

**Modulation der Signaltransduktion über Rezeptoren der
ErbB-Familie durch reaktive Sauerstoffspezies**

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

vorgelegt von

Juliane Ingeborg Helene Anneliese Beier

aus Krefeld

Düsseldorf 2005

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

Referent: PD. Dr. Lars-Oliver Klotz

Korreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2005

„Felix qui potuit rerum cognoscere causas”

Vergil

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Zelluläre Signalübertragung.....	6
1.1.1	Rezeptortyrosinkinasen der ErbB-Familie	6
1.2	EGFR-abhängige Signalwege	9
1.3	Proteintyrosinphosphatasen	12
1.3.1	PTP1B	13
1.4	Oxidativer Stress	14
1.4.1	Chinone	15
1.4.2	Glutathion	18
1.4.3	Singulett-sauerstoff.....	18
1.4.4	Ultraviolette Strahlung (UV).....	19
1.5	Aktivierung von Signalwegen durch oxidativen Stress.....	21
1.6	Fragestellung.....	22
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Zellkultur	23
2.2	Behandlung von Zellen	24
2.2.1	Behandlung mit Chinonen	24
2.2.2	Behandlung mit UVA	24
2.2.3	Behandlung von Zellen mit Bengalrosa/Licht.....	25
2.2.4	Dephosphorylierungstest auf Hemmung EGFR/ErbB2 regulierender PTPasen.....	25
2.3	Analytik	26
2.3.1	Aktivitätstest isolierter Phosphatasen	26
2.3.2	Bestimmung von Glutathion und Glutathiondisulfid	27
2.4	Gelelektrophorese und Western Blot	28
2.4.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	28
2.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	28
2.4.3	Immunpräzipitation	29

2.4.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und „Western-Blot“	29
2.4.5	Kolloidale Peptidfärbung nach BLAKESLEY et al. (1997)	30
2.4.6	Immunanfärbung nach Western-Blot	30
2.4.7	Entfernen von Antikörpern von der Membran („Strippen“)	32
2.4.8	Immunpräzipitations-Kinase-Test	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Aktivierung von EGFR und ErbB2 durch Menadion	34
3.2	Mechanismus der Aktivierung von Signalwegen durch Menadion	38
3.3	Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf das EGFR/ErbB2-Signalsystem	48
3.4	UVA-induzierte EGFR/ErbB2-Signaleffekte	53
4	Diskussion	56
4.1	Aktivierung von EGFR und ErbB2 durch Menadion	56
4.2	Mechanismus der Aktivierung von Signalwegen durch Menadion	57
4.3	Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf das EGFR/ErbB2-Signalsystem	62
4.4	UVA-induzierte EGFR/ErbB2-Signaleffekte	63
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
7	Abkürzungsverzeichnis	77

1 EINLEITUNG

1.1 Zelluläre Signalübertragung

Zu den elementaren Fähigkeiten jeder Zelle gehört es, auf die Umwelt zu reagieren und zu kontrollieren, welche Moleküle über die Plasmamembran eindringen oder abgesondert werden. Die Übertragung extrazellulärer Signale in das Zellinnere wird als Signaltransduktion bezeichnet. Im Zellinneren angestoßene Signalkaskaden dienen der intrazellulären Steuerung einer Reihe von physiologischen Vorgängen, beispielsweise der interzellulären Kommunikation, und sind daher essentielle Mechanismen, deren sich Vielzeller in der Wahrnehmung von Umweltbedingungen bedienen, um darauf im Sinne der Entwicklung und Erhaltung des gesamten Organismus zu reagieren.

Gerade die Haut ist als das den Körper umschließende Organ ständig veränderten Umwelteinflüssen, wie Temperaturschwankungen, UV-Licht, mechanischen Einflüssen oder dem Befall von Pathogenen ausgesetzt, also physikalischen, chemischen und biologischen Noxen, auf die die Haut im Sinne einer Anpassung oder Abwehr reagieren muss.

Hydrophile Substanzen, wie Ionen, Zucker oder Proteine können die Plasmamembran nicht passieren. Sie müssen mit Membranproteinen interagieren. Ein intrazelluläres Signal kann beispielsweise durch Aktivierung einer Kinase in der cytoplasmatischen Domäne eines Transmembranrezeptors nach extrazellulärer Bindung eines Liganden ausgelöst werden oder dadurch, dass Untereinheiten eines an Transmembranrezeptoren gekoppelten, GTP-bindenden Proteins nach Stimulation auf Zielproteine im Zellinneren einwirken.

1.1.1 Rezeptortyrosinkinasen der ErbB-Familie

Rezeptortyrosinkinasen stellen eine Gruppe von Rezeptoren dar, die die Plasmamembran durchspannen und Zellwachstum und -differenzierung kontrollieren.

Derzeit sind vier dem Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), EGFR, verwandte humane Wachstumsfaktorrezeptoren bekannt. Sie werden als ErbB1 bis ErbB4 (virales Homolog v-erbB, von engl: Avian Erythroblastosis Virus) oder HER1 bis HER4 (von engl.: human epidermal growth factor receptor) bezeichnet. ErbB1 ist identisch mit dem EGFR, daher wird im Verlauf dieser Arbeit von ihm als solchem gesprochen (Abb. 1.1). Die Mitglieder der ErbB-Rezeptor-Familie sind 170 bis 200 kDa große Transmembran-Glykoproteine, welche aus zwei cysteinreichen Domänen sowie zwei Ligandenbindungsdomänen in der extrazellulären N-terminalen-Komponente, einer transmembranen Region und einer zytoplasmatischen Proteintyrosinkinase-Domäne

zusammengesetzt sind (Ennis et al., 1991). Sie werden in allen Epithelien, aber auch in zahlreichen mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert.

ErbB2 ist aufgrund seiner Konformation konstant aktiv (Graus-Porta et al., 1997; Burgess et al., 2003; Citri et al., 2003) und wird bei Heterodimerisationen mit den anderen ErbB bevorzugt (Earp et al., 1995). Desweiteren besitzt ErbB2 keinen bekannten direkten Liganden. ErbB3 teilt sich Ligandenspezifitäten mit ErbB4, hat aber nur wenig oder keine Tyrosinkinaseaktivität und kann daher auch keine Signalübertragungsprozesse in homodimerer Form in Gang setzen (Kraus et al., 1989; Hanks et al., 1991; Soltoff et al., 1994). Daher sind ErbB2 und ErbB3 als wichtige Modulatoren der zellulären Antwort auf Wachstumsfaktoren durch Heterodimerisierung mit EGFR und ErbB4 zu verstehen (Beerli et al., 1996). An EGFR, ErbB3 und ErbB4 können verschiedene Liganden binden. Ihre Spezifität für einen einzelnen Liganden ist unterschiedlich (Yarden et al., 2001). Obwohl die ErbB-Rezeptoren viele Signalwege teilen, ist jeder Rezeptor mit bestimmten Signalproteinen verbunden (Yarden et al., 2001).

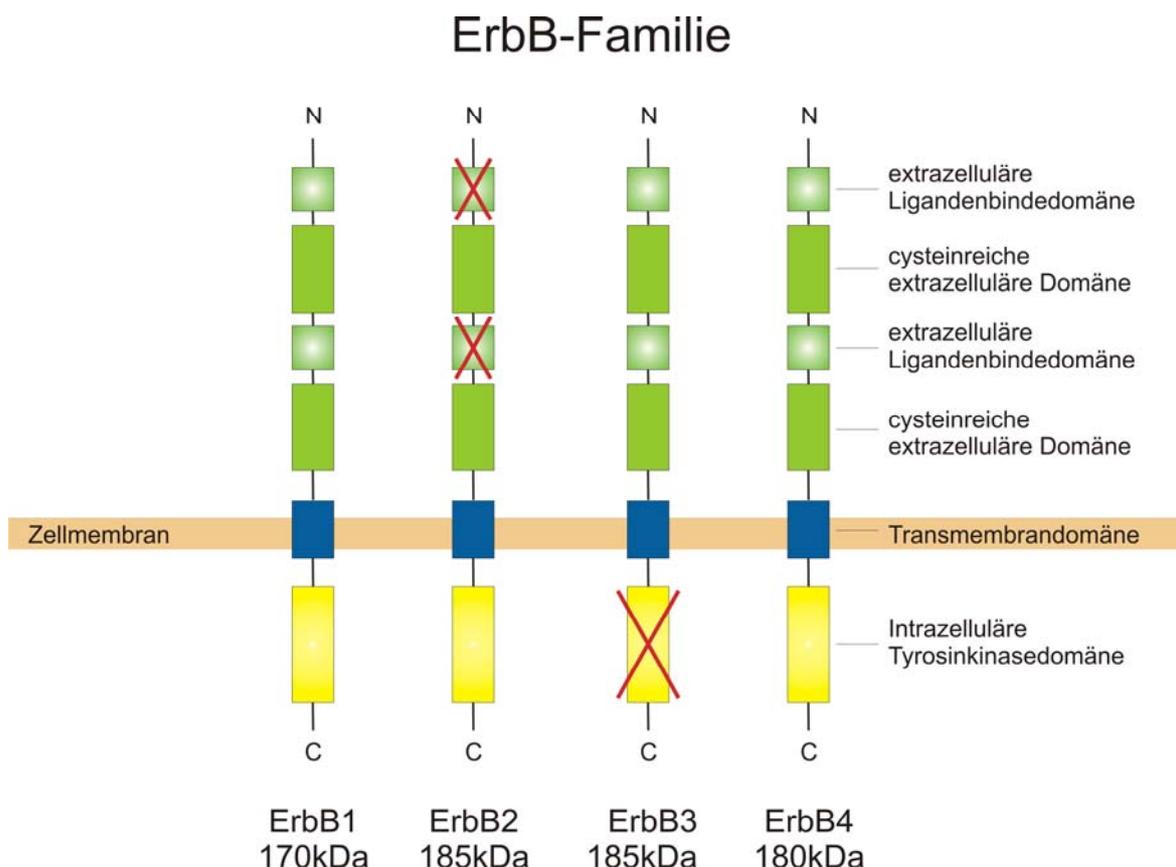


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Domänen der Mitglieder der ErbB-Rezeptor Familie. Die Kreuze weisen auf zwar vorhandene, aber nicht funktionsfähige Domänen hin.

Aktivierung von ErbB-Rezeptoren hat die Stimulation von Signaltransduktionswegen zur Folge, die direkt oder indirekt Zellzyklus und Genexpression beeinflussen, was die

Stimulation der zellulären Proliferation zur Folge hat. Die Bindung eines spezifischen Liganden an beiden Ligandenbindungsdomänen führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die eine Dimerisierung von ErbB-Rezeptoren nach sich zieht (Abb. 1.2). Es handelt sich dabei entweder um eine Homo-, häufiger jedoch um eine Heterodimerisierung. Die Dimerisierung wiederum aktiviert die intrinsische Proteinkinase über intermolekulare Trans-Autophosphorylierung innerhalb der zytoplasmatischen Region. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen nunmehr als Andockstelle für intrazelluläre Signalproteine, welche dann eine Kaskade von Signalen bis zum Zellkern einleiten, wodurch schließlich Proliferation, Migration und Differenzierung reguliert werden (Tiganis, 2002).

Signalübertragende Proteine binden oft über eine spezifische pY-bindende Domäne die SH2 Domäne (SH: src-Homologie) an phosphotyrosinhaltige Motive. Src ist eine lösliche Tyrosinkinase (*c-src*, p60src). SH1 stellt eine Tyrosinkinase-Domäne dar, SH2 eine Phosphotyrosin bindende Domäne und SH3 eine Domäne zur Bindung an prolinreiche Sequenzen (Xu et al., 1997).

Ein zweiter Typ einer Phosphotyrosin-bindenden Domäne ist die PTB (von engl.: protein tyrosine binding Domäne). Sie kommen hauptsächlich in Adapterproteinen vor. PTB Domänen binden normalerweise Phosphotyrosin innerhalb einer Sequenz Asn - Pro - X - pTyr. Bei der SH2 Domäne ist die C-terminale Sequenz entscheidend für die Erkennung. Src selbst bindet zum Beispiel ideal an die Sequenz pTyr - Glu - X (Glu) - Ile. Weder SH2 noch PTB Domänen binden beliebig an Phosphotyrosine.

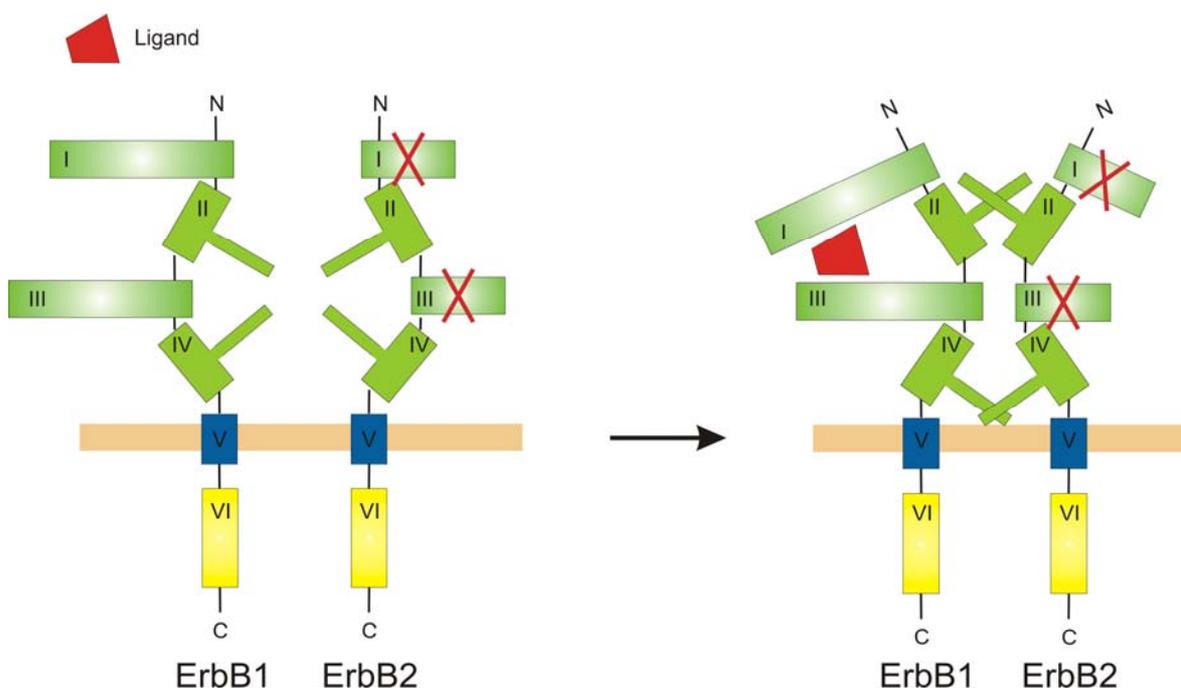


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Heterodimerisierung zweier Rezeptoren der ErbB-Familie. I und III: Ligandenbindungsdomäne, II und IV: cysteinreiche Domänen, V: Transmembran-Domäne, VI Kinase-Domäne. Die Kreuze weisen auf zwar vorhandene, aber nicht funktionsfähige Domänen hin.

In vielen menschlichen Karzinomen konnte eine erhöhte Aktivität von ErbB-Rezeptoren festgestellt und mit einem gesteigerten Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht werden (Prenzel et al., 2001). Wachstumsregulierende Moleküle und ihre Rezeptoren wirken, indem sie die Proliferation und Differenzierung der Zellen in Normalgeweben oder auch während der Embryogenese modulieren. In vielen Karzinomen sind jedoch die Wachstumsfaktoren oder ihre Rezeptoren überexprimiert oder andersartig (Harari et al., 2000; Olayioye, 2001). Bei starker Überexpression kann es zu ligandenunabhängiger Aktivierung kommen.

Das *v-erbB*-Onkogen führt zu Erythroleukämien und Fibrosarkomen. Durch eine N-terminale Deletion des Gens für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) *erbB* wird dessen extrazelluläre Wachstumsfaktor-bindende Domäne zerstört.

EGFR wird in Harnblasen-, Brust-, Kopf- und Nacken-, Nieren-, „non-small cell“ Lungen- und Prostata-Tumoren überexprimiert. ErbB2 wird in Brust-, Cervix-, Colon-, Ösophagial-, Lungen und Pancreas-Tumoren, ErbB3 in Brust-, Colon-, Prostata- und Magen-Tumoren und ErbB4 in Brust-Tumoren sowie Tumoren des Ovars überexprimiert (Normanno et al., 1994; Blume-Jensen et al., 2001).

1.2 EGFR-abhängige Signalwege

Der EGFR ist Ausgangspunkt für mehrere Signalwege (siehe Abb. 1.3). Die Aktivierung dieser Signalwege reguliert wiederum die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, den Zellzyklus oder apoptotische Prozesse und steuert so Proliferation, Differenzierung, Stress-Adaptation, Apoptose und zelluläres Überleben (Hilger et al., 2002).

Zu diesen Signalwegen zählen Kaskaden aus Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Diese MAPK-Kaskaden umfassen drei große Familien: die extrazellulär-regulierten Kinasen (Erk), die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) und die p38 Kinasen (Martindale et al., 2002). Die Signalwege, die zur Aktivierung der MAP-Kinasen führen, umfassen zwei weitere Kinasen, die den MAP-Kinasen vorangestellt sind. Dabei handelt es sich um die MAP-Kinase Kinase (MKK), die MAP-Kinasen aktiviert und die MAP-Kinase Kinase Kinase (MKKK), die wiederum MKK aktiviert.

Bei den MAP-Kinasen handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die ihrerseits durch doppelte Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten innerhalb eines Thr-X-Tyr-Motivs in der Aktivierungsregion aktiviert werden (Hazzalin et al., 2002).

Die Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors hat bezüglich der Aktivierung von MAPK-Kaskaden eine wichtige Funktion. Die aktivierten und phosphorylierten Tyrosinkinasen rekrutieren intrazelluläre Adapterproteine, wie beispielsweise Grb2. Grb2 verfügt für diese Bindung an den EGF-Rezeptor über eine SH2-Domäne (Lowenstein et al., 1992). Die SH2-Domäne von Grb2 erkennt und bindet spezifische Phosphotyrosin enthaltende Motive des EGFR, wohingegen die SH3-Domäne den Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (Son-Of-Sevenless) bindet. Ras, ein in der Membran verankertes G-Protein, existiert in einer inaktiven GDP- und einer aktiven GTP-bindenden Form. SOS katalysiert den Austausch von GDP und GTP (Lowenstein et al., 1992; Batzer et al., 1994). GTP-Ras rekrutiert die Ser/Thr-Kinase Raf in die Nähe der Zellmembran und aktiviert diese (Hallberg et al., 1994). Raf wiederum phosphoryliert die doppeltspezifischen Kinasen MEK1 und MEK2, die sowohl Serin-/Threoninreste als auch Tyrosinreste phosphorylieren können. Durch diese werden dann die MAPK Erk1 und Erk2, ebenfalls Ser/Thr-Kinasen, aktiviert (Marshall, 1994). Für die vollständige Aktivierung sind die Phosphorylierung des Threonins 202 und des Tyrosins 204 von Erk1/2 essentiell (Abb. 1.3) (Ray et al., 1988). So kommt es zu einem etwa 1000-fachen Anstieg der enzymatischen Aktivität von Erk1/2 (Widmann et al., 1999).

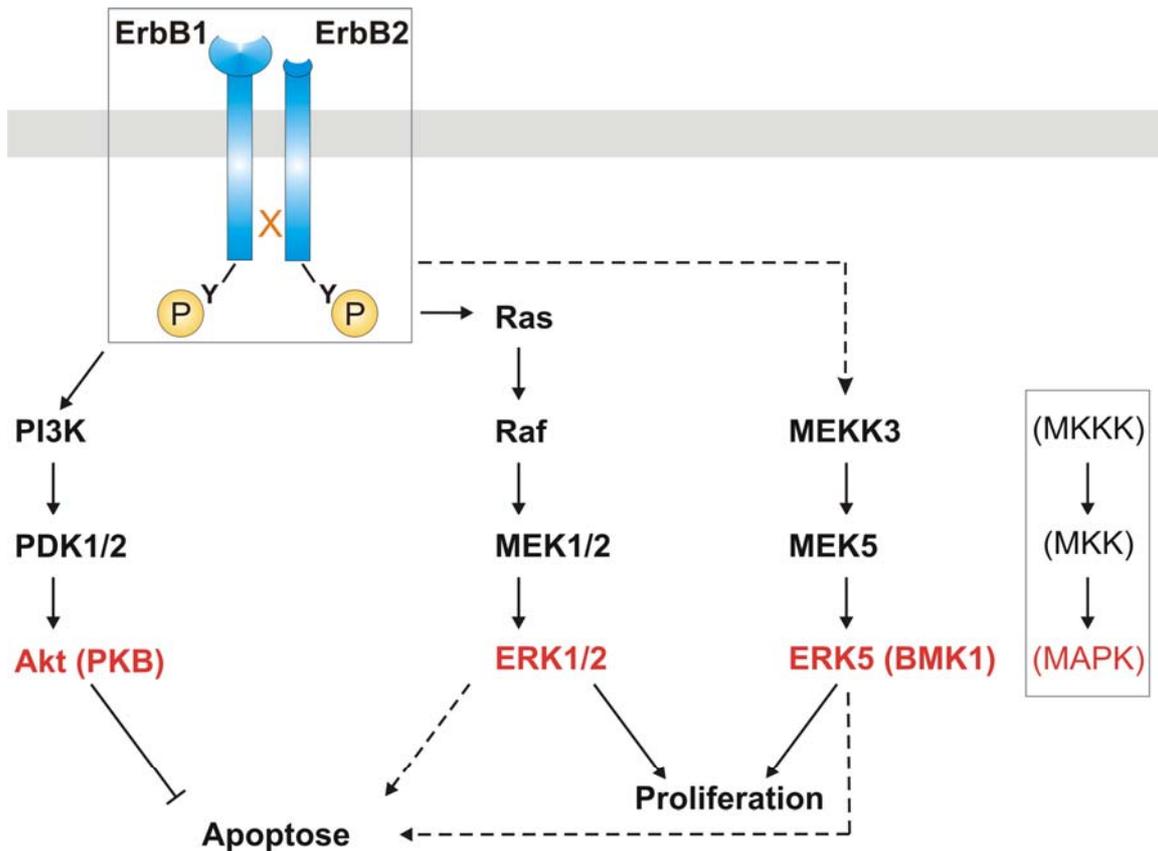


Abb. 1.3: Schematische Darstellung von ErbB-abhängigen Signalkaskaden. PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PDK1/2: Phosphoinositid-abhängige Kinase 1/2 (phosphoinositide-dependent kinase-1/2; PKB: Proteinkinase B; MEK: MAPK/ERK-Kinase, ERK: Extrazellulär regulierte Kinasen.

Die verschiedenen MAPK-Kaskaden sind spezifisch für die Antwort auf unterschiedliche Stimuli. So erfolgt die Aktivierung der Erk1/2 hauptsächlich durch Signale, die Wachstum und Differenzierung der Zellen auslösen (Campbell et al., 1995; Cobb et al., 1995; Seger et al., 1995). Dagegen werden p38 und JNK vor allem durch Stressfaktoren, z.B. ultraviolettes Licht und osmotischen Schock, sowie durch proinflammatorische Zytokine wie den Tumor-Nekrose-Faktor α und das Interleukin-1 stimuliert (Kyriakis et al., 1994). Daher werden p38 und JNK auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen bezeichnet (SAPK).

Ein weiterer stressresponsiver Signalweg ist der antiapoptotische Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg. Dieser Signalweg zählt nicht zu den MAPK-Kaskaden, ist aber dennoch von EGFR abhängig. Aktivierung von PI3K führt zur Bildung von Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Pleckstrin ist das Hauptsubstrat der Proteinkinase C (PKC) in Blutplättchen (Tyers et al., 1988). Das Homolog eines seiner drei Domänen in anderen Proteinen wird als PH-

Domäne (Pleckstrin-Homologie) bezeichnet und interagiert mit Plasmamembranlipid-Produkten wie PIP2 oder PIP3 (Ferguson et al., 2000; Lietzke et al., 2000). Diese haben eine hohe Affinität zu der N-terminalen PH-Domäne von Akt/PKB (Proteinkinase B), die sie direkt binden (James et al., 1996; Frech et al., 1997), was zur Folge hat, dass Akt an die Zellmembran rekrutiert und damit in die Nähe der Phosphoinositid-abhängigen Kinasen PDK1 und 2 gelangt. Diese phosphorylieren Thr308 und Ser473 und aktivieren Akt somit (Fruman et al., 1998; Cantley, 2002). Die Serin/Threonin-Kinase Akt (57 kDa) hat anti-apoptotische und proliferative Eigenschaften (Datta et al., 1996; Coffey et al., 1998). Neben der Aktivierung durch Wachstumsfaktoren wird Akt durch Stressstimuli wie Hitzeschock oder Wasserstoffperoxid aktiviert (Datta et al., 1997).

1.3 Proteintyrosinphosphatasen

Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen) bilden eine Familie von Enzymen, die Tyrosinphosphorylierungen und die daraus resultierenden Aktivitätsänderungen von Proteinen rückgängig machen.

Alle PTPasen besitzen einen essentiellen Cystein-Rest (pK_s 4,7-5,4) im aktiven Zentrum, das durch ein konserviertes HCX₅R-Motiv gekennzeichnet ist (Lohse et al., 1997). Durch den im Vergleich zum für Cysteinreste typischen pK_s -Wert von ca. 8,5 niedrigen pK_s -Wert eignet sich die Sulfhydrylgruppe bzw. das Cysteinthiolat besonders gut als Nucleophil, wird allerdings auch leichter oxidierbar (Fauman et al., 1996).

Mutation des reaktiven Cysteins führt zu einem Aktivitätsverlust. Weitere Gemeinsamkeiten aller PTPasen sind die Inhibition durch Vanadat, die Unempfindlichkeit gegenüber Okadainsäure, das Fehlen der Abhängigkeit von Metallionen und die Fähigkeit, *p*-Nitrophenylphosphat zu hydrolysieren (Fauman et al., 1996).

Nach der Bindung eines Substrats an das katalytische Zentrum der Phosphatase kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Schwefelatoms des Cysteinrestes am P-Atom des phosphorylierten Tyrosinrests. Daraus resultiert die Ausbildung eines Phosphocysteinyl-Intermediats unter Freisetzung des dephosphorylierten Substrats (Zhang et al., 1994; Zhang et al., 1994; Denu et al., 1995). In einem zweiten Schritt wird die Phosphatase regeneriert (Tonks, 2003). Hierbei findet eine Hydrolyse des Enzym-Phosphat-Intermediats unter Freisetzung von anorganischem Phosphat als zweitem Reaktionsprodukt statt (Barford, 1995).

Derzeit ist nur wenig über die Regulation von Phosphatasen bekannt. Als mögliche Mechanismen der Regulation von Phosphatasen werden Oxidationsreaktionen des reaktiven Cysteins im aktiven Zentrum der PTPase diskutiert (Tiganis, 2002). Dafür

spricht, dass eine H_2O_2 -Behandlung verschiedener PTPasen (Caselli et al., 1998; Lee et al., 1998) zur Oxidation des reaktiven Cysteins zu Sulfensäure (Cys-SOH) führt. Das oxidierte Cystein kann nun nicht länger als Phosphatakzeptor im ersten Schritt der PTPase-katalysierten Reaktion fungieren; daraus resultiert die Inaktivierung der PTPase. Die Reversibilität der Oxidation des Cysteins zu Sulfensäure ist Voraussetzung für die Regulation der PTPase-Aktivität. Im Gegensatz dazu ist die höhere Oxidation von Cystein zur Sulfin- oder Sulfonsäure irreversibel. Auch Glutathionylierung der Sulfensäure-Form der PTP1B wurde beschrieben (Barrett et al., 1999); aufgrund der Reversibilität dieser Modifikation wird dies als Mechanismus zum Schutz vor weiterer Oxidation interpretiert.

1.3.1 PTP1B

Bei der Proteintyrosinphosphatase PTP1B handelt es sich um eine intrazelluläre, membrangebundene Phosphatase. Die 35 Aminosäuren des hydrophoben C-Terminus der PTP1B, der die regulatorische Domäne beinhaltet, verankern die Phosphatase in der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (Frangioni et al., 1992). Die katalytische Domäne der PTP1B liegt im N-Terminus.

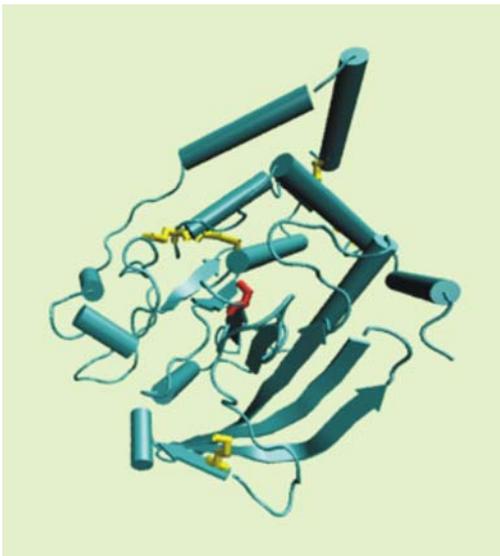


Abb. 1.4: Struktur von PTP1B. Rot markiert wurde das reaktive Cys²¹⁵ im aktiven Zentrum.

PTP1B reguliert *in vitro* den EGFR (Milarski et al., 1993) oder den Insulinrezeptor, obwohl sie keine SH2- oder PTB-Domäne besitzt, mit der sie an phosphorylierte Tyrosinreste von Rezeptortyrosinkinasen binden könnte. Aufgrund dieser Interaktion ist PTP1B von Bedeutung in der Regulation von Mitogenese und Insulinstoffwechsel (Brown-Shimer et al., 1992; Ahmad et al., 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass überexprimierte PTP1B den EGFR in humanen 293-

Zellen dephosphorylieren kann (Lammers et al., 1993). "Substrate-trapping"-Experimente bestätigen, dass EGFR als Substrat für PTP1B dienen kann (Tiganis et al., 1998).

Es existieren derzeit drei Möglichkeiten zur Erkennung des EGFR durch ER-lokalisierte PTP1B. Die erste ist, dass PTP1B möglicherweise bereits den gerade synthetisierten Rezeptor dephosphoryliert, denn im ER erhält der Rezeptor die Fähigkeit zur Autophosphorylierung (Sliker et al., 1986). Auf diesem Wege könnte eine ligandenunabhängige Aktivierung des EGFR verhindert werden. In PTP1B^{-/-} Zelllinien wurde von einer Hyperphosphorylierung von Proteinen mit ca. 180 kDa berichtet (Cheng et al., 2001). PTP1B-defiziente Fibroblasten weisen eine erhöhte EGFR-Tyrosinphosphorylierung auf, ohne aber eine Hyperaktivierung der ERK2- und Akt-Signalwege zu zeigen (Tonks et al., 2001). Möglich ist hier ein kompensatorischer Mechanismus, der mithilfe einer oder mehrerer Phosphatasen die erhöhte Rezeptoraktivität ausgleicht, oder aber der hyperphosphorylierte EGFR bleibt am ER und ist so nicht in der Lage, ERK2 oder Akt zu aktivieren.

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

Die dritte Möglichkeit ist die Dephosphorylierung vesikulär internalisierten EGFRs (Waterman et al., 2001; Dikic, 2003). Aktivierung des Rezeptors durch EGF führt zu einer schnellen Internalisation des Rezeptors durch „Clathrin-coated Pits“. Nach der Internalisation befinden sich die EGF-Rezeptor-Komplexe in frühen Endosomen, die sich zu späten Endosomen und multivesikulären Körperchen entwickeln. Während dieses Prozesses unterliegen die Rezeptoren einer Sortierung und werden entweder in Lysosomen proteolytisch degradiert oder wiederaufbereitet und in die Plasmamembran zurückgeführt (Sorkin, 2001).

1.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress entsteht durch Verschiebung des Fließgleichgewichtes von Prooxidantien und Antioxidantien zugunsten der Ersteren (Sies et al., 1985). Die unvollständige Reduktion molekularen Sauerstoffs führt dabei zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die den Organismus schädigen können. Diese partielle Reduktion des molekularen Sauerstoffs führt zur Bildung von Singulett-Sauerstoff oder Superoxid, woraus wiederum Peroxynitrit oder Wasserstoffperoxid resultieren können (siehe Abb. 1.5).

Zelluläre Prozesse, wie z.B. die mitochondriale Atmungskette (Nohl et al., 1980), das

P-450 Elektronentransportsystem (Puntarulo et al., 1998) oder Entzündungsprozesse gehen mit der Bildung von ROS einher.

Aber auch exogene Umweltfaktoren, wie ultraviolette Strahlung, bilden reaktive Sauerstoffspezies (Klotz et al., 2001). Viele der von UV-Strahlung hervorgerufenen Einflüsse auf die Zelle werden durch Singulett-Sauerstoff verursacht.

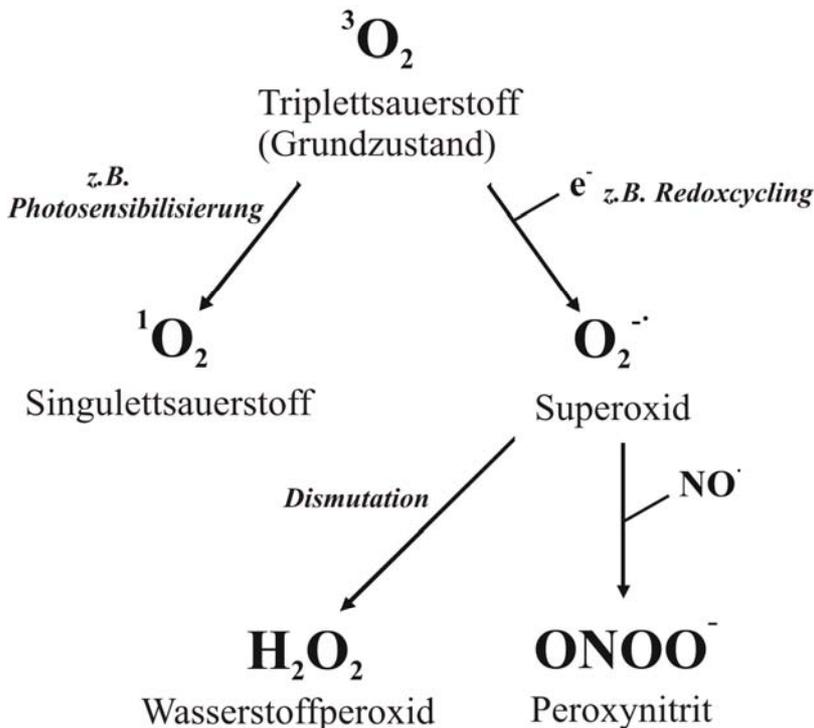


Abb. 1.5: Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies aus Triplett-Sauerstoff.

1.4.1 Chinone

Chinone sind in zahlreiche biochemische Reaktionen eingebunden (Bolton et al., 2000). Hierzu zählen Redoxreaktionen wie der Elektronentransport durch Ubichinon in der Atmungskette, die Carboxylierung von Koagulationsfaktoren unter Mitwirkung von K-Vitaminen oder Redox-Cycling als Resultat einer Chinon-Reduktion gefolgt von einer Reoxidation durch molekularen Sauerstoff, bei der Superoxid entsteht.

Die Vitamin K-Familie besitzt ein 1,4-Naphthochinon-Grundgerüst. 2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthochinon (auch α -Phyllochinon) wird auch als Vitamin K_1 bezeichnet. Daneben gibt es noch das Vitamin K_2 (2-Methyl-3-difarnesyl-1,4-naphthochinon), das auch als Menachinon oder Farnochinon bezeichnet wird. Als Vitamin K_3 bezeichnet man das ausschließlich künstlich hergestellte 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion). Für die biologische Wirksamkeit von Vitamin K ist die Methylgruppe an Position 2 essentiell. Die

K-Vitamine unterscheiden sich in der Länge der Seitenkette an Position 3, die das Löslichkeitsverhalten bestimmt. Vitamin K₁ wird von Pflanzen, Vitamin K₂ dagegen von Darmbakterien synthetisiert.

Die Hauptfunktion von Vitamin K (K: Koagulation) in höheren Organismen besteht darin, dass es als Kofaktor in der Carboxylierung der Glutamyreste der Gerinnungsproteinen dient (Berkner, 2000; Bern, 2004; Rost et al., 2004).

Menadion weist im Vergleich zu Vitamin K₁ und K₂ eine niedrigere antihämorrhagische Wirkung auf.

Vitamin K-Derivate sind in der Lage, das Wachstum vieler Tumorzellen zu hemmen (Kar et al., 2002). Daher wird der Einsatz von 1,4-Naphthochinonen in der Chemotherapie von Krebserkrankungen diskutiert. Die zytotoxischen Eigenschaften biologisch relevanter Chinone werden im Wesentlichen auf die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch so genanntes „Redox-Cycling“ und Alkylierungsreaktionen, durch die zelluläre Thiole blockiert und die antioxidative Kapazität der Zelle gesenkt wird, zurückgeführt (Kappus et al., 1981).

Vitamin K₃ (Menadion) wird als Modellchinon in der Zellkultur eingesetzt und weist ein hohes Potential zur Wachstumsinhibition auf (Prasad et al., 1981; Wang et al., 1995). Für Menadion konnte gezeigt werden, dass die wachstumshemmende Wirkung sowohl durch Alkylierung als auch durch Redox-Cycling ausgelöst werden kann (Abb. 1.6). Letzteres findet sich in Anwesenheit von Reduktionsmitteln, wobei zwei Wege bekannt sind. Durch einen 1-Elektronen-Transfer, beispielsweise durch NADPH-Cytochrom P450 Reduktase, entstehen instabile Semichinonradikalanionen. Das Semichinonradikalanion kann nun spontan Elektronen auf molekularen Sauerstoff transferieren, der in biologischen Systemen in hohen micromolaren Konzentrationen vorliegt, und somit unter Bildung eines Superoxidradikals zum Chinon reoxidieren (Brunmark et al., 1989). Die 2-Elektronen-Reduktion, die durch die zytoprotektive NAD(P)H: Chinon-Oxidoreduktase („DT-Diaphorase“, NQOR) katalysiert wird (Miller et al., 1986), führt zur Bildung des Hydrochinons, das hinsichtlich der Bildung von ROS eine niedrigere Reaktivität als Semichinon aufweist, da es durch Konjugation und Bildung von Glukuroniden oder Sulfaten detoxifiziert werden kann. Andererseits kann es durch Autoxidation von Hydrochinonen auch zu Bildung von ROS kommen.

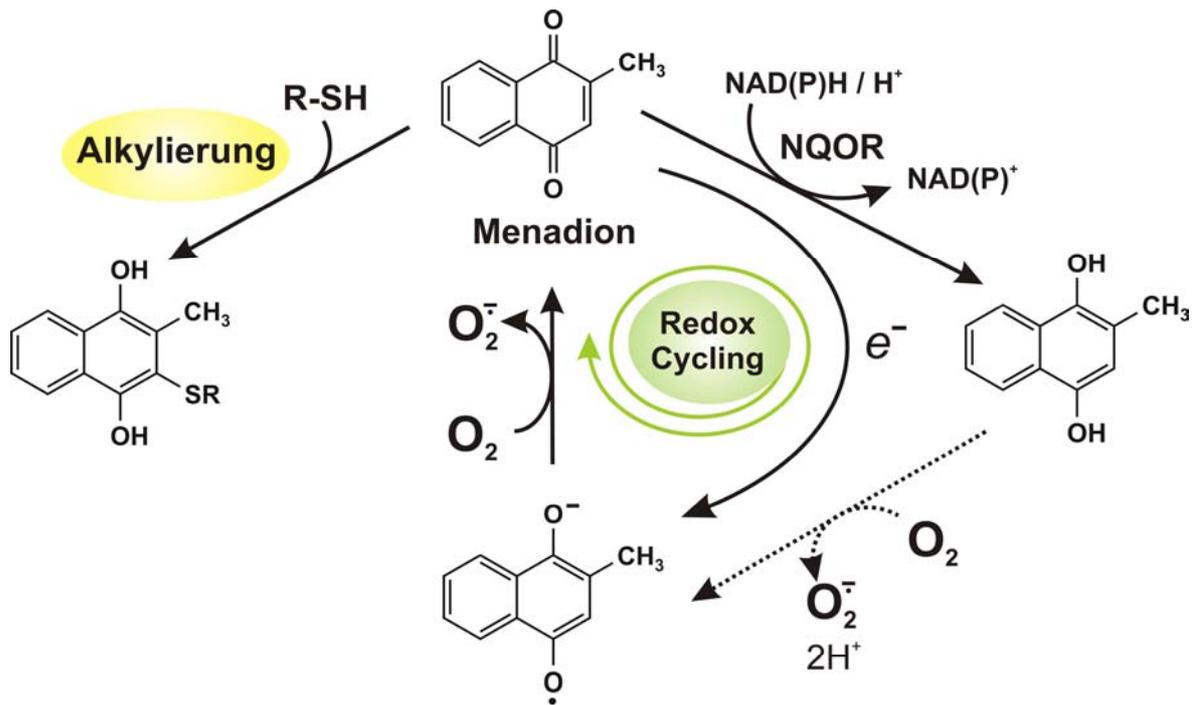


Abb. 1.6: Alkylierung und Redox-Cycling als Reaktionswege des Menadions. NQOR NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben Menadion auch NSC95397 (2,3-bis[(2-Hydroxyethyl)thio]-1,4-naphthochinon) und DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon) untersucht (Abb. 1.7). Bei NSC95397 handelt es sich um ein Naphthochinonderivat, das neben einem hohen Potential zur Hemmung von Krebszellwachstum (Lazo et al., 2001) eine hohe Selektivität in der Hemmung der Cdc25-Phosphatase-Familie aufweist (Melchheier et al., 2005). DMNQ ist ein reiner Redoxcyclus, dessen C-3 substituiert ist, was eine Alkylierung gemäß Abb. 1.6 unmöglich macht (Gant et al., 1988).

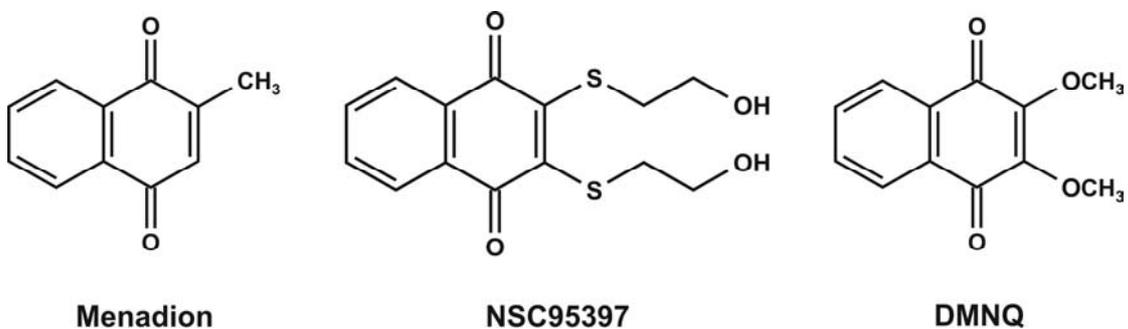


Abb. 1.7: Strukturformeln der im Rahmen der Arbeit verwendeten Chinone

1.4.2 Glutathion

Das Tripeptid Glutathion (γ -Glutamylcysteinglycin, GSH) ist intrazellulär in millimolaren Konzentrationen vorhanden, wobei GSH ca. 100 mal höher konzentriert vorliegt als Glutathiondisulfid (GSSG) (Anderson et al., 1983; Sies, 1999). Glutathion hat mehrere wichtige Funktionen im Stoffwechsel inne, beispielsweise im Fremdstoffmetabolismus als Cosubstrat von Glutathion S-Transferase. Außerdem werden Peroxide durch Glutathionperoxidasen unter Oxidation von GSH zu GSSG reduziert (Ernster et al., 1986). Die Reduktion von GSSG zu GSH wird durch die Glutathion-Reduktase auf Kosten von NADPH katalysiert.

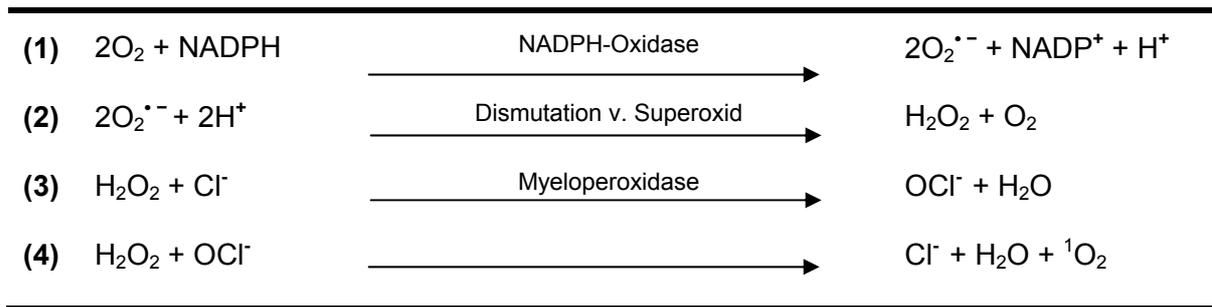
Ferner können Proteinthiole glutathionyliert werden, also gemischte Protein-Glutathion-Disulfide ausbilden. Glutathionylierung verändert reversibel die Reaktivität verschiedener Kinasen und Phosphatasen, beispielsweise der Proteinkinase A (PKA) (Humphries et al., 2002), verschiedene Isoformen von Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase D (PKD) (Chu et al., 2001), PTP1B (Barrett et al., 1999), PP2A (Rao et al., 2002) sowie den Transkriptionsfaktor c-Jun (Klatt et al., 1999). Menadion kann Glutathionylierung des Cys¹²³⁸ der Kinsedomäne von MEKK1 induzieren, was die Inhibition von MEKK1 zur Folge hat (Anselmo et al., 2004; Cross et al., 2004).

1.4.3 Singulett-Sauerstoff

Singulett-Sauerstoff ist eine elektronisch angeregte Form des molekularen Sauerstoffs. Molekularer Sauerstoff ist im Grundzustand aufgrund seines Triplettzustands relativ unreaktiv. Eine Änderung dieses Zustands durch Energiezufuhr führt zur Aktivierung des Sauerstoffs. Die Sauerstoffaktivierung kann sowohl auf physikalischem als auch auf chemischem Wege erfolgen, wobei die physikalische Sauerstoffaktivierung unter Beibehaltung der Elektronenzahl aber unter Veränderung ihrer Spins zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führt.

In vivo wird Singulett-Sauerstoff hauptsächlich über zwei Wege gebildet, entweder photochemisch über die Anregung endogener Photosensibilisatoren durch Licht und Transfer der Anregungsenergie auf den molekularen Triplett-Sauerstoff, oder in Dunkelreaktionen, beispielsweise in Entzündungsprozessen (Tab. 1.1). Reduktion eines Sauerstoffmoleküls führt dabei zur Bildung von Superoxid, z.B. durch die NADPH-Oxidase in neutrophilen Granulozyten (Steinbeck et al., 1992) (Reaktion 1). Dismutation von Superoxid erzeugt Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff (2), wobei Wasserstoffperoxid Substrat für die Myeloperoxidase ist, die Hypochlorit generiert (3), welches mit Wasserstoffperoxid zu Singulett-Sauerstoff und Wasser reagiert (4) (Klotz et al., 2003).

Tab. 1.1: Schematische Darstellung der Entstehung von Singulett-Sauerstoff in Dunkelreaktionen



Singulett-Sauerstoff modifiziert DNA, was durch Proteine für DNA-Reparatur erkannt werden kann. Sowohl Einzelstrangbrüche als auch DNA-Doppelstrangbrüche und G:C → T:A Transversionen wurden beschrieben (Di Mascio et al., 1990; Piette, 1991; Sies et al., 1992; Ravanat et al., 1995; Will et al., 1999; Cadet et al., 2002).

Singulett-Sauerstoff-induzierte Proteinoxidation führt zum Abbau der Proteine durch das 20S-Proteasom (Grune et al., 2001). Die Aminosäuren Cystein, Histidin, Methionin, Tryptophan und Tyrosin sind besonders anfällig für Oxidation, und diese Modifikationen können die Aktivität von Proteinen ändern, die an zellulären Signalprozessen beteiligt sind (Dean et al., 1997; Davies et al., 1999).

ROS führen durch Oxidation von Cysteinresten zur Inaktivierung vieler Enzyme, wie etwa Proteintyrosinphosphatasen (siehe 1.3) (Herrlich et al., 2000). Desweiteren wird auch Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin) durch Singulett-Sauerstoff oxidiert. Als Produkte entstehen die entsprechenden Sulfinat, Sulfonat, Disulfide und Disulfid-S-Oxide (Devasagayam et al., 1991). Die beiden letzten Produkte sind, wie auch Glutathion-sulfensäure und S-Nitroso-Glutathion, in der Lage, Proteinthiole zu glutathionylieren (Klatt et al., 2000; Huang et al., 2002).

1.4.4 Ultraviolette Strahlung (UV)

Das auf die Erdoberfläche treffende Sonnenlicht lässt sich in ultraviolettes, sichtbares und Infrarotlicht untergliedern. Dabei wird die elektromagnetische Strahlung der Wellenlängen < 400 nm als ultraviolettes (UV) Licht bezeichnet. Das vom menschlichen Auge wahrnehmbare Licht geringerer Energie und mit größerer Wellenlänge (400 nm bis 740 nm) wird als sichtbares Licht (Vis) bezeichnet. Als Infrarotlicht (IR) bezeichnet man schließlich das Licht größerer Wellenlängen ab 740 nm. Infrarotlicht kann vom menschlichen Körper nur als Wärmestrahlung wahrgenommen werden.

Die ultraviolette Strahlung lässt sich in den vakuumultravioletten (30 bis 180 nm), den UVC- (180 bis 280 nm), UVB- (280 bis 320 nm) und UVA-Anteil (320 bis 400 nm) untergliedern.

Die kurzwellige, energiereiche UVB-Strahlung gelangt bis in die oberen Schichten der Dermis und kann zum einen die Zellen der Epidermis, die Keratinozyten und Melanozyten, und zum anderen die Fibroblasten und Endothelzellen der Dermis schädigen. Die energieärmere UVA-Strahlung erreicht auch tiefer liegendes dermales und zum Teil subkutanes Gewebe.

UVA-Strahlen führen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle (Cadet et al., 1992). Dabei wird die Lichtenergie zunächst von endogenen Chromophoren, wie Porphyrinen, Flavinen und bestimmten Chinonen absorbiert und schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen, aus dem ROS entstehen (Klotz et al., 2001). Schematisch ist dies in Abb. 1.8 dargestellt. Diese ROS können dann schädigend auf zelluläre Makromoleküle, wie beispielsweise die DNA wirken (Kielbassa et al., 1997).

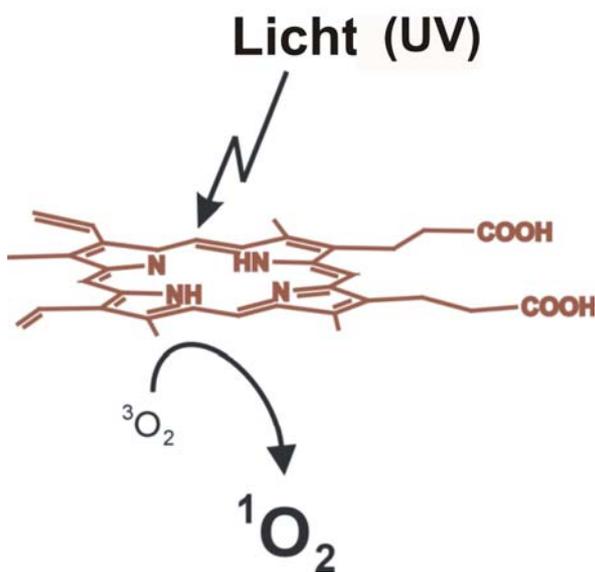


Abb. 1.8: Bildung von Singulett-Sauerstoff durch UV-Bestrahlung von Chromophoren. Photosensibilatoren, wie das Protoporphyrin IX aus der Abbildung werden durch Lichtabsorption angeregt und wechseln in den Triplettzustand. Von dort übertragen sie Energie auf molekularen Sauerstoff, was in der Entstehung von Singulett-Sauerstoff resultiert.

Im Gegensatz zu den energieärmeren UVA-Strahlen, die keine direkten DNA-Schäden hervorrufen können, kommt es nach UVB-Exposition zu typischen DNA-Veränderungen, die mit einer direkten Absorption einhergehen. Dies sind neben Strangbrüchen und Strangverknüpfungen, kovalente Verknüpfungen benachbarter Pyrimidinbasen, die zur Ausbildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und Pyrimidin-(4-6)-Pyrimidon Photoaddukten führt (Freeman et al., 1989; Douki et al., 1999).

Sonnenbrand, vorzeitige Hautalterung sowie ein erhöhtes Risiko für Hauttumore, aber auch photoallergische und phototoxische Reaktionen sind die Folgen übermäßiger Sonnen- und damit UV-Exposition.

1.5 Aktivierung von Signalwegen durch oxidativen Stress

Photooxidativer Stress führt neben der Schädigung von zellulären Makromolekülen auch zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und nachfolgend Transkriptionsfaktoren, die über Proliferation und zelluläres Überleben entscheiden.

Bestrahlung von Zellen mit UVA (320-400 nm) führt, ausgelöst durch Singulett-Sauerstoff, zu einer schnellen, transienten Aktivierung von p38 und JNK, nicht aber von Erk1/2 (Klotz et al., 1997; Klotz et al., 1999). Durch entweder chemisch oder photochemisch erzeugten Singulett-Sauerstoff sind ebenfalls nur p38 und JNK signifikant zu aktivieren (Klotz et al., 1999).

Im Gegensatz zu UVA und Singulett-Sauerstoff führt oxidativer Stress, der durch Behandlung mit alkylierenden Agenzien und Redox-Cyclern wie Menadion hervorgerufen wird, zu einer Aktivierung von Erk1/2. Zwei weitere reaktive Sauerstoffspezies, Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit, aktivieren alle drei genannten MAPK-Familien, auch Erk1/2 (Guyton et al., 1996; Wang et al., 1998; Schieke et al., 1999), was darauf hindeutet, dass die MAPK-Aktivierung vom Typ des jeweiligen Oxidans abhängt.

Für Erk5 konnte eine Aktivierung durch oxidativen Stress, osmotischen Schock (Zhou et al., 1995) sowie durch Wachstumsfaktoren (English et al., 1999; Kamakura et al., 1999) nachgewiesen werden.

1.6 Fragestellung

Durch seine Heterodimerisierung mit EGFR ist ErbB2 ein wichtiger Modulator der zellulären Antwort auf Stimulation des EGFR.

Der EGFR-Signalweg wird ligandenunabhängig durch das Naphthochinonderivat Menadion über die Hemmung von Phosphatasen beeinflusst. Menadion kann zum einen alkylierend und zum anderen als Redox-Cycler wirken. Der Mechanismus der Hemmung von Phosphatasen ist noch nicht geklärt.

Ebenso wie Menadion haben reaktive Sauerstoffspezies einen Einfluss auf EGFR-abhängige Signalwege.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Wie reagieren Zellen auf Belastung mit Menadion? Kommt es zur Aktivierung von ErbB2 und nachgeschalteter Signalkaskaden? Welche Mechanismen liegen dieser Wirkung von Menadion zugrunde?
 - 2.) Welche Rolle spielen ErbB2-regulierende Phosphatasen in dieser zellulären Reaktion? Ist dieser Mechanismus im zellfreien System simulierbar?
 - 3.) Lassen sich die zellulären Stressreaktionen auf Xenobiotika wie Menadion und die Reaktion auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vergleichen? Ist die Bildung von ROS Teil des Wirkmechanismus von Menadion?
-

2 MATERIAL UND METHODEN

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

2.1 Zellkultur

Tab. 2.1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinien:

Bezeichnung	Beschreibung	Bezugsquelle
HaCaT	humane Keratinozyten, aus spontan transformierten Keratinozyten hervorgegangen (Boukamp et al., 1997), (Fusenig et al., 1998), immortal, nicht tumorigen	Freundlicherweise von Herrn PD Dr. P. Brenneisen zur Verfügung gestellt
SCL-1	kaum differenzierte, humane Plattenepithelkarzinomzellen (Boukamp et al., 1982)	s.o.
NHEK	humane sekundäre Hautkeratinozyten	s.o.
HFC	humane sekundäre Hautfibroblasten	Clonetics/Bio-Whittaker, Duke, USA
1306	humane sekundäre Hautfibroblasten, immortal	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK

Mit Ausnahme der NHEK wurden alle in Tab. 2.1 aufgelisteten Zellen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin supplementiert war („Komplettmedium“), in einer wasserdampfgesättigten, 37°C warmen Atmosphäre mit 5 % (v/v) Kohlendioxid kultiviert. NHEK wurden in speziellem Keratinocyten-Medium (Gibco, Karlsruhe) kultiviert.

Zum Passagieren und Vermehren wurden die Zellen nach Erreichen 80-90%iger Konfluenz mit PBS gewaschen und nach Abnahme des Waschpuffers mit einer Trypsin-EDTA Lösung abgelöst. Die Reaktion wurde nach 5-10 min mit dem Anzuchtmedium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen verteilt.

Zum Einfrieren und Lagern der Zellen wurde nach Abstoppen der Trypsinierung die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO) aufgenommen und mit einer Zelldichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryogefäßen bei -80°C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und in eine 75 cm^2 -Kulturflasche mit Kompletmedium überführt. Um den DMSO-Gehalt im Medium auf unter 1 % zu reduzieren und dadurch einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde sowohl nach 4-5 h als auch nach 24 h ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.2 Behandlung von Zellen

2.2.1 Behandlung mit Chinonen

Zellen wurden in 60 mm-Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80-100% in Kompletmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten. Während der Behandlung wurden die Zellen für 15 min bei 37°C mit $100\text{ }\mu\text{M}$ Menadion bzw. DMSO (als Lösungsmittelkontrolle zu den eingesetzten Chinonen in äquivalenten Volumina) jeweils in serumfreiem Medium, inkubiert. Bei zusätzlicher Verwendung der Inhibitoren des EGFR, AG1478 ($10\text{ }\mu\text{M}$), Compound 56 ($10\text{ }\mu\text{M}$) bzw. von ErbB2, AG825 ($10\text{ }\mu\text{M}$), AG879 ($10\text{ }\mu\text{M}$) (alle Calbiochem, San Diego, USA) erfolgte vor der Behandlung der Zellen eine Präinkubation für 30 min mit dem jeweiligen Inhibitor, der auch während der Behandlung in gleicher Konzentration zugegen war. Die Präinkubation der Zellen mit $100\text{ }\mu\text{M}$ Dicoumarol (Calbiochem) erfolgte für 10 min bei 37°C ; Dicoumarol war auch während der Behandlung in gleicher Konzentration zugegen. Nach der Behandlung wurden die Zellen gewaschen und anschließend für eine Western-Analyse oder einen Glutathiontest vorbereitet.

2.2.2 Behandlung mit UVA

Zellen wurden in Vollmedium bis zu einer Konfluenz von 80-100% auf 30 mm-Zellkulturschalen herangezogen. Vor der Behandlung wurden sie für 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten. Wenn benötigt, erfolgte eine Stunde vor der Bestrahlung eine Vorinkubation mit $1\text{ mM Na}_3\text{VO}_4$ in serumfreiem Medium. Anschließend wurden die entsprechenden Zellen mit einer Dosis von 30 J/cm^2 (UVA700, Waldmann Lichttechnik, Villingen) in PBS oder serumfreiem DMEM ohne Phenolrot bestrahlt und danach sofort in Radionimmunopräzipitations (RIPA)-Puffer [20 mM Tris/HCl ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM EGTA ; 1% (w/v) Triton X-100; $1\text{ mM Na-Orthovanadat (Na}_3\text{VO}_4)$; $2,5\text{ mM Na-Pyrophosphat}$; $1\text{ mM }\beta\text{-Glycerophosphat}$; pH 7,5; jeweils frisch zugesetzt 1 mM

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) sowie 1 µg/ml Leupeptin] lysiert. Zur Kontrolle wurde immer eine unbehandelte und eine mit EGF behandelte Probe mitgeführt. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Western-Blot-Analyse (vgl. Kap. 2.4.6).

2.2.3 Behandlung von Zellen mit Bengalrosa/Licht

Bengalrosa ist ein Photosensibilisator, dessen Bestrahlung mit Weißlicht in Gegenwart von Sauerstoff zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führt. Zellen wurden in Vollmedium bis zu 80-100% Konfluenz auf 30 mm-Zellkulturschalen herangezogen und für 24 Stunden ausgehungert. Die Zellen wurden mit 0,1 bzw. 0,3 µM Bengalrosa (Stammlösung: 10 mM in H₂O) behandelt und für 10 Minuten mit Weißlicht bestrahlt. Danach erfolgte in einigen Fällen eine weitere 15-minütige Inkubation mit EGF und im Anschluss daran die Zellyse mit RIPA-Probenpuffer (vgl. 2.2.2). Die Analyse der Proben wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem Western-Blot durchgeführt (s. Kap. 2.4.6).

2.2.4 Dephosphorylierungstest auf Hemmung EGFR/ErbB2 regulierender PTPasen

Der hier beschriebene Test auf die Inhibition EGFR regulierender Phosphatasen geht auf den von (Knebel et al., 2000) beschriebenen Phosphatase-Test im Zellsystem zurück. In diesem Test wird der Phosphorylierungsstatus des EGFR in Gegenwart spezifischer EGFR-Kinaseinhibitoren untersucht, woraus Rückschlüsse auf eine eventuelle Hemmung von EGFR regulierenden Phosphatasen gezogen werden können. Über Nacht in serumfreiem DMEM inkubierte Zellen werden mit EGF stimuliert und anschließend mit einer Substanz inkubiert, bei der es sich um einen potentiellen PTPase-Inhibitor handelt. Anschließend werden die Zellen kurz mit einem Kinaseinhibitor behandelt und direkt danach lysiert. Handelt es sich bei dem zu testenden Agens um keinen Phosphatase-Inhibitor, so ist im darauffolgenden Western-Blot (s. Kap. 2.4.6) keine EGFR-Phosphorylierung mehr zu detektieren; durch die EGF-Stimulation wurde der Rezeptor aktiviert, anschließend aber durch assoziierte Phosphatasen dephosphoryliert, und durch die Inkubation mit einem Kinase-Inhibitor war keine neuerliche Autophosphorylierung möglich. Handelte es sich bei dem zu testenden Agens jedoch um einen PTPase-Inhibitor, so würde in der anschließenden Western-Blot-Analyse (s. Kap. 2.4.6) noch ein phospho-EGFR-Signal zu detektieren sein, da der Rezeptor nicht dephosphoryliert worden sein kann. Abb. 2.1 zeigt eine schematische Darstellung des Tests.

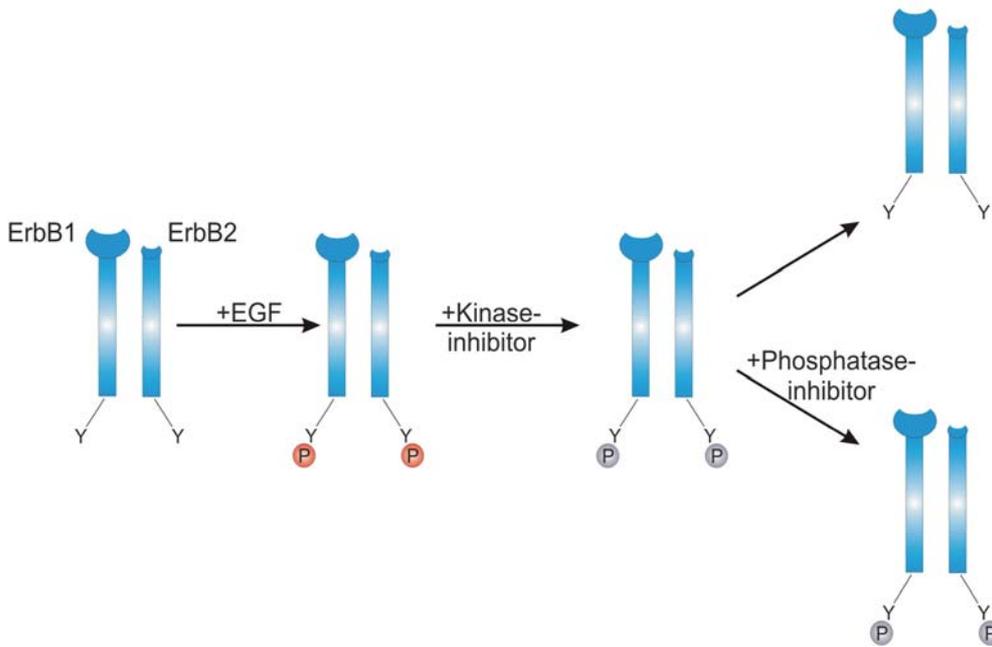


Abb. 2.1: Prinzip des Tests auf Hemmung ErbB-regulierender Phosphatasen. (Details siehe Text)

HaCaT-Zellen wurden in Kompletmedium bis zu 80-100%iger Konfluenz in 30 mm-Zellkulturschalen herangezogen. Vor der Behandlung wurden sie über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Durch Zugabe von EGF (100 ng/ml) für 5 Minuten wurde die EGFR-Phosphorylierung stimuliert, anschließend erfolgte Waschen der Zellen mit PBS und die Behandlung mit dem zu testenden Agens [z.B. 15 min Menadion (100 μ M) in serumfreiem DMEM]. Nach Entfernen der zu testenden Lösung wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und anschließend für 30 sec mit dem EGFR-Inhibitor AG1478 (10 μ M in DMEM) behandelt und anschließend sofort in 100 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer [125 mM Tris; 4% (w/v) SDS; 20% (w/v) Glycerin; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8 jeweils frisch zugesetzt 100 mM DTT] lysiert und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Es folgt die elektrophoretische Auftrennung auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (s. Kap.2.4.4) und anschließende Western-Blot-Analyse (s. Kap. 2.4.6) auf Tyrosinphosphorylierung des EGFR.

2.3 Analytik

2.3.1 Aktivitätstest isolierter Phosphatasen

Die Aktivität der Tyrosinphosphatase PTP1B (Biomol, Hamburg) wurde über die Dephosphorylierung des Substrates *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP; Sigma-Aldrich) gemessen. PTP1B (0,1 μ M in 50 mM HEPES, pH 6,8) wurde mit Menadion, NSC95397,

DMSO (Kontrolle), H₂O₂ oder N-Acetylcystein (NAC) in den benötigten Konzentrationen für 10 min in einem Volumen von 50 µl inkubiert und dann zu 750 µl pNPP/HEPES (2 mM pNPP in 50 mM HEPES, pH 6,8) gegeben. pNPP ist ein farbloses Substrat, das zu *p*-Nitrophenol hydrolysiert, was zu einer Zunahme der Absorption bei 405 nm führt. Die Bildung von *p*-Nitrophenol kann unter Zuhilfenahme des pK_s von 7,15 für *p*-Nitrophenol und des Extinktionskoeffizienten ε₄₀₅ von 18000 M⁻¹ cm⁻¹ für Nitrophenolat nach Korrektur für die spontane Hydrolyse von pNPP berechnet werden.

2.3.2 Bestimmung von Glutathion und Glutathiondisulfid

Die Bestimmung von Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG) beruht auf der Reaktion mit 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), durch die zwei Moleküle GSH zu GSSG oxidiert werden (siehe Abb. 2.2). Bei dieser Reaktion entsteht das farbige Thionitrobenzoat-Anion (TNB), welches ein Absorptionsmaximum bei 412 nm besitzt. Das entstandene GSSG wird unter Verbrauch von NADPH durch Glutathiondisulfid-Reduktase (GRed) enzymatisch reduziert. Das entstehende GSH reagiert sodann erneut mit DTNB. Bei dieser Reaktion werden GSH und GSSG gleichermaßen erfaßt. Um allein GSSG zu bestimmen, wird GSH mit 2-Vinylpyridin derivatisiert und nimmt somit am beschriebenen zyklischen Prozeß nicht mehr teil.

Für die Glutathionbestimmung wurden HaCaT-Zellen nach entsprechender Behandlung mit kaltem PBS gewaschen. Nach möglichst vollständigem Absaugen wurden sie in 250 µl 10 mM HCl lysiert, mit einem Zellschaber von der Kulturschale (Ø 90 mm) entfernt und bei -80°C eingefroren. Nach dem Wiederauftauen wurden sie für ca. 20 sec auf Eis sonifiziert. 200 µl des Lysats wurden in frische Eppendorfgefäße überführt. Je 100 µl wurden für die Messung von GSSG und Gesamtglutathion benötigt. Der Rest des Lysats wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung aufbewahrt. Zu den 200 µl Lysat wurden 67 µl 5-Sulfosalicylsäure (SSA) gegeben [Endkonzentration 5% SSA (w/v)]. Standardreihen aus GSSG und GSH wurden über den gesamten Versuch hinweg ebenso behandelt wie die Proben. Nach Abzentrifugieren (5 min, 20.000 g, 4°C) wurde der Überstand in neue Eppendorfgefäße transferiert. 40 µl wurden sofort für die Messung von Gesamtglutathion verwendet und 100 µl für die GSSG-Messung in ein separates Eppendorfgefäß überführt. Die Bestimmung von GSSG erfolgt nach Derivatisierung des reduzierten Glutathions. Hierzu wurden 2 µl 2-Vinylpyridin und 6 µl Triethanolamin zu 100 µl der Probe gegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Die Reaktionslösung bestand aus 340 µl Reaktionspuffer (0,2 M Tris, pH 8; 0,1 mM EDTA; 1,5 mM NADPH), 40 µl Probe bzw. Standard und 20 µl DTNB (Stammlösung: 10 mM). Durch Zugabe von 10 µl Glutathion-Reduktase (Fluka, 1-2 U/ml) wurde die Reaktion gestartet. Die Absorption bei 412 nm wurde in einem ELISA-Reader (Power Wave X

select, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, USA) gemessen. Die Quantifizierung von Gesamtglutathion und Glutathiondisulfid erfolgte jeweils anhand der Standardreihen und durch Normalisierung auf den Proteingehalt (Bradford, 1976) der zentrifugierten, aber noch nicht mit SSA-behandelten Lysate.

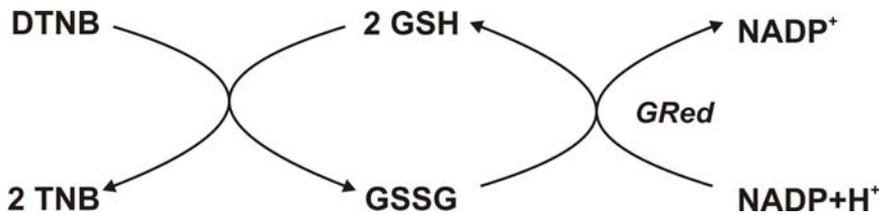


Abb. 2.2: Prinzip des DTNB-GSSG-Recycling Tests auf Gesamtglutathion und Glutathiondisulfid

2.4 Gelelektrophorese und Western Blot

2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Proteinextrakte von behandelten Zellen wurden durch direkte Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer (vgl. 2.2.2) hergestellt. Für eine 35 mm-Zellkulturschale wurden dabei 100 μ l des RIPA-Puffers verwendet. Nach Zugabe des Probenpuffers wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus der Zellkulturschale gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und lysiert. Dann wurden die Proben bei -80°C eingefroren, wieder aufgetaut und für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Kap. 2.3.2) wurde den Proben 2x Laemmli-Probenpuffer (vgl. 2.2.4) zugesetzt. Daraufhin wurden sie 5 min auf 95°C erhitzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Gegebenenfalls wurden die Proteinextrakte bis zur Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamidgel bei -20°C gelagert.

2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinbestimmung in Zellextrakten erfolgte mittels des „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (Bio-Rad, München) nach Bradford (1967) gegen Standards aus Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers.

Im Falle hoher Detergenzkonzentrationen im Zellextrakt wurde die Proteinkonzentration auf Basis der 1951 entwickelten Methode nach (Lowry et al., 1951) unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad D_C Protein Assay) gegen Standards aus Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.4.3 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation des EGFR aus Zellysaten wurden in 90 mm-Kulturschalen gewachsene Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und nach gründlicher Aspiration des PBS 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 Na₃VO₄; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) lysiert und mit einem Zellschaber gesammelt. Unlösliches Zellmaterial wurde durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 20.000 g) in einer Mikrozentrifuge sedimentiert und der Überstand anschließend in frische Reaktionsgefäße transferiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde nach Lowry (vgl. 2.4.2) bestimmt und dann durch Zugabe entsprechender Volumina von IP-Puffer auf Konzentrationen von 1,4 mg/ml eingestellt. Jeweils 4 µg polyklonaler Anti-EGFR-Antikörper aus Kaninchen (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA), sowie 50 µl einer 50%-igen, in IP-Puffer gewaschenen Protein A-Agarose-Suspension (Upstate Biotechnology) wurden zu 500 µl Probe pipettiert. Über einen Zeitraum von 14 bis 20 h wurde der EGF-Rezeptor unter langsamer Überkopfrotation der Reaktionsgefäße 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 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach gründlichem Mischen der Proben wurden diese für 3-5 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden für 3 min in einer Tischzentrifuge bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Jeweils 20 µl des Überstandes mit gelöstem immunpräzipitiertem Material wurden auf ein 8%-iges SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und „Western-Blot“

Die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen, bei maximal 40 mA pro Minigel (Towbin et al., 1979).

Trenngel (12 % Acrylamid): 40 % (v/v) Sol 1; 25 % (v/v) Sol 2; 35 % (v/v) H₂O

Zur Polymerisation Zugabe von 0,07 % (v/v) APS und 0,007 % (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED).

Sammelgel (4 % Acrylamid): 13,4 % (v/v) Sol 1; 30 % (v/v) Sol 3; 56,6 % (v/v) H₂O

Zur Polymerisation Zugabe von 0,075 % (v/v) APS; 0,007 % (v/v) TEMED.

Zusammensetzung der einzelnen Lösungen:

Sol 1: 30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid

Sol 2: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 8,8

Sol 3: 0,4 % (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8 mM EDTA) pH 6,8

Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,8

APS: 10-12 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat.

Der Transfer („Blotting“) der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Hybond-P, Amersham, Braunschweig) geschah über Nacht bei 12 V. Hierzu wurde nach der Elektrophorese das zu blottende Gel kurz in Transferpuffer [25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,5] äquilibriert und zusammen mit in Gelgröße zurechtgeschnittenen 3 mm-Blottingpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie mit in Methanol aktivierter und anschließend in Transferpuffer äquilibrierter PVDF-Membran (Amersham) zum Blottingaufbau zusammengestellt. Zwei in Transferpuffer gesättigte Blottingpapiere wurden luftblasenfrei auf die Anode gebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei weiteren Blottingpapieren, die in einer „Tank-Blotting“-Apparatur der Firma Invitrogen (Karlsruhe) zum Elektrotransfer eingesetzt wurde. Als Kontrolle für einen erfolgreichen Transfer diente eine reversible Anfärbung der Proteinbanden mit PonceauS [0,1% (w/v) PonceauS in 5% (v/v) Essigsäure) bzw. Amidoschwarz [0,1% (w/v) Amidoschwarz in 5% (v/v) Essigsäure].

2.4.5 Kolloidale Peptidfärbung nach BLAKESLEY et al. (1997)

Die Färbung von Proteingelen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch eine Peptidfärbelösung, die Coomassie Blue G-250 in kolloidaler Form enthält. Der Farbstoff färbt Proteine reversibel blau, indem er an basische Aminosäure-Seitenketten bindet.

Das Trenngel wird nach beendeter SDS-PAGE für mehrere Stunden in die Lösung gelegt und anschließend in Wasser entfärbt, bis sich die blauen Proteinbanden deutlich von der durchsichtigen Gelmatrix abheben. Die Sensitivität dieser Färbemethode liegt bei 0,1 bis 0,2 µg Protein pro Bande.

Zur Herstellung der Peptidfärbelösung wurden zuerst 0,8 g Coomassie G250 in 400 ml Wasser unter Rühren gelöst und dies wurde dann mit 400 ml 1 M H₂SO₄ aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert, wobei sich ein braunes Filtrat ergab. Nach Zugabe von 88 ml 10 M KOH (49,3 g/88 ml) und 124 ml 100% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) ergab sich eine grüne, kolloidale Lösung.

2.4.6 Immunanfärbung nach Western-Blot

Der Nachweis einzelner Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte mithilfe von Antikörpern. Das Blockieren unspezifischer Bindestellen erfolgte mit Blockierpuffer, bestehend aus TBST [TBS (20 mM Tris; 137 mM NaCl; pH 7,6) + 0,1% (v/v) Tween20] und 1% Magermilchpulver (BioRad, Hamburg) bzw. 1% (w/v) BSA für 60 min. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in TBST und

1% Magermilchpulver für 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer Stunde Waschen mit TBST, wobei dieses mehrfach gewechselt werden sollte, erfolgte dann die Inkubation mit an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltem sekundärem Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrift mit TBST von mindestens einer Stunde (auch hier sollte der Puffer häufig gewechselt werden) erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper über Chemilumineszenz [„SuperSignal® West Pico Chemiluminescent“ Substrat (Pierce, Rockford, USA)] durch Auflegen eines Filmes (Amersham, Freiburg).

Tab. 2.2: Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper:

Zielprotein	Quelle/Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper		
Akt	Cell Signaling Technology, Beverly, USA, # 9272	1:1000 in 1% (w/v) Milchpulver/TBST
EGFR	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA; # 06-847	1:1000 in 1% (w/v) BSA/TBST
EGFR	Cell Signaling Technology, # 2234	1:1000 in 1% (w/v) BSA/TBST
ErbB2	Upstate Biotechnology, # 2242	1:1000 in 1% (w/v) BSA/TBST
ErbB2	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, # SC-284	1:1000 in 1% (w/v) BSA/TBST
ERK1/2	Cell Signaling Technology, # 9102	1:5000 in 1% (w/v) Milchpulver/TBST
p38	Cell Signaling Technology, # 9212	1:1000 in 1% (w/v) Milchpulver/TBST
phospho-Akt (Ser ⁴⁷³)	Cell Signaling Technology, # 9271	1:1000 in 1% (w/v) Milchpulver/TBST
phospho-EGFR (Tyr ¹⁰⁶⁸)	Biosource, # 44-788	1:2000 in 1% (w/v) BSA/TBST
phospho-ErbB2 (Tyr ¹¹³⁹)	Biosource, # 44-902	1:1000 in 1% (w/v) BSA/TBST
phospho-ErbB2 (Tyr ¹²⁴⁸)	Biosource, # 44-904	1:1000 in 1% (w/v) BSA/TBST
phospho-ErbB2 (Tyr ¹²⁴⁸)	Cell Signaling Technology, # 2247	1:500 in 1% (w/v) BSA/TBST

phospho-ERK1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Cell Signaling Technology, # 9101	1:5000 in 1% (w/v) Milchpulver/ TBST
phospho-ERK5 (Thr ²¹⁸ /Tyr ²²⁰)	Cell Signaling Technology, # 3371	1:1000 in 1% (w/v) Milchpulver/ TBST
phospho-p38	Cell Signaling Technology, # 9211	1:1000 in 1% (w/v) Milchpulver/ TBST
phospho-Tyrosin	Upstate Biotechnology, # 05-321	1:1000 in 1% (w/v) BSA/TBST

Sekundärantikörper

Anti-Rabbit-HRP	Dianova, Hamburg # 111-035-144	1:3000 in TBST
Anti-Mouse-HRP	Pierce, Rockford, USA # 31160	1:20000 in TBST

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

Zum Entfernen von Antikörpern von der PVDF-Membran, um weitere Proteine mit neuen Antikörpern detektieren zu können, wurde die Membran für 30 min im Wasserbad bei 50°C in Stripping-Puffer [100 mM β -Mercaptoethanol; 2% (w/v) SDS; 62,5 mM Tris pH 6,8] geschwenkt. Danach wurde die Membran zunächst mit ausreichend Wasser und anschließend 2-3 Male für ca. 10 min in großen Volumina von TBST bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Für die neue Immunanfärbung (wie unter 2.4.6 beschrieben) wurde der Vorgang erneut mit dem Blockierungsschritt begonnen. Da mit dem Strippen auch ein Teil des an die Membran gebundenen Proteins verloren geht, sollte zunächst immer das in vermutlich niedrigeren Mengen vorliegende Antigen nachgewiesen werden.

2.4.8 Immunpräzipitations-Kinase-Test

Zur Messung der Aktivität von zellulärem Erk5 wurde dies aus Zellysaten mithilfe eines Erk5-Antikörpers (H-300, Santa Cruz Biotechnology, # SC-5626) immunpräzipitiert (vgl. Kap. 2.4.3). Nach Abzentrifugieren wurde der IP-Ansatz je dreimal mit eiskaltem RIPA sowie Kinasepuffer (10 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT) gewaschen und anschließend der Überstand abgenommen. Zum IP-Ansatz wurden dann auf Eis 35 μ l Kinasepuffer, 5 μ l 150 μ M ATP, 5 μ l (1 mg/ml) basisches Myelinprotein (MBP) und 5 μ Ci [γ ³²P] ATP pipettiert und für 30 min bei 30°C unter mehrmaligem Schütteln inkubiert. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 2x Laemmli-Puffer (vgl. 2.2.4) und Denaturierung bei 95°C für 5 min abgestoppt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden 20 μ l des Überstands auf ein SDS-Polyacrylamidgel (16 %) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss mit

Coomassie gefärbt (vgl. 2.4.4) und getrocknet. Das phosphorylierte Substrat wurde durch Phosphoimaging (FLA-2000, Raytest/Fujifilm, Straubenhardt) im Gel detektiert und quantifiziert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Aktivierung von EGFR und ErbB2 durch Menadion

Als Modellsystem für die Untersuchung ErbB2-abhängiger Signaltransduktion dienten menschliche Keratinozyten (HaCaT). Da ErbB2 bekanntermaßen Heterodimere mit EGFR bildet (vgl. 1.1.1), sollte überprüft werden, ob dies auch in HaCaT-Zellen der Fall ist. HaCaT-Zellen wurden dazu für 24 h in serumfreiem DMEM inkubiert und für 15 min mit 100 ng/ml EGF behandelt. Nach Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert. 100 µg Lysatprotein wurden mit 4 µg eines EGFR-Antikörpers und Protein A-Agarose für die Immunpräzipitation inkubiert. Nach Auftrennung in einem 8 %igen SDS-PAA-Gel konnte im Western-Blot sowohl EGFR mithilfe eines EGFR-spezifischen Antikörpers bei ca. 170 kDa als auch ErbB2 anhand eines ErbB2-spezifischen Antikörpers bei ca. 185 kDa detektiert werden. Durch phospho-spezifische EGFR- bzw. ErbB2-Antikörper konnte außerdem die Aktivität der jeweiligen Rezeptortyrosinkinase nachgewiesen werden. Sowohl die Copräzipitation von ErbB2 mit EGFR als auch die Tyrosinphosphorylierung von ErbB2 nach Stimulation mit EGF deuten auf die Heterodimerisierung von ErbB2 mit EGFR hin (siehe Abb. 3.1).

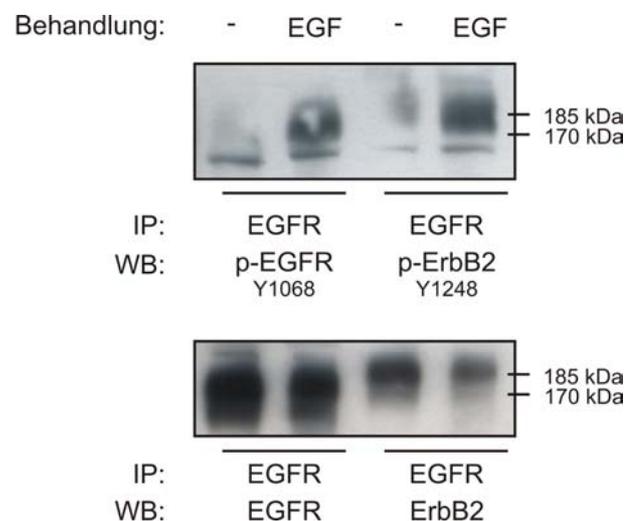


Abb. 3.1: Co-Immunpräzipitation von EGFR und ErbB2 in HaCaT-Zellen. Die Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM synchronisiert und daraufhin mit 100 ng/ml EGF oder Puffer für 15' inkubiert. Für die Immunpräzipitation über Nacht bei 4°C wurden 100 µg Protein und 4 µg EGFR-Antikörper eingesetzt. Im anschließenden Western Blot wurde die EGFR/ErbB2-Heterodimerisation nachgewiesen. Beide Rezeptortyrosinkinasen sind aktiv. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängige Experimente.

Unter Einwirkung von Menadion findet sich eine Aktivierung des EGFR in zahlreichen Zelltypen (Abdelmohsen et al., 2003). Um zu testen, ob dies auch für ErbB2 gilt, wurden HaCaT-Zellen für 24 h in serumfreiem DMEM und anschließend für 15 min mit Menadion (100 μ M) in serumfreiem DMEM inkubiert. Als Resultat dieser Behandlung zeigte sich im Western Blot, dass nicht nur der EGFR sondern auch ErbB2 phosphoryliert und somit aktiviert ist (Abb. 3.2). Ebenso wie der EGFR besitzt ErbB2 mehrere Phosphorylierungstellen, die zu einer vollständigen Aktivierung des Rezeptors essentiell sind. Zwei dieser Stellen sind die Tyrosinreste 1139 und 1248. Beide wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht und im Falle einer Aktivierung von ErbB2 phosphoryliert vorgefunden. In Abb. 3.2 wurde ebenfalls auf beide Phosphorylierungstellen hin untersucht; stellvertretend wurde Y1139 gezeigt.

HaCaT-Zellen sind immortal, jedoch nicht tumorigen. Daher sollte zum Vergleich der Einfluss von Menadion ebenfalls auf weitere Kerationozytenzelllinien untersucht werden. Der Versuch wurde also in normalen Keratinozyten (NHEK) und in Plattenepithelkarzinom-Zellen (SCL-1) wiederholt. Abb. 3.2 zeigt auch in NHEK sowie in SCL-1-Zellen eine menadioninduzierte ErbB2-Phosphorylierung. Als Positivkontrolle für die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase diente in allen drei Zelltypen eine EGF-Behandlung (100 ng/ml). Auch der nachgeschaltete Erk1/2-Signalweg wurde in allen Fällen aktiviert, wie durch Nachweis der Thr- und Tyr-Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 im Western-Blot nachgewiesen wurde (Abb. 3.2 B).

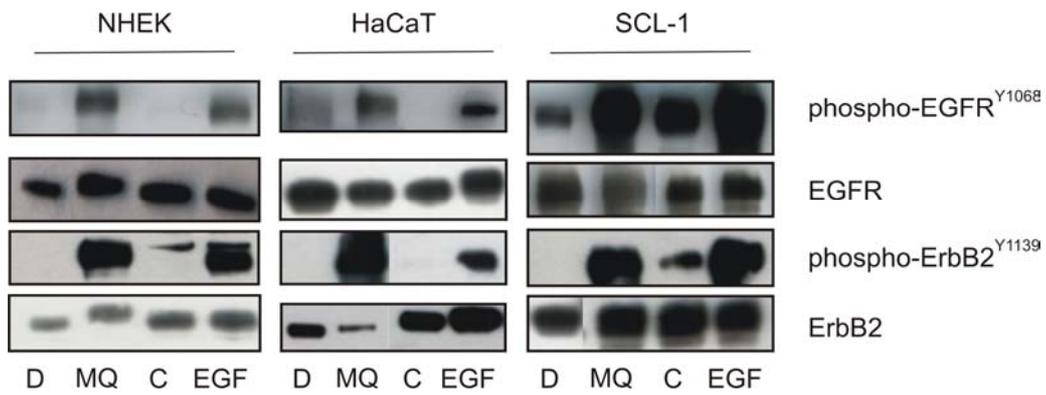
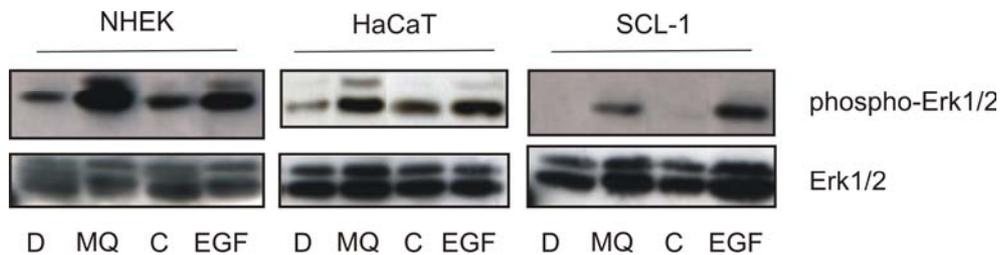
**B**

Abb. 3.2: Stimulierbarkeit von EGFR und ErbB2 in drei Keratinozytenzelllinien durch Menadion. Die Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM inkubiert und daraufhin mit 100 μ M Menadion (MQ) bzw. DMSO (D) als Lösungsmittelkontrolle oder 100 ng/ml EGF für 15' inkubiert; C: Kontrollbehandlung für EGF. Die Analyse dieser Behandlung erfolgte im anschließenden Western Blot auf **(A)** EGFR, ErbB2 oder **(B)** Erk1/2. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für $n = 3$ voneinander unabhängige Experimente.

Da also sowohl der EGFR als auch ErbB2 durch Menadion aktiviert wird, sollte geklärt werden, ob dies in Abhängigkeit voneinander geschieht, wie aufgrund der oben gezeigten Heterodimerisierung zu erwarten wäre. Hierzu wurde nun die Wirkung von EGFR-spezifischen Inhibitoren auf die menadioninduzierte Phosphorylierung von ErbB2 in HaCaT und SCL-1 getestet. Die Zellen wurden für 24 h in serumfreiem DMEM inkubiert, danach für 30 min in serumfreiem DMEM mit je 10 μ M der Tyrphostine AG1478 oder „Compound56“ (c56) präinkubiert und anschließend für 15 min mit 100 μ M Menadion in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors coinkubiert. Zur Kontrolle wurde der Versuch unter denselben Bedingungen mit EGF anstelle von Menadion als Stimulus durchgeführt. In Abb. 3.3 ist das Ergebnis des nachfolgenden Western Blots dargestellt. Die EGFR-spezifischen Inhibitoren unterbinden demnach nicht nur die Aktivierung des EGFR, sondern auch die Tyrosinphosphorylierung von ErbB2. ErbB2 wird somit ausschließlich über EGFR als Dimerisierungspartner phosphoryliert und also im Falle einer Hemmung

Inhibitoren mit Menadion (100 μ M), EGF (100 ng/ml) oder H₂O₂ (1 mM) für weitere 15 min. Die Auswirkungen dieser Behandlung sind in den in Abb. 3.4 dargestellten Western Blots aufgezeigt. Wie aufgrund der Spezifität der Kinaseinhibitoren erwartet, zeigt sich weder in Menadion-behandelten Zellen noch in denen, die mit EGF oder H₂O₂ inkubiert wurden, eine Hemmung des EGFR-Signals nach AG825- und AG879-Präinkubation. Interessanterweise konnte auch keine Inhibition der ErbB2-Phosphorylierung beobachtet werden. Im Gegenteil wurden die Phosphorylierungen auf ErbB-Ebene im Vergleich zur Kontrolle eher verstärkt.

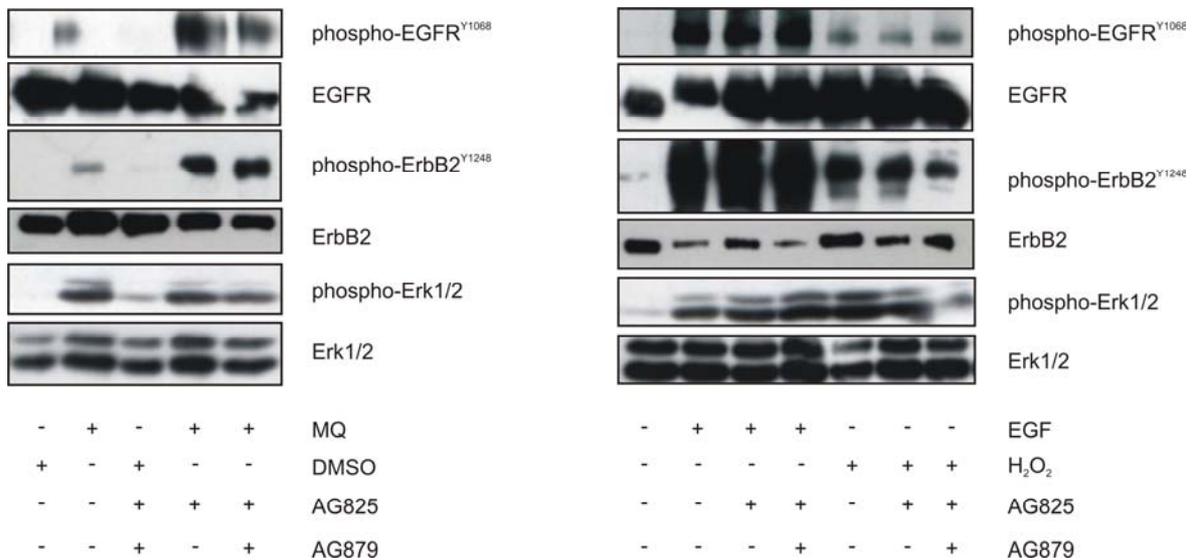


Abb. 3.4: Einfluss der ErbB2-spezifischen Inhibitoren AG825 und AG879 auf die durch Menadion (MQ) induzierte Aktivierung von EGFR und ErbB2. HaCaT-Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM synchronisiert, dann 30 min mit AG825 und AG879 präinkubiert und anschließend für 15 min mit den Inhibitoren sowie 100 μ M MQ, 100 ng/ml EGF oder 1 mM H₂O₂ coinkubiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 2 voneinander unabhängige Experimente.

3.2 Mechanismus der Aktivierung von Signalwegen durch Menadion

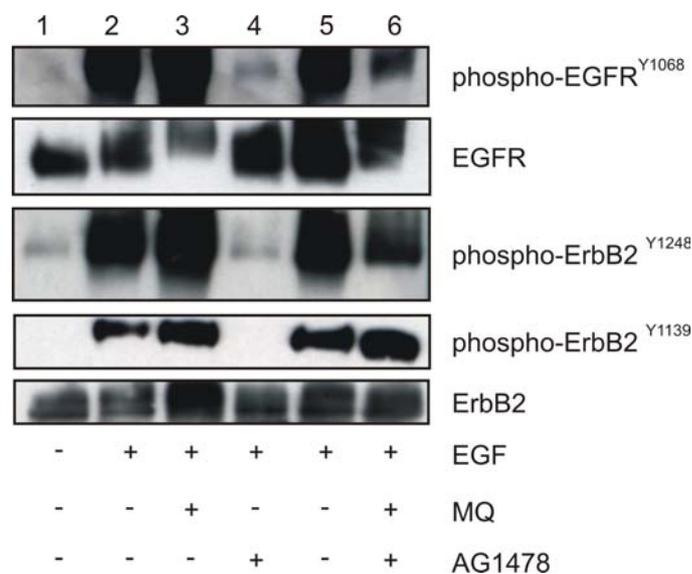
Nachdem gezeigt werden konnte, dass ErbB2 durch Menadion aktivierbar ist, sollte geklärt werden, ob dies durch Phosphatasen reguliert wird. Hierzu wurde ein Test auf Dephosphorylierung von EGFR/ErbB2 durchgeführt (vgl. 2.2.4). Zellen wurden für 24 Stunden mit serumfreiem Medium inkubiert, um die basale Phosphorylierung der Proteine zu minimieren (Abb. 3.5 A, Spur 1). Daraufhin erfolgte eine Phosphorylierung und somit Aktivierung des EGFR durch Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF (Abb.

3.5 A, Spur 2). Nach Entfernen von EGF schloß sich eine Inkubation mit Menadion an. Schließlich wurden die Zellen mit dem Kinaseinhibitor AG1478 inkubiert, um die Tyrosinphosphorylierung des stimulierten Rezeptors zu untersuchen, und daraufhin umgehend lysiert. In den Proben, die mit Lösungsmittel statt Menadion behandelt wurden, fand sich EGFR dephosphoryliert, was auf die Regulation durch PTPasen hinweist (Spur 4). Trotz AG1478 blieb jedoch bei dem durch die EGF-Behandlung in phosphoryliertem Zustand vorliegenden EGFR die Phosphorylierung erhalten, auch wenn anschließend mit AG1478 gehemmt wurde (Spur 6). Zurückzuführen ist dies auf Hemmung EGFR-regulierender PTPasen durch Menadion (Abdelmohsen et al., 2003).

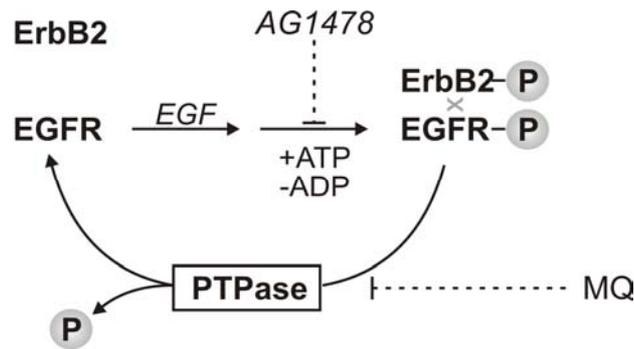
In den als Teil des Dephosphorylierungstests durchgeführten Western Blots (Abb. 3.5) zeigen sich in den mit Menadion und Kinaseinhibitor AG1478 behandelten Proben eine starke Tyrosinphosphorylierung nicht nur des EGFR, sondern auch von ErbB2. Für ErbB2 wurden zwei für die Aktivierung essentielle Phosphorylierungsstellen untersucht. Sowohl für Y1139, als auch für Y1248 wurde eine Phosphorylierung nachgewiesen. Neben EGFR-regulierenden Phosphatasen werden somit auch ErbB2-regulierende Phosphatasen blockiert.

Der Dephosphorylierungstest wurde unter Verwendung der ErbB2-spezifischen Kinaseinhibitoren AG825 und AG879 wiederholt. Da jedoch auch hier durch die Inhibitoren (AG825 oder AG879) weder eine ErbB2- noch eine EGFR-Dephosphorylierung erzielt werden konnte, lag wiederum die Vermutung nahe, dass dies auf einen Ausgleich der ErbB2-Phosphorylierung durch den EGFR als Dimerisierungspartner zurückzuführen ist.

A



B



C

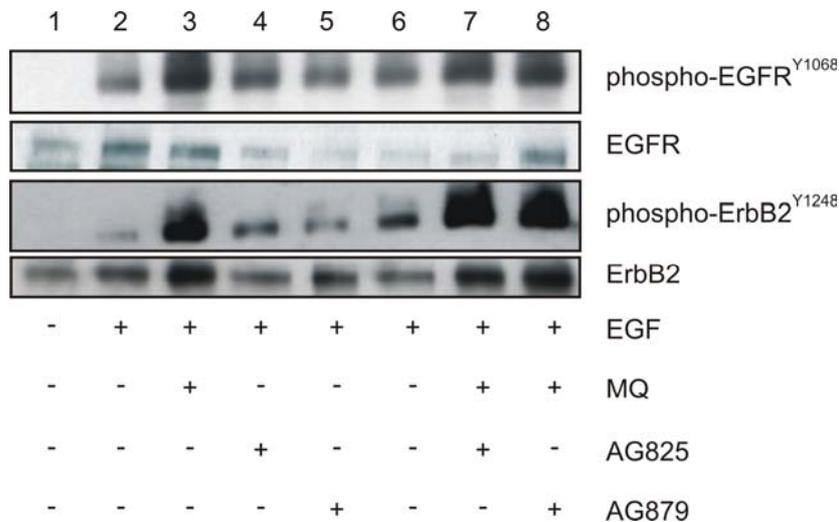


Abb. 3.5: Dephosphorylierungstest auf EGFR und ErbB2 durch PTPasen **(A)** HaCaT-Zellen wurden über Nacht mit serumfreiem DMEM gehalten, für 5 min mit EGF (100 ng/ml) stimuliert und für 15 min mit 100 μ M Menadion (MQ) inkubiert. Darauf erfolgte eine 30-sekündige Inkubation mit dem Kinaseinhibitor AG1478 und sofort Lyse der Zellen. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Der Nachweis der EGFR/ErbB2-Aktivierung erfolgte durch Western-Blot-Analyse. **(B)** Schema zur Interpretation von (A). **(C)** Die Behandlung der Zellen erfolgte wie unter (A) beschrieben. Anstelle des Kinaseinhibitors AG1478 wurden hier AG825 und AG879 verwendet. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

Da die Ergebnisse des mit dem EGFR-spezifischen Kinaseinhibitor durchgeführten Dephosphorylierungstest darauf hindeuten, dass auch ErbB2 durch eine oder mehrere PTPasen kontrolliert wird, war von weiterem Interesse, auf welche Weise Menadion auf die Phosphatasen Einfluss nimmt. Mithilfe von N-Acetylcystein (NAC) sollte geklärt werden, ob die menadionvermittelte Phosphataseinhibition reversibel ist. Dies wäre nur im Falle einer Oxidation möglich; eine Alkylierung durch Menadion ist unter physiologischen Bedingungen irreversibel.

HaCaT-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem DMEM inkubiert und im Anschluss daran für 15 min mit 100 μ M Menadion inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation entweder in serumfreiem DMEM ohne Zusatz oder mit 3 mM NAc. Die NAc-Behandlung musste als Postinkubation erfolgen, da NAc bei einer Coinkubation direkt mit Menadion reagieren würde. Nach der anschließenden Lyse wurde ein Western Blot durchgeführt. Dieser (Abb. 3.6) zeigt, dass eine Postinkubation mit NAc nach einer Inkubation mit Menadion die EGFR/ErbB2-Aktivierung deutlich erniedrigt. Dies lässt darauf schließen, dass unter Menadionbelastung zumindest teilweise oxidative Einflüsse zur Aktivierung von ErbB2 führen.

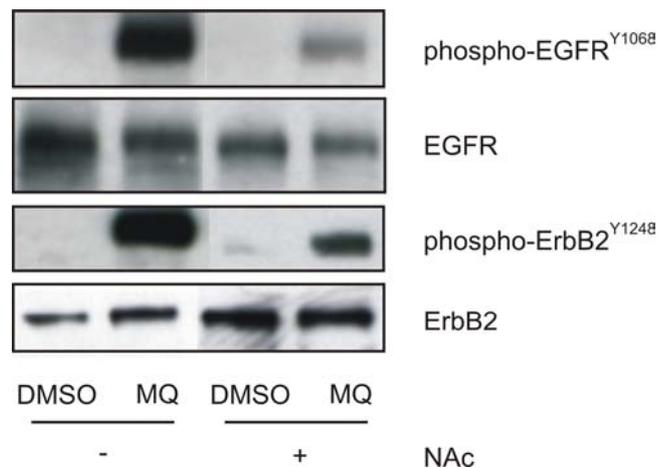


Abb. 3.6: Einfluss von NAc auf die Aktivierung des EGFR/ErbB2-Systems durch 100 μ M Menadion (MQ, 15 min) in HaCaT-Zellen. Vor der Behandlung wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium gehalten. Behandlung mit NAc (3 mM) erfolgte als Postinkubation von 30 min. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

Da eine Inkubation mit NAc die menadionvermittelte EGFR/ErbB2-Aktivität zwar deutlich aber dennoch nur teilweise verringert, sollte auf andere Weise versucht werden, in den Mechanismus der EGFR/ErbB2-Phosphorylierung durch Menadion einzugreifen. Dazu wurde Dicoumarol [3,3'-Methylen-bis(4-hydroxycoumarin)], das die NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-1 und somit die 2-Elektronen-Reduktion von Menadion blockiert, verwendet. Erneut wurden HaCaT-Zellen für 24 h in serumfreiem Medium inkubiert und danach behandelt. Auf eine 30-minütige Präinkubation mit 100 μ M Dicoumarol folgte eine Coinkubation mit Dicoumarol und Menadion (ebenfalls 100 μ M) für 15 min. Anschließend wurde für 30 min mit 3 mM NAc postinkubiert. Im darauffolgenden Western Blot (Abb. 3.7) konnte deutlich eine Verstärkung der mithilfe von NAc bereits nachgewiesenen Reversibilität detektiert werden. Aber ähnlich wie im Fall von NAc ist Dicoumarol allein nicht in der Lage, das menadionvermittelte EGFR- bzw. ErbB2-Phosphosignal komplett zu

unterdrücken. Dieses Ergebnis spiegelt sich jedoch nicht auf Erk1/2-Ebene wider. Hier ist auch nach Dicoumarol- oder NAc-Inkubation eine Erk1/2-Phosphorylierung zu detektieren.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Menadion oxidativen Einfluss auf die ErbB-regulierenden Phosphatasen besitzt, aber keinen direkten Effekt auf den nachgeschalteten Erk1/2-Signalweg hat.

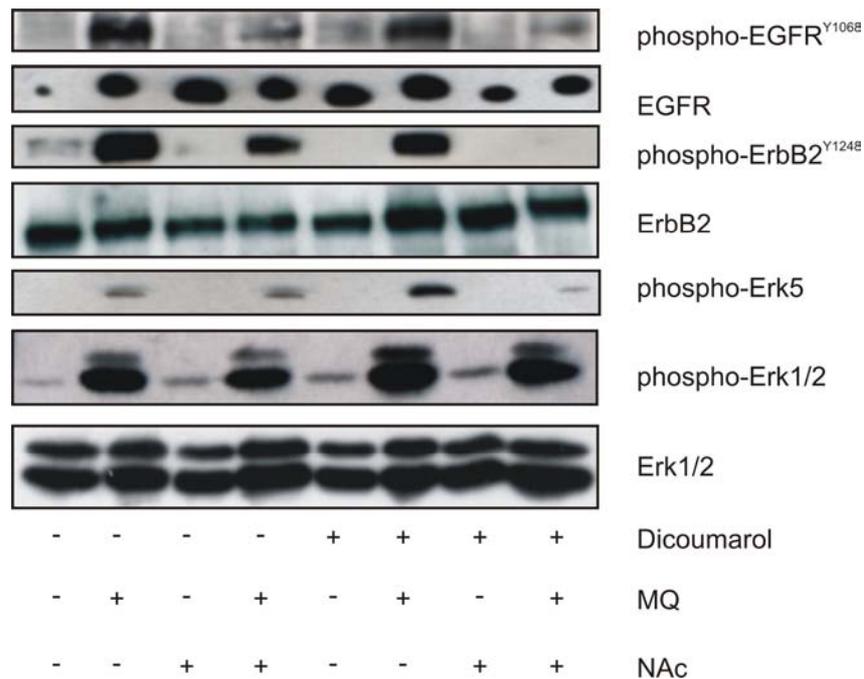


Abb. 3.7: Effekt von NAc und Dicoumarol auf menadioninduzierte Aktivierung des EGFR/ErbB2-Systems in HaCaT-Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium wurden die Zellen mit Dicoumarol (100 μ M) oder Medium für 30 min präinkubiert und dann mit Menadion (MQ, 100 μ M) und Dicoumarol oder Medium für 15 min coinkubiert. Darauf erfolgte eine Postinkubation mit NAc (3 mM) oder Medium. Als Lösungsmittelkontrolle für Dicoumarol wurde DMSO eingesetzt. Die Analyse auf EGFR-, ErbB2-, Erk1/2- oder Erk5- Signale erfolgte in anschließenden Western Blots. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

Redox-Cycling von Menadion in Abhängigkeit von seiner 2-Elektronen-Reduktion ist also an der Hemmung ErbB-regulierender PTPasen im zellulären System beteiligt. Dass Dicoumarol das Redox-Cycling von Menadion und somit die Reduktion von ROS in der Zelle tatsächlich hemmt, wurde mithilfe eines Glutathiontests gezeigt.

Zellen, die mit Menadion behandelt worden waren, zeigten eine leichte Depletion des zellulären Glutathionspiegels sowie eine signifikante Akkumulation von Glutathiondisulfid

gegenüber der DMSO-Kontrolle. Dies lässt auf einen oxidativen Einfluss von Menadion schließen, da Redox-Cycling von Menadion über Superoxid zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt, welches durch die Glutathionperoxidase und 2 GSH, die wiederum zu GSSG oxidiert werden, reduziert wird. GSSG kann jedoch nicht wieder reduziert werden, da die dafür notwendige Glutathionreduktase von Menadion inhibiert wird.

Präinkubation mit Dicoumarol und anschließende Coinkubation mit Menadion und Dicoumarol führte zwar zu einer leichten Depletion des Glutathionspiegels, jedoch einer signifikant geringeren Anreicherung von Glutathiondisulfid. Dicoumarol ist also in der eingesetzten Konzentration in der Lage, die NQOR und NQOR-abhängiges Redox-Cycling zu einem großen Teil zu unterbinden.

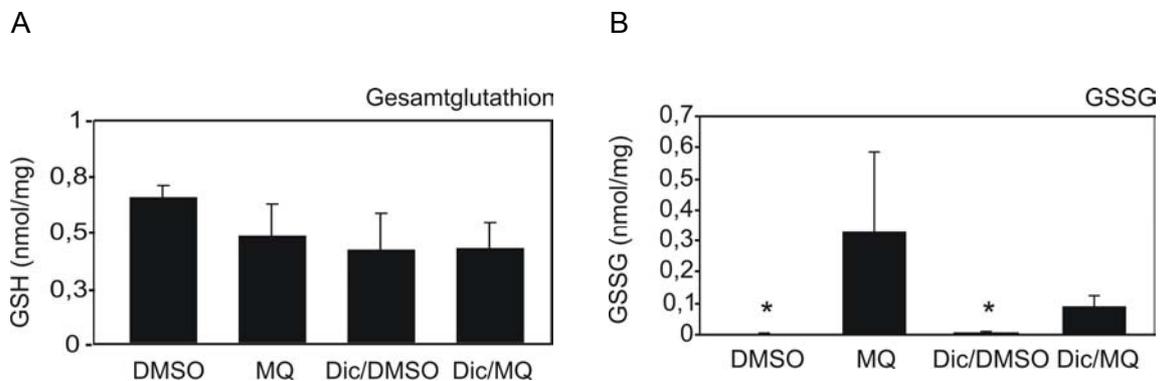


Abb. 3.8: Glutathionspiegel in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit Menadion. HaCaT-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem Medium gehalten, für 30 min mit Dicoumarol (100 μ M) oder Puffer präinkubiert und im Anschluss daran für 15 min mit 100 μ M Menadion behandelt. In einem Glutathiontest (2.3.2) wurden **(A)** Veränderungen des zellulären Glutathionspiegels und **(B)** Glutathiondisulfid-Konzentrationen ermittelt. Für *-gekennzeichnete Proben lag die GSSG-Konz. unter der Nachweisgrenze von 0,005 nmol/mg. Die gezeigten Daten (MW \pm SD) resultieren aus ≥ 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Da die Untersuchungen des Mechanismus der durch Menadion verursachten Phosphatasehemmung dafür sprechen, dass es sich zumindest teilweise um eine reversible PTPase-Oxidation und nicht um eine irreversible Phosphatasehemmung aufgrund einer Alkylierung durch Menadion handelt, sollte dies auch im zellfreien System an einer isolierten Phosphatase nachgewiesen werden.

Der isolierte, cytosolische Teil der Phosphatase PTP1B, die bekanntermaßen den EGFR reguliert, wurde mit 50 μ M Menadion für 10 min bei 37°C inkubiert (Abb. 3.9). Anschließend wurde die Phosphatase-Aktivität mithilfe von *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) bestimmt. Es fand sich eine Hemmung der PTPase-Aktivität durch Menadion um 80 %

gegenüber der Kontrolle. Um auszuschließen, dass durch Luftsauerstoff während der Inkubation der PTPase mit Menadion Wasserstoffperoxid entsteht, das dann wiederum für die Hemmung der PTPase verantwortlich wäre, wurde Katalase eingesetzt. Katalase ist ein peroxisomales Hämenzym, das die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff katalysiert. Eine Inkubation von Menadion mit der Phosphatase in Gegenwart von 45 U Katalase zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Inhibition der PTPase durch Menadion. Also beruht die Hemmung der PTPase nicht auf einem durch Wasserstoffperoxid hervorgerufenen Effekt.

Wie bereits gezeigt (Abb. 3.6), wird im zellulären Umfeld die menadioninduzierte Aktivierung von EGFR/ErbB2 über PTPasen durch NAc teilweise rückgängig gemacht werden. Im Falle des PTPase-Tests mit der isolierten PTP1B wurde anschließend an eine Inkubation mit Menadion (10 min) NAc (0,3 mM) für weitere 10 min zugegeben. Obgleich NAc allein gegenüber der Kontrolle bereits zu einem PTPase-Aktivitätsverlust von ca. 25% führt, fand sich gegenüber der NAc-Kontrolle eine Abschwächung der PTPase-Aktivität von lediglich 25% (im Vergleich zu 80% in Abwesenheit von NAc).

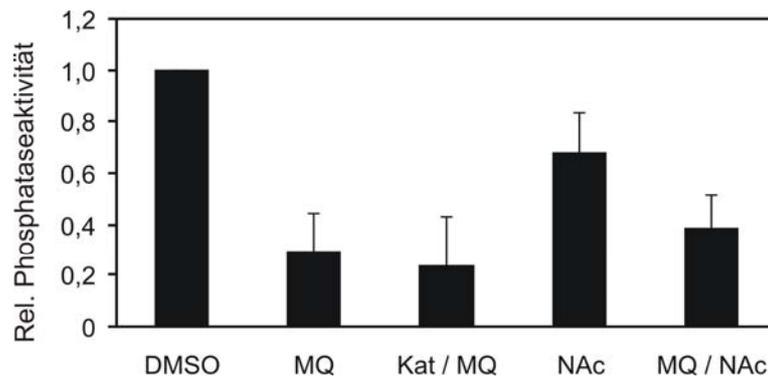


Abb. 3.9: PTP1B-Inhibition durch Menadion (MQ). Isolierte PTP1B wurde für 10 min bei 37°C mit 50 μ M Menadion, 45 U Katalase plus Menadion, mit NAc (0,3 mM) sowie mit Menadion mit Zugabe von NAc nach 10 min für weitere 10 min inkubiert. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PTPase-Aktivität gemäß 2.3.1. Die gezeigten Daten ($MW \pm SD$) resultieren aus ≥ 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Um genaueren Aufschluss über den Mechanismus der PTPase-Inhibition durch Menadion zu erhalten, wurde zu Vergleichszwecken in weiteren PTPase-Aktivitätstests NSC95397, ein weiteres 1,4-Naphthochinonderivat, herangezogen. NSC95397 blockiert die PTPase nicht alkylierend, sondern nur durch Einlagerung in ihr aktives Zentrum.

Für die Inhibition der PTPase durch NSC95397 sind weitaus geringere Konzentrationen nötig. Bereits 0,5 μ M NSC95397 reichen aus, um Inhibition der PTPase von etwa 65 %

hervorzurufen (Abb. 3.10). Einen weiteren Vergleich lieferte die Behandlung mit DMNQ. Bei DMNQ handelt es sich ebenfalls um ein 1,4-Naphthochinonderivat, das jedoch nur durch Redox-Cycling wirkt. Die durch 50 μM dieses Chinons hervorgerufene Inhibition der PTP1B beläuft sich auf ca. 40%.

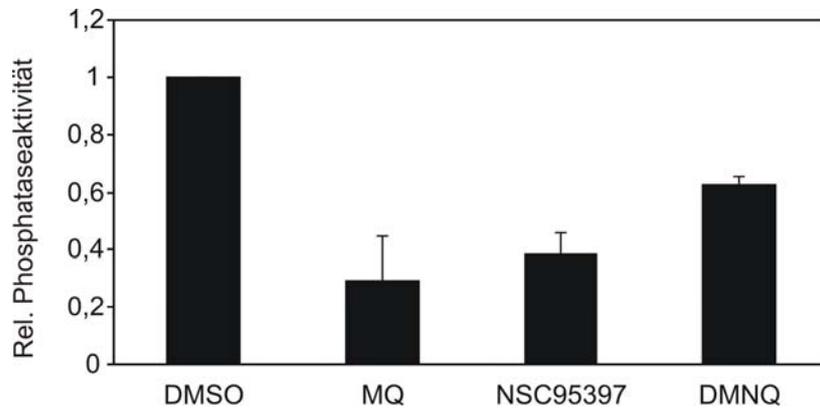


Abb. 3.10: Vergleich des Einflusses von Menadion, NSC95397 und DMNQ auf isolierte PTP1B. Die Phosphatase wurde für 10' bei 37°C mit 50 μM Menadion, 0,5 μM NSC95397 oder 50 μM DMNQ behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PTPase-Aktivität gemäß 2.3.1. Die gezeigten Daten (MW \pm SD) resultieren aus ≥ 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Die IC_{50} -Werte für Menadion und NSC95397, also jene Konzentrationen, die nötig sind, um das Enzym zu 50 % zu inhibieren liegen bei ca. 20 μM für Menadion bei 1 μM für NSC95397 (Abb. 3.11).

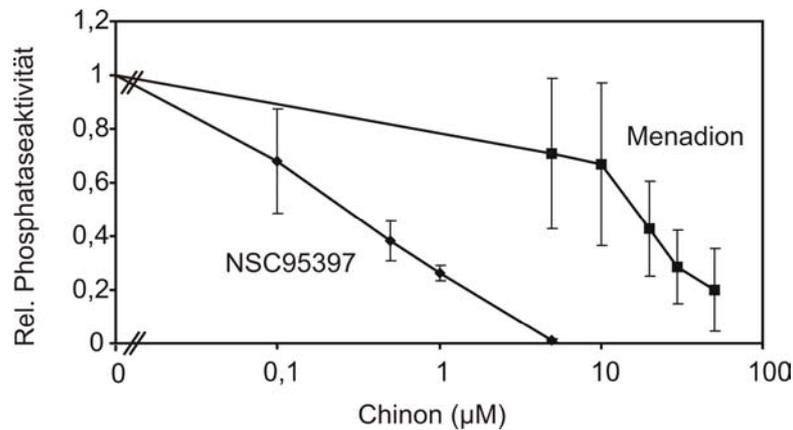


Abb. 3.11: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung von PTP1B durch Menadion und NSC95397. Isolierte PTP1B wurde für 10 min bei 37°C mit den angegebenen Konzentrationen an Menadion bzw. NSC95397 behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PTPase-Aktivität gemäß 2.3.1. Die gezeigten Daten (MW \pm SD) resultieren aus ≥ 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Um mögliche Veränderungen oder Dimerisierungen von PTP1B und dadurch erklärbare Inhibition der Phosphataseaktivität durch Menadion feststellen zu können, wurde erneut ein Phosphatasetest mit isolierter PTP1B durchgeführt und anschließend per SDS-PAGE untersucht. Als Kontrolle für die Behandlung wurden eine mit DMSO behandelte Probe, eine mit NSC95397 sowie eine mit DMNQ behandelte Probe aufgetragen. Im angefärbten Gel (Abb. 3.12, links) ist in allen vier Proben die 37,4 kDa große Bande der PTP1B deutlich erkennbar. Menadion führt offensichtlich zu einer Veränderung der PTP1B, die sich in einer sehr schwachen Bande unterhalb 85 kDa zeigt (siehe Pfeil). Daraufhin wurde zur näheren Untersuchung ein Western Blot durchgeführt (Abb. 3.12, rechts). Mithilfe eines PTP1B-Antikörpers wurde die Phosphatase detektiert. Auch hier ist in allen vier Proben die 37,4 kDa große Bande der PTP1B deutlich erkennbar. Bei der Veränderung der PTPase durch Menadion muss es sich um eine Dimerisierung handeln, da analog zu der Bande im Gel unterhalb 85 kDa ein PTP1B-Signal (siehe Pfeil) detektiert wurde. Dieser geringe Anteil kann jedoch nicht ausschließlich die Ursache eines so hohen Funktionsverlustes der PTPase sein. Weder für NSC95397 noch für DMNQ konnte im Gel oder im Western Blot eine Veränderung der Phosphatase festgestellt werden.

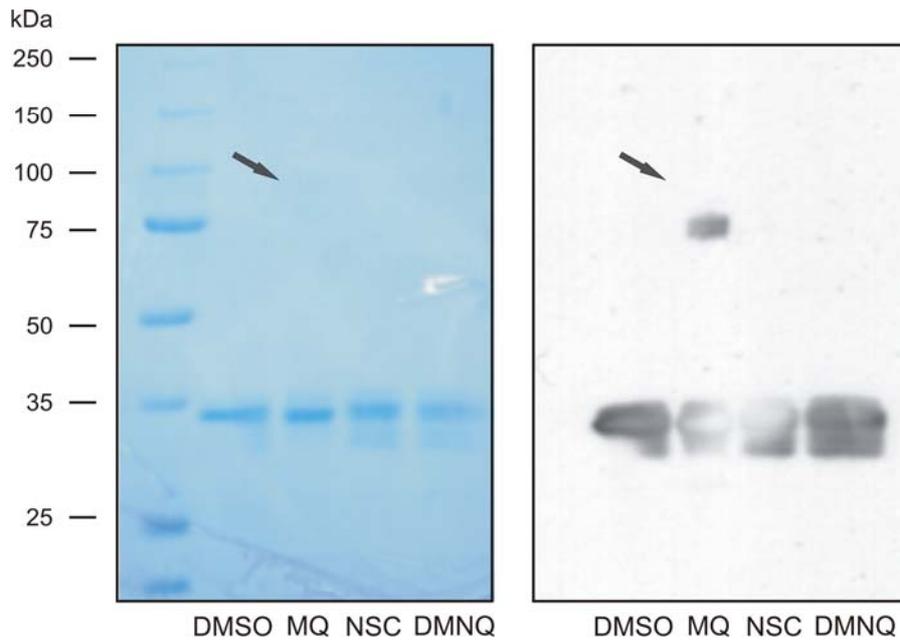


Abb. 3.12: Behandlung der isolierten PTP1B (2,5 μ M) für 10 min bei 37°C mit 50 μ M Menadion (MQ), 0,5 μ M NSC95397 (NSC) oder 50 μ M DMNQ. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2x Laemmli-puffer abgestoppt. Daraufhin wurden die Proben bei 95°C aufgekocht. Elektrophoretische Auftrennung im reduzierenden PAA-Gel (links) und anschließender Western Blot (rechts). Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

Die Reaktion von Menadion kann durch Aufkochen derart verstärkt werden, dass es zu einer drastischen Abnahme der PTP1B-Bande bei 37,4 kDa kommt. Gleichzeitig zeigt sich auf ca. 100-250 kDa eine deutliche Proteinspur, was sich vermutlich auf eine starke Oxidationsreaktion und Oligomerisierung der PTPase zurückführen lässt. Dieser Versuch bestätigt die Vermutung, dass dem Wirkungsmechanismus von Menadion auf ErbB-regulierende Phosphatasen zum größten Teil oxidative Prozesse zugrunde liegen.

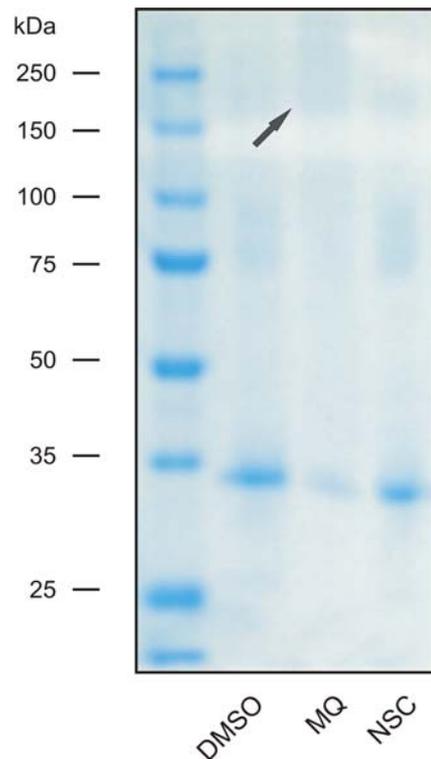


Abb. 3.13: Menadion- und NSC95397-Behandlung der isolierten PTP1B (2,5 μ M) für 10 min bei 37°C. Anschließendes Aufkochen ohne Zugabe von Laemmli-puffer führt zu einer starken Veränderung der PTPase. Auswirkungen dieser Behandlung dargestellt nach elektrophoretischer Auftrennung im reduzierenden PAA-Gel. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

Das Redox-Cycling von Menadion stellt also den Hauptmechanismus der Wirkung auf ErbB-regulierende Phosphatasen dar. Vermutlich haben dennoch auch Alkylierung des reaktiven Cysteins und Blockierung des aktiven Zentrums einen Anteil an der Wirkung auf die Phosphatasen.

3.3 Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf das EGFR/ErbB2-Signalsystem

Aufgrund der Feststellung, dass die menadioninduzierte EGFR/ErbB2-Aktivierung durch PTPase-Hemmung zumindest partiell eine Folge von Oxidationsreaktionen ist, wurde mit Singulett-Sauerstoff ein weiteres Oxidans hinsichtlich seines Einflusses auf das ErbB-System untersucht.

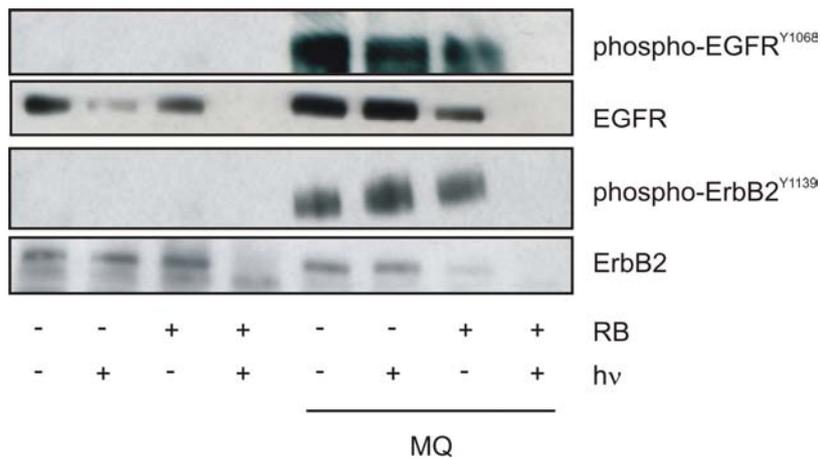
Zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff wurde Bengalrosa (RB) mit Weißlicht ($h\nu$) bestrahlt. Um zu testen, ob Singulett-Sauerstoff die Phosphorylierung von EGFR/ErbB2 und deren nachgeschaltete Signalwege beeinflusst, wurden HaCaT-Zellen für 24 h mit

serumfreiem DMEM inkubiert und für 10 min mit 0,3 μM Bengalrosa behandelt und/oder mit Weißlicht bestrahlt. Es wurde weder phosphorylierter EGFR noch phospho-ErbB2 detektiert. Somit führt Singulett-Sauerstoff-Behandlung zu keiner Aktivierung der Rezeptoren. Der zelluläre EGFR/ErbB2-Gesamtgehalt wurde jedoch im Vergleich zu den Kontrollen durch Singulett-Sauerstoff-Behandlung drastisch vermindert (siehe Abb. 3.14 A und B, je Reihe 1-4).

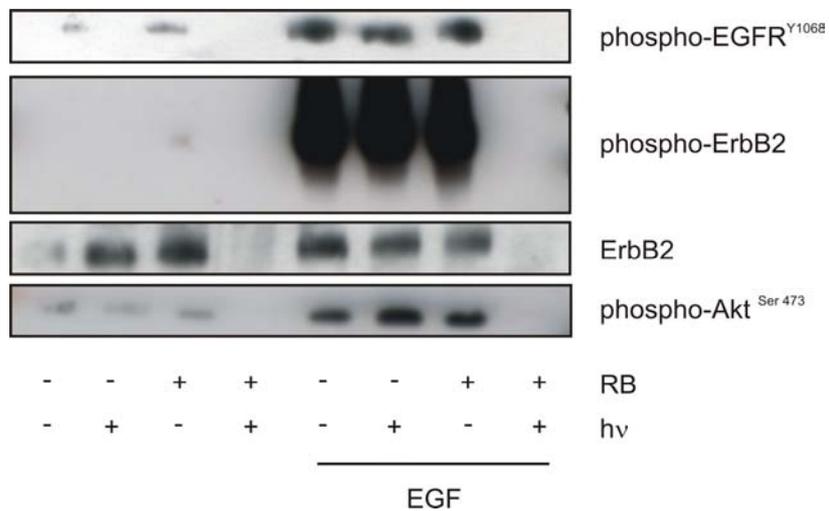
Darauf schloss sich eine 30-minütige Inkubation mit oder ohne Menadion (100 μM) bzw. EGF (100 ng/ml) in serumfreiem DMEM an. Im Falle der Kontrollen zeigten sich aufgrund der Postinkubation sowohl EGFR als auch ErbB2 phosphoryliert und aktiviert. Bei beiden wurde jedoch eine Phosphorylierung durch Singulett-Sauerstoff-Behandlung unterbunden. Die durch Menadion bzw. durch EGF hervorgerufene Tyrosinphosphorylierung von EGFR/ErbB2 wurde also durch Singulett-Sauerstoff deutlich verringert. Auch hier wurde eine sehr starke Verminderung des zellulären EGFR/ErbB2-Gesamtgehaltes durch Singulett-Sauerstoff-Behandlung detektiert (siehe Abb. 3.14 A und B, je Reihe 5-8).

Um nachzuweisen, dass eine Behandlung der Zellen mit Bengalrosa/Licht für 10 min überhaupt eine durch Singulett-Sauerstoff induzierte Aktivierung von Signalwegen in Zellen bewirken kann, wurde im Western Blot p38-Phosphorylierung nachgewiesen. Die p38-Kinase wird bekanntermaßen durch Singulett-Sauerstoff aktiviert (Klotz et al., 1997). Daher wurden HaCaT-Zellen erneut mit serumfreiem DMEM behandelt und in Anwesenheit von Bengalrosa (0,3 μM) mit Weißlicht bestrahlt. In der Tat wurde die Stresskinase p38 durch Bengalrosa-/Weißlicht aktiviert.

A



B



C

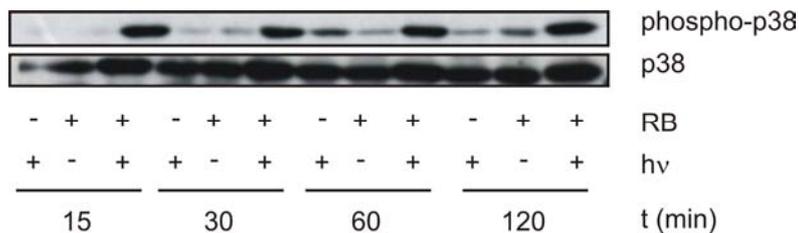


Abb. 3.14: Auswirkung von Singulett-Sauerstoff auf Menadion- **(A)** und EGF- **(B)** induzierte EGFR/ErbB2-Aktivierung in HaCaT-Zellen. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium mit 0,3 µM Bengalrosa (RB) behandelt, 10 min mit Weißlicht (hv) bestrahlt und mit Menadion (100 µM), EGF (100 ng/ml) oder Puffer postinkubiert. Nachweis der ErbB-Phosphorylierung erfolgte über Western Blots. **(C)** RB und/oder hv behandelte HaCaT-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume in serumfreiem DMEM postinkubiert. Die Analyse des Phosphorylierungsstatus von p38 erfolgte im Western Blot (n ≥ 3).

Um zu zeigen, dass der durch Singulett-Sauerstoff vermittelte Effekt der Negativregulation der EGFR/ErbB2-Phosphorylierung für weitere Zelltypen gilt, wurde der Versuch in menschlichen Hautfibroblasten wiederholt.

Auch hier fand sich dieser Effekt der Negativregulation der Rezeptoren durch Singulett-Sauerstoff. Die Bestrahlung mit Weißlicht in Anwesenheit von Bengalrosa von HFC-Zellen führte zu einer Verringerung der EGFR- und ErbB2-Phosphorylierung sowie zur Abnahme des zellulären EGFR/ErbB2-Spiegels (siehe Abb. 3.15 A).

Von weiterem Interesse war nun, ob die Negativregulation von ErbB2 durch Singulett-Sauerstoff auch Auswirkung auf die nachgeschalteten Signalwege hat. Daher wurden dieselben Zellysate der oben beschriebenen Behandlung auf Aktivierung von Akt (Proteinkinase B), Erk1/2 und Erk5 hin untersucht. Für den Erk5-Nachweis wurde sowohl ein Western Blot (Abb. 3.15 A) als auch ein Immunpräzipitations-Kinasetest (vgl. 2.4.8) aus HFC-Zellysaten mit [γ ³²P]-markiertem ATP und basischem Myelinprotein (MBP) als Substrat für Erk5 durchgeführt (Abb. 3.15 B). Im Kinasetest wurde für Erk5, ähnlich wie auf Rezeptor-Ebene, eine verringerte Aktivität festgestellt. In den Kontrollzellen fand sich eine relativ hohe Basalphosphorylierung von Erk5, die im Kinasetest nachgewiesen wurde (Abb. 3.15 A, B). Als Kontrolle für die Aktivierung einer Signalkaskade diente ein Western Blot mit denselben Lysaten auf phospho-p38 (Abb. 3.15 B). Die Verringerung der Erk5-Aktivität konnte im Western Blot nur in den Lysaten jener Zellen nachgewiesen werden, die anschließend an die Singulett-Sauerstoffbehandlung mit EGF behandelt worden waren, da der Western Blot weniger sensitiv ist als der Kinasetest (Abb. 3.15 A).

Es zeigte sich, dass Singulett-Sauerstoff-Exposition eine verminderte Aktivierung auch auf Akt- und auf Erk1/2-Ebene hervorruft. Wiederum diente ein p38-Western Blot als Nachweis für die Aktivierung einer Signalkaskade durch Singulett-Sauerstoff (Abb. 3.15 C).

Bei der Untersuchung des Singulett-Sauerstoff-Einflusses auf eine weitere Zelllinie, 1306-Hautfibroblasten, zeigte sich, dass die Bestrahlung von Bengalrosa mit Weißlicht in diesen Zellen ebenfalls zu einer Verringerung der EGFR- und ErbB2-Phosphorylierung sowie zur Abnahme des zellulären EGFR/ErbB2-Spiegels führt. Auch für Akt und Erk5 wurde eine Verminderung der Phosphorylierung mithilfe von Western Blots nachgewiesen (Abb. 3.15D).

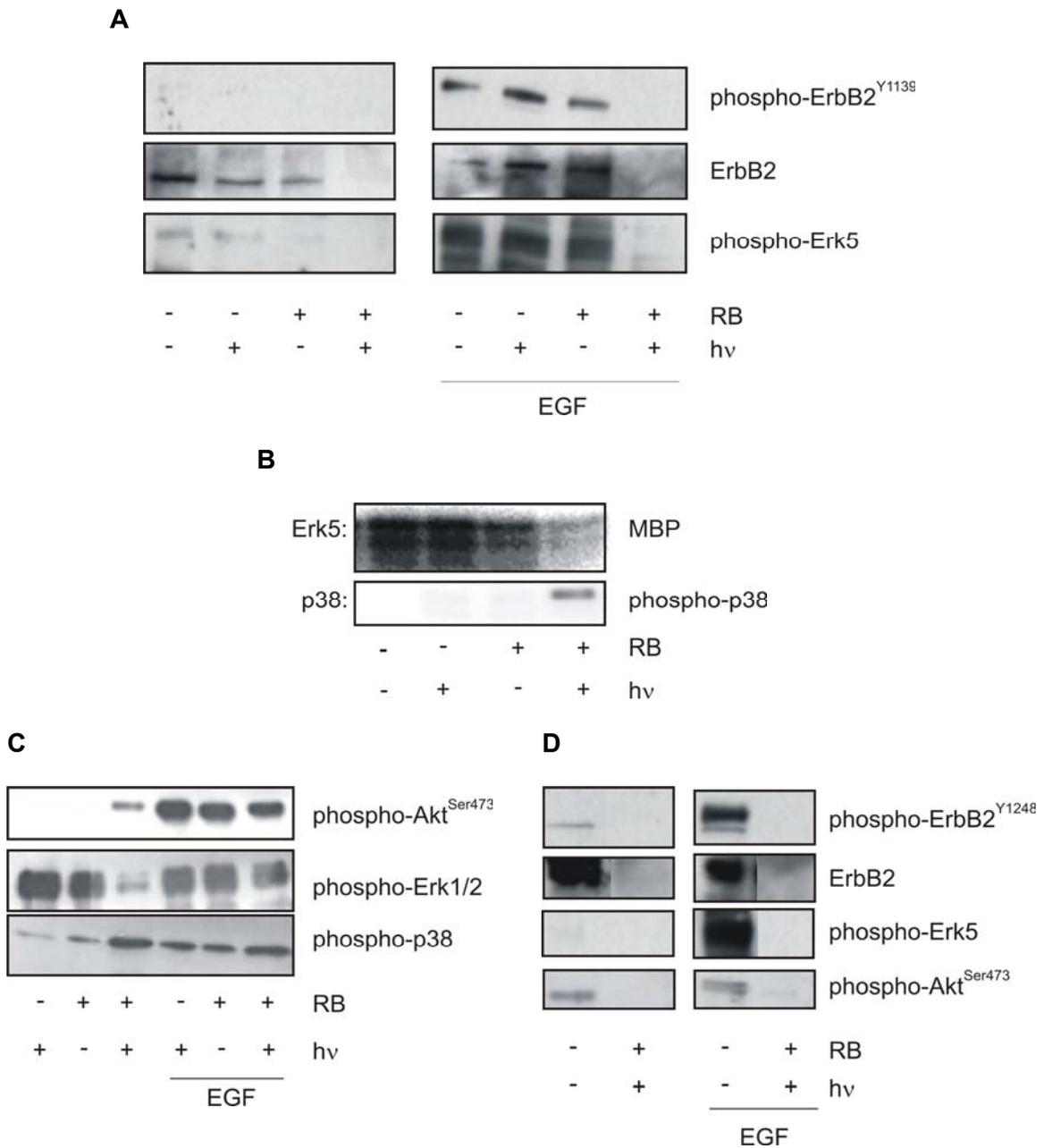


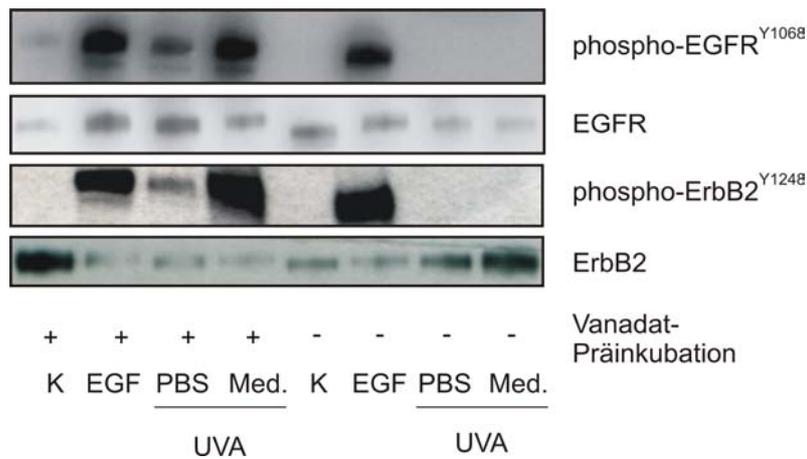
Abb. 3.15: Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf EGFR/ErbB2-abhängige Signalwege in menschlichen Hautfibroblasten (HFC und 1306). Die Zellen wurden 24 h in serumfreiem Medium inkubiert, mit 0,3 μ M Bengalrosa behandelt, 10 min mit Weißlicht bestrahlt und mit EGF (100 ng/ml) oder Puffer für 30 min postinkubiert. Der Nachweis der jeweiligen Kinasephosphorylierung bzw. -aktivität erfolgte anhand von **(A)** Western Blots auf ErbB2 und Erk5 (HFC-Zellen) und **(B)** Immunopräzipitations-Kinasetest (2.4.8) mit [γ ³²P]-markiertem ATP und basischem Myelinprotein (MBP) als Substrat für Erk5 (HFC-Zellen). Zur Kontrolle für die Aktivierung eines Signalwegs wurde ein Western Blot mit denselben Lysaten auf Phosphorylierung von p38 durchgeführt. **(C)** Western Blot auf Akt, Erk1/2 und p38 mit HFC-Zellysaten. **(D)** Nachweis der jeweiligen Kinasephosphorylierung in 1306-Zellysaten anhand von Western Blots auf ErbB2, Erk5 und Akt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

3.4 UVA-induzierte EGFR/ErbB2-Signaleffekte

Zahlreiche biologische Effekte der UVA-Strahlung werden durch Singulett-Sauerstoff vermittelt. Dies warf die Frage auf, ob eine UVA-Exposition von Zellen ähnliche Folgen für das ErbB-System hat wie eine Behandlung der Zellen mit Singulett-Sauerstoff.

Ebenso wie Singulett-Sauerstoff führt UVA-Bestrahlung im Zellsystem nicht zu der Inhibition einer EGFR-regulierenden Phosphatase und hat somit keine Aktivierung des Rezeptors zur Folge. Vielmehr ist der bisher postulierte Effekt (Knebel et al., 1996), dass UVA-Bestrahlung von Zellen EGFR-Phosphorylierung induziert, auf Wasserstoffperoxid, welches bei der UVA-Bestrahlung von Zellen im Medium entsteht, zurückzuführen (Mahns et al., 2003). Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für ErbB2 bestätigt: HaCaT- oder SCL-1-Zellen wurden für 24 h in serumfreiem DMEM inkubiert und dann mit UVA-Licht (30 J/cm^2) sowohl in PBS als auch in farblosem, serumfreiem DMEM bestrahlt. Im Western Blot in Abb. 3.16 ist erkennbar, dass weder Bestrahlung in PBS noch in DMEM in einer ErbB2-Aktivierung resultiert, wohingegen nach einer Vorbehandlung mit Na-Vanadat eine UVA-induzierte ErbB2-Phosphorylierung nachweisbar ist, wenn Medium als Bestrahlungspuffer verwendet wurde. Diese Aktivierung wird jedoch nicht durch Singulett-Sauerstoff sondern von während der Bestrahlung in Medium entstandenem Wasserstoffperoxid vermittelt (von Montfort, 2004).

A



B

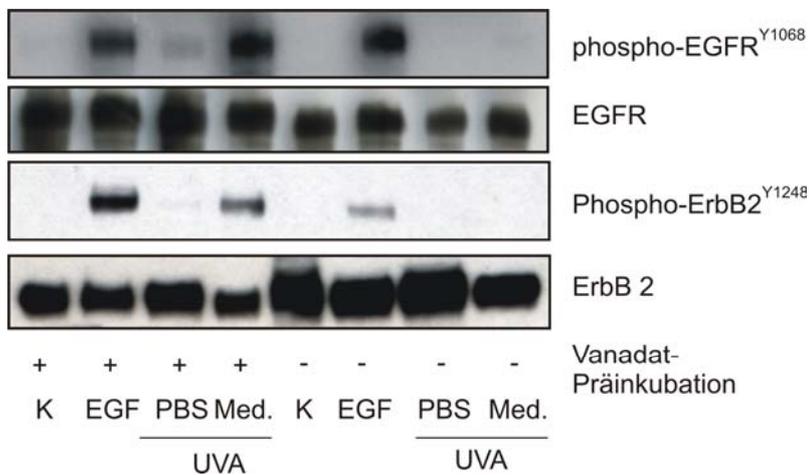


Abb. 3.16: Aktivierung von EGFR und ErbB2 durch UVA-Bestrahlung in HaCaT- (A) und SCL-1- (B) Zellen. Die Zellen wurden über Nacht in serumfreiem DMEM behandelt und sofern in der Abb. angegeben für 1 h mit 1 mM Na₃VO₄ präinkubiert. Sie wurden daraufhin mit 30 J/cm² UVA bestrahlt; als Bestrahlungspuffer diente dabei entweder PBS oder farbloses, serumfreies Medium. K= Negativkontrolle ohne Behandlung, EGF=Positivkontrolle mit Stimulation der Zellen durch EGF (100 ng/ml für 5 min). Nachweis der EGFR- und ErbB2-Phosphorylierung erfolgte im anschließenden Western Blot. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

Zur Kontrolle der Aktivierung einer Signalkaskade durch UVA wurden HaCaT-Zellen mit serumfreiem DMEM für 24 h inkubiert und mit 30 J/cm² UVA-Licht bestrahlt. Nach Postinkubationszeiten in serumfreiem DMEM von 15, 30, 60, und 120 min wurde im Western Blot auf p38-Phosphorylierung untersucht (Abb. 3.17). Die Stresskinase p38 wurde, wie aufgrund einer Studie von Klotz et al. (1999) erwartet, durch die UVA-

Bestrahlung aktiviert.

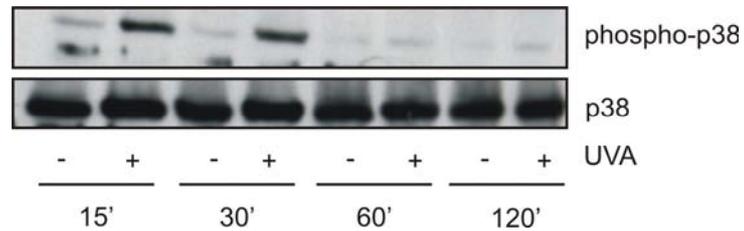


Abb. 3.17: Aktivierung von p38 durch UVA-Bestrahlung. Für 24 h in serumfreiem DMEM inkubierte HaCaT-Zellen wurden in PBS mit 30 J/cm^2 UVA-Licht bestrahlt und für 15, 30, 60 und 120 min in DMEM postinkubiert. Der Phosphorylierungszustand von p38 wurde im Western Blot untersucht. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

Interessanterweise konnte nach UVA-Exposition (30 J/cm^2) in PBS, anders als auf EGFR-Ebene, mithilfe eines Kinasetests eine verminderte Aktivität von Erk5 in HFC-Fibroblasten festgestellt werden. Für den Erk5-Nachweis wurde ein Immunpräzipitations-Kinasetest (vgl. 2.4.8) mit $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markiertem ATP und basischem Myelinprotein (MBP) als Substrat für Erk5 durchgeführt. In den Kontrollen, also unbestrahlten Zellen, fand sich eine relativ hohe Basalphosphorylierung von Erk5, die im Kinasetest nachgewiesen wurde. Als Kontrolle für die Aktivierung einer Signalkaskade durch UVA diente ein Western Blot mit denselben Lysaten auf p38 (Abb. 3.18).

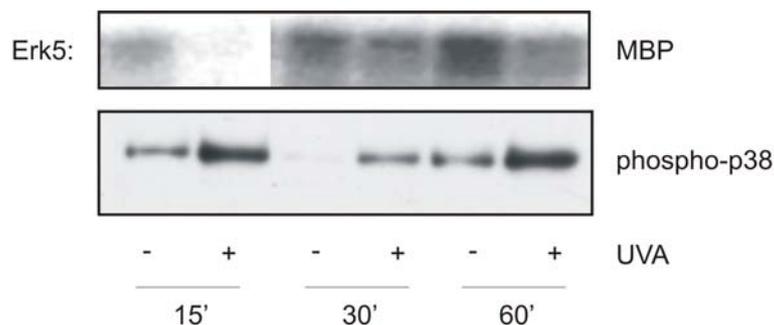


Abb. 3.18: Untersuchung des EGFR/ErbB2-nachgeschalteten Erk5-Signalwegs in HFC-Zellen. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium mit 30 J/cm^2 UVA bestrahlt; als Bestrahlungspuffer diente PBS. Der Nachweis der Erk5-Aktivität erfolgte über einen Immunpräzipitations-Kinasetest (2.4.8) mit $[\gamma^{32}\text{P}]$ -markiertem ATP und basischem Myelinprotein (MBP) als Substrat für Erk5. Zur Kontrolle wurde ein Western Blot mit denselben Lysaten auf p38 durchgeführt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für ≥ 3 voneinander unabhängige Experimente.

4 DISKUSSION

4.1 Aktivierung von EGFR und ErbB2 durch Menadion

In einer Vielzahl von Zellen (Earp et al., 1995) ist ErbB2 Dimerisierungspartner von EGFR. Dies konnte mithilfe von Immunpräzipitationen auch für HaCaT-Zellen bestätigt werden (Abb. 3.1).

In verschiedenen Zelltypen wird der EGFR unter Einwirkung von Menadion aktiviert (Abdelmohsen et al., 2003).

Sowohl in HaCaT- als auch in NHEK- sowie in SCL-1-Zellen konnten in der vorliegenden Arbeit menadioninduzierte ErbB2-Phosphorylierungen nachgewiesen werden (Abb. 3.2 A). Auch der nachgeschaltete Erk1/2-Signalweg wurde in allen Fällen aktiviert (Abb. 3.2 B).

Eine Inkubation der Zellen mit den EGFR-spezifischen Inhibitoren AG1478 und c56 ergab, dass diese interessanterweise nicht nur die menadioninduzierte Phosphorylierung des EGFR, sondern auch die von ErbB2 inhibieren. Gleiches gilt für die EGF-induzierte Aktivierung von EGFR und ErbB2. Eine Behandlung der Zellen mit den ErbB2-spezifischen Inhibitoren AG825 und AG879 wiederum zeigte weder einen inhibitorischen Einfluss auf die EGFR-Phosphorylierung, noch auf die ErbB2-Phosphorylierung, auf beiden Ebenen wurde die Phosphorylierung eher verstärkt. Beiden Beobachtungen liegt vermutlich dieselbe Erklärung zugrunde. Der EGFR ist im inaktiven Zustand derart gefaltet, dass die extrazellulären, cysteinreichen Domänen, die für die Dimerisierung notwendig sind, nicht zugänglich für weitere ErbB-Monomere sind. Im Falle einer Ligandenbindung „öffnet“ sich der Rezeptor, was eine Dimerisierung ermöglicht. Für ErbB2 gilt dies nicht. ErbB2 besitzt keinen direkten Liganden und ist permanent entfaltet. Er gilt daher als konstitutiv aktiv (Roskoski, 2004). ErbB2 wird ausschließlich über den Dimerisierungspartner, wie etwa EGFR phosphoryliert. Das bedeutet, dass ErbB2 im Falle einer EGFR-Inhibition, wie durch EGFR-spezifische Inhibitoren, nicht phosphoryliert werden kann, da keine Trans-Autophosphorylierung stattfindet.

Vermutlich führen also eine EGFR-Phosphorylierung und die daraus resultierende Trans-Phosphorylierung von ErbB2 zu einem Ausgleich der ErbB2-Inhibition durch den Inhibitor. Interessanterweise konnte im selben Versuchsansatz keine Änderung der Erk1/2-Phosphorylierung detektiert werden. Das bedeutet, dass die Inhibitoren, obwohl sie die Phosphorylierung auf ErbB-Ebene verstärken, keinen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierung des EGFR/ErbB2 nachgeschalteten Erk1/2-Signalwegs haben. Das wiederum

spricht für die Funktionalität der Inhibitoren sowie für einen Ausgleich der ErbB2-Phosphorylierung durch den EGFR.

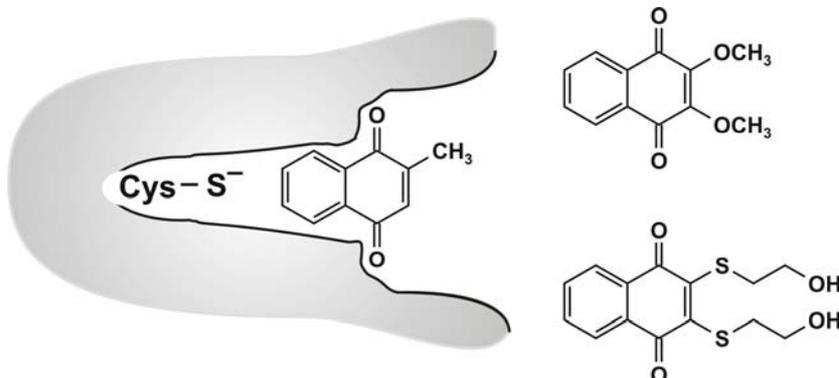
4.2 Mechanismus der Aktivierung von Signalwegen durch Menadion

Im Rahmen der Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivierung des ErbB2-Systems durch Menadion - ähnlich wie von Herrlich et al. (2000) für die Aktivierung des EGFR durch Oxidantien berichtet - ligandenunabhängig über die Hemmung von Phosphatasen erfolgt (vgl. Kapitel 3.2).

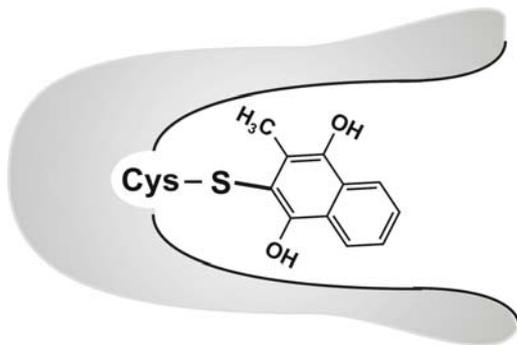
Sodann wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Regulation von ErbB2 unabhängig von EGFR und nicht zwangsläufig durch dieselben Phosphatasen reguliert wird (Abb. 3.5). Es existieren daher menadionsensitive Tyrosinphosphatasen, die ErbB2 regulieren.

Für Menadion sind als direkte Wirkmechanismen die Alkylierung oder Redox-Cycling bzw. eine Kombination beider Mechanismen beschrieben (Klotz et al., 2002). Alle bislang bekannten PTPasen weisen in ihrem aktiven Zentrum einen Cysteinrest auf, der sowohl oxidiert als auch alkyliert werden kann, und somit sowohl durch Redox-Cycling als auch Alkylierung zellulärer Nucleophile geschädigt werden kann (Wang et al., 2000). Neben Alkylierung und Redox-Cycling besteht noch die Möglichkeit, dass Menadion durch Einlagerung in das aktive Zentrum der PTPase eine Hemmung hervorruft. In Abb. 4.1 sind diese drei Wirkungsmechanismen schematisch dargestellt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welcher dieser Mechanismen in der Wirkung von Menadion auf ErbB2-regulierende Phosphatasen zutreffen kann.

A



B



C

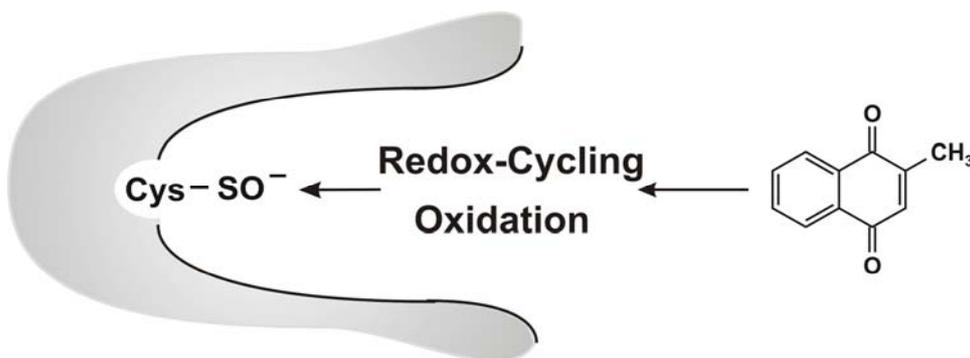


Abb. 4.1: Drei mögliche Wirkmechanismen der Menadionbehandlung einer PTPase. **(A)** Einlagerung des Menadions (oder auch DMNQ sowie NSC95397) ins aktive Zentrum führt zur Hemmung der PTPase. **(B)** Alkylierung des reaktiven Cysteins im aktiven Zentrum resultiert in einer inaktiven Form des Enzyms, da Cys²¹⁵ nicht mehr als intermediärer Phosphatakzeptor fungieren kann. **(C)** Redox-Cycling von Menadion und Oxidation des reaktiven Cysteins im aktiven Zentrum führt zu Sulfen-, Sulfin- oder Sulfonsäure, wodurch es zur Hemmung der PTPase kommt, da Cys²¹⁵ auch hier nicht mehr als intermediärer Phosphatakzeptor fungieren kann.

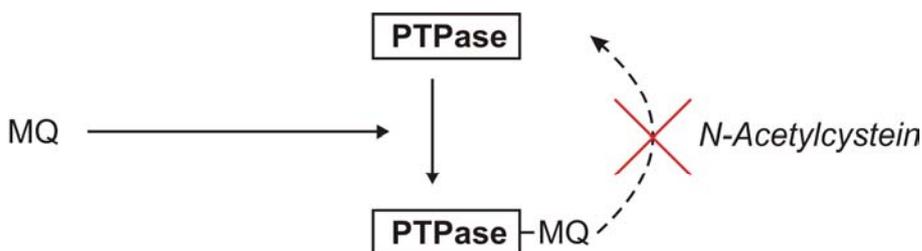
Postinkubation mit NAc zeigte, dass menadioninduzierte Aktivierung von EGFR sowie ErbB2 zwar zurückgeht, jedoch nicht gänzlich verschwindet (Abb. 3.6). Da ausschließlich oxidative Effekte durch NAc rückgängig gemacht werden können und eine Alkylierung durch Menadion irreversibel ist (vgl. Abb. 4.2), lassen die Beobachtungen darauf schließen, dass - beispielsweise durch Redox-Cycling entstandene - ROS zumindest teilweise an der Phosphataseinhibition beteiligt sein müssen.

Aufgrund der Vermutung, dass Redox-Cycling zumindest teilweise am Mechanismus der Phosphataseinhibition beteiligt ist, wurden Zellen zusätzlich zu NAc mit dem NQOR-Inhibitor Dicoumarol, welches das Redox-Cycling von Chinonen hemmen kann, behandelt. Während eine alleinige Inkubation mit Dicoumarol nur einen minimalen Einfluss auf die ErbB2-Aktivität hat, verstärkt es den Effekt von NAc (Abb. 3.7). Wie in

Abb. 4.2 schematisch dargestellt, greift Dicoumarol an anderer Stelle als NAc in den menadionvermittelten Reaktionsmechanismus der PTPase-Inaktivierung ein, es hemmt die NAD(P)H: Chinon-Oxidoreduktase (NQOR), die die 2-Elektronen-Reduktion katalysiert, aus der ROS resultieren können (Miller et al., 1986). Dadurch ist die verstärkte Reversibilität zu erklären.

Menadion führt auch zur Aktivierung von Erk1/2. Interessanterweise konnte diese Aktivierung jedoch weder durch Behandlung mit N-Acetylcystein oder Dicoumarol noch durch eine Coinkubation beider inhibiert werden, obwohl ein Effekt auf EGFR/ErbB2-Ebene erkennbar ist (Abb. 3.7). Der oxidative Effekt von Menadion beschränkt sich also auf ErbB-regulierende Phosphatasen, nachgeschaltete Signalwege, hier Erk1/2, bleiben somit unbeeinflusst von einer Unterbindung des Redox-Cyclings. Dies lässt auf weitere durch Menadion hervorgerufene Effekte auf die Signaltransduktion schließen, die trotz EGFR/ErbB2-Inhibition zu einer Stimulation von Erk1/2 führen.

A



B

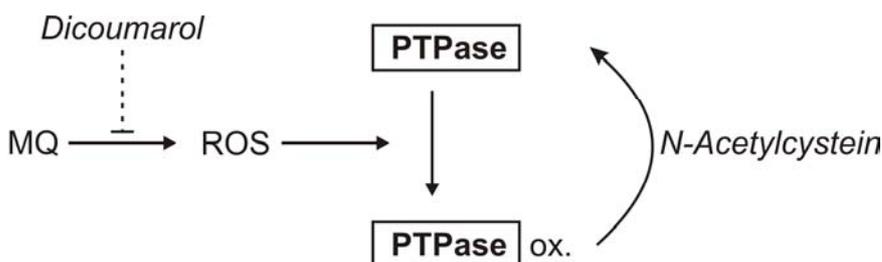


Abb. 4.2: Mögliche Wege der Beeinflussung der menadioninduzierten PTPase-Inaktivierung. **(A)** Menadionvermittelte, irreversible Hemmung der PTPase durch Alkylierung **(B)** reversible Oxidation der PTPase.

Glutathion ist im Zellsystem sowohl in Alkylierungsreaktionen, als auch in das Redox-Cycling von Chinonen eingebunden. Menadion interagiert mit Glutathion (Abdelmohsen et al., 2003) in einer Michael-Addition. Dadurch werden zum Beispiel Phosphatasen und auch andere Signalproteine nicht mehr vor Oxidation durch weitere Oxidantien geschützt.

Nach einer Behandlung mit Menadion wurde eine signifikante Akkumulation von Glutathiondisulfid detektiert. Dies lässt auf einen indirekten Mechanismus schließen, der auf Erschöpfung der zellulären Glutathion-Vorräte beruht. Das Redox-Cycling von Menadion führt über Superoxid zur Bildung von Wasserstoffperoxid, welches durch die Glutathionperoxidase und 2 GSH, die wiederum zu GSSG oxidiert werden, reduziert wird. GSSG kann jedoch nicht wieder reduziert werden, da die dafür notwendige Glutathionreduktase von Menadion inhibiert wird.

Eine Coinkubation der Zellen mit Menadion und Dicoumarol führt wiederum zu einer leichten Depletion des Glutathionspiegels, wohingegen der Glutathiondisulfidspiegel im Vergleich zu einer alleinigen Menadionbehandlung nur leicht steigt (Abb. 3.8). Der NQOR-Inhibitor Dicoumarol hemmt die 2-Elektronen-Reduktion von Chinonen zu Hydrochinonen und ist somit in der Lage, NQOR-abhängiges Redox-Cycling zu einem großen Teil zu unterbinden.

Durch eine Studie von (Takakura et al., 1999) ist bekannt, dass sich isolierte PTP1B durch reaktive Stickstoffspezies wie Peroxynitrit inhibieren lassen. Auch Menadion ist dazu in der Lage. Die Behandlung isolierter PTP1B (2,5 μM) mit Menadion hat gezeigt, dass 50 μM des Chinons die Phosphataseaktivität auf 20 % des Kontrollwertes verringern. Da bei dieser Reaktion Luftsauerstoff vorhanden ist, ist es möglich, dass während des Redox-Cyclings über die Bildung von Superoxid Wasserstoffperoxid entsteht. Um nun auszuschließen, dass dieser Effekt auf einer Entstehung von Wasserstoffperoxid beruht, wurde in einem weiteren Test Katalase hinzugegeben. Katalase katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff. Da jedoch nach einer Behandlung mit Katalase kein signifikanter Unterschied der PTPase-Inhibition detektierbar war, konnte Wasserstoffperoxid als Mediator ausgeschlossen werden. Im zellulären System konnte gezeigt werden, dass N-Acetylcystein die menadioninduzierte ErbB-Aktivierung teilweise rückgängig macht. Im zellfreien PTPase-Test konnte dies ebenfalls bestätigt werden. Diese Ergebnisse (vgl. Abb. 3.9) sprechen dafür, dass Redox-Cycling zwar nicht komplett, jedoch zum Teil für die inhibitorische Wirkung von Menadion verantwortlich sein muss. Denn wie in Abb. 4.2 dargestellt, ist eine Alkylierung nicht reversibel.

(Carr et al., 2002) zeigten, dass neben Menadion auch weitere Naphthochinonderivate PTPasen hemmen. Im Vergleich zu Menadion, das mit 50 μM die Phosphataseaktivität auf 20 % verringert, ist NSC95397 bereits in weitaus geringerer Konzentration in der Lage die PTP1B zu hemmen. 0,5 μM reichen aus, um die Phosphataseaktivität auf 40 % zu verringern. Auch mit dem Chinon DMNQ ließ sich eine Inhibition des Enzyms hervorrufen, wenn auch, mit etwa 60 % verbleibender PTPaseaktivität, in einem weit geringeren Ausmaß (siehe Abb. 3.10). Der Mechanismus der Phosphataseinhibition durch

NSC95397 beruht ausschließlich auf der Einlagerung in das aktive Zentrum. Bei DMNQ handelt es sich um einen reinen Redox-Cycler, während Menadion auch alkylieren kann. Da DMNQ die Phosphatase weit weniger hemmt, wurde erneut vermutet, dass nicht ausschließlich das Redox-Cycling von Menadion, sondern auch Blockierung des reaktiven Zentrums oder Alkylierung des reaktiven Cysteins am Mechanismus der Phosphataseinhibition beteiligt sein kann. Blockierung des aktiven Zentrums kann wiederum ebenfalls nicht der Hauptmechanismus sein. Da ausschließlich oxidative Effekte durch NAc rückgängig gemacht werden können (vgl. Abb. 4.2) und im zellulären Umfeld nachgewiesen werden konnte, dass NAc die durch Menadion hervorgerufenen Effekte rückgängig macht (Abb. 3.6), lässt sich Blockierung des aktiven Zentrums als Hauptmechanismus der PTPaseinhibition ausschließen. Menadion (IC_{50} : 20 μ M) erreicht jedoch, bei gleicher Konzentration, bei weitem nicht den Grad an PTPase-Inhibition, den NSC95397 (IC_{50} : 1 μ M) erreicht, wie sich anhand der IC_{50} -Werte ablesen lässt (Abb. 3.11).

In einem weiteren Versuch wurde erneut isolierte PTP1B mit Menadion, NSC95397 und DMNQ inkubiert, um im anschließenden SDS-PAGE mögliche Veränderungen oder Dimerisierungen und dadurch erklärbare Inhibition der Phosphatase-Aktivität feststellen zu können. Nach einer Färbung des Gels konnte eine sehr schwache Bande auf ca. doppelter Höhe der PTPase im Fall der Menadion-Behandlung festgestellt werden. Im darauffolgenden Western Blot lässt sich auf dieser Höhe von ca. 85 kDa eine etwas stärkere Bande detektieren, bei der es sich vermutlich um dimerisierte PTP1B handelt (Abb. 3.12). Es konnte also nachgewiesen werden, dass ein geringer Teil der Phosphatase durch Dimerisierung an Funktion verliert, aber dennoch bleibt die fast vollständige Inhibition der PTPase nach Inkubation mit Menadion ungeklärt. Weder NSC95397 noch DMNQ führen zu einer, im Gel sichtbaren, Veränderung der PTP1B. Aufgrund des Mechanismus von NSC95397 wurde keine Veränderung erwartet. DMNQ ist ein reiner Redox-Cycler; offensichtlich verändert DMNQ jedoch die PTPase auf eine Art, die im Gel nicht detektierbar ist. Es könnten Dimerisierungen über Disulfid-Brücken als Resultat oxidativer Reaktionen am reaktiven Cystein der PTPase zustande gekommen sein. Diese werden jedoch in einem reduzierenden Gel weder gelöst und sind somit nicht detektierbar. Bei der durch Menadion hervorgerufenen Dimerisierung muss es sich um eine andere, irreversible Form handeln, beispielsweise eine Dimerisierung zweier Tyrosine. Diese kann durch Entstehung von Tyrosylradikalen zustande kommen (Schroeder et al., 2001; Schroeder et al., 2001).

Interessanterweise zeigt derselbe Versuch jedoch mit anschließendem Aufkochen des Versuchsansatzes eine Verstärkung der Reaktion von Menadion. Es kommt zu einer starken Abnahme der PTP1B-Bande im Gel nach Menadion-Behandlung (Abb. 3.13).

Offensichtlich findet durch die Zufuhr von Hitze eine starke Oxidationsreaktion mit anschließender Oligomerisierung statt.

Beide Versuche bestätigen die Vermutung, dass es sich beim Wirkungsmechanismus bezüglich der PTPase-Inhibition von Menadion um Oxidationsreaktionen handelt.

Redox-Cycling hat also einen starken Einfluss auf die menadionvermittelte Phosphataseinhibition und stellt vermutlich auch den Hauptmechanismus dar. Dennoch sind sowohl Alkylierung, als auch Einlagerung des Chinons in das aktive Zentrum an der Phosphataseinhibition beteiligt.

4.3 Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf das EGFR/ErbB2-Signalsystem

Aufgrund der Feststellung, dass die menadioninduzierte EGFR/ErbB2-Aktivierung durch PTPase-Inhibition eine Folge von Oxidationsreaktionen ist, wurde als weiteres Oxidans Singulett-Sauerstoff hinsichtlich seines Einflusses auf das ErbB-System und abhängige Signalkaskaden untersucht. Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Zellen mit Bengalrosa und Weißlicht behandelt und anschließend mit Menadion oder EGF inkubiert. Bengalrosa ist ein lipophiler und damit membrangängiger Photosensibilisator, der unter Bestrahlung mit Weißlicht Singulett-Sauerstoff bildet. Es ist bereits bekannt, dass Präinkubation mit $^1\text{O}_2$ in HeLa-Zellen anstatt zu einer gesteigerten zu einer verringerten Aktivierung des EGFR durch EGF führt (von Montfort, 2004). Ähnliche Beobachtungen gab es in Keratinozyten, bei denen nach Behandlung mit Singulett-Sauerstoff sowohl die Phosphorylierung des Rezeptors als auch der Gesamtproteinanteil selber abnimmt (Zhuang et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnte, ebenfalls in Keratinozyten, eine verringerte Aktivierung des EGFR sowie von ErbB2 sowohl durch EGF als interessanterweise auch durch Menadion beobachtet werden (Abb. 3.14). Aber auch in weiteren Zelllinien konnte ebenfalls eine Verminderung an EGFR- sowie ErbB2-Gesamtprotein nach Singulett-Sauerstoff-Exposition nachgewiesen werden. Behandlung von Fibroblasten (1306 und HFC) mit Singulett-Sauerstoff (generiert durch Bengalrosa und Licht) führte zu denselben Resultaten (Abb. 3.15). Erkennbar waren auch hier sowohl verringerte Aktivität der ErbB2-Kinase als auch Verminderung des ErbB2-Gesamtgehaltes der Zelle.

Diese Abnahme an EGFR- bzw. ErbB2-Gesamtprotein geht vermutlich nicht auf Internalisation oder den normalen Proteolyseweg zurück, sondern auf eine durch Singulett-Sauerstoff erhöhte Caspase3-Aktivität, da sich das Verschwinden des Rezeptors mit einem Caspase3-Inhibitor verhindern lässt (Zhuang et al., 2003). Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft.

Der Einfluss von Singulett-Sauerstoff auf das EGFR/ErbB2-System überträgt sich auch auf die nachgeschalteten Signalwege. Singulett-Sauerstoff-Behandlung führt sowohl auf Akt-,

Erk1/2- als auch auf Erk5-Ebene zu einer verringerten Aktivierung. Dieser Aktivitätsverlust geht vermutlich auf eine verminderte Phosphorylierung zurück, da im Gegensatz zu EGFR und ErbB2 keine Verringerung des zellulären Erk1/2-, Erk5-Spiegels nachgewiesen werden konnte.

4.4 UVA-induzierte EGFR/ErbB2-Signaleffekte

UVA-Signaltransduktionseffekte werden häufig durch Singulett-Sauerstoff vermittelt. UVA-Bestrahlung führt ebenso wie Singulett-Sauerstoff im Zellsystem nicht zur Inhibition einer EGFR-regulierenden Phosphatase und somit zur Aktivierung des Rezeptors. Vielmehr ist der bisher postulierte Effekt (Knebel et al., 1996), dass UVA-Bestrahlung von Zellen eine EGFR-Phosphorylierung induziert auf Wasserstoffperoxid, welches bei der UVA-Bestrahlung von Zellen im Medium entsteht, zurückzuführen (Mahns et al., 2003). In HeLa-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Wasserstoffperoxid die UVA-induzierte EGFR-Aktivierung vermittelt (von Montfort, 2004).

HaCat- und SCL-1-Zellen wurden, sowohl in PBS als auch in serumfreiem, farblosem DMEM als Bestrahlungspuffer, mit 30 J/cm^2 UVA-Licht bestrahlt. In Analogie zu Versuchen, die durch von Montfort (2004) durchgeführt wurden und auf die oben genannte Studie von Knebel (1996) zurückgehen, führte weder die Bestrahlung in PBS noch in DMEM zu einer Aktivierung des Rezeptors. Jedoch konnte in Zellen, die vor der Bestrahlung eine Stunde mit dem Tyrosinphosphataseinhibitor Natriumvanadat vorbehandelt worden waren, eine EGFR/ErbB2-Phosphorylierung detektiert werden. Dies gilt allerdings ausschließlich für DMEM als Bestrahlungspuffer; Bestrahlung in PBS führte auch hier nicht zur Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase (Abb. 3.16). Diese Resultate lassen sich durch eine Studie von Mahns et al. (2003), die besagt, dass bei Bestrahlung von DMEM hohe Konzentrationen an H_2O_2 ($> 100 \mu\text{M}$) im Medium entstehen, erklären. Die Aktivierung der EGFR- und ErbB2-Rezeptoren geht also nicht auf UVA-Bestrahlung zurück, sondern wird vermutlich durch Wasserstoffperoxid, das bei der Bestrahlung generiert wird, induziert. Bestätigt wird das durch eine weitere Studie von von Montfort (2004), in der berichtet wird, dass unter den Bedingungen einer Natriumvanadat-Vorbehandlung, deutlich geringere Mengen an Wasserstoffperoxid ausreichen, den EGFR zu stimulieren als ohne eine solche Vorbehandlung.

Interessanterweise konnte bei der Untersuchung der nachgeschalteten Signalwege auf Erk5-Ebene, unter Zuhilfenahme eines Kinasetests, eine verringerte Kinaseaktivität festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen auf Rezeptor-Ebene. Der Kontroll-Western-Blot auf p38 zeigte die erwartete p38-Phosphorylierung (Abb. 3.18).

Die Ursache der verminderten Erk5-Aktivität ist nicht geklärt. Klotz et al. (1997 und 1999) konnten nachweisen, dass die stimulierenden Effekte von UVA auf p38 und JNK durch Singulett-Sauerstoff vermittelt werden. In Analogie hierzu kann vermutet werden, dass ähnlich wie bei der Behandlung von Zellen mit Bengalrosa und Licht die verminderte Aktivität von Erk5 durch Singulett-Sauerstoff hervorgerufen wird.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der Wirkungsmechanismus von Menadion auf ErbB-regulierende Phosphatasen hauptsächlich auf Bildung von ROS beruht und zur zellulären Stressreaktion im Sinne der Aktivierung von Signalwegen beitragen kann. Außerdem wurde gezeigt, dass Rezeptoren der ErbB-Familie nicht nur als Angriffspunkt für Naphthochinonderivate, sondern auch für reaktive Sauerstoffspezies, wie Singulett-Sauerstoff und UVA, dienen. Sie eignen sich somit als Zielstrukturen für pharmakologische Modulation stressinduzierter und pathophysiologisch relevanter Signalwege.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zellen reagieren auf extrazelluläre Stimuli, wie zum Beispiel auf Wachstumsfaktoren, mit Aktivierung von Signalkaskaden, die das zelluläre Überleben und die Proliferation regulieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion von Zellen im Sinne der Aktivierung von Signalkaskaden auf exogene Noxen in Form von Modellstimuli wie 1,4-Naphthochinonen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) untersucht. Von besonderem Interesse waren Rezeptoren der ErbB-Familie und ihnen angeschlossener Signalwege, die im Rahmen der Entstehung zahlreicher Krebsarten eine wichtige Rolle spielen.

Belastung von menschlichen Keratinozyten mit 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion, Vitamin K₃) führte sowohl zur Aktivierung des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR, ErbB1) und der verwandten Rezeptortyrosinkinase ErbB2 als auch zur Aktivierung der nachgeschalteten Kinasen Erk1/2, Erk5 und Akt.

EGFR-spezifische Inhibitoren, wie die Tyrphostine AG1478 und „Compound56“, blockierten nicht nur die menadioninduzierte Aktivierung von EGFR sondern auch von ErbB2. Entsprechend wurde selbst unter Einwirkung ErbB2-spezifischer Inhibitoren eine ErbB2-Phosphorylierung durch Menadion induziert.

Als Mechanismus der Aktivierung von EGFR und ErbB2 durch Menadion wird in der vorliegenden Arbeit die Hemmung von rezeptorregulierenden Proteintyrosinphosphatasen (PTPasen) postuliert. Im Zellsystem konnte in Dephosphorylierungsstudien eine Hemmung sowohl EGFR als auch ErbB2 regulierender PTPasen durch Menadion nachgewiesen werden.

Die durch Menadion induzierte Aktivierung von ErbB2 konnte mit Hilfe von N-Acetylcystein (NAc) teilweise rückgängig gemacht werden. Dieser Effekt wurde durch Dicoumarol, welches das Redox-Cycling von Chinonen einschränken kann, verstärkt. Hinsichtlich des Mechanismus der Phosphatasehemmung durch Menadion sprechen diese Befunde für eine reversible PTPase-Oxidation und gegen eine irreversible PTPase-Hemmung im Sinne einer Alkylierung durch Menadion. Ähnliches fand sich im zellfreien System: PTP1B, eine PTPase, die bekanntermaßen die Tyrosinphosphorylierung des EGFR reguliert, wurde durch Menadion direkt gehemmt, wobei der im Rahmen der Arbeit ermittelte IC₅₀-Wert bei 20 µM lag. N-Acetylcystein konnte auch hier die Inhibition teilweise rückgängig machen. Ein bekannter nichtalkylierender PTPase-Inhibitor, 2,3-bis[(2-Hydroxyethyl)thio]-1,4-naphthochinon (NSC95397) hemmte zudem PTP1B mit einem IC₅₀-Wert von 0,3 µM.

Aufgrund der Tatsache, dass die Menadion-induzierte EGFR/ErbB2-Aktivierung durch PTPase-Hemmung eine Folge von Oxidationsreaktionen zu sein scheint, wurden im

letzten Teil der Arbeit weitere Oxidantien hinsichtlich ihres Einflusses auf das ErbB-System untersucht.

Im Gegensatz zu Menadion induziert Singulett-Sauerstoff keine Phosphorylierung des EGFR/ErbB2-Systems. Darüber hinaus wurde selbst die durch Menadion induzierte Aktivierung der Rezeptoren unterbunden, was unter anderem auf den Abbau von EGFR und ErbB2 zurückzuführen ist, der durch Singulett-Sauerstoff induziert wurde und sich auch auf nachgeschaltete Signalkaskaden auswirkte, deren EGFR/ErbB2-abhängige Aktivierung durch Singulett-Sauerstoff unterbunden wurde.

Singulett-Sauerstoff vermittelt zahlreiche biologische Effekte der UVA-Strahlung. Entsprechend fand sich eine Aktivierung des EGFR/ErbB2 Systems unter UVA-Bestrahlung von Zellen lediglich unter Bedingungen, die eine UVA-induzierte Bildung von Wasserstoffperoxid zuließen, das bekanntermaßen EGFR/ErbB2 zu aktivieren vermag.

Zusammenfassend wurde am Beispiel von Naphthochinonderivaten und reaktiven Sauerstoffspezies festgestellt, dass Rezeptoren der ErbB-Familie Angriffs- und Integrationspunkte für zahlreiche exogene Noxen sind und sich somit als Zielstrukturen für pharmakologische Modulation stressinduzierter und pathophysiologisch relevanter Signalwege eignen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdelmohsen, K., P. A. Gerber, C. von Montfort, H. Sies und L. O. Klotz (2003). "Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases." J Biol Chem **278**(40): 38360-7.
- Ahmad, F., P. M. Li, J. Meyerovitch und B. J. Goldstein (1995). "Osmotic loading of neutralizing antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative regulation of the insulin action pathway." J Biol Chem **270**(35): 20503-8.
- Anderson, M. E. und A. Meister (1983). "Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(3): 707-11.
- Anselmo, A. N. und M. H. Cobb (2004). "Protein kinase function and glutathionylation." Biochem J **381**(Pt 3): e1-2.
- Barford, D. (1995). "Protein phosphatases." Curr Opin Struct Biol **5**(6): 728-34.
- Barrett, W. C., J. P. DeGnore, S. Konig, H. M. Fales, Y. F. Keng, Z. Y. Zhang, M. B. Yim und P. B. Chock (1999). "Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215." Biochemistry **38**(20): 6699-705.
- Batzer, A. G., D. Rotin, J. M. Urena, E. Y. Skolnik und J. Schlessinger (1994). "Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor." Mol Cell Biol **14**(8): 5192-201.
- Berli, R. R. und N. E. Hynes (1996). "Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities." J Biol Chem **271**(11): 6071-6.
- Berkner, K. L. (2000). "The vitamin K-dependent carboxylase." J Nutr **130**(8): 1877-80.
- Bern, M. (2004). "Observations on possible effects of daily vitamin K replacement, especially upon warfarin therapy." J Parenter Enteral Nutr **28**(6): 388-98.
- Blume-Jensen, P. und T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature **411**(6835): 355-65.
- Bolton, J. L., M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst und T. J. Monks (2000). "Role of quinones in toxicology." Chem Res Toxicol **13**(3): 135-60.
- Boukamp, P., S. Popp, S. Altmeyer, A. Hulsen, C. Fasching, T. Cremer und N. E. Fusenig (1997). "Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT." Genes Chromosomes Cancer **19**(4): 201-14.
- Boukamp, P., W. Tilgen, R. T. Dzarlieva, D. Breitkreutz, D. Haag, R. K. Riehl, A. Bohnert und N. E. Fusenig (1982). "Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin." J Natl Cancer Inst **68**(3): 415-27.
-

-
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brown-Shimer, S., K. A. Johnson, D. E. Hill und A. M. Bruskin (1992). "Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene." Cancer Res **52**(2): 478-82.
- Brunmark, A. und E. Cadenas (1989). "1,4-Reductive addition of glutathione to quinone epoxides. Mechanistic studies with HPLC with electrochemical detection under anaerobic and aerobic conditions. Evaluation of chemical reactivity in terms of autoxidation reactions." Free Radic Biol Med **6**(2): 149-65.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, C. Eigenbrot, K. M. Ferguson, T. P. Garrett, D. J. Leahy, M. A. Lemmon, M. X. Sliwkowski, C. W. Ward und S. Yokoyama (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." Mol Cell **12**(3): 541-52.
- Cadet, J., C. Anselmino, T. Douki und L. Voituriez (1992). "Photochemistry of nucleic acids in cells." J Photochem Photobiol B **15**(4): 277-98.
- Cadet, J., S. Bellon, M. Berger, A. G. Bourdat, T. Douki, V. Duarte, S. Frelon, D. Gasparutto, E. Muller, J. L. Ravanat und S. Sauvaigo (2002). "Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases." Biol Chem **383**(6): 933-43.
- Campbell, J. S., R. Seger, J. D. Graves, L. M. Graves, A. M. Jensen und E. G. Krebs (1995). "The MAP kinase cascade." Recent Prog Horm Res **50**: 131-59.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573): 1655-7.
- Carr, B. I., Z. Wang und S. Kar (2002). "K vitamins, PTP antagonism, and cell growth arrest." J Cell Physiol **193**(3): 263-74.
- Caselli, A., R. Marzocchini, G. Camici, G. Manao, G. Moneti, G. Pieraccini und G. Ramponi (1998). "The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂." J Biol Chem **273**(49): 32554-60.
- Cheng, A., G. S. Bal, B. P. Kennedy und M. L. Tremblay (2001). "Attenuation of adhesion-dependent signaling and cell spreading in transformed fibroblasts lacking protein tyrosine phosphatase-1B." J Biol Chem **276**(28): 25848-55.
- Chu, F., N. E. Ward und C. A. O'Brian (2001). "Potent inactivation of representative members of each PKC isozyme subfamily and PKD via S-thiolation by the tumor-promotion/progression antagonist glutathione but not by its precursor cysteine." Carcinogenesis **22**(8): 1221-9.
- Citri, A., K. B. Skaria und Y. Yarden (2003). "The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3." Exp Cell Res **284**(1): 54-65.
-

-
- Cobb, M. H. und E. J. Goldsmith (1995). "How MAP kinases are regulated." J Biol Chem **270**(25): 14843-6.
- Coffer, P. J., J. Jin und J. R. Woodgett (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J **335**: 1-13.
- Cross, J. V. und D. J. Templeton (2004). "Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain." Biochem J **381**(Pt 3): 675-83.
- Datta, K., A. Bellacosa, T. O. Chan und P. N. Tsichlis (1996). "Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells." J Biol Chem **271**(48): 30835-9.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh und M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-41.
- Davies, M. J., S. Fu, H. Wang und R. T. Dean (1999). "Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease." Free Radic Biol Med **27**(11-12): 1151-63.
- Dean, R. T., S. Fu, R. Stocker und M. J. Davies (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation." Biochem J **324**: 1-18.
- Denu, J. M. und J. E. Dixon (1995). "A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 5910-4.
- Devasagayam, T. P., A. R. Sundquist, P. Di Mascio, S. Kaiser und H. Sies (1991). "Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers." J Photochem Photobiol B **9**: 105-16.
- Di Mascio, P., C. F. Menck, R. G. Nigro, A. Sarasin und H. Sies (1990). "Singlet molecular oxygen induced mutagenicity in a mammalian SV40-based shuttle vector." Photochem Photobiol **51**: 293-8.
- Dikic, I. (2003). "Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1178-81.
- Douki, T., D. Perdiz, P. Grof, Z. Kuluncsics, E. Moustacchi, J. Cadet und E. Sage (1999). "Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role." Photochem Photobiol **70**: 184-90.
- Earp, H. S., T. L. Dawson, X. Li und H. Yu (1995). "Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research." Breast Cancer Res Treat **35**(1): 115-32.
- English, J. M., G. Pearson, T. Hockenberry, L. Shivakumar, M. A. White und M. H. Cobb (1999). "Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control." J Biol Chem **274**(44): 31588-92.
- Ernster, L., A. S. Atallah und P. Hochstein (1986). "DT diaphorase and the cytotoxicity and mutagenicity of quinone-derived oxygen radicals." Prog Clin Biol Res **209A**: 353-63.
-

-
- Fauman, E. B. und M. A. Saper (1996). "Structure and function of the protein tyrosine phosphatases." Trends Biochem Sci **21**(11): 413-7.
- Ferguson, K. M., J. M. Kavran, V. G. Sankaran, E. Fournier, S. J. Isakoff, E. Y. Skolnik und M. A. Lemmon (2000). "Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains." Mol Cell **6**(2): 373-84.
- Frangioni, J. V., P. H. Beahm, V. Shifrin, C. A. Jost und B. G. Neel (1992). "The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence." Cell **68**(3): 545-60.
- Frech, M., M. Andjelkovic, E. Ingley, K. K. Reddy, J. R. Falck und B. A. Hemmings (1997). "High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity." J Biol Chem **272**(13): 8474-81.
- Freeman, S. E., H. Hacham, R. W. Gange, D. J. Maytum, J. C. Sutherland und B. M. Sutherland (1989). "Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5605-9.
- Fruman, D. A., R. E. Meyers und L. C. Cantley (1998). "Phosphoinositide kinases." Annu Rev Biochem **67**: 481-507.
- Fusenig, N. E. und P. Boukamp (1998). "Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes." Mol Carcinog **23**(3): 144-58.
- Gant, T. W., D. N. Rao, R. P. Mason und G. M. Cohen (1988). "Redox cycling and sulphhydryl arylation; their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes." Chem Biol Interact **65**(2): 157-73.
- Graus-Porta, D., R. R. Beerli, J. M. Daly und N. E. Hynes (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." Embo J **16**(7): 1647-55.
- Grune, T., L. O. Klotz, J. Gieche, M. Rudeck und H. Sies (2001). "Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite." Free Radic Biol Med **30**(11): 1243-53.
- Guyton, K. Z., Y. Liu, M. Gorospe, Q. Xu und N. J. Holbrook (1996). "Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury." J Biol Chem **271**(8): 4138-42.
- Hallberg, B., S. I. Rayter und J. Downward (1994). "Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation." J Biol Chem **269**(6): 3913-6.
- Hanks, S. K. und A. M. Quinn (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members." Methods Enzymol **200**: 38-62.
-

-
- Harari, D. und Y. Yarden (2000). "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." Oncogene **19**(53): 6102-14.
- Hazzalin, C. A. und L. C. Mahadevan (2002). "MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?" Nat Rev Mol Cell Biol **3**(1): 30-40.
- Herrlich, P. und F. D. Böhmer (2000). "Redox regulation of signal transduction in mammalian cells." Biochem Pharmacol **59**(1): 35-41.
- Hilger, R. A., M. E. Scheulen und D. Strumberg (2002). "The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer." Onkologie **25**(6): 511-8.
- Huang, K. P. und F. L. Huang (2002). "Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 1049-56.
- Humphries, K. M., C. Juliano und S. S. Taylor (2002). "Regulation of cAMP-dependent protein kinase activity by glutathionylation." J Biol Chem **277**(45): 43505-11.
- James, S. R., C. P. Downes, R. Gigg, S. J. Grove, A. B. Holmes und D. R. Alessi (1996). "Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation." Biochem J **315** (Pt 3): 709-13.
- Kamakura, S., T. Moriguchi und E. Nishida (1999). "Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus." J Biol Chem **274**(37): 26563-71.
- Kappus, H. und H. Sies (1981). "Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation." Experientia **37**(12): 1233-41.
- Kar, S., T. Adachi und B. I. Carr (2002). "EGFR-independent activation of ERK1/2 mediates growth inhibition by a PTPase antagonizing K-vitamin analog." J Cell Physiol **190**(3): 356-64.
- Kielbassa, C., L. Roza und B. Epe (1997). "Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light." Carcinogenesis **18**(4): 811-6.
- Klatt, P. und S. Lamas (2000). "Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress." Eur J Biochem **267**(16): 4928-44.
- Klatt, P., E. P. Molina, M. G. De Lacoba, C. A. Padilla, E. Martinez-Galesteo, J. A. Barcena und S. Lamas (1999). "Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation." Faseb J **13**(12): 1481-90.
- Klotz, L. O., K. Briviba und H. Sies (1997). "Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts." FEBS Lett **408**(3): 289-91.
- Klotz, L. O., N. J. Holbrook und H. Sies (2001). "UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events." Curr Probl Dermatol **29**: 95-113.
- Klotz, L. O., K. D. Kröncke und H. Sies (2003). "Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells." Photochem Photobiol Sci **2**(2): 88-94.
- Klotz, L. O., P. Patak, N. Ale-Agha, D. P. Buchczyk, K. Abdelmohsen, P. A. Gerber, C. von Montfort und H. Sies (2002). "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**(17): 4922-8.
- Klotz, L. O., C. Pellieux, K. Briviba, C. Pierlot, J. M. Aubry und H. Sies (1999). "Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA." Eur J Biochem **260**(3): 917-22.
- Knebel, A., F. D. Böhmer und P. Herrlich (2000). "Radiation-induced signal transduction." Methods Enzymol **319**: 255-72.
- Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich und P. Herrlich (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." Embo J **15**(19): 5314-25.
- Kraus, M. H., W. Issing, T. Miki, N. C. Popescu und S. A. Aaronson (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9193-7.
- Kyriakis, J. M., P. Banerjee, E. Nikolakaki, T. Dai, E. A. Rubie, M. F. Ahmad, J. Avruch und J. R. Woodgett (1994). "The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases." Nature **369**(6476): 156-60.
- Lammers, R., B. Bossenmaier, D. E. Cool, N. K. Tonks, J. Schlessinger, E. H. Fischer und A. Ullrich (1993). "Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells." J Biol Chem **268**(30): 22456-62.
- Lazo, J. S., D. C. Aslan, E. C. Southwick, K. A. Cooley, A. P. Ducruet, B. Joo, A. Vogt und P. Wipf (2001). "Discovery and biological evaluation of a new family of potent inhibitors of the dual specificity protein phosphatase Cdc25." J Med Chem **44**(24): 4042-9.
- Lee, S. R., K. S. Kwon, S. R. Kim und S. G. Rhee (1998). "Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor." J Biol Chem **273**(25): 15366-72.
- Lietzke, S. E., S. Bose, T. Cronin, J. Klarlund, A. Chawla, M. P. Czech und D. G. Lambright (2000). "Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains." Mol Cell **6**(2): 385-94.
- Lohse, D. L., J. M. Denu, N. Santoro und J. E. Dixon (1997). "Roles of aspartic acid-181 and serine-222 in intermediate formation and hydrolysis of the mammalian protein-tyrosine-phosphatase PTP1." Biochemistry **36**(15): 4568-75.
- Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi und J. Schlessinger (1992). "The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling." Cell **70**(3): 431-42.
-

-
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Mahns, A., I. Melchheier, C. V. Suschek, H. Sies und L. O. Klotz (2003). "Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide." Free Radic Res **37**(4): 391-7.
- Marshall, C. J. (1994). "MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 82-9.
- Martindale, J. L. und N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." J Cell Physiol **192**(1): 1-15.
- Melchheier, I., C. von Montfort, D. Stuhlmann, H. Sies und L. O. Klotz (2005). "Quinone-induced Cdc25A inhibition causes ERK-dependent connexin phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **327**(4): 1016-23.
- Milarski, K. L., G. Zhu, C. G. Pearl, D. J. McNamara, E. M. Dobrusin, D. MacLean, A. Thieme-Sefler, Z. Y. Zhang, T. Sawyer, S. J. Decker und et al. (1993). "Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B." J Biol Chem **268**(31): 23634-9.
- Miller, S. M., D. P. Ballou, V. Massey, C. H. Williams, Jr. und C. T. Walsh (1986). "Two-electron reduced mercuric reductase binds Hg(II) to the active site dithiol but does not catalyze Hg(II) reduction." J Biol Chem **261**(18): 8081-4.
- Nohl, H. und W. Jordan (1980). "The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide." Eur J Biochem **111**(1): 203-10.
- Normanno, N., F. Ciardiello, R. Brandt und D. S. Salomon (1994). "Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer." Breast Cancer Res Treat **29**(1): 11-27.
- Olayioye, M. A. (2001). "Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members." Breast Cancer Res **3**(6): 385-9.
- Piette, J. (1991). "Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen." J Photochem Photobiol B **11**(3-4): 241-60.
- Prasad, K. N., J. Edwards-Prasad und A. Sakamoto (1981). "Vitamin K3 (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture." Life Sci **29**(13): 1387-92.
- Prenzel, N., O. M. Fischer, S. Streit, S. Hart und A. Ullrich (2001). "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." Endocr Relat Cancer **8**(1): 11-31.
- Puntarulo, S. und A. I. Cederbaum (1998). "Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes." Free Radic Biol Med **24**(7-8): 1324-30.
-

-
- Rao, R. K. und L. W. Clayton (2002). "Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 610-6.
- Ravanat, J. L. und J. Cadet (1995). "Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products." Chem Res Toxicol **8**(3): 379-88.
- Ray, L. B. und T. W. Sturgill (1988). "Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(11): 3753-7.
- Roskoski, R., Jr. (2004). "The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 1-11.
- Rost, S., A. Fregin, V. Ivaskevicius, E. Conzelmann, K. Hortnagel, H. J. Pelz, K. Lappegard, E. Seifried, I. Scharrer, E. G. Tuddenham, C. R. Muller, T. M. Strom und J. Oldenburg (2004). "Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2." Nature **427**(6974): 537-41.
- Schieke, S. M., K. Briviba, L. O. Klotz und H. Sies (1999). "Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation." FEBS Lett **448**(2-3): 301-3.
- Schroeder, P., L. O. Klotz, D. P. Buchczyk, C. D. Sadik, T. Schewe und H. Sies (2001). "Epicatechin selectively prevents nitration but not oxidation reactions of peroxynitrite." Biochem Biophys Res Commun **285**(3): 782-7.
- Schroeder, P., H. Zhang, L. O. Klotz, B. Kalyanaraman und H. Sies (2001). "(-)-Epicatechin inhibits nitration and dimerization of tyrosine in hydrophilic as well as hydrophobic environments." Biochem Biophys Res Commun **289**(5): 1334-8.
- Seeger, R. und E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." FASEB J **9**(9): 726-35.
- Sies, H. (1999). "Glutathione and its role in cellular functions." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 916-21.
- Sies, H. und E. Cadenas (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **311**(1152): 617-31.
- Sies, H. und C. F. Menck (1992). "Singlet oxygen induced DNA damage." Mutat Res **275**(3-6): 367-75.
- Slieker, L. J., T. M. Martensen und M. D. Lane (1986). "Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. Glycosylation-dependent acquisition of ligand binding activity occurs post-translationally in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **261**(32): 15233-41.
- Soltoff, S. P., K. L. Carraway, 3rd, S. A. Prigent, W. G. Gullick und L. C. Cantley (1994). "ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor." Mol Cell Biol **14**(6): 3550-8.
- Sorkin, A. (2001). "Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 480-4.
-

-
- Steinbeck, M. J., A. U. Khan und M. J. Karnovsky (1992). "Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap." J Biol Chem **267**(19): 13425-33.
- Takakura, K., J. S. Beckman, L. A. MacMillan-Crow und J. P. Crow (1999). "Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite." Arch Biochem Biophys **369**(2): 197-207.
- Tiganis, T. (2002). "Protein tyrosine phosphatases: dephosphorylating the epidermal growth factor receptor." IUBMB Life **53**(1): 3-14.
- Tiganis, T., A. M. Bennett, K. S. Ravichandran und N. K. Tonks (1998). "Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase." Mol Cell Biol **18**(3): 1622-34.
- Tonks, N. K. (2003). "PTP1B: from the sidelines to the front lines!" FEBS Lett **546**(1): 140-8.
- Tonks, N. K. und B. G. Neel (2001). "Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 182-95.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tyers, M., R. A. Rachubinski, M. I. Stewart, A. M. Varrichio, R. G. Shorr, R. J. Haslam und C. B. Harley (1988). "Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets." Nature **333**(6172): 470-3.
- von Montfort, C. (2004). "Regulation des EGF-Rezeptors durch Tyrosinphosphatasen in der zellulären Antwort auf reaktive Sauerstoffspezies." (Dissertation, Heinrich-Heine-Universität).
- Wang, W. und C. M. Higuchi (1995). "Induction of NAD(P)H:quinone reductase by vitamins A, E and C in Colo205 colon cancer cells." Cancer Lett **98**(1): 63-9.
- Wang, X., J. L. Martindale, Y. Liu und N. J. Holbrook (1998). "The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival." Biochem J **333** (Pt 2): 291-300.
- Wang, Z., M. Wang und B. I. Carr (2000). "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**(3): 338-46.
- Waterman, H. und Y. Yarden (2001). "Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases." FEBS Lett **490**(3): 142-52.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe und G. L. Johnson (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-80.
-

- Will, O., E. Gocke, I. Eckert, I. Schulz, M. Pflaum, H. C. Mahler und B. Epe (1999). "Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022." Mutat Res **435**(1): 89-101.
- Xu, W., S. C. Harrison und M. J. Eck (1997). "Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src." Nature **385**(6617): 595-602.
- Yarden, Y. und M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-37.
- Zhang, Z. Y. und J. E. Dixon (1994). "Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **68**: 1-36.
- Zhang, Z. Y., D. Maclean, D. J. McNamara, T. K. Sawyer und J. E. Dixon (1994). "Protein tyrosine phosphatase substrate specificity: size and phosphotyrosine positioning requirements in peptide substrates." Biochemistry **33**(8): 2285-90.
- Zhou, G., Z. Q. Bao und J. E. Dixon (1995). "Components of a new human protein kinase signal transduction pathway." J Biol Chem **270**(21): 12665-9.
- Zhuang, S., G. D. Ouedraogo und I. E. Kochevar (2003). "Downregulation of epidermal growth factor receptor signaling by singlet oxygen through activation of caspase-3 and protein phosphatases." Oncogene **22**(28): 4413-24.
-

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extrazellulär regulierte Kinasen 1/2
FCS	fetal calf serum (fötales Kalbserum)
Grb2	growth factor receptor binding protein 2
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MBP	Basisches Myelinprotein
NAc	N-Acetylcystein
n. d.	nicht definiert
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	Pleckstrin homologe Domäne
pI	isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PK	Proteinkinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PTB	Phosphotyrosin bindende Domäne
PTK	Proteintyrosinkinase
PTPase	Proteintyrosinphosphatase

pThr	Phosphothreonin
pTyr	Phosphotyrosin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pSer	Phosphoserin
RB	Rose Bengal (Bengalrosa)
ROS	reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	Src-homologe Domäne Typ 2
SSA	5-Sulfosalicylsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	volume/volume, ml in 100 ml Gesamtvolumen
w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Lars-Oliver Klotz für die Bereitstellung des interessanten Themas, die fachliche Betreuung dieser Arbeit und die dafür bereitgestellten finanziellen Mittel. Außerdem möchte ich mich bei ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Herrn Universitätsprof. Dr. Sies danke ich für die Überlassung der Arbeitsstelle und für die bereitgestellten finanziellen Mittel.

Herrn Universitätsprof. Dr. Wunderlich danke ich sehr für die Übernahme des Korreferats.

Herrn PD Dr. Peter Brenneisen danke ich für die Ratschläge, die stete Hilfsbereitschaft und die Bereitstellung der für die Arbeit verwendeten Zellen.

Ich möchte ebenfalls den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Klotz für die gute Zusammenarbeit und die vielen wertvollen Diskussionen danken. Darüber hinaus gilt mein Dank besonders meinen Laborkollegen Friedi Döpp, Philippe Walter, Dr. Arne Gerber und Dr. Stefanie Galbán für ihre Hilfsbereitschaft aber auch die vielen schönen Tage im Labor.

Ganz herzlich danke ich Dr. Claudia von Montfort und Karin Neukam für ihre Hilfsbereitschaft, Freundschaft und die vielen schönen gemeinsamen Tage.

Andrea Borchard danke ich sehr für ihre Hilfe, Unterstützung und Geduld in allen Laborfragen.

Außerdem möchte ich unserer Mittagsrunde, u.a. Dominik Stuhlmann, Bahar Cat und Lirija Alili für die vielen Diskussionen über fachliche und andere ☺ Themen danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Gisela Wölfel danke ich für ihre Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Meinen Freunden und der Familie Leidecker danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt haben. Insbesondere danke ich Leika dafür, dass sie mir in allen Lebenslagen stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Nadine Tillmanns danke ich ganz besonders für ihre Freundschaft und ihre Fähigkeit immer die richtigen Worte zur richtigen Zeit zu finden.

Meinem Freund Ingo Vogelskamp danke ich von ganzem Herzen für seine Geduld, Liebe und moralische Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung in allen Belangen.

„Finis coronat opus“

Ovid

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Juliane Beier

Düsseldorf, den

Juliane Ingeborg Helene Anneliese Beier

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 07. Januar 1977
Geburtsort: Krefeld
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Dietger Beier, Rentner
Sibylle Beier, geb. Staufenberg, Realschullehrerin

Schulbildung

Grundschule 1983 - 1987 Südschule, Krefeld
Gymnasium 1987 - 1996 Marienschule, Krefeld
1996 Abitur

Hochschulausbildung

WS 1996/97 - WS 2001/2002
Studium im Fachbereich Biologie an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
04.12.2001 Diplom

SS 2002 - SS 2005
Promotion im Institut für Biochemie und Molekularbiologie 1
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf