte.
1975 wurde Selen als essentieller Bestandteil der zellulären Glutathionperoxidase in Säugetierzellen und in der Formatdehydrogenase und Glycinreduktase in Bakterien beschrieben und die biochemische Selenforschung begann.
In letzter Zeit mehrten sich die Erkenntnisse, dass eine ungenügende Selenzufuhr negative Auswirkungen auf die Gesundheit hat. In den siebziger Jahren des zwanzigsten Jahrhundert beschrieben Forscher zwei schwere endemische Krankheiten, die besonders in Selenmangelgebieten in China vorkamen, die Keshan- und die Kashin-Beck-Krankheit [Yang et al, 1993; Fan et al, 1990].
Die Keshan-Krankheit ist eine endemische Kardiomyopathie in der Gegend Keshan in China. Betroffen sind überwiegend junge Frauen, Jugendliche und Kinder. Die Keshan-Krankheit führt in der akuten Phase unbehandelt zu einer Herzmuskelnekrose. Die Todesursache der Erkrankten ist ein akutes Herzversagen mit begleitendem kardialen Lungenödem. Die Krankheit führt bei Auftreten der Symptome innerhalb von 48 Stunden zum Tode.
Die Kashin-Beck-Krankheit geht mit äußerst schmerzhaften, entzündlich-degenerativen Gelenksdeformationen einher und befällt ebenfalls Kinder und Frauen in Selenmangel-gebieten Chinas.
Eine milde, nicht mit Mangelerscheinungen einhergehende Selenminderversorgung wird weiter mit vielen Stoffwechselkrankheiten in Verbindung gebracht, unter anderem mit kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten sowie mit Diabetes mellitus. Außerdem zeigen Studien, dass Selen durch die antioxidative Wirkung der Glutathionperoxidasen weiterhin anitmutagene und antikarzinogene Effekte hat [Schrauzer, 2000]. Verknüpft ist mit dieser Wirkungsweise, dass während der Karzinogenese reaktive Sauerstoffspezies, kurz ROS, und somit oxidativer Stress entsteht.
In verschiedenen deskriptiven Studien wurden niedrigere Konzentrationen von Selen in Plasma, Serum und Urin in Assoziation mit verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet. Die antikarzinogene Effektivität von Selen ist von der chemischen Darreichungsform und deren Dosis abhängig [Ip et al, 1998)]. In einer prospektiven placebokontrollierten Doppel-Blindstudie wurde an Probanden mit Hautkrebserkrankungen in der Anamnese die Hypothese getestet, ob eine Supplementation mit Selen das Krebsrisiko senken kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von 200µg Selen pro Tag über mehrere Jahre die Krebs-Todesrate

signifikant verringert. Zusätzlich nahm die Anzahl an Neuerkrankungen an Lungen-, Prostata- und Darmkrebs erheblich ab [Clark et al, 1996]. Eine Analyse des Behandlungseffektes der Selensupplementation zeigte, dass bei denjenigen Probanden, die initial eine niedrige Basalkonzentration von Selen im Plasma (<106 ng/ml) hatten, die protektive Wirkung der Selenbehandlung am größten war [Combs, 2001].
Weiterhin weisen die Daten der Studie SELECT in dem präklinischen, epidemiologischen und Phase III-Abschnitt darauf hin, dass Vitamin E und Selen präventive Wirkungen auf das Vorkommen von Prostatakrebs haben [Klein et al, 2003].
Experimentelle *in-vitro* Studien mit verschiedenen Tumorzelllinien zeigten zahlreiche Effekte von Selen auf die Tumorzellen. Ein großer Teil dieser Effekte war von zytotoxischer Natur, andere Wirkungsweisen zeigen unterschiedliche Regulationen und Expressionsmuster verschiedener Redoxpotential-abhängiger Transkriptionsfaktoren, wie nFκB, welche die Karzinogenese hemmen [Makropoulos et al, 1996; Flohe et al, 1997; Otsuka et al, 1999].

1.1.2.1 Glutathionperoxidasen

Glutathionperoxidasen sind selenabhängige Enzyme, die im katalytischen Zentrum ein Selenocysteinmolekül enthalten (Abb.2). In allen Bereichen der Tierwelt haben Säugetierzellen selenabhängige Glutathionperoxidasen exprimiert. In Pflanzen, Pilzen und Bakterien gibt es den Glutathionperoxidasen funktionell analoge Enzyme.
Die in menschlichen Zellen beschriebenen Glutathionperoxidasen werden historisch aufgrund ihrer Substratspezifität, ihres Vorkommens und abhängig von der Zeit ihrer Entdeckung unterschieden.

Abb. 2 Struktur der Glutathionperoxidase.
Der Selenocysteinrest befindet sich im katalytischen Zentrum des Enzyms und ist für die katalytische Funktion bei der Detoxifizierung von Peroxiden verantwortlich (nach Stryer, 5. Ausgabe).

Die GPx1-3 liegen als Tetramere vor, die GPx4 als Monomer. Das Molekulargewicht der GPx4 ist mit 22kD geringer als das der einzelnen Untereinheiten der anderen Glutathionperoxidasen.

Die Glutathionperoxidasen katalysieren abhängig von dem Thiol Glutathion die Reduktion von Hydrogen- und Alkylhydroperoxiden, ohne dass bei dieser Reaktion freie Radikale entstehen.

Die Substratspezifität zwischen den einzelnen Glutathionperoxidasetypen variiert erheblich [Brigelius-Flohe, 1999]. Die cGPx vermag anorganische und organische Hydroperoxide zu reduzieren, die GPx4 reduziert weiterhin die Hydroperoxide von komplexen Lipiden, Lipoproteinen, Cholesterinestern sowie Lpidhydroperoxide im Phosphatidatmolekül (Phospholipidhydroperoxide). Die letzteren, in Membranen integrierten Lipidhydroperoxide entstehen durch Hydroperoxidbildung an ungesättigten Fettsäuren. Das größte Vorkommen von Fettsäuren findet sich in der Zellmembran in Form von Membranlipiden. Phospholipide stellen den größten Anteil der Membranlipide und bestehen aus vier Komponenten: zwei Fettsäuregruppen, Glycerin, einer Phosphatgruppe und einem an die Phosphatgruppe gebundenen Alkohol. Aus sterischen Gründen befinden sich die ungesättigten Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure u.a., in der A_2-Position im Phosphatidatmolekül. Dementsprechend entstehen auch Lipidhydroperoxide bevorzugt an dieser Stelle. Die GPx4 kann aufgrund ihrer Struktur bevorzugt mit diesen Lipidhydroperoxiden reagieren [Ursini et al, 1990]. Die phGPx kann zytosolisch und membranassoziert in der Zelle und Mitochondrien vorkommen. Trotz der Substratspezifität der phGPx für Phospholipidhydroperoxide können diese auch durch die cGPx in Zusammenarbeit mit der PhospholipaseA_2 reduziert werden [Sevanian et al, 1983; Antunes et al, 1995].

Seit der Entdeckung der cGPx 1975 wurden viele Phänomene, die auf Selenmangel basierten, mit der Glutathionperoxidase in Verbindung gebracht. Beispielsweise zeigten cGPx-defiziente Mäuse nach der Infektion mit einem avirulentem Coxsackievirus ein Krankheitsbild, das der Keshan-Krankheit ähnelte (siehe unten) [Beck, 1995]. Weiterhin waren diese cGPx-defizienten Mäuse unabhängig von ihrem Selensupplementstatus resistenzvermindert gegenüber oxidativem Stress.

1.1.2.2 Reaktionsmechanismus der Glutathionperoxidasen

Der katalytische Mechanismus der Selenocystein-enthaltenden Glutathionperoxidasen für die Reduktion von Hydroperoxiden (ROOH) umfasst die Oxidation von Selenolat, das zu einer Reduktion der Hydroperoxide in Alkohole führt [Sies, 1997].

Im katalytischen Zentrum der reaktionsbereiten Glutathionperoxidase liegt das Selen im Selenocystein als Selensäurederivat vor. Bei der Reaktion der Glutathionperoxidase wird das Selenocystein im katalytischen Zentrum durch das Peroxid zur Oxidationsstufe der selenigen Säure (E-SeOH) oxidiert. Schrittweise wird jetzt der Selenocysteinrest reduziert. Zuerst reagiert es mit einem Thiol, typischerweise dem Glutathion, und bildet ein Selenodisulfid (E-Se-SG). Die Selenodisulfidbrücke dieser Zwischenstufe wird im Folgenden durch ein zweites Glutathion-Molekül gespalten. Durch diese Reaktion wird der Grundzustand des Enzyms wiederhergestellt [Epp et al, 1983].

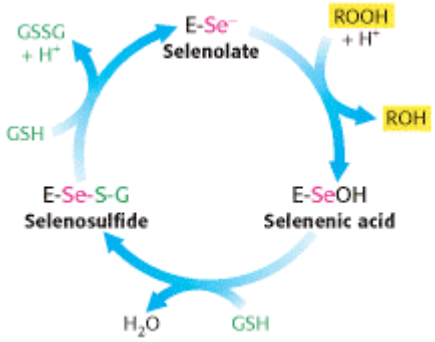


Abb. 3 Mechanismus der Glutathionperoxidase
[nach O. Epp, R. Ladenstein, und A. Wendel. Eur. J. Biochem. 133(1983):51].

1.1.3 Oxidativer Stress und Antioxidantien

Oxidativer Stress entsteht, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung von Pro-Oxidantien, sprich reaktiven Sauerstoffspezies, und der antioxidativen Kapazität der Zelle zum Schutz vor Schäden oxidativen Ursprungs kommt [Sies, 1985, 1986, 1997].

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen als Nebenprodukte im zellulären Stoffwechsel, hauptsächlich in den Mitochondrien während der Energiegewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung, aber auch durch extrazelluläre Ereignisse wie beispielsweise die Bestrahlung mit ultraviolettem (UV-) Licht. Durch molekularen Sauerstoff (O_2) wird die

Energieausbeute in der aeroben Zucker- und Fettmetabolisierung in den Mitochondrien im Vergleich zur anaeroben Metabolisierung vervielfacht. Während der oxidativen Phosphorylierung durch Elektronentransferreaktionen wird molekularer Sauerstoff über die Atmungskettenkomplexe zu H_2O reduziert. Während dieser Elektronentransferreaktionen können aber auch nur teilweise reduzierte, hoch reaktive Metabolite des O_2, die ROS, entstehen. Ungefähr 95% der ROS entstehen während der physiologischen Energiegewinnung durch die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette.

ROS können in freie Radikale, wie zum Beispiel das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot -}$), Hydroxylradikale ($HO\cdot$), Peroxylradikale ($ROO\cdot$), Alkoxylradikale ($RO\cdot$) und nicht-radikalische Verbindungen wie das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) und organische Peroxide (ROOH), eingeteilt werden [Brenneisen et al, 2002] (Tab. 2 und 3). Neben intrazellulärer ROS-Entwicklung können auch Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie beispielsweise der transformierende Wachstumsfaktor (TGF-β1), die ROS-Menge innerhalb der Zelle stark erhöhen, indem sie entweder die Expression von antioxidativen Enzymen hemmen [Kayanoki et al, 1994; Islam et al, 1997] oder die Expression der NADH-Oxidase erhöhen [Thannickal et al, 1995; Cat et al, 2006, 2007]. Membran-assoziierte Oxidasen und andere zelluläre Enzyme in und um zelluläre Membranen stellen Hauptquellen für Wachstumsfaktor-/Zytokin-induzierte ROS-Produktion dar [Thannickal und Fanburg, 2000].

Obgleich ROS meist nur eine kurze Halbwertzeit besitzen, können sie mit Nukleinsäuren (DNA, RNA), Proteinen und Lipiden reagieren. An der DNA können diese Reaktionen zu Strangbrüchen führen und Proteine können mit anderen Proteinen oder auch DNA quervernetzt werden. Mögliche Folgeschäden für die Zelle sind zum einen der Funktionsverlust der jeweiligen Strukturen mit der möglichen Folge des Zelltodes oder zum anderen Schäden des Genoms auf DNA-Ebene.

Schäden des Genoms durch ROS sind neben Modifikationen der Basen auch andere von ROS erzeugte Schäden wie Einzel- und Doppelstrangbrüche [Sies, 1986], die durch Hydrolyse der Phosphat-Desoxyribose-Verknüpfung entstehen, oder basenfreie (apurinische, apyrimidinische) Stellen, die bei der Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose gebildet werden und auch in oxidierter Form auftreten [OhUigin et al, 1987; Piette et al, 1981]. Durch die Basenmodifikationen kann es bei der teilungsfähigen Zelle zu inkorrekten Basenpaarungen kommen. Falls diese Basenpaarungen durch die Mismatch-Reparaturmechanismen nicht beseitigt werden können, manifestieren sich diese Schäden als eine in das Genom aufgenommene Mutation. Je nachdem, an welcher Stelle diese Mutation

auftritt, besteht die Gefahr, dass die vormals oxidativ geschädigte Zelle in eine maligne Zelle transformiert wird und sich ein Tumor bilden kann.

Weiterhin führt die Oxidation von Lipiden an C=C-Bindungen zu Peroxiden, an den Säure- und Alkoholresten zu Hydroperoxiden, die wiederum eine radikalische Kettenreaktion auslösen, somit die Peroxidation vorantreiben und letztendlich zu oxidativen Schäden führen.

Es konnte gezeigt werden, dass α- und β-ungesättigte Aldehyde und Malondialdehyd (MDA), welche Produkte der Lipidperoxidation sind, mutagene und karzinogene Eigenschaften besitzen [Marnett, 1999].

Formel	Bezeichnung	Abnehmende Reaktivität ↓
HO•	Hydroxyl-Radikal	
$^1O_2$	Singulettsauerstoff	
HO_2•	Perhydroxyl-Radikal	
O_{2-}•	Superoxid-Radikalanion	
RO•	Alkoxyl-Radikal (R=Alkylrest)	
ROO•	Hydroperoxyl-Radikal (R=Alkylrest)	
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	
NO•	Stickstoffmonoxid	
HOCl	Hypochlorige Säure	

Tabelle 2 Reaktive Sauerstoffspezies mit abnehmender Reaktivität (nach Markant et al, 1995)

Da *oxidativer Stress* in Form von ROS hauptsächlich endogen in der Zelle während der Atmungskette entsteht und um einer hohen Konzentration von exogen entstandenen ROS entgegenzuwirken, verfügt die Zelle über enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Systeme. Dazu gehören die Superoxid-Dismutase (SOD), die $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 reduziert, die Katalase und die zuvor beschriebenen selenabhängigen Glutathionperoxidasen, die H_2O_2 in H_2O und O_2 reduzieren. Neben enzymatischen Antioxidantien gibt es auch chemische Verbindungen mit anti-oxidativen Eigenschaften. Zu diesen zählen beispielsweise N-acetyl-L-cysteine (NAC), das Vitamin E-Derivat Trolox, Vitamin C, 2,6-butyliertes Hydroxytoluen (BHT), Selen (Se) oder der Eisenchelator Desferrioxamin (DFO) [Cat, 2007].

Oxidativer Stress wird auch mit anderen humanen Erkrankungen wie kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten in Verbindung gebracht [Sies, 1991]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass ROS entscheidende Mediatoren in der Signalkaskade von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind [Brigelius-Flohe, 2004].

1.1.4 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

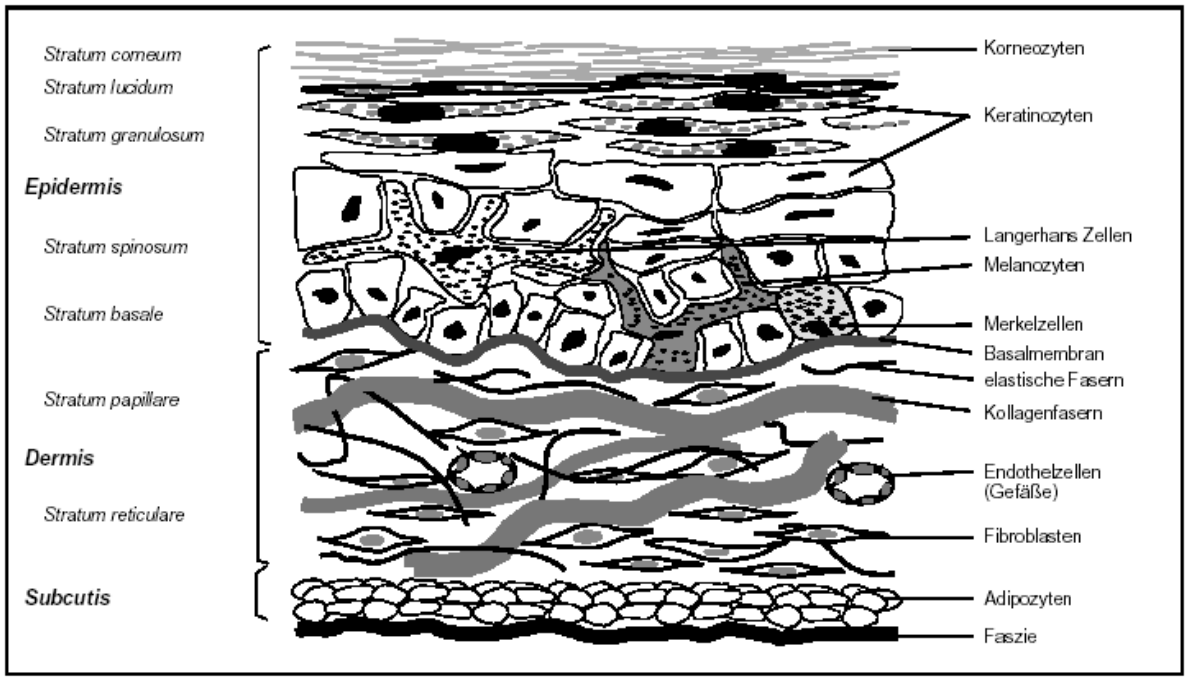


Abb. 4 Aufbau der menschlichen Haut.

Die Haut stellt mit bis zu 2 m² Oberfläche das größte Organ des Menschen dar. Sie dient als schützende Barriere gegenüber physikalischen, chemischen oder mikrobiellen Einwirkungen und übernimmt vielfältige Stoffwechselfunktionen. Um diesen Funktionen nachzukommen, verfügt die menschliche Haut über eine komplexe Struktur. Von außen nach innen gliedert sie sich grob in Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Corium oder Dermis) und Unterhaut (Subcutis) (Abb. 4). Epidermis und Dermis stellen die Haut im eigentlichen Sinne dar und werden als Cutis bezeichnet. Die Epidermis setzt sich aus fünf Schichten zusammen, nämlich der Hornschicht (*Stratum corneum*), Glanzschicht (*Stratum lucidum*), Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) und Basalschicht (*Stratum basale*). *Stratum spinosum* und *Stratum basale* werden auch als *Stratum germinativum* (Regenerationsschicht) zusammengefasst, da hier durch mitotische Teilungen neue Zellen entstehen. Diese Zellen wandern in die oberen drei Zellschichten (Verhornungsschicht) ein, wo sie eine Umstrukturierung der in ihnen enthaltenen Keratinfilamente erfahren und zu kernlosen Korneozyten (Hornzellen) ausdifferenzieren, um schließlich ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel zu bilden. Die äußeren Bereiche des *Stratum corneum* schilfern regelmäßig ab (Desquamatio insensibilis), wodurch sich die Epidermis innerhalb von etwa 27 Tagen vollständig erneuert. Zusätzlich enthält die Epidermis die melaninbildenden Zellen des Pigmentsystems (Melanozyten), dendritische Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen)

und Sinneszellen, die möglicherweise als Mechanorezeptoren fungieren können (Merkel-Zellen) [modifiziert nach Stuhlmann 2004].

Die Epidermis wird durch die Basalmembran, die aus *Lamina lucida externa*, *Lamina densa* und *Lamina lucida interna* besteht, von der Dermis getrennt. Die Basalmembran bildet durch ihren speziellen Aufbau aus verschiedenen Glykoproteinen wie beispielsweise Laminin, Kollagen Typ IV oder Entactin einen selektiven molekularen Filter, den verschiedene Tumor- oder Entzündungszellen passieren können. Auch in der Dermis lassen sich verschiedene Schichten differenzieren, dies sind Papillarschicht (*Stratum papillare*) und Geflechtschicht (*Stratum reticulare*). Über die bindegewebigen Papillen des *Stratum papillare* ist die Dermis fest mit der Epidermis verzahnt. In diesem Bereich liegen auch Kapillarschlingen, die die Versorgung der Epidermis sicherstellen, initiale Lymphgefäße, freie, bis in die Epidermis verzweigende Nervenendigungen, Wärme- und Kälterezeptoren sowie Tastsinnesorgane.

Als Bindegewebszellen werden neben Fibroblasten und Mastzellen die Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) gefunden. Den Raum zwischen zellulären und fasrigen Elementen (Interstitium) füllt eine gallertige Flüssigkeit aus, die sogenannte Interzellulärsubstanz. Faserige Elemente und Interzellulärsubstanz bilden gemeinsam die extrazelluläre Matrix (EZM), in der sich die Zellen bewegen und miteinander interagieren. Das *Stratum reticulare* enthält weniger Zellen, ihre Kollagenfasern bilden jedoch ein dichtes Netzwerk, das überwiegend parallel zur Körperoberfläche ausgerichtet ist und in dessen Maschen sich Fasern des elastischen Bindegewebes verzweigen. Als eigenständige Strukturen der Haut sind Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen in die Dermis eingebettet. Das Bindegewebe der Haut ist in komplexer Weise aus Strukturproteinen und Bindegewebszellen (Fibroblasten) aufgebaut, wobei die Fibroblasten für die Synthese und den Abbau dieser Strukturproteine verantwortlich sind. Zu ihnen werden verschiedene multifunktionale Glykoproteine, Proteoglykane und Faserproteine wie Elastin und unterschiedliche Kollagene gezählt [Ross et al, 1995; Brenneisen et al, 1996; Kielty et al, 1997]. Gerade den Kollagenen kommt in der Haut eine besondere strukturelle und funktionelle Bedeutung zu. Beispielsweise verbindet ein sehr langes, stäbchenförmiges Kollagen vom Typ VII die Epidermis mit der Dermis und ist selber mit anderen Strukturproteinen der Basalmembranzone wie Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen und Kalinin in molekular noch nicht bekannter Weise vernetzt. Kollagen Typ I ist mit einem Anteil von über 80 % mengenmäßig das häufigste Strukturprotein der Dermis und insbesondere für deren Reißfestigkeit und Stabilität verantwortlich [van der Rest et al 1991; Fleischmajer et al 1990]. Der Abbau einzelner Bindegewebsproteine wird in kontrollierter

Weise durch Enzyme reguliert, die zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen gehören. Die Aktivität dieser Matrix- Metalloproteinasen wird wiederum durch von Fibroblasten synthetisierte Inhibitoren (TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases) kontrolliert [Docherty et al, 1992; Matrisian, 1992; Kalhari, 1997; Kugler, 1999]. Letztendlich garantiert ein ausgeglichenes Verhältnis der Synthese von Strukturproteinen auf der einen Seite und der Matrix- Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren auf der anderen Seite die Funktion des Bindegewebes der Haut. Dieses sensible Gleichgewicht wird jedoch durch Kanzerogene wie UV-Strahlung entscheidend gestört [Scharffetter-Kochanek et al, 1991, 1992, 1997; Stein et al, 1989; Wlaschek et al, 1993, 1994, 1995, 1997; Hermann et al, 1993; Koivukangas, 1994; Brenneisen et al, 1998]. UVB-Exposition führt vermutlich über eine gestörte Zell-Matrix-Interaktion und durch ein Ungleichgewicht zwischen Matrix-Synthese und Matrix-Abbau zu erheblichen Störungen in Prozessen wie der Wundheilung und zur Begünstigung von Tumorinvasion und Metastasierung in der Tumorprogression [Canfield et al, 1986].

1.1.5 Das Plattenepithelkarzinom

Neben dem Begriff Plattenepithelkarzinom werden einige Begriffe synonym verwendet: Spinaliom, Spinoläres Karzinom, Stachelzellkarzinom oder Epithelioma spinocellulare. Diese Begriffe beschreiben einen Hauttumor, dessen Inzidenz in Mitteleuropa bei 25-30 pro 100.000 Einwohner liegt. Somit ist das Plattenepithelkarzinom (nach dem Basaliom) der zweithäufigste Hauttumor; in sonnenreichen Regionen ist die Inzidenz noch höher.
Männer erkranken 2-5x Mal häufiger als Frauen; dies kann man nur zum Teil durch die erhöhte Exposition gegenüber kanzerogenen Noxen in bevorzugt „männlichen“ Berufen erklären. Spinaliome treten bevorzugt im höheren Alter mit einem Gipfel zwischen 70-80 Jahren auf. Dies ist die Folge sich über die Gesamtlebensdauer summierender kanzerogener Noxen, wie UV-Licht, Röntgenbestrahlung, industrielle Schadstoffe (Teer, Mineralöle, Arsen) oder chronische Virusinfektion [Aubin et al, 2003].

Ein Plattenepithelkarzinom entsteht durch einen mehrstufigen Prozess, zu dem prädisponierende Faktoren und karzinogene Noxen beitragen. Der erste Schritt findet auf molekularer Ebene statt. Durch Karzinogene werden Schäden an der DNA verursacht.
Unvollständige Reparatur führt zu einer somatischen Mutation und zum Entstehen einer malignen Zelle, wobei allerdings nur eine Mutation nicht ausreicht.

Um aus einer Zelle einen malignen Klonus und ein Karzinom entstehen zu lassen, sind neben den genetischen Faktoren weitere Schritte des Wachstums und der Wachstumsförderung notwendig, die man unter dem Befriff Epigenetik zusammenfasst und die bisher nicht vollständig verstanden sind. Sicher ist, dass nicht alle malignen Klone zu malignen Tumoren werden. Ca 80-90% der Klone können von der Epidermis eliminiert werden. Die restlichen persisistieren als maligne Klone, überwuchern und führen schließlich zu einem Karzinom.

Das Spinaliom ist ein solider epithelialer Tumor mit Verhornungstendenz. Die Spinaliomzellen sind groß und plasmareich und ähneln den Keratinozyten des *stratum spinosum*. Je differenzierter das Spinaliom, desto stärker die Neigung zur Verhornung. Zum Teil finden sich sogenannte Hornperlen, die aus konzentrisch aufgebauten Schichten aus Spinaliomzellen mit zentraler Verhornung entstehen. Je undifferenzierter das Spinaliom, desto häufiger finden sich Atypien, Hyperplasie und Hyperchromasie der Zellen sowie atypische Mitosen. Der Differenzierungsgrad ist von prognostischer Bedeutung [modifiziert nach Stuhlmann, 2004].

Abb. 5 Fortgeschrittenes Plattenepithelkarzinom im Kopfbereich eines älteren Mannes.

1.1.6 *Gap Junctions* und Zell-Zell-Kommunikation

Als im Verlaufe der Evolution aus Einzellern mehrzellige Organismen wurden, mussten diese miteinander eine Reihe von Anpassungen realisieren, die einen komplexen Organismus ausmachen. So z.B. entstanden sogenannte „*junctions*“; Zellverbindungen, die in drei Subtypen unterteilt werden:

1. undurchlässige Verbindungen - *tight junctions*
2. Haftverbindungen - *Adhäsionsverbindungen, Desmosomen*
3. kommunizierende Verbindungen - *gap junctions*

In einem vielzelligen Organismus ist eine fein aufeinander abgestimmte Regulation von molekularen und physiologischen Prozessen Voraussetzung für die Funktionalität des Organismus. Diese Homöostase wird von drei Kommunikationsprozessen beherrscht. Neben der extrazellulären Kommunikation über Wachstumsfaktoren/Zytokine und der intrazellulären Kommunikation über sekundäre Botenstoffe und intrazelluläre Signal-Kaskaden spielt die interzelluläre Kommunikation über *gap junctions* eine wesentliche Rolle [Hayashi et al, 1998; Trosko et al, 1998].

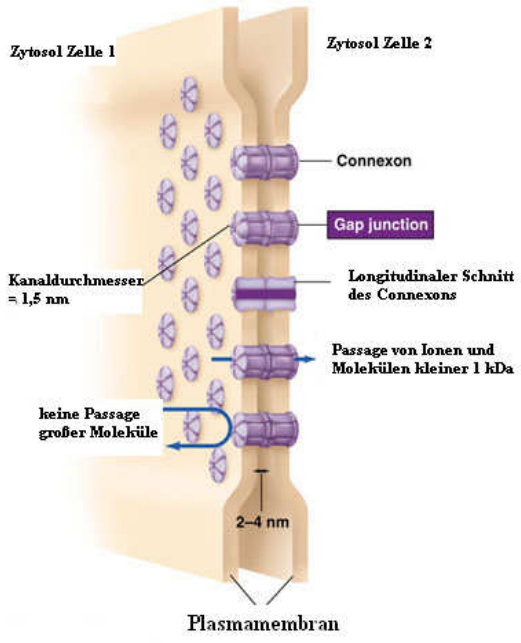


Abb. 6 Darstellung von gap junctions.
Quelle: Internet, Neuronal Physiology, Colorado,
verändert [http://www.colorado.edu/epob/epob1220lynch/image/figure3k.jpg].

Gap junctions sind Anhäufungen von Transmembrankanälen, die die Zytoplasmen benachbarter Zellen direkt verbinden. Dabei stellt jede Zelle jeweils Halbkanäle (Connexone) zur Verfügung, die aneinander andocken und gemeinsam den vollständigen Kanal bilden. *Gap Junctions* bilden sich nur zwischen Zellen des gleichen Gewebetyps aus.
Gap junction-Kanäle sind für Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu 1000 Dalton durchlässig. Dies ermöglicht den interzellularen Austausch von Aminosäuren, Zuckern und Nukleotiden sowie sekundären Botenstoffen wie cAMP, IP3 oder Ca^{2+}-Ionen [Saez et al, 1989; Niessen et al, 2000; Stuhlmann, 2004].
Durch diesen direkten interzellulären Austausch von Molekülen sind Zellen untereinander verbunden und können auf molekularer Ebene kommunizieren.

1.1.7.1 Tumorprogression und Tumor-Stroma-Interaktion

Ein Tumor ist definiert als die abnorme Vergrößerung eines Gewebetyps, hervorgerufen durch die unkontrollierte Proliferation dysplastischer Zellen [Meyer et al, 1998]. Maligne veränderte Zellen entstehen durch vielfältige Mechanismen. Sowohl genetische Prädispositionen wie Mutationen in Genen, beispielsweise die familiäre Adenomatosis polyposis coli mit Verlust des p53-Tumorsuppressorgens, als auch erworbene Expositionen mit kanzerogen Stoffen, Erregern und Strahlungen führen zu dysplastischen Mutationen, die bei fehlenden Reperaturmechanismen oder starker Exposition neoplastische Zellen erzeugen [Meyer et al, 1998]. Gemeinsam haben neoplastische Zellen, dass zelluläre Kontrollmechanismen wie die Einleitung des induzierten Zelltodes (Apoptose) außer Kraft gesetzt sind und die Tumorzellen dadurch unkontrolliert proliferieren können. Im nächsten Schritt können Tumorzellen aus ihrem Zellverband emigrieren, das Stroma invadieren und metastasieren. Metastasierung beschreibt die Fähigkeit von Tumorzellen, durch Invasion in das umgebende Gewebe den Primärtumor zu verlassen, Anschluß an das Blutgefäßsystem zu bekommen (Intravasation) und nach Extravasation einen Sekundärtumor zu bilden [Müller et al, 2002].
Invasives Wachstum ist durch Veränderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion gekennzeichnet. Tumorzellen verändern ihre stromale Umgebung durch extrazelluläre

Kommunikation (siehe Punkt 1.1.6). Vermutlich wird die Invasion von Tumorzellen in dem Bindegewebe der Haut wesentlich durch Fibroblasten beeinflusst [De Wever et al, 2003].

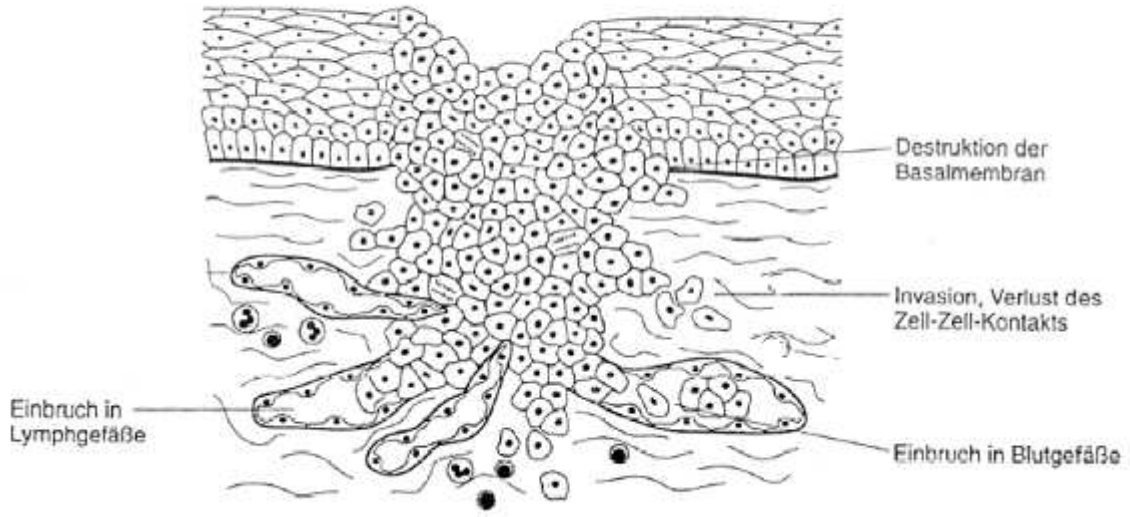


Abb. 7 Eigenschaften eines invasiv wachsenden Karzinoms [verändert nach Scheiden et al, 2003].

Dabei kommt es zu Tumor-Stroma-Interaktionen, die die Invasion der Tumorzellen scheinbar positiv beeinflussen [Liotta et al, 2001; Cat et al, 2006].

Nach der **Drei-Schritt-Hypothese** (Abb. 7) besteht die Invasion aus folgenden Schritten: Adhäsion der Tumorzellen an die Matrix, Degradation der Matrix und Migration der Tumorzellen durch die degradierte Matrix [Liotta et al, 1986]. Das heißt, die Tumorzellen wandern in das subepitheliale Bindegewebe und können aktiv Bestandteile des Bindegewebes abbauen, um Anschluss an das Blutgefäß zu bekommen. Nach Verlust der Zell-Zell-Adhäsion kommt es zum Einbruch der Tumorzellen in die Lymph- und/oder Blutgefäße.

Zell-Zell-Adhäsion wird durch Zelladhäsionsmoleküle wie den Integrinen und E-Cadherinen, weiterhin durch E-Selektine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie gewährleistet.

Integrine sind an der Zelloberfläche lokalisierte heterodimerische Glykoproteine (α- und β-Subeinheiten). Sie beeinflussen wichtige Aspekte des Verhaltens der Tumorzellen wie Motilität, Invasion, Zellwachstum und Zellmorphologie. Die Integrine verbinden die EZM mittels ihrer zytoplasmatischen Domänen mit den Komponenten des Zytoskeletts. Auf diese Weise erfüllen die Integrine eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion (Aplin et al, 1999; Giancotti et al, 1999]. Der Kontakt der Integrine mit den Proteinen der EZM aktiviert die Gruppe der Rho-Proteine der kleinen GTP-ase; umgekehrt beeinflussen die

Proteine aus der Rho-und Ras-Gruppe die Fähigkeit der Bindung von Integrinen an ihre Liganden.

Die E-Cadherine sind transmembrane Glykoproteine, die epitheliale Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Ein Verlust von E-Cadherin kann zu Verlust des Zusammenhaltes zellulärerer Verbände führen [Mesnil et al, 2002].

Die Degradation der Matrix wird als zweiter wichtiger Schritt angesehen, um den malignen Zellen die lokale Invasion zu erlauben, weiter in die Lymph- und Blutzirkulation zu gelangen und schließlich Fernmetastasen zu bilden. Mittels lokaler Proteolyse wird das Eindringen der Tumorzellen in das umliegende Gewebe erleichtert. Die dazu benötigten Enzyme werden von den Tumorzellen selbst oder von Zellen des Stromas nach Stimulation durch die Tumorzellen produziert. Die 4 bisher bekannten Klassen der Proteinasen, die sich an der Proteolyse beteiligen, sind: Serin-Proteinasen, Cystein-Proteinasen, Asparagin-Proteinasen und Metalloproteinasen. Viele Studien über die Degradation beschäftigten sich mit der Expression von MMP bei malignen Zellen. Sie untersuchten die direkte Korrelation zwischen der Anzahl der von Tumorzellen produzierten MMP und den Invasivitätseigenschaften der Zellen *in vitro* sowie dem Metastasierungspotenzial *in vivo*. Die Studien zeigen, dass die Invasionskapazität direkt mit der Produktion der MMP korreliert [Lioatta et al, 1980; Nakajima et al, 1993; Garbisa et al, 1983].

Durch die degradierte Matrix können die Tumorzellen nun in das umliegende Gewebe wandern, durch Neoangiogenese Anschluß an das Blutsystem bekommen und so in weiter entfernte Regionen des Organismus gelangen, um dort Metastasen zu bilden. Metastasen bilden sich durch diese so verschleppten Zellen entweder dadurch, dass Tumorzellen in der Endstrombahn der Gefäße embolisieren und sich dann absiedeln, oder durch Adhärenz an das Endothel. Die embolisierten oder adhärierenden Tumorzellen durchdringen dann die endotheliale Basalmembran und invadieren in das subendotheliale Bindegewebe. Im Folgenden invadieren die Tumorzellen in das Parenchym des betroffenen Organs [Stuhlmann, 2004; Folkman, 2006; Cat, 2007].

1.1.7.2 Tumorinvasion und direkte Zell-Zell-Kommunikation

Bei der Entwicklung von Hauttumoren (Basaliome, Plattenepithelkarzinome, Melanome) durch neoplastische Transformation epidermaler Zellen handelt es sich um einen Mehrstufenprozess, dem epigenetische und genetische Veränderungen zugrunde liegen [Yuspa, 1998; Matsumura et al, 2002]. Diese Veränderungen führen zu einem Ungleichgewicht der zellulären Homöostase. Die Homöostase wird durch drei Kommunikationsprozesse aufrechterhalten. Neben der extrazellulären Kommunikation mittels Wachstumsfaktoren/Zytokinen und der intrazellulären Kommunikation mittels sekundärer Botenstoffe und intrazellulärer Signalkaskaden spielt auch die interzelluläre Kommunikation über *gap junctions* eine wichtige Rolle. Die Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) mittels *gap junctions* ermöglicht beispielsweise die Vermittlung von Signalen zur Wachstumskontrolle, aber auch von Apoptosesignalen. Viele Tumore sind in der Lage, die ZZK der Zellen in ihrer Umgebung durch Zytokine zu unterbinden, um sich beispielsweise vor Apoptosesignalen aus dem stromalen Gewebe zu schützen und so ein ungehindertes Wachstum des Tumors zu gewährleisten.

Tumorzellen untereinander kommunizieren nicht über *gap junctions* [Trosko et al, 1998]. Der Verlust der ZZK bei Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen der Haut steht mit einer fehlenden Expression der Connexine 26 und 43 und mit dem Verlust der Translokation der Connexine an die Membranoberfläche in Verbindung, wie am Modell der Hautkarzinogenese an der Maus gezeigt werden konnte [Tada und Hashimoto, 1997]. Weiterhin ist bekannt, dass eine Vielzahl an Tumorpromotoren die *gap junctionale* ZZK der veränderten Zellen vermindert, eine Erhöhung der *gap junctionalen* ZZK die Tumorinvasion hingegen maßgeblich vermindern kann [Trosko, 2001, 2005].

Nicht nur Tumorzellen, sondern auch dermale Fibroblasten zeigen in der Tumor-Stroma-interaktion eine Veränderung in der interzelluären Kommunikation. Dermale Fibroblasten kommunizieren nicht mit den Tumorzellen über *gap junctions*, aber auch untereinander zeigen dermale Fibroblasten in einem Tumor-Stroma-Modell eine verminderte *gap junctionale* ZZK. Diese Verminderung der ZZK kann durch Mikronährstoffe (z.B. Selen) aufgehoben werden [Stuhlmann et al, 2003, 2004].

1.2 Fragestellung

Viele Untersuchungen konnten zeigen, dass die Interaktionen zwischen Tumorzellen und den umliegenden stromalen Zellen hinsichtlich der Progression des Tumors eine entscheidende Rolle spielen. Stromale Zellen haben den Vorteil, dass sie genomische Stabilität aufweisen, und es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von TGF-β1 durch Tumorzellen für die gestörte homologe Zell-Zell-Kommunikation über *gap junctions* von stromalen Fibroblasten zu einem großen Teil verantwortlich ist und mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Zusammenhang steht. Über die ROS-abhängigen molekularen Mechanismen, die zum Schließen der *gap junctions* in den Fibroblasten führen, ist wenig bekannt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Selen diese Effekte verhindert [Stuhlmann et al, 2003]. Die Mechanismen der Selenwirkung auf die stromalen Fibroblasten wurden bisher nicht vollständig geklärt.

In der medizinischen Forschung finden Spurenelemente wie Selen eine immer größere Beachtung. Extreme Selenmangelerscheinungen und Vergiftungen durch Selen sind schon seit langer Zeit als Krankheitsentitäten beschrieben, in letzter Zeit mehren sich aber die Erkenntnisse, dass zum einen eine milde und ohne Mangelerscheinungen auftretende Selenminderversorgung bei der Entstehung von sehr unterschiedlichen Krankheiten eine Rolle spielt, zum anderen gewinnt Selen als supplementäres Therapeutikum sowohl in der Tumortherapie als auch in der Prophylaxe zunehmend an Bedeutung.

Im Vordergrund der bisherigen Studien über die Wechselwirkungen und Effekte von Selen insbesondere auf Tumorerkrankungen standen klinisch-epidemiologische Gesichtspunkte einer Selensubstitution und die molekularen Wirkungsmechanismen von Selen auf die Tumorzellen. Tumorzellen sind allerdings genotypisch relativ instabil und somit eine heterogene und daher schwerer zu untersuchende Population.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die von Tumorzellen initiierten, molekularen ROS-abhängigen Mechanismen, die zum Schließen der *gap junction* in stromalen Fibroblasten führen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich nun mit der Frage, durch welche molekularen Wirkungsmechanismen Selen Einfluss auf die *gap junction*-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation stromaler Fibroblasten in Wechselwirkung mit Tumorzellen als Modell für die Tumor-Strom-Interaktion nimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsmaterialien

APS analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
BHT	Sigma, Deisenhofen
Albumin from bovine serum (BSA) 98%	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix	Qiagen, Hilden
Diphenyliodonium 98%	Sigma, Deisenhofen
DTT	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure (Eisessig) 100% pro analysi	Merck, Darmstadt
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Gentamycin solution	Sigma, Deisenhofen
Glycin ≥ 99,9% p.A.	Roth, Karlsruhe
KCl	Invitrogen, Carlsbad
L-Glutamin f. biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$	Invitrogen, Carlsbad
MTT 98% (TLC)	Sigma, Deisenhofen
$NaCl_2$ pro analysi	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4 pro analysi	Merck, Darmstadt
Na-Selenit	Merck, Darmstadt
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
TGF-β1, recombinant from human	RnD, Minneapolis USA
Tris Pufferan® ≥ 99,9%	Roth, Karlsruhe
Trolox for hplc	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Zitronensäure	Sigma, Deisenhofen
L-alpha- Phosphatidylcholin Typ III-S (soybean)	Sigma, Deisenhofen
Lipoxidase (EC 1.13.11.12) Typ IV (soybean)	Sigma, Deisenhofen
Sep-Pak C18 Säulen	Millipore, Eschborn
β- Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen

Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Lucifer Yellow CH-Lösung	Sigma, Deisenhofen

2.2 Puffer und Lösungen

Einfriermedium	DMEM-Medium mit 20% FCS 10% DMSO
Carnoy´s Fixativ	Methanol/Eisessig, 3:1
MTT-Lösung	10% MTT in DMEM
Reaktionspuffer GPx-Aktivitätsmessung	0,1 M Tris-HCL, pH 8.0 2mM EDTA 1.5 mM NaN3 0,1 % TritonX-100 15 IU/ml Glutathionreduktase 30 mM Glutathion
Reaktionspuffer Lipidhydroperoxidation	0,2 mM Tris HCl (pH8,8) 3 mM Na Desoxcholat- Lösung) 250000 U Lipoxidase Typ IV
McIlvaine-Puffer	50mM Zitronensäure (pH 6,8) 100mM Na_2HPO_4
Reaktionspuffer GSH/GSSG Assay	0,2 M Tris pH 8 0,1 mM EDTA 1,5 mM NADPH 0,5 mM DTNB

PBS	140mM NaCl 10mM Na_2HPO_4
Trypsin-EDTA: PBS (1:1)	0,5g/L Trypsin 0,2g/L Na-EDTA PBS
10x-Puffer für PCR	200 mM Tris-HCl 500 mM KCL 15 mM $MgCl_2$ pH 8,3

2.3 Enzyme und Primer (PCR)

Superscript RNAse H-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad
Taq Polymerase	Quiagen, Hilden

GPx1-sense	5'-TCATCCTCAAAGAAAGTGTATTGG-3'
GPx1-antisense	5'-AGTAGGAGTTTCTTTCACATAACC-3'
GPx4-sense	5'-CAGATCACGAGGTCAGGAGA-3'
GPx4-antisense	5'-GTCTAGTGCTCCAGTCCTCT-3'
HPRT-sense	5'-ATTCTTTGCTGACCTGCTGGATT-3'
HPRT-antisense	5'-CTTAGGCTTTGTATTTTGCTTTTC-3'

2.4 Verbrauchsmaterialien

Zellkultureinsätze	Becton Dickinson, Le Pont de Claix
Zellkultur-Materialien	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläschen	Assistent
Kryotubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulose-Membran Hybond-C Extra	Amersham Biosciences, Freiburg
Whatman-Filterpapiere	Roth, Karlsruhe
Bio-Max-Film	Kodak, Stuttgart

2.5 Geräte

Analysenwaage AB 204-S	Mettler Toledo, Schweiz
Elektro-Blot-Apparatur	Roth, Karlsruhe
CCD Kamera (ORCA II) Digital Kamera	Hamamatsu, Japan
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Clean Air Sterilbank	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Criterion Electrophorese-Kammer	Bio-Rad, München
Diana III Raytest-Kamera	Raytest, Straubenhardt
Femtotip-I-Kapillaren	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenz-/Lichtmikroskop Axiovert 100 TV	Carl Zeiss, Oberkochen
Heraeus Inkubator	Kendro, Langenselbold
Magnet-Rührer	Janke+Kunkel IKAMAG©RCT, Staufen
Mikroinjektor	InjectMan, Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Braun, Melsungen
Milli-Q Anlage	Millipore, Eschborn
Neubauer-Zählkammer	Brand, Göttingen
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg
Powersupplier Power Pac Basic™	Bio-Rad, München
Primus 96 plus PCR-Maschine	MWG AG Biotech, Schweden
RM-5-Assistant Rollschüttler	Braun, Melsungen

Schüttler Rotamax 120	Heidolph-Instruments, Schwabach
Ultrasonic Disintegrater No. 7100	M.S.E., Lorch
Vortexer	Janke+Kunkel Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Düsseldorf

2.6 Software

AIDA Image Analyzer v.3.1
GraphPad Prism 3.0
Diana III Camera Control
Aqua Cosmos

2.7 Charakteristika der verwendeten Zelllinien

HDF - humane dermale Fibroblasten

HDF sind humane Hautfibroblasten, die von Praeputien gesunder 2-12jähriger Jungen stammen und bei Zirkumzisionen gewonnen wurden. Die zur Isolation der Zellen verwendeten Biopsien erhielten wir freundlicherweise von Dr. Meyer aus der Praxis-Klinik Grevenbroich.
Für die Experimente wurden die Zellen zwischen Passage 2-12 verwendet.

SCL1

Die SCL1-Zellen sind wenig differenzierte menschliche Plattenepithelkarzinomzellen der Haut, die ursprünglich aus dem Karzinom einer 74-jährigen Frau stammen. Die Zellen erhielten wir freundlicherweise von Dr. Norbert Fusenig aus dem DKFZ in Heidelberg.

2.8 Isolation von Fibroblasten aus Biopsien

Vor Beginn der Isolation wurden die Biopsien in kaltem PBS (140mM NaCl, 10mM Na_2HPO_4) einmal gewaschen und daraufhin erneut für eine Minute in PBS mit 20µg/ml Gentamyzin gewaschen. Anschließend wurde das Fettgewebe großzügig mit einem Skalpell entfernt, wobei darauf zu achten war, dass die Biopsie nicht austrocknet. Dann wurde die Biopsie in möglichst kleine Stücke zerteilt, die nicht größer als 5mM sein sollten. Diese Stücke wurden mit der Dermisseite nach unten auf eine Petrischale gelegt und 10min angetrocknet. Anschließend wurde DMEM mit 20% FCS dazugegeben. Die Schalen sollten möglichst wenig bewegt werden, um das Ablösen der Hautstücke zu verhindern. Nach einigen Tagen wuchsen zuerst epitheliale Zellen aus der Biopsie nach außen. Unter diesen wuchsen dann einige Tage später die Fibroblasten heraus. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Fibroblasten trypsiniert und im Folgenden unter Aufrechterhaltung des hohen Serumanteils weiterkultiviert werden. Nur die Fibroblasten sind in dem stark serumhaltigen Medium kultivierbar.

2.9 Stammhaltung und Anzucht der Zellen

Die Hautfibroblasten und die SCL1-Zellen wurden in Dublecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM-Medium), das mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert wurde, in einer wasserdampfgesättigten, auf 37°C temperierten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert.
Nach Erreichen einer 80-90%-igen Konfluenz wurden alle Zellen zuerst mit PBS (140mM NaCl, 10mM Na_2HPO_4) gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS Lösung (0,5g/L Trypsin; 0,2g/L Na-EDTA) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2-5min durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt, die Zellen wurden resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen überführt.

Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde die kumulative Populationsdichte bestimmt. Diese errechnet sich wie folgt:

$$\frac{\log(\text{Zellzahl nach Passage}) - \log(\text{eingesäte Zellzahl})}{\log(2)} = PD$$

$$CPD = \Sigma PD$$

Abb. 8 Bestimmung der kumulativen Populationsdichte CPD.

Die Fibroblasten wurden bis zu einer CPD von 20 verwendet. Die SCL1-Zellen wurden unabhängig von ihrer CPD verwendet. Alle verwendeten Zellen wurden in regelmäßigen Abständen durch DNA-Färbung oder PCR auf Mycoplasmenkontamination hin untersucht.

2.10 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Alle Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA:PBS Lösung (0,5g/L Trypsin; 0,2g/L Na-EDTA) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2-5min durch Zugabe von FCS-haltigem Medium abgestoppt. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (DMEM-Medium mit 20% FCS und 5% DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryotubes bei -80°C eingefroren.
Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und in eine 75 cm^2 Kulturflasche mit Komplettmedium überführt. Um den DMSO-Gehalt in dem Medium auf unter 1% zu reduzieren und dadurch einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde sowohl nach 4-5 h als auch nach 24h ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.11 Herstellung von konditioniertem Medium

Fibroblasten und SCL1-Zellen wurden bis zur Konfluenz in serumhaltigem Medium in 750ml Zellkulturflaschen kultiviert. Nach zweimaligem Waschen wurde das serumhaltige Medium gegen 12ml serumfreies Medium ausgetauscht und für 48h inkubiert, um die von den Zellen in das serumfreie Medium sezernierten Bestandteile zu gewinnen. Nach Abzentrifugieren von Zelltrümmern wurde der Überstand entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C bis zu vier Wochen aufbewahrt. Konditionierte Medien werden wie folgt benannt:
CM^{HDF} steht für konditioniertes Medium von humanen dermalen Fibroblasten (conditioned medium von *h*umanen *d*ermalen *F*ibroblasten) und CM^{SCL1} für konditioniertes Medium von SCL1-Plattenepithelkarzinomzellen.

2.12 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Bei Mykoplasmen handelt es sich um zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, welche parasitär Zellen befallen können. Mykoplasmen können das geregelte Zellwachstum beeinflussen bzw. die Reaktionen von Zellen auf bestimmte Stimuli verändern. Durch den Einsatz des fluoreszierenden Farbstoffes Bisbenzimid erfolgte die Kontrolle der Zellkulturen. Zellen wurden in einer Dichte von etwa 1000 Zellen/cm^2 auf einem Deckgläschen kultiviert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die nicht konfluenten Zellen auf dem Deckgläschen mit 2ml PBS gewaschen und für 10min in 1 ml Carnoy's Fixativ (Methanol/Eisessig, 3:1) fixiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit McIlvaine-Puffer (pH 6,8; 50mM Zitronensäure, 100mM Na_2HPO_4,) und eine 15minütige Inkubation in 1ml Bisbenzimid-Lösung (0,05µg/ml). Nach zweimaligem Waschen mit dH_2O konnte das Deckgläschen mit den Zellen auf einen Objektträger mit 20µl Einbettmedium fixiert werden. Innerhalb der nächsten 20min wurden die angefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350nm und einer Emissionswellenlänge von 460nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Durch den Farbstoff Bisbenzimid wird selektiv DNA angefärbt. Nicht kontaminierte Kulturen zeigten eine deutliche hellblaue Fluoreszenz, welche ausschließlich auf den Zellkern beschränkt ist. Zellkulturen mit Mykoplasmen zeigten neben dem fluoreszierenden Zellkern eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der äußeren Zellmembran und zwischen den Zellen. Die

Mykoplasmen erschienen entweder als gleichmäßig über die Zytoplasmamembran verteilte Partikel, oder sie bildeten Aggregate auf der Zelloberfläche und/oder zwischen den Zellen. Kontaminierte Zellen wurden autoklaviert und entsorgt.

2.13 Vitalitätsbestimmung von Zellen – MTT-Test

Der nachfolgend beschriebene MTT-Test dient dazu, die Vitalität von Zellen in der Zellkultur insbesondere nach der Applikation bestimmter Stressfaktoren wie Inkubation mit chemischen Agenzien zu bestimmen. Bei diesem Test wird das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein blaues, unlösliches Formazansalz umgewandelt. Die Absorption des Formazansalz wird als Maß für die Vitalität der Zellen angesehen und kann photometrisch bestimmt werden.

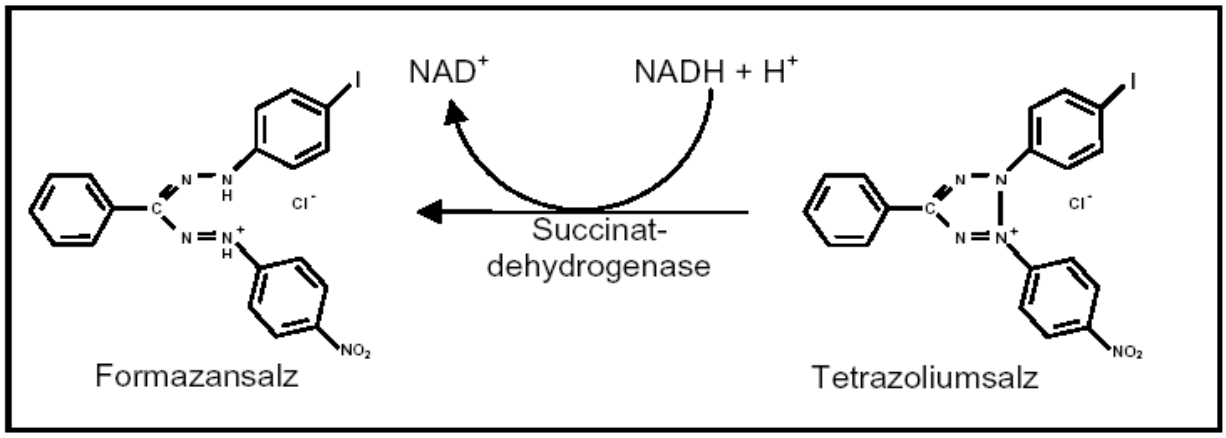


Abb. 9 Prinzip des MTT-Tests: Bildung von Formazansalz als Parameter für dieVitalität von Zellen.

Zur Aufnahme des Tetrazoliumsalzes wurden die Zellen mit einer 10%igen MTT-Lösung in DMEM für 1-2h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Aufnahme wird das Tetrazoliumsalz von einer mitochondrialen Succinatdehydrogenase chemisch modifiziert. Es werden Wasserstoffionen von dem Enzym auf das Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch der Tetrazoliumring gespalten wird und ein blaues, unlösliches Formazansalz entsteht (Abb. 9). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das MTT-haltige DMEM abgesaugt und die Zellen wurden mit DMSO solubilisiert. Das in DMSO gelöste Formazan wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 560nm mit einer Referenzwellenlänge von 690nm quantifiziert. Der Nullabgleich erfolgte dabei durch Messung von reinem DMSO. Die

Vitalität der Zellen bzw. die Zytotoxizität einer Behandlung wurde als Prozent der Formazan-Bildung der behandelten Zellen, verglichen mit der Formazan-Bildung unbehandelter Zellen, bestimmt:

$$\%\ \text{Vitalität} = \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}} \times 100$$

$$\%\ \text{Zytotoxizität} = \left[1 - \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}}\right] \times 100$$

Abb. 10 Berechnung der Toxizität.

2.14 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen erfolgten auf Basis der Methode nach Lowry unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad, DC) gegen Standards aus Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers.

2.15 Allgemeine Versuchsbedingungen

Die verwendeten Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt.

Alle im Ergebnisteil gezeigten Experimente wurden, sofern nicht anders beschrieben, dreimal unabhängig durchgeführt. Mikroinjektionsexperimente wurden in Box-Whiskers-Blots aufgetragen, die Signifikanzen wurden nach Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Zur quantitativen Darstellung der gemessenen Kommunikationswerte werden „Box-Whiskers-Plots“ verwendet. Diese zeigen den Medianwert (Linie in der Mitte), die 25% Quartile (unterer Teil der Box), die 75% Quartile (oberer Teil der Box) sowie Minimal- und Maximalwerte (untere und obere vertikale Linie). Die Verteilung der Werte ist nicht parametrisch nach Gauss. Die Analyse der Signifikanz erfolgte durch Mann-Whitney-Test, Wilcoxon-Test und Kruskal-Wallis-Test. Alle weiteren Signifikanzen, deren Werte parametrisch nach Gauss verteilt sind, wurden nach Student´s T-Test ermittelt. *P < 0,05; **P < 0.01 und ***P < 0.001 wurden vor der Studie als Signifikanzgrenzen festgelegt. Alle verwendeten Substanzen wurden vor Verwendung mittels MTT-Test auf Toxizität hin

überprüft. Die Zellen wurden ausschließlich mit Konzentrationen behandelt, die nach 48h-72h Inkubation eine Überlebensrate von >80% erzielten. Bis zum Zeitpunkt des Experiments befanden sich alle Zellen in Vollmedium.
Die Experimente wurden, sofern nicht anders beschrieben, alle in HDF konditioniertem Medium (CM^{HDF}) durchgeführt.

2.16 Kommunikationsassay (Mikroinjektion)

Die Bestimmung der relativen Zell-Zell-Kommunikation erfolgte durch die intrazelluläre Mikroinjektion einer 10%igen (w/v) Lösung des Fluoreszenz-Tracer-Farbstoffes Lucifer Yellow CH (Abb. 11). Dieser nichttoxische Tracer liegt aufgrund des niedrigen pKa-Wertes zweier Sulfonsäuregruppen bei physiologischem pH-Wert als Kation vor, wodurch intakte Membranen für diesen wasserlöslichen Farbstoff impermeabel sind und so eine unspezifische Membrandiffusion ausgeschlossen ist.

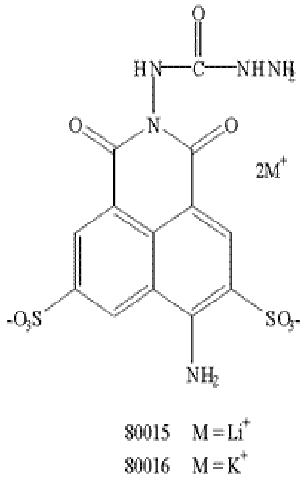


Abb. 11: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow.

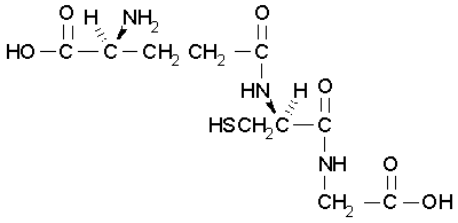
Das Prinzip der Farbstoff-Transfer-Tests beruht auf der Diffusion des injizierten Farbstoffes von der injizierten Zielzelle über die *gap junctions* in die benachbarten Zellen. Nach genau einer Minute werden die fluoreszierenden Zellen, mit Ausnahme der injizierten Zelle, ausgezählt. Es lässt sich somit eine Aussage über den relativen Kopplungsgrad des Zellverbandes und den relativen Öffnungsgrad der *gap junctions* treffen.

Die Mikromanipulation erfolgte mittels einer Gerätekombination aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Köln), einem Mikromanipulator (FemtoJet, Eppendorf, Hamburg) und einem semiautomatischen Mikroinjektor (InjectMan, Eppendorf, Hamburg). 50 bis 200 Femtoliter der Lucifer Yellow CH-Lösung wurden mittels Femtotip-I-Kapillaren (Eppendorf, Hamburg) bei einem Injektionsdruck von 150 hPa, einer Injektionsdauer von 0,5 Sekunden und einem Kompensationsdruck von 50 hPa zytoplasmatisch in eine Zielzelle injiziert.
Zur Messung der ZZK wurde pro Kulturschale jeweils in 10 zufällig ausgewählte Zellen injiziert. Die Anregungswellenlänge von Lucifer Yellow liegt bei 426nm und das Emissionswellenlängenmaximum bei 540nm. Die zu messenden Zellen wurden in 35mm-Zellkulturschalen bis zur Konfluenz herangezogen, und dann wurde das jeweilige Experiment durchgeführt.

2.17 Nachweis von Glutathion

Glutahion ist ein Tripeptid, bestehend aus Glycin, Cystein und Glutamat. Glutamat ist in diesem Peptid in γ-Position mit Cystein verknüpft. Glutathion kann in oxidierter Form (GSSG) als Dimer und in reduzierter Form (GSH) als Monomer vorkommen. Es dient in der Zelle als Kosubstrat für verschiedene antioxidativen Enzyme, wie beispielsweise der Glutathionperoxidase (GPx), und wird von diesen oxidiert. Das eigentliche Substrat (z.B. H_20_2) dieser Enzyme wird dabei reduziert.
Der Versuchsaufbau ist ein enyzmgekoppelter Versuch, der auf der abnehmenden Extinktion von NADPH basiert, welches von der hinzugegebenen Glutathionreduktase für die Reduktion von GSSG zu GSH verbraucht wird.
Mittels 5,5´Dithio- bis (2-) nitrobenzoesäure (DTNB) wird ein Zyklus der Reduktion und Oxidation in Gang gesetzt, der mit einem Verbrauch von NADPH durch die Glutathion-reduktase messbar gemacht wird.

Reduziertes Glutathion (GSH)



Oxidiertes Glutathion (GSSG)

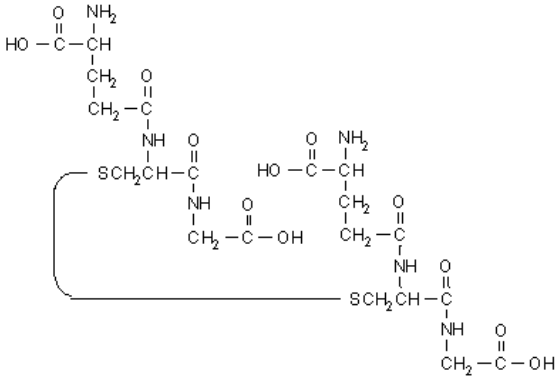


Abb. 12 Strukur von reduziertem und oxidiertem Glutathion.

1 Mol DTNB wird jeweils durch 2 Mol GSH zu 2 Mol 5-Thio-nitrobenzoesäure (TNB) reduziert, wobei TNB nicht weiter oxidiert werden kann und im weiteren Verlauf nicht mehr zur Verfügung steht. Die 2 Mol GSH werden in dieser Reaktion zu 1 Mol GSSG oxidiert, welches wiederum durch die Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch zu 2 Mol GSH reduziert wird. Es erfolgt mit steigender Konzentration von Glutathion eine stärkere Abnahme von NADPH, welche photometrisch beobachtet wird.

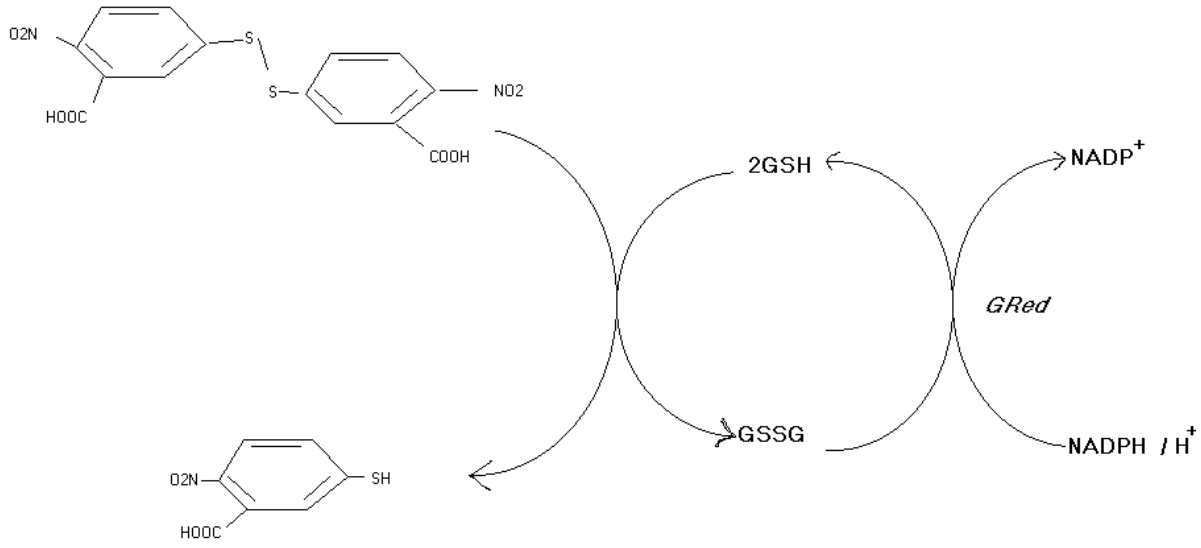


Abb. 13 Reaktionsweg der Nachweisreaktion von Glutathion mittels DTNB (siehe Text).

DTNB und NADPH werden im Überschuss hinzugegeben, so dass der geschwindigkeits-bestimmende Faktor die Glutathionkonzentration ist.

GSSG-Messung:

Durch Vorbehandlung der Proben mit 2-Vinylpyridin und Triethanolamin wird das vorher in der Probe enthaltende GSH eliminiert, so dass hier der geschwindigkeitsbestimmende Faktor die GSSG-Konzentration ist. Die Reaktion läuft dann vom GSSG zu GSH via Glutathion-reduktase ab. Das entstandene GSH wird dann wiederum durch DTNB wie oben beschrieben weiter oxidiert.

Probenaufbereitung, Versuchsablauf und Berechnung:

Zellen einer Zellplatte mit 10 cm Durchmesser wurden bei 90 bis 100 prozentiger Konfluenz mit PBS gewaschen, getrocknet und bei -70ºC eingefroren. Danach wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 250µl 0,01N HCL-Lösung abgeschabt und sonifiziert.

Jeweils 100µl wurden für den Nachweis von oxidierten und reduzierten Glutathion verwendet, jeweils 50µl für die Proteinbestimmung.

Zu den Proben für die Glutathionbestimmung wurde 5-Sulfosalizyl-Säure (Endkonzentration 5%) hinzugegeben. Die Proben wurden für 5min bei 4° und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert.

Für die Bestimmung des reduzierten Glutathions wurden 40µl des Überstands verwendet. Für die Bestimmung des oxidierten Glutathions wurde der Überstand wie folgt weiterbehandelt:

Zur Elimination des reduzierten Glutathions werden 100µl der Probe mit 2µl 2-Vinylpyridin und 6µl Triethanolamin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 40µl für die Messung verwendet.

Die Messung sowohl des reduzierten als auch des oxidierten Glutathions erfolgte mit 40µl der Probe und 360µl des Reaktionspuffers. Jeweils 100µl wurden in eine Kammer einer 96-Well-Platte transferiert. Die Reaktion wurde mit 10µl einer 10-20 U/ml-haltigen Glutathion-reduktase-Lösung gestartet. Gemessen wurde bei 412nm über einen Zeitraum von 5 Minuten.

Auswertung:

Ein erhöhter Level von oxidiertem (GSSG) im äquimolaren Verhältnis zu reduzierten Glutathion (2GSH) ist ein Merkmal für eine erhöhte Aktivität glutathionabhängiger antioxdiativer Enzyme und stattgefundenen oxidativen Stress.

2.18 Herstellung von Phosphatidylcholinhydroperoxid

Die Herstellung des Substrates Phosphatidylcholinhydroperoxid für die Aktivitätsmessung der pH-GPx erfolgte nach der beschriebenen Methode von M. Maiorino [Maiorino et al, 1990].
Es handelt sich um eine enzymatische Hydroperoxidation von Phosphatidylcholin durch die Phosphatidylcholin Lipoxidase Typ IV.
L-α-Phosphatidylcholin aus der Sojabohne wirde mit Stickstoff (N_2) begast. Es bleibt ein Pellet, welches in 1ml einer Pufferlösung (0,2M Tris HCl, pH 8; 3mM Desoxycholat) aufgenommen wird.
Das L-α-Phosphatidylcholin in der Pufferlösung wurde zu dem Reaktionspuffer (22ml einer 0,2mM Tris HCl (pH 8,8); 3mM Na Desoxycholat-Lösung) hinzugegeben und für 30min mit 25.0000 U Lipoxidase Typ IV unter Raumtemperatur inkubiert.
Eine Aufreinigung erfolgt mit einer Sep-Pak C18 Säule, welche vorher mit Methanol gewaschen und anschließend mit H_20 äquibriliert wurde. Der Reaktionsansatz wird aufgeladen, und nach einem 10minütigen Waschen mit 220ml H_20 wird Phosphatidylcholinhydroperoxid mit 2-3ml Methanol eluiert.
Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch nach Y. Bao [Bao Y, 1995 Anal Biochem 224,395] bei 232nm (ε/ 2.500*Mol=M).

2.19 Aktivitätsmessung der zytosolischen und membranständigen Glutathionperoxidase

Die GPx1 und GPx4-Aktivität wurde nach der Methode von Imai [Imai et al, 1998] gemessen.
Die Aktivitätsmessung der Glutathionperoxidase (GPx) ist eine photometrische enzymgekoppelte Nachweisreaktion.
Konfluente Zellen eines 10cm Dish wurden in 500µl eines 0,1M Tris-HCL, pH 7.4 Puffers (mit 5mM beta-Mercaptoethanol; 0,5µg/ml Leupeptin; 0,7µg/ml Pepstatin A; 100 µg/ml PMSF) aufgenommen. Durch Sonifizierung wurden die Zellen aufgeschlossen. Das Homegenat wurde für 10min bei 4°C bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, eine Aufbewahrung der Proben bei -70°C ist möglich. Es erfolgte eine Proteinbestimmung.

Für den Versuchsansatz wurden 0,5mg Protein des Überstands verwandt und auf 1 ml mit der Reaktionslösung aufgefüllt (Reaktionslösung 1ml: 0,1M Tris-HCL, pH 8.0; 2mM EDTA; 1.5mM NaN3; 0,1 % TritonX-100; 15 IU/ml Glutathionreduktase; 30mM Glutathion).

Der Reaktionsansatz mit dem Zellüberstand inkubierte für 8min bei 37°C, anschließend folgte eine Zugabe von 100µl NADPH (2mM in 0,1% $NaHCO_3$) und eine weitere 8minütige Inkubation bei 37°C.

Die Reaktion wurde mit 100µM des Substrates tert-butylhydroxyperoxid oder 100µM Wasserstoffperoxid für die GPx1 bzw. 30µM Phosphatidylcholinhydroperoxid für die GPx 4 gestartet. Die Absorptionsabnahme wurde photometrisch bei 340nm gemessen (Diagramm 1).

Die Spektrographie erfolgte nach Abgleich des Spektrums des Reaktionspuffers. Die Aktivität wurde nach Abzug der Autooxidation des NADPH aus der Absorptionsabnahme berechnet.

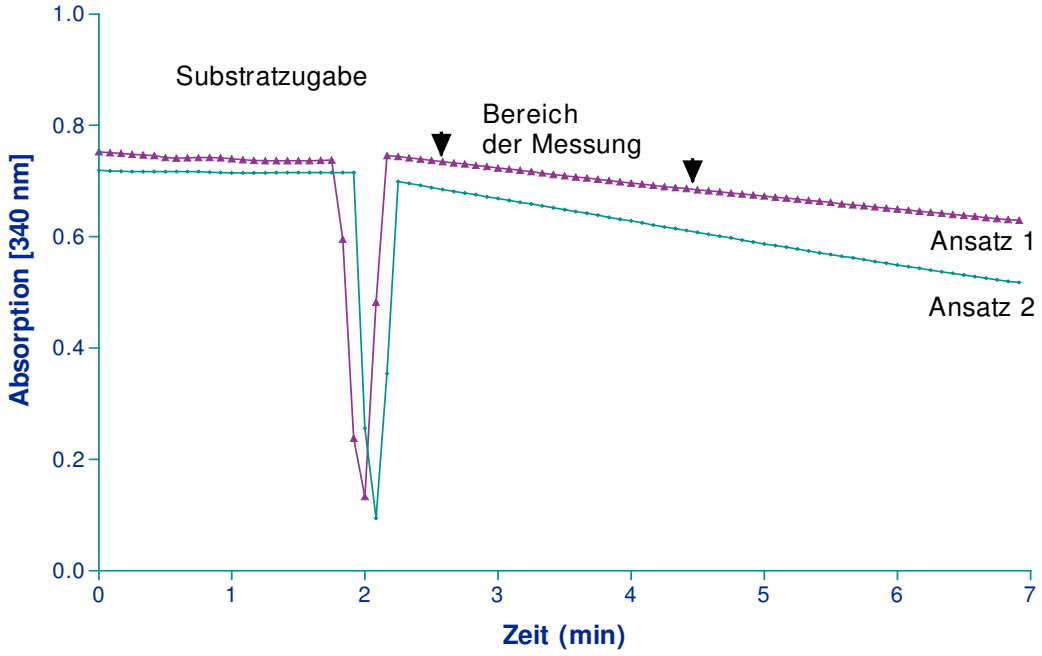


Diagramm 1: Messung der GPx–Aktivität.
Nach 3minütiger Inkubation des Zelllysats im Reaktionspuffer mit NADPH und dem Enzym Glutathionreduktase bei 37°C in der Messküvette wird das Substrat hinzugegeben. Gemessen wird die Abnahme des NADPH im Spektrophotometer bei 340nm.

2.20 Lipidperoxidationsassay

Mit Hilfe dieses Assays konnte die Zunahme von Lipidhydroperoxiden innerhalb der Zelle nach Behandlung mit konditioniertem Medium von SCL-1 Tumorzellen gemessen werden. Die Isolierung und Messung der Lipidhydroperoxide aus Fibroblasten wurde unter Verwendung des Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit (Cayman Chemicals, Grünberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden HDF auf Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10cm ausgesät. Das Experiment wurde mit konfluenten Zellen durchgeführt. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 500µl H_2O (+50 µM BHT). Zu dem Lysat wurden anschließend 500 µl Extract R hinzugefügt und kurz gevortext. Weiter wurde 1ml kaltes Chloroform dazugegeben und gevortext. Das Gemisch wurde dann 5 Minuten mit 1.500 x g bei 0°C zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen, wobei für die weitere Extraktion nur die untere Chloroform-Phase verwendet wurde. Zu 500µl der unteren Phase wurden 450µl eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2:1) pipettiert. Im nächsten Schritt wurde das Chromophor vorbereitet, indem FTS-Reagent 1 und FTS-Reagent 2 im Verhältnis 1:1 vermischt wurden. 50µl dieses Chromophors wurden dann zu den Proben dazugegeben und gevortext. Das fertige Gemisch aus Chromophor und Proben wurde anschließend 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Absorption der entstandenen Lösung wurde bei 500nm gemessen.
Zu jedem Experiment wurde zusätzlich eine Standardmessung (Tab. 3) durchgeführt. Um verschiedene Konzentrationen für den Standard zu erhalten, wurde die Stammlösung mit dem Chloroform/Methanol wie folgt verdünnt:

	HP Standard (µl)	**Methanol (µl)**	**Endkonzentration HP (nmol)**
A	0	950	0
B	10	940	0,5
C	20	930	1,0
D	30	920	1,5
E	40	910	2,0
F	60	890	3,0
G	80	870	4,0
H	100	850	5,0

Tabelle 3: Zusammensetzung des Hydroperoxid (HP)-Standards. Die Endkonzentration ist in nmol/ml angegeben.

In Diagramm 2 ist ein Beispiel für den HP-Standard dargestellt, mit dem der Lipidhydroperoxidgehalt der Proben berechnet werden konnte.

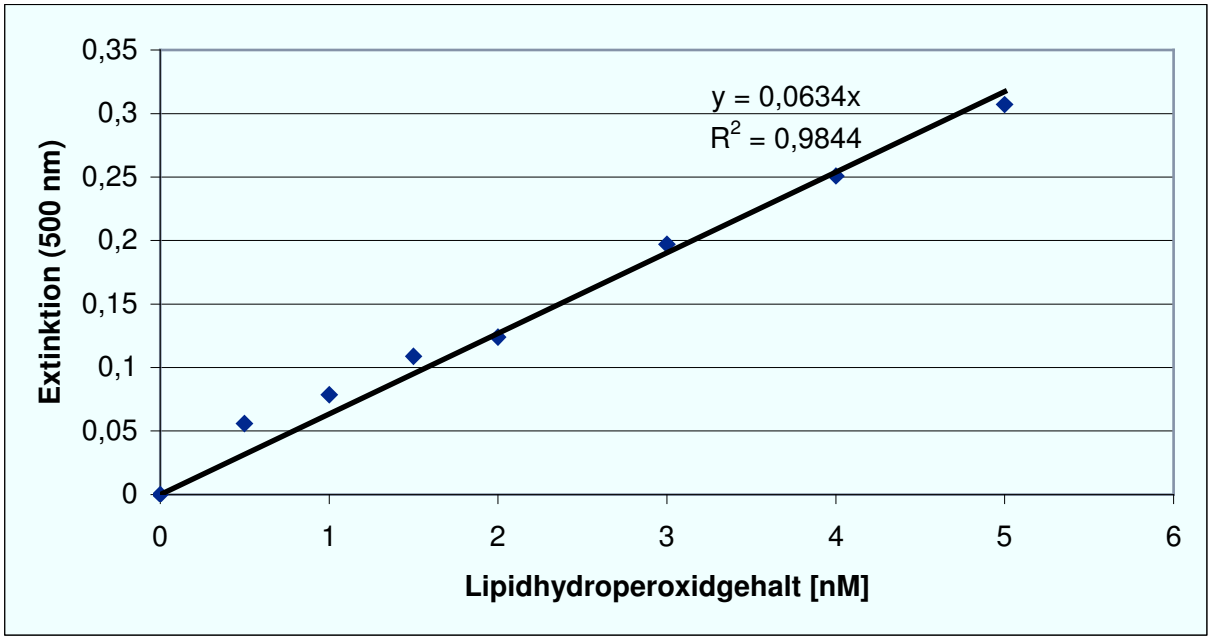


Diagramm 2: Graphische Darstellung eines HP-Standards zur Berechnung des Lipidhydroperoxidgehalts einer Probe.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Selen auf humane dermale Fibroblasten (HDF) untersucht, die mit konditioniertem Medium (CM) der epidermalen Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL1 behandelt wurden.
Die Inkubation der Fibroblasten mit konditioniertem Medium von Tumozellen stellt ein vereinfachtes Modell der Tumor-Stroma-Interaktion dar.
Untersucht wurde der Einfluss von Selenit auf die interzelluläre Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) der mit konditioniertem Medium der Tumozellen behandelten Fibroblasten.

Die vorliegende Arbeit basiert auf Vorarbeiten von Stuhlmann et al [2003, 2004]
Die Eckpunkte dieser Arbeiten sind zusammengefasst:
1.) Eine Inkubation konfluenter Hautfibroblasten mit konditioniertem Medium von SCL1-Tumorzellen führt zu einer schnellen Verminderung der ZZK. Diese ist reversibel [Stuhlmann et al, 2003].
2.) Das konditionierte Medium von Tumorzellen führt über einen parakrinen Mechanismus zu einer endogenen Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies, die für den Verlust der homologen ZZK der Fibroblasten verantwortlich ist [Stuhlmann et al, 2004].
3.) Natriumselenit sorgt für den Erhalt der direkten ZZK konfluenter Hautfibroblasten über einen bisher unbekannten Mechanismus.
An diesem letzten Punkt (3.) setzt die hier vorliegende Arbeit an.

3.1 Selen regeneriert die homologe Zell-Zellkommunikation von Fibroblasten

Verschiedene Konzentrationen von Natriumselenit wurden mittels eines MTT-Test auf ihre Toxizität überprüft. Eine Konzentration von bis zu 1 µM Na_2SeO_3 (Natriumselenit) erwies sich als nicht toxisch, die Überlebensrate betrug nach 48h Inkubationszeit 80% (Abb. 14). Erst ab einer Konzentration von 10µM konnte eine deutliche Zytotoxizität von Natriumselenit nachgewiesen werden. In den folgenden Experimenten wurde aufgrund der geringen Toxizität nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden und beobachtbaren Effekten [Stuhlmann et al, 2003] eine Konzentration von 0,5µM Natriumselenit gewählt.

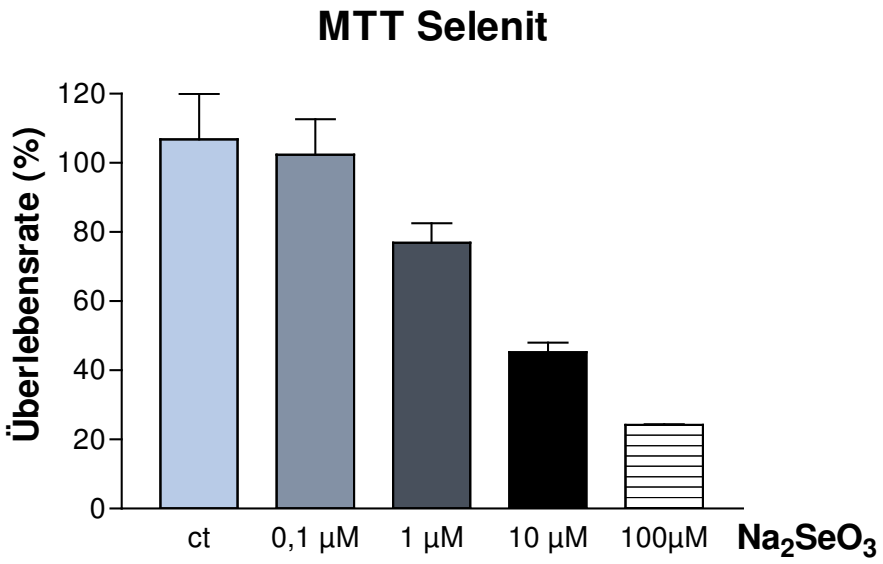


Abb. 14 MTT Zytotoxizität von Selen auf HDF.
Fibroblasten wurden insgesamt 48h mit den Konzentrationen 0,1; 1; 10 und 100µM Na2SeO3 inkubiert, anschließend erfolgte die Bestimmung der überlebenden Zellen photometrisch mittels des MTT-Tests. Die Experimente wurden im Triplikat durchgeführt.

In der Mikroinjektion dienten Fibroblasten als Kontrolle, die 48 Stunden jeweils mit und ohne Natriumselenit in konditioniertem Medium von Fibroblasten (CM^{HDF} und $CM^{HDF,Selenit}$) inkubiert wurden, weiterhin Fibroblasten, die 24h nach der Inkubation in CM^{HDF} für weitere 24h mit konditioniertem Medium von Tumorzellen (CM^{SCL1}) behandelt wurden. Die Messung der ZZK erfolgte mittels der Mikroinjektion von Lucifer-Yellow und anschließender mikroskopischer Auswertung der gefärbten Zellen (Abb.15).

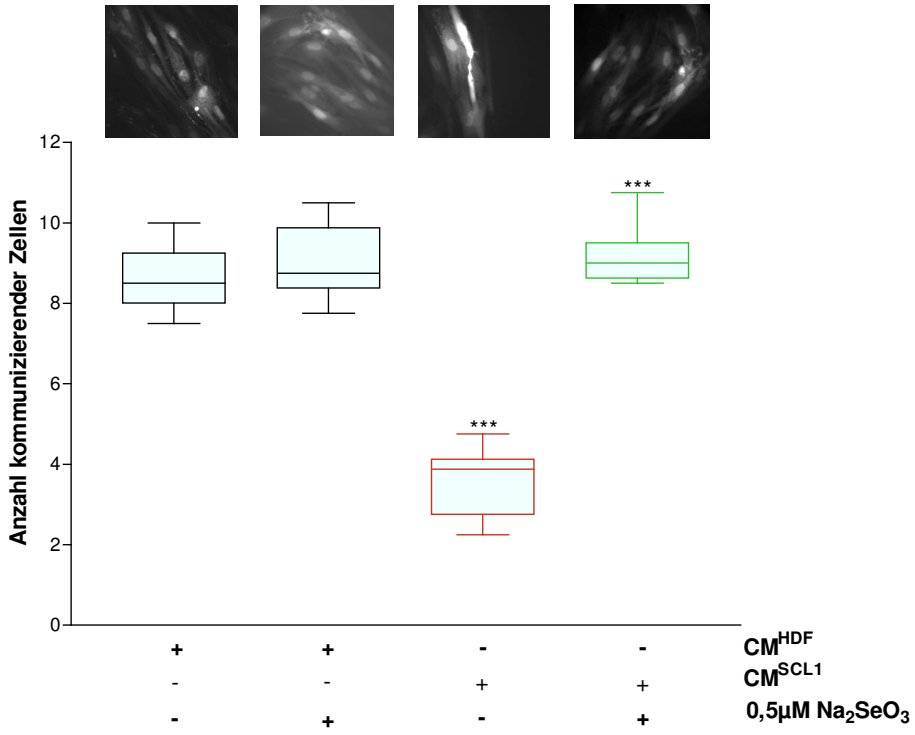


Abb. 15 Selenit hebt die Verminderung der gap-junctionalen ZZK durch CM^{SCL1} auf.
Um den durch Tumorzellen ausgelösten Effekt von Natriumselenit auf die homologe ZZK von Fibroblasten zu zeigen, wurden konfluente Fibroblasten mit 0,5µM Natriumselenit in konditioniertem Medium (CM^{HDF}) für 24h vorinkubiert. Danach erfolgte eine 24stündige Inkubation mit konditioniertem Medium der Plattenepithelkarziomzelllinie SCL1 (CM^{SCL1}) und Natriumselenit ($CM^{SCL1,Selenit}$). Die gap junction-abhängige Kommunikation wurde mittels Mikroinjektion an unbehandelten (CM^{HDF}), für 24h mit CM^{SCL1} und mit CM^{SCL1} plus Na_2SeO_3 ($CM^{SCL1,Selenit}$) behandelten Fibroblasten gemessen. Das Experiment wurde dreimal jeweils im Duplikat durchgeführt.
Oberhalb der Tabelle sind repräsentative Fotos der gap junctionalen Kommunikation der Fibroblasten abgebildet.
******p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; *** p<0,001 $CM^{SCL1, Selenit}$ gegenüber CM^{SCL1}.***

Eine Inkubation mit Selenit in CM^{HDF} ($CM^{HDF,Selenit}$) im Vergleich zu den nur mit CM^{HDF} behandelten Zellen zeigte keinen Einfluss auf die ZZK der Fibroblasten (Abb. 15), eine Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen (CM^{SCL1}) vermindert die ZZK signifikant. Die Daten sind als Box-Whisker-Blot oder auch Kastengrafik aufgetragen. Gezeigt werden in dieser Darstellung jeweils der Median (Mittellinie im Kasten), das obere und untere Quartil (jeweils der Teil des Kastens ober- bzw. unterhalb des Medians) sowie der obere und der untere Extremwert (die verlängerte Linie, die aus dem jeweiligen Quartil herausragt).

Der Median der Zahl kommunizierender Fibroblasten, die mit CM^{HDF} behandelt wurden, betrug 9 Zellen, der Median der Zahl kommunizierender Fibroblasten, die mit CM^{SCL1} behandelt wurden, betrug 3 Zellen. Wenn die Zellen mit Selenit in CM^{HDF} vorinkubiert und danach mit konditioniertem Medium von Tumorzellen und Selenit behandelt wurden, wurde der Effekt des konditionierten Mediums von Tumorzellen aufgehoben und die homologe ZZK auf ein vergleichbar hohes Niveau der mit CM^{HDF} behandelten Zellen angehoben. Der Median der Zahl kommunizierender Fibroblasten unter $CM^{HDF,Selenit}$-Behandlung betrug 9 Zellen.

Eine physiologisch besser verträgliche Selenquelle als Natriumselenit ist Selenomethionin [Combs, 1986]. Selenomethionin trägt anstelle der Hydoxylgruppe im Methioninmolekül ein Selen-Wasserstoffmolekül. Um zu überprüfen, ob der Effekt von Selen auch in dieser Darreichungsform nachweisbar ist, wurden Fibroblasten mit Selenomethionin und konditioniertem Medium von Tumorzellen inkubiert und anschließend wurden Mikroinjektionsexperimente durchgeführt.

Zuvor wurden verschiedene Konzentrationen von Selenomethionin in einem Zellüberlebenstest analog zum Natriumselenit durchgeführt. Eine nicht-toxische Konzentration von 1µM SeMeth (Überlebensrate >80% nach 48h) wurde als Standardkonzentration benutzt.

Der Versuchansatz zeigt (Abb. 16), dass Selenomethionin denselben kommunikations-erhaltenden Effekt auf die mit konditioniertem Medium von Tumorzellen behandelten Fibroblasten hat wie Natriumselenit. Des weiteren zeigt sich, dass dieser Effekt ohne Vorinkubation durch eine alleinige, 24stündige parallele Inkubation von SeMeth und CM^{SCL1} erreicht wird.

Obwohl Selenomethionin besser verträglich ist, allerdings eine geringere Bioverfügbarkeit als Natriumselenit hat, wurde in den weiteren Experimenten Natriumselenit verwendet [Combs, 1986; Whangler et al, 1998; siehe 1.1.1.2].

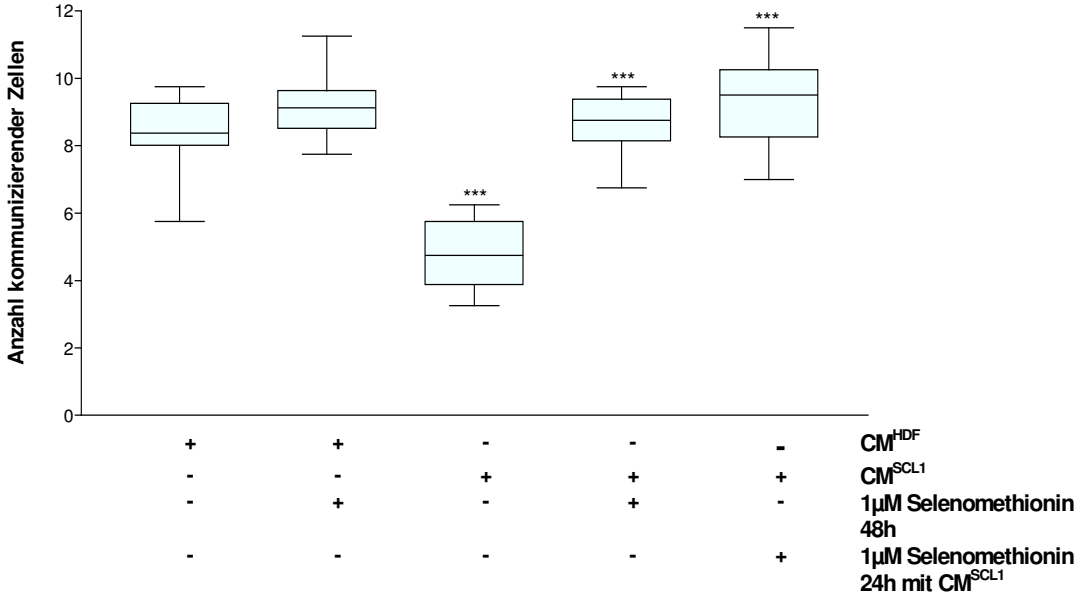


Abb. 16 Selenomethionin hebt die Verminderung der ZZK durch CM^{SCL1} auf.
Die Inkubationsbedingungen der ersten vier Versuchsgruppen sind mit denen der vier Versuchsgruppen der Abb. 15 identisch. Als Erweiterung erfolgte nach 24stündiger Vorinkubation mit konditioniertem Medium von Fibroblasten eine Koinkubation von konditioniertem Medium von Tumorzellen (CM^{SCL1}) und 1µM Selenomethionin ($CM^{SCL1,SeMeth}$). Anschließend wurden Mikroinjektionsexperimente durchgeführt Das Experiment erfolgte dreimal jeweils im Duplikat. ***p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; ***p<0,001 $CM^{SCL1,SeMeth}$ gegenüber CM^{SCL1}.

Zur Beantwortung der Frage, wann die regenerierende Wirkung von Selenit auf die ZZK eintritt, wurde eine zeitgleiche Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen und Selenit ($CM^{SCL1,Selenit}$) mit anschließenden Mikroinjektionsexperimenten zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Behandlung von konfluenten Fibroblasten mit $CM^{SCL1,Selenit}$ bereits nach 6 Stunden zu einer teilweisen Regeneration der ZZK führte, der Median kommunizierender Fibroblasten betrug nach 6 Stunden 5 Zellen (Abb. 17). Die alleinige Behandlung mit CM^{SCL1} führte bereits nach 3 Stunden zu einer Verminderung der ZZK auf durchschnittlich 3 kommunizierende Fibroblasten und konnte durch eine gleichzeitige 3stündige Behandlung mit Selenit nicht verhindert werden. Eine vollständig regenerierte ZZK wird nach 12 Stunden Inkubation mit $CM^{SCL1,Selenit}$ erreicht. Die Zahl kommunizierender Fibroblasten, die für 12 Stunden mit $CM^{SCL1,Selenit}$ behandelt wurden, war hier nahezu auf Kontrollniveau. Die alleinige Behandlung mit Selenit hatte keinen Einfluss auf die direkte ZZK.

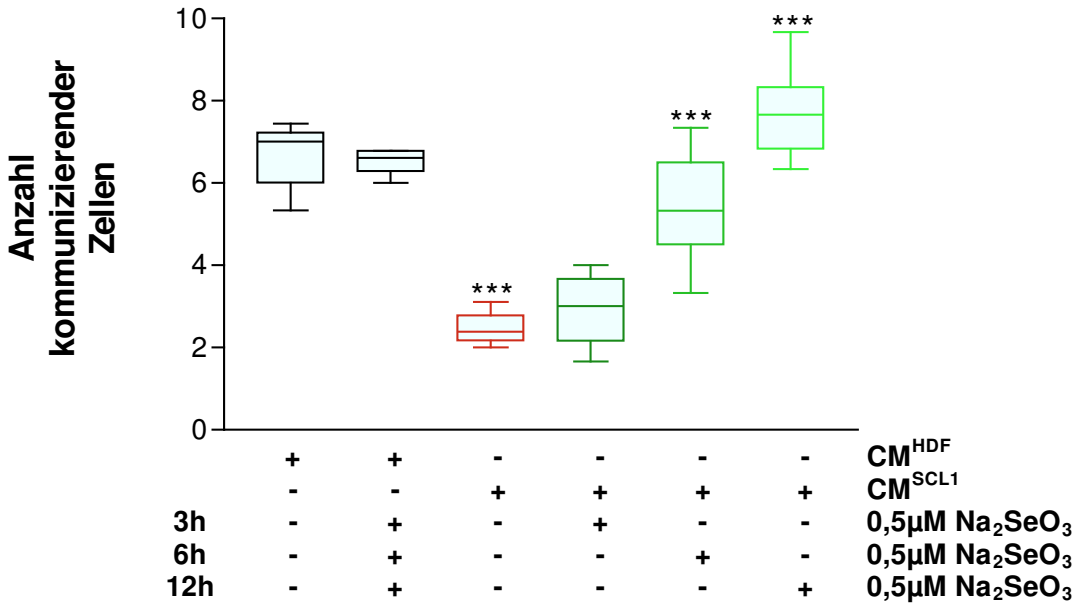


Abb. 17 Zeitabhängigkeit der Wirkung von Selenit auf mit konditioniertem Medium von Tumorzellen behandelte Fibroblasten.
Zur Beantwortung der Frage, wann die Selenwirkung einsetzt, wurden Fibroblasten mit 0,5µM Natriumselenit und konditioniertem Medium von Tumorzellen für jeweils 3, 6 und 12 Stunden inkubiert und anschließend wurde die Kommunikation gemessen. Als Kontrolle dienten jeweils über die gleichen Zeiträume mit konditioniertem Medium ohne Natriumselenit sowie mit konditioniertem Medium von Tumorzellen inkubierte Fibroblasten. Das Experiment wurde zweimal jeweils im Triplikat durchgeführt.
******p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; ***p<0,001 6h $CM^{SCL1,Selenit}$ gegenüber CM^{SCL1}; ***p<0,001 12h $CM^{SCL1,Selenit}$ gegenüber CM^{SCL1}.***

3.2 Lipidhydroperoxide vermindern die homologe ZZK von Fibroblasten

Um die Art der ROS, die bei der Inkubation mit konditioniertem Medium von Tumorzellen entstehen, näher zu spezifizieren, wurden Fibroblasten mit den Antioxidantien Trolox, einem Vitamin E-Derivat, und butyliertem Hydroxtoluen (BHT) behandelt. Die Antioxidantien BHT und Trolox verhindern die Lipidperoxidation in Zellen [Gavino et al, 1981; Brenneisen et al, 1998]. Eine nicht-toxische Konzentration von 5 µM BHT und 50 µM Trolox (Überlebensrate >80% nach 48h) wurde als Standardkonzentration benutzt.

Wiederum konnte mit CM^{SCL1} die homologe ZZK der Fibroblasten signifikant vermindert werden. Der Median der Zahl kommunizierender Fibroblasten betrug 3-4 Zellen (Abb. 18 und 19). Eine Inkubation mit $CM^{HDF,Trolox}$ bzw. $CM^{HDF,BHT}$ im Vergleich zu den mit CM^{HDF} behandelten Zellen hatte keinen Einfluss auf die ZZK. Die Zahl der kommunizierenden Zellen nach der Behandlung mit $CM^{SCL1,BHT}$ (Abb. 18) und $CM^{SCL1,Trolox}$ (Abb. 19) war nahezu identisch mit der Zahl kommunizierender Zellen der unbehandelten Kontrolle (CM^{HDF}), wie die Medianwerte der Box-Whisker-Blots zeigen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass eine durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen ausgelöste Lipidperoxidation in Fibroblasten zur Verminderung der homologen Zell-Zell-Kommunikation führt.

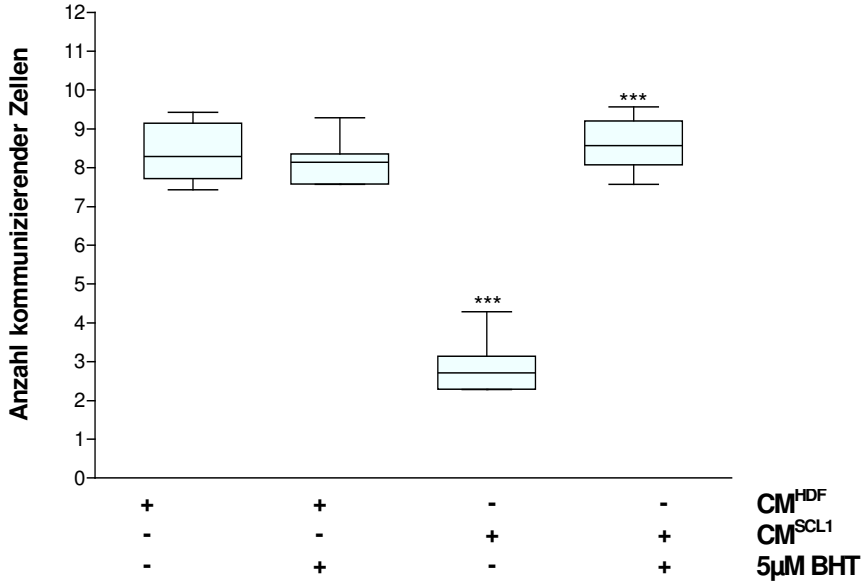


Abb. 18 BHT verhindert die CM^{SCL1} ausgelöste Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten.
Fibroblasten wurden jeweils mit BHT 24h in konditioniertem Medium von Fibroblasten ($CM^{HDF,BHT}$) vorinkubiert und anschließend 24h mit konditioniertem Medium von Tumorzellen ($CM^{SCL1,BHT}$) behandelt. Als Kontrolle dienten mit CM^{HDF} und CM^{SCL1} behandelte Fibroblasten. Mittels Mikroinjektionen wurde die Zahl kommunizierender Fibroblasten bestimmt. Das Experiment wurde dreimal jeweils im Triplikat durchgeführt.
****** p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; *** p<0,001 $CM^{SCL1,BHT}$ gegenüber CM^{SCL1}.***

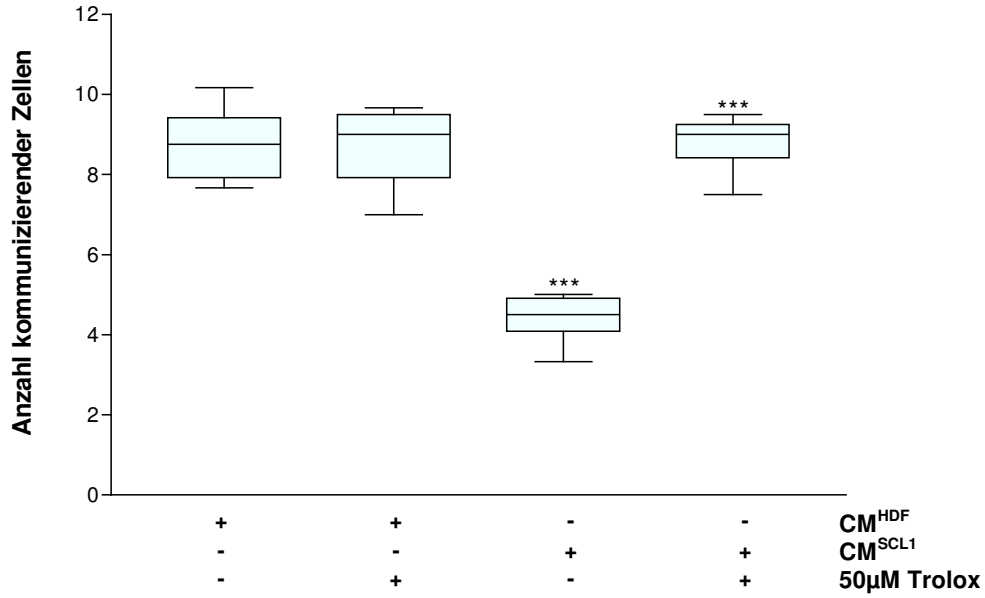


Abb. 19 Trolox verhindert die CM^{SCL1} ausgelöste Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten. Fibroblasten wurden jeweils mit Trolox 24h in konditioniertem Medium von Fibroblasten ($CM^{HDF,Trolox}$) vorinkubiert und anschließend 24h mit konditioniertem Medium von Tumorzellen ($CM^{SCL1,Trolox}$) behandelt. Als Kontrolle dienten mit CM^{HDF} und CM^{SCL1} behandelte Fibroblasten. Mittels Mikroinjektionen wurde die Zahl kommunizierender Fibroblasten bestimmt. Das Experiment wurde dreimal jeweils im Triplikat durchgeführt.
****** p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; *** p<0,001 $CM^{SCL1,Trolox}$ gegenüber CM^{SCL1}.***

Um zu prüfen, ob die Lipidperoxidation die ZZK negativ beeinflusst, wurden mit dem folgenden Versuchsansatz 3 Fragen geklärt:

a) Zu prüfen war, ob exogen zugeführter oxidativer Stress über die Bildung von Hydroperoxiden zu einer Verminderung der ZZK führt. Durch eine hohe Konzentration von Ascorbyl-2-phosphat und dem im Medium enthaltenen Eisen werden über eine Fenton-abhängige Reaktion Hydoxyl-Radikale (HO•) gebildet, die dann eine vermehrte Lipidperoxidation auslösen und im Verlauf zu einer erhöhten Konzentration von Hydroperoxiden führen [Yu et al, 1997; Sakurai et al, 2006].

b) Weiterhin wurde geprüft, ob eine Fenton-abhängige ZZK-Verminderung durch Selenit verhindert werden kann.

c) Da beschrieben wurde, dass das konditionierte Medium von Tumorzellen einen erhöhten Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} vermittelt [Stuhlmann et al, 2003], wurde mittels des Ca^{2+}-bindenden Chelators EGTA eine mögliche Kalziumabhängigkeit der Fenton-abhängigen Hydroperoxidwirkung untersucht.

Durch die Behandlung mit Ascorbyl-2-phosphat wurde die interzelluläre Kommunikation der Fibroblasten signifikant erniedrigt (Abb. 19), der Median der Zahl kommunizierender Zellen

betrug 3 Zellen. In der Kontrollgruppe nach CM^{HDF}–Behandlung kommunizierten durchschnittlich 10 Fibroblasten pro Minute miteinander.

Die Behandlung mit Selenit und EGTA bei gleichzeitiger Inkubation mit Ascorbyl-2-phosphat regenerierte die ZZK auf das Niveau der unbehandelten Fibroblasten (Abb. 20) und verhinderte den kommunikationserniedrigenden Effekt von Ascorbyl-2-phosphat. Der Median der Zahl kommunizierender Fibroblasten wurde durch die Selenitbehandlung auf 9 Zellen, durch die EGTA-Behandlung auf 10 angehoben.

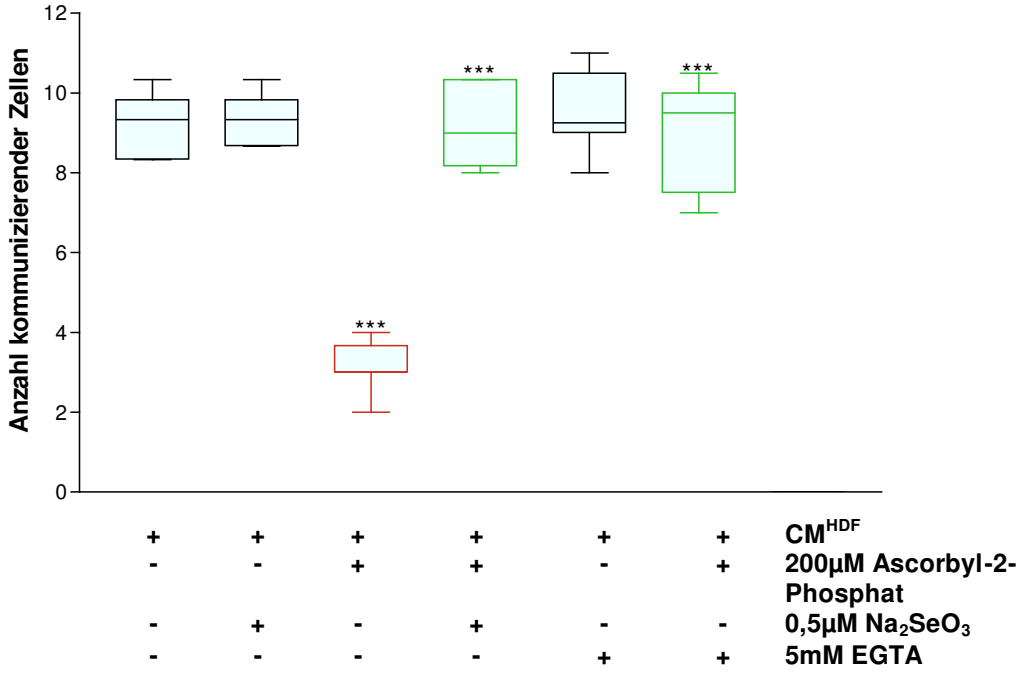


Abb. 20 Ascorbyl-2-phosphat hemmt die homologe ZZK von Fibroblasten. Die Verminderung der ZZK kann durch Selenit verhindert werden und ist kalziumabhängig.
Um einen kommunikationsvermindernden Effekt der Hydroperoxidbildung durch eine hohe Konzentration an Ascorbyl-2-phosphat zu untersuchen, wurden unbehandelte Fibroblasten für 2h mit 200µM Ascorbyl-2-phosphat inkubiert. Anschließend wurden Mikroinjektionsexperimente durchgeführt. Um zu testen, ob Selenit die Wirkung von Ascorbyl-2-phosphat verhindern kann, wurden Fibroblasten 24 Stunden mit $CM^{HDF,Selenit}$ vorinkubiert und anschließend für 2h mit 200µM Ascorbyl-2-phosphat behandelt. Die Kalziumabhängigkeit wurde getestet, in dem Fibroblasten 5min mit 1mM EGTA vor- und 2h zusammen mit Ascorbyl-2-phosphat inkubiert wurden. Anschließend wurden Mikroinjektions-experimente durchgeführt. Die Experimente wurden zweimal im Triplikat durchgeführt.
*** $p<0,001$ $CM^{HDF,Ascorbyl-2-phosphat}$ gegenüber CM^{HDF}; *** $p<0,001$ $CM^{HD,Ascorbyl-2-phosphat+Selenit}$ gegenüber $CM^{HDF,Ascorbyl-2-phosphat}$; *** $p<0,001$ $CM^{HDF,Ascorbyl-2-phosphat+EGTA}$ gegenüber $CM^{HDF,Ascorbyl-2-phosphat}$.

3.3 Konditioniertes Medium von Tumorzellen erzeugt in Fibroblasten Lipidhydroperoxide

Da die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass vermutlich eine CM^{SCL1}–ausgelöste Lipidperoxidation in Fibroblasten für die Aufhebung der direkten ZZK verantwortlich ist, wurde die Menge an Lipidhydroperoxiden (LOOH) in CM^{SCL1}- und CM^{HDF}-behandelten Fibroblasten bestimmt. Ebenso wurde der Einfluss von Selenit auf die Bildung der LOOH untersucht.

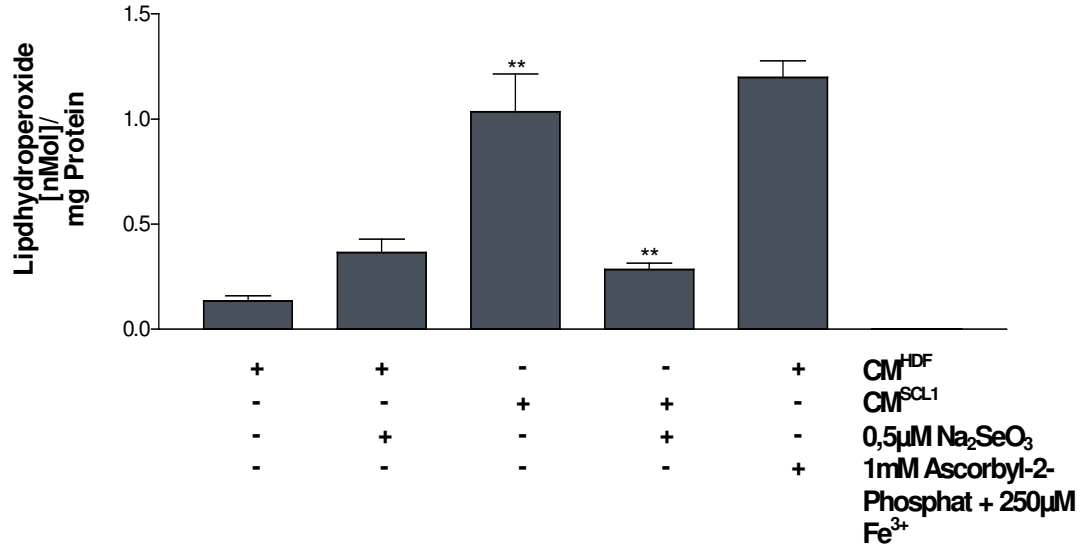


Abb. 21 Bestimmung von Lipidhydroperoxiden in Fibroblasten.
Für diesen Versuchsansatz wurden konfluente Fibroblasten mit $CM^{HDF,Selenit}$ und CM^{HDF} für 24 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine 2stündige Behandlung mit CM^{SCL1} und $CM^{SCL1,Selenit}$. Als Kontrolle für die Nachweisreaktion wurden Fibroblasten 2 Stunden mit 1mM Ascorbyl-2-phosphat und 25µM Fe^{3+} behandelt, um mittels einer Fenton-abhängigen Reaktion in den Zellen eine hohe Konzentration von Lipidhydroperoxiden zu produzieren. Anschließend wurde der Lipidhydroperoxid-Gehalt der Zellen gemessen. Das Experiment wurde zweimal im Triplikat durchgeführt.
***** p<0,05 CM^{SCL1}gegenüber CM^{HDF}; ** p<0,05 $CM^{SCL1,Selenit}$ gegenüber CM^{SCL1}.***

Abbildung 21 zeigt den Gehalt an Lipidhydroperoxiden von unbehandelten und behandelten Fibroblasten. Die Konzentration an Lipidhydroperoxiden der mit CM^{SCL1} behandelten Fibroblasten lag bei etwa 1 nMol, die mit $CM^{SCL1,Selenit}$ behandelten Fibroblasten zeigten eine Lipidhydroperoxidkonzentration von 0,28 nMol. Die Kontrollen, die mit CM^{HDF} und $CM^{HDF,Selenit}$ behandelt wurden, zeigten einen ebenfalls deutlich niedrigeren Gehalt an Lipidhydroperoxiden.

Dadurch wird erkennbar, dass konditioniertes Medium von Tumorzellen ebenso wie Ascorbyl-2-phosphat und Eisen eine erhöhte Konzentration von Lipidhydroperoxiden in Fibroblasten provoziert. Eine Behandlung mit Selenit hingegen vermindert die Produktion

von Lipidhydroperoxiden, hervorgerufen durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen, signifikant.

3.4 Die NAD(P)H-Oxidase als Quelle der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Da gezeigt werden konnte, dass die durch konditioniertes Medium von Tumorzellen induzierte ZZK-Verminderung der Fibroblasten abhängig von Lipidhydroperoxiden ist, stellte sich nun die Frage, welche möglichen Quellen es für die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies gibt, die zur Induktion der Lipidperoxidation führen. Es wurde die NAD(P)H-Oxidase untersucht. Sie produziert Superoxid ($O_2^{\cdot -}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die NAD(P)H-Oxidase wird durch die Proteinkinase C (PKC) akiviert. Die Proteinkinase C selbst wird durch eine Erhöhung der Kalziumkonzentration in der Zelle aktiviert [Cat el al, 2006]. Um ihren Einfluss auf die *gap junctional*-vermittelte ZZK zu untersuchen, wurde der Inhibitor Apocynin eingesetzt, der spezifisch die NAD(P)H-Oxidase blockiert.

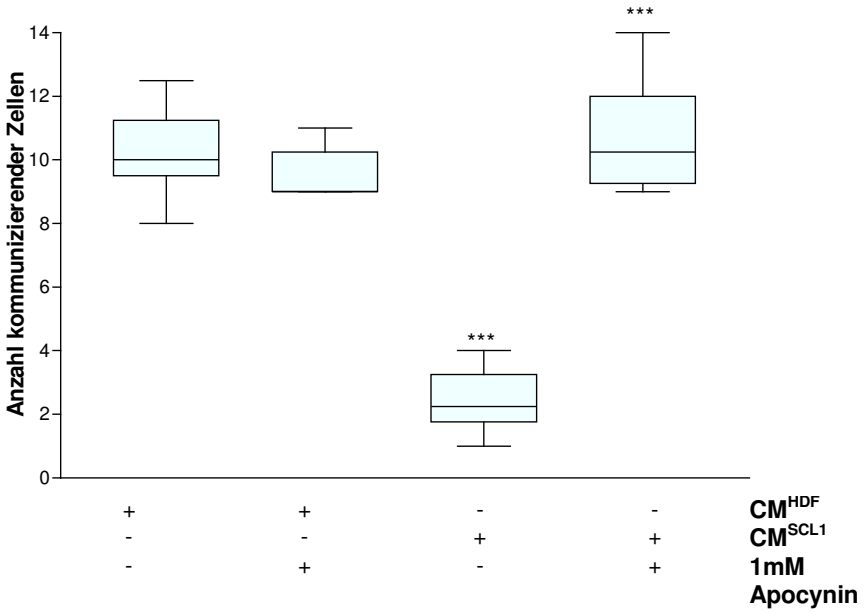


Abb. 22 Hemmung der NAD(P)H-Oxidase durch Apocynin.
Zur Messung der ZZK diente auch hier die Mikroinjektion. Eine nicht-toxische Konzentration von 1mM Apocynin (Überlebensrate >80% nach 48h) wurde als Standardkonzentration benutzt. Die Zellen wurden 3h mit Apocynin vorinkubiert, anschließend erfolgte eine weitere dreistündige Koinkubation mit CM^{SCL1} und Apocynin. Die jeweiligen Kontrollen waren mit CM^{HDF}, $CM^{HDF,Apocynin}$ und CM^{SCL1} behandelte Fibroblasten. Das Experiment wurde im Triplikat durchgeführt.
****** p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; *** p<0,001 $CM^{SCL1+Apocynin}$ gegenüber CM^{SCL1}.***

Das Experiment zeigt (Abb. 22), dass Apocynin den ZZK-vermindernden Effekt des konditionierten Mediums der Tumorzellen verhindert. Die Zahl der kommunizierenden Zellen nach der Behandlung mit Apocynin in dem konditioniertem Medium von Tumorzellen $CM^{SCL1,Apocynin}$ war nahezu identisch mit der Zahl kommunizierender Zellen der unbehandelten Kontrolle (CM^{HDF}), wie die Medianwerte der Box-Whisker-Blots zeigen. Daraus kann geschlossen werden, dass ein initialer Schritt der Lipidperoxidation, hervorgerufen durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen, durch die Aktivierung der NADP(H)-Oxidase induziert wird und zu einer Verminderung der ZZK führt. Die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen CM^{SCL1} zeigte den kommunikationsvermindernden Effekt nach dreistündiger Inkubationszeit. Der Median der Zahl kommunizierender Fibroblasten betrug 2 Zellen. Eine Behandlung mit Apocynin in konditioniertem Medium CM^{HDF} hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ZZK.

3.5 Einfluss der Phospholipase A_2 auf die Verminderung der ZZK

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass die Verminderung der ZZK durch Hydroperoxide hervorgerufen wird und kalziumabhängig ist. In der Literatur ist beschrieben, dass die Phospholipase A_2, kurz PLA_2, welche an der A_2-Stelle im Phospholipidmolekül Fettsäuren aus dem Molekül freisetzt, durch Hydroperoxide und Kalzium aktiviert wird [Yasuda et al, 1977] und über die Freisetzung von Arachidonsäure die *gap junctionale* ZZK vermindert [Hii et al, 1995]. Um einen möglichen Einfluss der PLA_2 auf die Wirkung des konditionierten Medium von Tumorzellen auf Fibroblasten zu testen, wurden Fibroblasten gleichzeitig mit einem Inhibitor der PLA_2, α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat (MAFP), und mit konditioniertem Medium von Tumorzellen behandelt.

Dieser Versuch zeigt (Abb. 23), dass die Zahl kommunizierender Zellen, die mit $CM^{SCL1,MAFP}$ behandelt wurden, nahezu identisch ist mit der Zahl kommunizierender Zellen, die mit CM^{HDF} behandelt wurden. Der Median der kommunizierenden Zellzahl lag bei den mit $CM^{SCL1,MAFP}$ behandelten Zellen bei etwa 9, der Median der Kontrollgruppe lag bei 10 Zellen. Die mit CM^{SCL1} behandelten Zellen zeigten den kommunikationsvermindernden Effekt des konditionierten Mediums der Tumorzellen, der Median lag bei etwa 2 kommunizierenden Zellen. Eine Behandlung mit $CM^{HDF,MAFP}$ hatte keinen Einfluss auf die ZZK. Der die interzelluläre Kommunikation vermindernde Effekt des konditionierten Medium der

Tumorzellen wurde durch den PLA_2-Inhibitor α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat aufgehoben.

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass in Fibroblasten durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen Lipidhydroperoxide produziert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass exogen zugeführter oxidativer Stress in Form von Ascorbyl-2-phosphat analog zu der Behandlung mit CM^{SCL1} zu einer Verminderung der *gap junctionalen* ZZK in Fibroblasten führt. Die Verminderung der ZZK durch das konditionierte Medium von Tumorzellen konnte durch die Hemmung der PLA_2 mittels MAFP verhindert werden.

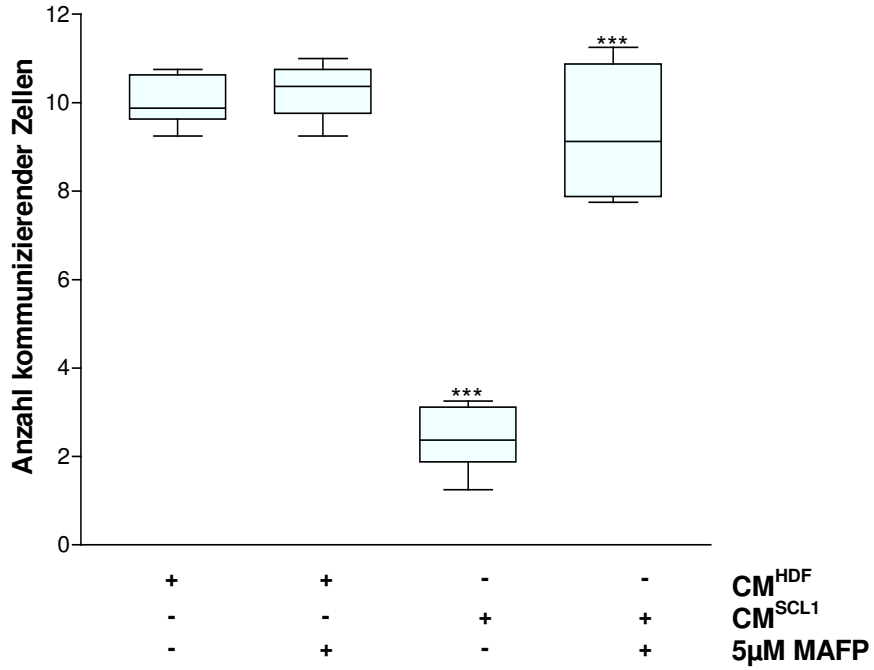


Abb. 23 Inhibition der PLA_2 durch α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat.
Für diesen Versuchsansatz wurden Fibroblasten jeweils 24h mit dem PLA_2-Inhibitor α-Methyl-Arachidonyl-fluorophosphonat in CM^{HDF} ($CM^{HDF,MAFP}$) vorinkubiert und weitere 24h mit konditioniertem Medium von Tumorzellen und α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat ($CM^{SCLI,MAFP}$) behandelt. Eine nicht-toxische Konzentration von 5µM α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat (Überlebensrate >80% nach 48h) wurde als Standardkonzentration benutzt. Die jeweiligen Kontrollen waren mit konditioniertem Medium von Fibroblasten (CM^{HDF}), mit konditioniertem Medium plus α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat ($CM^{HDF,MAFP}$) und konditioniertem Medium von Tumorzellen (CM^{SCL1}) behandelte Fibroblasten. Anschließend wurden Mikroinjektionsexperimente durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal jeweils im Duplikat durchgeführt.
******p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; ***p<0,001 $CM^{SCL1,MAFP}$ gegenüber CM^{SCL1}.***

Im nächsten Versuchsansatz wurde überprüft, ob die Hemmung der PLA_2 die ZZK-Verminderung durch exogen zugeführten oxidativen Stress verhindern kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Fibroblasten mit α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat und Ascorbyl-2-phosphat als Auslöser für ROS analog zu Abbildung 20 behandelt. Es konnte gezeigt werden (Abb. 24), dass die Inkubation mit Ascorbyl-2-phosphat die ZZK vermindert,

die Behandlung mit α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat dies jedoch verhindert. Der Median der Zahl kommunizierender Fibroblasten, die mit Ascorbyl-2-phosphat behandelt wurden, betrug 3 Zellen, der Median der Zahl kommunizierender Fibroblasten, die mit beiden Substanzen behandelt wurden, war signifikant höher und betrug 8 Zellen. Die mit CM^{HDF} behandelten Fibroblasten der Kontrolle kommunizierten durchschnittlich mit 9 Fibroblasten.

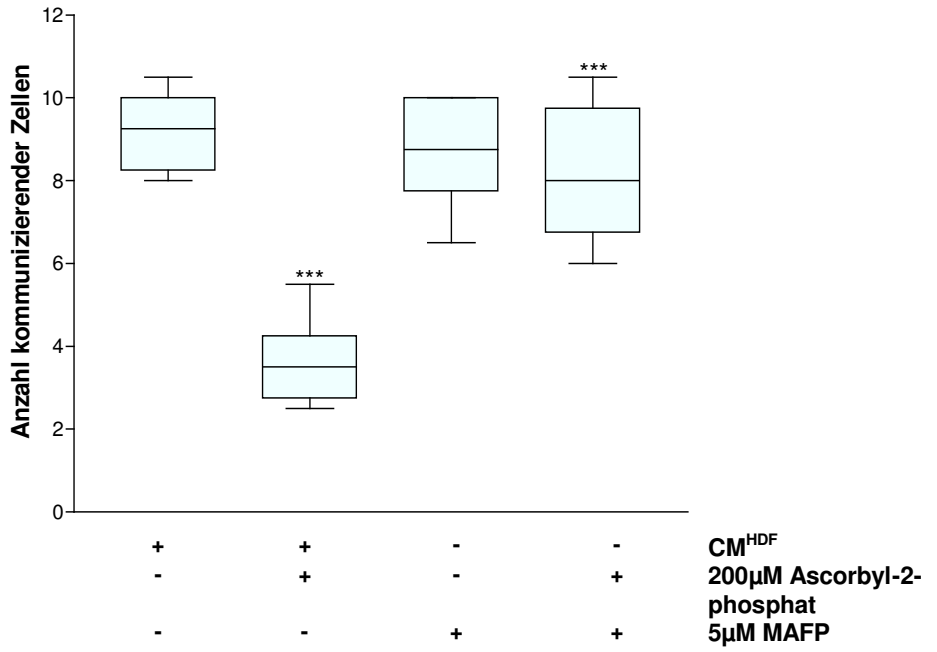


Abb. 24 Der ZZK-vermindernde Effekt durch Lipidperoxide konnte durch Hemmung der PLA_2 verhindert werden. Es erfolgte eine 24stündige Vorinkubation mit 5µM α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat, anschließend eine 2stündige Inkubation mit 200µM Ascorbyl-2-phosphat und 5µM α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat in konditioniertem Medium. Die Kontrollen wurden mit CM^{HDF}, $CM^{HDF,MAFP}$ und $CM^{HDF,Ascorbyl2\text{-}Phosphat}$ behandelt. Das Experiment wurde dreimal jeweils im Duplikat durchgeführt. ***p<0,001 $CM^{Ascorbyl\text{-}2\text{-}phosphat}$ gegenüber CM^{HDF}; ***p<0,001 $CM^{Ascorbyl\text{-}2\text{-}phosphati,MAFP}$ gegenüber $CM^{Ascorbyl\text{-}2\text{-}phosphat}$.

3.6 Die Wirkung von Selen auf die ZZK ist glutathionabhängig

Der kommunikationsregenerierende Effekt von Selen tritt mit einer Latenz von mehreren Stunden auf, und die Behandlung mit Selenit hat eine Verminderung der durch konditioniertes Medium von Tumorzellen provozierten Lipidhydroperoxidbildung zur Folge.

Wegen der Latenz von mehreren Stunden scheint die antioxidative Wirkung von Natriumselenit nicht durch physikochemische Eigenschaften der dargebotenen Form zustande zu kommen, sondern es müssen in der Zelle Metabolisierungen stattfinden, die Selenit in eine aktive antioxidative Form umwandeln. Da in der Zelle die aktive Form von Selenit

Selenocystein als Bestandteil im aktiven Zentrum von Selenoproteinen ist, wurden selenabhängige Enzyme vermutet.

Um die in Frage kommenden Enzyme einzugrenzen, wurden Fibroblasten mit Buthionin Sulfoximin (BSO) behandelt, einem Hemmstoff der γ-Glutamyl-Cystein-Synthetase.

Die γ-Glutamyl-Cystein-Synthase ist ein selenunabhängiges Schrittmacherenzym der Glutathionsynthese [Griffith und Meister, 1979]. Durch Hemmung dieses Enzyms wird die Glutathionsynthese blockiert und die Zelle verarmt an Glutathion.

Glutathionabhängigen Enzymen fehlt demzufolge ein Kosubstrat, dementsprechend sind glutathionabhängige Enzym in ihrer Aktivität eingeschränkt bzw. inaktiv.

Die Behandlung mit $CM^{SCL1,Selenit,BSO}$ führte zu einer Verminderung der ZZK auf das Niveau der mit CM^{SCL1} behandelten Zellen (Abb. 25). Der kommunikationsregenerierende Effekt von Selenit tritt also unter der gleichzeitigen Behandlung mit konditioniertem Medium der Tumorzellen und BSO nicht auf, obwohl Selenit ebenfalls im Medium vorlag.

Daher scheint Glutathion ein bedeutsamer Faktor für die selenabhängige Wirkung auf die ZZK zu sein.

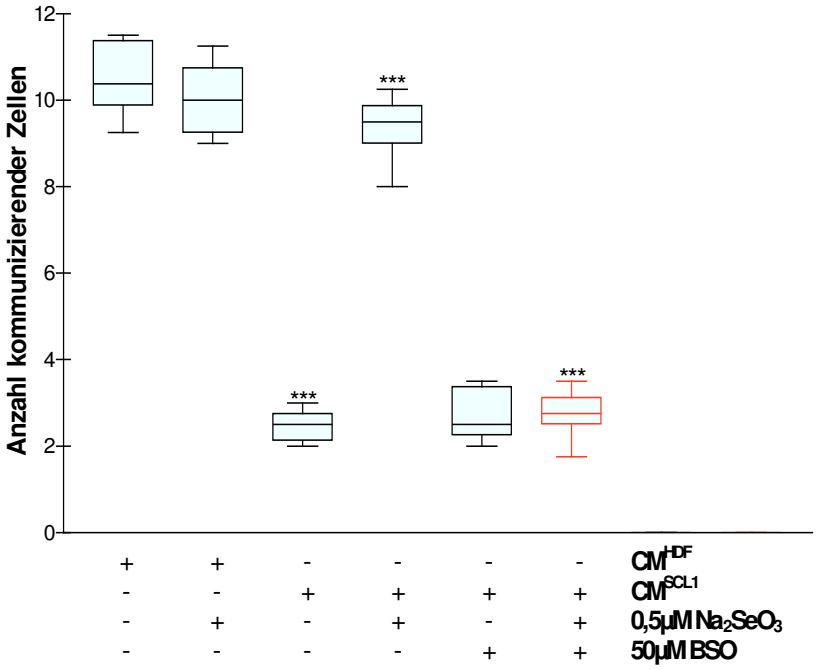


Abb. 25 Der kommunikationsregenerierende Effekt von Selenit auf die ZZK ist glutathionabhängig.
Für diesen Versuchsansatz wurden Fibroblasten mit 50µM BSO und 0,5µM Natriumselenit in CM^{HDF} 24h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine 24stündige Inkubation mit BSO und Natriumselenit in CM^{SCL1} ($CM^{SCL1,Selenit,BSO}$). Eine nicht-toxische Konzentration von 50µM BSO (>80% Überlebensrate in Kombination mit $CM^{SCL1,Selenit}$) wurde benutzt. Nach 48h erfolgte die Messung der Zell-Zell-Kommunikation. Das Experiment wurde dreimal jeweils im Triplikat durchgeführt. *** p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; *** p<0,001 $CM^{SCL1,Selenit}$ gegenüber CM^{SCL1}; *** p<0,001 $CM^{SCL1,Selenit,.BSO}$ gegenüber $CM^{SCL1,Selenit}$; *** p<0,001 $CM^{SCL1,Selenit,BSO}$ gegenüber CM^{HDF}.

Glutathion ist ein Co-substrat vieler antioxidativer Enzyme, unter anderem der Glutathionperoxidasen. Als gemeinsamer Reaktionsweg des Glutathionstoffwechsels werden 2 Moleküle der reduzierten Thiolform (GSH) unter Wasserstoffabgabe zu einem Molekül oxidiert, in dem zwei Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft werden (GSSG). In diesem Prozess wird GSH verbraucht. Im Experiment kann das Verhältnis von GSSG zu 2 Molekülen GSH (GSSG/2GSH) als Marker für stattgefundene Oxidation bei gleichzeitiger Aktivität glutathionverbrauchender antioxidativer Systeme verwendet werden.
Nachfolgend wurde im benutzten Zellmodell reduziertes Glutathion (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) quantitativ bestimmt. Für diesen Ansatz wurden Fibroblasten analog zu Abb. 15 behandelt. Nach 48h Gesamtinkubationszeit wurde mittels einer enzymgekoppelten Nachweisreaktion die Konzentration von GSH und GSSG gemessen und das Verhältnis GSSG/2GSH berechnet. Die physiologische Konzentration von reduziertem Glutathion (GSH) ist unter physiologischen Bedingungen größer als die Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) [Asensi et al, 1999]. In dem untersuchten Zellmodell konnte eine bis zu zehnmal höhere Konzentration von GSH gemessen werden.
In Abbildung 26a ist zu erkennen, dass das äquimolare Verhältnis von GSSG zu 2GSH (Ratio GSSG/2GSH) bei den mit $CM^{SCL1,Selenit}$ behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich erhöht ist.
Die mit CM^{SCL1} und $CM^{HDF,Selenit}$ behandelten Zellen weisen keine signifikante Änderung der Ratio GSSG/2GSH im Vergleich zu der mit CM^{HDF} behandelten Kontrollgruppe auf.
In Abbildung 26b sind die Messungen des reduziertem GSH, in Abbildung 26c des oxidiertem GSH, GSSG, aufgetragen. Man sieht keine signifikante Änderung der GSH-Konzentration der mit CM^{HDF}, $CM^{HDF,Selenit}$, CM^{SCL1} und $CM^{SCL1,Selenit}$ behandelten Zellen (Abb. 26b), jedoch eine signifikante Erhöhung des Gehalts an GSSG (Abb. 26 c) analog zur Ratio GSSG/2GSH (Abb. 26a) in den mit $CM^{SCL1,Selenit}$ behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die mit CM^{HDF}, CM^{SCL1} und $CM^{HDF,Selenit}$ behandelt wurden.

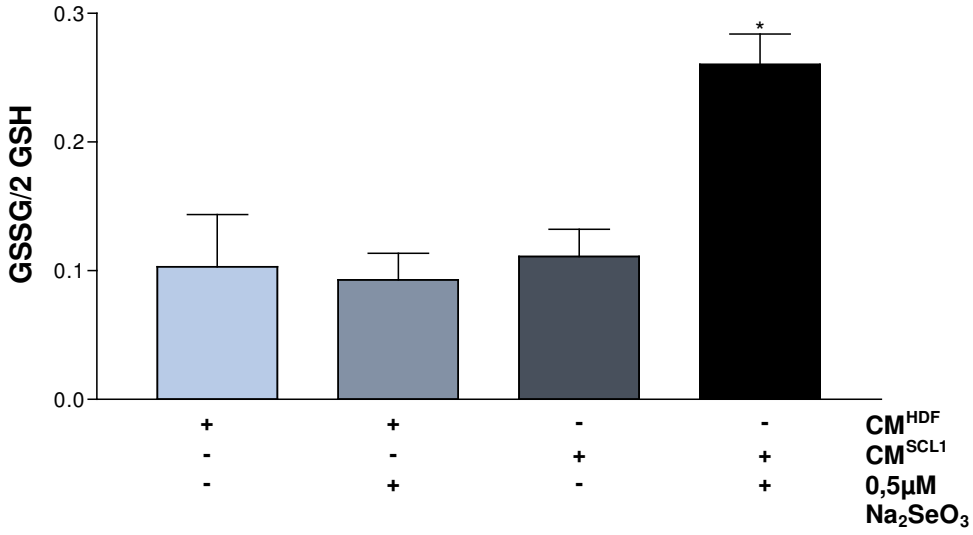


Abb. 26a Das Verhältnis von GSSG zu GSH erhöht sich unter der Behandlung mit Selenit und CM^{SCL1}. Fibroblasten wurden 24 h mit CM^{HDF} und $CM^{HDF,Selenit}$ inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung für weitere 24h mit CM^{SCL1} und $CM^{SCL1,Selenit}$. Es folgte die Messung von reduziertem und oxidiertem Glutathion mittels einer enzymgekoppelten Nachweisreaktion mit dem Enzym Glutathionreduktase und Berechnung des Verhältnis GSSG/2GSH . Das Experiment wurde viermal jeweils im Triplikat durchgeführt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Student´s T-Test.
** p< 0,05 $CM^{SCL1,Selenit}$ gegenüber CM^{HDF}.*

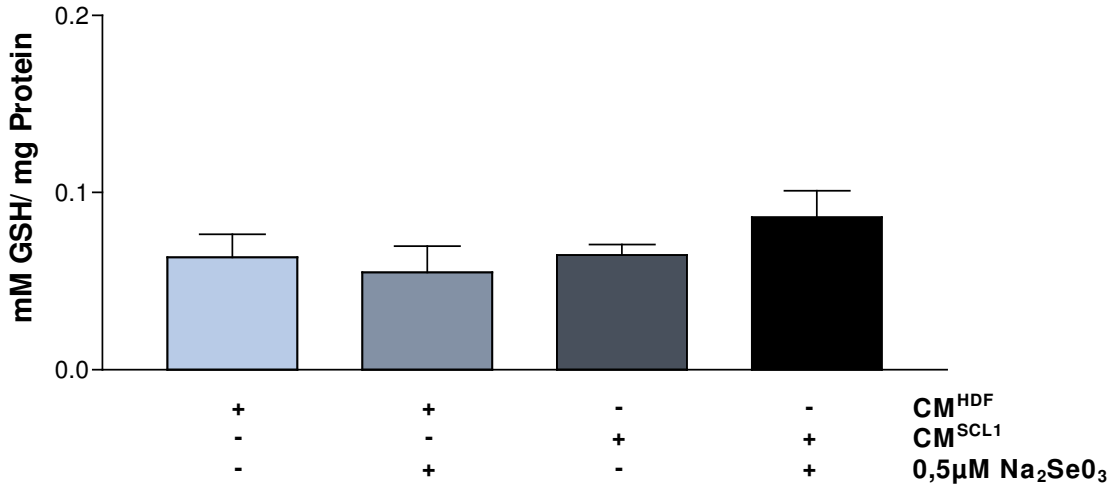


Abb. 26b Die quantitative Bestimmung von GSH zeigt keine signifikanten Unterschiede der Glutathionkonzentration, Fibroblasten wurden 24h mit CM^{HDF} und $CM^{HDF,Selenit}$ inkubiert. Anschließend erfolgte für weitere 24h eine Behandlung mit CM^{SCL1} und $CM^{SCL1,Selenit}$. Es zeigen sich keine signifikanten Konzentrationsänderungen. Das Experiment wurde viermal jeweils im Triplikat durchgeführt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Student´s T-Test.

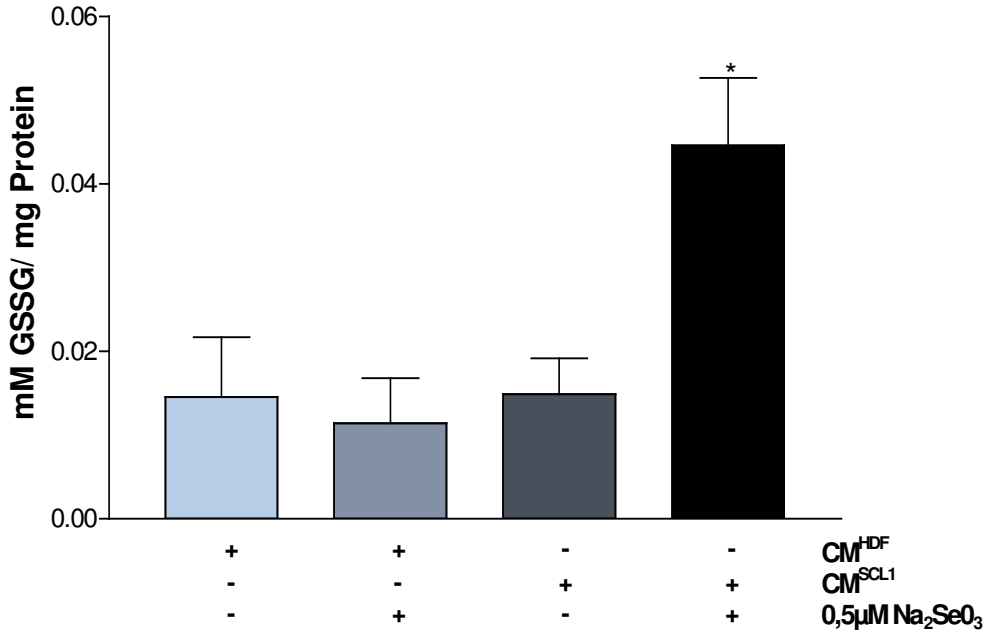


Abb. 26c Erhöhung der GSSG-Konzentation unter Behandlung mit $CM^{SCL1,Selenit}$.
Fibroblasten wurden 24h mit CM^{HDF} und $CM^{HDF,Selenit}$ inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung für weitere 24h mit CM^{SCL1} und $CM^{SCL1,Selenit}$. Es folgte die Messung von reduziertem Glutathion mittels einer enzymgekoppelten Nachweisreaktion mit dem Enzym Glutathionreduktase. Das Experiment wurde viermal jeweils im Triplikat durchgeführt, die statistische Auswertung erfolgte mittels Student´s T-Test.
**** p< 0,05 $CM^{SCL1,Selenit}$ gegenüber CM^{HDF}.***

3.7 Expression der cGPx und phGPx in Hautfibroblasten

Die vorherigen Versuchsansätze zeigen, dass die Wirkung von Natriumselenit glutathionabhängig ist. Als mögliche Enzyme für die selenitvermittelten Effekte kamen die Glutathionperoxidasen als glutathion- und selenabhängige Enzyme in Betracht.

Die Gruppe der Glutathionperoxidasen umfasst vier Enzyme, Glutathionperoxidase 1-4, deren Substratspezifität und -präferenz sowie deren Expression in Geweben unterschiedlich ist. Der katalytische Mechanismus dieser Selenocystein enthaltenden Enzyme für die Reduktion von Hydroperoxiden (ROOH) umfasst die Oxidation der entsprechenden sauren Seitengruppe (R-SeOH), was zu einer Reduktion der Hydroperoxide in Alkohole führt [Sies, 1997].

Ubiquitär vorkommend ist die Glutathionperoxidase 1 (cytosolische, cGPx) und die membranständige Glutathionperoxidase 4 (phGPx). Die GPx2 und GPx3 haben eine ähnliche Substratspezifität wie die cGPx und sind vorwiegend im Gastrointestinaltrakt bzw. im Blutplasma vorhanden [Brigelius-Flohe, 1999].

Um zu prüfen, ob die cGPx und phGPx in den verwendeten Hautfibroblasten exprimiert werden, wurde der Nachweis mittels RT-PCR durchgeführt.

In den Abbildungen 27 a-c sind die jeweiligen Gele gezeigt. Als methodische Kontrolle diente eine RT-PCR gegen die mRNA von dem ubiquitär vorkommenden und exprimierten Enzym HPRT (siehe Abb. 27c). Die Zyklenzahl betrug für alle RT-PCR jeweils 18, 20, 22 und 24 Zyklen.

Dieses Experiment zeigt, dass sowohl die cGPx (Abb. 27a) als auch die phGPx (Abb. 27b) in den Fibroblasten konstant exprimiert wird.

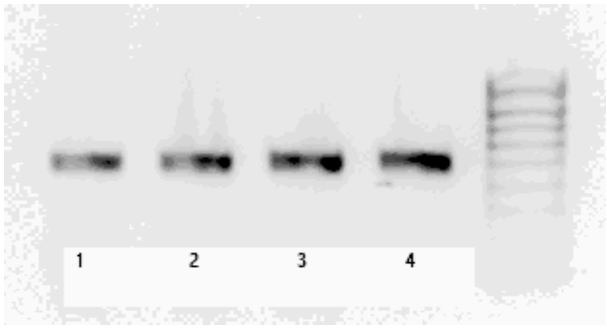


Abb. 27a RT-PCR der cGPx in konfluenten Hautfibroblasten.
Das Experiment wurde dreimal wiederholt.
1= 18 Zyklen; 2= 20 Zyklen; 3=22 Zyklen; 4=24 Zyklen.

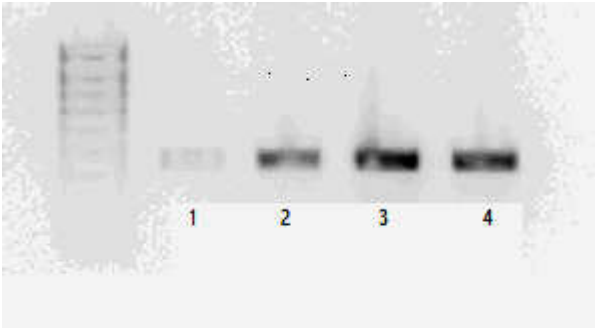


Abb. 27b RT-PCR der phGPx in konfluenten Hautfibroblasten.
Das Experiment wurde dreimal wiederholt.
1= 18 Zyklen; 2= 20 Zyklen; 3=22 Zyklen; 4=24 Zyklen.

Abb. 27c Kontroll RT-PCR mit HPRT in konfluenten Hautfibroblasten.
Das Experiment wurde dreimal wiederholt.
1= 18 Zyklen; 2= 20 Zyklen; 3=22 Zyklen; 4=24 Zyklen.

3.8 Die Aktivität der cGPx und phGPx steigt zeitabhängig nach Seleninkubation an

Als nächstes schloss sich die Frage an, inwieweit die beiden Glutathionperoxidasen durch Selenit stimuliert werden. Für diese Fragestellung wurde als Methode die Enzymaktivitätsmessung angewandt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass das physiologische Korrelat, die Aktivität des jeweiligen Enzyms, direkt gemessen wird.

Analog zu den Zeitpunkten der Mikroinjektion in Abb. 17 wurden Fibroblasten mit Selenit für jeweils 3, 6 und 12 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Fibroblasten. Gemessen wurde jeweils die Enzymaktivität mit dem Substrat tertiärem Butyrathydroperoxid für die cGPx und dem Substrat Phosphatidylcholinhydroperoxid (PCOOH) für die phGPx.

In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass nach 6stündiger Behandlung mit Selenit sowohl die Aktivität der cGPx als auch der phGPx im Vergleich zu den jeweiligen Basalwerten um etwa 50 % signifikant gestiegen waren. Der Mittelwert der cGPx-Aktivität stieg von 42,3 U/mg Protein nach 6stündiger Natriumselenitinkubation auf 62,6 U/mg Protein, nach weiteren 6 Stunden (und 12stündiger Gesamtinkubationszeit) auf 76,3 U/mg Protein. Die phGPx verhielt sich ähnlich. Der Mittelwert der basalen phGPx-Aktivität betrug 12 U/mg Protein, nach 6stündiger Selenitinkubation stieg die Aktivität auf 22,5 U/mg Protein, nach 12 Stunden auf 34,26 U/mg Protein.

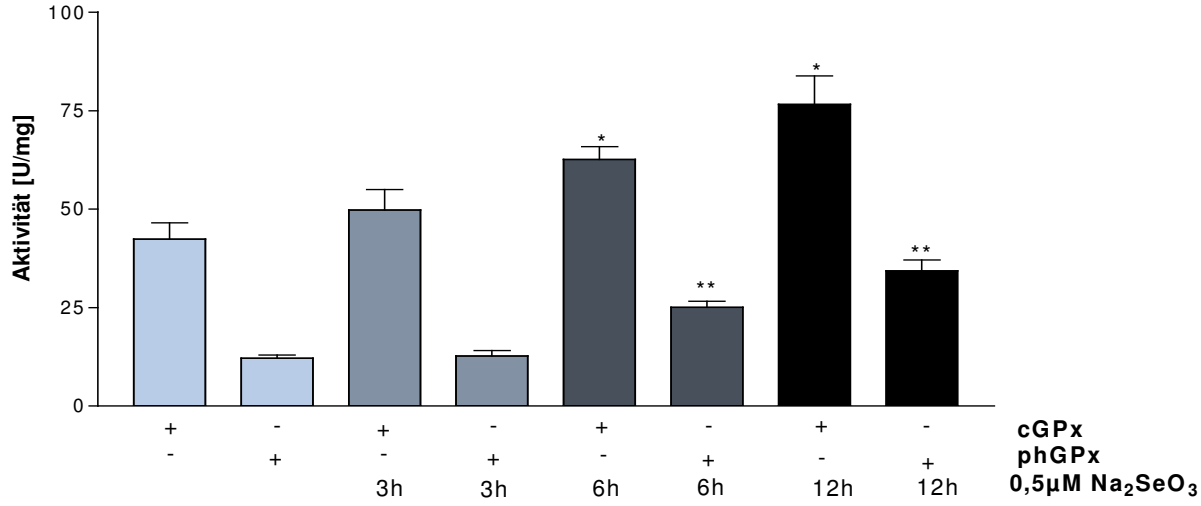


Abb. 28 Die Aktivität der cGPx und phGPx steigt zeitabhängig nach Selensubstitution.
Messung der Enzymaktivität der cGPx mit dem Substrat tertiäres Butyrat-Hydroperoxid (200µM) und der phGPx mit Phosphatidylcholinhydroperoxi (30µM). Fibroblasten wurden mit $CM^{HDF,Selenit}$ für 3, 6 und 12 Stunden inkubiert. Das Experiment wurde dreimal jeweils im Triplikat durchgeführt , die statistische Auswertung erfolgte mittels Student´s T-Test.
**** p<0,05 Enzymmessung cGPx nach 6h bzw. 12h $CM^{HDF,Selenit}$ gegenüber CM^{HDF}; **p<0,05 Enzymmessung phGPx nach 6h, bzw. 12h $CM^{HDF,Selenit}$ gegenüber CM^{HDF}.***

3.9 Glutathionperoxidasen vermitteln die ZZK-regenerierende Wirkung von Selen

Um zu überprüfen, ob die cGPx und phGPx nicht nur durch die Selenitbehandlung stimuliert werden, sondern auch an der kommunikationsregenerierenden Wirkung von Selenit beteiligt sind, wurden in einem weiteren Versuchsansatz Zellen mit dem Inhibitor für Glutathionperoxidasen Mercaptosuccinat [Chaudiere et al, 1983] sowie konditioniertem Medium von Tumorzellen und Selenit behandelt.

Es ist zu erkennen (Abb. 29), dass die Zellen, die mit $CM^{SCL1,Selenit,Mercaptosuccinat}$ behandelt wurden, im Vergleich zu den mit $CM^{SCL1,Selenit}$ behandelten Zellen keine Erhöhung der ZZK aufweisen. Die Zahl dieser kommunizierenden Zellen war nahezu identisch mit der Zahl kommunizierender Zellen, die mit CM^{SCL1} behandelt wurden, und der kommunikations-regenerierende Effekt von Selenit wird durch Mercaptosuccinat nahezu vollständig aufgehoben. Daraus folgt, dass die ZZK-regenerierende Wirkung von Selenit durch die glutathionabhängigen Enzyme aus der Gruppe der Glutathionperoxidasen vermittelt wird.

Aus den vorher gezeigten Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die ZZK-vermindernde Wirkung des konditionierten Mediums von Tumorzellen durch die Aktivierung von prooxidativen Enzymen wie der NAD(P)H-Oxidase, nachfolgender Lipidhydroperoxid-produktion und durch Aktivierung der Phospholipase A_2 vermittelt wird.

Diese Effekte lassen sich durch Antioxidantien verhindern. Im Falle von Selenit wurde als Effektorenzym die Glutathionperoxidase identifiziert.

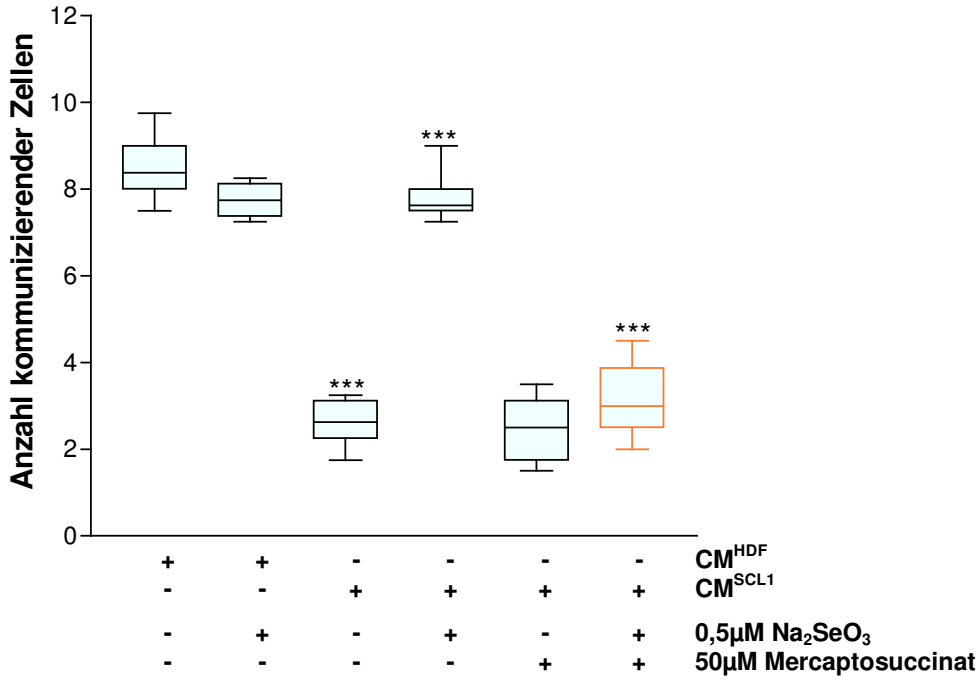


*Abb. 29 Die kommunikationsregenerierende Selenitwirkung wird durch Glutathionperoxidasen vermittelt. Fibroblasten wurden analog zu Abb. 15 und 25 mit CM^{HDF} und $CM^{HDF,Selenit}$ und zusätzlich mit Mercaptosuccinat ($CM^{HDF,Mercaptosuccinat}$, $CM^{HDF,Selenit, Mercaptosuccinat}$) für 24h vorinkubiert. Nach einem Mediumwechsel erfolgte eine 24stündige Inkubation mit Selenit und Mercaptosuccinat in konditioniertem Medium von Tumorzellen (CM^{SCL1}, $CM^{SCL1,Selenit}$, $CM^{SCL1, Mercaptosuccinat}$ und $CM^{SCL1,Selenit, Mercaptosuccinat}$). Eine nicht-toxische Konzentration von 50µM Mercaptosuccinat (>80% Überlebensrate in Kombination mit $CM^{SCL1,Selenit}$) wurde benutzt. Anschließend wurden Mikroinjektionsexperimente durchgeführt. Die Experimente wurden dreimal jeweils im Triplikat durchgeführt. *** p<0,001 CM^{SCL1} gegenüber CM^{HDF}; *** p<0,001 $CM^{SCL1,Selenit}$ gegenüber CM^{SCL1}; *** p<0,001 $CM^{SCL1,Selenit, Mercaptosuccinat}$ gegenüber $CM^{SCL1,Selenit}$; *** p<0,001 $CM^{SCL1,Selenit, Mercaptosuccinat}$ gegenüber CM^{HDF}.*

4. Diskussion

Den Malignomen der Haut muss sich die Medizin in Zukunft in zunehmendem Maße widmen, da es aufgrund des sich vergrößernden atmosphärischen Ozonlochs und der damit einhergehenden erhöhten UV-Exposition vermehrt zur Bildung von Hauttumoren kommen kann [De Gruijl et al, 2003; Diffey, 2004]. Erhöhte Bestrahlung mit UVB-Licht kann zu zahlreichen biochemischen Veränderungen in der Zelle führen. So kommt es als Reaktion auf ultraviolettes Licht zum Beispiel zu einer Regulierung bestimmter Gene, die für Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle und Zerstörung des dermalen Bindegewebes der Haut verantwortlich sind [Brenneisen et al, 2002].

Das Spurenelement Selen gewinnt in Therapiekonzepten gegen Tumorerkrankungen immer mehr Bedeutung. In frühen unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass in Regionen der Vereinigten Staaten mit hohem Verbrauch an Selen die Todesraten durch Krebserkrankungen niedriger sind als in Regionen mit niedrigerem Selenverbrauch [Shamberger und Frost, 1969; Schrauzer und Rhead, 1971]. In neueren klinischen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass Selen als Nahrungsmittelergänzung das Krebsrisiko und die Todesrate sowie bei malignen Erkrankungen der Haut die Entstehung von Sekundärtumoren und Metastasenbildung verringert [Clark et al, 1996; Klein et al, 2003]. Bislang gibt es nur unzureichende Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, die zur verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei der Krebsentstehung beitragen und die Wirkung einer Selensupplementation erklären.

In neueren Studien der Arbeitsgruppe Brenneisen wurde in einem *in-vitro* Tumor-Stroma-Modell mit Zellen der epidermalen Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL1 und humanen dermalen Fibroblasten gezeigt, dass eine Behandlung von (stromalen) Fibroblasten mit Selen sowohl Einfluss auf die Invasionskapazität von Tumorzellen hat [Cat et al, 2006] als auch auf die direkte Zell-Zell-Kommunikation der Fibroblasten [Stuhlmann et al, 2003, 2004], ohne dass die molekularen Wirkungsmechanismen, die zum Schließen der *gap junctions* führen, vollständig geklärt wurden.

Die relevanten Eckpunkte der Arbeiten zur Zell-Zell-Kommunikation sind:

1.) Eine Inkubation konfluenter Hautfibroblasten mit konditioniertem Medium der Tumorzelllinie SCL1 führt zu einer schnellen Verminderung der ZZK. Diese ist reversibel [Stuhlmann et al, 2003].

2.) Das konditionierte Medium von Tumorzellen sorgt über einen parakrinen Mechanismus und durch die endogene Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies für einen Verlust der homologen ZZK der Fibroblasten [Stuhlmann et al, 2004].
3.) Selen erhält die direkte ZZK konfluenter Hautfibroblasten, die mit konditioniertem Medium von Tumorzellen behandelt wurden, über einen bisher unbekannten Mechanismus [Stuhlmann et al, 2004].
4.) Der in dem konditioniertem Medium von Tumorzellen mit erhöhter Konzentration vorkommende Wachstumsfaktor TGF-β1 wurde als maßgeblich für die Verminderung der ZZK identifiziert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vordringlich mit den molekularen Wirkungsmechanismen von Selen auf die von *gap junctions* abhängige Zell-Zell-Kommunikation der Fibroblasten in dem angeführten Tumor-Stroma-Interaktions-Modell. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Wirkungen des konditionierten Mediums von Tumorzellen näher untersucht.

Als zelluläres Modell wurde ein *in-vitro* Tumor-Stroma-Modell unter Verwendung humaner dermaler Fibroblasten und konditionierten Mediums aus Monolayerkulturen der epidermalen Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL1 gewählt. Um in dem Tumor-Stroma-Modell den physiologischen Bedingungen in der Haut möglichst nahe zu kommen, wurde nicht direkt mit TGF-β1, sondern mit konditioniertem Medium der Plattenepithelkarzinomzelllinie SCL1 gearbeitet.
Somit repräsentiert dieses Modell vereinfacht die *in-vivo* Situation eines Plattenepithelkarzinoms [Detmar, 2000] und erleichtert die Untersuchung des Einflusses von Tumorzellen epithelialen Ursprungs auf dermale Fibroblasten, während zusätzliche Einflüsse, wie sie in intakter Haut oder dem gesamten Organismus vorkommen, vermieden werden.

4.1 Konditioniertes Medium von Tumorzellen erzeugt Lipidhydroperoxide in Fibroblasten

Oxidativer Stress beschreibt schädliche Bedingungen, die entstehen, wenn die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, Prooxidantien) in einem System die Fähigkeit des Systems übersteigt, diese mittels Antioixidantien zu neutralisieren und zu eliminieren [Sies et al, 1985]. Wenn der intrazelluläre Gehalt an ROS nicht reguliert werden kann, führt dies zu Schäden an zellulären Lipiden, Proteinen und DNA und zur Hemmung von Signaltransduktionswegen, aber auch von anderern zellulärer Funktionen [Sies, 1986]. Aufgrund dieser Schädigungen wird *oxidativer Stress* auch mit humanen Erkrankungen, wie kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten, Krebs und auch dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht [Sies, 1991].

ROS werden während zellulärer Stoffwechselprozesse primär in den Mitochondrien während der oxidativen Phosphorylierung als Nebenprodukte gebildet. Die biochemische Umsetzung von Sauerstoff zu Wasser verläuft über mehrere Zwischenstufen wie Superoxid ($O_2^{\cdot -}$), das Produkt der Ein-Elektronen-Reduktion des Sauerstoffs, und Hydroxylradikals ($HO\cdot$), das durch Spaltung von H_2O_2 entsteht. Beides sind hochreaktive Spezies, die die Lipidperoxidation, bei der Lipidhydroperoxide entstehen, vorantreiben.

Die Initiation der Lipidperoxidation, die primär zu Lipidhydroperoxiden führt und an der hauptsächlich Superoxid ($O_2^{\cdot -}$) und Hydroxilradikale ($HO\cdot$) beteiligt sind, wird durch einen prooxidativen Status gefördert. Viele Studien bestätigen, dass die Produktion von ROS in nicht-phagozytotären Zellen über Signalkaskaden nach Aktivierung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen induziert wird [Sundaresan et al, 1995; Bae et al, 1997]. Es wurde nach möglichen Enzymen gesucht, die durch diese Signalkaskaden aktiviert werden. In primären humanen Lungenfibroblasten induziert der in dem konditioniertem Medium von Tumorzellen vorhandene Faktor TGF-β1 die Src-Kinase-abhängige Aktivierung der membranassoziierten NAD(P)H-Oxidase [Thannickal und Fanburg, 2000]. In transformierten Fibroblasten scheinen Ras und Rac (GTP-bindende Proteine) direkt mit der Produktion des Superoxids ($O_2^{\cdot -}$) verknüpft zu sein [Irani et al, 1997]. Es ist bekannt, dass die NAD(P)H-Oxidase Superoxid ($O_2^{\cdot -}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Ein- und Zwei-Elektronenreduktionen aus O_2 produziert [Thannickal und Fanburg, 2000]. Die NAD(P)H-Oxidase konnte in der vorliegenden Arbeit als involviertes Enzym nachgewiesen werden.

Malondialdehyd (MDA), ein ungesättigtes Hydroxylaldehyd, ist eines von mehreren möglichen Endprodukten der Lipidperoxidation, das aus Lipidhydroperoxiden entsteht.

Intrazellulär gebildete ROS treiben den Peroxidationsprozess voran, der zur Produktion von Lipidhydroperoxiden führt [Polte et al, 2003]. Ein weiteres Endprodukt der Lipidperoxidation ist das 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE), das bei der Oxidation der Arachidonsäure entsteht. 4-HNE ist u.a. in der Lage, die Protein- und DNA-Synthese zu inhibieren, Enzyme zu inaktivieren, die interzelluläre Kommunikation durch *gap junctions* zu verhindern, aber auch die Migration von Zellen zu beeinflussen [Uchida et al, 1999]. In den Arbeiten von Stuhlmann konnten nach der Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen ROS mittels DCF-Messungen in Fibroblasten nachgewiesen werden [Stuhlmann et al, 2003]. In der vorliegenden Arbeit wurden die ROS näher spezifiziert und eine signifikante Erhöhung von Lipidhydroperoxiden konnte nach der Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen in Fibroblasten nachgewiesen werden.

Neben endogenen Prozessen spielen bei der Entstehung von ROS auch exogene Faktoren eine Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hydroxylradikale nach UVB-Bestrahlung über die Fenton-Reaktion gebildet werden [Brenneisen et al, 2002]. Diese können innerhalb der Zelle zu erheblichen Schäden und letztendlich zu der Formation von Tumoren, beispielsweise der Haut, führen. Wasserstoffperoxid kann durch Plasmamembranen und das Cytosol zum Zellkern diffundieren und dort mit Metallionen als Bestandteil von Proteinen oder Ionen, die an die DNA gebunden sind, interagieren, um Hydroxylradikale zu bilden. Diese können die DNA über kettenspezifische HO·-Generation stark schädigen. Durch die Zerstörung der DNA kann es im Folgenden zu verschiedenen Erkrankungen wie dem Auftreten von Malignomen kommen [Halliwell, 2002].

4.2 Die Verminderung der homologen Zell-Zell-Kommunikation von Fibroblasten entsteht durch Lipidhydroperoxide

Die Tatsache, dass fast alle Zellen innerhalb fester Gewebe *gap junctions* bilden und in Folge dessen metabolisch gekoppelt sind (ZZK), wird als Argument für die außerordentliche Wichtigkeit dieser Strukturen bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase angeführt. Eine Verminderung dieser Kopplung in einem Zellverband ist ein Indikator für ein Ungleichgewicht in der Homöostase einer Zelle im Vergleich zu den benachbarten Zellen im Zellverband. Neben anderen Effekten kann eine Verminderung der ZZK durch verschiedene Noxen ausgelöst und beobachtet und als Marker für eine Schädigung eines Zellverbandes gedeutet werden [Trosko, 1997]. Die Formen der Verminderung der *gap junctions* sind vielfältig. Sie kann auf der Ebene der Minderexpression, auf der Ebene des Transportes in die

Zellmembran [Mesnil, 2002] und durch direkte Konformationsänderung zum geschlossenen Tunnelprotein, beispielsweise durch Phosphorylierung [Hii et al, 1995], erfolgen. Eine bekannte Noxe, die zu einer Verminderung der ZZK führt, ist oxidativer Stress [Trosko et al; 1997, Böck et al, 2007; Upham et al, 1998, 2009]. In der vorliegendenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. Mittels der Mikroinjektion konnte gezeigt werden, dass während der Behandlung mit hochdosiertem Ascorbat und Eisen, bei der durch die Fenton-Reaktion vermehrt Hydroperoxide entstehen, die ZZK vermindert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen Lipidhydroperoxide in Fibroblasten entstehen und diese zu einer Verminderung der ZZK führen.

4.3 Die Verminderung der ZZK durch das konditionierte Medium von Tumorzellen wird durch die Enzyme Phospholipase A_2 und NAD(P)H-Oxidase vermittelt

Die Beteiligung oxidativer Prozesse in der Tumorentwicklung ist hinlänglich bekannt. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte ROS-Mengen zu Hyperplasie [Giri et al, 1995], Hyperproliferation [Arora et al, 1999] und Apoptoseresistenz führen [Fang et al, 2004]

Einige Studien beschreiben die Wachstumsfaktor-/Zytokin-vermittelte Bildung von ROS während physiologischer Signalkaskaden durch membranlokalisierte Oxidasen, wie zum Beispiel die NAD(P)H-Oxidase, in phagozytotischen und in nicht-phagozytotischen Zellen [Jones et al, 1994; Hiran et al, 1997; Bayraktutan et al, 1998]. Der in dem konditioniertem Medium von Tumorzellen vorhandene Wachstumsfaktor TGF-β1 stimuliert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in verschiedenen Zelltypen [Kayanoki et al, 1994; Sanchez et al, 1996; Islam et al, 1997] und kann die Expression von enzymatischen Antioxidantien in einigen Zelltypen hemmen [Kayanoki et al, 1994; Islam et al, 1997].

Das Hauptargument für die Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation bei der Krebsentstehung ist die Beobachtung, dass fast alle Tumorzellen nicht zur homologen ZZK fähig sind, das heißt, sie kommunizieren nicht untereinander und auch nicht mit den sie umgebenden Zellen gleichen Ursprungs [Mesnil, 2002]. Zudem hemmen nahezu alle Tumorpromotoren die ZZK [Trosko, 2005].

Es konnte in vielen Zellmodellen gezeigt werden, dass oxidativer Stress die ZZK vermindert, sowohl als schnelle Antwort innerhalb weniger Sekunden als auch nach einer längeren Latenzzeit, was auf die verschiedenen beschriebenen Regulationsmechanismen

zurückzuführen ist [Hii et al, 1995; Trosko et al, 1997; Böck et al, 2007; Upham et al, 1998, 2009]. Eine mögliche Folge dieser oxidativen Stress-induzierten Verminderung der ZZK ist die Transformation in maligne Zellklone oder deren Vorstufen [Brenneisen et al, 2005; Yamasaki et al, 1995, 1999; Trosko et al, 1998, 1999, 2009].

In den Arbeiten von Stuhlmann konnte gezeigt, dass in konditioniertem Medium der SCL1-Plattenepithelkarzinomlinie der transformierende Wachstumsfaktor TGF-β1 für das Schließen der *gap junctions* und damit für eine gestörte Zell-Zell-Kommunikation verantwortlich ist [Stuhlmann et al, 2003, 2004]. In den darauffolgenden Arbeiten von Cat et al [2006] konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Behandlung mit TGF-β1 die Transdifferenzierung der Fibroblasten in Myofibroblasten begünstigt und diese Transdifferenzierung ROS-abhängig ist [Cat et al, 2006]. Als Folge der Transdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten wird die Tumorzellinvasion begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das konditionierte Medium von Tumorzellen die Kommunikation von nichtmalignen gesunden Fibroblasten vermindert. Weiterhin konnte eine Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase an diesen Prozessen beobachtet werden. Es konnte mit Hilfe der Mikroinjektion nachgewiesen werden, dass die Hemmung der NAD(P)H-Oxidase eine Verminderung der ZZK verhinderte. Da die durch NAD(P)H-Oxidase erzeugten ROS Superoxid ($O_2^{\cdot -}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) den Peroxidationsprozess vorantreiben, der zur Produktion intrazellulärer Lipidhydroperoxide führt [Polte und Tyrell, 2003], liegt die Vermutung nahe, dass der initiale Schritt der Lipidperoxidation durch Enzyme wie die NAD(P)H-Oxidase angestoßen wird. Eine Spezifizierung, ob die NADH oder die NADPH-Oxidase, welche beide durch Apocynin gehemmt werden, für diesen Schritt verantwortlich ist, wurde bei Cat in dem auch hier untersuchten Zellmodell [Cat et al, 2006] diskutiert und die durch die Proteinkinase C aktivierte NADPH-Oxidase scheint maßgeblich in der Signalkaskade des untersuchten Zellmodells involviert zu sein.

Eine weitere wichtige Rolle in der Signalkaskade, die zur Verminderung der ZZK durch konditioniertes Medium von Tumorzellen führt, spielt die Phospholipase A_2 (PLA_2). Die PLA_2 katalysiert die hydolytische Spaltung von Fettsäuren aus der A_2-Position des Phosphatidats und wird sowohl durch Hydroperoxide als auch durch Kalzium aktiviert [Sevanian et al, 1983; Yasuda et al, 1977].

Es ist bekannt, dass die PLA_2 und deren Produkt, die Arachidonsäure, bei vielen von Tumorzellen induzierten Stoffwechselprozessen beteiligt ist [Nakanishi et al, 2006], und in verschiedenen Zellmodellen konnte gezeigt werden, dass die durch PLA_2 freigesetzte

Arachidonsäure die *gap junctionale* Zell-Zell-Kommunikation vermindert [Hii et al, 1995; Lazrak et al, 1994]. Ebenso vermindern Inhibitoren des Arachidonsäurestoffwechsels die Produktion von ROS, insbesondere von Lipidhydroperoxiden und H_2O_2 [Nakamura et al, 2003]. Durch die Inhibition der PLA_2 sowie durch die Untersuchung im kalziumfreien Medium konnte im untersuchten Zellmodell die Verminderung der ZZK, hervorgerufen sowohl durch konditioniertes Medium von Tumorzellen als auch durch während der Fenton-Reaktion entstandene Hydroperoxide, verhindert werden.

4.4 Antioxidantien heben die ZZK-vermindernde Wirkung des konditionierten Mediums von Tumorzellen auf

Antioxidantien und Spurenelemente gewinnen immer mehr Bedeutung in den Therapiekonzepten von Tumorerkrankungen. Antioxidantienreiche Diäten als Nahrungsmittelergänzung könnten das Risiko von Krebserkrankungen erheblich verringern [Steinmetz et al, 1996]. Studien mit Zellkulturen haben bereits gezeigt, dass Vitamin E, Vitamin C, Selen und einige Phytochemikalien selektiv Apoptose in Tumorzellen auslösen können, wobei die gesunden Zellen verschont bleiben [Borek et al, 1994; Sigounas et al, 1997; Taper et al, 2004].

Eine Vielzahl natürlich vorkommender, antioxidativ wirkender Systeme schützt die Lipidmoleküle der Zellmembranen vor oxidativer Schädigung. Die schützenden Eigenschaften des Vitamin E beruhen auf seiner Fähigkeit, die Lipidoxidation durch Reduktion radikalischer Zwischenprodukte zu unterbrechen. Dabei wird es zu einem α-Tocopheroxy-Radikal oxidiert, das aufgrund extensiver Delokalisierung und der sterischen Hinderung der Methylsubstituenten relativ reaktionsträge ist [Vollhardt, 2000]. Das wasserlösliche Trolox, ein Vitamin E-Derivat, verhindert die Lipidperoxidation von Zellen direkt [Gavino et al, 1981], indem es radikalische Zwischenprodukte der Lipidperoxidation reduziert.

Während der Entwicklung multizellulärer Organismen bildeten sich viele Mechanismen aus, um den entstandenen Zellverband gegen verschiedene Noxen zu schützen. Für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Zellverbandes ist die Zell-Zell-Kommunikation von essentieller Bedeutung, eine Schädigung einzelner Zellen ist gefährdend für den gesamten Zellverband. Eine Noxe, die sowohl durch exogene Einflüsse als auch während der Entwicklung zum oxidativen Stoffwechsel endogen entsteht und die Zell-Zell-Kommunikation vermindern kann, sind ROS [Trosko et al; 1997, Böck et al, 2007; Upham et

al, 1998, 2009]. Weiterhin wird die ROS-induzierte Verminderung der ZZK durch Antioxidantien verhindert [Sies 1997; Uphan et al, 1998; Trosko et al, 1997; Brigelius-Flohe et al, 2006; Brenneisen et al, 2005; Böck et al, 2007]. In der vorliegenden Arbeit konnte bewiesen werden, dass durch die Behandlung von Fibroblasten mit konditioniertem Medium von Tumorzellen ROS in Form von Lipidhydroperoxiden entstehen und diese die ZZK von Fibroblasten vermindern. Weiterhin konnte durch die Experimente mit den Antioxidantien BHT und Trolox sowie Selen im Einklang mit der Literatur bewiesen werden, dass Antioxidantien zu einer Regeneration der ROS-induzierten Verminderung der ZZK führen.

4.5 Die cGPx und phGPx sind für die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kommunikation von Selen bei der Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen verantwortlich

Selenverbindungen sind von besonderem Interesse, da sie bereits therapeutisch eingesetzt werden. Ihnen werden protektive Eigenschaften zugeschrieben, die in erster Linie mit den selenabhängigen Glutathionperoxidasen zusammenhängen [Schrauzer, 2000].

In einer unabhängigen Studie untersuchten Clark und Mitarbeiter [Clark et al, 1996] die Hypothese, dass Selen als Nahrungsmittelergänzung das Krebsrisiko verringern kann. Dazu wurden Patienten, die schon einmal an Hautkrebs erkrankt waren, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von 200 µg Selen pro Tag über mehrere Jahre die Krebs-Todesrate signifikant verringert hat. Zusätzlich nahm die Anzahl an Neuerkrankungen an Lungen-, Prostata-, und Darmkrebs erheblich ab. Selenit und einige andere antioxidativ wirkende Agenzien werden bereits als Supplement von Krebspatienten eingenommen, die sich einer Chemotherapie unterziehen müssen.

Neben den offensichtlichen Einflüssen der enzymvermittelten antioxidativen Eigenschaften besitzen Selenverbindungen bzw. die selenabhängigen Enzyme durch die Änderung des Redoxpotentials viele Möglichkeiten, Einfluss auf die Zellregulation zu nehmen. Dies setzt voraus, dass entsprechende Regulationsmechansismen wie Signalkaskaden von Wachstums-faktoren redox-reguliert sind und dementsprechend durch ROS beeinflusst werden [Brenneisen et al, 2005; Brigelius-Flohe, 2006].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von Lipidhydroperoxiden in Fibroblasten, hervorgerufen durch die Behandlung mit konditio-niertem Medium von Tumorzellen, durch Selenit verhindert werden konnte.

Ebenso konnte in der Mikroinjektion gezeigt werden, dass die durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen hervorgerufene Verminderung der Zell-Zell-Kommunikation durch Selenit verhindert wurde.

Dies steht im Einklang mit der Literatur, wonach die ZZK durch den oxidativen Status der Zelle moduliert wird [Uphan et al, 1998; Trosko et al, 1997; Brigelius-Flohe et al 2006; Böck et al, 2007].

Weiterhin wurde in der Mikroinjektion gezeigt, dass die Wirkung von Selenit auf die mit konditioniertem Medium von Tumorzellen behandelten Fibroblasten durch die Hemmung der Glutathionsynthese mittels BSO und durch die damit einhergehende Glutathionverarmung nicht stattfand.

In Ergänzung dieser Ergebnisse konnte durch die Messung von reduziertem und oxidiertem Glutathion nachgewiesen werden, dass die durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen entstehenden ROS bei gleichzeitiger Behandlung mit Selenit glutathionabhängig umgesetzt werden. Dies konnte anhand einer Zunahme von oxidiertem Glutathion bei gleichbleibender Konzentration von reduziertem Glutathion gezeigt werden. Da das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion (GSSG/2GSH) sowohl von der Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies als auch von dem Aktitvitätslevel der glutathionverbrauchenden Enzyme abhängig ist, lassen sich aus den dargestellten Ergebnissen nachfolgende Schlussfolgerungen ableiten:

a) Die Behandlung mit Selenit und konditioniertem Medium von Tumorzellen führt zu einem Konzentrationsanstieg der reaktiven Sauerstoffspezies bei gleichzeitiger Erhöhung der antioxidativen Kapazität selen- und glutathionabhänger Enzyme.

b) Die Veränderung nur einer Seite dieses Gleichgewichtes, nämlich entweder nur der Konzentrationsanstieg der ROS durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen oder nur die Aktivitätserhöhung der selen- und glutathionabhängen Enzyme durch Behandlung mit Selenit, führt zu keiner Änderung des Verhältnisses von oxidiertem zu reduziertem Glutathion.

Da der Wirkungseintritt von Natriumselenit erst mit einer Latenz von mehreren Stunden stattfindet, im Gegensatz zum schnelleren Wirkungseintritt von NAC, Trolox und BHT, ist eine vorherige Metabolisierung von Selenit wahrscheinlich, wie zum Beispiel der Einbau des Selenits in das katalytische Zentrum eines Enzyms.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde ein antioxidativ wirkendes, glutathionabhängiges Selenoprotein angenommen.

Die Gruppe der Glutathionperoxidasen besteht aus Selenoproteinen, die die DNA und andere zelluläre Komponenten vor Schädigungen durch Oxidantien schützen. Der Mechanismus der Glutathionperoxidasen ist glutathionabhängig und führt zu einer Zunahme von oxidiertem Glutathion [Brigelius-Flohe, 2008; Schrauzer, 2000]. Mittels der RT-PCR wurden die in der Literatur als möglich exprimierten Glutathionperoxidasen cGPx (zytosolische GPx) und phGpx (membranständige GPx) [Brigelius-Flohe, 1999, 2008] in den untersuchten Fibroblasten nachgewiesen. Durch die Aktivitätsmessung der cGPx und der phGPx konnte eine zeitabhängige Zunahme der Aktivität beider Enzyme nach Selensubstitution beobachtet werden. Die Zunahme der Aktivität beider Enzyme korrelierte zeitlich parallel mit der in der Mikroinjektion gemessenen Wiederherstellung der ZZK. Weiterhin konnte durch die Inhibition beider Enzyme durch den Hemmstoff Mercaptosuccinat [Chaudiere, 1984] ein Ausbleiben der ZZK-regenerierenden Wirkung von Selenit unter der Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen in der Mikroinjektion beobachtet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die Wirkung von Selenit im untersuchten Zellmodell durch die Enzyme cGpx und phGPx vermittelt wird. Auch in anderen Studien konnte die besondere Rolle der Glutathionperoxidasen bezüglich der Wirkmechanismen von Selen in der Tumor-Stroma-Interaktion sowohl in klinischen Studien als auch in verschiedenen Zellmodellen nachgewiesen werden [Böck et al, 2007; Brigelius Flohe, 2008; Squires et al, 2006].

Es blieb die Frage offen, welche der beiden Glutathionperoxidasen für die Reduktion der Lipidhydroperoxide verantwortlich ist, da beide Enzyme durch die Supplementation mit Selen stimuliert werden. Lipidhydroperoxide entstehen in der Zellmembran durch die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren an der A_2-Position im Phospholipidmolekül. Diese liegen dann als Phospholipidhydroperoxide (Phosphatidathydroperoxide) vor und sind im bestehenden Molekül ein Substrat für die membrangebundene phGPx. Phospholipidhydroperoxide können durch die cGpx nicht verstoffwechselt werden [Antunes et al, 1995]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ZZK-vermindernde Wirkung von Lipidhydroperoxiden, hervorgerufen durch die Behandlung mit Ascorbat und Eisen sowie durch die Behandlung mit konditioniertem Medium von Tumorzellen, durch die Hemmung der PhospholipaseA_2 (PLA_2) verhindert werden konnte. Daraus kann gefolgert werden, dass die durch Lipidhydroperoxide hervorgerufeneVerminderung der ZZK von der PLA_2 abhängig ist [Nakanishi et al, 2006] und Lipidhydroperoxide durch die Aktivierung der PLA_2 hydrolytisch aus der A_2-Position des Phospholipidmoleküls gespalten werden [Yushida et al, 1977]. Die so entstandenen Lipidhydroperoxide sind nun nicht mehr in der Membran im

Phosphatidat-Molekül gebunden und können unter Selensupplementation im Cytosol auch von der cGPx reduziert werden [Sevanian et al, 1983].

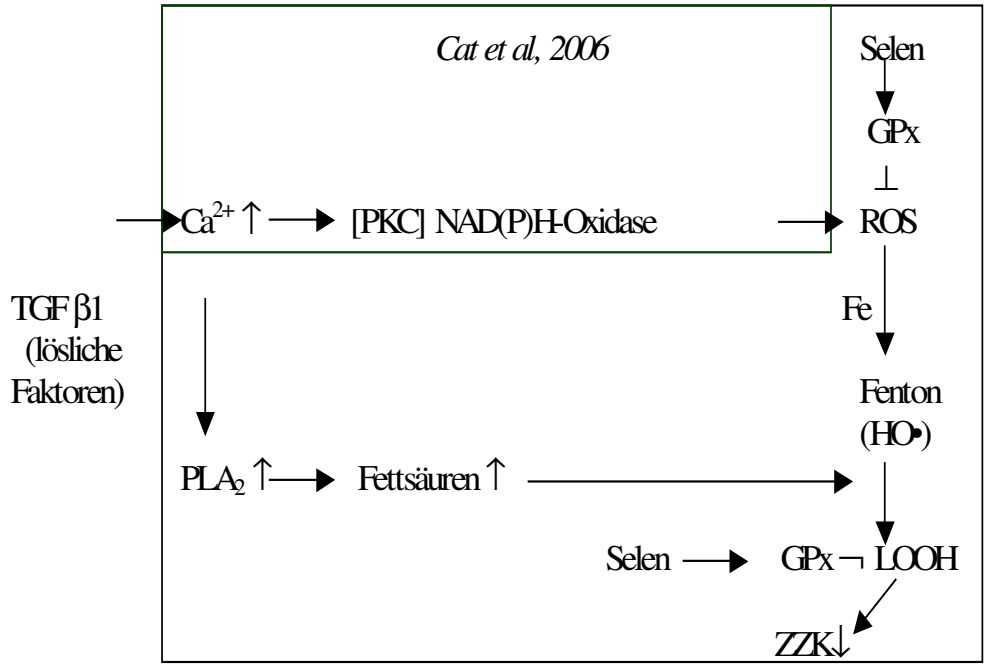


Abb. 30 Molekulare Mechanismen der ZZK-Verminderung durch konditioniertes Medium von Tumorzellen.
Durch lösliche Faktoren wie TGF-β1 im konditioniertem Medium der Tumorzelle strömt Kalzium in die Zelle. Durch die Aktivierung der NADP(H)-Oxidase entstehen in stromalen Zellen ROS (oberer Kasten: Schema abgeändert nach Cat et al, 2006, unterer Kasten: Schema aus der vorliegenden Arbeit). Durch die Fenton-Reaktion entstehen auf diesem Wege Hydroxylradikale(HO•), welche die Lipidperoxidation in Gang setzt. Durch Kalziumeinstrom wird die PLA_2 aktiviert und Fettsäuren sowie Lypidhydroperoxide werden aus der A_2 –Position im Phospholipidmoleküls aus der Zellmembran freigesetzt. Die ZZK wird durch die entstandenen cytosolischen Lipidhydroperoxide vermindert. Die Substitution von Selen erhöht die Aktivität der c- und phGPx, sodass vermehrt auftretende ROS abgebaut werden. Eine Folge davon ist die Wiederherstellung der ZZK.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die bisherigen Daten, dass die durch Tumorzellen sezernierten löslichen Faktoren die benachbarten stromalen Zellen bezüglich ihres oxidativen Status maßgeblich beeinflussen [Trosko et al, 1997; Cat et al, 2006]. Weiterhin wird die durch *gap junction*-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation stromaler Zellen durch ROS vermindert [Trosko et al, 1998; Stuhlmann et al, 2002, 2003], was eine Schwächung des stromalen Zellverbandes darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die cGPx und phGPx erstmals als maßgebliches Enzym für die Wirkung von Natriumselenit im untersuchten Zellmodell identifiziert (Abb. 30). Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass Antioxidantien, insbesondere Selenverbindungen und selenabhängige antioxidative Enzyme, einen wesentlichen Faktor in der Tumor-Stroma-Interaktion zugunsten einer Stärkung des umliegenden Gewebes gegen die Tumorzellen darstellen [Brenneisen et al, 2005; Brigelius-Flohe, 2006, 2008].

5. Perspektiven

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Selenit durch Stimulation der cGPx und phGpx die ZZK-vermindernden Effekte von konditioniertem Medium von Tumorzellen auf Fibroblasten aufhebt. Der Zusammenhang mit Lipidhydroperoxiden konnte dargelegt werden. In dem Prozess der Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten durch konditioniertes Medium von Tumorzellen ist neben der NAD(P)H-Oxidase, den ROS und speziell den Lipidhydroperoxiden auch die Phospholipase A_2 involviert.

Die Aussage dieser Arbeit ist, dass durch das konditionierte Medium von Tumorzellen ROS entstehen, wodurch vermutlich über die PLA_2 und weitere Enzyme Metaboliten freigesetzt werden, die die *gap junctionale* ZZK vermindern. Die Verminderung der ZZK stromaler Zellen begünstigt die Tendenz der Tumorzellen, aus einem Zellverband abzusiedeln und zu metastasieren

Daraus ergeben sich für die zukünftige Forschung interessante Fragestellungen:

- Gibt es weitere Komponenten der zur Verminderung der *gap junctionalen* ZZK führenden Signalkaskade?

- Welche Bedeutung hat die *gap junctionale* ZZK auf die Tumor-Stroma-Interaktion und die Metastasenbildung in einem *in vivo* Modell?

- Welche Mikronährstoffe und Antioxidantien können in ein therapeutisch wirksames Konzept eingegliedert werden?

Da Invasion und Metastasierung nach wie vor das größte Problem der Krebstherapie darstellen, könnte die Aufklärung der zellulären Interaktionen zwischen Tumor und Stroma bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze sehr hilfreich sein. Dieses neue Konzept der stromalen Therapie, die den Schutz stromaler Zellen vor dem Einfluss von Tumorzellen durch den Einsatz von Antioxidantien und Mikronährstoffen beinhaltet, könnte einen weiteren Schritt für die Chemoprävention gegen Tumorinvasion darstellen.

6. Zusammenfassung

Das Spurenelement Selen sowie andere Mikronährstoffe haben mittlerweile aufgrund der prognostisch günstigen Auswirkungen einen Platz in Therapiekonzepten gegen Tumorerkrankungen gefunden. Im Kontext der Tumorprogression und der Tumor-Stroma-Interaktion liefern epidemiologische Studien Anhaltspunkte für eine Wirksamkeit dieser Therapiekonzepte, ohne dass die molekularen Mechanismen der Tumorprogression und der Wirkung der Mikronährstoffe vollständig geklärt wurden. Dabei ist das Verständnis der hier auftretenden molekularen Mechanismen im Kampf gegen Tumorinvasion und Metastasierung von entscheidender Bedeutung.

Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, und hier hauptsächlich Lipidhydroperoxiden, durch konditioniertes Medium von Tumorzellen in einem etablierten *in vitro* Tumor-Stroma-Interaktionsmodell konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Die NAD(P)H-Oxidase konnte als beteiligtes Enzym identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Lipidhydroperoxide zu einer Verminderung der homologen ZZK von Fibroblasten führen und diese ROS-induzierte Verminderung der ZZK kalziumabhängig ist. Weiterhin konnte die Aufrechterhaltung der ZZK im beschriebenen Tumor-Stroma-Interaktionsmodell durch Antioxidantien, insbesondere Selen, gezeigt werden. Hieraus lassen sich weitere therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung von metastasierenden Tumoren ableiten.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die durch konditioniertes Medium von Tumorzellen induzierte Produktion von Lipidhydroperoxiden in Fibroblasten durch die Behandlung mit Selen vermindert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die ZZK-regenerierende Wirkung von Selen glutathionabhängig ist. In diesem Zusammenhang konnten die Enzyme cGPx und phGPx als für die ZZK-regenerierende Selenwirkung ursächliche Enzyme identifiziert werden.
Die vorliegende Studie zeigte weiterhin den Einfluss der Phospholipase A_2 auf den Transduktionsweg der ZZK-Verminderung durch konditioniertes Medium von Tumorzellen und liefert Anreize für die weitere Erforschung dieser Enzymgruppe und deren Metabolite im Zusammenhang der Karzinogenese.

7. Literaturverzeichnis

Antunes F, Salvador A, Pinto RE.
PHGPx and phospholipase A2/GPx: comparative importance on the reduction of hydroperoxides in rat liver mitochondria.
Free Radic Biol Med. 1995 Nov;19(5):669-77.

Aplin AE, Howe AK, Juliano RL
Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth.
Curr. Opin. Cell. Biol. 1999 11: 737-744.

Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Lloret A, Lehner M, Garcia-de-la Asuncion J, Viña J.
Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage.
Methods Enzymol. 1999;299:267-76.

Aubin F, Humbey O, Guerrini JS, Mougin C, Laurent R.
[Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus]
Ann Dermatol Venereol. 2003 Dec;130(12 Pt 1):1131-8. Review.

Bao Y, Chambers SJ, Williamson G.
Direct separation of hydroperoxy- and hydroxy-phosphatidylcholine derivatives: application to the assay of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.
Anal Biochem. 1995 Jan 1;224(1):395-9

Beck MA, Shi Q, Morris VC, Levander OA.
Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates.
Nat Med. 1995 May;1(5):433-6.

Böck A, Flohé L, Köhrle J.
Selenoproteins - biochemistry and clinical relevance.
Biol Chem. 2007 Oct;388(10):985-6.

Brash AR.
Arachidonic acid as a bioactive molecule.
J Clin Invest. 2001 Jun 1; 107(11): 1339-1345.PMCID: 209328

Brenneisen P, Oh J, Wlaschek M, Wenk J, Briviba K, Hommel C, Herrmann G, Sies H, Scharffetter-Kochanek K.
Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts.
Photochem Photobiol. 1996 Oct;64(4):649-57. Corrected and republished in:
Photochem Photobiol 1996 Nov;64(5):877-85.

Brenneisen P, Steinbrenner H, Sies H.
Selenium, oxidative stress, and health aspects.
Mol Aspects Med. 2005 Aug-Oct;26(4-5):256-67. Review.

Brigelius-Flohé R.
Selenium compounds and selenoproteins in cancer.
Chem Biodivers. 2008 Mar;5(3):389-95

Brigelius-Flohe R.
Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors.
Biol Chem. 2006 Oct-Nov;387(10-11):1329-35. Review.

Brigelius-Flohe R.
Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases.
Free Radic Biol Med. 1999 Nov;27(9-10):951-65. Review.

Brigelius-Flohe R, Banning A, Kny M, Bol GF.
Redox events in interleukin-1 signaling.
Arch Biochem Biophys. 2004 Mar 1;423(1):66-73. Review.

Brigelius-Flohe R, Flohe L.
Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation?
Biofactors. 2003;17(1-4):93-102. Review

Canfield PJ, Xu FN, Greenoak GE, Reeve VE, Gallagher CH, Wilkinson F.
Ultrastructure of ultraviolet radiation-induced hairless mouse skin carcinogenesis, with special reference to the epidermal-dermal junction.
Pathology. 1986 Jul;18(3):337-44.

Cat B, Stuhlmann D, Steinbrenner H, Alili L, Holtkotter O, Sies H, Brenneisen P.
Enhancement of tumor invasion depends on transdifferentiation of skin fibroblasts mediated by reactive oxygen species
J Cell Sci. 2006 Jul 1;119(Pt 13):2727-38. Epub 2006 Jun 6

Cat B
Mesenchymal-mesenchymale Transition: Oxidativer Stress und Tumorinvasion
Inaugural-Dissertation 2007 Düsseldorf

Cerutti PA.
Oxy-radicals and cancer.
Lancet. 1994 Sep 24;344(8926):862-3. Review.

Chaudiere J, Wilhelmsen EC, Tappel AL.
Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans
J Biol Chem. 1984 Jan 25;259(2):1043-50.

Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW et al
Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial.
Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA 276. 1996: 1957-1963.

Davies MJ, Forni LG, Willson RL.
Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions.
Biochem J. 1988 Oct 15; 255(2): 513-522. PMCID: 1135258

De Wever O, Mareel M
Role of tissue stroma in cancer cell invasion.
J. Pahol. 200, 2003: 429-447.

Docherty AJ, O'Connell J, Crabbe T, Angal S, Murphy G.
The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases.
Trends Biotechnol. 1992 Jun;10(6):200-7. Review.

Epp O, Ladenstein R, Wendel A.
The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution.
Eur J Biochem. 1983 Jun 1;133(1):51-69

Fan AM, Kizer KW.
Selenium. Nutritional, toxicologic, and clinical aspects.
West J Med. 1990 Aug; 153(2): 160-167. PMCID: 1002502

Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R.
Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis.
Ann N Y Acad Sci. 1990;580:161-75.

Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L
Redox regulation of NF-kappa B activation.
Free Radic Biol Med. 1997;22(6):1115-26

Flohe L, Gunzler WA.
Assays of glutathione peroxidase.
Methods Enzymol. 1984;105:114-21.

Folkman J.
Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?
Nat Rev Drug Discov. 2007 Apr;6(4):273-86. Review.

Giancotti FG, Ruoslahti E
Integrin signaling.
Science 285, 1999: 1028-1032.

Griffith OW, Meister A.
Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine)
J Biol Chem. 1979 Aug 25;254(16):7558-60.

Hayashi T, Nomata K, Chang CC, Ruch RJ, Trosko JE.
Cooperative effects of v-myc and c-Ha-ras oncogenes on gap junctional intercellular communication and tumorigenicity in rat liver epithelial cells.
Cancer Lett. 1998 Jun 19;128(2):145-54.

Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter- Kochanek K.
UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts.
Exp Dermatol. 1993 Mar;2(2):92-7.

Hii CS, Ferrante A, Schmidt S, Rathjen DA, Robinson BS, Poulos A, Murray AW.
Inhibition of gap junctional communication by polyunsaturated fatty acids in WB cells: evidence that connexin 43 is not hyperphosphorylated.
Carcinogenesis. 1995 Jul;16(7):1505-11

Islam KN, Kayanoki Y, Kaneto H, Suzuki K, Asahi M, Fujii J, Taniguchi N
TGF-beta1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in HIT cells through accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and glutathione peroxidase. Free. Radic. Biol. Med. 22, 1997: 1007-1017.

Kahari VM, Saarialho-Kere U.
Matrix metalloproteinases in skin.
Exp Dermatol. 1997 Oct;6(5):199-213. Review.

Kielty CM, Shuttleworth CA.
Microfibrillar elements of the dermal matrix.
Microsc Res Tech. 1997 Aug 15;38(4):413-27. Review.

Klotz LO, Kroncke KD, Buchczyk DP, Sies H (2003)
Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress.
J. Nutr. 133: 1448S-1451S.

Koivukangas V, Kallioinen M, Autio-Harmainen H, Oikarinen A.
UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo.
Acta Derm Venereol. 1994 Jul;74(4):279-82.

Kohrl J, Brigelius-Flohe R, Bock A, Gartner R, Meyer O, Flohe L.
Selenium in biology: facts and medical perspectives.
Biol Chem. 2000 Sep-Oct;381(9-10):849-64. Review.

Kugler A.
Matrix metalloproteinases and their inhibitors.
Anticancer Res. 1999 Mar-Apr;19(2C):1589-92. Review.

Lazrak A, Peres A, Giovannardi S, Peracchia C.
Ca-mediated and independent effects of arachidonic acid on gap junctions and Ca-independent effects of oleic acid and halothane.
Biophys J. 1994 Sep; 67(3): 1052-1059.PMCID: 1225457

Liotta LA, Kohn EC
The microenvironment of the tumour-host interface.
Nature 411, 2001: 375-379.

Loch-Caruso R, Upham BL, Harris C, Trosko JE.
Divergent roles for glutathione in lindane-induced acute and delayed-onset inhibition of rat myometrial gap junctions.
Toxicol Sci. 2005 May;85(1):694-702. Epub 2005 Feb 16

Maiorino M, Gregolin C, Ursini F.
Phospholipidhydroperoxide glutathione peroxidase.
Methods Enzymol. 1990;186:448-57.

Makropoulos V, Bruning T, Schulze-Osthoff K.
Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV-1 LTR promoter activity.
Arch Toxicol. 1996;70(5):277-83.

Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer , H., und Pullauf, J.
Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung
Pharmazeutische Zeitung 140, 1995, 2313-2327

Marnett LJ
Chemistry and biology of DNA-damage by malondialdehyde.
IARC Sci. Publ. 150, 1999: 17-27.

Matrisian LM.
The matrix-degrading metalloproteinases.
Bioessays. 1992 Jul;14(7):455-63. Review.

Mesnil M
Connexins and cancer.
Biol. Cell. 94, 2002: 493-500.

Meyer T, Hart IR.
Mechanisms of tumor metastasis.
Eur J Cancer. 1998 Feb;34(2):214-21. Review.

Nakamura Y, Kozuka M, Naniwa K, Takabayashi S, Torikai K, Hayashi R, Sato T, Ohigashi H, Osawa T.
Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation.
Free Radic Biol Med. 2003 Nov 1;35(9):997-1007.

Nakanishi M, Rosenberg DW.
Roles of cPLA(2)alpha and arachidonic acid in cancer. Biochim Biophys Acta. 2006 Nov;1761(11):1335-43. Epub 2006 Sep 15.

Niessen H, Harz H, Bedner P, Kramer K, Willecke K.
Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate.
J Cell Sci. 2000 Apr;113 (Pt 8):1365-72.

Otsuka G, Nagaya T, Saito K, Mizuno M, Yoshida J, Seo H.
Inhibition of nuclear factor-kappaB activation confers sensitivity to tumor necrosis factor-alpha by impairment of cell cycle progression in human glioma cells.
Cancer Res. 1999 Sep 1;59(17):4446-52

Petersen MJ, Hansen C, Craig S.
Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts.
J Invest Dermatol. 1992 Oct;99(4):440-4.

Pierceall WE, Woodard AS, Morrow JS, Rimm D, Fearon ER
Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines.
Oncogene. 1995 11: 1319-1326.

Puz MJ, Johnson BA, Murphy BJ.
Use of the antioxidant BHT in asymmetric membrane tablet coatings to stabilize the core to the acid catalyzed peroxide oxidation of a thioether drug.
Pharm Dev Technol. 2005;10(1):115-25.

Ross JM, McIntire LV, Moake JL, Rand JH.
Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions.
Blood. 1995 Apr 1;85(7):1826-35.

Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MV.
Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(8):2708-12.

Sakurai K, Nabeyama A, Fujimoto Y.
Ascorbate-mediated iron release from ferritin in the presence of alloxan.
Biometals. 2006 Jun;19(3):323-33

Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, Bolsen K, Schothorst A, Goerz G, Krieg T, Plewig G.
UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo.
Arch Dermatol Res. 1991;283(8):506-11.

Scharffetter-Kochanek K, Klein CE, Heinen G, Mauch C, Schaefer T,Adelmann-Grill BC, Goerz G, Fusenig NE, Krieg TM, Plewig G.
Migration of a human keratinocyte cell line (HACAT) to interstitial collagen type I is mediated by the alpha 2 beta 1-integrin receptor.
J Invest Dermatol. 1992 Jan;98(1):3-11.

Scharffetter-Kochanek K.
Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy.
Adv Pharmacol. 1997;38:639-55. Review.

Scheiden R, Wagener C, Knolle U, Dippel W, Capesius C.
Atypical squamous cells of undetermined significance: audit and the impact of potential litigation. Retrospective review of 682 cases.
Cytopathology. 2003 Oct;14(5):257-62.

Schrauzer GN
Anticarcinogenic effects of selenium.
Cell. Mol. Life Sci. 57, 2000: 1864-1873.

Schrauzer GN, Rhead WJ
Interpretation of the methylene blue reduction test of human plasma and the possible cancer protecting effect of selenium.
Experientia 27, 1971: 1069-1071.

Schwarz K, Stesny JA, Foltz CM
Relation between selenium traces in L-cystine and protection against dietary liver necrosis.
Metabolism. 1959 Jan;8(1):88-90. No abstract available.

Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Montestruque S.
The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides.
Arch Biochem Biophys. 1983 Jun;223(2)

Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW
Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities.
Cell Growth Differ. 2, 1991: 365-372.

Sies H
Biochemistry of oxidative stress.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 25, 1986: 1058-1071.

Sies H
Oxidative stress: from basic research to clinical application.
Am. J. Med. 91, 1991: 31S-38S.

Sies H
Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. Exp. Physiol. 82, 1997: 291-295.

Sies H, Cadenas E
Oxidative stress: damage to intact cells and organs.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 311, 1985: 617-631.

Stein B, Rahmsdorf HJ, Steffen A, Litfin M, Herrlich P.
UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human Immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein.
Mol Cell Biol. 1989 Nov;9(11):5169-81.

Stuhlmann D, Ale-Agha N, Reinehr R, Steinbrenner H, Ramos MC, Sies H, Brenneisen P
Modulation of homologous gap junctional communication of human dermal fibroblasts via paracrine factor(s) generated by squamous tumor cells.
Carcinogenesis 24, 2003: 1737-1748.

Stuhlmann D
Modulation Gap Junction vermittelter Zell-Zell-Kommunikation durch parakrin wirkenden Transformierenden Wachstumsfaktor β1 (TGFβ1): Rolle in der Tumor-Stroma-Interaktion
Inaugural-Dissertation 2004 Düsseldorf

Stuhlmann D, Steinbrenner H, Wendlandt B, Mitic D, Sies H, Brenneisen P
Paracrine effect of TGFβ1 on downregulation of gap junctional communication between human dermal fibroblasts.
BBRC 319, 2004: 321-326.

Squires J, Berry MJ.
Selenium, selenoproteins, and cancer.
Hawaii Med J. 2006 Aug;65(8):239-40.

Thannickal VJ, Fanburg BL.
Activation of an H2O2-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1.
J Biol Chem. 1995 Dec 22;270(51):30334-8.

Thannickal VJ, Fanburg BL.
Reactive oxygen species in cell signaling.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Dec;279(6):L1005-28. Review.

Trosko JE, Inoue T.
Oxidative stress, signal transduction, and intercellular communication in radiation carcinogenesis.
Stem Cells. 1997;15 Suppl 2:59-67.

Trosko JE, Ruch RJ.
Cell-cell communication in carcinogenesis
Front Biosci. 1998 Feb 15;3:D208-36.
PMID: 9458335 [PubMed - as supplied by publisher]

Trosko JE., Chang CC
Mechansim of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer
Mutat Res. 2001 Sep 1;480-481:219-29.

Trosko JE.
The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy.
Biomed Pharmacother. 2005 Oct;59 Suppl 2:S326-31. Review.
PMID: 16507402

Trosko JE, Chang CC, Upham B, Wilson M.
Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intracellular signalling leading to altered gap junctional intercellular communication.
Toxicol Lett. 1998 Dec 28;102-103:71-8.

Upham BL, Deocampo ND, Wurl B, Trosko JE.
Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated fatty acids is dependent on the chain length of the fluorinated tail.
Int J Cancer. 1998 Nov 9;78(4):491-5.

Upham BL, Trosko JE.
Oxidative-dependent integration of signal transduction with intercellular gap junctional communication in the control of gene expression.
Antioxid Redox Signal. 2009 Feb;11(2):297-308

van der Rest M, Garrone R.
Collagen family of proteins.
FASEB J. 1991 Oct;5(13):2814-23. Review.

Wenk HN, Honda CN.
Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues.
J Comp Neurol. 1999 Jun 14;408(4):567-79.

Wlaschek M, Bolsen K, Herrmann G, Schwarz A, Wilmroth F, Heinrich PC, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K.
UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived-collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage?
J Invest Dermatol. 1993 Aug;101(2):164-8.

Wlaschek M, Heinen G, Poswig A, Schwarz A, Krieg T, Scharffetter- Kochanek K.
UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6.
Photochem Photobiol. 1994 May;59(5):550-6.

Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H, Scharffetter-Kochanek K.
Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase.
J Invest Dermatol. 1995 Feb;104(2):194-8.

Wlaschek M, Wenk J, Brenneisen P, Briviba K, Schwarz A, Sies H, Scharffetter-Kochanek K.
Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro.
FEBS Lett. 1997 Aug 18;413(2):239-42.

Yamasaki H, Mesnil M, Omori Y, Mironov N, Krutovskikh V.
Intercellular communication and carcinogenesis.
Mutat Res. 1995 Dec;333(1-2):181-8.

Yamasaki H, Krutovskikh V, Mesnil M, Tanaka T, Zaidan-Dagli ML, Omori Y.
Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis.
C R Acad Sci III. 1999 Feb-Mar;322(2-3):151-9.

Yang C, Niu C, Bodo M, Gabriel E, Notbohm H, Wolf E, Müller PK.
Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. An animal model to study the molecular defects of Kashin-Beck disease.
Biochem J. 1993 Feb 1; 289(Pt 3): 829-835. PMCID 1132251

Yasuda M, Fujita T.
Effect of lipid peroxidation on phospholipase A2 activity of rat liver mitochondria. Jpn J Pharmacol. 1977 Jun;27(3):429-35.

Yu TW, Anderson D.
Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation.
Mutat Res. 1997 Oct 6;379(2):201-10.

Yuspa SH
The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis.
J. Dermatol. Sci. 17, 1998: 1-7.

8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BHT	2, 6-butyliertes Hydroxytoluen
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
BSO	Buthionin Sulfoximin
CM	Konditioniertes Medium
DAPI	Bisbenzimid
DMEM	Eagle´s Medium, nach Dublecco`s Modifikation
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fötales Kälberserun
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HDF	humane dermale Fibroblasten
KCL	Kaliumchlorid
MeOH	Methanol
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mM	mMol/L
mm	Millimeter
MTT	Tetrazoliumsalz3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAC	N-acetyl-L-cystein
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
nM	nmol/L
nm	Nanometer
MAFP	α-Methyl-Arachidonylfluorophosphonat
MS	Mercaptosuccinat
µm	Mikrometer
µM	µMol/

PBS	Phosphate buffered saline
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
s.	siehe
SC	Solution control (Lösungsmittelkontrolle)
SCL1	Plattenepithelkarzinomzellen der Linie SCL1
SDS	Natriumdodecylsulfat
SN	Supernatant (Zellüberstand)
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte isotonische Salzlösung mit 0,1% (v/v) TritonX100
TGF-β1	Transforming growth factor-beta 1
rTGF-β1	rekombinantes Transforming growth factor-beta 1
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation

Lebenslauf von Bernhard Wendlandt

Name: Bernhard Hans Günther Wendlandt
geboren: 24.05.1979 in Berlin- Charlottenburg

Sohn von Dr.Ing. Reinhard Wendlandt, geb. 25.10.1944 und Inge Silvia Schuren, Kisowetz, geborene Kisowetz, geboren 27.05.1951, gestorben 18.06.2003.

Schul- und Berufsausbildung

Frühjahr 1985- 1989	Besuch der Grundschule Meiderich, Wiesbadener Strasse in 47138 Duisburg
Frühjahr 1989-1998 Abschluss mit Abitur 1998	Besuch des Max-Planck-Gymnasium in Meiderich, Werner-Wild-Strasse in 47138 Duisburg
Oktober 1998 bis November 1999	Ableistung des Zivildienstes bei der Berufsfeuerwehr Duisburg
Frühjahr 2000- Herbst 2005	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf
20.03.2002 in Düsseldorf	Ärztliche Vorprüfung Note gut (1,66)
25.03.2003 in Düsseldorf	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note gut
05.09.2003 in Düsseldorf	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note befriedigend (3,00)
Herbst 2005- Herbst 2006	Ableistung des praktischen Jahres am Klinikum Gerresheim in Düsseldorf
07.11.2006 in Düsseldorf	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Note gut, Gesamtnote gut (2,50)
23.11.2006	Approbation als Arzt
01.01.2007 – 31.03.2007	Assistenzarzt an der Uni-Klinik Düsseldorf, Klinik für Gastroenterologie
Seit 01.05.2007	Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesie, Schmerztherapie und operative Intensivmedizin, St. Johannes Hospital Duisburg Hamborn