

Aus dem Institut für Biochemie und Mikrobiologie I

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

**Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2
durch selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate in
Rattenleberepithelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Friedburg Döpp

2007

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

**gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. Nat. Bernd Nürnberg
Dekan**

Referent: PD Dr. Lars-Oliver Klotz

Korreferent: Prof. Dr. Schulze- Osthoff

Inhaltsangabe

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung und Fragestellung	7
1.1. Der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF): Funktion und Bedeutung für die Krebsentstehung	7
1.2. Mitogenaktivierte Proteinkinasen	9
1.3. Fragestellung	14
2. Methoden	15
2.1. Zellkultur	15
2.1.1. Stammhaltung und Anzucht der Zellen	15
2.1.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen	15
2.1.3. Toxizitätstest mit Neutralrot	16
2.1.4. Behandlung von Zellen	16
2.2. Analytik	17
2.2.1. Proteinbestimmung nach Bradford	17
2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	17
2.2.3. Western-Blot	18
2.2.4. Entfernen von Antikörpern von der Membran ("Strippen")	19
3. Ergebnisse	20
3.1. Zytotoxizität selen- und tellurhaltiger Menadionderivate	20
3.2. Aktivierung von ERK1/2 durch Menadion sowie selen- bzw. tellurhaltige Derivate	23
3.3. Modulation der durch Naphthochinone induzierten Aktivierung von ERK1/2 durch Kinasehemmstoffe	25
3.4. Aktivierung des EGF-Rezeptors durch selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate	27
4. Diskussion	
4.1. Aktivierung von ERK1/2 durch selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate	31

4.2. Unterschiede zwischen selen- und tellurhaltigen Naphthochinonderivaten	34
4.3. Vermutete Mechanismen für EGFR-abhängige Signalwege durch Menadion- derivate	34
5. Zusammenfassung	36
6. Literatur	37
7. Anhang	41

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreit
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK1/2	Extrazellulär regulierte Kinase1/2
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
GJC	Gap junctional intercellular communication
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MQ	Menadion
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenine-Dinukleotid (phosphate), reduziert
NR	Neutralrot, 3-Amino-7-dimethyl-2-methylphenacin
NQOR	NAD(P)H:Chinon- Oxidoreduktase-1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PTPase	Proteintyrosinphosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED	N, N, N`, N`,-Tetramethylethylendiamin

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

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

1. Einleitung und Fragestellung

Kommunikation von Zellen untereinander ist ein wesentlicher Teil der menschlichen Entwicklung. Nur durch Informationsaustausch können Zellen auf Reize reagieren, die von außen kommen und die die weiteren Arbeitsprozesse in der Zelle gravierend beeinflussen können. Dazu sind Signalmoleküle entscheidend, die die Information an die Zelle herantragen. Entweder können diese Signalmoleküle selbst die Zellmembran passieren, oder die Information wird mit Hilfe geeigneter Rezeptorproteine in der Zellmembran in das Zellinnere weitergeleitet, beispielsweise durch Strukturveränderungen von Molekülen und unter Aktivierung von Phosphorylierungsprozesse regulierenden Enzymen.

Proteinphosphorylierungen im Rahmen von Signaltransduktionsprozessen werden über das Zusammenspiel von Kinasen und Phosphatasen reguliert. Während Kinasen die Phosphorylierung von Zielproteinen auf Kosten von ATP katalysieren, beschleunigen Phosphatasen die Dephosphorylierung.

1.1. Der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF): Funktion und Bedeutung für die Krebsentstehung

In einer Vielzahl epithelialer Tumorzellen ist der EGF-Rezeptor überexprimiert oder verstärkt aktiv, woraus eine Verstärkung von Signalprozessen, die Wachstum sowie Infiltration und Metastasierung fördern, resultiert.

Zu den bekannten Krebsarten mit Überexpression der EGFR zählen das nichtkleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) sowie das Mamma-, Magen-, Prostata-, Ovarial- und kolorektale Karzinom. Auch im Glioblastom wurde eine EGFR-Überexpression gefunden (Agus et al., 2000; Prenzel et al., 2001; Mendelsohn, 2002).

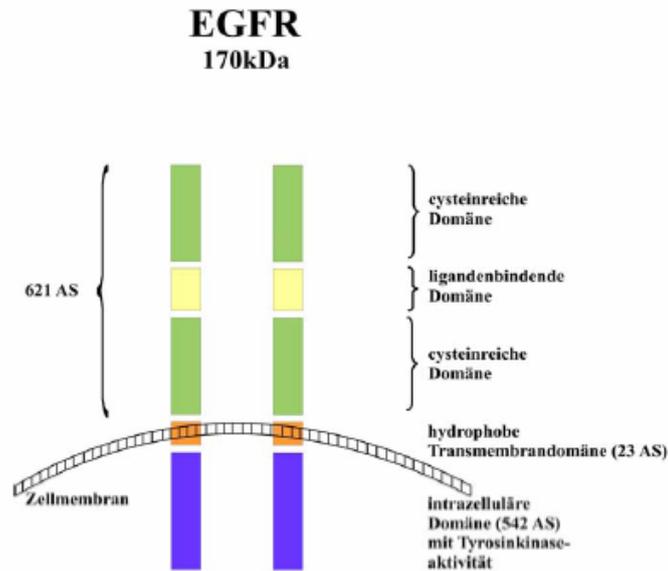


Abb .1.1. Schematische Darstellung eines EGF-Rezeptor-Dimers

Der EGF-Rezeptor besteht aus einem extrazellulären Teil mit cysteinreichen Domänen und ligandenbindenden Domänen, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität.

Der EGF-Rezeptor (EGFR), auch bekannt als HER1 oder ErbB1, ist ein zellmembranständiges Glykoprotein von 170 kDa. Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einem transmembranen lipophilen Segment und einem intrazellulären Bereich, der Tyrosinkinaseaktivität besitzt (Cadena und Gill, 1992). Der EGF-Rezeptor gehört zur Familie der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen, die neben EGFR selbst, (ErbB1/HER1) auch ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) umfasst (Ciadiello et al., 2001, Baselga, 2002, Olayioye et al., 2003).

Bei Bindung eines Liganden an einen EGF-Rezeptor kommt es zu dessen Dimerisierung, entweder mit einem weiteren EGFR-Monomer, oder mit einem anderen Mitglied der ErbB-Familie (Sako et al., 2000). Nach der Dimerisierung erfolgt die Phosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne. Die entstandenen Phosphotyrosylreste dienen als Andockstellen für weitere Signalproteine, die damit in die Nähe der Zellmembran gebracht und Ausgangspunkt zellulärer Signalkaskaden werden.

Negative Regulation des EGFR sowie EGFR-abhängiger Signalprozesse erfolgt über Dephosphorylierung des Rezeptors, die durch Proteintyrosinphosphatasen katalysiert wird. Es

existiert eine große Familie von Rezeptor- und Nichtrezeptor-Tyrosinphosphatasen, die in vivo eine Vielzahl von Signalwegen kontrollieren (Anderson et al., 2001; Tonks und Neel, 2001).

Stimulation des EGFR hat in der Regel proliferative Wirkung. Dazu trägt eine Gruppe von Enzymen bei, die in Abhängigkeit von EGFR stimuliert werden: die mitogenaktivierten Proteinkinasen.

1.2. Mitogenaktivierte Proteinkinasen

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) werden unter Einfluss von Wachstumsfaktoren, Wasserstoffperoxid, UV-Licht oder Phorbolester stimuliert (Stevenson et al., 1994; Sachsenmaier et al., 1994; Guyton et al., 1996; Wang et al., 1998; Osada et al., 2001). Zu den klassischen MAPK gehören die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen ERK1 und ERK2.

MAPK werden von vorgeschalteten Kinasen [MAPK/ERK-Kinasen (MEK) 1 und 2] durch Threonin- und Tyrosinphosphorylierung aktiviert (Hazzalin und Mahadevan, 2002) und modulieren die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die auch an der Regulation von Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind (siehe Abb.1.2.).

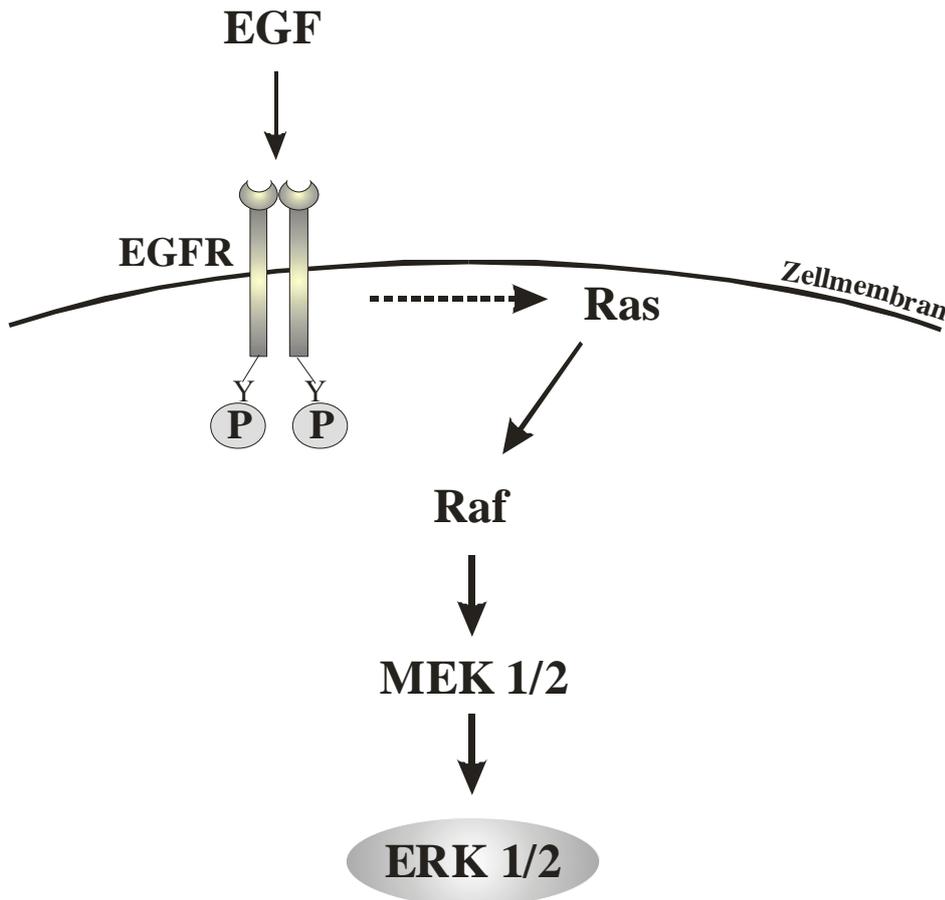


Abb. 1.2. Schematische Darstellung der zur Aktivierung mitogenaktivierter Proteinkinasen (MAPK) führenden Signalkaskade nach Stimulation des EGF-Rezeptors.

Nach Dimerisierung und Tyrosinphosphorylierung des EGFR kommt es über Adapterproteine zur Aktivierung des GTP-bindenden Proteins Ras, was die Aktivierung der Ser-/Thr-Kinase Raf zur Folge hat, die durch Phosphorylierung von MAPK/ERK-Kinasen (MEK) 1 und 2 und deren dadurch erreichte Aktivierung zur MEK-abhängigen Phosphorylierung und Aktivierung der MAPK ERK 1 und 2 führt.

Auch Naphthochinonderivate aktivieren die in Abb.1.2. gezeigten Signalwege, wie für Menadion (2-Methyl-1,4-naphthochinon), DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphthochinon) und NSC95397 (2,3-bis[(2-Hydroxyethyl)thio]-1,4-naphthochinon) gezeigt wurde (Klotz et al., 2002, Melchheier et al., 2005, Beier et al., 2006). Menadion, auch als Vitamin K₃ bezeichnet, ist chemisch relativ einfach zu synthetisieren (Mayer 1971) und diente deshalb als Vitamin K-Quelle zur Nahrungsergänzung. Aufgrund seiner alkylierenden Eigenschaften und der daraus resultierenden Zytotoxizität, ist dies heute nicht mehr der Fall. Der zytotoxische Effekt von Naphthochinonen und Vitamin-K-Derivaten wird allerdings in der Krebsforschung mit dem Ziel genutzt, Wachstum vieler Tumorzellen zu hemmen (Kar et al., 2002).

Ein möglicher Mechanismus sowie eine Konsequenz der Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalkaskade, die zur Aktivierung von ERK1 und ERK2 führt, werden in Abb. 1.3. aufgewiesen.

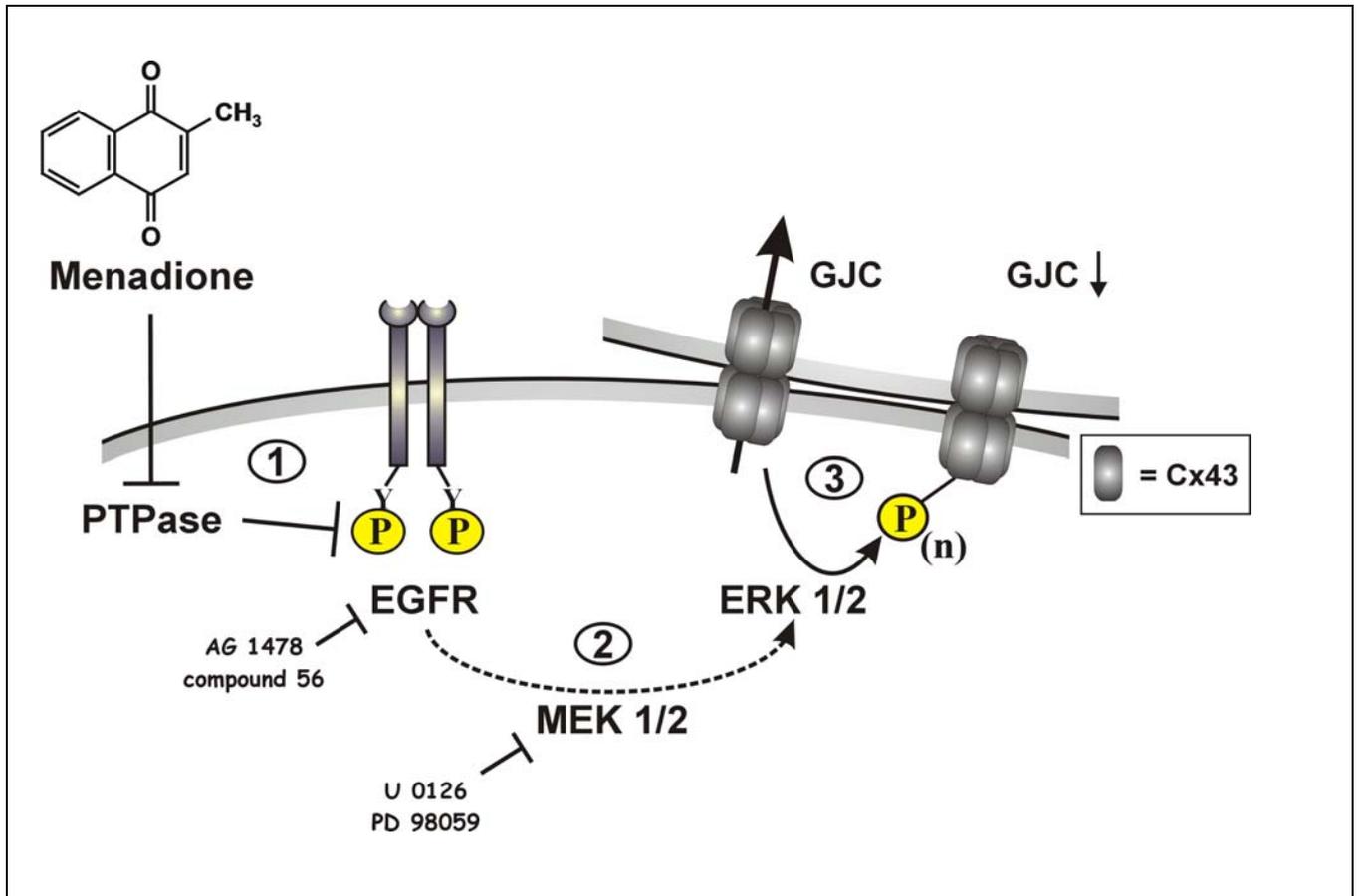


Abb .1.3. Schematische Darstellung der Aktivierung von ERK durch Menadion

Behandlung von Zellen mit Menadion führt zur Hemmung einer Proteintyrosinphosphatase (PTPase, 1). Daraus resultiert eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors, was Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinasen ERK 1 und 2 über MEK1/2 zur Folge hat (2). Aktiviertes ERK phosphoryliert Connexin 43, einen Baustein von Gap Junctions, was Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kommunikation (GJC) zur Folge hat (3) (Abdelmohsen et al., 2004).

Menadion, wie auch NSC95397, hemmen intrazellulär eine noch nicht identifizierte Proteintyrosinphosphatase (PTPase), die unter normalen Umständen die Phosphorylierung des EGFR an der Zellmembran kontrolliert (Abdelmohsen et al., 2003, Melchheier et al., 2005, Beier et al., 2006). Durch die daraus resultierende Aktivierung des Rezeptors wird die oben beschriebene Kaskade initiiert, die zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1 (44

kDa) und ERK2 (42 kDa) führt. Eine Konsequenz der ERK-Aktivierung ist die Phosphorylierung von Connexin-43-Molekülen, den Bausteinen von Gap Junctions, was Hemmung der Zell-Zell-Kommunikation und der Diffusion niedermolekularer Substanzen über Gap Junctions nach sich zieht. Als Mechanismen für die PTPase-Hemmung und dadurch hervorgerufene EGFR-Aktivierung werden Redoxcycling unter Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies sowie Alkylierungsreaktionen diskutiert (Abdelmohsen et al., 2003).

Die Menadionderivate, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeichnen sich durch einen selen- oder einen tellurhaltigen Rest aus und werden in Abb. 1.4. gezeigt. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Zuge des Redoxcyclings von Naphthochinonderivaten führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxid und Wasserstoffperoxid. Letzteres wird über Peroxidasen wie Glutathionperoxidase (GPx) reduziert. GPx katalysieren die Peroxidreduktion auf Kosten des Tripeptids Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly), das in diesem Zuge zum Glutathiondisulfid oxidiert wird. Die zytosolische GPx ist ein Selenoprotein, das im aktiven Zentrum ein essentielles Selenocystein enthält. Die GPx-Reaktion kann durch niedermolekulare Selenverbindungen imitiert werden (Klotz und Sies, 2003). Das gilt auch für analoge Verbindungen, die statt des Selens das Tellur (wie Selen ein Element der 6. Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente) enthalten (Briviba et al., 1998).

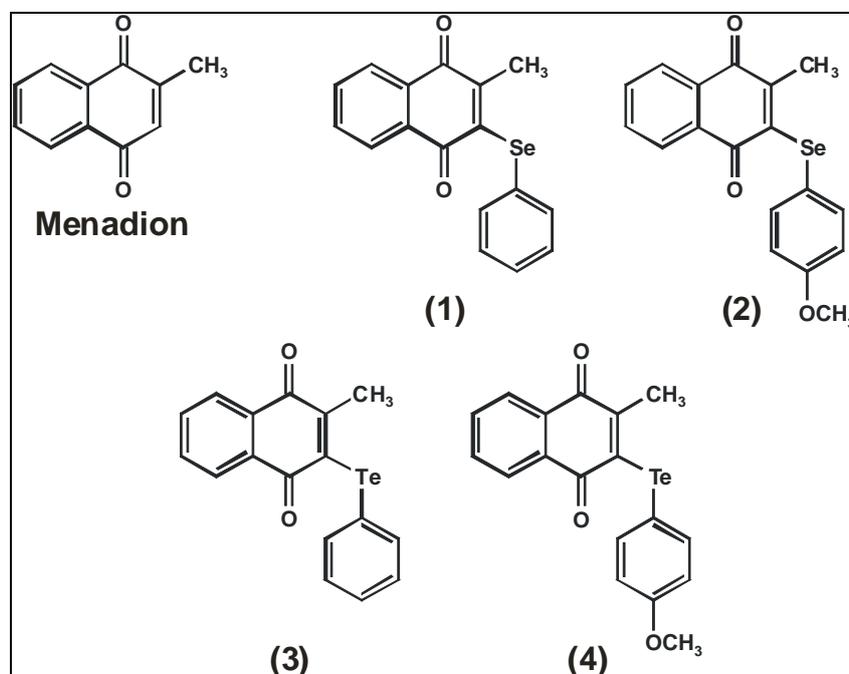


Abb.1.5. Strukturen der in dieser Arbeit eingesetzten Naphthochinonderivate

(1) MQ-Se-Ph: 3-Phenylselenid des Menadions, (2) MQ-Se-Ph-OMe: 3-Methoxyphenylselenid des Menadions,
 (3) MQ-Te-Ph: 3-Phenyltellurid des Menadions, (4) MQ-Te-Ph-OMe: 3-Methoxyphenyltellurid des Menadions

Neben den bekannten chemisch-industriellen Einsatzgebieten dieser Elemente, etwa des Tellurs in der Giessereiindustrie (Döpp und Blankenagel, 1979), sind organische Selen- und Tellurverbindungen also antioxidativ wirksame und damit potentiell biologisch einsetzbare Substanzen.

1.3. Fragestellung

Die Untersuchung von Naphthochinonen ergab in der Vergangenheit, daß in der Zelle ablaufende Signalprozesse beeinflusst werden.

Am Beispiel des Menadions konnte bereits gezeigt werden, dass ERK-Aktivierung als Behandlungsfolge resultiert und damit Zellwachstum beeinflusst wird.

In dieser Arbeit werden drei zentrale Fragen beleuchtet:

- 1) Findet eine ERK-Aktivierung auch durch Menadionderivate statt, denen ein Selen bzw. Tellur enthaltender Rest anhaftet?
- 2) Gibt es Unterschiede in der Stärke der ERK-Aktivierung in der Gruppe der Menadionderivate, das heißt: Verhält sich eine Substanz mit Selenrest anders als mit Tellurrest?
- 3) Kann die Aktivierung von Signalwegen pharmakologisch beeinflusst werden?

2. Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die hergestellten Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q- Anlage (Millipore, Eschborn) angefertigt. Die verwendeten Antikörper wurden, wie an jeweiliger Stelle nachfolgend angegeben, bezogen.

2.1.Zellkultur

2.1.1. Stammhaltung und Anzucht der Zellen

WB-F344-Rattenleberepithelzellen wurden von Dr. I.A. Cotgreave und Dr. L.Wärngard, Institut für Umweltmedizin, Karolinska Institut (Stockholm, Schweden) sowie von Dr. J.E. Trosko, Institut für Pädiatrie und Entwicklung, Michigan State University (East Lansing, Michigan), bezogen.

Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10% (v/v) FCS, 2mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettlösung) versetzt war, in einer wasserdampfgesättigten, 37 °C warmen Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Nach dem Erreichen einer 80 bis 90%igen Konfluenz wurde mit PBS gewaschen und nach Absaugen des Waschpuffers eine Trypsin/EDTA- Lösung zum Ablösen der Zellen aufgetragen. Die Trypsinaktivität wurde nach zwei bis fünf Minuten durch Anzuchtmedium unterbrochen, die Zellen wurden resuspendiert und auf eine entsprechende Anzahl Kulturflaschen bzw. Schalen überführt.

2.1.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Nach Trypsinierung wurden in Kulturmedium resuspendierte Zellen abzentrifugiert und in Einfriermedium [DMEM mit 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO] wieder aufgenommen und mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryogefäßen bei -80°C eingefroren. Nach Auftauen gefrorener Zellen wurden diese in 75cm^3 Kulturflaschen mit Fertigmedium gegeben. Um der Gefahr einer Membranschädigung durch den DMSO-Gehalt im Medium vorzubeugen, erfolgte ein Mediumwechsel sowohl nach 4 bis 5 Std. als auch nach 24 Std.

2.1.3. Toxizitätstest mit Neutralrot

Neutralrot ist ein Vitalfarbstoff, der ausschließlich von lebenden Zellen aufgenommen wird. Zur Färbung von in 24-Well-Schalen gewachsenen Zellen wurden 500 µl einer Neutralrotlösung [5 ml Neutralrotlösung (Sigma; 3,3 g/l PBS) in 100 ml DMEM ohne FCS] aufgetragen und die Zellen bei 37° C für zwei Stunden inkubiert. Nach Absaugen und Waschen in PBS wurde 1ml einer Fixier- und Extraktionslösung [50% (v/v) Essigsäure, 1% (v/v) Ethanol, 49% Wasser] hinzugegeben. Die Platten mit den Zellen wurden für 30 bis 60 min vorsichtig auf einen Rüttler gestellt. Anschliessend wurde die Extinktion bei 405nm und 550nm photometrisch bestimmt.

2.1.4. Behandlung von Zellen

Zur Behandlung von WB-F344-Zellen mit Naphthochinonderivaten wurden die Zellen in Vollmedium bis zu einer Konfluenz von 80-100% auf 6-Well-Zellkulturschalen herangezogen und über Nacht in serumfreien Medium ausgehungert. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS, erfolgte die Inkubation der Zellen mit Naphthochinonen in 1µl serumfreiem Medium je Vertiefung. Da die Naphthochinonderivate aus Stammlösungen in DMSO in Medium verdünnt wurden (Endkonzentration 10-50µM), wurden zur Kontrollbehandlung die Zellen mit DMSO in entsprechender Verdünnung in Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für (30 bis 60 min bei 37°C. Schließlich erfolgte die Lyse der Zellen durch 200µl eines 2xLaemmli-Puffers.

Zur Hemmung spezifischer Kinasen, die durch Naphthochinonbehandlung aktiviert werden, wurden unterschiedliche Inhibitoren eingesetzt, die MEK 1/2 [PD98059, 50 µM Endkonzentration, U0126, 10 µM (beide Alexis Biochemicals, San Diego, USA)] oder die EGF-Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität hemmen [AG1478 (Alexis Biochemicals) und "compound56" (c56, Calbiochem, San Diego), beide 10 µM]. Als Kontrolle diente wieder DMSO. Die Zellen wurden für 30 min vor Behandlung mit Naphthochinonen mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert, die auch während der Chinonbehandlung zugegen waren.

2. 2. Analytik

2.2.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde gemäss der 1976 entwickelten Methode nach Marion Bradford unter Verwendung kommerziell erhältlicher Lösungen ("Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent", Bio-Rad, München) gegen Standards aus Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

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

In der SDS-PAGE werden Proteine im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das amphiphile Detergens SDS lagert sich stöchiometrisch an Proteine, die dadurch denaturiert werden. Die aufgetrennten Proteine können angefärbt oder immunologisch nachgewiesen werden. Die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen bei maximal 40 mA pro Minigel (Towbin et al., 1979).

Zusammensetzung der Gele:

1. 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-Tetramethylethylendiamin (TEMED).
2. 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.

2.2.3. Western-Blot

Proteine in Polyacrylamidgelen können auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran überführt und spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen werden. Dieser Prozess wird als Western-Blotting bezeichnet, wobei das Muster der elektrophoretischen Trennung erhalten bleibt. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden. Für diesen elektrophoretischen Transfer existieren zwei unterschiedliche Systeme (Tank-Blot-System und Semidry-Blot-System). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur mit dem Tank-Blot-System gearbeitet.

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).

Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran werden die übriggebliebenen freien Bindungsstellen mit Milchpulver oder BSA blockiert, da sich sonst Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen. Damit die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachweisbar ist, wird ein spezifischer sekundärer Antikörper eingesetzt, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) markiert ist. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol und löst hierdurch eine Chemilumineszenz aus, deren Intensität über Schwärzung eines Filmes messbar ist.

Nach dem Transfer wurde also die PVDF-Membran zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde oder über Nacht in 5% BSA oder 5% Milchpulver in TBST [0,1% Tween-20 in TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris/ HCl, pH 7.5)] gelagert. Anschliessend folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C oder für drei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde mit TBST eine Stunde lang gewaschen, wobei dieses mehrfach gewechselt wurde. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine

Stunde bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschdurchgang mit TBST für eine Stunde nach oben genannter Weise erfolgte die Entwicklung mittels ECL- Reaktion mit dem "Super-Signal® West Pico" Substrat (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben.

Eine Liste der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper mit ihren Verdünnungen findet sich in Tabelle 2.1.

2.2.4. Entfernen von Antikörpern von der Membran ("Strippen")

Um Antikörper von der PVDF-Membran zu entfernen, damit weitere Proteine mit neuen Antikörpern detektiert werden 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 (Leitungs-)Wasser und anschließend 2-3 Male für ca. 10 min in großen Volumina von TBST bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Für die neue Immunanfärbung (wie oben 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.

Tab. 2.1: Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper

Zielprotein	Quelle/Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper		
EGFR	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA, # 2234	1:1000 in 1% (w/v) BSA/TBST
ERK1/2	Cell Signaling Technology, # 9102	1:5000 in 1% (w/v) Milchpulver/TBST
phospho-EGFR (Tyr ¹⁰⁶⁸)	Biosource, Camarillo, CA, USA, # 44-788	1:1000 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
Sekundärantikörper		
Anti-Rabbit-HRP	Dianova, Hamburg, # 111-035-144	1:5000 in 1% (w/v) Milchpulver/TBST

3. Ergebnisse

3.1. Zytotoxizität selen- und tellurhaltiger Menadionderivate

Zur Bestimmung der in Zellkultur einsetzbaren Konzentrationen der in Abb. 1.5. dargestellten Naphthochinonderivate (Nr. 1-4 in Abb. 1.5.; im Folgenden mit S (Substanz) 1 bis S4 bezeichnet, wurde deren Zytotoxizität für WB-F344-Rattenleberepithelzellen über einen Neutralrot-Test ermittelt. Hierzu wurden WB-F344-Zellen für 24 h mit den Menadionderivaten belastet und anschließend für 2 h in Gegenwart von Neutralrot inkubiert.

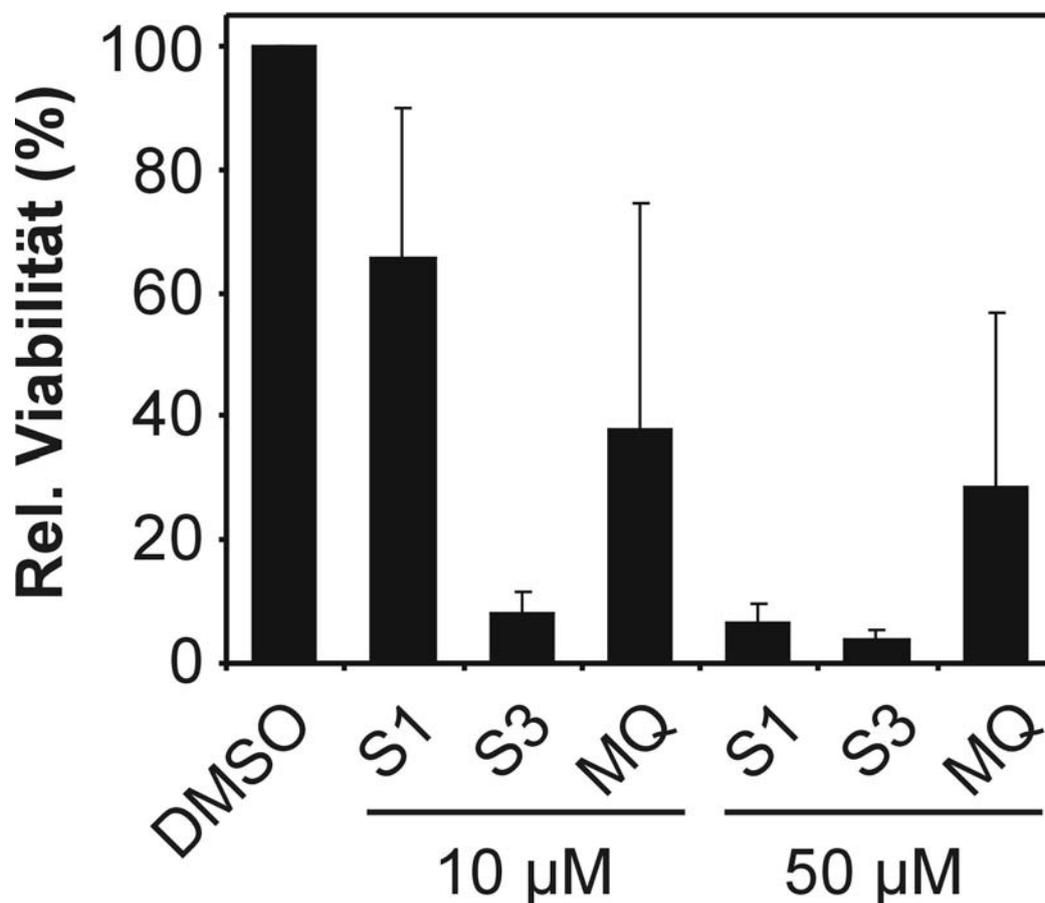


Abb. 3.1. Viabilität von WB-F344-Rattenleberepithelzellen nach Naphthochinonbehandlung

WB-Zellen wurden mit den Menadionderivaten S1 (selenhaltig) und S3 (tellurhaltig) sowie Menadion (MQ) in den angegebenen Konzentrationen für 24 h behandelt und anschließend mit Neutralrot gemäß Kap. 2.1.3. für 2 h inkubiert. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 bis 5 voneinander unabhängigen Einzelwerten (\pm S.E.M.).

In Abb. 3.1. ist zu erkennen, dass alle Naphthochinonderivate in einer Konzentration von 50 μM sehr toxisch wirken. Dieser Effekt ist in Konzentrationen von 10 μM stark abgeschwächt. Hierbei fällt auf, dass das Naphthochinonderivat mit Selenanteil (S1) nicht so zellschädlich ist wie das tellurhaltige (S3). Menadion (MQ) selbst ist tendenziell weniger toxisch als S3 und (bei 50 μM) S1. Im Weiteren wurde untersucht, ob die Toxizität durch Hemmstoffe beeinflusst wird. Hierzu wurden Zellen zum einen mit Dicumarol, einem Vitamin-K-Antagonisten, und zum anderen mit Hemmstoffen der EGFR-ERK-Signalkaskade vorbehandelt. Dicumarol hemmt die NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase-I (NQOR-I), die Menadion zum Hydrochinon (Menadiol) reduziert, während U0126 die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 durch MEK1/2 hemmt. Der Tab 3.1. ist zu entnehmen, wie die Zellen auf die Behandlung bezüglich der Viabilität reagierten.

Behandlung	Viabilität in % [Stabw (bei n>2) / Bereich (bei n=2)]	n
DMSO (Kontrolle)	100	4
S1 10 µM	101,8 ± 0,5	2
+ Dicumarol	4,5 ± 4,7	3
+ U0126	46,1 ± 21,3	2
S1 50 µM	9,0 ± 8,6	3
+ Dicumarol	3,0 ± 1,9	3
+ U0126	0,5 ± 0,0	2
S3 10 µM	3,1 ± 1,4	3
+ Dicumarol	0,7 ± 0,8	3
+ U0126	1,6 ± 1,0	2
S3 50 µM	0,9 ± 0,5	3
+ Dicumarol	3,0 ± 3,0	4
+ U0126	1,2 ± 0,9	3
Menadion 10 µM	1,1 ± 0,4	2
+ Dicumarol	1,3 ± 0,0	2
+ U0126	11,7 ± 9,9	2
Menadion 50 µM	0,9 ± 0,1	2
+ Dicumarol	1,2 ± 0,1	2
+ U0126	3,3 ± 2,4	2

Tab. 3.1. Toxizität unter Naphthochinonderivatbehandlung nach Vorinkubation mit Dicumarol oder U0126

WB-F344-Rattenleberepithelzellen wurden für 30 min mit 100 µM Dicumarol bzw. 10 µM U0126 vorinkubiert, bevor die Naphthochinonderivate S1 (Phenylselenid des Menadions), S3 (Phenyltellurid des Menadions) oder Menadion (MQ) hinzugegeben wurden und mit und ohne Dicumarol bzw U0126 für 24 h bei 37° C inkubiert wurden. DMSO diente als Kontroll-Lösung.

Tab. 3.1. ist zu entnehmen, dass Dicumarol die Toxizität von S1 und S3 tendenziell erhöht, was für eine protektive Rolle der NQOR spricht, die auch für Menadion beschrieben wurde. Im Gegensatz dazu sieht man keine signifikante Veränderung der Toxizität von S1, S3 oder Menadion durch U0126.

3.2. Aktivierung von ERK1/2 durch Menadion sowie selen- bzw. tellurhaltige Derivate

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Klotz konnte gezeigt werden, dass Menadion in WB-F344-Zellen in die ERK-Signalkaskade eingreift und zur Aktivierung von ERK1/2 führt (Abdelmohsen et al., 2003).

In dieser Arbeit war es das Ziel, herauszufinden, ob die selen- bzw. tellurhaltigen Naphthochinonderivate ebenfalls eine ERK-Aktivierung auslösen würden. Dazu wurden WB-F344-Rattenleberepithelzellen zu einer Konfluenz von 80 bis 100 % herangezüchtet und für 24 h ausgehungert, d.h. unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor im abgedunkelten Raum 1 ml der in serumfreiem Zellkulturmedium (DMEM) verdünnten Naphthochinonderivate S1 bis S4 und Menadion, je in den Konzentrationen 10 μM und 50 μM , für 30 bzw. 60 min aufgetragen wurde. Als Kontrolle diente in entsprechender Verdünnung eingesetztes DMSO, da die Stammlösungen der Naphthochinonderivate in DMSO angesetzt waren.

Die Westernblot-Analyse ergab, dass alle eingesetzten Naphthochinonderivate bei einer Einwirkzeit von 30 min zur starken Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1 und ERK2 führen (siehe Abb. 3.2.). Das Ausmaß der Aktivierung von ERK1/2 durch 50 μM Naphthochinonderivat ging hierbei weit über die Intensität der Aktivierung durch 10 μM hinaus. Der Verlust der Gesamt-ERK1/2-Banden bei gleichzeitiger Phosphorylierung von ERK1/2 (Spuren 7-11) ist aus ungeklärten Gründen oftmals dann zu sehen, wenn die Phosphorylierung sehr intensiv ist.

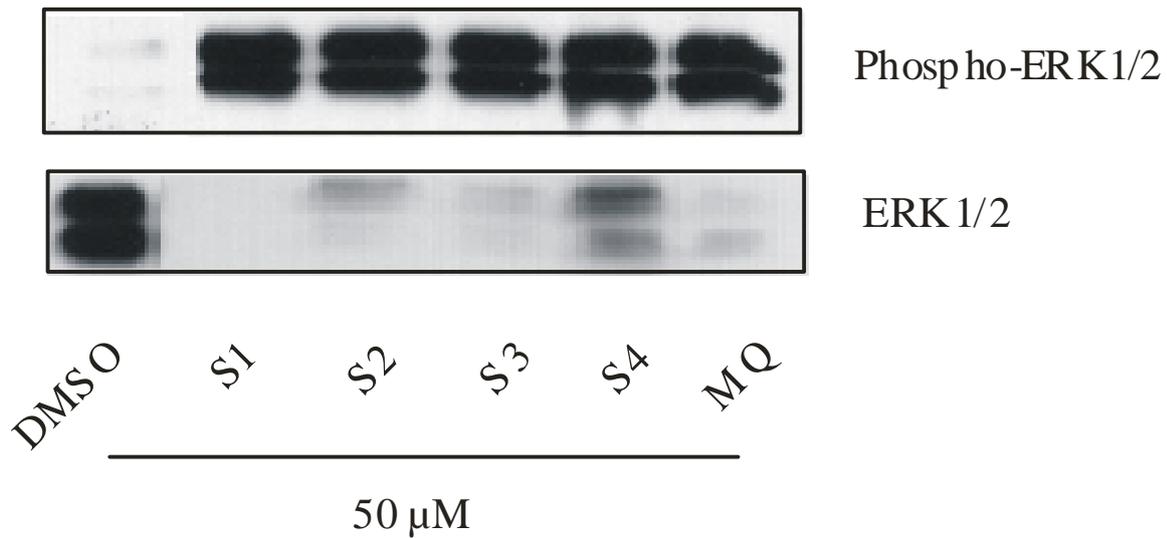


Abb. 3.2. Aktivierung von ERK1/2 durch Menadion und Menadionderivate

WB-F344-Rattenleberepithelzellen wurden mit den Naphthochinonderivaten S1 bis S4 (S1 und S2 selenhaltig, S3 und S4 tellurhaltig) und Menadion (MQ) in den angegebenen Konzentrationen für **30 min** inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der ERK1/2-Phosphorylierung mittels Westernblot gemäß Kap. 2.2.3. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ Experimente mit gleichem Ergebnis.

Nach 60 min Einwirkzeit fiel auf, dass in 2 von 3 Experimenten die ERK-Phosphorylierung unter Belastung mit 10 µM S1 deutlich intensiver war als bei den übrigen Naphthochinonderivaten. In hohen Konzentrationen (50 µM) ist die ERK-Phosphorylierung bei allen Menadionderivaten gleichermaßen intensiv.

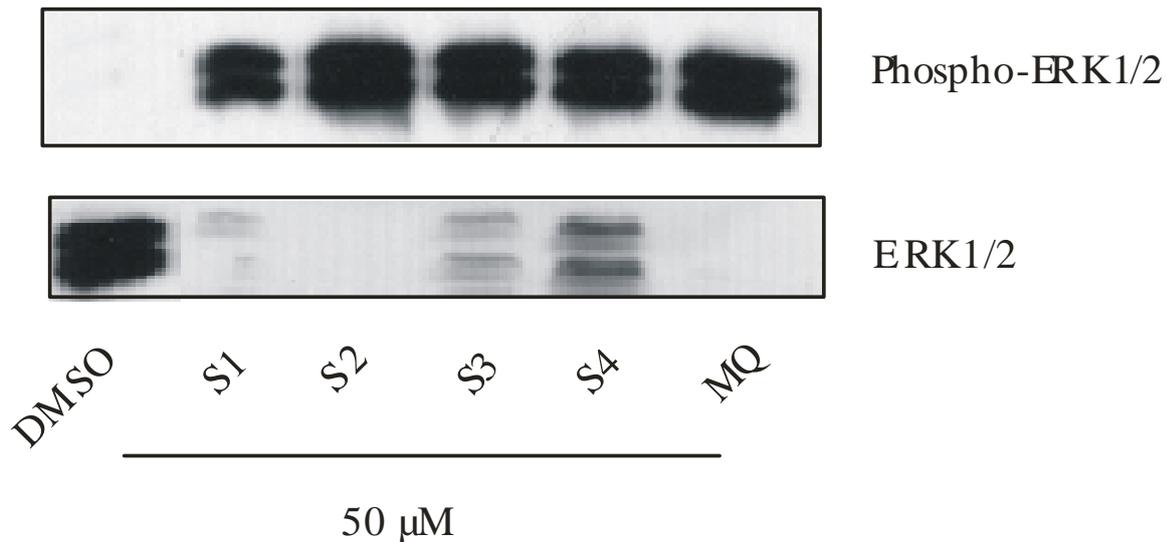


Abb. 3.3. Aktivierung von ERK1/2 nach 60 minütiger Einwirkzeit von Menadion und Menadionderivaten
WB-F344-Zellen wurden mit den angegebenen Naphthochinonderivaten [S1 und S2 (selenhaltig) und S3 und S4 (tellurhaltig)] und Menadion (MQ) mit den oben genannten Konzentrationen für **60 min** inkubiert. Anschließend erfolgte die Darstellung der ERK1/2-Phosphorylierung nach Westernblotanalyse gemäß Kap. 2.2.3. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 3$ Experimente mit gleichem Ergebnis.

3.3. Modulation der durch Naphthochinone induzierten Aktivierung von ERK1/2 durch Kinasehemmstoffe

Um herauszufinden, auf welchem Wege die Aktivierung von ERK1/2 nach Belastung von Zellen mit S1 bis S4 stattfindet, wurden Inhibitoren mit jeweils unterschiedlichen Angriffspunkten eingesetzt, AG1478 und Compound 56 (Hemmstoffe der EGFR-Tyrosinkinase) sowie U0126 und PD98059 (MEK1/2-Inhibitoren). Dazu wurden WB-F344-Zellen angezüchtet und nach Erreichen einer 80 bis 100 % igen Konfluenz für 24 h ausgehungert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen. Es folgte eine 30 minütige Vorinkubation mit MEK- bzw. EGFR-Inhibitoren.

Dafür wurden die Zellen mit U0126, AG1478 oder C56 (je 10 µM) bzw. PD98059 (50 µM) inkubiert. Anschließend wurden die Naphthochinonderivate S1 bis S4 oder Menadion direkt aus der jeweiligen Stammlösung auf eine Endkonzentration von 50 µM hinzu pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100 µl eines Laemmli-puffergemisches lysiert.

Nach Westernblotanalyse zeigte sich die in Abb. 3.4. dargestellte Aktivierung von ERK1 und ERK2 durch die Naphthochinone.

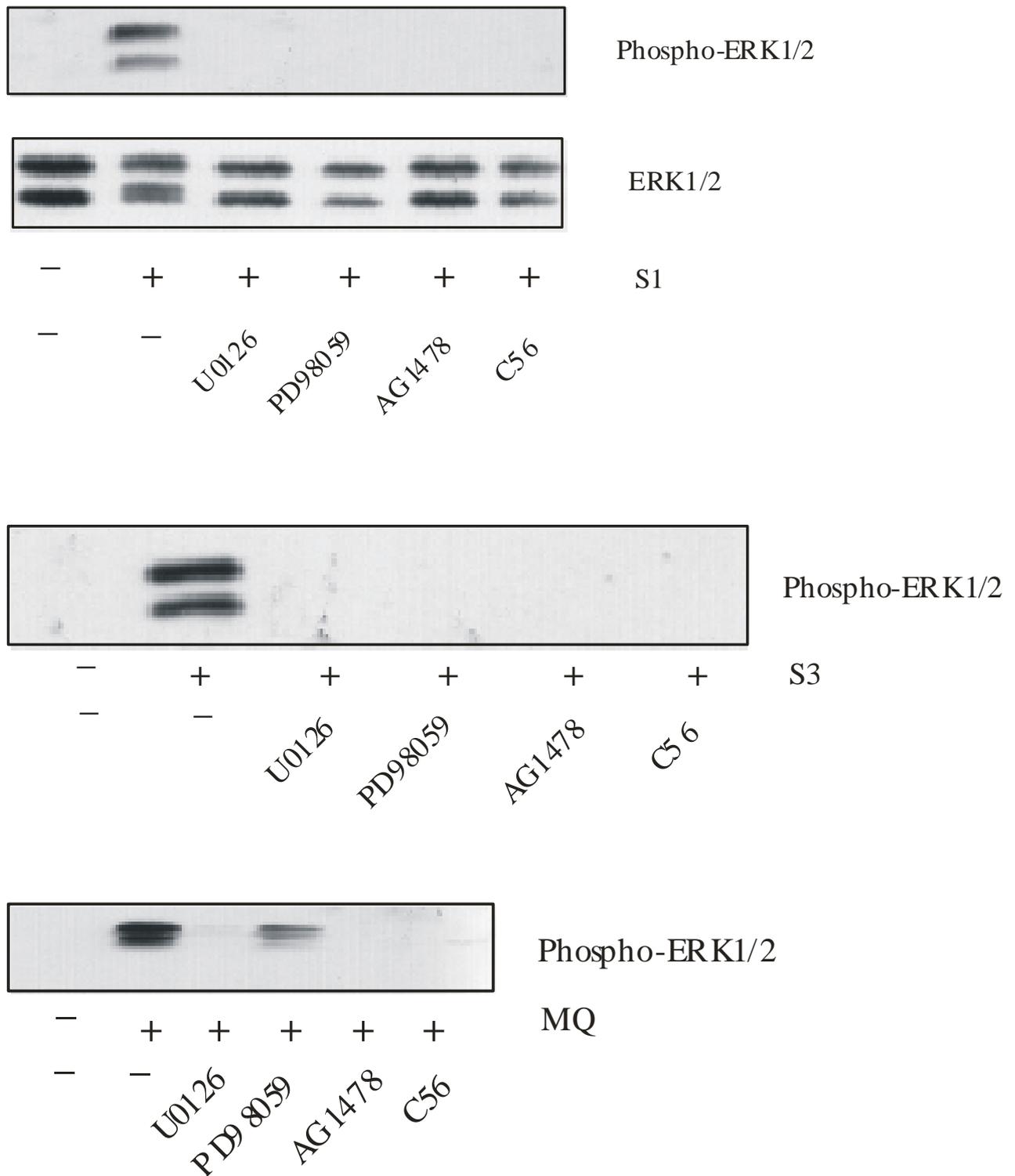


Abb. 3.4. Hemmung der durch Naphthochinone induzierten ERK-Phosphorylierung durch Inhibitorbehandlung bei selen- und tellurhaltigen Naphthochinonderivaten im Vergleich zu Menadion
 30 minütige Vorinkubation von WB-F344-Rattenleberepithelzellen mit den angegebenen Inhibitoren wurden selen- bzw. tellurhaltige Naphthochinonderivate zu hier stellvertretend S1 (Phenylenid des Menadions) S3 (Phenyltellurid des Menadions) und Menadion (MQ) in einer Konzentration von 50 μ M für weitere 30 min hinzugegeben bevor ERK-Aktivierung per Western Blot nachgewiesen wurde. Die Abbildungen sind repräsentativ für n = 2 Experimente.

Jeder der eingesetzten Hemmstoffe blockierte die durch Naphthochinone induzierte ERK-Aktivierung, was auf die Bedeutung sowohl von EGFR als auch von MEK für die ERK-Phosphorylierung hinweist. Allerdings konnte beim Methoxyphenylselenid des Menadions (S2) und Phenyltellurid des Menadions (S3) in Einzelfällen der Inhibitor PD98059 die ERK-Phosphorylierung nur unvollständig hemmen. Die EGFR-Inhibitoren AG1478 und C56 reduzierten die EGFR-Phosphorylierung bei Substanz 2 und 3 ebenfalls deutlich. Obgleich im Falle des Menadions die Hemmung durch PD98059 nur unvollständig war, ist doch eine deutliche Abschwächung der ERK-Aktivierung feststellbar; dies deutet auf eine Beteiligung von MEK1/2 hin, was durch die vollständige Hemmung der ERK-Aktivierung durch U0126 bestätigt wird. Die Hemmung durch AG1478 und C56 spricht für eine Beteiligung des EGFR.

3.4. Aktivierung des EGF-Rezeptors durch selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate

Die Daten aus Abb. 3.4. sprechen für eine Beteiligung des EGFR an der durch Naphthochinone induzierten ERK-Aktivierung. Entsprechend sollte die Aktivierung des EGFR unter Belastung mit S1 bis S4 bzw. Menadion untersucht werden. WB-F344-Rattenleberepithelzellen wurden für 60 min mit den selen- bzw. tellurhaltigen Naphthochinonderivaten inkubiert und Lysate anschließend auf die Tyrosinphosphorylierung des EGFR hin analysiert (siehe Abb. 3.5.), was eine gesteigerte Phosphorylierung des EGFR an Tyrosin 1068 in exponierten Zellen ergab.

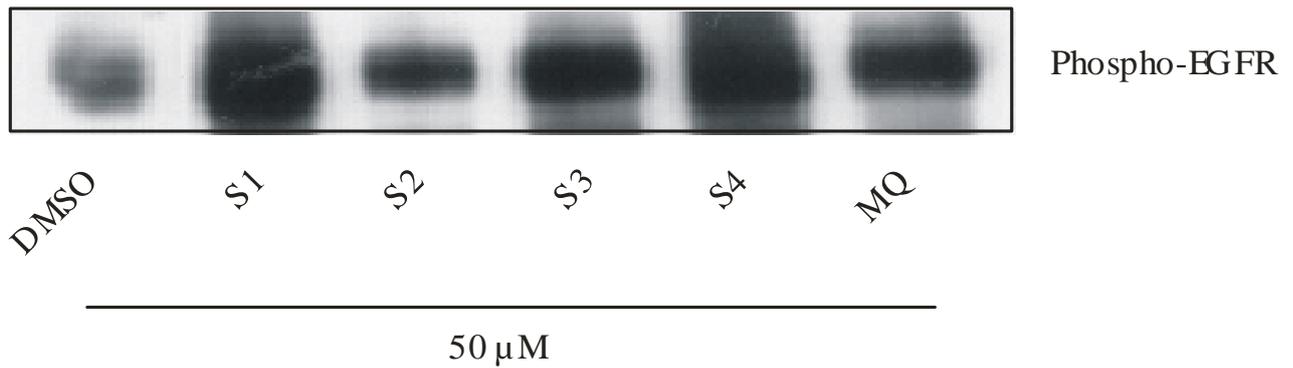


Abb. 3.5. Selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate induzieren die EGFR-Phosphorylierung in WB-F344-Zellen.

WB-F344-Rattenleberepithelzellen wurden in den angezeigten Konzentration mit selenhaltigen (S1 und S2) und tellurhaltigen Naphthochinonderivaten (S3 und S4) sowie Menadion (MQ), jeweils 50 µM Endkonzentration, für 60 min inkubiert. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. Die Untersuchung auf Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR erfolgte durch Westernblot-Analyse. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 2 Experimente.

Nachdem sich gezeigt hatte, dass eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch alle in dieser Arbeit untersuchten Naphthochinonderivate induziert wurde, sollte nun über die Behandlung der Zellen mit spezifischen Inhibitoren geschaut werden, ob die EGF-Rezeptorphosphorylierung selbst aufgehoben werden kann. Dafür wurden WB-Rattenleberepithelzellen für 30 min mit AG1478 und C56 als spezifischen Inhibitoren der EGF-Rezeptortyrosinkinase behandelt. Gleichzeitig wurden die MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 getestet.

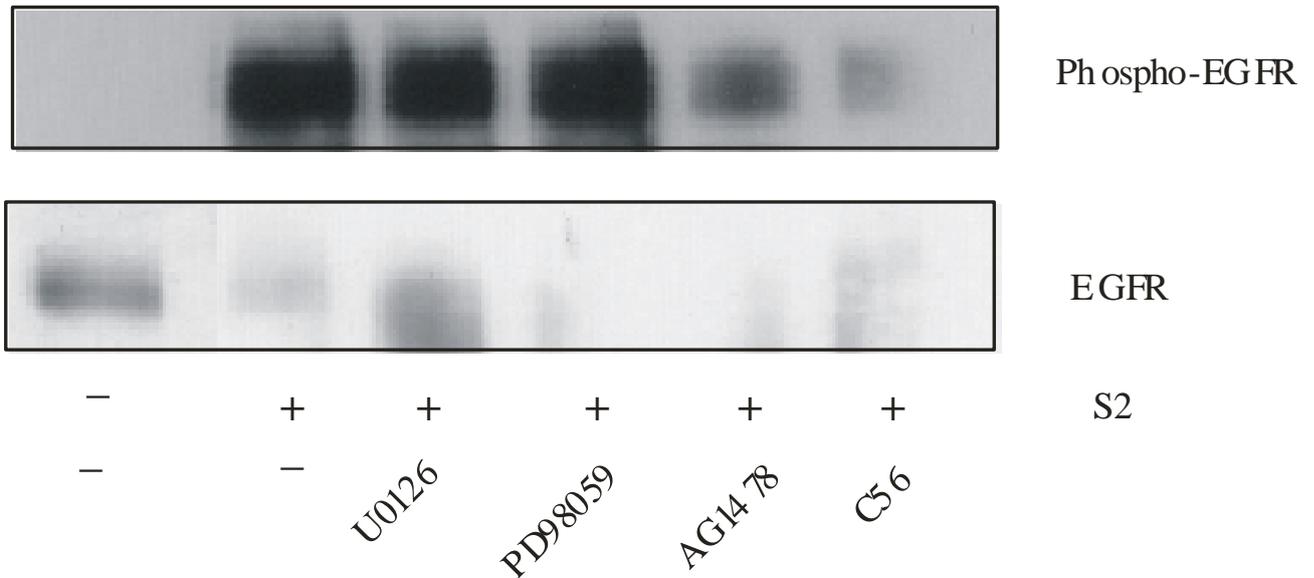


Abb. 3.6. Die durch Naphthochinone induzierte Phosphorylierung des EGFR durch Behandlung mit selenhaltigen Naphthochinonderivaten wird von spezifischen EGFR-Inhibitoren unterdrückt.

WB-F344-Rattenleberepithelzellen mit den angegebenen Inhibitoren wurden selen- bzw. tellurhaltige Naphthochinonderivate zu hier stellvertretend S2 (Methoxyphenylselenid des Menadions) in einer Konzentration von 50 μM für weitere 30 min hinzugegeben bevor EGFR-Aktivierung per Western Blot nachgewiesen wurde. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 2$ Experimente.

Stellvertretend für selenhaltige Naphthochinonderivate wurde das Methoxyphenylselenid des Menadions (S2) auf die Effekte der Inhibitoren untersucht (Abb 3.6.). Es zeigte sich, dass MEK-Inhibitoren keine Wirkung auf die EGFR-Phosphorylierung haben, während eine abgeschwächte Phosphorylierung unter der Behandlung mit AG1478 oder C56 von EGFR festzustellen ist.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden für tellurhaltige Naphthochinonderivate die gleichen Beobachtungen gemacht wie bei dem oben beschriebenen selenhaltigen Menadionderivat. Auch hier zeigte sich keine Wirkung auf die EGFR-Phosphorylierung durch U0126 und PD98059 sowie jeweils eine deutlich abgeschwächte EGFR-Phosphorylierung durch AG1478- und C56-Einsatz. Gleiches gilt für Menadion (Abb. 3.7.)

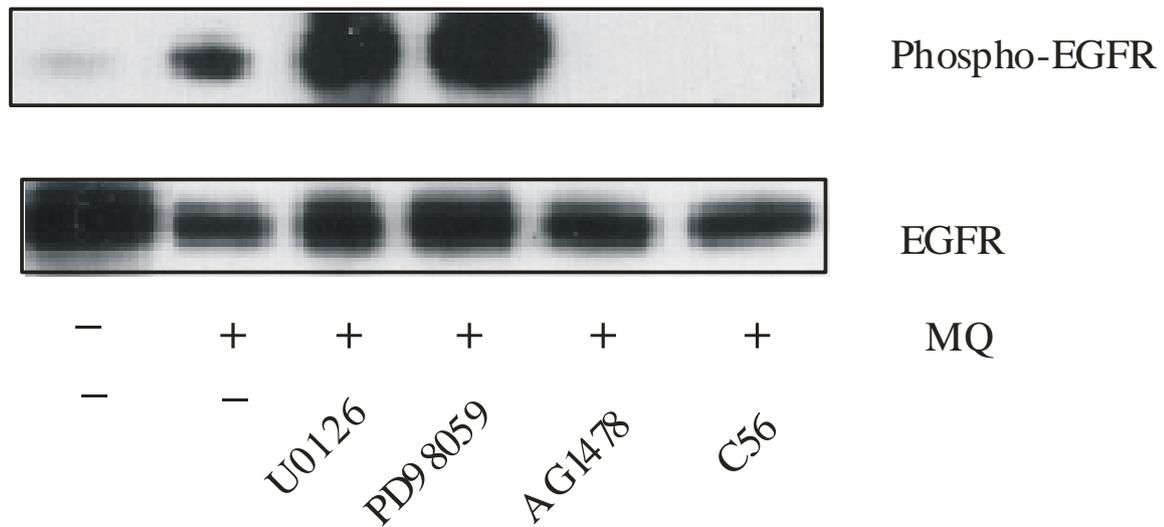


Abb. 3.7. Durch Menadion induzierte Phosphorylierung des EGFR wird von spezifischen EGFR-Inhibitoren unterdrückt.

WB-F344-Rattenleberepithelzellen wurden mit den angegebenen Inhibitoren für 30 min vorinkubiert und anschließend mit Menadion (50 μ M) für weitere 30 min behandelt. Die Abbildung ist repräsentativ für $n = 2$ Experimente.

4. Diskussion

4.1. Aktivierung von ERK1/2 durch selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass selen- wie auch tellurhaltige Naphthochinonderivate eine deutlich sichtbare ERK1/2 Aktivierung erzeugen (siehe Abb. 3.2.). Die ERK1/2-Aktivierung durch Menadion konnte schon durch andere Arbeiten bewiesen werden (Klotz et al, 2002). Es galt die Frage zu beantworten, auf welchem Weg die Aktivierung von ERK1/2 durch die hier untersuchten Menadionderivate abläuft. Es sind folgende Wege der ERK-Aktivierung bereits bekannt

1) Redoxcycling

2) Alkylierung

Für Menadion wurde in anderen Arbeiten gezeigt (Abdelmohsen et al, 2003), dass es zum Teil über Alkylierungsprozesse wirkt, aber auch über Redoxcycling zur ERK1/2-Aktivierung kommt.

Menadionderivate zeigen in niedrigen Konzentrationen von 10 μM bei Phenylselenid des Menadions (S1) keine, bzw. bei Zellbehandlung mit Phenyltellurid des Menadions (S3) eine eingeschränkte Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu sind alle in dieser Arbeit untersuchten Menadionderivate einschließlich Menadion selbst bei 50 μM sehr toxisch, wobei der toxische Effekt mit der Konzentration der Substanzen zunimmt. Für Menadion und andere Naphthochinone wie p-Benzochinon und 2,3-Dimethoxynaphthochinon ist dieser Effekt schon im Rahmen eines andersartigen Toxizitätstests (MTT-Test) gezeigt worden (Abdelmohsen et al., 2003), wobei Menadion im Vergleich toxischer war als die anderen in Arbeit von Abdelmohsen untersuchten Naphthochinonderivate. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Menadion im Vergleich zu selen- bzw. tellurhaltigen Naphthochinonderivaten weniger toxisch ist. Die Vorbehandlung der Zellen mit Dicumarol, einem Hemmstoff der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (siehe Tab. 3.1.), ergab, dass Dicumarol nur einen sehr geringen Einfluss auf die Viabilität nach anschließender Naphthochinonbehandlung hatte. Man sieht bei selenhaltigen Naphthochinonderivaten eine geringe Zelltodverstärkung. Bei Zellen, die mit tellurhaltigen Naphthochinonen behandelt wurden, starben diese nur bei Behandlung mit niedriger Konzentration (S3, 10 μM) unter Dicumarol-Einfluss. Bei der Behandlung mit Menadion selbst zeigte eine Viabilitätszunahme

der Zellen unter der Inhibitorbehandlung. Dies entspricht den Ergebnissen in der Arbeit von Abdelmohsen et al, 2003, der die ERK-Aktivierung für Menadion zum großen Teil Alkylierungsprozessen zuschreibt. Somit spricht die Hemmung von Dicumarol auf das Zellwachstum bei selen- und z.T. tellurhaltigen Naphthochinonderivaten eher für Redoxcyclingprozesse, die bei der ERK-Aktivierung eine Rolle spielen.

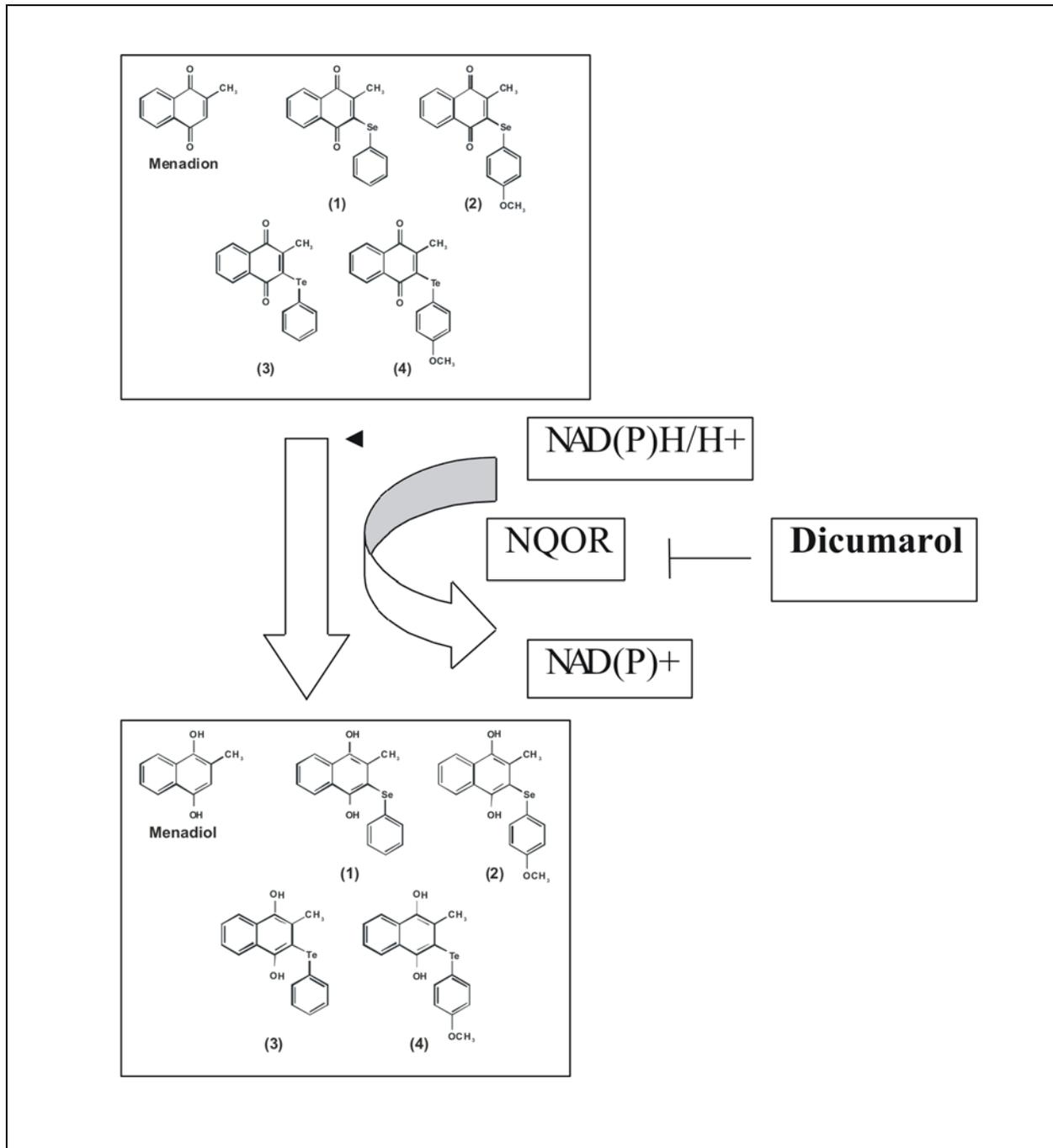


Abb. 4.1. Reduktion von Menadionderivaten durch NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase (NQOR)

Dicumarol verhindert die Reduktion von Menadion zu einem Hydrochinon durch Hemmung der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase. Gleiches wird vermutet für die Menadionderivate 1-4.

4.2. Unterschiede zwischen selen- und tellurhaltigen Naphthochinonderivaten

Als Nächstes sollte die Frage beleuchtet werden, ob Unterschiede im Aktivierungsverhalten zwischen selen- bzw. tellurhaltigen Naphthochinonen zu erkennen sind. Das heisst, gibt es Unterschiede in der Stärke der ERK-Aktivierung in der Gruppe der Menadionderivate? Würde sich eine Substanz mit Selenrest anders verhalten als eine mit Tellurrest, und macht es einen Unterschied in der Aktivierung, wenn der Metallrest als Methoxygruppe oder als Selenid- bzw. Telluridrest vorliegt?

Es konnte gezeigt werden, dass alle Naphthochinonderivate bei einer Konzentration von 50 μM ERK1/2 stark aktivieren, wobei sich bei einem Versuchsdurchlauf das Methoxyphenylselenid des Menadions (S2) einmalig schwächer in der Aktivierung darstellte. Bei längerer Einwirkzeit ergaben sich hier keine Unterschiede (Abb. 3.3.).

In niedrigerer Konzentration erwies sich in der Regel eine insgesamt schwächere ERK1/2-Aktivierung, wobei es scheint, dass das selenhaltige Naphthochinonderivat S1 (Phenylselenid des Menadions) ERK1/2 stärker aktiviert, als tellurhaltige Menadionderivate, als Menadion sowie als das Methoxyphenylselenid des Menadions (S2).

4.3. Vermutete Mechanismen für EGFR-abhängige Signalwege durch Menadionderivate.

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob es eine Auswirkung auf die ERK-Aktivierung durch Einsatz von Inhibitoren gibt und, ob diese dadurch einzelne Signalprozess-Teilschritte für die unbekanntes Menadionderivate aufklären können? In Abb. 3.5. wurde gezeigt, dass alle in dieser Arbeit untersuchten Naphthochinonderivate eine EGFR-Phosphorylierung bewirken, vor allem mit einer Konzentration von 50 μM . Da für Menadion die ERK-Aktivierung über EGFR-Phosphorylierung bekannt war, wurde der Verdacht für diese Signalabfolge erhärtet, indem EGFR-spezifische Inhibitoren wie AG1478 und C56 die EGFR-Phosphorylierung wieder aufgehoben haben. Es erwies sich, dass durch MAPK-Inhibitoren keine bzw. nur eine eingeschränkte Hemmung der Phosphorylierung von EGFR zu sehen war. Somit bestätigte

sich der Verdacht, dass auch selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate in ihrer Reaktion dem Menadion gleichen und damit Signalwege für die bis dahin unbekanntes Menadionderivate als wahrscheinlich angenommen werden können (siehe Abb. 4.2.)

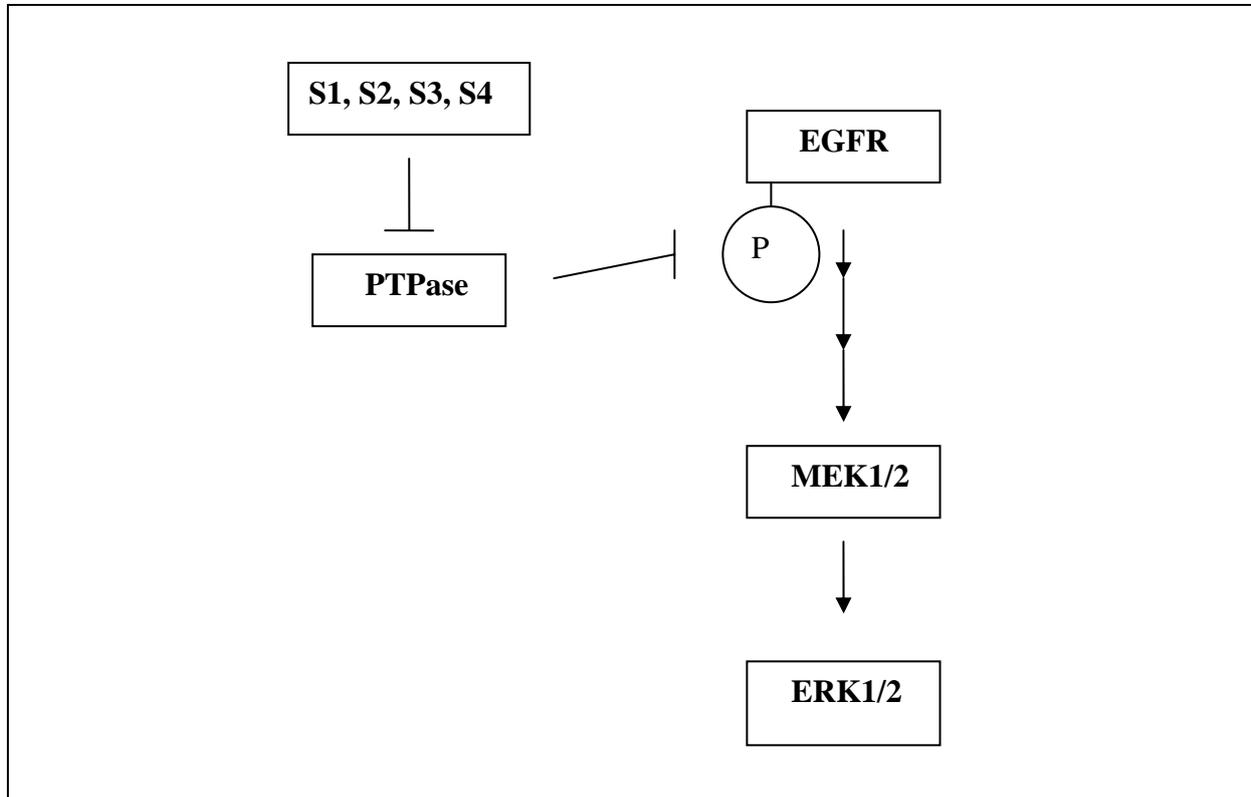


Abb. 4.2. Möglicher Mechanismus der EGFR-Aktivierung bei selen- und tellurhaltigen Naphthochinonderivaten

Vermutlich hemmen selen- sowie tellurhaltige Naphthochinonderivate (S1 und S2, selenhaltig, S3 und S4 tellurhaltig) eine Tyrosinphosphatase (PTPase), so dass der EGF-Rezeptor (EGFR) phosphoryliert werden kann.

Wie in Abb. 4.2. dargestellt ist, hemmen selen- sowie tellurhaltige Naphthochinonderivate eine PTPase, die den EGFR negativ reguliert. Dadurch wird ein Netto-Anstieg der Tyrosinphosphorylierung des EGFR möglich. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade kommt es zur ERK1/2-Aktivierung.

5. Zusammenfassung

Über Reize aus der Umwelt kann Einfluss auf Proliferations- bzw. Apoptoseprozesse von Zellen genommen werden. Pharmakologische Substanzen wie Menadion wurden diesbezüglich in früheren Arbeiten untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass selen- wie auch tellurhaltige Menadionderivate zytotoxisch wirken, wie es auch von der Ursprungssubstanz Menadion bekannt war. Durch Einsatz von Dicumarol, einem Hemmstoff der NAD(P)H:Chinon-Oxidoreductase-I (NQOR-I), gibt es Hinweise darauf, dass selen- bzw. tellurhaltige Naphthochinonderivate über Redoxcyclingprozesse für Zelluntergang verantwortlich sind.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate ERK1/2 aktivieren. Zusätzlich wurde getestet, ob die ERK-Aktivierung dieser Menadionderivate über ligandenunabhängige EGFR-Phosphorylierung ablaufen würde, was sich in den Versuchen auch erwies.

Ein Unterschied zwischen selen- und tellurhaltigen Naphthochinonderivaten konnte generell nicht festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass selen- und tellurhaltige Naphthochinonderivate mit zunehmender Konzentration in ihrer Wirkung auf Rattenleberepithelzellen toxisch wirken, was vermutlich über Redoxcyclingprozesse und damit über Sauerstoffradikalbildung zu erklären ist.

Die Untersuchung der hier eingesetzten Naphthochinonderivate hat Wege beleuchtet, die in der Zellforschung mit Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zellüberleben verknüpft sind und zum Verständnis von pharmakologischen Effekten auf zellulärer Ebene beigetragen haben.

6. Literatur

Abdelmohsen, K. (2003), Gerber, P.A., von Montfort, C., Sies, H., Klotz, L.O.

"Epidermal growth factor receptor is a common mediator of quinone-induced signaling to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases." J.Biol. Chem. 278 (40), 38360-7

Agus, D. B., Bunn, P. A., Frankling, W. (2000).

"HER-2/neu as a therapeutic target in non-small cell lung cancer." Semin. Oncol. 27, 53-63, (Suppl 11)

Anderson, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F.,

Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K. and Moller, N. P.

(2001). "Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains." Mol. Cell. Biol. 21 (21), 7117-7136

Baselga, J. (2002)

"Targeting the epidermal growth factor receptor with tyrosine kinase inhibitors: small molecules, big hopes." J. Clin. Oncol. 20, 2217-2219

Beier, J.I., von Montfort, C., Sies, H. Klotz L.O. (2006)

"Activation of ErbB2 by 2-Methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) in human keratinocytes: role of EGFR and protein tyrosine phosphatases." FEBS Lett. 580, 1859-64

Briviba, K., Sies, H., Klotz, L. O., Sharov, S., Assmann, A. (1998)

"Protection against peroxynitrite by Selenoproteins."

Z. Naturforsch. 53 (3-4), 228-32

Cadena, D. L., and Gill, G. N. (1992). "Receptor tyrosine kinases." FASEB J. 6, 2332-2337

Ciardiello, F. and Tortora, G. (2001). "A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor." Clin. Cancer Res. 7, 2958-2970

Döpp, R., Blankenagel, D. (1979) " Zur thermischen Analyse von Temperguss und Grauguss." Giesserei 66,182-186

Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q. and Holbrook, N. J. (1996).
"Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury." J. Biol. Chem. 41, 38-42

Kar, S., Adachi, T. and Carr, B. I. (2002). "EGFR-independent activation of ERK1/2 mediates growth inhibition by a PTPase antagonizing K-vitamin analog." J. Cell Physiol. 190 (3), 356-64.

Klotz, L. O., Patak, P., Ale-Agha, N. Buchczyk, D. P., Abdelmohsen, K., Gerber, A., von Montfort, C. and Sies, H. (2002)
"2-Methyl-1,4-naphthoquinone, Vitamin K₃, Decreases Gap-Junctional Intercellular Communication via Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor/Extracellular Signal-regulated Kinase Cascade1."
Cancer Res. 62, 4922-4928

Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (2002). "MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?" Nat Rev Mol Cell Bio 3 (1),30-40.

Mayer, H. und Isler, O. (1971). "Synthesis of vitamins K." Methods in Enzymology. Vol. 18C, 491-547

Melchheier, I., von Montfort, C., Stuhlmann, D., Sies, H. und Klotz, L.O. (2005)
"Chinone-induced Cdc25A inhibition causes ERK-dependent connexin phosphorylation"
Biochem. Biophys. Res. Vol 327, Pages 1016-1023

Mendelsohn, J. (2002) "Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy." Journal of Clinical Oncology. 20 (18), 1-13 Suppl.S

Nutter, L. M. Cheng, A. L., Hung, H. L., Hsieh, R. K., Ngo, E. O., Liu, T. W. (1991).
"Menadion:spectrum aof anticancer aktivity and effects on nucleotide metabolism in human neoplasie cell lines." Biochem.Pharmacol. 41, 1283

Olayoye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., Hynes, N. E. (2000).
"The ErbB signalling network: receptor heterodimerisation in development and cancer."
EMBO J. 19, 3159-3167

Osada, S., Osada, K. and Carr, B. I. (2001). "Tumor cell growth inhibition and extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation by novel K vitamins." J. Mol. Biol 314 (4), 765-72.

Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A. (2001). "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." Endocr. Relat. Cancer 8 (1), 11-31.

Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H.J. (1994).
"Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response." Cell 78 (6), 963-72

Sako , Y., Minighchi, S., Yanagida, T. (2000).
"Single molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells." Nature Cell biol. 2, 168-172

Stevenson, M. A., Pollock, S. S., Coleman, C. N. and Calderwood, S. K. (1994).

"X-irradiation, phorbol esters, and H₂O stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates." Cancer Res. 54 (1), 12-5

Tonks, N. K. and Neel, B. G. (2001).

"Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatase." Curr. Opin. Cell. Biol. 13 (2), 182-95

Wang, X., Martindale, J. L., Liu, Y. and Holbrook, N. J. (1998). "The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival." Biochem. J. 333 (Pt 2), 291-300.

7. Anhang

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Lars Oliver Klotz, für die Vergabe dieses wichtigen und interessanten Arbeitsthemas, seine Geduld und die fachlich herausragende Unterstützung.

Ich danke Herrn Univ.-Prof.Dr.med. Dr.h.c. Helmut Sies, unter seiner Leitung arbeiten und forschen zu dürfen.

Ich möchte mich besonders bei Andrea Borchard bedanken, die mir mit ihrer besonnenen und gewissenhaften Art die Arbeit mit Zellen herangetragen hat und jederzeit ihre Hilfe bereitwillig zur Verfügung gestellt hat.

Ebenso danke ich sehr Elisabeth Sauerbier, die durch ihren kompetenten und fachlichen Weitblick die gewissenhafte Arbeit im Labor möglich gemacht hat.

Bei meiner Arbeitskollegin, Frau Dr. Claudia von Montfort, möchte ich mich besonders für ihre fachliche Kompetenz und ihre freundliche Art bedanken, unter der ein gutes Arbeitsklima in der Zeit Beständigkeit hatte. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Juliane Beier und Herrn Dr. Philipp Walter, die ihre Zeit und ihr Vertrauen in dieser Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt haben.

Ich möchte mich bei Herrn Mike Weber bedanken, der an mich geglaubt hat und mir in schwierigen Zeiten stets beigestanden hat.

Mein Dank gilt auch meinen Freundinnen, Frau Liane Hopmann, die mich durch ihre Anwesenheit erst vervollständigt, und Frau Claudia Steinbeck, deren Verständnis und Beistand ich stets gewiss sein konnte.

Ich danke Herrn Dr. Jürgen Scheer dafür, dass er mich in die Welt der Wissenschaft mitnahm und Lebensziele erweckt hat.

Zuletzt danke ich vor allem meiner Familie, die mir ein absolutes Vorbild ist und mir in jeder Lebenssituation Rückhalt gab: meiner Mutter, deren Güte alles erst ermöglicht hat, meinem Vater, der Vorbild und Ansporn ist, und meinen Geschwistern, an denen ich mich stets orientieren konnte und die mich immer selbstlos unterstützt haben.

Curriculum vitae

Name: Friedburg Döpp
Geburtsdatum: 20.02.1977
Geburtsort: Wuppertal
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstatus: ledig

Schulen:

1983-87 Grundschole Wassermaus in Ennepetal
1987-96 Reichenbach-Gymnasium in Ennepetal

Au-pair:

Okt. 96 - April 97 Marbella, Spanien

Ausbildung:

1997-2000 Kinderkrankenpflegeschole der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
2000 Staatsexamen zur Kinderkrankenschwester in Düsseldorf

Studium:

2000 Medizinstudium an der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
2002 Ärztliche Vorprüfung
2003 Erste Ärztliche Prüfung
2005 Zweite Ärztliche Prüfung
2006 Dritte Ärztliche Prüfung

Assistenzärztin:

2006 Pneumologie Hochgebirgsklinik Davos
2007 Kinderchirurgie Uniklinik Inselspital Bern

Erklärung

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

(Friedburg Döpp)

Düsseldorf, 6. Dezember 2006