

**Wirkmechanistische Untersuchungen zur  
Beeinflussung von zellulären  
Signalübertragungswegen durch  
antineoplastische Substanzen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“  
genehmigte Dissertation (D386)

vorgelegt von  
Diplom-Lebensmittelchemikerin  
**Susanne Meiers**

Betreuer: **Prof. Dr. G. Eisenbrand**

Kaiserslautern 2000

Tag der Wissenschaftlichen Aussprache: 15. Dezember 2000

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Wortmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Februar 1997 und August 2000  
im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der  
Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für seine wohlwollende Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft während meiner Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. R. Wortmann möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Für Veronika und Klaus

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil</b>	3
2.1	<b>Zelluläre Signaltransduktionskaskade</b>	3
2.2	<b>Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK)</b>	4
2.2.1	Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-Rezeptor)	5
2.2.2	Ligandbindung und Rezeptor-Oligomerisierung	6
2.3	<b>Effektorproteine der Rezeptor-Tyrosinkinasen</b>	8
2.3.1	SH2-Domänen	9
2.3.2	SH3-Domänen	10
2.3.3	Grb2-Protein als Adaptermolekül der intrazellulären Signalübertragung	10
2.4	<b>Ras</b>	12
2.5	<b>Die Raf-Kinase als Effektor der Signaltransduktion durch Ras</b>	13
2.6	<b>Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase (MAPKK)</b>	14
2.7	<b>Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)</b>	15
2.8	<b>Der Transkriptionsfaktor Elk1</b>	17
2.9	<b>Untersuchte Substanzklassen</b>	19
2.9.1	Hemmstoffe des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors	19
2.9.2	Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole	20

---

2.9.3	Substituierte Pteridine	22
2.9.4	Flavonoide	24
2.9.4.1	Chalcone	26
2.9.4.2	Isoflavone	30
2.9.4.3	Flavonoide aus <i>Scutellaria baicalensis</i>	31
2.9.4.4	Anthocyanidine	33
<b>3</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Protein-Tyrosinkinase-ELISA</b>	<b>36</b>
4.1.1	Western-Blot	36
4.1.2	Austestung der Antikörperkonzentration	37
4.1.3	Referenzverbindung Tyrphostin AG 1478	39
4.1.3.1	Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs	39
4.1.3.2	Cytotoxizität von Tyrphostin AG 1478	40
4.1.3.3	Beeinflussung des Zellzyklus durch Tyrphostin AG 1478	41
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse des PTK-ELISAs und der Referenzsubstanz Tyrphostin AG 1478	42
<b>4.2</b>	<b>Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Reporter-Gen-Assay</b>	<b>43</b>
4.2.1	Aufbau des MAPK-Reporter-Gen-Assays	43
4.2.2	Plasmide	46
4.2.3	Austestung der Zelllinien und Transfektionsbedingungen für den MAPK-Reporter-Gen-Assay	48
4.2.4	Plasmidkonzentrationen	51
4.2.5	Validierung des MAPK-Reporter-Gen-Testsystems mit Referenzsubstanzen	52
4.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der Etablierung des MAPK-Reporter-Gen-Assay	54

---

<b>4.3 Wirkmechanistische Untersuchung verschiedener Substanzklassen</b>	<b>55</b>
<b>4.3.1 Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole</b>	<b>55</b>
4.3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der wirkmechanistischen Untersuchungen von Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole	57
<b>4.3.2 Substituierte Pteridine</b>	<b>58</b>
4.3.2.1 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs	58
4.3.2.1.1 Modifikation in Position 4 und 7 (Gruppe 1)	58
4.3.2.1.2 Modifikation in Position 6 (Gruppe 2)	61
4.3.2.1.3 Modifikation in Position 2 (Gruppe 3)	62
4.3.2.2 Cytotoxizität	65
4.3.2.3 Hemmung der Elk1-Phosphorylierung	66
4.3.2.4 Untersuchung der PDE4-Aktivität in A 431-Zellen und transfizierten A 431-Zellen	70
4.3.2.5 Untersuchung des Einflusses der Pteridinderivate auf den Zellzyklus	71
4.3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der wirkmechanistischen Untersuchungen substituierter Pteridine	73
<b>4.3.3 Flavonoide</b>	<b>75</b>
4.3.3.1 Chalcone	75
4.3.3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Chalcone	77
4.3.3.2 Isoflavone	78
4.3.3.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Isoflavone	80
4.3.3.3 Flavone aus <i>Scutellaria baicalensis</i>	81
4.3.3.3.1 Cytotoxizität von Baicalein und Baicalin	81
4.3.3.3.2 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs	82
4.3.3.3.3 Hemmung der Elk1-Phosphorylierung	84
4.3.3.3.4 Untersuchungen zum Metabolismus von Baicalin mittels HPLC	89
4.3.3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der <i>Scutellaria baicalensis</i> Flavone	93

4.3.3.4	Anthocyanidine	94
4.3.3.4.1	Cytotoxizität	94
4.3.3.4.2	Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs	95
4.3.3.4.3	Hemmung der Elk1-Phosphorylierung	97
4.3.3.4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Anthocyanidine	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>102</b>
<b>6.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>102</b>
<b>6.2</b>	<b>Material</b>	<b>103</b>
<b>6.3</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>104</b>
<b>6.4</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>106</b>
6.4.1	Zelllinien und Kulturmedien	106
6.4.2	Mediumwechsel	107
6.4.3	Passagieren und Zellzählung	107
6.4.4	Einfrieren und Lagern von Zellen	108
6.4.5	Auftauen von Zellen	108
6.4.6	Zellkultivierung und Zellfixierung auf Objektträger	109
6.4.7	Mycoplasmascreening	109
<b>6.5</b>	<b>Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford</b>	<b>110</b>
<b>6.6</b>	<b>Sulforhodamin B (SRB)-Test</b>	<b>110</b>
<b>6.7</b>	<b>Durchflußzytometrie</b>	<b>112</b>



---

<b>6.8 Isolierung des EGF-Rezeptors</b>	113
6.8.1 Gewinnung von Zellmembranen aus A 431-Zellen	113
6.8.2 Affinitätschromatographie	114
6.8.3 Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Substrat	115
6.8.4 Phosphorylierungsreaktion der EGF-Rezeptor-assoziierten Proteinkinase	115
<b>6.9 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Reporter-Gen-Assay</b>	117
6.9.1 Amplifikation von Plasmiden	117
6.9.1.1 Anlegen einer Übernachtskultur	117
6.9.1.2 Kompetente E. coli DH5 $\alpha$ nach Calciumchlorid-Temperatur-Schock Methode	118
6.9.1.3 Transformation von E. coli DH5 $\alpha$ nach der Hitzeschock-Methode	118
6.9.1.4 Amplifikation eines Plasmids in E. coli DH5 $\alpha$	119
6.9.1.5 Anlegen eines Glycerolstockes	119
6.9.1.6 Durchführung einer Plasmid-Minipräparation	120
6.9.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration	120
6.9.1.8 Überprüfung der amplifizierten Plasmide durch Restriktions-Verdau u. anschließender elektrophoretischer Trennung im Agarosegel	121
6.9.1.9 Plasmidmaxipräparation	123
6.9.2 Prüfung unterschiedlicher Transfektionsmethoden	124
6.9.2.1 Elektroporation	124
6.9.2.2 Polybrene-Dimethylsulfoxid-Methode	126
6.9.2.3 Tfx <sup>TM</sup> -50	128
6.9.2.4 FuGENE <sup>TM</sup> 6	129
6.9.3 Durchführung des Reporter-Gen-Assays in 24-Lochplatten mit FuGENE <sup>TM</sup> 6	129
<b>6.10 Phosphodiesterase (PDE) aus A 431-Zellen und pFR-Luc/pFA2-Elk1 transfizierten A 431-Zellen</b>	130
6.10.1 Zytoplasmatische PDE	131
6.10.2 Partikelgebundene PDE	131

---

6.10.3	Bestimmung der PDE-Aktivität	132
6.10.3.1	cAMP-PDE Assay	132
6.10.3.2	PDE-Hemmassay	133
<b>6.11</b>	<b>Western-Blotting</b>	134
6.11.1	Probenvorbereitung	134
6.11.2	Proteinfällung	135
6.11.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-Page)	135
6.11.4	Proteintransfer und Detektion	136
6.11.5	Immunoblotting	137
<b>6.12</b>	<b>HPLC-Trennverfahren</b>	138
6.12.1	Probenvorbereitung	138
6.12.2	Substanztrennung mittels HPLC	138
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>140</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>154</b>
<b>8.1</b>	<b>Strukturformeln der Bisindolylmaleimide und Indolcarbazole</b>	154
<b>8.2</b>	<b>Strukturformeln der substituierten Pteridine</b>	155
<b>8.3</b>	<b>Strukturformeln der Flavonoide</b>	156
8.3.1	Strukturformeln der Chalcone	156
8.3.1.1	Chalcone der Gruppe I	156
8.3.1.2	Chalcone der Gruppe II	156
8.3.1.3	Khellin u. weitere Derivate mit Strukturhomologien zu Chalconen	156
8.3.2	Strukturformeln der Isoflavone	157
8.3.3	Strukturformeln der Flavone aus <i>Scutellaria baicalensis</i>	158
8.3.4	Strukturformeln der Anthocyanidine	159

<b>Veröffentlichungen aus dieser Arbeit</b>	<b>160</b>
---	------------

<b>Dank</b>	<b>161</b>
-------------	------------

---

## Abkürzungen

Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)]
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Aktivatorprotein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Celsius
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen (cyclin dependent kinases)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dbd	DNA binding domain
DC-TA-46	7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridin
DG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether)-N,N,N,N-tetraessigsäure
ERK	extracellular signal regulated kinase
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
Elk1	Ets like kinase 1
FKS	Fetales Kälberserum
G-Phase	Gap-Phase
GDP	Guanosindiphosphat

---

Glu	Glutaminsäure
Grb2	growth factor receptor binding protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HB-EGF	Heparin-Binding EGF-like growth factor (HB-EGF)
HER	human EGF receptor
HMW	high molecular weight
HPLC	high pressure liquid chromatography
IC <sub>50</sub>	50 % Wachstumshemmung (inhibitory concentration 50 %)
Ig	Immunoglobulin
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphat
K	Kontrolle
kDa	Kilo-Dalton
K <sub>i</sub>	Hemmkonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
Luc	Luciferase
LXFL 529	Lung Xenograft Fiebig Large Cell 529
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MEM	minimal essential medium
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NAF	Neu Activating Factor
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived-growth-factor
PIP2	Phosphoinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

---

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PTK	Protein-Tyrosinkinase
Ras	rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolution per minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SH2	Src homology domain 2
SH3	Src homology domain 3
Sos	son of sevenless
S-Phase	Synthese-Phase
SR 101	Sulforhodamin 101
SRB	Sulforhodamin B
<i>src</i>	humanes Homolog des Onkogens von Rous-Sarkoma-Virus
SRC	Produkt des <i>src</i> -Gens
Tab	Tabelle
TBS	Tris-Puffer (tris buffered saline)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-alpha	transforming growth factor-alpha
TLCK	N- $\alpha$ -p-Tosyl- $\alpha$ -lysyl-chlormethanhydrochlorid
TNF	tumor necrosis factor
TRE	TPA responsive element
TRIS	Tris-(hydroxyethyl)aminomethan
Tween20	Polyethylensorbitan-Monolaurat
Tyr	Tyrosin
U	Unit
UAS	upstream activating sequence

## 1 Einleitung

Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein wichtiger zellulärer Signalübertragungsmechanismus, der eine bedeutende Rolle bei Zellproliferation und Differenzierung spielt. Enzyme wie zum Beispiel Protein-Tyrosinkinasen und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) katalysieren diese Phosphorylierungen. Die Gegenspieler dieser Kinasen, Phosphatasen, halten den Phosphorylierungsstatus in der Zelle auf niedrigem Niveau.

In Tumorzellen sind Onkogenprodukte häufig Bestandteile dieser Signalübertragungswege. Protein-Tyrosinkinasen oder Ras-Proteine werden in vielen humanen Tumoren exprimiert. Gerät das Zusammenspiel zwischen diesen Kinasen und Phosphatasen aus dem Gleichgewicht, so kann dies zu unkontrollierter Proliferation führen. Diese Beobachtung kann z.B. für viele Tumorpromotoren, die über diese Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kaskade wirken, festgestellt werden.

Eine Überexpression von Rezeptoren der Tyrosinkinase-Familie des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) oder eines entsprechenden Wachstumsfaktors konnte bei einer Reihe von Tumoren wie z.B. bei Mamma-, Magen-, Ovarial- oder Cervixcarcinomen festgestellt werden. Diese Überexpression korreliert meist mit einer schlechten Prognose und kürzeren Überlebenszeit der Tumorpatienten (Kohler et al., 1989; Piontek et al., 1993; Khazaie et al., 1993; Bridges, 1996; Davies & Chamberlin, 1996). Dieser zelluläre Signalübertragungsweg stellt daher einen wichtigen Ansatzpunkt für die Forschung neuer antineoplastischer Wirkstoffe dar. Es gibt mehrere mögliche Therapieansätze, um in diese EGFR-MAPK-Signaltransduktionskaskade eingreifen und diese unterbrechen zu können.

So könnte ein Toxin-konjugierter Wachstumsfaktor in einer Tumorzelle, die hohe EGFR-Level aufweist, durch rezeptorvermittelte Endozytose selektiv wirken. Hierbei würde die überproportionale Ligandbindung in der Tumorzelle im Vergleich zu Normalzellen ausgenutzt werden (Davies & Chamberlin, 1996).

Eine Inhibierung der Proliferation in EGFR-positiven Tumoren konnte durch Anwendung von Antikörpern gegen die Ligandbindungsstelle des EGFRs in vitro erzielt werden (Davies & Chamberlin, 1996).

Ein weiterer Ansatzpunkt das Wachstum von Tumorzellen, die den EGFR überexprimieren, zu hemmen, ist die Modulierung der EGFR-Funktion. Zahlreiche Substanzen wie z.B. Tyrophostin AG 1478, Dianilino-Phthalimid CGP 52411 oder einige Flavonoide wie z.B. Genistein, hemmen die EGFR-Funktion (Bridges, 1996; Davies & Chamberlin, 1996).

Aus den Substanzklassen der Indolocarbazole, Bismaleimide, Pteridine oder Flavonoide zeigen einige Substanzen gute wachstumshemmende Eigenschaften am großzelligen Lungenkarzinom LXFL529L oder dem Vulvacarcinom A 431. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit wirkmechanistischen Untersuchungen zu diesen antineoplastischen Substanzen, deren potentiell Target die zelluläre Signaltransduktionskaskade darstellt. Als Ansatzpunkt wurde die Inhibierung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors gewählt. Um Modifikationen des nachgeschalteten Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Weges feststellen zu können wurden weitergehende Untersuchungen in der Zelle durchgeführt.



## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Zelluläre Signaltransduktionskaskade

Extrazelluläre Signale werden über Transmembranrezeptoren in intrazelluläre Signale umgewandelt und in der Zelle weitergeleitet. Die folgende Abbildung gibt einen kurzen Überblick über den Signaltransduktionsweg einer Rezeptor-Tyrosinkinase bis in den Zellkern, der in den folgenden Kapiteln näher beschrieben wird.

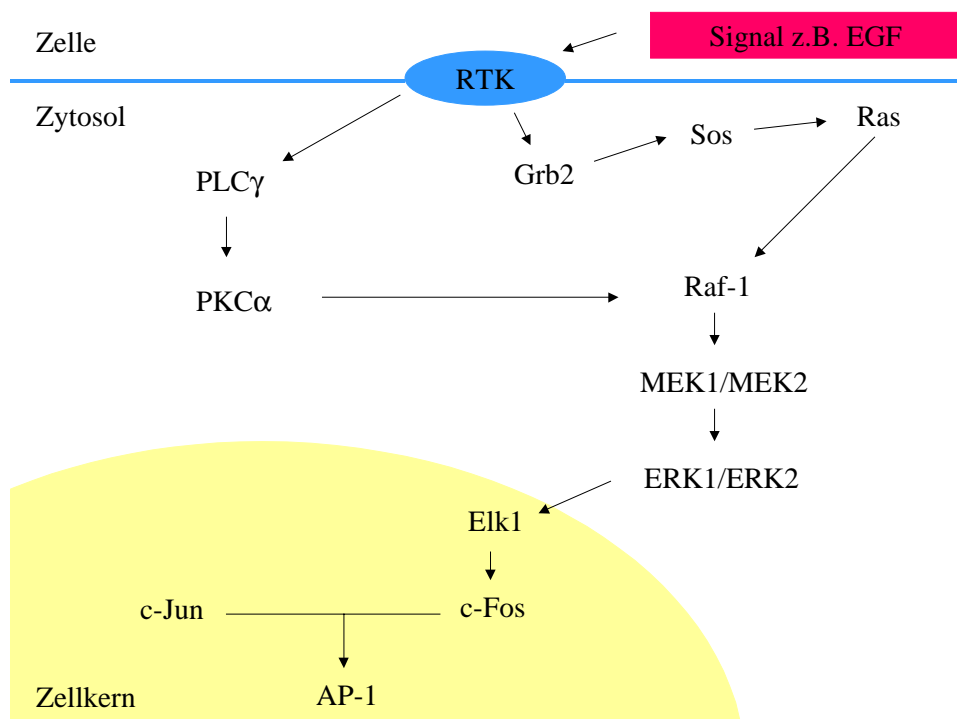


Abb. 2.1: Zelluläre Signaltransduktionskaskade

## 2.2 Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)

Im Regulationssystem von vielzelligen Organismen stellen Polypeptide wie Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren und Hormone entscheidende Komponenten dar. Viele dieser Faktoren binden an Zelloberflächenrezeptoren und aktivieren dadurch die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität (Ullrich & Schlessinger, 1990).

Rezeptoren von Wachstumsfaktoren mit Tyrosinkinase-Aktivität zeichnen sich durch einen ähnlichen Aufbau aus. Sie besitzen alle eine lange glykosylierte, extrazelluläre Ligandbindungsdomäne, eine hydrophobe Transmembranregion und eine zytoplasmatische Domäne, welche die katalytische Tyrosinkinase-Domäne enthält.

Auf der Basis der Sequenzähnlichkeit kann man diese Rezeptoren in Subklassen klassifizieren (Abb. 2.2) (Yarden & Ullrich, 1988; Ullrich & Schlessinger, 1990).

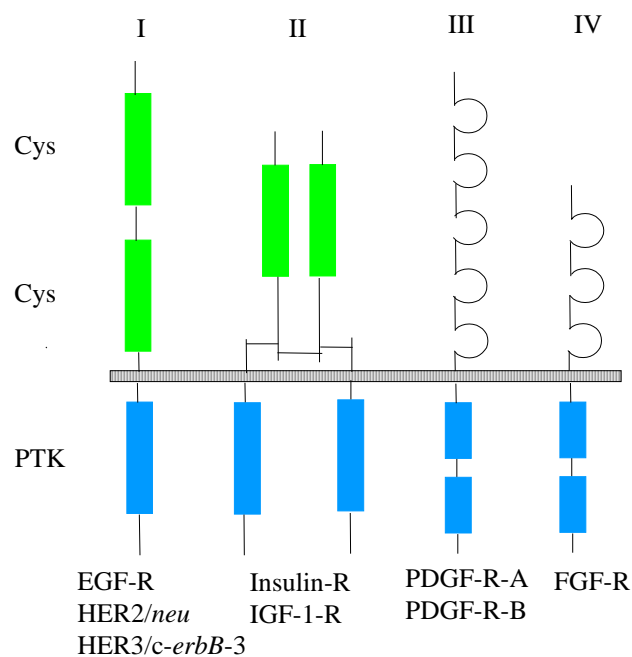


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Rezeptor-Tyrosinkinase-Subklassen

EGF-R: Epidermal growth factor receptor

IGF-1-R: Insulin related growth factor-1-receptor

PDGF-R: Platelet derived growth factor receptor

FGF-R: Fibroblast growth factor receptor

(Yarden & Ullrich, 1988; Ullrich & Schlessinger, 1990)

Das charakteristische Aussehen der Subklasse I besteht aus zwei cysteinreichen Sequenzen in der extrazellulären Domäne des monomeren Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne der Subklasse II besitzt eine disulfidverbrückte  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur mit ähnlichen cysteinreichen Sequenzen. Subklasse III besitzt fünf und Subklasse IV drei Immunglobulin-ähnliche Wiederholungen. Die Tyrosinkinase-Domäne von Subklasse III und IV ist unterbrochen durch eine hydrophile Sequenz unterschiedlicher Länge (Ullrich & Schlessinger, 1990).

### 2.2.1 Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-Rezeptor)

Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) ErbB-1 gehört zusammen mit ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4) zur Substanzklasse I der Rezeptor-Tyrosinkinasen (Lemmon & Schlessinger, 1994; Earp et al., 1995; Heldin, 1995). Es handelt sich um ein aus 3 Domänen bestehendes 170 kDa Transmembran-Glykoprotein, das in den meisten Geweben des Körpers mit einer Anzahl von 20.000-200.000 Rezeptoren pro Zelle vorkommt (Todderud & Carpenter, 1989; Prigent & Lemoine, 1992).

Die 621 Aminosäuren-lange extrazelluläre Domäne ist verantwortlich für die Liganderkennung. Sie besitzt einen hohen Anteil an Cysteinresten, die clusterartig angeordnet sind und durch die potentielle EGF-Bindungsstelle (epidermal growth factor) voneinander getrennt sind (Yarden & Ullrich, 1988; Todderud & Carpenter, 1989; Prigent & Lemoine, 1992).

Diese extrazelluläre Domäne läßt sich nochmals in vier Domänen unterteilen, auf die 12 Asparagin- (N-verknüpft) Glykosylierungsstellen verteilt sind, von denen 10-11 tatsächlich glykosyliert vorliegen (Todderud & Carpenter, 1989; Hsuan et al., 1989).

Die zweite Domäne ist eine 23 Aminosäuren-lange hydrophobe Transmembranregion (Prigent & Lemoine, 1992). Diese ist von der zytoplasmatischen, katalytischen Domäne durch die juxtamembrane Sequenz getrennt.

Die juxtamembrane Sequenz der einzelnen Subklassen ist unterschiedlich, jedoch bei den Mitgliedern derselben Subklasse konserviert (Ullrich & Schlessinger, 1990). In dieser Region ist ein Threoninrest (Thr<sub>654</sub>) enthalten, der die Hauptphosphorylierungsstelle durch die Proteinkinase C darstellt, wodurch ein regulatorischer Einfluß auf die Aktivität des EGFRs ausgeübt werden kann (Yarden & Schlessinger, 1988).

Die dritte Domäne des EGFRs stellt die 542 Aminosäuren-lange intrazelluläre Region dar, welche die hochkonservierte Tyrosinkinase-Domäne enthält (Yarden & Ullrich, 1988; Prigent & Lemoine, 1992). Die Protein-Tyrosinkinase-Domäne ist der am höchsten konservierte Abschnitt der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Sie enthält die Consensussequenz GlyXGly-XXGlyX (15-20) Lys-721, die Teil der ATP-Bindungsstelle ist. Ein Austausch von Lysin in dieser Sequenz bewirkt den Verlust der Kinaseaktivität sowohl *in vitro*, als auch in lebenden Zellen (Todderud & Carpenter, 1989; Ullrich & Schlessinger, 1990). Rezeptor-Tyrosinkinasen unterscheiden sich vor allem in ihrem carboxyterminalen Ende, das sich auf der intrazellulären Seite befindet. Beim EGF-Rezeptor sind einige Autophosphorylierungsstellen in dieser Region lokalisiert, wodurch Interaktionen des aktivierten EGF-Rezeptors mit Substraten und anderen Proteinen beeinflusst werden können (Yarden & Ullrich, 1988; Margolis et al., 1989; Ullrich & Schlessinger, 1990). Die Rezeptorautophosphorylierung findet in diesem Bereich hauptsächlich an den drei Tyrosinresten Tyr-1068, Tyr-1148 und Tyr-1173 statt (Gill et al., 1987; Yarden & Ullrich, 1988; Prigent & Lemoine, 1992). Die Autophosphorylierungsstellen des EGF-Rezeptors konkurrieren mit exogenen Substraten um die Substratbindungsstelle der Tyrosinkinase-Domäne. Die Autophosphorylierung des EGFRs kann durch gegenseitige Phosphorylierung der Dimere *in vitro* und in lebenden Zellen erfolgen (Ullrich & Schlessinger, 1990). Neben der Aktivierung der eigenen Tyrosinkinase-Aktivität kann es dadurch auch zur Bildung von Bindungsstellen für Effektorproteine, wie zum Beispiel Grb2 (growth factor receptor binding protein) kommen (Cohen et al., 1995).

### **2.2.2 Ligandbindung und Rezeptoroligomerisierung**

Ligandbindung und daraus resultierende Änderung der Konformation der extrazellulären Domäne führt zur Rezeptoroligomerisierung, die die Interaktionen der angrenzenden zyttoplasmatischen Domäne stabilisiert und zur Aktivierung der Kinasefunktion führt. Rezeptoroligomerisierung erlaubt die Übertragung einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne zur zyttoplasmatischen Domäne, ohne daß eine Änderung der Position der Aminosäurereste in der Transmembran-Domäne erforderlich ist (Ullrich & Schlessinger, 1990).

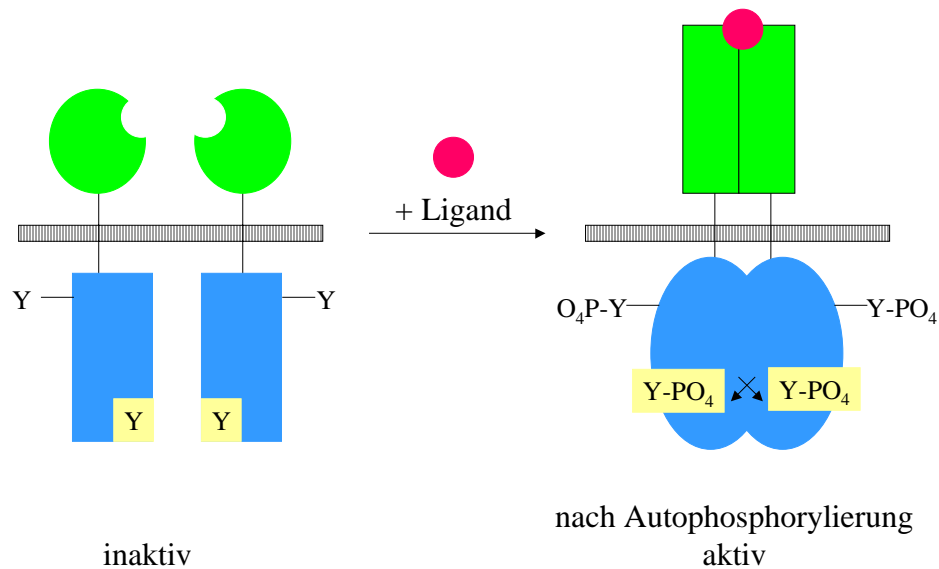


Abb. 2.3: Ligand-induzierte Dimerisierung und Autophosphorylierung (modifiziert nach Krauss, 1997)

Diese Rezeptoroligomerisierung kann durch monomere Liganden wie zum Beispiel EGF oder TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), die eine Konformationsänderung induzieren, ausgelöst werden. Für diese Konformationsänderung des extrazellulären Teils des EGF-Rezeptors ist ein 4-Domänen-Modell vorgeschlagen worden, bei dem die Ligandbindung (EGF) über die Spalte zwischen Domäne I und III erfolgt. Domäne II und IV, die die cysteinreichen Domänen darstellen, befinden sich nahe der Plasmamembran (Ullrich & Schlessinger, 1990). Oligomerisierte Wachstumsfaktorrezeptoren besitzen erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität und höhere Ligandbindungsaffinität (Schlessinger, 1988). Rezeptor-Tyrosinkinasen katalysieren die Phosphorylierung eines exogenen Substrates ebenso wie die Phosphorylierung von Tyrosinresten in ihrer eigenen Polypeptidkette.

Durch Ligand-induzierte Oligomerisierung ist die Bildung von Heterodimeren zwischen den einzelnen Subtypen einer Rezeptor-Tyrosinkinase-Subklasse möglich, wodurch die Vielfalt und Regulation von Signalwegen erhöht und moduliert werden kann. Heterodimerisierung der extrazellulären Domäne erhöht die Möglichkeiten der Ligand-Rezeptor-Interaktionen, während eine Heterodimerisierung der zyttoplasmatischen Domänen die Variation der SH2-Domänen-haltigen Signalmolekülen, die an diesen Rezeptor binden können, erhöht (Lemmon & Schlessinger, 1994).

## 2.3 Effektorproteine der Rezeptor-Tyrosinkinasen

Effektorproteine treten in Wechselwirkung mit aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen und tragen somit zur Verzweigung und Variabilität der Signalübertragung bei. Zu den wichtigsten Effektormolekülen von Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören Grb2, die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI(3)-Kinase), die Phospholipase C- $\gamma$ , zytoplasmatische Tyrosinkinasen der Src-Familie, p120-GTPase aktivierendes Protein (p120-GAP) und Tyrosin-spezifische-Proteinphosphatase SH-PTP2. Je nach Effektorprotein kann eine Aktivierung durch Phosphorylierung an Tyrosinresten, durch Induktion einer Konformationsänderung oder durch Translokation zur Plasmamembran erfolgen. Die Wechselwirkung des Effektorproteins mit der Rezeptor-Tyrosinkinase erfolgt über seine SH2 (Src-Homolog)-Domäne (Krauss, 1997).

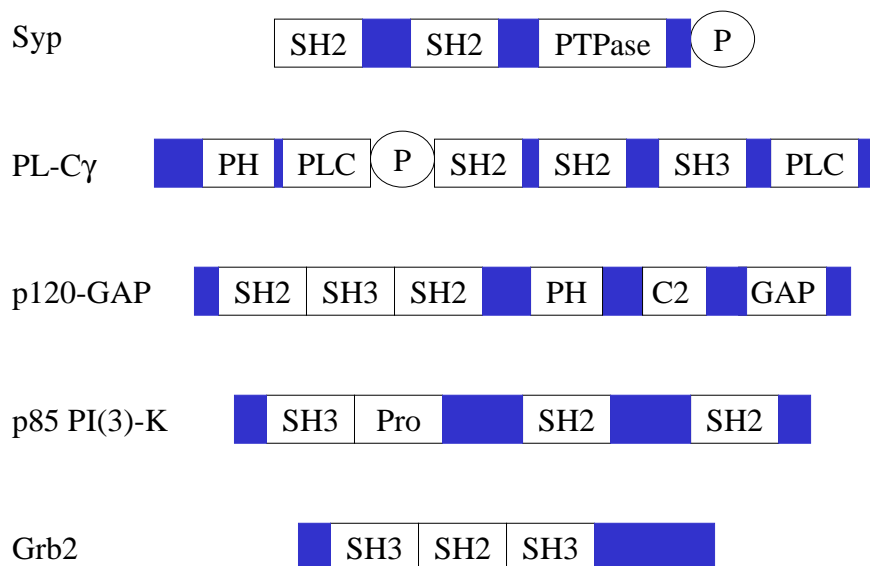


Abb. 2.4: Einige Signalproteine mit ihren Proteinmodulen

- Syp: Syp-Protein-Tyrosinphosphatase  
 SH2-SH3: Src-Homologie-Regionen 2 und 3  
 PTPase: Proteintyrosin-Phosphatase  
 P: Phosphotyrosin-haltige Bindungsstelle für SH2-Domänen  
 PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne  
 PLC: katalytische Domäne der Phospholipase  
 GAP: GTPase aktivierende Domäne  
 Pro: Prolin-reiche SH3-Bindungsstelle

C2: C2 Domäne

(modifiziert nach: Krauss, 1997; Cohen et al., 1995; Gawler, 1998)

### 2.3.1 SH2-Domänen

SH2-Domänen lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen, die sich in der Sequenzanforderung an ihre Substrate unterscheiden (Krauss, 1997). Die SH2-Domäne erkennt spezifisch Phosphotyrosinreste und deren Sequenzumgebung in Zielproteinen. Bei allen SH2-Domänen ist die Phosphotyrosin-Bindungstasche konserviert. Die Spezifität von SH2-Domänen wird durch drei Reste X-X-X, die sich im carboxyterminalen Bereich zum Phosphotyrosin pTyr-X-X-X befinden, erzielt. Durch synthetische Phosphotyrosin-Peptid-Bibliotheken, die sich in diesen Positionen unterscheiden, kann man optimale Peptidliganden für SH2-Domänen bestimmen (Pawson, 1995; Songyang et al., 1995). Die meisten SH2-Domänen gehören der Gruppe I an, die Aminosäuren in der Reihenfolge pTyr-hydrophil-hydrophil-hydrophob bevorzugen. SH2-Domänen der Gruppe II wählen die Sequenz pTyr-hydrophob-X-hydrophob aus (Cohen et al., 1995).

Bindet ein SH2-haltiges Signalprotein an eine aktivierte Rezeptorkinase, so findet eine Änderung der subzellulären Lokalisation statt, indem das Signalprotein zur Membran und damit in die Nähe des Zielproteines gebracht wird. Die Substrate für die Phospholipase C- $\gamma$  und die PI(3)-Kinase befinden sich in der Zytoplasmamembran. Die Targets für GAP und Grb2-Sos (Sos: son of sevenless) (siehe 2.3.3) befinden sich ebenfalls in oder an der Membran lokalisiert. SH2-haltige Proteine können auch selbst Substrate für Tyrosinkinasen darstellen und durch eine Bindung an eine aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinase zur somit erhöhten Aktivität des Enzyms führen. Beispiele hierfür sind die PI(3)-Kinase und Phospholipase C- $\gamma$ , bei denen man annimmt, daß es sich um einen allosterischen Mechanismus handelt (Cohen et al., 1995).

### 2.3.2 SH3-Domänen

Die SH3-Domänen kommen ebenfalls in vielen Signalproteinen vor und stellen damit Kopplungsmodule dar. SH3-Domänen binden Liganden über prolinreiche Sequenzen von ca. 10 Aminosäuren, prolinreiche Peptide stellen ebenso sehr gute Bindungssubstrate dar. Eine Erhöhung der Spezifität und Selektivität von Tyrosinkinasen scheint durch spezifische Kopplung von Substraten an Tyrosinkinasen über die SH3-Domäne zu erfolgen (Cohen et al., 1995; Krauss, 1997).

### 2.3.3 Grb2-Protein als Adaptermolekül der intrazellulären Signalübertragung

Grb2-Protein (Growth factor receptor binding protein) stellt ein Adaptermolekül dar, über dessen Proteinmodule es zu Protein-Protein-Wechselwirkungen kommt und damit zur Verknüpfung von zellulären Signalen. Es besteht aus einer SH2-Domäne, die von zwei SH3-Domänen umgeben ist. Die SH3-Domäne von Grb2 bindet an prolinreiche Sequenzen im C-terminalen Teil des Ras-Nucleotid austauschfaktors Sos. Die Bindung erfolgt mit hoher Affinität an eine kurze Sequenz von Sos. An kürzeren prolinreichen Peptiden kann ebenfalls eine Bindung detektiert werden. Die SH2-Domäne von Grb2 erkennt  $Y_xN_x$ -Muster und bindet mit hoher Affinität die optimale Sequenz YVNV (Chardin et al., 1995). Aktivierung und Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors kreiert eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne von Grb2 (Cohen et al., 1995). Die Bindung dieser Grb2-Domäne an die Phosphotyrosin-Sequenzen des EGFRs oder anderer Adapterproteine wie z.B. Shc, rekrutiert den Grb2-Sos-Komplex zur Plasmamembran (siehe Abb. 2.5), wo Sos den Nucleotid austausch bei Ras stimuliert (Chardin et al., 1995).



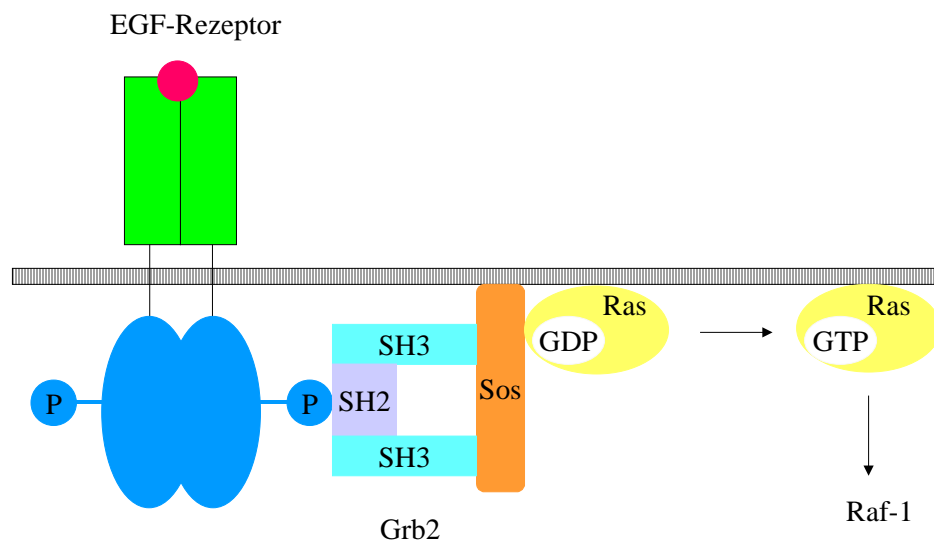


Abb. 2.5: Rekrutierung von Sos zur Plasmamembran führt zur Ras-Aktivierung (modifiziert nach Aronheim et al., 1994)

## 2.4 Ras

Signale von Rezeptor-Tyrosinkinase, Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden über Ras-Proteine weiter zum Zellkern geleitet (Krauss, 1997). Das Ras-Protein (Ras: von rat sarcoma abgeleitet) ist zentrale Schaltstelle in vielen zellulären Signaltransduktionswegen, die Proliferation und Differenzierung steuern (Wittinghofer & Herrmann, 1995).

Ras-Proteine gehören zur Superfamilie der regulatorischen GTPasen, die als Monomere mit einer Größe von 16-25 kDa aktiv sind (Krauss, 1997). Zu den Mitgliedern dieser Ras-Superfamilie gehören Ras (p21<sup>Ras</sup>), Rap, R-Ras und Ral (Wittinghofer & Herrmann, 1995).

Ras, ein GTP-bindendes Protein, das über Farnesyl- und Palmitoyl-Reste an der Innenseite der Zellmembran assoziiert ist, fungiert als molekularer Schalter, der zwischen dem inaktiven GDP-gebundenen und dem aktiven GTP-gebundenen Zustand wechselt (Wittinghofer & Herrmann, 1995). Ohne externe Aktivierung liegt hauptsächlich die GDP-Form vor. Der Nucleotidstatus wird durch Ras-Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (Ras-GEF: Ras-Guanin-nucleotid-exchange factor) und Ras-GTPase-aktivierende Proteine (Ras-GAPs: GTPase-activating protein) kontrolliert. Eine Aktivierung tritt auf, wenn der Guanin-Nucleotid-Austauschfaktor die Nucleotidfreisetzung vom Ras-Protein beschleunigt. Zu den Ras-Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren gehören Cdc25 und Sos (Wittinghofer & Herrmann, 1995; Wittinghofer, 1998). Das Signal wird unterbrochen durch Hydrolyse von GTP. Dies erfolgt durch die intrinsische GTPase Aktivität des GTP-bindenden Proteins (Aronheim et al., 1994). Die GTPase-Reaktion wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigt, die einerseits regulatorische Proteine sein können und andererseits selbst Effektoren, d.h. Proteine, die downstream Signale weiterleiten, darstellen können (siehe Abb. 2.6). Zu dieser Gruppe zählen p120-GAP, Neurofibromin und Gap1 (Wittinghofer & Herrmann, 1995; Wittinghofer et al., 1997; Scheffzek et al., 1997). Der Nucleotidaustausch ist langsamer als die GTP-Hydrolyse und stellt somit den limitierenden Schritt der Ras-Aktivierung dar (Aronheim et al., 1994).

Mutationen an den Aminosäurepositionen 12 (außer ein Austausch von Prolin), 13 oder 61 zeigen ein konstitutiv aktives Ras-Protein, dessen Signalübertragung durch GAPs nicht mehr beeinflußt werden kann (Krauss, 1997).

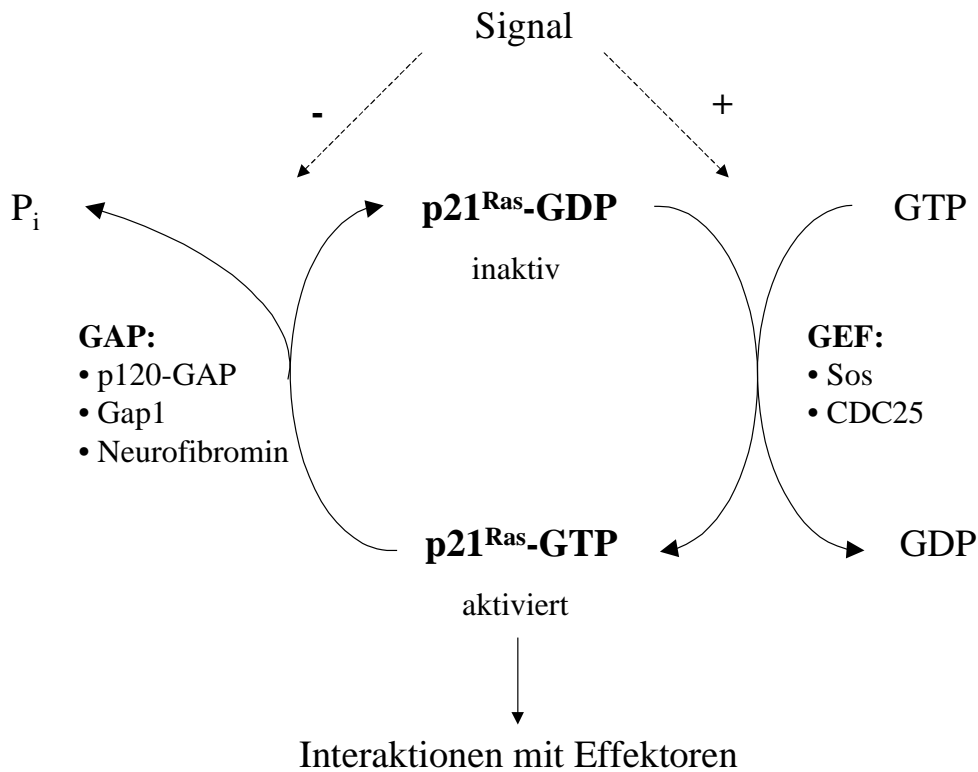


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des p21<sup>Ras</sup>-Zyklus (Wittinghofer & Herrmann, 1995)

Das Ras-Protein stellt ein multifunktionelles Signalprotein dar. Es geht Wechselwirkungen mit der zytoplasmatischen Serin/Threonin-Proteinkinase Raf-1 (siehe 2.5) und der MEK-Kinase (siehe 2.6) ein, und stellt damit einen positiven Regulator der ERK/MAPK-Signaltransduktionskaskade dar. Eine Bindung an die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typ p110-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI(3)-Kinase) ist ebenso beschrieben (Vojtek et al., 1993; Aronheim et al., 1994; Wittinghofer & Herrmann, 1995).

## 2.5 Die Raf-Kinase als Effektor der Signaltransduktion durch Ras

Die Raf-Kinase ist dem Ras-Protein im Signaltransduktionsweg nachgeschaltet (Krauss, 1997). Sie ist das am besten untersuchte Signalmolekül auf der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Kinase-Ebene (MAPKKK oder MAP3K) (siehe Abb. 2.7).

Die Raf-Kinase ist eine 70-75 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinase (Seeger & Krebs, 1995). Säuger besitzen mindestens 3 verschiedene Gene, A-raf, B-raf und c-raf1. Raf-Kinasen besitzen drei konservierte Domänen CR1, CR2 und CR3. Der Domäne CR1 wird eine auto-regulatorische Funktion der Raf-Kinaseaktivität zugeschrieben, deren Verlust zur onkogenen Aktivierung der Raf-Kinase führt. Domäne CR2 besitzt ebenfalls eine regulatorische Funktion. Serin- und Threoninreste in dieser Region dienen als regulatorische Phosphorylierungsstellen. Mutationen in diesem Bereich führen ebenso wie Mutationen in der CR1 Domäne zur onkogenen Aktivierung der Raf-Kinase (Krauss, 1997). Die katalytische Domäne CR3 verfügt über eine ATP- und eine Substratbindungsstelle. Ras interagiert mit der Raf-Kinase über die Domäne CR1. Diese Interaktion benötigt GTP gebundenes Ras (Vojtek et al., 1993).

Nach Stimulation mit verschiedenen Mitogenen erfährt Raf eine transiente Aktivierung innerhalb von 2-3 Minuten (Seeger & Krebs, 1995). Die aktivierte Raf-Kinase und möglicherweise die MAPKKs Mos (von Moloney murine sarcoma abgeleitet) und MEKK1 phosphorylieren und aktivieren die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase (MAPKK) (Aronheim et al., 1994; Cobb et al., 1996).

Das zytosolisch lokalisierte Rap1A-Protein, das eine hohe Homologie im Effektorbereich zum Ras-Protein aufweist, ist in der Lage die Raf-Kinase zu binden. Eine anschließende Translokation zur Zellmembran ist nicht feststellbar, wodurch dem Rap1A-Protein auch die Funktion eines Antagonisten des Ras-Weges zugesprochen wird (Krauss, 1997).

## **2.6 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase (MAPKK)**

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase (MAPKK oder MEK (MAP/ERK-Kinase)) ist eine konservierte Familie von Serin/Threonin Proteinkinasen, die bislang aus drei hoch homologen (85 %) Formen bestehen. Die MEK-1a steht für die 44-kDa MEK-1, die auch MKK-1a oder MAPKK genannt wird. Die zweite Isoform MEK-1b bezeichnet die 41-kDa MKK-1b, die auch MEK-3 genannt wird. Die dritte Form stellt MEK-2 dar, die 45-kDa groß ist und auch als MKK-2 bezeichnet wird. Weitere Isoformen mit geringerer Homologie sind xMEK-2 und xMEK-3 (Seeger & Krebs, 1995).

Raf-1 phosphoryliert *in vitro* MEK-1 an Serin 218 und 222. Über diese Phosphorylierung wird die MEK-1 aktiviert (siehe Abb. 2.7). Eine Mutation von Serin zu Alanin an einer, oder beiden Stellen, führt zum kompletten Verlust der *in vitro* Aktivierung von MEK-1 durch Raf (Zheng & Guan, 1994; Alessi et al., 1994). Die MEK ist eine dual-spezifische Proteinkinase, die entweder Tyrosin, oder Serin/Threonin spezifisch ist und deren Substrate die MAP Kinase ERK1 und ERK2 (ERK: extrazellulär regulierte Kinase) sind (Cobb et al., 1996).

## 2.7 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase Weg wird durch Hormone und Wachstumsfaktoren stimuliert. Die Regulationsmechanismen dieses Signaltransduktionsweges sind kompliziert und es gibt zahlreiche Inaktivierungsmöglichkeiten (Cobb et al., 1996).

In Säugern zählt die MAP Kinase-Familie mehr als zwölf Mitglieder (Canagarajah et al., 1997). Die Proteinkinasen ERK-1 (p44<sup>MAPK</sup>), ERK-2 (p42<sup>MAPK</sup>) und MAPK (p40<sup>MAPK</sup>) gehören zu dieser Gruppe von MAPKs (Seger & Krebs, 1995).

Die MAP Kinase Isoformen ERK-1 und ERK-2 führen Schlüsselereignisse in der Zelle durch, indem sie Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteine, andere Proteinkinasen und Enzyme phosphorylieren (Canagarajah et al., 1997).

Die 3-dimensionale Struktur von ERK-2 enthält die 2-Domänen-Organisation, wie in allen Proteinkinasen, deren Struktur bislang bestimmt wurden. Die erste Domäne ist die kleine N-terminale Domäne, die den Kontakt zu ATP herstellt. Die zweite Domäne ist die größere C-terminale Domäne, die die Haupterkennungsstelle für Proteinsubstrat-Interaktionen darstellt (Cobb et al., 1996). Die Aktivität der MAPK ERK-1 und ERK-2 resultiert aus der zweifach-Phosphorylierung, der dual-spezifischen Proteinkinase MEK1 und MEK2 im TXY-Motiv, das bei den meisten MAPKs vorhanden ist (Seger & Krebs, 1995). Die Phosphorylierung an Tyrosin 185 und an Threonin 183 reguliert die Aktivität, die dabei 1000-fach gesteigert wird (Cobb et al., 1996; Canagarajah et al. 1997). Die nicht phosphorylierte MAPK, oder die nur an Threonin oder Tyrosin phosphorylierte Form, besitzt eine niedrige Aktivität (Cobb et al., 1996).

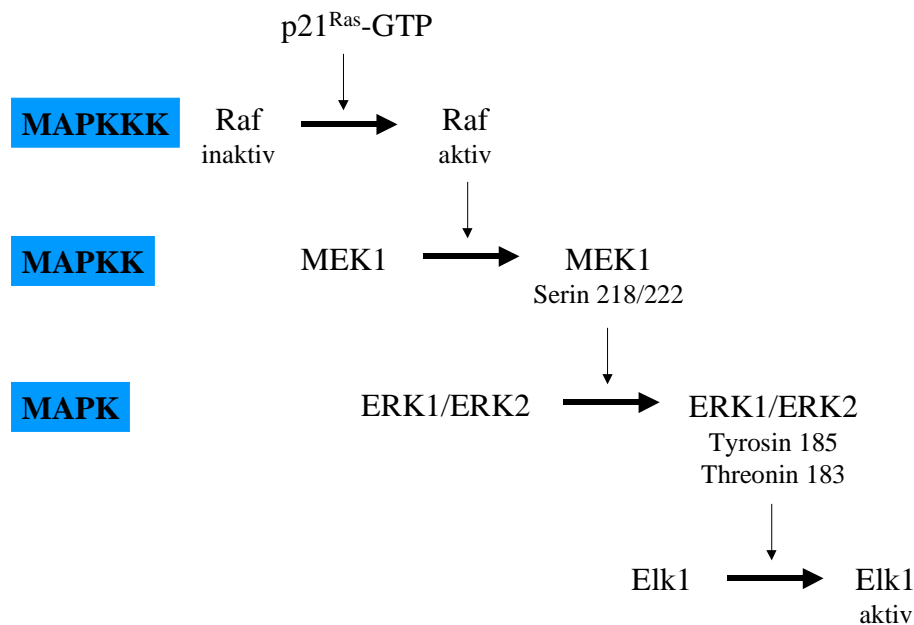


Abb. 2.7: MAPK-Signaltransduktionsweg

MAP Kinasen sind Enzyme, denen regulatorische Domänen, autoinhibitorische Segmente oder regulatorische Subeinheiten fehlen. Trotzdem wird ihre Aktivität genau kontrolliert. Sie sind hoch spezifisch in ihren Interaktionen mit aktivierenden Enzymen und Substraten, da sie nur ein bestimmtes Spektrum von zellulären Substraten phosphorylieren (Canagarajah et al., 1997). Die ERKs sind Prolin-gerichtete Proteinkinasen, d.h. sie phosphorylieren nur Substrate mit Serin- oder Threoninresten, die sich in der Nachbarschaft zu Prolin befinden (Cobb et al., 1996; Canagarajah et al., 1997). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro ist die häufigste Consensussequenz der Substraterkennung durch ERK-1 und ERK-2 (Seger & Krebs, 1995).

Transkriptionsfaktoren und andere nukleäre Proteine sind Substrate der ERKs, wodurch ihre Rolle als wichtige Regulatoren der nukleären Transkriptionsaktivität verdeutlicht wird. Proteine, upstream der MAPK in der MAPK-Kaskade, wie z.B. der EGF-Rezeptor, Sos, Raf-1 oder MEK stellen gute Substrate für die ERKs dar (Seger & Krebs, 1995). So wird zum Beispiel die C-terminale Region von Sos durch MAPK phosphoryliert und damit die Fähigkeit von Sos reduziert mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu interagieren (Gawler, 1998). Die Phosphorylierung dieser upstream-Komponenten durch die ERKs wird als Feedback-Mechanismus bezeichnet.

Eine andere, wichtige Gruppe von ERK-1 und ERK-2 Substraten sind Zytoskelettelemente wie z.B. Mikrotubuli assoziierte Proteine-1 (MAP-1), MAP-2, Tau etc.. Ihre Phosphorylierung durch ERK scheint die Reorganisation des Zytoskelettes und die Zellmorphologie zu regulieren (Seger & Krebs, 1995).

Während nach Stimulation MEK1 und MEK2 permanent im Zytosol verbleiben, erfolgt eine Translokation der aktiven Form von ERK-1 und ERK-2 vom Zytosol zum Nukleus (Brunet et al., 1999).

Da Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung zur Aktivierung der MAP Kinase erforderlich sind, gibt es drei Typen von Phosphatasen, die sie inaktivieren können. Die dual-spezifische Phosphatase, die Phosphoserin/-threonin-Phosphatase oder die Phosphotyrosin-Phosphatase können zum Aktivitätsverlust führen (Cobb et al., 1996; Canagarajah et al., 1997; Brunet et al., 1999). MAPK-Dephosphorylierung und -Inaktivierung kann im Nukleus und im Zytoplasma stattfinden (Brunet et al., 1999). Ebenso führt ein Austausch von Threonin 183 gegen Alanin oder Tyrosin 185 gegen Phenylalanin zum Verlust der ERK-1- und ERK-2-Aktivität (Canagarajah et al., 1997).

Aktivierte ERKs translozieren in den Zellkern, um dort den Komplex TCF/Elk1 (siehe 2.8) zu phosphorylieren. Daraus resultiert die Induktion der c-fos-Transkription (Aronheim et al., 1994).

## **2.8 Der Transkriptionsfaktor Elk1**

Das Serum-Response-Element (SRE) ist ein wichtiges regulatorisches Element in verschiedenen Genen höherer Eukaryonten (z.B. c-fos Promoter) (Treisman, 1992). Bei Zellen, die Wachstumsfaktoren, Cytokine oder Streß ausgesetzt werden, führt die Aktivierung des SRE zum Anstieg der Genexpression (z.B. c-fos) (Marais et al., 1993; Whitmarsh et al., 1995).

Das SRE des c-fos Gens hat eine Bindungsstelle für den Serum-Response-Faktor (SRF) (Treisman, 1992). Der SRF ist ein hochkonserviertes Protein, dessen DNA-Bindungsdomäne Strukturen enthält, die Dimerisierung, sequenzspezifische DNA-Bindung und Interaktionen mit dem ternären Komplexfaktor p62/TCF (ternary complex factor) vermitteln (Treisman,

1992). Am 5' Ende der SRF-Bindungsstelle ist ein Bindungsmotiv für die Ets-Domäne (E-twenty-six-specific), die durch p62/TCF erkannt wird (Treisman, 1992). p62/TCF bildet mit dem SRF den ternären Komplex am SRE von c-fos und führt zum Anstieg der Genexpression (Treisman, 1992; Whitmarsh et al., 1995).

Zwei Ets-Domänproteine Elk1 und SAP-1 (SRF accessory protein-1) haben DNA-Bindungseigenschaften, die ähnlich sind mit p62/TCF (Treisman, 1992; Marais et al., 1993; Whitmarsh et al., 1995).

Elk1 und SRF bilden einen ternären Komplex am SRE von c-fos (Marais et al., 1993). Die Aktivität des SRE ist abhängig von der Bindung des Transkriptionsfaktors und des SRF an das SRE (Marais et al., 1993). In einigen Studien wird diskutiert, daß der ternäre Komplex essentiell ist für die vollständige SRE-Funktion (Marais et al., 1993).

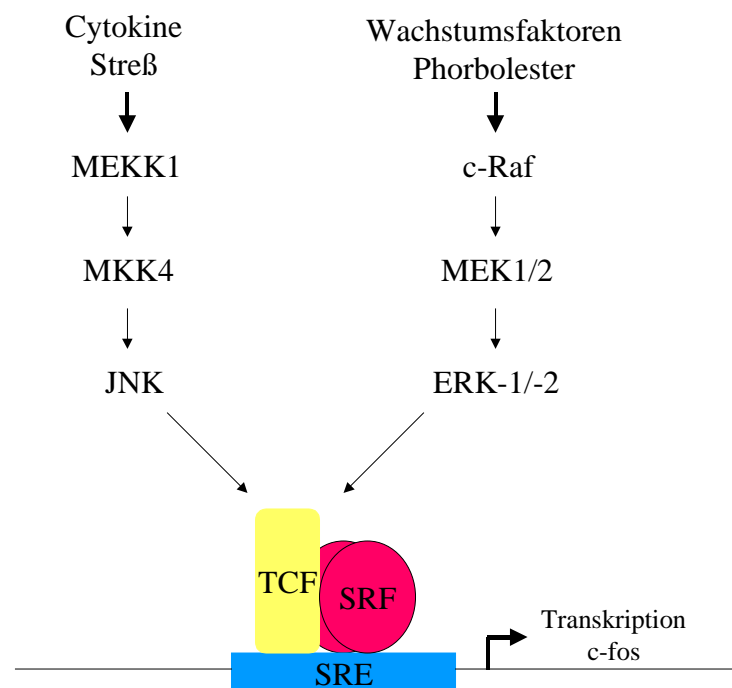


Abb. 2.8: ERK- und JNK-Signaltransduktionswege aktivieren SRE-abhängige Genexpression (Whitmarsh et al., 1995)

Die C-terminale Region von Elk1, die man als regulatorische Aktivierungsdomäne zur Transkription ansieht, wird an verschiedenen Stellen in vitro, aber auch in vivo nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren phosphoryliert (Marais et al., 1993).



Diese Phosphorylierung aktiviert die C-terminale Transkriptions-Aktivierungsdomäne und führt sowohl zu einem Anstieg der DNA-Bindung als auch der Formation des ternären Komplexes (Marais et al., 1993; Whitmarsh et al., 1995). Das TCF-Protein Elk1 wird phosphoryliert durch die MAPKs JNK, ERK-1 und ERK-2 (siehe Abb. 2.7) (Cavigelli et al., 1995; Gille et al., 1995; Price et al., 1995).

Die MAPK phosphoryliert die C-terminale Region von Elk1 an den Positionen Serin 383, 389 und 422 (Marais et al., 1993). Phosphorylierungen durch die MAPK an den Aminosäurepositionen Threonin 363, 368 und 417 scheinen ebenfalls für eine vollständige Aktivierung der Transkription erforderlich zu sein (Marais et al., 1993). Die nukleäre Translokation von MAPK ist für eine Elk1-abhängige Aktivierung erforderlich, da die Phosphorylierung von Elk1 durch MAPK im Zellkern auftritt (Brunet et al., 1999).

## 2.9 Untersuchte Substanzklassen

### 2.9.1 Hemmstoffe des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors

In der Literatur sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Substanzen beschrieben, die die Autophosphorylierung des EGFRs oder der EGFR assoziierten Protein-Tyrosinkinase-Aktivität inhibieren. Quinazoline wie z.B. Tyrphostin AG 1478 (siehe Abb. 2.9) sind hoch selektive Hemmstoffe des EGFRs (Levitzki & Gazit, 1995; Myers, 1998). Tauscht man Chlor gegen Brom im Tyrphostin AG 1478 aus, so erhält man die Substanz PD 153035, einen noch besseren EGFR-Hemmstoff (Fry et al., 1994; Bridges et al., 1996). Tyrphostin AG 1478 wurde als Referenzsubstanz im Sulforhodamin-B-Assay, PTK-ELISA, MAPK-Reportergen-Assay und bei der Durchflußzytometrie eingesetzt.

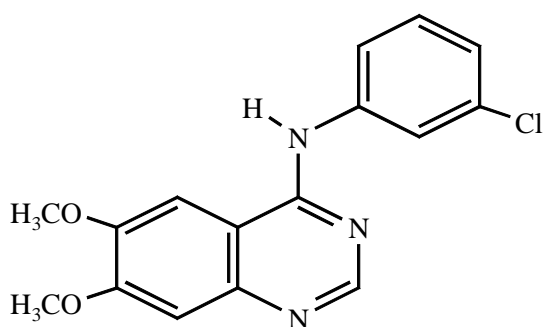


Abb. 2.9: Tyrphostin AG 1478

## 2.9.2 Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole

Protein-Tyrosinkinase-Inhibitoren sind interessante Targets für die pharmazeutische Forschung. Ciba-Geigy hat sehr potente und selektive Inhibitoren der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase identifiziert (Spada & Myers, 1995; Law & Lydon, 1996). Die Substanzen sind strukturverwandt mit dem Aglycon von Staurosporin (siehe Abb. 2.10 A). Von der Grundstruktur B (siehe Abb. 2.10) sind die Dianilino-Phthalimide CGP 52411 und CGP 53353 abgeleitet, die beide Hemmstoffe des EGFRs darstellen. Diese Substanzen zeigen nur geringe Aktivität gegenüber anderen Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen (Buchdunger et al., 1994; Traxler et al., 1997).

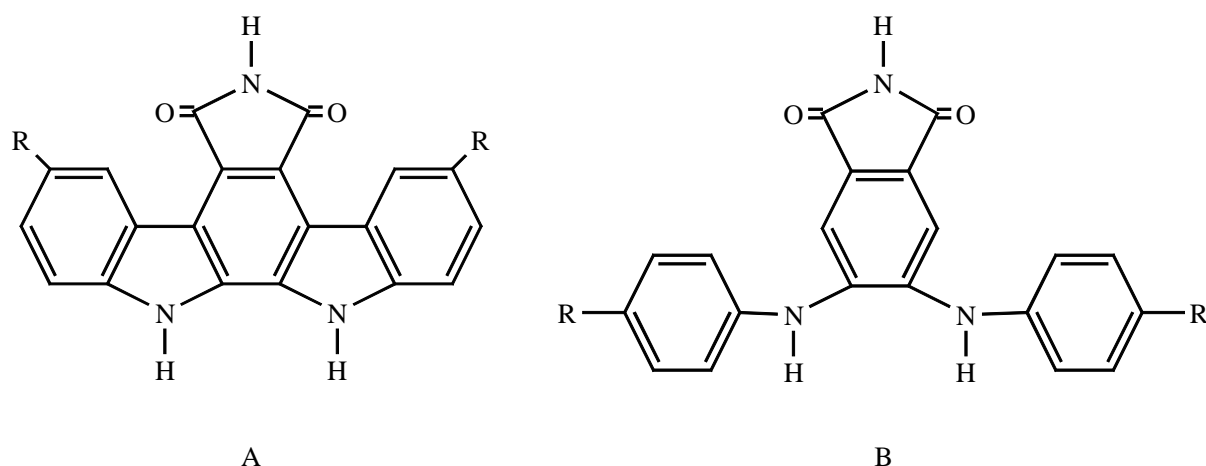
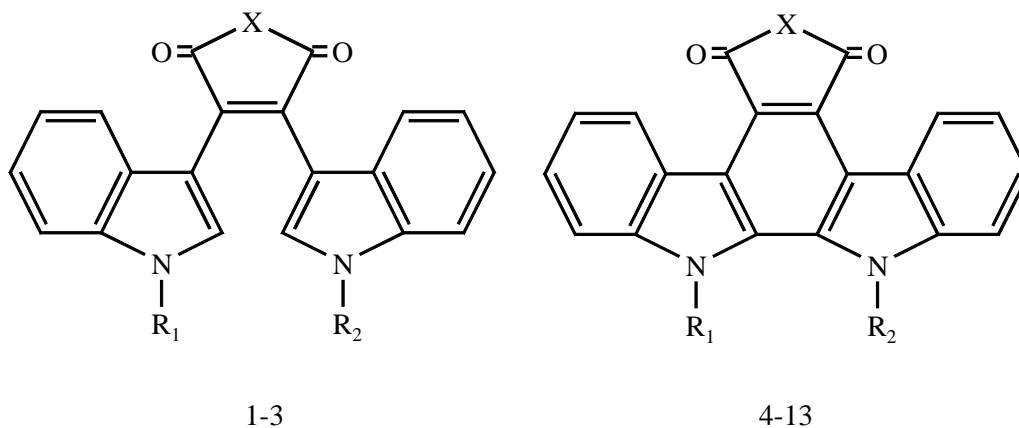


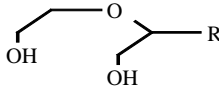
Abb. 2.10: Staurosporin-Aglykon (A) R = H, Indolocarbazol 3744W (A) R = OCH<sub>3</sub> und die Dianilino-Phthalimide CGP 52 411 (B) R = H und CGP 53 353 (B) R = F (Buchdunger et al., 1994; Traxler et al., 1997 ; Spacey et al., 1998)

Von der Arbeitsgruppe Melnik (Moskau) wurden drei Bisindolylmaleimide und zehn Indolocarbazole (siehe Tab. 2.1) zur Verfügung gestellt. Untersuchungen von Niederberger zeigten, daß alle diese Substanzen mit Ausnahme von 1 und 11 die Aktivität der isolierten, zytosolischen Proteinkinase C (PKC) hemmen, ebenso wie der bekannte PKC-Inhibitor Staurosporin (Niederberger, 1998). Staurosporin und analoge Substanzen, wie zum Beispiel das Indolocarbazol 3744W (siehe Abb. 2.10) sind Inhibitoren der PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (Spacey et al., 1998). Da die Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole aus der Moskauer-Arbeitsgruppe Strukturähnlichkeit zu Staurosporin-Aglykon bzw. Indolocarbazol 3744W und Dianilino-Phthalimide aufweisen, wurde zur weiteren Aufklärung der Wirkmechanismen

dieser Substanzklassen Untersuchungen zur Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs durchgeführt.

Tab. 2.1: Grundstruktur der untersuchten Bisindolylmaleimide (1-3) und der Indolocarbazole (4-13) (Melnik et al., 1996 a; Melnik et al., 1996 b)



Substanz	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	O	$\alpha$ -L-Arabinose	CH <sub>3</sub>
2	NH	$\alpha$ -L-Arabinose	CH <sub>3</sub>
3	NH	$\beta$ -D-Xylose	H
4	NH	$\alpha$ -L-Arabinose	H
5	NH	$\beta$ -D-Xylose	CH <sub>3</sub>
6	NH	$\alpha$ -L-Arabinose	CH <sub>3</sub>
7	NH	$\beta$ -D-Xylose	H
8	NH	$\beta$ -D-Ribose	H
9	NH	$\beta$ -D-Galactose	CH <sub>3</sub>
10	NH	$\beta$ -D-Ribose	CH <sub>3</sub>
11	O	$\beta$ -D-Xylose	CH <sub>3</sub>
12	NH	$\beta$ -D-Galactose	H
13	NH		CH <sub>3</sub>

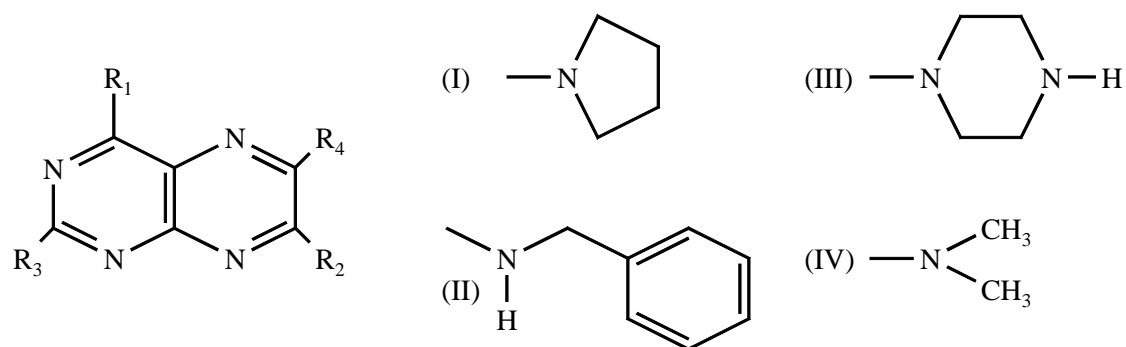
### 2.9.3 Substituierte Pteridine

Wachstumsfaktoren binden spezifisch an Oberflächenrezeptoren von Zellmembranen. Durch Bindung eines Liganden kommt es zur Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, in Folge dessen die Adenylatzyklase aktiviert wird. Die Adenylatzyklase bildet aus Adenosin-triphosphat (ATP) den Second Messenger 3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Dieses Signalmolekül aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die Phosphorylierungen z.B. an Serin- und Threoninresten durchführt (Voet & Voet, 1992; Krauss, 1997). Das Signal wird durch Phosphodiesterasen beendet, die cAMP zu 5'AMP hydrolysiert (Beavo et al., 1994). Der Second Messenger cAMP spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und Differenzierung.

Behandelt man humane MCF-7-Mammacarcinom Zellen und B 16-murine Melanom Zellen mit 7-Benzylamino-6-chlor-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridin (DC-TA-46), so wird das Zellwachstum dosisabhängig bereits in Konzentrationen von 1  $\mu$ M inhibiert. DC-TA-46 hemmt die 3',5'-zyklische Nucleotid-Phosphodiesterase 4 (PDE4), was zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels in der Zelle führt (Drees et al., 1993).

Merz und Müller haben Derivate zu DC-TA-46 synthetisiert, die sich durch Variation der Substituenten in den Positionen 2, 4, 6 und 7 unterscheiden (siehe Tab. 2.2). Die in dieser Arbeit untersuchten Pteridin-Derivate zeigen dosisabhängige Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen und stellen gleichzeitig gute Inhibitoren der isolierten PDE4 dar (Merz et al., 1998; Müller, 2000). Eine Korrelation zwischen Wachstumshemmung und PDE4-Hemmung läßt sich nur für einige Derivate, z.B. 7a-7d, aufstellen. Die beobachtete Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen von einigen Substanzen, z.B. 7k, wird somit nicht nur durch PDE4-Hemmung in der Zelle verursacht, sondern möglicherweise auch durch ein anderes Target. Um die Frage zu klären, ob diese Pteridin-Derivate neben dem cAMP-Signaltransduktionsweg in weitere zelluläre Signalübertragungswege eingreifen, wurden Untersuchungen zur Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs und des MAPK-Weges durchgeführt.

Tab. 2.2: Strukturen der untersuchten Pteridin-Derivate (Merz et al., 1998; Müller persönliche Mitteilung)



Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
7a/DC-TA-46	I	II	III	Cl
7b	II	I	III	Cl
7c	I	I	III	Cl
7d	I	IV	III	Cl
7e	IV	II	III	Cl
7f	IV	IV	III	Cl
7g	I	II	4-methylpiperazino	Cl
7h	I	II	morpholino	Cl
7i	I	II	4-acetylpiperazino	Cl
7j	I	II	3-oxopiperazino	Cl
7k	I	II	2-aminoethylamino	Cl
7l	I	II	2-hydroxyethylamino	Cl
7m	I	II	IV	Cl
7n	I	II	Cl	IV
7o	I	II	III	H
E272	I	II	4-glycylpiperazino (Hydrochlorid)	Cl
E273	I	II	4-lysylpiperazino (Hydrochlorid)	Cl
E274a	I	II	4-carboxymethylpiperazino (Na-Salz)	Cl
E274	I	II	4-carboxymethylpiperazino	Cl
E275a	I	II	4-(1-glutamyl)piperazino (Na-Salz)	Cl

Tab. 2.3: Fortsetzung der Strukturen der Pteridin-Derivate

Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
E275	I	II	4-(1-glutamyl)piperazino	Cl
E276	I	II	III	CH <sub>3</sub>
E278	I	II	4-(2-hydroxyethyl)-piperazino	Cl
E279	I	II	4-(2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethyl)- piperazino	Cl
E280	I	II	4-carbamoylmethylpiperazino	Cl

### 2.9.4 Flavonoide

1936 haben Szent-Györgyi und Mitarbeiter festgestellt, daß bestimmte Flavonoide Vitaminqualität besitzen und haben den Begriff „Vitamin P“ für eine Mischung aus Zitrusflavonoide geprägt. Auch wenn Flavonoide heutzutage nicht mehr zu der Gruppe der Vitamine gehören, so mehren sich doch Hinweise, daß sie eine wichtige Position zwischen essentiellen und nicht-essentiellen Nahrungsmittelbestandteilen einnehmen (Kühnau, 1976).

Flavonoide werden eine Reihe von biologischen Wirkungen zugeschrieben. So wird in der Literatur von einer Hemmung von Protein-Tyrosinkinasen, hemmenden Effekten auf die Xanthinoxidase, Hemmung der Phosphatidylinositol-3-kinase, antioxidativen Wirkungen und von der Wachstumshemmung einiger Tumorzelllinien berichtet (Geahlen et al., 1989; Chang et al., 1993; Herrmann, 1995; So et al., 1997; Agullo et al., 1997; Gabrielska et al., 1999; Kuntz et al., 1999).

Flavonoide lassen sich in die Hauptgruppen der Flavone, Flavonole, Flavanone, Catechine, Anthocyanidine und Isoflavone unterteilen.

Die Biosynthese der Flavonoide (siehe Abb. 2.11) geht von einer aktivierten Hydroxyzimtsäure und drei aktivierten Malonsäuren aus, die zu einem Chalcon kondensieren. Durch Zyklisierung entsteht aus dem Chalcon ein Flavanon. Vom Flavanon ausgehend können Flavone und Flavanonole gebildet werden. Aus Flavanonolen können über Endiole und Enole Anthocyanidine gebildet werden (Belitz & Grosch, 1992). Der tierische Organismus kann das Flavan-Grundgerüst nicht synthetisieren, so daß Flavonoide ausschließlich pflanzlichen Ursprungs sind (Kühnau, 1976).

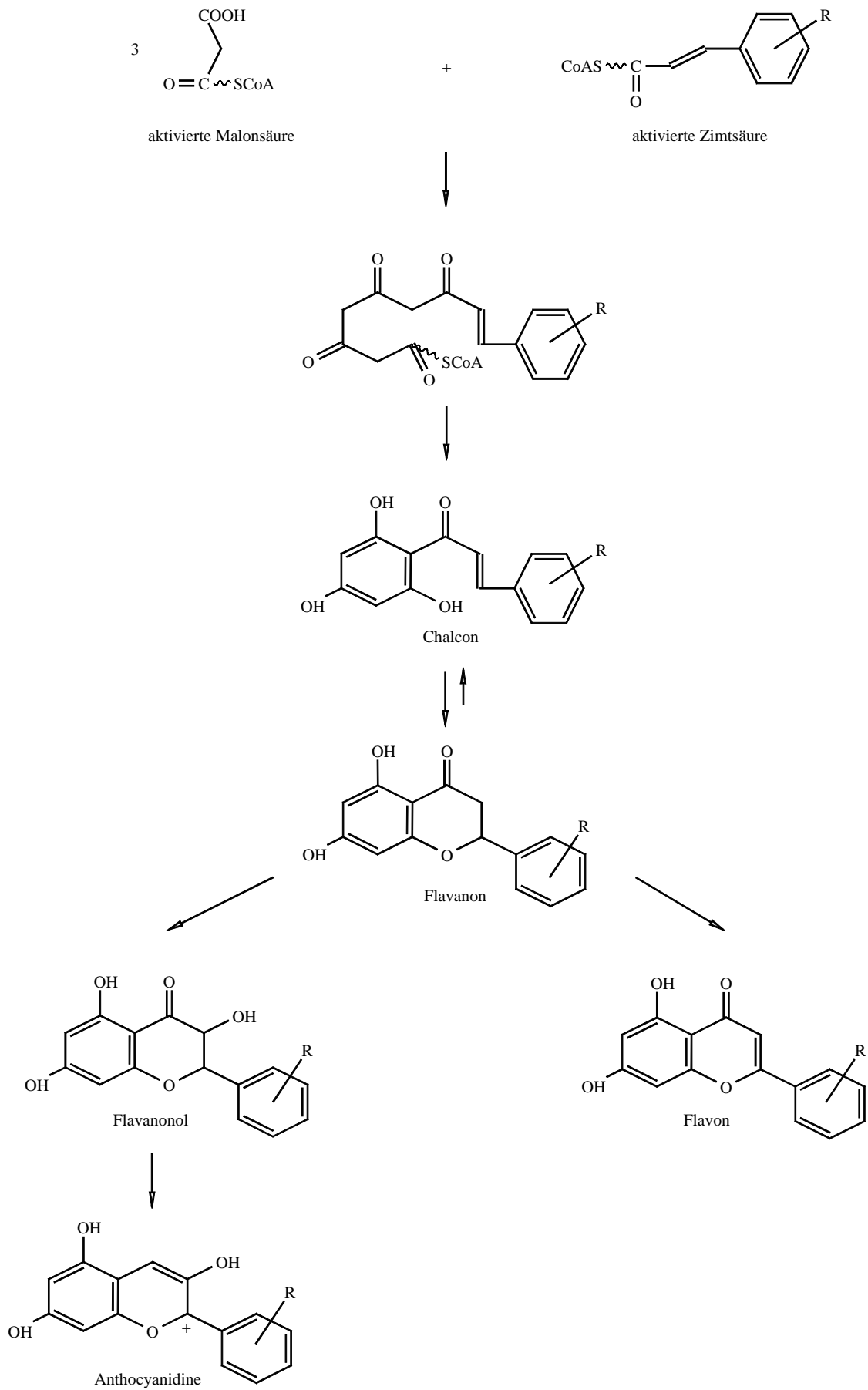


Abb. 2.11: Biosynthese von Flavonoiden (Belitz &amp; Grosch, 1992)

### 2.9.4.1 Chalcone

Chalcone sind Vorstufen bei der Biosynthese von Flavonen oder Anthocyanidinen (siehe Abb. 2.11). De Vincenzo et al. (1995) konnten antiproliferative Effekte auf das Wachstum von Tumorzellen durch Chalcone feststellen.

Das prenylierte Chalcon Xanthohumol (siehe Abb. 2.12), das aus Hopfen (*Humulus lupulus*) isoliert wurde, zeigt in vitro Cytotoxizität gegenüber der Mammacarcinomzelllinie MCF-7, der Colonicarcinomzelllinie HT-29 und dem Ovarialcarcinom A-2780. 3'-Methyl-3-hydroxy-chalcone zeigen die höchste antitumor- und antitumorpromovierende Aktivität (Miranda et al., 1999).

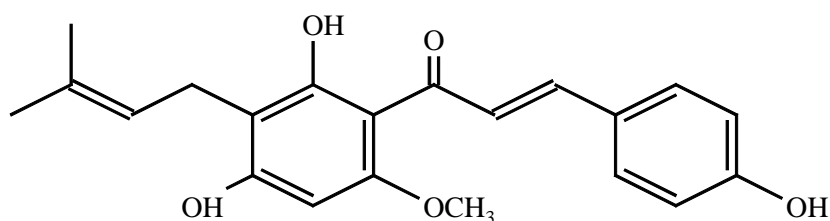


Abb. 2.12: Xanthohumol (Miranda et al., 1999)

In der Literatur ist auch die Hemmung von einigen Enzymen, wie z.B. Glutathion-Reduktase, cAMP-Phosphodiesterase oder die Hemmung der aeroben Glykolyse durch diese Substanzklasse beschrieben (De Vincenzo et al., 1995).

Das Polyphenol Butein (siehe Abb. 2.13) hemmt die EGF induzierte Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors des humanen Leberzellcarcinoms HepG2. Die EGFR assoziierte Tyrosinkinase-Aktivität wird ebenso durch das Chalcon Butein mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 16  $\mu$ M inhibiert (Yang et al., 1998). Die Hemmung der EGFR-Kinaseaktivität ist kompetitiv zu ATP und nicht kompetitiv zum Substrat poly (Glu, Ala, Tyr) 6:3:1. Der spezifische Inhibitor der Protein-Tyrosinkinase des EGFRs Butein hemmt nicht die PKC und PKA (Yang et al., 1998).



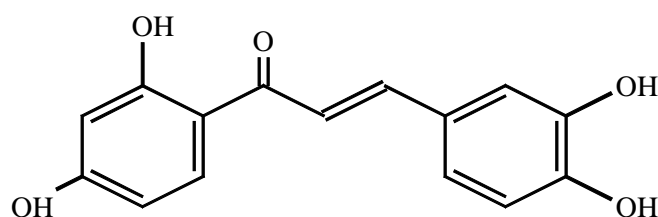
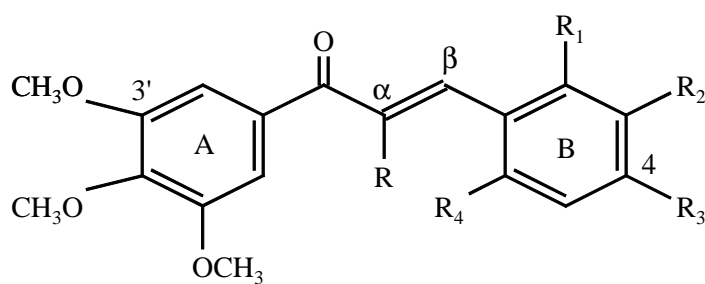


Abb. 2.13: Butein, ein bekannter Hemmstoff des EGFRs (Yang et al., 1998)

Aus der Arbeitsgruppe von McGown, Manchester (England), wurden uns eine Reihe von Chalconen zur Verfügung gestellt. Aufgrund der von Yang et al. (1998) beobachteten Ergebnisse, wurden diese Chalone auf eine Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase untersucht.

Die Chalone der Gruppe I (siehe Tab. 2.4) weisen Strukturähnlichkeit zu Butein auf. Sie unterscheiden sich in den Substituenten des Phenylrings A und B und durch Methylsubstitution in Nachbarschaft zur Carbonylverbindung.

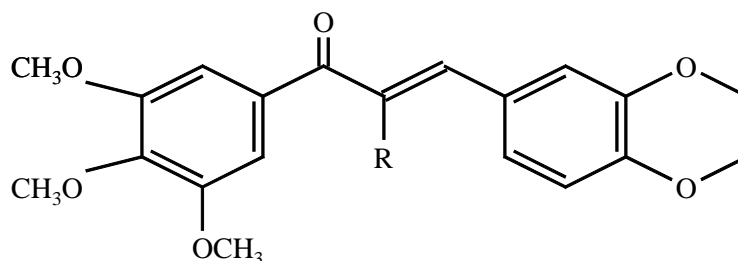
Tab. 2.4: Chalone der Gruppe I



Substanz	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
SD 414	CH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
DRA/005	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
RF 50	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
NL2/88	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
RF 24	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

Die Chalone der Gruppe II (siehe Tab. 2.5) unterscheiden sich von den Chalonen der Gruppe I nur in den Substituenten am B-Ring.

Tab. 2.5: Chalone der Gruppe II



Substanz	R
SD/376	H
SD/388	CH <sub>3</sub>

In Abb. 2.14 sind Khellin und weitere Derivate mit Strukturhomologien zu der Substanzklasse der Chalone dargestellt. Auch diese Substanzen wurden von der Manchester-Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt und auf eine Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase untersucht.

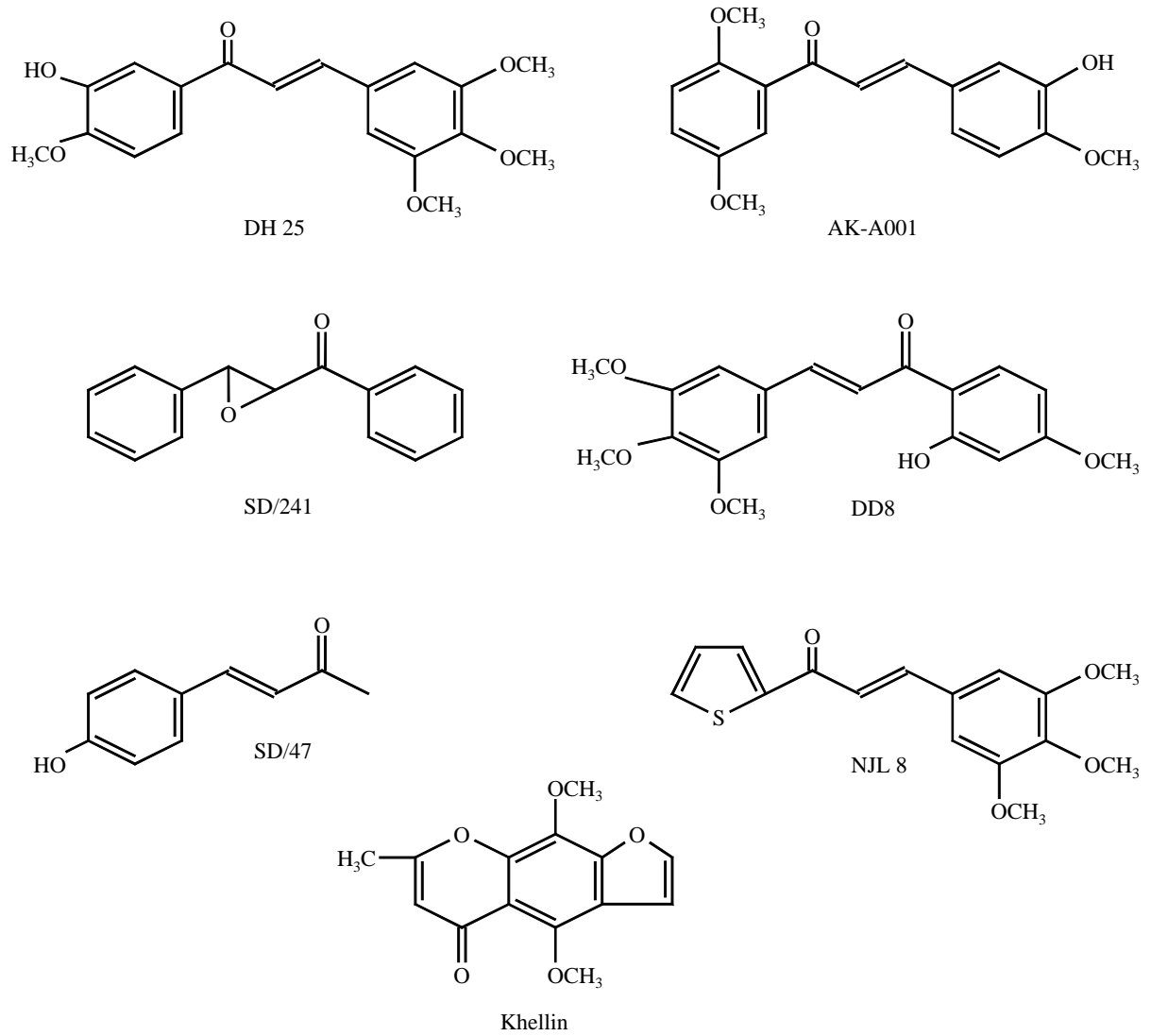
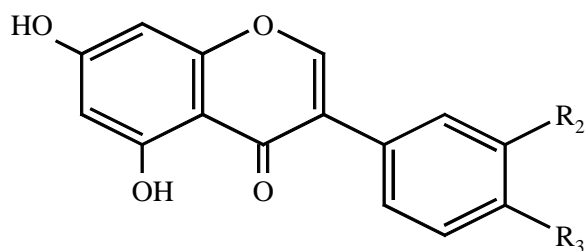


Abb. 2.14: Khellin und weitere Derivate mit Strukturhomologien zu Chalconen

### 2.9.4.2 Isoflavone

In der Literatur sind eine Reihe von Isoflavonen beschrieben, die die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs inhibieren. Genistein (siehe Tab. 2.6), das aus dem Fermentationsgemisch von *Pseudomonas sp.* isoliert wird, stellt einen Inhibitor der EGFR assoziierten Tyrosinkinase dar. Die Hemmung ist ebenso wie bei Butein kompetitiv zu ATP und nicht kompetitiv zum Phosphatakzeptor (Akiyama et al., 1987). Biochanin A (siehe Tab. 2.6), dessen Hydroxygruppe in 4'-Position im Gegensatz zu Genistein methoxyliert ist, hemmt deutlich schlechter die Autophosphorylierung des EGFRs als Genistein (Akiyama et al., 1987).

Tab. 2.6: Isoflavone, die die Autophosphorylierung oder PTK-Aktivität des EGFRs inhibieren (Akiyama et al., 1987; Traxler et al., 1999)

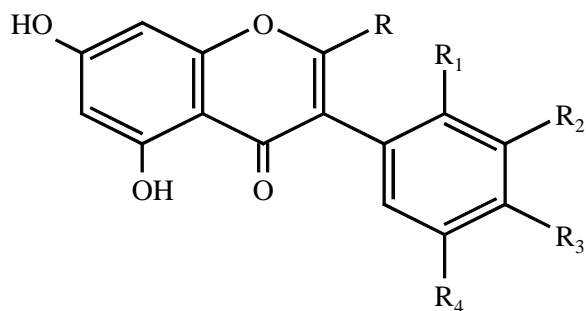


Substanz	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Genistein	H	OH
Biochanin A	H	OCH <sub>3</sub>
3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon	Cl	H

Durch die Anwendung eines Pharmacophor-Modelles konnten Traxler et al. (1999) ausgehend vom Genistein und Quinazolin neue Isoflavone synthetisieren, die die EGFR Tyrosinkinase-Aktivität besser inhibieren als Genistein. Die potenteste Substanz mit Isoflavon-Grundstruktur ist 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon (siehe Tab. 2.6), die zehnfach höhere Inhibierung der EGFR Tyrosinkinase-Aktivität zeigt als Genistein. Eine hundertfach potentere Substanz als Genistein erhält man durch Austausch von O-1 gegen ein Stickstoffatom in 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon (Traxler et al., 1999).

Die Arbeitsgruppe von McGown, Manchester (England), hat Isoflavone synthetisiert, die in Tabelle 2.7 dargestellt sind. Die Substanzen weisen Strukturhomologien zu diesen in der Literatur beschriebenen Hemmstoffen auf. Auf Grund dieser Datenlage wurden die Verbindungen auf eine Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs untersucht.

Tab. 2.7: Isoflavone



Substanz	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
92-238	H	H	OH	H	H
92-125	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
92-121	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
92-129	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
92-63	COOEt	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
92-64	COOEt	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
92-114	COOEt	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

### 2.9.4.3 Flavonoide aus *Scutellaria baicalensis*

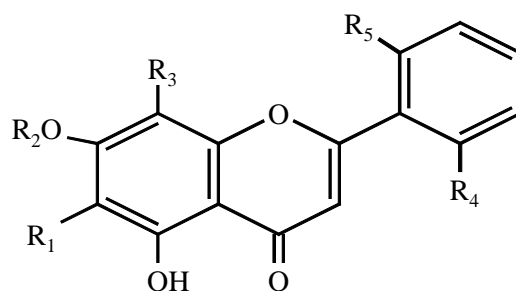
In Japan und China wird die traditionelle pflanzliche Zubereitung Sho-saiko-to (Xiao-chai-hu-tang in China) zur Behandlung verschiedener chronischer Lebererkrankungen und Entzündungen des respiratorischen Systems eingesetzt. Sho-saiko-to besteht aus den sieben Pflanzenextrakten *Bupleuri radix*, *Pinelliae tuber*, *Scutellaria radix*, *Zizyphi fructus*, *Ginseng radix*, *Glycyrrhizae radix* und *Zingiberis rhizoma* (Yano et al., 1994; Sakamoto et al., 1993). Sho-saiko-to hemmt das Wachstum von Tumorzelllinien sowohl in vitro, als auch in vivo (Okita et al., 1993; Sakamoto et al., 1993; Yano et al., 1994; Mizushima et al., 1995).

Die Wurzeln von *Scutellaria baicalensis* enthalten zahlreiche Flavonoide (siehe Tab. 2.8). Die Hauptbestandteile sind Baicalein, Baicalin und Wogonin.

Baicalein, Baicalin und Wogonin hemmen das Wachstum der T-lymphoiden Leukämiezellen (CEM-Zellen). Baicalein hemmt die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität der nicht aufgereinigten CEM-Zellmembranlösung (Huang et al., 1994).

Die *Scutellaria baicalensis* Flavonoide (siehe Tab. 2.8) zeigten alle bis auf Wogonosid wachstumshemmende Wirkung an humanen Tumorzelllinien im mikromolaren Bereich (Niederberger, 1998). Daher stellte sich die Frage, ob die wachstumsinhibierenden Effekte dieser Substanzen durch Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs und Beeinflussung der downstream Signaltransduktionskaskade verursacht werden.

Tab. 2.8: Flavonoide aus *Scutellaria baicalensis*

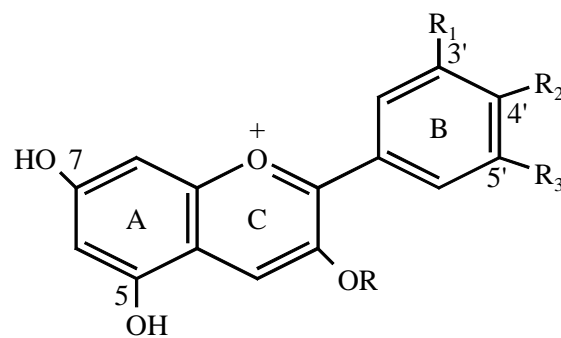


Flavon	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Baicalein	OH	H	H	H	H
Baicalin	OH	Glucuronsäure	H	H	H
Wogonin	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
Wogonosid	H	Glucuronsäure	OCH <sub>3</sub>	H	H
Skullcapflavon II	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH

### 2.9.4.4 Anthocyanidine

Anthocyanidine (siehe Tab. 2.9) kommen in zahlreichen Früchten und Gemüse vor (Wang et al., 1997). Je nach Färbung der Früchte ist der Anthocyaningehalt sehr unterschiedlich (Herrmann, 1991). In schwarzen Johannisbeeren, Kirschen, Pflaumen, Brombeeren und Stachelbeeren kommen hauptsächlich Cyanidinglycoside, wie zum Beispiel Cyanidin-3-glucosid und Cyanidin-3-rutinosid vor (Herrmann, 1991). In Äpfel und Birnen, soweit diese überhaupt Anthocyanine enthalten, kommt hauptsächlich das Glycosid Cyanidin-3-galactosid vor (Herrmann, 1991). Malvidin ist vor allem in Trauben und Heidelbeeren zu finden, während Delphinidin zusätzlich noch in Schwarzen Johannisbeeren vorkommt (Wang et al., 1997).

Tab. 2.9: Verschiedene Anthocyanidin- bzw. Anthocyaninstrukturen (Kühnau, 1976)



Anthocyanidin/ Anthocyanin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R
Cyanidin	OH	OH	H	H
Delphinidin	OH	OH	OH	H
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Oenin (Malvidin-3-glucosid)	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Glucose
Idaein (Cyanidin-3-galactosid)	OH	OH	H	Galactose

Um die tägliche Aufnahme dieser Nahrungsmittelinhaltsstoffe zu ermitteln wurde eine Abschätzung vorgenommen. Aus den Daten der Nationalen Verzehrstudie und zahlreichen Literaturangaben zum Flavonoidgehalt pflanzlicher Lebensmittel wurde, eine tägliche Aufnahme von 11,95 mg Flavonolen und 2,72 mg Anthocyanen ermittelt (Böhm et al., 1998).

Für Anthocyanine sind eine Reihe von biologischen Wirkungen in der Literatur beschrieben. So wird von antioxidativen Eigenschaften, Suppression von Tumorwachstum *in vitro* und über die Hemmung der Xanthinoxidase durch Anthocyanine berichtet (Kamei et al., 1995; Costantino et al., 1995; Tsuda et al., 1996; Wang et al., 1997; Gabrielska et al., 1999; Pool-Zobel et al., 1999).

Cyanidin und Delphinidin (siehe Tab. 2.9), die beide gute Wachstumshemmung an den Tumorzelllinien A 431 und LXFL529L zeigen, wurden auf eine Beeinflussung der EGFR-MAPK-Signaltransduktionskaskade untersucht. Als Referenzsubstanz wurde bei diesen Versuchen der Grünteeinhaltsstoff (-)-Epigallocatechin-3-gallat (siehe Abb. 2.15), Hemmstoff des EGFRs, eingesetzt (Liang et al., 1997).

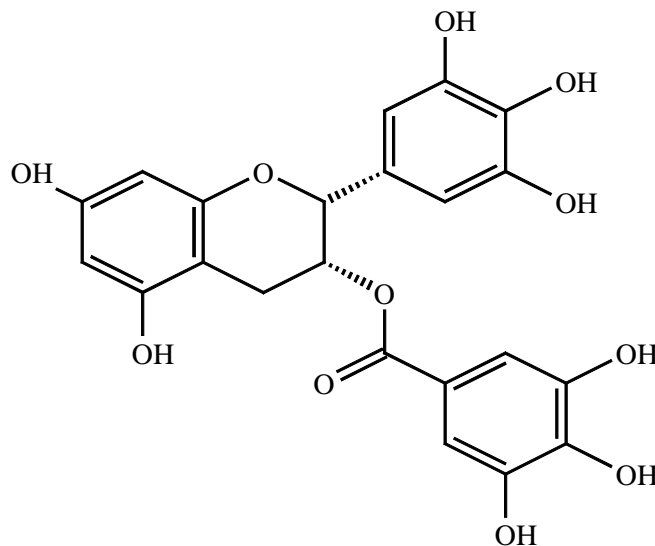


Abb. 2.15: (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) (Liang et al., 1997)



---

### 3 Problemstellung

In unserem Arbeitskreis wurden zahlreiche Substanzen auf antineoplastische Effekte im Sulforhodamin B-Test untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung von Testsystemen zur weiteren wirkmechanistischen Untersuchung dieser Substanzen. Die Testsysteme sollten zum Substanzscreening geeignet sein, um eine Optimierung der Struktur-Wirkungsbeziehung in Zusammenarbeit mit der Synthesegruppe erzielen zu können.

Zuerst sollte ein Enzym-linked Immunosorbant Assay (ELISA) zur Untersuchung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) aufgebaut werden. Nach Validierung des Testsystemes mit Tyrphostin AG 1478, sollten verschiedene Substanzklassen getestet werden.

Substanzen aus der Gruppe der Indolocarbazole, Bisindolylmaleimide und substituierten Pteridine wurden auf eine Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase getestet. Aus der Substanzklasse der Flavonoide wurden auf Grund ihrer Strukturhomologie zu bekannten Hemmstoffen aus der Gruppe der Chalone, Isoflavone, Flavone und Anthocyanidine, Substanzen zur Untersuchung einer PTK-Hemmung des EGFRs ausgewählt.

Substanzen, die die EGFR assoziierte Tyrosinkinase inhibieren, sollten anschließend in der Zelle auf eine Hemmung der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade untersucht werden, da hierbei die zelluläre Pharmakokinetik dieser Substanzen mitberücksichtigt wird.

Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signaltransduktionsweg ist von zentraler Bedeutung für Wachstum und Differenzierung. Um eine Hemmung dieses Signaltransduktionsweges messen zu können, sollte ein Reporter-gen-Assay etabliert werden. Nach Validierung des MAPK-Reporter-gen-Assays mit Referenzsubstanzen werden Substanzen aus den oben genannten Gruppen ausgewählt, die auf Grund ihrer Struktur und ihrem bisherigen Wirkungsprofil potentielle Hemmstoffe dieser Signaltransduktionskaskade sein könnten.

Untersuchungen zur Cytotoxizität dieser Substanzen und zu Zellzyklusveränderungen nach Inkubation mit diesen Substanzen, sollten die wirkmechanistischen Untersuchungen ergänzen.

---

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Protein-Tyrosinkinase-ELISA

Der EGF-Rezeptor, ein Transmembran-Rezeptor, wandelt ein extrazelluläres Signal in ein intrazelluläres Signal um. Zur Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die EGF-Rezeptor assoziierte Proteintyrosin-Kinaseaktivität wurde ein Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) etabliert, um ein Screening von Substanzen im Mikrotiterformat durchführen zu können. 96-Lochplatten mit hoher Proteinbindungskapazität wurden mit einem synthetischen Substrat der Protein-Tyrosinkinasen, Poly (Glu, Tyr) 4:1 (Gastpar, 1997; Moyer et al., 1997; Schraag et al., 1993) beschichtet. Der EGF-Rezeptor wurde aus der A 431-Zelllinie, einem Epidermiscarcinom der Vulva, mittels Weizenkeimlektin-Agarose, die selektiv N-Acetylglucosaminreste der extrazellulären Domäne des EGFRs bindet, aufgereinigt (Gastpar, 1997). Diese erhaltene Enzympräparation wurde im Protein-Tyrosinkinase-ELISA (PTK-ELISA) eingesetzt.

#### 4.1.1 Western-Blot

Die Reinheit der nach Affinitätschromatographie erhaltenen EGF-Rezeptor-Lösung wurde durch Western-Blot-Analyse überprüft. Fraktion 2 und 3 der Affinitätschromatographie wurden mit ATP-haltigem Assaypuffer versetzt, damit der isolierte EGF-Rezeptor an Tyrosinresten phosphoryliert vorliegt. Die Aceton-gefällte Proteinlösung wurde im SDS-Polyacrylamid-Gel (10 %) durch Elektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der EGFR wurde einerseits mit einem Anti-EGFR-Antikörper, der gegen die intrazelluläre Domäne gerichtet ist detektiert. Und zum anderen wurde er mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper detektiert. In Abb. 4.1 ist deutlich eine Bande bei 170 kDa nach Inkubation mit beiden Antikörpern erkennbar. Diese Bande stimmt mit Literaturangaben für den EGFR überein (Yeaton et al., 1983; Lin et al., 1987).

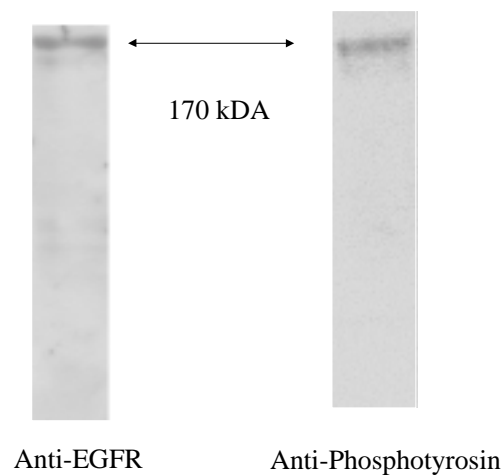


Abb. 4.1: Western-Blot mit Antikörper Anti-EGFR und Anti-Phosphotyrosin

Die durch Affinitätschromatographie isolierte Enzympräparation ist somit nicht mit anderen Membranproteinen, die eine Proteintyrosinkinase-Aktivität oder Autophosphorylierungs-Aktivität an Tyrosinresten aufweisen, verunreinigt und wird daher für die Durchführung von Protein-Tyrosinkinase-ELISAs verwendet.

#### 4.1.2 Austestung der Antikörperkonzentrationen

Es zeigte sich bei der Versuchsdurchführung, daß der ursprünglich verwendete Primärantikörper Anti-Phosphotyrosin (Gastpar, 1997) nicht lagerstabil ist. Daher wurde der Primärantikörper Anti-Phosphotyrosin und der Sekundärantikörper Anti-Maus-Ig POD durch den Antikörper Anti-Phosphotyrosin-Peroxidase (Klon 3-365-10, Boehringer, Mannheim) ersetzt.

Kriterien für die optimale Antikörperkonzentration sind zum einen die gute Auswertbarkeit und zum anderen die Analysezeit. Aus Versuchen mit dem ursprünglich verwendeten Antikörper ergab sich eine auswertbare optische Dichte von 0,7 bei 405 nm. Als Substrat für den Peroxidase gekoppelten Antikörper wurde 2, 2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)] (ABTS) verwendet. Laut Herstellerangaben sollte die Reaktionszeit maximal 60 Minuten betragen, da ansonsten das Meßsignal wieder abnehmen und damit verfälscht würde. Aus diesen Gründen wurde die Antikörperkonzentration so gewählt, daß nach ca. 30 Minuten Reaktionszeit eine optische Dichte von 0,7 erreicht wird.

In der in Abbildung 4.2 dargestellten Versuchsreihe wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen ausgetestet.

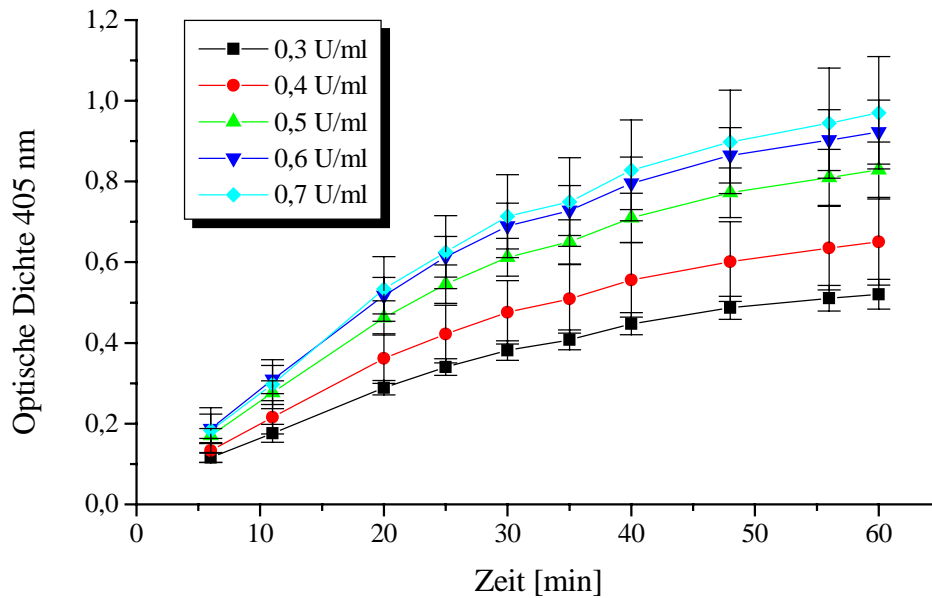


Abb. 4.2: Austestung der Konzentration des Antikörpers Anti-Phosphotyrosin-Peroxidase (Klon 3-365-10)

Auf Grund dieser Kriterien ergab sich aus obiger Versuchsreihe eine Antikörperkonzentration von 0,6 U/ml für den Protein-Tyrosinkinase-ELISA. Ein weiterer Vorteil der sich aus der Verwendung des gekoppelten Anti-Phosphotyrosin-Peroxidase-Antikörpers ergibt ist die Reduzierung der Versuchsdauer um ca. 90 Minuten.

### 4.1.3 Referenzverbindung Tyrphostin AG 1478

#### 4.1.3.1 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs

Aus der großen Gruppe der EGF-Rezeptor-Hemmstoffe wurde aus der Klasse der Tyrphostine zur Validierung des Testsystems als Referenzsubstanz Tyrphostin AG 1478 ausgewählt (siehe Abb. 2.9) (Fry et al., 1994; Levitzki & Gazit, 1995). Tyrphostin AG 1478 zeichnet sich durch Selektivität und seinen niedrigen  $IC_{50}$ -Wert von 0,31 nM gegenüber der PTK des EGFRs aus (Levitzki & Gazit, 1995; Bridges et al., 1996).

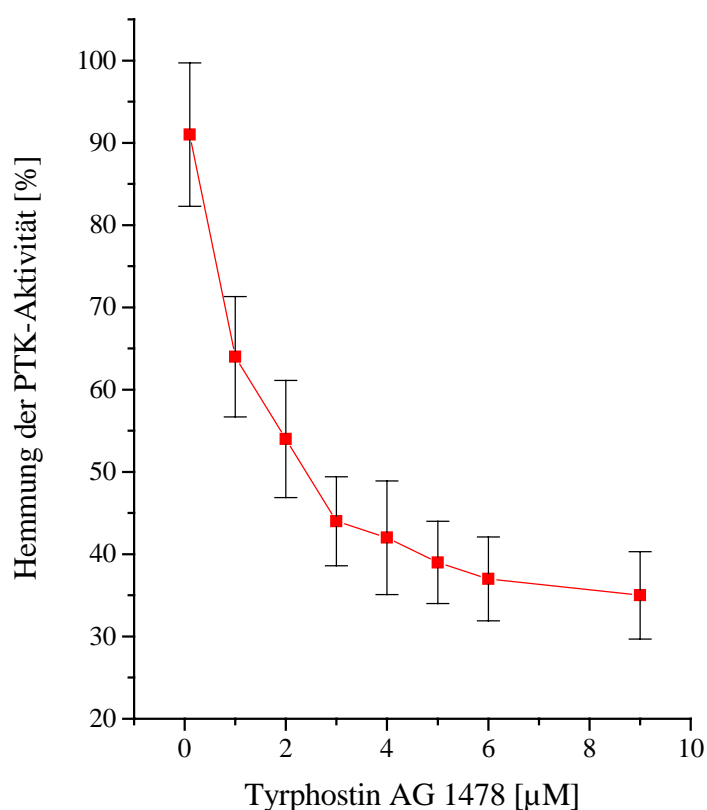


Abb. 4.3: PTK-ELISA mit Tyrphostin AG 1478

Tyrphostin AG 1478 besitzt in diesem Protein-Tyrosinkinase-ELISA (PTK-ELISA) einen  $IC_{50}$ -Wert von 2,4 µM. Diese Diskrepanz kann zum einen am verwendeten Substrat im Assay liegen. In der Literatur wurde ein 14 Aminosäure-langes Fragment der Phospholipase C $\gamma$ 1 verwendet, im hier eingesetzten ELISA hingegen das Polypeptid (Glu, Tyr) 4:1 (Bridges et al., 1996; Traxler et al., 1999). Ein weiterer Grund für diese Unterschiede könnte im Aufbau des Assays liegen.

Im PTK-ELISA ist das Substrat am Boden der ELISA-Platte, die eine hohe Proteinbindungskapazität besitzt, fixiert, wohingegen in der Literatur häufig eine Durchführung mit Substrat in Lösung verwendet wird. Ein weiterer Unterschied in der Hemmwirkung könnte durch die Enzymlösung hervorgerufen werden. So können die verwendeten Enzympräparationen über Affinitätschromatographie gewonnen werden, oder rekombinant aus *E. coli*.

Da in der Literatur sehr verschiedene Substrate in unterschiedlichen Testsystemen zur Untersuchung von EGFR-Hemmstoffen beschrieben sind, kann ein Vergleich von Wirkstoffen untereinander immer nur im jeweiligen Testsystem erfolgen. Aus diesem Grund wurden bei jeder Durchführung eines PTK-ELISAs sowohl eine Positiv-, als auch eine Negativkontrolle mitgeführt.

#### 4.1.3.2 Cytotoxizität von Tyrphostin AG 1478

Der selektive EGFR-Hemmstoff Tyrphostin AG 1478, der das Wachstum von humanen Papillomavirus 16 (HPV16)-immortalisierten Keratinozyten (HF-1-Zellen) inhibiert, wurde auf Beeinflussung des Wachstums der Tumorzellen LXFL529L und A 431 im Sulforhodamin B-Assay getestet (Ben-Bassat et al., 1997; Levitzki & Gazit, 1995).

Tab. 4.1: Wachstumshemmung nach 72-stündiger Inkubation mit Tyrphostin AG 1478 im Sulforhodamin B-Assay.

IC<sub>50</sub>: Konzentration, bei der das Zellwachstum gegenüber der Kontrolle um 50 % reduziert ist.

Substanz	Zelllinie	
	LXFL529L IC <sub>50</sub> [μM]	A 431 IC <sub>50</sub> [μM]
Tyrphostin AG 1478	14,0 ± 0,8	0,4 ± 0,1

Am großzelligen Lungencarcinom LXFL529L zeigte Tyrphostin AG 1478 nach 72-stündiger Inkubation einen IC<sub>50</sub>-Wert von 14,0 ± 0,8 μM. Die Zelllinie A 431, ein Epidermiscarcinom der Vulva, reagierte bei 72-stündiger Inkubation mit Tyrphostin AG 1478 mit einem IC<sub>50</sub>-

Wert von  $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$  wesentlich empfindlicher. Die Zelllinie A 431 exprimiert etwa siebenmal mehr EGF-Rezeptoren, als die Zelllinie LXFL529L (Fiebig et al., 1999). Somit könnte die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen auf den unterschiedlichen Rezeptorstatus zurückgeführt werden.

#### 4.1.3.3 Beeinflussung des Zellzyklus durch Tyrphostin AG 1478

Zur Feststellung einer Zellzyklusbeeinflussung bei Inkubation mit Tyrphostin AG 1478 wurden durchflußzytometrische Untersuchungen durchgeführt (siehe Abb. 4.4).

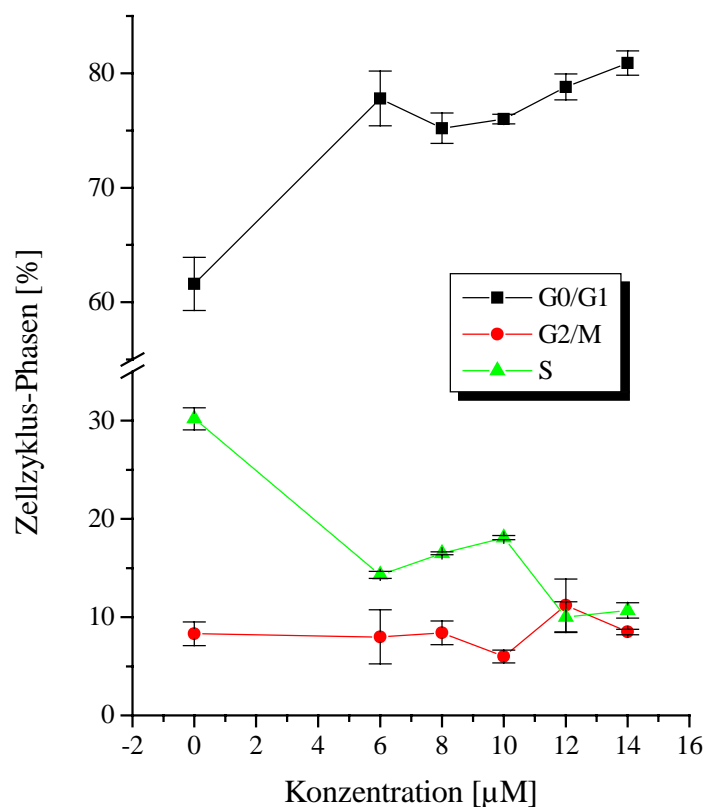


Abb. 4.4: Durchflußzytometrie mit A 431-Zellen, die 24 Stunden serumhaltig mit Tyrphostin AG 1478 inkubiert wurden (exemplarische Messung,  $n = 2$ )

HF-1-Zellen, die mit Tyrphostin AG 1478 behandelt wurden zeigten eine zeitabhängige Akkumulation in der G1-Phase des Zellzyklus mit einer gleichzeitigen Abnahme der Zellzahl in der G2/M und S-Phase (Ben-Bassat et al., 1997).

---

A 431-Zellen wurden 24 Stunden serumhaltig mit Tyrphostin AG 1478 behandelt. Nach dieser Zeit konnte eine Akkumulierung der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus festgestellt werden. Ebenso wie in der Literatur für HF-1-Zellen beschrieben, konnte auch für A 431-Zellen eine Reduzierung der Zellzahl in der S-Phase beobachtet werden. Somit stimmen die Ergebnisse der Durchflußzytometrie gut mit den Literaturdaten für HF-1-Zellen überein.

#### **4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse des PTK-ELISAs und der Referenzsubstanz Tyrphostin AG 1478**

Mittels Affinitätschromatographie konnte aus der Vulvacarcinom-Zelllinie A 431 der EGF-Rezeptor als Enzympräparation für den Protein-Tyrosinkinase-ELISA isoliert werden. Der von Gastpar (1998) aufgebaute ELISA konnte durch Verwendung des Antikörpers Anti-Phosphotyrosin-Peroxidase (Klon 3-365-10) verbessert werden. Dieser neu eingesetzte Antikörper weist eine höhere Stabilität auf und verkürzt die Versuchsdauer um 90 Minuten, so daß dieses Testsystem für ein Substanzscreening mit höherem Probendurchsatz geeignet ist. Zur Validierung des Testsystems wurde Tyrphostin AG 1478 ausgewählt und ein  $IC_{50}$ -Wert von 2,4  $\mu$ M für die Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs ermittelt.

Untersuchungen zur Wachstumshemmung zeigten, daß Tyrphostin AG 1478 an der Zelllinie A 431, die den EGFR überexprimiert wesentlich cytotoxischer ist, als an der großzelligen Lungencarcinom-Zelllinie LXFL529L. Eine Inkubation der A 431-Zellen mit Tyrphostin AG 1478 führte zur G0/G1 Arretierung der Zellen, bei gleichzeitiger Abnahme der Zellzahl in der S-Phase.



## 4.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) -Reportergen-Assay

Untersuchungen zur Hemmung des EGFRs wurden an isolierten Enzympräparationen durchgeführt. In weiteren Untersuchungen sollte der Frage nachgegangen werden, ob in intakten Zellen diese Hemmwirkung zelluläre Effekte auf die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden bedingt. Mit Hilfe eines Reportergen-Assays läßt sich der Einfluß einer Substanz auf die EGFR-MAPK-Signaltransduktionskaskade in der Zelle untersuchen. Hierbei werden wichtige Parameter der zellulären Pharmakokinetik wie z.B. Resorption und Metabolisierung der Substanz berücksichtigt.

### 4.2.1 Aufbau des MAPK-Reportergen-Assays

Ein extrazelluläres Signal kann über den EGFR weiter über den Ras-Raf-Pathway zur MAPK geleitet werden, die nach Translokation in den Zellkern den Transkriptionsfaktor Elk1 phosphoryliert (siehe 2.8). Im MAPK-Reportergen-Assay wird dieser Signalübertragungsweg untersucht, indem man die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk1 durch die MAPK indirekt über ein Reportergen mißt.

A 431-Zellen, die den EGFR überexprimieren (Fiebig et al., 1999), werden mit dem Fusionsplasmid pFA2-Elk1 und dem Reporterplasmid pFR-Luc transfiziert (siehe Abb. 4.5). Das Fusionsplasmid pFA2-Elk1 kodiert für ein Protein, das eine GAL 4-DNA-Bindungsdomäne (GAL 4-dbd) und ein Fragment des Transkriptionsfaktors Elk1 fusioniert enthält, indem sich die Phosphorylierungsstellen der MAPK befinden (Sadowski & Ptashne, 1989; Pan & Coleman, 1990; Kakidani & Ptashne, 1988). Das Reportergenplasmid pFR-Luc enthält fünfmal als Kontrollregion (Promoter) das 17 mer GAL 4 binding element vor dem Luciferasegen (Webster et al., 1988).

Zu diesem Transfektionsansatz werden zwei unterschiedliche Kontrolltransfektionen durchgeführt. Der erste Kontrollansatz wird mit den Plasmiden pFR-Luc und pFC2-dbd (siehe Abb. 4.5) transfiziert. pFC2-dbd enthält die Sequenz GAL 4-dbd ohne das Fragment Elk1. Dieser Ansatz dient zur Erfassung unspezifischer Bindung von GAL 4-dbd an das GAL 4 binding element.

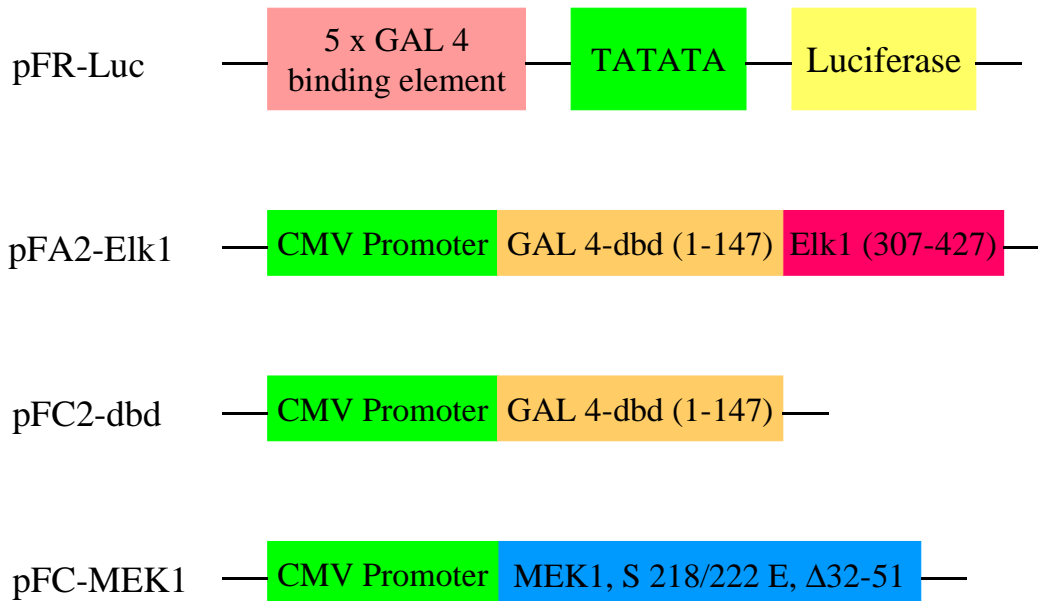


Abb. 4.5: Verwendete Plasmide im Reporter-Gen-Assay

- pFR-Luc: Reporter-Gen-Plasmid
- pFA2-Elk1: Fusionsplasmid
- pFC2-dbd: Negativkontrolle
- pFC-MEK1: Positivkontrolle

Der zweite Kontrollansatz wird mit den Plasmiden pFR-Luc, pFA2-Elk1 und pFC-MEK1 durchgeführt, um ein konstitutiv aktives MEK1 vorliegen zu haben. pFC-MEK1 ist konstitutiv aktiv, indem Serin 218 und Serin 222 gegen Glutamin ausgetauscht wurde. Ein Austausch von Serin 218 oder 222 gegen Glutamin führt zu einem 7- bzw. 30-fachen Anstieg der Aktivität der MAPKK-Mutanten gegenüber dem nicht phosphorylierten Wildtyp-Enzym (Alessi et al., 1994). Die Mutante S 218/222E hat eine etwas höhere Aktivität als die Mutante Glu 221 und kann nicht mehr durch p74raf-1 phosphoryliert oder aktiviert werden (Alessi et al., 1994). Dem Kontrollplasmid pFC-MEK1 fehlt darüber hinaus die Aminosäuresequenz 32-51. Eine Deletion dieser Aminosäuresequenz führt zu einer MAPKK-Mutante, deren Basalaktivität 45mal höher ist als beim Wildtyp, da diese Sequenz die inaktive MAPKK zu stabilisieren scheint (Mansour et al., 1994). Diese MAPKK-Mutanten können ERK2 an Threonin 183 und Tyrosin 185 phosphorylieren (Mansour et al., 1994).

A 431-Zellen werden in serumhaltigem Medium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgt Serumentzug für 24 Stunden. Dann erfolgt die Transfektion mit den Plasmiden pFA2-Elk1 und pFR-Luc oder den entsprechenden Kontrollansätzen. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen mit einer Testsubstanz inkubiert. 30 Minuten später erfolgt eine Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml EGF. Nach weiteren 4,5 Stunden wird dann die Luciferase-Aktivität vermessen.

Nach Stimulation der Zellen mit EGF kommt es zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAPK. Diese wiederum phosphoryliert Elk1 (siehe Abb. 4.6). Das phosphorylierte Fusionsprotein kann nun über GAL 4-dbd an die GAL 4 upstream activating sequence (UAS) binden und damit die Transkription des Luciferasegens auslösen.

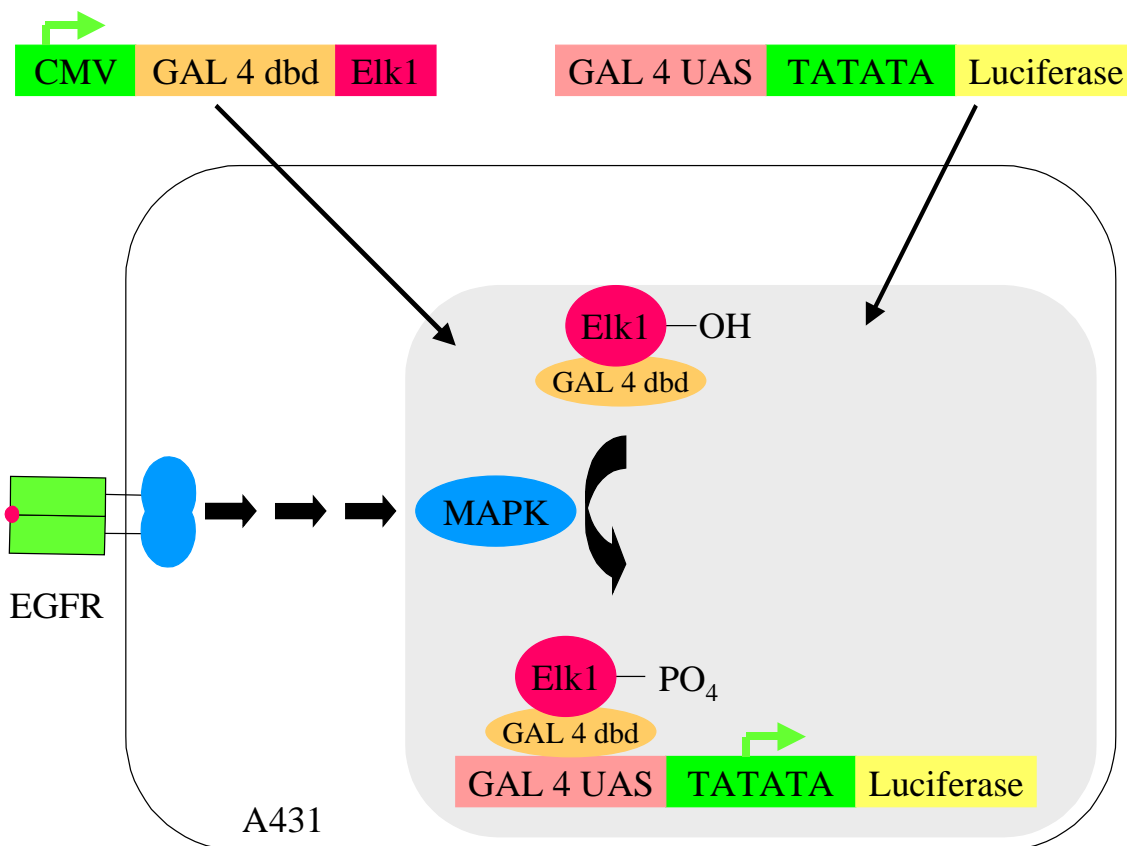


Abb. 4.6: MAPK-Reporter-gen-Assay

Der Vorteil dieses Testsystems besteht darin, daß es nach Etablierung schnell und einfach durchzuführen ist. Dieser Assay ist kostengünstig und nicht radioaktiv. In der Zelle gibt es keine endogene Luciferase-Aktivität, so daß die gemessenen Ergebnisse nicht verfälscht werden können (Hartmann, 1991).

### 4.2.2 Plasmide

Das Fusionsplasmid pFA2-Elk1 wird nach einer Maxipräparation durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Bam HI überprüft. pFA2-Elk1 (4935 Basenpaare) wird durch Eco RI bei Basenpaar 1461 geschnitten und durch Bam HI bei Basenpaar 1086, so daß zwei Fragmente von 375 und 4560 Basenpaaren entstehen. In Abb. 4.7 A ist das große Fragment bei 4560 Basenpaaren deutlich zu erkennen. Das kleine Fragment bei Basenpaar 375 kann man jedoch nur ganz schwach erkennen. Bei Auftragen von mehr Probe in die Geltaschen oder kontrastreicherer Einstellung der Aufnahme des Gels ist diese Bande deutlich erkennbar, allerdings ist dann die obere Bande überbelichtet. Die Maxipräparation des Fusionsplasmid pFA2-Elk1 ist somit erfolgreich.

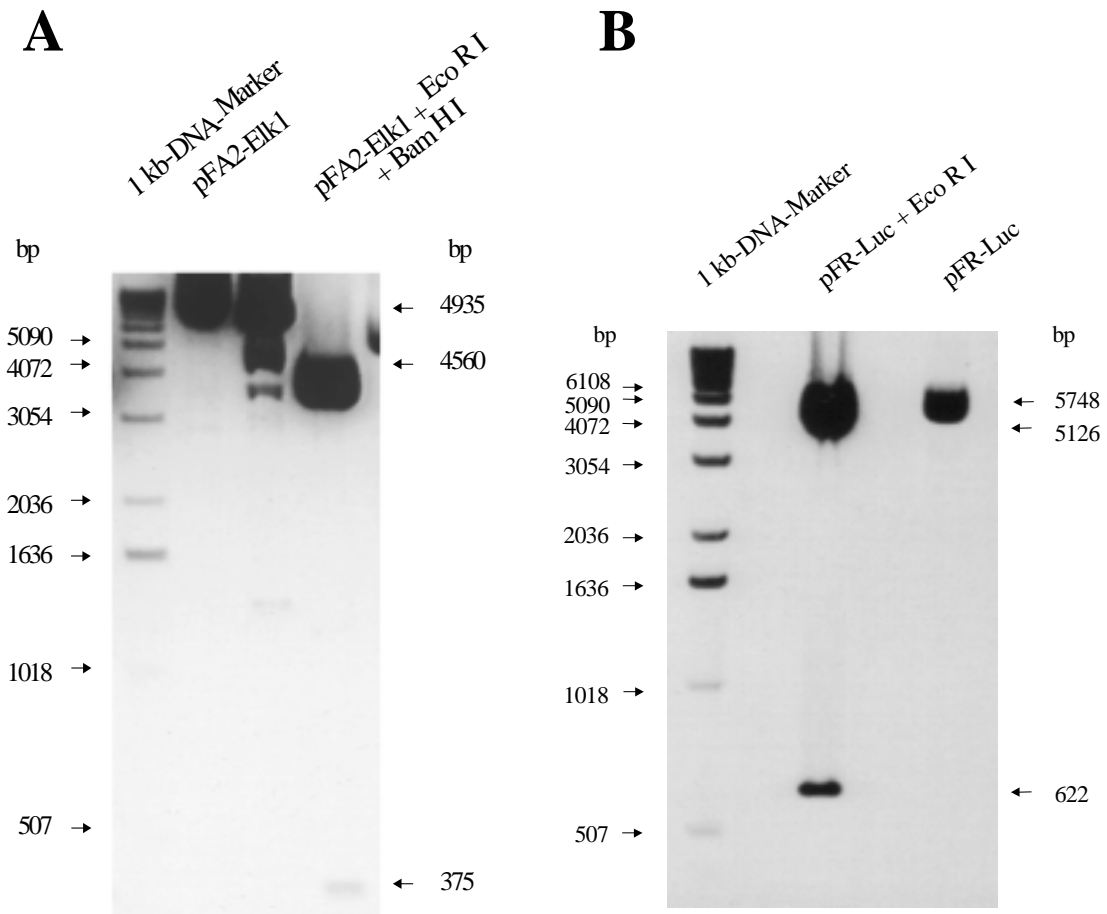


Abb. 4.7: Agarosegele von Plasmidmaxipräparationen mit und ohne Restriktionsverdau

**A:** Fusionsplasmid pFA2-Elk1

**B:** Reporterplasmid pFR-Luc

Das Reportergenplasmid pFR-Luc wird nach Maxipräparation durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym Eco RI überprüft. pFR-Luc (5748 Basenpaare) wird durch Eco RI an den Basenpaaren 2835 und 3457 geschnitten, so daß man 2 Fragmente mit 622 und 5126 Basenpaaren erhält. Diese beiden Banden konnten eindeutig identifiziert werden (vgl. Abb. 4.7 **B**), so daß die Plasmidpräparation keine Verunreinigungen enthält.

Auch die beiden Kontrollplasmide wurden überprüft (siehe Abb. 4.8).

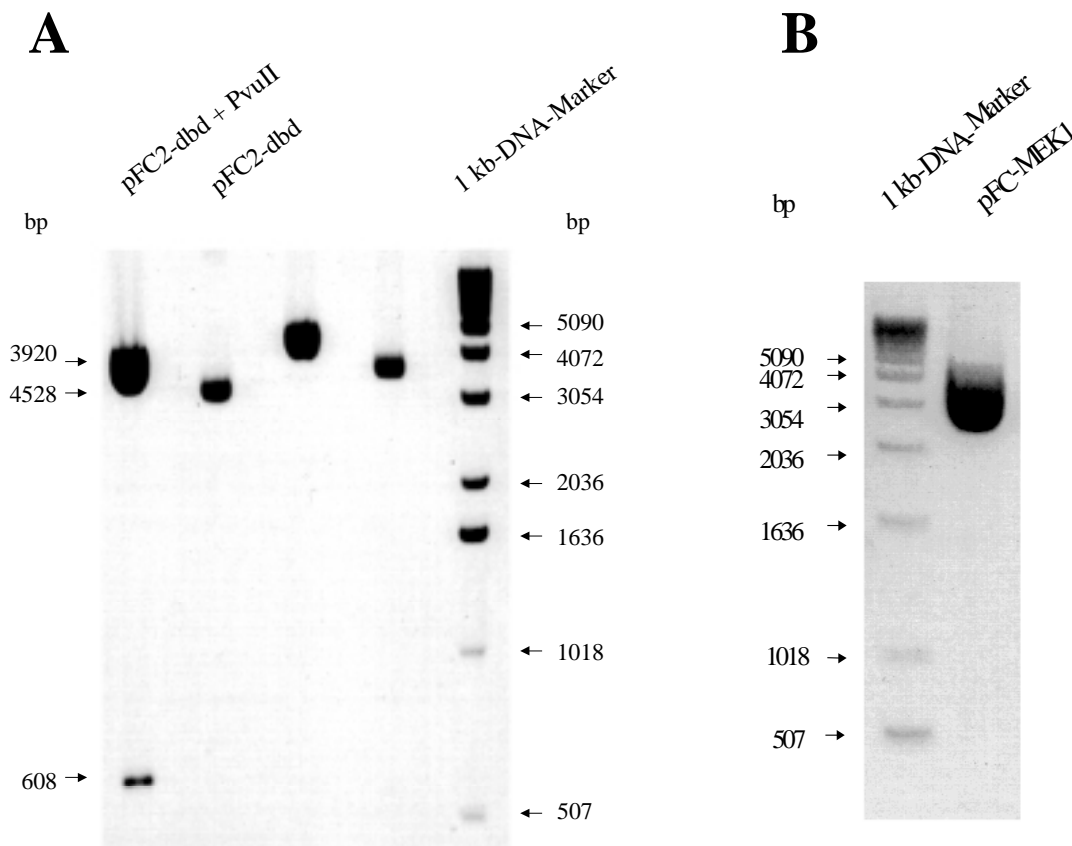


Abb. 4.8: Agarosegele von Plasmidmaxipräparationen mit und ohne Restriktionsverdau

**A:** Kontrollplasmid pFC2-dbd

**B:** Kontrollplasmid pFC-MEK1

Wenn man den Grundvektor pFA-CMV (4576 Basenpaare) am Anfang der Multiple cloning site (MCS) mit Bam HI (am Basenpaar 1086) und am Ende mit Bgl II (am Basenpaar 1134) schneidet, so erhält man einen Doppelstrang, dessen Enden direkt miteinander legiert werden

können. Das nach Ligation erhaltene Plasmid, dem fast vollständig die MCS fehlt, ist das Kontrollplasmid pFC2-dbd.

Die Maxipräparation des Kontrollplasmides pFC2-dbd wurde durch Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym Pvu II überprüft. Pvu II schneidet pFC2-dbd an den Basenpaaren 2104 und 2712, wodurch zwei Fragmente entstehen mit der Größe 608 und 3920 Basenpaaren. In Abb. 4.8 A konnten diese zwei Banden mit der entsprechenden Größe zugeordnet werden, womit die Aufarbeitung der Plasmide gelungen ist.

Über das Kontrollplasmid pFC-MEK1 (siehe Abb. 4.8 B) liegen keine Angaben über Anzahl der Basenpaare und Restriktionsschnittstellen vor, so daß lediglich überprüft wurde, ob eine Verunreinigung mit anderen Plasmiden vorliegt. Da in Abb. 4.8 B nur eine Bande erkennbar ist, wurde davon ausgegangen, daß die Aufarbeitung der Plasmide in Ordnung ist.

### **4.2.3 Austestung der Zelllinien und Transfektionsbedingungen für den MAPK-Reportergen-Assay**

Zur Durchführung des MAPK-Reportergen-Assays mußte nun eine geeignete Zelllinie ausgewählt werden. Einerseits sollte die Zelllinie durch EGF stimulierbar sein und andererseits einen genügend hohen MAPK-Spiegel besitzen, so daß der Transkriptionsfaktor Elk1 phosphoryliert werden kann.

Für die geeignete Zelllinie sollte anschließend die optimalen Transfektionsbedingungen ausgearbeitet werden. Die in Abb. 4.10 und 4.11 dargestellten Ergebnisse wurden durch Versuche in Petrischalen mit gleicher Zellzahl ermittelt.

Zu Beginn wurde die Elektroporation gewählt, eine physikalische Methode zum Gentransfer, bei der die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert wird. Diese Transfektionsmethode wurde bei A 431-Zellen und Chinesischen Hamsteroovarien-Zellen (CHO-Zellen) (siehe Abb. 4.9) angewendet, jedoch war hier die Transfektionseffizienz sehr niedrig. Ein Nachteil der Elektroporation ist der hohe Plasmidverbrauch bei der Transfektion. Ein weiterer Nachteil dieser Transfektionsmethode ist das Absterben einer hohen Anzahl von Zellen während der Elektroporation. Die daraus resultierende niedrige Luciferase-Aktivität konnte bei A 431-Zellen mit 10 µM Tyrphostin AG 1478 im Gegensatz zum Inkubationsansatz der CHO-Zellen inhibiert werden.

Als nächstes wurde die Polybrene-Dimethylsulfoxid-Methode, bei der die DNA-Adsorption an die Zelloberfläche durch dieses Polykation erhöht wird, angewendet. Diese Transfektionsmethode war wesentlich effizienter, als die Elektroporation. Für den Kontrollansatz von A 431-Zellen konnten zehnfach höhere relative Lichteinheiten erzielt werden, als beim Inkubationsansatz mit 10  $\mu$ M Tyrphostin AG 1478.

Damit ist diese Durchführung für eine Messung der Inhibierung des EGFR vermittelten Signalweges in den Zellkern geeignet. Die Transfektionseffizienz des Polybrene-Ansatzes mit CHO-Zellen war wesentlich schlechter. Die Luciferase-Aktivität dieses Ansatzes konnte durch den EGFR-Hemmstoff Tyrphostin AG 1478 nicht inhibiert werden.

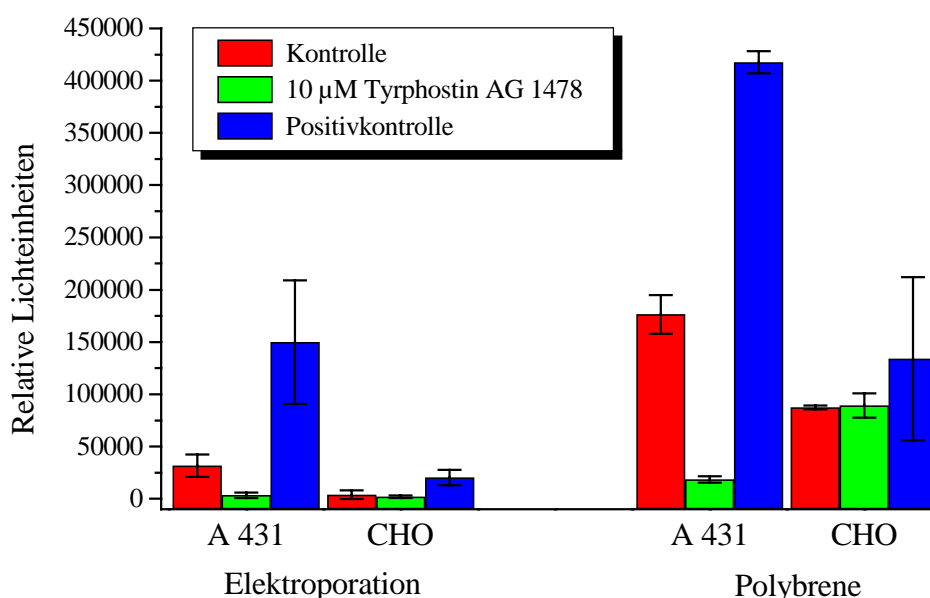


Abb. 4.9: Transfektion von A 431- und CHO- Zellen mittels Elektroporation und Polybrene-Methode

Für die Durchführung der Inkubationsansätze in Petrischalen waren diese Ergebnisse sehr gut, aber diese Art der Versuchsdurchführung eignet sich nicht für größere Versuchsansätze. Daher wurden noch die beiden Transfektionsmethoden Tfx<sup>TM</sup>-50 und FuGENE<sup>TM</sup>6 (siehe Abb. 4.10) ausgetestet.

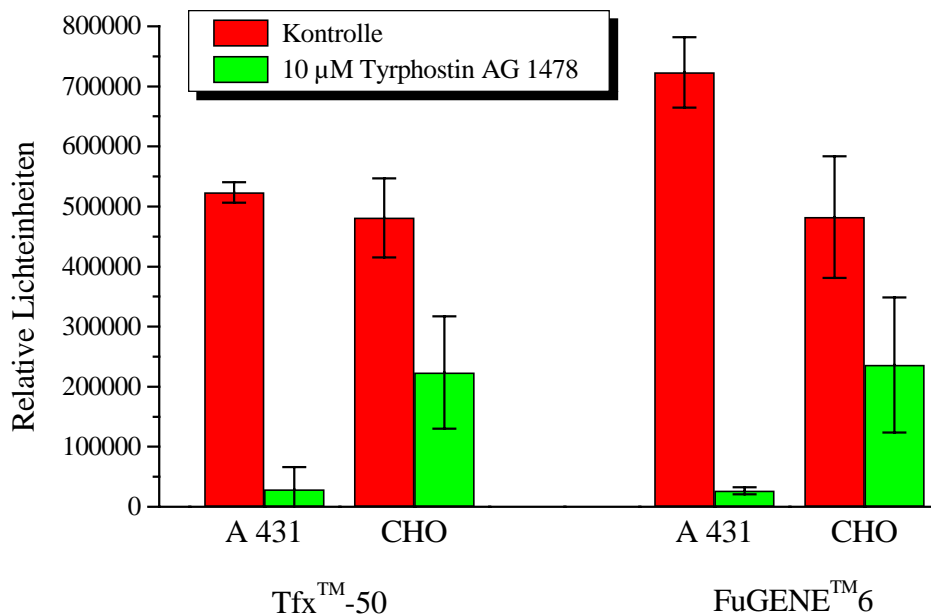


Abb. 4.10: Transfektion von A 431- und CHO- Zellen mit Tfx™-50 und FuGENE™6

Beide Methoden waren so effizient, daß das Zelllysät vor Messung im Luminometer 1:20 verdünnt werden mußte. Die Transfektionsmethode mit der höchsten Ausbeute an relativen Lichteinheiten und dem größten Unterschied zwischen Kontrollansatz und Tyrphostin AG 1478-Ansatz war die FuGENE™6-Methode. Da dadurch die beste Auswertbarkeit eines Versuches gewährleistet ist, ist die Methode der Wahl für die Durchführung eines Substanzscreenings in 24-Lochplatten somit die FuGENE™6-Methode.

Ungewöhnlich bei diesen Versuchen war das Verhalten der CHO-Zellen. Bei der Verwendung der Elektroporation oder Polybrene-Methode konnte keine Hemmung des Elk1-Phosphorylierung durch Inkubation mit Tyrphostin AG 1478 erzielt werden. Bei der Tfx™-50 und FuGENE™6-Methode hingegen konnte die Elk1-Phosphorylierung bei Inkubation von CHO-Zellen mit 10 μM Tyrphostin AG 1478 nur zu ca. 50 % reduziert werden.

Worin besteht der Unterschied im Verhalten im MAPK-Reporter-Gen-Assay zwischen A 431- und CHO-Zellen?



Nach Aushungern und Transfektion der Zellen, werden diese mit 10  $\mu$ M Tyrphostin AG 1478 inkubiert. Nach 30 Minuten werden die Zellen mit 100 ng/ml EGF-Lösung stimuliert. Hätten CHO-Zellen nun keine bzw. nur wenige EGF-Rezeptoren, so könnte keine Stimulation mit EGF-Lösung erzielt werden und somit dürfte es kein bzw. nur ein geringes Kontrollsignal geben. Da dies aber nicht der Fall ist, muß es für die unterschiedlichen Effekte dieser beiden Zelllinien andere Ursachen geben. CHO-Zellen besitzen eine Reihe von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen. Möglicherweise wird Tyrphostin AG 1478 nach Resorption in die Zelle schneller in der CHO-Zelle metabolisiert, als in A 431-Zellen. Damit könnte die Substanz möglicherweise nicht mehr ausreichend wirken. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der schlechten Aufnahme der Substanz in die Zelle, so daß sie nicht an ihrem Wirkort vorliegt. Damit könnte die Elk1-Phosphorylierung nur schlecht inhibiert werden. Die Phosphorylierung von Elk1 könnte auch durch einen anderen in den CHO-Zellen ausgeprägten Signalweg, wie z.B. den JNK-Weg (c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen) erfolgen.

#### 4.2.4 Plasmidkonzentration

Um ein optimales Signal im MAPK-Reportergen-Assay bei der Durchführung in 24-Lochplatten mit A 431-Zellen zu erzielen, wurden verschiedenen Plasmidkonzentrationen getestet.

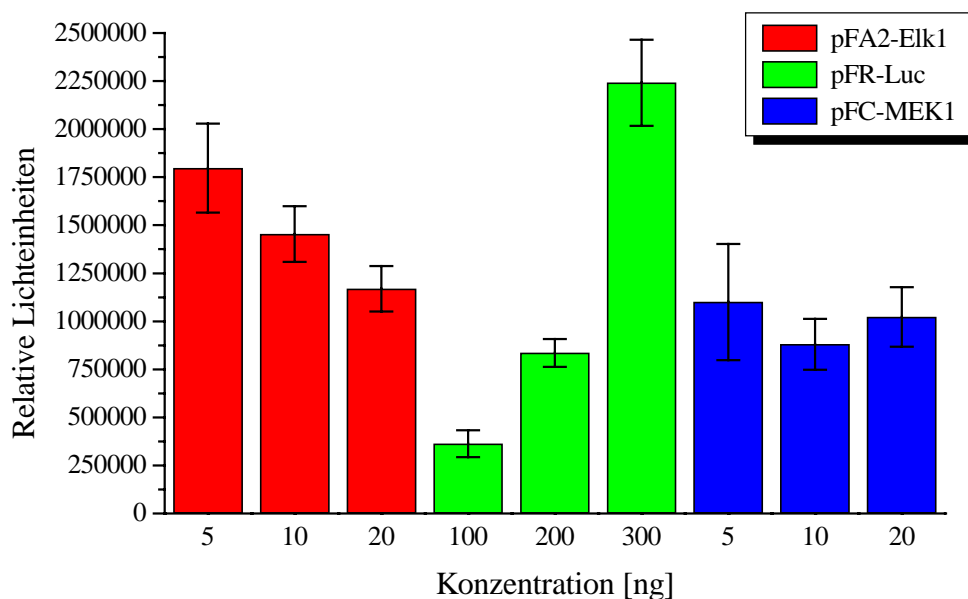


Abb. 4.11: Austestung der Plasmidkonzentrationen von pFA2-Elk1, pFR-Luc und pFC-MEK1

Aus der obigen Abbildung ergab sich für 60000 Zellen eine optimale Plasmidkonzentration von 5 ng pFA2-Elk1, 300 ng pFR-Luc und 5 ng pFC-MEK1.

#### 4.2.5 Validierung des MAPK-Reportergen-Testsystems mit Referenzsubstanzen

Zum Auswählen der geeigneten Zelllinie und der optimalen Transfektionsmethode wurde der EGFR-Hemmstoff Tyrphostin AG 1478 immer mitgeführt. Zur Validierung des Testsystems wurden nun weitere bekannte Hemmstoffe der zellulären Signaltransduktionskaskade getestet (siehe Abb. 4.12).

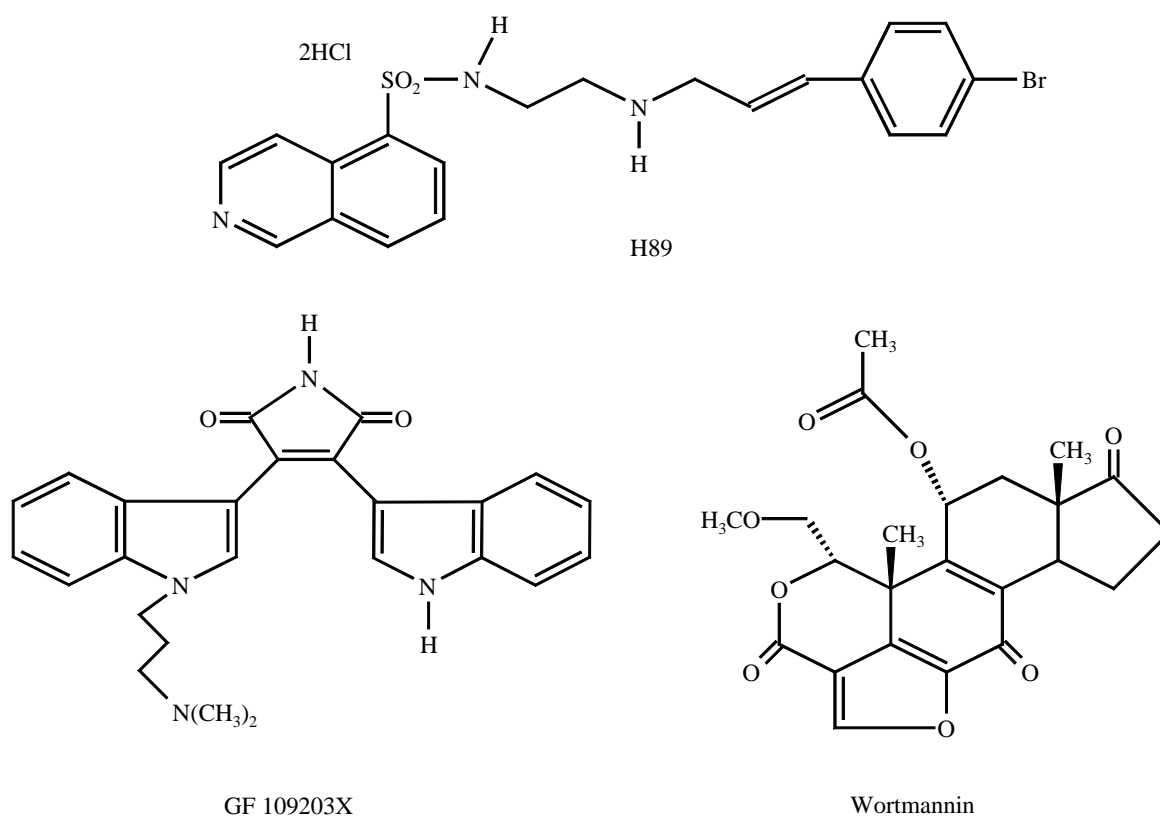


Abb. 4.12: Referenzsubstanzen H89, GF 109203X und Wortmannin

Zur Überprüfung dieses Testsystems wurde der bekannte PKC-Hemmstoff GF 109203X (GFX), der PKA-Hemmstoff H89 und der PI-3-Kinase-Hemmstoff Wortmannin eingesetzt.

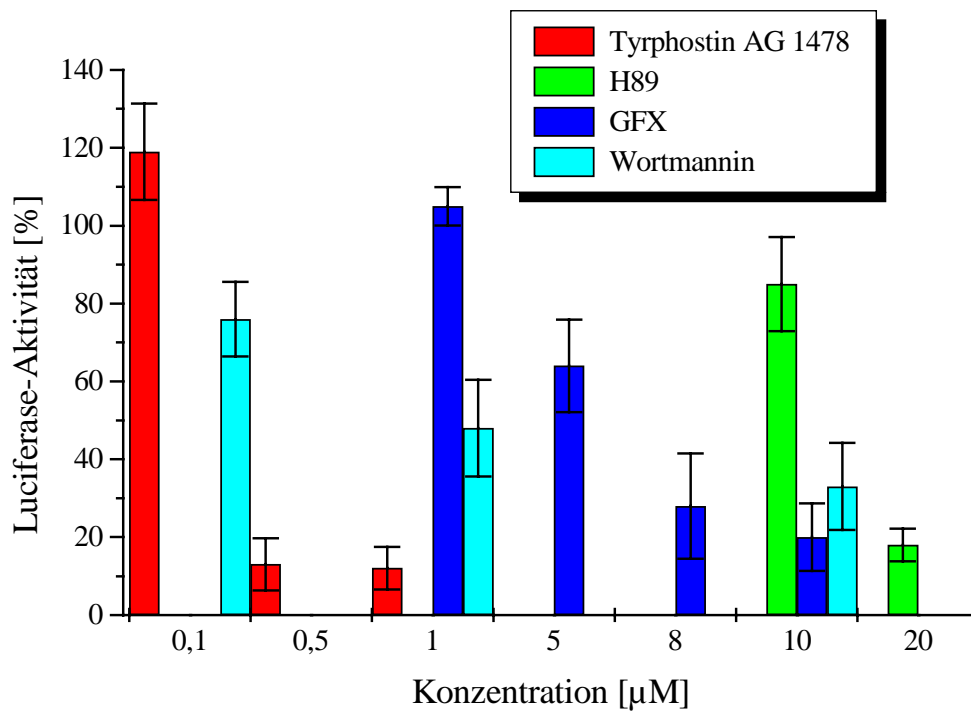


Abb. 4.13: MAPK-Reportergen-Assay mit Referenzsubstanzen

Im MAPK-Reportergen-Assay zeigten diese Referenzsubstanzen alle eine dosisabhängige Inhibierung der Luciferase-Aktivität. Tyrphostin AG 1478 inhibiert die Elk1-Phosphorylierung schon in einer Konzentration von 0,5 µM fast vollständig. 10 µM GFX hemmte die Elk1-Phosphorylierung auf ca. 20 %. H89 hemmte die Luciferase-Aktivität auf 18 % erst in einer Konzentration von 20 µM. Wortmannin inhibierte die Luciferase-Aktivität bei 10 µM auf 33 %. Vergleicht man die Werte mit den Cytotoxizitätsdaten in Tab. 4.2, so kann man feststellen, daß die Hemmung der Elk1-Phosphorylierung bei den Substanzen Tyrphostin AG 1478, Wortmannin und GFX im Bereich der Wachstumshemmung an A 431-Zellen liegt. H89 hemmt die Luciferase-Aktivität, im Vergleich zu Tyrphostin AG 1478, nicht in Konzentrationen, in denen Wachstumshemmung auftritt.

Tab. 4.2: Wachstumshemmung nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Referenzsubstanzen im Sulforhodamin B-Assay.

IC<sub>50</sub>: Konzentration, bei der das Zellwachstum gegenüber der Kontrolle um 50 % reduziert ist.

Substanz	A 431-Zelllinie IC <sub>50</sub> -Wert [ $\mu$ M]
Tyrphostin AG 1478	0,4 $\pm$ 0,1
Wortmannin	9,2 $\pm$ 3,0
GFX	6,1 $\pm$ 0,1
H89	7,1 $\pm$ 0,8

#### 4.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Etablierung des MAPK-Reportergen-Assays

Die durch Transformation und anschließender Amplifikation in *E. coli* gewonnenen Plasmide wurden isoliert und auf Reinheit überprüft. Als geeignete Zelllinie wurde für die Transfektion das Vulvacarcinom A 431 ausgewählt. Als optimale Transfektionsmethode für die Durchführung in 24-Lochplatten erwies sich die FuGENE<sup>TM</sup>6-Methode. Nach Austestung der Plasmidkonzentrationen wurden Versuche mit PKC-, PI-3-Kinase, EGFR- und PKA-Inhibitoren durchgeführt. Wie nach Abb. 2.1 zu erwarten war, interagieren diese Substanzen mit dem MAPK-Signaltransduktionsweg. Die Substanzen Tyrphostin AG 1478, Wortmannin und GFX zeigen in Konzentrationen, in denen Wachstumshemmung zu beobachten war, eine Hemmung der Elk1-Phosphorylierung.

Nachdem die Etablierung und Validierung des MAPK-Reportergen-Assays mit der Referenzsubstanz Tyrphostin AG 1478 erfolgreich war, können nun weitere Substanzen auf eine Hemmung des MAPK-Signaltransduktionsweges untersucht werden.

## 4.3 Wirkmechanistische Untersuchung verschiedener Substanzklassen

Im Anhang (Seite 154-159) befinden sich Strukturformelübersichten der einzelnen untersuchten Substanzklassen zum Ausklappen.

### 4.3.1 Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole

Die Arbeitsgruppe Melnik, Moskau, hat drei Bisindolylmaleimide und zehn Indolocarbazole (siehe Anhang S. 154 oder Tab. 2.1) mit unterschiedlichen Zuckersubstitutionen in  $R_1$  sowie Variation der Reste in Position X und  $R_2$  zu wirkmechanistischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Niederberger beobachtete eine gute wachstumshemmende Wirkung dieser Substanzen ( $IC_{50}$ -Werte  $< 10 \mu M$ ) mit Ausnahme von 1 und 11 im Sulforhodamin B-Assay an LXFL529L-Zellen (Niederberger, 1998). An isolierter PKC zeigten diese Substanzen ebenfalls gute Hemmwirkung, wiederum mit Ausnahme von 1 und 11. Im Gegensatz dazu, konnte Niederberger deutliche Hemmung der PKC-Aktivität in der Zelle nur mit den Substanzen 4 und 10 erzielen. Eine geringere Inhibierung der PKC in der Zelle zeigten Substanz 2 und 5; die übrigen Substanzen waren praktisch unwirksam mit  $IC_{50}$ -Werten  $> 50 \mu M$ .

Alle diese Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole hemmen die cdk1 (Cyclin dependent kinase 1) mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $< 10 \mu M$  (Niederberger, 1998).

Die Dianilino-Phthalimide CGP 52 411 und CGP 53 353 (siehe Abb. 2.9) stellen in Hinblick auf Tyrosinkinasen selektive Inhibitoren des EGFRs dar, die kompetitiv um die ATP-Bindungsstelle konkurrieren (Buchdunger et al., 1994; Traxler et al., 1997). Sie sind ebenfalls potente Hemmstoffe der PKC (Buchdunger et al., 1994; Traxler et al., 1997). Auch Rezeptor-Tyrosinkinasen bilden ein Target für Indolocarbazole. Indolocarbazol 3744W (siehe Abb. 2.9) ist ein neuer, potenter und selektiver Hemmstoff der Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors in intakten Zellen (Spacey et al., 1998). Aufgrund der Strukturhomologie dieser Verbindungen zu Bisindolylmaleimiden und Indolocarbazolen der Melnik-Gruppe lag es nahe, diese in Hinblick auf eine Wirkung gegenüber der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs zu untersuchen.

Die vorliegenden Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole wurden in Konzentration bis zu ihrer maximalen Löslichkeit im EGFR-ELISA getestet (siehe Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Testung der Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole im EGFR-ELISA

Substanz	Konzentration im Ansatz	Hemmung der PTK-Aktivität [%]
1	80 $\mu$ M	10 $\pm$ 5,3
2	60 $\mu$ M	13 $\pm$ 6,6
3	100 $\mu$ M	23 $\pm$ 8,2
4	100 $\mu$ M	14 $\pm$ 5,7
5	60 $\mu$ M	15 $\pm$ 5,8
6	10 $\mu$ M	4 $\pm$ 6,4
7	30 $\mu$ M	20 $\pm$ 5,6
8	10 $\mu$ M	4 $\pm$ 6,1
9	30 $\mu$ M	12 $\pm$ 4,2
10	80 $\mu$ M	24 $\pm$ 5,4
11	30 $\mu$ M	26 $\pm$ 4,9
12	30 $\mu$ M	9 $\pm$ 5,5
13	20 $\mu$ M	5 $\pm$ 5,5

Die Substanzen zeigten in dem untersuchten Konzentrationsbereich im EGFR-ELISA keine, bis geringe Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs. Da die IC<sub>50</sub>-Werte der SRB-Teste im unteren mikromolaren Bereich lagen, ist die beobachtete Hemmung von ca. 20 % bei einigen Derivaten im untersuchten Konzentrationsbereich nicht relevant.

Die beobachteten antiproliferativen Effekte dieser Substanzgruppe an LXFL529L-Zellen (Niederberger, 1998) können somit nicht auf eine Beeinflussung der Proteintyrosin-Kinaseaktivität des EGFRs zurückgeführt werden.

Die Indolocarbazole 4-10, 12 und 13 unterscheiden sich gegenüber dem Staurosporin-Derivat 3744W nur in den Positionen R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> und in der Phenylringsubstitution. Hier wäre zu klären,

---

ob diese Substanzen eine Hemmung der Autophosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase PDGFR, wie dies für die Substanz 3744W gilt, bewirken könnten.

#### **4.3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der wirkmechanistischen Untersuchungen von Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole**

Die untersuchten Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole zeigten in dem untersuchten Konzentrationsbereich keine bzw. eine geringe Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs. Somit bleibt die Frage offen, ob die wachstumshemmende Wirkung dieser Substanzklassen nur auf die Hemmung der PKC, der cdk1 und der Topoisomerase (Niederberger, 1998) zurückzuführen ist, oder ob andere Targets wie zum Beispiel die Rezeptor-Tyrosinkinase PDGFR (Spacey et al., 1998) eine Rolle spielen könnten.

## 4.3.2 Substituierte Pteridine

DC-TA-46 und seine Derivate hemmen das Zellwachstum von LXFL529L-Zellen, darüber hinaus sind sie zum Teil gute PDE4-Hemmstoffe (siehe Anhang S. 155 oder 2.8.3). Um weiteren Aufschluß zum potentiellen Wirkmechanismus zu erhalten, wurde diese Substanzklasse auf eine Beeinflussung der Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs hin untersucht. Substanzen, die die PTK-Aktivität des EGFRs inhibieren, wurden anschließend im zellulären Testsystem auf eine Beeinflussung des MAPK-Signalweges hin untersucht.

### 4.3.2.1 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs

Substituierte Pteridine lassen sich nach ihrem Substitutionsmuster in vier verschiedene Gruppen untergliedern. Bei Gruppe 1 findet eine Variation des Pteridingrundgerüsts in Position 4 und 7 statt. Gruppe 2 beinhaltet Verbindungen, bei denen Chlor in Position 6 gegen Wasserstoff oder eine Methyl-Gruppe ausgetauscht wird. Bei Gruppe 3 findet jeweils ein Austausch der funktionellen Gruppen in Position 3 statt.

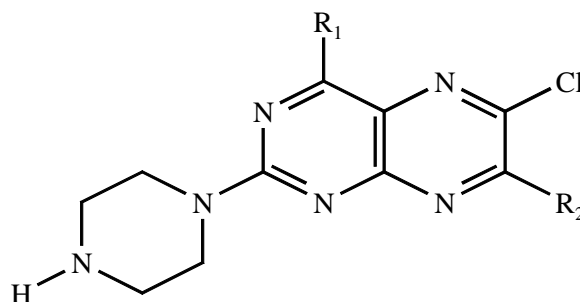
Da diese Derivate sehr unterschiedlich in ihrem Lösungsverhalten sind, wurde als Vergleichskonzentration 30  $\mu\text{M}$ , die höchste (gemeinsame) im ELISA einsetzbare Konzentration, gewählt.

#### 4.3.2.1.1 Modifikation in Position 4 und 7 (Gruppe 1)

Die Leitsubstanz DC-TA-46 (7a) zeigt im Protein-Tyrosinkinase-ELISA (PTK-ELISA) bei 30  $\mu\text{M}$  eine Hemmung von 22 % (siehe Tab. 4.4). Die Wirkung von 7c liegt im PTK-ELISA im gleichen Konzentrationsbereich wie 7a. Ein Austausch von Benzylamino gegen Pyrrolidino an Position 7 führt somit zu keinem Wirkverlust. Die Einführung von Dimethylamino in Position 4 oder 7 bei den Substanzen 7d-f führt hingegen zum Verlust der Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase.



Tab. 4.4: Ergebnisse der PTK-ELISAs von Pteridinderivaten mit Variationen des Grundgerüsts in Position 4 (R<sub>1</sub>) und Position 7 (R<sub>2</sub>)



Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Hemmung der PTK-Aktivität [%] Konzentration 30 µM	PDE4-Hemmung IC <sub>50</sub> [µM] (Merz et al., 1998)
7a/ DC-TA-46	pyrrolidino	benzylamino	22 ± 7,2	0,016 ± 0,005
7b	benzylamino	pyrrolidino	n.b.	0,083 ± 0,037
7c	pyrrolidino	pyrrolidino	21 ± 4,5	0,059 ± 0,005
7d	pyrrolidino	dimethylamino	2 ± 6,1	0,046 ± 0,006
7e	dimethylamino	benzylamino	5 ± 6,4	0,30 ± 0,14
7f	dimethylamino	dimethylamino	-1 ± 8,4 *	1,2 ± 0,5

n.b.: nicht bestimmt

\* Die optische Dichte des 7f-Inkubationsansatzes ist höher, als die des Kontrollansatzes und wird damit als negativer Wert angegeben.

In Abb. 4.14 ist die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität gegen die Substanzkonzentration verschiedener Pteridinderivate aufgetragen. Für die Substanz 7a erhält man im PTK-ELISA einen IC<sub>50</sub>-Wert von 48 ± 3,5 µM und für 7b einen IC<sub>50</sub>-Wert von 59 ± 18 µM. Diese IC<sub>50</sub>-Werte liegen im Vergleich zu Tyrphostin AG 1478 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 2,4 µM um den Faktor 20 höher. Für die Substanz 7c, die fast die gleiche Hemmwirkung wie 7a bei 30 µM zeigte, konnte kein IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden, da die Substanz in höheren Konzentrationen nicht löslich war.

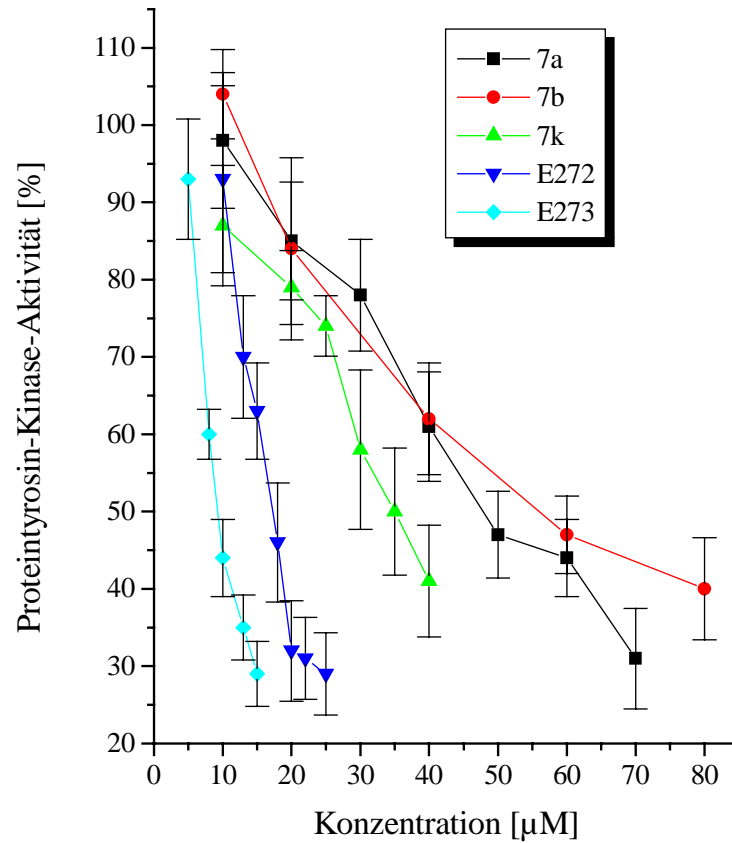


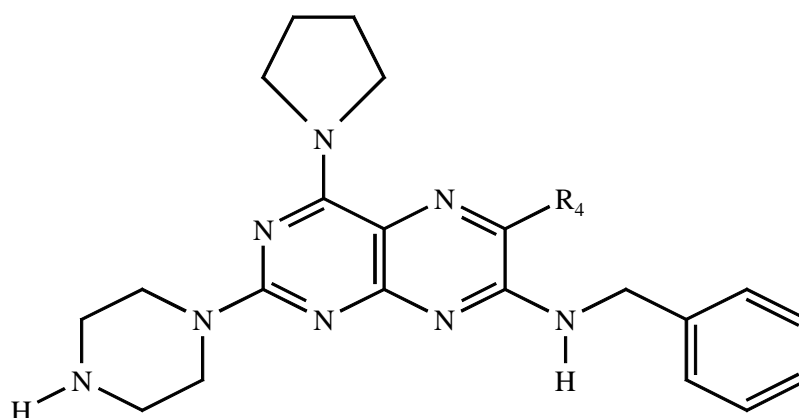
Abb. 4.14: PTK-ELISA mit verschiedenen Pteridinderivaten

7a und 7b, die sich in den Substituenten  $R_1$  und  $R_2$  unterscheiden, zeigten im PTK-ELISA kaum einen Unterschied in der Hemmwirkung. Im Hinblick auf die PDE4-Hemmung unterscheiden sich diese beiden Substanzen jedoch deutlich (Merz et al., 1998). Der  $IC_{50}$ -Wert der PDE4-Hemmung von 7a ist fünffach niedriger, als bei 7b.

### 4.3.2.1.2 Modifikation in Position 6 (Gruppe 2)

Ersetzt man bei 7a (DC-TA-46) in Position 6 Chlor gegen Wasserstoff (7o) oder eine Methylgruppe (E276), so ist keine Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs im Vergleich zu 7a mehr festzustellen (siehe Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Ergebnisse der PTK-ELISAs von Pteridin-Derivaten mit Variationen des Grundgerüsts in Position 6 (R<sub>4</sub>)



Substanz	R <sub>4</sub>	Hemmung der PTK-Aktivität [%] Konzentration 30 µM	PDE4-Hemmung IC <sub>50</sub> [µM] <sup>a</sup> (Merz et al., 1998), <sup>b</sup> (Müller, 2000)
7o	H	-16 ± 15,3 *	0,36 ± 0,09 <sup>a</sup>
E276	CH <sub>3</sub>	-8 ± 15,2 *	0,2 ± 0,2 <sup>b</sup>

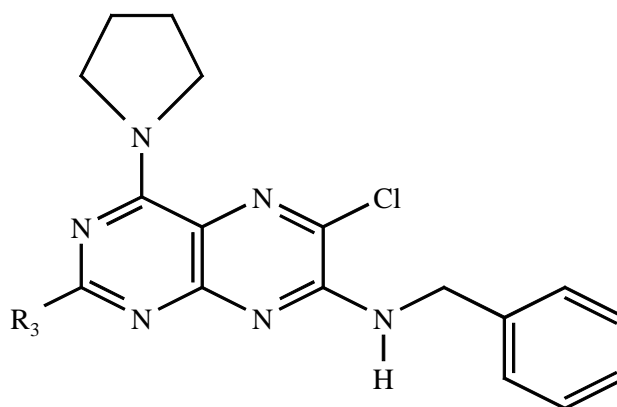
\* Die optische Dichte des Inkubationansatzes ist höher, als die des Kontrollansatzes und wird damit als negativer Wert angegeben.

Vergleicht man die PDE4-Hemmung (siehe Tab. 4.5) von 7o und E276 mit 7a, so ist ein Wirkverlust um den Faktor 10 festzustellen (Merz et al., 1998; Müller 2000). Die Einführung eines voluminösen Restes wie z.B. einer Methylgruppe verhindert eine Hemmwirkung gegenüber der PTK des EGFRs. Aus diesen Ergebnissen kann man schlußfolgern, daß das Chloratom in Position 6 von entscheidender Bedeutung für die Hemmung der EGFR assoziierten PTK ist. Dies ist bei der PDE4-Hemmung anders, wie die Ergebnisse für die Substanzen 7o und E276 zeigen (Merz et al., 1998; Müller, 2000).

### 4.3.2.1.3 Modifikation in Position 2 (Gruppe 3)

Führt man in 7a anstelle des Piperazinrestes an Position 2 des Pteridingrundgerüsts Morpholino (7h), Dimethylamino (7m) oder 2-Hydroxyethylamino (7l) ein, so führt dies ebenfalls zum Verlust der Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs im PTK-ELISA (siehe Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Ergebnisse der PTK-ELISAs von Pteridinderivaten mit Variationen des Grundgerüsts in Position 2 (R<sub>3</sub>)



Substanz	R <sub>3</sub>	Hemmung der PTK-Aktivität [%] Konzentration 30 µM	PDE4-Hemmung IC <sub>50</sub> [µM] (Merz et al., 1998)
7h	morpholino	-4 ± 11,5 *	2,5 ± 0,4
7k	2-aminoethylamino	42 ± 10,3	3,7 ± 0,5
7l	2-hydroxyethylamino	-6 ± 14,4 *	2,8 ± 0,1
7m	dimethylamino	10 ± 4,2	1,8 ± 1,2

\* Die optische Dichte des Inkubationansatzes ist höher, als die des Kontrollansatzes und wird damit als negativer Wert angegeben.

Im Gegensatz zum 2-Hydroxyethylamino (7l) bewirkt die Einführung von 2-Aminoethylamino (7k) eine Erhöhung der Hemmwirkung auf die EGFR assoziierte Tyrosinkinase-Aktivität. Die Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs durch 7k bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  ist mit  $42 \pm 10,3 \%$  im Vergleich zu 7a, fast doppelt so hoch. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 7k im PTK-ELISA (siehe Abb. 4.14) liegt mit  $35 \pm 1,2 \mu\text{M}$  deutlich unter dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 7a, aber immer noch höher als der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Referenzsubstanz Tyrphostin AG 1478.

Die Substanzen 7h-7m unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die PDE4 kaum (Merz et al., 1998). 7l und 7m bewirken an der Zelllinie LXFL529L eine um den Faktor 4-5 niedrigere Wachstumshemmung, als die Substanz 7k (Merz et al., 1998). 7h weist keine Cytotoxizität in diesem Bereich auf (Merz et al., 1998). Damit liegt die Schlußfolgerung nahe, daß es für die Substanz 7k neben der PDE4 noch andere Targets geben muß, die für die beobachtete gute Wachstumshemmung verantwortlich sein müssen.

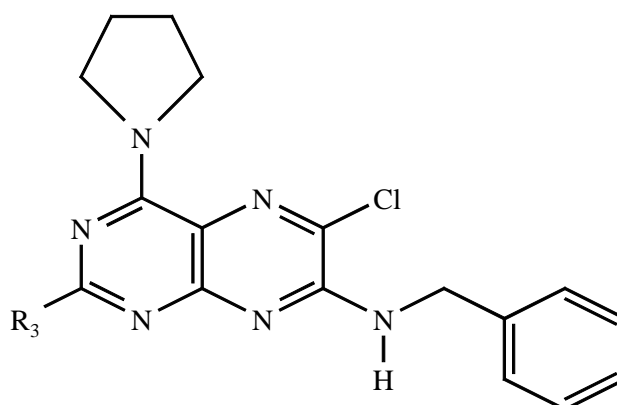
Um den Einfluß auf die zelluläre Signaltransduktionskaskade ausgehend von EGFR durch die Substanzen 7a und 7k besser beurteilen zu können, wurden weitere Untersuchungen mit diesen Substanzen im zellulären MAPK-Reportergen-Assay durchgeführt.

Führt man weitere Modifikationen am Piperazinrest (siehe Tab. 4.7) durch, so erhält man zwei Derivate, mit verstärkter Hemmwirkung gegenüber der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs im Vergleich zu 7a, 7b und 7k.

Die Einführung von 4-Glycylpiperazino (E272) an Position 2 des Pteridingrundgerüsts führt zur Halbierung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes im PTK-ELISA auf  $17 \pm 2,0 \mu\text{M}$  im Vergleich zu 7k. Die Verlängerung des Restes in Position 2 des Pteridingrundgerüsts bewirkt eine nochmalige Verbesserung der Hemmwirkung gegenüber der EGFR assoziierten Tyrosinkinase. So erzielt das 4-Lysylpiperazino-Derivat (E273) einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $9 \pm 1,0 \mu\text{M}$  im PTK-ELISA und ist damit in Hinblick auf die Hemmung der PTK-Aktivität das wirkungsstärkste Pteridin-derivat.

E272 und E273 weisen im Gegensatz zu 7a aber nur eine geringe PDE4-Hemmung auf (Müller, 2000). Im SRB-Test kann nach Inkubation mit E272 und E273 eine Inhibierung des Wachstums von LXFL529L-Zellen festgestellt werden (Müller, 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Substanzen E272 und E273 ein anderes Wirkungsspektrum besitzen, als die Leitsubstanz 7a. Daher wurden diese Substanzen ebenfalls auf eine Hemmung des MAPK-Signalweges hin untersucht.

Tab. 4.7: Ergebnisse der PTK-ELISAs von Pteridinderivaten mit Variationen des Grundgerüsts in Position 2 (R<sub>3</sub>)



Substanz	R <sub>3</sub>	Hemmung der	PDE4-Hemmung
		PTK-Aktivität [%] Konzentration 30 μM	IC <sub>50</sub> [μM] <sup>a</sup> (Merz et al., 1998) <sup>b</sup> (Kunz, 2000)
7g	4-methylpiperazino	0 ± 11,6	3,1 ± 0,7 <sup>a</sup>
7i	4-acetylpiperazino	-8 ± 15,2 *	5,9 ± 1,1 <sup>a</sup>
7j	3-oxopiperazino	8 ± 8,5	4,2 ± 0,5 <sup>a</sup>
E272	4-glycylpiperazino (Hydrochlorid)	n.b.	1,2 ± 0,5 <sup>b</sup>
E273	4-lysylpiperazino (Hydrochlorid)	n.b.	8,0 ± 3,2 <sup>b</sup>
E274a	4-carboxymethylpiperazino (Na-Salz)	9 ± 13,6	2,8 ± 0,2 <sup>b</sup>
E274	4-carboxymethylpiperazino	-4 ± 9,3 *	1,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
E275a	4-(1-glutamyl)piperazino (Na-Salz)	36 ± 7,6	8,1 ± 1,5 <sup>b</sup>
E275	4-(1-glutamyl)piperazino	-12 ± 10,2 *	32,9 ± 5,5 <sup>b</sup>
E278	4-(2-hydroxyethyl)-piperazino	-34 ± 9,6 *	27,6 ± 5,8 <sup>b</sup>
E279	4-(2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethyl)	-29 ± 7,2 *	> 100 <sup>b</sup>
E280	4-carbamoylmethylpiperazino	-4 ± 6,7 *	27,3 ± 0,7 <sup>b</sup>

n.b.: nicht bestimmt

\* Die optische Dichte des Inkubationansatzes ist höher, als die des Kontrollansatzes und wird damit als negativer Wert angegeben.

Durch Einführung des Restes 4-(1-Glutamyl)piperazinos in Position 2 des Pteridingrundgerüsts erhält man die Substanz E275a, die bei 30  $\mu\text{M}$  eine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs von  $36 \pm 7,6 \%$  zeigt. Eine  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung mit dieser Substanz war nicht möglich, da die Substanz bei höheren Konzentrationen ausfiel.

Weitere Substitutionen in Position 4 des Piperazinos führten im Vergleich zu 7a, E272 und E273 zu einem Verlust der PTK-Hemmung des EGFRs (siehe Tab. 4.7), so daß bei diesen Substanzen keine weiteren wirkmechanistischen Untersuchungen vorgenommen wurden.

#### 4.3.2.2 Cytotoxizität

Betrachtet man die Substanzen in Hinblick auf Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen und A 431-Zellen (siehe Tab. 4.8), so sind kaum Unterschiede zwischen 7a, 7k, 7o, E272, und E276 feststellbar. Diese Substanzen wirken an A 431-Zellen nur geringfügig besser, als an LXFL529L-Zellen.

Tab. 4.8: Wachstumshemmung nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen Pteridin-derivaten im Sulforhodamin B-Assay.  
 $\text{IC}_{50}$ : Konzentration, bei der das Zellwachstum gegenüber der Kontrolle um 50 % reduziert ist.

Substanz	Zelllinie	
	A 431 $\text{IC}_{50}$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ]	LXFL529L $\text{IC}_{50}$ -Werte [ $\mu\text{M}$ ]
7a	$1,1 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,3^a$
7k	$2,3 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,4^a$
7o	$4,2 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,7^a$
E272	$3,2 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,4^b$
E273	$10,0 \pm 1,7$	$21,9 \pm 0,7^b$
E276	$3,7 \pm 0,7$	$4,1 \pm 0,3^b$

<sup>a</sup> (Merz et al., 1998), <sup>b</sup> (Müller, 2000)

Vergleicht man nun die Cytotoxizitätsdaten der SBR-Tests von E272 an A 431-Zellen mit LXFL529L-Zellen so kann man kaum einen Unterschied zwischen diesen beiden Zelllinien feststellen (siehe Tab. 4.8). Beim 4-Lysinpiperazino-Derivat (E273) hingegen zeigt sich eine höhere Empfindlichkeit der A 431-Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $10 \pm 1,7$  gegenüber den LXFL529L-Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $21,9 \pm 0,7$  (siehe Tab. 4.8). Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei 7a, hier halbiert sich der  $IC_{50}$ -Wert bei A 431-Zellen im Vergleich zu LXFL529L-Zellen. A 431-Zellen exprimieren ca. siebenmal mehr EGF-Rezeptoren, als die Zelllinie LXFL529L. Da aus der Substanzklasse der Pteridine die Substanz E273 am effektivsten die PTK-Aktivität des EGFRs inhibiert hat, könnte man daraus schließen, daß der EGFR ein wichtiges Target für E273 darstellen könnte.

### 4.3.2.3 Hemmung der Elk1-Phosphorylierung

Die Substanzen 7a, 7k, E272, E273 und E276, die im PTK-ELISA untersucht worden sind, wurden anschließend im MAPK-Reportergen-Assay eingesetzt. Es wurden sowohl Substanzen, die die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs inhibieren, als auch PDE4-Hemmstoffe darstellen, untersucht.

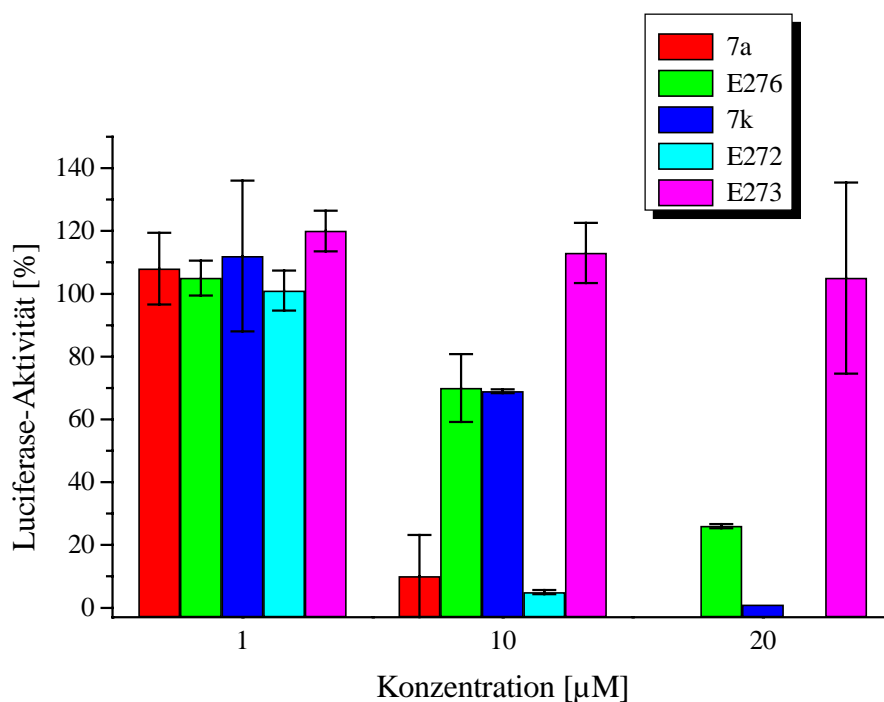


Abb. 4.15: MAPK-Reportergen-Assay mit 7a und Derivaten



Alle untersuchten Substanzen zeigten bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  keine Hemmung der Luciferase-Aktivität. E273 zeigte bei 1  $\mu\text{M}$  sogar eine geringe Stimulation der Luciferase-Aktivität auf  $120 \pm 6,5 \%$ . Erst bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  konnte man bei einigen Substanzen eine Hemmung der Luciferase-Aktivität feststellen. Nahezu vollständig wurde die Elk1-Phosphorylierung durch die Substanz E272 inhibiert. Durch Inkubation mit 7a konnte die Luciferase-Aktivität auf  $10 \pm 13,2 \%$  reduziert werden, die damit doppelt so hoch war, wie die Luciferase-Aktivität nach E272 Behandlung. Die Elk1-Phosphorylierung wurde durch die Substanzen E276 und 7k bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf  $70 \pm 10,8 \%$  bzw.  $69 \pm 0,6 \%$  reduziert. Der Einfluß dieser Substanzen auf die Signaltransduktion des MAPK-Weges war damit bei dieser Konzentration annähernd gleich. Bei 20  $\mu\text{M}$  hingegen konnte man deutliche Unterschiede bei der Elk1-Phosphorylierung feststellen. E276 reduzierte die Luciferase-Aktivität nur auf  $26 \pm 0,7 \%$ , wohingegen 7k zur vollständigen Inhibierung auf  $1 \pm 0 \%$  führte.

E273 zeigte bis 20  $\mu\text{M}$  keine Hemmung der Luciferase Aktivität im MAPK-Reporter-Gen-Assay.

7a stellt im Vergleich zu Tyrphostin AG 1478, einen nur gering wirksamen EGFR-Hemmstoff ( $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $48 \pm 3,5 \mu\text{M}$ ) dar. Im MAPK-Reporter-Gen-Assay hemmt 7a fast vollständig die Elk1-Phosphorylierung bei 10  $\mu\text{M}$ . Damit besteht eine Diskrepanz zwischen dem PTK-ELISA mit isoliertem Enzym und dem transgenen, zellulären Testsystem.

Wie können diese Unterschiede nun erklärt werden?

In Abb. 4.16 ist die Signaltransduktionskaskade ausgehend von EGFR aufgeführt. Crosstalks zwischen dem MAPK-Signalweg und anderen zellulären Signaltransduktionswegen sind hier aufgezeigt. Eine PDE4-Hemmung durch 7a bewirkt einen Anstieg von cAMP in der Zelle, wodurch die PKA aktiviert wird (Wagner, 1998). Die aktivierte PKA kann wiederum die Raf-Kinase inhibieren. Damit wird über die Hemmung der Hydrolyse von cAMP ein Eingriff in die Signalübertragung des MAPK-Weges möglich. Die Hemmung der Elk1-Phosphorylierung durch 7a könnte somit durch das Zusammenfließen zweier Signaltransduktionswege in den MAPK-Signalweg erklärt werden. Welcher Signalweg allerdings den Hauptbeitrag für die Reduzierung der Luciferase-Aktivität im MAPK-Reporter-Gen-Assay liefert kann mit diesen Ergebnissen nicht geklärt werden. Ob aus der Beeinflussung des EGFR in der Zelle tatsächlich eine Hemmung des MAPK-Weges resultiert, müßte an einem Target downstream des EGFRs und upstream der Raf-Kinase untersucht werden.

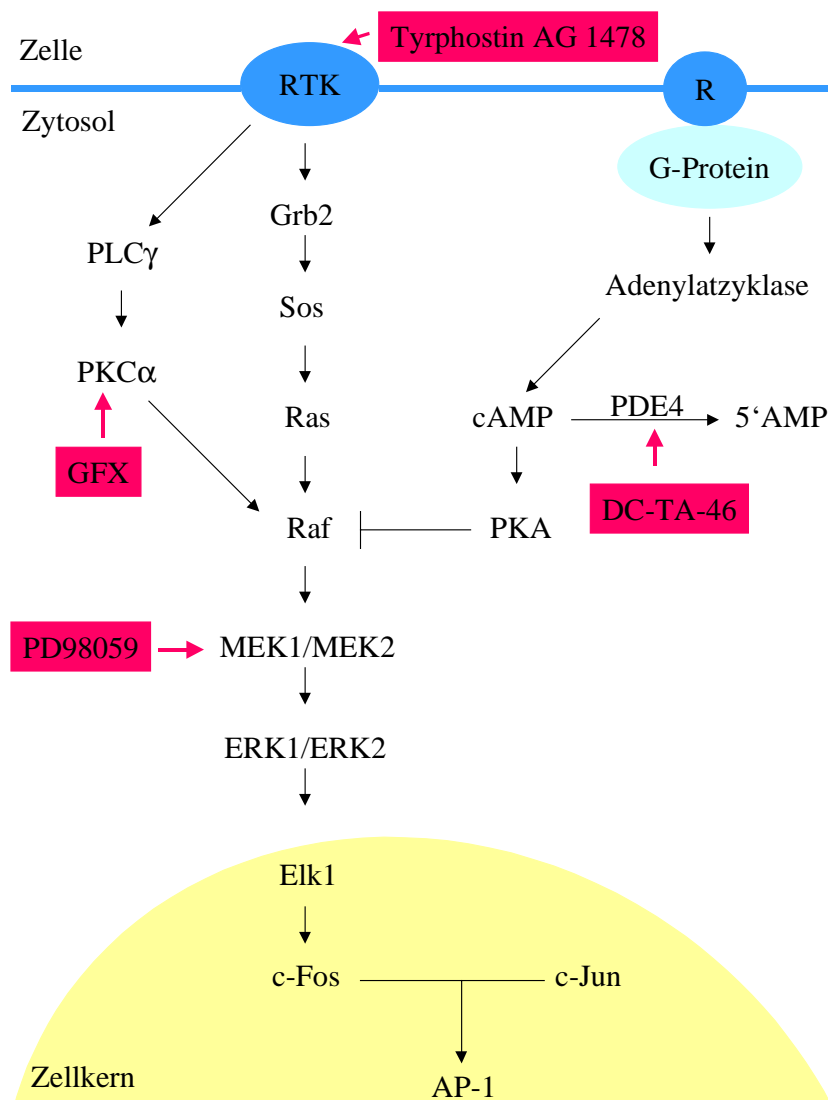


Abb. 4.16: Verknüpfung des Ras und cAMP-Signalweges im MAPK-Signalübertragungsweg

E272 ist im Vergleich zu 7a ein weniger wirksamer PDE4-Hemmstoff und ein potenterer EGFR-Hemmstoff ( $IC_{50}$ -Wert von  $17 \pm 2,0 \mu\text{M}$ ). Aus der Substanzklasse der Pteridinderivate hemmte diese Substanz die Luciferase-Aktivität im MAPK-Reportergen-Assay am besten. Die Hemmung der Elk1-Phosphorylierung durch E272 könnte somit hauptsächlich durch Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase verursacht werden, und nicht wie bei 7a durch Hemmung der PDE4.

Die Substanz E276 zeigte im PTK-ELISA keine Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase. E276 ist jedoch ein PDE4-Hemmstoff (Müller, 2000). Im MAPK-Reporter-Gen-Assay zeigte die Substanz bei 20  $\mu\text{M}$  eine gute Hemmung der Luciferase-Aktivität. Damit könnte E276 über die PKA vermittelte Inhibierung der Raf-Kinase in den MAPK-Signalweg eingreifen.

7k hemmt die isolierte PDE4 (230-fach) schlechter und den isolierten EGFR (1,4-fach) besser, als 7a. Die Substanz 7a hemmt im Gegensatz zu 7k die PDE4 in der Zelle (Kunz, 2000). Die Substanz 7k zeigt im MAPK-Assay erst bei 20  $\mu\text{M}$  eine nahezu vollständige Hemmung der Luciferase-Aktivität. Die Leitsubstanz 7a hingegen zeigt diese Effekte schon in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Im Hinblick auf die Wachstumshemmung an LXFL529L- und A 431-Zellen unterscheiden sich diese beiden Substanzen 7a und 7k jedoch nur geringfügig in ihrer Wirkung (siehe Tab. 4.8). Da nur ein geringer Unterschied in bezug auf die Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs zwischen diesen Substanzen besteht, liegt der Schluß nahe, daß das Pteridinderivat 7k neben dem EGFR noch ein anderes Target besitzen muß.

Erstaunlicherweise zeigte die Substanz E273, die sich als bester Hemmstoff der PTK-Aktivität des EGFRs herausstellte, keinen Einfluß auf die Luciferase-Aktivität im MAPK-Assay im untersuchten Konzentrationsbereich. Selbst bei wachstumshemmenden Konzentrationen zeigte die Substanz E273 keine Inhibierung der Elk1-Phosphorylierung. Betrachtet man die wachstumshemmende Wirkung von E273 gegenüber den Zelllinien A 431 ( $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $10,0 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ) und LXFL529L ( $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $21,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$  (Müller, 2000)), so kann man feststellen, daß die Zelllinie A 431 signifikant empfindlicher reagiert, als die Zelllinie LXFL529L. Die gleiche Beobachtung konnte auch für Tyrphostin AG 1478 gemacht werden. Allerdings zeigte Tyrphostin AG 1478 eine drastische Reduktion der Elk1-Phosphorylierung in Konzentrationen, die Wachstumshemmung an A 431-Zellen auslösen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied wäre eine schlechte Resorption der Substanz in die Zelle. Unter dieser Annahme könnte somit der Zeitraum von 30 Minuten für die Substanzinkubation vor Stimulation mit EGF bei der Durchführung des MAPK-Reporter-Gen-Assay möglicherweise nicht ausreichen, um genügend Substanz in die Zelle zu bringen.

Um diese Frage zu klären, könnte man einen Reporter-Gen-Assay durchführen, indem vor Stimulation mit EGF der Zeitraum für die Substanzinkubation verlängert würde.

Dieser Diskussion liegt die wichtige Annahme zugrunde, daß in transfizierten A 431-Zellen des MAPK-Reportergen-Assays die PDE4-Expression nicht modifiziert ist. Um diese Frage zu klären, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

#### 4.3.2.4 Untersuchung der PDE4-Aktivität in A 431-Zellen und transfizierten A 431-Zellen

Wurde durch Transfektion der A 431-Zellen mit den Plasmiden pFA2-Elk1 und pFR-Luc die Expression der PDE4 modifiziert? Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein PDE-Assay mit transfizierten A 431-Zellen im Vergleich zu unbehandelten A 431-Zellen durchgeführt (siehe Tab. 4.9).

Tab. 4.9: PDE und Rolipram-hemmbarere PDE im Zytosol gemessen von A 431-Zellen und A 431-transfiziert mit pFR-Luc und pFA2-Elk-1

Zelllinie	Gesamt-PDE-Aktivität [pmol/min x ml x mg Protein]	Rolipram-hemmbarere PDE-Aktivität [pmol/min x ml x mg Protein]
A 431 Zytosol	10,1 ± 1,12	0,8 ± 0,99
A 431-transfiziert mit pFR-Luc und pFA2-Elk1 Zytosol	9,3 ± 1,77	0,9 ± 1,20

Wie sich hier aus dieser Tabelle ergibt, wurde weder die Gesamt-PDE-Aktivität noch die Rolipram-hemmbarere-PDE-Aktivität durch Transfektion der A 431-Zellen mit den Plasmiden pFA2-Elk1 und pFR-Luc verändert.

Damit können die untersuchten Pteridinderivate ihre Hemmwirkung gegenüber der PDE4 in A 431- und transfizierten A 431-Zellen entfalten. Die unter 4.3.2.3 getroffene Annahme konnte damit bestätigt werden.

### 4.3.2.5 Untersuchungen des Einflusses der Pteridinderivate auf den Zellzyklus

Um weiteren Aufschluß über den Wirkmechanismus dieser Substanzklasse zu erhalten wurden A 431-Zellen 24 Stunden serumhaltig jeweils mit den Substanzen 7a und 7k inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen mittels Durchflußzytometer vermessen.

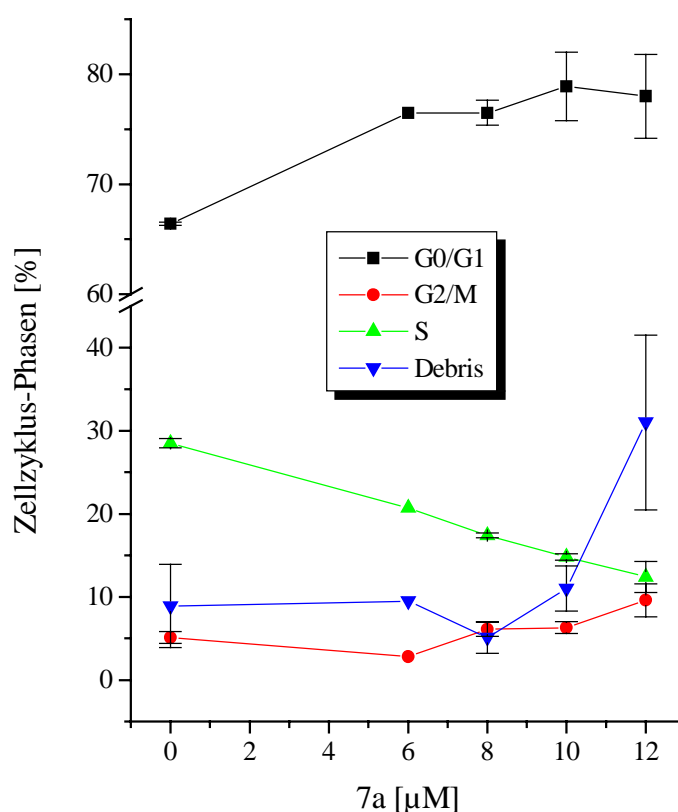


Abb. 4.17: Durchflußzytometrie mit A 431-Zellen, die 24 Stunden serumhaltig mit 7a inkubiert wurden (exemplarische Messung, n = 2)

Bei Inkubation von A 431-Zellen mit 7a ist eine Akkumulierung der Zellen in der G0/G1-Phase bei gleichzeitiger Abnahme der Zellen in der S-Phase feststellbar. Die Zellzahl in der G2/M-Phase bleibt weitgehend unverändert. Bei 12 µM 7a steigt der Gehalt an Debris (apoptotischen und terminal fragmentierte Zellen) massiv an.

Dies stimmt gut mit Ergebnissen an LXFL529L- und MCF-7-Zellen überein (Wagner, 1998).

7k zeigt ebenso wie 7a eine Arretierung der Zellen in G0/G1 (siehe Abb. 4.18). Auch bei 7k ist eine Abnahme von Zellen in der S-Phase festzustellen. Einen Anstieg des Debris ist auch bei 10  $\mu\text{M}$  7k zu bemerken.

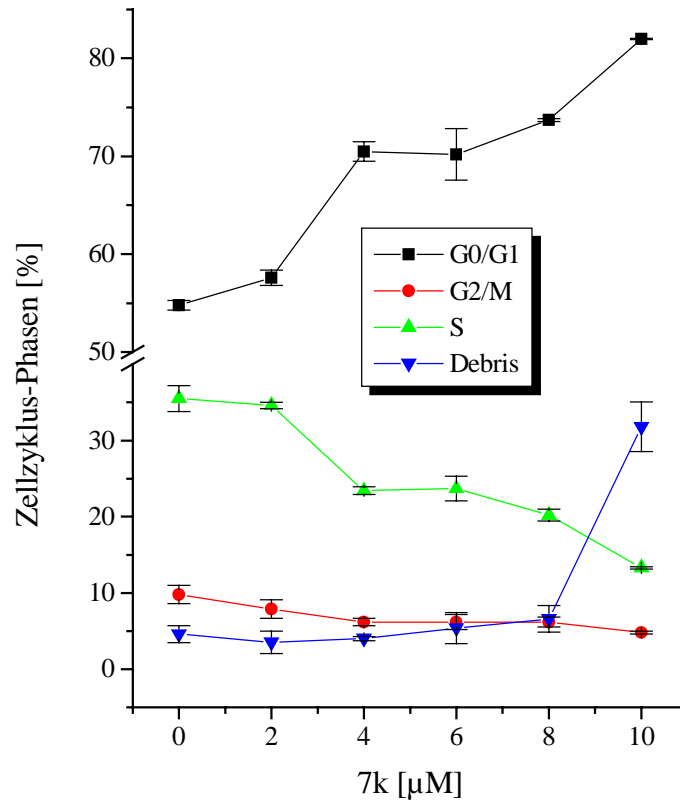


Abb. 4.18: Durchflußzytometrie mit A 431-Zellen, die 24 Stunden serumhaltig mit 7k inkubiert wurden (exemplarische Messung, n = 2)

Inkubiert man A 431-Zellen 24 Stunden serumhaltig mit dem bekannten EGFR-Hemmstoff Tyrphostin AG 1478, so werden die Zellen ebenfalls in G0/G1 arretiert (siehe Abb. 4.4). Die Anzahl der Zellen, die sich in der S-Phase befinden nimmt im Gegensatz dazu ab.

7a, 7k und Tyrphostin AG 1478 zeigen die gleichen Effekte auf den Zellzyklus von A 431-Zellen. So führen sie zur Arretierung der Zellen in G0/G1-Phase und zur Abnahme der Zellzahl in der Synthese-Phase. Damit kann man an Hand der Durchflußzytometrie-Daten keine Unterscheidung der Substanzen bezüglich ihres Targets vornehmen.

#### 4.3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der wirkmechanistischen Untersuchungen substituierter Pteridine

7a und Derivate hemmen das Wachstum verschiedener Tumorzelllinien und sind zum Teil potente Phosphodiesterase 4-Hemmstoffe (Merz, 1998; Kunz, 2000; Müller, 2000).

Bei Untersuchungen im PTK-ELISA zeigt die Leitsubstanz 7a (DC-TA-46) einen  $IC_{50}$ -Wert von  $48 \pm 3,5 \mu\text{M}$ . Die Substanz 7b, bei der Benzylamino gegen Pyrrolidino in 7a vertauscht wird, zeigt im PTK-ELISA eine niedrigere Hemmwirkung gegenüber der EGFR assoziierten Tyrosinkinase. Die Einführung einer Dimethylgruppe an den Positionen 4 und 7 (7d-7f) bei der Leitsubstanz 7a führt zum Verlust der Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFRs. Werden ausgehend von der Leitsubstanz 7a weitere Modifikationen in Position 2 durchgeführt, so kann dies je nach Substituent einerseits zum Wirkverlust führen und andererseits zur erhöhten Hemmwirkung. So besitzen die Substanzen 7k, E272 und E273 eine deutlich bessere Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFRs als die Leitsubstanz 7a. Ein Austausch des Chlors in der Leitsubstanz 7a gegen Wasserstoff, oder eine Methylgruppe, führt zum kompletten Verlust der PTK-Hemmung im ELISA.

Die Untersuchungen der Substanzen 7a, 7k, 7o, E272 und E276 im Sulforhodamin B-Test zeigen annähernd gleiche  $IC_{50}$ -Werte an den Zelllinien A 431 und LXFL529L. Diese Substanzen hemmen das Wachstum der Zelllinie A 431 in niedrigeren Konzentrationen als das der LXFL529L-Zellen. Ungewöhnlich ist die Substanz E273, da sie eine deutlich niedrigere Wachstumshemmung aufweist, als die übrigen Substanzen. Auffällig ist jedoch, daß gegenüber 7o und E273 die Zelllinie A 431 deutlich empfindlicher reagiert. E273, die unter den Pteridinderivaten die PTK-Aktivität des EGFRs am besten inhibiert, bewirkt bei der Zelllinie A 431 eine stärkere Wachstumshemmung. Ganz im Gegensatz dazu zeigt die Substanz 7o ebenfalls eine höhere Wirkung auf die Zelllinie A 431. Diese Substanz inhibiert allerdings die PTK-Aktivität im untersuchten Konzentrationsbereich nicht. Eine Erklärung ist gegenwärtig auf Grund der vorliegenden Datenlage nicht vorhanden.

Auf eine Hemmung der Elk1-Phosphorylierung wurden die Substanzen 7a, E276, 7k, E272 und E273 untersucht. Die Leitsubstanz 7a und das Glycin-Derivat E272 zeigen bei  $10 \mu\text{M}$  eine fast vollständige Inhibierung der Luciferase-Aktivität im MAPK-Reporter-Gen-Assay, die im Bereich der Wachstumshemmung oder der PTK-Hemmung liegt. Die Substanz E276 und

---

7k, die bei 10  $\mu\text{M}$  nur eine schwache Hemmung der Elk1-Phosphorylierung zeigen, hemmen die Luciferase-Aktivität bei 20  $\mu\text{M}$  deutlich. Ungewöhnlich ist die Wirkung von E273 im MAPK-Reporter-Gen-Assay. Diese Substanz ist die potenteste im PTK-ELISA, zeigte aber bis 20  $\mu\text{M}$  keine Beeinträchtigung der Luciferase-Aktivität. Untersuchungen zeigen, daß die PDE4-Aktivität durch Transfektion mit den Plasmiden pFA2-Elk1 und pFR-Luc nicht modifiziert wird. Daher kann man aus den vorliegenden Daten schließen, daß die Hemmung der Elk1-Phosphorylierung durch die Pteridinderivate möglicherweise zum Teil aus der gleichzeitigen Hemmung der PDE4 und Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs resultiert.

Die Untersuchungen zur Beeinflussung des Zellzyklus nach Inkubation von A 431-Zellen mit den Substanzen 7a und 7k sollte zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus dienen. Da 7a, 7k und Tyrphostin AG 1478 jedoch gleiche Effekte auf den Zellzyklus zeigen, kann zwischen PDE4-Hemmung und PTK-Hemmung des EGFRs nicht unterschieden werden.



### 4.3.3 Flavonoide

#### 4.3.3.1 Chalcone

Aus der Arbeitsgruppe von McGown, Manchester (England), wurden uns zahlreiche Chalcone (siehe im Anhang Seite 156 oder 2.9.4.1) zur Verfügung gestellt. Nachdem Untersuchungen zeigten, daß diese Substanzen das Wachstum der Tumorzelllinie LXFL529L im SRB-Test inhibieren, wurden weitere Untersuchungen zum Wirkmechanismus durchgeführt. In der Literatur beschreibt Yang (1998) das Chalcon Butein (siehe Abb. 2.13) als einen spezifischen EGFR-Hemmstoff. Daher lag es nahe, die von McGown zur Verfügung gestellten Substanzen, die Strukturähnlichkeit zu Butein besitzen, auf eine Hemmung der EGFR assoziierten Protein-Tyrosinkinase-Aktivität zu untersuchen.

Die untersuchten Chalcone der Gruppe I (siehe im Anhang Seite 156 oder Tab. 2.4) weisen unterschiedliche Substituenten am Phenylring bzw. eine Methylgruppe in Nachbarschaft zur Carbonylfunktion auf. Diese Chalcone (siehe Tab. 4.10) besitzen nur eine geringe Löslichkeit und zeigen in den untersuchten, maximal löslichen Konzentrationen nur eine sehr geringe Hemmung der PTK-Aktivität.

Tab. 4.10: Ergebnisse der PTK-ELISAs mit Chalconen der Gruppe I

Substanz	Konzentration im Ansatz	Hemmung der PTK-Aktivität [%]
SD 414	10 $\mu$ M	9 $\pm$ 4,2
DRA/005	20 $\mu$ M	16 $\pm$ 5,0
RF 50	20 $\mu$ M	5 $\pm$ 5,1
NL 2/88	20 $\mu$ M	13 $\pm$ 4,6
RF 24	10 $\mu$ M	-18 $\pm$ 14,3 *

\* Die optische Dichte des Inkubationansatzes ist höher, als die des Kontrollansatzes und wird damit als negativer Wert angegeben.

Die Substanz DRA/005, die eine Hydroxy- und Methoxygruppe am B-Ring besitzt, zeigt im PTK-ELISA bei 20  $\mu\text{M}$  die höchste Hemmwirkung der Substanzgruppe I an der PTK-Aktivität des EGFRs mit  $16 \pm 5,0$  %. Durch Methylierung der freien OH-Gruppe von DRA/005 erhält man die Substanz RF 24, die keine Hemmung der EGF-Rezeptor assoziierten Protein-Tyrosinkinase-Aktivität im ELISA aufweist.

Vergleicht man die Substanz DRA/005 mit Butein, so stellt man fest, daß die Einführung von Methoxygruppen an Position 4 des B-Ringes und an den Positionen 3', 4' und 5' des A-Ringes zu einem Wirkverlust gegenüber der EGFR assoziierten Protein-Tyrosinkinase führt. Eine Erhöhung der Methoxygruppen am B-Ring, ausgehend von DRA/005, führt ebenfalls zum Verlust der Hemmwirkung. NL2/88 besitzt im B-Ring im Gegensatz zu DRA/005 nur eine Methoxygruppe an Position 3. Diese beiden Substanzen weisen ähnlich geringe Hemmwirkungen auf die PTK des EGFRs auf. Daraus könnte man folgern, daß die Substituenten an Position 3 und 4 austauschbar wären. Die Substanz RF 50, deren B-Ring dreifach methoxyliert ist, zeigt keine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs im ELISA mehr.

Der beobachteten Wachstumshemmung dieser Substanzen muß somit ein anderer Wirkmechanismus zugrunde liegen, als die Hemmung der EGFR assoziierten Protein-Tyrosinkinase.

Die Substanzen der Gruppe II (siehe Anhang Seite 156 oder Tab. 2.5) unterscheiden sich von den Substanzen SD 414 und DRA/005 durch die Substituenten am B-Ring. Auch die beiden Substanzen SD/376 und SD/388 zeigen keine Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs (siehe Tab. 4.11.). Aus dem Vergleich dieser Ergebnisse mit den Daten für DRA/005 und Butein (Yang, 1998) könnte man schließen, daß freie Hydroxygruppen an 3 und 4 Position des B-Ringes eine wesentliche Rolle bei der Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs spielen.

Tab. 4.11: Ergebnisse der PTK-ELISAs mit Chalconen der Gruppe II

Substanz	Konzentration im Ansatz	Hemmung der PTK-Aktivität [%]
SD/376	40 $\mu\text{M}$	$4 \pm 5,5$
SD/388	20 $\mu\text{M}$	$3 \pm 8,2$

Als nächstes wurden eine Reihe weiterer Substanzen, die wachstumshemmende Wirkung besitzen untersucht (siehe Anhang Seite 156 oder Abb. 2.14). Keine Verbindungen aus dieser Substanzklasse zeigten eine Beeinflussung der EGFR assoziierten Protein-Tyrosinkinase in den untersuchten, maximal löslichen Konzentrationen.

Tab. 4.12: Ergebnisse der PTK-ELISAs mit Substanzen der Gruppe III

Substanz	Konzentration im Ansatz	Hemmung der PTK-Aktivität [%]
Dh 25	100 $\mu$ M	$6 \pm 6,6$
Ak-A001	20 $\mu$ M	$2 \pm 6,7$
DD 8	20 $\mu$ M	$-4 \pm 8,8$ *
NJL 8	10 $\mu$ M	$-5 \pm 9,9$ *
SD/241	100 $\mu$ M	$-5 \pm 10,8$ *
SD/47	100 $\mu$ M	$-4 \pm 9,0$ *
Khellin	100 $\mu$ M	$4 \pm 3,9$

\* Die optische Dichte des Inkubationansatzes ist höher, als die des Kontrollansatzes und wird damit als negativer Wert angegeben.

Vergleicht man Substanz Ak-A001 mit Butein, so stellt man fest, daß eine Methylierung der Hydroxygruppen in Position 2' und 4 und eine Methoxylierung in Position 5' anstelle einer Hydroxylierung in Position 4', zum vollständigen Verlust der Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFRs führt.

#### 4.3.3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Chalone

Die Chalone der Arbeitsgruppe von McGown wurden aufgrund ihrer Wachstumshemmung an LXFL 529L-Zellen und ihrer Strukturhomologie zum bekannten EGFR-Hemmstoff Butein auf eine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs untersucht. Diese Chalone zeigten jedoch alle keine Hemmeffekte gegenüber der EGFR assoziierte Tyrosinkinase. Eine Methoxylierung des A- und B-Ringes führte fast zum kompletten Verlust der Hemmwirkung dieser Verbindungen.

### 4.3.3.2 Isoflavone

Die Isoflavone Genistein oder Biochanin A (siehe Tab. 2.6) sind bekannte Hemmstoffe des EGFRs. Die Manchester Arbeitsgruppe von McGown (England) hat Isoflavone (siehe Anhang Seite 157 oder Tab. 2.7) synthetisiert, die Strukturhomologien zu diesen bekannten Inhibitoren haben. Daher wurden sie auf eine Hemmung des EGFRs untersucht.

Die Isoflavone 92-238 und Genistein unterscheiden sich nur durch die Position der Hydroxygruppe im B-Ring. 92-238 trägt diese Hydroxygruppe an 3' Position und nicht wie Genistein an 4' Position. Im PTK-ELISA hemmt 92-238 die Protein-Tyrosinkinase des EGFRs dosisabhängig (siehe Abb. 4.19). Für die Substanz 92-238 konnte kein  $IC_{50}$ -Wert für die PTK-Hemmung angegeben werden, da nicht mehr genügend Substanz vorhanden war. Aus den drei gemessenen Konzentrationen wurde kein  $IC_{50}$ -Wert bestimmt, da die Konzentrationen sich über einen weiten Bereich ausdehnen.

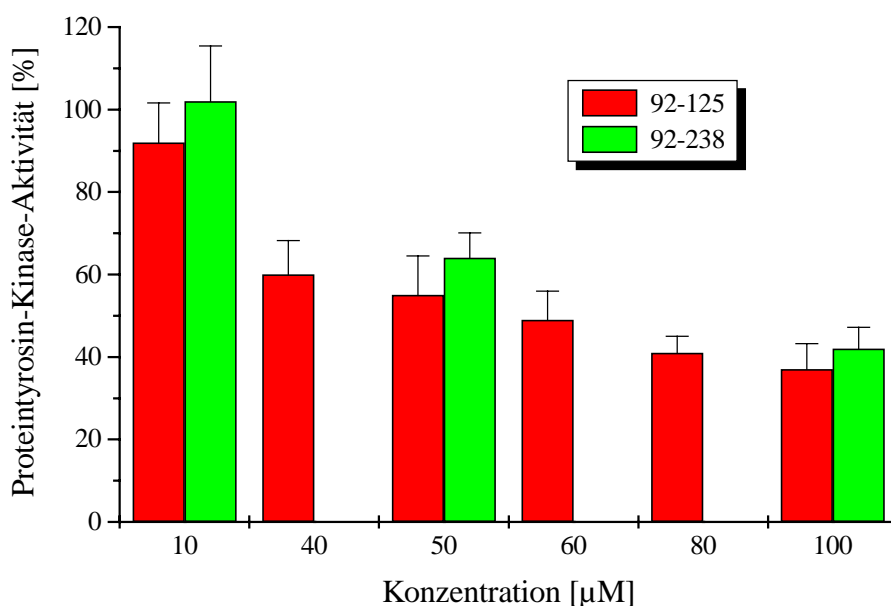


Abb. 4.19: PTK-ELISA mit 92-125 und 92-238

Strukturverwandt mit 92-238 ist 92-125, da diese Substanz anstelle der Hydroxygruppe eine Methoxygruppe besitzt. Biochanin A und 92-125 unterscheiden sich nur durch die Position der Methoxygruppe im B-Ring.

In Untersuchungen mittels PTK-ELISA (siehe Abb. 4.19) zeigt 92-125 eine höhere Hemmwirkung auf die EGFR assoziierte Protein-Tyrosinkinase-Aktivität, als die Substanz 92-238. Man kann für die dosisabhängige Hemmung durch 92-125 einen  $IC_{50}$ -Wert von  $58 \pm 6,9 \mu\text{M}$  ermitteln. Diese Substanz ist damit nahezu um den Faktor 25 schlechter als Tyrphostin AG 1478.

3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon ist durch die Chlorsubstitution an Position 3' zehnmal potenter als Genistein (Traxler et al., 1999). Traxler et al. haben für diese Verbindung einen  $IC_{50}$ -Wert für die PTK-Hemmung des EGFRs von  $0,095 \mu\text{M}$  ermittelt (1999).

Diese  $IC_{50}$ -Werte lassen sich jedoch nicht direkt miteinander vergleichen, da sich die Assays bei gleichem verwendeten Substrat doch in der Durchführung unterscheiden.

Führt man eine Hydroxygruppe nicht an Position 3' im B-Ring, sondern an der Position 2' im B-Ring ein, so ergibt sich die Substanz 92-121 (siehe Tab. 4.13).

92-121 zeigt bei  $100 \mu\text{M}$  eine Hemmung von  $43 \pm 5,6 \%$  der PTK-Aktivität des EGFRs. 92-125 zeigt bei  $100 \mu\text{M}$  eine Hemmung von  $63 \pm 6,2 \%$  der EGFR assoziierten Tyrosinkinase. Somit führt eine Verschiebung der Methoxygruppe von Position 3' nach 2' im B-Ring zu einer Abnahme der Hemmwirkung.

Tab. 4.13: Ergebnisse der PTK-ELISAs mit Isoflavonen

Substanz	Konzentration im Ansatz	Hemmung der PTK-Aktivität [%]
92-63	$60 \mu\text{M}$	$21 \pm 11,0$
92-64	$100 \mu\text{M}$	$26 \pm 9,9$
92-114	$60 \mu\text{M}$	$-5 \pm 12,7 *$
92-121	$100 \mu\text{M}$	$43 \pm 5,6$
92-129	$20 \mu\text{M}$	$3 \pm 10,4$

\* Die optische Dichte des Inkubationansatzes ist höher, als die des Kontrollansatzes und wird damit als negativer Wert angegeben.

Die Substanzen 92-63, 92-64, 92-114 unterscheiden sich von den Substanzen 92-125, 92-121 und 92-129 durch Einführung der -COOEt Gruppe an Position 2 des Chromongrundgerüsts. Die Einführung der -COOEt Gruppe beim Chromongrundgerüst führt bei 92-64 im Vergleich zu 92-125 zu einer Abnahme der Hemmung der PTK-Aktivität bei 100  $\mu\text{M}$  um fast 50 %. 92-125 hemmt bei 100  $\mu\text{M}$  die PTK-Aktivität um  $51 \pm 7,0$  %, 92-64 hingegen nur  $26 \pm 9,9$  %. 92-63 zeigt bei 60  $\mu\text{M}$  nur eine Hemmung von  $21 \pm 11,0$  %.

In der Literatur ist die Substanz (5g) beschrieben, die Strukturhomologie zu 92-63, 92-64 und 92-114 aufweist. Bei dieser Substanz trägt das Chromongrundgerüst an Position 2 die Gruppe -COOEt und am B-Ring nur eine einzige Hydroxygruppe an Position 4'. (5g) hemmt die Autophosphorylierung des EGFRs mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 5,6  $\mu\text{M}$  (Ogawara et al., 1989; Groundwater et al., 1996).

Führt man bei der Substanz 92-125 weitere Methoxygruppen im B-Ring in den Positionen 4' und 5' ein, so erhält man die Substanz 92-129. Die Einführung der weiteren Hydroxygruppen führt zum Verlust der Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs im Vergleich zu 92-125.

#### 4.3.3.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Isoflavone

Die untersuchten Isoflavone der Arbeitsgruppe von McGown wurden aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit zu Genistein, Biochanin A, 3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavone und (5g) auf eine Hemmung der EGFR assoziierten Protein-Tyrosinkinase hin untersucht. Einen Austausch der Hydroxygruppe von 3' Position (92-238) im B-Ring gegen eine Methoxygruppe (92-125), führt zur verstärkten Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs. Die Substanz 92-125 hemmt die EGFR assoziierte Protein-Tyrosinkinase mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $58 \pm 6,9$   $\mu\text{M}$ . 92-125 stellt somit im Vergleich zu Tyrphostin AG 1478 einen deutlich unwirksameren Hemmstoff dar. Eine Methoxylierung in 2' Position (92-121) anstelle der 3' Position (92-125) führt zur Abnahme der Hemmeffekte auf die PTK-Aktivität des EGFRs. Bei Einführung von drei Methoxygruppen im B-Ring ist für 92-129 bei 20  $\mu\text{M}$  keine Hemmung der PTK des EGFRs meßbar. Beim Vergleich der Substanzen 92-125 und 92-64 wird deutlich, daß es durch Einführung der -COOEt-Gruppe an 2 Position des Chromongrundgerüsts zur Reduzierung der Hemmung der PTK des EGFRs kommt. Biochanin A und (5g) inhibieren die Autophosphorylierung des EGFRs. Es bleibt die Frage zu klären, ob die untersuchten Verbindungen möglicherweise die Funktion des EGFRs über eine Inhibierung der Autophosphorylierung beeinflussen.

### 4.3.3.3 Flavone aus *Scutellaria baicalensis*

#### 4.3.3.3.1 Cytotoxizität von Baicalein und Baicalin

Zunächst wurde für Baicalein und Baicalin (siehe Anhang Seite 158 oder Tab. 2.8) die Cytotoxizität im SRB-Test an der Vulvacarcinom-Zelllinie A 431 bestimmt (siehe Tab. 4.14). Niederberger hatte diese beiden Substanzen schon an den Zelllinien LXFL529L, HL 60, K 562, U 937 und MCF-7 getestet (1998). Es zeigte sich jedoch, daß die untersuchte Vulvacarcinom-Zelllinie A 431 mit Abstand am empfindlichsten auf Baicalein und Baicalin reagierte.

Tab. 4.14: Wachstumshemmung nach 72-stündiger Inkubation mit Baicalein und Baicalin im Sulforhodamin B-Assay.

IC<sub>50</sub>: Konzentration, bei der das Zellwachstum gegenüber der Kontrolle um 50 % reduziert ist.

Substanz	Zelllinie	
	LXFL529L	A 431
	IC <sub>50</sub> [µM]	IC <sub>50</sub> [µM]
	<sup>a</sup> (Niederberger, 1998)	
Baicalein	26 ± 1 <sup>a</sup>	13 ± 6
Baicalin	38 ± 4 <sup>a</sup>	22 ± 7

Vergleicht man die Wirkung dieser Substanzen auf A 431- und LXFL529L-Zellen, so kann man feststellen, daß sich die IC<sub>50</sub>-Werte für Baicalein und Baicalin um ca. 50 % bei der Zelllinie A 431 reduzieren. Auffällig ist hier jedoch, daß Baicalein deutlich besser das Wachstum der Tumorzellen inhibiert, als Baicalin. Dies stimmt gut mit den Untersuchungen von Niederberger an den oben genannten Zelllinien überein (1998). Eine Erklärung hierfür könnte die wahrscheinlich unterschiedliche Aufnahme der Substanzen in die Zelle sein. Niederberger (1998) hat Hinweise gefunden die dafür sprechen, daß Baicalein und Baicalin unterschiedliche Angriffspunkte in der Zelle haben könnten.

Worin begründet sich die Sensitivität der A 431-Zellen im Vergleich zu LXFL529L-Zellen? Ist der unterschiedliche EGF-Rezeptorstatus der Zellen für diese Sensitivität gegenüber Baicalein und Baicalin ausschlaggebend? Um die Frage zu klären, ob diese Substanzen die PTK-Aktivität des EGFRs beeinflussen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

#### 4.3.3.4.2 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs

Baicalein inhibiert die PTK-Aktivität einer Zellmembranlösung von humanen T-lymphoiden Leukämiezellen (CEM-Zellen) (Huang et al., 1994). Da bei diesen Versuchen eine nicht aufgereinigte Membranfraktion verwendet wurde, lag es nahe eine aufgereinigte EGFR-Lösung im PTK-Assay zu verwenden, um das Angriffsziel von Baicalein in der Zelle genauer bezeichnen zu können.

Neben Baicalein und Baicalin wurden drei weitere *Scutellaria baicalensis* Flavonoide (siehe Anhang Seite 158 oder Tab. 2.8) auf eine Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase untersucht (siehe Tab. 4.15).

Tab. 4.15: Ergebnisse der PTK-ELISAs mit *Scutellaria baicalensis* Flavone

Substanz	Konzentration im Ansatz	Hemmung der PTK-Aktivität [%]
Baicalein	10 $\mu$ M	60 $\pm$ 4,5
Baicalin	80 $\mu$ M	4 $\pm$ 12,2
Wogonin	60 $\mu$ M	15 $\pm$ 9,1
Wogonosid	80 $\mu$ M	10 $\pm$ 14,5
Skullcapflavon II	100 $\mu$ M	-3 $\pm$ 6,8 *

\* Die optische Dichte des Inkubationansatzes ist höher, als die des Kontrollansatzes und wird damit als negativer Wert angegeben.

Wogonin und sein Glucuronid Wogonosid zeigten im PTK-ELISA bei den untersuchten Konzentrationen nur eine geringe Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase. Skullcapflavon II weist bei 100  $\mu$ M noch keine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs auf.



Baicalein hemmte als einzige dieser *Scutellaria baicalensis* Flavonoide die PTK-Aktivität des EGFRs im unteren mikromolaren Bereich (siehe Abb. 4.20). Für Baicalein konnte im PTK-ELISA ein  $IC_{50}$ -Wert von 1,1  $\mu\text{M}$  ermittelt werden. Baicalein hemmt somit die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs in vitro besser, als die Referenzsubstanz Tyrphostin AG 1478, die einen  $IC_{50}$ -Wert von 2,4  $\mu\text{M}$  (siehe Abb. 4.3) besitzt.

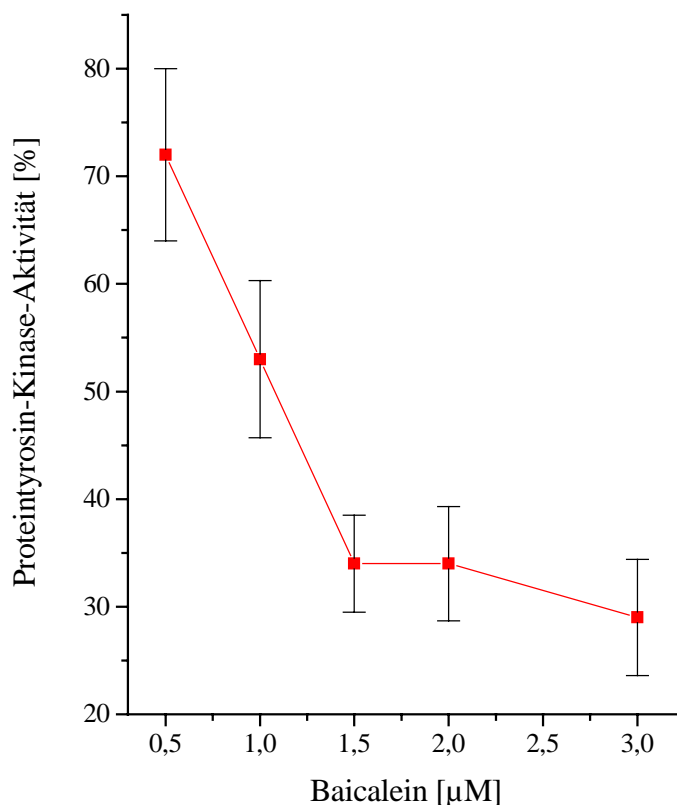


Abb. 4.20: PTK-ELISA mit Baicalein

Im Gegensatz dazu zeigt Baicalin, das Glucuronid von Baicalein, keine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs im PTK-ELISA bis 80  $\mu\text{M}$ . Die Einführung einer Glucuronsäure an Position 7 des Chromongrundgerüsts führt somit zum Verlust der Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität des EGFRs. Glycosyliert man die Hydroxygruppe in Position 7 des Genisteins, so erhält man Genistin. Diese Substanz hat durch diese Modifizierung ihre Hemmwirkung gegenüber der PTK des EGFRs verloren (Ogawara et al., 1989). Ogawara et al. haben festgestellt, daß Hydroxygruppen in den Positionen 5, 7 und 4' für die komplette Hemmwirkung erforderlich sind (1989).

Ein Fehlen der Hydroxygruppe in Position 6 und die Einführung einer Methoxygruppe in Position 8 (Wogonin) führt nahezu zum vollständigen Verlust der Hemmwirkung gegenüber der Tyrosinkinase des EGFRs. Der Austausch der Hydroxygruppen gegen Methoxygruppen im A-Ring und die Einführung weiterer Methoxygruppen am A- und B-Ring (Skullcapflavon II) führen ebenfalls zu einem kompletten Verlust der Hemmwirkung. Diese Ergebnisse stimmen gut mit Literaturangaben überein, in denen vom Verlust der Hemmwirkung durch Einführung von Methoxygruppen berichtet wird (Ogawara et al., 1989; Groundwater et al., 1996).

#### 4.3.3.3 Hemmung der Elk1-Phosphorylierung

Die *Scutellaria baicalensis* Flavonoide (siehe Anhang Seite 158 oder Tab. 2.8) wurden alle im MAPK-Reportergen-Assay eingesetzt. Mit diesem Testsystem sollte überprüft werden, ob die Substanzen, die im PTK-ELISA wirkten auch in der Zelle aktiv sind. Als Endpunkt wurde wiederum die Phosphorylierung von Elk1 gemessen.

In Abb. 4.21 ist die Luciferase-Aktivität gegen die Konzentration der untersuchten Flavone aufgetragen.

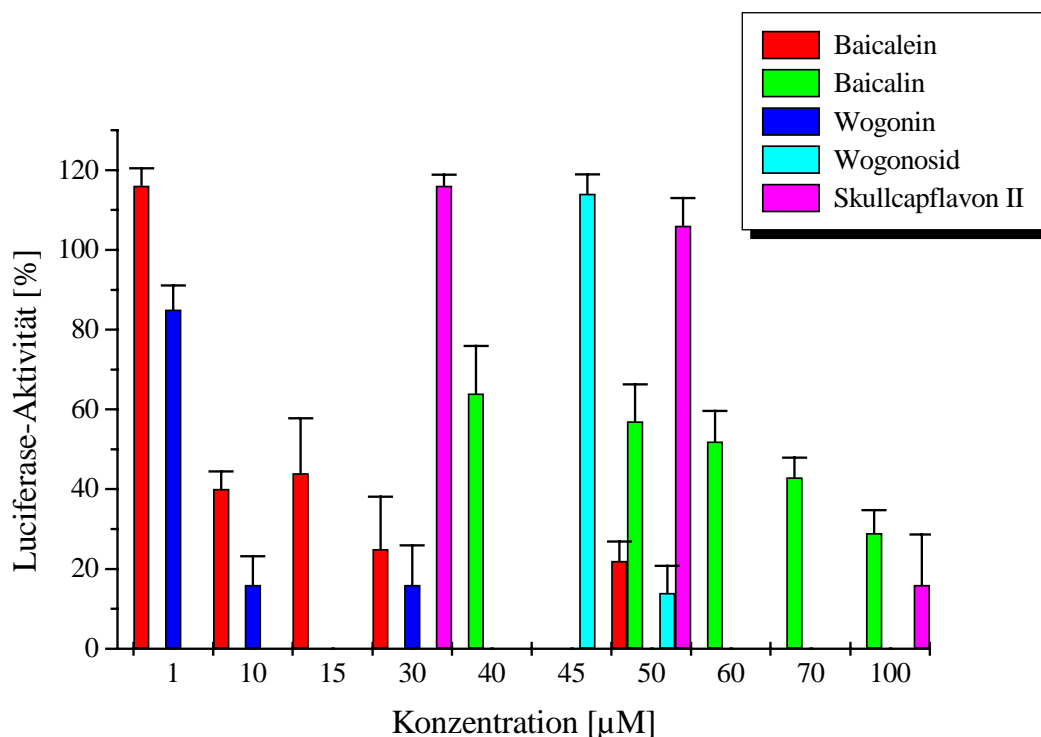


Abb. 4.21: MAPK-Reportergen-Assay der *Scutellaria baicalensis* Flavone

Baicalein, in der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , führt zur Stimulation der Luciferase-Aktivität im MAPK-Reportergen-Assay auf 116 %. Bei 10  $\mu\text{M}$  Baicalein wird die Luciferase-Aktivität jedoch schon auf 40 % gesenkt. Bei 30  $\mu\text{M}$  Baicalein ist nur noch eine Luciferase-Aktivität von 25 % festzustellen.

Ganz anders hingegen verhält sich Baicalin. Bei 40  $\mu\text{M}$  Baicalin ist noch eine Luciferase-Aktivität im MAPK-Reportergen-Assay von 64 % festzustellen. Die Luciferase-Aktivität nimmt dosisabhängig im MAPK-Reportergen-Assay unter dem Einfluß von Baicalin ab. Bei 100  $\mu\text{M}$  Baicalin ist nur noch eine Luciferase-Aktivität von 29 % meßbar, die somit der von Baicalein in etwa bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  entspricht.

In Konzentrationen, in denen beim isolierten EGFR bereits eine Hemmung der Protein-Tyrosinkinase durch Baicalein festgestellt werden konnte, ist beim MAPK-Reportergen-Assay noch keine Hemmung der Luciferase-Aktivität zu bemerken. Erst bei höheren Konzentrationen, die im Bereich der Wachstumshemmung an A 431-Zellen liegen, kann eine Hemmung der Elk1-Phosphorylierung gemessen werden. Baicalein hemmt die Phosphodiesterase 4 (PDE4) (Marko, persönliche Mitteilung). Die Inhibierung der Elk1-Phosphorylierung könnte somit über die Hemmung der PTK des EGFRs und gleichzeitig über die Hemmung der PDE4 erfolgen (siehe Abb. 2.1).

Ein weiteres Target für Baicalein im MAPK-Signalübertragungsweg läßt sich ebensowenig ausschließen, wie eine Interaktion mit anderen Signalwegen, deren Ziel die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk1 ist.

Die Substanz A23187 verursacht die Phosphorylierung der MAPK, was zur Aktivierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) führt (siehe Abb. 4.22) (Nakahata et al., 1998). Im Anschluß daran kommt es zur Freisetzung von Arachidonsäure und Bildung von Prostaglandin E<sub>2</sub>.

Sho-saiko-to und San'o-shashin-to, die beide *Scutellaria Radix* enthalten, inhibieren die Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> (Nakahata et al., 1998). *Scutellaria Radix* hemmt die durch A23187 induzierte Aktivierung der MAPK-Aktivität. Bei Zellen, die mit *Scutellaria Radix* oder Baicalein inkubiert wurden, konnten Nakahata et al. eine Hemmung der Phosphorylierung der MAPK feststellen (1998). In einer neueren Veröffentlichung von Nakahata et al. (1999) wird diese Hemmung der MAPK-Phosphorylierung durch Baicalein auf eine Hemmung von Raf zurück geführt (Weitere Angaben hierzu sind leider nicht möglich, da der Artikel nur in japanisch vorliegt.). Nakahata et al. (1998) postulieren, daß Baicalein in

*Scutellaria Radix* die Freisetzung der Arachidonsäure durch Hemmung des MAPK-cPLA<sub>2</sub>-Weges reduziert.

2'Amino-3'-methoxyflavon (PD 98059) blockiert die MEK und dadurch kommt es zur Inhibierung der Phosphorylierung und Aktivierung der MAP Kinase (Alessi et al., 1995). 2'Amino-3'-methoxyflavon ist strukturverwandt mit den untersuchten *Scutellaria baicalensis* Flavonon.

Somit gäbe es mehrere potenzielle Angriffspunkte für Baicalein im MAPK-Signaltransduktionsweg (siehe Abb. 4.22), die zur Hemmung der Elk1-Phosphorylierung führen könnten.

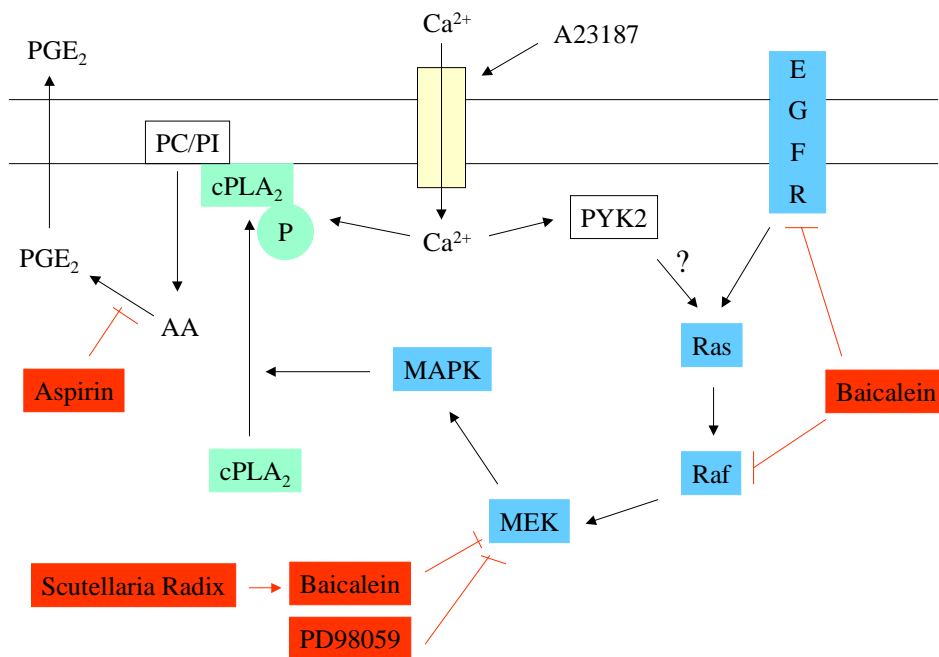


Abb. 4.22: Mögliche Inhibierungsmechanismen von Baicalein in der Arachidonsäurekaskade von Ratten C6 Gliomazellen (modifiziert nach Nakahata et al., 1998)

- PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E<sub>2</sub>  
 PC: Phosphatidylcholin  
 PI: Phosphatidylinositol  
 AA: Arachidonsäure  
 cPLA<sub>2</sub>: zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub>  
 PYK2: prolinreiche Tyrosinkinase 2

Die Substanz Baicalin, die bis 80  $\mu\text{M}$  im PTK-ELISA keine Hemmung zeigte, wies im MAPK-Reportergen-Assay in diesem Bereich jedoch schon eine deutliche Hemmung der Luciferase-Aktivität auf. Bei 60  $\mu\text{M}$  betrug die Luciferase-Aktivität nur noch 52 %. Die Konzentrationen, in denen Baicalin eine Hemmung der Elk1-Phosphorylierung verursacht, liegt deutlich über der ermittelten Wachstumshemmung nach 3 Tagen im SRB-Test. In der Literatur sind im Gegensatz zu Baicalein nur geringe Hemmeffekte für die PGE<sub>2</sub>-Bildung nach Inkubation mit Baicalin beschrieben (Nakahata et al., 1998). Somit muß ein Target von Baicalin oder dessen Metaboliten upstream von Elk1 liegen.

Auf Grund der Strukturhomologie zu PD98059 wäre hier als potentieller Angriffspunkt die MEK möglich. Nicht auszuschließen ist auch eine Interaktion mit Raf, wie sie für Baicalein beschrieben ist (Nakahata et al., 1999).

Für die übrigen *Scutellaria baicalensis* Flavone zeigt sich ein ähnliches Bild, wie für Baicalin. Skullcapflavon II, das bis 100  $\mu\text{M}$  im PTK-ELISA keine Hemmung zeigte, hat im MAPK-Reportergen-Assay bei dieser Konzentration die Luciferase-Aktivität auf 16 % reduziert. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß upstream von Elk1 Skullcapflavon II oder dessen Metabolit mit einem Signaltransduktionsmolekül der MAPK-Kaskade oder Signalwegen, die in diesen münden, interagieren muß. Allerdings liegen die Wirkkonzentrationen im MAPK-Reportergen-Assay deutlich über den IC<sub>50</sub>-Werten der Cytotoxizität an den Zelllinien LXFL529L (IC<sub>50</sub> = 10 ± 2  $\mu\text{M}$ ) und HL60 (IC<sub>50</sub> = 5,5 ± 0,5  $\mu\text{M}$ ) (Niederberger, 1998). Somit scheint die Beeinflussung des MAPK-Signalweges durch Skullcapflavon II für die Inhibierung des Wachstums dieser Zelllinien nicht von entscheidender Bedeutung zu sein. Weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Skullcapflavon II sind daher notwendig.

Sehr ungewöhnlich ist die Wirkung von Wogonin im MAPK-Reportergen-Assay. Wogonin zeigte eine deutlichere Hemmung der Elk1-Phosphorylierung als Baicalein. Bei 10  $\mu\text{M}$  Wogonin, konnte nur noch eine Luciferase-Aktivität von 16 % gemessen werden. Wogonin zeigte aber im Gegensatz zu Baicalein im PTK-ELISA bei 60  $\mu\text{M}$  nur eine Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität von 15 %. Für diesen Unterschied könnte es mehrere Gründe geben. Zum einen könnte Wogonin statt des EGFRs ein anderes Target in der Signaltransduktionskaskade inhibieren und dadurch zur Reduzierung der Luciferase-Aktivität im MAPK-Reportergen-Assay führen. Und zum anderen könnte erst ein Metabolit von Wogonin zu der

beobachteten Hemmung der Luciferase-Aktivität führen. Niederberger (1998) hatte für Wogonin eine Wachstumshemmung an K 562-Zellen im SRB-Test von 32  $\mu\text{M}$  festgestellt, die vergleichbar war mit der Wirkung von Baicalein (1998). Die beobachtete Hemmung der Elk1-Phosphorylierung im MAPK-Reporter-Gen-Assay könnte somit mit der Hemmung des Zellwachstums in Verbindung stehen.

Nakahata et al. (1998) haben in einem zellulären Testsystem die Prostaglandin  $\text{E}_2$ -Synthese nach Stimulation mit A23187 und Inkubation mit Wogonin gemessen. Dabei stellten sie fest, daß Wogonin die  $\text{PGE}_2$ -Synthese noch besser inhibiert als Baicalein (Nakahata et al., 1998). Als Ursache der Wirkung von Baicalein wurde eine Interaktion mit Raf vorgeschlagen, so daß über die in Abb. 4.22 dargestellte Signaltransduktionskaskade eine Hemmung der  $\text{PGE}_2$ -Synthese erfolgen könnte. Da Wogonin die  $\text{PGE}_2$ -Synthese (Nakahata et al., 1998) und die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk1 hemmt, muß das Target von Wogonin oder dessen Metaboliten zwischen dem EGFR und Elk1 liegen.

Wogonosid wurde im ELISA auf Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase in einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  untersucht. In dieser Konzentration zeigte sich im ELISA nur eine geringe Hemmung, wohingegen im MAPK-Reporter-Gen-Assay bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Wogonosid die Luciferase-Aktivität auf 15 % reduziert war.

Niederberger konnte für das Glucuronid von Wogonin nur eine schwache Hemmung des Wachstums von LXFL529L-Zellen ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) feststellen (1998). Betrachtet man das Ergebnis des PTK-ELISAs, so stellt man fest, daß Wogonosid in einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  nur eine geringe PTK-Hemmung verursacht. Im MAPK-Reporter-Gen-Assay hingegen wird bei 50  $\mu\text{M}$  die Luciferaseaktivität um 86 % inhibiert. Ungewöhnlich ist hierbei, daß bei 45  $\mu\text{M}$  Wogonosid eine leichte Stimulation der Luciferase-Aktivität auf 114 % zu bemerken ist. In dem kleinen Konzentrationsbereich von 45-50  $\mu\text{M}$  nimmt die Elk1-Phosphorylierung ungewöhnlich dramatisch ab, wie dies für kein anderes untersuchtes Flavon zu beobachten war.

Die Diskrepanz zwischen den Wirkkonzentrationen von Wogonosid am isolierten Enzym und im zellulären Testsystem, könnte die gleichen Ursachen haben, wie bei Wogonin. Auch hier könnte ein anderes Signalmolekül im Signalübertragungsweg beeinflußt werden, womit die Inhibierung der Elk1-Phosphorylierung erklärbar wäre.

Eine Abspaltung der Glucuronsäure wäre denkbar, wodurch man Wogonin erhalten würde. Damit würde der gleiche Wirkmechanismus wie bei Wogonin nur zeitverzögert zu Grunde liegen. Die Wirkung könnte aber auch erst durch einen Metaboliten erzeugt werden.

#### **4.3.3.3.4 Untersuchungen zum Metabolismus von Baicalin mittels HPLC**

Niederberger (1998) konnte bei Zellzyklusuntersuchungen mit den Flavonen Baicalein und Baicalin unterschiedliche Effekte dieser Substanzen auf die Zelllinie LXFL529L feststellen. Baicalin führte zur Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzykluses, während Baicalein einen Arrest in G2/M auslöste (Niederberger, 1998). Niederberger hatte festgestellt, daß Baicalein die Induktion von DNA-Strangbrüchen und die Aktivität von Topoisomerasen beeinflußt, wohingegen Baicalin dies nicht bewirkt.

Baicalein und Baicalin unterscheiden sich sowohl in der Wirkung auf die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs, als auch in Hinblick auf den MAPK-Reporter-Gen-Assay. Baicalin zeigte im PTK-Assay bis 80 µM keine Wirkung und im Reporter-Gen-Assay im Vergleich zu Baicalein nur eine sehr schlechte Wirkung, aber das Wachstum der Vulvacarcinomzelllinie A 431 wurde trotzdem deutlich gehemmt.

Aus dieser Datenlage ergab sich die Frage ob Baicalein und Baicalin die gleichen Targets in der Zelle angreifen. Wird Baicalin zu Baicalein metabolisiert oder umgekehrt?

Um diese Frage zu klären wurden A 431-Zellen mit Baicalin und Baicalein inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Inkubation durch Zellyse beendet. Das Zellysat mit Methanol extrahiert und mittels HPLC aufgetrennt. Mit dem Eluentengemisch 45 % 0,4 % ige Ameisensäure/ 55 % Methanol erfolgte die Auftrennung zuerst für eine Standardmischung aus Baicalin und Baicalein (siehe Abb. 4.23).

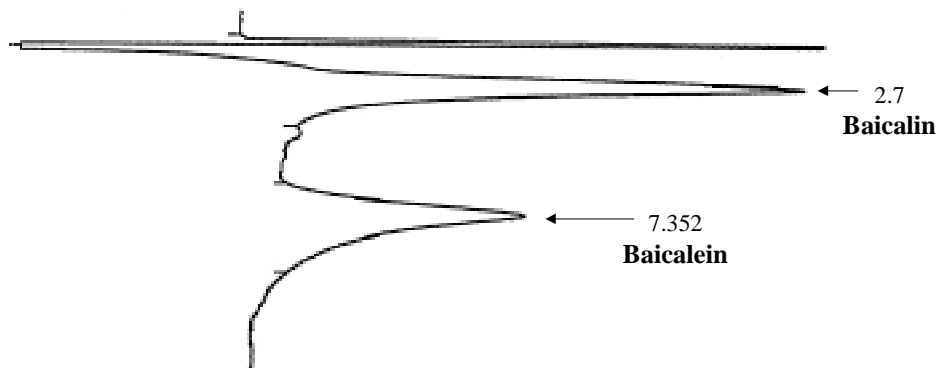


Abb. 4.23: HPLC-Chromatogramm

Standardgemisch aus 5  $\mu\text{M}$  Baicalein und 2  $\mu\text{M}$  Baicalin

Weder bei der aufgearbeiteten Baicalein Probe noch bei der Baicalin Probe konnte nach 24 stündiger Inkubation Baicalein gefunden werden. Die Retentionszeiten für Baicalin betrug 2,7 Minuten, die für Baicalein 7,35 Minuten. Ob die gesamte Menge an Baicalin nach 24 Stunden abgebaut wurde, kann nicht festgestellt werden, da in diesem Bereich durch die Zellyse freigesetztes Protein ebenfalls stark absorbiert.

Bei der chromatographischen Auftrennung des Baicalin-Ansatzes ist ein Metabolit mit der Retentionszeit von 18,5 Minuten detektiert worden. Auf Grund von fehlender Referenzsubstanz ist diese unbekannt, eluierte Substanz nicht identifizierbar.



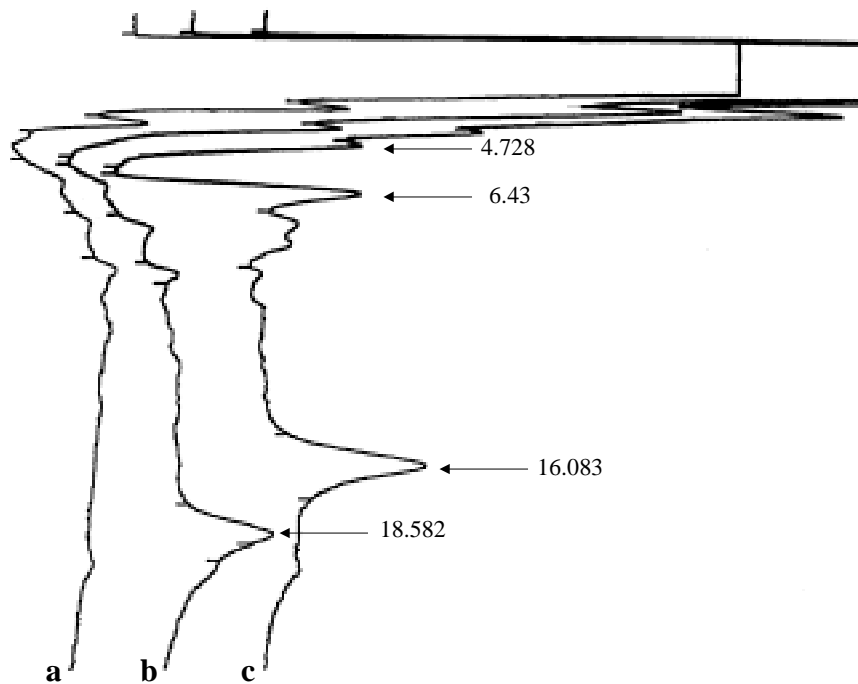


Abb. 4.24: HPLC-Chromatogramm

- a** Inkubationsansatz mit 0,2 % DMSO
- b** Inkubationsansatz mit 100  $\mu$ M Baicalin
- c** Inkubationsansatz mit 100  $\mu$ M Baicalein

Um festzustellen, ob nach 24 Stunden noch Baicalein vorhanden ist, wurde auch ein Inkubationsansatz mit Baicalein durchgeführt. Hier konnten zwei Metaboliten mit einer Retentionszeit von 6,43 und 16,08 Minuten gefunden werden. Durch Koinjektion mit dem Standardgemisch aus Baicalein und Baicalin konnte keine Überlagerung des Baicaleinpeaks mit dem unbekanntem Substanzpeak bei 6,43 Minuten erzielt werden. Daher muß es sich bei dem Substanzpeak bei 6,43 Minuten um einen Metaboliten von Baicalein handeln.

Die Frage, ob Baicalein in Baicalin umgewandelt wird, kann mit diesem Ansatz nicht geklärt werden, da der Proteinpeak des Inkubationsansatzes im Bereich der Absorption von Baicalin liegt und somit einen möglichen Metabolitenpeak in diesem Bereich überlagern würde.

---

Nach einmaliger oraler Applikation von Baicalein und Baicalin an Ratten wurden in der Galle die gleichen Metaboliten gefunden (Abe et al., 1990). Eine methylierte Verbindung wurde in geringer Konzentration gefunden. Glucuronide und Sulfate, die durch Phase II-Reaktionen gebildet wurden, konnten nachgewiesen werden, aber keine Aglycone. Die Ausscheidung der Metaboliten des Glucuronids Baicalin ist um ca. 4 Stunden im Vergleich zum Aglycon verzögert, was somit für eine Hydrolyse von Baicalin vor der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt spricht (Abe et al., 1990). Die intestinale Mikroflora führt zur Spaltung der Aglycone im Darm. 95 % der im Urin ausgeschiedenen Flavone sind mit Glucuronsäure konjugiert (Li et al., 1998; Heilmann & Merfort, 1998 a; Heilmann & Merfort, 1998 b).

Die Applikation von Baicalein und Baicalin an Ratten zeigte bei Untersuchung der biliären Ausscheidung das gleiche Metabolitenspektrum, wenn auch zeitlich verzögert (Abe et al., 1990). Betrachtet man einen Inkubationsansatz mit A 431-Zellen nach 24 Stunden, so stellt man ein unterschiedliches Metabolitenspektrum fest. In diesem Inkubationsansatz sind keine Darmbakterien, die das Glycosid spalten könnten. Wenn Baicalin als Aglycon aufgenommen würde, wie im Rattenversuch gezeigt, müßte sich auch ein Metabolitenspektrum wie bei Baicalein, nur eben verzögert einstellen.

Die bisherige Datenlage und die HPLC-Ergebnisse zu Baicalein und Baicalin deuten daraufhin, daß Baicalein und Baicalin an den untersuchten Zelllinien ein unterschiedliches Metabolitenspektrum ergeben. Baicalin könnte, wenn die untersuchten Zellen keine Glycosidase-Aktivität besitzen, möglicherweise als Glycosid resorbiert werden, wodurch das unterschiedliche Wirkungsspektrum erklärbar wäre.

#### 4.3.3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der *Scutellaria baicalensis* Flavone

Baicalein und Baicalin zeigten an unterschiedlichen Zelllinien Wachstumshemmung. Es zeigte sich jedoch, daß die Vulvacarcinom-Zelllinie, die empfindlichste Zelllinie, der bislang im Arbeitskreis untersuchten Zelllinien ist.

Aus der Gruppe der *Scutellaria baicalensis* Flavone hemmte lediglich Baicalein mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,1 µM die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs. Baicalin und Skullcapflavon II hemmten die PTK-Aktivität des EGFRs im untersuchten Konzentrationsbereich im ELISA nicht. Wogonin und Wogonosid zeigten bei den untersuchten Konzentrationen nur eine schwache Hemmung der EGFR assoziierten Tyrosinkinase im PTK-ELISA.

Bei der Untersuchung der *Scutellaria baicalensis* Flavonoide im MAPK-Reporter-Gen-Assay hemmte Baicalein die Elk1-Phosphorylierung in einem Konzentrationsbereich in dem auch Wachstumshemmung feststellbar war. Baicalin hemmte die Luciferase-Aktivität dosisabhängig, obwohl im PTK-ELISA bei diesen Konzentrationen keine Hemmung feststellbar war. Untersuchungen zum Metabolismus von Baicalein und Baicalin zeigten ein unterschiedliches Metabolitenspektrum. Damit wäre auch das unterschiedliche Wirkspektrum dieser beiden Substanzen erklärbar.

Ein überraschendes Ergebnis zeigten die Substanzen Wogonin und Wogonosid. Beide Substanzen hemmten die Elk1-Phosphorylierung. Wogonin zeigte die höchste Wirkung auf die Luciferase-Aktivität. Skullcapflavon II zeigte ebenfalls im untersuchten Konzentrationsbereich eine Hemmung der Elk1-Phosphorylierung, die jedoch für die beobachtete Wachstumshemmung wahrscheinlich keine Rolle spielt. Damit bleibt der Wirkmechanismus von Skullcapflavon II, der zur Cytotoxizität an LXFL529L-Zellen führt, weiter ungeklärt.

Für die untersuchten *Scutellaria baicalensis* Flavonoide konnte eine Interaktion mit der MAPK-Signaltransduktionskaskade nachgewiesen werden, jedoch bleibt die Frage nach dem angegriffenen Target noch weiter offen. Daher sind weitere Untersuchungen zur Klärung der möglichen Interaktionen mit Raf, MEK oder MAPK notwendig.

### 4.3.3.4 Anthocyanidine

#### 4.3.3.4.1 Cytotoxizität

Die wachstumshemmende Eigenschaften der Anthocyanidine Cyanidin und Delphinidin (siehe Anhang Seite 159 oder Tab. 2.9) wurden im Sulforhodamin B-Test im Vergleich zu (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) (siehe Anhang Seite 159 oder Abb. 2.15) getestet. EGCG hemmt das Wachstum zahlreicher humaner Tumorzellen in vitro (Okabe et al., 1997; Chen et al., 1998; Fujiki et al., 1998; Hibasami et al., 1998; Paschka et al., 1998; Valcic et al., 1996; Yang et al., 1998). Die hier beobachtete Wachstumshemmung von EGCG an A 431-Zellen steht im Einklang mit publizierten Daten (Ahmad et al., 1997; Liang et al., 1999).

Tab. 4.16: Wachstumshemmung nach 72-stündiger Inkubation im Sulforhodamin B-Assay. IC<sub>50</sub>: Konzentration, bei der das Zellwachstum gegenüber der Kontrolle um 50 % reduziert ist.

Substanz	Zelllinie	
	LXFL529L IC <sub>50</sub> [µM] (Bottler, 1998 <sup>a</sup> ) (Weyand, 2000 <sup>b</sup> )	A 431 IC <sub>50</sub> [µM]
Cyanidin	73 ± 4 <sup>a</sup>	42 ± 1
Delphinidin	33 ± 3 <sup>a</sup>	18 ± 2
Malvidin	> 100 <sup>b</sup>	61 ± 7 <sup>b</sup>
Cyanidin-3-β-D-galactosid	> 100 <sup>b</sup>	> 100 <sup>b</sup>
Malvidin-3-β-D-glucosid	> 100 <sup>b</sup>	> 100 <sup>b</sup>
(-)-Epigallocatechin-(3)-gallat	32 ± 2 <sup>a</sup>	21 ± 1

Die Aglykone Cyanidin und Delphinidin hemmen das Wachstum von LXFL529L-Zellen (Bottler, 1998) und A 431-Zellen ebenso wie die Referenzsubstanz EGCG. Diese Substanzen weisen jedoch alle gegenüber dem Epidermiscarcinom der Vulva eine höhere Cytotoxizität auf, als an der Zelllinie LXFL529L (siehe Tab. 4.16).

Diese unterschiedliche Sensitivität könnte möglicherweise auf den unterschiedlichen EGF-Rezeptorstatus zurückzuführen sein. LXFL529L-Zellen exprimieren signifikant weniger EGF-Rezeptoren im Vergleich zur A 431-Zelle (Fiebig et al., 1999). Delphinidin zeigt an beiden Zelllinien Wachstumshemmung in der gleichen Größenordnung wie EGCG. Cyanidin zeigt ebenso wie Delphinidin und EGCG eine dosisabhängige Wachstumshemmung, die jedoch zu höheren Konzentrationen hin verschoben ist. An der HCT-15-Zelllinie, einem malignen Darmcarcinom, zeigt Delphinidin ebenfalls bessere Wachstumshemmung als Cyanidin (Kamei et al., 1995). Weyand (2000) konnte für die Glycoside Cyanidin-3- $\beta$ -D-galactosid (Idaein) und Malvidin-3- $\beta$ -D-glucosid (Oenin) an beiden Zelllinien keine Wachstumshemmung bis 100  $\mu$ M feststellen. Malvidin zeigte eine signifikant niedrigere Wachstumshemmung an A 431-Zellen, die jedoch ebenso dosisabhängig ist wie bei Cyanidin und Delphinidin (Weyand, 2000). Weyand konnte für Malvidin keine Wachstumshemmung an LXFL529L-Zellen bis zu 100  $\mu$ M feststellen.

Freie Hydroxygruppen im B-Ring und freie Hydroxygruppen in Position 3 scheinen essentiell für die beobachtete Wachstumshemmung an LXFL529L- und A 431-Zellen zu sein. Ein Zuckerrest in Position 3 wie z.B. bei Oenin und Idaein eliminiert die wachstumshemmende Wirkung vollständig. Delphinidin, das drei Hydroxygruppen im B-Ring in den Positionen 3', 4' und 5' und eine Hydroxygruppe in Position 3 aufweist, zeigt eindeutig die höchste wachstumshemmende Potenz. Eine Reduzierung der Hydroxygruppen im B-Ring, wie z.B. bei Cyanidin führt zur signifikanten Abnahme der Wachstumshemmung. Der Einfluß von freien Hydroxygruppen im B-Ring im Vergleich zu Methoxysubstituenten wird durch den Vergleich zwischen Delphinidin und Malvidin deutlich. Methoxysubstituenten in 3' und 5'-Position reduzieren stark die wachstumshemmenden Eigenschaften.

#### **4.3.3.4.2 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs**

In der Literatur wird EGCG als guter Hemmstoff des EGFRs beschrieben, daher wurden auch die Anthocyanidine Delphinidin und Cyanidin untersucht (Liang et al., 1997). Als Mechanismus der Hemmung des EGFRs durch EGCG wird die Inhibierung der EGF-Bindung an seinen Rezeptor beschrieben (Liang et al., 1999). Als weitere Vergleichsubstanz, neben Tyrphostin AG 1478, wurde EGCG im PTK-ELISA eingesetzt.

Die Substanzen Cyanidin und Delphinidin, die aus der Gruppe der untersuchten Anthocyane und Anthocyanidine die beste Wachstumshemmung zeigten, wurden auf eine Hemmung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs untersucht. EGCG hemmte die Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs im gleichen Konzentrationsbereich wie die Substanzen Cyanidin und Delphinidin (siehe Abb. 4.25). EGCG und die beiden Anthocyanidine inhibierten die PTK-Aktivität des EGFRs sogar besser, als die Positivkontrolle Tyrphostin AG 1478 (siehe Abb. 4.3). Weyand (2000) konnte keine Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität des EGFRs für die Substanzen Malvidin, Cyanidin-3- $\beta$ -D-galactosid und Malvidin-3- $\beta$ -D-glycosid bis 100  $\mu$ M feststellen. EGCG zeigte die höchste Hemmwirkung mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0,2 \pm 0,02 \mu$ M. Dieser  $IC_{50}$ -Wert stimmt gut mit dem Literaturwert von umgerechnet 1,1  $\mu$ M überein (Liang et al., 1997). Der geringe Unterschied zwischen Literaturwert und gemessenem  $IC_{50}$ -Wert könnte auf eine andere Durchführung des Kinase-Assays bei Verwendung des gleichen Substrates zurückgeführt werden. Aber auch die Anthocyanidine Cyanidin und Delphinidin waren ebenso potent wie EGCG mit  $IC_{50}$ -Werten von  $0,8 \mu$ M  $\pm 0,2$  bzw.  $1,3 \mu$ M  $\pm 0,2$ .

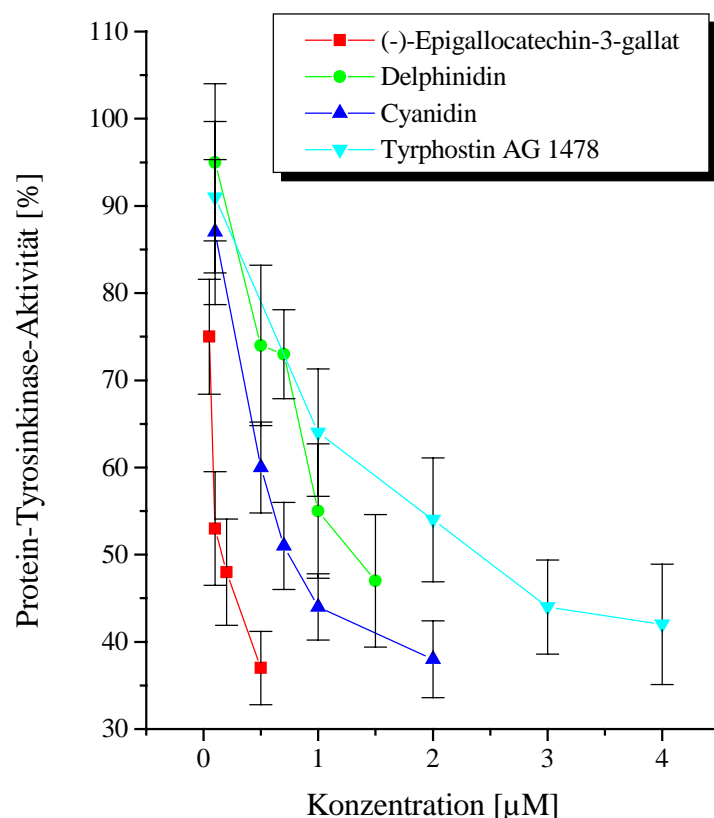


Abb. 4.25: PTK-ELISA mit EGCG, Delphinidin und Cyanidin

Im Gegensatz zum Sulforhodamin B-Assay erzielt die Einführung einer Hydroxygruppe am B-Ring von Cyanidin, wodurch man Delphinidin erhält, nicht eine Erhöhung der Hemmwirkung im PTK-ELISA. Beide Substanzen zeigen ähnliche inhibierende Eigenschaften. Freie Hydroxygruppen in Position 3, 3' und 4' sind notwendig für eine effiziente Enzymhemmung. Die Einführung von Methoxygruppen in 3' und 5' Position oder eines Zuckers in Position 3 führt zum kompletten Verlust der enzyminhibierenden Eigenschaften.

In der Literatur wird eine Blockierung der EGF-Bindung und der EGF-Rezeptor Kinaseaktivität sowohl für EGCG, als auch (-)-Epicatechin-3-gallat beschrieben (Liang et al., 1997). Für die Substanzen (+)-Catechin/(-)-Epicatechin und (+)-Galocatechin/(-)-Epigallocatechin, die sich von Cyanidin und Delphinidin nur in der Hydrierung des C-Ringes unterscheiden, bei sonst gleicher Substituenten am A- und B-Ringes, konnten Liang et al. (1997) keine signifikante Hemmung der EGF-Rezeptor Kinaseaktivität feststellen. Das könnte somit ein Hinweis sein, daß für die Hemmung der Tyrosinkinase des EGFRs das aromatische System des C-Ringes und damit die räumliche Anordnung dieser Ringstrukturen hier von entscheidender Bedeutung sein könnte.

#### **4.3.3.4.3 Hemmung der Elk1-Phosphorylierung**

Aufgrund der Meßergebnisse aus dem PTK-ELISA ergab sich die Frage, ob die Anthocyanidine Cyanidin und Delphinidin die Signaltransduktionskaskade in der Zelle downstream des EGFRs inhibieren. In weiteren Untersuchungen wurde daher im Reportergen-Assay die Phosphorylierung des Transaktivatorproteins GAL4-Elk1 durch die MAPK gemessen.

Cyanidin und Delphinidin hemmen die Aktivierung des GAL4-Elk1-Fusionsproteins im Konzentrationsbereich der Wachstumshemmung. Die Hemmung des EGFRs und die Beeinflussung des downstream-Signalweges könnten zur beobachteten Wachstumshemmung dieser Nahrungsmittelinhaltsstoffe beitragen.

Bei niedrigen Konzentrationen induziert (5  $\mu\text{M}$ ) EGCG eine geringe, aber signifikante Erhöhung der Luciferase-Aktivität (siehe Abb. 4.26). Dieser Effekt kehrt sich jedoch bei Konzentrationen  $\geq 20 \mu\text{M}$  um. Einen ähnlichen geringen, signifikanten Effekt konnte auch bei Delphinidin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  festgestellt werden, auch hier kehrt sich der Effekt um und die Luciferase-Aktivität ist bei 30  $\mu\text{M}$  um 50 % gehemmt. Cyanidin hemmt die Luciferase-Aktivität weniger als Delphinidin und EGCG, zeigt aber auch eine dosisabhängige

Hemmung. Weyand (2000) konnte für Malvidin einen ähnlichen Kurvenverlauf messen, wie für Cyanidin. Die Glycoside Cyanidin-3- $\beta$ -D-galactosid und Malvidin-3- $\beta$ -D-glycosid zeigten im Reporter-gen-Assay in Konzentrationen bis 20  $\mu$ M bzw. 70  $\mu$ M einen Anstieg der Luciferase-Aktivität (Weyand, 2000). Beim Glycosid Cyanidin-3- $\beta$ -D-galactosid ging die Luciferase-Aktivität anschließend wieder auf den Basallevel zurück und im Falle von Malvidin-3- $\beta$ -D-glycosid blieb die Luciferase-Aktivität auf erhöhtem Level (Weyand, 2000).

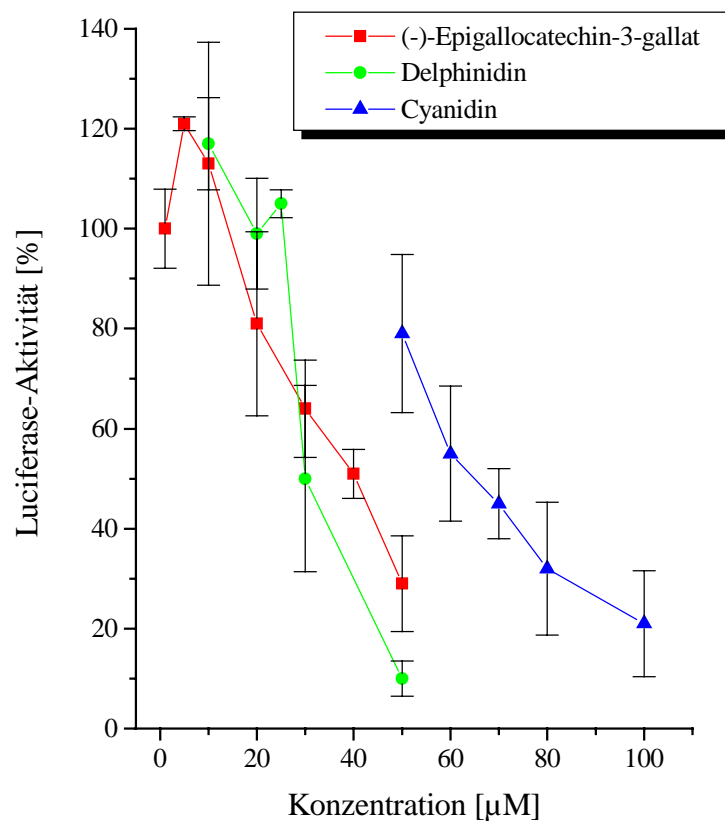


Abb. 4.26: Reporter-gen-Assay mit EGCG, Delphinidin und Cyanidin in A 431-Zellen

Die Anthocyanidine Cyanidin und Delphinidin inhibieren in wachstumshemmenden Konzentrationen die Expression von Luciferase, die als Indikator für die Inhibierung der Elk1-Phosphorylierung herangezogen wird. Weyand konnte dagegen keine signifikante Inhibition der Luciferase-Expression durch Behandlung mit den Glycosiden Cyanidin-3- $\beta$ -D-galactosid und Malvidin-3- $\beta$ -D-glycosid feststellen.



EGCG, Delphinidin, Cyanidin und Malvidin (Weyand, 2000) inhibieren die Luciferase-Expression, als Endpunkt der Inhibierung der Elk1-Phosphorylierung in A 431-Zellen. Der Konzentrationsbereich, indem man eine PTK-Hemmung dieser Substanzen im ELISA feststellen kann, liegt mehr als eine Größenordnung niedriger, als die Wachstumshemmung und die Inhibierung der Luciferase-Expression. Diese unterschiedliche Wirkkonzentrationen am isolierten Enzym und in der Zelle resultieren möglicherweise aus der Aufnahme dieser Substanzen in die Zelle. Über zelluläre Aufnahme, subzelluläre Verteilung, Metabolismus und Elimination von Flavonen, Anthocyanidinen und Catechinen ist bisher nur wenig bekannt.

#### **4.3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Anthocyanidinen**

Delphinidin zeigt bei Wachstumshemmung an den Tumorzelllinien LXFL529L und A 431, Hemmung der EGF-Rezeptor assoziierten Tyrosinkinase und Hemmung der Elk1-Phosphorylierung, die gleichen Eigenschaften bzw. den gleichen Konzentrationsbereich wie EGCG. Cyanidin war weniger aktiv, aber hemmte ebenfalls das Wachstum der humanen Tumorzelllinien LXFL529L und A 431. Im Gegensatz hierzu zeigt das methoxylierte Derivat Malvidin nur eine Wachstumshemmung an A 431-Zellen, aber keine Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs (Weyand, 2000). Weyand konnte zeigen, daß downstream des EGFRs die Elk1-Phosphorylierung allerdings durch Konzentrationen inhibiert wird, bei denen Wachstumshemmung auftritt. Somit kann die beobachtete Sensitivität dieser Substanzklasse gegenüber A 431-Zellen nicht nur mit dem EGFR-Status in Zusammenhang gebracht werden, da möglicherweise noch ein anderes Target in der Signaltransduktionskaskade downstream des EGFRs oder eines anderen Weges, der die Elk1-Phosphorylierung beeinflusst, betroffen sein könnte. Ebenso zeigten die glycosylierten Substanzen keine Hemmung dieser Targets (Weyand, 2000).

Bei Ratten kann nach oraler Applikation von Cyanidin-3- $\beta$ -D-glycosid das intakte Glycosid schnell gemessen werden (Tsuda et al., 1999). Beim Menschen kann nach oraler Aufnahme von Holunderbeeren-Extrakt die glycosidische Form der Anthocyane im Plasma detektiert werden (Cao & Prior, 1999). Da aber nur wenig über die tägliche Aufnahme, Bioverfügbarkeit, Absorption und Metabolismus dieser Anthocyanidine beim Menschen bekannt ist, sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine Bewertung der Relevanz dieser Nahrungsmittel-inhaltstoffe für die Gesundheit des Menschen vornehmen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Enzyme linked immuno sorbant Assay zur Untersuchung der Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Um die Beeinflussung der Signaltransduktionskaskade downstream des EGFRs durch antineoplastische Substanzen weiter in intakten Zellen untersuchen zu können, wurde ein Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Reportergen-Assay entwickelt.

Tyrphostin AG 1478, ein bekannter EGFR-Inhibitor, erwies sich im neu etablierten Testsystem als potenter Hemmstoff der Protein-Tyrosinkinase (PTK) des EGFRs mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 2,4  $\mu$ M. Das Wachstum von A 431-Zellen wird durch Tyrphostin AG 1478 signifikant stärker inhibiert, als das Wachstum von LXFL529L-Zellen. Die Behandlung von A 431-Zellen mit Tyrphostin AG 1478 induziert eine Arretierung der Zellen in G0/G1-Phase des Zellzyklus, bei gleichzeitiger Abnahme der Zellzahl in der Synthesephase.

Neuartige Bisindolylmaleimide und Indolocarbazole zeigten in tumorzellwachstumshemmenden Konzentrationen keine bzw. nur eine geringe Hemmung der PTK-Aktivität des EGFRs.

Aus der Gruppe der substituierten Pteridine hemmte die Leitsubstanz 7a (DC-TA-46) die PTK-Aktivität des EGFRs mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $48 \pm 3,5$   $\mu$ M. Modifikationen in Position 2 spielen eine wesentliche Rolle bei der Hemmung der EGFR assoziierten PTK. Modifikationen der Leitsubstanz in Position 6, wie z.B. Austausch des Chlors gegen Wasserstoff oder eine Methylgruppe, führten zum Verlust der Hemmwirkung auf die PTK-Aktivität. Die untersuchten Substanzen 7a, 7k, 7o, E272, E273 und E276 hemmten das Wachstum der A 431-Zellen in niedrigeren Konzentrationen, als das Wachstum von LXFL529L-Zellen. Im MAPK-Reportergen-Assay zeigten 7a und das Glycin-Derivat E272 als einzige dieser Substanzen in Konzentrationen, in denen Wachstumshemmung und PTK-Hemmung vorliegt, eine fast vollständige Inhibierung der Elk1-Phosphorylierung. Hingegen zeigte das Lysin-Derivat E273, das die höchste Hemmwirkung der Pteridinderivate im PTK-Assay aufwies, in wachstumshemmenden Konzentrationen im MAPK-Reportergen-Assay keine Hemmung der Luciferase-Aktivität.

---

Ferner wurden unterschiedliche Klassen von Flavonoiden untersucht. Aus den Gruppen der untersuchten Chalone und Isoflavone erwies sich keine Substanz als potenter PTK-Hemmstoff.

Die untersuchten Flavone aus *Scutellaria baicalensis* hemmten das Wachstum von A 431-Zellen in niedrigeren Konzentrationen, als das Wachstum von LXFL529L-Zellen. Aus dieser Gruppe hemmte Baicalein als einzige die PTK-Aktivität des EGFRs in wachstumshemmenden Konzentrationen mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,1 µM. Neben Baicalein zeigte Wogonin eine Hemmung der Elk1-Phosphorylierung, wobei nur Baicalein in wachstumshemmenden Konzentrationen die Luciferase-Aktivität inhibierte.

Des weiteren erwiesen sich die Anthocyanidine Delphinidin und Cyanidin in wachstumshemmenden Konzentrationen als Hemmstoffe der EGFR assoziierten Tyrosinkinase und Elk1-Phosphorylierung. Beide Substanzen hemmten das Wachstum von A 431-Zellen in niedrigeren Konzentrationen, als das Wachstum von LXFL529L-Zellen.

Abschließend ist festzuhalten, daß neue molekulare Untersuchungsmethoden erfolgreich etabliert wurden, die Einblick in Mechanismen ermöglichen, die für eine tumorzellwachstumshemmende Wirkung relevant sind. Hierbei stand im Vordergrund die Aufklärung von Interaktionen in zellulären Signalketten, die wesentliche Bedeutung für die Zellproliferation besitzen. Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit war vor allem der Wachstumsfaktor getriggerte Signalweg Rezeptor-Tyrosinkinase/Ras/Raf/MAPK. Die so etablierten Testmethoden können dazu beitragen, neue Wirkprinzipien zur Tumorwachstumshemmung aufzufinden bzw. zu charakterisieren.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Geräte

Blotting:	Multiphor II (Pharmacia) TE 42 Transphor Tank Transfer (Hofer)
Chemilumineszenzmessung:	Luminometer (BMG)
Durchflußzytometer:	Particle Analyzer System 3 (Partec)
Elektrophorese:	Mini Protean II (Biorad) Spannungsgerät BIORAD Power-Pac 300 Spannungsgerät BIORAD Power Pac 200
ELISA-Reader:	Modell 450 (Biorad)
Geldokumentation:	Lumi-Imager (Boehringer Mannheim)
Geltrockner:	Gel dryer Model 543
HPLC:	Pumpe: Jasco PU-980 Gradientenmischer: Jasco LG-980-02, Ternary Gradient Unit Entgaser: Jasco DG-980-50, 3-Line Degaser Autosampler: Marathon Detektor: LCD 500 (Gamma Analysen Technik) Integrator: Shimadzu C-R3A
Mikroskopie:	Durchlicht-/Fluoreszenz-Mikroskop, Typ Axioskop (Zeiss) Fluoreszenzfiltereinsatz 365, FT 395, LP 420 (Farbgläser mit Breitbandcharakter, UV-Anregung: 365/366 nm) Fluoreszenzfiltereinsatz BP 450-490; FT 510; LP 520 Objektive: Plan Neofluar 100 x/1,30 oil Plan Neofluar 63 x/1,25 oil Okular: PL 10 x
pH-Meter:	pH 521 (WTW) Metrohm 632
Rüttler:	Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Rührer:	Magnetrührer MR 2002 (Heidolph)
Schüttelwasserbad:	Köttermann
Spektralphotometer:	Uvikon 810 (Kontron)
Szintillationszähler:	Betamatik I Modell 3380 (Kontron)
Transfektion:	Elektroporator (Invitrogen)
Trockenschrank:	Memmert
Überkopfschüttler:	Heto Lab Equipment Type RK 10-VS
Ultraschallbad:	Sonorex RK 102 H (Bandelin)
Ultraschallstab:	Labsonic 2000
Vortex:	Genie (Bender & Hobein)
Waage:	AE 163 (Mettler) Sartorius 1104
Wasserbad:	Haake E 15 Haake D 8 Wasserbad U3 (Julabo)
Zentrifugen:	Biofuge fresco (Heraeus) Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf) Ultrazentrifuge: Centrikon T-2055 (Kontron) Zentrifuge Mode J2-21 (Beckmann)

Zellkultur:	Biofreezer (Forma) Brutschrank: Cytoperm (Heraeus) 8-Kanal-Dispenser Modell 8800 (Nichiryo) Lichtmikroskop Labovert (Leitz) Pipettierhilfe: Pipettus-Akku (Tecnomara) Sterile Werkbank: Lamin-Air HLBB 2448 6S (Heraeus) Vakuumsaugpumpe (KNF-Neuberger) Varioklav-Dampfsterilisator: 500 E (H+P Labortechnik)
-------------	---

## 6.2 Material

Elektrophorese:	Gel-Blotting-Papier (Roth) Hybond <sup>TM</sup> -C, Nitrozellulose-Membran 0,45 µm (Amersham)
HPLC:	Säule: LiChroCART <sup>®</sup> 125-4 HPLC-Cartridge (Merck) LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 endcapped (5µm) Vorsäule: LiChroCART <sup>®</sup> 4-4, LiChrospher <sup>®</sup> 100 RP-18 (5µm) (Merck)
PTK-Aufarbeitung:	Agarose-Wheat Germ Lectin (Amersham Pharmacia Biotech) Filter Kit HR 10 (Pharmacia Biotech) Immuno-Platten-Microlon Platte F (Greiner)
Radioaktivitätsmessungen:	Minivials (Zinsser)
Transfektion:	Elektroporations-Küvetten, 0,4 cm (Invitrogen)
Western-Blot-Detektion:	BioMax Light 1 (Kodak) Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (Boehringer Mannheim) Entwickler: Ilford speed LK24 (Kodak) Fixierer: Ilford speed AL4 (Kodak)
Zellkultur:	Kulturflaschen (Nunc) Neubauer-Zählkammer Petrischalen, Durchmesser 144 mm und 58 mm (Nunc) Quadriperm (Fischer)

Zellkulturflaschen und sonstige sterile Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Greiner, Nunc oder Sarstedt bezogen.

## 6.3 Reagenzien

Chemikalien allgemein:

- ABTS<sup>®</sup>-Tabletten (Boehringer Mannheim)
- ABTS<sup>®</sup>-Puffer (Boehringer Mannheim)
- N-Acetyl-D-Glucosamin (Sigma)
- Adenosin-5'-triphosphat (Boehringer Mannheim)
- Agar-Agar (Roth)
- Ammoniumpersulfat, APS (Serva)
- Aprotinin (Boehringer Mannheim)
- BSA Albumin Fraktion V (Roth)
- Caseinhydrolysat (GIBCOBRL Life Technologies)
- Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma)
- Curcumin (Cayman Chemical)
- Cyanidinchlorid (Roth)
- Cyclisches Adenosinmonophosphat, cAMP (Fluka)
- 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, DAPI (Sigma)
- Delphinidinchlorid (Roth)
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Fluka)
- DNA ladder 1 kb (GIBCOBRL Life Technologies)
- EGF, Human, Recombinant, E. coli (Calbiochem)
- Ethidiumbromid (Sigma)
- FuGENE<sup>™</sup>6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim)
- Fötales-Kälberserum, FKS (Gibco)
- GF 109203 X (Bisindolymaleimide I) (Calbiochem)
- L-Glutamine (Sigma)
- Glycerin (Boehringer Ingelheim)
- Glycin (Boehringer Ingelheim)
- (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
- HEPES Sodium Salt (Sigma)
- Kanamycin (Invitrogen<sup>®</sup>)
- Leupeptin (Boehringer Mannheim)
- Manganchlorid (Sigma)
- β-Mercaptoethanol (Sigma)
- Methanol (Riedel-de-Häen)
- Minimum Essential Medium Easel (Sigma)
- MultiMark<sup>™</sup> Multi-Colored Standard (Novex)
- Natriumchlorid (Roth)
- PD 98059 (Calbiochem)
- Penicillin-Streptomycin (10.000 I.U./ml; 10000 µg/ml)  
(GIBCOBRL Life Technologies)
- Pepstatin (Boehringer Mannheim)
- p-Phenyldiamine-Dihydrochlorid (Sigma)
- Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF (Boehringer Mannheim)
- Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) PIPES Disodium salt (Sigma)
- Poly (Glu, Tyr) 4:1 Sodium salt (Sigma)
- Prestained SDS-Page Standard Solution (Sigma)
- Propidiumiodid (Sigma)
- RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (GIBCOBRL Life Technologies)

---

	SeeBlue™ Pre-Stained Standards (Novex)
	Select Yeast Extract (GIBCOBRL Life Technologies)
	Sigmacote (Sigma)
	Sodium Bicarbonate 7,5 %, (GIBCOBRL Life Technologies)
	Sulforhodamin B (Sigma)
	Szintillationscocktail Ready Safe (Beckmann)
	Tfx™-50 Reagenz (Promega)
	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED (Biorad)
	Trypanblau (Serva)
	Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Boehringer Mannheim)
	Tryptone (Invitrogen)
	Tween 20, Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Sigma)
	Tyrphostin AG 1478 (Alexis)
	Wortmannin (KY 12420) (Calbiochem)
Enzyme:	Restriktionsendonuclease Bam HI (Boehringer Mannheim)
	Restriktionsendonuclease Eco RI (Boehringer Mannheim)
	Restriktionsendonuclease Pvu II (Boehringer Mannheim)
Plasmide:	PathDetect™ Elk trans-Reporting System (Stratagene)
Antikörper:	Monoclonal anti-Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor, Mouse Ascites Fluid Clone F4 (Sigma)
	Anti-Maus Ig-POD, Fab Fragmente, 40 U (Boehringer Mannheim )
	Anti-phosphotyrosine Mouse monoclonal antibody clone 1G2, 100 µg (Boehringer Mannheim)
	Anti-Phosphotyrosin-Peroxidase (Klon 3-365-10) (Boehringer Mannheim)
	Monoklonaler Antikörper gegen Phosphotyrosin, 100 µg (Boehringer Mannheim)
Kits:	ECL Western blotting detection reagents (Amersham Life science)
	Luciferase Assay System (Promega)
	LumiGLO® Chemiluminescentsubstrat (NEW ENGLAND Biolabs)
	Nucleospin kit für Minipräparation (Macherey-Nagel)
	QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)

Die folgenden Substanzen wurden freundlicherweise von den entsprechenden Firmen und Instituten zur Verfügung gestellt:

DC-TA-46 (Boehringer Ingelheim (Dr. Karl Thomae GmbH), Biberach)

Rolipram (Schering AG, Berlin)

Alle sonstigen hier nicht aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Amersham Life Science, Boehringer Mannheim, Fluka, ICN, Promega, Serva und Sigma in p.A. Qualität bezogen.

## **6.4 Zellkultur**

### **6.4.1 Zelllinien und Kulturmedien**

#### **A 431-Zelllinie**

A 431-Zellen entstammen einem Epidermiscarcinom der Vulva. Man entnahm es einer Patientin im Alter von 85 Jahren und hat es als Monolayer kultiviert. Nach langer in vitro-Kultivierung zeigen die fibroblastenähnlichen Zellen ihre maligne Charakteristik. A 431-Zellen haben einen hypertriploiden Karyotyp mit einer modalen Chromosomenanzahl von 74 (Giard et al., 1973).

#### **CHO-Zelllinie**

Die CHO-Zelllinie wurde 1957 aus Ovarialbiopsiematerial eines chinesischen Hamsters entwickelt. Sie eignet sich sehr gut zur Transfektion, da sie in der Lage ist rekombinante Proteine in hohem Maße nach Transfektion zu exprimieren (Chaney, 1996).

#### **CV-1-Zelllinie**

Die CV-1-Zelllinie wurden aus der Niere eines männlichen, erwachsenen Grünaffens gewonnen (Hay, 1994).

#### **LXFL 529L-Zelllinie**

Lung Xenograft Fiebig Large 529L (LXFL 529L) ist ein großzelliges Bronchialcarcinom, das einer 34 jährigen Patientin entnommen und nicht durch Antitumormedikamente vorbehandelt wurde. Die Überlebenszeit betrug 115 Tage nach Tumorentnahme. Bei der Patientin war ein regionaler Lymphknotenbefall, aber keine erkennbaren Metastasen, festzustellen. Seit April 1984 wird das großzellige Bronchialcarcinom in Nacktmäusen passagiert, wobei in Nacktmäusen die Verdopplungszeit bei subkutanem Wachstum 5 Tage beträgt (Fiebig et al., 1992).



Tab. 6.1: Kulturmedien und Kulturbedingungen von Zelllinien

Zelllinie	Kulturmedium	Kulturbedingungen
A 431	MEM 300 mg/l L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % FKS	37°C 5 % CO <sub>2</sub> 95 % Luftfeuchtigkeit
CHO	RPMI 1640	37°C
CV-1	1 % Penicillin/Streptomycin	5 % CO <sub>2</sub>
LXFL 529L	10 % FKS	95 % Luftfeuchtigkeit

#### 6.4.2 Mediumwechsel

Der Wechsel des Mediums erfolgt, indem das verbrauchte Medium abgegossen wird und der in der Kulturflasche verbleibende Zellmonolayer mit 5-10 ml PBS gewaschen wird. Anschließend wird, auf 37°C vorgewärmtes, frisches Medium entsprechend der Flaschengröße zugegeben (Lindel & Bauer, 1987).

PBS	10 g	NaCl
(Phosphate buffered saline)	0,25 g	KCl
	1,44 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,25 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	auf 1 l mit bidest. Wasser auffüllen, pH 7,3-7,4 einstellen und autoklavieren	

#### 6.4.3 Passagieren und Zellzählung

Zum Passagieren der Zelllinie wird das Kulturmedium abgegossen und der Zellmonolayer mit 5-10 ml PBS gewaschen. Anschließend werden 5 ml Trypsinlösung (je nach Flaschengröße) hinzugegeben und 30 Sekunden inkubiert.

Die Trypsinlösung wird abgegossen und die Kulturflasche wird daraufhin ca. 2 min im Brutschrank weiter inkubiert. Danach wird durch Klopfen auf den Boden der Zellkulturflasche die restlichen am Boden haftenden Zellen abgelöst. Die Zellen werden in ca. 5 ml Medium resuspendiert. Zur Zellzählung werden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung versetzt und lichtmikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt (Lindel & Bauer, 1987).

Trypanblau-Lösung	0,4 g	Trypanblau	
	0,81 g	NaCl	
	0,06 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
			mit H <sub>2</sub> O bidest. auf 100 ml auffüllen, pH 7,3-7,4 einstellen und anschließend sterilfiltrieren
Trypsinlösung	0,05 g	Trypsin	
	0,025 g	EDTA	
			in 100 ml PBS lösen, sterilfiltrieren und in 5 ml Portionen einfrieren

#### 6.4.4 Einfrieren und Lagern von Zellen

Nach Abtrypsinieren des Monolayers und Inaktivierung des Trypsins mit 5 ml Medium, werden zu 900 µl Zellsuspension 100 µl DMSO zugegeben. Die Zellsuspension wird in Kryoröhrchen zu 1 ml aliquotiert, verschraubt und vermischt. Die Kryoröhrchen werden langsam eingefroren und bei -80°C im Biofreezer gelagert. Zur Langzeitlagerung können die Zellen, nach einem Tag Lagerung im Biofreezer, in flüssigen Stickstoff überführt werden (Lindel & Bauer, 1987).

#### 6.4.5 Auftauen von Zellen

Tiefgefrorene Zellen werden schnell im Wasserbad auf 37°C aufgetaut. Man zentrifugiert bei 200 x g ab, durch Dekantieren entfernt man den Überstand und dadurch auch das zytotoxische DMSO. Das erhaltene Zellpellet wird im Medium resuspendiert und die Zellsuspension in

Kulturflaschen zum weiteren Kultivieren überführt. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel um DMSO-Reste zu entfernen (Lindel & Bauer, 1987).

#### 6.4.6 Zellkultivierung und Zellfixierung auf Objektträger

Zum Mycoplasmascreening werden Zellen in Quadripermschalen auf Objektträger ausgestreut. Sterile Objektträger (Superfrost) werden in Quadripermschalen gelegt und jeweils mit 5 ml Zellsuspension versehen. Nach ca. 24-stündiger Kultivierung im Brutschrank können die Objektträger fixiert und zum Mycoplasmascreening eingesetzt werden. Dazu werden die Objektträger mit Methanol abgespült und in Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ca. 5 Minuten fixiert (Lindel & Bauer, 1987).

#### 6.4.7 Mycoplasmascreening

Methanolfixierte Objektträger werden kurz getrocknet und mit 50  $\mu\text{l}$  DAPI/Propidiumiodid/Antifade-Farbreagenzlösung angefärbt. Man deckt den Objektträger mit einem Deckglas ab und kann nun die Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Anregung: 380 nm, Emission: 488 nm) auf eine Mycoplasmenkontamination hin untersuchen.

Kleine fluoreszierende Punkte im Zytoplasma bzw. im interzellulären Raum deuten auf eine Mycoplasmenkontamination hin.

Antifade-Puffer	100 mg p-Phenylendiamin Dihydrochlorid in 10 ml PBS lösen auf pH 8 mit 0,5 M Carbonat-Dicarbonat Puffer einstellen, in 90 ml Glycerin aufnehmen, sterilfiltrieren und bei $-20^{\circ}\text{C}$ lagern.
Farbstofflösungen	1 mg DAPI in 1 ml bidest. $\text{H}_2\text{O}$ lösen. 1 mg Propidiumiodid in 1 ml bidest. $\text{H}_2\text{O}$ lösen.
Farbreagenz	je 1 $\mu\text{l}$ beider Farbstofflösungen zu 1 ml Antifade-Puffer geben.

## 6.5 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Aus einer BSA-Stammlösung der Konzentration 2 mg/ml wird eine Verdünnungsreihe aufgestellt. Mit bidest. Wasser werden Verdünnungen der Konzentrationen 0,05/0,1/0,2/0,5/0,8/1 mg/ml hergestellt. 100 µl der Probenlösung bzw. der Standardlösung werden mit 900 µl Bradford-Reagenzlösung versetzt und kurz gevortext. Nach 5 Minuten sind die Ansätze für 60 Minuten bei 595 nm meßbar. Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei gegen den jeweiligen Reagenzienblindwert (Wasser bzw. Puffer) gemessen wird.

Bradford-Reagenzlösung                      100 mg Coomassie Brillant Blue G 250 werden mit 50 ml 50 % igen Ethanol (v/v) gelöst. Man fügt 100 ml 85 % ige Phosphorsäure hinzu und füllt mit dest. Wasser auf 1 l auf.

Die Proteinbestimmung erfolgt durch Auftragen der Extinktionen gegen den Proteingehalt des Standards. Mit Hilfe linearer Regression wird eine Eichgerade des Standards erstellt und so der Proteingehalt bestimmt (Bradford, 1976; Holtzhauer, 1988).

## 6.6 Sulforhodamin B (SRB)-Test

Bei diesem Test wird durch Detektion des Lebendproteins nach Substanzeinwirkung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mittels eines photometrischen Assays die zytotoxische Wirkung von Substanzen bestimmt (Skehan et al., 1990).

In einer 24-Lochplatte werden 6000 A 431-Zellen pro ml ausgestreut und 24 Stunden anwachsen gelassen. Anschließend wird das Medium abgesaugt und durch frisches, mit den entsprechenden Wirkstoffkonzentrationen, ersetzt. Die Testsubstanzen, die in DMSO gelöst sind, werden mit Medium 1:100 verdünnt. Die Endkonzentration an DMSO beträgt somit 1 % im Ansatz. Die Kontrollansätze werden einmal ohne DMSO und einmal mit 1 % DMSO inkubiert.

Die 24-Lochplatte ist folgendermaßen aufgeteilt:

K/M	K/D	T1	T2	T3	T4
K/M	K/D	T1	T2	T3	T4
K/M	K/D	T1	T2	T3	T4
K/M	K/D	T1	T2	T3	T4

K/M: Kontrolle nur mit Medium

K/D: Kontrolle mit 1 % DMSO

T 1-4: Testsubstanz in der entsprechenden Konzentration

### **Fixierung**

Nach 72 Stunden wird die Inkubation der 24-Lochplatte durch Zugabe von 100 µl 4°C kalter 50 % iger Trichloressigsäure je Loch, abgestoppt. Nach einer Stunde Fixierung bei 4°C werden die Löcher fünfmal mit kaltem Wasser ausgewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### **Färbung und Messung**

Die fixierten Zellen werden nach dem Trocknen mit 250 µl 0,4 % iger Sulforhodamin-Lösung je Loch 30 Minuten angefärbt. Der überschüssige Farbstoff wird durch viermaliges Waschen mit 1 % iger Essigsäure entfernt und die Platten werden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Mit 1 ml Tris-Base-Lösung wird der aufgenommene Farbstoff eluiert und nach 5 Minuten photometrisch bei 564 nm gegen Tris-Base-Lösung vermessen.

### **Auswertung**

Die Auswertung des SRB-Testes erfolgt durch Bildung der Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Kontrollwerten und den jeweiligen Testsubstanzwerten. Man bezieht die Mittelwerte der jeweiligen Testsubstanzwerte auf den Mittelwert der Kontrollwerte (T/C). Der IC<sub>50</sub>-Wert stellt die Konzentration dar, bei der das Wachstum der Zellen gegenüber der Kontrolle 50 % beträgt.

---

Trichloressigsäure	50 % ig in bidest. Wasser
Essigsäurelösung	1 % ig in bidest. Wasser
Sulforhodamin B-Lösung	0,4 % ig in 1% iger Essigsäure
Tris-Base-Lösung (pH 10,5)	10 mM in bidest. Wasser

## 6.7 Durchflußzytometrie

### Probenvorbereitung

A 431-Zellen werden in mittleren Petrischalen mit einer Zelldichte von  $7 \times 10^5$  Zellen/ml ausgestreut und 24 Stunden anwachsen gelassen. Anschließend werden die Zellen mit Testsubstanz bzw. deren Lösungsmittel (DMSO) oder nur mit Medium (zur Geräte Einstellung) für 24 Stunden inkubiert. Pro Substanzkonzentration werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Das Medium wird abpipettiert und gesammelt. Die Zellen werden mit 1 ml PBS gewaschen und die Waschlösung wird ebenfalls gesammelt. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml Trypsin-Lösung für 1 Minute versetzt. Die sich ablösenden Zellen werden in 2 ml Medium resuspendiert und mit der gesammelten Lösung vereinigt. Es folgt eine zehnminütige Zentrifugation bei 200 x g. Der Überstand wird abpipettiert und das Zellpellet wird in 5 ml 70 % igem Ethanol aufgenommen. Die Zellen werden vereinzelt und können bis zur Messung bei 4°C gelagert werden.

1000 µl der gut gemischten Zellsuspension werden entnommen und 10 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 500 µl Kernisolationspuffer (KIL) resuspendiert und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 2 ml einer Färbelösung (DAPI/Sulforhodamin 101) zugegeben, gut gemischt und nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Durchflußzytometer vermessen.

## 6.8 Isolierung des EGF-Rezeptors

### 6.8.1 Gewinnung von Zellmembranen aus A 431-Zellen

A 431-Zellen werden in 40 großen Petrischalen konfluent wachsen gelassen. Zur Gewinnung der Zellmembranen werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wird 10 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird mit PBS resuspendiert und anschließend wieder 10 Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wird das Zellfeuchtgewicht bestimmt und die Zellen in 5 ml KMP-Puffer resuspendiert.

Die Zellen werden nun durch Ultraschallbehandlung (3 x 10 Sekunden) zerstört und danach bei 2°C und 15000 x g 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird gesammelt und das Pellet wird erneut mit KMP-Puffer versetzt. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt. Die gesammelten und vereinigten Überstände werden auf Eis gerührt. Durch Zugabe einer 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung wird im Zentrifugationsüberstand ein Ca<sup>2+</sup>-Ionengehalt von 10 mM eingestellt. Nach 15 Minuten Aggregationszeit zentrifugiert man die ausgefallenen Vesikel bei 2°C und 7000 x g 30 Minuten ab. Das erhaltene Pellet wird verworfen und der Überstand wird bei 2°C und 100000 x g 1 Stunde zentrifugiert. Das erhaltene Membranpellet kann bei -70°C gelagert werden (Gastpar, 1997).

KMP-Puffer (pH 7,2)	20 mM	PIPES · NaOH
	1 mM	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O
	5 mM	KCl
	0,2 mM	PMSF
Trypsin-Lösung	0,25 g	Trypsin
	0,35 g	EDTA
		mit PBS auf 500 ml auffüllen, steril filtrieren, als Aliquot bei -20°C lagerbar

## 6.8.2 Affinitätschromatographie

5 ml Weizenkeimlektin-Agarose werden in eine Säule gefüllt. Mit einer 1 M NaCl-Lösung entfernt man das Natriumazid vom Säulenmaterial und equilibriert mit 50 ml Säulenpuffer. Das eingefrorene Membranpellet wird in 10 ml KMPT-Puffer resuspendiert und anschließend 1 Stunde auf Eis gerührt. Nichtgelöste Bestandteile werden durch eine einstündige, hochtourige Zentrifugation bei 2°C und 100000 x g abgetrennt. Der erhaltene Überstand wird auf die vorbereitete Affinitätssäule gegeben. Die Affinitätschromatographie wird bei 4°C mit einer Flußrate von 1,5 ml/min durchgeführt. Nichtgebundene Bestandteile werden zuerst durch Spülen mit Säulenpuffer entfernt. Anschließend werden die gebundenen Proteine durch Zusatz von 0,3 M N-Acetylglucosamin zum Säulenpuffer eluiert. Die gesammelten Fraktionen werden auf einen Gehalt von 1 mM Dithiothreitol (DTT) gebracht und bis zur Aktivitätsbestimmung bei -70°C gelagert. Das Säulenmaterial wird nach beendeter Chromatographie mit 1 M NaCl-Lösung gespült und unter Natriumazid aufbewahrt (Gastpar, 1997).

KMPT-Puffer (pH 7,2)                      1 %    Triton X-100 in KMP-Puffer

Säulenpuffer (pH 7,2)                    40 mM    HEPES · NaOH  
     500 mM    NaCl  
     1 mM     PMSF  
     10 %     Glycerol  
     0,05 %   Triton X-100

Dithiothreitol (DTT)-Lösung    10 mM    DTT

NaCl-Lösung                                1 mM    NaCl



### 6.8.3 Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Substrat

100 µl einer poly (Glu, Tyr) 4:1-Lösung wird in 96-Lochplatten mit hoher Proteinbindungskapazität gefüllt und über Nacht bei 35°C einwirken gelassen. Anschließend werden die Mikrotiterplatten entleert und dreimal mit je 200 µl Waschlösung gewaschen und dann bei 35°C getrocknet (Gastpar, 1997).

Poly (Glu, Tyr) 4:1-Lösung    0,1 mg    Poly (Glu, Tyr) 4:1 in 1 ml PBS

Waschlösung                            0,1 %    Tween 20 in PBS

### 6.8.4 Phosphorylierungsreaktion der EGF-Rezeptor-assoziierten Proteinkinase

10 µl einer zu testenden Lösung (10 %) DMSO werden in die vorbereitete Mikrotiterplatte einpipettiert. Diese Lösung läßt man 10 Minuten auf 40 µl EGF-Rezeptorlösung einwirken. Anschließend wird die Kinasereaktion, durch Zugabe von auf 37°C vortemperierten 50 µl Assaypuffer, gestartet. Nach 30 Minuten bei 37°C wird die Kinasereaktion durch Entfernen des Assaypuffers beendet. Die Platte wird dreimal mit je 200 µl Waschlösung gewaschen. In jedes Loch werden 75 µl Anti-Phosphotyrosin-POD-Lösung pipettiert und 60 Minuten bei 35°C einwirken gelassen. Nach Entleeren der Antikörperlösung werden die Löcher dreimal mit je 200 µl Waschlösung gewaschen. Die Peroxidasereaktion wird durch Zugabe von 100 µl ABTS pro Loch gestartet und dauert zwischen 15 und 60 Minuten. Bei 405 nm wird die entstehende Grünfärbung im ELISA-Reader vermessen (Gastpar, 1997).

Die 96-Lochplatte ist folgendermaßen aufgeteilt:

	B	N	P	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
	B	N	P	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
	B	N	P	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
	B	N	P	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
	B	N	P	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
	B	N	P	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	

B: Blindwert, 1 % DMSO

N: Normalreaktion, 1 % DMSO

P: Positivkontrolle, 10 µM Tyrphostin AG 1478 (gelöst in DMSO) im Ansatz

T1-T7: Testsubstanzen

### Auswertung:

Die Hemmwirkung der untersuchten Substanz berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$T / C [\%] = ((T - C_N) / (C_B - C_N)) \times 100 \%$$

C : Optische Dichte der Kontrolle

T: Optische Dichte der Testverbindung

C<sub>B</sub>: Optische Dichte des Blindwertes

C<sub>N</sub>: Optische Dichte der Normalreaktion

Bei jedem Versuch werden pro Konzentration sechs Löcher vermessen. Die Mittelwerte der Versuche werden gemittelt und über lineare Regression wird der IC<sub>50</sub>-Wert bestimmt.

---

Waschpuffer	0,1 %	Tween 20 mit PBS
ABTS-Lösung	50 mg	ABTS (Tablette) in 50 ml ABTS-Puffer lösen
EGF-Rezeptorlösung		mit PBS und 0,1 % BSA verdünnen
Assaypuffer (pH 7,2)	50 mM	HEPES · NaOH
	10 mM	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O
	2 mM	MnCl <sub>2</sub>
	200 μM	ATP
Antikörperlösung	0,6 U	Anti-Phosphotyrosin-POD in 1 ml 1 % BSA in PBS

## 6.9 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Reportergen-Assay

### 6.9.1 Amplifikation von Plasmiden

#### 6.9.1.1 Anlegen einer Übernachtskultur

Einige Mikroliter eines Glycerolstockes vom Bakterienstamm *E. coli* DH5α werden in ein steriles Reagenzglas mit Übernachtskulturdeckel, das 5 ml LB-Medium enthält, überführt. Diese Lösung wird über Nacht bei 37°C und ca. 160 U/min im Schüttelinkubator inkubiert (Sambrook et al., 1989; Bertram & Gassen, 1991).

LB-Medium	10 g	Tryptone
(Luria-Bertani-Medium)	5 g	Hefe
	10 g	NaCl
		pH 7,0 einstellen und mit H <sub>2</sub> O bidest. auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren

### **6.9.1.2 Kompetente E. coli DH5 $\alpha$ nach Calciumchlorid-Temperatur-schock-Methode**

Nach 10-16 Stunden werden 300  $\mu$ l der Übernachtskultur in 30 ml LB-Medium überführt und für ca. 2,5 Stunden im Schüttelinkubator bei 160 U/min und 37°C inkubiert. Danach wird die Bakteriensuspension bei 5000 U/min (Zentrifuge Beckmann) und 4°C 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 12,5 ml eisgekühlter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Diese Lösung wird 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend erneut bei 5000 U/min 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird erneut in 2,5 ml eisgekühlter CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Von diesen kompetenten E. coli DH5 $\alpha$  kann ein Glycerolstock angelegt werden und bis zur Transformation bei -20°C gelagert werden (Sambrook et al., 1989; Bertram & Gassen, 1991).

### **6.9.1.3 Transformation von E. coli DH5 $\alpha$ nach der Hitzeschock-Methode**

100  $\mu$ l von kompetenten E. coli DH5 $\alpha$  werden in einem sterilen Eppendorfgefäß mit 50 ng Plasmid versetzt, gemischt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wird die Suspension genau 90 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten und danach wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend werden 900  $\mu$ l LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben und für 45-60 Minuten im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension werden 100  $\mu$ l auf einer Petrischale ausplattiert, die 20  $\mu$ g/ml Ampicillin bzw. 50  $\mu$ g/ml Kanamycin (je nach Plasmid) enthält. Die Petrischalen werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Parallel hierzu wird eine Kontrolle angesetzt ohne Plasmidzugabe.

Die Plasmide pFR-Luc und pFC-MEK1 enthalten Ampicillinresistenzgene und die Plasmide pFA2-Elk1 und pFC2-dbd enthalten Kanamycinresistenzgene (Sambrook et al., 1989; Bertram & Gassen, 1991).

---

LB-Agar	15 g Agar 10 g Tryptone 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7,0 einstellen und mit H <sub>2</sub> O bidest. auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren, danach jeweils 20 ml in 10 cm Petrischale geben, auskühlen lassen und bei 4°C lagern
LB-Agar mit Ampicillin	Nach Abkühlen des LB-Agars Ampicillin 20 µg/ml zugeben.
Ampicillin-Stammlösung	20 mg/ml sterilfiltriert, bei -20°C gelagert
LB-Agar mit Kanamycin	Nach Abkühlen des LB-Agars Kanamycin 50 µg/ml zugeben
Kanamycin-Stammlösung	0,5 mg/ml H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert

#### 6.9.1.4 Amplifikation eines Plasmids in *E. coli* DH5α

Die bewachsenen Petrischalen werden bis zum Anlegen einer Übernachtskultur in den Kühlschrank gestellt. Zum Anlegen einer Übernachtskultur für eine Minipräparation werden 7 ml LB-Medium mit 10 µl Ampicillinlösung versetzt. Hierzu gibt man eine isolierte Kolonie in ein Reagenzglas mit Übernachtskulturdeckel. Den Inkubationsansatz stellt man über Nacht bei 37°C und 150 U/min in den Schüttelinkubator.

#### 6.9.1.5 Anlegen eines Glycerolstockes

Am nächsten Morgen wird von dieser Übernachtskultur 1 ml entnommen und mit 200 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C weggefroren.

### 6.9.1.6 Durchführung einer Plasmid-Minipräparation

Die Plasmid-Minipräparation wird mit einem NucleoSpin-Kit durchgeführt. 5 ml der Bakteriensuspension werden 1 Minute bei 14000 U/min (Tischzentrifuge Eppendorf) abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird vorsichtig mit Puffer A1 resuspendiert. Anschließend werden 250 µl von Puffer A2 zur Lyse zugegeben, gut gemischt und 5 Minuten stehen gelassen. 300 µl von Puffer A3 werden schließlich zugegeben, gut gemischt und 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wird für 12 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird anschließend auf eine NucleoSpin-Säule gegeben. Diese wird dann 1 Minute bei 14000 U/min zentrifugiert. Anschließend werden 7000 µl Puffer A4 auf die Säule gegeben und wieder 1 Minute bei 14000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wird erneut zentrifugiert um Restmengen an Ethanol zu entfernen. Anschließend wird die DNA mit 50 µl TE-Puffer von der Säule eluiert.

TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

### 6.9.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt durch Messung der Absorption der Proben bei 260 und 280 nm mittels eines UV-Spektrometers (Sambrook et al., 1989).

Die Konzentration ergibt sich aus:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml doppelsträngige DNA}$$

Die Reinheit ergibt sich aus:

$$\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

Bei einem Quotient von 1,8 ist die Aufarbeitung sauber.

### 6.9.1.8 Überprüfung der amplifizierten Plasmide durch Restriktionsverdau und anschließender elektrophoretischer Trennung im Agarosegel

Eine erfolgreiche Transformation bzw. Amplifikation ist durch Restriktionsverdau und anschließender Auftrennung der Fragmente bzw. der Plasmide im Agarosegel nachweisbar. Der Restriktionsverdau erfolgt nach folgendem Schema.

Tab. 6.2: Restriktionsverdau

	pFR-Luc	pFA-Elk1	pFA-Elk1	pFC2-dbd
Plasmidmenge	3,7 $\mu$ l (= 3 $\mu$ g)	1 $\mu$ l (= 1 $\mu$ g)	3 $\mu$ l (= 3 $\mu$ g)	3 $\mu$ l (= 3 $\mu$ g)
H <sub>2</sub> O	13,3 $\mu$ l	16 $\mu$ l	13 $\mu$ l	14 $\mu$ l
SuRE/Cut Puffer	2 $\mu$ l (H)	2 $\mu$ l (H)	2 $\mu$ l (B)	2 $\mu$ l (M)
Restriktionsenzym	1 $\mu$ l Eco RI	1 $\mu$ l Eco RI	1 $\mu$ l Eco RI 1 $\mu$ l Bam HI	1 $\mu$ l Pvu II

Der Restriktionsverdau erfolgt 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschließend werden 4  $\mu$ l Gelladungspuffer (6 x) hinzugegeben, gut gemischt und anschließend 20  $\mu$ l je Geltasche aufgetragen.

Restriktionsenzyme:

- Restriktionsendonuclease Bam HI Boehringer Mannheim, 1000 U
- Restriktionsendonuclease Eco RI Boehringer Mannheim 5000 U
- Restriktionsendonuclease Pvu II Boehringer Mannheim

Gelladungspuffer (6 x)

- 0,25 % Bromphenolblau
- 40 % Glukose in Wasser (w/v)

---

SuRE/Cut Puffer (10 x)	(B)	100 mM	Tris/HCl, pH 8,0
		50 mM	Magnesiumchlorid
Boehringer Mannheim		1 M	NaCl
		10 mM	2-Mercaptoethanol
	(H)	500 mM	Tris/HCl, pH 7,5
		100 mM	MgCl <sub>2</sub>
		1 M	NaCl
		10 mM	Dithioerythritol
	(M)	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
		100 mM	MgCl <sub>2</sub>
		500 mM	NaCl
		10 mM	Dithioerythritol

#### Agarosegel (1-1,3 %)

1,3 g Agarose werden in 100 ml TAE (1 x) erhitzt, nach Abkühlen auf ca. 60°C fügt man 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung hinzu. Danach wird das Gel in die Gelkammer gegossen. Vorbereitete Proben und Marker werden mit 4 µl Ladepuffer versetzt. Davon werden 20 µl in die Ladungstaschen des auspolymerisierten Gels pipettiert. Die Auftrennung erfolgt zuerst für 5-10 Minuten bei 40 V, anschließend wird die Spannung auf 70 V erhöht. Nach Auftrennung der DNA erfolgt die Detektion im UV-Licht.

Ethidiumbromidstammlösung                      10 mg/ml

TAE-Puffer (50 x)                      242 g    Tris Base  
   57,1 ml    Eisessig  
   100 ml    0,5 M EDTA, pH 8,0  
   ~ pH 8,5 einstellen , mit Wasser auf 1 Liter auffüllen

Marker    1 Kb DNA ladder (GIBCOBRL Life Technologies)



### 6.9.1.9 Plasmidmaxipräparation

Die Isolierung der Plasmide aus transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgt mittels QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Hierbei werden durch alkalische Lyse und Aufreinigung unter Verwendung von Anionenaustauscher-Harz (QIAGEN-Säule) bis zu 500  $\mu\text{g}$ /Säule Plasmide gewonnen.

250 ml LB-Medium werden mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin oder 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin, je nach Plasmid, versetzt. Zu diesem Selektivmedium werden 200  $\mu\text{l}$  der transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  hinzugegeben und für 12-16 Stunden bei 37°C und 160 U/min im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 12-15 Stunden werden die Bakterien durch Zentrifugation (15 Minuten, 6000 U/min, 4°C) (Zentrifuge Beckmann) in einem sterilen Zentrifugengefäß geerntet. Das erhaltene Pellet wird in 10 ml von Puffer P1 resuspendiert. Anschließend werden 10 ml von Puffer P2 hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach fügt man 10 ml Puffer P3 hinzu und inkubiert 15-20 Minuten auf Eis. Anschließend zentrifugiert man bei 20000 x g für 30 Minuten bei 4°C. Der Überstand, der Plasmid-DNA enthält, wird erneut bei 20000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Eine QIAGEN-Säule wird mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Der Überstand der letzten Zentrifugation wird auf diese Säule gegeben. Es wird zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die gebundene DNA wird mit 15 ml Puffer QF eluiert. Hierzu fügt man 10,5 ml Isopropanol, wodurch die DNA präzipitiert wird. Nach Mischen wird erneut bei 15000 x g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 5 ml 70 % igem Ethanol gewaschen und dann bei 15000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird 5-10 Minuten getrocknet und anschließend in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt bei -20°C. Der DNA-Gehalt wird mittels UV-Spektrometer bei 260 nm bestimmt. Die Überprüfung der amplifizierten Plasmide erfolgt durch Restriktionsverdau und anschließender Auftrennung im Agarosegel.

QIAGEN Anionenaustausch-Harz

Puffer P1	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
(Resuspensionspuffer)	10 mM	EDTA
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	RNase A

---

Puffer P2 (Lysepuffer)	200 mM 1 %	NaOH SDS
Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	3,0 M	Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer QBT (Equilibrierungspuffer)	750 mM 50 mM 15 % 0,15 %	NaCl 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS), pH 7,0 Isopropanol Triton X-100
Puffer QC (Waschpuffer)	1,0 M 50 mM 15 %	NaCl MOPS, pH 7,0 Isopropanol
Puffer QF (Elutionspuffer)	1,25 M 50 mM 15 %	NaCl Tris/HCl, pH 8,5 Isopropanol
Puffer QN (Elutionspuffer)	1,6 M 50 mM 15 %	NaCl MOPS, pH 7,0 Isopropanol

## 6.9.2 Prüfung unterschiedlicher Transfektionsmethoden

### 6.9.2.1 Elektroporation

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode zum Gentransfer. Biologische Membranen werden durch Einwirken kurzer elektrischer Impulse oberhalb der kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert, ohne ihre Struktur zu zerstören. Ein Stofftransport durch die Membranen kann während dieser erhöhten Durchlässigkeit erfolgen (Koch-Brandt, 1993).

A 431-, CHO- oder CV-1-Zellen werden in 10 % FKS haltigem Medium kultiviert. Die Zellen werden abtrypsinisiert, die Zellzahl wird bestimmt und anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen.  $4 \times 10^6$  Zellen werden in 500  $\mu$ l eiskaltes PBS aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette überführt. Hierzu fügt man entsprechende DNA-Mengen (siehe Tabelle 6.3). Nach 10 Minuten Kühlen auf Eis wird die Elektroporation durchgeführt. Anschließend werden die Zellen zur Regeneration für 10 Minuten auf Eis gestellt. Während dieser Zeit legt man 5 ml serumhaltiges Medium in kleinen Petrischalen vor. Man fügt 1 ml Medium in die Elektroporationsküvette und verteilt deren Inhalt auf diese vier kleine Petrischalen ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Platte) und stellt die Petrischalen bei 37°C in den Brutschrank. Nach 24 Stunden wird das Medium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgt nun die Inkubation mit 10  $\mu$ M Tyrphostin AG 1478 oder entsprechender DMSO-Konzentration. 30 Minuten nach Inkubationsbeginn wird mit 100 ng/ml EGF stimuliert.

Die Zellen werden nach der Elektroporation in 0,5 % FKS haltigem Medium ausgestreut. Zwei Tage später werden die Zellen mit 10  $\mu$ M Tyrphostin AG 1478 oder entsprechender DMSO-Konzentration serumfrei inkubiert. 30 Minuten danach wird mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Nach weiteren 4,5 Stunden wird der Inkubationsansatz abgestoppt. Die Petrischalen werden zweimal mit je 1 ml PBS gespült. Dann läßt man 250  $\mu$ l Lysepuffer 20 Minuten einwirken und schabt anschließend die Zellen ab. Ein Aliquot wird mit 180  $\mu$ l Luciferasesubstratlösung versetzt. Die Luciferaseaktivität wird im Luminometer vermessen.

Tab. 6.3: Eingesetzte Plasmidmenge pro kleine Petrischale

	pFR-Luc	pFA2-Elk1	Kontrollplasmid
Kontrolle	4 $\mu$ g	200 ng	
Positivkontrolle	4 $\mu$ g	200 ng	200 ng pFC-MEK1
Negativkontrolle	4 $\mu$ g		200 ng pFC2-dbd

Elektroporationsparameter

330 V

25 mA

1000  $\mu$ F

---

EGF-Lösung		100 µg EGF in 10 ml einer 10 mM AcOH-Lösung mit 0,1 % BSA lösen
Lysepuffer (Promega) (1 x)	25 mM 2 mM 2 mM 10 % 1 %	Tris-Phosphat, pH 7,8 DTT 1,2-Diaminocyclohexan, N,N,N',N'-tetraessigsäure Glycerin Triton X-100
Luciferase Assay Puffer (10 ml) (Promega) (Zusammensetzung des re- konstituierten Puffers)	20 mM 1,07 mM 2,67 mM 0,1 mM 33,3 mM 270 µM 470 µM 530 µM	Tricine, pH 7,8 (MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> •5H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> EDTA DTT Coenzym A Luciferin ATP
Luciferase Assay Substrat (Promega)	7 mg	

### 6.9.2.2 Polybrene-Dimethylsulfoxid-Methode

Die DNA-Adsorption an die Zelloberfläche wird durch Anwesenheit von Polybrene (siehe Abb. 6.1), einem Polykation mit einer relativen Molekülmasse von etwa 6000, erhöht und durch nachfolgende Behandlung der Zellen mit DMSO wird die Aufnahme von DNA in die Zellen erleichtert (Koch-Brandt, 1993).

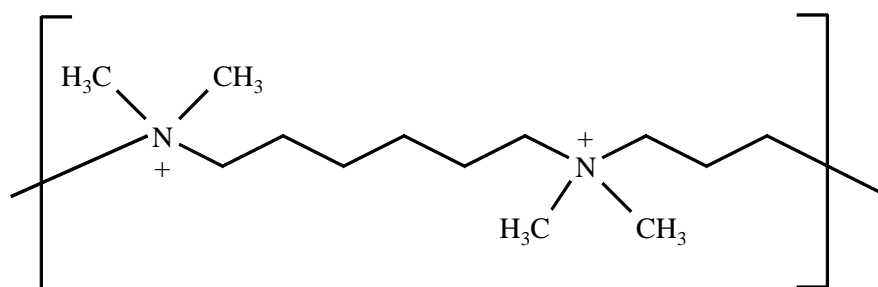


Abb. 6.1: Strukturformel von Polybrene (Hexadimethrin-bromid)

### Durchführung

Man streut  $1 \times 10^6$  Zellen A 431- oder CHO- Zellen in 10 % FKS haltigem Medium in kleine Petrischalen aus. Nach 24 Stunden werden die Zellen für 24 Stunden serumfrei gesetzt. Dann wird das alte Medium von den Platten abgesaugt und die Transfektionsreagenzmischung (siehe Tab. 6.4) wird zugegeben. Bei  $37^\circ\text{C}$  wird nun im Brutschrank inkubiert, wobei jeweils nach 1,5 Stunden vorsichtig geschüttelt wird. Nach 6 Stunden wird die Polybrene-DNA-Mischung entfernt. Man läßt genau vier Minuten eine 30 % ige DMSO-Lösung (serumfrei) einwirken. Der Ansatz wird zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und anschließend gibt man 0,5 % FKS haltiges Medium für 18 Stunden hinzu (modifiziert nach Chaney, 1986). Dann inkubiert man den Ansatz mit  $10 \mu\text{M}$  Tyrphostin AG 1478 oder entsprechender DMSO-Konzentration. Nach 30 Minuten stimuliert man mit  $100 \text{ ng/ml}$  EGF. Die Inkubation wird nach weiteren 4,5 Stunden abgestoppt. Die Petrischalen werden zweimal mit je 1 ml PBS gespült. Dann läßt man  $250 \mu\text{l}$  Lysepuffer 20 Minuten einwirken und schabt anschließend die Zellen ab. Ein Aliquot wird mit  $180 \mu\text{l}$  Luciferasesubstratlösung versetzt. Die Luciferaseaktivität wird im Luminometer vermessen.

Tab. 6.4: Transfektionsreagenzmischung pro kleine Petrischale

	pFR-Luc	pFA2-Elk1	Kontrollplasmid	Polybrene-Lösung	serumfreies Medium
Kontrolle	4 $\mu\text{g}$	200 ng		5 $\mu\text{l}$	5 ml
Positivkontrolle	4 $\mu\text{g}$	200 ng	200 ng pFC-MEK1	5 $\mu\text{l}$	5 ml
Negativkontrolle	4 $\mu\text{g}$		200 ng pFC2-dbd	5 $\mu\text{l}$	5 ml

Polybrene-Lösung	10 mg	Hexadimethrin-bromid/ml sterilem H <sub>2</sub> O bidest.
DMSO-Lösung	30 %	Dimethylsulfoxid in Medium/10 % FKS

### 6.9.2.3 Tfx<sup>TM</sup>-50

Tfx<sup>TM</sup>-50 (Promega) ist ein Transfektionsreagenz, das aus dem synthetischen, kationischen Lipid N,N,N',N'-Tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-dioleoyloxy-1,4-butandiammoniumiodide (0,4 mg) und L-Dioleoyl phosphatidylethanolamin (DOPE) (0,3 mg) und 1ml Nuclease-freiem Wasser besteht.

Man streut  $1 \times 10^6$  A 431- oder CHO-Zellen pro kleine Petrischale in 10 % FKS haltigem Medium aus. Nach 24 Stunden werden die Zellen für 24 Stunden serumfrei gesetzt. Anschließend wird die Transfektion durchgeführt, in dem DNA, serumfreies Medium und Tfx<sup>TM</sup>-50 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach Entfernen des Mediums fügt man die Transfektionsreagenzmischung (siehe Tab. 6.5) hinzu. Nach 1 Stunde wird serumhaltiges Medium zugesetzt und damit die Zellen über Nacht auf 0,5 % FKS gesetzt. Am nächsten Morgen werden die Zellen mit 10  $\mu$ M Tyrphostin AG 1478 oder entsprechender DMSO-Konzentration inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgt die Zugabe von 100 ng/ml EGF. Nach weiteren 4,5 Stunden wird die Inkubation abgestoppt. Die Petrischalen werden zweimal mit je 1 ml PBS gespült. Dann läßt man 250  $\mu$ l Lysepuffer 20 Minuten einwirken und schabt anschließend die Zellen ab. Ein Aliquot wird mit 180  $\mu$ l Luciferasesubstratlösung versetzt. Die Luciferaseaktivität wird im Luminometer vermessen.

Tab. 6.5: Transfektionsreagenzmischung pro kleine Petrischale

	pFR-Luc	pFA2-Elk1	Kontrollplasmid	Tfx <sup>TM</sup> -50	serumfreies Medium
Kontrolle	4 $\mu$ g	200 ng		24 $\mu$ l	2 ml
Positivkontrolle	4 $\mu$ g	200 ng	200 ng pFC-MEK1	24 $\mu$ l	2 ml
Negativkontrolle	4 $\mu$ g		200 ng pFC2-dbd	24 $\mu$ l	2 ml

### 6.9.2.4 FuGENE™6

Man streut  $1 \times 10^6$  A 431- oder CHO-Zellen pro kleine Petrischale in 10 % FKS haltigem Medium aus. Nach 24 Stunden werden die Zellen für 24 Stunden serumfrei gesetzt. Anschließend wird die Transfektion durchgeführt. Medium und FuGENE™6 (Boehringer Mannheim) werden in einem Reaktionsgefäß für 5 Minuten inkubiert. Dann wird diese Mischung zur vorbereiteten DNA-Lösung gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Transfektionsreagenzmischung (siehe Tab. 6.6) tropfenweise auf die Zellen verteilt. Nach der Transfektion werden die Zellen über Nacht auf 0,5 % FKS gesetzt. Am nächsten Morgen werden die Zellen mit 10  $\mu$ M Tyrphostin AG 1478 oder entsprechender DMSO-Konzentration inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgt die Zugabe von 100 ng/ml EGF. Nach weiteren 4,5 Stunden wird die Inkubation abgestoppt. Die Petrischalen werden zweimal mit je 1 ml PBS gespült. Dann läßt man 250  $\mu$ l Lysepuffer 20 Minuten einwirken und schabt anschließend die Zellen ab. Ein Aliquot wird mit 180  $\mu$ l Luciferasesubstratlösung versetzt. Die Luciferaseaktivität wird im Luminometer vermessen.

Tab. 6.6: Transfektionsreagenzmischung pro kleine Petrischale

	pFR-Luc	pFA2-Elk1	Kontrollplasmid	FuGENE™6	serumfreies Medium
Kontrolle	4 $\mu$ g	200 ng		12 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Positivkontrolle	4 $\mu$ g	200 ng	200 ng pFC- MEK1	12 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Negativkontrolle	4 $\mu$ g		200 ng pFC2-dbd	12 $\mu$ l	100 $\mu$ l

### 6.9.3 Durchführung des Reporteragen-Assays in 24-Lochplatten mit FuGENE™6

In 24-Lochplatten werden 30000 A 431-Zellen pro Loch in serumhaltigem (10 % FKS) Medium ausgestreut. Nach 18-24 Stunden wird das Medium entfernt und die Zellen mit serumfreiem Medium versetzt. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen transfiziert. Medium und FuGENE™6 werden in einem Reaktionsgefäß für 5 Minuten inkubiert. Dann

wird diese Mischung zur vorbereiteten DNA-Lösung gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Transfektionsreagenzmischung (siehe Tab. 6.7) tropfenweise auf die Zellen verteilt. Nach weiteren 24 Stunden beginnt die Inkubation mit Substanz oder entsprechender Lösungsmittelkonzentration. 30 Minuten nach Substanzzugabe wird mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Die Inkubation wird nach weiteren 4,5 Stunden beendet, indem das Medium abgesaugt und zweimal mit je 1 ml PBS gespült wird. Anschließend fügt man 250 µl Lysepuffer hinzu, den man 20 Minuten einwirken läßt. Der Überstand wird abpipettiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Messung gelagert. Ein Aliquot des Zelllysates wird mit 180 µl Luciferasereagenzlösung versetzt und die Luciferaseaktivität im Luminometer vermessen.

Tab. 6.7: Transfektionsreagenzmischung für 30000 Zellen

	pFR-Luc	pFA2-Elk1	Kontrollplasmid	FuGENE <sup>TM</sup> 6	serumfreies Medium
Kontrolle	150 ng	2,5 ng		0,46 µl	10 µl
Positivkontrolle	150 ng	2,5 ng	2,5 ng pFC-MEK1	0,46 µl	10 µl
Negativkontrolle	150 ng		2,5 ng pFC2-dbd	0,46 µl	10 µl

## 6.10 Phosphodiesterase (PDE) aus A 431-Zellen und pFR-Luc/ pFA2-Elk1 transfizierten A 431- Zellen

### Probenvorbereitung

A 431-Zellen werden mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/10 ml serumhaltigem Medium in Petrischalen ( $56,7 \text{ cm}^2$ ) ausgestreut. Nach 24 Stunden wird das Medium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen mittels nichtliposomalem Transfektionsreagenz FuGENE<sup>TM</sup>6 mit den Plasmiden pFA2-Elk1 und pFR-Luc transfiziert. Die transfizierten Zellen werden dann nach weiteren 24 Stunden mit 100 ng/ml EGF-Lösung stimuliert. Nach 4,5 Stunden wird die Stimulation beendet, indem man mit der PDE-Gewinnung beginnt. Zu diesem Zeitpunkt sollten die Zellen in den Schalen einen 70-90 % igen Monolayer aufweisen. Bevor die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Probenpuffer behandelt werden, wird ein Aliquot zur Überprüfung der Luciferaseaktivität und damit



der Transfektion entnommen. Parallel hierzu werden als Kontrolle A 431-Zellen ausgestreut, die bis auf die Transfektion gleich behandelt werden. Aus diesen Zellen wird ebenfalls PDE gewonnen.

### **PDE aus Tumorzellen**

Das Medium wird nach Inkubation entfernt und die Tumorzellen werden zweimal mit je 10 ml eisgekühltem PBS gespült. Anschließend werden die Tumorzellen zweimal mit je 200 µl Probenpuffer abgeschabt. Diese Zerkleinerung und alle folgende Schritte zur PDE-Gewinnung sind auf Eis durchzuführen, um Aktivitätsverluste der PDE zu verhindern. Die Homogenisation der Tumorzellen erfolgt anschließend in einem Handpotter.

#### **6.10.1 Zytoplasmische PDE**

Das Homogenat wird 30 Minuten bei 4°C und 100000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand entspricht der zytoplasmischen PDE.

#### **6.10.2 Partikelgebundene PDE**

Die partikelgebundene PDE muß aus der Membran solubilisiert werden. Hierzu wird das verbleibende Pellet der zytoplasmischen Aufarbeitung in 1000 µl Probenpuffer, der mit Triton X-100 (0,5 %) versetzt ist, resuspendiert und mittels Handpotter homogenisiert. Die Suspension wird anschließend bei 4°C und 100000 x g 30 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene Überstand entspricht der partikelgebundenen PDE.

---

Probenpuffer	30 mM	TRIS/pH 7,4 (HCl)
	0,1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
	10 mg	Trypsininhibitor
	1 µM	Pepstatin
	1 µM	Leupeptin
	0,5 mM	PMSF
	0,5 µM	2-Mercaptoethanol

### 6.10.3 Bestimmung der PDE-Aktivität

Die Messung der PDE-Aktivität erfolgt in Anlehnung an die Methode von Pöch. Der Substratumsatz wird pro Zeiteinheit und mg Protein angegeben (Pöch, 1971).

#### 6.10.3.1 cAMP-PDE Assay

Der Inkubationsansatz wird in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und besteht aus 50 µl Puffer, 50 µl "cAMP-Mix" und 50 µl Enzymlösung bzw. deren Verdünnung. Ein Leerwert, der aus 100 µl Puffer und 50 µl "cAMP-Mix" besteht, muß zur Berechnung des cAMP-Umsatzes mitgeführt werden. Leerwert und Probenansatz werden kurz mit dem Vortex geschüttelt und bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 250 µl ZnSO<sub>4</sub>-Lösung (0,226 M) gestoppt. Anschließend werden 250 µl Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung (0,226 M) hinzupipettiert, wobei ein BaSO<sub>4</sub>-Niederschlag entsteht, der vorhandenes [<sup>3</sup>H]-5'-AMP mitreißt und nicht umgesetztes [<sup>3</sup>H]-cAMP in der Lösung beläßt. Nach kurzem Mischen mittels Vortexer wird für 3 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. 450 µl des Überstandes werden mit 4,5 ml Beckmann-Szintillationscocktail versetzt und kurz gevortext. Anschließend wird im Szintillationszähler der Tritiumgehalt für 1 Minute gemessen. Der gemessene Tritiumgehalt ist proportional zur verbliebenen [<sup>3</sup>H]-cAMP-Konzentration in 450 µl Aliquot des Inkubationsansatzes. Bestimmt werden Impulse pro Minute (cpm). Aus der Differenz zwischen Leerwert und Probenwert errechnet sich die Umsatzrate im Testansatz (Pöch, 1971).

---

"cAMP-Mix"	30 mM	TRIS/pH 7,4 (HCl)
	9 mM	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O
	3 mM	AMP
	3 μM	cAMP
		werden in bidest. Wasser gelöst, in 5 ml Portionen bei -20°C gelagert, 10 μl [ <sup>3</sup> H]-cAMP pro 5 ml Aliquot werden kurz vor Testbeginn zugegeben.
ZnSO <sub>4</sub> -Lösung	0,266 mM	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O, in H <sub>2</sub> O bidest. herstellen.
Ba(OH) <sub>2</sub> -Lösung	0,266 mM	Ba(OH) <sub>2</sub> · 8 H <sub>2</sub> O, in H <sub>2</sub> O bidest. herstellen.

### 6.10.3.2 PDE-Hemmassay

Mit Hilfe des PDE-Hemmassays können ohne vorherige Isolierung und Aufreinigung einzelne PDE-Isoenzyme direkt aus dem Cytosol bestimmt werden. Ein spezifischer Modulator verändert den cAMP-Umsatz und läßt so eine quantitative Bestimmung der Isoenzyme zu (Tenor et al., 1992; Suttrop et al., 1993). Der Modulator Rolipram hemmt spezifisch die PDE4 (Wells et al., 1988). Von Rolipram wird eine Stammlösung in DMSO angesetzt. Der Gehalt an Isoenzym PDE4 errechnet sich aus den cAMP-Umsätzen nach Zusatz von Rolipram im Vergleich zu denen der Kontrolle, d.h. die Gesamtaktivität.

Tab. 6.8: Pipettierschema zur Bestimmung von PDE4 aus A 431-Zellen und pFR-Luc/pFA2-Elk1 transfizierten A 431-Zellen

Bestimmung von	Probe	Rolipram 10 µM im Ansatz	Puffer	cAMP-Mix
Leerwert	-	-	100 µl	50 µl
Gesamt-zytosolische PDE A 431	50 µl		50 µl	50 µl
Zytosolische PDE4 A 431	50 µl	50 µl		50 µl
Gesamt-partikuläre PDE A 431	50 µl		50 µl	50 µl
Partikuläre PDE4 A 431	50 µl	50 µl		50 µl
Gesamt-zytosolische PDE pFR-Luc/pFA2-Elk1-A 431	50 µl		50 µl	50 µl
Zytosolische PDE4 pFR-Luc/pFA2-Elk1-A 431	50 µl	50 µl		50 µl
Gesamt-partikuläre PDE pFR-Luc/pFA2-Elk1-A 431	50 µl		50 µl	50 µl
Partikuläre PDE4 pFR-Luc/pFA2-Elk1-A 431	50 µl	50 µl		50 µl

## 6.11 Western-Blotting

### 6.11.1 Probenvorbereitung

Die Probenaufbereitung für den Western-Blot erfolgt wie unter 6.8.1 und 6.8.2 beschrieben.

### 6.11.2 Proteinfällung

Zur Proteinkonzentrierung werden die Proben nach der Affinitätschromatographie, die PTK-Aktivität aufweisen, mit dem 3 fachen Volumenanteil an eiskaltem Aceton versetzt und über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dann werden die Proben 10 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert und der entsprechende Überstand vorsichtig abpipettiert. Bei Raumtemperatur läßt man die Acetonreste verdampfen. Das erhaltene Pellet wird mit SDS-Probenpuffer versetzt (25  $\mu\text{g}$  Protein in 10  $\mu\text{l}$  Probenpuffer), gut resuspendiert und 5 Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  gekocht. Nicht gelöste Bestandteile werden durch sehr kurzes Zentrifugieren abgetrennt.

SDS-Probenpuffer	50 ml	Tris 0,5 M
	40 ml	Glycerin
	5 %	Mercaptoethanol
	1,24 g	SDS
	0,16 g	Bromphenolblau
		pH 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen

### 6.11.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung der Proteine wird eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) in einem Vertikalsystem durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem 8 % igen SDS-Polyacrylamidgel. Die verwendete Geldicke beträgt 1 mm. Nach Auspolymerisieren der Gele werden die Proben in die Geltaschen einpipettiert und bei einer konstanten Spannung von 100 V im Kühlschrank aufgetrennt.

Trenngel (8 %)	7 ml	H <sub>2</sub> O
(für zwei Minigele)	3,7 ml	Tris (1,5 M)/HCl, pH 8,8
	4 ml	Acrylamid (30 %)
	147,6 $\mu\text{l}$	SDS (10 %)
	73,8 $\mu\text{l}$	APS (10 %)
	7,3 $\mu\text{l}$	TEMED

---

Sammelgel	2,4 ml	H <sub>2</sub> O
(für zwei Minigele)	1 ml	Tris (0,5 M)/HCl, pH 6,8
	0,5 ml	Acrylamid (30 %)
	40 µl	SDS (10 %)
	40 µl	APS (10 %)
	4 µl	TEMED
APS-Lösung	10 %	APS in H <sub>2</sub> O bidest.
SDS (10 %)	10 g	SDS auf 100 ml H <sub>2</sub> O bidest.
Elektrophorese-Laufpuffer	25 mM	Tris pH 8,3
	200 mM	Glycin
	0,1 %	SDS

#### 6.11.4 Proteintransfer und Detektion

Die Proteine, die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, werden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und fixiert. Dies erfolgt nach der Semi-Dry-Methode bei einer Stromstärke von 25 mA/Gel für 90 Minuten.

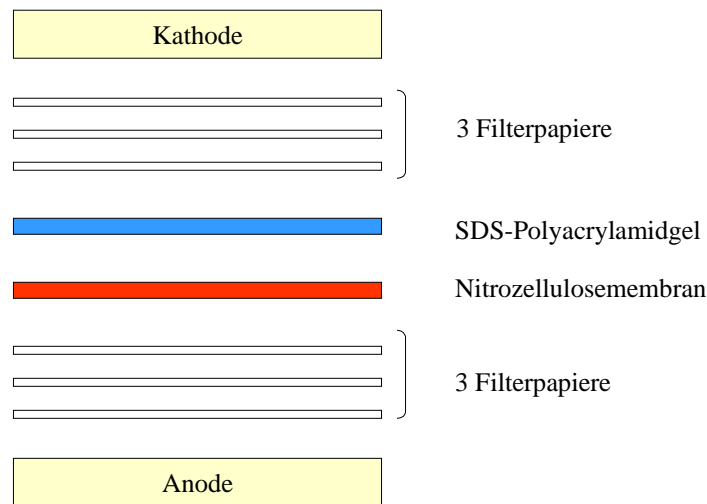


Abb. 6.2: Aufbau eines Semi-Dry-Blots

Transfer-Puffer	39 mM	Glycin
	48 mM	Tris
	0,037 %	SDS
	20 %	Methanol

### 6.11.5 Immunoblotting

Nach Beendigung des Proteintransfers auf die Nitrozellulosemembran, wird diese über Nacht bei 4°C in einer BSA/TBS-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wird die Membran 3 x 5 Minuten mit TBS-Tween-Lösung gewaschen. Dann erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-EGFR (1:2000 mit 1 % BSA/TBS-Lösung verdünnt) für 2 Stunden. Daraufhin folgen 3 Waschschrte zu je 5 Minuten mit TBS-Tween-Lösung. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-Maus-Ig-POD (1:200 mit 1 % BSA/TBS verdünnt). Nach 60 Minuten wird die Membran erneut 3 x 5 Minuten mit TBS-Tween-Lösung gewaschen. Zur Detektion legt man die Membran 1 Minute in Chemilumineszenz-Lösung. Anschließend wird die Membran auf einen Röntgenfilm zur Visualisierung der Signale exponiert.

---

TBS	2,42 g	Tris
	8 g	NaCl
		auf 1 l H <sub>2</sub> O auffüllen
BSA/TBS-Lösung	2 %	BSA in TBS-Lösung
TBS-Tween-Lösung	0,3 %	Tween 20 in TBS

## 6.12 HPLC-Trennverfahren

### 6.12.1 Probenvorbereitung

Man streut 15 große Petrischalen mit einer Zelldichte von  $8,7 \times 10^6$  A 431-Zellen aus. Nach 24 Stunden inkubiert man mit 100  $\mu$ M Baicalein, 100  $\mu$ M Baicalin bzw. als Kontrolle 0,2 % DMSO im Ansatz. Nach weiteren 24 Stunden spült man 3 x mit 5 ml PBS, läßt anschließend Trypsin genau 2 Minuten einwirken und inkubiert nach Entfernen des Trypsins im Brutschrank nach. Die Zellen einer großen Petrischale werden in 2 ml Medium resuspendiert. Anschließend in flüssigem Stickstoff gecrackt. Zur Proteinfällung fügt man 8 ml eiskaltes Methanol hinzu und bewahrt das Ganze für 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Danach wird das ausgefallene Protein durch Zentrifugation bei 3500 rpm für 10 Minuten abgetrennt. Der Überstand aus fünf großen Petrischalen wird vereinigt und bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird in 1 ml Methanol resuspendiert und nochmals kurz abzentrifugiert. Der hierbei erhaltene Überstand wird schließlich zur HPLC eingesetzt.

### 6.12.2 Substanztrennung mittels HPLC

Das Fließmittelgemisch 0,4 % ige Ameisensäure/Methanol wird im Ultraschallbad entgast. In Vorversuchen wird jeweils die Fließmittelzusammensetzung von weniger polaren zu polarerer Gemischen variiert, um das geeignete Fließmittel zu erhalten.



Tab. 6.9: HPLC-Bedingungen und Retentionszeiten von Baicalein und Baicalin

 $\lambda$  Detektionswellenlänge $t_R$  Retentionszeit

Substanz	Eluent	Flow [ml/min]	$\lambda$ [nm]	$t_R$ [min]
Baicalin	45 % 0,4 % ige HCOOH 55 % Methanol	1	273	2,7
Baicalein	45 % 0,4 % ige HCOOH 55 % Methanol	1	273	7,35

## 7 Literaturverzeichnis

Abe K.-i., Inoue O., Yumioka E. (1990) Biliary excretion of metabolites of baicalin and baicalein in rats. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 208-211.

Agullo G., Gamet-Payraastre L., Manenti S., Viala C., Rémésy C., Chap H., Payraastre B. (1997) Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology* **52**, 1649-1657.

Ahmad N., Feyes D. K., Nieminen A.-L., Agarwal R., Mukhtar H. (1997) Green tea constituent epigallocatechine-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *Journal of National Cancer Institute* **89**, 1881-1886.

Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S.-i., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 5592-5595.

Alessi D. R., Saito Y., Campbell D. G., Cohen P., Sithanandam G., Rapp U., Ashworth A., Marshall C. J., Cowley S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74<sup>raf-1</sup>. *The EMBO Journal* **13**, 1610-1619.

Alessi D. R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D. T., Salti A. R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem* **270**, 27489-27494.

Aronheim A., Engelberg D., Li N., Al-Alawi N., Schlessinger J., Karin M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* **78**, 949-961.

Beavo J. A., Conti M., Heaslip R. J. (1994) Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Molecular Pharmacology* **46**, 399-405.

Belitz H.-D., Grosch W. (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag, Heidelberg.

Ben-Bassat H., Rosenbaum-Mitrani S., Harzstark Z., Shlomai Z., Kleinberger-Doron N., Gazit A., Plowman G., Levitzki R., Tsvieli R., Levitzki A. (1997) Inhibitors of epidermal growth factor receptor kinase and of cyclin-dependent kinase 2 activation induce growth arrest, differentiation, and apoptosis of human papilloma virus 16-immortalized human keratinocytes. *Cancer Research* **57**, 3741-3750.

Bertram S., Gassen H. G. (1991) Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.

Böhm H., Boeing H., Hempel J., Raab B., Kroke A. (1998) Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z Ernährungswiss* **37**, 147-163.

Bottler C. (1998) Forschungspraktikum, Universität Kaiserslautern.

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**, 248-254.

Bridges A. J. (1996) The Epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases and cancer: Can an atypical exemplar be a sound therapeutic target?. *Current Medicinal Chemistry* **3**, 167-194.

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

- 
- Brunet A., Roux D., Lenormand P., Dowd S., Keyse S., Pouyssegur J. (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO Journal* **18**, 664-674.
- Buchdunger E., Trinks U., Mett H., Regenass U., Müller M., Meyer T., McGlynn E., Pinna L. A., Traxler P., Lydon N. B. (1994) 4,5-Dianilinophthalimide: A protein-tyrosine kinase inhibitor with selectivity for the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway and potent *in vivo* antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2334-2338.
- Canagarajah B. J., Khokhlatchev A., Cobb M. H., Goldsmith E. J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-869.
- Cao G., Prior R. L. (1999) Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clinical Chemistry* **45**, 574-576.
- Cavigelli M., Dolfi F., Claret F.-X., Karin M. (1995) Induction of *c-fos* expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *The EMBO Journal* **14**, 5957-5964.
- Chaney W. G., Howard D. R., Pollard J. W., Sallustio S., Stanley P. (1986) High-frequency transfection of CHO cells using polybrene. *Somatic Cell and Molecular Genetics* **12**, 237-244.
- Chang W.-S., Lee Y.-J., Lu F.-J., Chiang H.-C. (1993) Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research* **13**, 2165-2170.
- Chardin P., Cussac D., Maignan S., Ducruix A. (1995) The Grb2 adaptor. *FEBS Letters* **369**, 47-51.
- Chen Z. C., Schell J. B., Ho C.-T., Chen K. Y. (1998) Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Letters* **129**, 173-179.
- Cobb M. H., Xu S., Cheng M., Ebert D., Goldsmith E., Robinson M. (1996) Structural analysis of the MAP kinase ERK2 and studies of MAP kinase regulatory pathways. *Advances in Pharmacology* **36**, 49-65.

- Cohen G. B., Ren R., Baltimore D. (1995) Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**, 237-248.
- Costantino L., Rastelli G., Albasini A. (1995) Anthocyanidines as inhibitors of xanthine oxidase. *Pharmazie* **50**, 573-574.
- Davies D. E., Chamberlin S. G. (1996) Targeting the epidermal growth factor receptor for therapy of carcinomas. *Biochemical Pharmacology* **51**, 1101-1110.
- De Vincenzo R., Scambia G., Benedetti Panici P., Ranelletti F. O., Bonanno G., Ercoli A., Delle Monache F., Ferrari F., Piantelli M., Mancuso S. (1995) Effects of synthetic and naturally occurring chalcones on ovarian cancer cell growth: structure-activity relationships. *Anti-Cancer Drug Design* **10**, 481-490.
- Drees M. (1992) Dissertation, 3',5'-zyklisches Nucleotid Phosphodiesterase als Target der antineoplastischen Therapie. Universität Kaiserslautern.
- Earp H. S., Dawson T. L., Li X., Yu H. (1995) Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: A new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Research and Treatment* **35**, 115-132.
- Fiebig H. H., Berger D. P., Dengler W. A., Wallbrecher E., Winterhalter B. R. (1992) Combined in vitro/in vivo test procedure with human tumor xenografts. in: Fiebig H. H., Berger D. P. (Eds). *Immunodeficient Mice in Oncology*, Karger, Basel, Switzerland, Contributions to Oncology **42**, 321-351.
- Fiebig H. H., Dengler W. A., Roth T. (1999) Human Tumor Xenografts: Predictivity, Characterization and Discovery of New Anticancer Agents. in: Fiebig H. H., Burger A. M. (Eds). *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*, Karger, Basel, Switzerland, Contributions to Oncology **54**, 29-50.
- Fry D. W., Kraker A. J., McMichael A., Ambroso L. A., Nelson J. M., Leopold R. W., Connors R. W., Bridges A. J. (1994) A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* **265**, 1093-1095.

Fujiki H., Suganuma M., Okabe S., Sueoka N., Komori A., Sueoka E., Kozu T., Tada Y., Suga K., Imai K., Nakachi K. (1998) Cancer inhibition by green tea. *Mutation Research* **402**, 307-310.

Gabrielska J., Oszmianski J., Komorowska M., Langner M. (1999) Anthocyanin Extracts with Antioxidant and Radical Scavenging Effect. *Z. Naturforschung* **54c**, 319-324.

Gastpar R. (1997) Dissertation, Immunchemische Protein-Tyrosin-Kinase-Assays für die wirkmechanistischen Untersuchungen neuer 2-Phenylindol- und 2-Phenylbenzo[b]thiophen-derivate. Universität Regensburg.

Gawler D. J. (1998) Points of convergence between  $Ca^{2+}$  and Ras signalling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* **1448**, 171-182.

Geahlen R. L., Koonchanok N. M., McLaughlin J. L. (1989) Inhibition of Protein-Tyrosine Kinase Activity by Flavanoids and related compounds. *Journal of Natural Products* **52**, 982-986.

Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dasik H., Parks W. P. (1973) In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumor. *JNCI* **51**, 1417-1423.

Gill G. N., Santon J. B., Bertics P. J. (1987) Regulatory Features of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of cellular physiology supplement* **5**, 35-41.

Gille H., Kortenjann M., Thomae O., Moomaw C., Slaughter C., Cobb M. H., Shaw P. E. (1995) ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *The EMBO Journal* **14**, 951-962.

Groundwater P. W., Solomons K. R. H., Drewe J. A., Munawar M. A. (1996) Protein Tyrosine Kinase Inhibitors. *Progress in Medicinal Chemistry* **33**, 233-329.

Hartmann A. (1991) Luciferase als Reportergen der genetischen Regulation. *BioTech* **5**.

Hay (1994) American cell type culture collection (ATCC). Cell lines and hydridomas, 8. edition.

Heilmann J., Merfort I. (1998 a) Aktueller Kenntnisstand zu Metabolismus von Flavonoiden, I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. Pharmazie in unserer Zeit **27**, 58-65.

Heilmann J., Merfort I. (1998 b) Aktueller Kenntnisstand zu Metabolismus von Flavonoiden, II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavononen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. Pharmazie in unserer Zeit **27**, 173-183.

Heldin C.-H. (1995) Dimerization of Cell Surface Receptors in signal transduction. Cell **80**, 213-223.

Herrmann K. (1991) Vorkommen, Gehalte und Bedeutung von Inhaltsstoffen des Obstes und Gemüses, II. Flavonoide: Catechine, Proanthocyanidine, Anthocyanine. Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung **5-6**, 170-175.

Hibasami H., Komiya T., Achiwa Y., Ohnishi K., Kojima T., Nakanishi K., Akashi K., Hara Y. (1998) Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. Oncology Reports **5**, 527-529.

Holtzhauer M. (1988), Biochemische Arbeitsmethoden, Springer-Verlag.

Hsuan J. J., Panayotou G., Waterfield M. D. (1989) Structural basis for epidermal growth factor receptor function. Progress in Growth Factor Research **1**, 23-32.

Huang H.-C., Hsieh L.-M., Chen H.-W., Lin Y.-S., Chen J.-S. (1994) Effects of baicalein and esculetin on transduction signals and growth factors expression in T-lymphoid leukemia cells. European Journal of Pharmacology-Molecular Pharmacology Section **268**, 73-78.

Kamei H., Kojima T., Hasegawa M., Koide T., Umeda T., Yukawa T., Terabe K. (1995) Suppression of Tumor Cell Growth by Anthocyanins In Vitro. Cancer Investigation **13(6)**, 590-594.

---

Khazaie K., Schirmacher V., Lichtner R. B. (1993) EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer and Metastasis Review* **12**, 254-274.

Koch-Brandt C. (1993) *Gentransfer: Prinzipien, Experimente, Anwendung bei Säugern*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Kohler M., Janz I., Wintzer H. -O., Wagner E., Bauknecht T. (1989) The expression of EGF receptors, EGF-like factors and *c-myc* in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer Research* **9**, 1537-1548.

Krauss G. (1997) *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*, VCH-Verlag, Weinheim.

Kühnau J. (1976), *The Flavonoids. A Class of Semi-Essential Food Components: Their Role in Human Nutrition*. *Wld Rev. Nutr. Diet.* **23**, 117-191.

Kuntz S., Wenzel U., Daniel H. (1999) Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* **38**, 133-142.

Kunz C. (2000) Dissertation, in Vorbereitung. Universität Kaiserslautern.

Law N. M., Lydon N. B. (1996) The anticancer potential of tyrosine kinase inhibitors. *Emerging Drugs: The prospect for improved medicines, Annual executive briefing 1996, Chapter twelve*, Ashley Publications Ltd., 241-260.

Lemmon M. A., Schlessinger J. (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *TIBS* **19**, 459-463.

Levitzki A., Gazit A. (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* **267**, 1782-1788.



- 
- Li C., Homma M., Oka K. (1998) Characteristics of delayed excretion of flavonoids in human urine after administration of Sho-saiko-to, a herbal medicine. *Biol. Pharm. Bull* **21**, 1251-1257.
- Liang Y.-C., Lin-Shiau S.-Y., Chen C.-F., Lin J.-K. (1997) Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **67**, 55-65.
- Liang Y.-C., Chen Y.-C., Lin Y.-L., Lin-Shiau S.-Y., Ho C.-T., Lin J.-K. (1999) Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3,3'-digallate. *Carcinogenesis* **20**, 733-736.
- Lin P. H., Selinfreund R., Wakshull E., Wharton W. (1987) Rapid and efficient purification of plasma membrane from cultured cells: Characterization of epidermal growth factor binding. *Biochemistry* **26**, 731-736.
- Lindel T., Bauer J. (1987) *Zell- und Gewebekultur*. Stuttgart: Fischer-Verlag.
- Mansour S. J., Matten W. T., Hermann A. S., Candia J. M., Rong S., Fukasawa K., Woude G. F. V., Ahn N. G. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**, 966-970.
- Marais R., Wynne J., Treisman R. (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**, 381-393.
- Margolis B. L., Lax I., Kris R., Dombalagian M., Honegger A. M., Howk R., Givol D., Ullrich A., Schlessinger J. (1989) All Autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/*neu* are located in their carboxyl-terminal tails. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 10667-10671.
- Melnik S. Y., Bakhmedova A. A., Garaeva L. D., Goryunova O. V., Miniker T. D., Plikhtyak I. L., Ektova L. V., Yartseva I. V. (1996 a) Synthesis and antiproliferative properties of bis(indolyl)furan-2,5-dione and bis(indolyl)-1H-pyrrole-2,5-dione N-glycosides, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2** (6), 397-405.

Melnik S. Y., Bakhmedova A. A., Garaeva L. D., Miniker T. D., Plikhtyak I. L., Ektova L. V., Ivanova T. P., Adanin V. M., Yartseva I. V. (1996 b) Synthesis and antiproliferative properties of 3-(1H-3-indolyl)-4-(1-glycosyl-3-indolyl)-1H-pyrrole-2,5-diones. Russian Journal of Bioorganic Chemistry **22** (11), 726-731.

Merz K.-H., Marko D., Regiert T., Reiss G., Frank W., Eisenbrand G. (1998) Synthesis of 7-benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridine and novel derivatives free of positional isomers. Potent inhibitors of cAMP-specific phosphodiesterase and of malignant tumor cell growth. Journal of Medicinal Chemistry **46**, 4733-4743.

Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y.-H., Deinzer M. L., Barnes D. W., Buhler D. R. (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. Food and Chemical Toxicology **37**, 271-285.

Mizushima Y., Kashii T., Tokimitsu Y., Kobayashi M. (1995) Cytotoxic effect of herbal medicine Sho-saiko-to on human lung cancer cell lines *in vitro*. Oncology Reports **2**, 91-94.

Moyer J. D., Barbacci E. G., Iwata K. K., Arnold L., Boman B., Cunningham A., DiOrio C., Doty J., Morin M. J., Moyer M. P., Neveu M., Pollack V. A., Pustilnik L. R., Reynolds M. M., Sloan D., Theleman A., Miller P. (1997) Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Cancer Research **57**, 4838-4848.

Müller A. (2000) Dissertation, in Vorbereitung. Universität Kaiserslautern.

Myers M. R. (1998) United states patent 5.710.158.

Nakahata N., Kutsuwa M., Kyo R., Kubo M., Hayashi K., Ohizumi Y. (1998) Analysis of inhibitory effects of Scutellariae Radix and baicalein on prostaglandin E<sub>2</sub> production in rat C6 glioma cells. American Journal of Chinese Medicine **26**, 311-323.

---

Nakahata N., Kyo R., Kutsuwa M., Ohizumi Y. (1999) Inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade by baicalein, a flavonoid of natural origin. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **144**, 215-219.

Niederberger E. (1998) Dissertation, Mechanismusorientierte Untersuchungen zur antineoplastischen Wirkung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten. Universität Kaiserslautern.

Ogawara H., Akiyama T., Watanabe S.-i. (1989) Inhibition of tyrosine protein kinase activity by synthetic isoflavones and flavones. *The Journal of Antibiotics* **XLII** (2), 340-343.

Okabe S., Suganuma M., Hayashi M., Sueoka E., Komori A. (1997) Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9 by tea polyphenols. *Jpn. J. Cancer Res.* **88**, 639-643.

Okita K., Murakami T., Takahashi M. (1993) Anti-growth effects with components of Sho-saiko-to (TJ-9) on cultured human hepatoma cells. *European Journal of Cancer Prevention* **2**, 169-176.

Paschka A. G., Butler R., Young C. Y.- F. (1998) Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Letter* **130**, 1-7.

Pan T., Coleman J. E. (1990) The DNA binding domain of GAL4 form a binuclear metal ion complex. *Biochemistry* **29**, 3023-3029.

Pawson T. (1995) Getting down to specifics. *Nature* **373**, 477-478.

Piontek M., Hengels K.-J., Porschen R., Strohmeyer G. (1993) Antiproliferative effect of tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor-stimulated growth of human gastric cancer cells. *Anticancer Research* **13**, 2119-2124.

Pösch N. (1971) Assay of phosphodiesterase with radioactively labeled cyclic 3',5'-AMP as substrate. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **268**, 272-299.

---

Pool-Zobel B. L., Bub A., Schroder N., Rechkemmer G. (1999) Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur J Nutr* **38**, 227-34.

Price M. A., Rogers A. E., Treisman R. (1995) Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *The EMBO Journal* **14**, 2589-2601.

Prigent S. A., Lemoine N. R. (1992) The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progress in growth factor research* **4**, 1-24.

Sadowski I., Ptashne M. (1989) A vector for expression GAL(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **17**, 7539.

Sakamoto S., Mori T., Sawaki K., Kawachi Y., Kuwa K., Kudo H., Suzuki S., Sugiura Y., Kasahara N., Nagasawa H. (1993) Effects of Kampo (Japanese herbal) medicine "Sho-saiko-To" on DNA-synthesizing enzyme activity in 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic carcinomas in rats. *Planta Med* **59**, 152-154.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning A Laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition.

Scheffzek K., Ahmadian M. R., Kabsch W., Wiesmüller L., Lautwein A., Schmitz F., Wittinghofer A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338.

Schlessinger J. (1988) Signal transduction by allosteric receptor oligomerisation. *TIBS* **13**, 443-446.

Schraag B., Staal G. E., Adriaansen-Slot S. S., Salden M., Rijksen G. (1993) Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of protein tyrosine kinase activity. *Anal Biochem* **211**, 233-239.

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

---

Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R. (1990) New colorimetric assay for anticancer-drug screening. *JNCI* **82**, 1107-1112.

So F. V., Guthrie N., Chambers A. F., Carroll K. K. (1997) Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters* **112**, 127-133.

Songyang Z., Carraway III K. L., Eck M. J., Harrison S. C., Feldman R. A., Mohammadi M., Schlessinger J., Hubbard S. R., Smith D. P., Eng C., Lorenzo M. J., Ponder B. A. J., Mayer B. J., Cantley L. C. (1995) Catalytic specificity of proteintyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**, 536-539.

Spacey G. D., Uings I. J., Slater M., Hirst S., Bonser R. W. (1998) Indolocarbazoles. *Biochemical Pharmacology* **55**, 261-271.

Spada A. P., Myers M. R. (1995) Small molecule inhibitors of tyrosine kinase activity. *Exp. Opin. Ther. Patents* **5**, 805-817.

Suttrop N., Weber U., Welsch T., Schudt C. (1993) Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J. Clin. Invest.* **91** (4), 1421-1428.

Tenor H., Wendel A., Schudt C. (1992) Regulation of PDE IV iso-enzyme activity in HaCaT cells by cAMP increasing agents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **347**, R112.

Todderud G., Carpenter G. (1989) Epidermal growth factor: the receptor and its function. *BioFactors* **2**, 11-15.

Traxler P., Furet P., Mett H., Buchdunger E., Meyer T., Lydon N. (1997) Design and synthesis of novel tyrosine kinase inhibitors using a pharmacophore model of the ATP-binding site of the EGF-R. *J. Pharm. Belg.* **52**, 88-96.

---

Traxler P., Green J., Mett H., Séquin U., Furet P. (1999) Use of a Pharmacophore Model for the Design of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors: Isoflavones and 3-Phenyl-4(1*H*)-quinolones. *J. Med. Chem.* **42**, 1018-1026.

Treisman R. (1992) The serum response element. *TIBS* **17**, 423-426.

Tsuda T., Horio F., Osawa T. (1999) Absorption and metabolism of cyanidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside in rats. *FEBS Letters* **449**, 179-182.

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

Valcic S., Timmermann B. N., Alberts D. S., Wächter G. A., Krutzsch M., Wymer J., Guillén J. M. (1996) Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anti-Cancer drugs* **7**, 461-468.

Voet D., Voet J. G. (1992) *Biochemie*, VCH, Weinheim.

Vojtek A. B., Hollenberg S. M., Cooper J. A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**, 205-214.

Wagner B. (1998) Dissertation, cAMP-spezifische Phosphodiesterasen: Verhalten bei maligner Zelltransformation und Wirkmechanismus eines spezifischen Hemmstoffes. Universität Kaiserslautern.

Wang H., Cao G., Prior R. L. (1997) Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 304-309.

Webster N., Jin J. R., Green S., Hollis M., Chambon P. (1988) The yeast UAS<sub>G</sub> is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 *trans*-activator. *Cell* **52**, 169-178.

Wells J. N., Miller J. R. (1988) Methylxanthine inhibitors of phosphodiesterase. *Methods Enzymol.* **159**, 489-496.

---

Weyand U. (2000) Diplomarbeit, Zelluläre Wirkungen von Lebensmittelinhaltsstoffen am Beispiel ausgewählter Anthocyane und Maillard-Produkte. Universität Kaiserslautern.

Whitmarsh A. J., Shore P., Sharrocks A. D., Davis R. J. (1995) Integration of MAP Kinase signal transduction pathway at the serum response element. *Science* **269**, 403-407.

Wittinghofer A., Herrmann C. (1995) Ras-effector interactions, the problem of specificity. *FEBS Letters* **369**, 52-56.

Wittinghofer A., Schefzek K., Ahmadian M. R. (1997) The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Letters* **410**, 63-67.

Wittinghofer F. (1998) Caught in the act of the switch-on. *Nature* **394**, 317-320.

Yang E.-B., Zhang K., Cheng L. Y., Mack P. (1998) Butein, a Specific Protein Tyrosine Kinase Inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **245**, 435-438.

Yang G. Y., Liao J., Kim K., Yurkow E. J., Yang C. S. (1998) Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* **19**, 611-616.

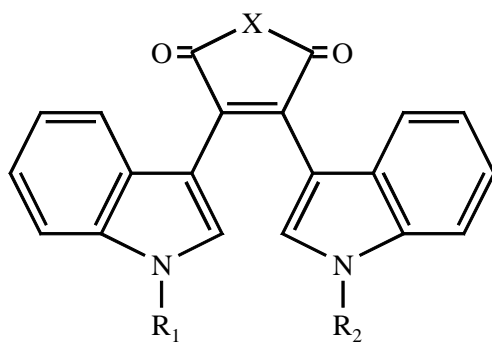
Yano H., Mizoguchi A., Fukuda K., Haramaki M., Ogasawara S., Momosaki S., Kojiro M. (1994) The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. *Cancer Research* **54**, 448-454.

Yarden Y., Ullrich A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 443-78.

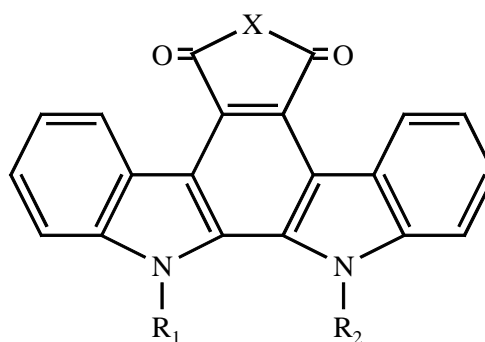
Yeaton R. W., Lipari M. T., Fox C. F. (1983) Calcium-mediated degradation of epidermal growth factor receptor in dislodged A431 cells and membrane preparations. *The Journal of Biological Chemistry* **258**, 9254-9261.

## 8 Anhang

## 8.1 Strukturformeln der Bisindolylmaleimide (1-3) und Indolocarbazole (4-13)



1-3

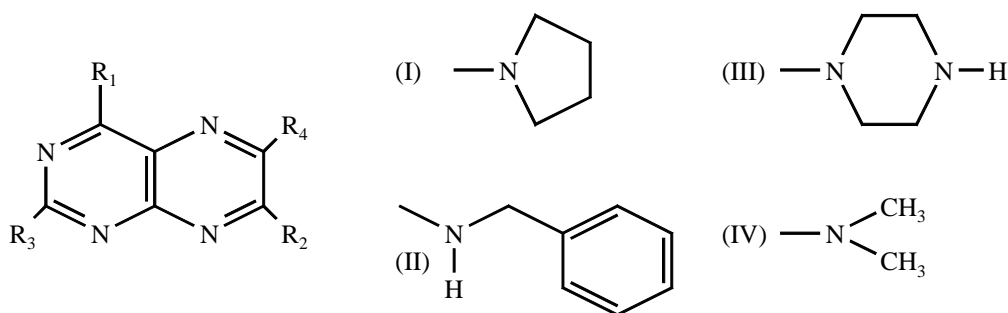


4-13

Substanz	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	O	$\alpha$ -L-Arabinose	CH <sub>3</sub>
2	NH	$\alpha$ -L-Arabinose	CH <sub>3</sub>
3	NH	$\beta$ -D-Xylose	H
4	NH	$\alpha$ -L-Arabinose	H
5	NH	$\beta$ -D-Xylose	CH <sub>3</sub>
6	NH	$\alpha$ -L-Arabinose	CH <sub>3</sub>
7	NH	$\beta$ -D-Xylose	H
8	NH	$\beta$ -D-Ribose	H
9	NH	$\beta$ -D-Galactose	CH <sub>3</sub>
10	NH	$\beta$ -D-Ribose	CH <sub>3</sub>
11	O	$\beta$ -D-Xylose	CH <sub>3</sub>
12	NH	$\beta$ -D-Galactose	H
13	NH		CH <sub>3</sub>



## 8.2 Strukturformeln der substituierten Pteridine

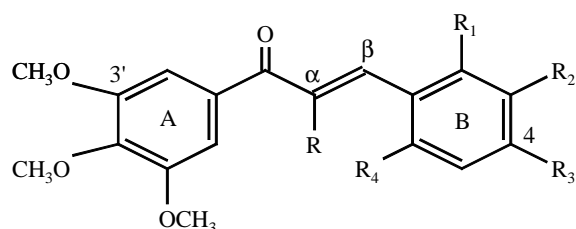


Substanz	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
7a/DC-TA-46	I	II	III	Cl
7b	II	I	III	Cl
7c	I	I	III	Cl
7d	I	IV	III	Cl
7e	IV	II	III	Cl
7f	IV	IV	III	Cl
7g	I	II	4-methylpiperazino	Cl
7h	I	II	morpholino	Cl
7i	I	II	4-acetylpiperazino	Cl
7j	I	II	3-oxopiperazino	Cl
7k	I	II	2-aminoethylamino	Cl
7l	I	II	2-hydroxyethylamino	Cl
7m	I	II	IV	Cl
7n	I	II	Cl	IV
7o	I	II	III	H
E272	I	II	4-glycylpiperazino (Hydrochlorid)	Cl
E273	I	II	4-lysylpiperazino (Hydrochlorid)	Cl
E274a	I	II	4-carboxymethylpiperazino (Na-Salz)	Cl
E274	I	II	4-carboxymethylpiperazino	Cl
E275a	I	II	4-(1-glutamyl)piperazino (Na-Salz)	Cl
E275	I	II	4-(1-glutamyl)piperazino	Cl
E276	I	II	III	CH <sub>3</sub>
E278	I	II	4-(2-hydroxyethyl)-piperazino	Cl
E279	I	II	4-(2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethyl)-piperazino	Cl
E280	I	II	4-carbamoylmethylpiperazino	Cl

## 8.3 Strukturformeln der Flavonoide

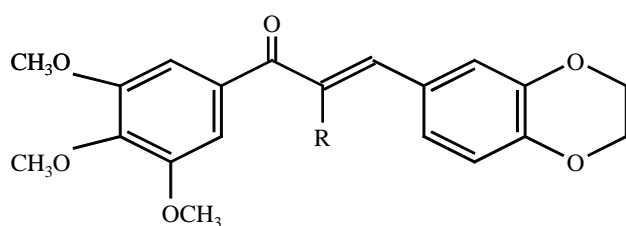
### 8.3.1 Strukturformeln der Chalcone

#### 8.3.1.1 Chalcone der Gruppe I



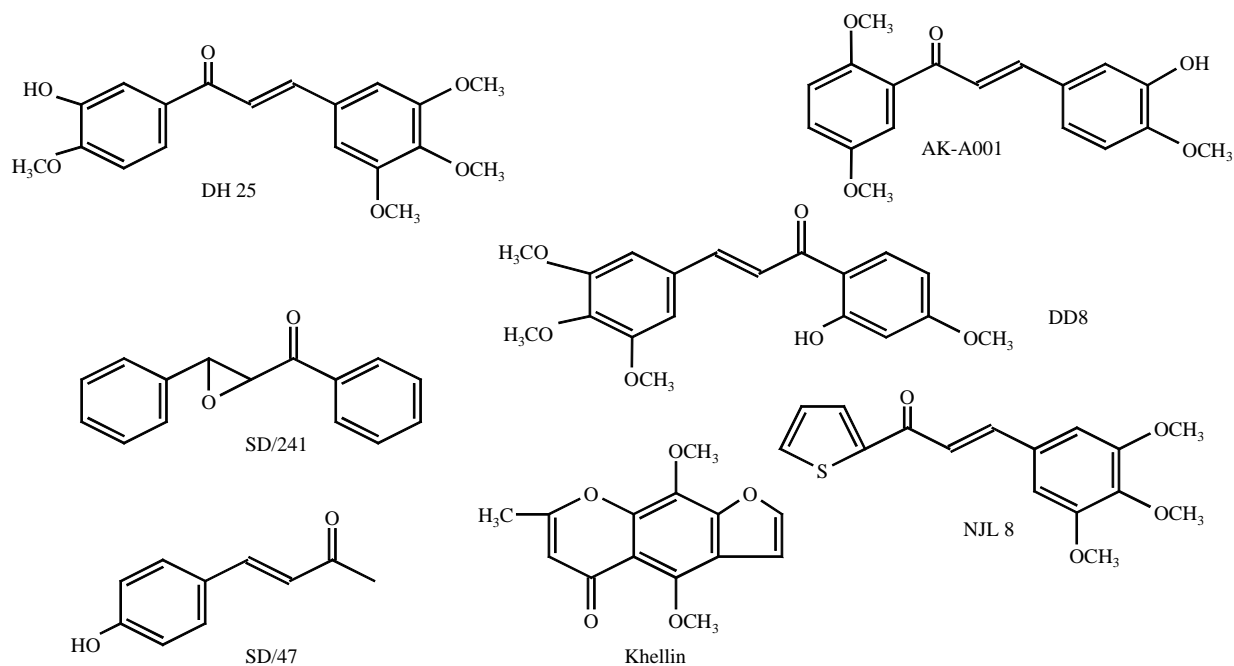
Substanz	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
SD 414	CH <sub>3</sub>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
DRA/005	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
RF 50	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
NL2/88	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
RF 24	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

#### 8.3.1.2 Chalcone der Gruppe II

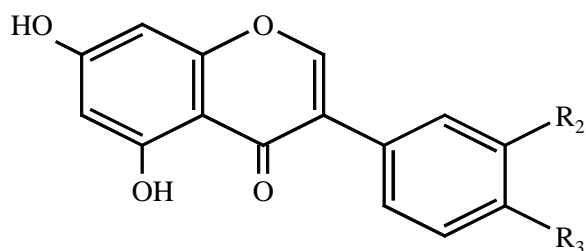


Substanz	R
SD/376	H
SD/388	CH <sub>3</sub>

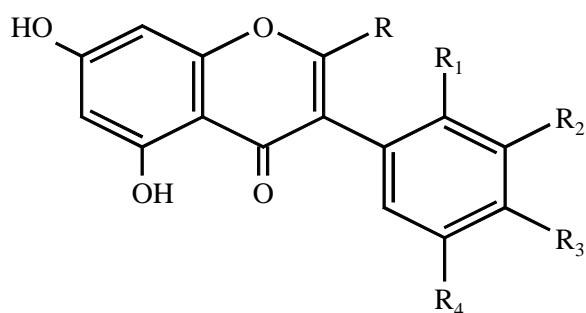
#### 8.3.1.3 Khellin und weitere Derivate mit Strukturhomologien zu Chalconen



## 8.3.2 Strukturformeln der Isoflavone

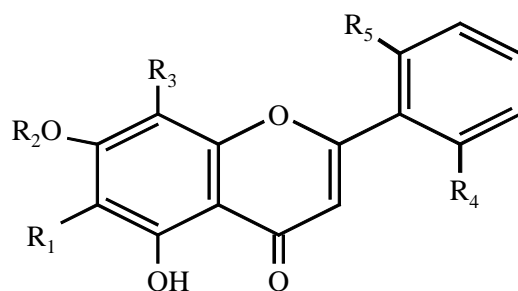


Substanz	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Genistein	H	OH
Biochanin A	H	OCH <sub>3</sub>
3'-Chlor-5,7-dihydroxyisoflavon	Cl	H



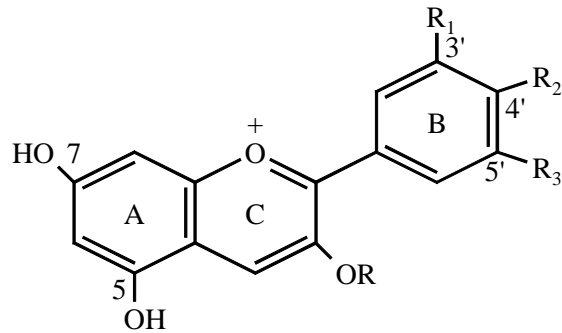
Substanz	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
92-238	H	H	OH	H	H
92-125	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
92-121	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
92-129	H	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
92-63	COOEt	OCH <sub>3</sub>	H	H	H
92-64	COOEt	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
92-114	COOEt	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

### 8.3.3 Strukturformeln der Flavone aus *Scutellaria baicalensis*



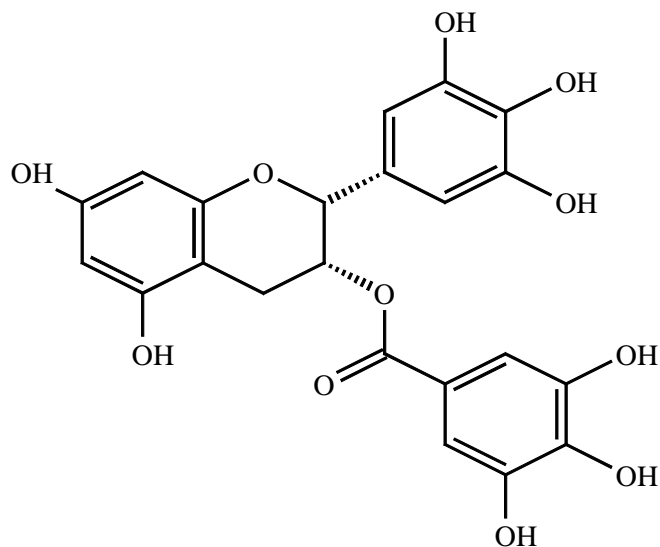
Flavon	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Baicalein	OH	H	H	H	H
Baicalin	OH	Glucuronsäure	H	H	H
Wogonin	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
Wogonosid	H	Glucuronsäure	OCH <sub>3</sub>	H	H
Skullcapflavon II	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH

### 8.3.4 Strukturformeln der Anthocyanidine



Anthocyanidin/ Anthocyanin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R
Cyanidin	OH	OH	H	H
Delphinidin	OH	OH	OH	H
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Oenin (Malvidin-3-glucosid)	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Glucose
Idaein (Cyanidin-3-galactosid)	OH	OH	H	Galactose

#### (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)



---

## Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

### Abstracts-Poster

Meiers S., Marko D., The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth factor receptor. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Francisco, 1.-5.4.2000

Eisenbrand G., Meiers S., Niederberger E., Tang W.C., Marko D., Genzlinger A., Zankl H., Profile of biological activities of flavones from *Scutellaria baicalensis*. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Philadelphia, 10.-14.4.1999

Niederberger E., Meiers S., Genzlinger A., Zankl H., Tang W.C., Eisenbrand G., Marko D., Flavones and inhibition of tumor cell growth: new aspects on the mechanism of action. DFG-Symposium of the Senate Commission on the Evaluation of Food Safety (SKLM), Carcinogenic/Anticarcinogenic Factors in Food: Novel Concepts?, Kaiserslautern, 4.-7. Oktober 1998

### Publikation

Meiers S., Kemény M., Weyand U., Gastpar R., v. Angerer E., Marko D., The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth factor receptor. Journal of Agricultural and Food Chemistry, in Druck.

## Dank

Mein Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Arbeitskreises Eisenbrand, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Doris Marko danke ich für ihre gute Zusammenarbeit und Unterstützung während der Promotionszeit. Sowie für die stetige Diskussionsbereitschaft und kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Daniela danke ich für die aufmunternden Worte und kritische Durchsicht des Manuskriptes. Frank danke ich für die Hilfe und Problemlösungen bei Computerfragen. Beiden möchte ich jedoch vor allem für die Freundschaft und vielen schönen Stunden der gemeinsamen, vergangenen Jahre in Kaiserslautern danken.

Meinen Laborkollegen Dr. Gudrun Palke, Monika Kemény und Elke Litminansky danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Den Forschungspraktikanten Marina Schüle und Thomas Hecht danke ich für ihre engagierte und zuverlässige Mitarbeit im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlußarbeit bzw. Schwerpunktpraktikums.

Ingrid Hemm und Ingrid Romani danke ich für organisatorische Arbeiten und Unterstützung in Verwaltungsangelegenheiten.

Dr. Robert Gastpar, Arbeitskreis von Angerer Universität Regensburg, danke ich für die Hilfe und Tips bei der Etablierung des PTK-ELISAs.

Kathrin Kirstner und Anja Genzlinger danke ich für die Unterstützung bei den Durchflußcytometrie-Messungen.

Klaus danke ich für Alles.