

**Modulation der interzellulären Kommunikation in
Säugerzellen durch Hemmung von Cdc25: zur Bedeutung
von mitogen-aktivierten Proteinkinasen und reaktiven
Sauerstoffspezies**

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ira Melchheier

aus Koblenz

**Düsseldorf
2004**

**Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Referent: PD. Dr. Lars-Oliver Klotz

Korreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Mai 2004

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
cAMP	Zyklisches Adenosin-3'5'-Monophosphat
Cdc25	Cell division cycle DSP 25
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
Cx43	Connexin43
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMNQ	2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSP	doppelt-spezifische Phosphatase
DTT	1,4-Dithiothreit
EGF	Epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase-1 und -2
FKS	Fötale Kälberserum
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MQ	Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon)
MTT	4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NQOR-1	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-1
PAA	Polyacrylamid
PSP	Protein-Serin-Phosphatase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 MAP-Kinase-Signalkaskaden	6
1.1.1 Der EGF-Rezeptor	6
1.1.2 Die Ras/MAPK- Signalkaskade	7
1.1.3 Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2	7
1.2 Connexin 43 und Zell-Zell-Kommunikation	9
1.3 Struktur und Wirkung von 1,4-Naphthochinonderivaten	10
1.4 Die doppelt-spezifischen Phosphatasen der Cdc25-Familie	11
1.5 Der Zellzyklus	12
1.6 Ziele der Arbeit	14

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien	15
2.2 Zellkultur	15
2.3. Methoden	15
2.3.1 UVA-Behandlung von WB-F344-Zellen	15
2.3.2 Behandlung von WB-F344-Zellen mit Chinonen	16
2.3.3 Viabilität von WB-F344-Zellen (MTT-Test)	16
2.3.4 Proteinbestimmung	16
2.3.5 Gelelektrophorese und Immunchemische Methodik	17
2.3.5.1 Aufbereitung von Proben	17
2.3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrotransfer	17
2.3.5.3 Immunanfärbung (Western-Analyse)	18
2.3.5.4 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)	18
2.3.6 ELISA-Analyse (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	18
2.3.7 Immunhistochemischer Nachweis von Connexin43	19
2.3.8. Kommunikationsassay (Mikroinjektion)	19
2.3.9 Facs-Analyse (Fluorescent-assisted cell sorting)	20
2.3.10 Antisense-DNA-Behandlung	20
2.3.11 Proliferationsbestimmung (BrdU-Assay)	21

3. Ergebnisse	
3.1 Aktivierung des EGFR und der ERK1/2-Signalkaskade durch NSC95397	22
3.1.1 Ermittlung der Behandlungskonzentration von NSC95397	22
3.1.2 Zytotoxizität von NSC95397	23
3.1.3 NSC95397-induzierte Aktivierung von ERK1/2	23
3.1.4 NSC95397-induzierte Aktivierung des EGFR	26
3.1.5 Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf die Zytotoxizität von NSC95397 und Menadion	26
3.2 Mechanismus der Aktivierung des EGFR durch NSC95397	29
3.2.1 UVA-induzierte Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade	29
3.2.2 Untersuchung zur Bedeutung der NAD(P)H:Chinon- Oxidoreduktase für Signaleffekte von NSC95397	30
3.2.2.1 Abbau von H ₂ O ₂ durch Katalase	31
3.2.2.2 Hemmung der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-1 (NQOR-1) durch Dicoumarol	32
3.2.2.3 Dicoumarol-abhängige Toxizität von NSC95397	33
3.2.3 Interaktion von NSC95397 mit der DSP Cdc25A	34
3.3. Einfluss der NSC95397-induzierten ERK1/2-Aktivierung auf die Zell-Zell-Kommunikation	35
3.3.1. Zell-Zell-Kommunikation nach NSC95397 Behandlung	36
3.3.2 Phosphorylierungsgrad von Cx43 nach NSC95397-Behandlung	36
3.4. NSC95397-induzierte Modulation des Zellzyklus	40
3.4.1 Proliferationsrate nach Behandlung mit NSC95397	40
3.4.2 Zellzyklus-Analyse nach Behandlung mit NSC95397	41
4. Diskussion	
4.1 Zytotoxizität und Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalweges durch NSC95397	44
4.2 Einfluss von NSC95397 auf den Zellzyklus	46
4.3 NSC95397-induzierte Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation	48
5. Zusammenfassung	51
6. Literaturverzeichnis	52

1. Einleitung

Das Empfangen und der Austausch von Informationen ist die Grundlage eines jeden lebenden Systems. Die Einzelzelle mehrzelliger Organismen ist in der Lage, auf Einflüsse von außen zu reagieren und Informationen mit ihren Nachbarzellen auszutauschen.

Damit Signale von außen ins Innere der Zelle gelangen können, muss zunächst die Zellmembran als äußere Begrenzung der Zelle überwunden werden. Die Passage durch die Zellmembran kann durch Diffusion, gerichteten Transport oder untereinander vernetzte Reaktionskaskaden ablaufen. An der Zelloberfläche befinden sich in die Membran integrierte Rezeptoren. Sie sind im Ruhezustand inaktiv und können durch Reize von außen aktiviert werden. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines Liganden nach dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“, d. h. die Bindung bestimmter Liganden an spezifische Rezeptoren. Die Bindung des Liganden initiiert so den Beginn des Informationsflusses. Der aktivierte Rezeptor veranlasst die Regulation bestimmter Proteine im Zytoplasma, die das Signal dann bis hin zum Zellkern weiterleiten können, wo Genregulationsprozesse in Gang gebracht werden. Diese Weiterleitung geschieht durch untereinander vernetzte Signaltransduktionskaskaden.

1.1 MAP-Kinase-Signalkaskaden

1.1.1 Der EGF-Rezeptor

Für die Kontrolle von Proteinfunktionen und die Signalübermittlung ist die Balance zwischen Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung essentiell. Während Phosphorylierung beispielsweise zu einer Aktivierung von Proteinen führen kann, sorgt Dephosphorylierung dafür, dass ein solches aktiviertes Protein wieder in den Ruhezustand übergehen kann. Proteinkinasen katalysieren hierbei Phosphorylierung und Proteinphosphatasen die Dephosphorylierung.

Ein Prototyp der an der Zellmembran lokalisierten Rezeptor-Tyrosinkinase ist der EGF-Rezeptor. Er wird in zahlreichen Geweben exprimiert, und seine Aktivierung setzt eine Vielzahl von Signalwegen in Gang, die sich untereinander kreuzen und überlappen können und so im Endeffekt zur Modulation von Genexpression, Zellteilung, Differenzierung, Zellbeweglichkeit und Apoptose beitragen.

Der EGF-Rezeptor, ein 170 kDa großes Glykoprotein, besteht aus zwei glykosylierten, cysteinreichen extrazellulären Domänen (EZD), welche die Liganden-bindende Region flankieren (Schlessinger und Ullrich, 1992), einer hydrophoben transmembranen Domäne (TMD) und einer katalytischen, intrazellulären Domäne (IZD). Seine 621 AS große EZD ist

für die Ligandenerkennung verantwortlich. Die aus 23 AS bestehende TMD verankert das Protein in der Zellmembran und stellt das Bindestück mit der aus 542 AS bestehenden IZD dar, welche Tyrosinkinase-Aktivität aufweist.

Die Tyrosinkinase des EGF-Rezeptor, spielt eine wichtige Rolle bei der zytosolischen Signalübertragung, die durch Dimerisierung des Rezeptors und nachfolgende Auto-phosphorylierung in trans initiiert wird. Die phosphorylierten Tyrosinkinasen rekrutieren anschließend intrazelluläre Adapterproteine wie beispielsweise Grb2. Grb2 verfügt für diese Bindung an den EGF-Rezeptor über eine SH2 (Src-Homologie)-Domäne (Lowenstein et al., 1992).

1.1.2 Die Ras/ERK- Signalkaskade

Grb2 ist konstitutiv an den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor SOS gebunden und normalerweise im Zytosol lokalisiert. Ras ist ein in der Membran verankertes G-Protein, das in der inaktiven GDP- und der aktiven GTP-gebundenen Form existiert. Die Bildung des aktiven, GTP-gebundenen Ras erfolgt durch die Bindung an SOS oder einen anderen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (Adjei, 2001). Die Relokalisierung des Grb/SOS-Komplexes an die Zellmembran, durch Bindung an den phosphorylierten EGF-Rezeptor, führt zu einer Bindung zwischen SOS und Ras. Dies löst einen Austausch von Ras-gebundenem GDP durch GTP aus und aktiviert somit Ras.

GTP-Ras rekrutiert die Ser/Thr-Kinase Raf in die Nähe der Zellmembran und aktiviert diese (Hallberg et al., 1994; Stokoe et al., 1994). Einmal aktiviert, phosphoryliert Raf die doppelt-spezifischen Kinasen MEK1 und MEK2, durch die dann die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1 und ERK2, ebenfalls Ser/Thr-Kinasen, aktiviert werden (Leervers et al., 1994). Diese Aktivierung von ERK1/2 hat einen inhibitorischen Effekt auf den Grb2-SOS-Komplex, infolgedessen sich Grb2 von SOS löst und die Aktivierung von Ras beendet (Langlois et al., 1995).

Für die MAPK ERK1 und ERK2 fungieren also MEK1/2 als MAPK-Kinasen (MAPKK) und Raf als MAPKK-Kinase (MAPKKK).

Ras aktiviert neben Raf auch weitere Signalmoleküle, wie beispielsweise die Phosphoinositid-3-Kinase, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

1.1.3 Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2

ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa) werden über den beschriebenen Signalweg durch Stimulation von Zellen mit Mitogenen, wie den Wachstumsfaktoren EGF und PDGF, aktiviert. Daneben führen auch Vitamin K₃ (Menadion), H₂O₂, UV-Licht oder Phorbolster zu

einer Aktivierung von ERK1/2 (Osada et al., 2001; Peus et al., 1999; Stevenson et al., 1994;). Diese Aktivierung reguliert, abhängig von ihrer Dauer und Stärke (Roovers & Assoian, 2000), eine Vielzahl zellulärer Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Zelltod.

Für die vollständige Aktivierung von ERK1/2 ist die Phosphorylierung sowohl des Threoninrestes 183 als auch des Tyrosin-Restes 185 erforderlich (Ray & Sturgill, 1988).

Die Phosphorylierung von ERK1/2 führt zu ihrer schnellen Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und somit deren Aktivität regulieren kann (Treisman, 1996). Es ist weiterhin bekannt, dass ERK1/2 das Membranprotein Connexin43 (Cx43), welches eine entscheidende Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation spielt, phosphoryliert und somit auch direkten Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation nimmt (Warn-Cramer et al., 1998) (Abb. 1.1).

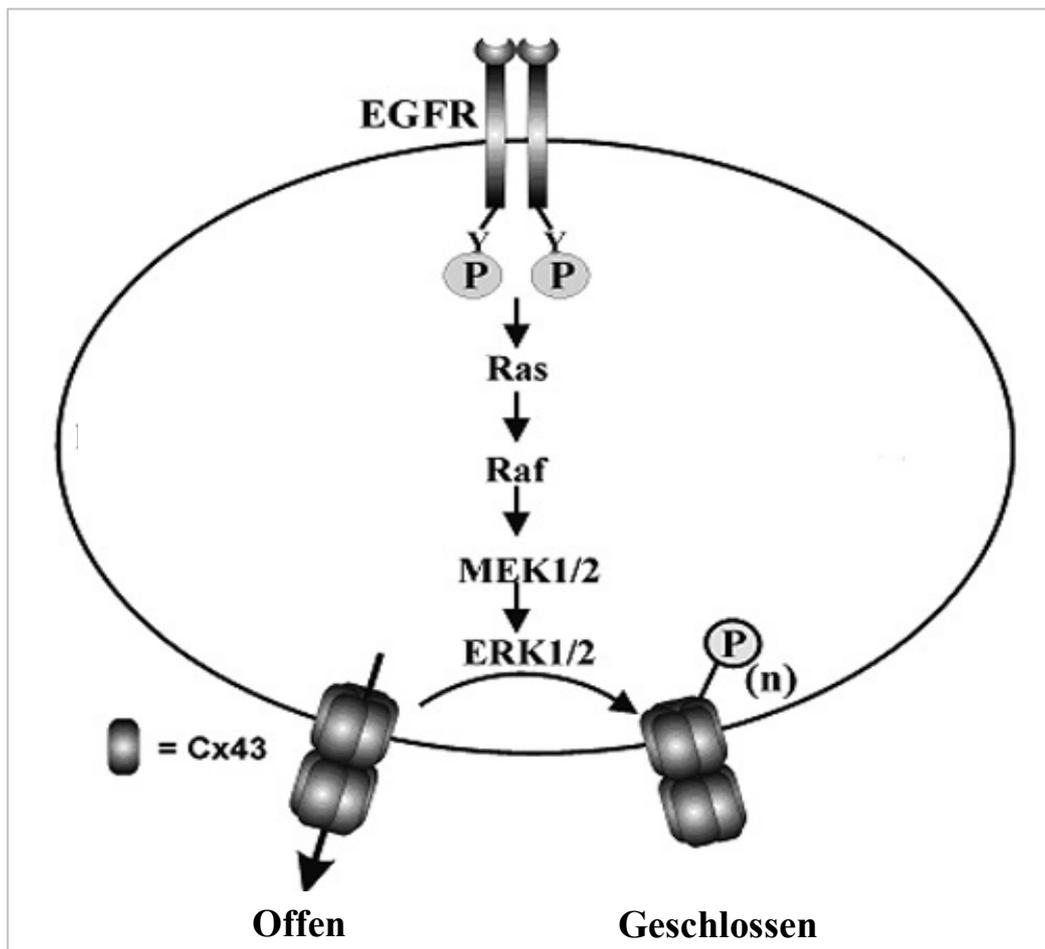


Abb. 1.1. Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalkaskade

Schematische Darstellung der EGFR-ERK1/2 Signalkaskade und der Regulation der interzellulären Kommunikation über Connexin43. (Erläuterungen siehe Text)

1.2 Connexin 43 und Zell-Zell-Kommunikation

Cx43 ist ein Membranprotein von 43 kDa und gehört zur Familie der Connexine, von denen mittlerweile zirka 20 verschiedene Mitglieder beschrieben sind. Sechs dieser Proteine, die nach ihren Molekulargewichten benannt sind, bilden jeweils ein Connexon. Durch Interaktion zweier Connexone werden die Zytoplasmen zweier benachbarter Zellen miteinander verbunden, wozu jede der verbundenen Zellen ein Connexon stellt. Eine der Hauptaufgaben der dadurch gebildeten Zell-Zell-Kanäle (mehrere solcher Kanäle bilden die „Gap Junctions“), ist die Regulierung von Proliferations- und Differenzierungsprozessen (Krutovskikh & Yamasaki, 1997). Diese findet durch den Austausch von Ionen und niedermolekularen Stoffen von bis zu 1 kDa statt (Willecke et al., 2002).

Alle Connexine zeigen eine ähnliche Membrantopologie, mit einem intrazellulären Amino- und Carboxyterminus und 4 Transmembrandomänen. Während die vier Transmembranbereiche und die extrazellulären Schleifen hochkonserviert sind, zeigt sich bei der intrazellulären Schleife und dem Carboxyterminus eine hohe Diversität unter den einzelnen Connexinen. Der Aminoterminus weist bei allen bekannten Connexinen die gleiche Länge auf (Simon & Goodenough, 1998; Trosko & Ruch, 1998).

Während eine basale Phosphorylierung der Connexine für den Zusammenbau der Zell-Zell-Kanäle und der Aktivierung der Zell-Zell-Kommunikation benötigt wird, führt eine Hyperphosphorylierung des Carboxyterminus zu ihrer Hemmung (Musil et al., 1990). Für die MAPK ERK1/2 ist bekannt, dass sie Cx43 an drei verschiedenen Serinresten (Ser255, Ser279, Ser282) phosphorylieren und so die Zell-Zell-Kommunikation beeinflussen können (Warn-Cramer et al., 1998) (Abb1.2).

Connexine haben in der Zelle eine Halbwertszeit von zwei bis fünf Stunden. Die wichtigsten beschriebenen Faktoren, die auf die interzelluläre Kommunikation Einfluss nehmen, sind der pH-Wert, dessen Verschiebung ins Saure die Zell-Zell-Kommunikation vermindert (Spray et al., 1985), Calcium, dessen erhöhte Konzentration die Kommunikation vermindert bzw. in höheren Konzentrationen sogar komplett hemmt (Bruzzone et al., 1996) und cAMP, das in Abhängigkeit vom Gewebe und Connexintyp sowohl eine Steigerung als auch eine Hemmung der Kommunikation hervorrufen kann (Hotz-Wagenblatt et al., 1993).

Des Weiteren findet eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von Cx43 und der Zell-Zell-Kommunikation im Verlauf des Zellzyklus statt. So weisen mitotisch aktive Zellen eine zusätzliche hyperphosphorylierte Cx43-Form auf und stellen die Kommunikation mit benachbarten Zellen komplett ein (Lampe et al., 1998).

Neben den bereits erwähnten Faktoren führt die Exposition der Zellen mit Tumorpromotoren (Phorbol ester, Lindan, DDT), Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF) und Vitamin-K₃ (Menadion), sowie die Expression von Onkogenen (ras, raf, src) zu einer Inhibition der Zell-Zell-Kommunikation (Trosko & Ruch 1998; Hu et al., 1995; Klotz et al., 2002).

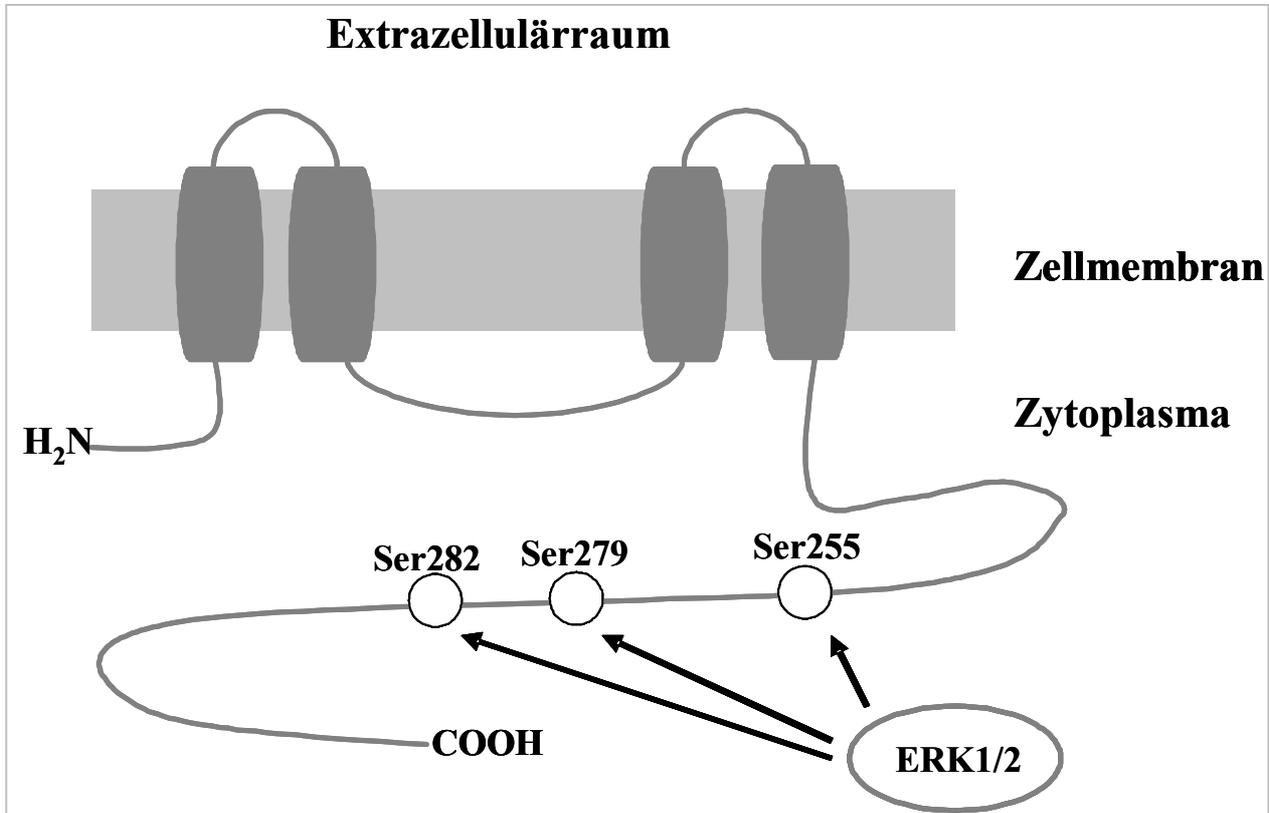


Abb.1.2: Membrantopologie von Cx43

Schematische Darstellung der Membrantopologie und der durch ERK1/2 phosphorylierten Serinreste von Connexin 43. (Erläuterung siehe Text)

1.3 Struktur und Wirkung von 1,4-Naphthochinonderivaten

Die Vitamin K-Familie besitzt ein 1,4-Naphthochinon-Grundgerüst. Ihre natürlichen Vertreter sind Vitamin K₁ (Phytomenadion) und Vitamin K₂ (Menachinon). Vitamin K₁ und K₂ agieren als Kofaktoren für die γ -Glutamylcarboxylase (Suttie, 1993).

Der wohl prominenteste synthetisch hergestellte Vertreter dieser Familie ist das Vitamin K₃ (Menadion), das als Modellchinon in der Zellkultur eingesetzt wird und ein hohes Potential zur Wachstumsinhibition aufweist (Prasad et al., 1981; Wu et al., 1993; Wang et al., 1995). Diese inhibitorischen Effekte werden sowohl durch Sulfhydryl-Arylierung (Gant et al., 1988) als auch durch oxidativen Stress, vermittelt über Redox-Cycling, hervorgerufen (Ross et al., 1986) und korrelieren mit der Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2 (Osada et al., 2001). Für den Einsatz in der Krebstherapie eignet sich Menadion, das einen starken Antitumoreffekt

bei Nagetier-, und Humantumoren aufweist, jedoch nur bedingt, da es stark zelltoxisch ist und Nebenwirkungen wie Kardiotoxizität und Anämien hat (Carr et al. 2002; Tzeng et al., 1992), während Vitamin K₁ und Vitamin K₂ nur in sehr hohen Konzentrationen (>100mM) in der Lage sind, Zellwachstum zu inhibieren (Bouzahzah et al., 1995; Wang et al., 1995).

Aufgrund seines wachstumsinhibitorischen Effekts auf Krebszellen diente die Struktur von Menadion als Ausgangspunkt für die Synthese zahlreicher Analoga, die bezüglich ihrer Zytotoxizität und ihren Einfluss auf den Zellzyklus untersucht wurden. Mit NSC95397 (2,3-bis[(2-Hydroxyethyl)thio]-1,4-naphthochinon) fand sich ein Naphthochinonderivat, das neben einem hohen Potential zur Hemmung von Krebszellwachstum (Lazo et al., 2002), eine hohe Selektivität in der Hemmung der DSP der Cdc25-Familie aufwies.

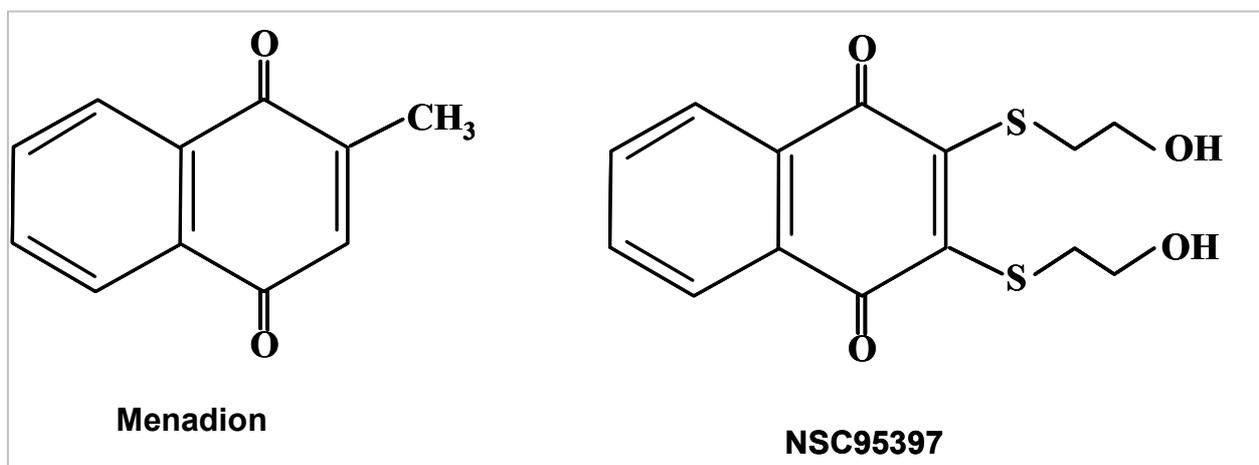


Abb. 1.3.: Chemische Struktur von Menadion und NSC95397

1.4 Die doppelt-spezifischen Phosphatasen der Cdc25-Familie

Proteinphosphatasen werden in zwei Klassen unterteilt, die Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen (PSPs) und die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs). Die Klasse der PTPs wird nochmals in vier Familien unterteilt, wobei nur die Tyrosin-spezifischen und die niedermolekularen Proteinphosphatasen ausschließlich Phosphotyrosine hydrolysieren. Dagegen gehören die Phosphatasen der VHR- und Cdc25-Familie zu den doppelt-spezifischen Phosphatasen (DSP), die neben den Phosphotyrosinen auch Phosphoserine und Phosphothreonine hydrolysieren oder dephosphorylieren können (Hunter, 1995).

Die PSPs unterscheiden sich von den PTPs vor allem durch die Struktur und den Katalysemechanismus. Während die PSPs die Hydrolyse der Phosphosäureester mit Hilfe von Metallionen als Kofaktoren in einem einstufigen Mechanismus katalysieren, findet die Reaktion bei den PTPs über ein Phosphocystein als Intermediat in einem zweistufigen Mechanismus statt. Das aktive Zentrum ist bei allen PTPs daher auch ähnlich und enthält ein

Cys-(X)₅-Arg-Motiv (Zhang et al., 1994; Eckstein et al., 1996). Bis auf diese Sequenz hat Cdc25 allerdings keine Ähnlichkeit mit anderen Phosphatasen und stellt eine unabhängige Familie dar (Fauman et al., 1998).

Die doppelt-spezifischen Proteinphosphatasen der Cdc25-Familie haben essentielle Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus. In Säugerzellen konnten drei homologe Cdc25-Mitglieder identifiziert werden: Cdc25A, B und C (Sadhu et al., 1990; Millar et al., 1991; Nagata et al., 1991). Die Cdc25-Mitglieder aktivieren verschiedene Zellzyklus-Kinasen durch Dephosphorylierung inhibitorischer Phosphotyrosine (Nilson & Hoffmann, 2000). Hierbei ist Cdc25A für den Eintritt in die S-Phase durch Aktivierung des Cdk2/CyklinE-Komplexes, verantwortlich (Jinno et al., 1994) und spielt möglicherweise auch beim Eintritt in die Mitose eine Rolle (Mailand et al., 2002). Sowohl Cdc25B als auch Cdc25C sind Regulatoren des G2/M-Übergangs.

Des Weiteren gibt es verstärkte Hinweise darauf, dass Cdc25A und B an der Entstehung vieler Krebserkrankungen beteiligt sind. Eine gesteigerte Expression von Cdc25A und/oder Cdc25B bei verschiedenen menschlichen Krebsarten konnte gezeigt werden (Galaktionov et al., 1995; Gasparotto et al., 1997; Hernandez et al., 2001).

1.5 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein komplexer Prozess, der Wachstum und Proliferation eukaryotischer Zellen reguliert und damit an Organentwicklung und der Entstehung von Krankheiten wie beispielsweise Krebs beteiligt ist. Er gliedert sich in die G1- (engl.: gap), S- (Synthese), G2- und die M-Phase (Mitose), welche die Zellverdopplung abschließt. Weiterhin existiert eine G0-Phase, in der die Zellen zwar potentiell teilungsfähig sind, sich aber in einem Ruhestadium befinden. Gründe für den Übergang in die G0-Phase sind beispielsweise das Fehlen von Wachstumsfaktoren, Nährstoffmangel, oder Kontaktinhibition durch andere Zellen. Stimulierte Zellen verlassen die G0-Phase und treten in die G1-Phase ein, in der sich die Zelle auf die DNA-Synthese vorbereitet. Am Ende der G1-Phase muss ein erster Restriktionspunkt überschritten werden, nach dem ein Abbruch des angefangenen Zellzyklus nicht mehr möglich ist. Anschließend geht die Zelle in die S-Phase über, in der die DNA repliziert wird. In der folgenden G2-Phase wird die Zelle auf die Mitose vorbereitet, wobei am 2. Restriktionspunkt die Integrität der replizierten DNA vor der Chromosomentrennung überprüft wird. In der M-Phase findet die eigentliche Zellteilung statt (Alberts, 1995).

Der geregelte Ablauf des Zellzyklus wird über ein System aus Cyklinen und Cyklin-abhängigen Kinasen (Cdk; engl: cyclin-dependent kinase) in Form von Cdk/Cyklin-

Komplexen gesteuert. Cdks, von denen in Säugerzellen mindestens 7 beschrieben sind (Pines, 1995), sind Serin/Threonin-Kinasen, die an spezifischen Punkten des Zellzyklus aktiviert werden. Ein Großteil ihrer Regulation verläuft über ihren Phosphorylierungsstatus. Als Aktivatoren dienen neben den Cyklinen die Cdc25-Phosphatasen und der Cdk7/Cyklin H-Komplex. So erfolgt beispielsweise die Aktivierung von Cdk1 durch eine Dephosphorylierung von Thr 14 und Tyr 15 durch die Cdc25-Phosphatasen (Berry & Gould, 1996). Hemmung der Cdks erfolgt entweder durch die Phosphorylierung von Thr14/Tyr15 (für Cdk1), Dephosphorylierung von Thr16 (für Cdk1), Dissoziation des Cyklins aus dem Cdk/Cyklin-Komplex oder durch Bindung von Cdk-Inhibitoren der p21/p27 bzw. der p16^{INK}-Familien (Xiong et al., 1993; Serrano, 1993; Gu, 1993).

Zu ihrer Aktivierung bilden die Cdks einen Komplex mit Cyklinen, die zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus gebildet und wieder proteolytisch abgebaut werden (Chun 1996). Cdks regulieren die Übergänge im Zellzyklus und sichern, dass jede Phase vor dem Beginn der nächsten Phase vollendet ist (Hartwell, 1994; Nasmyth, 1996).

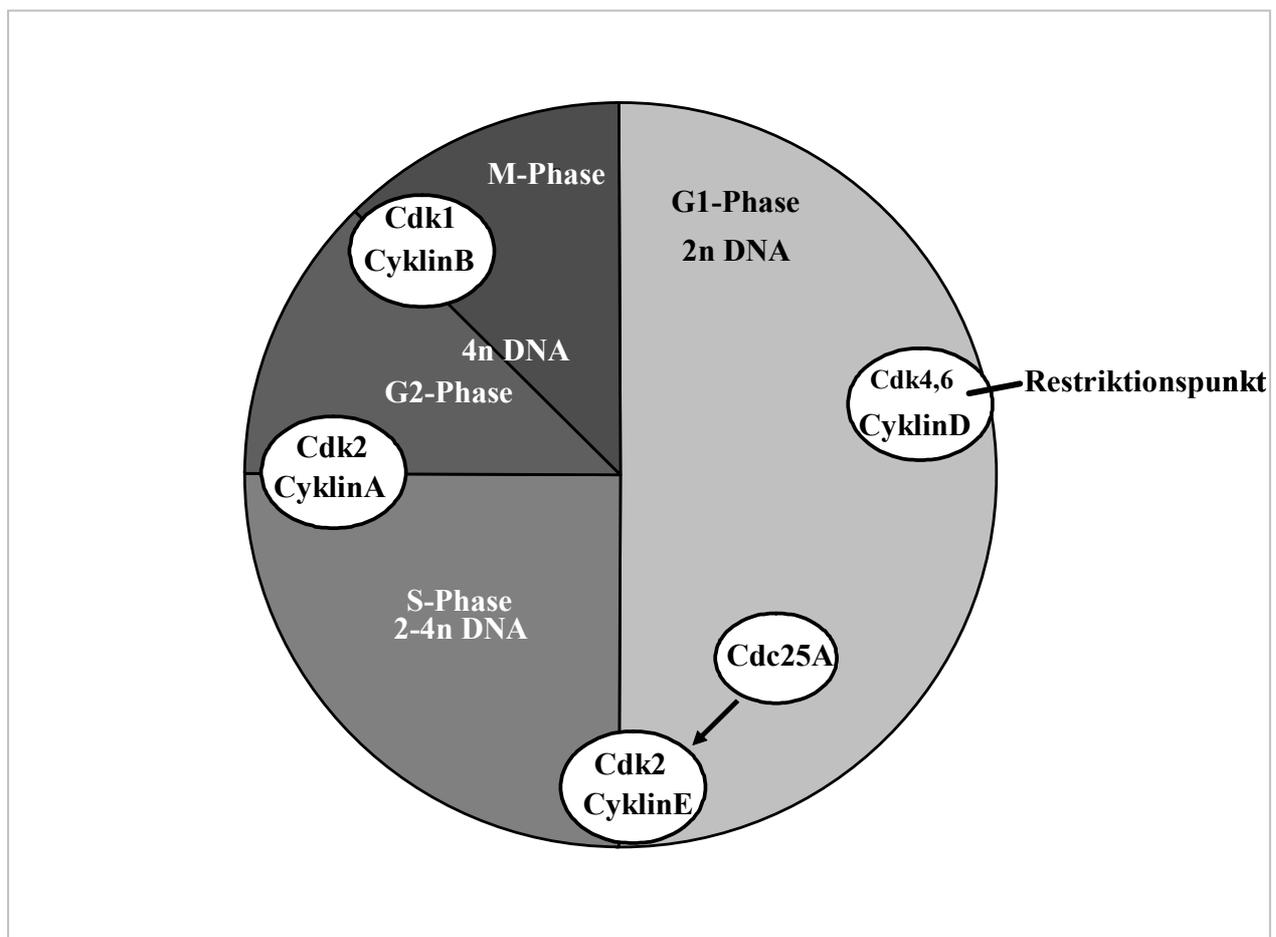


Abb.1.4: Schematische Darstellung des Zellzyklus: Cdc25A reguliert den Übergang G1-S-Phase durch aktivierende Dephosphorylierung von Cdk2.

1.6 Ziele der Arbeit

NSC95397 ist ein Naphthochinonderivat, das die für die Regulation des Zellzyklus essentiellen Cdc25-Phosphatasen hemmt. Solche Phosphatasen sind attraktive Zielstrukturen für auf Hemmung des Krebszellwachstums basierende Krebstherapie.

Da es als Chinon zum einen als Redox-Cycler wirken kann und zudem, da es sich um ein Naphthochinon handelt, in Analogie zu Menadion eine Stimulation EGFR-abhängiger Signalkaskaden möglich ist, stellen sich folgende Fragen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

- 1.) Führt die Behandlung von Säugerzellen mit NSC95397 zur Aktivierung von EGFR und EGFR-abhängiger Signalkaskaden, die in der Regel zur Steigerung der Proliferation führen?
- 2.) Welche Wirkung hat NSC95397 auf den Zellzyklus und wie verhält sich dies zu den Ergebnissen aus 1.)?
- 3.) Kann NSC95397 die Zell-Zell-Kommunikation, die sowohl Proliferation als auch Entartung von Zellen beeinflusst, modulieren?
- 4.) Welche Mechanismen liegen der Wirkung von NSC95397 zugrunde?

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Die verwendeten Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q Anlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Die benutzten Primärantikörper wurden wie an jeweiliger Stelle nachfolgend angegeben bezogen. Sekundärantikörper stammten von Sigma (Deisenhofen), Molecular Probes (Göttingen) und ICN (Costa Mesa, CA, USA).

2.2 Zellkultur

WB-F344 Rattenleberepithelzellen wurden von Dr. James E. Trosko, East Lansing, MI, USA, bezogen und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplementiert mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS; Greiner, Frickenhausen), L-Glutamin (2 mM), Streptomycin (20 mg/l) und Penicillin (20000 IU/l) kultiviert.

Die Zellen wurden in 600 mL-Kulturflaschen in 30 mL Medium angezogen und bei einer Konfluenz von 80%-100% trypsiniert und auf die entsprechend benötigte Anzahl von Zellkulturflaschen bzw. -gefäßen überführt.

2.3. Methoden

2.3.1 UVA-Behandlung von WB-F344-Zellen

WB-F344-Zellen wurden in Vollmedium bis zu zirka 90% Konfluenz in 35 mm-Zellkultur-schalen herangezogen. Vor der Behandlung wurden sie für 24 h in 0%-Medium synchronisiert. Die Bestrahlung mit UVA-Licht (UVA700, Waldmann Lichttechnik, Villingen) erfolgte mit einer Dosis von 30 J/cm² in PBS, Riboflavin-Lösung, oder Nährmedium verschiedener Hersteller und Supplementierung (Mahns et al, 2003). Nach Bestrahlung wurden die Zellen 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend für eine Western-Analyse wie unten beschrieben vorbereitet.

Für die Behandlung der Zellen mit aktiver oder inaktiver (15 min, 95°C) Katalase (40U/ml) wurde eine Präinkubation mit dem Enzym für 1 h bei 37°C vorgenommen. Zellfreies Medium wurde bestrahlt und im Anschluß an die Bestrahlung direkt auf die präinkubierten Zellen transferiert. Nach einer Inkubation von 15 min wurden die Zellen für eine Western-Analyse vorbereitet.

2.3.2 Behandlung von WB-F344-Zellen mit Chinonen

WB-F344-Zellen wurden, je nach anschließend durchgeführter Methode, in 6-well-, 24-well-, 35 mm- oder 60 mm-Zellkulturschalen bis zu zirka 90% Konfluenz in Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in 0%-Nährmedium synchronisiert.

Bei der Behandlung wurden die Zellen 15 min bei 37°C mit DMSO (äquivalente Volumina zu den eingesetzten Chinonen), als Lösungsmittelkontrolle, 10µM NSC95397 (in DMSO; Biotrend Chemikalien, Köln) bzw. 50µM Menadion, jeweils in FKS-freiem Medium, inkubiert. Bei zusätzlicher Verwendung der Inhibitoren des EGFR AG1478 (10µM), bzw. von MEK1/2, U0126 (10µM) oder PD98059 (50µM) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), erfolgte vor der Behandlung der Zellen eine 30 min Präinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor, der auch während der Behandlung in gleicher Konzentration eingesetzt wurde. Die Behandlung der Proben mit 100 µM Dicoumarol und 100µM DMNQ (Calbiochem, San Diego, CA, USA) erfolgte für 60 min bei 37°C. Nach der Behandlung wurden die Zellen gewaschen und anschließend für eine Western-Analyse, eine MTT-Analyse, eine FACS-Analyse bzw. einen Proliferationsassay vorbereitet.

Für die Behandlung mit Katalase wurden die Zellen wie unter 2.3.1 beschrieben vorbehandelt.

2.3.3 Viabilität von WB-F344-Zellen (MTT-Test)

Vitale Zellen vermögen MTT (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) mittels mitochondrialer und mikrosomaler Dehydrogenaseaktivität (Levitz und Diamond, 1985) in das entsprechende blaue, schwerlösliche Formazan umzuwandeln. Zur Messung der Viabilität wurden Zellen in 24-well Kulturschalen bis zur Konfluenz herangezogen, entsprechend behandelt, nach 15 min bzw. 24 h gewaschen und mit 200 µL 0,5 mg/mL MTT (in FKS-freiem Medium) für etwa 2 h im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle diente MTT-Lösung in Medium. Bei ausreichender Blaufärbung der Positivkontrolle wurde durch Zusatz von 200 µL Lysislösung (0,1 % (w/v) HCl; 10 % (w/v) SDS) die Reaktion gestoppt und die Zellen lysiert. Die Ansätze wurden im Brutschrank inkubiert, bis ausgefallenes Formazan in Lösung gegangen war. Schließlich wurde die Extinktion bei 560 nm gemessen und zum Ausgleich von durch Präzipitate entstehender Absorption die Extinktion bei 690 nm abgezogen.

2.3.4 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen erfolgten auf Basis der 1976 entwickelten Methode nach Marion Bradford unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad, Protein Assay) gegen Standards aus Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers.

2.3.5 Gelelektrophorese und Immunchemische Methodik

2.3.5.1 Aufbereitung von Proben

Proteinextrakte von behandelten Säugerzellen wurden durch direkte Lyse der Zellen mit 2 x Probenpuffer hergestellt. Für eine 35 mm-Zellkulturschale wurden dabei 100 µL 2 x Probenpuffer (125 mM Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glycerin, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8 und jeweils frisch zugesetzt 100 mM DTT) verwendet. Nach Zugabe des Probenpuffers wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und durch Sonifizieren (20 s, halbmaximale Leistung) lysiert. Vor der Auftragung wurden die Proben 5 min auf 95°C erhitzt.

2.3.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrotransfer

Die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte wie beschrieben (Laemmli, 1970; (Towbin et al., 1979):

Trenngel (12 % Acrylamid): 4% (v/v) Sol 1; 2.5% (v/v) Sol 2; 3.5% (v/v) H₂O; 7x10⁻³% (v/v) APS; 7x10⁻⁴% (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED).

Sammelgel (4% Acrylamid): 1.34% (v/v) Sol 1; 3% (v/v) Sol 3; 5.66% (v/v) H₂O; 7.5x10⁻³% (v/v) APS; 7.5x10⁻⁴% (v/v) TEMED.

Zusammensetzung der einzelnen Lösungen: Sol 1: 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid; Sol 2: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 8.8. Sol 3: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 6.8. Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8.8; APS: 10-12% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Nach Elektrophorese wurden die Proteine im Gel auf eine Membran elektrotransferiert. Nach Elektrophorese wurde das zu blottende Gel kurz in Transferpuffer (25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,5) äquilibriert und zusammen mit in Gelgröße zurechtgeschnittenen und in Transferpuffer genäßten 3 mm-Blottingpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie in 100% Methanol aktivierter und anschließend in Transferpuffer genäßter PVDF-Membran (Hybond ECL, Amersham, Braunschweig) zum Blottingaufbau zusammengestellt. Zwei Blottingpapiere wurden luftblasenfrei auf die Anode gebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei weiteren Blottingpapieren. Der Elektrotransfer wurde bei ca. 60-100 mA je Minigel für 60-90 min (Richtwert: 0.8 mA/cm² für 1-2 h, die Spannung übersteigt hierbei keine 15 V) in einer Pharmacia-Multiphor-Kammer oder einer Semi-Dry-Blotting-Apperatur (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Zur Kontrolle auf erfolgreichen Transfer wurde die Membran nach der Proteinübertragung 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.

2.3.5.3 Immunanfärbung (Western-Analyse)

Auf den Elektrobplot 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 nun für 1 h bei RT in Blockierpuffer (5% (w/v) Magermilchpulver (BioRad, Hamburg) in TBST) geschwenkt, gefolgt von Inkubation mit 1:1000 bis 1:5000 in Blockierpuffer verdünntem primären Antikörper (über Nacht bei 4°C oder 2 h bei RT). Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 5-10 min bei RT) wurde für 1-2 h mit in Blockierpuffer verdünntem sekundären Antikörper (in der Regel 1: 5000 bis 1:10000) inkubiert.

Folgende Primäantikörper wurden verwendet:

Anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Anti-total-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); Anti-phospho-EGFR (Tyr1068) (Biosource, Solingen); Anti-total-EGFR (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY); Anti-Cdc25A (144) (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

2.3.5.4 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)

Zum Entfernen von Antikörpern von der PVDF-Membran zum Zwecke des Detektierens anderer Proteine mit neuen Antikörpern wurde die Membran für 30 min im Wasserbad bei 55°C in Stripping-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol; 2% (w/v) SDS; 62.5 mM Tris pH 6,8) geschwenkt. Danach wurde die Membran zunächst mit ausreichend Wasser und anschließend 2-3 Mal für ca. 10 min in großen Volumina von TBST bei RT gewaschen und mit dem Blockierungsschritt für die neue Immunanfärbung begonnen. Da mit dem Strippen auch geblottetes Protein verlorengeht, sollte zunächst immer das in vermutlich niedrigeren Mengen vorliegende Antigen nachgewiesen werden.

2.3.6 ELISA-Analyse (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Zellen wurden wie unter 2.3.2 beschrieben behandelt. Bei der anschließend durchgeführten ELISA-Analyse wurde der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 ermittelt. In einer weiteren Analyse wurde der Gesamtgehalt an ERK1/2 untersucht. Die Analysen erfolgten mit dem ERK1/2 (pTpY 185/187)- und dem ERK1/2 (total)-Kit der Fa. Biosource, Solingen, und ihre Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.3.7 Immunhistochemischer Nachweis von Connexin43

Nach der unter 2.3.2 beschriebenen Behandlung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und für 10 min mit kaltem Methanol (-20°C) fixiert. Danach wurde das Methanol

entfernt und die Zellen weitere zwei Mal mit PBS erneut gewaschen. Die Zellen wurden mit der Blockierlösung (3% Ziegennormalserum und 0,3% Triton X-100 in PBS) für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper (1:1500 in PBS mit 1% Ziegennormalserum) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten mit PBS wurden die fixierten Zellen mit einem Alexa 488-gekoppeltem anti-Kaninchen IgG-Sekundäranitkörper aus Ziege(1:800 in PBS) für 45 min bei 37°C inkubiert. Sie wurden erneut dreimal je 5 min mit PBS gewaschen und einer anschließenden DAPI-Färbung unterzogen (siehe unten). Abschließend wurden die Glasplättchen mit einem Tropfen Fluoromount (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) auf einem Objektträger fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Verwendet wurden folgende Primärantikörper: Anti-phospho-Connexin43 (Ser279/282), (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA); Anti-total-Connexin43, (Zymed, San Francisco, CA, USA).

Zum Anfärben von Zellkernen der WB-F344 Zellen wurden die Zellen vor dem Fixieren auf dem Objektträger mit ca. 1 ml DAPI-Lösung (0,5 mg/ml in H₂O) für 5 min bei RT Inkubiert und anschließend dreimal je 5 min mit PBS gewaschen.

2.3.8. Kommunikationsassay (Mikroinjektion)

Zellen wurden in 35mm-Zellkulturschalen zu zirka 90% Konfluenz in Vollmedium herangezogen. Sie wurden für 24 h mit einem FKS-freien Medium inkubiert, um die durch FKS erniedrigte Grundkommunikation wiederherzustellen und sie zu synchronisieren. Die Behandlung erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben.

Für die Bestimmung der Zell-Zell-Kommunikation wurden Mikroinjektionen des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow durchgeführt. Die Messung der ZZK erfolgte durch eine Gerätekombination aus einem axioverten Fluoreszenzmikroskop (Axiovert, Zeiss, Köln) Mikromanipulator (FemtoJet, Eppendorf, Hamburg) und Mikroinjektor (InjectMan, Eppendorf, Hamburg). 50 bis 200 Femtoliter einer 10 %igen Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow CH in 0,33 M LiCl wurden mittels Femtotips bei einem Druck von 50 hPa und bei einer Injektionsdauer von 0,5 Sek. intrazellulär in eine Zielzelle injiziert. Die angewendete Lucifer Yellow-Konzentration ist nicht zelltoxisch.

Das Prinzip der Farbstoff-Transfer-Tests beruht auf der Diffusion des injizierten Farbstoffes Lucifer Yellow über die Zell-Zell-Kanäle von der injizierten Zielzelle in die benachbarten Zellen. Dadurch lässt sich eine Aussage über den Kopplungsgrad des Zellenverbandes und den relativen Öffnungsgrad der Zellkanäle treffen. Aufgrund des niedrigen pK-Wertes der

beiden Sulfonsäuregruppen des Farbstoffes, die bei physiologischem pH-Wert ionisiert vorliegen, sind intakte Membranen für diesen wasserlöslichen Farbstoff impermeabel, so dass eine unspezifische Membrandiffusion ausgeschlossen wird. Die Anregungswellenlänge von Lucifer Yellow liegt bei 426 nm und das Emissionswellenlängenmaximum bei 540 nm.

Für die Messung der ZZK wurde bei jeder Testreihe pro Kulturschale jeweils in 10 zufällig ausgewählte Zellen der Farbstoff Lucifer Yellow injiziert. Die Anzahl der benachbarten, fluoreszierenden Zellen wurde ca. 1 min. nach der Injektion der Zielzelle ermittelt.

2.3.9 FACS-Analyse (Fluorescence-assisted cell sorting)

Zellen wurden in 60 mm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 50-60% in 3% FKS-Medium kultiviert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für 24 h in FKS-freies Medium überführt. Anschließend erfolgte ggf. eine Präinkubation mit AG1478 bzw. U0126 für 30 min, gefolgt von einer Koinkubation mit 10 μ M NSC95397 für 60 min. Nach der Behandlung wurden die Zellen weitere 24 h in Vollmedium kultiviert. In serumfreiem Medium gehaltene Kontrollzellen wurden stattdessen weitere 24 h in FKS-freiem Medium kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend für 7 min bei 37°C trypsinisiert. Das Trypsinieren wurde durch Zugabe von 1ml Vollmedium gestoppt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen 30 min in 70% Ethanol bei 4°C fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen 30 min bei 37°C mit 5 μ g/mL DNase-freier RNase (Roche, Mannheim) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Zugabe von 0,5mg/mL Propidiumiodid erfolgte unmittelbar vor der Messung. Für die Messung wurde das Gerät Facscalibur E1024 (Beckton-Dickinson, San Francisco, CA, USA) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm WinMDI2.8.

2.3.10 Antisense-DNA-Behandlung

Zum Ausschalten der Synthese von Proteinen über die Antisense-Technik transfiziert man Zellen mit kurzen Antisense-DNA-Stücken, die Sequenzen des für das Zielprotein codierenden Gens entsprechen. Diese Antisense-DNA hybridisiert mit der für das Zielprotein codierenden mRNA des Zielproteins und verhindert somit deren Translation.

Zellen wurden in 60 mm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 30-40% angezogen. Anschließend erfolgte eine Transfektion von 5 μ g Cdc25A-Antisense-DNA (5' AGC ACG TGA CGC GCC AAA CTG 3' mit Phosphothioat-Rückgrat, Thermo Electron GmbH, Ulm) bzw. Kontroll-Antisense-DNA (5'GGA GGA AGA TGA AGC AGG CTA 3' mit Phosphothioat-Rückgrat) pro Schale unter Verwendung von Superfect-Transfektionsreagenz (10 μ l) (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Abweichend von den Herstellerangaben wurden die Zellen ca. 16 h transfiziert und anschließend weitere 24 h in

Vollmedium kultiviert. Vor der Behandlung wurden die transfizierten Zellen weitere 24 h in FKS-freiem Medium kultiviert. Zur Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Transfektionsreagenz ohne DNA behandelt wurden.

Die Zellen wurden mit DMSO bzw. 1 μ M, 5 μ M oder 10 μ M NSC95397 für 15 min behandelt und nach Waschen mit PBS in 2x Probenpuffer lysiert. Es folgte eine Western-Analyse auf Cdc25A, phospho- und total-ERK1/2.

2.3.11 Proliferationsbestimmung (BrdU-Assay)

WB-F344-Zellen wurden in 6 well-Zellkulturschalen angezogen und wie unter 2.3.2 beschrieben behandelt.

Die Wachstumsrate von WB-F344-Zellen wurde mit Hilfe eines BrdU-Labeling-Kits (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Aktivierung des EGFR und der ERK1/2-Signalkaskade durch NSC95397

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Inhibitor der Cdc25-Familie, NSC95397, handelt es sich um ein 1,4-Naphthochinonderivat. Von zahlreichen 1,4-Naphthochinonen ist bekannt, dass sie Einfluss auf das Zellwachstum und die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden in der Zelle nehmen. Für das strukturell nah verwandte Menadion ist die Aktivierung des EGFR und der ERK1/2-Signalkaskade beschrieben (Klotz et al., 2002).

Die nachfolgend vorgestellten Untersuchungen sollten Aufschluss darüber erbringen, ob NSC95397 Einfluss auf EGFR-abhängige Signalkaskaden nimmt.

3.1.1 Ermittlung der Behandlungskonzentration von NSC95397

Zunächst sollte ermittelt werden, ob und in welcher Konzentration NSC95397 Einfluss auf die Aktivierung der Kinasen ERK1/2 nimmt. Hierfür wurden WB-F344-Zellen 15 bzw. 60 min mit Konzentrationen von 1-100 μ M NSC95397 behandelt. DMSO diente als Lösungsmittel- und Menadion als Positivkontrolle.

Wie in Abb. 3.1 dargestellt, zeigte sich bereits nach 15 min bei einer Behandlungskonzentration von 10 und 50 μ M NSC95397 eine deutliche ERK1/2-Aktivierung. Bei einer Konzentration von 100 μ M NSC95397 war keine Aktivierung mehr detektierbar. Menadion zeigte erwartungsgemäß ab einer Konzentration von 50 μ M eine Aktivierung der untersuchten Kinasen, während DMSO keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2 nahm. Die Gesamtmenge des Proteins blieb durch die Behandlung unbeeinflusst (ohne Abb.).

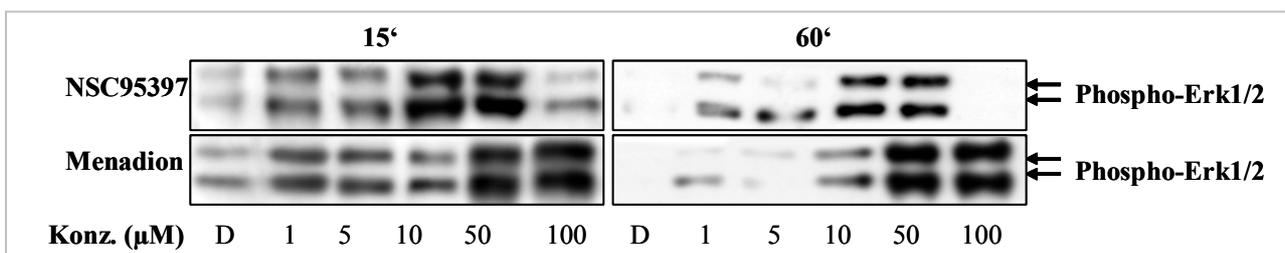


Abb 3.1: Konzentrationsabhängige Aktivierung von ERK1/2 durch NSC95397

Synchronisierte WB-F344-Zellen wurden 15 bzw. 60 min mit DMSO (D), 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M NSC95397 bzw. Menadion bei 37°C behandelt. Anschließend wurde die Aktivierung von ERK1/2 mit Hilfe einer Western-Analyse untersucht.

3.1.2 Zytotoxizität von NSC95397

Für die nachfolgenden Untersuchungen sollte die Zytotoxizität von NSC95397 in WB-F344-Zellen bestimmt werden. Die Zellen wurden für 60 min mit DMSO bzw. steigenden NSC95397-Konzentrationen (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einer MTT-Analyse unterzogen.

Es zeigte sich, dass die Toxizität mit steigender Konzentration von NSC95397 zunimmt. Während die Viabilität bei einer Konzentration von 10 μ M NSC95397 bei 65% liegt, fällt sie bei 25 μ M NSC95397 bereits auf 15% ab. Dementsprechend wurde für die nachfolgend beschriebenen Experimente eine Konzentration von 10 μ M NSC95397 eingesetzt (Abb. 3.2).

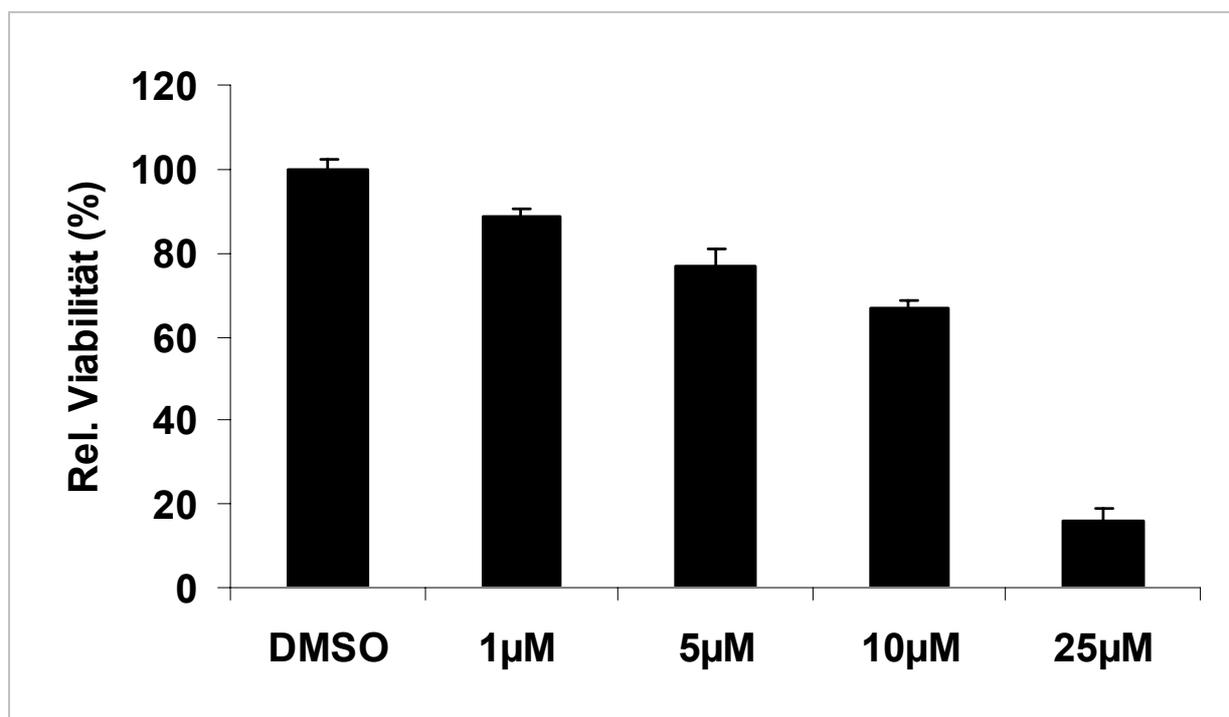


Abb. 3.2: Zytotoxizität in Abhängigkeit der NSC95397-Konzentration

Synchronisierte WB-F344-Zellen wurden 60 min mit DMSO, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M bzw. 25 μ M NSC95397 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität mit Hilfe eines MTT-Test untersucht. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen +/- SD.

3.1.3 NSC95397-induzierte Aktivierung von ERK1/2

ERK1/2 sind Teil einer Signalkaskade, die an der Membran der Zelle mit dem EGFR beginnt. Es sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von ERK1/2 durch NSC95397 über die Aktivierung des EGFR verläuft.

Synchronisierte WB-F344-Zellen wurden mit 10 μ M NSC95397 behandelt. Die Behandlung erfolgte zusätzlich mit Inhibitoren des EGFR, AG1478 (10 μ M), und der MAPKK MEK1/2, U0126 (10 μ M) sowie PD98059 (50 μ M).

Die Western-Analyse zeigte die erwartete Aktivierung von ERK1/2 durch NSC95397, die bei zusätzlicher Behandlung mit den drei Inhibitoren unterdrückt wurde (Abb. 3.3A).

Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurde eine ELISA-Analyse durchgeführt. Ausgehend vom Basalniveau zeigte sich eine 20fach erhöhte ERK1/2-Aktivierung nach Exposition der Zellen mit 10 μ M NSC95397. Diese Aktivierung wurde durch die zusätzliche Behandlung mit den Inhibitoren AG1478 und U0126 um ein 4faches und mit PD98059 um die Hälfte vermindert (Abb. 3.3B).

Bei der Behandlung der Zellen mit Menadion ist die Aktivierung von ERK1/2 mehr als 200fach höher als in nicht stimulierten Zellen. AG1478 führt zu einer 10fach geringeren, U0126 zu einer 100fach geringeren und PD98059 zu einer 3fach geringeren Aktivierung von ERK1/2 (Abb. 3.3C).

Für die Vermittlung von Wachstumssignalen ist nicht nur die Aktivierung von ERK1/2 sondern auch die Dauer dieser Aktivierung von Belang (Roovers & Assoian, 2000). Aus diesem Grund sollte ermittelt werden, wie lange die NSC95397-induzierte ERK1/2-Aktivierung detektierbar bleibt. WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO bzw. 10 μ M NSC95397 behandelt und anschließend, nach Waschen mit PBS, direkt bzw. nach einer Postinkubation (in FKS-freiem Medium) von 30, 60, 120, 240 und 360 min auf ihre ERK1/2-Aktivierung untersucht (Abb. 3.3D). Eine Aktivierung war über den gesamten untersuchten Zeitraum festzustellen.

Die Untersuchung der NSC95397-abhängigen ERK1/2-Aktivierung hat somit gezeigt, dass die Behandlung von WB-F344-Zellen mit NSC95397 und Menadion zu einer starken ERK1/2-Aktivierung führt, die sich sowohl auf Ebene des EGFR als auch auf Ebene von MEK1/2 unterdrücken lässt.

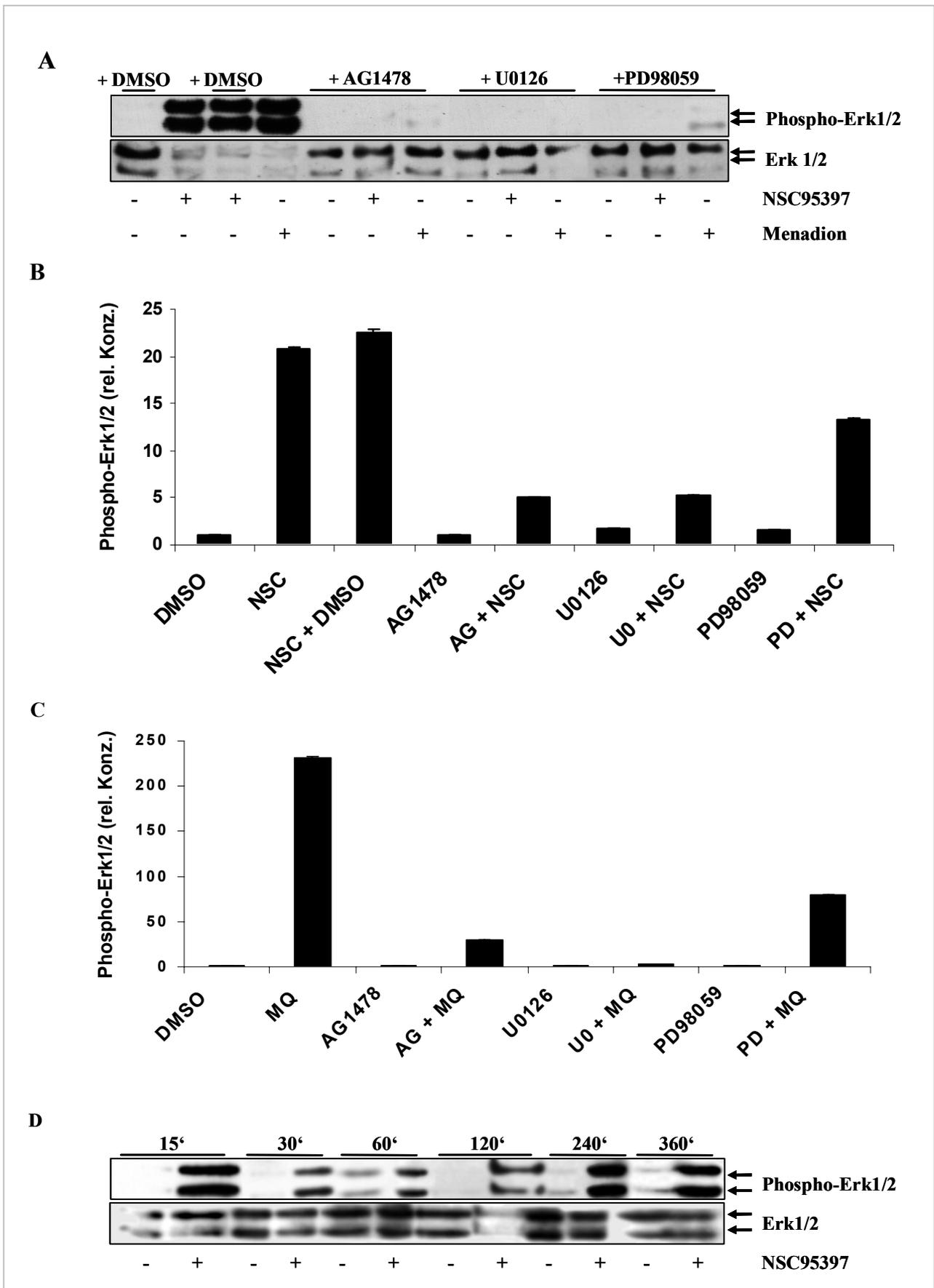


Abb. 3.3: Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade durch NSC95397

(A) WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO, NSC95937 (10 μ M) bzw. Menadion (50 μ M) +/- Prä- und Koinkubation des EGFR-Kinase-Inhibitors AG1478 (10 μ M) bzw. der MEK1/2-Inhibitoren U0126 (10 μ M) oder PD98059 (50 μ M) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde eine Westernblot-Analyse auf ERK1/2-Phosphorylierung und auf den Gesamtgehalt an ERK1/2 vorgenommen.

(B) Behandlung wie in (A) mit Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung im ELISA. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen +/- SD.

(C) WB-F344 -Zellen wurden 15 min mit DMSO bzw. Menadion (50 μ M) +/- Prä- und Koinkubation des EGFR-Kinase-Inhibitors AG1478 (10 μ M) bzw. der MAPKK-Inhibitoren U0126 (10 μ M) oder PD98059 (50 μ M) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde eine ELISA-Analyse auf ERK1/2-Phosphorylierung vorgenommen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen +/- SD.

(D) WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO bzw. 10 μ M NSC95397 behandelt. Anschließend wurde eine Postinkubation von 15-360 min vorgenommen und die Zellen auf ERK1/2-Aktivierung mittels Western-Analyse untersucht.

3.1.4 NSC95397-induzierte Aktivierung des EGFR

Tatsächlich verursachte die Behandlung der Zellen mit 10 μ M NSC95397 eine Aktivierung des EGFR, die durch eine gleichzeitige Behandlung mit dem Inhibitor AG1478 unterdrückt werden konnte. Die beiden MEK1/2-Inhibitoren U0126 und PD98059 hatten auf die Aktivierung des EGFR, da sie in der Kaskade erst unterhalb des EGFR wirksam werden, erwartungsgemäß keinen Einfluss (Abb.3.4).

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit NSC95397 eine Aktivierung der ERK1/2 Signalkaskade erzeugt, die bereits an der Zellmembran auf der Ebene des EGFR beginnt.

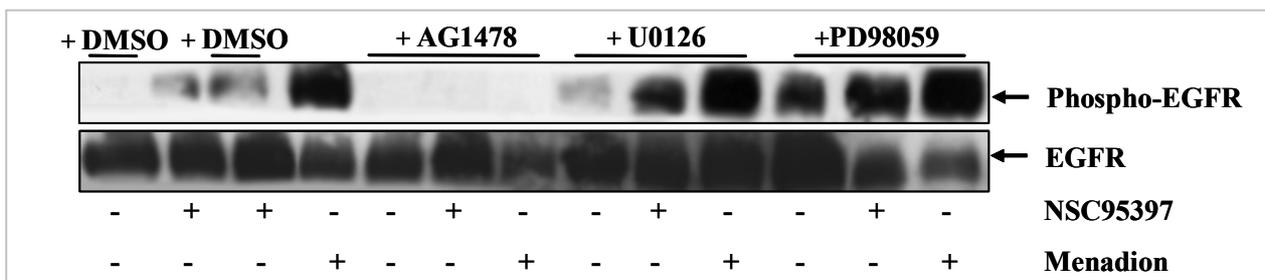


Abb. 3.4: NSC95397-induzierte EGFR-Aktivierung

WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO (Vehikelkontrolle), NSC95937 (10 μ M) bzw. Menadion (50 μ M) +/- Prä- und Koinkubation des EGFR-Kinase-Inhibitors AG1478 (10 μ M) bzw. der MEK1/2-Inhibitoren U0126 (10 μ M) oder PD98059 (50 μ M) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde eine Westernblot-Analyse auf EGFR-Phosphorylierung vorgenommen.

3.1.5 Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf die Zytotoxizität von NSC95397 und Menadion

Mit Hilfe einer MTT-Analyse sollte untersucht werden, ob die Inhibitoren AG1478, U0126 und PD98059 die Zytotoxizität der Chinone NSC95397 und Menadion beeinflussen.

WB-F344-Zellen wurden 15 min mit 10 μ M NSC95397 bzw. 50 μ M Menadion behandelt. Diese Behandlung erfolgte in Kombination mit einer Prä- und Koinkubation von 10 μ M AG1478, 10 μ M U0126 bzw. 50 μ M PD98059. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen direkt oder nach weiteren 24 h Inkubation in FKS-freiem Medium einer MTT-Analyse unterzogen.

Die Analyse zeigt deutlich, dass die Verwendung der Inhibitoren AG1478, U0126 und PD98059 allein zu keinem Zeitpunkt toxisch für die Zellen ist.

Bei Verwendung der Inhibitoren in Kombination mit NSC95397 zeigt sich eine generelle Steigerung der Zytotoxizität. Hierbei fällt auf, dass dieser Effekt bei Verwendung von U0126 und PD98059 nach der 15-minütigen Behandlung deutlich stärker ist als bei AG1478.

24 h nach der 15-minütigen Behandlung mit NSC95397 ist die messbare Viabilität der Zellen nach Behandlung auf 15-30% abgesunken. Hierbei ist zu bemerken, dass die Verwendung von U0126 mit NSC95397 die Zellen scheinbar weniger stark beeinflusst als die zusätzliche Verwendung der anderen beiden Inhibitoren (Abb3.5A). Möglicherweise wird diese erhöhte Toxizität durch eine Interaktion von NSC95397 mit AG1478 bzw. PD98059 hervorgerufen.

Bei der Verwendung von Menadion liegt die Viabilität nach 15 min bei zirka 30%. Anders als bei NSC95397 scheint die zusätzliche Behandlung mit den drei Inhibitoren diesen Effekt zu diesem Zeitpunkt deutlich zu mindern. Die Viabilität dieser Zellen liegt zwischen 65% und 97%. Nach 24 h ist bei allen Zellen, die mit Menadion behandelt wurden, nur noch eine Viabilität von 5% messbar (Abb.3.5B).

Das Experiment zeigt, dass sich die Zytotoxizität von NSC95397 und Menadion, besonders in Kombination mit den verwendeten Inhibitoren, deutlich unterscheiden. Während die Hemmung des EGFR und von MEK1/2 bei der 15-minütigen Behandlung mit Menadion eher zu einer Verminderung der Toxizität führt, wird diese bei NSC95397 hierdurch verstärkt. Somit scheint die Aktivierung des EGFR und von ERK1/2 im Fall von Menadion eine protektive Wirkung hervorzurufen, die bei NSC95397 nicht erzeugt wird. Dies deutet darauf hin, dass die Zytotoxizität beider Chinone auf unterschiedlichen Wirkmechanismen basiert.

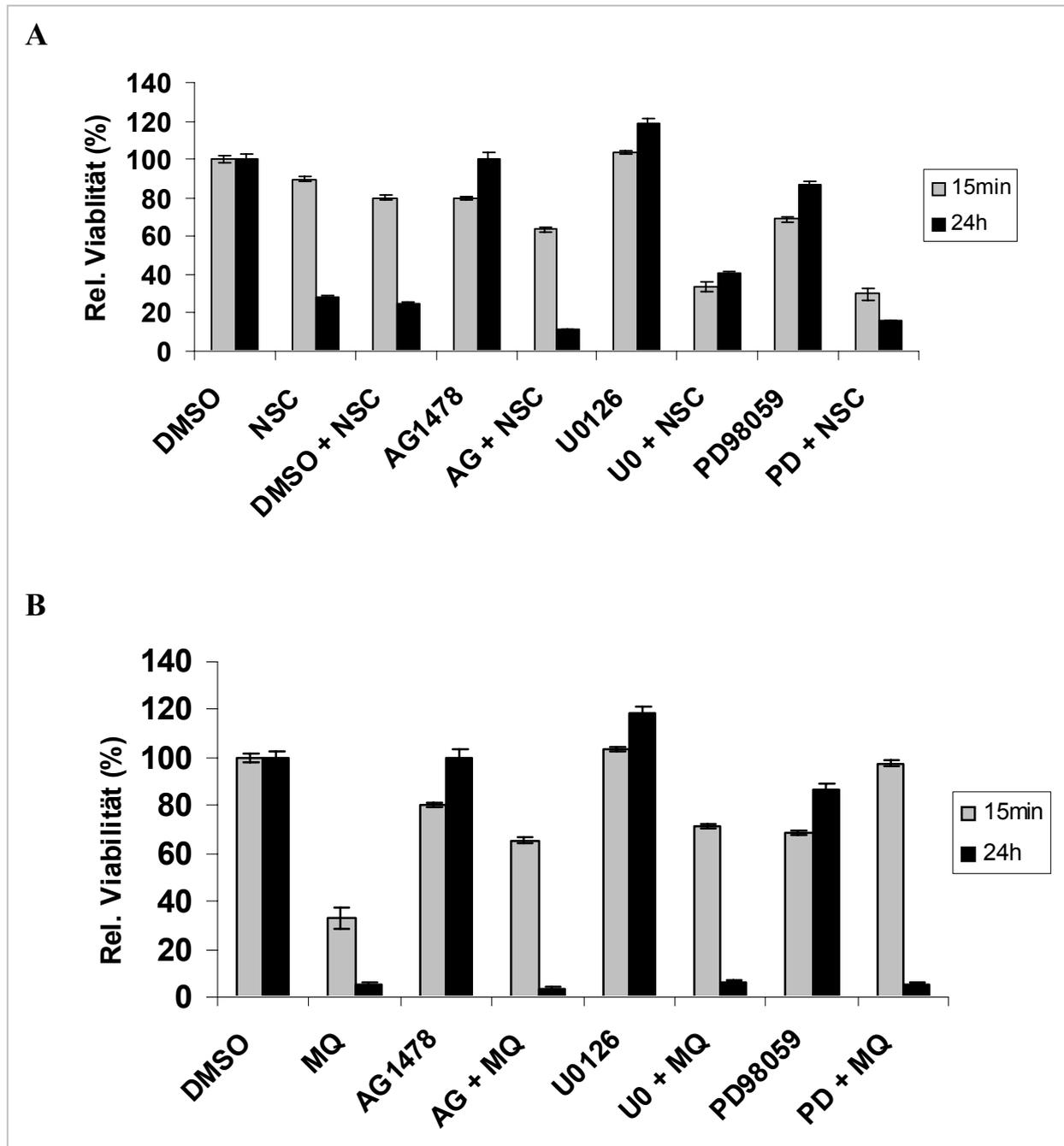


Abb. 3.5.: Zytotoxizität von Chinonen in Kombination mit Inhibitoren des EGFR und von MEK1/2

(A) WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO (Vehikelkontrolle) bzw. NSC95937 (10 μ M) +/- Prä- und Koinkubation des EGFR-Kinase-Inhibitors AG1478 (10 μ M) bzw. der MEK1/2-Inhibitoren U0126 (10 μ M) oder PD98059 (50 μ M) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde direkt oder nach weiteren 24 h Inkubation in FCS-freiem Medium die Viabilität mit Hilfe eines MTT-Test bestimmt.

(B) WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO (Vehikelkontrolle) bzw. Menadion (50 μ M) +/- Prä- und Koinkubation des EGFR-Kinase-Inhibitors AG1478 (10 μ M) bzw. der MAPKK-Inhibitoren U0126 (10 μ M) oder PD98059 (50 μ M) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde direkt oder nach weiteren 24 Std. Inkubation in FCS-freiem Medium die Viabilität mit Hilfe eines MTT-Test bestimmt.

Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen +/- SD.

3.2 Mechanismus der Aktivierung des EGFR durch NSC95397

Nachdem die Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalkaskade in WB-F344-Zellen durch NSC95397 gezeigt werden konnte, sollte nun der dieser Aktivierung zugrunde liegende Wirkmechanismus untersucht werden.

Für 1,4-Naphthochinone, wie beispielsweise Menadion, sind zwei Wirkmechanismen in der Zelle beschrieben. Zum einen ist bekannt, dass sie unter Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies Redox-Cycling durchlaufen können. Ein weiterer Wirkmechanismus ist die Arylierung von Nukleophilen in der Zelle (Bolton et al., 2000).

3.2.1 UVA-induzierte Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade

Zunächst sollte untersucht werden, ob in WB-F344-Zellen ERK1/2 durch reaktive Sauerstoffspezies aktiviert werden kann. Reaktive Sauerstoffspezies, wie beispielsweise Superoxid oder Wasserstoffperoxid, entstehen permanent in der Zelle und werden durch Schutzenzyme, wie beispielsweise die Superoxid-Dismutase abgebaut, damit sie keine Schädigung in der Zelle hervorrufen können. Eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle führt zu oxidativem Stress. Auslöser von oxidativem Stress sind unter anderem Bestrahlung mit UVA-Licht oder Autooxidationsreaktionen wie das Redox-Cycling (Review: Sies, 1986).

WB-F344-Zellen wurden mit einer Dosis von 30 J/cm^2 UVA-Licht in PBS oder Vollmedium verschiedener Zusammensetzung bestrahlt. Anschließend wurde die Aktivierung von ERK1/2- über Western-Analyse mit einem Antikörper, der die Phosphorylierung von ERK1/2 anzeigt, untersucht.

Es zeigte sich, dass die UVA-Bestrahlung von Zellen in Medium eine Aktivierung von ERK1/2 auslöst, die bei der Verwendung von PBS jedoch nicht detektierbar war (Abb.3.6A). Dies weist darauf hin, dass die UVA-Bestrahlung in Nährmedium zu photochemischen Reaktionen führt, die eine Aktivierung der Kinasen ermöglichen. Auslöser für diese Reaktionen müssen Bestandteile des Mediums sein, die in PBS nicht enthalten sind.

Untersucht wurden die drei Komponenten Riboflavin, Tryptophan und HEPES, die Bestandteil aller untersuchten Nährmedien sind. Hierzu wurden WB-F344-Zellen in PBS mit UVA-Licht bestrahlt, dem $1 \mu\text{M}$ Riboflavin, $78 \mu\text{M}$ Tryptophan und 25 mM HEPES zugesetzt wurde. Die gewählten Konzentrationen der drei Komponenten entsprechen Konzentrationen, die in Nährmedien für die Zellkultur Verwendung finden.

Es zeigte sich, dass die Kombination von Riboflavin und Tryptophan bzw. HEPES in PBS bei der Bestrahlung mit UVA zu einer deutlichen Aktivierung von ERK1/2 führt, während jeweils die Zugabe eines Supplementes allein keine Aktivierung auslöste (Abb. 3.6B).

Durch UVA-Bestrahlung von Riboflavinlösungen in Gegenwart von Tryptophan oder HEPES entsteht bekanntermaßen H_2O_2 (Mahns et al., 2003). In WB-F344-Zellen lassen sich ERK1/2 also durch oxidative Stimuli (UVA-induzierte Bildung von H_2O_2) aktivieren.

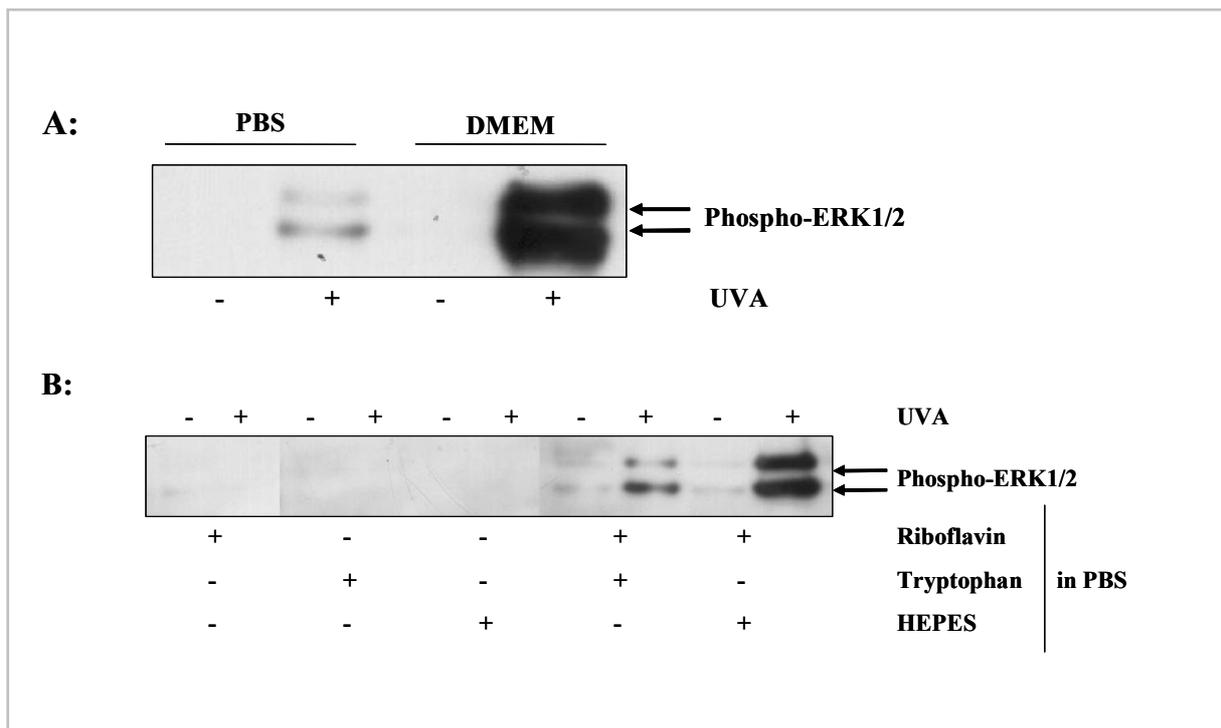


Abb. 3.6.: UVA-induzierte ERK1/2-Aktivierung

(A) WB-F344-Zellen wurden in PBS bzw. DMEM mit einer Dosis von $30J/cm^2$ UVA-Licht bestrahlt. Nach einer Inkubation von 15 min bei $37^\circ C$ wurde die Aktivierung von ERK1/2 mittels Western-Analyse untersucht.

(B) WB-F344-Zellen wurden in mit $1\mu M$ Riboflavin, $78\mu M$ Tryptophan und/oder $25mM$ HEPES in PBS mit einer Dosis von $30J/cm^2$ UVA-Licht bestrahlt. Nach einer Inkubation von 15 min bei $37^\circ C$ wurde die Aktivierung von ERK1/2 mittels Western-Analyse untersucht.

3.2.2 Untersuchung zur Bedeutung der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase für Signaleffekte von NSC95397

Als Redox-Cycling bezeichnet man die Reduktion eines Chinons in sein korrespondierendes Semichinon und dessen nachfolgende Oxidation in das ursprüngliche Chinon unter Freisetzung von Superoxid. Viele Chinone werden durch das Enzym NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-1 (NQOR-1) direkt in ihr korrespondierendes Hydrochinon umgewandelt werden. Das Hydrochinon reagiert mit molekularem Sauerstoff, unter Freisetzung von

Superoxid, in das Semichinon. Dieses wird wiederum durch Reaktion mit molekularem Sauerstoff, unter Freisetzung von Superoxid, in das Chinon umgewandelt.

Die Bedeutung des Redox-Cycling für die Wirkung von NSC95397 auf ERK1/2 lässt sich auf verschiedenen Ebenen untersuchen. Ein möglicher experimenteller Ansatz ist die Unterdrückung der H_2O_2 -Akkumulation in der Zelle durch Kobehandlung mit dem Enzym Katalase, welches H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff disproportioniert.

Des Weiteren ist es möglich, das Enzym NQOR-1, welches die Umwandlung des Chinons in sein korrespondierendes Hydrochinon katalysiert, durch Dicoumarol zu hemmen und somit die intrazelluläre Bildung von Superoxid zu verringern (Abb. 3.7).

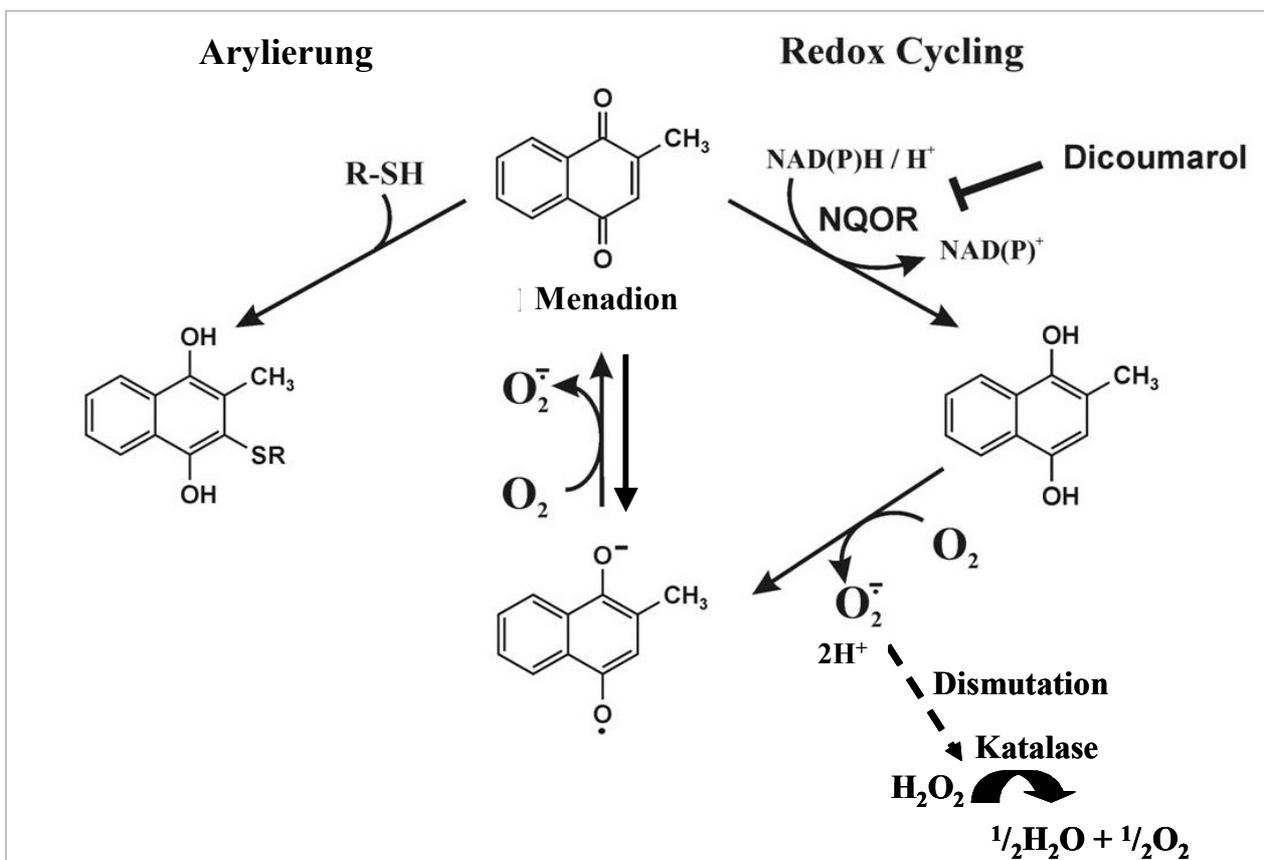


Abb. 3.7.: Intrazelluläre Wirkmechanismen von 1,4-Naphthochinonen am Beispiel von Menadion

Das Schema zeigt die beiden Hauptreaktionswege von Menadion in Säugerzellen. Des Weiteren sind die beiden experimentellen Ansätze für die Untersuchung von Redox-Cycling (Dicoumarol und Katalase) dargestellt.

3.2.2.1 Abbau von H_2O_2 durch Katalase

Die ERK1/2-Signalkaskade wird durch H_2O_2 aktiviert (Klotz et al, 2002a), dass durch Redox-Cycling gebildet werden kann. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die NSC95397-induzierte ERK1/2-Aktivierung über die intrazelluläre Bildung von H_2O_2 verläuft. Hierzu wurden WB-F344-Zellen vor der Behandlung mit $10\mu\text{M}$ NSC95397 30 min mit inaktivierter und aktiver Katalase präinkubiert. Obwohl das Enzym über die Zellmembran

nicht in die Zelle gelangen kann, kann H_2O_2 die Zellmembran problemlos passieren und somit extrazellulär in H_2O und O_2 disproportioniert werden. Nach Zugabe von NSC95397 wurden die Zellen weitere 15 min inkubiert und anschließend auf ERK1/2-Aktivierung, mittels Western-Analyse, untersucht.

Das Experiment zeigt eine Aktivierung von ERK1/2 nach der Behandlung mit NSC95397, Menadion und H_2O_2 . Diese Aktivierung lässt sich durch die Prä- und Koinkubation mit Katalase nur im Fall von H_2O_2 unterdrücken, während sie keinen Einfluss auf die Behandlung mit NSC95397 oder Menadion nimmt.

Das Experiment lieferte keinen Hinweis darauf, dass die Aktivierung von ERK1/2 durch NSC95397 hauptsächlich durch intrazellulär generiertes H_2O_2 stattfindet.

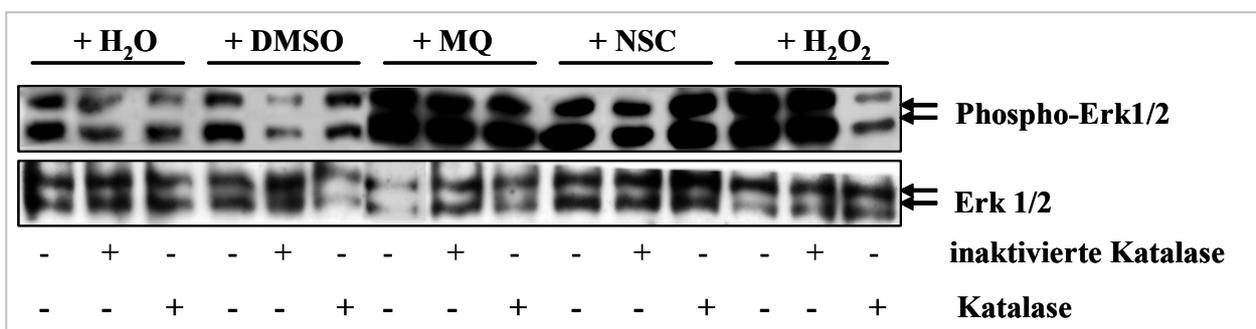


Abb. 3.8: ERK1/2-Aktivierung in Anwesenheit von Katalase

WB-F344-Zellen wurden 30 min mit inaktivierter und aktiver Katalase (40U/ml) präinkubiert. Anschließend wurde H_2O , DMSO (als Lösungsmittelkontrolle für NSC95397, Menadion), $10\mu\text{M}$ NSC95397, $50\mu\text{M}$ Menadion und $250\mu\text{M}$ H_2O_2 (als Positivkontrolle) zugefügt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Bei der Western-Analyse wurden der Phosphorylierungsgrad und die Totalmenge von ERK1/2 untersucht.

3.2.2.2 Hemmung der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-1 (NQOR-1) durch Dicoumarol

Durch Hemmung der NQOR-1 mit Hilfe von Dicoumarol sollte untersucht werden, ob für die NSC95397-induzierte ERK1/2-Aktivierung die Reduktion zum Hydrochinon notwendig ist.

WB-F344-Zellen wurden 60 min mit $10\mu\text{M}$ NSC95397 bzw. $100\mu\text{M}$ DMNQ mit oder ohne Dicoumarol behandelt. DMNQ wurde als Positivkontrolle gewählt, da es sich bei dieser Substanz bekanntermaßen um einen reinen Redox-Cycler handelt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Western-Analyse auf EGFR- und ERK1/2-Aktivierung untersucht.

Sowohl EGFR als auch ERK1/2 zeigen eine deutliche Aktivierung nach der Behandlung mit NSC95397 und DMNQ, die bei der Verwendung von Dicoumarol allein nicht detektierbar ist. Während sich bei der Exposition mit DMNQ die Aktivierung beider Proteine durch die zusätzliche Behandlung mit Dicoumarol unterdrücken lässt, nimmt der Inhibitor auf die NSC95397-induzierte Aktivierung keinen Einfluss (Abb. 3.9).

Es bleibt festzustellen, dass auch die Hemmung der NQOR-1 durch Dicoumarol keinen Hinweis darauf liefert, dass es sich bei dem vorrangigen Wirkmechanismus von NSC95397 um Redox-Cycling handelt. Jedenfalls scheint das Hydrochinon nicht notwendig für die Funktion zu sein.

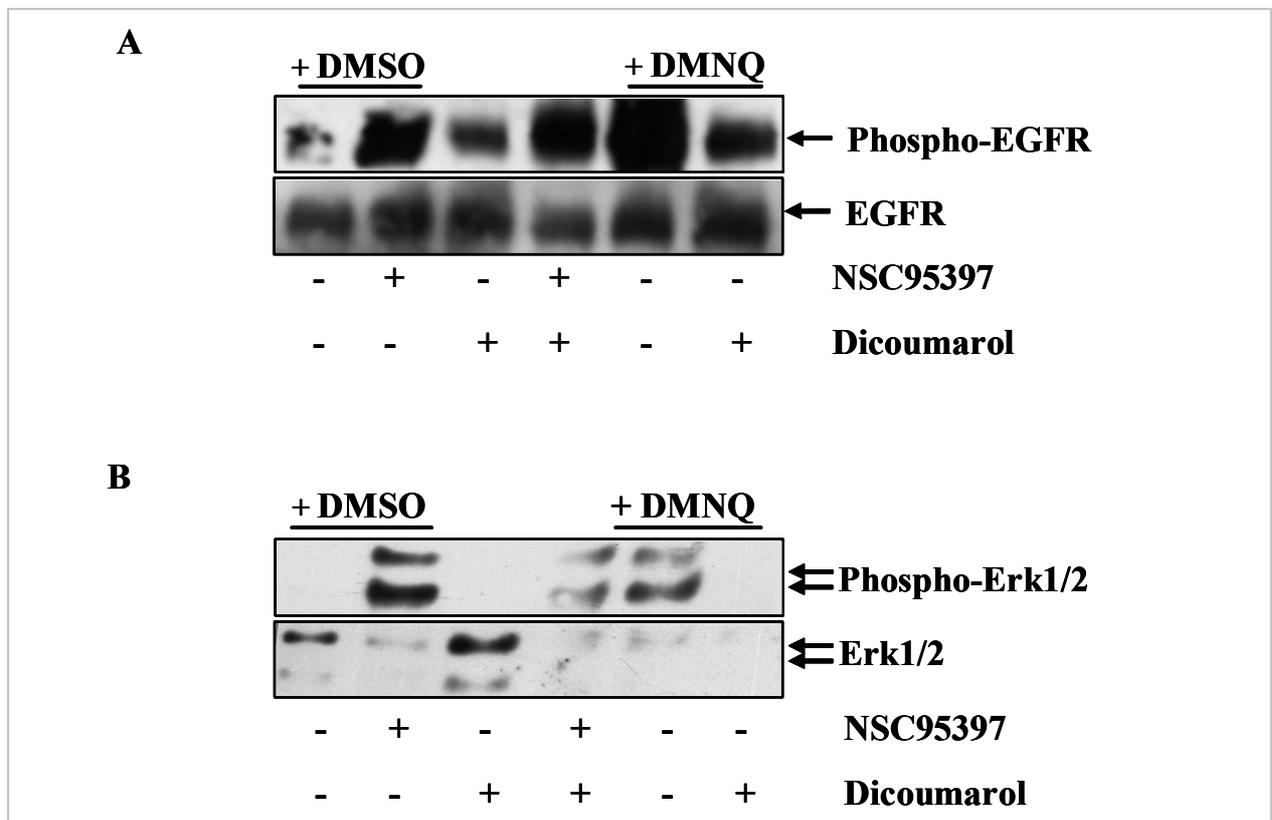


Abb. 3.9: Hemmung der NQOR-1 durch Dicoumarol

(A) WB-F344 -Zellen wurden 60 min mit DMSO (Vehikelkontrolle), 10 μ M NSC95397 bzw. 100 μ M DMNQ +/- 100 μ M Dicoumarol inkubiert. Bei der anschließenden Western-Analyse wurde der Phosphorylierungsgrad und die Totalmenge des EGFR untersucht.

(B) WB-F344 -Zellen wurden 60 min mit DMSO (Vehikelkontrolle), 10 μ M NSC95397 bzw. 100 μ M DMNQ +/- 100 μ M Dicoumarol inkubiert. Bei der anschließenden Western-Analyse wurde der Phosphorylierungsgrad und die Totalmenge von ERK1/2 untersucht.

3.2.2.3 Dicoumarol-abhängige Toxizität von NSC95397

Für die Untersuchungen des Einflusses des Inhibitors Dicoumarol auf die Zytotoxizität von NSC95397 wurden WB-F344-Zellen 60 min mit DMSO, 10 μ M NSC95397 bzw. 100 μ M Dicoumarol behandelt. Anschließend wurde direkt oder nach 24 h Inkubation in FKS-freiem Medium die Viabilität mit Hilfe einer MTT-Analyse untersucht.

Die Behandlung mit Dicoumarol führte sowohl nach 15 min als auch nach 24 h zu einer Abnahme der Viabilität von zirka 45%. Diese Abnahme der Viabilität konnte auch in

Kombination mit NSC95397 nach 15 min festgestellt werden. Nach 24 h konnte nur noch eine Viabilität von 10% festgestellt werden (Abb. 3.10).

Das Experiment zeigte, dass die Behandlung mit NSC95397 in Kombination mit Dicoumarol zu einer erhöhten Zytotoxizität nach beiden untersuchten Zeitpunkten führt.

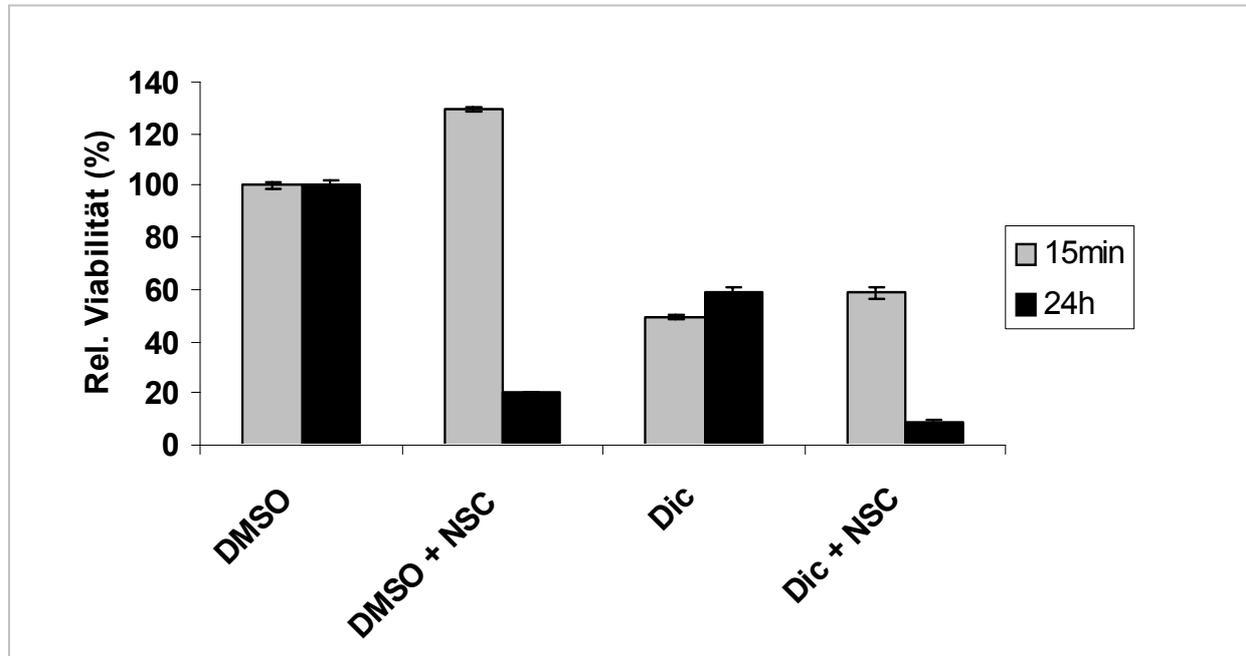


Abb. 3.10: Toxizität von NSC95397 in Kombination mit Dicoumarol

WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO, 10 μ M NSC95397 und 100 μ M Dicoumarol behandelt. Anschließend wurden die Zellen direkt und nach 24 h Inkubation in FKS-freiem Medium einer MTT-Analyse unterzogen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen +/- SD.

3.2.3 Interaktion von NSC95397 mit der DSP Cdc25A

Es konnte gezeigt werden, dass die NSC95397-induzierte Aktivierung der EGFR-Signalkaskade weder durch die zusätzliche Behandlung mit Katalase noch durch die Hemmung der NQOR-1 beeinflusst wird. Alternativ hierzu besteht die Möglichkeit, dass die Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalweges durch eine direkte Interaktion von NSC95397 mit einer Phosphatase, deren Funktion dadurch gehemmt würde, stattfindet. Bei dem untersuchten Naphthochinonderivat NSC95397 handelt es sich um einen Inhibitor der doppelt-spezifischen Cdc25-Phosphatasen, von denen Cdc25A als Phosphatase des EGFR beschrieben ist (Wang et al., 2002).

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob eine direkte Interaktion zwischen NSC95397 und Cdc25A stattfindet. Dazu wurden WB-F344-Zellen mit Cdc25A-Antisense DNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit NSC95397 in Konzentrationen von 1, 5 und 10 μ M behandelt und die Aktivierung von ERK1/2 untersucht.

Es zeigte sich, dass die Aktivierung von ERK1/2 in diesen Zellen bereits bei einer Konzentration von 5 μM NSC95397, gegenüber 10 μM NSC95397 in nicht transfizierten Zellen, erfolgt (Abb. 3.11). Diese erhöhte „Empfindlichkeit“ der transfizierten Zellen gegenüber NSC95397 deutet darauf hin, dass die Wirkung des Chinons über eine direkte Interaktion mit der Phosphatase Cdc25A hervorgerufen wird, da nunmehr weniger NSC95397 zur Hemmung der Dephosphorylierung von ERK1/2 benötigt wird.

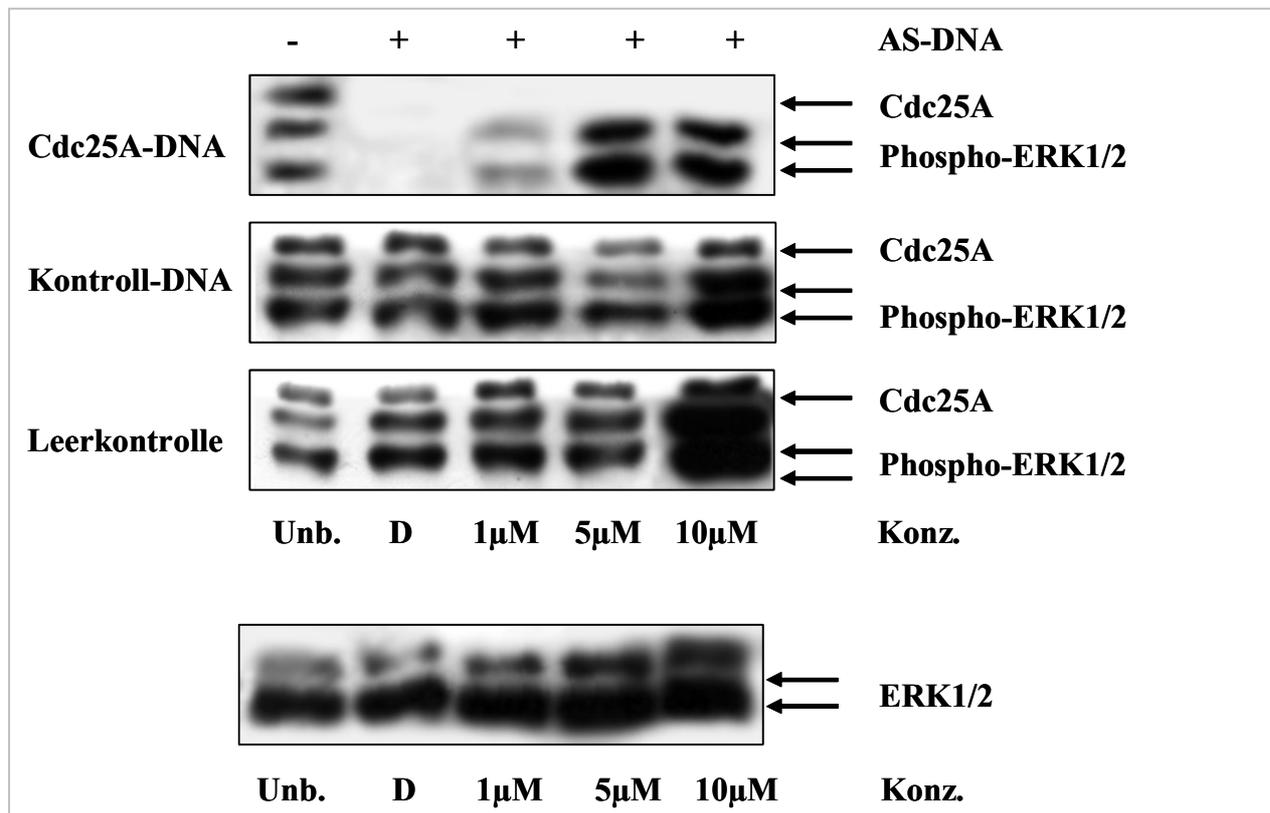


Abb. 3.11: NSC95397-abhängige ERK1/2-Aktivierung nach Transfektion mit Antisense-DNA

WB-F344-Zellen wurden mit Cdc25A- bzw. Kontroll-Antisense-DNA transfiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit Transfektionsreagenz ohne DNA behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit DMSO (D), 1 μM , 5 μM und 10 μM NSC95397 für 15 min behandelt und auf ERK1/2-Aktivierung untersucht.

3.3. Einfluss der NSC95397-induzierten ERK1/2-Aktivierung auf die Zell-Zell-Kommunikation

Nach der Untersuchung der Mechanismen der Aktivierung sollten nun die Auswirkungen der NSC95397-induzierten Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalkaskaden untersucht werden.

Es ist beschrieben, dass Cx43 ein zytoplasmatisches Zielprotein von ERK1/2 darstellt. Eine Hyperphosphorylierung dieses Proteins führt zu einem Verschluss der Zell-Zell-Kanäle und somit zu einer Hemmung der Kommunikation (Lampe & Lau, 2000). Die NSC95397-

bedingte Aktivierung von ERK1/2 könnte somit auch Einfluss auf die Zell-Zell-Kommunikation nehmen.

3.3.1. Zell-Zell-Kommunikation nach NSC95397 Behandlung

Es sollte untersucht werden, ob die Zell-Zell-Kommunikation nach einer Behandlung der Zellen mit NSC95397 abnimmt. WB-F344-Zellen wurden mit DMSO bzw. 10 μ M NSC95397, in Kombination mit den Inhibitoren AG1478, U0126 und PD98059, inkubiert und ihre Kommunikation wurde anschließend mit Hilfe einer Mikroinjektion untersucht.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit 10 μ M NSC95397 zu einer Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation führt. Diese lässt sich durch die Kobehandlung mit dem Inhibitor U0126 komplett unterdrücken. Die Koinkubation mit den Inhibitoren AG1478 und PD98059 führte jedoch nicht zu einer Unterdrückung der Hemmung (Abb. 3.12).

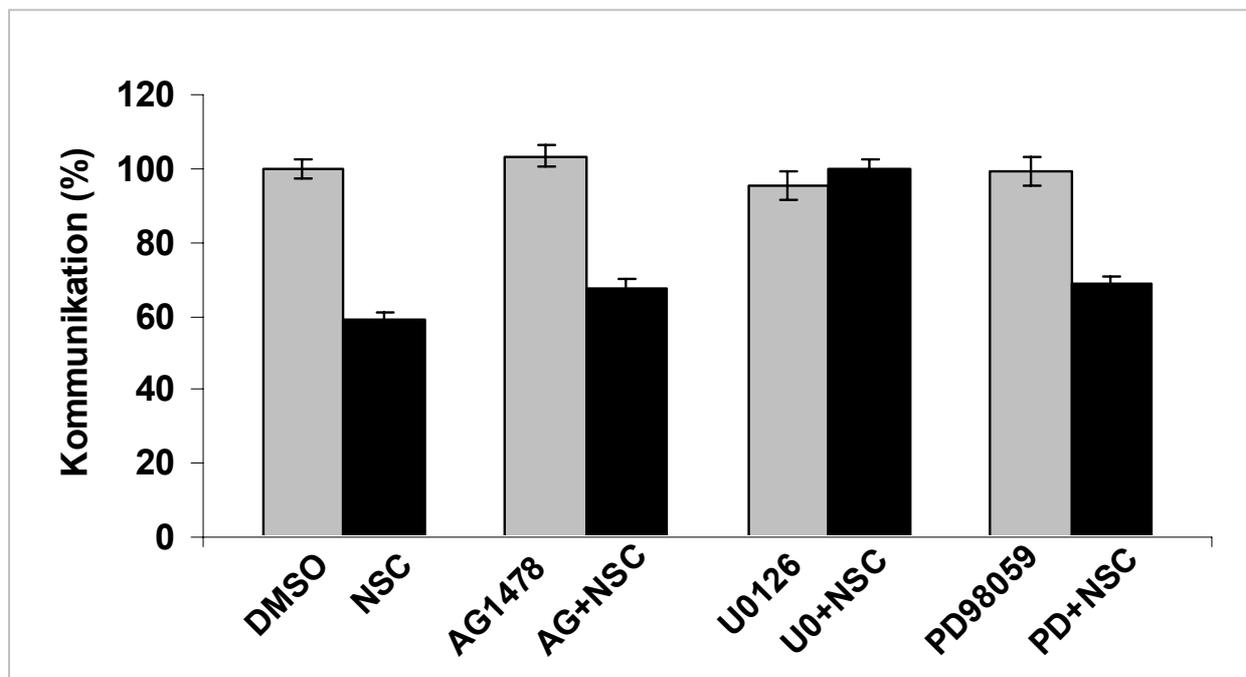


Abb. 3.12: Zell-Zell-Kommunikation nach Behandlung mit NSC95397

WB-F344-Zellen wurden mit den Inhibitoren AG1478, U0126 und PD98059 präinkubiert. Die Inkubation mit DMSO bzw. die Koinkubation mit 10 μ M NSC95397 erfolgte für 15 min. Anschließend wurde mit Hilfe der Mikroinjektion die Kommunikationsfähigkeit der Zellen untersucht. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen +/- SD.

3.3.2 Phosphorylierungsgrad von Cx43 nach NSC95397-Behandlung

Die Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation wird durch eine Hyperphosphorylierung von Cx43 hervorgerufen, die durch die ERK1/2-Kinasen ausgelöst wird. Mit Hilfe einer

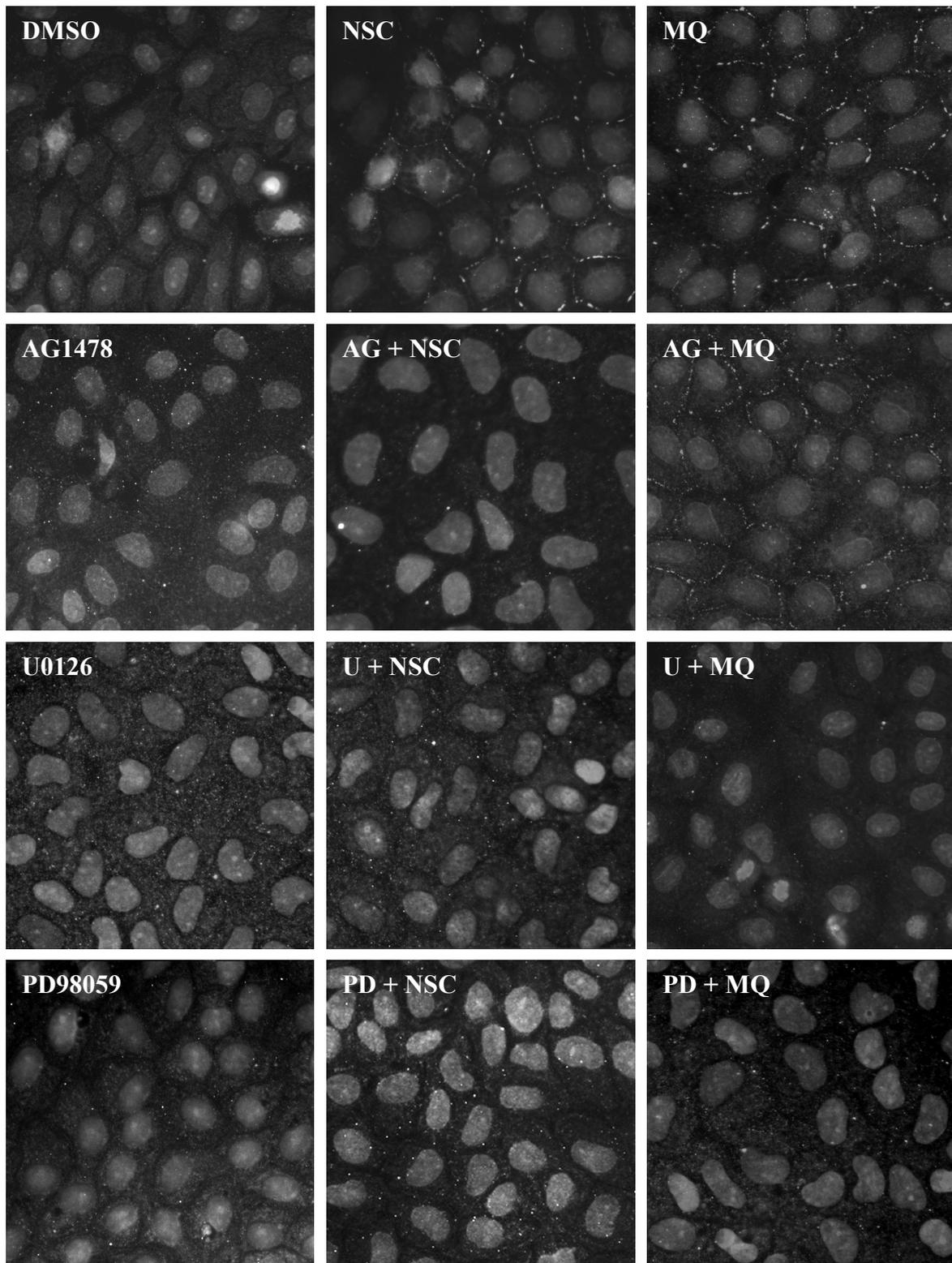
immunohistologischen Anfärbung wurden zwei der drei bekannten Cx43-Phosphorylierungsstellen von ERK1/2 untersucht (Lampe and Lau 2000).

WB-F344-Zellen wurden mit DMSO, NSC95397, Menadion bzw. DMNQ, in Kombination mit den Inhibitoren AG1478, U0126, PD98059 oder Dicoumarol wie bereits beschrieben behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und einer immunohistologischen Anfärbung auf Cx43-Phosphorylierung (Ser279/282) unterzogen. Es wurde auch untersucht, ob sich der Gesamtgehalt von Cx43 infolge der Behandlung verändert.

Das Experiment zeigte, dass der Phosphorylierungsgrad von Cx43 in den Zellen infolge der Behandlung mit NSC95397 und Menadion stark ansteigt, zu sehen an den weißen Punkten entlang der Zellmembran. Die mit AG1478, U0126, PD98059 und NSC95397 behandelten Proben zeigen keine Phosphorylierung der Cx43-Proteine (Abb.3.13A). Im Fall von AG1478 und PD98059 ist dies überraschend, weil sich die durch NSC95397 gehemmte Kommunikation durch die Verwendung beider Inhibitoren nicht wiederherstellen lässt.

Die Cx43-Phosphorylierung ließ sich durch Dicoumarol nur bei mit DMNQ-behandelten Zellen, nicht aber bei den Zellen, die mit NSC95397 behandelt wurden, unterdrücken (Abb. 3.13B).

Abb. 3.13C zeigt, dass sich der Gesamtgehalt an Cx43 in den Zellen infolge der Behandlung nicht verändert.

A

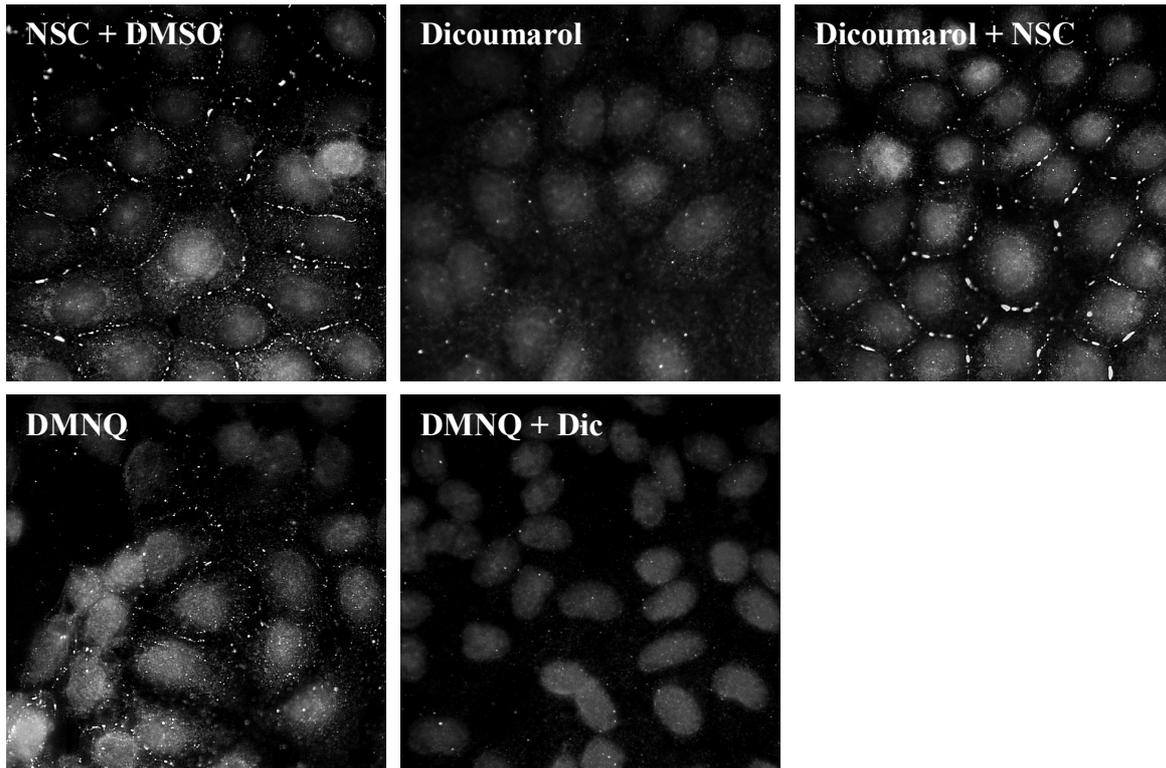
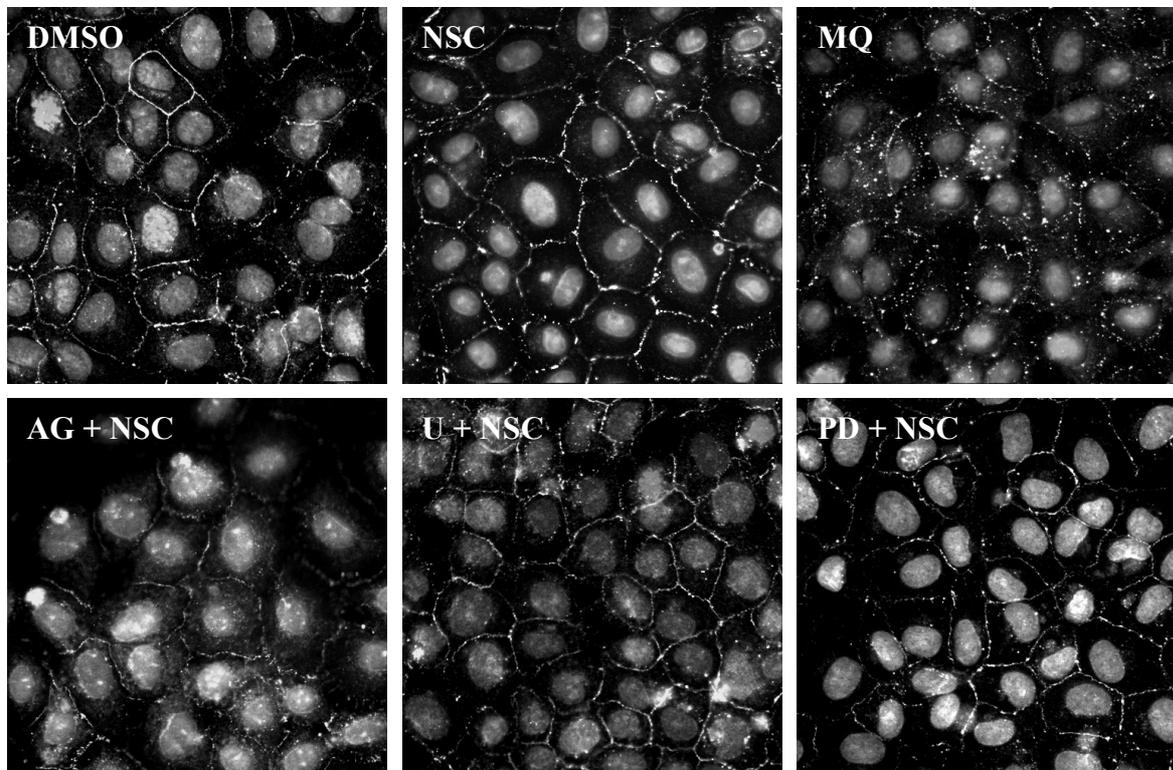
B**C**

Abb. 3.13: Cx43-Phosphorylierung nach NSC95397-Behandlung

(A) WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO, NSC95937 (10 μ M) bzw. Menadiol (50 μ M) +/- Prä- und Koinkubation des EGFR-Kinase-Inhibitors AG1478 (10 μ M) bzw. der MEK1/2-Inhibitoren U0126 (10 μ M) oder

PD98059 (50 μ M) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde die Cx43-Phosphorylierung (Ser279/282) mit Hilfe einer immunohistologischen Anfärbung untersucht.

(B) WB-F344-Zellen wurden 60 min mit NSC95397 (10 μ M), DMNQ (100 μ M) und Dicoumarol (100 μ M) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde die Cx43-Phosphorylierung (Ser279/282) mit Hilfe einer immunohistologischen Anfärbung untersucht.

(C) WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO, NSC95397 (10 μ M) bzw. Menadion (50 μ M) +/- Prä- und Koinkubation des EGFR-Kinase-Inhibitors AG1478 (10 μ M) bzw. der MEK1/2-Inhibitoren U0126 (10 μ M) oder PD98059 (50 μ M) bei 37°C behandelt. Anschließend wurde die Gesamtmenge von Cx43 mit Hilfe einer immunohistologischen Anfärbung untersucht.

3.4. NSC95397-induzierte Modulation des Zellzyklus

Die doppelt-spezifische Phosphatasen Cdc25 haben ihre Hauptaufgaben im Zellzyklus und sind für sein Voranschreiten essentiell. Eine Behandlung mit dem Inhibitor NSC95397, der diese Phosphatasen hemmt, sollte sich dementsprechend auf den Zellzyklus auswirken und nachweisbar sein.

3.4.1 Proliferationsrate nach Behandlung mit NSC95397

Infolge der Behandlung mit NSC95397 sollte, durch die fehlende Aktivität der Cdc25-Phosphatasen, ein Zellzyklus-Arrest ausgelöst werden. Dieser Effekt sollte durch einen Proliferationsassay untersucht werden.

WB-F344-Zellen wurden mit 1, 5 und 10 μ M NSC95397 behandelt und nach 24 h Postinkubation in Vollmedium einer Proliferationsanalyse unterzogen. Des Weiteren wurde der Einfluss des EGFR und von MEK1/2 auf die Proliferation durch zusätzliche Verwendung der Inhibitoren AG1478, U0126 und PD98059 untersucht. Auch der Einfluss von Menadion und DMNQ auf die Proliferation wurde untersucht (Abb.3.14).

Erwartungsgemäß zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation infolge NSC95397-Behandlung. Die Verwendung von 10 μ M NSC95397 zeigte eine Hemmung der Proliferation um 80%.

Die Hemmung des EGFR durch AG1478 zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation, während die Hemmung von MEK1/2 durch U0126 bzw. PD98059 zu einer 30 bzw. 50% niedrigeren Wachstumsrate führte.

Bei Koinkubation der Zellen mit NSC95397 und den drei Inhibitoren zeigte sich eine Hemmung der Proliferationsrate von zirka 65%.

Die Behandlung der Zellen mit Menadion und DMNQ führte zu einer Hemmung der Proliferation von 90%.

Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation infolge NSC95397 konzentrationsabhängig abnimmt und dass diese durch zusätzliche Hemmung des EGFR und von MEK1/2 wieder geringfügig ansteigt.

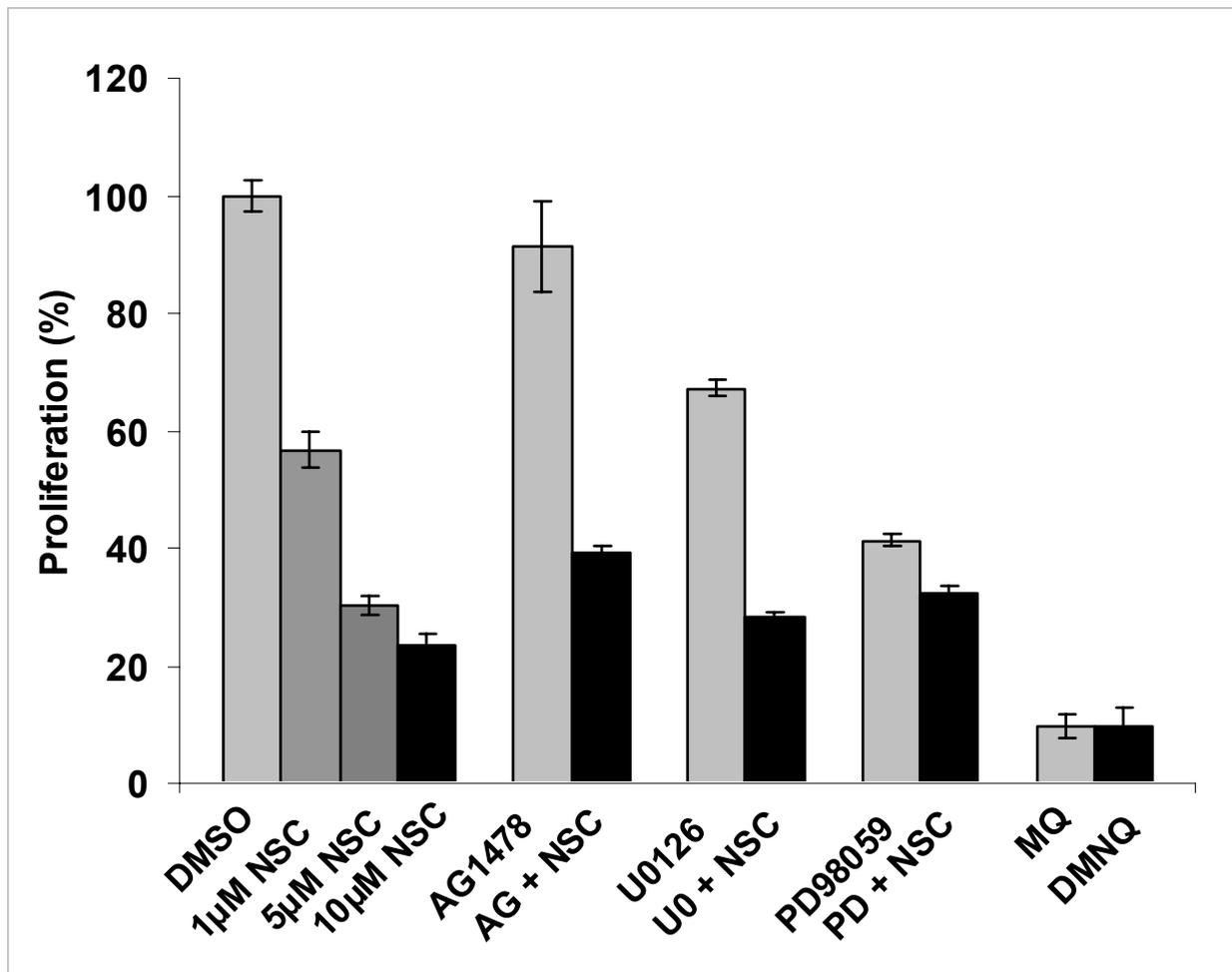


Abb.3.14: Proliferationsrate nach NSC95397-Behandlung

WB-F344-Zellen wurden 15 min mit DMSO bzw. mit 1, 5 und 10µM NSC95397 behandelt. Des Weiteren erfolgte eine Behandlung mit 10µM NSC95397 +/- Prä- und Koinkubation des EGFR-Kinase-Inhibitors AG1478 (10 µM) bzw. der MEK1/2-Inhibitoren U0126 (10µM) oder PD98059 (50µM) bei 37°C. Nach 24 Std. Postinkubation in Vollmedium wurde die Proliferationsrate der Zellen bestimmt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen +/- SD.

3.4.2 Zellzyklus-Analyse nach Behandlung mit NSC95397

Nachdem gezeigt werden konnte, dass NSC95397 zu einer Hemmung der Proliferation führt, sollte mit Hilfe einer FACS-Analyse untersucht werden, in welcher Phase des Zellzyklus dieser Arrest stattfindet.

Durch eine Kultivierung zunächst in Serum-reduziertem (3% DMEM) und anschließend in Serum-freiem Nährmedium wurde der Zellzyklus von WB-F344-Zellen in der G1-Phase arretiert. Nach der Behandlung mit NSC95397 wurde durch Zugabe von Vollmedium der

Zyklusarrest aufgehoben und die Zellen, mit Ausnahme der 0%-Kontrolle, weitere 24 h in Vollmedium inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet und ihre Zellzyklusstadien mit Hilfe einer FACS-Analyse untersucht. Außerdem sollte die Rolle der ERK1/2-Aktivierung im Bezug auf den Zellzyklus untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen zusätzlich mit AG1478 oder U0126 behandelt und untersucht.

Während unbehandelte oder mit DMSO behandelte Zellen einen normalen Verlauf des Zellzyklus zeigten, zeigte sich ein deutlicher G1-Arrest nach der Behandlung der Zellen mit 10 μ M NSC95397. Bei unbehandelten (Abb.3.15Aa) bzw. mit DMSO (Abb.3.15Ac) behandelten Zellen befanden sich 55% der Zellen in der G1-Phase, 11% in der S-Phase und 25% in der G2-Phase. Demgegenüber wurden nach einer Behandlung mit 10 μ M NSC95397 70 % der Zellen in der G1-Phase, 9% in der S-Phase und 20% apoptotische Zellen detektiert (Abb.3.15Af).

Der Einsatz von 1 μ M NSC95397 (Abb.3.15Ad) zeigte keinen Einfluss auf den Zellzyklus, während der Einsatz von 5 μ M NSC95397 (Abb.3.15Ae) eine Verschiebung innerhalb des Zellzyklus zeigte, jedoch kein Arrest in einer Zellzyklusphase detektierbar war. So konnten nach dem Einsatz von 5 μ M NSC95397 47% der Zellen in der G1-Phase, 15% der Zellen in der S-Phase und 30% der Zellen in der G2-Phase detektiert werden.

Die Hemmung des EGFR durch AG1478 (Abb.3.15Ba) bzw. von MEK1/2 durch U0126 (Abb.3.15Bc) führte zu einer leichten Arretierung des Zellzyklus mit 65% Zellen in der G1-Phase, 9% Zellen in der S-Phase und 19% Zellen in der G2-Phase. Die zusätzliche Hemmung der Cdc25-Phosphatasen durch NSC95397 führte zu einem G1-Arrest, in dem sich 77% der detektierbaren Zellen befanden. Der Anteil der apoptotischen Zellen sank auf 10%, im Gegensatz zu 23% bei 10 μ M NSC95397 (Abb.3.15Bb/d vs 3.15Af).

Das Experiment hat gezeigt, dass die Behandlung mit 10 μ M NSC95397 zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase führt. Die Hemmung des EGFR und von MEK1/2 verstärkt diesen Effekt leicht, senkt jedoch den Anteil apoptotischer Zellen.

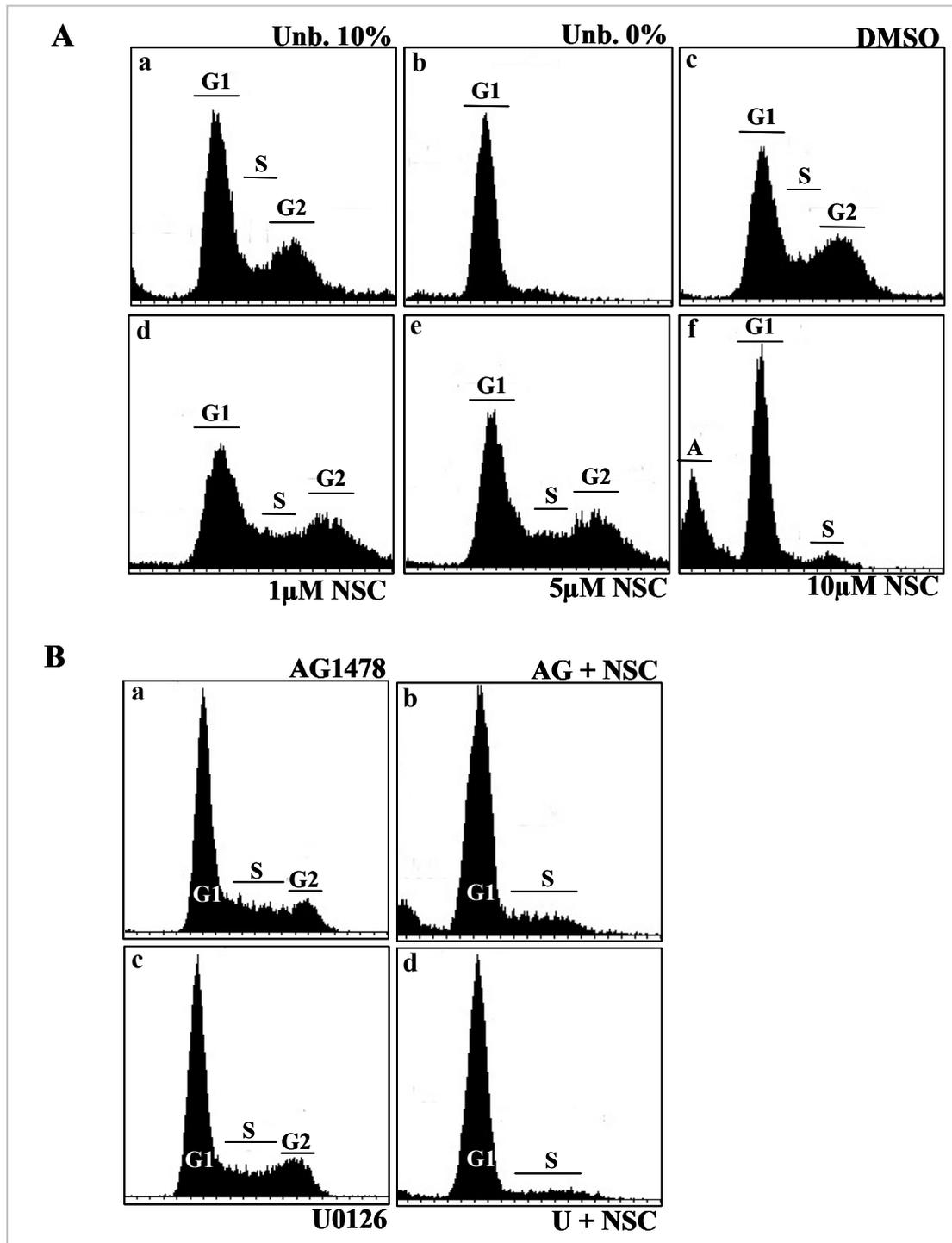


Abb. 3.15: Zellzyklusanalyse nach NSC95397-Behandlung

(A) WB-F344-Zellen wurden durch Kultivierung in FKS-freiem Medium in der G1-Phase arretiert. Nach Behandlung mit DMSO bzw. 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M NSC95397 wurde die Zellen weitere 24 h in Vollmedium inkubiert. Anschließend erfolgte eine Untersuchung des Zellzyklus mit Hilfe einer FACS-Analyse.

(B) WB-F344-Zellen wurden durch Kultivierung in FKS-freiem Medium in der G1-Phase arretiert. Nach Kobehandlung der Zellen mit 10 μ M AG1478, 10 μ M U0126 und 10 μ M NSC95397 wurden die Zellen weitere 24 h in Vollmedium inkubiert. Anschließend erfolgte eine Untersuchung des Zellzyklus mit Hilfe einer FACS-Analyse.

4. Diskussion

4.1 Zytotoxizität und Aktivierung EGFR-abhängiger Signalwege durch NSC95397

Das 1,4-Naphthochinonderivat NSC95397 wird im Hinblick auf eine mögliche Krebstherapie untersucht, da es als Inhibitor der doppelt-spezifischen Phosphatasen der Cdc25-Familie wirkt, deren Hauptaufgabe in der Progression des Zellzyklus liegt, für dessen Voranschreiten sie essentiell sind. Es ist beschrieben, dass in einer Vielzahl von Krebsarten, wie zum Beispiel Magen-, Lungen- oder Brustkrebs (Kudo et al., 1997; Wu et al., 1998; Galaktionow et al., 1995), die beiden DSP Cdc25A und Cdc25B überexprimiert werden. Ihre Hemmung sollte dementsprechend zu einer Verlangsamung bzw. zu einem Stop des Zellwachstums führen.

Für Chinone wie beispielsweise das Benzochinon, DMNQ oder Menadion sind als Wirkmechanismen die Arylierung von Nukleophilen oder Redox-Cycling bzw. eine Kombination beider Mechanismen beschrieben (Klotz et al., 2002b; Abdelmohsen et al., 2003). Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Anhaltspunkt dafür gefunden werden, dass die Zytotoxizität von NSC95397 durch Redox-Cycling beeinflusst wird.

Aufgrund dessen wurde untersucht, ob die Ursache für die Toxizität von NSC95397 auf der Ebene der Signaltransduktion zu finden ist. So ist beispielsweise für cis-Platin beschrieben, dass Induktion von Apoptose über eine Aktivierung von ERK1/2 verläuft (Wang et al., 2000). Die Aktivierung EGFR-abhängiger Signalwege durch 1,4-Naphthochinonderivate, wie beispielsweise Menadion, ist beschrieben und konnte auch für das untersuchte Naphthochinonderivat NSC95397 gezeigt werden (Abb.3.1; 3.3; 3.4).

Neben den beiden bereits angesprochenen Wirkmechanismen des Redox-Cycling und der Arylierung von Nukleophilen besteht die weithin akzeptierte Hypothese, dass die EGFR-Aktivierung durch die Hemmung einer Protein-Tyrosin-Phosphatase, die eine negative Regulation des EGFR verläuft, stattfindet (Herrlich and Böhmer, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des EGFR-Signalweges nicht durch Redox-Cycling ausgelöst wird. Weder die Hemmung der NQOR-1 durch Dicoumarol (Abb.3.9A/B), noch die Kobehandlung mit Katalase (Abb.3.8) zur Verminderung der durch Redox-Cycling induzierten H₂O₂-Akkumulation in der Zelle, zeigten eine Unterdrückung der Aktivierung des EGFR bzw. von ERK1/2.

Einen Anhaltspunkt dafür, dass es sich bei dem Aktivierungsmechanismus des EGFR-abhängigen Signalweges von NSC95397 um eine direkte Interaktion mit der Phosphatase Cdc25A handelt, für die bekannt ist, dass sie die Phosphorylierung des EGFR reguliert (Wang et al., 2002), wurde durch die Transfektion mit Cdc25A-Antisense-DNA erhalten. Hierdurch wurde die Menge an NSC95397, die für eine Aktivierung von ERK1/2 notwendig ist, halbiert.

Die Transfektion mit Antisense-DNA führt zu einer Herabsetzung, jedoch in den meisten Fällen nicht zu einem „Knock-out“ des Zielproteins. In diesem Fall wurde die Menge an Cdc25A mindestens unter die Nachweisgrenze einer Westernanalyse abgesenkt. Der weiterhin notwendige Einsatz von 5µM NSC95397 zur Aktivierung von ERK1/2 deutet darauf hin, dass eine gewisse Restaktivität von Cdc25A oder anderer Cdc25 Phosphatasen vorhanden war. Die Aktivierung von ERK1/2 durch geringere Mengen an NSC95397 deutet jedoch darauf hin, dass aufgrund der geringeren Menge an Cdc25A weniger NSC95397 für eine Aktivierung benötigt wird (Abb. 3.11).

Die Aktivierung des EGFR und von ERK1/2 lässt sich durch die Verwendung des Inhibitors AG1478 auf der Ebene des EGFR und zusätzlich durch die MEK1/2-Inhibitoren U0126 und PD98059 auf der Ebene von ERK1/2 hemmen. Es zeigte sich jedoch, dass auch diese Hemmung keinerlei Einfluß auf die Toxizität von NSC95397 nimmt. Die Zytotoxizität des Chinons ist also unabhängig von der Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalweges.

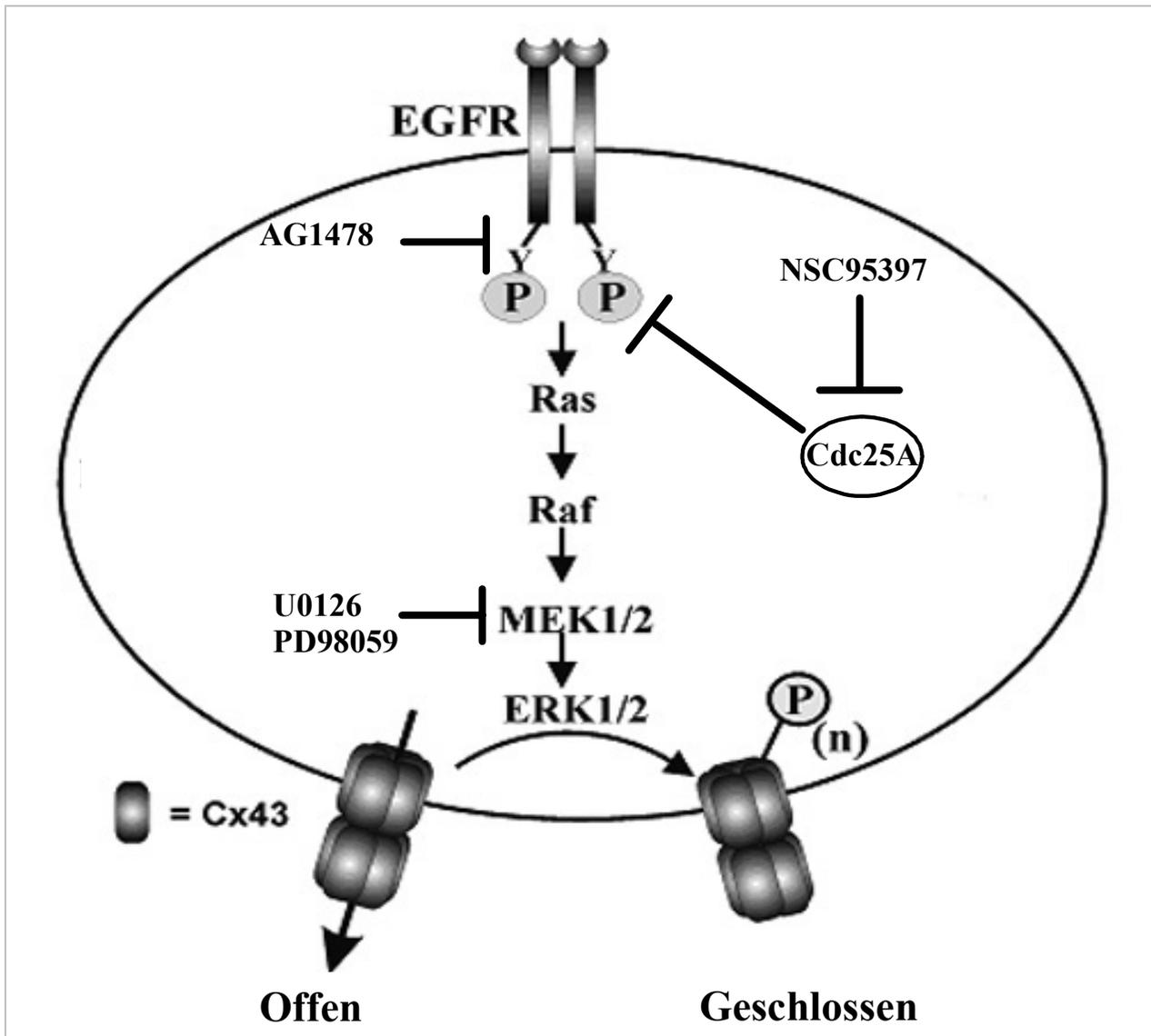


Abb.4.1.: NSC95397-induzierte Aktivierung der EGFR-Signalkaskade

Schematische Darstellung der durch NSC95397 induzierten Aktivierung der EGFR-Signalkaskade mit resultierender Phosphorylierung und daraus resultierender Hemmung der interzellulären Kommunikation.

4.2 Einfluss von NSC95397 auf den Zellzyklus

Neben seiner Herabsetzung der Zellviabilität nimmt NSC95397 auch Einfluss auf die Proliferation und den Zellzyklus.

Die Aktivierung des EGFR und von ERK1/2 führt unter anderem zur Proliferation, welche durch die Zielproteine von ERK1/2, zu denen Transkriptionsfaktoren ebenso wie Schlüsselenzyme für die Nukleotid- und Proteinsynthese gehören, ausgelöst wird (Whitmarsh und Davis, 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben jedoch gezeigt, dass die durch NSC95397 ausgelöste Aktivierung des EGFR und von ERK1/2 nicht zu Proliferationseffekten führen. Bei NSC95397 handelt es sich um einen irreversiblen

Inhibitor der Cdc25-Familie. Die DSP Cdc25A hat ihre Hauptaufgabe am G1-S-Übergang bei der Aktivierung des Cdk2/CyklinE-Komplexes (Hoffmann et al., 1994).

Es ist beschrieben, dass Dauer und Stärke der Aktivierung von ERK1/2 besonders in der G1-Phase eine entscheidende Rolle für den weiteren Verlauf des Zellzyklus spielt. So führt eine transiente (>1 Std.), starke Aktivierung von ERK1/2 zur Induktion von p21^{cip}, einem Inhibitor der Cyklin-abhängigen Kinase Cdk2. Die dauerhafte (<5 Std.), zunächst starke, aber dann verhaltene Aktivierung von ERK1/2 führt zunächst zur Induktion von p21^{cip} und anschließend zur Induktion von Cyklin D1. Dies führt im weiteren Verlauf zur Progression der G1-Phase. Eine dauerhafte, starke Aktivierung von ERK1/2 führt zur beständigen p21^{cip}-Induktion mit nachfolgender Cyklin D1-Induktion, die mit einem G1-Phasen-Arrest korreliert (Review: Roovers & Assoian, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsrate von Rattenleber-epithelzellen infolge einer NSC95397-Behandlung konzentrationsabhängig abnimmt (Abb.3.14). Ein Zellzyklusarrest war durch die Hemmung der Cdc25A, aufgrund ihrer essentiellen Funktion am G1/S-Übergang, zwar zu erwarten, steht jedoch im Widerspruch zur mindestens 6 Stunden anhaltenden Aktivierung von ERK1/2, die zu einer Progression der G1-Phase führen sollte. Dies deutet darauf hin, dass die hier hervorgerufene Aktivierung von ERK1/2 für die Progression im Zellzyklus allein nicht ausreichend ist.

Die Analyse des Zellzyklus hat gezeigt, dass es zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase kommt (Abb.3.15A). Dieser bestätigt die Funktion einer Cdc25-Phosphatase am G1/S-Übergang und die Wirkung von NSC95397 (Abb.4.1). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass durch die Kobehandlung mit AG1478 und U0126 die detektierbare Menge an apoptotischen Zellen deutlich niedriger ausfiel. Dies liefert einen Anhaltspunkt dafür, dass die verlängerte Phosphorylierung von ERK1/2 zu einer erhöhten Apoptoserate der Zellen führt, wenn eine Progression im Zellzyklus, beispielsweise durch die Hemmung der Cdc25A, nicht möglich ist.

Die leichte Arretierung des Zellzyklus durch den Einsatz von AG1478 und U0126 gibt einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass die Aktivierung von ERK1/2 für die Progression notwendig, wenn auch nicht ausreichend ist (Abb.3.15B).

Die Untersuchung der Proliferation und des Zellzyklus infolge einer NSC95397-Behandlung haben gezeigt, dass der durch NSC95397 ausgelöste Zellzyklusarrest der Aktivierung des EGFR und von ERK1/2 übergeordnet sind. Die Aktivität von Cdc25A am G1-S-Übergang ist essentiell, während die Aktivierung des EGFR-abhängigen ERK-Signalweges der Progression des Zellzyklus zwar dient, jedoch allein nicht ausreichend ist, um diesen voranzutreiben.

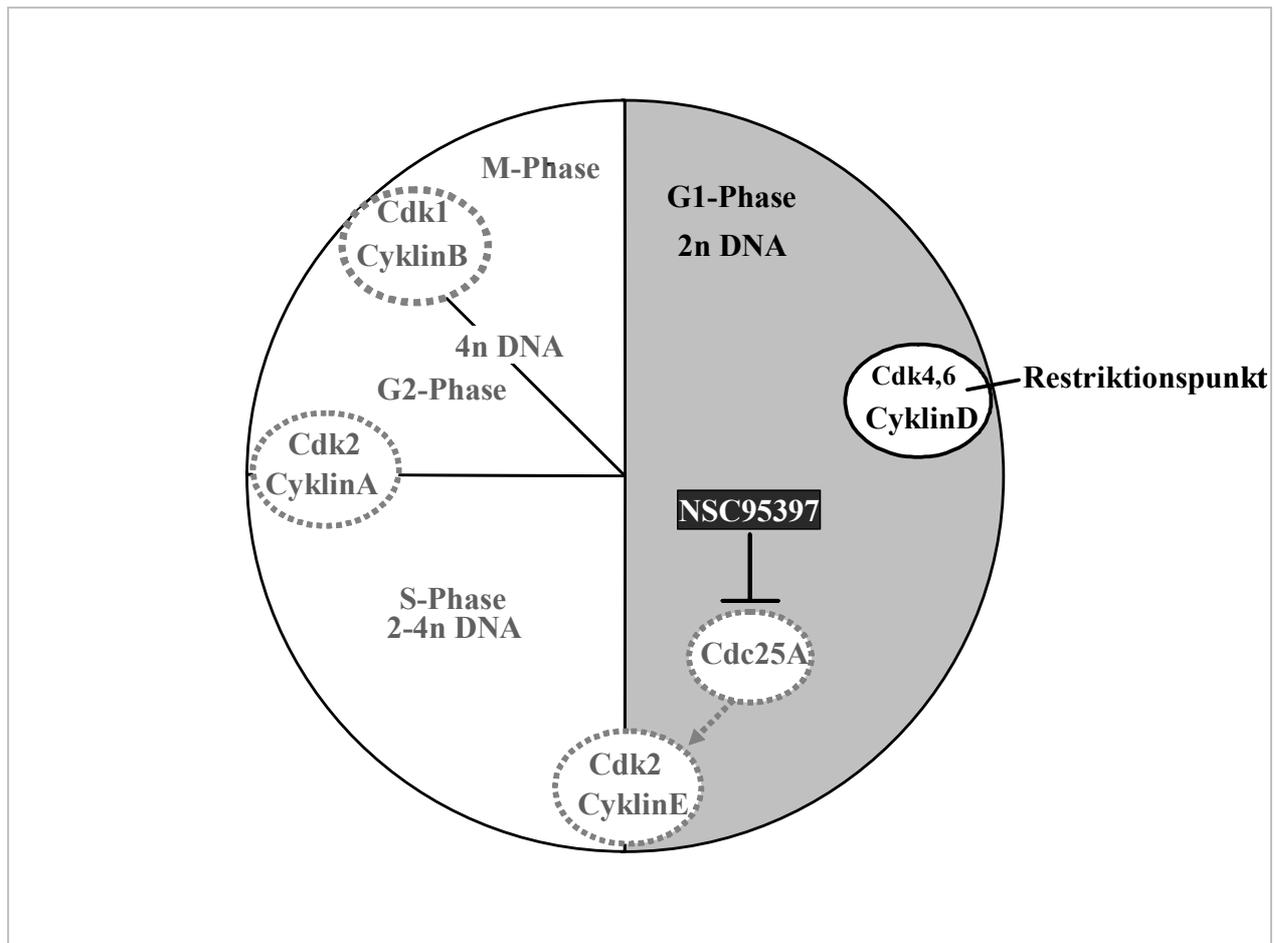


Abb.4.2: Schematische Darstellung der NSC95397-vermittelten Inhibierung von Cdc25A und des daraus resultierenden G1-Arrest. Weiße Regionen werden nach Inhibierung von Cdc25A durch NSC95397 nicht mehr durchlaufen, und die Zellen arretieren in der G1-Phase.

4.3 NSC95397-induzierte Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation

Neben den proliferativen Effekten führt die Aktivierung von ERK1/2 zu einer Hemmung der interzellulären Kommunikation durch eine Phosphorylierung von Cx43. Für die Bildung der Zell-Zell-Kanäle durch Cx43 ist zwar eine Phosphorylierung des Proteins notwendig, eine Hyperphosphorylierung des Proteins führt allerdings zum Verschluss der Kanäle und somit zu einer Hemmung der Kommunikation. Drei verschiedene Stellen in Cx43 die durch ERK1/2 phosphoryliert werden, sind bekannt, Ser255, Ser279 und Ser282. Alle drei liegen im zytoplasmatischen Teil des Cx43-Proteins (Warn-Cramer et al., 1996, Lampe and Lau, 2000 and Kim et al., 1999).

Die Untersuchung der Zell-Zell-Kommunikation hat gezeigt, dass die Behandlung mit NSC95397 zu einer Herabsetzung der Zell-Zell-Kommunikation führt (Abb.3.12), die mit Phosphorylierung der Serinreste 279/282 von Cx43 (Abb.3.13) einhergeht. Diese Phosphorylierung ließ sich durch die Verwendung der Inhibitoren AG1478, U0126 und PD98059 unterdrücken, was darauf hindeutet, dass die Hemmung der Zell-Zell-

Kommunikation in einem direkten Zusammenhang mit der NSC95397-abhängigen Aktivierung von ERK1/2 steht. Überraschenderweise konnte eine wiederhergestellte Zell-Zell-Kommunikation jedoch nur bei der Verwendung von U0126, nicht aber bei AG1478 und PD98059, festgestellt werden. Da alle drei Inhibitoren in der gleichen Signalkaskade wirken, wäre zu erwarten gewesen, dass die Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation in allen drei Fällen unterdrückt würde. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür zum einen darin begründet, dass U0126 der potenteste der drei verwendeten Inhibitoren, ist. Zum anderen wurden nur zwei der drei bekannten Phosphorylierungsstellen von Cx43 untersucht, so dass eine Phosphorylierung von Ser255, die ebenfalls in einer reduzierten Kommunikationsfähigkeit der Zellen resultiert, nicht auszuschließen ist. Im Fall von AG1478, das den EGFR hemmt, könnte eine weitere Ursache darin begründet sein, dass die DSP Cdc25A nicht nur als Phosphatase für den EGFR sondern auch als vermutliche Phosphatase für Raf-1 beschrieben ist (Xia et al., 1999). Raf-1 ist in der EGFR-Signalkaskade zwischen dem Rezeptor und den Kinasen ERK1/2 lokalisiert. Seine Stimulation könnte zum einen ERK1/2 aktivieren und bliebe zudem von der Hemmung des EGFR unbeeinflusst.

Es ist zu bemerken, dass die NSC95397-induzierte Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation mit der Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase einhergeht. Im Verlauf des Zellzyklus verändert sich das Maß an Zell-Zell-Kommunikation beständig. Während Zellen in der G1-Phase eher mäßig kommunizieren, steigt die Kommunikation in der S-Phase stark an, um in der G2/M-Phase wieder stark abzunehmen (Bittman & LoTurco, 1999; Stein et al., 1992). Somit ist nicht auszuschließen, dass die beobachtete NSC95397-induzierte Abnahme der Zell-Zell-Kommunikation, die für diese Phase charakteristische schwächere Kommunikationsfähigkeit der Zellen widerspiegelt und diese durch die Arretierung der Zellen in der G1-Phase deutlicher detektierbar ist, als bei Zellen, deren Zellzyklus „normal“ abläuft.

Die Hemmung der Kommunikation könnte jedoch auch eine andere oder vielleicht zusätzliche Ursache haben. Am 1. Restriktionspunkt in der G1-Phase überprüft die Zelle, ob genügend Nährstoffe für die Vollendung des gesamten Zellzyklus zur Verfügung stehen und ob DNA-Schäden vorhanden sind. DNA-Schädigungen führen zu einem raschen Abbau von Cdc25A, und die Zellen arretieren für die Dauer der DNA-Reparatur in der G1-Phase (Mailand et al., 2000). Die fehlende Cdc25A-Aktivität führt zu einer ERK1/2-Aktivierung, wie sie auch durch den Inhibitor NSC95397 hervorgerufen wird (Nemoto et al., 2004). Die daraus resultierende Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation verschafft der Zelle zusätzliche Ressourcen, da die Aufrechterhaltung der Kommunikation aufgrund der relativ niedrigen Halbwertszeit von Cx43 einen hohen Energieaufwand erfordert. Außerdem ermöglicht der

Verschluss der Zell-Zell-Kanäle eine mögliche Störung der DNA-Reparatur durch benachbarte Zellen zu unterbinden.

Mit Hilfe des 1,4-Naphthochinonderivates NSC95397 konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Zellzyklus-regulierenden Phosphatasen der Cdc25-Familie zu einer dauerhaften Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalweges führt und dadurch die Zell-Zell-Kommunikation gehemmt wird. Neben seiner bekannten Funktion im Zellzyklus hat Cdc25 also scheinbar auch die Aufgabe, die Zell-Zell-Kommunikation aufrechtzuerhalten. Diese implizierte Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kommunikation ist sinnvoll, da die Zelle hierdurch durch den umliegenden Zellverband kontrollierbar bleibt und auch selbst eine Kontrollfunktion ausüben kann. Eine Entkopplung dieser beiden Vorgänge, z. Bsp. Vollendung des Zellzyklus ohne intakte Zell-Zell-Kommunikation, erleichtert eine Entartung, wie sie beispielsweise bei der Tumorbildung zu beobachten ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass NSC95397 ein hohes Potential zur Inhibierung des Zellwachstums aufweist. Dieser Effekt wird von der Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalweges begleitet. Diese Aktivierung führt zu einer Hemmung der interzellulären Kommunikation, die eine Entartung von Zellen begünstigen könnte und somit eine unerwünschte Nebenwirkung darstellt. Dieser unerwünschten Nebenwirkung kann durch eine zusätzliche Behandlung mit U0126 entgegengewirkt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NSC95397, ein 1,4-Naphthochinonderivat und irreversibler Inhibitor der doppelt-spezifischen Cdc25 Phosphatasen, das als Hemmstoff für Krebszellwachstum untersucht wird, die Kinasen ERK1/2 in Leberephithelzellen aus der Ratte aktiviert. Mit Hilfe von Inhibitoren wurde gezeigt, dass diese Aktivierung auf der Ebene des EGF-Rezeptors (EGFR) beginnt und über MEK1/2 verläuft.

Diese Aktivierung des EGFR-abhängigen Signalweges ist durch Dicoumarol nicht hemmbar; eine Reduktion zum Hydrochinon durch die NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-1 ist also nicht notwendig. NSC95397-Behandlungen in Zellen, die mit Cdc25A-Antisense-DNA transfiziert wurden, weisen vielmehr darauf hin, dass die Aktivierung des EGFR und von ERK1/2 durch eine direkte Interaktion von NSC95397 mit der DSP Cdc25A hervorgerufen werden.

Neben der NSC95397-induzierten Aktivierung des EGFR-abhängigen MEK/ERK-Signalweges zeigte sich eine Hemmung der Proliferation und ein Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase. Dieser Arrest wurde durch die zusätzliche Hemmung des EGFR und von MEK1/2 nicht beeinflusst, jedoch resultierte diese Hemmung in einer Verminderung der durch NSC95397 hervorgerufenen Apoptoserate.

Die NSC95397-induzierte ERK1/2-Aktivierung resultierte in einer Hemmung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions, die durch Phosphorylierung von Connexin43 verursacht wurde. Beide Effekte ließen sich durch die Hemmung von MEK1/2 unterdrücken. Mit Hilfe des Inhibitors NSC95397 wurde also ein Zusammenhang zwischen der Zellzyklus-regulierenden Phosphatase Cdc25A, EGFR-abhängigen Signalwegen und der Zell-Zell-Kommunikation aufgezeigt. Interessanterweise steht dabei die Aktivierung eher proliferativer EGFR-abhängiger Signalwege einem NSC95397-induzierten Zellzyklusarrest gegenüber. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des EGFR und von ERK1/2 den Fortschritt des Zellzyklus zwar unterstützt, per se jedoch nicht ausreicht, um dessen Ablauf zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu reicht die Hemmung des EGFR-abhängigen Signalweges allein nicht aus, den Zellzyklus dauerhaft anzuhalten. Der EGFR-abhängige MEK/ERK-Signalweg ist dementsprechend der Funktion der DSP Cdc25A untergeordnet, wirkt bei der Progression des Zellzyklus jedoch unterstützend.

6. Literaturverzeichnis

- Adjei, A.A., (2001).
Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy.
J. Nat. Cancer Inst. **93/14**: 1062-1074.
- Berry L.D., Gould K.L. (1996).
Regulation of cdc2 activity by phosphorylation at T14/Y15.
Prog. Cell Cycle Res. **2**: 99-106.
- Bittman, K. S., LoTurco, J. J. (1999).
Differential regulation of connexin 26 and 43 in murine neocortical precursors.
Cereb. Cortex **9**: 188-195.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J. (2000).
Role of Quinones in Toxicology.
Chem. Res. Toxicol. **13**: 135-160.
- Bouzahzah, B., Nishikawa, Y., Simon, D., Carr, B.I., (1995).
Growth control and gene expression in a new hepatocellular carcinoma cell line, Hep40: inhibitory actions of vitamin K.
J Cell Physiol. **165**: 459-467.
- Bruzzone, R., White, T.W., Goodenough, D.A. (1996).
The cellular Internet: on-line with connexins.
Bioessays **18(9)**: 709-18.
- Carr B.I., Wang Z., Kar S. (2002).
K vitamins, PTP antagonism, and cell growth arrest.
J. Cell Physiol. **193**: 263-74.
- Fauman, E. B., Cogswell, J. P., Lovejoy, B., Rocque, W. J., Holmes, W., Montana, V. G., Piwnica-Worms, H., Rink, M. J., Saper, M. A. (1998).
Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A.
Cell **93**: 617-625.
- Eckstein, J. W., Beer-Romero, P., Berdo, I. (1996).
Identification of an essential acidic residue in Cdc25 protein phosphatase and a general three-dimensional model for a core region in protein phosphatases.
Prot. Science. **5**: 5-12.
- Gant, T.W., Ramakrishna Rao, D.N., Mason, R.P., Cohen, G.M. (1988).
Redox cycling and sulphhydryl arylation: their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes.
Chem-Biol Interact. **65**: 157-173.
- Galaktionov K., Jessup C., Beach D. (1995a)
Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation.
Genes Dev. **9**: 1046-58.

- Galaktionov, K., Lee, A.K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M., Beach, D. (1995b).
CDC25 phosphatases as potential human oncogenes.
Science. **269**: 1575-1577.
- Gasparotto, D., Maestro, R., Piccinin, S., Vukosavljevic, T., Barzan, L., Sulfaro, S., Boiocchi, M. (1997).
Overexpression of Cdc25A and Cdc25B in head and neck cancers.
Cancer Res. **57**: 2366-2368.
- Gu Y., Truck C.W., Morgan D.O. (1993).
Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit,
Nature. **366**: 707-710.
- Hallberg, B., Rayter, S.I., and Downward, J. (1994).
Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation.
JBC **269**: 3913-3916.
- Hartwell L.H, Kasten M.B. (1994).
Cell Cycle Control and Cancer.
Science. **266**: 1821-1828.
- Herrlich, P. and Böhmer, F.D. (2000).
Redox regulation of signal transduction in mammalian cells.
Biochem. Pharmacol. **59**: 35-41.
- Hernandez, S., Besser, X., Bea, S. (2001).
Differential expression of Cdc25 cell-cycle activating phosphatases in human colorectal carcinoma.
Lab. Invest. **81**: 465-473.
- Hoffmann, I., Draetta, G., Karsenti, E. (1994).
Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a Cdk2-cyclinE dependent phosphorylation at the G1/S transition.
EMBO J. **13**: 4302-4310.
- Hotz-Wagenblatt A., Shalloway D. (1993).
Gap junctional communication and neoplastic transformation.
Crit Rev Oncog. **4(5)**: 541-58.
- Hu J., Engman L., Cotgreave I.A. (1995).
Redox-active chalcogen-containing glutathione peroxidase mimetics and antioxidants inhibit tumour promoter-induced downregulation of gap junctional intercellular communication between WB-F344 liver epithelial cells.
Carcinogen. **16**: 1815-24.
- Hunter, T. (1995).
When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase.
Cell. **80**, 225-236.

- Jinno, S., Suto, J., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., Okayama, H. (1994).
Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle.
EMBO J **13**: 1549-1556.
- Keyse S.M., (2000).
Protein phosphatases and the regulation of mitogen –activated protein kinase signaling.
Curr. opin. Cell Biol. **12**: 186-192.
- Kim, D.Y., Kam, Y., Koo, S.K., and Joe, C.O. (1999).
Gating Connexin 43 Channels Reconstituted in Lipid Vesicles by Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation.
JBC **274**: 5581-5587.
- Klotz, L-O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J.M., Sies, H. (1999).
Mitogenactivated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-,) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA.
Eur. J. Biochem. **260**, 917-922.
- Klotz, L-O. (2002a).
Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen.
Biol. Chem. **383**, 443-456.
- Klotz, L-O., Patak, P., Ale-Agha, N., Buchczyk, D.P., Abdelmohsen, K., Gerber, P.A., von Montfort, C., Sies, H. (2002b).
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**: 4922-4923.
- Krutovskikh V., Yamasaki H. (1997).
The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis.
Histol. Histopathol. **12**: 761-8.
- Kudo, Y., Yasui, W., Ue, T., Yamamoto, S., Yokozaki, H., Nikai, H., Tahara, E. (1997).
Overexpression of cyclin-dependent kinase-activating CDC25B phosphatase in human gastric carcinomas.
Jpn. J.Cancer Res. **88**, 947-952.
- Laemmli, U. K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. **227**, 680-685.
- Lampe, P.D., Kurata, W.E., Warn.Cramer, B.J., Lau, A.F. (1998).
Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34^{cdc2}kinase.
J. Cell Sci. **111**: 833-841.

- Lampe, P.D., and Lau, A.F. (2000).
Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins.
Arch. Biochem. Biophys. **384**: 205–215.
- Langlois, W.J., Sasaoka, T., Saltiel, A.R., Olefsky, J.M. (1995).
Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation.
JBC **270**: 25320–25323.
- Lazo, J.S., Nemoto, K., Pestell, K.E., Cooley, K., Southwick, E.C., Mitchell, D.A., Furey, W., Gussio, R., Zaharevitz, D.W., Joo, B., Wpif, P. (2002).
Identification of a Potent and Selective Pharmacophore for Cdc25 Dusal Specificity Phosphatase Inhibitors.
Molecular Pharmacology **61**: 720-728.
- Leevers, S. J., Paterson, H. F., Marshall, C.J., (1994).
Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane.
Nature.**369**: 411-414.
- Levitz, S. M., and Diamond, R. D. (1985).
A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT.
J. Infect. Dis. **152**: 938-945.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., Schlessinger, J. (1992).
The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling.
Cell. **70**: 431–442.
- Mahns, A., Melchheier, I., Suschek, C.V., Sies, H., Klotz, L-O. (2003).
Irradiation of Cell with Ultraviolet-A (320-400 nm) in the Presence of Cell Culture Medium Elicits Biological Effects Due to Extracellular Generation of Hydrogen Peroxide.
Free Radic Res. **37**: 391-7.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., Lukas, J. (2000).
Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage.
Science.**288**: 1425-1429.
- Mailand, N., Podtelejnikov, A.V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., Lukas, J. (2002).
Regulation of G2/M events by CDC25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability.
EMBO J **21**: 5911-5920.
- Millar, J.B., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C., Russel, P. (1991).
p55Cdc25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**: 10500-10504.

- Musil L.S., Cunningham B.A., Edelman G.M., Goodenough D.A. (1990).
Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines.
J. Cell Biol. **111**: 2077-88.
- Nagata, A., Igarashi, M., Jinno, S., Suto, K., Okayama, H. (1991).
An additional homolog of the fission yeast *cdc25+* gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells.
Nem. Biology **3**: 959-968.
- Nasmyth K. (1996).
Viewpoint: Putting the Cell Cycle in Order.
Science.**274**: 1643-1645.
- Nemoto, K., Vogt, A., Oguri, T., Lazo, J.S. (2004).
Activation of Raf-1/MEK/ERK Kinase Pathway by a novel Cdc25 inhibitor in human Prostate Cancer Cells.
Prostate. **58**: 95-102
- Nilsson, I., Hoffman, I. (2000).
Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family.
Prog. Cell Cycle Res. **4**: 107-144.
- O'Brien, P.J., (1991).
Molecular Mechanisms of Quinone Cytotoxicity.
Chem.-Biol. Interactions **80**: 1-41.
- Osada, S., Saji, S., Osada, K., (2001).
Critical role of extracellular-regulated kinase phosphorylation on menadione (vitamin K3) induced growth inhibition.
Cancer (Phila.) **91**: 1156-1165.
- Peus, D., Meves, A., Vasa, R.A., Beyerle, A., O'Brien, T., Pittelkow, M.R. (1999).
H₂O₂ is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation.
Free Radic Biol. Med. **27 (11-12)**: 1197-1202.
- Pines J., (1995).
Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations.
Adv Cancer Res. **66**: 181-212.
- Prasad, K.N., Edwards-Prasad, J., Sakamoto, A. (1981).
Vitamin K3 (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture.
Life Sci. **29**: 1387-1392.
- Ray, L.B. and Sturgill, T.W. (1988).
Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**: 6940-6943.

- Ross, D., Thor, H., Orrenius, S., Moledeus, P. (1985).
Interaction of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) with glutathione.
Chem-Biol Interact. **55**: 177–184.
- Roovers, K., and Assioan, R. K., (2000).
Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery.
BioEssays **22**:818-826.
- Sadhu, K.S., Reed, I., Richardson, H., Russel, P. (1990).
Human homolog of fission yeast Cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in
G₂.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**: 5139-5143.
- Schlessinger J., Ullrich A. (1992)Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases.
Neuron. **9**: 383-391.
- Seger, R. and Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade.
FASEB J. **9**: 726-735.
- Serrano M., Hannon G. J., Beach D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control
causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.
*Nature.***366**: 704-707.
- Sies H., (1998). Biochemie des oxidativen Stress.
Angew. Chem. **98**: 1061-1075.
- Simon A.M., Goodenough D.A. (1998). Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends
Cell. Biol.* **8**: 477-83.
- Spray, D.C., Bennett, M.V., (1985). Physiology and pharmacology of gap junctions.*Annu
Rev Physiol.* **47**: 281-303.
- Stein, L. S., Boonstra, J. and Burghardt, R. C. (1992). Reduced cell-cell communication
between mitotic and nonmitotic cells.
Exp. Cell Res. **198**:1-7.
- Stevenson, M.A., Pollock, S.S., Coleman, C.N., Calderwood, S.K. (1994). X-irradiation,
phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-
3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates.
Cancer Res. **54(1)**: 5-12.
- Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K, Symons, M., Hancock, J. F. (1994).
Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane.
*Science.***264**: 1463-1467.
- Suttie, J.W. (1993). Synthesis of vitamin K-dependent proteins.
FASEB J **7**: 445–452.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979).
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:
procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**: 4350-4354.

- Treisman, R. (1996).
Regulation of Transkription by MAP kinase cascades.
Curr. Opin. Cell. Biol. **8**: 205-215.
- Trosko J.E., Ruch R.J. (1998).
Cell-cell communication in carcinogenesis.
Front. Biosci. **3**: D208-36.
- Tzeng W.F., Chiou T.J., Huang J.Y., Chen Y.H. (1992).
Menadione-induced cardiotoxicity is associated with alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis.
Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China, **16**: 84-90.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C., Helin, K., (1999).
CDC25A phosphatase is target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase.
Mol. Cell. Biol. **19**: 6379-6395.
- Vogt, A., Adachi, T., Ducruet, A.P., Chesebrough, J., Nemoto, K., Carr, B.I., Lazo, J.I., (2001).
Spatial Analysis of Key Signaling Proteins by High-content Solid-phase Cytometry in Hep3B Cells Treated with an Inhibitor of Cdc25 Dual-specificity Phosphatases.
JBC **276 (23)**: 20544-20550.
- Wang, X., Martindale, J. L., Holbrook, N. J. (2000).
Requirement for ERK Activation in Cisplatin-induced Apoptosis.
JBC **275 (50)**: 39435–39443.
- Wang, Z., Wang, M., Finn, F., Carr, B.I., (1995).
Growth inhibitory effects of vitamins K and their actions on gene expression.
Hepat. **22**: 876–882.
- Wang, Z., Meifang, W., Lazo, J.S., Carr, B. I., (2002).
Identification of Epidermal Growth Factor Receptor as a Target of Cdc25A Protein Phosphatase.
JBC **277**: 19470-19475.
- Warn-Cramer, B.J., Cottrell, G., Burt, J.M., Lau, A.F. (1998).
Regulation of Connexin-43 Gap Junctional Intercellular Communication by Mitogen-activated Protein Kinase.
JBC **273**: 9188-9196.
- Willecke K., Eiberger J., Degen J., Eckardt D., Romualdi A., Guldenagel M., Deutsch U., Sohl G. (2002).
Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome.
Biol. Chem. **383**: 725-37.

- Whitmarsh, A.J. and Davis, R J. (2000).
A central control for cell growth.
Nature. **403**: 255-256.
- Wu, W., Fan, Y. H., Kemp, B. L., Walsh, G., Mao, L. (1998).
Overexpression of Cdc25A and Cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc.
Cancer Res. **58**, 4082-4085.
- Wu, F.Y-H., Chang, N-T., Juan, C-C. (1993).
Vitamin K3-induced cell cycle arrest and apoptotic cell death are accompanied by altered expression of c-fos and c-myc in nasopharyngeal carcinoma cells.
Oncog. **8**: 2237–2244.
- Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D. (1993).
p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.
Nature. **366**: 701-704.
- Yoshimura, A., Ohno, T., (1988).
Lumiflavin-sensitized photooxygenation of indole.
Photochem. Photobiol. **48**: 561-565.
- Zhang, Z.-Y., Wang, Y., Wu, L., Fauman, E. B., Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Saper M. A., Dixon, J. E. (1994).
The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis.
Biochem. **33**: 15266-15270.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, Februar 2004