

**Regulation des EGF-Rezeptors durch
Tyrosinphosphatasen in der zellulären Antwort auf
reaktive Sauerstoffspezies**

Inaugural-Dissertation
zur

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

vorgelegt von

Claudia von Montfort

aus Neuss

**Düsseldorf
2004**

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

Referent: PD Dr. Lars-Oliver Klotz

Koreferent: Prof. Dr. Werner Kunz

Tag der mündl. Prüfung: 16. Juli 2004

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ALA	δ -Aminolävulinsäure (aminolevulinic acid)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BQ	Benzochinon
cdc	cell division cycle
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium
DMNQ	2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreit
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extrazellulär regulierte Kinasen 1/2
FCS	Fötales Kalbserum (fetal calf serum)
Gab-1	Grb2-associated binder-1
Grb2	growth factor receptor binding protein 2
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HOT	Hämatogene-Oxidations-Therapie
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase

NDPO₂	1,4-Endoperoxid von 3,3'-(1,4-Naphthyliden)dipropionat
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PH	Pleckstrin homologe Domäne
pI	isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PK	Proteinkinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	para-Nitrophenolphosphat
PP	Proteinphosphatase
pSer	Phosphoserin
PTB	Phosphotyrosin bindende Domäne
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
pThr	Phosphothreonin
pTyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RB	Bengalrosa (rose Bengal)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Src-homologe Domäne Typ 2
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
UE	Untereinheit

UV Ultraviolett

v/v volume/volume, ml Volumen in 100 ml Gesamtvolumen

w/v weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen

2.3.8.2 Vorbereitung der PTP1B	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Singulett-sauerstoff-induzierte Signaltransduktion	34
3.1.1 Hemmung von PTPasen durch Singulett-sauerstoff	34
3.1.2 Wirkung von Singulett-sauerstoff auf den EGFR	43
3.1.3 Ceramide als mögliche Mediatoren von Singulett-sauerstoff	45
3.2 UVA-induzierte Signaleffekte	47
3.2.1 Hemmung von PTPasen durch UVA	47
3.2.2 Wasserstoffperoxid als Mediator UVA-induzierter EGFR-Aktivierung	51
3.3 Chinone als Modulatoren EGFR-abhängiger Signaltransduktion	54
3.3.1 1,4-Naphthochinone als PTPase-Inhibitoren	54
3.3.2 Hemmung EGFR-regulierender PTPasen durch Chinone	55
4 Diskussion	59
4.1 Singulett-sauerstoff-induzierte Signaltransduktion	59
4.1.1 Hemmung von PTPasen durch Singulett-sauerstoff	59
4.1.2 Wirkung von Singulett-sauerstoff auf den EGFR	63
4.1.3 Ceramide als mögliche Mediatoren der Wirkung von Singulett-sauerstoff	64
4.2 UVA-induzierte Signaleffekte	64
4.2.1 Hemmung von PTPasen durch UVA	64
4.3 Chinone als Modulatoren EGFR-abhängiger Signalkaskaden	66
4.3.1 1,4-Naphthochinone als PTPase-Inhibitoren	66
4.3.2 Hemmung EGFR-regulierender PTPasen durch Chinone	67
5 Zusammenfassung	69
6 Literatur	71

1 Einleitung und Fragestellung

Zellen reagieren auf Veränderungen in ihrer Umgebung. Damit Signale von außen ins Innere der Zelle gelangen können, muss zunächst die Zellmembran als äußere Begrenzung der Zelle überwunden werden. Einige unpolare Signalmoleküle wie zum Beispiel Steroidhormone können durch die Zellmembran diffundieren und auf diese Weise in die Zellen eindringen. Die meisten Signalmoleküle sind jedoch so groß und polar, dass sie die Membran nicht passieren können, und geeignete Transportsysteme sind meist nicht vorhanden. Die Information, dass Signalmoleküle vorhanden sind, muss also durch die Zellmembran hindurch übertragen werden, ohne dass die Moleküle selbst in die Zelle gelangen. Diesen Informationstransfer durch die Membran übernimmt häufig ein membranassoziiertes Rezeptorprotein. Dabei handelt es sich um integrale Membranproteine, die sowohl extra- als auch eine intrazelluläre Domänen besitzen. Sie sind im Ruhezustand inaktiv und können durch Reize von außen aktiviert werden, zum Beispiel durch die Bindung eines Liganden an eine extrazelluläre Bindungsstelle. Der hierdurch aktivierte Rezeptor initiiert nun intrazellulären Informationsfluss.

1.1. Kinasen und Phosphatasen

Für Signaltransduktionsprozesse ist Proteinphosphorylierung von besonderer Bedeutung. Hierbei werden Zielproteine durch eine oder mehrere Proteinkinasen (PK) an bestimmten Stellen reversibel phosphoryliert, und diese Phosphatreste können durch spezifische Phosphatasen wieder entfernt werden. Der Grad der Phosphorylierung eines Proteins kann also durch Änderung sowohl der Kinaseaktivität, der Phosphataseaktivität, als auch beider, reguliert werden (HUNTER, 1995). Ein bekanntes Beispiel für einen Prozess, der durch das enge Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen reguliert wird, ist der Glycogenmetabolismus (SHENOLIKAR, 1994)

1.1.1 EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase

Proteintyrosinkinasen (PTK) der Familie des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) werden in zahlreichen epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert. Die EGFR-Familie umfasst vier nah verwandte

Rezeptor-PTKasen, EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Alle PTK des EGFR-Typs zeichnen sich durch eine modulare Struktur mit extrazellulärer ligandenbindender Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne, die die katalytische PTK Domäne enthält, aus. ErbB3 weist allerdings aufgrund von drei Mutationen in der PTK-Domäne eine stark verminderte Kinaseaktivität auf (KRAUS et al., 1989; PLOWMAN et al., 1990; HANKS und QUINN 1991), deshalb ist er für seine Aktivierung auf die Transphosphorylierung durch andere ErbB-Rezeptoren mit intakter Tyrosinkinaseaktivität angewiesen (SOLTOFF et al., 1994; BEERLI und HYNES 1996).

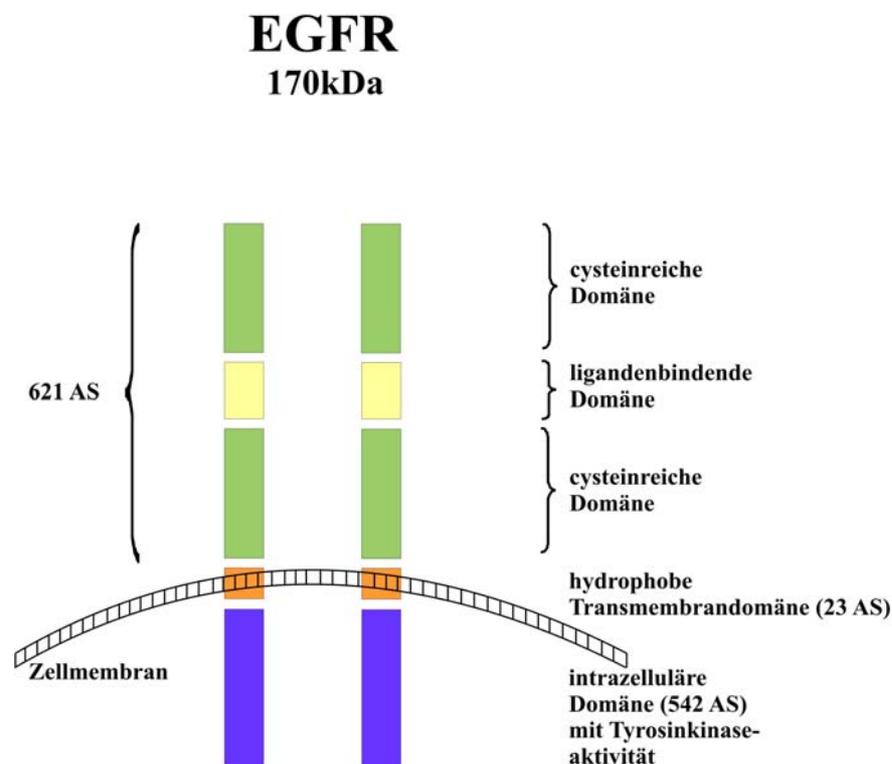


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des EGFR

Ein EGFR-Monomer (170 kDa) besteht aus dem extrazellulären Teil mit zwei cysteinreichen Domänen und ligandenbindender Domäne, der hydrophoben Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität.

Im Falle des EGFR kommt es durch Bindung des Liganden zur Dimerisierung des Rezeptors – dabei kann sowohl Homo- als auch Heterodimerisierung mit anderen ErbB-Typen auftreten – und der damit verbundenen Aktivierung der endogenen PTK mit nachfolgender Trans-Tyrosinphosphorylierung. Nach Bindung von Adapterproteinen an

die phospho-Tyrosine des Rezeptors kommt es zur Aktivierung von Signaltransduktionsprozessen, die regulierend auf Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben der Zelle einwirken (TIGANIS, 2002).

In Krebszellen liegt häufig eine EGFR- oder ErbB2-Überexpression oder eine Mutation vor, woraus eine Verstärkung oder Aktivierung von Signaltransduktionsprozessen resultiert, die einer karzinogenen Entartung Vorschub leistet, indem Progression, Invasion oder Metastasierung gefördert werden. (PRENZEL et al., 2001; YARDEN und SLIWKOWSKI, 2001; HARARI und YARDEN, 2000; OLAYIOYE et al., 2000; KIM und MÜLLER, 1999). So fand man zum Beispiel in Mamma-, Lungen- und Ovarienkarzinomzellen sowie in Glioblastomen höhere Expression von Mitgliedern der EGFR-Familie.

Bisher ist über die Proteintyrosinphosphatasen, die den EGFR (ErbB1) regulieren, vergleichsweise wenig bekannt. Da man beim EGFR mindestens fünf Hauptphosphorylierungsstellen identifiziert hat, ist es sehr gut möglich, dass verschiedene Phosphatasen an der Regulation des Rezeptors beteiligt sind. Obwohl noch keine EGFR-spezifischen Phosphatasen identifiziert wurden, sind einige Phosphatasen mit dem Rezeptor in Verbindung gebracht worden, darunter die Rezeptorphosphatasen RPTP σ und LAR (PULIDO et al., 1995) und die intrazellulären Phosphatasen SHP-1 (MATTHEWS et al., 1992), PTP1B (TONKS et al., 1988 a und b) und TCPTP (COOL, 1989 und 1990).

1.1.2 Proteintyrosinphosphatasen

Tyrosinphosphorylierung von intrazellulären Proteinen ist für Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung essentiell und spielt auch in der Ätiologie und Pathogenese von zahlreichen Krankheiten eine große Rolle. (TIGANIS, 2002). Der Gesamttyrosinphosphorylierungszustand der Zelle ist abhängig vom Zusammenspiel von Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen. Die Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen) bilden eine große Familie von Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Enzymen, die *in vivo* eine Vielzahl von Signalwegen kontrollieren (ANDERSEN et al., 2001; TONKS und NEEL, 2001).

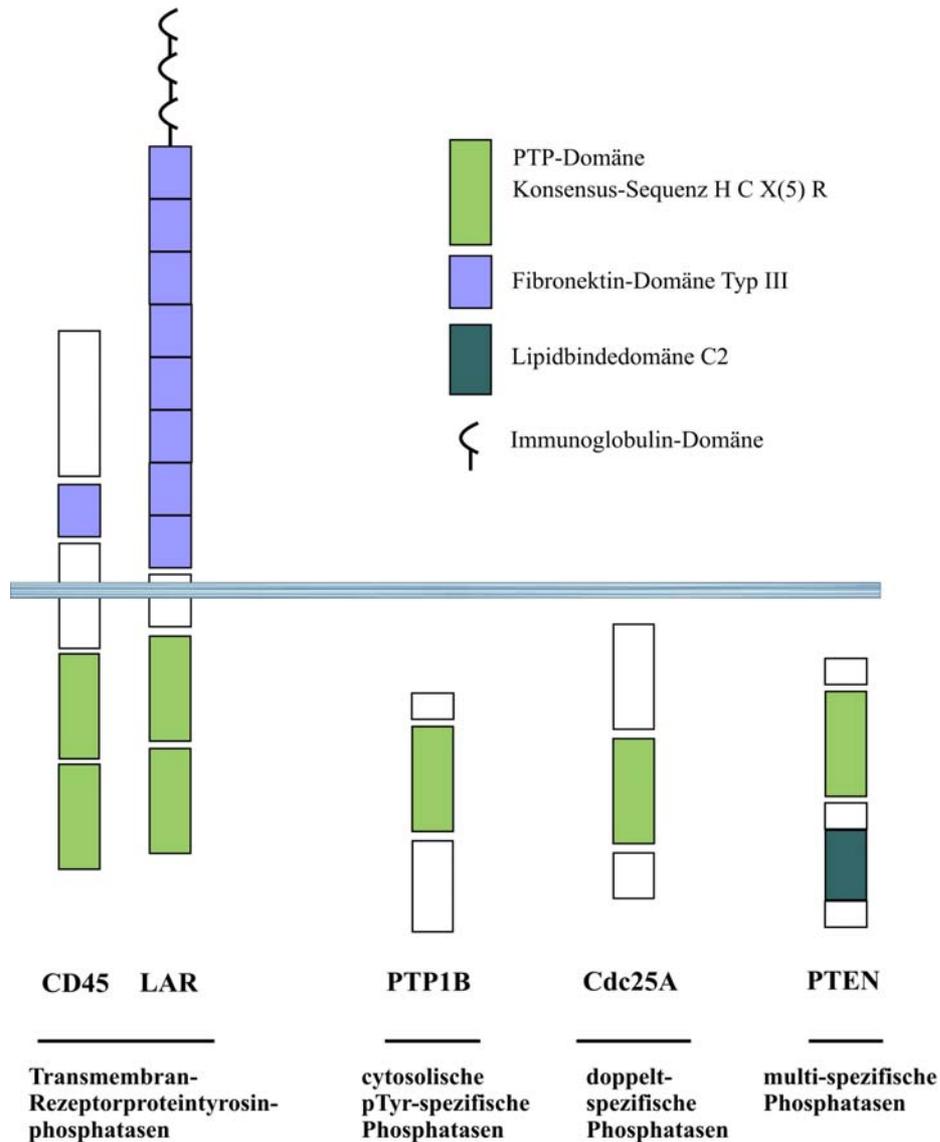


Abb. 1.2: Subtypen von Proteintyrosinphosphatasen und Beispiele

Ihnen ist die Inhibition durch Vanadat gemein, die Unempfindlichkeit gegenüber Okadainsäure und das Fehlen der Abhängigkeit von Metallionen, die Fähigkeit *p*-Nitrophenylphosphat zu hydrolysieren und ein Aktivitätsverlust durch Mutation des reaktiven Cysteins zu (FAUMAN und SAPER, 1996).

PTPs tragen ein charakteristisches Motiv, die Aminosäuresequenz $^1/VHCXXGXXR^S/T$. Diese Sequenz enthält einen konservierten Cysteinrest (BARFORD et al., 1995). Diesem reaktiven Cystein kommt eine besondere Rolle beim katalytischen Mechanismus der Proteine zu. Dabei handelt es sich um einen Zwei-Schritt-Mechanismus, der mit einem nucleophilen Angriff des S_γ -Atoms des katalytischen Cys an das P-Atom des Phosphotyrosyl-Substrates beginnt, bei dem ein Phospho-Enzym-Intermediat gebildet

wird. Im zweiten Schritt wird dieses Intermediat durch ein aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert (BARFORD et al., 1995).

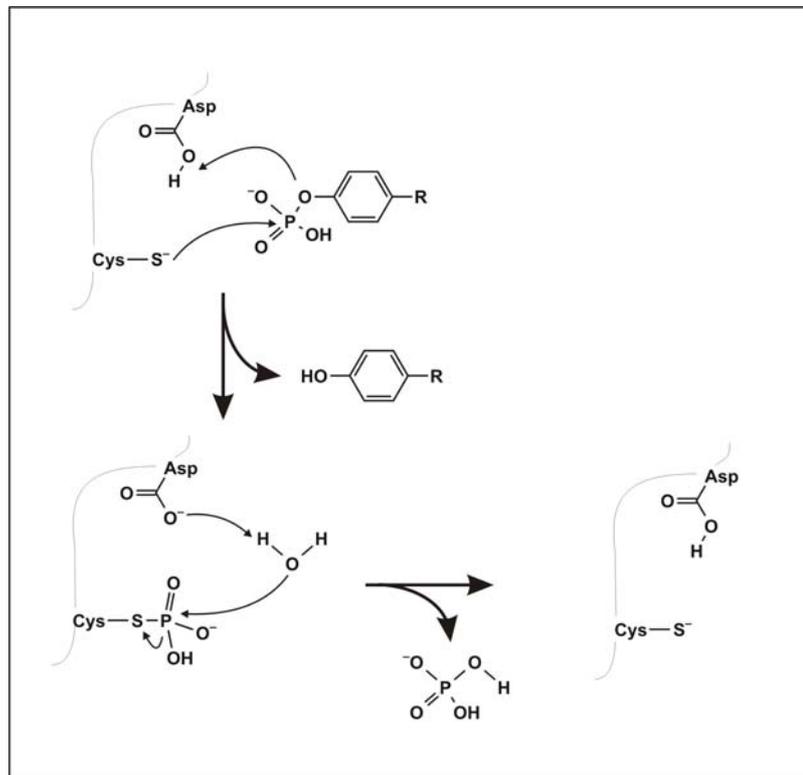


Abb. 1.3: Reaktionsmechanismus von Proteintyrosinphosphatasen

Ein nucleophiler Angriff des reaktiven Cysteins auf das P-Atom des phospho-Tyrosins führt zu einem Phosphoenzymintermediat, anschließend erfolgt die Hydrolyse.

Eine Besonderheit dieses reaktiven Cysteins ist der extrem niedrige pK_s-Wert der Sulfhydrylgruppe, welcher zum Beispiel bei der PTP1B bei ungefähr 5.4 liegt (LOHSE et al., 1997) – im Unterschied zum typischen pK_s-Wert von Cystein von 8.5. Durch diesen niedrigen pK_s-Wert, der aus den das Cystein umgebenden Aminosäuren Histidin, Serin und Threonin resultiert (FAUMAN und SAPER, 1996), eignet sich die Sulfhydrylgruppe bzw. das Cysteinthiolat besonders gut als Nucleophil, wird allerdings auch leichter oxidierbar.

Bis jetzt ist sehr wenig über die genaue Funktion oder Regulation bestimmter Phosphatasen bekannt (TIGANIS, 2002), jedoch wird als mögliche Regulation von PTPasen die Oxidation bestimmter Aminosäuren, vor allem des reaktiven Cysteins im aktiven Zentrum, diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung verschiedener PTPasen (LEE et al., 1998, CASELLI et al., 1998) einschließlich doppelt-

spezifischer Phosphatasen (DENU und TANNER, 1998) mit H_2O_2 zu einer Oxidation des reaktiven Cysteins zu Sulfensäure (Cys-SOH) führt. Das hat die Inaktivierung der Enzyme zur Folge, denn das oxidierte Cystein kann nicht länger als Phosphatakzeptor im ersten Schritt der PTPase-katalysierten Reaktion fungieren. Die Oxidation des Cysteins zu Sulfensäure ist reversibel (CLAIRBORNE et al., 1999) und bildet somit eine ideale Voraussetzung für eine Regulation der PTPase-Aktivität. Im Gegensatz dazu ist die höhere Oxidation von Cystein zur Sulfin- oder Sulfonsäure irreversibel. Man hat festgestellt, dass es auch zu einer reversiblen Glutathionylierung der Sulfensäure-Form der PTP1B kommen kann (BARRETT et al., 1999); dies wird als Mechanismus zum Schutz vor weiterer Oxidation diskutiert.

BAE et al. (1997) berichten, dass die Behandlung von A431-Zellen mit EGF zur Produktion von Wasserstoffperoxid führen kann, was mit einer Inhibition der PTP1B einhergeht. Die vermehrte intrazelluläre Produktion von Oxidantien wird seither als Auslöser der Steigerung der Tyrosinphosphorylierung nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren diskutiert (BAE et al., 1997, 2000; SUNDARESAN et al., 1995).

1.1.2.1 PTP1B

Die Proteintyrosinphosphatase PTP1B gehört zu den nicht-transmembranen Phosphatasen mit ubiquitärem Vorkommen. Es wurde gezeigt, dass sie *in vitro* an EGFR bindet (MILARSKI et al., 1993), obgleich sie keine SH2- oder Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB) enthält, mit der sie an phosphorylierte Tyrosinreste von Rezeptortyrosinkinasen binden könnte. PTP1B ist von Bedeutung in der Regulation von Mitogenese und Insulinstoffwechsel (BROWN-SHIMER et al., 1992; AHMAD et al., 1995).

PTP1B besitzt eine N-terminale katalytische Domäne und ein C-terminales regulatorisches Segment. Die 35 Aminosäuren des C-Terminus sind hydrophob und steuern die Phosphatase an die cytosolische Seite des Endoplasmatischen Retikulums (FRANGIONI et al., 1992). LAMMERS et al. zeigten 1993, dass in humanen 293-Zellen überexprimierte PTP1B EGFR dephosphorylieren kann. In dieser Studie wurde außerdem gezeigt, dass PTP1B den Tyrosin-phosphorylierten EGFR in der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren dephosphoryliert, aber keine Effekte auf die durch EGF induzierte Phosphorylierung hat, was vermuten lässt, dass PTP1B „irrtümlich“ aktivierten EGFR reguliert. „Substrate-trapping“-Experimente haben bestätigt, dass EGFR als Substrat für PTP1B dienen kann (TIGANIS et al., 1998; FLINT et al., 1997).

Für die Erkennung des EGFR durch die auf der ER-Membran verankerte PTP1B werden im Moment zwei Möglichkeiten diskutiert. Die erste ist, dass PTP1B den gerade synthetisierten EGFR dephosphoryliert, denn im ER erhält der Rezeptor die Fähigkeit zur Autophosphorylierung (SLIEKER et al., 1986). Auf diesem Wege könnte eine ligandenunabhängige Aktivierung des EGFR verhindert werden. In diesem Sinne wurde berichtet, dass ein Protein von ca. 180 kDa (EGFR hat ein MW von ungefähr 170 kDa) in PTP1B^{-/-} Zelllinien hyperphosphoryliert ist (CHENG et al., 2001) und PTP1B-defiziente Fibroblasten weisen eine erhöhte EGFR-Tyrosinphosphorylierung auf, ohne aber eine Hyperaktivierung der ERK2 - und Akt-Signalwege zu zeigen (TONKS und NEEL, 2001). Es könnte hier zwar ein kompensatorischer Mechanismus existieren, der die erhöhte Rezeptoraktivität ausgleicht, zum Beispiel in Form einer oder mehrerer Phosphatasen, oder aber der hyperphosphorylierte EGFR bleibt am ER und ist so nicht in der Lage, ERK2 oder Akt zu aktivieren.

Die zweite Möglichkeit für die Erkennung des EGFR durch die PTP1B besteht darin, dass das ER – und somit die sich dort befindlichen Phosphatasen – lokal in Kontakt mit der Plasmamembran tritt, so dass Zugriff auf den an der Plasmamembran lokalisierten EGFR besteht.

1.1.2.2 CD45

CD45 ist eine leukozytenspezifische, membranständige Proteintyrosinphosphatase (s. Abb. 1.2), die in allen Lymphozyten und auch in einigen polymorphkernigen Leukozyten exprimiert wird und sowohl für die Entwicklung von T-Zellen als auch für die antigeninduzierte T- und B-Zellaktivierung essentiell ist (TROWBRIDGE und THOMAS, 1994). Die extrazelluläre Region der CD45 zeigt eine hohe Heterogenität unter den verschiedenen Leukozyten-Typen; es existieren sehr unterschiedliche Isoformen, von 220 kDa auf B-Zellen bis zu 180 kDa auf T-Gedächtniszellen. Die Isoformen entstehen durch unterschiedliches Spleißen der drei Exons, die für den N-terminalen Bereich kodieren (JOHNSON et al., 1989; RALPH et al., 1987). Im Gegensatz zur variablen extrazellulären Region der Phosphatase handelt es sich bei dem intrazellulären Teil um eine invariante Region, die aus zwei ca. 300 Aminosäuren großen PTPase-Domänen besteht und einem ca. 80 Aminosäuren umfassenden C-Terminus (RALPH et al., 1987). Die Hauptphosphatase-Aktivität liegt dabei auf der membrannahen PTPase-Domäne; die Aktivität der C-terminalen PTPase-Domäne wird durch die membrannahe Domäne unterdrückt (TAN et al., 1993).

Als Substrate für die CD45 wurden *in vitro* und *in vivo* Mitglieder der Src-Kinase-Familie, p56^{lck} (OSTERGAARD et al., 1989; MUSTELIN und ALTMAN, 1990) und p59^{lyn}, identifiziert (MUSTELIN et al., 1992; SHIROO et al., 1992). Versuche von FURUKAWA et al. (1994) und MUSTELIN et al. (1995) ergaben, dass auch die für die Signalweiterleitung in T-Zellen nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors notwendigen Moleküle CD3 ζ und die ZAP-70-Tyrosinkinasen von CD45 dephosphoryliert werden.

1.1.3 MAPK und Akt

Zu den Signalmolekülen, die in Abhängigkeit von der Aktivierung von RTK (s. Kap. 1.1.1) aktiviert und durch PTPasen (s. Kap. 1.1.2) reguliert werden, gehören die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die an der zellulären Antwort auf mitogene Signale sowie umweltbedingten Stress beteiligt sind, und die Serin/Threonin-Kinase Akt, die ebenso wie ERK dem EGFR nachgestellt ist. Sie regulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und die Balance zwischen Überleben der Zelle und apoptotischem Zelltod.

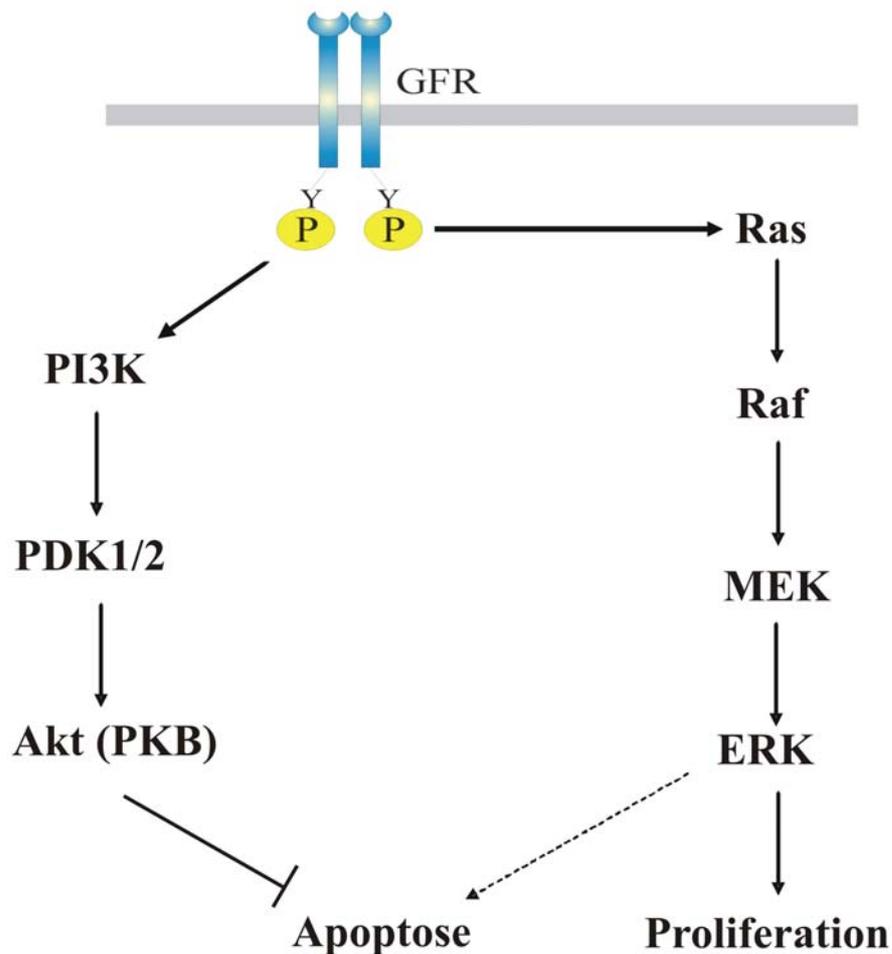


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der EGFR-Signalkaskade, die zur Aktivierung von Akt und ERK1/2 führt

GFR Wachstumsfaktorrezeptor (growth factor receptor); **PI3K** Phosphoinositid-3-Kinase; **PDK1/2** Phosphoinositid-abhängige Kinase 1/2 (phosphoinositide-dependent kinase-1/2; **PKB** Proteinkinase B; **MEK** MAPK/ERK-Kinase, **ERK** Extrazellulär-regulierte Kinasen

Die wichtigsten MAPK werden von vorgeschalteten Kinasen durch Thr- und Tyr-Phosphorylierung eines Thr-X-Tyr-Motives aktiviert (HAZZALIN und MAHADEVAN, 2002) und sind selber Prolin-gerichtete Ser/Thr-Kinasen, die wiederum ihre Substrate an Ser- oder Thr-Resten, die C-terminal von Prolin gefolgt sind, phosphorylieren.

Die klassischen MAPK sind die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERK) 1 (44 kDa) und 2 (42 kDa), die durch mitogene Stimuli wie Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Daneben führen auch Vitamin K₃ (Menadion), Wasserstoffperoxid, UV-Licht oder Phorbolster zu ihrer Aktivierung (OSADA et al., 2001; STEVENSON et

al., 1994; GUYTON et al., 1996; WANG et al., 1998; SACHSENMAIER et al., 1994). ERK1/2 modulieren, abhängig von Dauer und Stärke ihrer Aktivierung (ROOVERS und ASSOIAN, 2000), viele zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Zelltod. Für die vollständige Aktivierung sind dabei die Phosphorylierung des Threonins 202 und des Tyrosins 204 (RAY und STURGILL, 1988) essentiell.

Des Weiteren gibt es durch Stress aktivierbare Kinasen; dazu zählen die p38 MAPK, bestehend aus vier Mitgliedern von einem Molekulargewicht zwischen 38 und 43 kDa. Eine andere Gruppe bilden die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK), bestehend aus zehn Isoformen mit einem Molekulargewicht zwischen 46 und 57 kDa, die von drei Genen codiert werden, *jnk-1* bis *jnk-3*. Durch alternatives Spleißen entstehen schließlich die jeweiligen mRNAs.

Diese drei MAPK-Subfamilien weisen nicht nur Ähnlichkeit in ihrem Aktivierungsmechanismus auf, sondern auch in der Art, wie die Signalwege geschaltet sind: sie werden durch mehr oder weniger spezifische MAPK-Kinasen (MKK) aktiviert, die wiederum von MKK-Kinasen (MKKK) phosphoryliert und aktiviert werden. Weiter „stromaufwärts“ finden sich kleine GTP-bindende Proteine wie Ras. Transkriptionsfaktoren wie Elk1, Sap1, c-Jun oder ATF2 sowie weitere Proteinkinasen, die wiederum andere Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, gehören zu den Substraten von aktivierten MAPK. Durch die Phosphorylierung durch diese MAPK werden diese Faktoren aktiviert, und dies führt zur Synthese von Proteinen wie c-Jun und c-Fos, Bestandteile des „Leucizipper“-Transkriptionsfaktors AP1.

Bestrahlt man primäre humane Hautfibroblasten mit UVA (320-400 nm), so kommt es zu einer schnellen transienten Aktivierung von p38 und JNK, nicht aber von ERK1/2. Diese Effekte werden durch Singulett-Sauerstoff (vgl. Kap. 1.2.1) ausgelöst, wie unter Verwendung von $^1\text{O}_2$ -Quenchern und -Scavengern gezeigt wurde (KLOTZ et al., 1997 und 1999).

In Übereinstimmung damit sind nur p38 und JNK signifikant durch entweder chemisch oder photochemisch erzeugten $^1\text{O}_2$ zu aktivieren (KLOTZ et al., 1999). Durch Versuche mit verschiedenen Singulett-Sauerstoff-Quellen hat man herausgefunden, dass der Singulett-Sauerstoff dabei intrazellulär generiert werden muss. Während photochemisch durch Bestrahlung der Zellen in Anwesenheit des lipophilen Farbstoffes Bengalrosa (RB) entstandener Singulett-Sauerstoff zur Aktivierung der erwähnten Kinasen führt,

verhindert die Immobilisierung von RB an Agarose und die damit extrazelluläre Entstehung von $^1\text{O}_2$ die Aktivierung.

Ähnlich verhält es sich mit der lichtunabhängigen chemischen Freisetzung von $^1\text{O}_2$ durch thermischen Zerfall des membrangängigen 1,4-Endoperoxid von *N,N'*-bis(2,3-dihydroxypropyl)naphthalin-1,4-dipropionamid (DHPNO₂), das zur Aktivierung von p38 und JNK führt, im Gegensatz zu seinem ionischen Derivat, dem nicht membrangängigen NDPO₂ (KLOTZ et al., 1999).

Ein ähnliches Aktivierungsmuster von MAPK (also Aktivierung von p38 und JNK, nicht aber ERK1/2) zeigt sich nach Behandlung von Keratinocyten (HaCaT) mit 5-Aminolävulinat (ALA), gefolgt von Bestrahlung mit rotem Licht (ALA-photodynamische Behandlung). Aktivierung von p38 wird auch in menschlichen Melanomzellen beschrieben, die mit ALA-PDT behandelt werden (KLOTZ et al., 1998). Interessanterweise kann die Aktivierung von p38 durch UVA bereits bei viel geringeren Bestrahlungsdosen beobachtet werden, wenn die Hautzellen vorher mit ALA behandelt wurden (BUCHCZYK et al., 2001).

Im Gegensatz zu UVA und Singulett-Sauerstoff führt oxidativer Stress, der durch Behandlung mit alkylierenden Agenzien und Redoxcyclern wie Menadion hervorgerufen wird, zu einer Aktivierung von ERK1/2. Zwei weitere ROS, Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit, aktivieren alle drei genannten MAPK-Familien inklusive ERK1/2 (WANG et al., 1998; SCHIEKE et al., 1999), was darauf hindeutet, dass das MAPK-Aktivierungsmuster vom Typ des jeweiligen Oxidans abhängt. Eine bekannte biologische Konsequenz von JNK- und p38-Aktivierung durch Singulett-Sauerstoff und Singulett-Sauerstoff-generierende Behandlungen wie UVA-Bestrahlung oder PDT ist die Induktion von Apoptose, wie sie zum Beispiel von CHAN et al. (2000) gezeigt wurde. Dabei ist JNK für die Aktivierung von Caspase 3 und darauf folgende Apoptose nach Behandlung mit $^1\text{O}_2$ unabdingbar. In anderen Zellen wurde außerdem gezeigt, dass während der durch Singulett-Sauerstoff induzierten Apoptose Caspase 3 in Abhängigkeit von Caspase 8 aktiviert wird (ZHUANG et al., 2000).

Ein anderer Signalweg, der seinen Ursprung in der Autophosphorylierung des EGFR nimmt, ist der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg. Aktivierung von PI3K führt zur Bildung von 1,3-phosphorylierten Phosphoinositiden. Diese werden von der Akt-Pleckstrin-Homologie(PH)-Domäne erkannt, was zur Folge hat, dass Akt an die

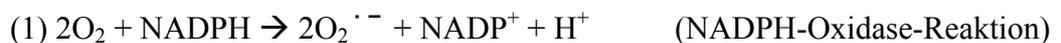
Zellmembran wandert und damit in die Nähe der Akt-Kinasen PDK1 und 2 gelangt, die Thr308 und Ser473 phosphorylieren und dann Akt aktivieren. (MURGA et al., 1998; COFFER et al., 1998; LEEVERS et al., 1999). Die Serin/Threonin-Kinase Akt (57 kDa) hat anti-apoptotische und proliferative Eigenschaften (COFFER et al., 1998; DATTA et al., 1997). Neben der Aktivierung durch Wachstumsfaktoren wird Akt durch Stressstimuli wie Hitzeschock oder Wasserstoffperoxid aktiviert (DATTA et al., 1999). Die Kinaseaktivität wird über Dephosphorylierung und Phosphorylierung von Thr308 und Ser473 reguliert, die im Bereich des C-Terminus angeordnet sind.

PKB/Akt reguliert den Glucosehaushalt und die Proteinsynthese der Zelle. Über die Aktivierung der p70 ribosomalen S6 Kinase (p70S6K) kommt es zur gesteigerten Translation spezifischer mRNAs. Akt phosphoryliert Transkriptionsfaktoren der „forkhead“-Familie wie FKHRL1 und AFX (BROWNAWELL et al., 2001; BRUNET et al., 1999) und inhibiert dadurch die Expression apoptotischer Proteine. Über die Phosphorylierung und Inaktivierung von BAD und Caspase 9 werden weitere Apoptosesignalwege inhibiert.

1.2 Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies

1.2.1 Singulett-Sauerstoff

Singulett-Sauerstoff ist eine elektronisch angeregte Form von molekularem Sauerstoff, die *in vivo* vor allem über zwei Wege entsteht: entweder photochemisch durch Anregung endogener Photosensibilisatoren durch Licht und anschließenden Transfer der Anregungsenergie auf den molekularen Sauerstoff im Grundzustand (Triplet-Zustand), oder in Dunkelreaktionen während einer Entzündung (Reaktion 1-4).



Hierbei entsteht Superoxid durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff, z. B. durch die NADPH Oxidase (1); es dismutiert zum Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff (2), wobei ersteres ein Substrat für die Myeloperoxidase ist, die Hypochlorit

generiert (3), welches mit Wasserstoffperoxid zu Singulett-Sauerstoff und Wasser reagiert (4).

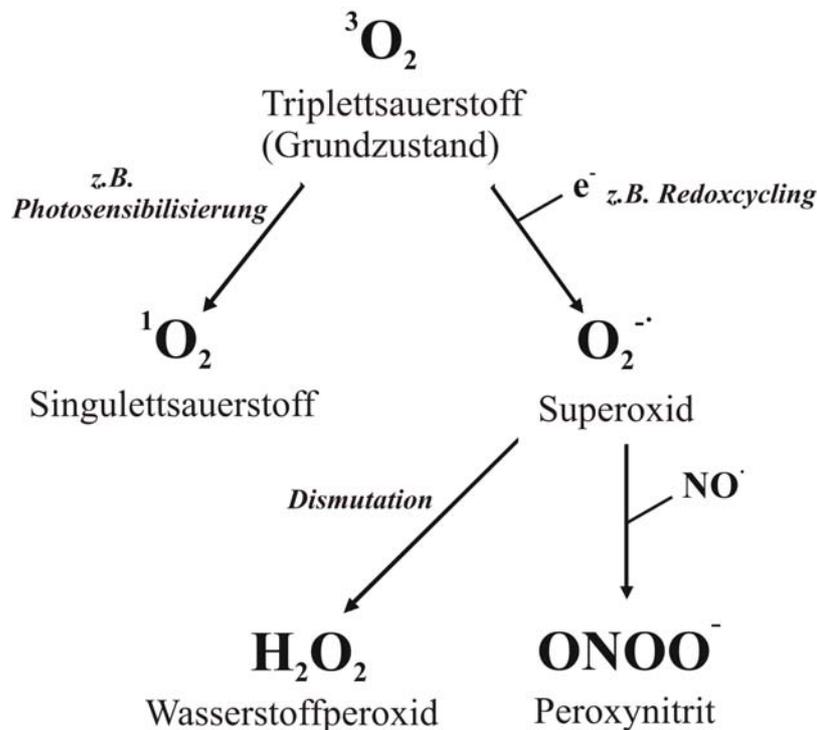


Abb. 1.4: Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies aus Triplett-Sauerstoff

Oxidation von Proteinen, Lipiden oder Nucleinsäuren durch Singulett-Sauerstoff kann zum Zelltod führen. Im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen ist diese Toxizität zum Beispiel für die Zerstörung von Mikroorganismen erwünscht. Auch wird Singulett-Sauerstoff in der Photodynamischen Therapie (PDT) einiger Krebsarten eingesetzt. Dabei werden die Krebszellen mit einem Photosensibilisator behandelt und anschließend Licht ausgesetzt. Durch die Bestrahlung werden dann reaktive Sauerstoffspezies gebildet, unter anderem Singulett-Sauerstoff, was zum Tod der Krebszellen führt.

Wie interagiert Singulett-Sauerstoff mit Biomolekülen, so dass Signalprozesse moduliert werden? Abhängig davon, ob ein positiver oder ein negativer Regulator eines bestimmten Signalweges generiert/aktiviert oder inaktiviert wird, resultiert dies entweder in einer Stimulation oder Inhibition eines Signalweges. Die Interaktion von

$^1\text{O}_2$ mit Biomolekülen führt hierbei zu Produkten, die ihrerseits wieder die Aktivität bestimmter Signalwege regulieren:

1. Die Interaktion von $^1\text{O}_2$ mit DNA führt zu Modifikationen, die durch Proteine für DNA-Reparatur oder für DNA-Schäden-abhängige Signalprozesse erkannt werden. Die Hauptmodifikation von Nucleinsäuren durch Singulett-Sauerstoff ist die Bildung von 8-oxo-(d)G [8-oxo-7,8-dihydro-(deoxy)guanosin] (RAVANAT und CADET, 1995; CADET et al., 2002; WILL et al., 1999). Häufig kommt es zu Einzelstrangbrüchen, aber für dsDNA sind auch Doppelstrangbrüche beschrieben, wenn auch nur bei sehr hohen $^1\text{O}_2$ -Konzentrationen (DI MASCIO et al., 1990). Entstehung von 8-oxo-dG ist die Basis für die Mutagenität von Singulett-Sauerstoff, es kommt zu G:C \rightarrow T:A Transversionen (PIETTE, 1991; SIES UND MENCK 1992).

2. Proteinoxidation durch Singulett-Sauerstoff führt zu Abbau durch das 20S-Proteasom (GRUNE et al., 2001). Die Aminosäuren Cystein, Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin sind besonders anfällig für Oxidation, und diese Modifikationen können Proteinaktivitäten ändern.

- Oxidation von Cysteinresten durch ROS führt zur Inaktivierung einer Fülle von Enzymen, unter anderem Tyrosin-Phosphatasen (siehe Abschnitt 1.1.2) (HERRLICH und BÖHMER, 2000). Aus dieser Inhibition kann dann eine Aktivierung einer Kinase resultieren, denn in Zellen, deren PTPasen gehemmt werden, würde es zu einer Netto-Steigerung der Tyrosin-Phosphorylierung kommen, durch die ein bestimmter Signalweg, der sonst durch Phosphataseaktivität abgeschaltet worden wäre, aktiviert wird/bleibt. Auch Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin) wird durch Singulett-Sauerstoff oxidiert. Es kommt zur Entstehung von entsprechenden Sulfinaten, Sulfonaten, Disulfiden und Disulfid-S-Oxiden (DEVASAGAYAM et al., 1991). Die beiden letzten Produkte sind, genauso wie Glutathionsulfensäure und S-Nitroso-Glutathion, in der Lage, Proteinthiole zu glutathionylieren (KLATT und LAMAS, 2000; HUANG und HUANG, 2002). Dies verändert reversibel die Reaktivität von verschiedenen Kinasen und Phosphatasen, unter anderem Protein Kinase A (HUMPHRIES et al., 2002), verschiedene Isoformen von Protein Kinase C, Protein

Kinase D (CHU et al., 2001), PTP1B (BARRETT et al., 1999), PP2A (RAO und CLAYTON 2002) sowie den Transkriptionsfaktor c-Jun (KLATT et al., 1999).

- Histidin-Oxidation durch $^1\text{O}_2$ wird für die Inaktiverung von mitochondrialen Permeabilitäts-Transition-Poren verantwortlich gemacht (SALET et al., 1997).
- Methioninreste werden durch ROS zu Methionin-Sulfoxiden oxidiert (LEVINE et al., 2000). Davon betroffen sind unter anderem zahlreiche Ionenkanäle und Hormone, deren Aktivität durch die Oxidation verändert wird.
- Tryptophan und Tyrosin-abhängige Peroxide entstehen durch die Einwirkung von Singulett-Sauerstoff auf Peptide und Proteine (WRIGHT et al., 2000 und 2002) und sind in der Lage, zelluläre Caspasen zu hemmen (HAMPTON et al., 2002), Schlüsselproteine im Apoptose-Prozess.

3. Die Oxidation von Lipiden kann zur Freisetzung von Lipidperoxidations-Produkten wie Malondialdehyd oder zur Produktion von Ceramiden (GRETHER-BECK et al., 2000) führen. Ceramide wiederum sind bekannte Aktivatoren von verschiedenen Signaltransduktionsprozessen, wie zum Beispiel durch den Transkriptionsfaktor AP2 induzierte Genexpression (GRETHER-BECK et al., 1996 und 2000).

1.2.2 Chinone

Chinone sind in zahlreiche biochemische Reaktionen involviert (BOLTON et al., 2000). Dazu gehören Redox-Reaktionen wie zum Beispiel beim Elektronentransport durch Ubichinon in der Atmungskette, Redoxcycling als Ergebnis einer Chinon-Reduktion gefolgt von einer Re-Oxidation durch molekularen Sauerstoff, bei der Superoxid entsteht, und die Carboxylierung von Koagulationsfaktoren unter Mitwirkung von K-Vitaminen.

Die Vitamin K-Familie besteht aus natürlich vorkommendem Vitamin K₁ (Phyllochinon), K₂ (Menachinon) und dem synthetisch hergestellten Vitamin K₃ (Menadion). Sie alle weisen das gleiche 1,4-Naphthochinon-Grundgerüst auf. Für die biologische Wirksamkeit von Vitamin K ist die Methylgruppe an Position 2 essentiell. Die K-Vitamine unterscheiden sich in der Länge der Seitenkette an Position 3, die für das Löslichkeitsverhalten und andere Eigenschaften verantwortlich ist. Vitamin K₁ kommt in pflanzlichen Lebensmitteln wie Sojabohnen, Milchprodukten, Muskelfleisch,

Tomaten, Hagebutten, grünem Gemüse und Kartoffeln vor. Vitamin K₂ dagegen wird von Darmbakterien synthetisiert.

Vitamin K₁ kann, da es fettlöslich ist, nur mit Hilfe von Gallensäure resorbiert werden. Daher kann die Resorption durch gleichzeitige Aufnahme von Fetten gesteigert werden. Im Körper ist Vitamin K im Blutplasma vorhanden und wird in Leber und Milz gespeichert. Reduziertes Vitamin K₁ fungiert als Cofaktor für γ -Glutamylcarboxylasen und spielt eine entscheidende Rolle bei der γ -Carboxylierung von Gerinnungsproteinen. Menadion zeigt im Vergleich zu Vitamin K₁ und K₂ eine niedrigere antihämorrhagische Wirkung auf.

Vitamin K-Derivate sind in der Lage, das Wachstum vieler Tumorzellen zu hemmen (KAR et al., 2002). Für Menadion konnte gezeigt werden, dass die hemmende Wirkung sowohl durch Alkylierung als auch durch Redoxcycling ausgelöst werden kann. Letzteres findet sich in Anwesenheit von Reduktionsmitteln, wobei zwei Wege bekannt sind; eine 1-Elektronen-Reduktion und die 2-Elektronen-Reduktion. Durch die 1-Elektronen-Reduktion – beispielsweise durch Cytochrom P450 Reduktase – entstehen Semichinone, die instabil sind und schnell mit Sauerstoff unter Bildung von Superoxid reagieren. Die 2-Elektronen-Reduktion führt zur Bildung des Hydrochinons, das hinsichtlich der Bildung von ROS eine niedrigere Reaktivität als Semichinon aufweist, da es durch Konjugation und Bildung von Glukuroniden oder Sulfaten eine Detoxifikation durchläuft. Andererseits kann es durch Autoxidation von Hydrochinonen auch zu Bildung von ROS kommen.

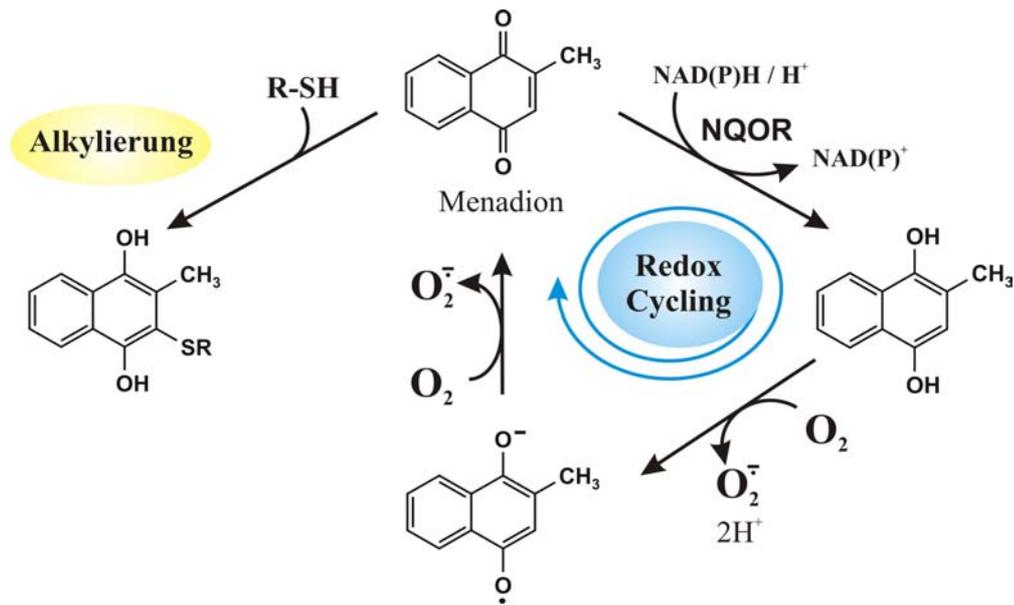


Abb. 1.6: Alkylierung und Redoxcycling als Reaktionswege des Menadions
NQOR NADPH-Chinon-Oxidoreduktase

Zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Chinonen gehören weiterhin 2,3-dimethoxy-1,4-naphthochinon (DMNQ), *p*-Benzochinon, Doxorubicin und NSC95397. Bei DMNQ handelt es sich um einen reinen Redoxcycler, dessen C-3 substituiert ist, was eine Alkylierung unmöglich macht (GANT et al., 1988). Benzochinon ist ein stark alkylierendes Chinon, und bei Doxorubicin handelt es sich um ein Anthrachinon-Derivat aus *actinomycetales sp.*, welches als Antitumor-Mittel bei der Behandlung von zahlreichen humanen Krebsarten wie Leukämie oder Brustkrebs eingesetzt wird (CALABRESI und CHABNER, 1996; CHABNER et al., 1996).

Menadion diente aufgrund seines wachstumsinhibitorischen Effekts auf Krebszellen als Ausgangspunkt für die Synthese zahlreicher Analoga, die bezüglich ihrer Zytotoxizität und ihres Einflusses auf den Zellzyklus untersucht wurden. NSC95397 (2,3-bis[(2-Hydroxyethyl)thio]-1,4-naphthochinon) ist 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 aufweist.

Abbildung 1.7 zeigt die Strukturformeln der oben erwähnten Chinone.

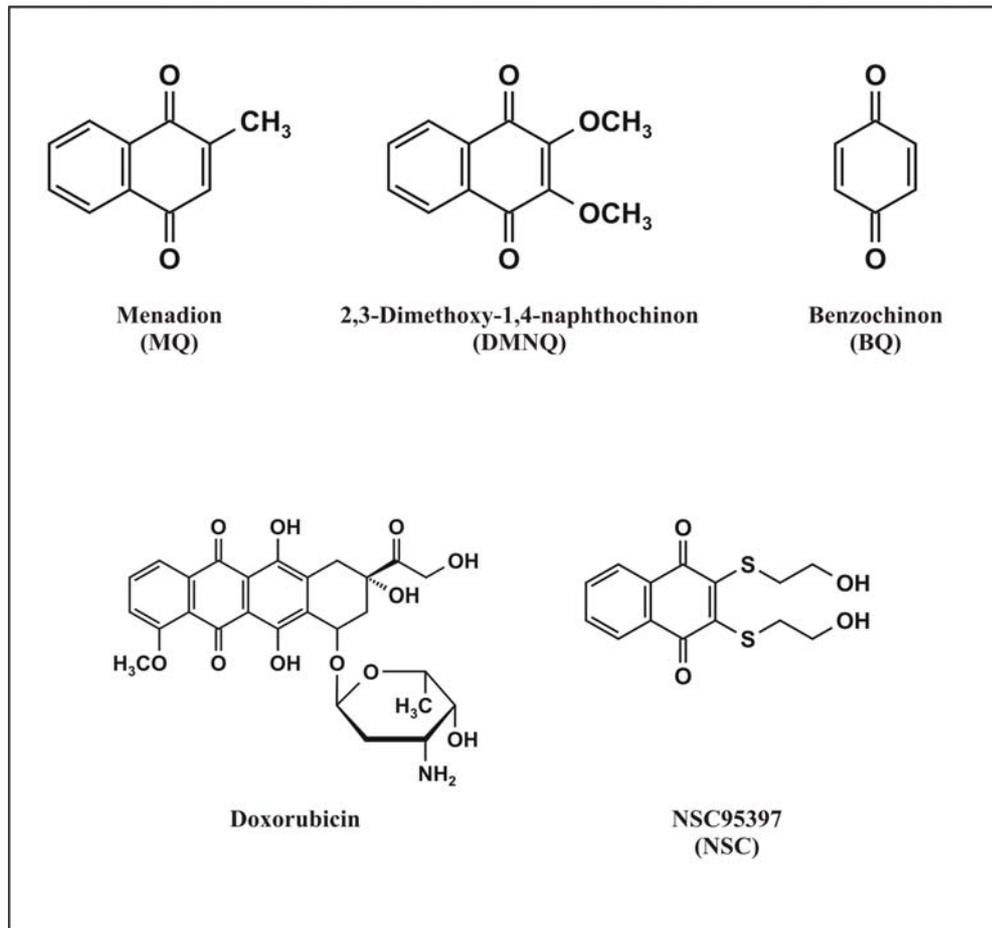


Abb. 1.7: Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chinone

1.3 Fragestellung

Einige reaktive Sauerstoffspezies beeinflussen bekanntermaßen von Wachstumsfaktoren aktivierte Signalwege. Beispielsweise führt Belastung mit Wasserstoffperoxid zu einer Aktivierung des EGFR, wobei postuliert wird, dass dies über eine Inhibition von Phosphatasen geschieht (KNEBEL et al., 1996). Dies wird auch für UVA-Bestrahlung diskutiert. Singulett-Sauerstoff, der durch UVA entsteht, führt zudem zu einer Aktivierung der Stresskinasen JNK und p38.

Ein Ziel dieser Arbeit lag nun darin, die Effekte von Singulett-Sauerstoff auf Phosphatasen zu untersuchen. Es stellten sich dabei folgende Fragen:

- 1) Ist Singulett-Sauerstoff ebenso wie Wasserstoffperoxid in der Lage, isolierte Phosphatasen und Phosphatasen im Zellsystem zu inhibieren?
- 2) Welche oxidativen Modifikationen finden sich bei mit Singulett-Sauerstoff behandelten Modellphosphatasen?
- 3) Beeinflusst Singulett-Sauerstoff den Phosphorylierungszustand des EGFR und EGFR-abhängige Signalwege?

Ebenso wie reaktive Sauerstoffspezies haben Redoxcykler wie Menadion einen Einfluss auf von Wachstumsfaktoren aktivierten Signalwege; es wurde gezeigt, dass bestimmte Chinone in der Lage sind, EGFR-Phosphorylierung zu induzieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob dies über die Hemmung von Phosphatasen zustandekommt.

2 Methoden

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 Antikörper wurden wie an jeweiliger Stelle nachfolgend angegeben bezogen.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Stammhaltung und Anzucht der Zellen

HeLa-Zellen (humanes Zervixkarzinom; European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, UK) wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) supplementiert war, in einer wasserdampfgesättigten, 37°C warmen Atmosphäre mit 5 % (v/v) Kohlendioxid kultiviert.

Zum Passagieren und Vermehren wurden die Zellen nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz mit PBS gewaschen und nach Abnahme des Waschpuffers mit einer Trypsin-EDTA : PBS Lösung (1:3) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2-5 min. mit dem Anzuchtmedium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen überführt.

Menschliche 1306-Hautfibroblasten (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) wurden auf dieselbe Weise in Kultur gehalten.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden möglichst in früheren Passagen verwendet. Nach dem Abstoppen der Trypsinierung (s.o.) wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (DMEM-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) wieder aufgenommen und mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryogefäßen bei -80°C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und in eine 75 cm² Kulturflasche mit Komplettmedium überführt. Um den DMSO-Gehalt im Medium auf unter 1% zu reduzieren und dadurch einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde sowohl nach 4-5 Std. als auch nach 24 Std. ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.1.3 Behandlung von Zellen

2.1.3.1 UVA-Behandlung

HeLa-Zellen wurden in Vollmedium bis zu einer Konfluenz von 80-100% auf 30mm-Zellkulturschalen herangezogen. Vor der Behandlung wurden sie über Nacht in serumfreiem Medium synchronisiert. Wenn benötigt, erfolgte eine Stunde vor der Bestrahlung eine Vorinkubation mit 1 mM Na_3VO_4 . Anschließend wurden die entsprechenden Zellen mit einer Intensität von 0.5, 15 oder 30 J/cm^2 (UVA700, Waldmann Lichttechnik, Villingen) in PBS oder serumfreiem DMEM ohne Phenolrot bestrahlt und danach sofort in 2x SDS-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) lysiert und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Zur Kontrolle wurde immer eine unbehandelte und eine mit EGF behandelte Probe mitgeführt. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung auf einem 8% SDS-Gel mit anschließender Western-Blot-Analyse (vgl. Kap. 2.3.4).

2.1.3.2 Behandlung der Zellen mit Bengalrosa/Licht oder C_2 -Ceramid

HeLa-Zellen bzw. 1306-Fibroblasten wurden in Vollmedium bis zu 80-100% Konfluenz auf 30 mm-Zellkulturschalen herangezogen und über Nacht ausgehungert. Die Zellen wurden mit 0.1 bzw. 0.3 μM Bengalrosa (Stammlösung: 10 mM in H_2O) behandelt und für 10 Minuten mit Weißlicht bestrahlt oder für 30 Minuten mit 10, 30 oder 50 μM C_2 -Ceramid (N-Acetyl-Sphingosin, Calbiochem, CA, USA; verdünnt wie angegeben in DMSO) inkubiert. Danach erfolgte eine weitere 30-minütige Inkubation mit EGF und im Anschluss daran die Zellyse mit 2x SDS-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). Die Analyse wurde mittel SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western-Blot durchgeführt (s. Kap. 2.3.4).

2.2 NDPO_2 -Synthese

Bei NDPO_2 handelt es sich um das 1,4-Endoperoxid von 3,3'-(1,4-Naphthyliden)dipropionat. Es ist ein hydrophiles Agens mit einer Halbwertszeit von 23 Minuten (37°C), das zu NDP, molekularem Sauerstoff und Singulett-Sauerstoff zerfällt. NDPO_2 wird als Singulett-Sauerstoff-Donor im zellfreien System benutzt.

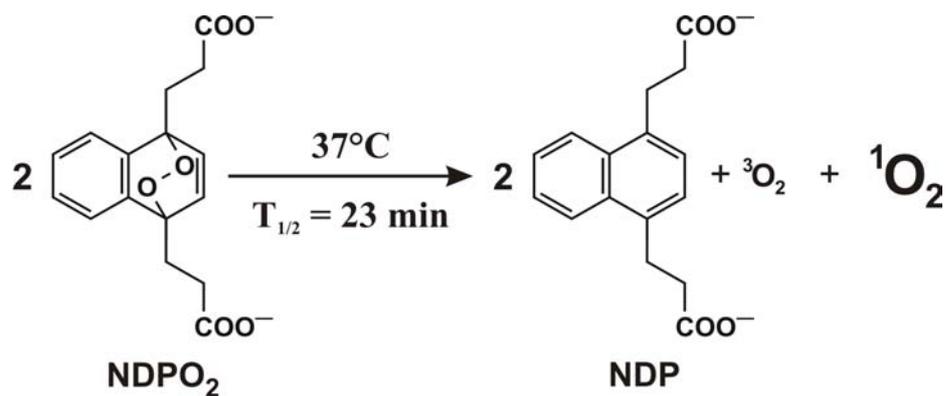


Abb. 2.1: Zerfall von NDPO₂ zu NDP, molekularem Sauerstoff und Singulett-sauerstoff

Die Synthese von NDPO₂ erfolgte aus NDP (Molecular Probes; USA). Nach der Vorbereitung von 2 M NaOH in D₂O (800mg/10ml) und 2 M Phosphorsäure (13.7ml 85% H₃PO₄/100ml), jeweils auf Eis, wurde 1 g NDP zusammen mit 2.42 g Na₂MoO₄·2H₂O, 168 mg NaHCO₃ und 212 mg Na₂CO₃ in 10 ml D₂O gelöst. Dazu eigneten sich 50 ml Plastik-Zentrifugationsröhrchen, getaucht in Wasser von etwa 20°C, mit Rührfisch auf dem Magnetrührer. Im Falle der Entstehung einer Suspension muss der Niederschlag in konzentrierter NaOH gerade aufgelöst werden. Es folgten nun fünf vorsichtige Zugaben von 30% H₂O₂ in etwa 14-minütigen Abständen (alles unter Rühren). 15 Minuten nach der letzten Zugabe wurde der Ansatz in Eiswasser getaucht. Der pH sollte nun bei 9 bis 10 liegen. Nach etwa 10 Minuten Vorkühlzeit erfolgte tropfenweises Zufügen von etwa 10 ml eiskalter 2 M Phosphorsäure (über etwa 5 Minuten) bis ein pH kleiner als 2 erreicht war. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten bei 4°C und 12000 xg zentrifugiert; zur besseren Handhabung sollte der Rührfisch davor nicht aus der Probe entfernt werden. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in eiskaltem Wasser resuspendiert; aufgrund des Rührfisches in der Probe genügte dazu das Halten der Probe über einen Magnetrührer. Nach erneuter Zentrifugation unter den oben beschriebenen Bedingungen mit anschließendem Verwerfen des Überstandes wurde der Rückstand auf Eis gehalten und in gerade so viel 2M NaOH/D₂O aufgenommen, dass das Präzipitat sich auflöste. Der pH-Wert sollte nun bei 7 liegen.

Die klare Lösung wurde sofort portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Eingefrorenes NDPO₂ wird zur Bestimmung der Ausbeute aufgetaut, in eiskaltem Wasser 1:5000 verdünnt und die Extinktion bei 290 nm bestimmt (E₀). Die Lösung wird sodann für 1 bis 2 Stunden bei 50°C oder 3 bis 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit zerfällt NDPO₂ unter ¹O₂-Freisetzung zum stabilen NDP. Es wird die Extinktion bei 290 nm gemessen (E₁), dabei gilt:

$$\begin{aligned}\varepsilon(\text{NDP})_{290} &= 7780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \varepsilon(\text{NDPO}_2)_{290} &= 140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\end{aligned}$$

Berechnung:

a) Gesamtkonzentration NDPO₂ und NDP:

$$[\text{NDPO}_2 + \text{NDP}]_0 = [\text{NDPO}_2 + \text{NDP}]_1 = [\text{NDP}]_1 = \{E_1 / \varepsilon(\text{NDP})\} \times 5000$$

b) Konzentration des Endoperoxids:

$$\begin{aligned}E_0 &= \varepsilon(\text{NDP})[\text{NDP}]_0 + \varepsilon(\text{NDPO}_2) [\text{NDPO}_2]_0 \\ &= \varepsilon(\text{NDP})[\text{NDP}]_1 - [\text{NDPO}_2]_0 + \varepsilon(\text{NDPO}_2)[\text{NDPO}_2]_0 \\ &= E_1 + [\text{NDPO}_2]_0(\varepsilon(\text{NDPO}_2) - \varepsilon(\text{NDP})) \\ [\text{NDPO}_2]_0 &= (E_0 - E_1) / (\varepsilon(\text{NDPO}_2) - \varepsilon(\text{NDP})) \\ &= (E_1 - E_0) / (\varepsilon(\text{NDP}) - \varepsilon(\text{NDPO}_2)) \\ &= (E_1 - E_0) / 7640\end{aligned}$$

$$[\text{NDPO}_2] = \{(E_1 - E_0) / 7640\} \times 5000$$

c) Ausbeute an Endoperoxid:

$$\begin{aligned}[\text{NDPO}_2] / [\text{NDPO}_2 + \text{NDP}] &= \{(E_1 - E_0) / (\varepsilon(\text{NDP}) - \varepsilon(\text{NDPO}_2))\} / (E_1 / \varepsilon(\text{NDP})) \\ &= (1 - E_0 / E_1) / (1 - \varepsilon(\text{NDPO}_2) / \varepsilon(\text{NDP})) \\ &= (1 - E_0 / E_1) / 0.982\end{aligned}$$

2.3 Analytik

2.3.1 Aktivitätstest isolierter Phosphatasen

Die Aktivität der Tyrosinphosphatasen PTP1B und CD45 (Calbiochem) wurde über die Dephosphorylierung des Substrates *p*-Nitrophenolphosphat (pNPP; Sigma-Aldrich) gemessen. CD45 (0.1 μM in 50 mM HEPES, pH 6.8) wurde mit NDPO₂, Menadion oder DMSO (Kontrolle) in den benötigten Konzentrationen für 10 bzw. 15 min. in einem Volumen von 50 μl inkubiert und dann zu 750 μl pNPP/HEPES (2 mM pNPP in

50 mM HEPES, pH 6.8) gegeben. Es bildete sich *p*-Nitrophenol, was zu einer Zunahme der Absorption bei 405 nm führte. Die Bildung von *p*-Nitrophenol kann unter Zuhilfenahme des pK_s von 7.15 für *p*-Nitrophenol und des Extinktionskoeffizienten ϵ_{405} von $18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Nitrophenolat nach Korrektur für die spontane Hydrolyse von pNPP berechnet werden.

2.3.2 Test auf Hemmung EGFR-regulierender Phosphatasen

Der hier beschriebene Test auf die Inhibition EGFR-regulierender Phosphatasen geht auf den von KNEBEL et al. (2000) beschriebenen Phosphatase-Assay im Zellsystem zurück. In diesem Test wird die Netto-Aktivierung des EGFR untersucht, aus der man Rückschlüsse auf eine eventuelle Hemmung von EGFR-regulierenden Phosphatasen ziehen kann. Über Nacht in serumfreiem DMEM inkubierte Zellen werden mit EGF stimuliert und anschließend mit einer Substanz inkubiert, bei der es sich um einen potentiellen PTPase-Inhibitor handelt. Anschließend werden die Zellen kurz mit einem Kinaseinhibitor behandelt und direkt danach lysiert. Wenn es sich nun bei dem zu testenden Agens um keinen Phosphatase-Inhibitor handelt, so ist im darauffolgenden Western-Blot (s. Kap. 2.3.6) auf EGFR-Phosphorylierung keine solche mehr zu detektieren; durch die EGF-Stimulation wurde der Rezeptor aktiviert, anschließend aber durch Phosphatasen dephosphoryliert, und durch die Inkubation mit einem Kinase-Inhibitor war keine neuerliche Autophosphorylierung möglich. Handelte es sich bei dem zu testenden Agens jedoch um einen PTPase-Inhibitor, so würde in der anschließenden Western-Blot-Analyse (s. Kap. 2.3.6) noch ein phospho-EGFR-Signal zu detektieren sein, da der Rezeptor nicht dephosphoryliert worden sein kann. Abb. 2.2 zeigt eine schematische Darstellung des Tests.

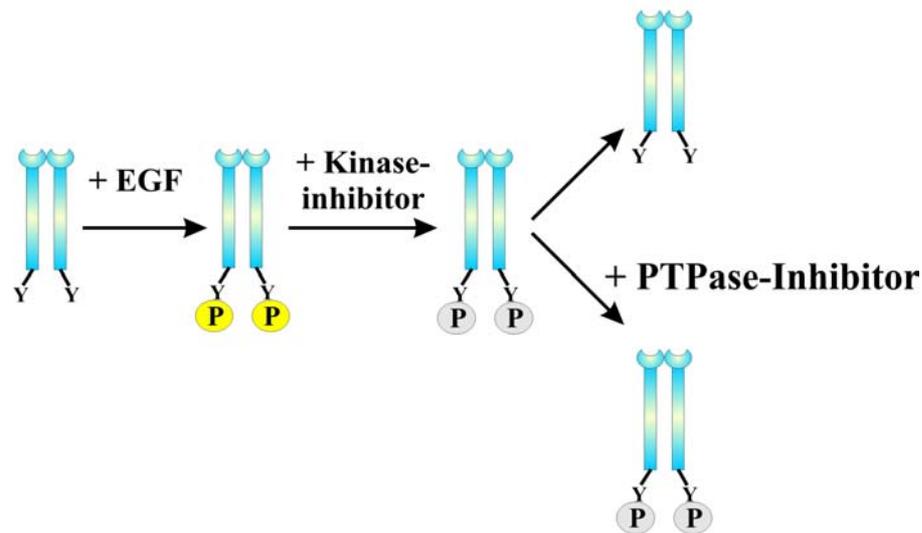


Abb. 2.2: Test auf Hemmung EGFR-regulierender Phosphatasen

HeLa-Zellen wurden in Vollmedium bis zu 80-100%iger Konfluenz in 30 mm-Zellkulturschalen herangezogen. Vor der Behandlung wurden sie über Nacht in serumfreiem Medium synchronisiert. Durch Zugabe von EGF (100 ng/ml) für 5 Minuten wurde die EGFR-Phosphorylierung stimuliert, anschließend erfolgte Waschen der Zellen mit PBS und die Behandlung mit dem zu testenden Agens (z.B. 15 Minuten Menadion (100 μ M) in serumfreiem DMEM). Nach Entfernen der zu testenden Lösung werden die Zellen für 30 Sekunden mit dem EGFR-Inhibitor Compound 56 (10-20 μ M in 0% DMEM) behandelt und anschließend sofort in 100 μ l 2x SDS-Probenpuffer (s.o.) lysiert und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Es folgt die elektrophoretische Auftrennung auf einem 8% SDS-Gel (s. Kap. 2.3.4) und anschließende Western-Blot-Analyse (s. Kap. 2.3.6) auf Tyrosinphosphorylierung des EGFR.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.3.3.1 Proteinbestimmung durch Coomassie-Spot-Test nach MINAMIDE und BAMBURG (1990)

Bei dieser Methode werden 1 μ l der zu analysierenden Proteinprobe unbekannter Konzentrationen sowie je 1 μ l einer BSA-Eichreihe bekannter Konzentration auf Whatman Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) pipettiert. Nach etwa dreiminütigem Trocknen wird das Filterpapier in Färbelösung (0.25% (w/v) Coomassie

Brilliant Blue G 250, 10% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure 98%) getränkt. Anschließend erfolgt die Entfärbung unter mehrfachem Wechseln der Entfärbelösung (10% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure 98%). Dies geschieht so lange, bis die unspezifische Hintergrundfärbung verschwunden ist und nur noch die blau gefärbten Proteinproben zu erkennen sind. Durch den optischen Vergleich der Farbintensitäten von Eichreihe und Probe kann eine Konzentrationsbestimmung vorgenommen werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0.1 µg Protein/µl.

2.3.3.2 Proteinbestimmung nach BRADFORD

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.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das amphiphile Detergens SDS lagert sich stöchiometrisch (1.4 g SDS/g Protein; WILSON und GOULDING, 1991) an Proteine an (nicht aber an Kohlenhydratreste bei Glykoproteinen). Dabei scheint sich ein SDS-Protein-Komplex mit einer kettenähnlichen Micellenstruktur zu bilden (SAMSÓ et al., 1995); das Protein wird dabei denaturiert.

Die aufgetrennten Proteine können angefärbt, immunologisch nachgewiesen oder, bei radioaktiven Proben, per Autoradiographie, nach Ausschneiden und Cerenkov-Zählung quantifiziert werden.

Je nach aufzutrennendem Bereich werden Polyacrylamid-Gele im Bereich von 6 bis 15% Acrylamid verwendet. Um scharfe Proteinbanden zu erhalten, wird das diskontinuierliche Verfahren benutzt. Dabei werden die Proben zunächst in einem großporigen Sammelgel bei pH 6.8 (Länge ca. 1.5 cm) zu einer scharfen Bande konzentriert, bevor sie in einem engporigen Trenngel bei pH 8.8 aufgetrennt werden.

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.

2.3.5 Kolloidale Peptidfärbelösung nach BLAKESLEY et al. (1997)

Die Färbung von Proteingelen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch eine Peptidfärbelösung, die Coomassie Blue G-250 in kolloidaler Form enthält. Der Farbstoff ergibt mit Proteinen eine reversible Blaufärbung, indem er an die basischen Seitenketten der Aminosäuren bindet.

Das Trenngel wird nach beendeter SDS-PAGE für mehrere Stunden in die Lösung gelegt und anschließend in Wasser entfärbt, bis sich die blauen Proteinbanden deutlich von der durchsichtigen Gelmatrix abheben.

Die Sensitivität dieser Färbemethode liegt bei 0.1 bis 0.2 µg Protein pro Bande.

Zur Herstellung der Peptidfärbelösung wurden zuerst 0.8 g Coomassie G250 in 400 ml Wasser unter Rühren gelöst und dies wurde dann mit 400 ml 1 M H₂SO₄ (= 21.3 ml 95% H₂SO₄; M: 98.08; D: 1.82) aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert, wobei sich ein braunes Filtrat ergab. Nach Zugabe von 88 ml 10 M KOH (M:56.1; d.h. 49.3 g/88 ml) und 124 ml 100% TCA (124 g auf 124 ml auffüllen) ergab sich eine grüne, kolloidale Lösung.

2.3.6 Western-Blot

Proteine in Polyacrylamidgelen können auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen und spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen werden. Bei diesem als Western-Blotting bezeichneten Prozess bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden. Für diesen elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Systeme im Einsatz, das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Tank-Blot-System und das Semidry-Blot System. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran müssen zuerst die übriggebliebenen freien Bindestellen auf der Membran blockiert werden, da sich sonst die Antikörper an diese Bindungsstellen heften und

einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen würden. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein. Dafür eignen sich meistens BSA oder Milchpulver.

Um die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachzuweisen wird ein Spezies-spezifischer sekundärer Antikörper verwendet, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt ist. HRP kann die Oxidation von Luminol katalysieren und dadurch eine Chemilumineszenz auslösen, deren Intensität über Schwärzung eines Films gemessen wird.

Die nachfolgend angegebenen Werte beziehen sich auf ein 10%iges SDS-Gel, 1.5 mm dick, für einen guten Transfer von Proteinen im Bereich um 40-170 kDa. Verwendet wurde eine Invitrogen-Novex-Mini-Cell-Tank-Apparatur. Bei anderen Voraussetzungen müssen die optimalen Transferbedingungen empirisch ermittelt werden.

Für die Durchführung werden pro Gel zwei Whatman Filterpapiere und eine Hybond™-(PVDF)-Membran der Firma Amersham Biosciences in der Größe des Trenngels benötigt (ca. 9 cm x 7 cm). Die Filterpapiere und Schwämme werden in Transferpuffer (5 mM Tris, 38.4 mM Glycin, 20% Methanol) eingeweicht; die PVDF-Membran muss vor der Benutzung in Methanol aktiviert werden (ca. 10 Sekunden) und wird anschließend auch in Transferpuffer gelegt. Zwei in Transferpuffer getränkte Schwämme werden auf die Kathode gelegt; darauf kommt ein eingeweichtes Filterpapier, auf welchem das Trenngel luftblasenfrei positioniert wird. Die PVDF-Membran wird nun ebenfalls luftblasenfrei auf das Gel gelegt, dann folgt das nächste Filterpapier. Anschließend folgt entweder ein getränkter Schwamm und ein zweites Gel mit Membran und Filterpapier (mehr als zwei Gele sollten aber in der Apparatur nicht geblottet werden) oder aber ausreichend in Transferpuffer getränkte Schwämme, um die Apparatur zu füllen. Für den Transfer über Nacht hat sich eine Spannung von 12 Volt als geeignet herausgestellt; alternativ kann auch über Tag 3-4 Stunden bei einer Spannung von 25 Volt geblottet werden.

Nach dem Transfer wird die PVDF-Membran für eine Stunde oder über Nacht in Blockierungspuffer (5% (w/v) BSA oder Milchpulver in TBST (0.1% Tween 20 in TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 7.5)) gelagert, dies dient dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen (zu beachten ist hierbei die Wahl des Blockierungsmittels, im Rahmen dieser Arbeit wurde BSA zum Blocken von Membranen benutzt, die auf pEGFR oder pY untersucht werden sollten, für alle anderen

Blots wurde Milchpulver benutzt). Zur Kontrolle auf erfolgreichen Transfer kann die Membran vor dem Blockieren für eine Minute in Ponceau S-Lösung (5% (v/v) Essigsäure, 0.1% (w/v) Ponceau S) geschwenkt und dann in Wasser entfärbt werden; Proteinspuren und -banden werden dabei rot sichtbar. Anschließend folgt die Inkubation mit dem primären Antikörper entweder über Nacht bei 4°C oder für drei Stunden bei Raumtemperatur. Nach einer Stunde waschen mit TBST, wobei dieses mehrfach gewechselt werden sollte, erfolgt dann die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrift mit TBST (auch hier sollte der Puffer öfters gewechselt werden) von mindestens einer Stunde erfolgt die Entwicklung mittels ECL-Reaktion mit dem „SuperSignal® West Pico Chemiluminescent“ Substrat (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben.

Es folgt eine Liste der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper mit ihren Verdünnungen:

- Anti-phospho-EGFR (Tyr1068) (Biosource, Camarillo, CA, USA; # 44-788)
1:2000 in 1% (w/v) BSA/TBST
- Anti-total-EGFR (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA; # 06-847)
1:1000 in 1% (w/v) Milchpulver/TBST
- Anti-phospho-Tyrosin (Upstate Biotechnology; # 05-321) 1:1000 in 1% (w/v)
BSA/TBST
- Anti-phospho-p38 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; # 9211S)
1:1000 in 1% (w/v) Milchpulver
- Anti-total-p38 (Cell Signaling Technology; # 9212) 1:1000 in 1% (w/v)
Milchpulver
- Anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Beverly,
MA, USA; 9101S) 1:5000 in 1% (w/v) Milchpulver/TBST
- Anti-total-ERK1/2 (Cell Signaling Technology; # 9102) 1:5000 in 1% (w/v)
Milchpulver/TBST
- Anti-phospho-Akt Ser₄₇₃ (Cell Signaling Technology; # 9271S) 1:1000 in 1%
(w/v) Milchpulver
- Anti-total-Akt (Cell Signaling Technology; # 9272) 1:1000 in 1% (w/v)
Milchpulver
- Anti-Rabbit-HRP (Dianova, Hamburg; # 111-035-144) 1:3000 in TBST

- Anti-Mouse-HRP (Pierce, Rockford, IL, USA) 1:20000 in TBST

2.3.7 „Strippen“ der Western-Blots

Zum Entfernen von Antikörpern von proteinbeladenen Membranen bedient man sich eines Gemisches aus SDS und β -Mercaptoethanol. Dazu wird die Blotmembran für 30 Minuten bei 50°C in „stripping buffer“ (100 mM β -Mercaptoethanol, 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8; 2% (w/v) SDS) geschüttelt. Anschließend wird die Membran ca. 1 Minute in Leitungswasser gewaschen, bis sie nicht mehr nach β -Mercaptoethanol riecht. Nun wäscht man die Membran noch 10-15 Minuten in TBST und dann ist sie für neuerliche immunochemische Nachweise vorbereitet.

2.3.8 Massenspektrometrische Analyse isolierter Phosphatasen

Um den Angriffspunkt von Singulett-Sauerstoff bei PTPasen zu analysieren, wurde mit Singulett-Sauerstoff behandelte, tryptisch verdauter PTP1B eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt.

2.3.8.1 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

ESI-MS erlaubt die genaue Molmassenbestimmung von Peptiden, Proteinen und anderen Biomolekülen (Nukleotide, Zucker). Sequenzinformationen können über die Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS) gewonnen werden. Zur massenspektrometrischen Molmassenbestimmung einer chemischen Verbindung werden neutrale Moleküle zunächst ionisiert und dann entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses m/z mit physikalischen Methoden, z. B. in elektrischen und magnetischen Feldern aufgetrennt.

Der Begriff „Elektrospray“ beschreibt die Dispersion einer Flüssigkeit in sehr viele kleine geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes. Dieser Prozess führt zu einer Desolvatisierung der gelösten Ionen. Im elektrischen Feld werden die Ionen bei Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert, wobei sich dieser Prozess formal in vier Schritte unterteilen lässt:

- 1) die Bildung von kleinen geladenen Tröpfchen aus der Lösung,
- 2) kontinuierlicher Lösungsmittelverlust dieser Tröpfchen durch Verdampfen, wobei die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt,

- 3) wiederholter spontaner Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosionen) und schließlich
- 4) Desolvatisierung der Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer.

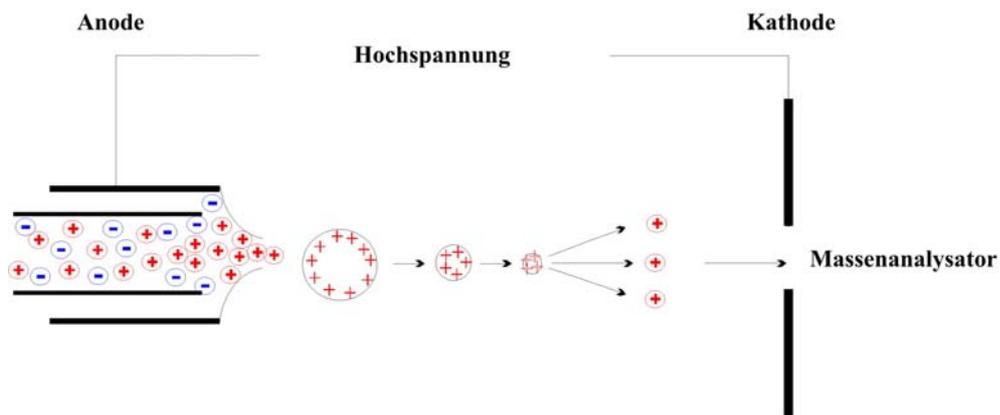


Abb. 3.3: Elektrospray-Mechanismus

Die Elektrospray-Quelle besteht aus einer gezogenen Glaskapillare mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern an der Austrittsöffnung. Die Glasspitze ist mit einer Metallschicht überzogen, um das Potential an die Spitze zu führen. Der Vorteil dieser Nano-Elektrospray-Quelle liegt in den sehr geringen Flussraten und der dadurch bedingten langen Messzeit für kleine Probenmengen und ihrer hohen Sensitivität.

Als typischer Massenfilter für die ESI-MS dient das Quadrupolmassenspektrometer, das bereits 1953 von W. Paul und H. Steinwedel beschrieben wurde. Unter einer vorgegebenen physikalischen Bedingung werden nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zum Detektor durchgelassen. Dies wird durch eine Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden (Quadrupol) erreicht, die Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses unter dem Einfluss eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes auf einer stabilen oszillierenden Bahn durchlaufen können. Alle anderen Ionen mit einem unterschiedlichen m/z -Verhältnis fliegen auf instabilen Bahnen und werden durch Kollision mit den Metallstäben gestoppt.

Entsprechend dem Prinzip der Elektrospray-Ionisation müssen die Analytmoleküle in gelöster Form zur Spitze der Elektrospray-Quelle geführt werden. Analyt-Lösungen sind meistens Gemische aus dipolaren organischen Lösungsmitteln (Methanol, Ethanol, Acetonitril) und – beim Nachweis positiv geladener Analyt-Ionen – verdünnte wässrige Säuren (0.01-0.1 % Ameisensäure, Essigsäure, TFA). Dabei beschleunigen die hohen

Dampfdrücke der organischen Lösungsmittel die Verdampfung des Lösungsmittels während des ESI - Prozesses, und das saure Milieu unterstützt die Protonierung der Analytmoleküle. Zusätze wie Puffer, Salze und Detergenzien stören den Elektrospray-Prozess.

Mit der Einführung sogenannter Triple-Quadrupol-Instrumente ist es möglich geworden, über die Massenanalyse der ESI-Ionen hinaus auch gezielt Strukturinformationen über einzelne Ionen zu erhalten. Bei der Produkt-Ionen-Analyse wird das Quadrupolfeld von Q1 so eingestellt, dass nur Ionen einer bestimmten Masse transferiert werden. Diese Vorläufer-Ionen werden in Q2 fragmentiert und die Produkt-Ionen (Tochter-Ionen) anschließend in Q3 analysiert.

2.3.8.2 Vorbereitung der PTP1B

Da bei dieser Untersuchung der Schwerpunkt auf das das reaktive Cystein enthaltene 22 Aminosäuren lange Fragment gesetzt werden sollte, wurde die zu untersuchende Probe, also behandelte oder unbehandelte PTP1B, vor der massenspektrometrischen Analyse tryptisch verdaut; dies geschah als In-Lösung-Verdau.

Dazu sollte das Protein in einer wässrigen Lösung vorliegen; eine Konzentration von 1-10 µg/µl wäre dabei von Vorteil, aber nicht unbedingt notwendig. Der Ansatz wurde auf eine Endkonzentration von 25 mM NH₄HCO₃ gebracht und der pH-Wert auf ungefähr 7.5 bis 8.5 eingestellt. Trypsin („Sequencing Grade Modified Trypsin“; Promega, Mannheim) wurde laut Herstellerangaben im mitgelieferten Puffer auf eine Konzentration von 0.1 µg/µl verdünnt und in einer Endkonzentration von 5% (w/w) zum Protein gegeben. Die Proben wurden vor Trypsin-Zugabe einige Minuten aufgekocht werden, um das Protein zu denaturieren und alle Stellen für das Trypsin zugänglich zu machen. Der Verdau erfolgte nun für drei Stunden bei 37°C (2 bis 3 Stunden reichen bei den meisten Proteinen), und anschließend wurde das Trypsin durch Erhitzen der Probe auf 95°C (10 Minuten) deaktiviert.

Nach dem tryptischen Verdau wurden die Proben in einer Vakuum-Zentrifuge bis zur vollständigen Trocknung eingengt; aufgrund des geringen Probenvolumens geschah dies ohne Wärmezufuhr. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Messung der Proben wurde von Frau Dr. Sabine Metzger vom BMFZ der Heinrich Heine Universität Düsseldorf mit dem Massenspektrometer ESI-QqTOF, Q Star X, der

Firma Applied Biosystems MDS Sciex, USA durchgeführt. An Stelle des dritten Quadrupols findet sich hier ein Time-of-flight (TOF) Analysator. Für die Ionisierung der Proben wurde eine Nano-Spray Quelle verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Singulett-Sauerstoff-induzierte Signaltransduktion

Reaktive Sauerstoffspezies beeinflussen zahlreiche zelluläre Signaltransduktionsprozesse. So führt Wasserstoffperoxid-Behandlung zu einer Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch die Inhibition regulierender Proteintyrosinphosphatasen. Gleiches wurde für die Bestrahlung von Zellen mit UVA gezeigt (KNEBEL et al., 1996). Eine weitere reaktive Sauerstoffspezies ist Singulett-Sauerstoff, von dem bekannt ist, dass er Stresskinasen wie p38 oder JNK aktiviert.

3.1.1 Hemmung von PTPasen durch Singulett-Sauerstoff

Zunächst sollte untersucht werden, ob auch Singulett-Sauerstoff-induzierte Signaltransduktion auf Ebene der Aktivität von Phosphatasen reguliert wird.

Um zu testen, ob es generell möglich ist, PTPasen durch Singulett-Sauerstoff zu inhibieren, wurde zunächst mit isolierten Phosphatasen gearbeitet. Die Rezeptortyrosinphosphatase CD45 und die cytosolische Tyrosinphosphatase PTP1B wurden mit dem Singulett-Sauerstoff-Donor NDPO₂ (siehe 2.2.1.1) inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe von pNPP die Phosphatase-Aktivität bestimmt. Als Kontrollen dienten dabei unbehandeltes Enzym (100%-Wert) und die Behandlung mit dem Zerfallsprodukt des Singulett-Sauerstoff-Donors, NDP. In Abbildung 3.1 ist zu erkennen, dass die cytosolische Phosphatase PTP1B sowohl durch 10 mM NDPO₂ (entsprechend einer berechneten „steady-state“-Konzentration von Singulett-Sauerstoff im Bereich von 9 nM) als auch durch 5 mM NDPO₂ stark inhibiert wurde. Zwar zeigt auch die Kontrolle mit NDP eine Hemmung der Phosphatase, aber es ist deutlich zu erkennen, dass NDP in einer Konzentration von 5 mM nur 50% Inhibition aufweist, 5 mM NDPO₂ dagegen die Aktivität auf nur noch 10% herabsetzt. Betrachtet man den gleichen Versuch mit der Rezeptortyrosinphosphatase CD45, so zeigt sich, dass bereits 1 mM NDPO₂ ausreichte, um die Phosphatase zu über 90% zu inhibieren, mit NDP dagegen wurde nur eine Hemmung von 50% erreicht.

Für beide Phosphatasen wurde versucht, die Inhibition durch NDPO₂ mit DTT wieder rückgängig zu machen. Die Phosphatasen wurden zuerst mit NDPO₂ inkubiert, dann

wurde 10 mM DTT in den Reaktionsansatz gegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert, bevor die Phosphataseaktivität bestimmt wurde. Sowohl im Falle der PTP1B (bei Behandlung mit 5 mM NDPO₂) als auch im Falle der CD45 zeigte sich, dass die Inhibition durch den Singulett-Sauerstoff-Donor mit DTT wieder auf das Niveau von NDP angehoben werden kann. Dies lässt vermuten, dass es durch die Zugaben von NDPO₂ zu einer Oxidation des Enzyms kommt, die zumindest teilweise durch DTT wieder rückgängig gemacht werden kann.

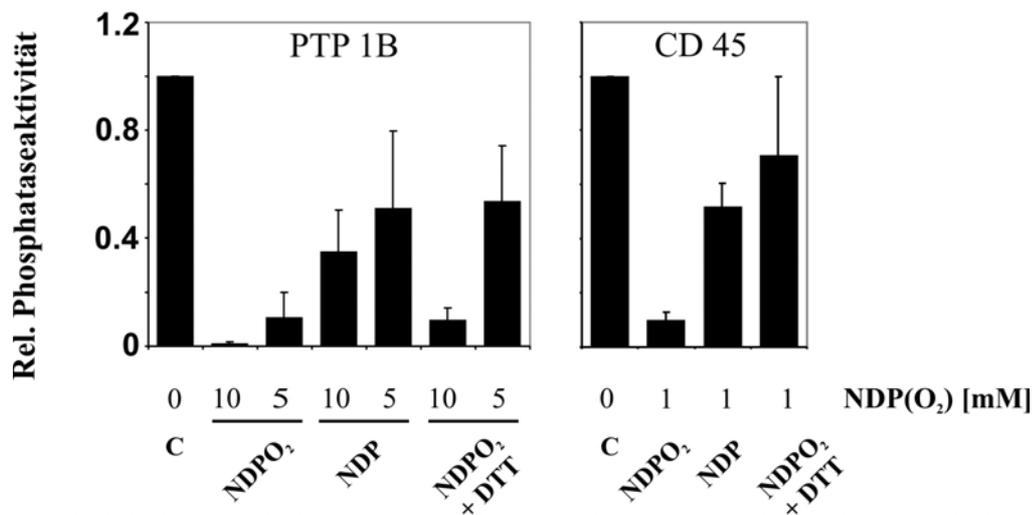


Abb. 3.1: Hemmung isolierter PTPasen durch Singulett-Sauerstoff

Isolierte PTP1B und CD45 wurden mit den angegebenen Konzentrationen an NDPO₂ oder NDP für 10 Minuten inkubiert. Anschließend folgte die Bestimmung der PTPase-Aktivität gemäß Kap. 2.2.1.1. Im Falle der Zugabe von DTT geschah dies nach 10-minütiger Einwirkung von NDPO₂. Nach weiteren 10 Minuten folgte die Aktivitätsbestimmung. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ($n = 3$) \pm Standardabweichung.

Zur Ermittlung des Angriffspunktes von Singulett-Sauerstoff wurde isolierte PTP1B mit NDPO₂ und mit NDP behandelt und anschließend per SDS-PAGE auf mögliche Dimerisierung und dadurch erklärable Inhibition der Phosphatase untersucht. Als Kontrolle für die Behandlung wurde eine mit NDPO₂ behandelte Probe mit DTT postinkubiert.

In Abbildung 3.2 ist die 37.4 kDa große Bande der PTP1B gut zu erkennen. In der zweiten Spur mit PTP1B nach NDPO₂-Behandlung ist unterhalb 85 kDa eine schwache Bande zu detektieren (s. Pfeil), die auf einen dimerisierten Anteil an PTP1B in der

Probe zurückzuführen sein könnte; jedoch würde dieser geringe Anteil keine derartig hohe Abnahme der Enzymaktivität erklären. Zusätzlich lässt sich ein minimaler Shift der PTP1B-Bande erkennen, dessen Ursache nicht geklärt ist.

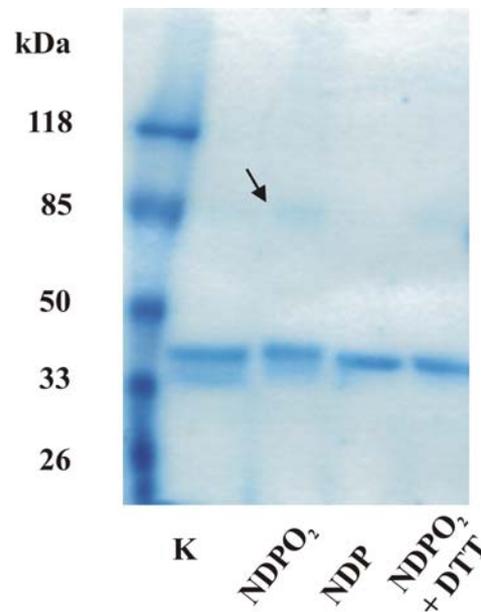


Abb. 3.2: Singulett-Sauerstoff-Behandlung der PTPase PTP1B

*PTP1B wurde mit Singulett-Sauerstoff behandelt und mittels nicht-reduzierender SDS-PAGE auf mögliche Dimerisierung untersucht. **K** unbehandelte PTP1B; **NDPO₂** PTP1B, behandelt mit dem 1,4-Endoperoxid von 3,3'-(1,4-Naphthyliden)dipropionat; **NDP** Kontrolle mit zerfallenem NDPO₂. In der Probe **NDPO₂ + DTT** wurde das Enzym nach Behandlung mit dem Endoperoxid in DTT-haltigem Probenpuffer aufgenommen.*

Da das Gel zeigt, dass die Inhibition der Phosphatase nicht auf eine Dimerisierung zurückzuführen sein kann, stellte sich nun die Frage, wie das Enzym durch Singulett-Sauerstoff inhibiert wird. Für andere reaktive Sauerstoffspezies ist beschrieben, dass sie das reaktive Cystein im aktiven Zentrum von PTPasen angreifen und somit die Enzyme inaktivieren, da das Cystein jetzt nicht mehr als Nucleophil fungieren kann. Es ist bekannt, dass ¹O₂ Cystein sowohl zu Sulfen-, Sulfin- als auch Sulfonsäure oxidieren kann, so dass denkbar ist, dass das reaktive Cystein im aktiven Zentrum oxidiert und das Enzym dadurch inhibiert wird.

Um dies zu untersuchen, wurde eine massenspektrometrische Analyse der PTP1B durchgeführt. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PTP1B handelt es sich um

das humane rekombinante Protein, Aminosäure 1 bis 322, mit einem Molekulargewicht von 37.4 kDa. Das Enzym wurde entweder unbehandelt oder nach Inkubation mit NDPO₂ tryptisch verdaut und dann über ESI-MS untersucht. Nachdem festgestellt werden konnte, dass nach Behandlung mit dem Singulett-Sauerstoff-Donor viele Methionin- und Cystein-Reste des Enzyms oxidiert vorlagen, wurde die Untersuchung auf das 22 Aminosäuren lange Fragment fokussiert, welches das reaktive Cys215 enthält. Dieses Segment hat die Aminosäuresequenz ESGSLSPVHGPVVVHCSAGIGR. Abbildung 3.3 A zeigt die errechneten Massen für die unoxidierte, die zweifach oxidierte und die dreifach oxidierte Form mit einfacher, dreifacher oder vierfacher Ladung als Masse pro Ladung (m/z). Abbildung 3.3 B zeigt die Spektren der Proben. Im oberen Teil der Abbildung ist die unbehandelte Probe zu sehen; detektiert wurde die unoxidierte Form mit vierfacher Ladung (544.58 m/z), die zweifach oxidierte Form mit ebenfalls vierfacher Ladung (552.58 m/z) und die dreifach oxidierte Form mit dreifacher Ladung (741.74 m/z). Es scheint, dass das Enzym hauptsächlich in der unoxidierten Form und der dreifach oxidierten Form vorliegt, jedoch lässt diese Methode keine genaue Quantifizierung zu. Betrachtet man dagegen den unteren Teil der Abbildung, die das mit dem Singulett-Sauerstoff-Donor behandelte Enzym zeigt, so erkennt man, dass keine unoxidierte Form mehr zu detektieren ist, sondern nur noch die zweifach oxidierte Form mit vierfacher Ladung (552.58 m/z) und vor allem die dreifach oxidierte Form mit dreifacher Ladung (741.73 m/z). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass durch den gebildeten Singulett-Sauerstoff das reaktive Cystein stark oxidiert wird.

A

Fragment		$[M+H]^+$	$[M+3H]^{3+}$	$[M+4H]^{4+}$
		m/z	m/z	m/z
AS 200-221	Cys	2175.06	725.69	544.52
AS 200-221	CysSulfinsäure	2207.05	736.36	552.52
AS 200-221	CysSulfonsäure	2223.05	741.69	556.62

B

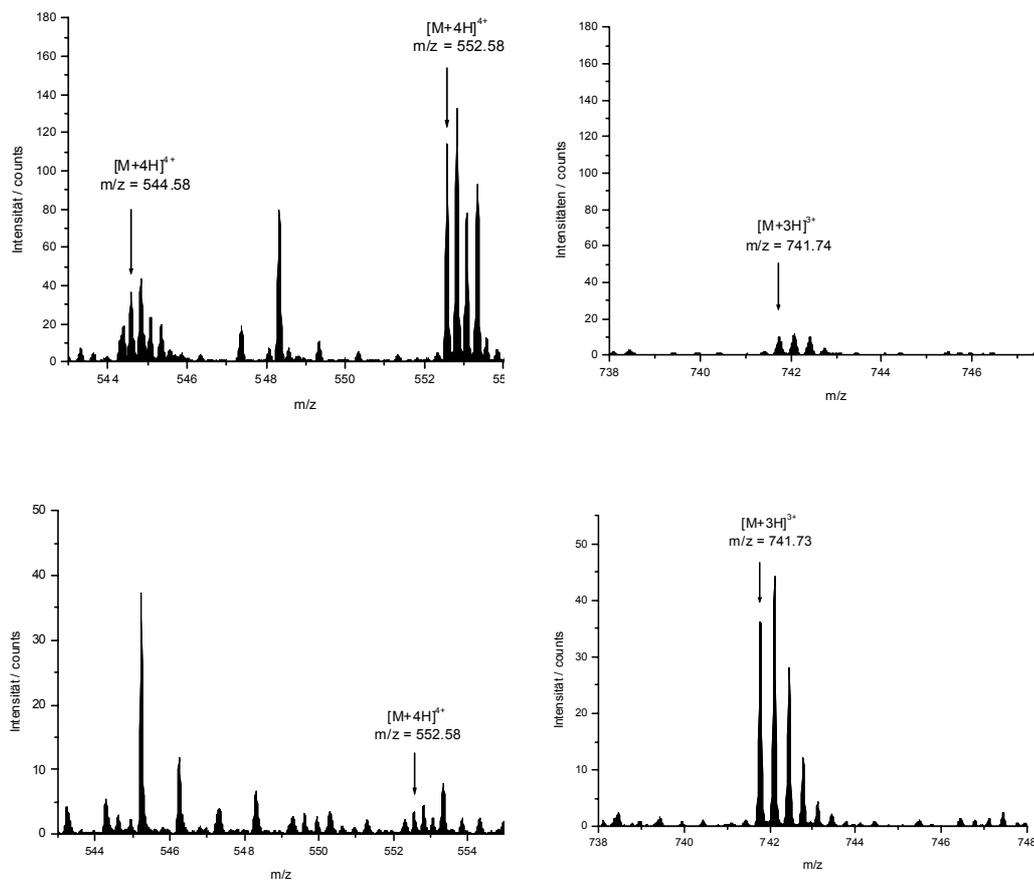


Abb. 3.3: Singulett-Sauerstoff-induzierte Oxidation des reaktiven Cysteins der PTPase PTP1B

(A) Die errechneten Massen des 22 Aminosäuren langen Fragments mit dem reaktiven Cys215 für die einfach, dreifach und vierfach geladene Form der unoxidierten, zweifach oxidierten und der dreifach oxidierten Form. Angegeben ist Masse pro Ladung (m/z).

(B) Die isolierte PTPase 1B wurde mit Singulett-Sauerstoff behandelt, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Singulett-Sauerstoff oxidiert das reaktive Cystein zu Sulfin- bzw. Sulfonsäure (untere Reihe). Die obere Reihe zeigt die unbehandelte Probe.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass isolierte Proteintyrosinphosphatasen durch NDPO_2 inhibiert werden können, stellte sich die Frage, ob dies auch im Zellsystem gilt. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Phosphatase-Assay wie unter Kapitel 2.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Zellen wurden für diesen Versuch über Nacht, mindestens aber sechs Stunden, mit serumfreiem Medium inkubiert, um das Ausmaß der basalen Phosphorylierung der Proteine gering zu halten. Dann folgte eine Stimulation mit EGF, um den Rezeptor zu aktivieren; EGFR lag danach phosphoryliert in der Zelle vor. Nach Entfernen des Wachstumsfaktors erfolgte die Behandlung mit dem zu untersuchenden Agens. Schließlich wurden die Zellen mit dem Kinaseinhibitor Compound 56 (c56) inkubiert und sofort lysiert. Handelte es sich bei dem zu untersuchenden Agens nun um einen Phosphataseinhibitor, so würde bei dem durch die EGF-Behandlung in einem phosphoryliertem Zustand vorliegenden Rezeptor die Phosphorylierung erhalten bleiben, auch wenn anschließend mit c56 gehemmt würde, da keine Phosphatase den Rezeptor dephosphoryliert haben könnte. Hat das zu untersuchende Agens jedoch keine inhibierende Wirkung auf Phosphatasen, so würde während seiner Inkubation der durch das EGF stimulierte EGFR durch Phosphatasen dephosphoryliert, und da durch die Einwirkung des Inhibitors Compound 56 keine weitere Phosphorylierung mehr stattfinden kann, wäre in diesem Fall kein Phosphosignal mehr zu detektieren.

Zur Versuchskontrolle wurden als erstes EGF-stimulierte HeLa-Zellen für 10 Minuten mit 10 mM H_2O_2 behandelt und anschließend für 30 Sekunden mit Compound 56 inkubiert. Die Zellen wurden sodann sofort lysiert, die Proben über Elektrophoresen auf einem 8%igen SDS-PA-Gel aufgetrennt und im Western-Blot auf Tyrosinphosphorylierung untersucht.

Abbildung 3.4 zeigt, dass mit 10 mM Wasserstoffperoxid sowohl in An- als auch in Abwesenheit des Kinaseinhibitors C56 ein phospho-Tyrosin-Signal in der richtigen Höhe zu detektieren ist und demnach wie erwartet die Dephosphorylierung des EGFR durch H_2O_2 inhibiert wird.

Das Fehlen der Phosphatase-inhibierenden Wirkung von Singulett-Sauerstoff auf zellulärer Ebene kann an der Wahl des $^1\text{O}_2$ -Donors gelegen haben. NDPO_2 ist nicht membrangängig, und so wurde in diesem Fall der Singulett-Sauerstoff extrazellulär gebildet.

Ein anderes bekanntes Singulett-Sauerstoff-generierendes System ist Bengalrosa (RB)/Licht, wobei es sich bei RB um einen lipophilen und damit membrangängigen Photosensibilisator handelt, der unter Bestrahlung mit Weißlicht Singulett-Sauerstoff bildet.

Der Phosphatase-Assay wurde nun mit Bengalrosa als $^1\text{O}_2$ -Lieferanten durchgeführt. Wiederum wurden HeLa-Zellen über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubiert, mit EGF stimuliert und dann mit dem zu untersuchenden Agens behandelt, in diesem Fall RB/Licht. Es wurde eine Bengalrosa-Konzentration von $0.3 \mu\text{M}$ eingesetzt; diese Konzentration hat sich in unserer Arbeitsgruppe bezüglich Toxizität und Wirkung als geeignet erwiesen; mikroskopisch ist direkt nach der Behandlung keine Veränderung der Zellen hinsichtlich Form, Adhäsion und Konfluenz zu erkennen.

Als Kontrolle wurden einige Zellen mit RB inkubiert, aber nicht bestrahlt, so dass es nicht zu einer Bildung von Singulett-Sauerstoff kommt. In Abbildung 3.5 A ist zu sehen, dass im Falle von Bengalrosa-Behandlung mit Weißlicht-Bestrahlung und anschließender Kinaseinhibition durch c56 keine Phosphatase-Inhibition zu detektieren war, da kein phospho-EGFR Signal zu erkennen ist. Als Kontrolle für die eingesetzte RB-Konzentration wurden mit serumfreiem DMEM behandelte HeLa-Zellen mit Bengalrosa in einer Konzentration von $0.3 \mu\text{M}$ behandelt, mit Weißlicht bestrahlt und auf p38-Phosphorylierung untersucht. Die Stresskinase p38 wurde durch Bengalrosa-/Weißlichtbehandlung aktiviert, was darauf hinweist, dass die gewählten Bedingungen der Behandlung mit $^1\text{O}_2$ für die Induktion von Signaleffekten geeignet waren.

3.1.2 Wirkung von Singulett-Sauerstoff auf den EGFR

Nachdem sich gezeigt hat, dass photochemisch erzeugter Singulett-Sauerstoff keinen nachweisbaren Einfluss auf EGFR-kontrollierende Phosphatasen in zellulärem Umfeld hat, sollte nun der Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf die Aktivierung des EGFR und EGFR-abhängige Signalwege untersucht werden.

Dazu wurden HeLa-Zellen über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubiert und für 10 Minuten mit 0.1 μM bzw. 0.3 μM Bengalrosa und/oder Weißlicht behandelt. Teilweise erfolgte anschließend eine 30-minütige Inkubation mit EGF (100 ng/ml). Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis dieser Behandlung: die durch EGF hervorgerufene Tyrosinphosphorylierung wurde durch $^1\text{O}_2$ nicht verstärkt. Im Gegenteil kam es zu einer Verringerung der Phosphorylierung des EGFR. Nach Behandlung der Zellen mit 0.3 μM RB und anschließender Bestrahlung sind im Blot keine phospho-EGFR-Banden mehr erkennbar; unabhängig davon, ob anschließend mit EGF inkubiert wurde. Auch der EGFR-Spiegel insgesamt wurde durch Bengalrosa-Behandlung mit Bestrahlung stark vermindert.

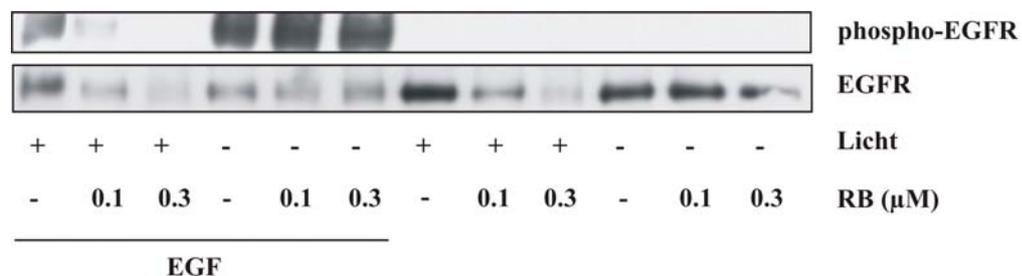


Abb 3.7: Singulett-Sauerstoff induziert die Dephosphorylierung des EGFR in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit der angezeigten Konzentration an Bengalrosa (RB) behandelt, mit Weißlicht bestrahlt und anschließend mit EGF (100 ng/ml) inkubiert. Die Untersuchung auf phosphorylierten EGFR erfolgte durch Western-Blot-Analyse. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

Um auch die Wirkung von Bengalrosa/Licht auf andere Zellen zu untersuchen, wurde das Experiment in menschlichen Hautfibroblasten wiederholt. Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis der Behandlung in 1306-Fibroblasten. Wieder führte eine Inkubation mit Bengalrosa und Bestrahlung mit Weißlicht zu einer Verminderung der durch EGF

hervorgerufenen EGFR-Phosphorylierung, und auch hier ist zu beobachten, dass der Gesamtgehalt an EGFR nach Bengalrosa/Weißlicht-Behandlung abnimmt.

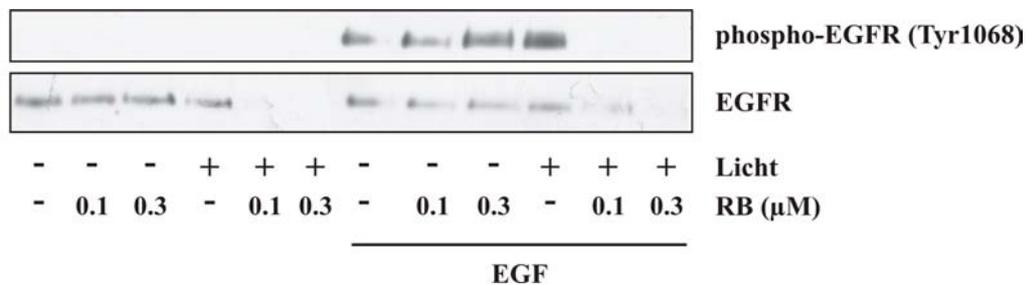


Abb. 3.8.: Singulett-Sauerstoff induziert die Dephosphorylierung des EGFR in Fibroblasten

1306-Fibroblasten wurden mit der beschriebenen Konzentration an Bengalrosa (RB) behandelt, für 10 Minuten mit Weißlicht bestrahlt und mit EGF (100 ng/ml) postinkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels Western-Blot-Analyse auf EGFR-Phosphorylierung untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die EGFR-Phosphorylierung durch Bengalrosa/Weißlicht-Behandlung negativ reguliert wird, waren nun die Konsequenzen für von EGFR abhängige Signalprozesse von Interesse. Es wurden die Auswirkungen auf Akt (Proteinkinase B) und auf die MAPK ERK1/2 getestet, die durch den EGFR-Signalweg kontrolliert werden. Untersuchungen in 1306-Fibroblasten zeigen, dass sowohl ERK1/2 als auch Akt nach Behandlung mit RB/Weißlicht in vermindertem Maße durch EGF stimulierbar sind (s. Abb. 3.9). Die geringe Aktivierung von ERK1/2 durch den Wachstumsfaktor lässt sich durch eine hohe Basalphosphorylierung erklären. Bei der Untersuchung des Gesamtproteins fällt ein Verschwinden der Banden in den Proben auf, in denen eine sehr hohe Phosphorylierung vorliegt. Dies liegt nicht an einer Verminderung des Gesamtproteinanteils, sondern es handelt sich um ein oft beobachtetes Phänomen; anscheinend wird beim „Strippen“ (s. Kap. 2.37) der Membran entweder das Protein aufgrund einer sehr starken Bindung an den Antikörper entfernt, oder aber es werden durch Bestandteile des Puffers Epitope zerstört, so dass der Antikörper nicht mehr binden kann.

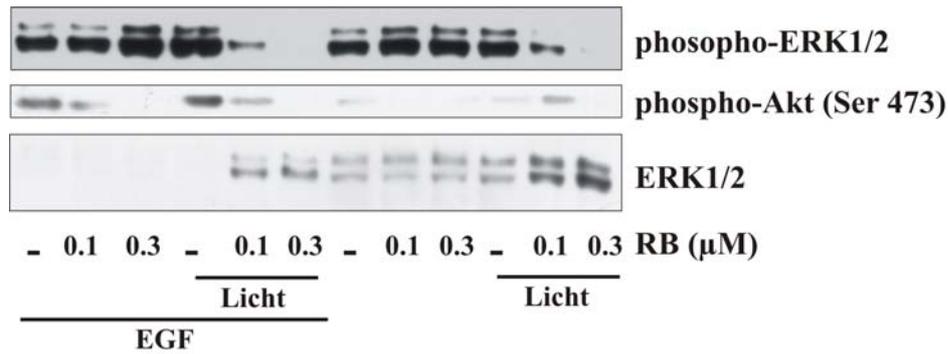


Abb. 3.9: Singulett-sauerstoff-abhängige Dephosphorylierung von Akt und ERK1/2

1306-Fibroblasten wurden mit der beschriebenen Konzentration an Bengalrosa behandelt, für 10 Minuten mit Weißlicht bestrahlt und mit EGF (100 ng/ml) oder Puffer postinkubiert (30 Minuten). Akt- und ERK1/2-Phosphorylierung wurden mittels Western-Blot analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

3.1.3 Ceramide als mögliche Mediatoren der Wirkung von Singulett-sauerstoff

Wodurch wird die Wirkung von Singulett-sauerstoff auf die Zellen vermittelt? Da von einigen Arbeitsgruppen Ceramide als Singulett-sauerstoff-Mediatoren diskutiert werden, wurde nun im Folgenden die obige Bengalrosa-/Weißlicht-Behandlung durch Behandlung mit Ceramiden ersetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit membrangängigem C₂-Ceramid gearbeitet.

1306-Fibroblasten wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubiert und dann für 30 Minuten mit 10 μM, 30 μM und 50 μM C₂-Ceramid behandelt. Es folgte eine Zugabe von 100 ng/ml EGF und eine weitere 30-minütige Inkubation. In Abbildung 3.10 ist zu erkennen, dass die Ceramid-Behandlung im Gegensatz zu der Bengalrosa-/Weißlichtbehandlung keine Änderung des Phosphorylierungszustandes des EGFR zur Folge hatte.

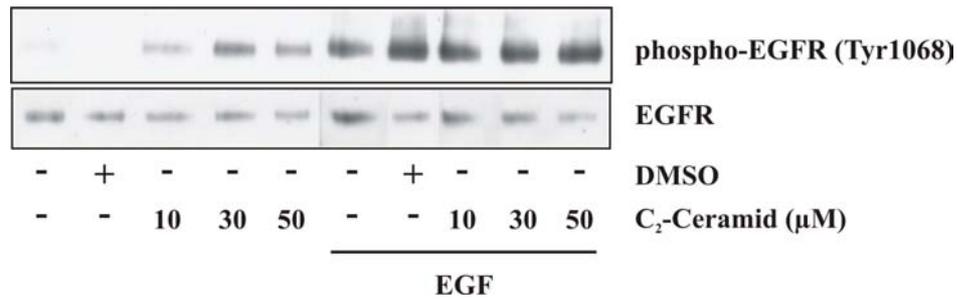


Abb. 3.10: Ceramide zeigen keinen Einfluss auf die EGFR-Phosphorylierung

1306-Fibroblasten wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubiert und am folgenden Tag mit der angezeigten Konzentration an C₂-Ceramiden behandelt; die Behandlung dauerte 30 Minuten. Danach folgte die Zugabe von EGF und eine weitere 30-minütige Inkubation vor der Zellyse. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Der Phosphorylierungszustand des EGFR wurde mittels Western-Blot untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängige Experimente.

Wieder wurde auch der Effekt auf Akt und ERK1/2 untersucht. Anders als auf EGFR-Ebene zeigte sich hier eine ähnliche Auswirkung auf den Phosphorylierungszustand von Akt und ERK1/2 wie bei der Bengalrosa-/Weißlichtbehandlung. Zwar ist in den mit C₂-Ceramiden behandelten Proben nur ein leichter Rückgang des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 zu erkennen, dafür zeigt sich der Einfluss von Ceramiden auf Akt umso deutlicher. Bereits bei einer Ceramidkonzentration von 10 µM ging der Phosphorylierungsgrad von Akt soweit zurück, dass auf dem Western-Blot kein phospho-Akt-Signal mehr zu detektieren war (Abb. 3.11). Auf diese Weise lässt sich eine Parallele zwischen den Effekten von Singulett-Sauerstoff und Ceramiden auf die Zelle ziehen, was eine Mittlerrolle von Ceramiden in der Singulett-Sauerstoffantwort nahe legt.

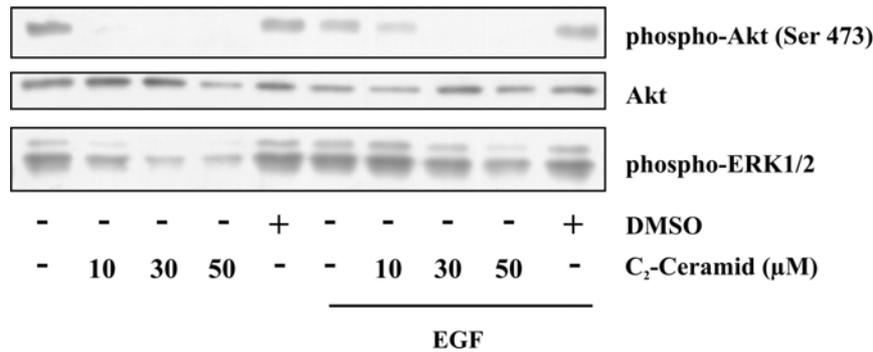


Abb. 3.11: Ceramid-induzierte Dephosphorylierung von Akt und ERK1/2

1306-Fibroblasten wurden für 30 Minuten mit der angezeigten Konzentration an C₂-Ceramid bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und anschließend für 30 Minuten mit EGF (100 ng/ml) inkubiert. Die Analyse auf Akt- und ERK1/2-Phosphorylierung erfolgte mittels Western-Blot. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

3.2 UVA-induzierte Signaleffekte

Es ist bekannt, dass viele UVA-Effekte durch Singulett-Sauerstoff vermittelt werden. Stresskinasen wie p38 und JNK werden durch Bestrahlung mit UVA via ¹O₂ aktiviert, und bei der Bestrahlung von Zellen mit UVA kommt es laut KNEBEL et al. (1996) zu einer Aktivierung des EGFR. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob durch die Bestrahlung von Zellen mit UVA-Licht identische Effekte wie durch Behandlung mit Singulett-Sauerstoff erzielt werden können.

3.2.1 Hemmung von PTPasen durch UVA

Über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubierte HeLa-Zellen wurden im Phosphatase-Test gemäß Kap. 2.3.2 mit EGF stimuliert und anschließend in PBS mit einer Dosis von 30 J/cm² UVA-Licht bestrahlt. Es folgte die 30-sekündige Inkubation mit dem Inhibitor c56 und im Anschluss daran die Lyse. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der oberen Hälfte der Abbildung 3.12 A gezeigt. Man erkennt, dass UVA-Bestrahlung nicht zu einer Inhibition von EGFR-regulierenden Tyrosinphosphatasen geführt hat; nach Behandlung mit UVA und c56 lässt sich kein phospho-Tyrosin Signal nachweisen. Da aber, wie oben erwähnt, berichtet wurde, dass es mit UVA zu einer EGFR-Aktivierung kommen muss, wurde der Versuch wiederholt, jedoch unter Bestrahlung der Zellen in serumfreiem DMEM ohne Phenolrot. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist im unteren

Teil der Abbildung 3.6 A zu sehen; auch hier zeigt sich kein phospho-Tyrosin-Signal nach UVA-Bestrahlung und anschließender Inhibitor-Behandlung. Interessanterweise induziert die Bestrahlung von Zellen mit UVA eine Dimerbildung des EGFR (s. Pfeil). Eine Dimerisierung des EGFR nach Behandlung mit Singulett-Sauerstoff wurde von ZHUANG et al. (2003) beobachtet; dies legt für den Versuch mit UVA nahe, dass es zu einer Entstehung von Singulett-Sauerstoff kommt und dies zwar eine Dimerisierung des Rezeptors verursacht, aber keinen Einfluss auf eine EGFR-regulierende Phosphatase hat.

Abbildung 3.6 B zeigt HeLa-Zellen, die zur Kontrolle der eingesetzten UVA-Dosis nach Inkubation in serumfreiem DMEM über Nacht mit UVA oder dem Chinon Menadion behandelt worden sind und danach auf Aktivierung von p38 untersucht wurden. Es zeigte sich, dass die im Phosphatase-Assay verwendete Dosis von 30 J/cm^2 UVA wie erwartet ausreicht, um p38-Phosphorylierung und damit zelluläre Signalprozesse zu stimulieren. Die Behandlung mit Menadion diente als zusätzliche Kontrolle der p38-Aktivierung.

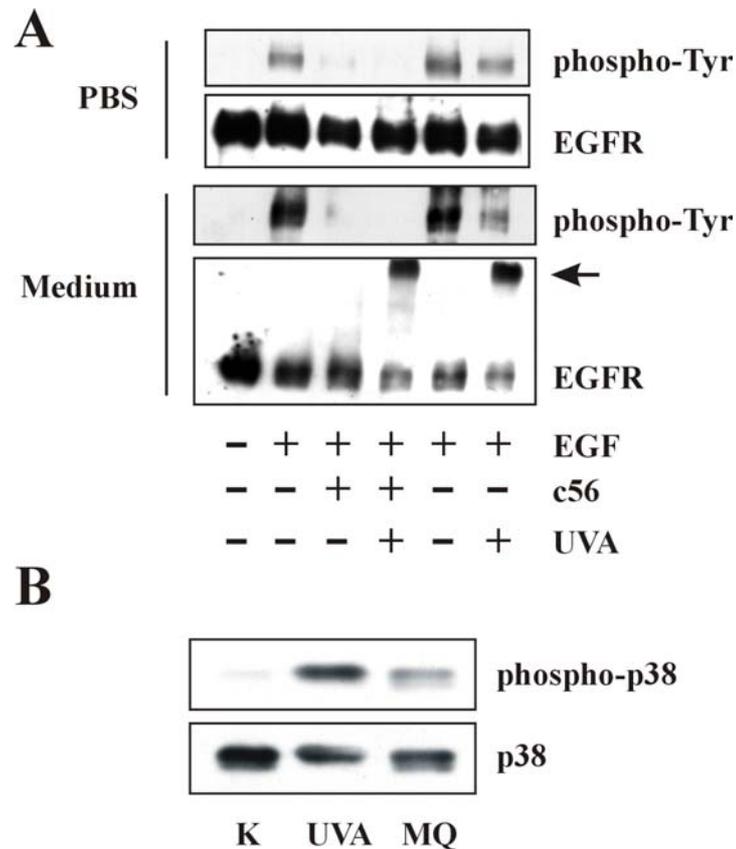


Abb. 3.12: UVA hat keinen Einfluss auf EGFR-regulierende Phosphatasen

(A) HeLa-Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubiert, für 5 Minuten mit EGF (100 ng/ml) stimuliert, mit 30 J/cm^2 UVA-Licht bestrahlt und sodann für 30 Sekunden entweder mit dem Kinaseinhibitor Compound 56 (c56; $10 \mu\text{M}$) oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert.

(B) Kontrollversuch für die eingesetzte Strahlungsintensität von 30 J/cm^2 . Über Nacht in serumfreiem DMEM inkubierte HeLa-Zellen wurden entweder nicht behandelt (K Negativkontrolle), mit 30 J/cm^2 UVA-Licht bestrahlt (UVA) oder mit $100 \mu\text{M}$ Menadion (MQ Positivkontrolle) inkubiert.

Der Phosphorylierungszustand von EGFR und p38 wurde über Western-Blot-Analyse untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

Wie in Abbildung 3.12 A zu erkennen ist, führte weder UVA-Bestrahlung in PBS noch in Medium zu einer Inhibition einer EGFR-regulierenden Phosphatase und der damit einhergehenden Aktivierung des Rezeptors. Dies steht im Gegensatz zu den von KNEBEL et al. (1996) postulierten Ergebnissen, dass UVA-Bestrahlung von Zellen EGFR-Phosphorylierung induziert. In einem neuen Versuchsansatz wurden nun die Bedingungen, unter denen in der oben erwähnten Veröffentlichung gearbeitet wurde, nachgeahmt. HeLa-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem DMEM inkubiert und

dann mit UVA-Licht unterschiedlicher Intensitäten (0.5, 15 und 30 J/cm²) bestrahlt. Sowohl PBS als auch farbloses, serumfreies DMEM wurden als Bestrahlungspuffer verwendet. Im oberen Teil der Abbildung 3.13 erkennt man, dass weder in PBS noch in DMEM bestrahlte Zellen phosphorylierten EGFR zeigten. Dies wurde zur Sicherheit sowohl mit anti-phospho-Tyrosin- als auch mit anti-phospho-EGFR-Antikörpern untersucht. Der untere Teil der Abbildung zeigt den gleichen Versuch, jedoch nach einstündiger Vorbehandlung Na₃VO₄ gemäß KNEBEL et al. (1996). Man erkennt, dass nun selbst eine geringe Intensität wie 0.5 J/cm² an UVA ausreicht, den EGFR zu aktivieren. Die Aktivierung findet aber nur statt, wenn die Bestrahlung in DMEM erfolgt ist.

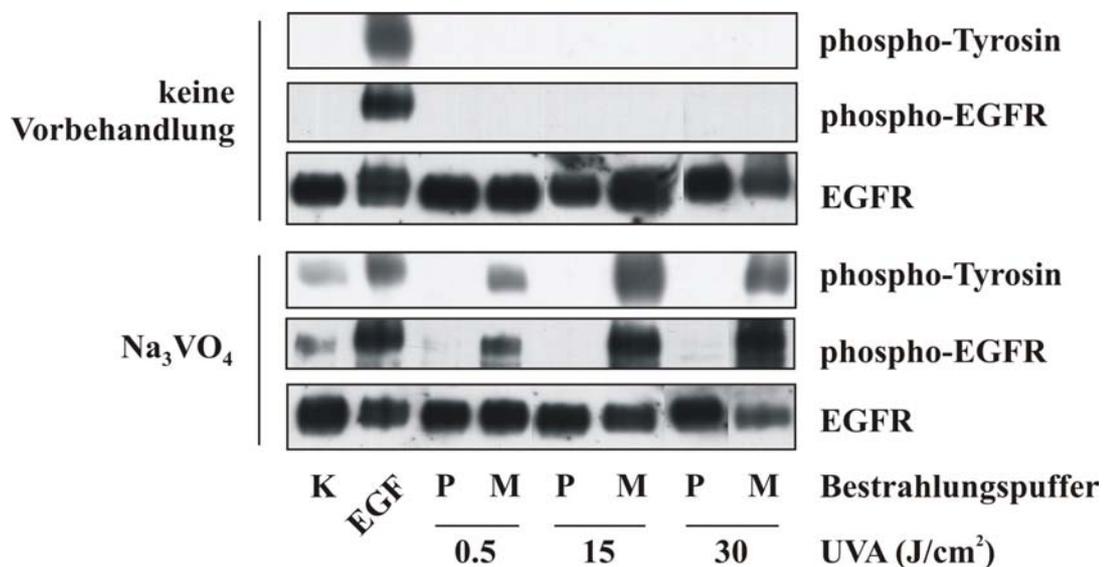


Abb. 3.13: Vanadat-abhängige Aktivierung des EGFR durch UVA-Bestrahlung in DMEM

HeLa-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem DMEM behandelt und im Fall der unteren Abbildung für eine Stunde vor der Behandlung mit 1 mM Na₃VO₄ inkubiert. Die Zellen wurden mit der angezeigten Intensität an UVA-Licht bestrahlt; als Bestrahlungspuffer diente dabei entweder PBS (P) oder farbloses, serumfreies Medium (M). K Negativkontrolle ohne Behandlung, EGF Positivkontrolle mit Stimulation der Zellen durch EGF (100 ng/ml für 5 Minuten). Die Analyse auf EGFR-Phosphorylierung erfolgte mittels Western-Blot. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängige Experimente.

3.2.2 Wasserstoffperoxid als Mediator UVA-induzierter EGFR-Aktivierung

Welcher Faktor vermittelt die EGFR-Stimulation nach UVA-Bestrahlung in DMEM? Durch die Arbeit von MAHNS et al. (2003) ist bekannt, dass es bei UVA-Bestrahlung von DMEM zur Entwicklung von Wasserstoffperoxid kommen kann. Es wurden H_2O_2 -Konzentrationen von über 100 μM gemessen.

Um zu überprüfen, ob diese Konzentrationen an H_2O_2 EGFR-Phosphorylierung und EGFR-vermittelte Signalübertragung aktivieren, wurden über Nacht in serumfreiem DMEM inkubierte HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an H_2O_2 behandelt und die Lysate anschließend auf EGFR- und ERK1/2-Phosphorylierung untersucht. Ein Teil der Zellen wurde dabei vor der Wasserstoffperoxid-Behandlung für eine Stunde mit 1 mM Na_3VO_4 vorinkubiert.

Der obere Teil der Abbildung 3.14 zeigt, dass in nicht mit Vanadat vorbehandelten HeLa-Zellen Konzentrationen von 31.3 μM bis 1000 μM nicht zur Stimulation des EGF-Rezeptors ausreichen. Erst bei der außerordentlich unphysiologischen Konzentration von 10 mM ist ein deutliches phospho-EGFR Signal zu erkennen. Auch auf ERK1/2-Ebene zeigt sich eine deutliche H_2O_2 -Konzentrationsabhängigkeit, allerdings reicht schon eine Konzentration von 500 μM für die Phosphorylierung von ERK1/2.

Wurden die HeLa-Zellen mit Na_3VO_4 vorbehandelt, so reichten im Unterschied zu den nicht vorbehandelten Zellen schon niedrige Konzentrationen von 62.5 μM bis 125 μM zur Stimulation des EGF-Rezeptors aus. Bei den MAPK ERK1/2 bestätigte sich dies – bereits bei einer Konzentration von 62.5 μM Wasserstoffperoxid ist eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung zu detektieren (Abbildung 3.14, unterer Teil).

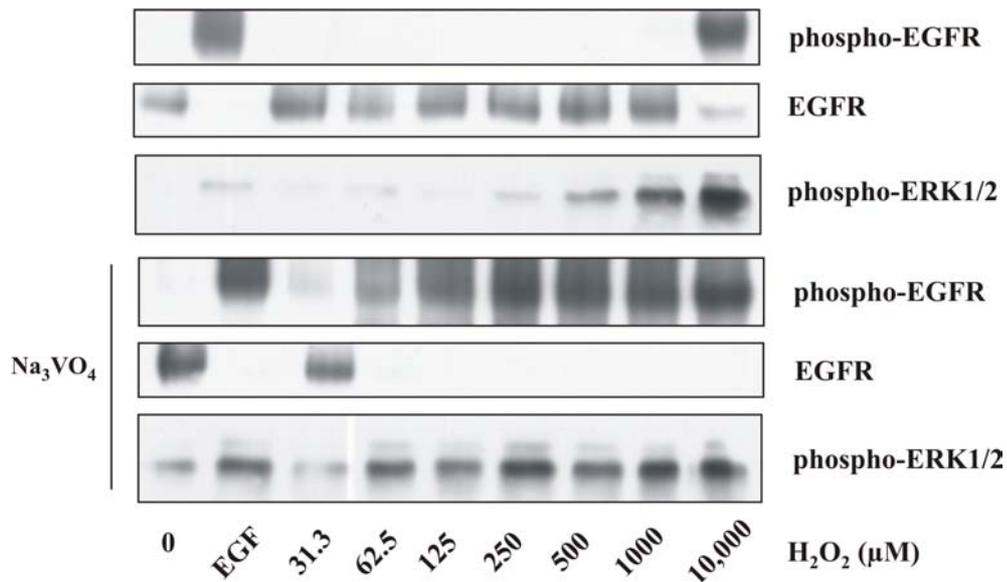


Abb. 3.14: Konzentrationsabhängige Aktivierung von EGFR und ERK1/2 durch Wasserstoffperoxid

HeLa-Zellen wurden über Nacht ausgehungert und anschließend mit steigenden Konzentrationen an Wasserstoffperoxid behandelt. Teilweise erfolgte eine einstündige Präinkubation mit Vanadat (1 mM). Die Aktivierung von EGFR und ERK1/2 wurde anschließend mit Hilfe einer Western-Analyse untersucht. Das Fehlen der EGFR-Banden bei der Untersuchung auf Gesamtprotein ist ein Phänomen das beim „Strippen“ (Kap. 2.3.7) von Blots mit starken phospho-Protein-Signalen auftritt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die EGFR-Aktivierung durch UVA-Bestrahlung in farblosem, serumfreiem DMEM auf die Bildung von Wasserstoffperoxid während der Bestrahlung zurückzuführen ist, wurde Katalase eingesetzt. Katalase ist ein peroxisomales Häm-Enzym, das die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff katalysiert. Da Katalase bekanntermaßen durch UVA-Bestrahlung inaktiviert wird (ZIGMAN et al., 1996), konnte das Enzym nicht während der Bestrahlung in den Bestrahlungspuffer gegeben werden.

Farbloses, serumfreies DMEM wurde mit UVA-Licht einer Intensität von 30 J/cm^2 bestrahlt. Anschließend wurden 40 U pro ml (entsprechend $3.125 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ Protein bei 12800 U/mg) aktive oder durch 10-minütiges Erhitzen auf 95°C inaktivierte Katalase in das bestrahlte Medium gegeben; dieses Gemisch wurde dann nach ca. 30 Sekunden auf über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubierte, für eine Stunde mit

1 mM Na_3VO_4 vorbehandelte HeLa-Zellen gegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C, anschließend wurden die Zellen lysiert (s. Abb 3.15).

Man erkennt, dass die Zugabe von bestrahltem DMEM zu einer Aktivierung des EGFR führte: die Western-Blot-Analyse zeigt ein starkes phospho-EGFR-Signal. Setzte man dem bestrahlten DMEM nun Katalase zu, bevor man es auf die zu behandelnden Zellen gab, so zeigte sich eine starke Verminderung der Aktivierung des EGFR. Dagegen war bei vorher hitzeinaktiviertem Enzym wieder eine starke Phosphorylierung erkennbar. Es zeigte sich so, dass die Aktivierung des EGFR durch UVA kein Singulett-Sauerstoff-vermittelter Effekt ist, sondern auf die Einwirkung von bei der Bestrahlung von Medium entstandenen Wasserstoffperoxid auf die mit Vanadat vorbehandelten Zellen zurückzuführen ist.

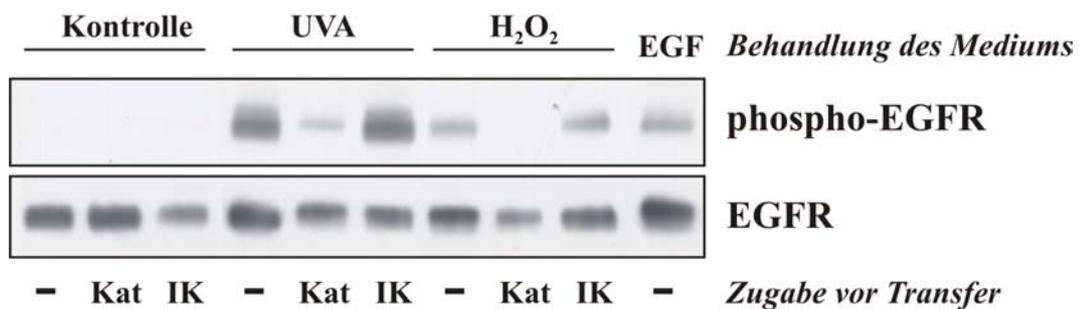


Abb. 3.15: Wasserstoffperoxid ist der Mediator von UVA-vermittelter EGFR-Aktivierung

HeLa-Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM behandelt; vor der Behandlung wurde eine Stunde mit Na_3VO_4 inkubiert. Mit UVA-Licht bestrahltem DMEM wurde aktive (**Kat**) oder inaktive Katalase (**IK**) beigefügt und anschließend wurden die Zellen mit diesem Gemisch für 15 Minuten inkubiert. Als Kontrolle diente die Behandlung von mit serumfreiem DMEM inkubierten, Na_3VO_4 -behandelten Zellen mit EGF (100 ng/ml für 5 Minuten; letzte Spur). EGFR-Phosphorylierung wurde mittels Western-Blot-Analyse ermittelt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

3.3 Chinone als Modulatoren EGFR-abhängiger Signaltransduktion

3.3.1 1,4-Naphthochinone als PTPase-Inhibitoren

In der zellulären Produktion von ROS spielen auch Redoxcycler wie Menadion (Vitamin K3) eine große Rolle. Von Menadion ist bekannt, dass es in vielen Zelltypen zur starken Aktivierung von ERK1/2 und Akt führt (ABDELMOHSEN et al., 2003; LI et al., 2001).

Um, in Analogie zu Singulett-Sauerstoff (Kap. 3.1.2), die Wirkung von Menadion auf isolierte Phosphatasen zu testen, wurde ein Phosphatase-Aktivitätstest mit der Rezeptorproteinphosphatase CD45 durchgeführt. Der Phosphatase-Test zeigt, dass die Phosphataseaktivität von CD45 durch 100 μ M Menadion um über 80% gesenkt wurde, DMSO (Lösungsmittelkontrolle) zeigte keine signifikanten Effekte (Abbildung 3.18). Neben Menadion wurde auch 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon (DMNQ), ein reiner Redoxcycler, getestet. Auch hier sind inhibitorische Effekte zu erkennen, die Phosphataseaktivität wurde jedoch lediglich um ca. 30% gesenkt.

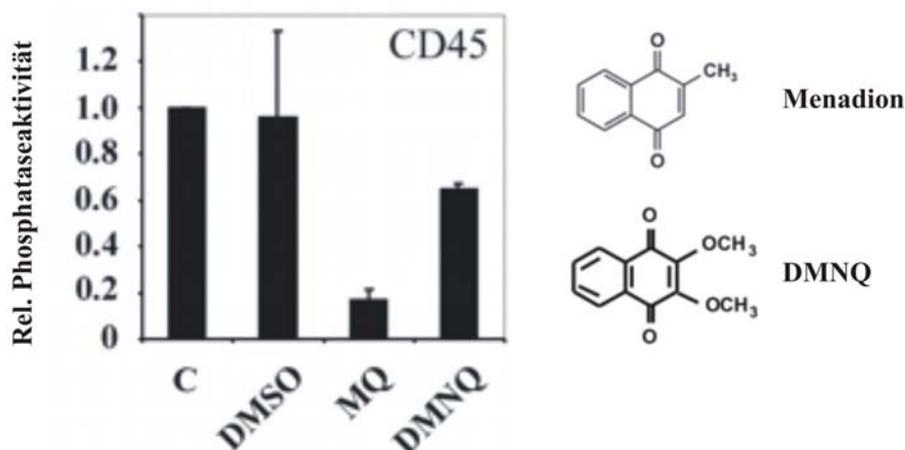


Abb 3.16: Hemmung der PTPase CD45 durch 1,4-Naphthochinone

Phosphatase Assay mit der isolierten Phosphatase CD45 und *p*-Nitrophenolphosphat als Substrat. Untersucht wurde die Hemmung der Phosphataseaktivität durch die Chinone Menadion (MQ) und DMNQ; DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus $n = 3$ Experimenten \pm Standardabweichung.

Für Menadion sind zwei Hauptreaktionsmechanismen bekannt, Alkylierung und Redoxcycling (siehe 1.1.4). Da der reine Redoxcyclus DMNQ nicht die gleichen inhibitorischen Effekte zeigt wie Menadion, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Menadion die Phosphatase über eine Alkylierung inhibiert. Ein möglicher Angriffspunkt für diese Modifikation stellt das reaktive Cystein im aktiven Zentrum des Proteins dar.

3.3.2 Hemmung EGFR-regulierender PTPasen durch Chinone

Nachdem gezeigt worden war, dass Menadion isolierte Phosphatasen inhibiert, interessierte auch hier der Effekt in einem zellulären System. Der in Kapitel 2.2.1.2 beschriebene Phosphatase-Test wurde mit Vitamin K3 als zu testendem Agens durchgeführt. Über Nacht in serumfreiem DMEM inkubierte HeLa-Zellen wurden mit 100 ng/ml EGF stimuliert und anschließend für 15 Minuten mit 100 μ M Menadion in serumfreiem DMEM behandelt. Es folgte eine 30-sekündige Inkubation mit dem Kinaseinhibitor Compound 56 und sofort anschließend Zellyse.

Nach der Behandlung mit Menadion und anschließender Kinase-Inhibition durch Compound 56 zeigt sich eine starke Tyrosinphosphorylierung des EGFR, was darauf hindeutet, dass eine Phosphatase inhibiert wurde (Abb. 3.17).

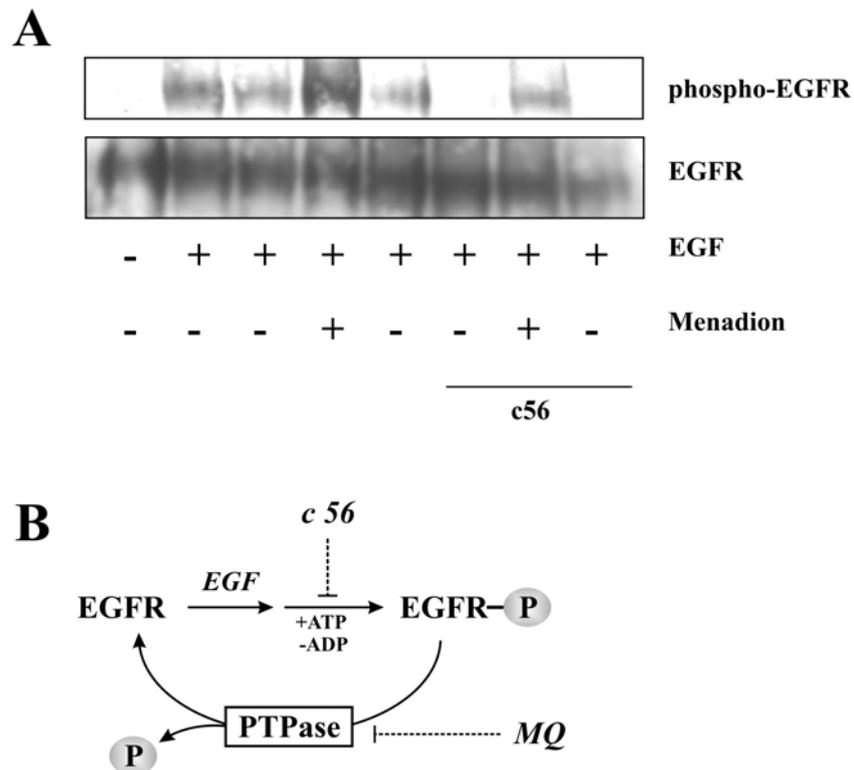


Abb 3.17: Menadion inhibiert EGFR-kontrollierende PTPasen

(A) HeLa-Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM behandelt, für 5 Minuten mit EGF (100 ng/ml) stimuliert und für 15 Minuten mit 100 μ M Menadion inkubiert. Anschließend folgte eine 30-sekündige Inkubation mit dem Kinaseinhibitor c56 und danach die sofortige Lyse. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Der Nachweis der EGFR-Aktivierung erfolgte durch Western-Blot-Analyse mit Hilfe eines phospho-Tyrosin-Antikörpers. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n \geq 3$ voneinander unabhängige Experimente.

(B) Schema zur Interpretation von (A)

Auf isolierte Phosphatasen zeigte DMNQ einen im Gegensatz zu Menadion geringen inhibitorischen Effekt. Es ist aufgrund der Substituierung des C₃-Atoms nicht in der Lage, eine Alkylierung durchzuführen. Abbildung 3.18 zeigt, dass durch Behandlung mit DMNQ keine EGFR-regulierende Phosphatasen inhibiert wurden; im Fall der Behandlung mit DMNQ und anschließender Inkubation mit c56 ist kein phospho-Tyrosin-Signal zu detektieren. Neben DMNQ wurde auch noch Benzochinon (BQ), ein stark alkylierendes Agens, getestet; auch hier ließ sich im Fall der Behandlung mit dem

Chinon und anschließender Kinaseinhibition durch c56 kein phospho-Tyrosin-Signal detektieren.

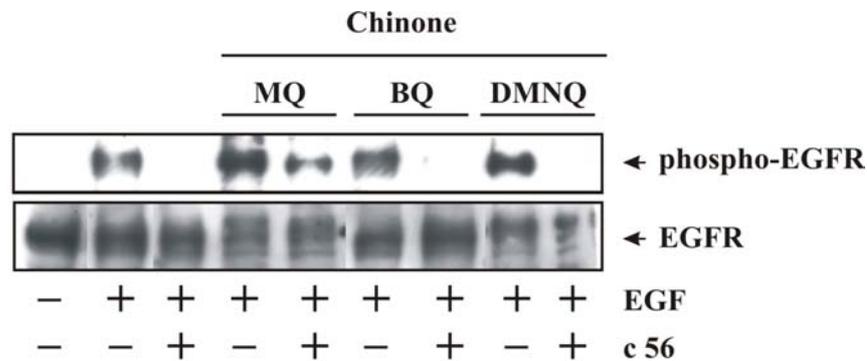


Abb. 3.18: Benzochinon und DMNQ haben keinen Einfluss auf EGFR-regulierende Phosphatasen
 HeLa-Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubiert und vor der Behandlung für 5 Minuten mit EGF(100 ng/ml) stimuliert. Es folgte die Behandlung mit den Chinonen Menadion (**MQ**; 15 Minuten), Benzochinon (**BQ**) und DMNQ (jeweils 30 Minuten) in einer Konzentration von 100 μ M. Anschließend wurden die Zellen für 30 Sekunden mit dem Kinaseinhibitor Compound 56 (c56; 10 μ M) oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubiert. Der Phosphorylierungszustand des EGFR wurde durch Western-Blot-Analyse untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängige Experimente.

Wie Menadion ließ sich mit dem Naphthochinonderivat NSC95397 (vgl. Kap. 1.1.4), einem bekannten Cdc25-Inhibitor, die Hemmung einer EGFR-regulierenden Phosphatase nachweisen (s. Abb. 3.19).

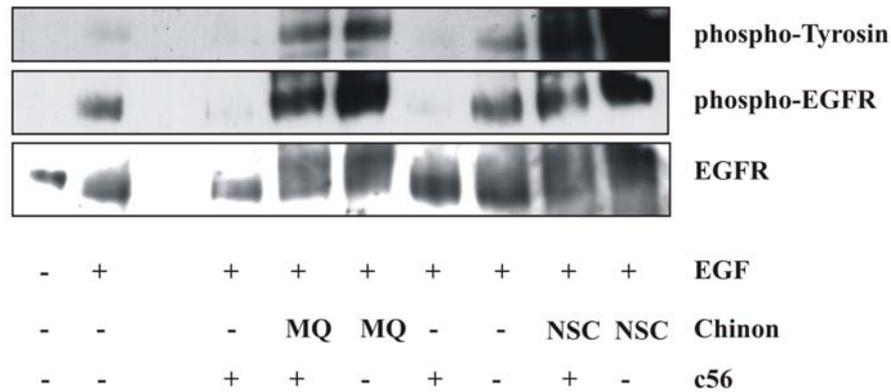


Abb. 3.19: Hemmung EGFR-regulierender PTPasen durch NSC95397

HeLa-Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM behandelt, für 5 Minuten mit EGF (100 ng/ml) inkubiert und für 15 Minuten mit Menadion (MQ; 100 μ M) oder NSC95397 (NSC; 10 μ M) behandelt. Anschließend folgte eine 30- sekündige Postinkubation mit dem Kinase-Inhibitor Compound 56 (c56; 10 μ M) oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle. Der Phosphorylierungsstatus des EGFR wurde per Western-Blot-Analyse ermittelt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n \geq 3$ voneinander unabhängige Experimente.

Im Gegensatz zu Menadion und NSC95397 zeigte das Anthrachinonderivat Doxorubicin – ein wichtiges als Anti-Tumor-Mittel gegen zahlreiche humane Krebsarten genutztes Chinon, keine detektierbare Inhibition einer EGFR-regulierenden PTPase (siehe Abbildung 3.20).

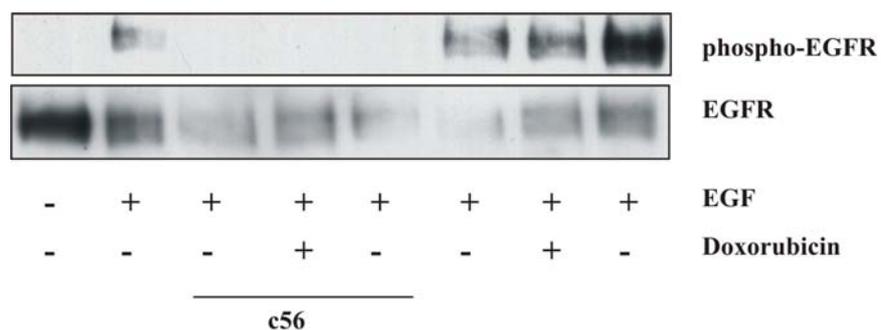


Abb. 3.20: Doxorubicin wirkt nicht über die Inhibition von EGFR-dephosphorylierenden Phosphatasen

HeLa-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem DMEM inkubiert, mit EGF (100 ng/ml; 5 Minuten) stimuliert und anschließend für 30 Minuten mit Doxorubicin (100 μ M) behandelt. Der Phosphorylierungszustand des EGFR wurde mittels Western-Blot ermittelt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n \geq 3$ voneinander unabhängige Experimente.

4 Diskussion

4.1 Singulett-Sauerstoff-induzierte Signaltransduktion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid oder Singulett-Sauerstoff die Signalkaskaden, die durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden, modulieren. UVA und H_2O_2 aktivieren den EGFR (KNEBEL et al., 1996 und 2000), und zumindest im letzteren Fall geschieht diese Aktivierung über die Inhibition von Phosphatasen.

4.1.1 Hemmung von PTPasen durch Singulett-Sauerstoff

Durch die Arbeit von TAKAKURA et al. (1999) ist bekannt, dass sich die isolierten Phosphatasen PTP1B und CD45 durch reaktive Stickstoff-Spezies wie Peroxynitrit inhibieren lassen. Auch Singulett-Sauerstoff hat diese Fähigkeit (s. Abb. 3.1). Die isolierten Phosphatasen CD45, eine Rezeptortyrosinphosphatase, und PTP1B, eine cytosolische Phosphatase, zeigten nach einer Inkubation mit dem Singulett-Sauerstoff-Donor NDPO₂ eine verminderte Aktivität. Bei der chemischen Erzeugung von ¹O₂ durch Thermodekomposition von 1 mM NDPO₂ stellt sich eine errechnete Singulett-Sauerstoff-„steady-state“-Konzentration von ca. 0.9 nM ein, wie sich aus der Halbwertszeit von NDPO₂ bei 37°C (23 min.) der Zerfallsstöchiometrie (1/2 ¹O₂ pro NDPO₂) und der Lebensdauer von ¹O₂ in H₂O errechnen lässt. Bereits diese Konzentration genügt zu einer fast vollständigen Inhibition der Phosphataseaktivität von 100 nM CD45; mit 5 mM NDPO₂ ließ sich die Aktivität der PTP1B (700 nM) auf nur noch 10% der Kontrollaktivität reduzieren. In beiden Fällen zeigte sich, dass die Hemmung zumindest partiell wieder aufgehoben werden konnte, was auf eine reversible Oxidation des Enzyms schließen lässt. Die Tatsache, dass nach der Behandlung mit dem Singulett-Sauerstoff-Donor das Reduktionsmittel DTT nicht immer in der Lage war, die vollständige Aktivität des Enzyms wiederherzustellen, zeigt an, dass einige Aminosäurereste des Enzyms bei der Behandlung so weit oxidiert wurden, dass keine Reduktion zur vollständig aktiven Form mehr stattfinden konnte.

In Kontrollversuchen wurde die Inhibition des NDPO₂-Zerfallsproduktes NDP untersucht; auch hier konnte eine leichte Hemmung der Enzymaktivität beobachtet werden, die sich aber signifikant von der Hemmung durch NDPO₂ unterschied. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ursache dieser Inhibition nicht weiter untersucht, es

lässt sich aber eine Besetzung des aktiven Zentrums – ganz analog zu 1,4-Naphthochinonen – durch das Naphthalin-1,4-dipropionat nicht ausschließen. Außerdem ist Inhibition durch Bestandteile des Lösungsmittels wie Reste von Molybdat aus der Synthese des NDPO₂ denkbar.

Zur Ermittlung des Angriffspunktes von Singulett-Sauerstoff wurde isolierte PTP1B mit NDPO₂ oder NDP behandelt und anschließend im SDS-PAGE auf mögliche Dimerisierung und dadurch erklärbare Inhibition der Phosphatase-Aktivität untersucht. Dabei wurde kein DTT im Probenpuffer benutzt, so dass, falls eine Dimerisierung aufträte, diese erhalten bliebe.

Eine solche Dimerisierung des Enzyms, die den Aktivitätsverlust hervorrufen könnte, ließ sich nicht zeigen. Es lässt sich zwar auf der Höhe etwas unterhalb der 85 kDa-Markerbande eine schwache Bande im Fall der NDPO₂-Behandlung detektieren, bei der es sich um dimerisierte PTP1B handeln könnte, aber dies würde nicht den fast vollständigen Funktionsverlust nach Inkubation mit Singulett-Sauerstoff erklären. Auffällig ist auch eine leicht verzögerte Wanderung der mit NDPO₂-behandelten Proben in der SDS-PAGE. Dies könnte durch eine Oxidation mehrerer Aminosäuren zu erklären sein, die die verminderte Einlagerung von SDS zur Folge hat, ähnlich wie man es auch bei phosphorylierten Proteinen beobachtet.

Da das Gel aber zeigt, dass die inhibitorische Wirkung des Singulett-Sauerstoff-Donors nicht auf eine Dimerisierung des Enzyms zurückzuführen sein kann, war der Grund für den Aktivitätsverlust an anderer Stelle zu suchen. Einen möglichen Angriffspunkt für eine Oxidation durch Singulett-Sauerstoff bot das reaktive Cys215. Die cytosolische Phosphatase PTP1B wurde mit NDPO₂ behandelt, tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Die Messungen ergaben, dass NDPO₂ zur Oxidation zahlreicher Methionine und Cysteine der PTP1B führt (nicht gezeigt; METZGER, pers. comm.). In der anschließenden MS/MS-Analyse wurde dann auf das 22 Aminosäuren lange Fragment fokussiert, welches das reaktive Cystein 215 enthält. Es ergab sich, dass bereits in der unbehandelten Probe neben der unoxidierten Form die zweifach oxidierte Sulfinsäure-Form zu detektieren war. Der Grund dafür könnte in Auftau/Einfrier-Schritten zur Aliquotierung sowie der dreistündigen Inkubation bei 37°C während des tryptischen Verdaus liegen.

Betrachtet man nun die mit dem Singulett-Sauerstoff-Donor NDPO₂ behandelte Probe (Abb. 3.3), so zeigt sich keine unoxidierte Form des Enzyms mehr; es lagen nur zweifach oxidierte (Sulfinsäure) und dreifach oxidierten Form (Sulfonsäure) vor. Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass das Cys215 einen Angriffspunkt für Singulett-Sauerstoff bietet. Abbildung 4.1 zeigt den vorgeschlagenen Wirkmechanismus von ¹O₂.

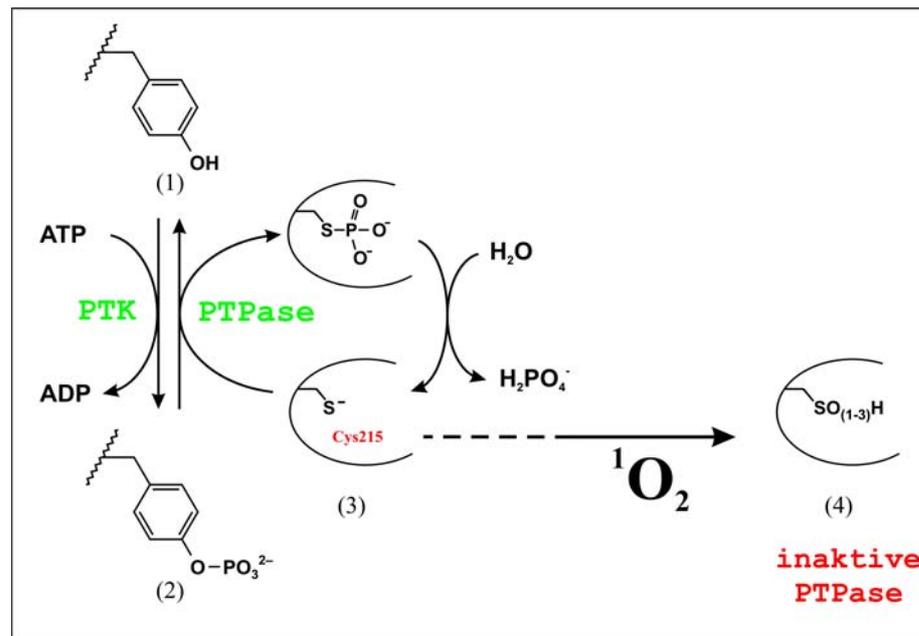


Abb. 4.1: Vermuteter Wirkmechanismus von Singulett-Sauerstoff in der Hemmung von PTPasen

Singulett-Sauerstoff oxidiert das reaktive Cystein im aktiven Zentrum zu Sulfen-, Sulfin- oder Sulfonsäure, was zur Hemmung der PTPase führt, da Cys215 nicht mehr als intermediärer Phosphatakzeptor fungieren kann. (1) Tyrosinrest eines Substrats einer PTK; (2) Phosphotyrosinrest eines Substrats einer PTPase; (3) reaktives Cystein einer aktiven PTPase; (4) oxidiertes reaktives Cystein einer inaktiven PTPase.

Obwohl aufgrund der partiellen Wiederherstellung der Enzymaktivität durch DTT davon auszugehen ist, dass ein Teil der Cysteine nur bis zur Sulfensäureform oxidiert wird, ist es nicht verwunderlich, dass bei der MS die einfach oxidierte Form nicht zu detektieren ist, da sie, wenn sie nicht zum Beispiel durch Glutathion geschützt oder durch DTT wieder zur Sulphydryl-Form reduziert wird, während der Verarbeitung direkt zu Sulfin- oder Sulfonsäure hochoxydiert wird.

Auffällig ist auch, dass sowohl die Massen für das unoxidierte als auch das zweifach oxidierte Fragment in der vierfachen Ladung detektiert wurden, die dreifach oxidierte Form dagegen nur in der dreifach geladenen Form. Der Grund dafür könnte sein, dass die zusätzliche Oxidation eine Ladung kompensiert (METZGER, pers. Komm.).

In kultivierten Zellen ließ sich unter Verwendung von NDPO₂ keine inhibitorische Wirkung auf EGFR-regulierende Phosphatasen nachweisen (s. Abb. 3.5). Dieses Ergebnis überrascht jedoch nicht, da bekannt ist, dass der Singulett-Sauerstoff zur Stimulation von z.B. JNK oder p38 intrazellulär generiert werden muss. Dies haben Versuche mit an Agarose immobilisiertem Bengalrosa, einem Photosensibilisator der unter Weißlichtbestrahlung ¹O₂ generiert, gezeigt (KLOTZ et al., 1999). Bei NDPO₂ handelt es sich dagegen um ein nicht membrangängiges Agens, so dass man davon ausgehen kann, dass im Falle dieser Behandlung ¹O₂ nur extrazellulär generiert wurde. Das Ergebnis dieses Versuchs gibt aber Auskunft darüber, dass, wenn Singulett-Sauerstoff einen Einfluss auf den EGFR haben sollte, dies nicht über die extrazelluläre Domäne des Rezeptors vermittelt würde.

Bengalrosa ist aber in der Lage, Singulett-Sauerstoff auch intrazellulär zu bilden. Bereits 1999 wurde von KLOTZ et al. gezeigt, dass auf diese Art generierter Singulett-Sauerstoff in der Lage ist, Stresskinasen wie p38 und JNK zu aktivieren. Für die damals verwendete Bengalrosa-Konzentration von 0.3 µM wurde gezeigt, dass bei einer 10-minütigen Bestrahlung mit einer kommerziell erhältlichen 500W-Halogenlampe aus 66 cm Entfernung kumulativ ungefähr 130 µM Singulett-Sauerstoff generiert werden. Da sich die Konzentration von 0.3 µM hinsichtlich ihrer stimulativen Wirkung als geeignet erwiesen hat, wurde die Zellen im Rahmen dieser Arbeit ähnlichen Konzentrationen ausgesetzt.

Der mit Bengalrosa/Licht durchgeführte Phosphatase-Test ergab aber wiederum keine Inhibition von EGFR-dephosphorylierenden Phosphatasen (s. Abb. 3.6, Teil A). Um sicher zu gehen, dass die eingesetzte Konzentration zur Aktivierung von Signalprozessen ausreichend war, wurden die Zellen nochmals mit RB/Licht behandelt und auf p38-Phosphorylierung untersucht; es zeigte sich eine starke Stimulation der MAPK, so dass gesagt werden kann, dass die Konzentration richtig gewählt wurde.

4.1.2 Wirkung von Singulett-Sauerstoff auf den EGFR

Nachdem gezeigt worden war, dass Singulett-Sauerstoff zwar auf isolierte Phosphatasen wirkt, aber nicht im Zellsystem, sollte der generelle Einfluss von $^1\text{O}_2$ auf EGFR-abhängige Signalkaskaden untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit Bengalrosa und Weißlicht behandelt und anschließend mit EGF inkubiert. Hier zeigte sich ein überraschendes Ergebnis: anstatt zu einer gesteigerten Aktivierung des EGFR durch EGF beizutragen, verhinderte vorherige Behandlung mit $^1\text{O}_2$ diese Aktivierung. Überraschenderweise konnte zudem eine Verminderung an EGFR-Gesamtprotein nach Singulett-Sauerstoff-Exposition nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Ähnliche Beobachtungen machten ZHUANG et al. (2003), die berichteten, dass nach Behandlung von Keratinocyten mit Singulett-Sauerstoff sowohl die Phosphorylierung des Rezeptors als auch der Gesamtproteinanteil selber abnimmt. Die Autoren führen diese Abnahme an EGFR aber nicht auf Internalisation oder den normalen Proteolyseweg zurück, sondern auf durch $^1\text{O}_2$ gesteigerte Caspase3-Aktivität, da sich das Verschwinden des Rezeptors mit einem Caspase3-Inhibitor verhindern lässt.

Behandlung in menschlichen Hautfibroblasten ergab identische Resultate (s. Abb. 3.8). Ob die Ursache für die Abnahme der Phosphorylierung des Rezeptors im Abbau desselben liegt oder ob es sich um zwei voneinander unabhängige Prozesse handelt, wovon der letztere auf Aktivierung einer Caspase beruht, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Untersuchung des Einflusses von Singulett-Sauerstoff (RB/Licht) auf EGFR-abhängige Signalwege zeigte, dass nach $^1\text{O}_2$ -Behandlung sowohl Akt als auch ERK1/2 vermindert durch EGF-Behandlung aktiviert werden. Im Gegensatz zum EGFR konnte weder auf Akt- noch auf ERK1/2-Ebene eine Verminderung des Proteinspiegels detektiert werden. Der Verlust an Aktivität scheint hier also auf jeden Fall auf eine Verminderung der Phosphorylierung zurückzuführen sein, wobei die durchgeführten Versuche keinen Rückschluss darüber zulassen, ob dies nur an einer verminderten Aktivierung durch den EGFR liegt, oder ob zusätzlich entsprechende Phosphatasen negativ reguliert werden.

4.1.3 Ceramide als mögliche Mediatoren der Wirkung von Singulett-sauerstoff

GRETHER-BECK et al. (1996; 2000) berichteten, dass es bei Bestrahlung von humanen Keratinocyten mit UVA zur Bildung von Ceramiden kommt. Dieser Prozess konnte durch Singulett-sauerstoff-Quencher inhibiert und durch Behandlung mit $^1\text{O}_2$ imitiert werden, was dafür spricht, dass Ceramide Mediatoren von Singulett-sauerstoff-induzierten Prozessen sein könnten. In Anlehnung an diese Studie wurde untersucht, ob die oben beschriebenen Effekte der Bengalrosa/Licht-Behandlung durch Ceramide zu imitieren sind.

Diese Untersuchung ergab, dass Ceramide keinen Einfluss auf den EGFR haben, weder auf den Phosphorylierungszustand noch auf den EGFR-Gehalt der Zelle (Abb. 3.10). Bei der Untersuchung von Akt und ERK1/2 stellte sich aber heraus, dass es, genau wie bei der Singulett-sauerstoff-Behandlung, zumindest im Falle von Akt zu einer deutlichen Abnahme der Phosphorylierung kommt, bei ERK1/2 ist nur eine schwache Abnahme zu detektieren (s. Abb. 3.11). Dies Ergebnis zeigt, dass zumindest für einen Teil der durch $^1\text{O}_2$ vermittelten Signaleffekte die Generierung von Ceramiden verantwortlich sein kann. Dies deckt sich mit den Daten von SCHIEKE et al. (2004); Ceramide entstehen, wenn auch nur moderat, sowohl durch die Bestrahlung mit UVA als auch bei der Behandlung mit Bengalrosa und Licht.

4.2 UVA-induzierte Signaleffekte

Von UVA ist bekannt, dass seine stimulierenden Effekte auf p38 und JNK durch Singulett-sauerstoff vermittelt werden (KLOTZ et al., 1997 und 1999). Die oben beschriebenen Phosphatase-Assays wurden nun mit UVA-Bestrahlung wiederholt, um noch eine weitere Singulett-sauerstoff-Quelle zu nutzen. KNEBEL et al. berichteten 1996, dass Bestrahlung von Rat-1/HER-Zellen mit UVA zu einer Aktivierung des EGFR führt, die mit der Inhibition von Tyrosinphosphatasen einhergeht.

4.2.1 Hemmung von PTPasen durch UVA

Bestrahlung von Zellen mit UVA führt nicht zu einer Inhibition einer EGFR-regulierenden Phosphatase. Als Bestrahlungspuffer wurde dabei zunächst PBS benutzt, dann aber auf serumfreies, farbloses DMEM gewechselt, welches auch in der oben

erwähnten Studie von KNEBEL et al. (1996) als Bestrahlungspuffer gewählt worden war. Es zeigte sich jedoch, dass die Wahl des Puffers keinen Einfluss auf etwaige Phosphatase-Inhibition hatte. Das Fehlen der hemmenden Wirkung konnte auch nicht auf zu niedrig eingesetzte Intensität zurückzuführen sein; in einem Kontrollexperiment wurde gezeigt, dass 30 J/cm² UVA ausreichend sind, Signalwege zu aktivieren, wie die Aktivierung von p38 beweist (s. Abb. 3.12).

Da UVA-Licht keine Wirkung auf EGFR-kontrollierende Phosphatasen hatte, wurde versucht, den Rezeptor selbst mit UVA-Bestrahlung zu aktivieren. HeLa-Zellen wurden über Nacht ausgehungert und mit verschiedenen Intensitäten an UVA-Licht bestrahlt (0.5, 15 und 30 J/cm²). Als Bestrahlungspuffer dienten dabei sowohl PBS als auch serumfreies, farbloses DMEM. Der Versuch zeigte aber, dass weder die Bestrahlung in PBS noch in DMEM zu einer Aktivierung der Rezeptorkinase führte (Abb. 3.13 oben), was im Gegensatz zu den Ergebnissen von KNEBEL et al. (1996) steht; laut deren Studie war bereits eine niedrige Intensität von 0.5 J/cm² ausreichend für eine Aktivierung. In der Tat fand sich unter den Bedingungen von KNEBEL et al., die die ausgehungerten Zellen vor der Behandlung eine Stunde mit Natriumvanadat, einem Tyrosinphosphataseinhibitor, vorbehandelt hatten, ein ganz anderes Ergebnis: mit Vanadat-Vorbehandlung reichte selbst eine Intensität von 0.5 J/cm² aus, die Phosphorylierung des EGFR zu stimulieren. Überraschenderweise geschah dies aber nur, wenn DMEM als Bestrahlungspuffer benutzt wurde; bei Bestrahlung in PBS kam es weiterhin zu keiner Aktivierung der Kinase (Abb. 3.13 unten).

MAHNS et al. (2003) berichteten, dass bei Bestrahlung von DMEM hohe Konzentrationen an H₂O₂ (> 100 µM) im Medium entstehen. Dies führte zu der Vermutung, dass die von KNEBEL et al. postulierte Aktivierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren nicht auf der eigentlichen UVA-Bestrahlung beruhen, sondern durch bei der Bestrahlung generiertes H₂O₂ induziert werden.

Dazu wurde zunächst getestet, ob die Konzentration von 100 µM Wasserstoffperoxid ausreicht, den EGFR zu aktivieren. Eine in HeLa-Zellen durchgeführte H₂O₂-Abhängigkeit zeigte, dass unter Natriumvanadat-Vorbehandlung bereits 62.5 µM genügte, den Rezeptor zu stimulieren. Diese Stimulation hatte durchaus auch Bedeutung für EGFR-abhängige Signalwege, da bereits bei einer Konzentration von 62.5 µM Wasserstoffperoxid eine deutliche pERK1/2 Aktivierung festgestellt werden konnte (s. Abb. 3.14).

Durch Einsatz von Katalase konnte der Nachweis erbracht werden, dass die durch UVA-Bestrahlung in Medium mit Vanadat-Vorbehandlung detektierte Aktivierung des EGFR auf Bildung von Wasserstoffperoxid während der Bestrahlung zurückzuführen ist (Abb. 3.15). Durch Bestrahlung von farblosem, serumfreien Medium mit 30 J/cm^2 und anschließendem Transfer dieses Gemisches auf die Zellen wurde EGFR-Aktivierung induziert. Die bloße Aktivierung zeigt, dass eine langlebige Spezies gebildet werden muss; dies schließt Singulett-Sauerstoff aus. Katalase-Zusatz zum bestrahlten Medium vor Transfer auf die Zellen unterband die Aktivierung. Wasserstoffperoxid ist demnach die aktive Spezies, die die UVA-induzierte EGFR-Aktivierung vermittelt.

4.3 Chinone als Modulatoren EGFR-abhängiger Signaltransduktion

Aktivierung des EGFR über Hemmung von Phosphatasen ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, eine Möglichkeit der ligandenunabhängigen Aktivierung eines Rezeptors. Für viele Xenobiotika ist eine ähnliche Fähigkeit, EGFR-abhängige Signalkaskaden zu aktivieren, beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Chinone, denen die Fähigkeit, den EGFR in kultivierten Zellen zu aktivieren, gemeinsam ist, hinsichtlich der Hemmung von EGFR-regulierenden PTPasen untersucht.

4.3.1 1,4-Naphthochinone als PTPase-Inhibitoren

Menadionbehandlung von isolierter CD45 hat gezeigt, dass das Chinon die Phosphataseaktivität auf 20 % des Kontrollwertes reduziert. Auch mit dem Chinon DMNQ ließ sich eine Inhibition des Enzyms hervorrufen, wenn auch im weit geringeren Ausmaß. Der Grund für die Hemmung durch DMNQ könnte die mögliche Bindung von 1,4-Naphthochinon an das aktive Zentrum der PTPase sein. Bei DMNQ handelt es sich um einen reinen Redoxcyclus, während Menadion auch alkylieren kann. Dies führte zu der Hypothese, dass Menadion die Phosphatase durch Alkylierung des reaktiven Cysteins hemmt. Dieser Mechanismus ist in der Abbildung 4.2 dargestellt.

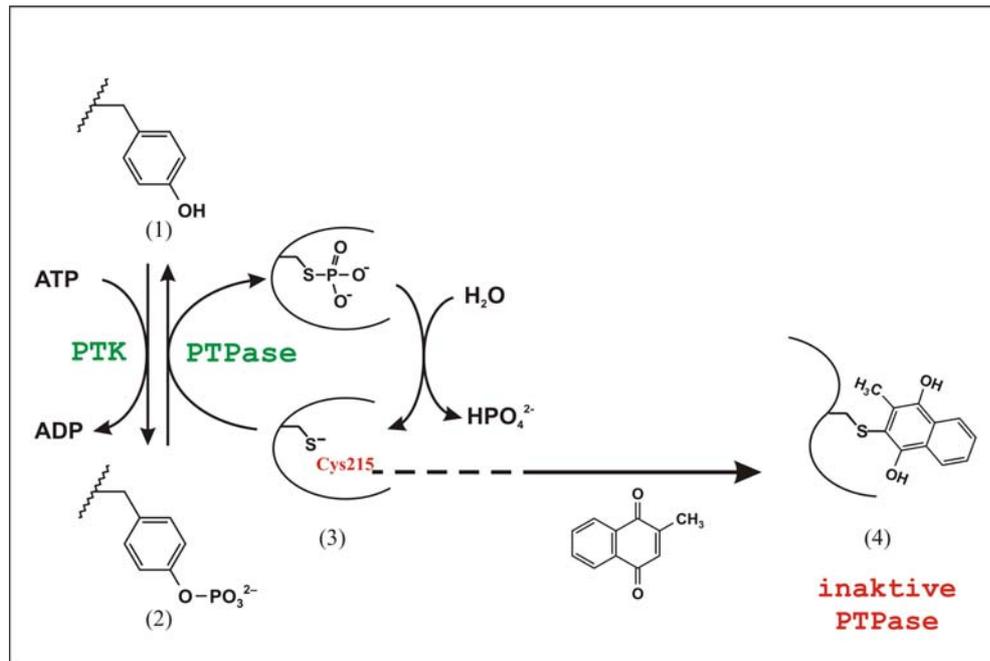


Abb. 4.2: Vermuteter Wirkmechanismus von Menadion in der Hemmung von PTPasen

Menadionbehandlung führt zu einer Alkylierung des reaktiven Cysteins im aktiven Zentrum; daraus resultiert eine inaktive Form des Enzyms, da Cys215 nicht mehr als intermediärer Phosphatazeptor fungieren kann. (1) Tyrosinrest eines Substrats einer PTK; (2) Phosphotyrosinrest eines Substrats einer PTPase; (3) reaktives Cystein einer aktiven PTPase; (4) alkyliertes reaktives Cystein einer inaktiven PTPase.

4.3.2 Hemmung EGFR-regulierender PTPasen durch Chinone

Es zeigte sich, dass Menadion auch im zellulären Umfeld in der Lage ist, EGFR-regulierende Phosphatasen zu inhibieren und dadurch zu einer Netto-Aktivierung des EGFR zu führen (s. Abb. 3.17). Ähnlich das 1,4-Naphthochinonderivat NSC95397, das neben einem hohen Potential zur Hemmung von Krebszellwachstum (LAZO et al., 2002) eine hohe Selektivität in der Hemmung der DSP der Cdc25-Familie aufweist. Im zellulären System zeigt der Phosphatase-Assay, dass NSC95397 ebenso wie Menadion zu einer Nettoaktivierung des EGFR durch Inhibition einer/mehrer Phosphatasen führen kann.

Im Unterschied zu diesen 1,4-Naphthochinonderivaten war mit 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon keine inhibierende Wirkung auf EGFR-regulierende Phosphatasen nachweisbar.

Weder Benzochinon noch Doxorubicin, ein Anthrachinon-Derivat aus *actinomycetales* *sp.*, welches als Antitumormittel bei der Behandlung von zahlreichen humanen Krebsarten wie Leukämie oder Brustkrebs eingesetzt wird, zeigten Einfluss auf den Phosphorylierungszustand des EGFR durch Regulierung von PTPasen. Aus diesen Resultaten ergibt sich, dass sowohl für Menadion als auch für NSC95397 die Aktivierung des EGFR durch Inhibition von PTPasen verantwortlich gemacht werden kann (ABDELMOHSEN et al., 2003; MELCHHEIER, 2004). Für Benzochinon kommt jedoch ein anderer Aktivierungsmechanismus in Frage; ABDELMOHSEN et al. (2003) beschreiben einen indirekten Mechanismus, der auf Erschöpfung der zellulären Glutathion-Vorräte beruht. BQ interagiert mit Glutathion, und somit werden zum Beispiel Phosphatasen und auch andere Signalproteine nicht mehr vor Oxidation geschützt. Für DMNQ und Doxorubicin kommen weder Erschöpfung des Glutathion-Vorrates (ABDELMOHSEN et al., 2003) noch die Inhibition von Phosphatasen (s. Abb. 3.18 und 3.20) in Frage. Da es durch die Verwendung der genannten Chinone zur Aktivierung von ERK1/2, einem Mitglied der EGFR-Signalkaskade, kommt, und diese Aktivierung durch Behandlung mit dem NQOR-Inhibitor Dicoumarol inhibiert werden kann (ABDELMOHSEN et al, 2003), scheint Redoxcycling der Chinone für die Effekte auf den EGFR-Signalweg verantwortlich zu sein.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass PTPasen als Angriffspunkt von ROS und anderen Agenzien dienen und zur zellulären Stressreaktion im Sinne der Aktivierung von Signalwegen beitragen können. Der über Proteintyrosinphosphatasen regulierte EGFR dient auf diese Weise als Integrationspunkt für zahlreiche Xenobiotika: Modulation der Aktivität des EGFR – sei es Aktivierung (Chinon, Wasserstoffperoxid) oder Hemmung (Singulett-sauerstoff) – ist Ausgangspunkt zellulärer Stressantworten.

5 Zusammenfassung

Zellen reagieren auf Veränderungen in ihrer Umwelt, etwa in Form der Aktivierung zellulärer Signalwege, die die Adaption an die veränderte Umgebung zur Folge hat. Die Mechanismen der Integration der veränderten Umweltbedingungen auf Zellebene sind jedoch oftmals nicht geklärt. Im Falle der UVA-Strahlung (320-400 nm), die zur Aktivierung von Signalmolekülen in Zellen führt, wurde die Bildung von Singulett-Sauerstoff, einer elektronisch angeregten Form molekularen Sauerstoffs, als Mittelmolekül identifiziert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation zellulärer Zielstrukturen, die zur Initiation zellulärer Signalkaskaden nach Belastung von Zellen mit UVA-Strahlung bzw. Singulett-Sauerstoff führen, sowie der Vergleich der Wirkung von UVA/Singulett-Sauerstoff mit derjenigen unterschiedlicher Xenobiotika auf Chinonbasis.

Informationstransfer durch die Zellmembran verläuft häufig über membranassoziierte Rezeptorproteine, weshalb eine Wirkung auf Rezeptortyrosinkinasen bzw. Rezeptor-regulierende Proteine naheliegt. Aus diesem Grund stand im Mittelpunkt der Arbeit die Modulation der Aktivität der EGF-Rezeptortyrosinkinase (EGFR).

Chemisch erzeugter Singulett-Sauerstoff war in der Lage, isolierte Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen), zu inhibieren, darunter die den EGFR regulierende PTP1B. Mit Hilfe massenspektrometrischer Analyse wurde gezeigt, dass die Inhibition des Enzyms mit der Oxidation eines für die Aktivität essentiellen reaktiven Cysteins einhergeht. Weder UVA-Bestrahlung von Zellen noch Behandlung mit Singulett-Sauerstoff führten jedoch zu einer Inhibition EGFR-regulierender Phosphatasen. Im Gegenteil verhinderte eine vorherige Behandlung der Zellen mit $^1\text{O}_2$ die Aktivierung des EGFR durch EGF; Singulett-Sauerstoff-Exposition ging zudem mit Verminderung des zellulären EGFR-Spiegels einher. Auch auf Akt- und ERK1/2-Ebene wurde eine verminderte Aktivierung festgestellt, was mit Ceramiden imitiert werden konnte. Dies lässt auf Ceramide als Mediatoren von Singulett-Sauerstoff-induzierten Prozessen schließen.

Schließlich wurde nachgewiesen, dass eine Aktivierung des EGFR durch UVA-Licht nicht auf Singulett-Sauerstoff, sondern auf während der Bestrahlung entstandenes Wasserstoffperoxid zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu Singulett-Sauerstoff konnten die 1,4-Naphthochinone Menadion und NSC95397, die den EGFR aktivieren, Phosphatasen sowohl im zellfreien als auch im zellulären Umfeld hemmen.

Der EGF-Rezeptor bildet einen Integrationspunkt der Wirkung zahlreicher reaktiver Sauerstoffspezies und Xenobiotika, und die Inhibition von Tyrosinphosphatasen ist ein möglicher Angriffspunkt in der Liganden-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors. Interessanterweise steht im Fall von Singulett-Sauerstoff die Inhibition von isolierten Phosphatasen – was im Zellsystem zu einer Nettoaktivierung des Rezeptors führen würde – die Verhinderung der Aktivierung des EGFR durch EGF gegenüber. Der EGFR ist demnach auch im Falle des Singulett-Sauerstoffs eine bedeutende zelluläre Schaltstelle, jedoch mit anderen Konsequenzen als beispielsweise im Falle von 1,4-Naphthochinonderivaten.

6 Literatur

- Abdelmohsen, K., Gerber, P. A., von Montfort, C., Sies, H. and Klotz, L. O.** (2003). "Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases." J Biol Chem: 38360-7.
- Ahmad, F., Li, P. M., Meyerovitch, J. and Goldstein, B. J.** (1995). "Osmotic loading of neutralizing antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative regulation of the insulin action pathway." J Biol Chem: 20503-8.
- Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K. and Moller, N. P.** (2001). "Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains." Mol Cell Biol: 7117-36.
- Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B. and Rhee, S. G.** (1997). "Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation." J Biol Chem: 217-21.
- Bae, Y. S., Sung, J. Y., Kim, O. S., Kim, Y. J., Hur, K. C., Kazlauskas, A. and Rhee, S. G.** (2000). "Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem: 10527-31.
- Barford, D., Jia, Z. and Tonks, N. K.** (1995). "Protein tyrosine phosphatases take off." Nat Struct Biol: 1043-53.
- Barrett, W. C., DeGnore, J. P., Konig, S., Fales, H. M., Keng, Y. F., Zhang, Z. Y., Yim, M. B. and Chock, P. B.** (1999). "Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215." Biochemistry: 6699-705.
- Beerli, R. R. and Hynes, N. E.** (1996). "Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities." J Biol Chem: 6071-6.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G. and Monks, T. J.** (2000). "Role of quinones in toxicology." Chem Res Toxicol: 135-60.

- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem: 248-54.
- Brownawell, A. M., Kops, G. J., Macara, I. G. and Burgering, B. M.** (2001). "Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX." Mol Cell Biol: 3534-46.
- Brown-Shimer, S., Johnson, K. A., Hill, D. E. and Bruskin, A. M.** (1992). "Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene." Cancer Res: 478-82.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E.** (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell: 857-68.
- Buchczyk, D. P., Klotz, L. O., Lang, K., Fritsch, C. and Sies, H.** (2001). "High efficiency of 5-aminolevulinic acid-photodynamic treatment using UVA irradiation." Carcinogenesis: 879-83.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A. G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J. L. and Sauvaigo, S.** (2002). "Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases." Biol Chem: 933-43.
- Carr, B. I., Wang, Z. and Kar, S.** (2002). "K vitamins, PTP antagonism, and cell growth arrest." J Cell Physiol: 263-74.
- Caselli, A., Marzocchini, R., Camici, G., Manao, G., Moneti, G., Pieraccini, G. and Ramponi, G.** (1998). "The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂." J Biol Chem: 32554-60.
- Chan, W. H., Yu, J. S. and Yang, S. D.** (2000). "Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2." Biochem J: 221-32.
- Cheng, A., Bal, G. S., Kennedy, B. P. and Tremblay, M. L.** (2001). "Attenuation of adhesion-dependent signaling and cell spreading in transformed fibroblasts lacking protein tyrosine phosphatase-1B." J Biol Chem: 25848-55.

- Chu, F., Ward, N. E. and O'Brian, C. A.** (2001). "Potent inactivation of representative members of each PKC isozyme subfamily and PKD via S-thiolation by the tumor-promotion/progression antagonist glutathione but not by its precursor cysteine." Carcinogenesis: 1221-9.
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J., 3rd, Charrier, V. and Parsonage, D.** (1999). "Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation." Biochemistry: 15407-16.
- Coffer, P. J., Jin, J. and Woodgett, J. R.** (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J: 1-13.
- Cool, D. E., Tonks, N. K., Charbonneau, H., Fischer, E. H. and Krebs, E. G.** (1990). "Expression of a human T-cell protein-tyrosine-phosphatase in baby hamster kidney cells." Proc Natl Acad Sci U S A: 7280-4.
- Cool, D. E., Tonks, N. K., Charbonneau, H., Walsh, K. A., Fischer, E. H. and Krebs, E. G.** (1989). "cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family." Proc Natl Acad Sci U S A: 5257-61.
- Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E.** (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes Dev: 2905-27.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E.** (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell: 231-41.
- Denu, J. M. and Tanner, K. G.** (1998). "Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation." Biochemistry: 5633-42.
- Devasagayam, T. P., Sundquist, A. R., Di Mascio, P., Kaiser, S. and Sies, H.** (1991). "Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers." J Photochem Photobiol B: 105-16.
- Di Mascio, P., Menck, C. F., Nigro, R. G., Sarasin, A. and Sies, H.** (1990). "Singlet molecular oxygen induced mutagenicity in a mammalian SV40-based shuttle vector." Photochem Photobiol: 293-8.

- Fauman, E. B. and Saper, M. A.** (1996). "Structure and function of the protein tyrosine phosphatases." Trends Biochem Sci: 413-7.
- Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D. and Tonks, N. K.** (1997). "Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases." Proc Natl Acad Sci U S A: 1680-5.
- Frangioni, J. V., Beahm, P. H., Shifrin, V., Jost, C. A. and Neel, B. G.** (1992). "The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence." Cell: 545-60.
- Furukawa, T., Itoh, M., Krueger, N. X., Streuli, M. and Saito, H.** (1994). "Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3 zeta chain." Proc Natl Acad Sci U S A: 10928-32.
- Gant, T. W., Rao, D. N., Mason, R. P. and Cohen, G. M.** (1988). "Redox cycling and sulphhydryl arylation; their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes." Chem Biol Interact: 157-73.
- Grether-Beck, S., Bonizzi, G., Schmitt-Brenden, H., Felsner, I., Timmer, A., Sies, H., Johnson, J. P., Piette, J. and Krutmann, J.** (2000). "Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation." Embo J: 5793-800.
- Grether-Beck, S., Olaizola-Horn, S., Schmitt, H., Grewe, M., Jahnke, A., Johnson, J. P., Briviba, K., Sies, H. and Krutmann, J.** (1996). "Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A: 14586-91.
- Grune, T., Klotz, L. O., Gieche, J., Rudeck, M. and Sies, H.** (2001). "Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite." Free Radic Biol Med: 1243-53.
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. and Holbrook, N. J.** (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury." J Biol Chem: 4138-42.
- Hampton, M. B., Morgan, P. E. and Davies, M. J.** (2002). "Inactivation of cellular caspases by peptide-derived tryptophan and tyrosine peroxides." FEBS Lett: 289-92.

- Hanks, S. K. and Quinn, A. M.** (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members." Methods Enzymol: 38-62.
- Harari, D. and Yarden, Y.** (2000). "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." Oncogene: 6102-14.
- Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C.** (2002). "MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?" Nat Rev Mol Cell Biol: 30-40.
- Herrlich, P. and Bohmer, F. D.** (2000). "Redox regulation of signal transduction in mammalian cells." Biochem Pharmacol: 35-41.
- Huang, K. P. and Huang, F. L.** (2002). "Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide." Biochem Pharmacol: 1049-56.
- Humphries, K. M., Juliano, C. and Taylor, S. S.** (2002). "Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation." J Biol Chem: 43505-11.
- Hunter, T.** (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." Cell: 225-36.
- Johnson, P., Greenbaum, L., Bottomly, K. and Trowbridge, I. S.** (1989). "Identification of the alternatively spliced exons of murine CD45 (T200) required for reactivity with B220 and other T200-restricted antibodies." J Exp Med: 1179-84.
- Kar, S., Adachi, T. and Carr, B. I.** (2002). "EGFR-independent activation of ERK1/2 mediates growth inhibition by a PTPase antagonizing K-vitamin analog." J Cell Physiol: 356-64.
- Kim, H. and Müller, W. J.** (1999). "The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis." Exp Cell Res: 78-87.
- Klatt, P. and Lamas, S.** (2000). "Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress." Eur J Biochem: 4928-44.
- Klatt, P., Molina, E. P., De Lacoba, M. G., Padilla, C. A., Martinez-Galesteo, E., Barcena, J. A. and Lamas, S.** (1999). "Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation." Faseb J: 1481-90.
- Klotz, L. O., Briviba, K. and Sies, H.** (1997). "Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts." FEBS Lett: 289-91.

- Klotz, L. O., Fritsch, C., Briviba, K., Tsacmacidis, N., Schliess, F. and Sies, H.** (1998). "Activation of JNK and p38 but not ERK MAP kinases in human skin cells by 5-aminolevulinate-photodynamic therapy." Cancer Res: 4297-300.
- Klotz, L. O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J. M. and Sies, H.** (1999). "Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA." Eur J Biochem: 917-22.
- Knebel, A., Böhmer, F. D. and Herrlich, P.** (2000). "Radiation-induced signal transduction." Methods Enzymol: 255-72.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. and Herrlich, P.** (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." EMBO J: 5314-25.
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. and Aaronson, S. A.** (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." Proc Natl Acad Sci U S A: 9193-7.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature: 680-5.
- Lammers, R., Bossenmaier, B., Cool, D. E., Tonks, N. K., Schlessinger, J., Fischer, E. H. and Ullrich, A.** (1993). "Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells." J Biol Chem: 22456-62.
- 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. and Wipf, P.** (2002). "Identification of a potent and selective pharmacophore for Cdc25 dual specificity phosphatase inhibitors." Mol Pharmacol: 720-8.
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R. and Rhee, S. G.** (1998). "Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor." J Biol Chem: 15366-72.
- Leervers, S. J., Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D.** (1999). "Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage." Curr Opin Cell Biol: 219-25.

- Levine, R. L., Moskowitz, J. and Stadtman, E. R.** (2000). "Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation." IUBMB Life: 301-7.
- Li, X. A., Bianchi, C. and Sellke, F. W.** (2001). "Rat aortic smooth muscle cell density affects activation of MAP kinase and Akt by menadione and PDGF homodimer BB." J Surg Res: 197-204.
- Lohse, D. L., Denu, J. M., Santoro, N. and Dixon, J. E.** (1997). "Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1." Biochemistry: 4568-75.
- Mahns, A., Melchheier, I., Suschek, C. V., Sies, H. and Klotz, L. O.** (2003). "Irradiation of cells 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: 391-7.
- Matthews, R. J., Bowne, D. B., Flores, E. and Thomas, M. L.** (1992). "Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences." Mol Cell Biol: 2396-405.
- Melchheier, I.** (2004) Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Milarski, K. L., Zhu, G., Pearl, C. G., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., MacLean, D., Thieme-Seffler, A., Zhang, Z. Y., Sawyer, T., Decker, S. J. and et al.** (1993). "Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B." J Biol Chem: 23634-9.
- Minamide, L. S. and Bamburg, J. R.** (1990). "A filter paper dye-binding assay for quantitative determination of protein without interference from reducing agents or detergents." Anal Biochem: 66-70.
- Munday, R., Smith, B. L. and Munday, C. M.** (1998). "Effects of butylated hydroxyanisole and dicoumarol on the toxicity of menadione to rats." Chem Biol Interact: 155-70.
- Murga, C., Laguinge, L., Wetzker, R., Cuadrado, A. and Gutkind, J. S.** (1998). "Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma." J Biol Chem: 19080-5.

- Mustelin, T. and Altman, A.** (1990). "Dephosphorylation and activation of the T cell tyrosine kinase pp56lck by the leukocyte common antigen (CD45)." Oncogene: 809-13.
- Mustelin, T., Pessa-Morikawa, T., Autero, M., Gassmann, M., Andersson, L. C., Gahmberg, C. G. and Burn, P.** (1992). "Regulation of the p59fyn protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase." Eur J Immunol: 1173-8.
- Mustelin, T., Williams, S., Tailor, P., Couture, C., Zenner, G., Burn, P., Ashwell, J. D. and Altman, A.** (1995). "Regulation of the p70zap tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase." Eur J Immunol: 942-6.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. and Hynes, N. E.** (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." EMBO J: 3159-67.
- Osada, S., Osada, K. and Carr, B. I.** (2001). "Tumor cell growth inhibition and extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation by novel K vitamins." J Mol Biol: 765-72.
- Ostergaard, H. L., Shackelford, D. A., Hurley, T. R., Johnson, P., Hyman, R., Sefton, B. M. and Trowbridge, I. S.** (1989). "Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A: 8959-63.
- Piette, J.** (1991). "Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen." J Photochem Photobiol B: 241-60.
- Plowman, G. D., Whitney, G. S., Neubauer, M. G., Green, J. M., McDonald, V. L., Todaro, G. J. and Shoyab, M.** (1990). "Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene." Proc Natl Acad Sci U S A: 4905-9.
- Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A.** (2001). "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." Endocr Relat Cancer: 11-31.
- Pulido, R., Serra-Pages, C., Tang, M. and Streuli, M.** (1995). "The LAR/PTP delta/PTP sigma subfamily of transmembrane protein-tyrosine-phosphatases: multiple human LAR, PTP delta, and PTP sigma isoforms are expressed in a

tissue-specific manner and associate with the LAR-interacting protein LIP.1." Proc Natl Acad Sci U S A: 11686-90.

- Ralph, S. J., Thomas, M. L., Morton, C. C. and Trowbridge, I. S.** (1987). "Structural variants of human T200 glycoprotein (leukocyte-common antigen)." EMBO J: 1251-7.
- Rao, R. K. and Clayton, L. W.** (2002). "Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation." Biochem Biophys Res Commun: 610-6.
- Ravanat, J. L. and Cadet, J.** (1995). "Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products." Chem Res Toxicol: 379-88.
- Ray, L. B. and Sturgill, T. W.** (1988). "Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells." J Biol Chem: 12721-7.
- Roovers, K. and Assoian, R. K.** (2000). "Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery." Bioessays: 818-26.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H. J.** (1994). "Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response." Cell: 963-72.
- Salet, C., Moreno, G., Ricchelli, F. and Bernardi, P.** (1997). "Singlet oxygen produced by photodynamic action causes inactivation of the mitochondrial permeability transition pore." J Biol Chem: 21938-43.
- Samso, M., Daban, J. R., Hansen, S. and Jones, G. R.** (1995). "Evidence for sodium dodecyl sulfate/protein complexes adopting a necklace structure." Eur J Biochem: 818-24.
- Schieke, S. M., Briviba, K., Klotz, L. O. and Sies, H.** (1999). "Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation." FEBS Lett: 301-3.
- Schieke, S. M., von Montfort, C.; Buchchyk, D. P.; Timmer, A.; Grether-Beck, S., Krutman, J.; Holbrook, N. J.; and Klotz, L. O.** (2004). "Singlet Oxygen-induced Attenuation of Growth Factor Signaling: Possible Role of Ceramides." Free Radic Res: 729-37.

- Shenolikar, S.** (1994). "Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation." Annu Rev Cell Biol: 55-86.
- Shiroo, M., Goff, L., Biffen, M., Shivnan, E. and Alexander, D.** (1992). "CD45 tyrosine phosphatase-activated p59fyn couples the T cell antigen receptor to pathways of diacylglycerol production, protein kinase C activation and calcium influx." Embo J: 4887-97.
- Sies, H. and Menck, C. F.** (1992). "Singlet oxygen induced DNA damage." Mutat Res: 367-75.
- Sliker, L. J., Martensen, T. M. and Lane, M. D.** (1986). "Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. Glycosylation-dependent acquisition of ligand binding activity occurs post-translationally in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem: 15233-41.
- Soltoff, S. P., Carraway, K. L., 3rd, Prigent, S. A., Gullick, W. G. and Cantley, L. C.** (1994). "ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor." Mol Cell Biol: 3550-8.
- Stevenson, M. A., Pollock, S. S., Coleman, C. N. and 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: 12-5.
- Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K. and Finkel, T.** (1995). "Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction." Science: 296-9.
- Takakura, K., Beckman, J. S., MacMillan-Crow, L. A. and Crow, J. P.** (1999). "Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite." Arch Biochem Biophys: 197-207.
- Tan, X., Stover, D. R. and Walsh, K. A.** (1993). "Demonstration of protein tyrosine phosphatase activity in the second of two homologous domains of CD45." J Biol Chem: 6835-8.
- Tiganis, T.** (2002). "Protein tyrosine phosphatases: dephosphorylating the epidermal growth factor receptor." IUBMB Life: 3-14.
- Tiganis, T., Bennett, A. M., Ravichandran, K. S. and Tonks, N. K.** (1998). "Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase." Mol Cell Biol: 1622-34.

- Tonks, N. K., Diltz, C. D. and Fischer, E. H.** (1988). "Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta." J Biol Chem: 6731-7.
- Tonks, N. K., Diltz, C. D. and Fischer, E. H.** (1988). "Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta." J Biol Chem: 6722-30.
- Tonks, N. K. and Neel, B. G.** (2001). "Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases." Curr Opin Cell Biol: 182-95.
- 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: 4350-4.
- Trowbridge, I. S. and Thomas, M. L.** (1994). "CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development." Annu Rev Immunol: 85-116.
- Tzeng, W. F., Chiou, T. J., Huang, J. Y. and Chen, Y. H.** (1992). "Menadione-induced cardiotoxicity is associated with alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis." Proc Natl Sci Counc Repub China B: 84-90.
- Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y. and Holbrook, N. J.** (1998). "The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival." Biochem J: 291-300.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H. C. and Epe, B.** (1999). "Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022." Mutat Res: 89-101.
- Wright, A., Bubb, W. A., Hawkins, C. L. and Davies, M. J.** (2002). "Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues." Photochem Photobiol: 35-46.
- Wright, A., Hawkins, C. L. and Davies, M. J.** (2000). "Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive peroxides." Redox Rep: 159-61.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X.** (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol: 127-37.
- Zhuang, S., Demirs, J. T. and Kochevar, I. E.** (2000). "p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3

activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide." J Biol Chem: 25939-48.

Zhuang, S. and Kochevar, I. E. (2003). "Ultraviolet A radiation induces rapid apoptosis of human leukemia cells by Fas ligand-independent activation of the Fas death pathways." Photochem Photobiol: 61-7.

Zhuang, S., Ouedraogo, G. D. and Kochevar, I. E. (2003). "Downregulation of epidermal growth factor receptor signaling by singlet oxygen through activation of caspase-3 and protein phosphatases." Oncogene: 4413-24.

Zigman, S., Reddan, J., Schultz, J. B. and McDaniel, T. (1996). "Structural and functional changes in catalase induced by near-UV radiation." Photochem Photobiol: 818-24.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Lars-Oliver Klotz für die interessante Themenstellung, die fachliche Betreuung und die praktische Hilfestellung. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die bereitgestellten finanziellen Mittel, die wissenschaftlichen Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Werner Kunz danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Helmut Sies danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und die bereitgestellten finanziellen Mittel.

Frau Dr. Sabine Metzger danke ich herzlich für die Durchführung der Massenspektrometrie; vor allem aber für die Mühe und die Ratschläge bei der Probenvorbereitung, der Auswertung der Ergebnisse sowie der Hilfe bei den Abbildungen.

Bei Herrn Dr. Andreas Kranz möchte ich mich für die Bereitstellung der Vakuum-Zentrifuge zur MS-Probenvorbereitung bedanken.

Herrn PD Dr. Peter Brenneisen danke ich für die Ratschläge und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Dr. Ira Melchheier, Dr. Niloofar Ale-Agha, Juliane Beier und Dominik Stuhlmann danke ich herzlich für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen und die schönen Stunden, die wir zusammen verbracht haben.

A mis españoles Karin « Cariña » Neukam y Juan « Diabolito » Carlos Carrillo: gracias por las horas divertidas y instructivas. Karin, gracias por tu amistad, por dar oídos a mí, por poder hablar sobre estrellas y otros problemas y por expresiones usuales como el f... subjuntivo ☺. Juan, nunca he encontrado una persona quién puede explicar su lengua materna tan bueno y tan expresivo (bailando, cantando ☺) como tú. Gracias por tu tiempo y tu amistad.

Bei meinen Labornachbarn Philippe Walther und Friedi Döpp möchte ich mich für die schöne Zeit und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Bei Dr. Kotb Abdelmohsen bedanke ich mich für die freundschaftlichen Diskussionen, die wertvollen Anregungen und kleinen praktischen Hilfestellungen (und die Chips und die Bonbons...)

Andrea Borchardt danke ich für ihre Hilfestellung in jeder Laborfrage und ihre immense Hilfsbereitschaft.

Marlies Scholtes danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft in allen organisatorischen Fragen und natürlich auch in allen Kostümfragen ☺.

Allen Freunden und Kollegen, die hier nicht namentlich erwähnt sind, danke ich für das freundschaftliche Verhältnis, die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meinem Mann Christian, für ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

(Claudia von Montfort)

Düsseldorf, 07. Juni 2004