

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies

**Induktion der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion und die Rolle der
Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2**

D i s s e r t a t i o n

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

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

vorgelegt von

Pauline Patak

(2003)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Prof. Dr. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. Dr. Helmut Sies

Korreferent: Prof. Dr. Stephan vom Dahl

meiner Familie und insbesondere meiner Grossmutter

„Was nutzt alles Wissen,
wenn man es nicht im Kopf behält.“
Dante Alighieri. „Die göttliche Komödie“

Herrn Professor Dr. Dr. Helmut Sies, unter dessen Anleitung diese Arbeit entstand, danke ich sehr herzlich für seine stetige Hilfe, seine Förderung und dafür, daß er mir dieses Thema anvertraut hat.

Herrn Professor Dr. Stephan vom Dahl danke ich für die Übernahme des Korreferates.

PD Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, für seine Einweisung in Methoden und die Diskussion von Ergebnissen.

- Dr. Heiko Possel danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit hinsichtlich der immunhistochemischen Experimente.
- Dipl.-Lebensmittelchemikerin Niloofar Ale-Agha danke ich recht herzlich für die Übernahme der Arbeiten im Hinblick auf die Messung der Zell-Zell-Kommunikation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Interzelluläre Kommunikation	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der Gap Junctions	1
1.1.2	Connexine	1
1.2	Regulation der interzellulären Kommunikation	3
1.2.1	Phosphorylierung von Connexin43 durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	5
1.3	Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies	9
1.3.1	Stoffwechsel von Menadion	9
1.3.2	Bildung von Peroxynitrit und seine schädlichen Wirkungen	11
1.4	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	12
1.5	Ziele der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Zellkultur	15
2.2	Toxizitätsmessung (MTT-Test)	15
2.3	Synthese von Peroxynitrit	16
2.4	Behandlung von Zellen	16
2.4.1	Behandlung der Zellen mit Menadion und TPA	16
2.4.2	Behandlung der Zellen mit Peroxynitrit	17
2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.6	Western Blotting und Immunanfärbung	19
2.6.1	Elektrotransfer	19
2.6.2	Immunanfärbung	20
2.7	Messung der Zell-Zell-Kommunikation	20

2.8	Immunhistochemie	21
3.	Ergebnisse	23
3.1	Toxizität von Menadion	23
3.2	ERK1/2-Aktivierung durch Menadion und Vergleich mit TPA	24
3.3	MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 hemmen die ERK-Aktivierung durch Menadion	25
3.4	Induktion der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion und Vergleich mit TPA	27
3.5	MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 hemmen die Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion	29
3.6	Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin hemmt die Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion	31
3.7	Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation durch Menadion	32
3.8	Mechanismus der Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation durch Menadion	33
3.9	ERK1/2-Aktivierung durch Peroxynitrit	36
3.10	Peroxynitrit führt nicht zur Induktion der Connexin43-Phosphorylierung	37
3.11	Peroxynitrit führt nicht zur Dislokation von Connexin43 aus der Zellmembran	37
4	Diskussion	40
4.1	Hemmung der interzellulären Kommunikation durch Menadion	40

4.2	Vergleich von Menadion mit Peroxynitrit	43
4.3	Menadion und Karzinogenese	44
5	Zusammenfassung	46
6	Literaturverzeichnis	47
7	Anhang	59

1. Einleitung

1.1. Interzelluläre Kommunikation: Gap Junctions

1.1.1. Aufbau und Funktion von Gap Junctions

Gap Junctions sind interzelluläre Proteinkanäle, die die Zytosole von benachbarten Zellen direkt miteinander verbinden. Sie ermöglichen Nachbarzellen den Austausch von Ionen, Signalmolekülen und kleinen polaren Molekülen mit einem Molekulargewicht < 1000 Dalton. Bei Säugern sind nur wenige Zelltypen nicht über solche Verbindungen gekoppelt: Skelettmuskelzellen, zirkulierende Blutzellen, Stammzellen und manche Neurone (Loewenstein, 1981). Gap Junctions sind für zahlreiche physiologische Prozesse von Bedeutung. Sie spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Zellhomöostase, der Erregungsleitung, der Wachstumskontrolle, der Embryonalentwicklung und der Signaltransduktion (Loewenstein, 1981; Bennett *et al.*, 1991).

Ein Proteinkanal ist aus zwölf Connexinmolekülen aufgebaut. Sechs Connexinmoleküle bilden einen Halbkanal, den man als Connexon bezeichnet. Die Oligomerisierung der Connexine zu Connexonen findet im Golgi-Apparat statt. An der Zellmembran treten zwei solche Halbkanäle einander gegenüberliegender Nachbarzellen im Extrazellulärraum mit ihren Enden in Kontakt und bilden einen funktionsfähigen Kanal (Goodenough *et al.*, 1996; Yeager *et al.*, 1998). Die Dichte solcher Proteinkanäle in der Zellmembran kann bis zu $10.000/\mu\text{m}^2$ betragen.

1.1.2. Connexine

Connexine sind Transmembranproteine. Die räumliche Faltung des Connexinmoleküls in der Zellmembran entspricht annähernd der Form eines "M": Amino- und carboxyterminales Ende weisen ins Zellinnere, während die zwischen ihnen liegende Proteinkette unter Bildung von Proteinschleifen die Zellmembran vier Male durchquert (Goodenough *et al.*, 1996; Lampe und Lau, 2000; vgl. Abb. 1.1, Kap. 1.2). Connexine besitzen demnach vier Transmembranbereiche, zwei extrazelluläre und drei intrazelluläre Domänen. Insbesondere die an Serinresten reiche carboxyterminale zytoplasmatische Proteinregion des Connexinmoleküls scheint für

die Regulation der interzellulären Kommunikation eine wichtige Rolle zu spielen (vgl. Kap. 1.2.1). Die extrazellulären Proteinschleifen besitzen je 3 Cysteinreste, die unter Ausbildung von Disulfidbrücken (Rahman & Evans, 1991; John & Revel, 1991) für die Faltung des Connexinmoleküls und die Funktion der Gap Junction-Poren von Bedeutung sind (Dahl *et al.*, 1992). Die extrazellulären Schleifen und die Membrandurchgänge sind unter den verschiedenen Isoformen konserviert, während die zytoplasmatischen Bereiche variieren. Diese variablen Bereiche des Connexinmoleküls scheinen für unterschiedliche Permeabilität, Selektivität und Öffnungscharakteristik der Connexine verantwortlich zu sein (Trosko *et al.*, 1998; vgl. Kap. 1.2). Die Connexine gehören zu einer Multigen-Familie, die aus mindestens 13 Mitgliedern besteht (Goodenough *et al.*, 1996). Die Nomenklatur der Connexine richtet sich nach ihrem Molekulargewicht, das zwischen 25 und 50 kDa liegen kann. Die verschiedenen Connexingene werden beim Säugetier in den einzelnen Gewebsverbänden und Organen mit unterschiedlicher Präferenz exprimiert. Tabelle 1.1 vermittelt einen Überblick über die bis heute bekannten Connexine beim Säugetier, einschließlich ihrer bevorzugten Lokalisation.

Tabelle 1.1: Bekannte Connexine (Cx) beim Säugetier und deren bevorzugte Verteilung in Geweben und Organen (aus Trosko *et al.*, 1998).

Connexin	Gewebe
Cx26	Hepatozyten, Pankreas, Endometrium
Cx30	Gehirn, Haut
Cx30.3	Haut
Cx31	Haut, Plazenta
Cx31.1	Haut
Cx32	Hepatozyten, Niere, Pankreas
Cx33	Hoden
Cx37	Endothel, Lunge, Ovar
Cx40	Endothel, glatte Muskulatur, Myokard, Lunge
Cx43	Epithel, Herz, Uterus, Bindegewebe, Gehirn
Cx45	Niere, Haut
Cx46	Augenlinse
Cx50	Augenlinse

Gap Junction-Poren können in Gewebsverbänden, die mehr als nur einen Connexin-Typ exprimieren, aus unterschiedlichen Connexinen zusammengesetzt sein (heteromere Connexone). Diese oligomere Heterogenität ist offenbar mit funktionellen Besonderheiten verbunden (Nicholson *et al.*, 1987). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, daß diese Connexon-Heterogenität zu einer veränderten molekularen Permeabilität der Gap Junctions führen kann (Simon & Goodenough, 1998).

Mutationen im Bereich der Connexingene wurden bei einer Reihe von menschlichen Erkrankungen nachgewiesen (Abrams & Bennett, 2000). So wurden Mutationen im Connexin32-Gen mit der Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung, einer X-chromosomal vererbaren peripheren Neuropathie, verantwortlich gemacht (Bergoffen *et al.*, 1993), während Connexin26-Mutationen mit autosomal rezessiv und dominant vererbbarer Taubheit assoziiert worden sind (Kelsell *et al.*, 1997). Zahlreiche Experimente mit Connexingen-Knockoutmäusen haben gezeigt, daß Connexin37-Mutationen in Mäusen zu Infertilität, Connexin43-Mutationen zu kongenitalen kardialen Malformationen und Connexin46- oder Connexin50-Mutationen zu der Entstehung von Katarakten führen (Simon & Goodenough, 1998).

1.2. Regulation der interzellulären Kommunikation

Die Regulation der Zell-Zell-Kommunikation kann auf unterschiedlichen Ebenen erfolgen. Zellen modifizieren ihre interzelluläre Kommunikation sowohl durch die Variation der Gesamtzahl von Kanälen als auch durch die Öffnungs- und Schließungsdynamik der Gap Junction-Poren. Modulation der Connexingen-Expression und posttranslationale Modifizierung der Connexin-Untereinheiten können Anzahl und Aktivität der Gap Junction-Poren in der Zellmembran beeinflussen. So ist bekannt, daß bestimmte Hormone, wie Glucocorticoide und Östrogene, sowie zahlreiche Pharmaka die Transkription von Connexin43 erhöhen und somit zu einer Zunahme der Zahl der Proteinkanäle in der Zellmembran führen (Yu *et al.*, 1994; Kwiatkowski *et al.*, 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Connexin43 im Rahmen der posttranslationalen Modifizierung an mindestens zwei Stellen phosphoryliert wird. Diese posttranslationale Phosphorylierung scheint für die Aggregation der Connexinmoleküle zu einem Proteinkanal, für die Kanal-permeabilität und die Stabilität des Connexinmoleküls von Bedeutung zu sein (Musil

& Goodenough, 1991; vgl. Kap. 1.2.1). Connexine besitzen im Unterschied zu anderen integralen Membranproteinen eine ungewöhnlich kurze Halbwertszeit. Sie beträgt, gemessen in verschiedenen Zellkulturen oder Gewebsverbänden, für Connexin43 etwa 1-3 Stunden im Gegensatz zu einer Halbwertszeit von Tagen bei den meisten anderen Membranproteinen (Yancey & Nicholson, 1981; Laird *et al.*, 1995). Diese hohe Umsatzrate der Connexine ermöglicht einen raschen Auf- und Abbau von Gap Junctions. Für ihren Abbau existieren mehrere Mechanismen. Die Proteinkanäle werden durch Einstülpung der Zellmembran in das Zytoplasma internalisiert und in den Lysosomen abgebaut oder mittels Ubiquitylierung markiert und proteasomal abgebaut (Larsen & Hai, 1978; Laing & Beyer, 1995; Laing *et al.*, 1997; Laird, 1996). Musil *et al.* (2000) konnten zeigen, daß durch Verminderung der Umsatzrate von Connexin43 infolge einer Inhibierung des proteasomalen Abbaues die Anzahl der Gap Junction-Poren in der Zellmembran zunimmt und ein signifikanter Anstieg der interzellulären Kommunikation erfolgt. Phorbolster, wie das 12-O-Tetra-decanoylphorbol-13-acetat (TPA), können über eine Verminderung der Halbwertszeit und Erhöhung der Umsatzrate von Connexin43 die Anzahl der Gap Junction-Poren in der Zellmembran reduzieren und darüber zu einer Abnahme der interzellulären Kommunikation führen (Lampe, 1994). Die Geschwindigkeit des Auf- und Abbaus von Gap Junctions stellt somit einen wichtigen Mechanismus für die Regulation der Zell-Zell-Kommunikation dar.

Einmal in der Zellmembran gebildete Gap Junction-Kanäle werden von der Zelle über Öffnung und Schließung, auch als „Gating“ bezeichnet, reguliert. Es gibt verschiedene Mechanismen, die den Öffnungszustand der Kanäle modulieren. So kennt man Proteinkinasen, die Connexine phosphorylieren und dadurch möglicherweise über eine veränderte Tertiärstruktur die Kanäle entweder öffnen oder schließen (Brink, 1996; vgl. Kap. 1.2.1). Einige Connexine, wie das Connexin26, werden nicht phosphoryliert, so daß auch andere Mechanismen für die Öffnung und Schließung der Proteinkanäle von Bedeutung sein müssen. Dazu zählen u.a. die Regulation des Öffnungsverhaltens über den intrazellulären Protonen- und Calciumgehalt, das Membranpotential und über freie Radikale (Saez *et al.*, 1993). Ein niedriger pH-Wert und hohe Calciumkonzentrationen (~mM) schließen die Zell-Zell-Kanäle (Spray *et al.*, 1992; Lazrak & Peracchia, 1993). Das Calcium-bindende Protein Calmodulin spielt offenbar für Wirkung von Calcium auf die Gap Junctions eine wichtige Rolle (Toyama *et al.*, 1994; Peracchia *et al.* 2000). Freie Radikale

werden während des normalen Zellmetabolismus oder durch bestimmte toxische Agenzien gebildet. Hohe extrazelluläre Konzentrationen von Radikalen schließen die Gap Junction-Poren und vermindern somit die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen (Saez *et al.*, 1987; Ruch & Klauning, 1988). In welchem Ausmaß freie Radikale an der physiologischen Regulation der interzellulären Kommunikation beteiligt sind und über welche Mechanismen dies geschieht, ist zur Zeit nicht geklärt. Es wurde aber gezeigt, daß Radikale, die bei ischämischen Prozessen, wie zum Beispiel einem Myokardinfarkt, in größerem Umfang anfallen, wesentlich am Abfall der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt sind (Ruch & Klauning, 1988; Owens *et al.*, 1996; Trosko *et al.*, 1998).

Unter all diesen Mechanismen spielt die Phosphorylierung von Connexinen durch bestimmte Proteinkinasen für die Regulation der interzellulären Kommunikation eine zentrale Rolle.

1.2.1. Phosphorylierung von Connexin43 durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Durch posttranslationale Phosphorylierung liegt Connexin43 in der unstimulierten Zelle in verschiedenen Phospho-Isoformen vor. Mit SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich diese Isoformen differenzieren. Man unterscheidet die schnell wandernde nicht phosphorylierte (NP) Form und die langsam wandernden phosphorylierten Isoformen P₁ und P₂ (Goodenough *et al.*, 1996). Darüber hinaus enthält Connexin43 Phosphorylierungsstellen für einige bekannte Proteinkinasen, wie Proteinkinase C (Saez *et al.*, 1997; Lampe *et al.*, 2000) und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) (Warn-Cramer *et al.*, 1996, 1998; Lau *et al.*, 2000). Bei den Phosphorylierungsstellen handelt es sich insbesondere um Serin-, seltener Threonin- oder Tyrosinreste (Crow *et al.*, 1990; Kurata *et al.*, 1994) in der zytoplasmatischen carboxyterminalen Proteinregion des Connexinmoleküls (Hossain & Boynton, 2000; vgl. Abb. 1.1). In der SDS-Gelelektrophorese läßt sich diese Hyperphosphorylierung des Connexinmoleküls als P₃ Phospho-Isoform darstellen.

Die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch Wachstumsfaktoren, wie den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) oder den Thrombozytenwachstumsfaktor (PDGF), kann in einer Abnahme der Zell-Zell-Kommunikation resultieren (Lau *et*

al.,1992). In Maus-Fibroblasten und in Rattenleberepithelzellen wurde gezeigt, daß EGF und PDGF zu einer raschen (2-10 min) und reversiblen Hemmung der interzellulären Kommunikation führen (Maldonado *et al.*, 1988; Lau *et al.*, 1992). Dabei korreliert die Abnahme der Zell-Zell-Kommunikation mit einer Hyperphosphorylierung von Connexin43. Die Anzahl der Gap Junction-Poren in der Zellmembran bleibt unverändert (Lau *et al.*, 1992). Allerdings scheint die Wirkung von EGF auf die interzelluläre Kommunikation zellspezifisch zu sein (Rivedal *et al.*, 1996; vgl. Tabelle 1.2). Warn-Cramer *et al.* (1998) konnten schließlich zeigen, daß EGF über eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, die spezifische Serinreste des Connexinmoleküls offenbar direkt phosphorylieren, zu einer Abnahme der Zell-Zell-Kommunikation führt. Bei den in Connexin43 phosphorylierten Serinresten handelt es sich um drei von Prolin gefolgte Serinreste: Ser255, Ser279 und Ser282. Connexin43-Mutanten, denen diese drei Phosphorylierungsstellen fehlen, sind zwar in der Lage, sich zu funktionsfähigen Gap Junction-Poren zu formieren, aber es erfolgt keine Hemmung der interzellulären Kommunikation durch EGF-Behandlung mehr. Inkubiert man Zellen, die mit EGF behandelt wurden mit Inhibitoren, welche die Aktivierung der MAPK verhindern, so unterbleiben sowohl die Connexin-Phosphorylierung als auch die Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation (Warn-Cramer *et al.*, 1998). Der Thrombozytenwachstumsfaktor und MAPK-Aktivator PDGF kann ebenso wie EGF zu einer Hemmung der interzellulären Kommunikation führen (Lau *et al.*, 1992, 2000; Lampe & Lau, 2000), allerdings scheinen die Mechanismen komplexer zu sein. Es wird eine Beteiligung sowohl für Proteinkinase C (PKC) als auch für MAPK angenommen, da die Hyperphosphorylierung von Connexin43 und die Abnahme der Kommunikation sowohl durch PKC-Inhibitoren als auch durch Inhibitoren der MAPK-Aktivierung gehemmt wurden (Hossain *et al.*,1998b, 1999). Neuere Erkenntnisse gehen zusätzlich von einer Beteiligung weiterer, bislang noch unbekannter Faktoren aus.

Welche Modulationen in der Zelle nach erfolgter Connexin43-Phosphorylierung durch MAPK letztendlich für die Abnahme der interzellulären Kommunikation verantwortlich sind, ist nicht genau bekannt. Es wird vermutet, daß die Connexin-Phosphorylierung über zahlreiche Mechanismen in die Regulation der interzellulären Kommunikation eingreifen kann. So reguliert die Phosphorylierung von Connexin43 die Oligomerisierung von Connexinen zu Connexonen, die Geschwindigkeit des Auf- und Abbaus von Gap Junctions und, wie bereits unter Kap. 1.2 beschrieben, das Gating

von Gap Junction-Poren. Eine weitere Hypothese geht davon aus, daß über die Phosphorylierung von Connexin43 bestimmte Bindungsstellen im Connexinmolekül geschaffen werden, die es Proteinkinasen und bestimmten Proteinen erlauben, mit dem Connexin in Wechselwirkung zu treten und darüber eine Modifizierung der interzellulären Kommunikation vorzunehmen (Lampe & Lau, 2000).

Tabelle 1.2: Aktivierung von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen und Auswirkungen auf die Zell-Zell-Kommunikation am Beispiel von Connexin43 (modifiziert nach Lau *et al.*, 2000)

Rezeptortyrosinkinase	Effekt auf die Zell-Zell-Kommunikation nach Kurz- (10 min-3 h) oder Langzeitbehandlung (5-6 h) mit verschiedenen Wachstumsfaktoren	Zelltyp	wahrscheinlicher Mechanismus
EGFR ¹	↓ (Kurzzeitbehandlung mit EGF)	Rattenleberepithelzellen, Hela Zellen, Maus-Fibroblasten	↑ Cx43-Serin-Phosphorylierung durch MAPK
	↑ (Langzeitbehandlung mit EGF)	humane Nierenepithelzellen	↑ Cx43-Spiegel
PDGFR	↓ (Kurzzeitbehandlung mit PDGF)	Maus-Fibroblasten	↑ Cx-43-Phosphorylierung? MAPK/PKC, andere?
		Rattenleberepithelzellen	
InsR	↓ (Kurzzeitbehandlung mit Insulin)	Xenopus Oozyten	↑ Cx43-Phosphorylierung
FGFR	↓ (Kurzzeitbehandlung mit FGF)	Rattenkardio-myozyten	↑ Cx43-Serin-Phosphorylierung
	↑ (Langzeitbehandlung mit FGF)	kardiale Rattenfibroblasten, bovine Endothelzellen	↑ Cx43-RNA und Protein
HGF	↓ (Kurzzeitbehandlung mit HGF)	Maus-Keratinocyten	↓ Cx43-Protein

¹Abkürzungen: **EGFR**, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; **PDGFR**, Thrombozytenwachstumsfaktorrezeptor; **InsR**, Insulinrezeptor; **FGFR**, Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor; **HGF**, Hepatozytenwachstumsfaktorrezeptor.

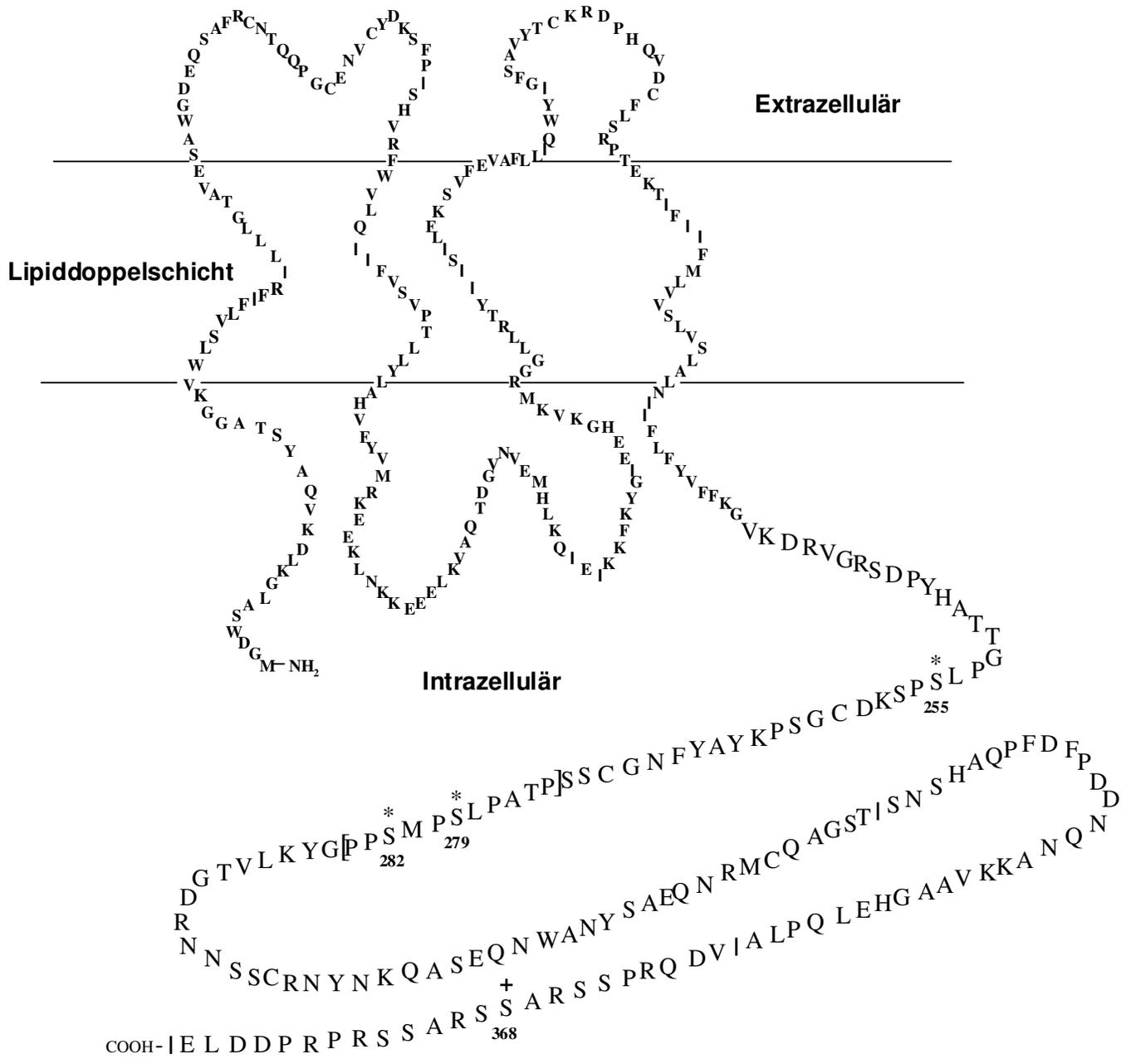


Abb. 1.1: Phosphorylierungsstellen für MAPK (*255, *279 und *282) und PKC (+368) im Connexin43-Molekül. Das Connexin43-Molekül ist schematisch dargestellt entsprechend der angenommenen Orientierung in der Zellmembran. Die Proteinfaltung wurde willkürlich gezeichnet. Eine Prolin-reiche Proteinregion wurde in Klammern gesetzt. Modifiziert nach Lampe & Lau, 2000.

1.3. Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies

1.3.1. Stoffwechsel von Menadion

Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon / Vitamin K₃) ist ein Chinon, das Zellen auf vielfältige Weise zu schädigen vermag. *In vivo*- und *in vitro*-Experimente haben gezeigt, daß Menadion das Zellwachstum inhibiert und zur Induktion von Apoptose führt (Prasad *et al.*, 1981; Noto *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1993; Chlebowski *et al.*, 1985). Für die zytotoxischen Eigenschaften des Menadions werden im wesentlichen zwei Mechanismen verantwortlich gemacht: die Erzeugung von oxidativem Stress und die Arylierung von Thiolgruppen (Thor *et al.*, 1982; Rossi *et al.*, 1986).

Menadion ist ein „Redox-Cycler“, der intrazellulär sowohl durch Ein- als auch Zwei-Elektronen-Transfer reduziert und unter Bildung von Superoxidradikalanionen wieder zur Ausgangssubstanz reoxidiert wird. In der mikrosomalen und mitochondrialen Zellfraktion unterliegt das Chinon der Ein-Elektronen-Reduktion durch die NADPH-Zytochrom-P-450-Reduktase bzw. die NADPH-Ubichinon-Oxidoreduktase. Dabei entsteht das entsprechende Semichinonradikal, das unter aeroben Bedingungen Sauerstoff zum Superoxidradikal reduziert. Das Superoxidradikal kann wiederum – spontan oder von Superoxiddismutasen katalysiert – zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid dismutieren. Im Zytosol reduziert das Enzym DT-Diaphorase (NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase) Menadion durch einen Zwei-Elektronen-Transfer zum Hydrochinon, ohne dabei Semichinonradikale als Intermediärprodukte freizusetzen (Brunmark & Cadenas, 1989; vgl. Abb. 1.2). Die DT-Diaphorase hat deshalb einen zytoprotektiven Effekt (Miller *et al.*, 1986). Andererseits fördert die Zwei-Elektronen-Reduktion zum Hydrochinon dessen Reoxidation – wiederum unter der Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid, sowie, über die Fenton-Reaktion aus letzterem hervorgehend, von Hydroxylradikalen. Diese so entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies reagieren mit Proteinen, Thiolen, DNA und Lipiden. Diese oxidativen Schäden resultieren in Konformationsänderung und Inaktivierung von Proteinen, DNA-Strangbrüchen und DNA-Basenmodifikationen mit der Bildung von 8-Hydroxydeoxyguanosin. Das beim Redox-Cycling von Menadion gebildete Wasserstoffperoxid wird intrazellulär unter Verbrauch von Glutathion (GSH) durch die selenhaltige Glutathion-Peroxidase reduziert. Dabei wird vermehrt oxidiertes Glutathion (GSSG) gebildet, das wiederum unter Verbrauch von NADPH durch die

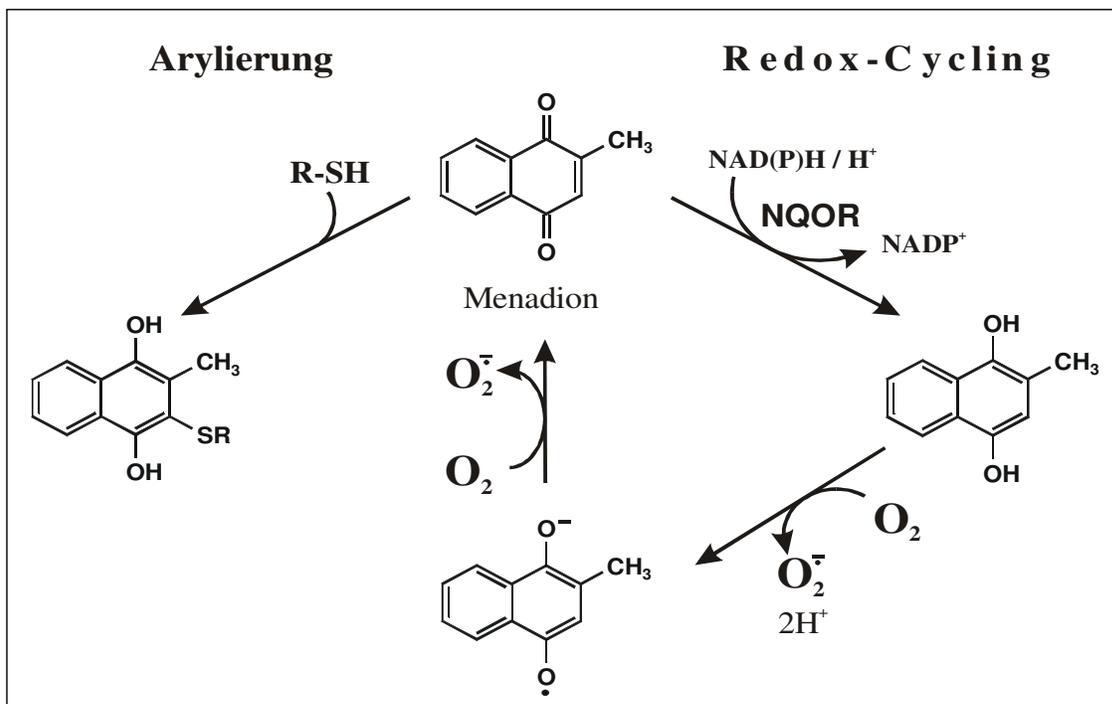


Abb. 1.2: Darstellung des Metabolismus von Menadion. Erläuterungen s. Text.

Glutathion-Reduktase zu GSH reduziert wird. Der durch Menadion induzierte oxidative Stress führt so zum Abfall der zellulären NADPH-Konzentration sowie zum Verlust der GSSG-Reduktase-Aktivität, die letztendlich in einer intrazellulären Akkumulation von oxidiertem Glutathion (GSSG) resultieren (Wefers & Sies, 1983; DiMonte *et al.*, 1984). Es kommt zu einer Entleerung des GSH-Pools und darüber zu einer Multiplikation oxidativer Schäden. Wie viele einfachen Chinone vermag Menadion mit einer Vielzahl von Substanzen in Form einer nukleophilen Additionsreaktion vom Michael-Typ zu reagieren (Bolton *et al.*, 2000). Dabei kommt es zur Alkylierung von zellulären Nukleophilen, wie Glutathion, DNA, RNA, und Proteinen. Insbesondere die Arylierung von Thiolen scheint für die zytotoxische Wirkung von Menadion eine bedeutende Rolle zu spielen. Neben seiner Oxidation trägt die Arylierung von GSH wesentlich zur Entleerung des GSH-Pools bei. Bei dieser Reaktion wird das Menadion zum entsprechenden Glutathionyl-Hydrochinon reduziert. Menadion vermag ferner vitale zelluläre Prozesse zu inhibieren, wie die *de novo*-Synthese der DNA sowie die mitochondriale ATP-Produktion (Redegeld *et al.*, 1990) und führt über eine gestörte Calciumhomöostase in der Zelle zu einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration (Brunmark & Cadenas, 1989). Welche der

beschriebenen Mechanismen für die zytotoxische Wirkung von Menadion letztendlich die höchste Relevanz besitzen, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt.

1.3.2. Bildung von Peroxynitrit und seine schädlichen Wirkungen

Peroxynitrit (ONOO^-) ist ein reaktives Molekül, das *in vivo* durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid (NO) mit dem Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) gebildet werden kann. Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion ist mit $\sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sehr hoch (Huie & Padmaja, 1993). Die peroxysalpetrige Säure ($\text{pK}_a = 6,8$) zerfällt zu Nitrat (NO_3^-) und hat in einfachem Puffer bei pH 7,4 und 37°C eine Halbwertszeit von 0,8 sek (Koppenol *et al.*, 1992). In biologischen Systemen ist mit einer kleineren Halbwertszeit zu rechnen, da Peroxynitrit bei physiologischem pH-Wert rasch mit biologischen Molekülen reagiert. Aufgrund der im Vergleich zu freien Radikalen relativ hohen Stabilität ist Peroxynitrit in der Lage, um einige Zelldurchmesser weit zu diffundieren (Crow & Beckman, 1995). Peroxynitrit besitzt ein hohes oxidatives Potential. *In vivo* vermag es u.a. Methionin, Cystein, Ascorbat, Thiole, Lipide und Nukleotide zu oxidieren. Durch Nitrierung und Nitrosylierung reagiert es mit der Aminosäure Tyrosin und anderen phenolhaltigen Verbindungen (Beckman *et al.*, 1996). Über diese Mechanismen vermag Peroxynitrit im lebenden Organismus zahlreiche Schäden anzurichten. Oxidation und Nitrierung können zur Inaktivierung von Enzymen führen, wie am Beispiel der Prostazyklinsynthase (Zou & Ulrich, 1996), der Alkoholdehydrogenase (Crow *et al.*, 1995) oder der Mangan-Superoxiddismutase (MacMillan-Crow *et al.*, 1996) gezeigt wurde. Peroxynitrit schädigt die DNA, initiiert Einzel- und Doppelstrangbrüche (Salgo *et al.*, 1996) und führt zur Bildung von 8-Nitroguanin und 8-oxo-Guanin (Yermilov *et al.*, 1995; Douki *et al.*, 1996). Die Entstehung von Peroxynitrit *in vivo* durch Entzündungszellen (Makrophagen, Neutrophilen, Lymphozyten) wurde bei einer Reihe von pathologischen Zuständen und menschlichen Erkrankungen nachgewiesen: chronische Entzündungen, Sepsis, Arteriosklerose, Ischämie / Reperfusion, Alzheimer-Erkrankung etc. (Ischiropoulos, 1998). Desweiteren vermag Peroxynitrit die über Gap Junctions vermittelte interzelluläre Kommunikation zu modulieren. Bolanos und Medina (1996) sowie Sharov *et al.* (1999) haben gezeigt, daß Peroxynitrit in der Lage ist, die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen zu inhibieren. Trotz dieser erheblichen Schäden, die es verursachen kann, ist die hohe Reaktivität von Peroxynitrit

für den lebenden Organismus von Bedeutung. Aufgrund seiner bakteriziden und generell zytotoxischen Wirkung wird es von Entzündungszellen gezielt gebildet, um in den Organismus eingedrungene Mikroorganismen abzutöten (Zhu *et al.*, 1992).

1.4. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) sind eine heterogene Gruppe von Proteinkinasen, die in der eukaryontischen Zelle fundamentale zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose, kontrollieren. Es handelt sich um Serin-/Threoninkinasen, die sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Proteine phosphorylieren können. Die wichtigsten Mitglieder der MAPK-Familie sind die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), die Jun-N-Terminus Kinasen (JNK) und die p38-MAPK. Die beiden 42- und 44-kDa-Proteinkinasen ERK1 und ERK2 werden als die klassischen MAPK angesehen. Sie werden durch mitogene Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Serumschock aktiviert. Die Aktivierung von ERK1 und ERK2 erfolgt am Ende einer dreistufigen Kaskade, die auch als das sogenannte MAPK-Modul bezeichnet wird (vgl. Abb. 1.3). In Säugerzellen beginnt die Reaktionskette oft mit der Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase, etwa des EGF- oder PDGF-Rezeptors. Über die Adaptorproteine Grb2 und SOS kommt es zur Aktivierung von Ras, das zu den monomeren guaninnukleotidbindenden Proteinen gehört. Auf Ras folgt als nächste Komponente die Serin-/Threoninkinase Raf, die wiederum die doppeltspezifischen MAPK Kinasen (MEK, MKK) 1 und MEK2 aktiviert, die sowohl Serin-/Threoninreste als auch Tyrosinreste phosphorylieren können. Der letzte Schritt des MAPK-Moduls ist die Phosphorylierung von Thr und Tyr durch MEK im Thr-Glu-Tyr-Motiv der MAPK ERK1 und ERK2. Nach ihrer Aktivierung können ERK1 und ERK2 über verschiedene Mechanismen in die Regulation zellulärer Prozesse eingreifen. Sie sind zum einen in der Lage, in den Zellkern zu wandern, um dort Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung zu aktivieren. Die durch ERK1/2 aktivierten Transkriptionsfaktoren Elk1, Ets1, Sap1a, c-Myc u.a. sind an der Regulation der Expression der beiden Protoonkogene c-jun und c-fos beteiligt, deren Proteinprodukte, c-Jun und c-Fos, als Heterodimer die klassische Form des Transkriptionsfaktors AP-1 bilden (Whitmarsh & Davis, 1996). Zum anderen können ERK1/2 auch zytoplasmatische Proteine phosphorylieren, wie die zytosolische Phospholipase A2, die juxtamembranäre Region des EGF-Rezeptors und zahlreiche

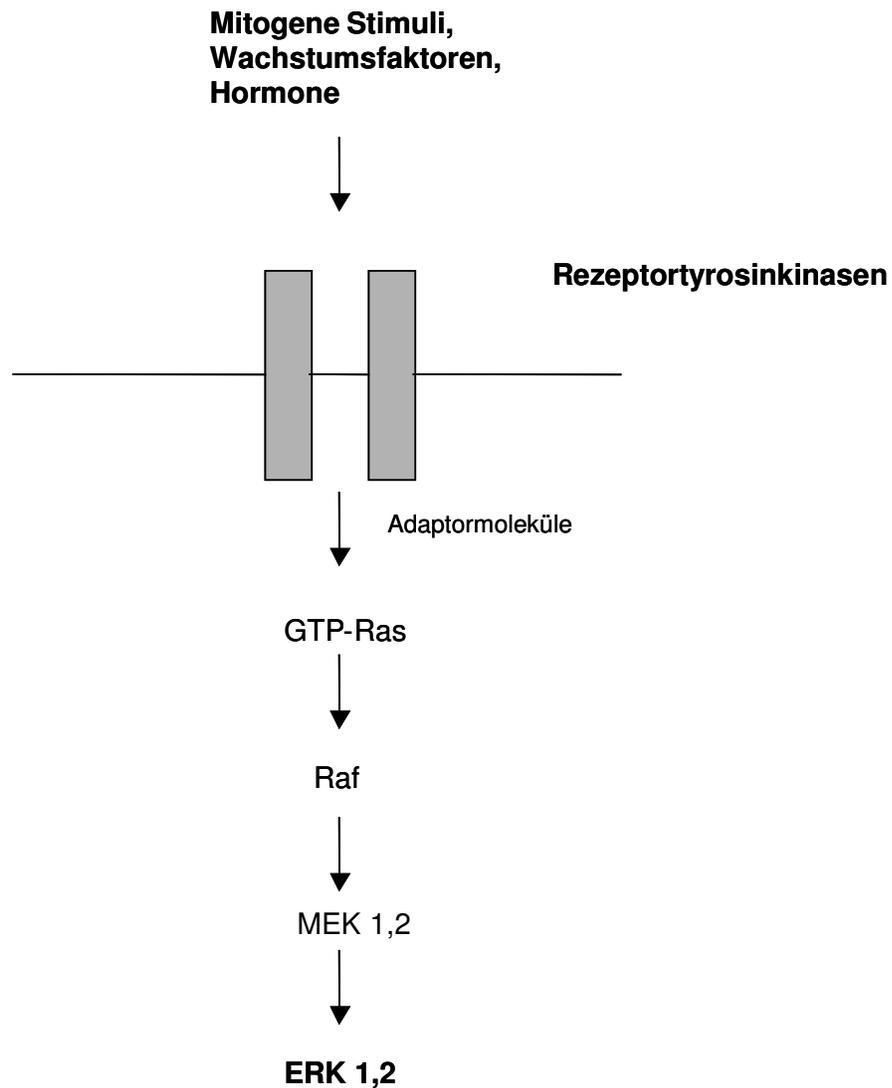


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Kinasekaskaden, die zur Aktivierung von ERK führen. Erläuterungen s. Text.

Mikrotubuli-assoziierte Proteine (Seger & Krebs, 1995; Widmann *et al.*, 1999) sowie Connexine (Warn-Cramer *et al.*, 1996, 1998; Lampe & Lau, 2000). Die MAPK ERK1/2 phosphorylieren ihre Substrate an Serin-/Threoninresten, die von Prolin gefolgt sind, weshalb man sie auch als sogenannte Prolin-gerichtete Kinasen bezeichnen kann. Für diesen Signaltransduktionsweg wurden zahlreiche Aktivatoren beschrieben. Neben den bereits erwähnten, wurde auch für reaktive Stickstoff- und

Sauerstoffspezies eine aktivierende Wirkung beschrieben. So führen Superoxid, Stickstoffmonoxid, Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit (Bass & Berk, 1995; Guyon *et al.*, 1996; Schieke *et al.*, 1999) zu einer ERK1/2 Aktivierung.

1.5. Ziele der Arbeit

In Vorarbeiten zu Menadion an Hautfibroblasten (Klotz, 1998) wurde gezeigt, daß Menadion die MAPK ERK1 und ERK2 zu aktivieren vermag. Da Mitogen-aktivierte Proteinkinasen bei der Regulation der interzellulären Kommunikation eine wichtige Rolle spielen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welchen Effekt Menadion auf den Phosphorylierungsstatus von Connexin43 sowie die interzelluläre Kommunikation von Rattenleberepithelzellen hat und, ob das Zustandekommen dieser Wirkung im Zusammenhang mit der Aktivierung der MAPK ERK1/2 steht. Gefundene Effekte sollten mit denen einer Behandlung der Zellen mit Peroxynitrit verglichen werden. Für Peroxynitrit ist gezeigt worden, daß es die Zell-Zell-Kommunikation inhibiert und ERK1/2 aktiviert. Allerdings sind die genauen Mechanismen nicht bekannt. In dieser Arbeit sollte deshalb zusätzlich untersucht werden, ob die Hemmung der interzellulären Kommunikation durch Peroxynitrit mit der Phosphorylierung von Connexin43 und, falls vorhanden, mit der Aktivierung von ERK1/2 erklärt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

WB-F344-Rattenleberepithelzellen wurden von Dr. I.A. Cotgreave und Dr. L. Wärngård, Institut für Umweltmedizin, Karolinska Institut (Stockholm, Schweden) sowie Dr. J.E. Trosko, Institut für Pädiatrie und Entwicklung, Michigan State University (East Lansing, Michigan), bezogen. Die Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM, Sigma, München) unter Zusatz von (Endkonzentrationen) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, 10% (v/v); Biochrom/Seromed, Berlin, und Greiner, Frickenhausen), L-Glutamin (2 mM), Streptomycin (20 mg/l) und Penicillin (20000 IU/l) kultiviert. Etwa 2 Tage nach Aussäen wurden die Zellen bei 100%-iger Konfluenz trypsinisiert und gesplittet. Für Gefrierkulturen wurden Zellen in 1 ml Gefriermedium (90% FCS, 10% DMSO) suspendiert, eingefroren und bei -80°C gehalten.

2.2. Toxizitätsmessung (MTT-Test)

Die Messung der Vitalität erfolgte mittels des MTT-Reduktionstests (Carmichael *et al.*, 1987). Grundlage dieses Tests ist die Fähigkeit vitaler Zellen zur Reduktion von MTT (3-[4,5,-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zum entsprechenden blauen Formazan aufgrund mitochondrialer und mikrosomaler Dehydrogenaseaktivität. Zur Messung der Vitalität wurden Zellen in 6-well Platten bis zur Konfluenz herangezogen, entsprechend behandelt, nach der gewünschten Inkubationszeit gewaschen und mit 800 μl MTT/well (0,5 mg/ml in Medium) für etwa 2 h im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle diente MTT-Lösung in Medium. Nach ausreichender Blaufärbung wurde durch Zusatz von 800 μl /well HCl (0,1% (w/w)/SDS (10% (w/v))) die Reaktion gestoppt und die Zellen lysiert. Zur Solubilisierung des Präzipitates wurden die Platten über Nacht im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen und zum Ausgleich die durch Präzipitate entstandende Absorption bei 700 nm subtrahiert.

2.3. Synthese von Peroxynitrit (ONOO⁻)

Das Peroxynitrit wurde von Dr. Lars-Oliver Klotz und Darius Buchczyk, Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, synthetisiert. Die Synthese von Peroxynitrit (ONOO⁻) erfolgte in einem sogenannten „Quenched-flow-Reaktor“ (Koppenol *et al.*, 1992), wobei Wasserstoffperoxid / Salzsäure (0,6 M H₂O₂ / 0,7 M HCl) und Natriumnitrit (0,6 M) durch ein Pumpensystem in einem T-Stück miteinander vermischt und die entstehende peroxysalpetrige Säure (ONOOH) in 1,2 M NaOH geleitet wird, bei deren pH-Wert das stabilere Peroxynitritanion (ONOO⁻) entsteht. Zur Zersetzung des überschüssigen H₂O₂ wird Mangandioxid (MnO₂) hinzugegeben. Mit diesem Syntheseverfahren kann eine Peroxynitritkonzentration von ca. 80-90 mM erreicht werden. Die Peroxynitritlösung wird bei -20 bis -80 °C eingefroren. Dabei lagert sich eine flüssige Schicht tiefgelben, hochkonzentrierten Peroxynitrits auf der gefrorenen Lösung ab. Durch abschließendes fraktioniertes Auftauen läßt sich eine Steigerung der Konzentration auf bis zu 300 mM erreichen. Bei -80 °C ist diese Peroxynitritlösung für einige Monate haltbar. Durch langsamen, spontanen Zerfall in alkalischer Lösung entstehen dabei zunehmende Mengen von Nitrit (NO₂⁻) und Sauerstoff. Daneben enthält die Lösung signifikante Mengen an Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Nitrat und Wasserstoffperoxid. Diese Kontamination und der hohe pH-Wert werden in Kontrollversuchen durch Einsatz zerfallenen Peroxynitrits berücksichtigt. Dafür wird der Peroxynitritlösung 37%-ige Salzsäure zugesetzt und nach vollständigem Zerfall der alkalische pH durch Zugabe äquimolarer Menge Natronlauge wiederhergestellt. Die Konzentration von Peroxynitrit wird nach 100- bis 1000-facher Verdünnung in 0,1% (w/v) KOH spektrophotometrisch als Extinktion bei 302 nm gemessen ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Hughes & Nicklin, 1968).

2.4. Behandlung von Zellen

2.4.1. Behandlung der Zellen mit Menadion und TPA

WB-F344 Zellen wurden in 30 mm-Kulturschalen zu 100% Konfluenz herangezogen. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit Menadion (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und TPA (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Da Menadion lichtempfindlich ist, wurde mit stark

verringertes Lichtintensität gearbeitet. In Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden vorab für die Testsubstanzen entsprechende Stammlösungen (Menadion: 100 mM, TPA: 1 mM) und eventuelle Verdünnungen erstellt. Kurz vor Inkubation wurden die zu testenden Substanzen in dem an Volumen insgesamt für alle 30 mm-Kulturschalen benötigten Medium (1ml / 30mm-Kulturschale) auf die entsprechenden Endkonzentrationen (Menadion: 50 und 100 μ M, TPA: 100 nM) verdünnt. Für die jeweiligen Verdünnungen wurde serumfreies Medium verwendet. Vor Behandlung der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend die entsprechend verdünnten Testsubstanzen hinzugegeben. Zusätzlich wurden mit Menadion behandelte WB-F344 Zellen mit den MEK-Inhibitoren PD98059 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), U0126 (Alexis, San Diego, CA, USA) oder dem Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) inkubiert. Dazu wurden in DMSO für die Inhibitoren entsprechende Stammlösungen erstellt (PD98059: 50 mM, U0126: 10 mM, Staurosporin: 1 mM). 30 min vor Menadion-Zugabe wurden die jeweiligen Inhibitoren zu den Zellen hinzugegeben. Die Endkonzentration für PD98059 betrug 50 μ M, für U0126 10 μ M und für Staurosporin 2 μ M. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die in serumfreiem Medium vorverdünnten Inhibitoren einschließlich der entsprechenden Menadion-Konzentrationen hinzugegeben. Die so behandelten Zellen wurden für die gewünschte Zeit bei 37°C inkubiert.

2.4.2. Behandlung der Zellen mit Peroxynitrit

Die Behandlung von WB-F344 Zellen mit Peroxynitrit erfolgte bei Konzentrationen von 300 und 500 μ M. Dazu wurde Peroxynitrit in 0,1% KOH (w/v) zu 30 mM und 50 mM Stammlösungen verdünnt. In den Kulturschalen erfolgte durch Zugabe von 10 μ l der jeweiligen Stammlösungen zu 1 ml PSG-Puffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4; 10 mM NaCl; 5 mM Glucose) eine 100-fache Verdünnung. Als Kontrolle wurde zerfallenes Peroxynitrit verwendet. Damit sich die Peroxynitritlösung in dem Phosphatpuffer verteilen konnte, wurden die Kulturschalen sofort nach Peroxynitrit-Zugabe gleichmäßig in verschiedene Richtungen geschwenkt. Anschließend wurden die Kulturschalen 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der peroxynitrithaltige Phosphatpuffer wurde entfernt, die Kulturschalen mit PBS gewaschen und 1 ml serumfreies Medium in jede Kulturschale hinzugegeben. Im Brutschrank bei 37°C

und einem CO₂-Gehalt von 5% wurden die Zellen für die gewünschte Zeit inkubiert und schließlich durch die Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer lysiert.

2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse des Proteinbestandes der Zellen wurden diese mit doppelt konzentriertem SDS-PAGE-Ladepuffer (in doppelt konzentrierter Form (2x) war dessen Zusammensetzung: 12 mM Tris, 4% (w/v) Glycerin, 100 mM DTT, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) lysiert, die Proben dann zur Denaturierung der zähflüssigen DNA und aller Proteine 2 sek sonifiziert, für 3-5 min gekocht und anschließend zur Lagerung eingefroren. Zur Auftragung auf das aus Sammel- und Trenngel bestehende SDS-Polyacrylamidgel wurden die aufgetauten Proben noch einmal für 2-3 min erhitzt. Für die Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele wurden die Angaben von Laemmli (1970) wie folgt modifiziert:

Trenngel (10% Acrylamid): 3,3% (v/v) Sol 1, 4,0% (v/v) Sol 2, 2,66 % (v/v) H₂O, 7×10^{-3} (v/v) APS, 7×10^{-4} (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) ; Sammelgel (5% Acrylamid): 1,67% (v/v) Sol 1, 2% (v/v) Sol 3, 6,27% (v/v) H₂O, $7,5 \times 10^{-3}$ (v/v) APS, $7,5 \times 10^{-4}$ (v/v) TEMED.

Zusammensetzung der einzelnen Lösungen: Sol 1: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid; Sol 2: 0,5% (w/v) SDS, 3 M Tris pH 8,8; Sol 3: 0,5% (w/v) SDS, 0,3 M Tris pH 6,7; Elektrodenpuffer: 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS, pH 8,3; APS: 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel entweder angefärbt oder auf eine Membran elektrotransferiert (s. Abschnitt 2.6). Zur Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Proteine im Gel durch Schwenken in einer Lösung aus 0,1% (w/v) Coomassie Serva Blue R in 10% (v/v) Eisessig, 30-40% (v/v) Methanol oder Ethanol und 50-60% Wasser für 15-30 min fixiert und angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch Schwenken des Gels in Entfärberlösung (10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Ethanol oder Methanol) entfernt.

2.6. Western Blotting und Immunanfärbung

2.6.1. Elektrotransfer

Nach der Elektrophorese wurde das zu blottende Gel kurz in Transferpuffer (25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,5) äquibriert und zusammen mit in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer genäbten 3 mm-Blottingpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie gleichermaßen behandelter PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond ECL, Amersham, Braunschweig) zum Blottingaufbau zusammengestellt. Die PVDF-Membran wurde vor Verwendung je einige Sekunden in Methanol und in Wasser (Entfernen überschüssigen MeOHs) angefeuchtet. Drei Blottingpapiere wurden luftblasenfrei auf die Anode gebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei weiteren Blottingpapieren (vgl. Abb. 2.1). Der Elektrotransfer wurde bei ca. 60-100 mA je Minigel für 60-90 min in einer BioRad-Kammer (BioRad, München) durchgeführt.

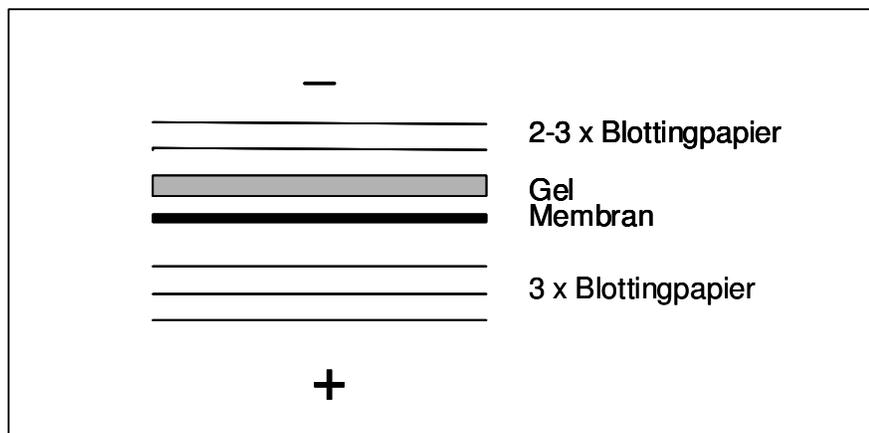


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau einer Elektrotransfereinheit für Western Blotting

Zur Kontrolle auf erfolgreichen Transfer wurde die Membran nach Blot für 1 min in essigsaurer Ponceau S-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure) geschwenkt und dann in Wasser entfärbt. Proteinspuren und -banden wurden rot sichtbar.

2.6.2. Immunanfärbung

Nachweis der Connexin-Phosphorylierung

Auf den Elektrobloblot folgte ein kurzes Waschen der Membran in TBST (TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) + 0,1% (v/v) Tween-20). Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4 °C in Blockierpuffer (5% (w/v) Milchpulver (BioRad, München) in TBST) geschwenkt. Am nächsten Morgen wurde die Membran für 2 h bei RT mit in Blockierpuffer verdünntem (1:1000) primärem Antikörper inkubiert. Die Immunanfärbung von phosphoryliertem Connexin43 (Cx43) erfolgte mit polyklonalem anti-Cx43 Antikörper (Zymed, San Francisco, CA, USA). Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 5-10 min) wurde für 1-2 h bei RT mit in Blockierpuffer verdünntem (1:5000) Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären anti-Kaninchen Antikörper (Dianova, Hamburg) inkubiert. Nachweis gebundener Antikörper über Chemilumineszenz erfolgte mit einem kommerziellen Kit, LumiGlo (New England Biolabs, Schwalbach).

Nachweis der MAPK-Phosphorylierung

Die Membran wurde nach erfolgtem Blot mit TBST gewaschen und für 1-3 h bei RT in Blockierpuffer geschwenkt, gefolgt von einer Inkubation mit in Blockierpuffer verdünntem (1:5000) primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Die Immunanfärbung von phospho-ERK1/2 erfolgte mit polyklonalem „anti-active MAPK“ Antikörper (Promega, Mannheim). Die übrigen Schritte entsprachen den oben genannten.

2.7. Messung der Zell-Zell-Kommunikation

Die Messung der Zell-Zell-Kommunikation wurde von Dipl.-Lebensmittelchemikerin Niloofar Ale-Agha, Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Mikroinjektion des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow CH (Sigma, München) angewandt. Das Ausmaß der Diffusion des injizierten Fluoreszenzfarbstoffes über Zell-Zell-Kanäle von der injizierten Zielzelle zu den Nachbarzellen läßt eine Aussage über den Kopplungsgrad des Zellverbandes bzw. die relative Zahl geöffneter Gap Junctions zu. Hierzu wurden pro Versuchsansatz 10 einzelne Zellen auf einer bewachsenen

Kulturschale mit Lucifer Yellow CH beladen und 5 min nach Beladung die Zahl der nunmehr fluoreszierenden Nachbarzellen bestimmt. Die Anregungswellenlänge von Lucifer Yellow CH liegt bei 426 nm, das Emissionsmaximum bei 540 nm. Intakte Zellmembranen sind für den wasserlöslichen Stoff impermeabel, da er zwei Sulfonatgruppen besitzt, die bei physiologischem pH-Wert ionisiert vorliegen, so daß eine unspezifische Membrandiffusion auszuschließen ist. In der gebräuchlichen Konzentration (s.u.) ist der Farbstoff nicht zelltoxisch.

Die für die Mikroinjektion verwendeten WB-F344 Zellen wurden bis zur Konfluenz mit 10% FCS-haltigem Medium versorgt. Die konfluenten Zellen wurden vor der jeweiligen Behandlung einen weiteren Tag ohne FCS gehalten, um eine durch das FCS erhöhte Grundkommunikation zu erniedrigen. Die Messung der Zell-Zell-Kommunikation wurde mittels einer Gerätekombination aus Fluoreszenzmikroskop (Typ IM 35, Eppendorf, Hamburg), Mikromanipulator (Typ S 170 Eppendorf, Hamburg) und Mikroinjektor (Typ 5242, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die intrazelluläre Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes (220 mM in 0,33 M Lithiumchlorid) erfolgte mit Hilfe von Femotips; dabei entspricht einem Injektionsdruck von 50 hPa bei einer Injektionsdauer von 0,5 sek ein Injektionsvolumen von 50-200 Femtolitern. Die Messungen wurden 3-4 Male wiederholt.

2.8. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde in Kooperation mit Dr. Heiko Possel, ehemals Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, durchgeführt.

WB-F344 Zellen wurden in mit Deckgläschen beschichteten 30 mm-Kulturschalen zu 70-90% Konfluenz herangezogen. Die Zellen wurden einen weiteren Tag ohne FCS gehalten, um eine durch das FCS erhöhte Grundkommunikation zu erniedrigen und, wie unter Material und Methoden beschrieben, mit Menadion (50 und 100 μ M), TPA (100 nM) oder Peroxynitrit (300 μ M) behandelt. Nach Behandlung wurden die Zellen drei Male mit PBS gewaschen, 10 min in Methanol bei -20°C fixiert und erneut gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,3% (v/v) normalem Ziegen Serum (Gibco) in PBS mit 0,3% (v/v) Triton X-100 für 45 min bei RT geblockt und mit polyklonalem, gegen Connexin43 gerichteten Antikörper (Verdünnung 1:1000 in 1% normalem Ziegen Serum) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit entsprechendem FITC-markiertem sekundärem

Antikörper für 45 min bei 37°C inkubiert (Verdünnung 1:500 in PBS) und nach erneutem Waschen wurde ein Tropfen Immunomount (Shandon) zu den Zellen hinzugegeben. Die immunhistochemischen Bilder wurden über eine an das Zeiss Axiovert Mikroskop gekoppelte Kamera (ORCA II, Hamamatsu) aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Toxizität von Menadion

WB-F344-Leberepithelzellen wurden in 6-well-Kulturschalen zur Konfluenz herangezogen. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Menadion für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen gewaschen und die Vitalität mittels MTT-Test (vgl. Abschnitt 2.2) bestimmt. Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen Menadion bis zu 100 µM keine wesentliche Toxizität aufweist (vgl. Abb. 3.1). Erst höhere Konzentrationen führten zu einer deutlichen Einschränkung der Vitalität, bis diese bei bei 500 µM nur noch etwa 50% betrug. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde Menadion in nicht-toxischen Konzentrationen verwendet.

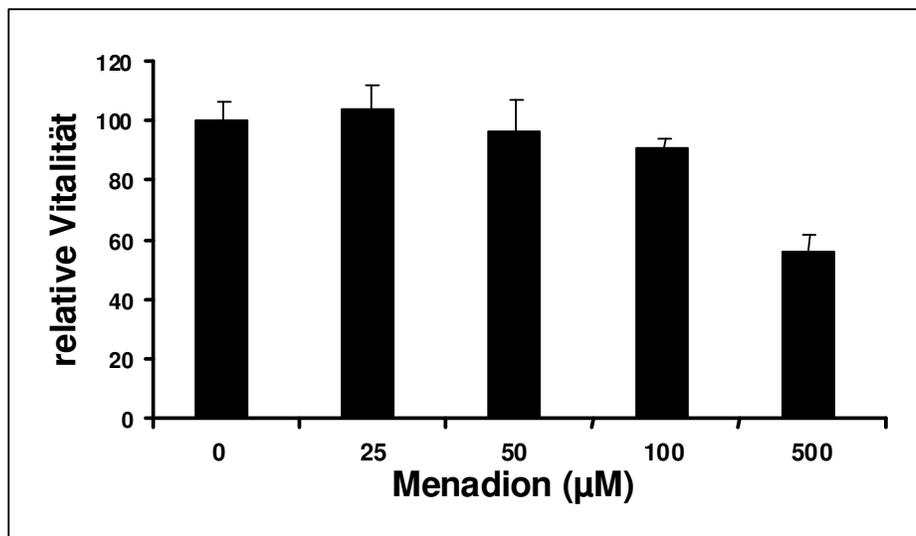


Abb. 3.1: Toxizität von Menadion in WB-F344 Rattenleberepithelzellen nach 30-minütiger Behandlung. Die Daten sind Mittelwerte \pm Stabw (n =3).

3.2. ERK1/2-Aktivierung durch Menadion und Vergleich mit TPA

Konfluente WB-F344 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Menadion für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen sofort lysiert und die Aktivierung von ERK1/2 im Western-Blot mittels eines Antikörpers gegen die doppelt phosphorylierte und damit aktivierte Form der Kinasen nachgewiesen (vgl. Abb. 3.2).

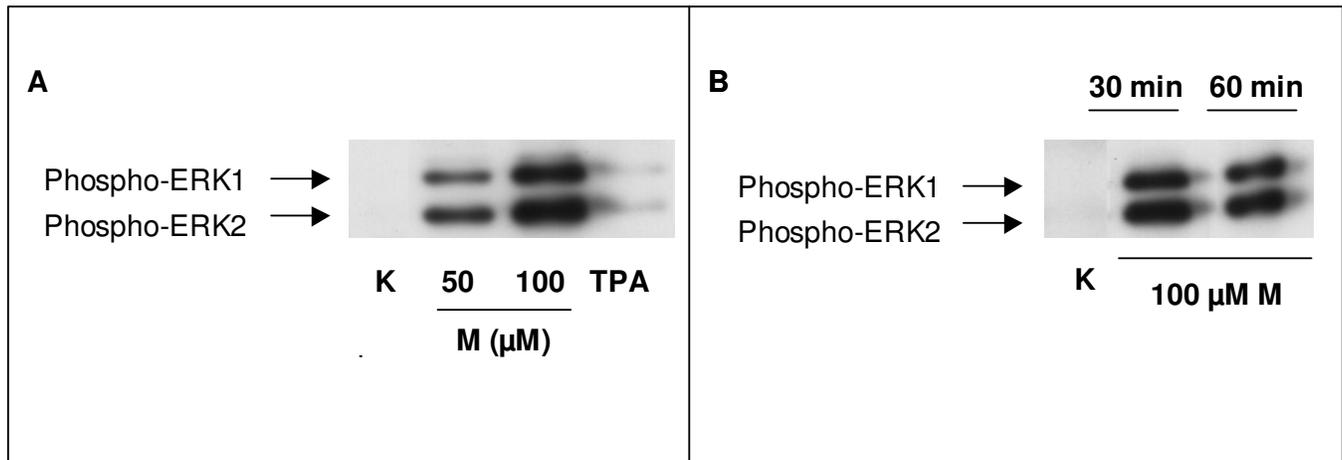


Abb. 3.2: A: Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch 15-minütige Inkubation mit Menadion (M) und nach Behandlung mit TPA (100 nM, 30 min Inkubation). In der Kontrolle (K) wurden die Zellen mit DMSO (0,2%) inkubiert. B: Zeitabhängigkeit der durch Menadion induzierten ERK1/2 Aktivierung am Beispiel von 100 μM Menadion. Dargestellt ist die ERK-Aktivierung nach Inkubationszeiten von 30 und 60 min im selben Experiment. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die Analyse des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 zeigte eine starke Aktivierung von ERK1/2 bei den verwendeten Menadion-Konzentrationen von 50 und 100 μM, die bereits nach 15 min nachweisbar war. Noch nach 30 und 60 min war die ERK1/2-Aktivierung gleichermaßen ausgeprägt, was auf eine persistente Aktivierung hinweist. Ferner zeigte sich, daß die Intensität der Aktivierung von der Menadion-Konzentration abhängt. Bei 100 μM fand sich auch die stärkste Aktivierung der MAPK ERK1 und ERK2. Verglichen wurde die ERK-Aktivierung durch Menadion mit dem Tumorpromotor TPA, der im Gegensatz zu Menadion eine eher schwache ERK1/2-Aktivierung hervorrief.

3.3. MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 hemmen die ERK-Aktivierung durch Menadion

Um zu untersuchen, ob die ERK1/2-Aktivierung durch Menadion über die Aktivierung der doppelt-spezifischen Kinasen MEK1 und MEK2 erfolgt, wurden die MEK-Inhibitoren PD98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavon) und U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien) verwendet. Konfluente WB-F344 Zellen wurden dazu 30 min bei 37°C mit PD98059 (50 µM) und U0126 (10 µM) präinkubiert. Anschließend wurde Menadion in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben und zusammen mit den Inhibitoren bei 37°C inkubiert. In der Western-Blot Analyse wurde die Hemmung der ERK1/2-Aktivierung mit Antikörpern gegen die phosphorylierte Form dargestellt (vgl. Abb. 3.3).

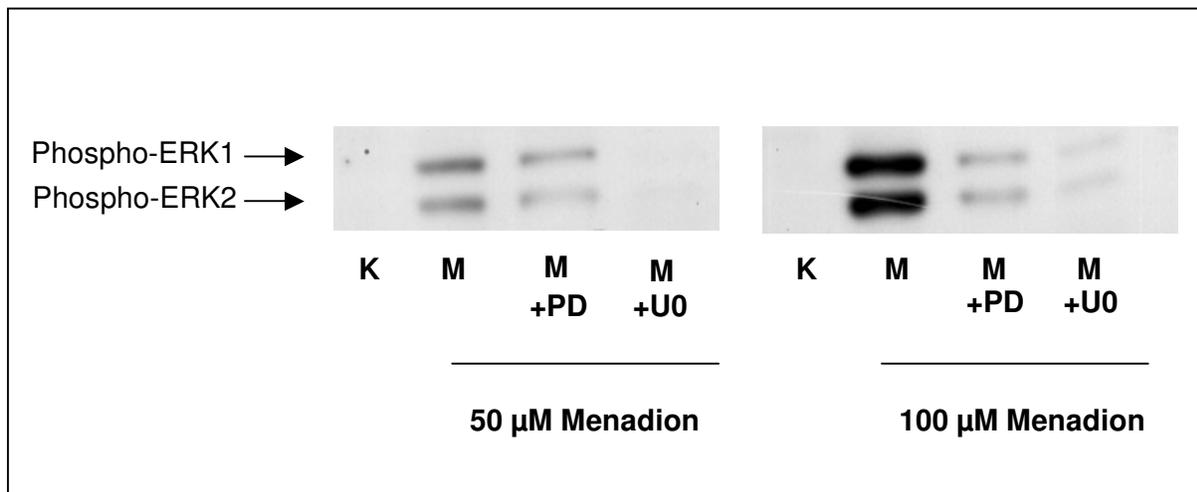
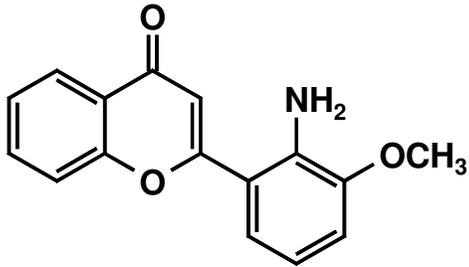


Abb. 3.3: MEK-Inhibitoren PD98059 (50 µM) und U0126 (10 µM) hemmen die Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch Menadion. Nach Menadion-Behandlung (30 min) wurden die Zellen lysiert und die Hemmung der ERK-Aktivierung im Western-Blot mit Antikörpern gegen die phosphorylierte Form nachgewiesen. In der Kontrolle (K) wurden die Zellen mit DMSO (0,2%) inkubiert.

Es zeigte sich, daß die beiden MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 die ERK-Aktivierung durch Menadion hemmen. Dabei war die Hemmung sowohl bei 50 µM als auch bei 100 µM Menadion etwa gleich stark ausgeprägt, so daß sich keine wesentlichen Konzentrationsunterschiede feststellen ließen. Allerdings unterschieden sich die beiden Inhibitoren deutlich in ihrer Hemmwirkung. U0126 inhibierte die ERK-

PD98059



U0126

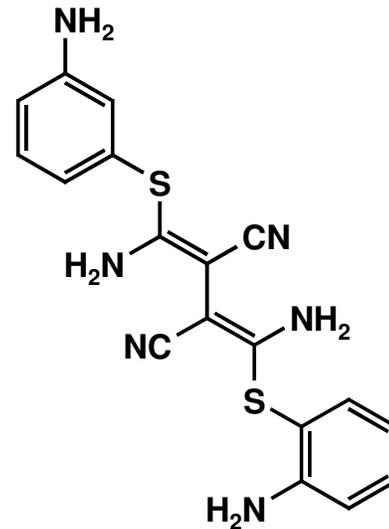


Abb. 3.4: Struktur der MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126

Aktivierung wesentlich stärker als PD98059. Die Ursache hierfür könnte an dem unterschiedlichen Wirkmechanismus beider Inhibitoren liegen. PD98059 hemmt die Aktivierung der MAPK ERK1 und ERK2, indem es stromaufwärts die Phosphorylierung der den MAPK vorgeschalteten Kinasen MEK1 und MEK2 inhibiert, und zwar durch Bindung an die nicht-phosphorylierte und damit inaktive Form von MEK1/2. Bereits phosphorylierte Kinasen vermag PD98059 dagegen nicht vollständig zu inhibieren. Obwohl die Aminosäuresequenzen von MEK1 und MEK2 zu etwa 90% homolog sind, inhibiert PD98059 MEK2 etwa zehnmals schwächer als MEK1. U0126 ist dagegen in der Lage, unabhängig von deren Phosphorylierungs- und Aktivitätszustand, MEK1/2 zu inhibieren und greift damit im Verlauf des MAPK-Signalweges weiter unten an als PD98059 (Alessi *et al.*, 1995). Favata *et al.* (1998) konnten für U0126 zeigen, daß es, verglichen mit PD98059, eine mindestens 40-fach höhere Affinität für MEK 1/2 besitzt.

Um die Hemmung der ERK-Aktivierung durch die beiden MEK-Inhibitoren zu verifizieren, wurden Lysate, die von mit Menadion behandelten Zellen stammten, im Western-Blot analysiert und mit Antikörpern untersucht, die sich gleichzeitig gegen die phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Form von ERK1 und ERK2 (total-ERK)

richten (vgl. Abb. 3.5). Dabei bestätigte sich, daß Menadion zu einer Aktivierung der MAPK ERK1/2 führt, die sich in der verminderten elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der phosphorylierten Kinasen ERK1 und ERK2 ausdrückt. Es zeigte sich erneut, daß die MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 die ERK1/2-Aktivierung durch Menadion hemmen.

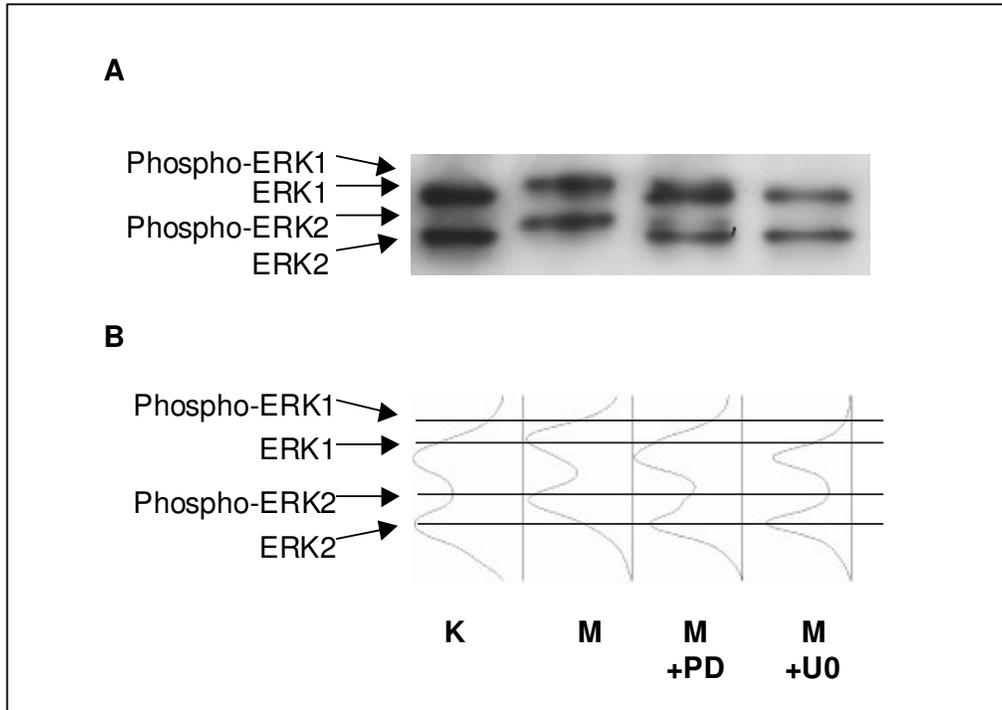


Abb. 3.5: Hemmung der ERK-Aktivierung durch Menadion (M, 50 μ M) in WB-F344 Zellen durch die MEK-Inhibitoren PD98059 (50 μ M) und U0126 (10 μ M). Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot mit Antikörpern gegen die phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Form sowie dessen densitometrische Auswertung (Scion Image Software der Fa. Scion, Frederick, MD, USA). K, Kontrolle.

3.4. Induktion der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion und Vergleich mit TPA

In der unstimulierten Zelle liegt Connexin43 in verschiedenen Phospho-Isoformen vor. Durch Western-Blot lassen sich diese Isoformen voneinander unterscheiden. Man unterscheidet die schnell wandernde nicht-phosphorylierte Form (NP) und die langsam wandernden einfach und doppelt phosphorylierten Isoformen P₁ bzw. P₂. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellen sich diese verschiedenen Iso-

formen von Connexin43 deshalb als drei scharf abgrenzbare, übereinanderliegende Banden dar. Von zahlreichen Pharmaka und natürlich vorkommenden Substanzen ist bekannt, daß sie die Phosphorylierung von Connexin43 induzieren und darüber zu einer Modulation der Zell-Zell-Kommunikation führen. Diese Hyperphosphorylierung von Connexin43 geht mit einer Verschiebung der verschiedenen Isoformen einher. Man spricht von einem sogenannten Banden-Shift, da die NP-Bande verschwindet und eine neue, sogenannte P₃-Bande sichtbar wird, die mit der Hyperphosphorylierung von Connexin43 korreliert.

Um den Effekt von Menadion auf den Phosphorylierungsstatus von Connexin43 zu untersuchen, wurden konfluente WB-F344 Zellen verschiedenen Menadion-Konzentrationen ausgesetzt. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Hyperphosphorylierung mit polyklonalem, gegen Connexin43 gerichtetem Antikörper nachgewiesen (vgl. Abb. 3.6).

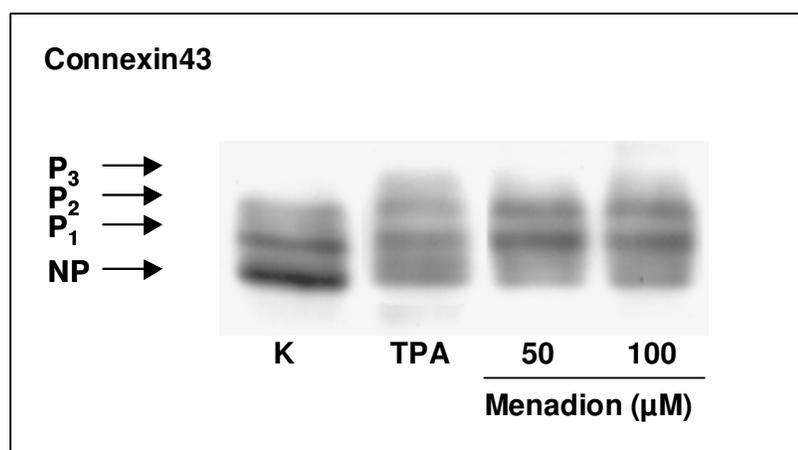


Abb. 3.6: Konzentrationsabhängigkeit der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion. WB-F344 Zellen wurden für 15 min mit 50 und 100 μM Menadion behandelt und lysiert. Die Hyperphosphorylierung durch Menadion wurde mit polyklonalem anti-Connexin43-Antikörper gemessen. Der Vergleich erfolgte durch mit TPA (100 nM) behandelten Zellen (Inkubation, 30 min). Als Kontrolle (K) diente DMSO (0,2%). Die Daten sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. NP, nicht-phosphorylierte Connexin43-Isoform; P₁, einfach phosphorylierte, P₂, doppelt phosphorylierte und P₃, hyperphosphorylierte Connexin43-Isoform.

Es zeigte sich, daß Menadion bereits nach 15 min zu einer ausgeprägten Hyperphosphorylierung von Connexin43 führte. Es ließ sich ein Banden-Shift feststellen, der mit einer Konzentrationsabnahme der NP-Isoform zugunsten vermehrt

phosphorylierter Formen (P₁ bis P₃) einherging. Die Intensität der Phosphorylierung war bei beiden Menadion-Konzentrationen etwa gleich stark ausgeprägt. Verglichen wurde der Menadion-Effekt mit dem von TPA. Bei TPA handelt es sich um einen Tumorpromotor, von dem bereits bekannt ist, daß er offenbar über die Aktivierung der Proteinkinase C (Lampe *et al.*, 2000) zu einer vermehrten Phosphorylierung von Connexin43 führt. Die Intensität der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion war mit der durch TPA-Behandlung hervorgerufenen vergleichbar. Um den Zeitverlauf der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion zu untersuchen, wurden Zellen verschiedenen Menadion-Konzentrationen unterschiedlich lange exponiert (vgl. Abb. 3.7). Dabei zeigte sich, daß bei beiden Konzentrationen das Ausmaß der Connexin43-Phosphorylierung nach 15 und 30 min am stärksten ist, sich aber auch nach 60 min noch nachweisen läßt.

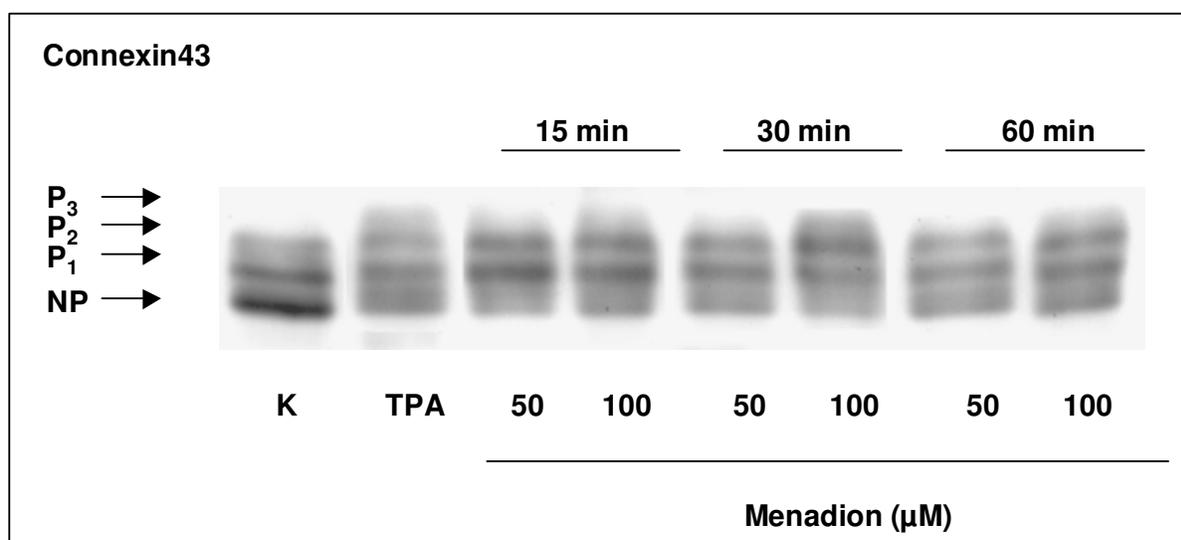


Abb. 3.7: Zeitverlauf der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion. Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot mit polyklonalem anti-Connexin43-Antikörper. K, Kontrolle (0,2% DMSO). NP, nicht-phosphorylierte Connexin43-Isoform; P₁, einfach phosphorylierte, P₂, doppelt phosphorylierte und P₃, hyperphosphorylierte Connexin43-Isoform.

3.5. MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 hemmen die Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion

Um eine Beteiligung der beiden MAPK ERK1 und ERK2 an der Phosphorylierung von Connexin43 durch Menadion zu finden, wurden konfluente WB-F344 Zellen mit

Menadion und den MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 behandelt und die Lysate im Western-Blot mit polyklonalem anti-Connexin43-Antikörper untersucht (vgl. Abb. 3.8).

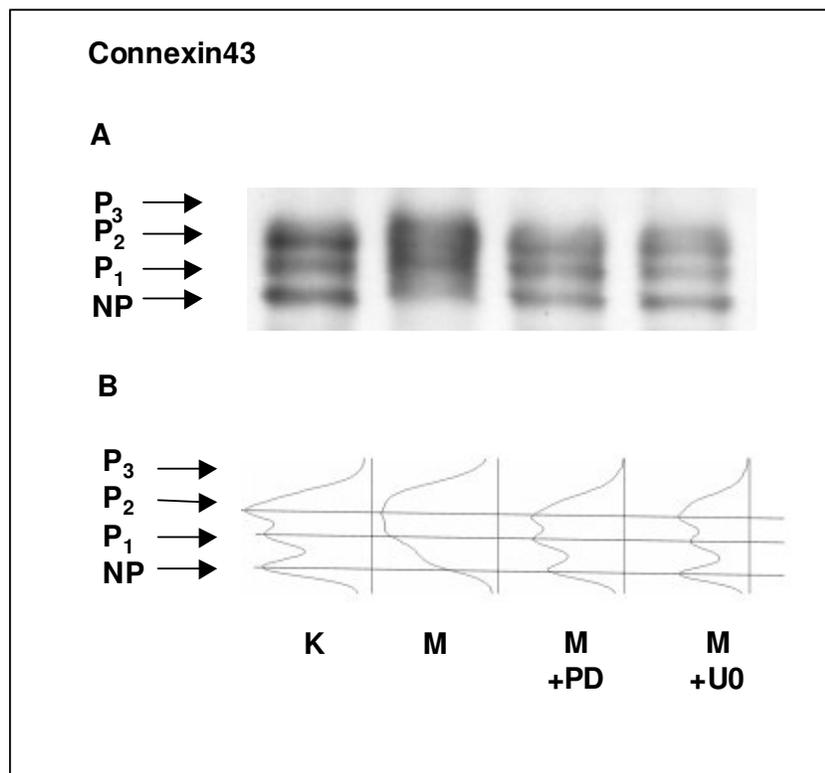


Abb. 3.8: A: MEK-Inhibitoren PD98059 (50 μ M) und U0126 (10 μ M) hemmen die Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion. WB-F344 Zellen wurden 30 min mit 50 μ M Menadion (M) und den entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Als Kontrolle (K) diente DMSO (0,2%). B, densitometrische Auswertung von A. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. NP, nicht-phosphorylierte Connexin43-Isoform; P₁, einfach phosphorylierte, P₂, doppelt phosphorylierte und P₃, hyperphosphorylierte Connexin43-Isoform.

Die Analyse des Phosphorylierungsstatus von Connexin43 ergab eine vollständige Hemmung der Connexin-Phosphorylierung sowohl durch PD98059 als auch durch U0126, was darauf schließen läßt, daß die Hyperphosphorylierung von Connexin43 durch Menadion sowohl von der Aktivierung von MEK1/2 als auch von ERK1 und ERK2 abhängig ist.

3.6. Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin hemmt die Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion

Für den Thrombozytenwachstumsfaktor PDGF wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung von Connexin43 sowohl von ERK1/2 als auch von der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) abhängig zu sein scheint (Hossain *et al.*, 1998b, 1999). Um zu testen, ob die Aktivierung der Proteinkinase C für die Hyperphosphorylierung von Connexin43 durch Menadion eine Rolle spielt, wurden konfluente WB-F344 Zellen mit Menadion und dem PKC-Inhibitor Staurosporin (2 µM; Sigma) inkubiert und die Lysate per Western-Blot mit polyklonalem Connexin43-Antikörper untersucht (vgl. Abb. 3.9).

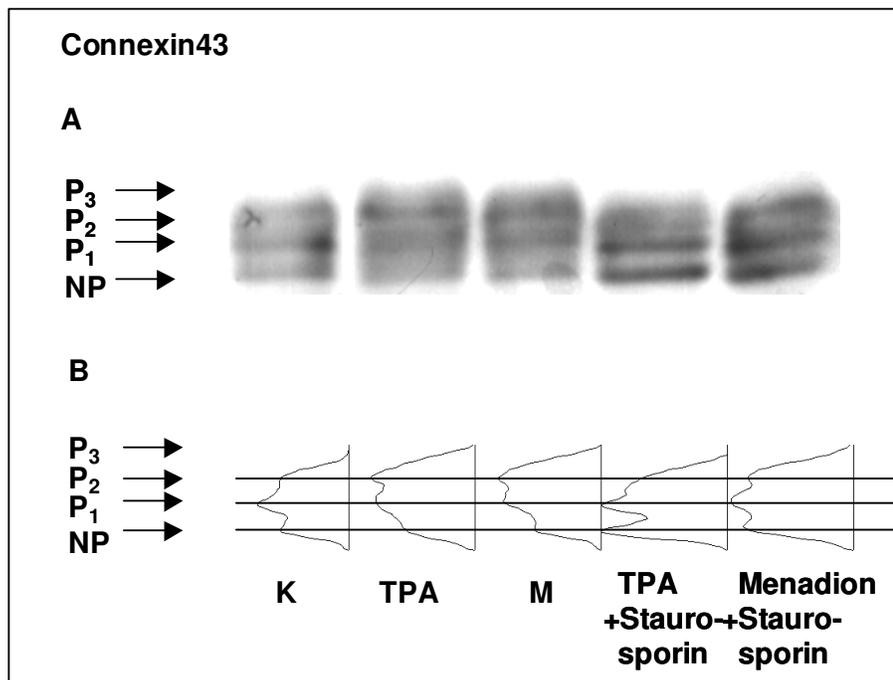


Abb. 3.9: A: PKC-Inhibitor Staurosporin hemmt die Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion. Konfluente WB-F344 Zellen wurden für 30 min mit Staurosporin (2 µM) bei 37°C präinkubiert und anschließend mit Menadion (50 µM) für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Vergleich erfolgte mit TPA (100 nM). Als Kontrolle (K) diente DMSO (0,2%). B zeigt die entsprechende densitometrische Auswertung. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. NP, nicht-phosphorylierte Connexin43-Isoform; P₁, einfach phosphorylierte, P₂, doppelt phosphorylierte und P₃, hyperphosphorylierte Connexin43-Isoform.

Es zeigte sich, daß der PKC-Inhibitor Staurosporin zu einer Hemmung der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion führt. Als Positivkontrolle diente der Tumorpromotor und PKC-Aktivator TPA. Für den Effekt von Menadion auf den Phosphorylierungsstatus von Connexin43 scheint demnach sowohl die Aktivierung von ERK1 und ERK2 als auch die Aktivierung der Proteinkinase C von Bedeutung zu sein.

3.7. Hemmung der Zell-Zell Kommunikation durch Menadion

Für die Regulation der Zell-Zell-Kommunikation konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von Connexinen durch Proteinkinasen eine wichtige Rolle spielt. Um zu untersuchen, welchen Effekt die Hyperphosphorylierung von Connexin43 durch Menadion auf die interzelluläre Kommunikation hat, wurde die Zell-Zell-Kommunikation in kultivierten WB-F344 Zellen untersucht. Konfluente Zellen wurden mit jeweils 50 und 100 μM Menadion sowie zusätzlich mit den MEK-Inhibitoren PD98059 (50 μM) und U0126 (10 μM) behandelt. Die Messung erfolgte nach der Methode des Farbstofftransfers (vgl. Kap. 2.7) nach 15-minütiger Inkubation.

Bereits nach 15 min Menadionbehandlung wurde ein signifikanter Abfall der interzellulären Kommunikation bei beiden Konzentrationen beobachtet (vgl. Abb. 3.10). Dabei war das Ausmaß der Hemmung der durch Gap Junctions vermittelten interzellulären Kommunikation bei 100 μM Menadion mit 75% deutlicher als bei 50 μM mit 50%. Die Hemmung der interzellulären Kommunikation wurde durch PD98059 und U0126 aufgehoben. In Einklang mit den Ergebnissen der Western-Blot Analyse (vgl. Abb. 3.3) war die Wirkung von U0126 auf die Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation durch Menadion stärker als die von PD98059.

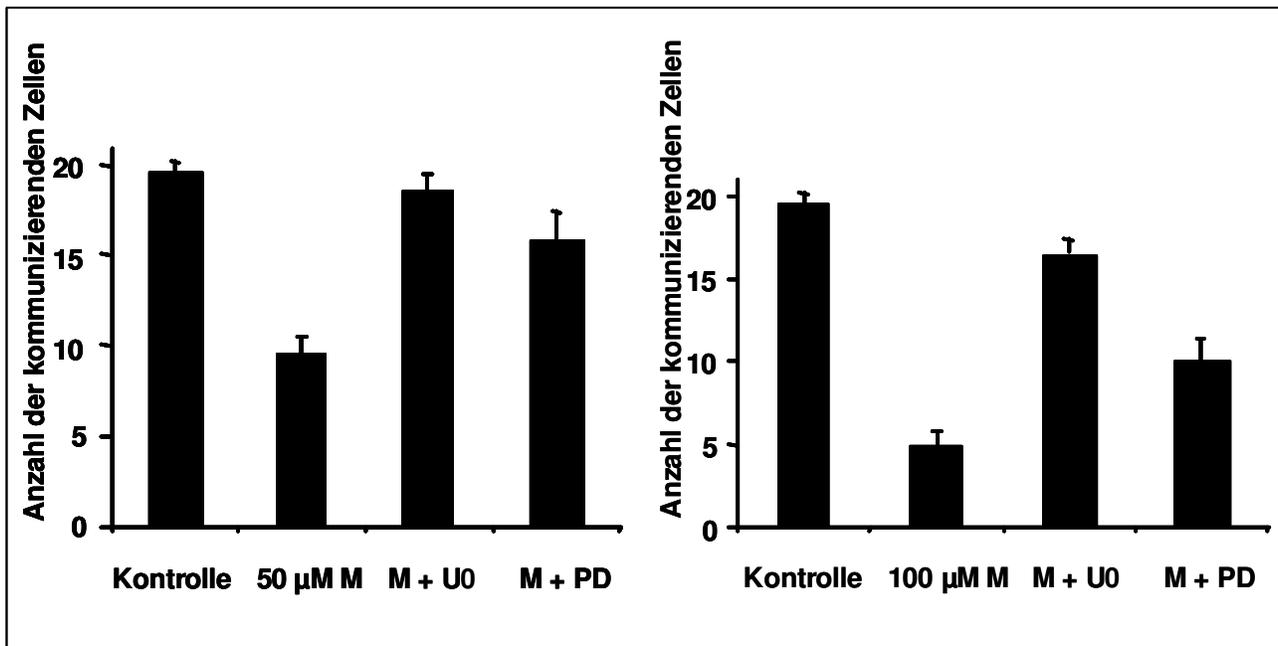


Abb. 3.10: Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation durch Menadion. Die Zell-Zell-Kommunikation wurde in konfluenten WB-F344 Zellen nach 15-minütiger Behandlung mit 50 und 100 µM Menadion (M) in Abwesenheit bzw. Gegenwart der MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 gemessen. Die Lösungsmittelkontrolle enthielt 0,2% DMSO. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± Stabw.

3.8. Mechanismus der Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation durch Menadion

Zahlreiche Tumorpromotoren, einschließlich des Phorbolesters TPA, vermögen eine Hyperphosphorylierung von Connexin43 zu induzieren, die mit der Internalisierung von Connexinmolekülen aus der Zellmembran korreliert (Ruch *et al.*, 2001). Um den Effekt von Menadion auf die Lokalisation der Connexine in der Zellmembran zu untersuchen, wurden zu 70-80% konfluente WB-F344 Zellen jeweils mit 50 und 100 µM Menadion behandelt und immunhistochemisch untersucht. Als Kontrolle für eine Connexin43-Internalisierung diente TPA.

Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben für TPA, nicht aber für Menadion, eine starke Abnahme der Connexin43-Konzentration in der Zellmembran. (vgl. Abb. 3.11). Dagegen konnte insbesondere für 100 µM Menadion 30 min nach Behandlung eine Tendenz zur Aggregation der Connexinmoleküle in der Zellmembran beobachtet werden. Menadion führt demzufolge eher zu einer

Aggregation als zu einer Internalisierung der Connexinmoleküle. Die Internalisierung der Gap Junctions scheint demnach kein notwendiger Mechanismus für die Hemmung der interzellulären Kommunikation zu sein.

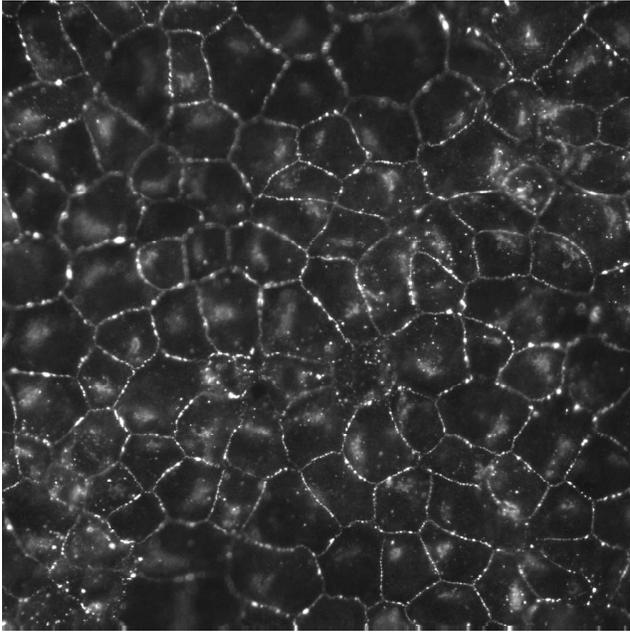
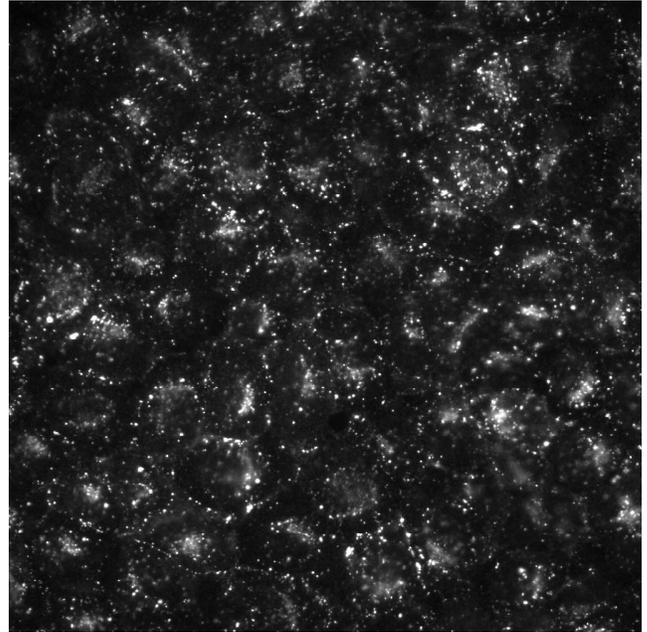
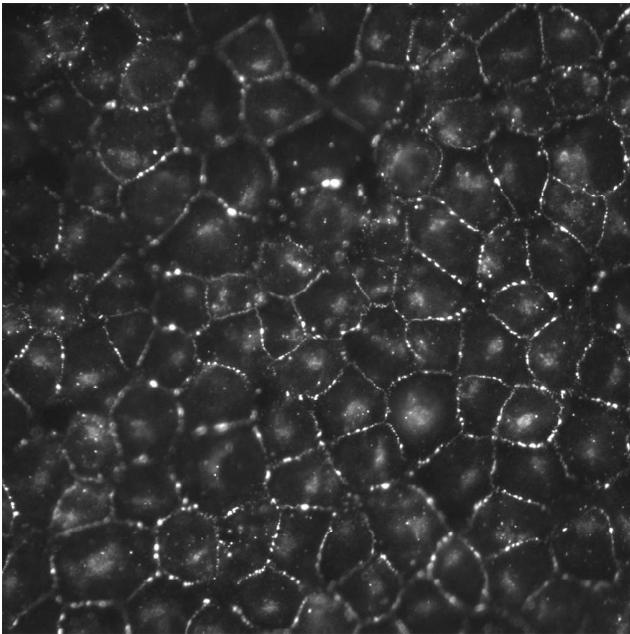
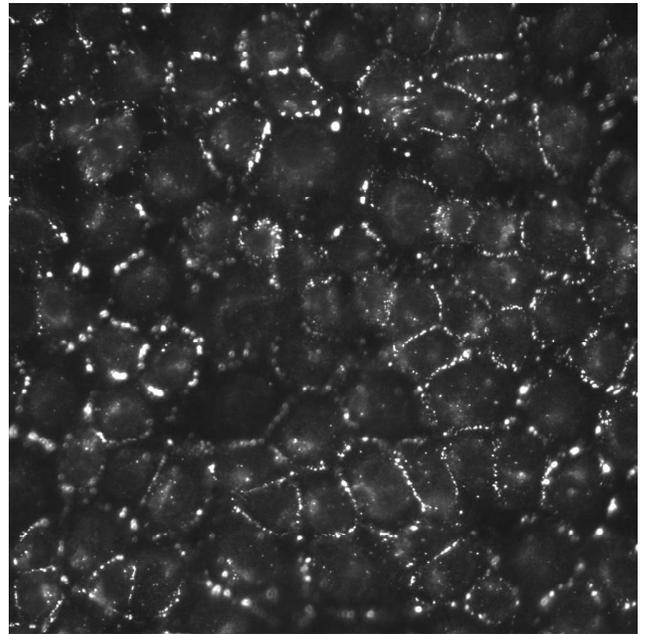
A**B****C****D**

Abb. 3.11: Immunhistochemische Untersuchung von mit Menadion behandelten WB-F344 Zellen. **A** Lösungsmittelkontrolle (0,2% DMSO; 60 min), **B** TPA (100 nM; 30 min), **C** 15 min nach Menadion-Behandlung (100 μ M) und **D** 30 min nach Menadion-Behandlung (100 μ M). Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

3.9. ERK1/2-Aktivierung durch Peroxynitrit

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob der ERK-Aktivator Peroxynitrit, von dem bereits bekannt ist, daß er die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen zu hemmen vermag (Bolanos & Medina, 1996; Sharov *et al.*, 1999), zu einer Hyperphosphorylierung von Connexin43 führt und, ob die Connexin43-Phosphorylierung, falls vorhanden, mit der Aktivierung von ERK1 und ERK2 erklärt werden kann. Dazu wurde zunächst die ERK1/2 Aktivierung durch Peroxynitrit dargestellt. Konfluente WB-F344 Zellen wurden per Bolus mit 300 und 500 μM Peroxynitrit behandelt und nach 15 bzw. 30 min lysiert und per Western-Blot auf ERK1/2-Aktivierung untersucht. Der Effekt von Peroxynitrit wurde dabei mit dem von Menadion verglichen (vgl. Abb. 3.12).

Sowohl für 300 als auch 500 μM zeigte Peroxynitrit nach Bolusbehandlung, verglichen mit Menadion, eine sehr schwache ERK1/2-Aktivierung. Dabei ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Intensität der ERK1/2-Aktivierung im Zeitverlauf.

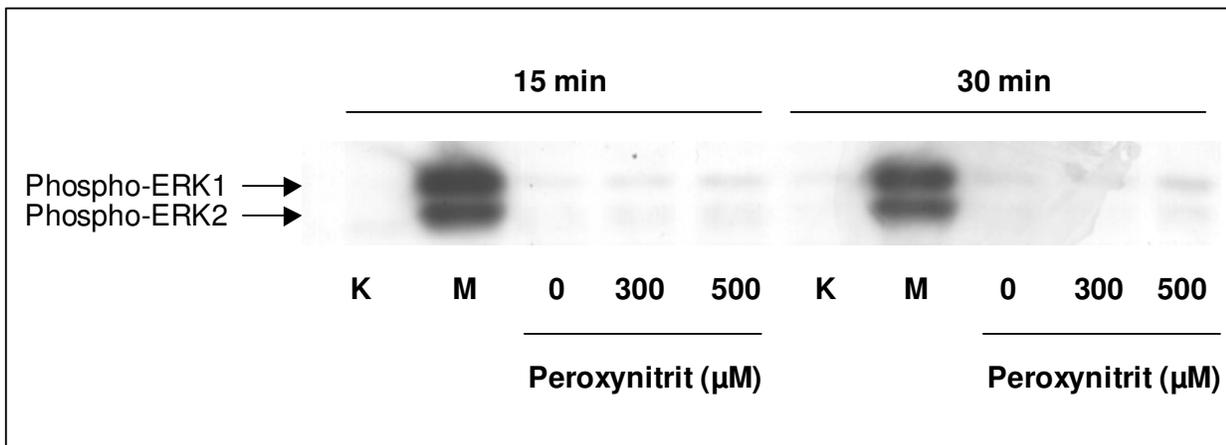


Abb. 3.12: ERK-Aktivierung durch Peroxynitrit. Die Zellen wurden mit 300 und 500 μM Peroxynitrit per Bolus behandelt und für 15 und 30 min inkubiert. Zum Vergleich ist die ERK-Aktivierung durch 100 μM Menadion (M) gezeigt. Als Kontrolle (K) diente DMSO (0,2%).

3.10. Peroxynitrit führt nicht zur Induktion der Connexin43-Phosphorylierung

Um zu untersuchen, ob die Hemmung der interzellulären Kommunikation mit der Phosphorylierung von Connexin43 erklärt werden kann, wurden konfluente WB-F344 Zellen mit 300 und 500 μM Peroxynitrit per Bolus behandelt und für 15, 30 und 60 min inkubiert. Im anschließenden Western-Blot wurde der Phosphorylierungsstatus von Connexin43 mittels polyklonalem Connexin43-Antikörper untersucht. Als Positivkontrolle für die Connexin43-Phosphorylierung diente TPA (vgl. Abb. 3.13).

Für beide Peroxynitritkonzentrationen und für alle untersuchten Zeitpunkte wurde gezeigt, daß Peroxynitrit zu keiner Induktion der Connexin43-Phosphorylierung führt.

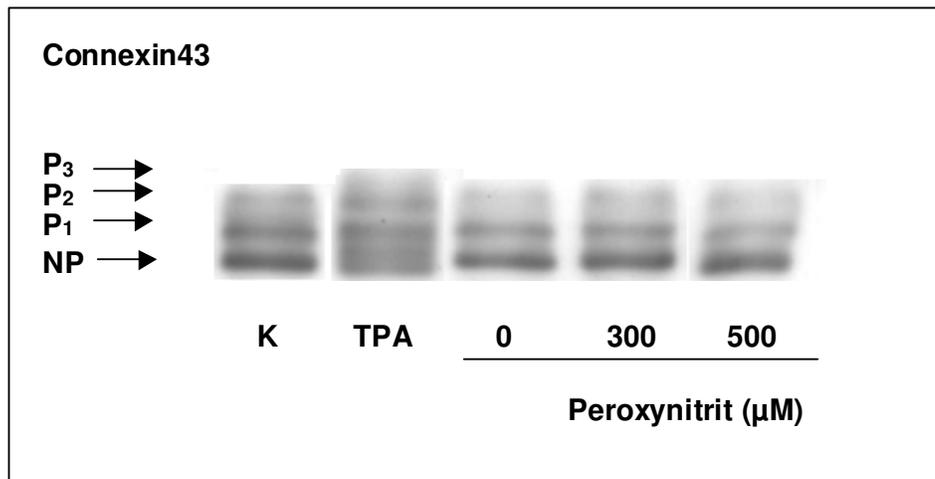


Abb. 3.13: Peroxynitrit induziert keine Phosphorylierung von Connexin43. Konfluente WB-F344 Zellen wurden per Bolus mit 300 und 500 μM Peroxynitrit behandelt und für 60 min inkubiert. Als Positivkontrolle diente TPA (100 nM; 30 min). Als Negativkontrolle (K) für TPA wurden die Zellen mit DMSO (0,2%) inkubiert, als Negativkontrolle für Peroxynitrit wurde zerfallenes Peroxynitrit verwendet (0 μM). Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. NP, nicht-phosphorylierte Connexin43-Isoform; P₁, einfach phosphorylierte, P₂, doppelt phosphorylierte und P₃, hyperphosphorylierte Connexin43-Isoform.

3.11. Peroxynitrit führt nicht zur Dislokation von Connexin43 aus der Zellmembran

Zur weiteren Untersuchung der Mechanismen, über die Peroxynitrit zu einer Beeinträchtigung der interzellulären Kommunikation führt, wurden zu 70-90% konfluente WB-F344 Zellen per Bolus mit 300 μM Peroxynitrit behandelt und nach 30

und 60 min Inkubation immunhistochemisch untersucht. TPA diente dabei wiederum als Kontrolle für eine Internalisierung von Connexin43 (vgl. Abb. 3.15).

Sowohl 30 als auch 60 min nach Peroxynitrit-Behandlung zeigte sich keine Internalisierung der Gap Junctions aus der Zellmembran, wie dies für TPA der Fall war. Es wurde auch keine Aggregation der Connexinmoleküle wie im Falle des Menadions beobachtet. Die mit Peroxynitrit behandelten Zellen zeigten in der immunhistochemischen Untersuchung der Lokalisation von Connexin43 keine Veränderung gegenüber der Kontrolle.

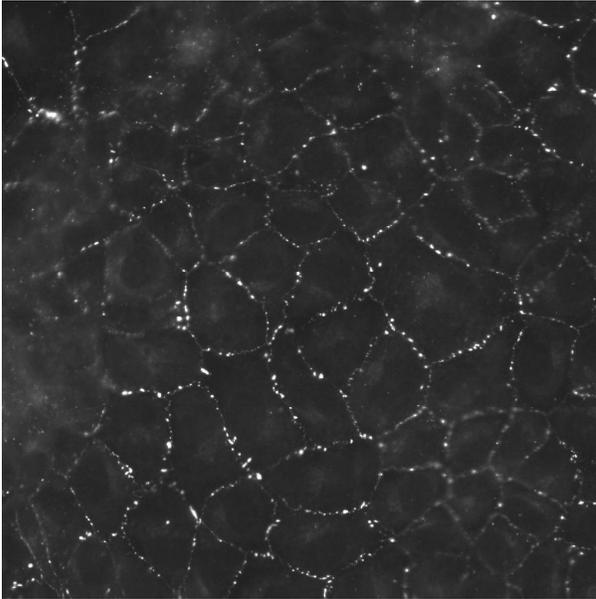
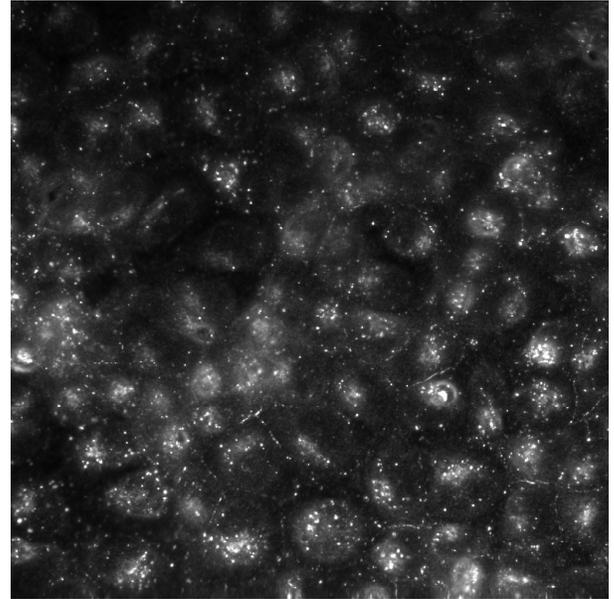
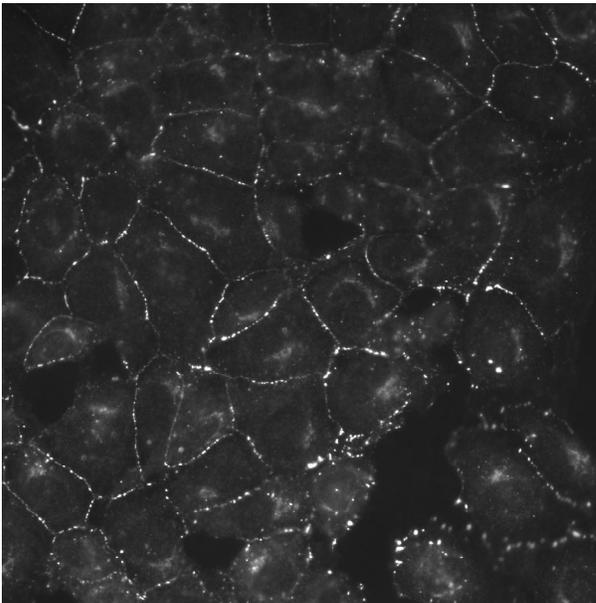
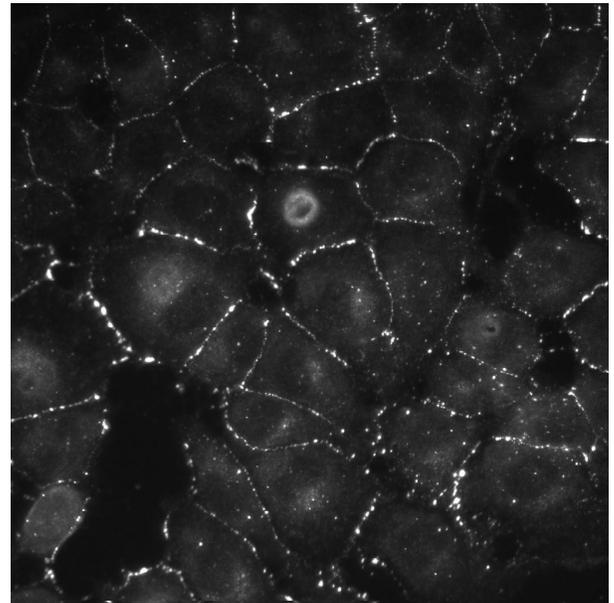
A**B****C****D**

Abb. 3.15: Immunhistochemische Darstellung der Connexin43-Verteilung in WB-F344Zellen nach Peroxynitrit-Behandlung. Die Zellen wurden mit 300 μ M Peroxynitrit für 30 und 60 min per Bolus behandelt. TPA (100 nM, 60 min) und DMSO (0,2%) dienten als Positiv- bzw. Negativkontrollen. **A** DMSO-Kontrolle, **B** TPA-Kontrolle, **C** WB-F344 Zellen 30 min und **D** 60 min nach Peroxynitrit-Behandlung. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4. Diskussion

4.1. Hemmung der interzellulären Kommunikation durch Menadion

Für zahlreiche Aktivatoren von Rezeptortyrosinkinasen wie FGF, EGF und PDGF ist bereits seit Anfang der 90er Jahre bekannt, daß sie, offenbar zellspezifisch, zu einer Hemmung der interzellulären Kommunikation führen und daß diese oftmals mit einer Hyperphosphorylierung von Connexin43 korreliert (Lau *et al.*, 1992). Am Beispiel von EGF konnte schließlich von Warn-Cramer *et al.* (1998) gezeigt werden, daß MAPK Connexin43 an bestimmten Serinresten direkt phosphorylieren und darüber die Zell-Zell-Kommunikation modulieren. MAPK spielen somit für die Regulation der interzellulären Kommunikation eine entscheidende Rolle. Ausgehend von den aus Vorexperimenten mit Hautfibroblasten (Klotz, 1998) gewonnenen Daten zur Aktivierung der MAPK ERK1 und ERK2 durch Menadion, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Effekt von Menadion auf die interzelluläre Kommunikation und den Phosphorylierungsstatus von Connexin43 vor dem Hintergrund einer MAPK-Aktivierung untersucht. Dabei zeigt sich, daß Menadion zu einer Phosphorylierung von Connexin43 führt und daß diese mit einer Abnahme der Zell-Zell-Kommunikation korreliert, die nicht auf einer Dislokation der Gap Junctions aus der Zellmembran, wie dies für TPA gezeigt wurde, basiert. Desweiteren zeigt sich, daß die durch Menadion induzierte ERK1/2-Aktivierung von der Aktivierung der doppeltspezifischen Kinasen MEK1 und MEK2 abhängig ist und daß die Connexin43-Phosphorylierung durch die MEK1/2-Inhibitoren PD98059 und U0126 sowie den PKC-Inhibitor Staurosporin inhibiert wird. Ausgehend von diesen Erkenntnissen stellen sich weitere Fragen in Bezug auf die ERK-Aktivierung und die Mechanismen, über die Menadion zu einer Modulation der interzellulären Kommunikation führt. Eine wesentliche Frage bei der Kinase-Aktivierung ist, an welchem Punkt des Signalweges vom Rezeptor bis zur phosphorylierten Kinase Menadion eingreift. Osada *et al.* (2001) konnten die MEK1/2-abhängige ERK1/2-Aktivierung durch Menadion bestätigen und gleichzeitig zeigen, daß Menadion zur Phosphorylierung des EGF- und HGF-Rezeptors in humanen Magenkarzinomzellen, zur Aktivierung des Ras-Signalweges und zur Induktion der MEK-Phosphorylierung führt, die letztendlich in der Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAPK ERK1/2 resultieren. Grundsätzlich läßt sich eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung durch direkte Aktivierung von Kinasen oder eine

Inhibierung von Phosphotyrosinphosphatasen (PTPasen) erreichen. Der letztere Mechanismus wurde für eine Reihe oxidativer Stimuli postuliert. Durch Oxidation eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum der PTPasen kommt es zu ihrer Inaktivierung und damit zur gesteigerten Phosphorylierung. So führen H_2O_2 und $\bullet NO$ über eine Thioloxidation im aktiven Zentrum zu einer Tyrosinphosphatase-inaktivierung (Caselli *et al.*, 1994; 1998). Als sogenannter Redox-Cycler wird Menadion intrazellulär reduziert und unter Bildung von Superoxid, welches – spontan oder von Superoxiddismutasen katalysiert – zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid dismutiert, wieder zum Ausgangsprodukt oxidiert. Über diese reaktiven Sauerstoffspezies – Superoxid und Wasserstoffperoxid – könnte Menadion zur Oxidation des Thiolrestes im aktiven Zentrum einer EGFR-Phosphatase und darüber zu einem Netto-Anstieg der Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase, somit also zu deren Aktivierung, führen. Da die durch Menadion induzierte Connexin43-Phosphorylierung sowohl durch den PKC-Inhibitor Staurosporin als auch durch die MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 gehemmt wird, ist für die Hyperphosphorylierung offenbar sowohl die Aktivierung der MAPK ERK1/2 als auch die Aktivierung der PKC von Bedeutung. Ein ähnlicher Mechanismus konnte für PDGF gezeigt werden (Hossain *et al.*, 1998b). In T51B-Rattenleberepithelzellen bewirkt PDGF eine rasche (innerhalb von 15-20 min) sowie reversible Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation bei gleichbleibender Anzahl von Gap Junctions in der Zellmembran und gleichzeitiger Hyperphosphorylierung von Connexin43. Im Unterschied zu EGF lassen sich Connexin43-Phosphorylierung und Hemmung der Kommunikation durch PDGF sowohl durch den PKC-Inhibitor Calphostin C als auch den MEK-Inhibitor PD98059 inhibieren. Wie läßt sich nun im Fall von Menadion die Verknüpfung beider Signalwege erklären? Für Phorbolster wird angenommen, daß sie über die Aktivierung der PKC zur Phosphorylierung der Serin-/Threoninkinase Raf führen und über diesen Mechanismus die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 induzieren können. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für Menadion vorstellbar und würde erklären, weshalb die Inhibierung sowohl von PKC als auch MEK 1/2 die Connexin43-Phosphorylierung hemmt.

Über welche Mechanismen führt Menadion letztendlich zur Hemmung der interzellulären Kommunikation? Schon seit längerer Zeit weiß man um die Bedeutung der Connexin43-Phosphorylierung für die Modulation der Zell-Zell-Kommunikation. Sie kann sowohl eine Zu- als auch Abnahme der interzellulären

Kommunikation zur Folge haben, wobei die jeweiligen Effekte zellspezifisch zu sein scheinen. Für EGF ist bekannt, daß ERK1/2 direkt spezifische Serinreste von Connexin43 phosphorylieren. Auch im Fall von Menadion ist ein ähnlicher Mechanismus denkbar, da es ebenso wie EGF zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptors und darüber zu einer Aktivierung der MAPK führt (Osada *et al.*, 2001). Welche Modulationen in der Zelle nach erfolgter Connexin43-Phosphorylierung für die Veränderungen der Kommunikation zwischen benachbarten Zellen verantwortlich sind, ist nur zum Teil bekannt. Die Phosphorylierung kann offenbar die Geschwindigkeit des Auf- und Abbaus von Gap Junctions in der Zellmembran, den Öffnungszustand der Gap Junction-Poren und die Oligomerisation der Connexine zu Connexonen regulieren (Lau *et al.*, 2000). Da die Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion bereits nach 15 min nachweisbar ist und die immunhistochemische Untersuchung für Menadion keine signifikante Veränderung in der Anzahl der Proteinkanäle ergeben hat, liegt es nahe, daß eine rasche Änderung der Kommunikation durch die Modulation des Öffnungs- und Schließungsverhaltens der Gap Junction-Poren erzielt werden könnte. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit keine Langzeitinkubationen mit Menadion durchgeführt, so daß sich weitere der oben erwähnten Mechanismen nicht ausschließen lassen. Neben der Connexin-Phosphorylierung könnten weitere Mechanismen an der Hemmung der interzellulären Kommunikation durch Menadion beteiligt sein. Die beim Redox-Cycling von Menadion erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies könnten über eine Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes oder der intrazellulären Calciumkonzentration zu einem vermehrten Schließen der Proteinkanäle führen.

Zuletzt sei auf die mögliche Bedeutung von H_2O_2 in Zusammenhang mit den Menadion-Effekten sowohl im Hinblick auf die ERK-Aktivierung als auch auf die Zell-Zell-Kommunikation hingewiesen. H_2O_2 entsteht intrazellulär beim Redox-Cycling von Menadion. Für H_2O_2 wurde gezeigt, daß es in der Lage ist, sowohl ERK (Guyton *et al.*, 1996) als auch die PKC zu aktivieren (Abe *et al.*, 1998). Wie für Phorbol ester bereits oben beschrieben, geht man auch bei Wasserstoffperoxid davon aus, daß es über die Aktivierung der PKC zu einer Phosphorylierung von Raf und darüber zu einer Induktion der ERK1/2-Phosphorylierung führt (Abe *et al.*, 1998). Es stellt sich nun die Frage, inwieweit Wasserstoffperoxid an der ERK-Aktivierung und der Modulation der Zell-Zell-Kommunikation durch Menadion beteiligt ist. Die Connexin43-Phosphorylierung durch H_2O_2 wurde erstmals von Mikalsen und Kaalhus

(1997) beschrieben. Weitere Experimente in diesem Zusammenhang wurden von Hossain *et al.* (1999) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die durch H₂O₂ induzierte Connexin43-Phosphorylierung vernachlässigbar schwach und vermutlich MAPK unabhängig ist, da die zeitliche Diskrepanz zwischen MAPK-Aktivierung und Hemmung der interzellulären Kommunikation etwa 1 h betrug. Messungen der Zell-Zell-Kommunikation unterhalb 1 h Inkubationszeit für H₂O₂ zeigten dagegen keine signifikanten Veränderungen der interzellulären Kommunikation. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß unter den in dieser Arbeit für Menadion gegebenen experimentellen Bedingungen der Effekt von Wasserstoffperoxid an der Connexin43-Phosphorylierung und der Hemmung der interzellulären Kommunikation durch Menadion vernachlässigt werden kann.

4.2. Vergleich von Menadion mit Peroxynitrit

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird untersucht, ob die Hemmung der interzellulären Kommunikation durch den ERK-Aktivator Peroxynitrit, die von Bolanos & Medina (1996) und von Sharov *et al.* (1999) beschrieben wurde, mit der Phosphorylierung von Connexin43 erklärt werden kann. Es zeigt sich, daß unter den gegebenen Bedingungen Peroxynitrit zu einer sehr schwachen ERK-Aktivierung führt und daß es zu keiner signifikanten Phosphorylierung von Connexin43 durch Peroxynitrit kommt. Es müssen also andere Mechanismen für die Hemmung der interzellulären Kommunikation durch Peroxynitrit verantwortlich sein. Um welche Mechanismen handelt es sich hierbei? Peroxynitrit ist eine stark oxidierende und nitrierende Verbindung. Durch Oxidation kommt es zur Reaktion mit Proteinen, Thiolen, DNA und Lipiden. Durch Nitrierung und Nitrosylierung werden phenolhaltige Aminosäuren modifiziert. Obwohl die ERK-Aktivierung durch Peroxynitrit bereits mehrfach beschrieben wurde (Schieke *et al.*, 1999; Oh-hashii *et al.*, 1999; Go *et al.*, 1999; Saeki *et al.*, 2000; Jope *et al.*, 2000), vermag Peroxynitrit durch die Nitrierung von Tyrosinresten in zellulären Proteinen die Tyrosinphosphorylierung zu verhindern und damit die Aktivierung entscheidender Signalwege zu stören (Kong *et al.*, 1996). Sharov *et al.* (1999) diskutieren als mögliche Ursache der Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation durch Peroxynitrit, daß Peroxynitrit und die bei seinem Zerfall entstehenden Hydroxylradikale zur Lipidperoxidation in der Umgebung der Gap Junctions führen und darüber möglicherweise die Öffnungsdynamik der Gap

Junction-Poren modulieren könnten. Andererseits könnte Peroxynitrit auch direkt mit den Sulfhydrylgruppen in der extrazellulären Proteinregion des Connexinmoleküls (vgl. Abb. 1.1) reagieren und darüber zu einer Konformationsänderung des Connexinmoleküls führen, die letztendlich in einer Dysfunktion der Proteinkanäle resultiert. Da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt haben, daß die Anzahl der Gap Junctions in der Zellmembran nach der Behandlung mit Peroxynitrit gleich bleibt, kann eine Dislokation als Ursache für die Hemmung der interzellulären Kommunikation ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit über die Peroxynitrit zu einer Hemmung der interzellulären Kommunikation führen könnte, wäre, wie auch bereits für Menadion beschrieben, über die Veränderung des intrazellulären pH-Wertes bzw. der intrazellulären Calciumkonzentration.

4.3. Menadion und Karzinogenese

Zu den Aufgaben der interzellulären Kommunikation gehört u.a. die Wachstumskontrolle, da Gap Junctions die Passage von niedermolekularen, für das Zellwachstum notwendigen Faktoren erlauben (Loewenstein & Kanno, 1966). Seit einiger Zeit kennt man die Bedeutung der Zell-Zell-Kommunikation für die Karzinogenese. Neoplastische Zellen weisen oftmals eine reduzierte interzelluläre Kommunikation auf (Weinstein *et al.*, 1976; Yamasaki, 1990), die über eine verminderte Wachstumskontrolle die Entartung von Zellen begünstigt. Die Mechanismen, die für die eingeschränkte interzelluläre Kommunikation bei Tumorzellen verantwortlich sind, sind zahlreich. Für humane Kolonkarzinomzellen wurde zum Beispiel gezeigt, daß die verminderte Expression von Connexin32 mit der DNA-Methylierung des Connexin32-Promotors korreliert (Zhu *et al.*, 1998). In einigen Tumorzellen ist die Expression von Connexinen ähnlich hoch wie bei nicht neoplastisch transformierten Zellen oder sogar höher. Cesen-Cummings *et al.* (1998) konnten in Maus- und humanen Lungenkarzinomzellen zeigen, daß die Connexin43-Expression von nicht-nachweisbar bis hin zur Überexpression reichte. Da neoplastische Zellen demnach nicht immer durch eine verminderte interzelluläre Kommunikation sowie Connexin-Expression charakterisiert sind, geht Loewenstein (1979) davon aus, daß die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen auf verschiedenen Ebenen gestört werden kann. Erstens kann es zur Beeinträchtigung

der Funktionalität der Proteinkanäle im Sinne ihrer Permeabilität kommen. Zweitens können Zellen funktionsfähige Gap Junctions untereinander ausbilden ohne Gap Junctions mit nicht-neoplastisch transformierten Zellen ausbilden zu müssen. Drittens können sie Gap Junctions ausbilden, die für wachstumsregulierende Signale unempfindlich sind und letztlich können die Zellen Defekte haben, die neben der verminderten Kommunikation ausreichend sind, um die Zellen neoplastisch zu transformieren.

Viele Substanzen und Gen-Produkte, die das Zellwachstum stimulieren oder in bestimmte das Wachstum stimulierende Signalwege eingreifen, hemmen die Zell-Zell-Kommunikation. Dazu rechnet man Wachstumsfaktoren, Onkogene und Karzinogene. Auch Menadion ist ein solches potentiell Karzinogen, das, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, u.a. ERK-1/2 aktiviert und über diesen Mechanismus zur gesteigerten Connexin43-Phosphorylierung und zur Abnahme der interzellulären Kommunikation führt. Die immunhistochemische Untersuchung von mit Menadion behandelten WB-F344 Zellen ergab zwar eine Lokalisation der Gap Junctions in der Membran, jedoch ließ sich eine Verdichtung der Gap Junctions in der Zellmembran erkennen. Es könnte sich hierbei um eine Aggregation von zum Abbau markierten, inaktiven Gap Junctions handeln. Zur genauen Erklärung dieses Phänomens müssen aber weitere Experimente durchgeführt werden.

Menadion ist ein potentes Chemotherapeutikum, welches das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* zu hemmen vermag (Nishikawa *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 2000; Okayasu *et al.*, 2001). Die chemotherapeutische Wirkung von Menadion wird sowohl auf Erzeugung von oxidativem Stress als auch auf Alkylierung von DNA zurückgeführt. Da die meisten Pharmaka, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, selbst mutagen wirken, werden sie als potentielle Karzinogene angesehen. Dies gilt auch für Menadion. Ein möglicher Mechanismus, über den Menadion zur neoplastischen Transformation von Zellen führen könnte, wäre, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, über die Modulation der Zell-Zell-Kommunikation.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon / Vitamin K₃) auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in WB-F344-Rattenleberepithelzellen untersucht und mit der Wirkung des Entzündungsmediators Peroxynitrit verglichen.

Dabei zeigte sich, daß Menadion in den verwendeten Konzentrationen von 50 und 100 µM zu einer Hyperphosphorylierung von Connexin43 führte, die bereits nach 15 min sehr ausgeprägt und auch nach 60 min noch nachweisbar war. Die durch Menadion induzierte Connexin43-Hyperphosphorylierung wurde durch die beiden MAPK / ERK-Kinase (MEK)-Inhibitoren PD98059 und U0126 sowie durch den Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin gehemmt. In Einklang mit diesen Daten zur Connexin43-Phosphorylierung ergab sich für beide Menadion-Konzentrationen bereits nach 15 min ein Abfall der Zell-Zell-Kommunikation auf bis zu 25% der Kontrollwerte. Dieser Effekt wurde durch die beiden genannten MEK-Inhibitoren aufgehoben. Connexine können bekanntermaßen durch ERK1/2 phosphoryliert werden. Korrespondierend mit der Aufhebung der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion und der verminderten Zell-Zell-Kommunikation durch MEK-Inhibitoren führte Menadion zu einer deutlichen Aktivierung von ERK1/2, die wiederum in Gegenwart der MEK-Inhibitoren blockiert wurde.

Peroxynitrit induzierte dagegen nur eine vernachlässigbar schwache ERK-Aktivierung und keine Connexin43-Phosphorylierung. In der immunhistochemischen Untersuchung ließ sich sowohl für Menadion als auch für Peroxynitrit keine Dislokation der Gap Junctions aus der Zellmembran feststellen. Allerdings wiesen mit Menadion behandelte Zellen eine Verdichtung der Gap Junctions in der Zellmembran auf.

Die durch Menadion verursachte Abnahme der interzellulären Kommunikation in Rattenleberepithelzellen liegt demnach in der Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 sowie der Phosphorylierung von Connexin43 durch die letzteren begründet, nicht aber in der Internalisierung von Connexin43, wie sie für einige Tumorpromotoren beschrieben wurde.

6. Literatur

Abe, M.K., Sreedharan, K., Karpova, A.Y., Li, J., Liu, P.T., Kuo, W.-L., and Hershenson, M.B. (1998). Hydrogen peroxide activates extracellular signal-regulated kinase via protein kinase C, raf-1, and MEK1. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**, pp. 562-569.

Abrams, K., and Bennett, M.V.L. (2000). Hereditary human diseases caused by connexin mutations. In: *Current Topics in Membranes: Gap Junctions, Molecular Basis of Cell Communication in Health and Disease* (Peracchia, C., Ed.), pp. 423-457. Academic Press, San Diego.

Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. (1995). PD 98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**, pp. 27489-94.

Baas, A.S., and Berk, B.C. (1995). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **77**, pp. 29-36.

Beckman, J.S. (1996). The physiological and pathophysiological chemistry of nitric oxide. In *Nitric Oxide: Principles and Actions* (Lancaster, J., Ed), pp. 1-82. Academic Press, San Diego, CA.

Bennett, M.V.L., Barrio, L.C., Barigiello, T.A., Spray, D.C., Hertzberg, E., and Saez, J.C. (1991). Gap Junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* **6**, pp. 305-320.

Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F., and Fischbeck, K.H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* **262**, pp. 2039-2042.

Berthoud, V.M., Ledbetter, M.L., Hertzberg, E.L., and Saez, J.C. (1992). Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca²⁺. *Eur J Cell Biol* **57**, pp. 40-50.

Bolanos, J.P., and Medina, J.M. (1996). Induction of nitric oxide synthase gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *Neurochem* **66**, pp. 2091-2099.

Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., and Monks, T.J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* **13**, pp. 135-160.

Brink, P.R. (1996). Gap junction channel gating and permselectivity: their roles in coordinated tissue function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**, pp. 1041-1046.

Brisette, J.L., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Dotto, G.P. (1991). The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol Cell Biol* **11**, 5364-5371.

Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A.C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R., and Cayota, A.M. (1999). Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* **162**, pp. 3356-3366.

Brunmark, A., and Cadenas, E. (1989). Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic Biol Med* **7**, pp. 435-477.

Caselli, A., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pazzagli, L., Cappugi, G., and Ramponi, G. (1994). Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. *J Biol Chem* **269**, pp. 24878-24882.

Caselli, A., Marzocchini, R., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pieraccini, G., and Ramponi, G. (1998). The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J Biol Chem* **273**, pp. 32554-32560.

Cesen-Cummings, K., Fernstrom, M.J., Malkinson, A.M., and Ruch, R.J. (1998). Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis* **19**, pp. 61-67.

- Chlebowski, R.T, Dietrich, M., Akman, S., and Block, J.B. (1985). Vitamin K₃ inhibition of malignant murine cell growth and human tumor colony formation. *Cancer Treat Rep* **69**, pp. 527-532.
- Crow, D.S., Beyer, E.C., Paul, D.L., Kobe, S.S., and Lau, A.F. (1990). Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Mol Cell Biol* **10**, pp. 1754-1763.
- Crow, J.P., and Beckman, J.S. (1995). The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity
- Dahl, G., Werner, R., Levine, E., and Rabadan-Diehl, C. (1992). Mutational analysis of gap junction formation. *Biophys J* **62**, pp. 172-182.
- Di Monte, D., Bellomo, G., Thor, H., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1984). Menadione-induced thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Arch Biochem Biophys* **235**, pp. 343-350.
- Douki, T., Cadet, J., and Ames, B.N. (1996). An adduct between peroxynitrite and 2'-deoxyguanosine: 4,5-dihydro-5-hydroxy-4-(nitrosooxy)-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* **9**, pp. 3-7.
- Go, Y.M., Patel, R.P., Maland, M.C., Park, H., Beckman, J.S., Darley-Usmar, V.M., and Jo, H. (1999). Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-jun NH(2)-terminal kinase. *Am J Physiol* **277**, pp. H1647-H1653.
- Goodenough, D.A, Goliger, J.A, and Ravel, J.-P. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* **65**, pp. 475-502.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., Holbrook, N.J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. *J Biol Chem* **271**, pp. 4138-4142.

Hossain, M.Z., and Boynton, A.L. (2000). Regulation of cx43 gap junctions: the gatekeeper and the password. *Sci STKE* **2000**, PE1.

Hossain, M., Peng, A., and Boynton, A.L. (1998b). Platelet-derived growth factor-induced disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 involves protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Cell Physiol* **176**, pp. 332-341.

Hossain, M., Jagdale, A., Peng, A., and Boynton, A.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of connexin43 are not sufficient for the disruption of gap junctional communication by platelet-derived growth factor and tetradecanoylphorbol acetate. *J Cell Physiol* **179**, pp. 87-96.

Huie, R.E., and Padmaja, S. (1993). The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Comm* **18**, pp. 195-199.

Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* **356**, pp. 1-11.

John, S.A., and Revel, J.-P. (1991). Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin43. *Biochem Biophys Res Commun* **178**, pp. 1312-1318.

Joep, R.S., Zhang, L., and Song, L. (2000). Peroxynitrite modulates the activation of p38 and extracellular regulated kinases in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* **376**, pp. 365-370.

Juedes, M.J., and Wogan, G.N. (1996). Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat Res* **349**, pp. 51-61.

Kadle, R., Zhang, J.T., and Nicholson, B.J. (1991). Tissue-specific distribution of differentially phosphorylated forms of Cx43. *Mol Cell Biol* **11**, pp. 363-369.

Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F., and Leigh, I.M. (1997). Connexin26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* **387**, pp. 80-83.

Klotz, L.-O. (1998). Effekt von UVA und Singulett-Sauerstoff auf JNK-, p38- und ERK-MAP Kinasen in menschlichen Hautzellen. Dissertation.

Kong, S.K., Yim, M.B., Stadtman, E.R., and Chock, P.B. (1996b). Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, pp. 3377-3382.

Konorev, E.A., Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1998). Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett* **427**, pp. 171-174.

Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S. (1992). Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* **5**, pp. 834-842.

Kurata, W.E., and Lau, A.F. (1994). p130gag-fps disrupts gap junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 in a manner similar to that of pp60v-src. *Oncogene* **9**, pp. 329-335.

Kwiatkowski, A.P., Baker, T.K., and Klauning, J.E. (1994). Comparison of glucocorticoid-mediated changes in the expression and function of rat hepatocyte gap junctional proteins. *Carcinogenesis* **15**, pp.1753-1758.

Laing, J.G., and Beyer, E.C. (1995). The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* **270**, pp. 26399-26403.

Laing, J.G., Tadros, P.N., Westphale, E.M., and Beyer, E.C. (1997). Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Exp Cell Res* **236**, pp. 482-492.

- Laird, D.W., Puranam, K.L., Revel, J.-P. (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiomyocytes. *Biochem J* **273**, pp. 67-72.
- Laird, D.W., Castillo, M., and Kasprzak, L. (1995). Gap junction turnover, intracellular trafficking and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells. *J Cell Biol* **131**, pp. 1193-1203.
- Laird, D.W. (1996). The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *J Bioenerg Biomembr* **28**, pp. 311-318.
- Lampe, P.D. (1994). Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: a dramatic inhibition of assembly. *J Cell Biol* **127**, pp. 1895-18905.
- Lampe, P. D., and Lau, A.F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* **384**, pp. 205-215.
- Lampe, P.D. TenBroek, E.M., Burt, J.M., Kurata, W.E., Johnson, R.G., and Lau, A.F. (2000). Phosphorylation of connexin43 in serine 368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J Cell Biol* **149**, pp. 1503-1512.
- Larsen, W. and Hai, N. (1978). Origin and fate of cytoplasmic gap junctional vesicles in rabbit granulosa cells. *Tissue Cell* **10**, pp. 585-598.
- Lau, A.F., Kanemitsu, M.Y, Kurata, W.E., Danesh, S., and Boynton, A.L. (1992). Epidermal growth factor disrupts gap-junctional communication and induces phosphorylation of connexin43 on serine. *Mol Biol Cell* **3**, pp. 865-874.
- Lau, A.F., Warn-Cramer, B.J., and Lin, R. (2000). Regulation of connexin43 by tyrosine protein kinases. In: *Current Topics in Membranes: Gap Junctions, Molecular Basis of Cell Communication in Health and Disease* (Peracchia, C., Ed), pp. 315-349. Academic Press, San Diego.

- Lazrak, A., and Peracchia, C. (1993). Gap junction gating sensitivity to physiological internal calcium regardless of pH in Novikoff hepatoma cells. *Biophys J* **65**, pp. 2002-2012.
- Liao, W.C., Wu, F.Y., and Wu, C.W. (2000). Binary/ternary combined effects of vitamin K₃ with other antitumor agents in nasopharyngeal carcinoma CG1 cells. *Int J Oncol* **17**, pp. 323-328.
- Loewenstein, W.R. (1981). Junctional intercellular communication: the cell-cell membrane channel. *Physiol Rev* **61**, pp. 829-913.
- Loewenstein, W.R., and Kanno, Y. (1966). Intercellular communication and the control of growth. Lack of communication between cancer cells. *Nature* **209**, pp. 1248-1249.
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P., Kerby, J.D., Beckman, J.S., and Thompson, J.A. (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, pp. 11853-11858.
- Maldonado, P.E, Rose, B., and Loewenstein, W.R. (1988). Growth factors modulate junctional cell-to-cell communication. *J Membr Biol* **106**, pp. 203-210.
- Mikalsen, S.O., and Kaalhus, O. (1997). A characterization of permolybdate and its effect on cellular tyrosine phosphorylation, gap junctional intercellular communication and phosphorylation status of the gap junction protein, connexin43. *Biochim Biophys Acta* **1356**, pp. 207-220.
- Miller, M.G., Rodgers, A., and Cohen, G.M. (1986). Mechanisms of toxicity of naphthoquinones to isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **35**, pp.1177-1184.
- Musil, L.S., and Goodenough, D.A. (1991). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* **115**, pp. 1357-1374.

Musil, L.S, Le, A.-C. N., VanSlyke, J.K., and Roberts, L.M. (2000). Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* **275**, pp. 25207-25215.

Musil, L.S, Beyer, E.C., and Goodenough, D.A. (1990). Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation. *J Membr Biol* **116**, pp. 163-175.

Nicholson, B., Dermietzel, R., Teplow, D., Traub, O., Willecke, K., and Revel, J.-P. (1987). Two homologous protein components of hepatic gap junctions. *Nature* **329**, 732-734.

Nishikawa, Y., Carr, B. I., Wang, M., Kar, S., Finn, F., Dowd, P., Zheng, Z., Kerns, J., and Naganathan, S. (1995). Growth inhibition of hepatoma cells induced by vitamin K and its analogs. *J Biol Chem* **270**, pp. 28304-28310.

Noto, V., Taper, H.S., Jiang, Y.H., Janssens, J., Bonte, J., and De Loecker, W. (1989). Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K₃) treatment on human tumor cell growth in vitro. I. Synergism of combined vitamin C and K₃ action. *Cancer* **63**, pp.901-906.

Oh-hashii, K., Maruyama, W., Yi, H., Takahashi, T., Naoi, M., and Isobe, K. (1995). Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Comm* **263**, pp.504-509.

Okayasu, H., Ishihara, M., Satoh, K., and Sakagami, H. (2001). Cytotoxic activity of vitamins K₁, K₂ and K₃ against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* **21(4A)**, pp. 2387-2392.

Osada, S., Saji, S., and Osada, K. (2001). Critical role of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation on menadione (vitamin K₃) induced growth inhibition. *Cancer* **91**, pp. 1156-1165.

Owens, L.M., Fralix, T.A., Murphy, E., Cascio, W.E., and Gettes, L.S. (1996). Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion exchange to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. Experimental Working Group. *Circulation* **94**, pp.10-13.

Peracchia C., Sotkis, A., Wang, X.G., Peracchia, L.L., and Persechini, A. (2000). Calmodulin directly gates gap junction channels. *J Biol Chem* **275**, pp. 26220-26224.

Prasad, K.N., Edwards-Prasad, J., and Sakamoto, A. (1981). Vitamin K3 (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture. *Life Sci* **29**, pp. 1387-1392.

Rahman, S., and Evans, W.H. (1991). Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. *J Cell Sci* **100**, pp. 567-578.

Redegeld, F.A., Moison, R.M., Barentsen, H.M., Koster, A.S., and Noordhoek, J. (1990). Interaction with cellular ATP generating pathways mediates menadione-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **280**, pp.130-136.

Rivedal, E., Mollerup, S., Haugen, A., and Vikhamar, G. (1996). Modulation of gap junctional intercellular communication by EGF in human kidney epithelial cells. *Carcinogenesis* **17**, 2321-2328.

Rossi, L., Moore, G.A., Orrenius, S., and O'Brien, P.J. (1986). Quinone toxicity in hepatocytes without oxidative stress. *Arch. Biochem Biophys* **251**, pp. 25-35.

Ruch, R.J., and Klauning, J.E. (1988). Inhibition of mouse hepatocyte intercellular communication by paraquat-generated oxygen free radicals. *Toxicol Appl Pharmacol* **94**, pp. 427-436.

Ruch, R.J., Trosko, J.E., and Madhukar, B.V. (2001). Inhibition of connexin43 gap junctional intercellular communication by TPA requires ERK activation. *J Cell Biochem* **83**, pp. 163-169.

Saeki, M., Kamisaki, Y., and Maeda, S. (2000). Involvement of mitogen-activated protein kinase in peroxynitrite-induced cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Res* **38**, pp. 213-216.

Saez, J.C., Berthoud, V.M., Moreno, A.P., and Spray, D.C. (1993). Gap junctions: multiplicity of controls in differentiated and undifferentiated cells and possible functional implications. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **27**, 163-198.

Saez, J.C., Bennett, M.V.L., and Spray, D.C. (1987). Carbon tetrachloride at hepatotoxic levels blocks reversibly gap junctions between rat hepatocytes. *Science* **236**, 967-969.

Saez, J.C., Nairn, A.C., Czernik, A.J., Fishman, G.I., Spray, D.C., and Hertzberg, E.L. (1997). Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal myocyte gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* **29**, pp. 2131-2145.

Salgo, M.G., Stone, K., Squadrito, G.L., Battista, J.R., and Pryor, W.A. (1995). Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem Biophys Res Comm* **210**, pp. 1025-1030.

Schieke, S.M., Briviba, K., Klotz, L.O., and Sies, H. (1999). Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett* **448**, pp. 301-303.

Sharov, V.S, Briviba, K. and Sies, H. (1999). Peroxynitrite diminishes gap junctional communication: protection by selenite supplementation. *IUBMB Life* **48**, pp. 379-384.

Simon, A.M., and Goodenough, D.A. (1998). Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol* **8**, pp. 477-482.

Spray, D.C., Moreno, A.P., Eghbali, B., Chanson, M., and Fishman, G.I. (1992). Gating of gap junction channels as revealed in cells stably transfected with wild type and mutant connexin cDNAs. *Biophys J* **62**, pp. 48-50.

- Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, S.A., Jewell, S., and Orrenius, S. (1982). The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphtoquinone) by isolated hepatocytes. *J Biol Chem* **257**, pp. 12419-12425.
- Toyama, J. Sugiura, H., Kamiya, K., Kodama, I., Terasawa, M., and Hidaka, H. (1994). Ca²⁺-calmodulin mediated modulation of the electrical coupling of ventricular myocytes isolated from guinea pig heart. *J Mol Cell Cardiol* **26**, pp. 1007-1015.
- Trosko, J.E., and Ruch, R. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci* **3**, pp. 208-236.
- Warn-Cramer, B.J., Lampe, P.D., Kurata, W.E., Kanemitsu, M.Y., Loo, L.W.M., Eckhart, W., and Lau, A.F. (1996). Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin43 gap junction protein. *J Biol Chem* **271**, pp. 3779-3786.
- Warn-Cramer, B.J., Cottrell, G.T., Burt, J. and Lau, A.F. (1998). Regulation of connexin43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**, pp. 9188-9196.
- Wefers,H., and Sies, H. (1983). Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and the menadione-glutathione conjugate: relation to glutathione and NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase) activity. *Arch Biochem Biophys* **224**, pp. 568-578.
- Weinstein, R.S., Merck, F.B., and Alroy, J. (1976). The structure and function of intercellular junctions in cancer. *Adv Cancer Res* **23**, pp. 23-89.
- Whitmarsh, A.J., and Davies, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction. *J Mol Med* **74**, pp. 589-607.
- Wu, F.Y., Liao, W.C. and Chang, H.M. Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *LifeSci* **52**, pp. 1797-17804.

- Yamasaki, H. (1990). Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, pp. 1051-1058.
- Yancey, S.B., Nicholson, B.J., and Revel, J.-P. (1981). The dynamic state of liver gap junctions. *J Supramol Struct Cell Biochem* **16**, pp. 221-232.
- Yeager, M., Unger, V.M., and Falk, M.M. (1998). Synthesis, assembly and structure of gap junctional intercellular channels. *Curr Opin Struct Biol* **8**, pp. 517-524.
- Yermilov, V., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M.D., Pignatelli, B. and Ohshima, H. (1995). Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* **16**, pp. 2045-2050.
- Yu, W., Dahl, G., and Werner, R. (1994). The connexin43 gene is responsive to oestrogen. *Proc R Soc Lond [Biol.]* **255**, pp. 125-132.
- Zhu, L., Gunn, C., and Beckman, J.S. (1992). Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **298**, pp.452-457.
- Zhu, W.B., Mironov, N., and Yamasaki, H. (1998). Hypermethylation of connexin32 gene as a mechanism of disruption of cell-cell communication in tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* **39**, p. 199.
- Zou, M.-H., and Ullrich, V. (1996). Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett* **382**, pp. 101-104.

7. Anhang

Anhang 1: Lebenslauf Pauline Patak

- 08.04.76 Geburt in Sunndalsöra / Norwegen
- 8/82-7/86 Grundschule (Herzogenrath, Aachen und Sunndalsöra/Norwegen)
- 8/86-6/95 Besuch des Städt. Gymnasiums am Poth in Düsseldorf-Gerresheim
Abitur: 07.06.95
- 4/96 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine
Universität, Düsseldorf
- 9/99-3/01 Doktorarbeit im Labor von Prof. Dr. Dr. H. Sies, Institut für
Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Thema: Induktion der Connexin43-Phosphorylierung durch Menadion
und die Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2
- 9/99-3/00 Kooperation von Prof. Dr. Dr. H. Sies, Institut für Physiologische
Chemie I, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf mit Prof. H.-W. Müller,
Institut für Neurobiologie, MNR-Klinik, Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf
Thema: Effekt von Selenoprotein P auf embryonale
Rattencortexneurone
- 10/01-9/02 Praktisches Jahr am King's College Hospital, Dpt. of Neurology,
London, U.K. und an den Universitätskliniken der Heinrich-Heine-
Universität, Düsseldorf
- 14.11.02 3. Staatsexamen

Anhang 2: Veröffentlichungen und Poster / Vorträge

Veröffentlichungen

Abdelmohsen, K., Patak, P., Gerber, A., Sies, H., Klotz, L.-O.
Quinone-induced signaling: from intra- to intercellular communication.
"Oxidants and Antioxidants in Biology", Feb. 6-9, 2003, Cadiz, Spain, Book
of Abstracts, p. 12.

Klotz, L.-O., Patak, P., Ale-Agha, N., Buchczyk, D.P., Abdelmohsen, K., Gerber, P.A.,
von Montfort, C., and Sies, H. (2002). 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K₃,
decreases gap junctional intercellular communication via activation of the epidermal
growth factor receptor / extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Res*
62, 4922-4928.

Patak, P., Buchczyk, D.P., Klotz, L.-O., and Sies, H. (2000). Loss of gap junctional
communication in a liver epithelial cell line is not mediated by phosphorylation of
connexins. *Biol Chem* **381**, S244 (Abstract).

Poster / Vorträge

Patak, P., Buchczyk, D.P., Klotz, L.-O., and Sies, H.: *Loss of gap junctional
intercellular communication is not mediated by phosphorylation of connexins.*
„Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, 10-13. Okt
2000, München

Patak, P.: *Investigation of selenoprotein P as a neurotrophic factor.* „Research
Meeting Krickenbeck II“, 11. Dezember 1999, Düsseldorf

Patak, P.: *Menadion: Induktion der Connexin-Phosphorylierung.* „Krickenbeck
Meeting III“, 13. Juni 2001, Akademie Schloss Krickenbeck