Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies

Zur Bedeutung des EGF-Rezeptors bei der Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 durch 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion) und klinisch eingesetzte Chinone

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Peter Arne Gerber

(2004)

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Sies
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Homey

Meinen Eltern

„Felix, qui potuit rerum cognoscere causas.“

- Vergil

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt daher Herrn Professor Dr. Dr. Helmut Sies für seine stete Hilfe, seinen Rat und seine Förderung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Bernhard Homey, Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich für die freundliche Betreuung, für die Einweisung in die Methoden und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Nicht zuletzt bin ich aufrichtig dankbar für die gewinnbringende Zusammenarbeit, für die Einweisung in wissenschaftliches Arbeiten und dafür, dass er mir dieses interessante Thema anvertraute.

Für ausgezeichnetes Arbeitsklima und vielerlei Hilfestellungen in fachlichen und anderen Fragen danke ich den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klotz sowie den anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meiner Mutter und meiner Familie für die stete Unterstützung in allen Belangen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Chinone 1

1.2 Der EGF-Rezeptor 5

1.3 Die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 8

1.4 Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosinkinasen 11

1.5 Beschreibung der untersuchten Chinone 12

1.5.1 Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon / Vitamin K_3) 12

1.5.2 Doxorubicin (Adriamycin) 13

1.5.3 Mitomycin C 14

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit 15

2 Material und Methoden 16

2.1 Reagenzien 16

2.2 Zellkultur 16

2.3 Behandlung der Zellen 17

2.3.1 Behandlung mit Chinonen und Inhibitoren 17

2.3.2 Behandlung mit epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) zur Verminderung der EGFR-Konzentration 18

2.4 Probenanalyse 18

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 18

2.4.2 Immunopräzipitation 20

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration 21

2.4.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse 21

2.5 Entfernen von Antikörpern („Strippen“) 23

3 Ergebnisse 24

3.1 Aktivierung von MAP-Kinasen durch Menadion und Effekte spezifischer Kinaseinhibitoren 24

3.1.1 Menadion-induzierte ERK1/2-Aktivierung und ihre Hemmung durch Inhibitoren des EGF-Rezeptors 24

3.1.2 Effekte von AG 1478 auf die Menadion-induzierte p38-Aktivierung 27

3.2 Einfluß von EGF-Vorinkubation auf Menadion-induzierte ERK1/2-Aktivierung 28

3.3 Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Menadion 30

3.4 Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Doxorubicin und Mitomycin C 32

4 Diskussion 34

4.1 Zur Bedeutung der ERK-Aktivierung durch Chinone 34

4.2 Die Bedeutung des EGF-Rezeptors für die Aktivierung von ERK durch Chinone 37

5 Zusammenfassung 42

6 Literatur 43

7 Anhang 57

1 Einleitung

1.1 Chinone

Chinone sind ringförmige Diketone, die nach dem jeweiligen Aromaten, von dem sie sich durch Oxidation ableiten, benannt werden. So findet man unter anderem Naphtho-, Benzo-, oder Anthrachinone. Chinone sind für eine Vielzahl biochemischer Prozesse von Bedeutung, beispielsweise für den Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette und die zelluläre Energieproduktion (Ubichinon) oder für die Carboxylierung von Gerinnungsfaktoren (Vitamin K_1 / Vitamin K_2). Andererseits sind auch die zelltoxischen, mutagenen und antineoplastischen Eigenschaften verschiedener Chinonverbindungen hinlänglich bekannt (Brunmark & Cadenas, 1989).

Bereits 1955 wurde das Methyl-*p*-benzochinon, ein einfacher sogenannter „Redox-Cycler“, vom *National Cancer Institute* (NCI) der USA auf seine zytotoxische Potenz untersucht. Noch heute sind einige der am häufigsten eingesetzten Zytostatika Chinone, wie Doxorubicin, Daunorubicin oder Mitomycin (Butler, 1998; Begleiter, 2000).

Die zytotoxischen Eigenschaften biologisch relevanter Chinone werden im wesentlichen auf die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies durch „Redox Cycling“ und die Alkylierung von zellulären Nukleophilen zurückgeführt (Kappus & Sies, 1981; Bolton *et al.*, 2000).

Ein Großteil intrazellulär gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies, die auch für zelluläre Alterungsprozesse verantwortlich gemacht werden, entsteht in der mitochondrialen Atmungskette und in den fremdstoffmetabolisierenden Enzymsystemen des endoplasmatischen Retikulums (Cadenas & Davies, 2000; Finkel & Holbrook, 2000). Das „Redox Cycling“ von Chinonen, etwa des Ubichinons, ist hieran beteiligt. Dabei wird das Chinon beispielsweise von der NADPH-CytochromP_{450}-Reduktase durch einen Ein-Elektronen-Transfer zu seinem entsprechenden Semichinonradikalanion reduziert. Das Semichinonradikalanion kann nun spontan Elektronen auf molekularen Sauerstoff transferieren, der in biologischen Systemen in hohen Konzentrationen vorliegt, und somit unter Bildung eines Superoxidradikals ($O_2^{\bullet -}$) zum Chinon reoxidieren (Brunmark & Candenas, 1989). Durch Zwei-Elektronen-

Reduktion von Chinonen, die durch die zytoprotektive NAD(P)H: Chinon-Oxidoreduktase („DT-Diaphorase“) katalysiert wird (Miller *et al*., 1986), wird das Semichinon und damit das „Redox Cycling“ umgangen: Das Enzym reduziert das Chinon unter Verbrauch von NAD(P)H zu seinem korrespondierenden Hydrochinon, das in Phase II des Fremdstoffmetabolismus konjugiert und schließlich ausgeschieden werden kann. Allerdings kann auch durch die Reoxidation des Hydrochinons zu seinem Semichinonradikalanion wiederum Superoxid entstehen.

Superoxidradikale können in der Folge zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid dismutieren:

(1) $$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Diese Reaktion verläuft spontan oder von Superoxiddismutasen katalysiert (Kappus & Sies 1981). In einer von Haber und Weiss 1934 postulierten Reaktion entsteht durch Reduktion von Wasserstoffperoxid durch Superoxid das hochreaktive Hydroxylradikal ($^{\bullet}OH$):

(2) $$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} + H^+ \longrightarrow O_2 + {}^{\bullet}OH + H_2O$$

Da die Reaktionskonstante dieser Reaktion allerdings nahezu gleich Null ist, wird sie in chemisch definierten Systemen nicht beobachtet (Gutteridge *et al.*, 1982; Halliwell 1982). Erst in Gegenwart von Eisenionen (Fe^{2+}) bildet sich aus Wasserstoffperoxid über die klassische Fenton-Reaktion ein Hydroxylradikal (Halliwell & Gutteridge, 1984; Gutteridge & Halliwell, 1989; Stadtman, 1990):

(3) $$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) – $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2, $^{\bullet}OH$ – können mit Bestandteilen der Zelle reagieren und verschiedenste zyto- und genotoxische Defekte verursachen. So können beispielsweise Proteine durch Oxidation von Sulfhydrylgruppen und Membranen und Lipide durch Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren geschädigt werden. Auf Ebene der DNA verursachen ROS neben Einzel- und Doppelstrangbrüchen eine Vielzahl weiterer oxidativer Schäden. Zu diesen zählen DNA-Protein-Vernetzungen, Depurinierungen oder Depyrimidinierungen. Die Modifikation von DNA-Basen kann zur Bildung von promutagenen DNA-Addukten führen. Dieses sind insbesondere das 8-Hydroxyguanin und das 5-Hydroxycytosin,

die zu Transversions- und Transitions-Punktmutationen führen können (Aruoma *et al.*, 1991).

Die Zelle verfügt über verschiedene antioxidative Systeme, die gebildete ROS abbauen können. Wie bereits beschrieben, wandelt die Superoxiddismutase Superoxid zu Wasserstoffperoxid um. Katalase entfernt Wasserstoffperoxid durch die Umwandlung zu Wasser und Sauerstoff (Kappus & Sies 1981):

(4) $$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Einen weiteren Schutz vor Zellschäden durch Wasserstoffperoxid bietet die selenhaltige Glutathionperoxidase (GPx). Unter Verbrauch von Glutathion (GSH) reduziert diese Wasserstoffperoxid zu Wasser. Das entstehende Glutathiondisulfid (GSSG) wird anschließend durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase (GR) zu Glutathion reduziert. So bilden GPx, GR, GSH und NADPH ein gekoppeltes antioxidatives System (Biesalski, 2000):

(5) $$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow 2\ H_2O + GSSG$$

(6) $$GSSG + 2\ NADPH \longrightarrow 2\ GSH + 2\ NADP^+$$

Die übermäßige Bildung von ROS durch Chinone führt zur Ausschöpfung der antioxidativen Kapazitäten und folglich zur Erzeugung von „oxidativem Stress“, also der Verschiebung des Verhältnisses der Fließgleichgewichtskonzentrationen von Anti- und Prooxidantien zugunsten letzterer (Sies & Cadenas, 1985; Sies, 1986). Oxidativer Stress wird als mitverantwortlich für die Entstehung vieler Erkrankungen angesehen. Als potentielle „free radical diseases“ werden unter anderem kardiovaskuläre Störungen (Hypertonie, Arteriosklerose, Myokardinfarkt), Autoimmunerkrankungen (Rheuma, Diabetes) und neurodegenerative Prozesse (Parkinson, Alzheimer) diskutiert (Cai & Harrison, 2000; Babior, 2000).

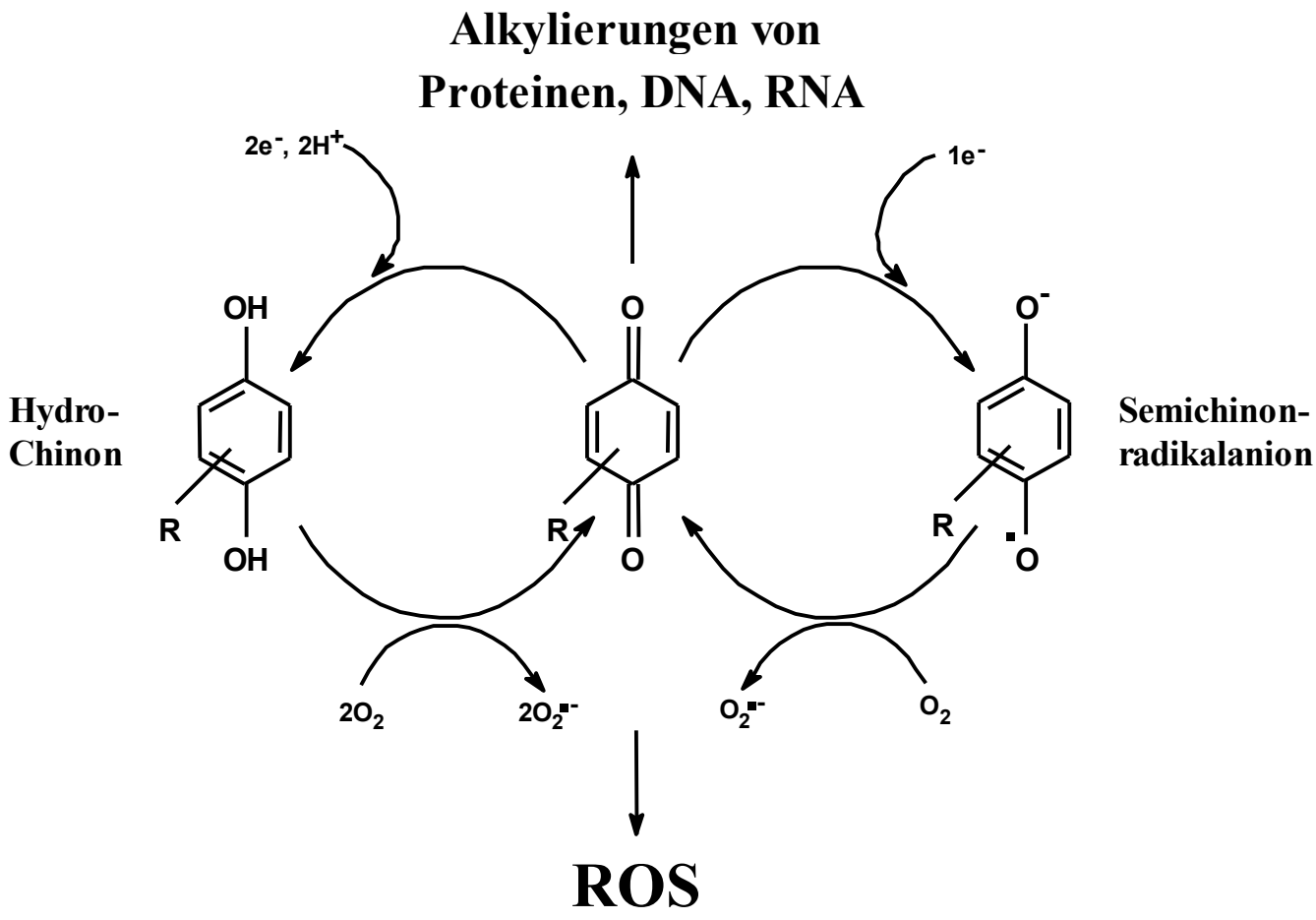

Abb.1: Alkylierungen und Redox-Cycling durch Chinone führen zu Bildung von Chinon-Addukten zellulärer Bestandteile und von reaktiven Sauerstoffspezies (nach Bolton *et al.*, 2000).

Viele Chinone sind ferner auch klassische Michael-Akzeptoren, die kovalente Bindungen mit zellulären Nukleophilen eingehen können. Als Michael-Additionsreaktion bezeichnet man die Addition eines Nukleophils (Michael-Donor) an eine durch Konjugation zu einer Ketogruppe aktivierte C-C-Doppelbindung (Michael-Akzeptor). So kommt es zu Zellschäden durch Alkylierungen von DNA-Bestandteilen, RNA oder Proteinen (Thor *et al.*, 1982; Rossi *et al.*, 1986; Boatman *et al.*, 2000; Hargreaves *et al.*, 2000), also die Michael-Addition dieser Bestandteile an ein entsprechendes Chinon. Die Alkylierung von Thiolgruppen führt bei GSH zur Bildung des entsprechenden Glutathionyl-Hydrochinons und zur Abnahme des zellulären GSH-Spiegels. Dies führt im Zusammenspiel mit der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies zu einer zusätzlichen Abnahme zellulärer antioxidativer Kapazität.

Ein mögliches weiteres Ziel für Alkylierungsreaktionen durch Chinone sind Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen), da ihr aktives Zentrum einen unter physiologischen Bedingungen deprotonierten Cysteinrest enthält, der Chinone als Michael-Donor angreifen kann. Die Schädigung und Inaktivierung dieser PTPasen kann zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Tyrosin-Phosphorylierung und Phosphotyrosin-Dephosphorylierung zugunsten der Phosphorylierung führen.

1.2 Der EGF-Rezeptor

Für die Regulation von Wachstum, Überleben und Differenzierung eukaryotischer Zellen sind Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) von fundamentaler Bedeutung. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-Rezeptor, EGFR). Dieser ist ein Transmembranprotein von 171 kDa, welches modulartig aus drei Domänen aufgebaut ist. Der aminoterminale Teil des Proteins bildet mit 622 Aminosäuren die extrazelluläre, ligandenbindende Domäne. Diese enthält zwei cysteinreiche Abschnitte (Ullrich & Schlessinger, 1990). Das membrandurchspannende Segment bildet mit 23 hydrophoben Aminosäuren die zweite Domäne. Die dritte, intrazelluläre Domäne schließlich besteht aus 542 Aminosäuren und enthält die ATP und Substrat bindenden Regionen sowie am carboxyterminalen Ende des Proteins (Y845, Y992, Y1068, Y1086, Y1173) die Regionen für die Autophosphorylierung des Rezeptors (Wells, 1999; Boulougouris & Elder, 2002; Burgess *et al.*, 2003), die nach durch Ligandenbindung induzierter Dimerisierung in trans erfolgt. Der EGFR gehört neben drei weiteren, strukturell und funktionell eng verwandten Zellmembranrezeptoren zur Gruppe der sogenannten ErbB-Rezeptoren. So bezeichnet man den EGFR auch als ErbB1 oder HER1 und die verwandten Rezeptoren entsprechend als ErbB2, ErbB3 und ErB4, bzw. als HER2, HER3 und HER4 (Baselga, 2002).

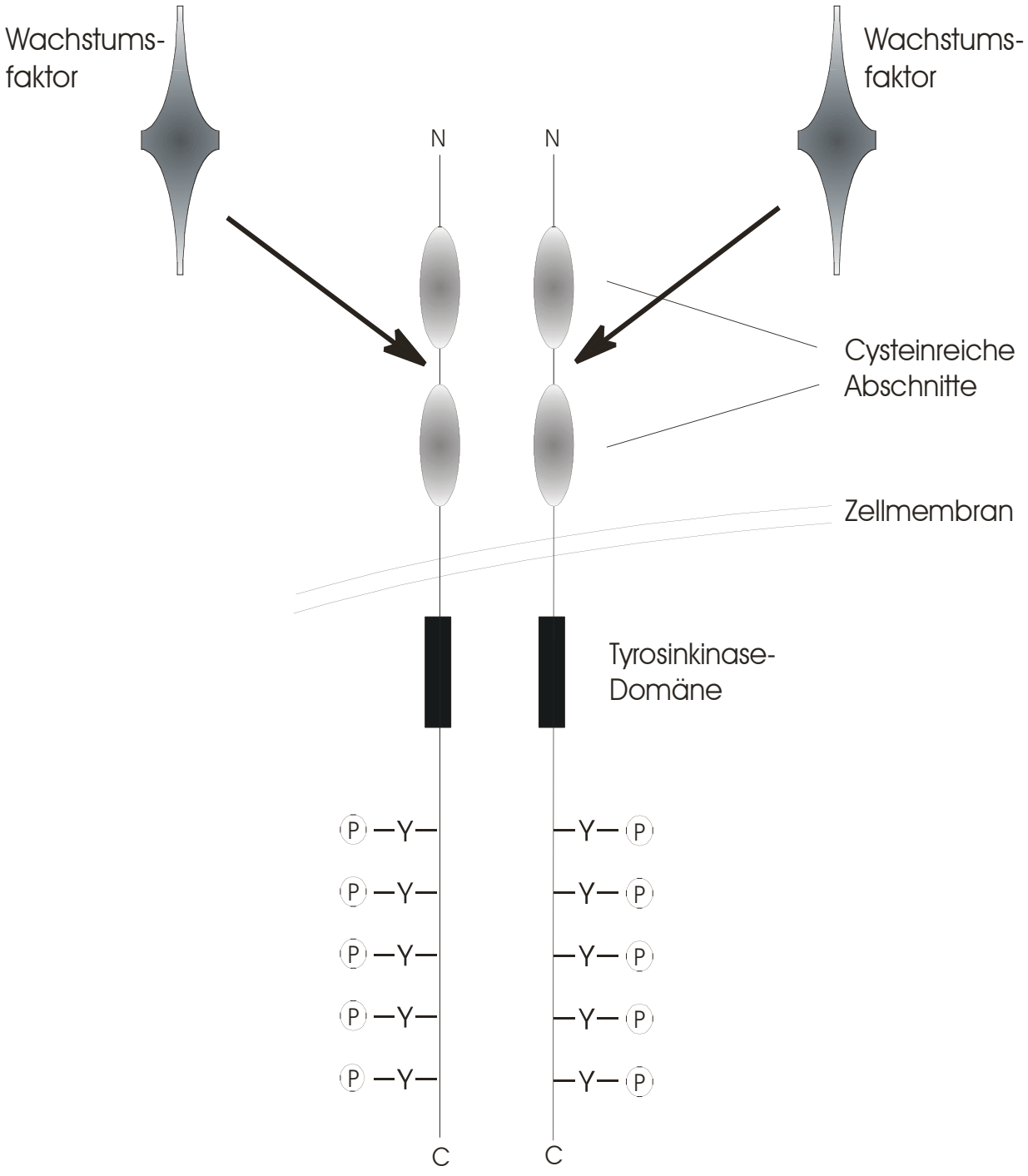

Abb.2: Struktur und Funktion des EGF-Rezeptors. Cysteinreiche, extrazelluläre Domäne (622 AS), lipophile Transmembrandomäne (23 AS) und intrazelluläre Domäne (542 AS) mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität.

Der EGFR ist in den Zellmembranen nahezu aller Epithel- und Stromazellen, sowie in bestimmten Glia- und Muskelzellen vorhanden. Hierbei ist von besonderem klinischen Interesse, daß ein Großteil verschiedener solider Tumoren eine Überexpression des EGFR aufweist. Hendler und Ozanne zeigten bereits 1984 mittels radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper, daß der EGFR in Lungentumoren in erhöhtem Maße exprimiert ist. Es finden sich ferner Überexpressionen von EGFR in Prostata-, Brust-, Magen-, Harnblasen-, oder kolorektalen, oder ovarialen Tumoren, beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC), sowie bei über 90 % der Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Hals-Bereich. Der Rezeptor spielt eine bedeutende Rolle für Wachstum und Überleben von Tumoren, und nicht selten korrelieren hohe Rezeptordichten mit einem aggressiveren klinischen Verlauf der Erkrankung (Salomon *et al.*, 1995; Woodburn, 1999; Hong & Ullrich, 2000). Zudem finden sich bei diversen hochaggressiven Tumoren durch Mutation veränderte, konstitutiv aktive Formen des EGFR, wie EGFRvIII, der auch ohne Ligandenbindung aktiv ist (Nishikawa *et al.*, 1994; Pedersen *et al.*, 2001).

Zelltyp	**Prozentualer Anteil der EGFR exprimierenden Tumoren**
Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals	80 – 100
Niere	50 – 90
NSCLC	40 – 80
Glioblastom	40 – 50
Ovarien	35 – 70
Harnblase	31 – 48
Pankreas	30 – 50
Kolon	25 – 77
Mamma	14 – 91

Tabelle 1: Häufigkeit einer erhöhten EGFR Expression in verschiedenen epithelialen Tumoren (Übersicht bei Hong & Ullrich, 2000).

Die Aktivierung des Rezeptors durch verschiedene Liganden wie den epithelialen Wachstumsfaktor (EGF), transformierenden Wachstumsfaktor α (TGF-α), Amphiregulin, β-Cellulin, Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HB-EGF), Epiregulin, durch Interleukin-8 (IL-8), oder durch Serumschock führt zu einer Homo-, respektive Hetero-Dimerisierung von ErbB Rezeptormolekülen (Schlessinger, 2002) und unmittelbar zur Aktivierung der intrinsischen Rezeptortyrosinkinase (RTK; Yarden & Sliwkowski, 2000). Die Überexpression der dem EGFR ähnlichen RTK Xmrk wurde als Ursache für die Melanombildung im Xiphophorus Fischmodell beschrieben, und es wird vermutet, daß die Expression des EGFR auch die Entwicklung menschlicher maligner Melanome im späten Stadium beeinflußt (Kraehn *et al.*, 1995).

Mit der Aktivierung der RTK kommt es zur Anlagerung von ATP und zu Autophosphorylierungen von Tyrosinresten in der zytosolischen Domäne, einschließlich Y845, Y992, Y1068, Y1086 und Y1173. Phosphorylierte Tyrosinreste am carboxyterminalen Ende des Rezeptors dienen als Bindungsstellen für zahlreiche Signalmoleküle, die eine sogenannte SH2-Domäne (Src-homologe Domäne Typ 2) besitzen, wie beispielsweise des zytosolischen Adapterproteins Grb2 (Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenes Protein 2; Downward, 1994).

1.3 Die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2

Nach der Bindung des Grb2 an den phosphorylierten EGFR bildet dieses mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (son of sevenless) einen Proteinkomplex, der das membrangebundene Onkogen Ras aktiviert. Ras gehört zur Gruppe der monomeren guaninnukleotidbindenden Proteine (G-Proteine) und nimmt eine Schlüsselstellung für die Aktivierung einer Reihe von durch Mitogene aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ein (Whitmarsch & Davis, 1996, 2000; Kyriakis & Avruch, 2001).

MAPK sind Kernstücke eines Signaltransduktionsnetzwerkes, das Proliferation, Differenzierung und zelluläres Überleben steuert (Hilger *et al.*, 2002). Den unterschiedlichen MAPK-Kaskaden ist eine hierarchische Verknüpfung dreier Enzymaktivitäten miteinander gemein. In der ersten Stufe dieser Signalkaskade phosphorylieren MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) die doppeltspezifischen MAPK-

Kinasen (MAPKK), die sodann durch eine Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten in einem -Thr-X-Tyr- Motiv MAPK in die aktive Form überführen. Im Falle der MAPK ERK1 und ERK2 (44 bzw. 42 kDa) wird die MAPKKK Raf durch Interaktion mit Ras aktiviert. Raf phosphoryliert die MAPKK MEK (auch MKK) 1 und MEK2, die dann die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1 und ERK2 katalysieren. Aktivierte ERK1/2 können dimerisieren und in den Kern wandern.

In den Zellkern translozierte ERK nehmen über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren Einfluß auf die Expression von Genen und somit auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Die Regulation der Expression sowohl des Cyclin D1 als auch der Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen $p21^{cip1}$ und $p27^{kip1}$ als Regulatoren der zellulären G_1-Phase sind hierbei besonders hervorzuheben (Osada & Saji, 2003). Dauer und Intensität der Aktivierung entscheiden über die genaue zelluläre Antwort auf ERK-Signale (Roovers & Assoian, 2000; Schwartz & Assoian, 2001).

Im Cytosol können aktivierte ERK verschiedenste Proteine, wie die Phospholipase A2, Mikrotubuli-assoziierte Proteine, oder auch die juxtamenbranäre Region des EGF-Rezeptors phosphorylieren (Seger & Krebs, 1995; Whitmarsh & Davis, 1996; Widmann *et al.,* 1999). Über die Phosphorylierung spezifischer Serinreste an Connexinmolekülen üben ERKs ferner einen direkten, hemmenden Einfluß auf die Zell-Zell-Kommunikation über Gap-Junctions aus (Warn-Cramer *et al.*, 1998).

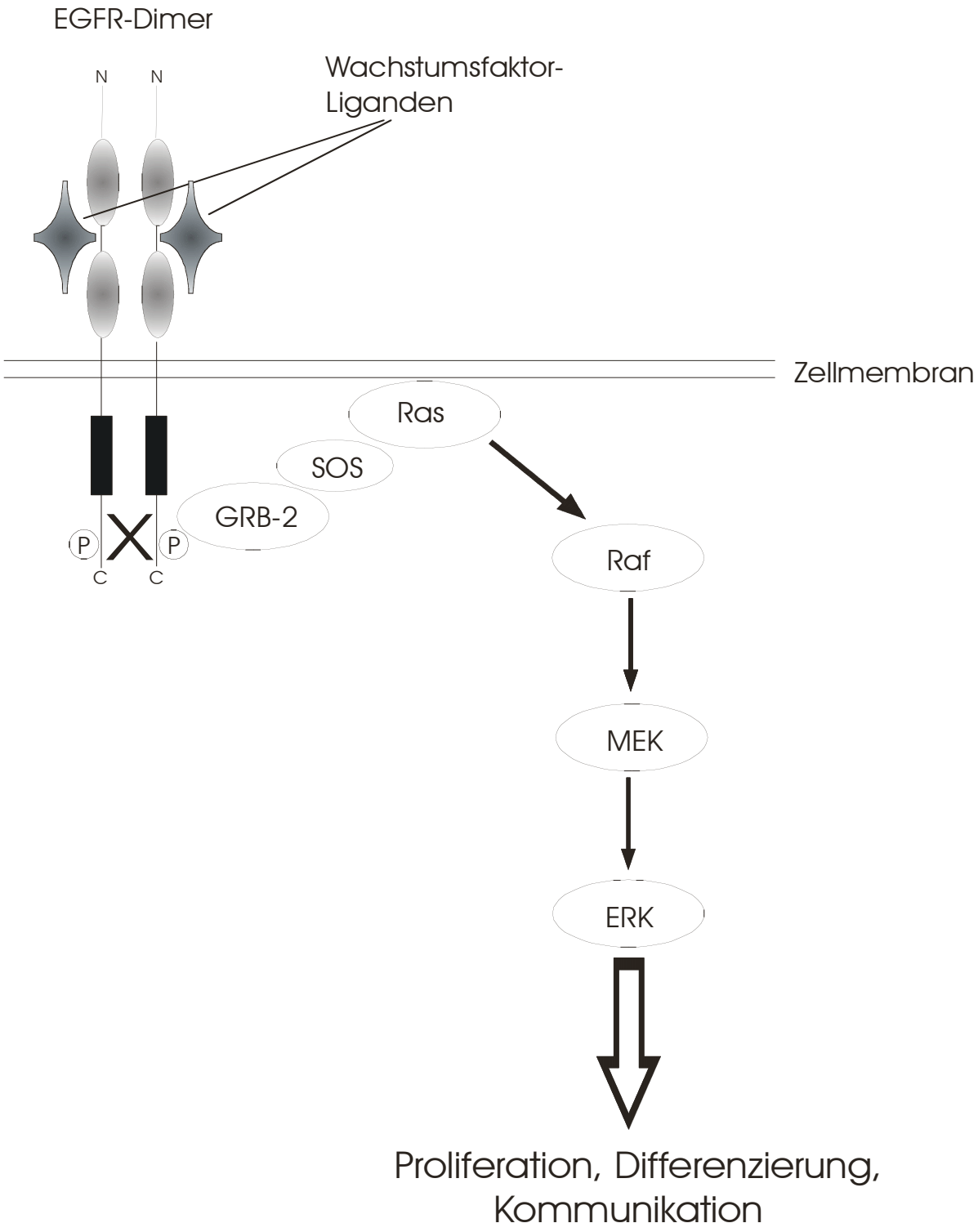

Abb. 3: Schematische Darstellung der EGFR-ERK Signaltransduktionskaskade.

1.4 Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Inhibitoren der Tyrosinkinasen des EGFR und des PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) sind niedermolekulare Verbindungen, die die Phosphorylierung, respektive Aktivierung der Rezeptoren verhindern. Die in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren sind die Tyrphostine AG 1478 [N-(3-Chlorphenyl)-6,7-dimethoxy-4-chinazolinamin], „Compound 56“ [4-((-3-Bromphenyl)-amino)-6,7-diethoxychinazoline] und AG 1295 (6,7-Dimethyl-2-phenylchinoxalin). AG 1295 gilt als selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase des PDGFR, während es sich bei den ersten beiden um spezifische Inhibitoren der EGFR Tyrosinkinase handelt (Bridges *et al.*, 1996; Rice, 1999; Chakravarti *et al.*, 2002). „Compound 56“ ist mit einer IC_{50} von 6 pM einer der potentesten Inhibitoren seiner Klasse (Bridges *et al.*, 1995).

Neben ihrer Verwendung bei *in vitro*-Experimenten, werden weiterentwickelte selektive Rezeptorinhibitoren derzeit auch als sogenannte „targeted cancer drugs“ in der Tumortherapie etabliert (Fry, 1999). Ein Beispiel für den erfolgreichen Einsatz eines selektiven EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors in der Klinik ist Astra Zenecas ZD1839 (Iressa, Gefitinib), welches als erstes Präparat seiner Art im Juli 2002 in Japan für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) zugelassen wurde. In vorausgegangenen Phase II-Untersuchungen (IDEAL 1 und 2) konnte bei über 40 % erfolglos vorbehandelter Patienten mit NSCLC eine Abnahme der Tumormasse und eine Besserung der Krankheitssymptome erreicht werden (Wakeling *et al.*, 2002; Kris & Tonato, 2002). 2003 wurde ZD1839 auch von der US-Zulassungsbehörde zur Behandlung des NSCLC zugelassen.

1.5 Beschreibung der untersuchten Chinone

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung dreier verschiedener Chinone untersucht, die im folgenden kurz beschrieben werden.

1.5.1 Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon / Vitamin K_3)

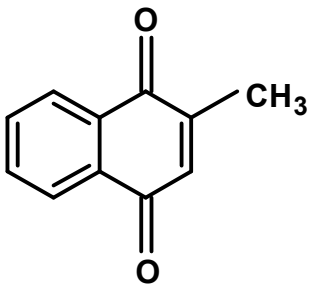

Abb. 4: Menadion

Die Familie der K-Vitamine umfasst zum einen die natürlich vorkommenden Formen Phyllochinon (Phytomenadion / Vitamin K_1) und Menachinon (Vitamin K_2), zum anderen das synthetisch erzeugte Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon / Vitamin K_3; Eder, 2002). Alle diese Verbindungen sind Naphthochinone und können durch „Redox Cycling“ reaktive Sauerstoffspezies erzeugen. Menadion, welches Zellen auch über die Alkylierung von zellulären Nukleophilen schädigen kann, ist als potenteste dieser Verbindungen ein häufig verwendetes Modellchinon für *in vitro*-Experimente. Menadion vermag das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* zu hemmen (Prasad *et al*., 1981; Noto *et al*., 1989; Wu *et al*.,1993; Chlebowski *et al*., 1985; Nutter *et al.*, 1991; Nishikawa *et al*., 1995; Liao *et al*., 2000; Okayasu *et al*., 2001; Osada *et al.*, 2001). Aufgrund seiner vielen, teils erheblichen Nebenwirkungen, ist der Einsatz von Menadion in der Humanmedizin jedoch nicht vertretbar. Auch der Einsatz als Nahrungsmittelergänzung in der Lebensmittelindustrie ist laut Bundesgesundheits-ministerium verboten.

Menadion ist bekanntermaßen mutagen und wirkt insbesondere toxisch auf Leberzellen. Es vermag die *de novo*-Synthese der DNA, sowie die mitochondriale ATP-Produktion zu hemmen (Redegeld *et al.,* 1990). Bei der Anwendung von Menadion kommt es zu Haut- und Schleimhautreizungen, allergischen Reaktionen,

sowie zur Ekzembildung. Hohe Dosen führen zu akuten Vergiftungserscheinungen mit Erbrechen und Albuminurie. Wechselwirkungen mit Erythrozyten führen zur Ausbildung hämolytischer Anämien, wovon insbesondere Neugeborene oder Patienten mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel betroffen sind (Eyer, 1997). Als Komplikationen können sich in der Folge dann eine Hyperbilirubinämie oder der gefürchtete Kernikterus ausbilden. Desweiteren wurden durch Menadion induzierte Plasmamembranschäden mit Störungen des Ca^{2+}-Spiegels (Brunmark & Cadenas, 1989), sowie Knochenanomalien bei gleichzeitiger Cumarintherapie beschrieben.

1.5.2 Doxorubicin (Adriamycin)

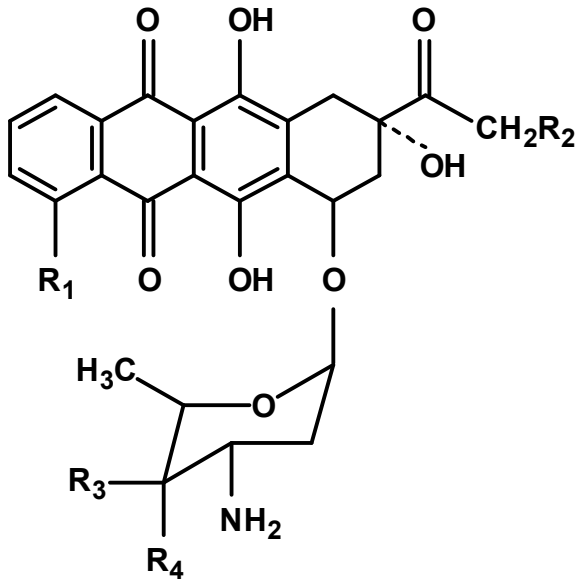

Abb. 5: Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Anthrazyklinantibiotikum mit antineoplastischen Eigenschaften. Es wird als Fermentationsprodukt aus Pilzen der Gattung *Streptomyces peucetius* gewonnen. Als Hauptmechanismus für die Zytotoxizität der Anthrazykline wird allgemein die starke DNA-Bindung, sowie die Hemmung der Topoisomerase II postuliert. Als Chinone vermögen sie es jedoch auch, Zellen über „Redox Cycling“ zu schädigen. Hauptlimitation für den Einsatz von Anthrazyklinen ist eine kumulative, dosisabhängige Kardiotoxizität, welche vornehmlich durch die oxidative Schädigung

kardialer Mitochondrienmembranen und mitochondrialer Enzyme verursacht wird (Eder, 2002).

Doxorubicin ist direkt wirksam und bedarf keiner metabolischen Aktivierung. Bei der hepatischen Inaktivierung durch die Spaltung der Glykosidbindung, entsteht neben verschiedenen inaktiven Metaboliten auch das zytotoxische Doxorubicinol.

Doxorubicin wird in der Behandlung diverser solider Tumoren, sowie zur Remissionsinduktion akuter Leukämien eingesetzt. Eine neue Form der Chemotherapie ist die erfolgreiche Applikation von PEGyliertem, liposomalem Doxorubicin (Doxil, Caelyx) in der Behandlung des AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkoms, bei Patienten, die eine Chemotherapie mit anderen Medikamenten nicht tolerieren oder bei denen die Erkrankung unter Therapie progrediert (Hengge *et al.*, 2001). Doxorubicin ist nachweislich mutagen, teratogen und karzinogen.

1.5.3 Mitomycin C

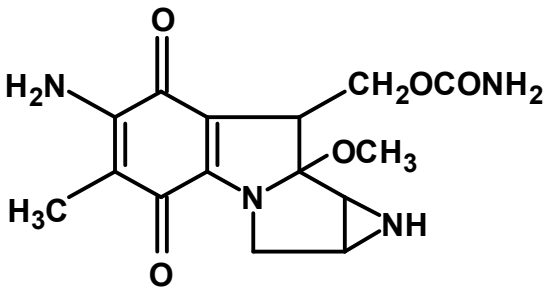

Abb. 6: Mitomycin C

Das Antibiotikum Mitomycin C ist ein Zytostatikum, welches als Fermentationsprodukt aus Pilzen der Gattung *Streptomyces caespotius* gewonnen wird. Als Chinon vermag es Zellen über die oben beschriebenen Mechanismen zu schädigen. Im Gegensatz zu Doxorubicin entfaltet Mitomycin C seine zytostatischen Eigenschaften erst nach Metabolisierung. Nach Reduktion des vorliegenden Chinons zu seinem Hydrochinon wird die Methoxygruppe abgespalten, der Aziridinring geöffnet und die Urethanseitenkette abgespalten. Hierbei entsteht ein bifunktionelles Alkylans, das in der Lage ist, komplementäre DNA-Stränge quer zu vernetzen (Iyer und Szybalski, 1964; Plumb & Workman, 1994; Chirrey *et al.*, 1995; Cummings *et al.*,

1995). Mitomycin C wird in der Behandlung diverser solider Tumoren und bei der Therapie der chronisch-myeloischen Leukämie seit den 1960er Jahren intensiv eingesetzt. Wie auch Doxorubicin ist Mitomycin nachweislich mutagen, teratogen und karzinogen (Eder, 2002).

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Zellen reagieren auf Stimuli, die durch die Exposition mit xenobiotischen Chinonen gesetzt werden, mit der Aktivierung stressinduzierter Signalkaskaden, die für die Regulation von Zellproliferation und Zelldifferenzierung verantwortlich sind. In Vorarbeiten an Hautfibroblasten konnte gezeigt werden, daß Menadion ERK1/2 zu aktivieren vermag (Klotz, 1998; Klotz, *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Mechanismus einer solchen Aktivierung in Rattenleberepithelzellen analysiert werden, wobei insbesondere die Bedeutung des EGF-Rezeptors untersucht werden sollte. Neben dem Modellchinon Menadion sollten weiterführend die klinisch relevanten Chinonverbindungen Doxorubicin und Mitomycin C hinsichtlich einer Aktivierung des EGFR untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Soweit nicht anders beschrieben, handelte es sich bei den verwendeten Substanzen und Lösungen um handelsübliche Chemikalien, welche von den Firmen Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen wurden. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt, welches auf einer Milli-Q Anlage (Fa. Millipore, Eschborn) aufbereitet wurde.

Die verwendeten primären Antikörper (anti-phospho-ERK1/2, anti-pan-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-pan-p38, anti-phospho-Tyrosin, anti-EGFR) stammen von der Firma Cell Signalling Technologies (Beverly, MA, USA), bzw. von der Firma Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Die sekundären Antikörper mit an Peroxidasen gekoppelten anti-Kaninchen-IgG und anti-Maus-IgG stammten von der Firma Promega (Mannheim)**,** bzw. von der Firma ICN (Costa Mesa, CA, USA).

2.2 Zellkultur

Die verwendeten WB-F344 Ratten-Leberepithelzellen wurden freundlicherweise von Dr. James E. Trosko, Michigan State University (East Lansing, Michigan, USA), zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine diploide Zellinie aus phänotypisch normaler Leber einer erwachsenen Ratte (Tsao *et al*., 1984). Diese Epithelzellen sind entweder Stammzellen oder frühe Vorläuferzellen der Rattenleber (Coleman *et al.*, 1997) und zeichnen sich unter anderem dadurch aus, daß sie große Mengen Connexin43 exprimieren (Zhang & Thorgeirsson, 1994).

Die Zellen wurden in Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) der Firma Sigma mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS; Fa. Greiner, Frickenhausen), 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin, in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) Kohlendioxid bei 37°C bis zur Konfluenz herangezogen. Die Materialien für die Zellkultur stammten von der Firma Greiner.

2.3 Behandlung der Zellen

2.3.1 Behandlung mit Chinonen und Inhibitoren

WB-F344 Zellen wurden in 30 mm-, respektive 90 mm-Kulturschalen zu 100 % Konfluenz herangezogen. Nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen wie folgt behandelt. Das Kulturmedium wurde aspiriert und die Zellen zum Entfernen von FCS-Rückständen und Zelltrümmern 2 Male mit PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4 und 1,4 mM KH_2PO_4; pH 7,2-7,4) gewaschen. Für die Behandlung wurden aus einer 100 mM Menadion-Stammlösung (in Dimethylsulfoxid, DMSO), Arbeitslösungen der Konzentrationen 25, 50 und 100 µM in FCS-freiem DMEM (aber mit 2 mM L- Glutamin und Penicillin/Streptomycin) erstellt. Die Zellen wurden mit diesen Arbeitslösungen überschichtet und für Zeiträume von 15 bis 60 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Für Menadion-haltige Lösungen wurden lichtundurchlässige Behältnissen verwendet, da das Chinon lichtempfindlich ist. Aus dem gleichen Grund fanden alle Experimente bei stark reduzierter Beleuchtung statt.

Die Behandlung mit Doxorubicin und Mitomycin C erfolgte analog. Dazu wurden aus Stammlösungen von Doxorubicin (25 mM in Wasser) oder Mitomycin (10 mM in Wasser) Arbeitslösungen in 100 µM Konzentration in FCS-freiem DMEM erstellt. Die Inkubation der Zellen mit den Arbeitslösungen erfolgte nun für jeweils 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2.

Zur Behandlung der Zellen mit den EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren AG 1478 (Calbiochem, Schwalbach) und „Compound 56“ (Calbiochem) sowie mit dem PDGFR Kinase-Inhibitor AG 1295 (Calbiochem) wurden aus 10 mM Inhibitoren-Stammlösungen in DMSO Arbeitslösungen in DMEM (10 µM Endkonzentration) erstellt.

Die Zellen wurden 30 Minuten mit den Inhibitoren bei 37°C und 5 % CO_2 vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde das Medium gegen Menadion und Inhibitor enthaltendes serumfreies DMEM ausgetauscht und die Zellen für weitere 15 bis 60 Minuten inkubiert.

2.3.2 Behandlung mit epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) zur Verminderung der EGFR-Konzentration

Zur Induktion der rezeptorvermittelten Endozytose des EGFR werden Zellen für 1 h mit hohen Konzentrationen EGF behandelt und anschließend für 2 h in Abwesenheit von EGF inkubiert.

WB-F344 Zellen wurden in 30 mm-Kulturschalen zu 100 % Konfluenz herangezogen. Nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers, wurden die Zellen wie folgt behandelt. Das konditionierte Kulturmedium wurde gesammelt und nach Zugabe von rekombinanten humanen EGF (epidermaler Wachstumsfaktor, R&D Systems; Wiesbaden) in einer Konzentration von 400 ng/ml, bzw. nach Zugabe des Vehikelpuffers (EGF-Puffer: 100 ml 0,1% BSA, 44 µl 37% HCl), wieder auf die Zellen gegeben. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit frischem, serumfreien DMEM für 120 Minuten bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert und nach Waschen mit PBS wie gewünscht behandelt.

2.4 Probenanalyse

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde nach der Behandlung der Zellen zunächst das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen, um DMEM- und Zelltrümmer zu entfernen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das PBS aspiriert und die Zellen dann mit doppelt konzentriertem SDS-PAGE Ladepuffer [125 mM Tris; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 100 mM DTT; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8] lysiert. Zur Denaturierung der viskosen DNA und aller Proteine wurden die Proben 2 Sekunden lang sonifiziert und anschließend für 3 bis 5 Minuten auf 95°C erhitzt.

Die verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele und Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

- Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele (10% bzw. 8% Acrylamid):
  Trenngel (10% Acrylamid): 33,3% (v/v) Lösung 1; 25% (v/v) Lösung 2; 41,7% (v/v) H_2O; 7 x 10^{-3}% (v/v) APS; 7 x 10^{-4}% (v/v) N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin (TEMED).
  Trenngel (8% Acrylamid): 26,6% (v/v) Lösung 1; 25% (v/v) Lösung 2; 48,4% (v/v) H_2O; 7 x 10^{-3}% (v/v) APS; 7 x 10^{-4}% (v/v) TEMED.
  Sammelgel (4% Acrylamid): 13,4% (v/v) Lösung 1; 30% (v/v) Lösung 3; 56,6% (v/v) H_2O; 7,5 x 10^{-3}% (v/v) APS; 7 x 10^{-4}% (v/v) TEMED.

- Zusammensetzung der einzelnen Lösungen:
  Lösung 1: 30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid
  Lösung 2: 0,4% (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8mM EDTA); pH 8,8
  Lösung 3: 0,4% (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8mM 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.

Die 1 mm dicken Gele wurden in zwei Arbeitsschritten hergestellt. Im ersten Schritt wurde das Trenngel gegossen und während des Polymerisierens mit Isopropanol überschichtet. Nach Entfernen des Isopropanols wurde im zweiten Schritt das Sammelgel gegossen. Fertig gegossene Gele sind bei 4°C mehrere Tage haltbar. Die Gelläufe wurden in Novex-Minigel-Kammern (Novex, Frankfurt) durchgeführt.

Nach Beladung der Geltaschen mit 15 bis 20 µl Probe erfolgte der Gellauf stromkontrolliert mit 60 mA pro Gel in Elektrophoresenpuffer [0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8] für ca. 80 Minuten, bis das Bromphenolblau aus dem Gel herausgetreten war.

2.4.2 Immunopräzipitation

Nach Behandlung der Zellen in 90 mm-Kulturschalen wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das PBS gründlichst aspiriert, um ein möglichst geringes Restvolumen an PBS auf den Zellen zurückzubehalten. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl eiskaltem IP-Puffer (30 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 10 mM NaF; 5 mM Na_3VO_4; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) lysiert und mit einem Zellschaber gesammelt.

Unlösliches Zellmaterial wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 20000 g in einer Mikrozentrifuge sedimentiert und der Überstand anschließend in frische Reaktionsgefäße transferiert.

Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde nach Bradfordt (1976) bestimmt und dann durch Zugabe entsprechender Volumina von IP-Puffer auf Konzentrationen von 1,4 mg/ml eingestellt.

Jeweils 4 µl polyklonaler Anti-EGFR-Antikörper aus Kaninchen (Upstate Biotechnology) , sowie 50 µl einer 50 %-igen, in IP-Puffer gewaschenen Protein A-Agarose (Upstate Biotechnology) wurden zu 500 µl Probe pipettiert. Das Waschen der Agarose erfolgte zweimal mit IP-Puffer.

Über einen Zeitraum von 14 bis 20 h wurde der EGF-Rezeptor unter langsamer Überkopfrotation der Reagenzgefäße bei 4°C präzipitiert. Anschließend wurde die Agarose zweimal mit IP-Puffer, sowie einmal mit IP-Waschpuffer (25 mM Tris, pH 6,8; 1 mM EDTA) gewaschen und dann mit 50 µl vierfach konzentriertem SDS-PAGE Ladepuffer versetzt. Nach gründlichem Mischen der Proben wurden diese für 3 bis 5 Minuten auf 95° C erhitzt. Die Proben wurden für 3 Minuten in einer Tischzentrifuge bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert, erneut gemischt, wiederum zentrifugiert und nochmals für 3 Minuten auf 95°C erhitzt, um eine maximale Menge an Protein zu gewinnen.

Jeweils 20 µl des Überstandes mit gelöstem immunopräzipitiertem Material wurden nach einem abschließenden 5-minütigen Zentrifugationsvorgang auf ein 8 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradfordt (1976) mit dem „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (Bio-Rad, München). Hierzu wurde 1 µl des Zellextraktes in 800 µl Wasser aufgenommen und mit 200 µl „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubationsphase wurde die Extinktionsänderung bei 595 nm spektrometrisch gemessen. Eine BSA-Stammlösung bekannter Konzentration diente der Erstellung einer Standardkurve.

2.4.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF; Hybond ECL; Amersham, Braunschweig) transferiert. Nach Aktivierung der Membran in Methanol und anschließendem Äquilibrieren von Gel und Membran in Transferpuffer [25 mM Tris; 200 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; pH 8,5], wurden diese zusammen mit 3 mm starken Gel-Blotting-Papieren (Fa. Karl Roth, Karlsruhe) entsprechend Abbildung 7 luftblasenfrei zusammengestellt. Der Transfer erfolgte stromreguliert für mindestens 60 Minuten bei 100 mA pro Minigel (Richtwert: 0.8 mA/cm² für 1-2 h, die Spannung übersteigt hierbei keine 15 V) in einer Semi-Dry-Blotting Apparatur (Trans-Blot SD, BioRad). Bei Gelen mit Proben aus EGFR Immunopräzipitationen erfolgte der Transfer spannungsreguliert bei 25 V für 180 Minuten mittels Tankblotting (Xcell II Blot Module, Novex).

Der Proteintransfer wurde durch reversible Anfärbung der Banden mit einer essigsauren Ponceau S Lösung [0,1% Ponceau S (w/v), 5% Essigsäure (v/v)] kontrolliert. Eine Gegenkontrolle erfolgte mittels Coomassie Brillant Blue. Hierzu wurde das Gel in einer Lösung aus 0,1 % (w/v) Coomassie Serva Blue R in 10% (v/v) Eisessig, 30 bis 40 % (v/v) Methanol und 50 bis 60 % Wasser für 30 Minuten fixiert und angefärbt. Die Entfernung überschüssigen Farbstoffs erfolgte durch Schwenken des Gels in Entfärberlösung [10% (v/v) Eisessig, 40% (v/v) Ethanol].

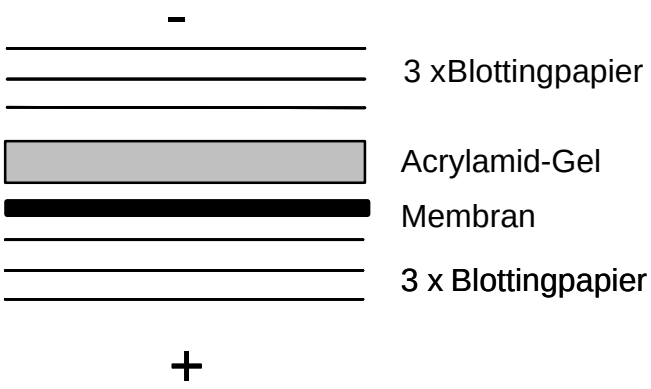

Abb. 7: Schematischer Aufbau einer Elektrotransfereinheit für Western Blotting (semi-dry)

Unspezifische Bindestellen wurden, je nach den Anforderungen des Primärantikörpers, durch Inkubation der Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einem Blockierpuffer aus TBS-Tween [„Tris buffered saline with Tween"; 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6 + 0,1% (v/v) Tween-20] mit 5 % Magermilchpulver (BioRad), bzw. in TBS-Tween mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA, Fraktion V; Fa. Roth), blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 90 Minuten bei RT oder über Nacht bei 4°C. Dieser wurde in der Regel 1:1000 in Blockierpuffer verdünnt. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten bei RT mit TBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG bzw. anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase), erfolgte über 60 Minuten bei RT (Verdünnung i.d.R. 1:1000 bis 1:5000 in TBS-Tween). Abschließend wurde die Membran dreimal in TBS-Tween für jeweils 5 Minuten bei RT gewaschen.

Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch 5-minütige Inkubation der Membran mit „ECL+" (Amersham). Dieses interagiert mit der, an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase, wobei die entstehende Chemoilumineszenz einen geeigneten Film (Hyperfilm ECL) belichtet.

2.5 Entfernen von Antikörpern („Strippen“)

Sollten mehrere verschiedene Immunodetektionen nacheinander durchgeführt werden, so wurde die PVDF-Membran nach der Belichtung des Films kurz mit TBS-Tween gewaschen und dann für 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C in „Stripping“-Puffer [100 mM ß-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,8] geschwenkt, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran zwei- bis dreimal in großen Volumina von TBS-Tween bei RT gewaschen. Für die neue Immunodetektion wurde nun wieder mit dem Blockierungsschritt, wie unter 2.4 beschrieben, begonnen.

Da mit dem „Strippen“ auch ein Teil des transferierten Proteins verlorengeht, sollte zunächst das Antigen nachgewiesen werden, das vermutlich in der geringsten Menge vorliegt.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung von MAP-Kinasen durch Menadion und Effekte spezifischer Kinaseinhibitoren

3.1.1 Menadion-induzierte ERK1/2-Aktivierung und ihre Hemmung durch Inhibitoren des EGF-Rezeptors

WB-F344 Rattenleberepithelzellen wurden für 15 bis 60 Minuten mit Menadion (50 µM) sowie mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG 1478 (10 µM) behandelt. Anschließend wurden die Zellen in doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Änderungen der Phosphorylierung und der Aktivierung von ERK1/2 wurden über Western-Blot Analyse und Immundetektion mit anti-phospho-ERK1/2-Antikörpern untersucht.

Für alle untersuchten Zeitpunkte zeigte sich bei den mit Menadion behandelten Zellen eine deutliche Phosphorylierung von ERK1/2. Bei den Zellen, die zusätzlich mit AG 1478 behandelt wurden, zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung. Für die nur mit dem Vehikel DMSO bzw. mit AG 1478 und DMSO behandelten Zellen zeigte sich keinerlei Phosphorylierung (Abb. 8.A).

Zur Kontrolle auf Proteingehalt der Proben nach Elektrotransfer und auf eine etwaige Veränderung des zellulären Gehalts an ERK1/2 durch die Behandlung wurden die eingesetzten Membranen von Antikörpern aus der Detektion von phospho-ERK1/2 befreit (vgl. Kap. 2.5) und einer zweiten Immunodetektion mit pan-ERK-spezifischen Antikörpern unterzogen. Diese zeigte neben einer gleichmäßigen Proteinverteilung auch den charakteristischen Bandenshift von phosphorylierten ERK in den mit Menadion behandelten Proben (Abb. 8.B).

Neben AG 1478 wurde auch der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor „Compound 56“ (10 µM) verwendet. Auch hier zeigte sich eine signifikante Hemmung der ERK1/2 Phosphorylierung für die untersuchten Zeiträume (Abb. 9).

Desweiteren wurde die Wirkung des PDGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors AG 1295 auf die durch Menadion induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Im Gegensatz zu den mit den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren behandelten Zellen zeigte sich hier jedoch keine Hemmung der ERK1/2 Phosphorylierung (Abb. 10).

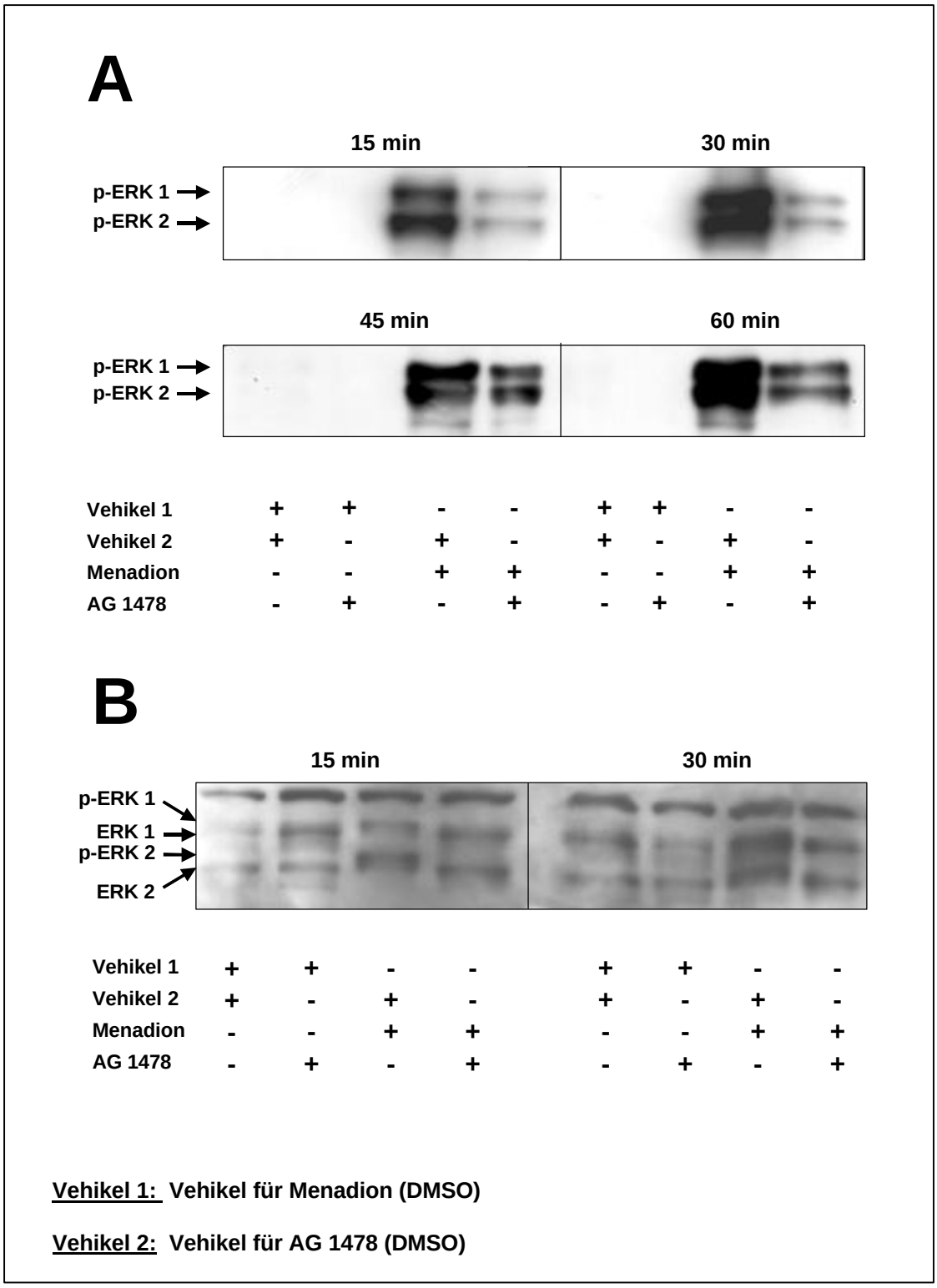

Abb. 8: Effekt des EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors AG 1478 (10 µM) auf die durch Menadion (50 µM) induzierte ERK1/2-Aktivierung. **A**: Untersuchung auf ERK-Phosphorylierung durch Verwendung phospho-ERK-spezifischer Antikörper. **B**: Untersuchung der elektrophoretischen Mobilität von phosphorylierten und nicht-phosphorylierten ERK1 und ERK2 durch Verwendung eines pan-ERK-spezifischen Antikörpers. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

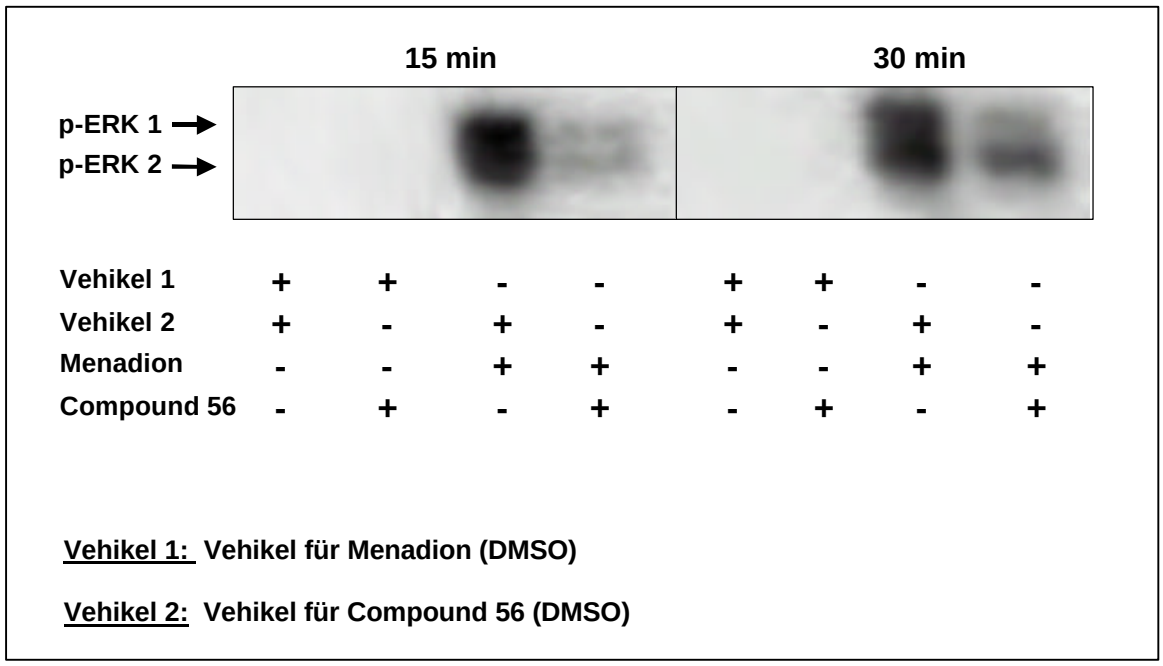

Abb. 9: Effekt des EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors „Compound 56“ (10 µM) auf die durch Menadion (50 µM) induzierte ERK1/2-Aktivierung. Western-Analyse unter Verwendung eines phospho-ERK-spezifischen Antikörpers. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

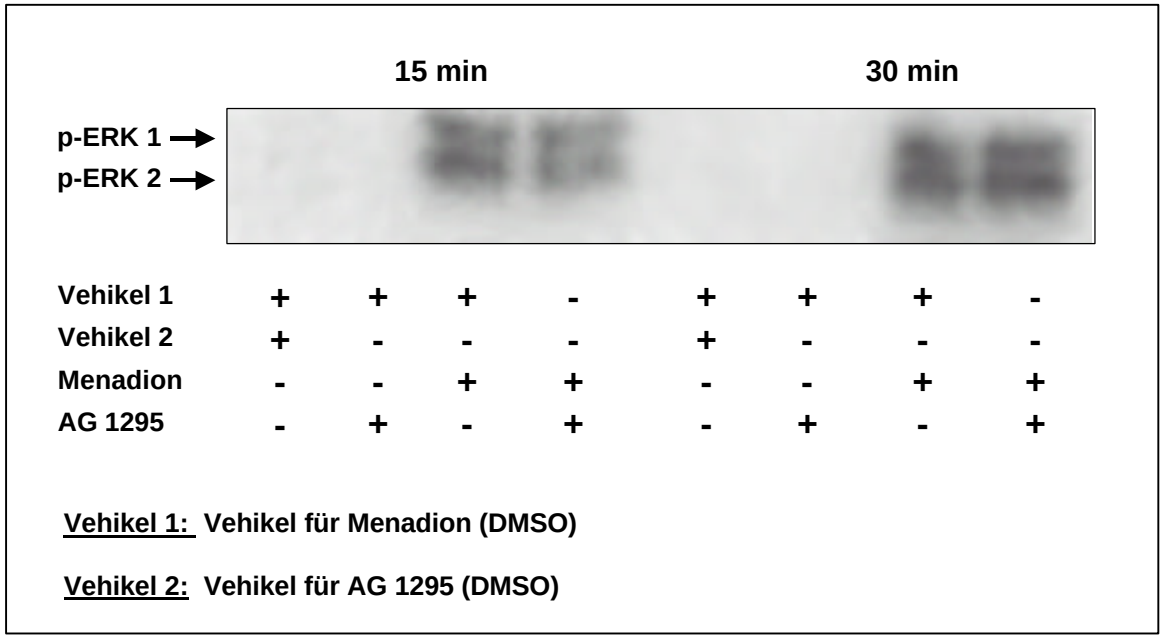

Abb. 10: Effekt des PDGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors AG 1295 (10 µM) auf die durch Menadion (50 µM) induzierte ERK1/2-Aktivierung. Western-Analyse unter Verwendung eines phospho-ERK1/2-spezifischen Antikörpers.

3.1.2 Effekt von AG 1478 auf die Menadion induzierte p38-Aktivierung

Um die Spezifität von AG 1478 für den EGFR zu zeigen, wurde die Hemmung der Aktivierung eines vom EGFR großenteils unabhängigen Signalwegs durch Menadion untersucht.

WB-F344 Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben mit Menadion und AG 1478 behandelt. Die Phosphorylierung der p38-MAP Kinase wurde über Western-Blot Analyse und Immunodetektion mit phospho-p38-spezifischen Antikörpern untersucht. Auch hier zeigte sich für die mit Menadion (50 µM) behandelten Zellen eine deutliche Phosphorylierung. Anders als bei ERK1/2 fand sich hier jedoch kein hemmender Effekt des AG 1478, was für die Spezifität des Inhibitors für EGFR spricht (Abb. 11).

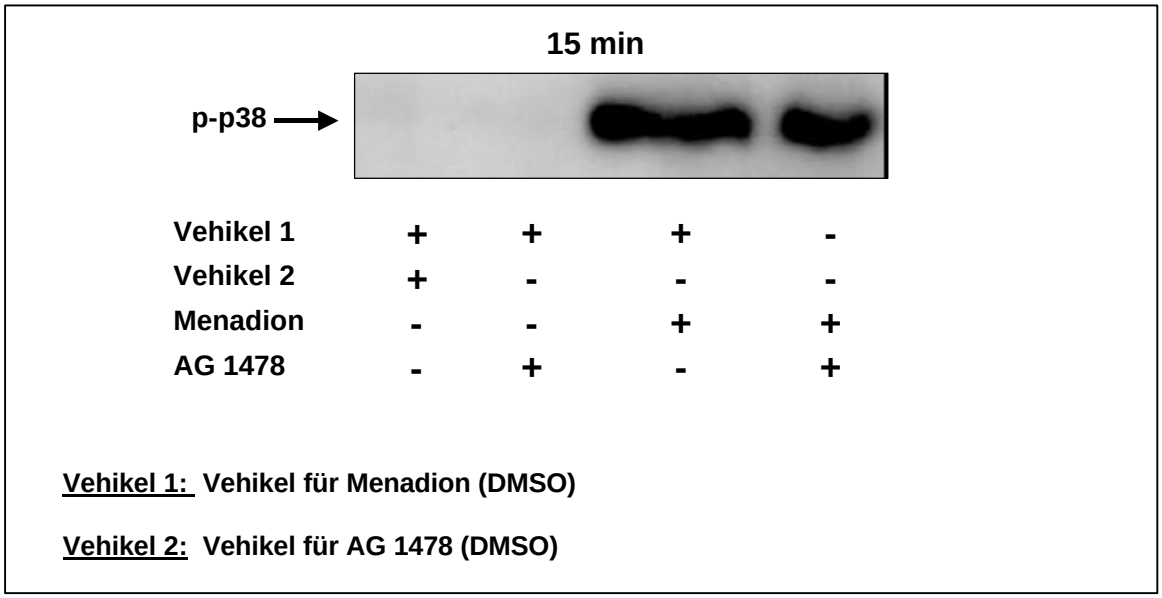

Abb. 11: Effekt des EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors AG 1478 (10 µM) auf die durch Menadion (50 µM) induzierte p38 MAP-Kinase Aktivierung. Western-Analyse unter Verwendung eines phospho-p38-spezifischen Antikörpers.

3.2 Einfluß von EGF-Vorinkubation auf Menadion-induzierte ERK1/2-Aktivierung

Um die Bedeutung des EGFR für die durch Menadion-induzierte ERK-Aktivierung auf andere Weise zu zeigen, wurde der zelleigene Mechansimus der rezeptorvermittelten Endozytose nach Überstimulation des EGFR (Masiu *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000a; Sorkin, 2001) ausgenutzt.

Dazu wurden WB-F344 Zellen mit hochkonzentriertem rekombinanten menschlichen EGF (400 ng/ml Endkonzentration) über einen Zeitraum von 60 Minuten vorbehandelt. Nach einer 120-minütigen Erholungsphase in serumfreiem DMEM erfolgte im zweiten Versuchsabschnitt eine 15-minütige Behandlung mit Menadionlösungen verschiedener Konzentrationen (5, 10, 25 µM), mit dem Vehikel DMSO oder, zur Kontrolle auf Erfolg der Verringerung der Rezeptordichte, mit EGF (100 ng/ml). Anschließend wurden die Zellen in doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer lysiert und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Änderungen der Phosphorylierung und der Aktivierung von ERK1/2 wurden über Western-Blot-Analyse und Immunanfärbung mit anti-phospho ERK1/2-Antikörpern untersucht.
Es zeigte sich sowohl für die im zweiten Versuchsabschnitt mit EGF (100 ng/ml) behandelten Zellen als auch für die Zellen, die mit 25 µM Menadionlösungen behandelt worden waren, eine deutliche Phosphorylierung der ERK1/2 MAP Kinasen. Für die mit 10 µM Menadionlösungen behandelten Zellen zeigte sich eine leichte Phosphorylierung. Bei Betrachtung der einzelnen Konzentrationen zeigte sich, daß jeweils die Zellen, die mit EGF (400 ng/ml) vorbehandelt worden waren, eine schwächere ERK1/2-Phosphorylierung aufwiesen als die mit Puffer vorbehandelten Zellen. Für die mit DMSO und die mit 5 µM Menadionlösungen behandelten Zellen ließ sich keine signifikante ERK1/2-Aktivierung erkennen (Abb. 12.A).

Zur Kontrolle auf Proteingehalt der Proben nach Elektrotransfer und auf eine etwaige Veränderung des gesamten ERK1/2 durch die Behandlung wurden die eingesetzte Membran von Antikörpern aus der Detektion von phospho-ERK1/2 befreit und einer zweiten Immunodetektion mit pan-ERK-spezifischen Antikörpern unterzogen. Es zeigte sich eine gleichmäßige Proteinverteilung für alle Proben (Abb. 12.B).

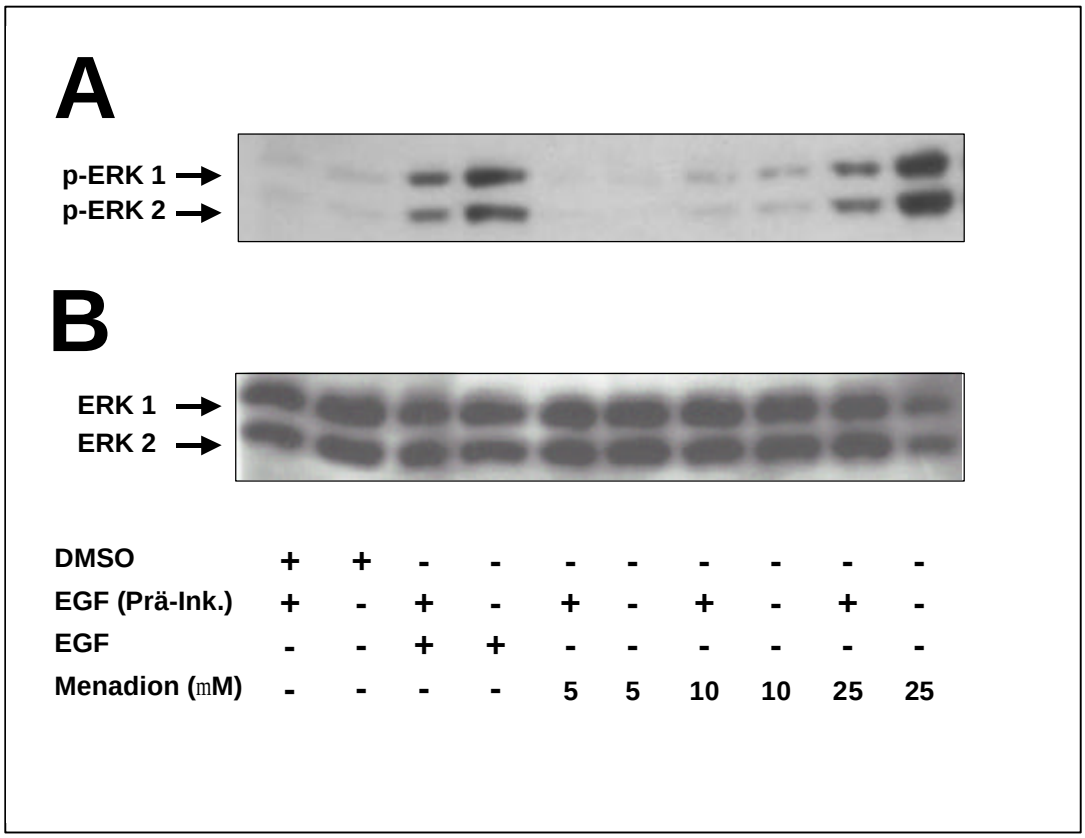

Abb. 12: Mit hochdosiertem human-EGF (400 ng/ml, 60 Minuten) vorbehandelte Zellen zeigen nach 120-minütiger Erholungsphase in serumfreien DMEM eine geringere durch EGF oder Menadion induzierte ERK 1/2-Aktivierung als die nicht-vorbehandelten Kontrollen. **A**: Untersuchung auf ERK-Phosphorylierung durch Verwendung phospho-ERK-spezifischer Antikörper. **B**: Nachweis von ERK1 und ERK2 durch Verwendung eines pan-ERK-spezifischen Antikörpers.
Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.3 Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Menadion

Nach den Hinweisen auf die Bedeutung des EGFR für die Aktivierung von ERK1/2 durch Menadion (Kap. 3.1, 3.2) sollte nun die Aktivierung bzw. Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR nachgewiesen werden.

WB-F344 Zellen wurden über einen Zeitraum von 15 Minuten mit Menadionlösungen verschiedener Konzentrationen (25 µM, 50 µM, 100 µM), mit menschlichem EGF (100 ng/ml; 15 Minuten), oder mit dem Vehikel DMSO behandelt. Als zusätzliche Kontrolle dienten Zellen, denen für die jeweiligen Zeiträume lediglich FCS-freies DMEM zugesetzt wurde. Nach Behandlung der Zellen wurden diese in eiskaltem IP-Puffer lysiert und anschließend der EGF-Rezeptor immunopräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurden Änderungen der Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung durch Immunanfärbung mit einem anti-phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper untersucht. Der Grad der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors korreliert hierbei mit der Stärke des Signals der Bande bei 171 kDa.
Für die mit 50 µM und 100 µM Menadionlösungen behandelten Zellen zeigte sich eine deutliche Rezeptorphosphorylierung. Die stärkste Phosphorylierung zeigten die mit EGF behandelten Zellen. Keine signifikante Phosphorylierung zeigten die mit serumfreien Medium, mit DMSO, oder mit 25 µM Menadion behandelten Zellen (Abb. 13).

Zur Kontrolle auf Proteingehalt der Proben nach Elektrotransfer und auf eine etwaige Veränderung des gesamten EGF-Rezeptors durch die Behandlung wurden die eingesetzten Membranen noch einer zweiten Immunodetektion mit anti-EGFR-Antikörpern unterzogen. Diese zeigte eine gleichmäßige Protein- und Rezeptorverteilung für alle Proben (Abb. 13).

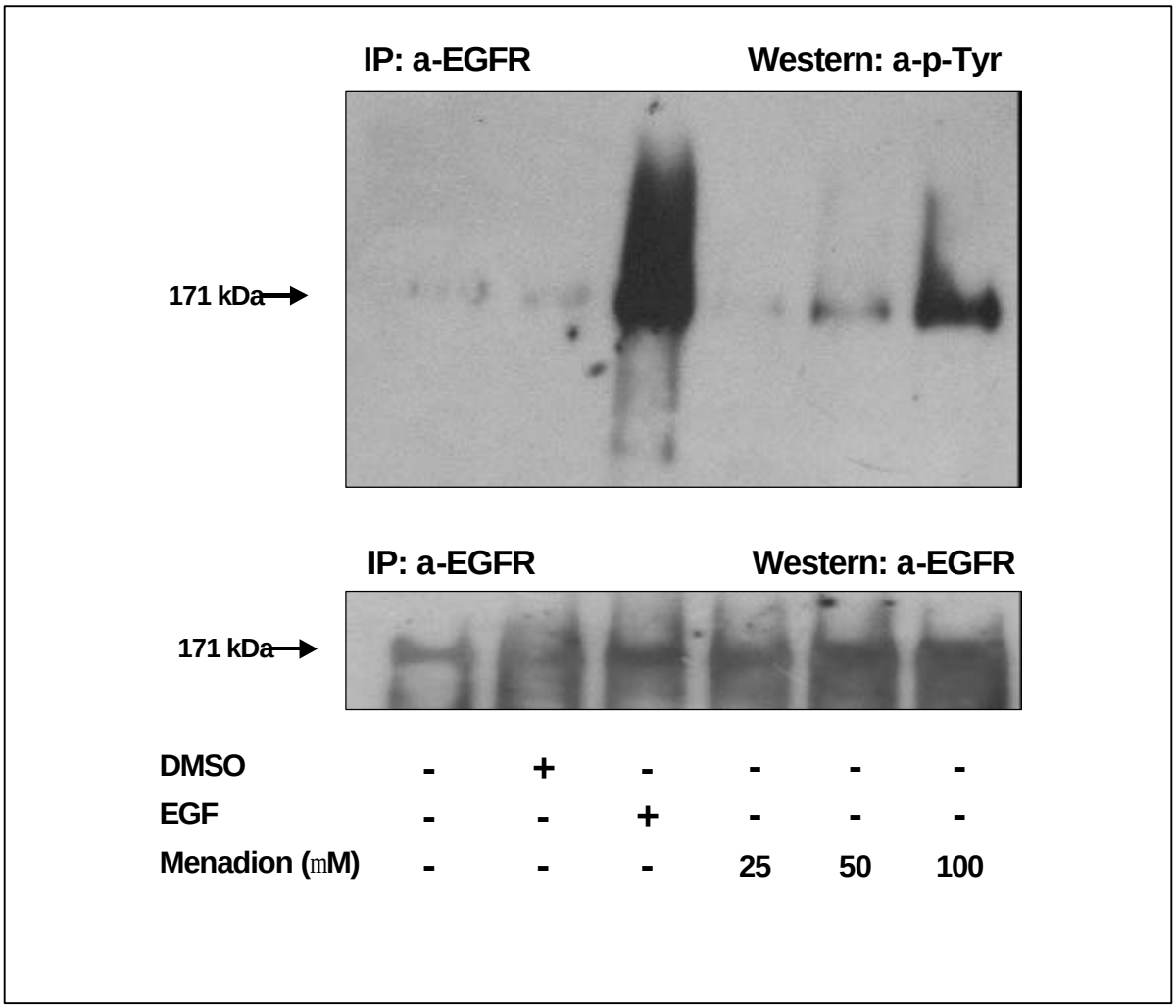

Abb. 13: Menadion induziert die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors. Western-Analyse von immunopräzipitiertem EGFR. Untersuchung auf EGFR-Phosphorylierung durch Verwendung eines phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpers. Nachweis von EGFR durch Verwendung eines EGFR-spezifischen Antikörpers. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

3.4 Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Doxorubicin und Mitomycin C

Nachdem die Aktivierung des EGFR durch Menadion gezeigt worden war (Kap. 3.3), stellte sich die Frage, ob auch klinisch relevante Chinone wie Doxorubicin oder Mitomycin C zur Aktivierung des EGFR führen.

WB-F344 Zellen wurden über einen Zeitraum von 60 Minuten mit einer 100 µM Doxorubicinlösung, mit einer 100 µM Mitomycin C Lösung, mit EGF (100 ng/ml; 15 Minuten), oder mit dem Vehikel (Wasser) behandelt. Nach Behandlung der Zellen wurden diese in eiskaltem IP-Puffer lysiert und anschließend der EGF-Rezeptor immunopräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot Analyse, wurden Änderungen der Rezeptorphosphorylierung durch Immunanfärbung mit einem anti-phospho-Tyrosin-Antikörper untersucht. Der Grad der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors korreliert hierbei mit der Stärke des Signals der 171 kDa-Bande.
Hier zeigte sich die stärkste Phosphorylierung für die mit EGF behandelten Zellen. Die mit Doxorubicin (Abb. 14) oder Mitomycin C (Abb. 15) behandelten Zellen zeigten ebenfalls eine deutliche Rezeptorphosphorylierung.
Zur Kontrolle auf Proteingehalt der Proben nach Elektrotransfer und auf eine etwaige Veränderung der Menge des EGF-Rezeptors durch die Behandlung wurden die eingesetzte Membranen nach „Stripping“ einer zweiten Immunodetektion mit anti-EGFR-Antikörpern unterzogen. Diese zeigte die gleiche Rezeptormenge für alle Proben (Abb. 14, Abb. 15).

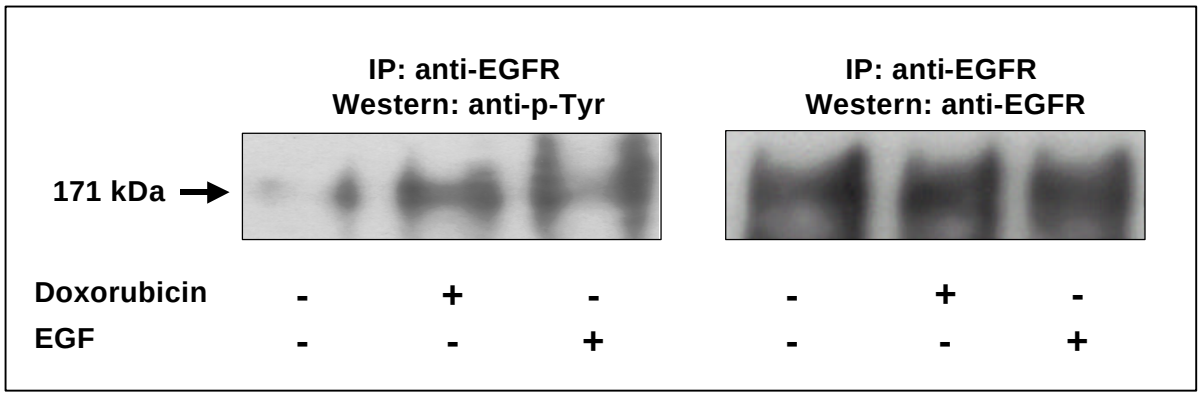

Abb. 14: Doxorubicin (100 µM) induziert die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors. Western-Analyse von immunopräzipitiertem EGFR und Untersuchung auf EGFR-Phosphorylierung durch Verwendung eines phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpers. Nachweis von EGFR durch Verwendung eines EGFR-spezifischen Antikörpers.
Als Kontrolle diente Reinstwasser, das DMEM im entsprechenden Volumen zugesetzt wurde.
Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

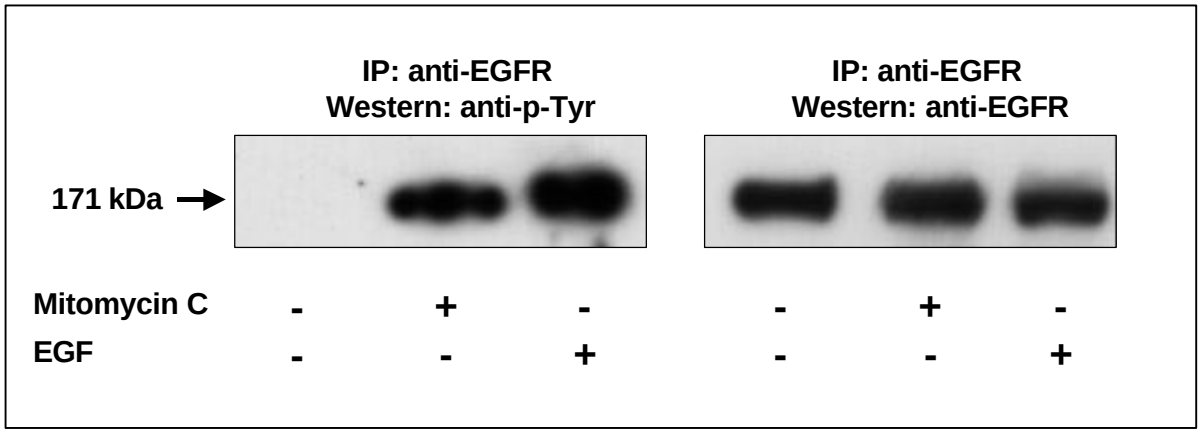

Abb. 15: Mitomycin C (100 µM) induziert die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors. Western-Analyse von immunopräzipitiertem EGFR und Untersuchung auf EGFR-Phosphorylierung durch Verwendung eines phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörpers. Nachweis von EGFR durch Verwendung eines EGFR-spezifischen Antikörpers.
Als Kontrolle diente Reinstwasser, das DMEM im entsprechenden Volumen zugesetzt wurde.
Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

4 Diskussion

4.1 Zur Bedeutung der ERK-Aktivierung durch Chinone

In der vorliegenden Arbeit werden die Effekte von Menadion (2-Methyl-1,4-Naphthochinon / Vitamin K_3) auf die Aktivität zellulärer ERK1/2 MAP-Kinasen untersucht. Menadion induziert seine Effekte sowohl über Arylierungsreaktionen als auch über das sogenannte „Redox Cycling“, und weist somit beide Reaktionswege auf, über die biologisch relevante Chinone ihre Wirkung ausüben (Brunmark & Cadenas, 1989; Bolton *et al.*, 2000).

In den durchgeführten Experimenten an WB-F344 Rattenleberepithelzellen konnte gezeigt werden, daß eine Zellbehandlung mit Menadion zu einer deutlichen Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führt. Dies deckt sich mit vorausgegangenen Untersuchungen an Hautfibroblasten (Klotz, 1998) und mit den Untersuchungen von Abdelmohsen *et al.* (2003) zur Wirkung von *p*-Benzochinon (BQ) und 2,3-Dimethoxy-1,4,-naphtochinon (DMNQ). Hieraus wird ersichtlich, daß Chinone Zellen nicht nur zerstören, sondern durch die Aktivierung von Signalkaskaden auch direkt Einfluß auf den Metabolismus der Zellen nehmen können. Die genaue Aufklärung dieser Signalwege und der Mechanismen ihrer Aktivierung trägt zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von Chinonen bei.

Die Behandlung von WB-F344 Rattenleberepithelzellen mit Menadion führt zu einer ERK-vermittelten Abnahme der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions (GJIC) um bis zu 75 % (Klotz *et al*., 2002). Bei Gap-Junctions handelt es sich um Ansammlungen von Proteinkanälen, welche die Zytosole benachbarter Zellen direkt miteinander verbinden und welche die interzelluläre Diffusion niedermolekularer Substanzen bis zu einer Masse von etwa 1 kDa ermöglichen (Vine & Bertram, 2002). Gap-Junctions dienen der Synchronisation der elektrochemischen und metabolischen Funktionen von Zellen im Zellverband (Loewenstein & Kanno, 1966; Loewenstein, 1981). Ein Gap-Junction-Kanal besteht aus zwei Hemi-Kanälen, den sogenannten Connexonen, die sich wiederum aus jeweils sechs Connexinmolekülen (Cx) zusammensetzen (Warn-Cramer, 1996; Goodenough *et al*., 1996; Yeager *et al*., 1998; Unger *et al.*, 1999). Die für Menadion beschriebene Hemmwirkung auf die GJIC wird mit einer ERK-vermittelten Hyperphosphorylierung des Connexins 43 (Cx43) begründet (Klotz *et al*., 2002; Abdelmohsen *et al*., 2003).

Die Zellen solider Tumoren weisen oft eine dysfunktionale GJIC auf (Weinstein *et al*., 1976; Yamasaki, 1990; Temme, 1997), und es wird vermutet, daß die GJIC eine zentrale Rolle bei der Regulation der Karzinogenese und des Überlebens von Tumorzellen spielt: Verlieren Zellen die Möglichkeit, mit ihren Nachbarn zu kommunizieren, so entziehen sie sich auch der Kontrolle durch den Verband und erlangen ein gesteigertes Entartungspotential.

Für über 100 verschiedene mutagene und nicht-mutagene Karzinogene und Tumorpromotoren, wie Phorbolester (Oh *et al*., 1991), Lindan (Guan *et al*., 1995), Barbiturate (Ren & Ruch, 1996), DDT und nicht zuletzt Menadion (Klotz *et al*., 2002; Abdelmohsen *et al*., 2003) wurde in *in vivo*- und *in vitro*- Experimenten eine Hemmwirkung auf die GJIC nachgewiesen.

Es erscheint zunächst paradox, daß eine nachweislich zytostatische Verbindung wie Menadion, stellvertretend für die Klasse der Chinon-Chemotherapeutika, durch ihren hemmenden Einfluß auf die GJIC die Entstehung von Tumoren favorisieren kann (Karzinogenese durch Kontrollverlust). Eine verminderte GJIC kann jedoch auch zyto-protektive Effekte vermitteln: Karzinogene können nicht ungehindert über geöffnete Gap-Junctions in benachbarte gesunde Zellen diffundieren und diese schädigen. Dies gilt auch für Chinone, die Zielzellen in solch geringen Konzentrationen erreichen, daß sie diese zwar nicht mehr zerstören, jedoch noch ausreichend hoch konzentriert sind, um zelluläre Transformationen zu induzieren.

Die Modulation der GJIC kann aber auch genutzt werden, um die Effektivität konventioneller Chemotherapeutika zu steigern und die zahlreichen bekannten Nebenwirkungen zu verringern. Die Hauptaufmerksamkeit der Forscher richtet sich hierbei auf den sogenannten „*Bystander*"- Effekt oder auch *kiss of death*, der im Zusammenhang der Selbstmord-Gentherapie von Bedeutung ist (Yamasaki *et al*., 1999; Andrade-Rozental *et al*., 2000; Chipman *et al*., 2003): Werden solide Tumoren über einen viralen Vektor mit einem Letal-Gen, wie zum Beispiel der Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase (HSV-TK), transduziert, so exprimiert nur eine kleine Zahl der Krebszellen das entsprechende Gen. Diese Zellen werden zerstört, sobald man dem Wirt eine Pro-Drug appliziert, welche durch das Produkt des Selbstmord-Gens zu toxischen Metaboliten konvertiert wird (ein Beispiel ist die Phosphorylierung von

Ganciclovir durch die HSV-TK). Erstaunlicherweise konnte beobachtet werden, daß auch viele der Nachbarzellen, ohne jedoch ein Letal-Gen zu exprimieren, zerstört wurden. In einigen Fällen kam es sogar zur kompletten Remission des Tumors (Mensil & Yamasaki, 2000). Ähnliches wurde für die Radio-Tumortherapie bei der Zellbestrahlung mit a-Teilchen beschrieben (Azzam *et al*., 2001). Diese Effekte führen die Forscher auf eine intakte GJIC zurück, die die Diffusion toxischer Metaboliten in benachbarte Zellen erlaubt.

Eine Unterbinden der Abnahme der GJIC nach Gabe von Chemotherapeutika wie Menadion, beispielsweise durch Einsatz von Inhibitoren der Aktivierung von ERK1/2, erscheint in diesem Zusammenhang als ein vielversprechender therapeutischer Ansatz. Offene Gap-Junctions könnten auch die Verteilung von Chemotherapeutika in schlecht vaskularisierten Regionen solider Tumoren steigern. Die gilt insbesondere für hydrophile, intravenös applizierte Verbindungen, die die lipophilen Zellmembranen nur schlecht durchdringen können (Abb. 16). Schließlich ist bekannt, daß GJIC eine bedeutende Rolle bei der zellulären Differenzierung spielt. Eine Steigerung der GJIC könnte Therapieresistenzen, die sich häufig in isolierten, wenig differenzierten neoplastischen Zellen ausbilden, rückgängig machen. Dies würde die Sensibilität von Tumorzellen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika erhöhen.

Die aufgestellten Hypothesen werden durch Untersuchungen von Huang *et al.* an menschlichen Glioblastomzellen unterstützt, die zeigen konnten, daß mit Cx43 transfizierte Zellen wesentlich sensitiver gegenüber verschiedenen Zytostatika waren als nicht-transfizierte Zellen. Die transfizierten Zellen zeigten eine verminderte Expression von bcl-2 und eine gesteigerte Tendenz zur Apoptose (Huang *et al*., 2001).

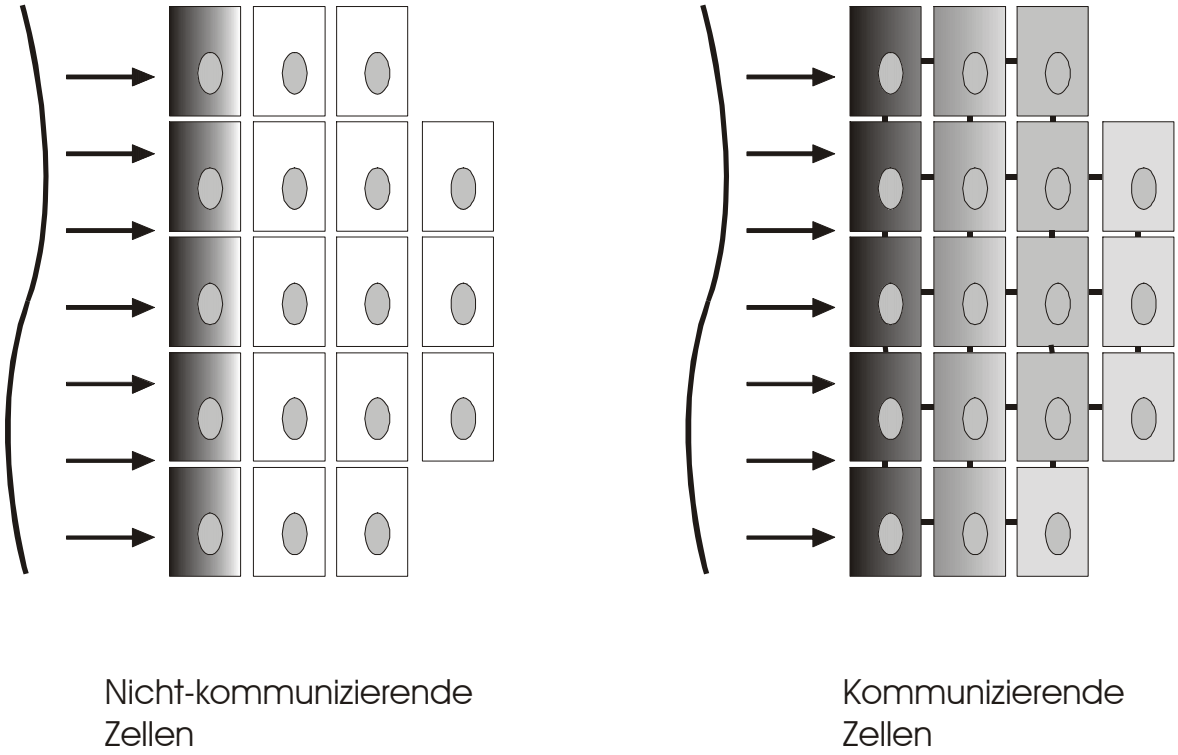

Abb. 16: Die Bedeutung des Bystandereffekts für die Distribution von Chemotherapeutika in schlecht vaskularisierten Tumoren. Vergleich zwischen nicht-kommunizierenden und kommunizierenden Zellen.

4.2 Die Bedeutung des EGF-Rezeptors für die Aktivierung von ERK durch Chinone

Verschiedene Chinone können durch eine ERK-induzierte Connexin-hyperphosphorylierung hemmend auf die GJIC einwirken. Wie aber vermitteln Chinone ihre Wirkung auf ERK1/2? In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die durch Menadion induzierte ERK-Aktivierung durch den Einsatz der Tyrphostine AG 1478 und „Compound 56“ deutlich abschwächen ließ. Bei diesen beiden Verbindungen handelt es sich um spezifische Inhibitoren der EGF-Rezeptortyrosinkinase (EGF-RTK), die eine Auto-Phosphorylierung des Rezeptors verhindern, die also offensichtlich von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung der ERK1/2 durch Chinonverbindungen ist.

Um die Rezeptorspezifizität der Inhibitoren genauer zu untersuchen, wurde der Effekt von AG 1478 auf die Menadion-induzierte Aktivierung der p38-MAPK untersucht, welche als weitgehend unabhängig vom EGFR gilt. Hierbei zeigte sich, anders als bei ERK, keine inhibierende Wirkung. In anderen Experimenten mit dem strukturverwandten Tyrphostin AG 1295, welches als spezifischer Inhibitor der Rezeptortyrosinkinase des Thrombozytenwachstumsfaktor-Rezeptors (PDGF-RTK) gilt, konnte kein Effekt auf die Menadion induzierte ERK-Aktivierung nachgewiesen werden. Dies unterstreicht nicht nur erneut die Spezifizität von AG 1478 und „Compound 56“ für EGFR, sondern deutet auch darauf hin, daß der PDGF-Rezeptor-Signalweg für eine durch Menadion induzierte ERK-Aktivierung keine bedeutende Rolle spielt.

Um die Bedeutung des EGFR für die Aktivierung von ERK1/2 durch Menadion weiterführend zu untersuchen, wurde eine alternative Methode genutzt, die den Einsatz von Inhibitoren vermeidet: Es ist bekannt, daß eine dauerhafte Zellexposition mit Wachstumsfaktoren in hohen Konzentrationen zu einer gesteigerten Rezeptorinternalisierung führen kann. Dies kommt einer vorübergehenden, funktionellen Inaktivierung der Rezeptoren gleich (Masui *et al*., 1993; Chen *et al*., 1998; Wang *et al*., 2000a; Sorkin, 2001). Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zeigen, daß eine einstündige Vorinkubation der Zellen mit hoch-konzentriertem menschlichen EGF, gefolgt von einer zweistündigen Erholungsphase der Zellen in serumfreiem Kulturmedium zu einer deutlichen Abnahme der durch Menadion induzierten Aktivierung von ERK1/2 führte. Gleiches gilt für die Aktivierung von ERK1/2 durch menschliches EGF. Die beobachteten Effekte belegen erneut die Bedeutung des EGFR für den untersuchten Signalweg.

Es wurde also über zwei vollkommen unterschiedliche Wege gezeigt, daß die durch Menadion induzierte ERK1/2-Aktivierung maßgeblich von einer Aktivierung des EGF-Rezeptors abhängig ist.

Die Rezeptoraktivierung konnte in Folgeexperimenten mittels Immunopräzipitation direkt nachgewiesen werden. Mit Menadion inkubierte Zellen zeigten eine gegenüber den Negativ-Kontrollen deutlich gesteigertes Phosphorylierungsniveau des EGFR.

Menadion ist ein häufig verwendetes, kostengünstiges Modellchinon. Nachdem die dargestellten Methoden mit Menadion erfolgreich etabliert worden waren, sollte abschließend die Wirkung der klinisch relevanten Chemotherpeutika Doxorubicin und Mitomycin C untersucht werden. Auch für diese Chinonverbindungen ließ sich mittels Immunopräzipitation die erwartete EGFR-aktivierende Wirkung nachweisen.

Ausgehend von den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen stellt sich die Frage nach dem genauen Mechanismus der EGFR-Aktivierung durch Chinone. Drei Möglichkeiten werden von den meisten Autoren für eine gesteigerte Autophosphorylierung des Rezeptors disskutiert: Die direkte Aktivierung der RTK, die Hemmung von negativ regulierenden Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPase), oder eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen diesen beiden gegenläufigen Einflüssen (Sachsenmaier *et al*., 1994; Knebel *et al*., 1996; Wang *et al*., 2000b; Herrlich & Böhmer, 2000). Knebel *et al.* konnten 1996 demonstrieren, daß die Aktivierung von RTKs durch ultraviolette Strahlung und ROS durch die Inaktivierung von PTPasen verursacht wurde. Für Menadion und andere Naphthochinonderivate konnte eine Inaktivierung von PTPasen zunächst an aus Zellysat isolierten Phosphatasen demonstriert werden (Klotz *et al*., 2002; Carr *et al*., 2002). In neueren Experimenten wurde eine Phophataseinaktivierung durch Menadion auch im intakten zellulären Umfeld nachgewiesen (Abdelmohsen *et al*., 2003). Um die Bedeutung der PTPasen für die Aktivierung des EGFR durch Chinone herauszustellen, führten Abdelmohsen *et al.* Untersuchungen an HeLa-Zellen durch, die besonders sensibel auf eine Stimulation mit EGF reagieren. Nach der Behandlung mit EGF wiesen die Zellen eine deutliche Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors auf, die nach der Zugabe des EGFR-RTK-Inhibitors „Compound 56“ wieder verschwand. Bei der zusätzlichen Inkubation der Zellen mit Menadion wurde neben einer gesteigerten Reizantwort auf die Behandlung mit EGF beobachtet, daß die Rezeptorphosphorylierung auch nach der Zugabe von „Compound 56“ erhalten blieb. Dies läßt sich nur mit der Existenz einer den Rezeptor dephosphorylierenden PTPase begründen, die durch Menadion inaktivierbar ist. Die genaue Identität dieser PTPase bleibt zunächst zu klären, erste Inhibitorstudien deuten jedoch darauf hin, daß es sich um die dual-spezifische PTPase Cdc25A handeln könnte (Kar *et al*., 2002). Diese Phosphatase interagiert nicht nur mit dem EGFR, sondern ist auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Tamura *et al*., 2000).

In Experimenten an Fisher-F344 Rattenleberzellen konnte beobachtet werden, daß eine EGFR-Aktivierung durch Vitamin K Analoga wesentlich länger persistierte, als die Aktivierung durch den physiologischen Liganden EGF. Während die EGF-induzierte Rezeptoraktivierung bereits nach ca. 30 Minuten nachließ, konnte die Chinon induzierte Aktivierung bis zu einem Zeitraum von 180 Minuten beobachtet werden. Auch diese Ergebnisse weisen auf die Funktion einer PTPase hin, die sich durch eine Behandlung mit Chinonen inaktivieren läßt (Wang *et al*., 2000b).

Alle bislang bekannten PTPasen weisen in ihrem aktiven Zentrum einen Cysteinrest auf, der sowohl oxidiert als auch alkyliert werden kann, und der somit durch beide für Chinone bedeutende Reaktionen – „Redox Cycling“ und die Alkylierung zellulärer Nukleophile – geschädigt werden kann (Wang *et al*., 2000b; Kolomdin & Aqvist, 2001). Um die Bedeutung des „Redox Cyclings“ für die Menadion-induzierte Aktivierung der EGFR-MEK-ERK Signalkaskade näher zu untersuchen, inkubierten Klotz *et al.* (2002) WB-F344 Zellen neben Menadion auch mit dem nicht alkylierenden Redox-Cycler 2,3-Dimethoxy-1,4,-naphthochinon (DMNQ). Die Behandlung mit DMNQ führte ebenfalls zu einer deutlichen Aktivierung von ERK1/2. Wurden die Zellen nun zusätzlich mit Dicoumarol inkubiert, einem Inhibitor der NAD(P)H: Chinon-Oxidoreduktase, der das „Redox Cycling“ beeinflussen kann, zeigte sich für die mit DMNQ behandelten Zellen eine komplette Hemmung der ERK-Aktivierung. Die ERK-Aktivierung in den mit Menadion behandelten Zellen blieb hingegen auch in Gegenwart von Dicoumarol unverändert hoch (Klotz *et al*., 2002). Weiterführende Experimente von Abdelmohsen *et al.* demonstrieren, daß Menadion, nicht aber DMNQ in der Lage ist, PTPasen zu inaktivieren. Schließlich konnte gezeigt werden, daß eine Vorinkubation der Zellen mit N-Acetyl-Cystein, welches die Synthese von anti-oxidativem GSH fördert, zwar bei DMNQ, nicht aber bei Menadion zu einer Reduktion der ERK-Aktivierung führte (Abdelmohsen *et al*., 2003). Diese Ergebnisse belegen, daß „Redox Cycling“ und die Bildung von ROS für die Menadion- induzierte ERK-Aktivierung nur eine untergeordnete Rolle spielen. Vielmehr wird die Aktivierung der EGFR-MEK-ERK Signalkaskade durch Menadion und strukturverwandte Vitamin K-Analoga mit der Hemmung einer EGFR-dephosphorylierenden PTPase durch Alkylierung erklärt. (Wang *et al*., 2000b; Klotz *et al*., 2002; Abdelmosen *et al*., 2003).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß der EGFR für die Chinon-induzierte Aktivierung von ERK1/2 essentiell ist. Die Aktivierung des Rezeptors durch Menadion wird hierbei auf die Arylierung und Hemmung von PTPasen zurückgeführt, die aktivierte Rezeptoren dephosphorylieren.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für weiterführende Versuche. Ziel dieser Versuche ist es, die Effektivität chemotherapeutischer Chinone durch Eingriffe in die aktivierten Signalkaskaden zu steigern. So zeigte sich bereits beim Einsatz von Doxorubicin in Kombination mit dem bereits eingeschränkt in der Tumortherapie verwendeten EGFR-TK-Inhibitor ZD1839 (Gefitinib, Iressa) eine gegenüber den Einzelsubstanzen gesteigerte, Wachstumshemmung in Tumorzellen (Ciardiello *et al*., 2000). Inwieweit diese Beobachtungen auf einen durch die Hemmung der Connexinphosphorylierung wiederhergestellten „*Bystander*“-Effekt zurückzuführen sind, bleibt abzuklären.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des EGF-Rezeptors für die durch Chinone induzierte Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2 in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) untersucht.

Hierbei zeigte sich, daß das Modellchinon Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon/Vitamin K_3) in Konzentrationen ab 10 µM zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 führte, die bereits nach 15 min sehr ausgeprägt und auch nach 60 min noch deutlich nachweisbar war. Die durch Menadion induzierte Aktivierung von ERK1/2 konnte durch Verwendung der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren AG 1478 und „Compound 56“ blockiert werden. Alternativ wurde eine Methode genutzt, die den Einsatz von Inhibitoren vermeidet: Eine einstündige Vorinkubation der Zellen mit hochkonzentriertem menschlichem EGF, gefolgt von einer zweistündigen Erholungsphase der Zellen in serumfreiem Kulturmedium zur Kontrolle einer EGFR-Internalisierung, führte zu einer deutlichen Abnahme der durch Menadion induzierten Aktivierung von ERK1/2. Beide Versuche zeigen über verschiedene Ansätze, daß der EGFR für die durch Menadion induzierte Aktivierung von ERK1/2 unabdingbar ist.
Durch Immunopräzipitation des EGFR und den anschließenden Nachweis von dessen Tyrosinphosphorylierung konnte bereits nach einer 15-minütigen Behandlung mit Menadion eine deutliche Rezeptorphosphorylierung festgestellt werden.
Ausgehend von den an Menadion gewonnenen Erkenntnissen wurde die Wirkung der klinisch etablierten chemotherapeutischen Chinone Doxorubicin (Adriamycin) und Mitomycin C auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFR untersucht. Für beide Verbindungen ließ sich nach einer 60-minütigen Inkubationsphase eine deutliche Rezeptorphosphorylierung beobachten.
Es ist bekannt, daß aktivierte ERK1/2 über die Hyperphosphorylierung von Connexinmolekülen eine Abnahme der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions (GJIC) verursachen können. Dies vermag durch die Hemmung des sogenannten „*Bystander*“-Effekts auch die Toxizität von chemotherapeutischen Chinonen zu mindern. Durch die Hemmung des in dieser Arbeit untersuchten Signalweges läßt sich die Aktivierung von ERK1/2 durch Chinone erfolgreich verhindern und somit eine funktionelle GJIC unter der Behandlung mit Chinonen reetablieren.

6 Literatur

1. Abdelmohsen,K., Gerber,P.A., von Montfort,C., Sies,H. & Klotz,L.O. 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.* **278**, 38360-38367 (2003).

2. Andrade-Rozental,A.F., Rozental,R., Hopperstad,M.G., Wu,.K.J., Vrionis, F.D. & Spray,D.C. Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life". *Brain Res. Brain Res. Rev.* **32**, 308-315 (2000).

3. Aruoma,O.I., Kaur,H. & Halliwell,B. Oxygen free radicals and human diseases. *J. R. Soc. Health* **111**, 172-177 (1991).

4. Azzam,E.I., de Toledo,S.M. & Little,J.B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 473-478 (2001).

5. Babior,B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* **109**, 33-44 (2000).

6. Baselga,J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* **7** Suppl **4**, 2-8 (2002).

7. Begleiter,A. Clinical applications of quinone-containing alkylating agents. *Front. Biosci.* **5**, E153-E171 (2000).

8. Biesalski,H.K. The role of antioxidants in nutritional support. *Nutrition* **16**, 593-596 (2000).

9. Boatman,R.J., English,J.C., Perry,L.G. & Fiorica,L.A. Covalent protein adducts of hydroquinone in tissues from rats: identification and quantitation of sulfhydryl-bound forms. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 853-860 (2000).

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

11. Boulougouris,P. & Elder,J.B. Epidermal growth factor receptor and transformation. *Surg. Today* **32**, 667-671 (2002).

12. Burgess,A.W., Hyun-Soo,C., Eigenbrot,C., Ferguson,K.M., Garrett,T.P.J., Leahy,D.J., Lemmon,M.A., Slwiwkowski,M.X., Ward,C.W. & Yokoyama,S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* **12**, 541-552 (2003).

13. Bridges,A.J., Zhou,H., Cody,D.R., Rewcastle,G.W., McMichael,A., Showalter,H.D.H., Fry,D.W., Kraker,A.J. & Denny,W.A. Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *J. Med. Chem.* **39**, 267-276 (1996).

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

15. Butler,J. DNA and Free Radicals: Techniques, Mechanisms & Applications. Aruoma,O.I. & Halliwell,B. (eds.), pp. 132-159 OICA International, Santa Lucia, London (1998).

16. Cadenas,E. & Davies,K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222-230 (2000).

17. Cai,H. & Harrison,D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**, 840-844 (2000).

18. Carr,B.I., Wang,Z. & Kar,S. K vitamins, PTP antagonism, and cell growth arrest. *J. Cell. Physiol.* **193**, 263-274 (2002).

19. Chakravarti,A., Chakladar,A., Delaney,M.A., Latham,D.E. & Loeffler,J.S. The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res.* **62**, 4307-4315 (2002).

20. Chen,W., Martindale,J.L., Holbrook,N.J. & Liu,Y. Tumor promoter arsenite activates extracellular signal-regulated kinase through a signaling pathway mediated by epidermal growth factor receptor and Shc. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5178-5188 (1998).

21. Chipman,J.K., Mally,A. & Edwards,G.O. Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity. *Toxicol. Sci.* **71**, 146-153 (2003).

22. Chirrey,L., Cummings,J., Halbert,G.W. & Smyth,J.F. Conversion of mitomycin C to 2,7-diaminomitosene and 10-decarbamoyl 2,7-diaminomitosene in tumour tissue in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **35**, 318-322 (1995).

23. Chlebowski,R.T., Block,J.B., Akman,S. & Dietrich,M. Vitamin K_3 inhibition of malignant murine cell growth and human tumor colony formation. *Cancer Treat. Rep.* **69**, 527-532 (1985).

24. Ciardiello,F., Caputo,R. & Bianco,R. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2053-2063 (2000).

25. Coleman,W.B., McCullough,K.D., Esch,G.L., Faris,R.A., Hixson,D.C., Smith,G.J. & Grisham,J.W. Evaluation of the differentiation potential of WB-F344 rat liver epithelial stem-like cells in vivo. Differentiation to hepatocytes after transplantation into dipeptidylpeptidase-IV-deficient rat liver. *Am. J. Pathol.* **151**, 353-359 (1997).

26. Cummings,J., Spanswick,V.J. & Smyth,J.F. Re-evaluation of the molecular pharmacology of mitomycin C. *Eur. J. Cancer* **31A**, 1928-1933 (1995).

27. Downward,J. The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett.* **338**, 113-117 (1994).

28. Eder,J.P. Drugs and neoplasms. Integrated Pharmacology (2nd). Page,C., Curtis,M., Sutter,M., Walker,M., Hoffmann,B. (eds.) Mosby, New York, 163-187 (2002).

30. Eyer,P. Blut und blutbildende Organe. Lehrbuch der Toxikologie. Marquardt,H. & Schäfer,S.G. (Hrsg.) Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, 238-256 (1997).

31. Fauman,E.B. & Saper,M.A. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 413-417 (1996).

32. Finkel,T. & Holbrook,N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247 (2000).

33. Fry,D.W. Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **82**, 207-218 (1999).

34. Goodenough,D.A., Ravel,J.-P. & Goliger,J.A. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 475-502 (1996).

35. Guan,X., Bonney,W.J. & Ruch,R.J. Changes in gap junction permeability, gap junction number, and connexin43 expression in lindane-treated rat liver epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **130**, 79-86 (1995).

36. Gutteridge,J.M., Rowley,D.A. & Halliwell,B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. *Biochem. J.* **206**, 605-609 (1982).

37. Gutteridge,J.M. & Halliwell,B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin. Haematol.* **2**, 195-256 (1989).

38. Halliwell,B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxy radicals in vivo. *Biochem. J.* **205**, 461-463 (1982).

39. Halliwell,B. & Gutteridge,J.M. Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol.* **105**, 47-56 (1984).

40. Hargreaves,R.H., Hartley,J.A. & Butler,J. Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents: DNA alkylation by aziridinylquinones. *Front. Biosci.* **5**, E172-E180 (2000).

41. Hendler,F.J. & Ozanne,B.W. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J. Clin. Invest.* **74**, 647-651 (1984).

42. Hengge,U.R., Esser,S., Rudel,H.P. & Goos,M. Long-term chemotherapy of HIV-associated Kaposi's sarcoma with liposomal doxorubicin. *Eur. J. Cancer* **37**, 878-883 (2001).

43. Herrlich,P. & Böhmer,F.D. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 35-41 (2000).

44. Hilger,R.A., Scheulen,M.E. & Strumberg,D. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie.* **25**, 511-518 (2002).

45. Hong W.K. & Ullrich,A. The role of EGFR in solid tumors and implications for therapy. *Oncology Biotherapeutics* **1**, 2-24 (2000).

46. Huang,R.P., Hossain,M.Z., Huang,R., Gano,J., Fan,Y. & Boynton, A.L. Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Int. J. Cancer* **92**, 130-138 (2001).

47. Iyer,V.N. & Szybalski,W. Mitomycins and Porfiromycin: Chemical Mechanism of activation and cross-linking of DNA. *Science* **145**, 55-58 (1964).

48. Kappus,H. & Sies,H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**, 1233-1241 (1981).

49. Kar,S., Adachi,T. & Carr,B.I. EGFR-independent activation of ERK1/2 mediates growth inhibition by a PTPase antagonizing K-vitamin analog. *J. Cell Physiol.* **190**, 356-364 (2002).

50. Klotz,L.-O. Effekt von UVA und Singulettsauerstoff auf JNK-, p38- und ERK-MAP Kinasen in menschlichen Hautzellen.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1998).

51. Klotz,L.O., Patak,P., Ale-Agha,N., Buchczyk,D.P., Abdelmohsen,K., Gerber,P.A., von Montfort,C. & Sies,H. 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Res.* **62**, 4922-4928 (2002).

52. Knebel,A., Rahmsdorf,H.J., Ullrich,A. & Herrlich,P. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15**, 5314-5325 (1996).

53. Kolmodin,K. & Aqvist,J. The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases revisited. *FEBS Lett.* **498**, 208-213 (2001).

54. Kraehn,G.M., Schartl,M. & Peter,R.U. Human malignant melanoma. A genetic disease? *Cancer* **75**, 1228-1237 (1995).

55. Kris,M.G. & Tonato,M. New approaches in the treatment of non-small cell lung cancer: taxanes in the treatment of NSCLC: pathways to progress. *Lung Cancer* **38** Suppl **4**, 1-3 (2002).

56. Kyriakis,J.M. & Avruch,J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807-869 (2001).

57. Liao,W.C., Wu,F.Y. & Wu,C.W. Binary/ternary combined effects of vitamin K3 with other antitumor agents in nasopharyngeal carcinoma CG1 cells. *Int. J. Oncol.* **17**, 323-328 (2000).

58. Loewenstein,W.R. & Kanno,Y. Intercellular communication and the control of growth. Lack of communication between cancer cells. *Nature* **209**, 1248-1249 (1966).

59. Loewenstein,W.R. Junctional intercellular communication: the cell-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* **61**, 829-913 (1981).

60. Masui,H., Castro,L. & Mendelsohn,J. Consumption of EGF by A431 cells: evidence for receptor recycling. *J. Cell Biol.* **120**, 85-93 (1993).

61. Mesnil,M. & Yamasaki,H. Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res.* **60**, 3989-3999 (2000).

62. Miller,M.G., Rodgers,A. & Cohen,G.M. Mechanisms of toxicity of naphthoquinones to isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1177-1184 (1986).

63. Nishikawa,R., Ji,X.D., Harmon,R.C., Lazar,C.S., Gill,G.N., Cavenee,W.K. & Huang,H.J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **91**, 7727-7731 (1994).

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

65. Noto,V., Taper,H.S., Jiang,Y.H., Janssens,J., Bonte,J. & De Loecker,W. Effects of sodium ascorbate (vitamin C) and 2-methyl-1,4-naphtoquinone (vitamin K_3) treatment on human tumor cell growth in vitro.I. Synergism of combined vitamin C and K3 action. *Cancer* **63**, 901-906 (1989).

66. Nutter,L.M., Cheng,A.L., Hing,H.L., Hsieh,R.K., Ngo,E.O. & Liu,T.W. Menadione: spectrum of anticancer activity and effects on nucleotide metabolism in human neoplastic cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 1283-1292 (1991).

67. Oh,S.Y., Grupen,C.G. & Murray,A.W. Phorbol ester induces phosphorylation and down-regulation of connexin 43 in WB cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1094**, 243-245 (1991).

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

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

70. Osada,S. & Saji,S. New approach to cancer therapy: the application of signal transduction to anti-cancer drug. *Curr. Med. Chem. Anti. -Canc. Agents* **3**, 119-131 (2003).

71. Pedersen,M.W., Meltorn,M., Damstrup,L. & Poulsen,H.S. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann. Oncol.* **12**, 745-760 (2001).

72. Plumb,J.A. & Workman,P. Unusually marked hypoxic sensitization to indoloquinone EO9 and mitomycin C in a human colon-tumour cell line that lacks DT-diaphorase activity. *Int. J. Cancer* **56**, 134-139 (1994).

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

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

75. Ren,P. & Ruch,R.J. Inhibition of gap junctional intercellular communication by barbiturates in long-term primary cultured rat hepatocytes is correlated with liver tumour promoting activity. *Carcinogenesis* **17**, 2119-2124 (1996).

76. Rice,A.B., Moomaw,C.R., Morgan,D.L. & Bonner,J.C. Specific inhibitors of platelet-derived groth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am. J. of Path.* **155**, 213-221 (1999).

77. Roovers,K. & Assoian,R.K. Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* **22**, 818-826 (2000).

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

79. Sachsenmaier,C., Radler-Pohl,A., Zinck,R., Nordheim,A. & Herrlich,P., Rahmsdorf,H.J. Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* **78**, 963-972 (1994).

80. Salomon,D.S., Brandt,R., Ciardiello,F. & Normanno,N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **19**, 183-232 (1995).

81. Schlessinger,J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669-672 (2002).

82. Schwartz,M.A. & Assoian,R.K. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J. Cell Sci.* **114**, 2553-2560 (2001).

83. Seger,R. & Krebs,E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735 (1995).

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

85. Sies,H. Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.* **98**, 1061-1675 (1986).

86. Sorkin,A. Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 480-484 (2001).

87. Stadtman,E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 315-325 (1990).

88. Tamura,K., Southwick,E.C., Kerns,J., Rosi,K., Carr,B.I., Wilcox,C. & Lazo,J.S. Cdc25 inhibition and cell cycle arrest by a synthetic thioalkyl vitamin K analogue. *Cancer Res.* **60**, 1317-1325 (2000).

89. Temme,A., Buchmann,A., Gabriel,H.D., Nelles,E., Schwarz,M. & Willecke,K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr. Biol.* **7**, 713-716 (1997).

90. Thor,H., Smith,M.T., Hartzell,P., Bellomo,G., Jewell,S.A. & Orrenius,S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 12419-12425 (1982).

91. Tsao,M.S., Smith,J.D., Nelson,K.G. & Grisham,J.W. A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Exp. Cell Res.* **154**, 38-52 (1984).

92. Ullrich,A. & Schlessinger,J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212 (1990).

93. Unger,V.M., Kumar,N.M., Gilula,N.B. & Yeager,M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* **283**, 1176-1180 (1999).

94. Vine,A.L. & Bertram,J.S. Cancer chemoprevention by connexins. *Cancer Metastasis Rev* **21**, 199-216 (2002).

95. Wakeling,A.E., Guy,S.P., Woodburn,J.R., Ashton,S.E., Curry,B.J., Barker,A.J. & Gibson,K.H. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* **62**, 5749-5754 (2002).

96. Wang,X., McCullough,K.D., Franke,T.F. & Holbrook,N.J. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* **275**, 14624-14631 (2000).

97. Wang,Z., Wang,M. & Carr,B.I. Involvement of hepatocyte epidermal growth factor receptor mediated activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in response to growth inhibition by a novel K vitamin. *J. Cell Physiol.* **183**, 338-346 (2000).

98. Warn-Cramer,B.J., Lampe,P.D., Kurata,W.E., Kanemitsu,M.Y., Loo,L.W., Eckhart,W. & Lau,A.F. Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 3779-3786 (1996).

99. Warn-Cramer,B.J., Cottrell,G.T., Burt,J.M. & Lau,A.F. Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 9188-9196 (1998).

100. Weinstein,R.S., Merck,F.B. & Alroy,J. The structure and function of intercellular junctions in cancer. *Adv. Cancer Res.* **23**, 23-89 (2003).

101. Wells, A. Molecules in focus: EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 637-643 (1998).

102. Whitmarsh,A.J. & Davis,R.J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* **74**, 589-607 (1996).

103. Whitmarsh,A.J. & Davis,R.J. A central control for cell growth. *Nature* **403**, 255-256 (2000).

104. Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B. & Johnson,G.L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* **79**, 143-180 (1999).

105. Woodburn,J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **82**, 241-250 (1999).

106. Wu,F.Y., Chang,H.M. & Liao,W.C. Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *LifeSci* **52**, 1797-1804 (1993).

107. Yamasaki,H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 1051-1058 (1990).

108. Yamasaki,H., Krutovskikh,V., Mensil,M., Tanaka,T., Zaidan-Dagli,M.L. & Omori,Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *C. R. Acad. Sci. III* **322**, 151-159 (1999).

109. Yarden,Y., & Sliwkowski,M. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127-137 (2001).

110. Yeager,M., Unger,V.M. & Falk,M.M. Synthesis, assembly and structure of gap junction intercellular channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 517-524 (1998).

111. Zhang,M. & Thorgeirsson,S.S. Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes. *Exp. Cell Res.* **213**, 37-42 (1994).

7 Anhang

Anhang 1: Teilpublikationen

1. Klotz,L.O., Patak,P., Ale-Agha,N., Buchczyk,D.P., Abdelmohsen,K., Gerber,P.A., von Montfort,C. & Sies,H. 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Res.* **62**, 4922-4928 (2002).

2. Abdelmohsen,K., Gerber,P.A., von Montfort,C., Sies,H. & Klotz,L.O. 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.* **278**, 38360-38367 (2003).

Anhang 2: Lebenslauf Peter Arne Gerber

12.10.1977	Geburt als Kind von Anna Jeannette Gerber, geb. Craanen (med.-techn. Assistentin) und Dr. Ing. Dipl. Wirtsch.-Ing. Hermann Arnold Gerber (Patentanwalt) in Düsseldorf
1984 – 1985	Besuch der Grundschule der Franziskusgemeinde, Düsseldorf
1985 – 1988	Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Roetgen, Kreis Aachen
1988 – 1997	Besuch des Privaten Franziskus-Gymnasiums Hürtgenwald - Vossenack, Kreis Düren; Abitur
1994 – 1995	Besuch der Oakridge Highschool Muskegon, MI, USA; Graduation
1997 – 1998	Wehrdienst als Sanitätssoldat, Technische Schule des Heeres und Fachschule des Heeres für Technik, Aachen
1998 – 2004	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2000 – 2003	Doktorarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I unter Prof. Dr. Dr. Sies. Thema: Zur Bedeutung des EGF-Rezeptors bei der Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 durch Chinone
07-08/2001	Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. C. E. Cross, UC Davis School of Medicine (Davis, CA, USA) Thema: Zu den Effekten von Ozon auf die intrazelluläre Signaltransduktion in Lungenzellen
05/2004	Ärztliche Prüfung

(Peter Arne Gerber)
Düsseldorf, den 14. Dezember 2004

Peter Arne Gerber

Abstract: **Zur Bedeutung des EGF-Rezeptors bei der Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 durch 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion) und klinisch eingesetzte Chinone**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-Rezeptor, EGFR) für die durch Chinone induzierte Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2 in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) untersucht.

Hierbei zeigte sich, daß das Modellchinon Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon/ Vitamin K_3) in Konzentrationen ab 10 µM zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 führte, die bereits nach 15 min sehr ausgeprägt und auch nach 60 min noch deutlich nachweisbar war. Die durch Menadion induzierte Aktivierung von ERK1/2 konnte durch Verwendung der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren AG 1478 und „Compound 56" blockiert werden. Alternativ wurde eine Methode genutzt, die den Einsatz von Inhibitoren vermeidet: Eine einstündige Vorinkubation der Zellen mit hochkonzentriertem menschlichem EGF, gefolgt von einer zweistündigen Erholungsphase der Zellen in serumfreiem Kulturmedium zur Kontrolle einer EGFR-Internalisierung, führte zu einer deutlichen Abnahme der durch Menadion induzierten Aktivierung von ERK1/2. Beide Versuche zeigen über verschiedene Ansätze, daß der EGFR für die durch Menadion induzierte Aktivierung von ERK1/2 unabdingbar ist.

Durch Immunopräzipitation des EGFR und den anschließenden Nachweis von dessen Tyrosinphosphorylierung konnte bereits nach einer 15-minütigen Behandlung mit Menadion eine deutliche Rezeptorphosphorylierung festgestellt werden.

Ausgehend von den an Menadion gewonnenen Erkenntnissen wurde die Wirkung der klinisch etablierten chemotherapeutischen Chinone Doxorubicin (Adriamycin) und Mitomycin C auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFR untersucht. Für beide Verbindungen ließ sich nach einer 60-minütigen Inkubationsphase eine deutliche Rezeptor-phosphorylierung beobachten.

Es ist bekannt, daß aktivierte ERK1/2 über die Hyperphosphorylierung von Connexinmolekülen eine Abnahme der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions (GJIC) verursachen können. Dies vermag durch die Hemmung des sogenannten „*Bystander*"-Effekts auch die Toxizität von chemotherapeutischen Chinonen zu mindern. Durch die Hemmung des in dieser Arbeit untersuchten Signalweges läßt sich die Aktivierung von ERK1/2 durch Chinone erfolgreich verhindern und somit eine funktionelle GJIC unter der Behandlung mit Chinonen reetablieren.

Prof. Dr. Dr. H. Sies