
**Wirkmechanistische Untersuchungen zur
Beeinflussung zellulärer Signalübertragungswege
durch substituierte Pteridine**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades 'Doktor der Naturwissenschaften'

genehmigte Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Diplom Chemikerin

Monika Kemény

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

Kaiserslautern 2002

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 12. Juni 2002

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Hans-Georg Kuball (Emeritus)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. med Dieter Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 1999 und Oktober 2001 im Fachbereich
Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität
Kaiserslautern.

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

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

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kuball danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für meine Eltern
und Gunther

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Signaltransduktion.....	3
2.1.1	Der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B-Signalweg.....	4
2.1.1.1	Die Phosphatidylinositol 3-Kinase.....	5
2.1.1.2	Die Protein Kinase B.....	7
2.1.1.3	Die Glycogen Synthase Kinase 3.....	9
2.1.1.4	Das pro-apoptotisch wirkende BAD.....	12
2.1.1.5	Caspase-9, FKHR, CREB und NFkB	14
2.1.2	Die mitogen-aktivierte Protein Kinase-Kaskade	17
2.1.2.1	Das mitogen-aktivierte Modul.....	19
2.1.2.2	Das stress-aktivierte Modul.....	20
2.1.3	Der cAMP-Signalweg.....	22
2.1.3.1	Die Proteinkinase A	23
2.1.3.2	3',5'-zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen	24
2.1.4	Integrin-abhängige Signaltransduktion.....	25
2.1.4.1	Integrin-vermittelte Proliferationsregulation.....	25
2.1.4.2	Integrin-vermittelte Zytoskelettorganisation.....	27
2.1.4.3	Die fokale Adhäsionskinase FAK.....	28
2.1.4.4	Das Adapterprotein Paxillin	29
2.2	Der Zellzyklus.....	32
2.2.1	Die regulatorischen Mitspieler des Zellzyklus	33
2.2.2	Regulation des Zellzyklus	35
2.2.3	CDK Inhibitoren.....	38

2.2.4	Das Retinoblastoma-Protein (pRb)	40
2.2.4.1	Struktur des pRb	40
2.2.4.2	Zellzyklusabhängige Regulation und Wirkung des pRB	41
2.3	Apoptose	44
2.3.1	Die Caspasen als Vermittler der Apoptose	45
2.3.2	Apoptoseinduktion durch cAMP-erhöhende Substanzen	47
2.3.3	Apoptoseinduktion durch Pteridine	48
3	Problemstellung und Zielsetzung	50
4	Ergebnisse und Diskussion	52
4.1	Wirkung ausgewählter Pteridin-Derivate auf den Signalweg der mitogen-aktivierten Protein Kinase	52
4.1.1	Untersuchung zur Hemmbarkeit der Protein Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors aus A431 Zellen anhand eines Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISA)	52
4.1.1.1	Das Tyrosinkinase-hemmende Potential der in Position 6 substituierten E481 Derivate E276, E281 und E286	53
4.1.2	Untersuchung zur Hemmbarkeit der ELK1 Phosphorylierung anhand eines Luciferase-Reportergen-Assays	55
4.1.2.1	Die Hemmung der ELK1 Phosphorylierung durch E281, E286 und E586 .	57
4.1.3	Diskussion der Ergebnisse der Tyrosinkinase-Hemmung und der ELK1-Phosphorylierung	59
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Tyrosinkinase-Hemmung und der ELK1-Phosphorylierung	62
4.2	Wirkung ausgewählter Pteridin-Derivate auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase	63
4.2.1	Untersuchung zur Hemmbarkeit der Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität in MCF-7 Zellen im Vergleich mit A431 Zellen	63

4.2.1.1	Einfluss von Wortmannin und Ly294002 auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität.....	65
4.2.1.2	Einfluss von E481 auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität in MCF-7 und A431 Zellen	66
4.2.1.3	Einfluss von E584 und E495 auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität in MCF-7 und A431 Zellen.....	67
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse zur Beeinflussung der Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität.....	69
4.3	Die Wirkung von E481 auf das Actingerüst.....	72
4.3.1	Morphologische Untersuchungen des Actinskeletts	73
4.3.2	Diskussion der morphologischen Untersuchungen.....	75
4.4	Die Wirkung von E481 auf den Phosphatidylinositol 3-Kinase- / Protein Kinase B-Signalweg.....	77
4.4.1	Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von PKB, GSK3b und BAD.....	78
4.4.1.1	Untersuchung der Phosphorylierung der PKB an Ser473 und Thr308	79
4.4.1.1.1	Einfluss von E481 und Wortmannin auf die Bandenintensität der PKB	79
4.4.1.1.2	Einfluss von E481 und Wortmannin auf die Bandenintensität der Phospho-Ser473-PKB	80
4.4.1.1.3	Einfluss von E481 und Wortmannin auf die Bandenintensität der Phospho-Thr308-PKB.....	81
4.4.1.2	Diskussion der Auswirkungen von E481, Wortmannin und EGF auf die Phosphorylierung der PKB	83
4.4.1.3	Untersuchung der Ser9-Phosphorylierung der GSK3b.....	85
4.4.1.3.1	Einfluss von E481 auf die Phosphorylierung der GSK3b an Ser9 bei einer Kurzzeitinkubation über 30 Minuten.....	85
4.4.1.3.2	Einfluss von E481 auf die Phosphorylierung der GSK3b an Ser9 bei einer Langzeitinkubation über 6, 18 und 24 Stunden.....	87
4.4.1.4	Diskussion der Auswirkungen von E481, Wortmannin und EGF auf die Phosphorylierung der GSK3b	88
4.4.1.5	Untersuchung der Ser112-Phosphorylierung des pro-apoptischen BAD..	91

4.4.1.5.1	Einfluss von E481 auf die Phosphorylierung des pro-apoptischen BAD an Ser112 bei einer Kurzzeitinkubation.....	91
4.4.1.5.2	Einfluss von E481 auf die Phosphorylierung von BAD an Ser112 nach Langzeitinkubation über 6, 18 und 24 Stunden.....	93
4.4.1.6	Diskussion der Auswirkungen von E481, Wortmannin und EGF auf die Phosphorylierung von BAD an Ser112	95
4.4.2	Zusammenfassung der Ergebnisse aus 4.4.1.....	97
4.5	Die Wirkung von E481 auf die Phosphorylierung des pRb.....	98
4.5.1	Untersuchung der pRb- Phosphorylierung.....	99
4.5.1.1	Einfluss von E481 und Ly294002 auf das pRb	99
4.5.2	Diskussion der Ergebnisse zur pRb-Phosphorylierung.....	102
4.6	Die Wirkung von E481 auf Paxillin	104
4.6.1	Morphologische Untersuchungen der Paxillinverteilung.....	105
4.6.2	Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von Paxillin.....	111
4.6.2.1	Einfluss von E481 auf die Tyrosin-Phosphorylierung von Paxillin	112
4.6.3	Diskussion der Paxillin-Untersuchungen.....	114
5	Zusammenfassung.....	117
6	Beschreibung der Methoden	119
6.1	Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Untersuchungen	119
6.1.1	Kultivierung und Inkubation der Zellen.....	119
6.1.2	Gewinnung der Zellproteine.....	119
6.1.3	Immunopräzipitation der PI3K	120
6.1.4	Waschung des Immunopräzipitats.....	120
6.1.5	Durchführung des PI3K-Assays.....	121
6.1.6	Bestimmung der PI3K-Aktivität	121

6.1.7	Präparation der Kieselgel-Platte.....	122
6.2	Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford.....	122
6.3	Western Blotting.....	123
6.3.1	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-Page)	123
6.3.2	Proteintransfer und Detektion	124
6.4	Bestimmung der Phospho-Tyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors.....	125
6.4.1	Isolierung der EGF-Rezeptor-haltigen Membran aus A431 Zellen....	125
6.4.2	Aufreinigung des EGF-Rezeptors	126
6.4.3	Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Substrat	127
6.4.4	Testung der einzelnen EGF-Rezeptor-Fractionen auf ihre Phosphorylierungsaktivität	127
6.4.5	Aktivitätsuntersuchungen der EGF-Rezeptor-assoziierten Protein- Tyrosin-Kinase.....	128
6.5	Bestimmung der Aktivität der mitogen-aktivierten Protein Kinase	129
6.5.1	Amplifikation der Plasmide.....	129
6.5.1.1	Ansetzen einer Übernachtskultur von kompetenten E. coli DH5a.....	129
6.5.1.2	Transformation der kompetenten E. coli DH5a	130
6.5.1.3	Amplifikation eines Plasmids in E. coli DH5a	130
6.5.1.4	Anlegen eines Glycerolstocks transformierter E. coli DH5a.....	130
6.5.1.5	Ansetzen einer Übernachtskultur für Maxipräparation	130
6.5.1.6	Plasmidmaxipräparation.....	131
6.5.1.7	Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration.....	131
6.5.1.8	Überprüfung der amplifizierten Plasmide	131
6.5.2	MAPK-Aktivitätsbestimmung über einen Luciferase-Reporter- Assay in A431 Zellen.....	132
6.5.2.1	Durchführung des Reporter-Gen-Assays	132

6.6	Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus der Proteinkinase B, Glycogen Synthase Kinase 3b, sowie von BAD in A431 Zellen.....	133
6.6.1	Kultivierung und Inkubation der Zellen.....	134
6.6.2	Gewinnung der Zellproteine und Western-Blotting.....	134
6.7	Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des Retinoblastoma Tumorsuppressorproteins in A431 Zellen.....	135
6.7.1	Kultivierung und Inkubation der Zellen.....	135
6.7.2	Gewinnung der Zellproteine und Western-Blotting.....	136
6.8	Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des Gerüstproteins Paxillin in A431 Zellen.....	137
6.8.1	Kultivierung und Inkubation der Zellen.....	137
6.8.2	Gewinnung der Zellproteine.....	137
6.8.3	Immunopräzipitation von Paxillin und Phospho-Tyrosin-haltigen Proteinen aus A431 Zellen.....	138
6.8.4	Aufarbeiten der Matrix-Immunokomplexe und Western-Blotting	138
6.8.5	Entfernen der Antikörper von der Membran.....	139
6.9	Morphologische Untersuchungen	139
6.9.1	Kultivierung von Zellen auf Objektträgern.....	139
6.9.2	Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden	139
6.9.2.1	Methanolfixierung.....	140
6.9.2.2	Paraformaldehydfixierung.....	140
6.9.3	Färbungsmethoden	140
6.9.3.1	Durchführung einer Actin-Fluoreszenzfärbung.....	140
6.9.3.2	Durchführung einer Paxillin-Fluoreszenzfärbung	141
6.10	Zellkultur.....	141

6.10.1	Zelllinien.....	142
6.10.1.1	A431 Zelllinie.....	142
6.10.1.2	MCF-7 Zelllinie.....	142
6.10.2	Zellkultivierung	142
6.10.3	Mediumwechsel.....	142
6.10.4	Einfrieren und Lagern von Zellen.....	143
6.10.5	Auftauen von Zellen.....	143
6.10.6	Passagieren von Monolayerkulturen.....	143
6.10.7	Zellzahlbestimmung.....	143
6.10.8	Mycoplasmascreening.....	144
6.11	Alphabetische Auflistung der Zubereitungen	145
7	Geräte und Materialien.....	154
7.1	Verwendete Geräte.....	154
7.2	Reagenzien.....	155
7.3	Verbrauchsmaterialien	157
8	Anhang.....	158
8.1	Strukturformeln der untersuchten Pteridine.....	158
9	Literaturverzeichnis	159

Abkürzungsverzeichnis

A431	Humane epidermale Vulvakarzinomzelllinie
ABTS	2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)]
Ac	Acetylrest
AC	Adenylat-Zyklase
AKAP	Ankerprotein der Protein Kinase A (A-kinase anchoring protein)
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf-1	Apoptotischer Protease-aktivierender Faktor 1
APC	Anaphase Förderkomplex (anaphase-promoting complex)
APS	Ammoniumpersulfat
ATF2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAD	Pro-apoptotischer BCL-2/BCL-X _L -Antagonist (BCL-2/BCL-X _L -antagonist, causing cell death)
BCL	Onkogen der B-Zell Leukämie (B-cell leukemia oncogene)
B-CLL	B-cell chronic lymphocytic leukemia; Zelllinie
BCR	breakpoint cluster region
BH3-Domäne	BCR-homologe 3-Domäne
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CAK	CDK-aktivierende Kinase
CaMKK	Calcium / Calmodulin-abhängige Kinase Kinase
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Cas	Crk-assoziiertes Substrat
Caspase	Aspartat-spezifische Cystein Protease
CBP	CREB-bindendes Protein
CDC25	Dualspezifische Phosphatase (cell division cycle protein 25)
cdc42	G Protein (cell division cycle protein 42)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (Cyclin dependent kinase)
CHK	Checkpoint Kinase
Cip/Kip	mit CDK's wechselwirkendes Protein (CDK/kinase interacting protein)
CKI	Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (cyclin-dependent kinase inhibitor)
CPITC	Coumarinphenylisothiocyanat
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	cAMP-responsive-element binding protein
CREM	cAMP-responsive-element-modulator
Csk	Carboxy-terminale SRC-Kinase (Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dbd	DNA binding domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E276	7-Benzylamino-6-methyl-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin
E281	7-Benzylamino-6-methoxy-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin
E286	7-Benzylamino-6-ethoxy-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin
E481	7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin

E495	7-Benzylamino-6-chloro-2-morpholino-4-pyrrolidino-pteridin
E584	2-(2-Aminoethylamino)-7-benzylamino-6-chloro-4-pyrrolidino-pteridin
E586	7-Benzylamino-2-morpholino-4-pyrrolidino-pteridin
ECM	Extrazellulärmatrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraessigsäure
ELISA	Verfahren zum semi-quantitativen Nachweis eines Antigens über einen Enzym-konjugierten Antikörper (enzyme linked immuno sorbent assay)
ELK1	Ets ähnliche Kinase 1 (Ets like kinase 1)
ERK	Extrazellulärsignal regulierte Kinase
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FKHR	Forkhead in rhabdomyosarcoma
FKS	Fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor (GTP-exchange-factor)
GF	Wachstumsfaktor (growth factor)
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (G-protein coupled receptor)
Grb2	Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenes Protein 2 (growth factor receptor-bound protein 2)
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
H89	[N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid·2HCl]
IC₅₀	Konzentration einer Substanz, die eine 50 %ige Wirkung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bedingt
Ig	Immunoglobulin
ILK	Integrin linked kinase
INK4	Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 4
JNK/SAPK	Jun N-terminale Kinase/stress-aktivierte Protein Kinase
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3
LXFL529	Lung Xenograft Fiebig Large Cell 529
Ly294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MAPKAP-K	MAPK aktivierte Protein Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MCF-7	Humane Mammakarzinomzelllinie
MEK	MAPK/ERK Kinase (MAPKK)
MEKK	MEK Kinase (MAPKKK)
min	Minuten
Myt1	Dualspezifische Protein Kinase
n. t.	nicht getestet (not tested)
Nck	SH2 / SH3-Domäne enthaltendes Adapterprotein, bindet an Wachstumsfaktorrezeptoren und Integrine
NES	Kern Exportsignal (nuclear export signal)
NFkB	Kern Faktor kappa B (nuclear factor kappa B)
NLS	Kern Lokalisationssignal (nuclear localization signal)
p	Signifikanz

p53	Durch DNA-Schäden induziertes Tumorsuppressorprotein
PAK	p21-aktivierte Protein Kinase
PBS	Paxillin-Bindungssequenz
PC12	Phäochromozytom-Zelllinie
PCNA	Elongationsfaktor der DNA-Polymerase δ (proliferating cell nuclear antigen)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Blutplättchenwachstumsfaktor (platelet-derived growth factor)
PH-Domäne	Pleckstrin-homologe Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PIX	PAK-interagierender Guanine Nukleotid Austauschfaktor
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PKL	Paxillin Kinase Linker
PP2A	Serin/Threonin spezifische Proteinphosphatase 2A
pRb	Retinoblastoma-Protein, Tumorsuppressorprotein
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10, Tumorsuppressorprotein
Rac	ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ras	Rat sarcoma
RSK	Ribosomale S6 Kinase
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S6K	S6 Kinase
SH2/3	SRC-homologe 2/3-Domäne
Shc	SH2-domain containing collagen-related proteins
SHIP	SH2-domain containing inositol 5'-phosphatase
sog.	so genannt
SOS	son of sevenless
SRB	Sulforhodamin B
SRC	Protein des humanen Homologs <i>src</i> des Rous-Sarcoma-Virus Onkogens
SRF	Serum-responsiver Faktor
TCF/LEF	T-cell-factor/Lymphoid-enhancer-binding-factor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tiam-1	T-lymphoma invasion-inducing and metastasis 1
TNF	tumor necrosis factor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u. a.	unter anderem
UAS	upstream activating sequences
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wee1	Mitotische Inhibitor Kinase
Wnt	Wingless
Wortmannin	[1S-(1a,6ba,9ab,11a,11bb)]-11-(Acetyloxy)-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-octahydro-1-(methoxymethyl)-9a,11b-dimethyl-3H-furo[4,3,2-de]indeno[4,5-h]2-benzopyran-3,6,9-trion
z. T.	zum Teil
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren

Ala	A	Alanin	$\text{CH}_3\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Arg	R	Arginin	$\text{HN=C(NH}_2\text{)-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Asn	N	Asparagin	$\text{H}_2\text{N-CO-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Asp	D	Asparaginsäure	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Cys	C	Cystein	$\text{HS-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Gln	Q	Glutamin	$\text{H}_2\text{N-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Glu	E	Glutaminsäure	$\text{HOOC-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Gly	G	Glycin	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
His	H	Histidin	$\text{NH-CH=N-CH=C-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Ile	I	Isoleucin	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Leu	L	Leucin	$\text{(CH}_3\text{)}_2\text{-CH-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Lys	K	Lysin	$\text{H}_2\text{N-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Met	M	Methionin	$\text{CH}_3\text{-S-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Phe	F	Phenylalanin	$\text{Ph-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Pro	P	Prolin	$\text{NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH-COOH}$
Ser	S	Serin	$\text{HO-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Thr	T	Threonin	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Trp	W	Tryptophan	$\text{Ph-NH-CH=C-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Tyr	Y	Tyrosin	$\text{HO-p-Ph-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
Val	V	Valin	$\text{(CH}_3\text{)}_2\text{-CH-CH(NH}_2\text{)-COOH}$
	X		beliebige Aminosäure

1 Einleitung

Häufig zeigen Tumorzellen gegenüber nichtmalignen Zellen ein schnelleres Wachstum. Bereits 1974 wurde von Hickie et al. beobachtet, dass eine gesteigerte Proliferationsrate von einem erniedrigten cAMP (zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat)-Spiegel in der Zelle begleitet ist. Die Homöostase von cAMP wird einerseits durch die Adenylat-Zyklase, welche aus Adenosintriphosphat (ATP) cAMP generiert, und andererseits durch cAMP-hydrolysierende Phosphodiesterasen (PDE), die cAMP zu 5'-Adenosinmonophosphat (AMP) spalten, aufrecht erhalten.

Untersuchungen in unserem Arbeitskreis zeigen, dass die cAMP-spezifische PDE4 die am stärksten exprimierte Isoenzymfamilie in einer Vielzahl humaner Tumoren ist [Marko et al., 2000]. Die Hemmung der PDE4, die mit einem Anstieg des cAMP-Spiegels korreliert [Marko et al., 1998], ist somit ein erfolgversprechendes Konzept bei der Inhibierung schnell proliferierender Tumoren.

Aus der Substanzklasse der Pteridine (s. Abb. 1) sind z. T. potente PDE-Hemmstoffe mit wachstumshemmenden Eigenschaften bekannt. Konzentrationsabhängig bewirken diese Pteridinderivate eine Arretierung von Tumorzellen innerhalb der G₁-Phase des Zellzyklus bzw. die Induktion des programmierten Zelltodes, der sog. Apoptose [Marko et al., 1998; Merz et al., 1998].

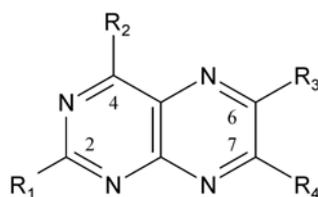


Abbildung 1: Pteridingrundgerüst.

Einige der wirkungsstärksten Pteridine, die das Wachstum von Tumorzellen hemmen, zeigen jedoch keine signifikante PDE-Hemmwirkung. Dies deutet darauf hin, dass zusätzlich zur Hemmwirkung auf PDEs auch andere wachstumsregulierende Enzyme in Tumorzellen durch Pteridine beeinflusst werden.

Für das ungehemmte Wachstum von Tumoren sind vor allem Mutationen von Tumorsuppressorgenen bzw. von Protoonkogenen verantwortlich. Während Tumorsuppressorgene in ihrer natürlichen Funktion negative Regulatoren des Zellwachstums exprimieren, codieren Protoonkogene z. B. für Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die das Zellwachstum fördern. In beiden Fällen kann eine Mutation zu verstärktem Zellwachstum führen. In Mamma- und Ovarialkarzinomen sind z. B. häufig Zelloberflächen-Rezeptoren des epidermalen Wachstumsfaktors überexprimiert. Nachgeschaltete wachstumsstimulierende Signalketten sind folglich überproportional stark aktiviert. Ebenso ist in vielen Tumoren der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg konstitutiv aktiviert, weil das gegenregulierende Tumorsuppressorprotein PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10) mutationsbedingt inaktiv ist. Dadurch werden Zelltod-auslösende Modulatoren der Tumorzelle und Repressoren des Zellwachstums unterdrückt. Ein weiteres Beispiel ist das in über 60 % aller humaner Tumoren inaktive Retinoblastoma (pRb)-Protein. Dieses Tumorsuppressorprotein reguliert in seiner natürlichen Form das Zellwachstum durch Blockieren von wachstumsfördernden Transkriptionsfaktoren [Wagener, 1999; Shim et al., 2000]. In allen genannten Fällen führt die Mutation zu verstärktem Wachstum.

Erste Befunde haben gezeigt, dass das Pteridinderivat 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin (E481) in der Vulvakarzinomzelllinie A431 die PI3K-Aktivität senkt [Kemény, 1998]. Auf diese Ergebnisse aufbauend, erschien eine detaillierte Untersuchung zur Beeinflussung von Zellmembranrezeptoren sowie des PI3K-Signalweges und des pRB-Proteins für angebracht.

2 Theoretischer Teil

2.1 Signaltransduktion

Die enorme strukturelle und funktionelle Vielfalt eines Organismus erfordert eine koordinierte Regulation des Zellwachstums bzw. der Elimination geschädigter Zellen über den sog. programmierten Zelltod (Apoptose). Die Regulation basiert auf einer interzellulären Kommunikation, die u. a. über direkte Zell-Zell-Interaktionen oder über Botenstoffe (Hormone, Wachstumsfaktoren bzw. Stressfaktoren wie z. B. Hitze oder Strahlung) erfolgt. Innerhalb der Zelle wird das Signal über sog. Signaltransduktionswege bis zum Zielprotein weitergeleitet. An der Regulation von Wachstum und Apoptose sind folgende Signaltransduktionswege maßgeblich beteiligt (s. Abb. 2):

- **Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/PKB)-** Signalweg
- **Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK)-**Signalweg
- **cAMP/PKA** (zyklisches Adenosinmonophosphat / Protein Kinase A)-Signalweg
- **Integrin**-Signalweg

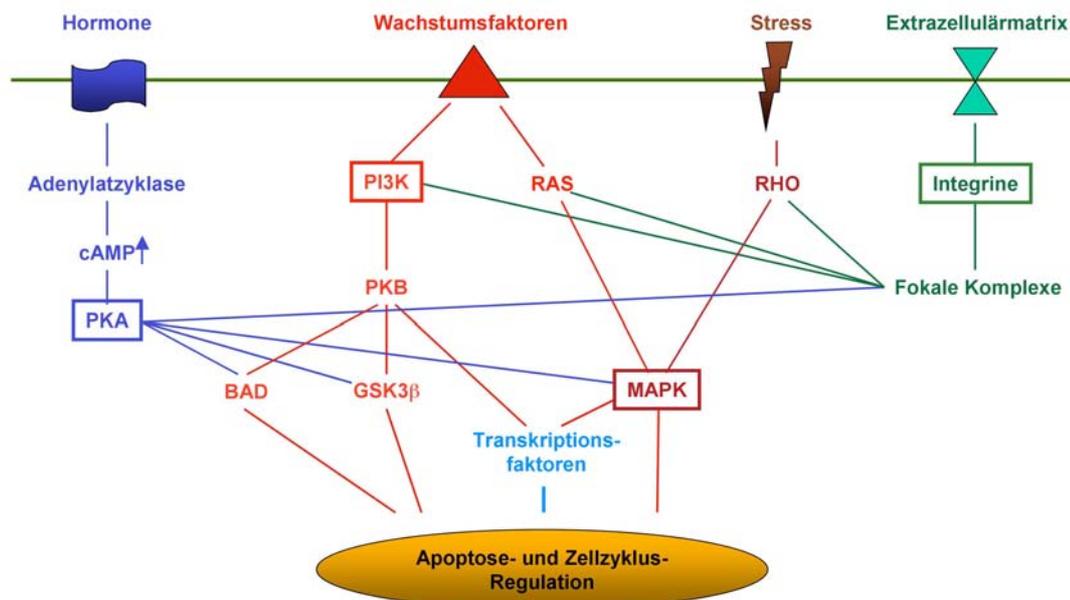


Abbildung 2: Signaltransduktionswege der Apoptose- und Zellzyklus-Regulation. cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, PK: Protein Kinase, PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase, GSK: Glycogen Synthase Kinase, RAS: RAS-Protein, RHO: kleines GTP-bindendes Protein, MAPK: mitogen-aktivierte PK, BAD: BCL-Antagonist, causing cell death.

2.1.1 Der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B-Signalweg

Der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/PKB)-Signalweg ist u. a. beteiligt an dem Apoptose-verhindernden sog. „Survival-Pathway“ der Zelle, an der Differenzierung, Proliferation, Angiogenese und Migration, sowie an Protein-Synthese und Glycogen-Metabolismus [Shepherd et al., 1998; Sheta et al., 2000].

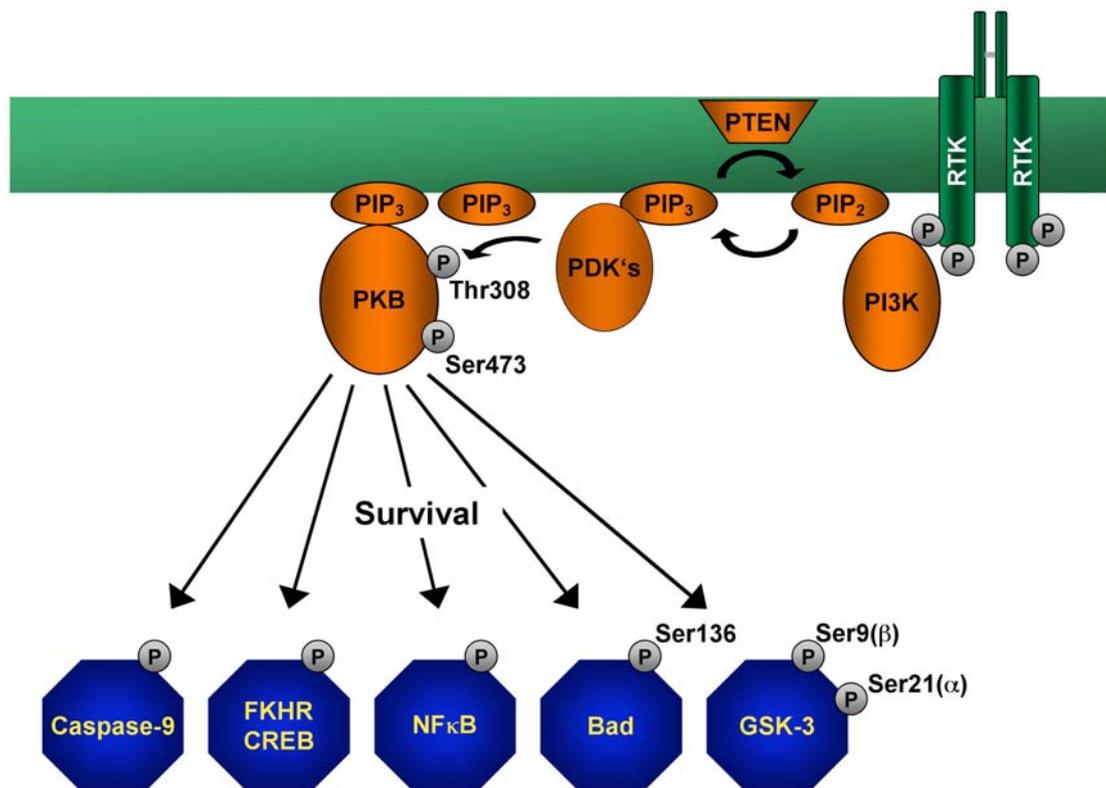


Abbildung 3: Der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/PKB)-Signalweg. RTK: Rezeptor Tyrosin Kinase, PDK: Phosphatidylinositol abhängige Kinasen, FKHR: Forkhead Transkriptionsfaktor, CREB: cAMP responsive element binding protein, GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3, NFκB: Nukleärer Faktor κB [Cell Signaling TECHNOLOGY™, modifiziert].

Der PI3K/PKB-Signalweg ist in Abb. 3 vereinfacht dargestellt. Diverse Botenstoffe wirken über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivierend auf die PI3K. Nach der Translokation an den Rezeptor phosphoryliert die PI3K die in der Plasmamembran befindlichen Phosphatidylinositole an der 3'-Position des Inositolrings. Vornehmlich das Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) dient anschließend anderen Enzymen als Bindungsstelle. Zu diesen Enzymen gehören die Protein Kinase B (PKB) sowie deren Aktivatoren, die PDKs (phosphatidylinositol-dependent kinases). Die Aktivierung der PKB führt zu einer Reihe von Enzymphosphorylierungen, die für den sog. „Survival-Pathway“ entscheidend sind. Zu den

PKB-Effektorproteinen des sog. „Survival-Pathways“ gehören u.a. die Caspase-9, BAD, Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und die Transkriptionsfaktoren FKHR (Forkhead-Transkriptionsfaktoren), CREB (cAMP-responsive-element binding protein) und NFkB (Kernfaktor kB) [Scheid & Woodgett, 2001].

2.1.1.1 Die Phosphatidylinositol 3–Kinase

Der Hauptaktivierungsweg der PI3K erfolgt durch direkte oder indirekte Anlagerung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie z. B. den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR oder den Insulinrezeptor [Vanhaesebroeck et al., 1997; Soltoff et al., 1994]. Das Bindungsmotiv für die SH2-Domäne (SRC-homologe 2) der PI3K ist eine Tyrosin-phosphorylierte YXXM-Sequenz (Y= Tyrosin, M= Methionin, X= beliebig). Andere Aktivierungsmöglichkeiten bestehen in der Anlagerung an zytosolische Protein-Tyrosin-Kinasen der SRC-Familie (Protein des humanen Homolog zu dem Onkogen des Rous-Sarcoma-Virus) [Liu et al., 1993], in der Aktivierung durch heterotrimere G-Proteine [Vanhaesebroeck et al., 1997; Rubio et al. 1997] oder in der direkten Aktivierung durch Koloalisation mit dem Ras Protoonkogen [Rodriguez-Vicana et al. 1994; Kauffmann-Zeh et al. 1997].

Die Familie der PI3K beinhaltet mehrere Enzyme mit unterschiedlicher Lipidsubstrat-Spezifität, unterschiedlicher Größe der katalytischen und regulatorischen Untereinheiten sowie differierenden Aktivierungsmechanismen [Review Krugmann & Welch, 1998; Vanhaesebroeck et al., 1997; Rubio et al. 1997]. Von den drei Klassen (I - III) wird in dieser Arbeit die Klasse Ia p85/p110-PI3K aus Säugerzellen untersucht.

Die p85/p110-PI3K ist ein Heterodimer aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen Untereinheit (p85). Die p85-Einheit besteht (s. Abb. 4) aus einer SH3 (SRC-homologe 3)-Domäne (interagiert mit prolinreichen Sequenzen), aus zwei SH2 Domänen (Interaktion mit Phosphotyrosinresten), einer bcr (breakpoint cluster region)-Domäne (Wechselwirkung mit kleinen GTP-bindenden Proteinen), zwei prolinreichen Domänen und einer coiled-coil Region für die p110-Bindung. Diese Domänen ermöglichen das weite Spektrum der Substratbindung, eine intermolekulare Dimerisation und die Rekrutierung der PI3K zur Plasmamembran, wodurch die PI3K aktiviert wird.



Abbildung 4: Struktur der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase. SH2 bzw. SH3: SRC-homologe 2 bzw. 3-Domäne, bcr: breakpoint cluster region, P: Prolin-reiche Region [Bell et al., 1996].

Die p110-Untereinheit besteht aus einer Lipid- und einer autoregulatorisch wirkenden Ser/Thr-Proteinkinase Domäne sowie einer p85- und einer Ras-Bindungssequenz [Bell et al., 1996, Rodriguez-Viciano et al., 1994 und 1996; Harpur et al., 1999].

In vitro besitzt die p85/p110-PI3K eine Spezifität für Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositol-4-phosphat sowie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), die jeweils an der D-3 Position des Inositolringes phosphoryliert werden [Serunian et al., 1990; Auger et al., 1989]. Physiologisch relevant ist allerdings nur die Reaktion zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), das in ruhenden Zellen nicht vorkommt und erst nach Rezeptorstimulierung in Sekundenschnelle synthetisiert wird [Carpenter & Cantley, 1998]. PIP₃ kann Proteine mit einer Pleckstrin-homologen (PH) Domäne binden und dient somit als Anker für eine Plasmamembranlokalisation.

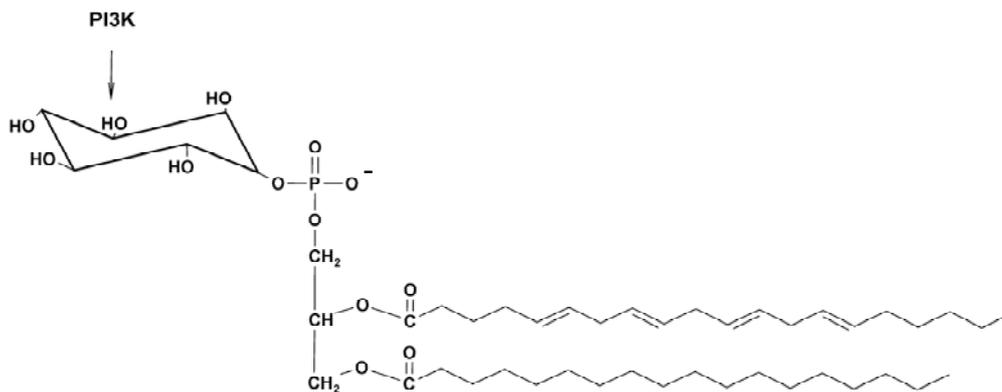


Abbildung 5: Phosphorylierungsstelle am Phosphatidylinositol durch die Phosphatidylinositol 3-Kinase

Negative Regulatoren des PI3K-Produktes sind die Lipidphosphatasen PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10) und SHIP (SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase). PTEN hydrolysiert die 3'-Position und SHIP die 5'-Position des PI3K-Produktes [Aman et al., 1998]. Wie wichtig der PI-3,4,5-P₃-Metabolismus für die Proliferationsregulation ist, zeigte sich mit der Entdeckung, dass PTEN ein Tumorsuppressorprotein ist [Wu et al., 1998].

2.1.1.2 Die Protein Kinase B

Die Protein Kinase B (PKB oder auch Akt, da es das zelluläre Homologe des transformierenden Onkogens des AKT8 Onkovirus ist) enthält aminoterminal eine PH (pleckstrin homologe)-Domäne mit der die Rekrutierung an die Plasmamembran erfolgt. Zwischen der PH-Domäne und einer carboxyterminalen hydrophoben, prolinreichen Region befindet sich eine Ser/Thr Kinase Domäne [Datta et al., 1999; Bellacosa et al., 1991; Coffey et al., 1998].

Die PKB existiert in 3 Isoformen (α , β , γ) mit gleicher Struktur und analogem Aktivierungsmechanismus. Nur die aktivierenden Phosphorylierungsstellen der einzelnen Isoformen variieren. Die in Abb. 6 dargestellte PKB α benötigt zur Entfaltung der vollen Aktivität sowohl eine Phosphorylierung innerhalb der Kinase-Domäne im sog. „T-Loop“ an Thr308 als auch im hydrophoben carboxyterminalen Teil an Ser473 [Scheid & Woodgett, 2001].



Abbildung 6: Struktur der Protein Kinase B (PKB) [Datta et al., 1999].

Der genaue Ablauf der PKB-Aktivierung ist bisher nicht eindeutig geklärt. Die folgende Abbildung zeigt den momentan diskutierten Mechanismus. Die Translokation der PKB zur Plasmamembran bringt sie in den Wirkungsbereich der Phosphatidylinositol-abhängigen Kinase 1 (phosphatidylinositol-dependent kinase 1, PDK1), die ebenfalls eine PH-Domäne besitzt. Die PDK1 wird durch Anlagern an PIP₃ stimuliert und ist verantwortlich für die aktivierende Phosphorylierung der PKB α an Thr308. Man geht davon aus, dass durch Phosphorylierung von Thr308 der T-Loop so modifiziert wird, dass sowohl ATP als auch das Kinase-Substrat Zugang zur katalytischen Domäne erhalten [Scheid & Woodgett, 2001]. Die verantwortliche Kinase für die Phosphorylierung von Ser473 wurde bisher nicht identifiziert. Man vermutet eine autonome PDK2 oder aber eine Autophosphorylierung durch die PKB, die nur von der Translokation zur Plasmamembran und weniger von einer zuvor durchgeführten Thr308-Phosphorylierung abhängig ist. Als mögliche PDK2-Kandidaten werden in der Literatur die mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAP-K2), die ribosomale S6 Kinase (RSK1 oder MAPKAP-K1) sowie die Integrin-verknüpfte Kinase (Integrin linked kinase, ILK) diskutiert [Vanhaesebroeck & Alessi, 2000; Scheid & Woodgett, 2001; Delcommenne et al., 1998].

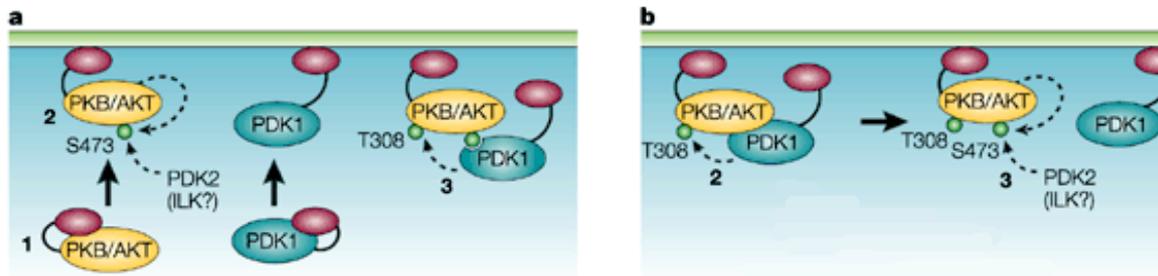


Abbildung 7: Modelle der PKB-Aktivierung. (a-1): Die PKB und PDK1 (Phosphatidylinositol-abhängige Kinase) lagern über die PH-Domäne an die Plasmamembran. (a-2): Autophosphorylierung oder PDK2-abhängige Phosphorylierung von Ser473. (a-3) anschließende PDK2-abhängige Thr308-Phosphorylierung. (b-2): Ebenso denkbar ist eine anfängliche Phosphorylierung an Thr308 über die PDK1, (b-3): anschließende Ser473-Phosphorylierung. ILK: Integrin linked kinase [Scheid & Woodgett, 2001; modifiziert].

Für die PI3K-abhängige Aktivierung der PKB ist zudem ein intaktes Actinskelett nötig [Peyrollier et al., 2000]. PI3K-unabhängig wird die PKB durch Agonisten der PKA [Filippa et al., 1999] sowie durch Erhöhung des zyttoplasmatischen Ca^{2+} -Gehalts aktiviert. Die Phosphorylierung erfolgt in beiden Fällen an Thr308, wobei Ca^{2+} über die Stimulierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase Kinase (CaMKK) aktivierend wirkt [Yano et al., 1998].

Die Substrate der PKB besitzen als minimale Consensus-Sequenz ein RXXRXXS/T (R= Arginin; S= Serin; T= Threonin; X= beliebige Aminosäure)-Motiv. Diese Sequenz ist in einer Vielzahl von Substraten vorhanden, wodurch die große Anzahl von Effektoren des PI3K/PKB-Signalweges verständlich wird [Alessi et al., 1996; Walker et al., 1998].

Die Zellzyklus- und Apoptose-regulierenden PKB-Substrate des sog. „Survival-Weges“ sind die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3, s. 2.1.1.3), BAD (BCL-2/BCL-X_L-antagonist, causing cell death, s. 2.1.1.4), Caspase-9 und verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z. B. FKHR (Forkhead), NFκB (nuclear factor kappa B) und CREB (cAMP-responsive element binding protein) (s. 2.1.1.5) [Datta et al., 1999; Datta et al., 2000].

Des Weiteren beeinflusst die PKB Bestandteile der Glycogenese und der Translation [Kohn et al., 1996; Deprez et al., 1997; Tanti et al., 1997; Hajduch et al., 1998; Summers et al., 1998; Wang Q. et al., 1999]. Wechselwirkungen mit dem MAPK-Signalweg erfolgen über die Phosphorylierung des Raf-Proteins an Ser259. Die Konsequenzen der dadurch stattfindenden Bindung von Raf an das 14-3-3 Protein sind bisher nicht eindeutig geklärt. In der Literatur sind sowohl aktivierende als auch inaktivierende Folgen beschrieben [Mason et al., 1999].

2.1.1.3 Die Glycogen Synthase Kinase 3

Die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) ist eine ubiquitär exprimierte Ser/Thr-Kinase, deren Inaktivierung entscheidend für das Überleben der Zelle ist. Transfektionsversuche an der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 zeigen, dass eine konstitutiv aktive GSK3 unabhängig von zugeführten Wachstumsfaktoren zur Apoptose führt, während eine inaktive GSK3 eine Apoptoseinduktion blockiert [Pap & Cooper, 1998].

Die GSK3 wird, wie in Abb. 8 dargestellt, über mehrere Signalwege durch Phosphorylierung an Ser21 (GSK3a) oder Ser9 (GSK3b) inhibiert. Die Inhibierung der GSK3 nach Wachstumsfaktor Stimulus ist PKB- und MAPKAP-K1 (MAPK-aktivierte Protein Kinase 1) vermittelt [Shaw & Cohen, 1999; Stambolic & Woodgett, 1994]. Aminosäuren wirken über die S6 Kinase inhibierend ($p70^{S6K}$: phosphoryliert die ribosomale Untereinheit des translativ wirksamen S6 Proteins) [Armstrong et al., 2001]. Nicht vernachlässigbar ist auch die inaktivierende Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA) [Fang et al., 2000].

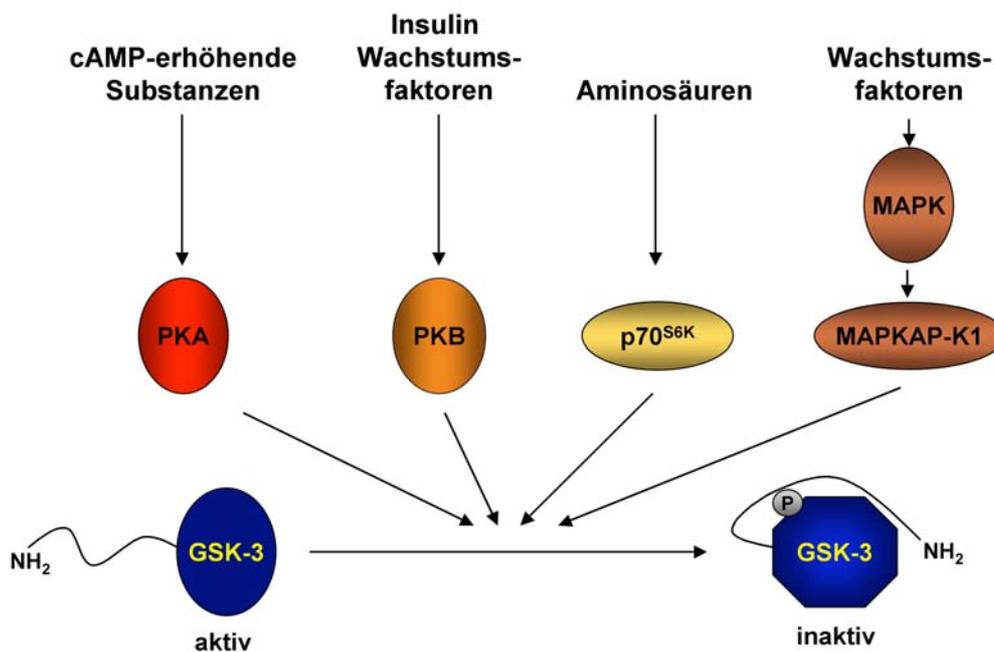


Abbildung 8: Inhibierung der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) durch verschiedene Signalwege. PKA: Protein Kinase A, PKB: Protein Kinase B, MAPK: mitogen-aktivierte Protein Kinase, MAPKAP-K1: MAPK-aktivierte Protein Kinase 1, $p70^{S6K}$: S6 Kinase [Cohen & Frame, 2001; modifiziert].

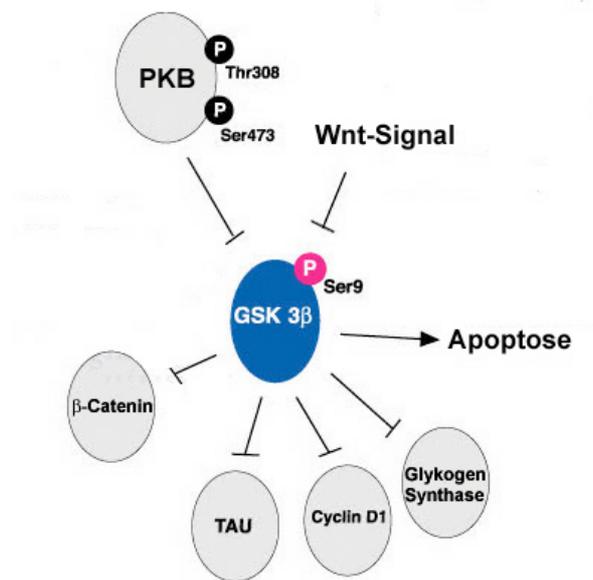


Abbildung 9: Substrate der GSK3b [Cell Signaling TECHNOLOGY™, modifiziert].

Substrate der GSK3b (s. Abb. 9) sind die Glykogen Synthase, Cyclin D1, das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau und β -Catenin. Zudem werden der eukaryotische Initiationsfaktor 2B sowie verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. [Diehl et al., 1998; Sears et al., 2000; Wagener, 1999; Oreña et al., 2000].

Entscheidend für die Vermittlung des PI3K/PKB-„Survival-Signals“ ist die Stabilisierung des Cyclin D1-Proteins, wodurch das Durchlaufen der G₁-Phase des Zellzyklus möglich ist. Die Stabilisierung basiert auf der Hemmung der GSK3b, wodurch die für den proteolytischen Abbau notwendige Phosphorylierung von Cyclin D1 an Thr286 unterbleibt. Neben der Aktivierung der Cyclin D1-Expression über den mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK)-Weg ist die Stabilisierung über den PI3K/PKB-Signalweg zur Erhaltung des Cyclin D1-Signals notwendig [Diehl et al., 1998]. Während der Embryogenese von Säugern wird die GSK3b über den sog. Wnt (Wingless)-Signalweg gehemmt, was zu einer Anreicherung von β -Catenin im Zytosol führt [Dale, 1998]. Zytosolisch vorliegendes β -Catenin kann in hohen Konzentrationen einen Komplex mit dem DNA-bindenden Protein TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid-enhancer-binding-factor) eingehen und als Transkriptionsfaktor die Expression von Cyclin D1 aktivieren [Giannis, 2000].

Die Hemmung der GSK3b bei aktivem PI3K/PKB-Signalweg verhindert auch die blockierende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-responsiv-element binding protein) innerhalb der DNA-Bindungsdomäne [Nikolakaki et al., 1993; Bullock & Habener, 1998].

Ein weiteres Substrat der GSK3b ist das Tau-Protein, welches in Neuronen das bedeutendste Substrat der GSK3b ist. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein und verbindet das Actin und das Mikrotubuli-Zytoskelett. Im stark phosphorylierten Zustand kann Tau keine Mikrotubuli anlagern [Tsuji et al., 2000]. Diesbezüglich konnte in Neuroblastomen durch Hemmung der PI3K (mit dem spez. Inhibitor Wortmannin) die Aktivierung der GSK3b und die Phosphorylierung des Tau-Proteins erzielt werden. Die gleichzeitige PI3K-abhängige Aktivierung von proteolytisch wirkenden Enzymen, den sog. „Caspasen“, induzierte allerdings die Spaltung der Protein Kinase C δ (PKC δ). Die Freisetzung der katalytisch aktiven Unter-einheit führte anschließend zur inaktivierenden Phosphorylierung der GSK3b, wodurch die Tau-Phosphorylierung beendet wurde [Tsuji et al., 2000].

Der Mechanismus der Substratphosphorylierung (Ausnahme: b-Catenin) basiert auf einem sog. „Priming-Phosphat“ (s. Abb. 10). Das Substrat muss einen phosphorylierten Ser/Thr-Rest vier Aminosäuren carboxyterminal zur eigentlichen GSK3b Phosphorylierungsstelle aufweisen [Dajani et al., 2001]. Mit diesem Rest wird das Substrat in die sog. „Priming-Tasche“ der GSK3b eingelagert und erst danach phosphoryliert.

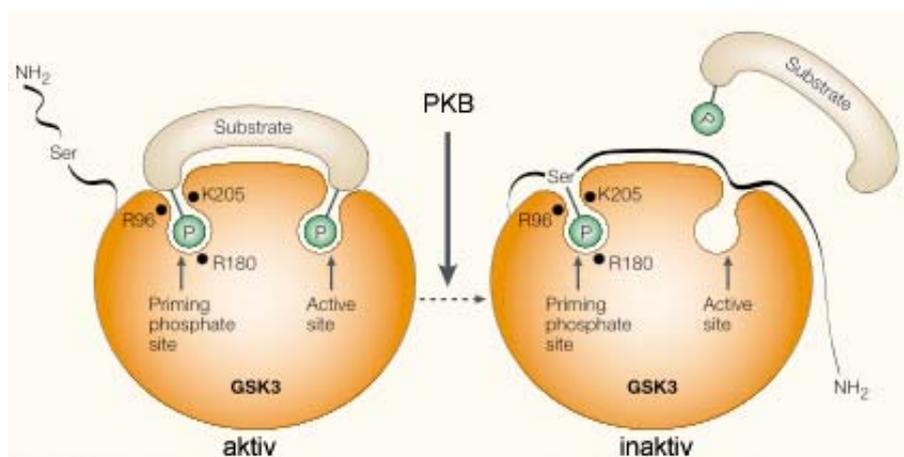


Abbildung 10: Anlagerung von Substraten und GSK3 Hemmung [Cohen & Frame; 2001].

Die inaktive GSK3, die entweder an Ser21 (GSK3a) oder Ser9 (GSK3b) phosphoryliert ist, wirkt selbst als Pseudosubstrat für die „Priming-Tasche“ und blockiert dadurch das Anlagern von Substraten und zusätzlich die katalytische Region.

2.1.1.4 Das pro-apoptotisch wirkende BAD

Das pro-apoptotisch wirkende BAD (BCL-2/BCL-X_L-antagonist, causing cell death) aus der BCL (B-cell lymphoma)-2 Familie wird als Antwort auf Wachstumsfaktoren sowohl über PKB, als auch über PKA und über den MAPK-Signalweg von der ribosomalen Protein Kinase RSK phosphoryliert (s. Abb. 11 und 15). Im phosphorylierten Zustand ist BAD inaktiv und wird z. T. durch das zytosolische 14–3–3 Protein gebunden.

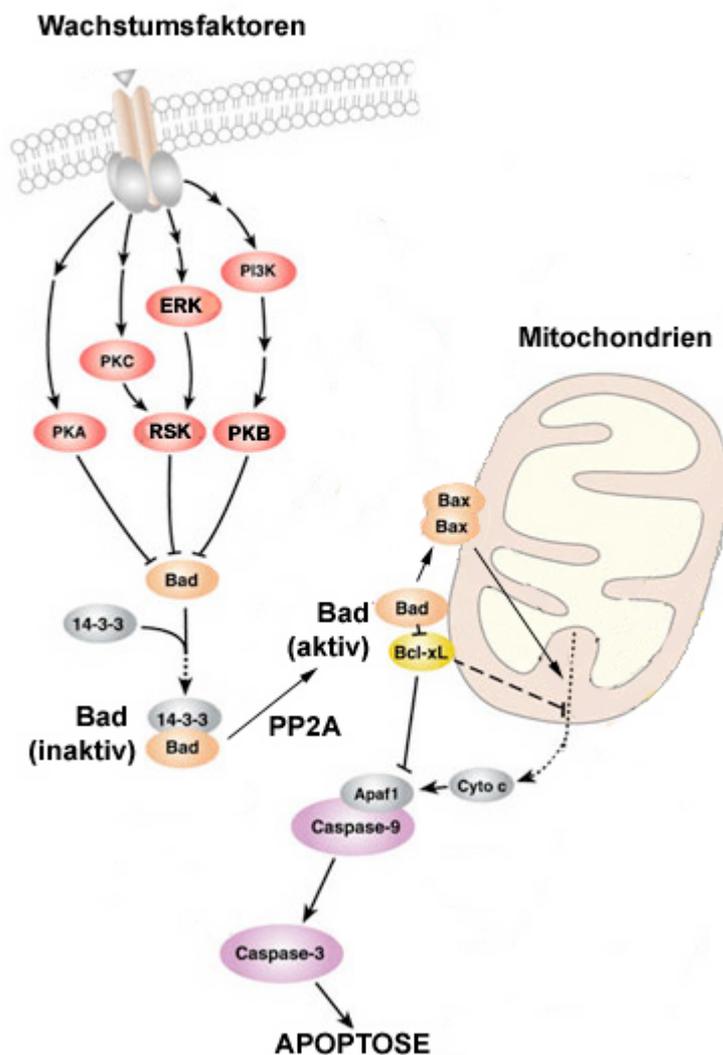


Abbildung 11: Wirkungsweise von BAD. PKA, PKB bzw. PKC: Protein Kinase A, B bzw. C, RSK: MAPK-aktivierte Kinase Kinase 1, Apaf1: apoptotic protease activating factor, Cyto c: Cytochrom C [Cell Signaling TECHNOLOGY™].

Die Dephosphorylierung wird durch die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin und die Proteinphosphatase PP2A bewirkt [Wang et al., 1999]. Im unphosphorylierten Zustand heterodimerisiert BAD mit den Proteinen BCL-2 oder BCL-X_L, die an den Mitochondrien verankert sind. Dadurch wird deren blockierendes Anlagern an das pro-apoptotische BAX verhindert [Zha et al., 1996]. BAX homodimerisiert und ermöglicht das Öffnen von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran. Durch diese Poren tritt Cytochrom C in das Zytoplasma aus und bindet an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), welches sich im Komplex mit der Procaspase-9 befindet. Die Spaltung der Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9 ist der initiiierende Schritt der Caspase-Kaskade und führt unumgänglich zur Apoptose (s. auch Kapitel 2.1.1.5 und 2.3.1) [Haldar et al., 1996; Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997; Antonsson et al., 2000].

BAD wird von den einzelnen Signalelementen an verschiedenen Resten phosphoryliert (Abb. 12). Eine Aktivierung der RSK1, entweder über den MAPK-Signalweg oder über die Protein Kinase C, führt zur Ser112-Phosphorylierung [Bonni et al., 1999; Tan et al., 1999]. Ser155 und möglicherweise auch Ser112 werden von der PKA bzw. von mitochondrialer PKA phosphoryliert [Harada et al., 1999]. Eine PKB-abhängige Phosphorylierung von Ser136 wird bisher immer noch widersprüchlich diskutiert [Lizcano et al., 2000; Harada et al., 1999].

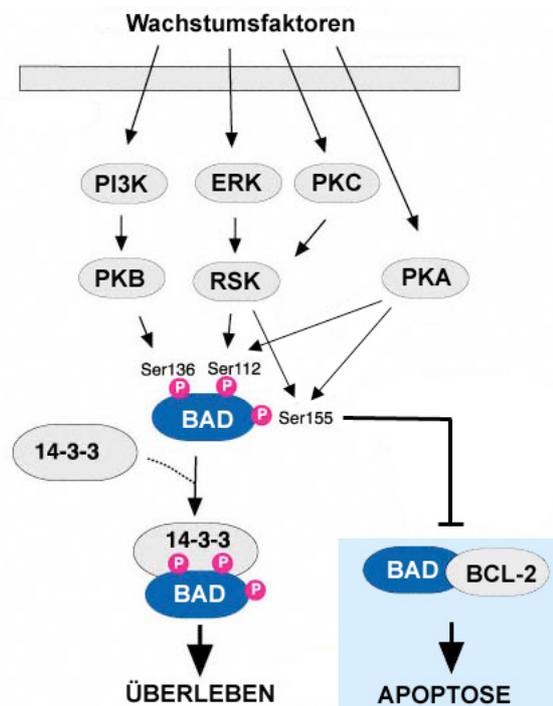


Abbildung 12: BAD Inaktivierung durch Protein Kinase (PK) B, C und A. RSK: MAPK-aktivierte Kinase-Kinase 1, ERK: Extrazellulär-regulierte Kinase des MAPK-Signalweges, PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase [Cell Signaling TECHNOLOGY™; modifiziert].

Nur das an Ser136 und/oder das an Ser112 phosphorylierte BAD wird über das zytosolische 14-3-3 Protein abgefangen. Die Phosphorylierung von Ser155 blockiert die Heterodimerisation mit dem BCL-2 bzw. BCL-X_L-Protein, da Ser155 innerhalb der BCL-2-bindenden „breakpoint cluster region“-homologen 3 Domäne liegt [Tan Y. et al., 2000; Lizcano et al., 2000; Datta et al., 2000].

Auch die Expressionsregulierung von Mitgliedern der BCL-2 Familie kann zur Regulation der Apoptose beitragen. Eine BCL-2 Überexpression fördert im Allgemeinen das Überleben der Zelle, während eine BAX-Überexpression die Synthese apoptosevermittelnder Enzyme begünstigt [Gil-Gómez et al., 1998].

2.1.1.5 Caspase-9, FKHR, CREB und NFκB

Neben BAD phosphoryliert die PKB auch die Caspase-9 und reguliert diverse Transkriptionsfaktoren, darunter den Forkhead-Transkriptionsfaktor FKHR, das „cAMP-responsiv-element binding protein“ CREB, sowie NFκB (nuclear factor κappa B).

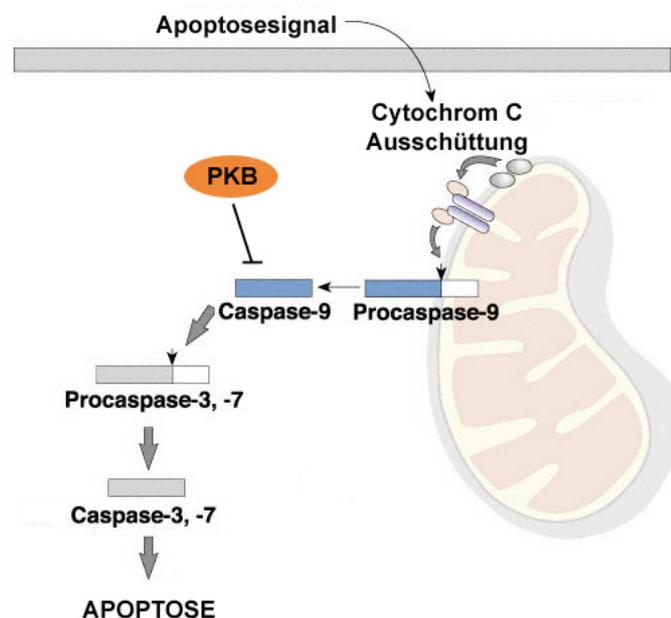


Abbildung 13: Hemmung der Caspase-9 durch die Protein Kinase B (PKB) [Cell Signaling TECHNOLOGY™; modifiziert].

Procaspase-9 spaltet im Komplex mit Cytochrom C und Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) in eine kleine und eine große katalytische Untereinheit auf (s. Abb. 13). Die große katalytische Einheit bildet die prozessierte Caspase-9 und dient nun als Initiator-Caspase für

Caspase-3 und Caspase-7 [Zou et al., 1999]. Die Caspase-9 kann spezifisch von der PKB an Ser196 phosphoryliert und, vermutlich durch Blockierung der intrinsischen katalytischen Aktivität, inhibiert werden [Cardone et al., 1998]. Dieser Mechanismus, der nur bei vorhandenem Wachstumssignal aktiv wird, verhindert, dass durch kleinere Mengen an Cytochrom C Apoptose ausgelöst wird. Zudem unterstützt die aktive PKB die Integrität der Mitochondrienmembran und vermindert so die Freisetzung größerer Mengen an Cytochrom C [Kennedy et al., 1999].

In Säugerzellen existieren mindestens 3 Isoformen der Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Familie (FKHR, FKHL1 und AFX). Eine N-terminale Phosphorylierung von FKHR an Thr24 durch PKB bewirkt eine zytoplasmatische Lokalisation und ein Anheften an das 14-3-3 Protein. Zudem existiert eine inhibitorische PKB-Konsensussequenz innerhalb der DNA-Bindungsdomäne von FKHR [Biggs et al., 1999a; Brunet et al., 1999b; Nakae et al., 1999 und 2000; Kops et al., 1999].

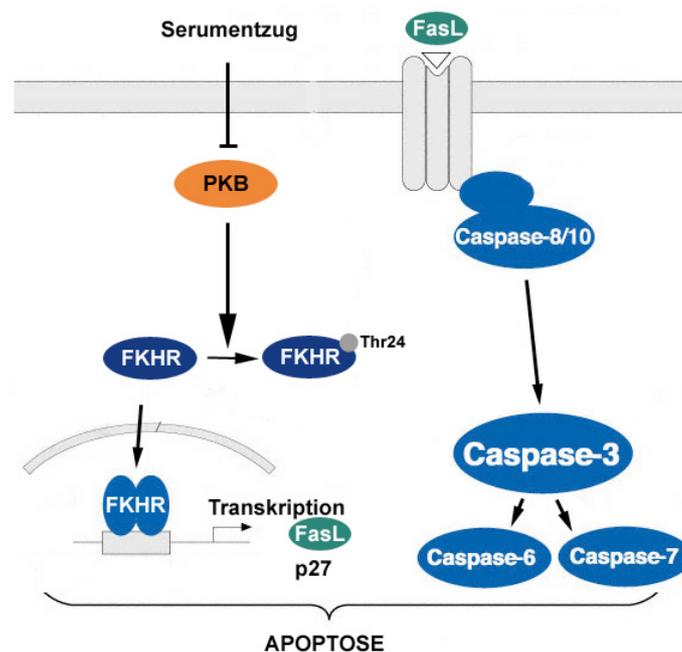


Abbildung 14: FKHR führt zur FasL-Transkription und zur autokrinen Apoptoseinduktion [Cell Signaling TECHNOLOGY™; modifiziert].

Bei einer Deaktivierung des PI3K/PKB-Weges (s. Abb. 14) bleibt FKHR unphosphoryliert, transloziert in den Kern und bindet dort u. a. an die Promotoren des FasL (Fas Liganden)-Gens [Brunet et al., 1999] und des p27-Gens (p27: Zellzyklus-Inhibitor s. 2.2.3) [Medema et al., 2000]. FasL wird aus der Zelle transloziert und bindet auf auto- oder parakrine Weise an den Zelloberflächenrezeptor Fas. Die Aktivierung des Fas-Rezeptors führt zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und bedingt die Apoptose. In PTEN-defizienten Prostata-Tumoren trägt

die aktive PKB über die Phosphorylierung von FKHR zum Erliegen der p27-Expression und somit zur gesteigerten Zellproliferation bei [Graff et al., 2000].

Zusätzlich zu FKHR werden noch andere Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, so z. B. CREB an Ser133. Dadurch wird die Bindung von CREB an das CREB-bindende Protein (CBP) verstärkt und die Transkription von Survival-Genen aktiviert [Du et al., 1998]. Gene, die durch CREB reguliert werden können sind u. a. Cyclin A und Cyclin D1 [D'Amico et al., 2000]

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch PKB aktiviert wird, ist NFκB. NFκB aktiviert unter anderem Survival-Gene, die in die Klasse der BCL-2 Familie und der Caspase-Inhibitoren gehören, so dass sowohl die Aktivität, als auch die Expression dieser Proteine über die PKB reguliert werden [Datta et al., 1999; Khwaja, 1999; Ozes et al., 1999; Romashkova & Makarov et al., 1999; Chu et al., 1997; You et al., 2001]. Der genaue Mechanismus der NFκB Regulierung ist bisher nicht geklärt. Wahrscheinlich kontrolliert die PKB indirekt die Transkriptionsaktivität von NFκB [Mayo et al., 2002; McKinsey et al., 1997].

2.1.2 Die mitogen-aktivierte Protein Kinase-Kaskade

Der mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK)-Signalweg ist in Abb. 15 dargestellt und kann in ein mitogen-aktiviertes Modul (links), welches zu Proliferation und Differentiation führt, und in ein stress-aktiviertes Modul (rechts) unterteilt werden. Das stress-aktivierte Modul splittet sich noch einmal in den sog. JNK/SAPK (c-Jun-N-terminale Kinase / stress-aktivierte Proteinkinase) und den p38-MAPK-Signalweg auf. Stress wie UV-Strahlung, Hitze oder Cytokine sowie Zell/Zell-Interaktionen aktivieren das stress-aktivierte Modul und vermitteln dadurch Entzündungsreaktionen und Apoptose, aber auch Proliferation und Differentiation. Der Aufbau der Kaskade ist in beiden Modulen identisch und erfolgt über ein membranständiges Schalterelement, welches das Signal über eine Kaskade von drei hintereinander geschalteten Kinasen bis in den Zellkern leitet.

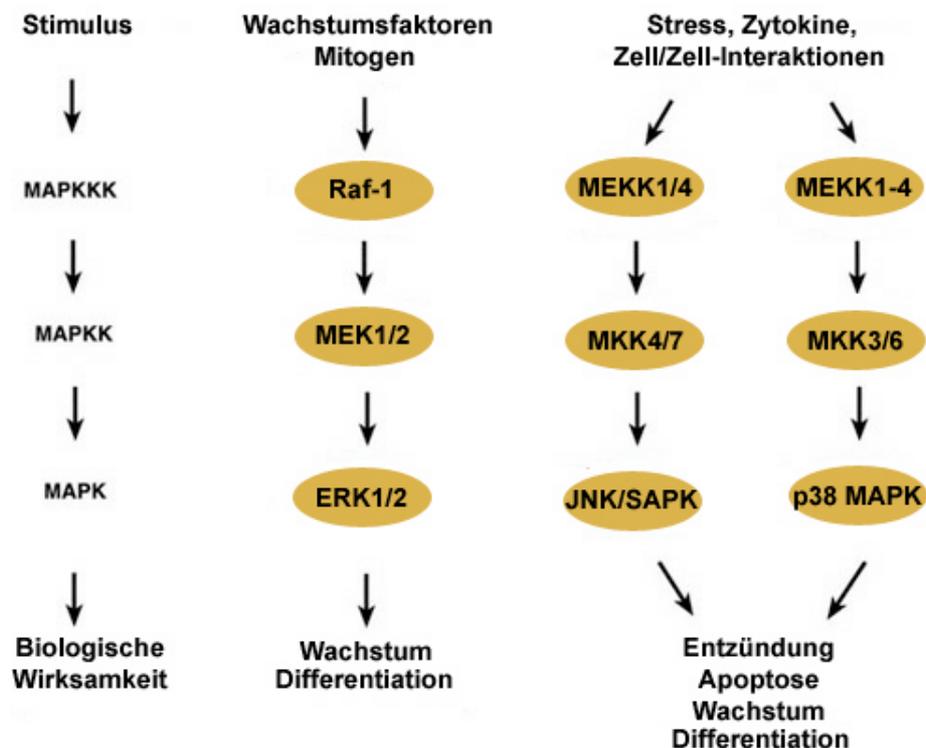


Abbildung 15: Aufbau der mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK)-Kaskade. ERK: Extrazellulärsignal-regulierte Kinase, MEK: MAPK/ERK Kinase, JNK/SAPK: c-Jun-N-terminale Kinase / stress-aktivierte Proteinkinase [Cell Signaling TECHNOLOGY™; modifiziert].

In jedem Modul erfolgt die Signalweiterleitung ausgehend von dem membranständigen GDP/GTP-bindenden Schalterelement (Ras für das mitogen-aktivierte Modul und Rac, Rho und cdc42 für das stress-aktivierte Modul; s. Abb. 16) auf eine, für das Modul spezifische, MAPK-Kinase Kinase (MAPKKK). Darauf folgt die Aktivierung einer MAPK-Kinase (MAPKK), welche dann wiederum MAPK phosphoryliert. Dabei sind die Kinasen über Gerüstproteine verknüpft, so dass ein schneller und spezifischer Informationstransport gewährleistet ist [Krauss, 2001].

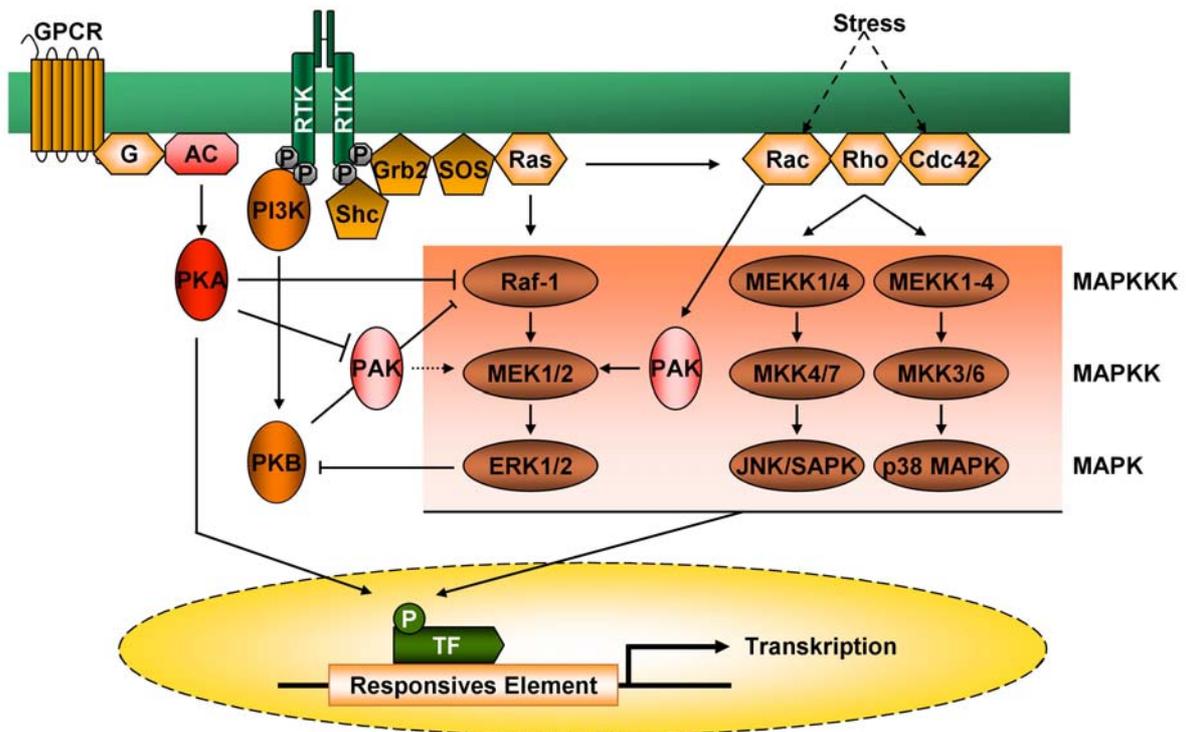


Abbildung 16: Der MAPK-Signalweg und Crosstalks zu anderen Signalkaskaden. AC: Adenylat-Zyklase, PK: Protein Kinase, PAK: p21-aktivierte Kinase, MAPK: mitogen-aktivierte PK, ERK Extrazellulärsignal-regulierte Kinase, MEK: MAPK/ERK Kinase, JNK/SAPK: c-Jun-N-terminale Kinase / stress-aktivierte Proteinkinase.

Crosstalks zu dem MAPK-Modul (s. Abb. 16) erfolgen vielfältig auf der Stufe der MAPKKK Raf-1. PKC kann aktivierend auf Raf-1 wirken (nicht im Bild), während PKA inhibierend wirkt [Mason et al., 1999]. Die p21-aktivierte Kinase PAK schafft die Voraussetzungen für ein aktivierbares MAPK-Modul, indem es MEK1 phosphoryliert (Ser298) und dadurch die Zusammenlagerung mit Raf-1 ermöglicht. PAK wird PKA-abhängig inhibiert bzw. Rac/cdc42-abhängig stimuliert. Ebenfalls erfolgt eine zelltyp- und stimulusrelevante Aktivierung des MAPK-Moduls auf der Stufe von Raf durch den PI3K/PKB-Signalweg [Zimmermann & Moelling, 1999]. Andererseits hat die MAPK ERK1/2 einen signalterminierenden Einfluss auf die PKB-Aktivität in der Fibroblasten-Zelllinie Swiss 3T3 [Shaw & Cohen, 1999]. Die PI3K kann auch das stress-aktivierte Modul beeinflussen, indem Rac und cdc42 aktiviert werden. Die Aktivierung von Rac erfolgt über den Rac-spezifischen

GTP-Austauschfaktor Tiam-1 (T-lymphoma invasion-inducing and metastasis 1) [Symons, 1995; Price et al., 1999].

2.1.2.1 Das mitogen-aktivierte Modul

Die Aktivierung des mitogen-aktivierten Moduls (s. Abb. 17) erfolgt durch Anlagerung von Wachstumsfaktoren (wie z. B. EGF, PDGF, Insulin) an die entsprechende Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) und bewirkt die Dimerisation des Rezeptors und die Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität. Dabei werden jeweils die Tyrosinreste des Dimerisationspartners phosphoryliert und dienen als Bindungsstellen für Adapterproteine mit SH2-Domäne.

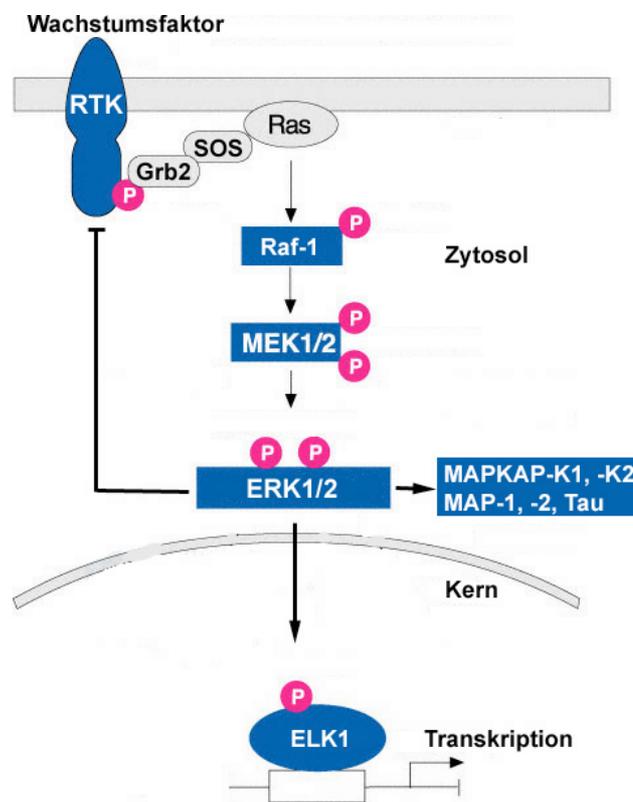


Abbildung 17: Das mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK)-Modul. RTK: Rezeptor Tyrosin Kinase, ERK: Extrazellulärsignal-regulierte Kinase, MAPKAP-K: MAPK-aktivierte Protein-Kinase oder RSK1, MAP: Mikrotubuli-assoziierte Proteine, ELK1: Ets ähnliche Kinase [Cell Signaling TECHNOLOGY™, modifiziert].

Das Anlagern des Adapterproteins Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) kann entweder direkt an den EGF Rezeptor oder über das Adapterprotein Shc (SH2-containing collagen-related protein) erfolgen. Grb2 ermöglicht die Translokation des GTP-Austauschfaktors (GEF, GTP-exchange-factor) SOS (son of sevenless) und die anschließende Aktivierung von Ras. Dieses Schalterelement ist in der GDP-bindenden Form inaktiv, wird aber mit Hilfe von SOS in die GTP-bindende Form überführt. Aktives Ras bedingt die

Translokation der Ser/Thr-spezifischen MAPKKK Raf-1 an die Membran und aktiviert diese im Zusammenspiel mit bisher unbekanntem membranständigen Ereignissen [Mason et al., 1999].

Die Substrate der MAPKKK Raf-1 sind MEK1 und MEK2 (Mitogen-aktivierte-Proteinkinase/Extrazellulärsignal-regulierte Kinase oder auch MAP/ERK-Kinase, MAPKK). Diese dualspezifischen MAPKKs sind für die Phosphorylierung der MAPKs ERK1 und ERK2 (Extrazellulärsignal-regulierte Kinase) verantwortlich. Die Ser/Thr-Kinase ERK1 und ERK2 kann sowohl zytosolische Substrate als auch, nach Translokation in den Zellkern, nukleäre Substrate phosphorylieren [Brunet et al., 1999].

Zu den zytosolischen Substraten von ERK zählen z. B. der EGF-Rezeptor und SOS, so dass beide Proteine einer negativen Autoregulation unterworfen sind [Gawler, 1998]. Des Weiteren werden Zytoskelettbestandteile wie z.B. Mikrotubuli assoziierte Proteine-1 und -2 (MAP-1, MAP-2) und Tau phosphoryliert. Daneben werden MAPKAP-K1 und -K2 (MAPK-aktiviert protein-kinase 1 und 2) phosphoryliert. Diese Kinasen hemmen kurzfristig die GSK3b, bevor sie, nach ca. 10 Minuten, in den Zellkern translozieren [Bokemeyer et al., 1996; Frame & Cohen, 2001, Shaw & Cohen, 1999].

Ein direktes nukleäres Substrat von ERK1/2 ist der ELK1 Transkriptionsfaktor. Nach Anlagerung an ELK1 wird die Formation eines sog. „ternären Komplexes“ und die Aktivierung der Transkriptions-Aktivierungsdomäne realisiert [Whitmarsh et al., 1995]. Der ternäre, d. h. drei Teile enthaltende Komplex besteht aus ELK1 und dem dimerisierten serum-response-faktor (SRF). Dieser aktiviert die Expression des *c-fos*-Gens über Anlagerung an das serum-response-element (SRE) [Dalton et al., 1993].

2.1.2.2 Das stress-aktivierte Modul

Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK1 ist auch über das stress-aktivierte Modul, bestehend aus dem p38-MAPK- und dem JNK/SAPK (c-Jun-N-terminale Kinase / stress-aktiviert protein-kinase)-Signalweg, möglich [Price et al., 1996; Janknecht and Hunter, 1997; Whitmarsh et al., 1997] (s. Abb. 18).

Die durch Wachstumsfaktoren aktivierte Phosphorylierung von ELK1 basiert allerdings weitgehend auf dem mitogen-aktivierten Modul. Die ELK1-Bindungs- und Phosphorylierungsregionen der einzelnen MAPKs (ERK, JNK und p38) sind voneinander verschiedenen und bewirken unterschiedliche Auswirkungen in Abhängigkeit von der jeweiligen MAPK und dem Stimulus [Yang et al., 1998a; Yang et al., 1998b].

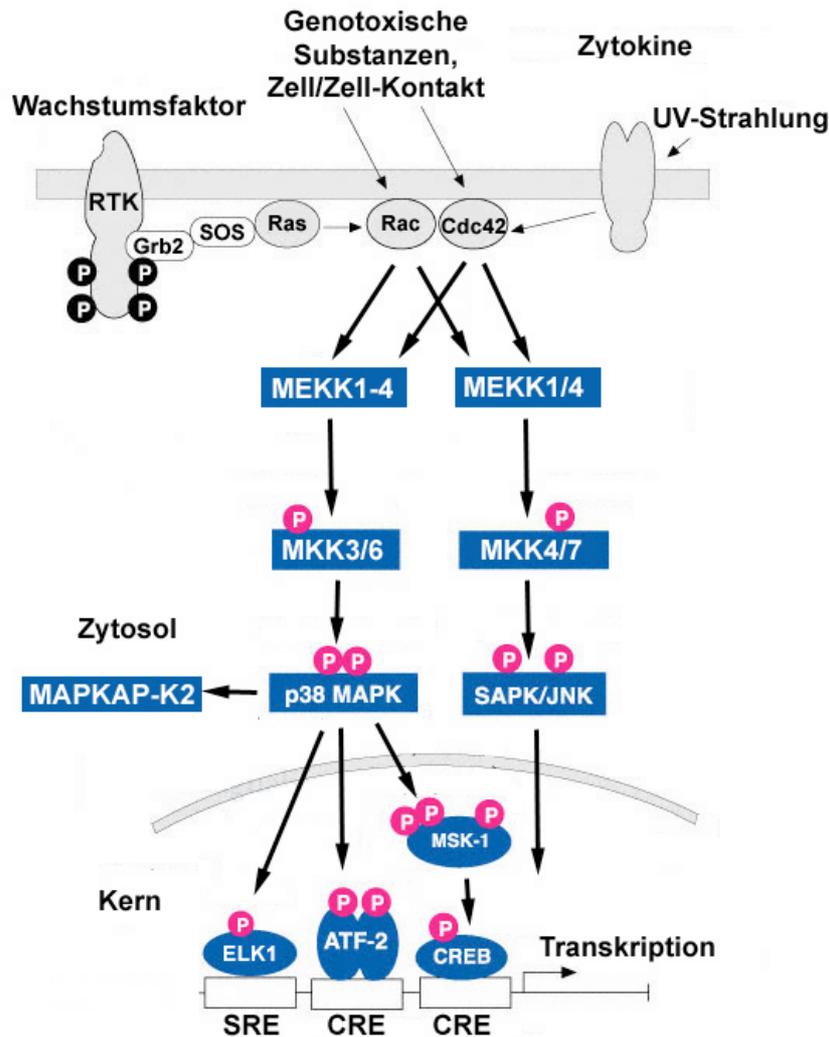


Abbildung 18: Stress-aktivierte Modulation der MAPK-Kaskade. RTK: Rezeptor Tyrosin Kinase, Rac/cdc42: kleine GTP-bindende Proteine der Rho-Familie, SAPK/JNK: stress-aktivierte Proteinkinase/c-Jun-N-terminale Kinase, MEKK: MAPK/ERK Kinase Kinase, MAPKAP-K2: MAPK-aktivierte Protein-Kinase2, MKK: MAPK Kinase, MSK-1: mitogen- und stress-aktivierte Kinase, ATF-2/CREB/ELK1: Transkriptionsfaktoren [Cell Signaling TECHNOLOGY™; modifiziert].

Die Aktivierung von SAPK/JNK erfolgt über die Kinase MKK4/7, während für die Phosphorylierung der p38 MAPK die Kinase MKK3/6 zuständig ist. Wie bei dem mitogen-aktivierten Modul beginnt die Signalkaskade über ein membranständiges Schalterelement aus der Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine, und zwar über Rac und cdc42. Die Aktivierung dieser zwei GTP-bindenden Proteine bewirkt zudem die Inaktivierung von Rho, welches ebenfalls in die Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine gehört. Die nachgeschaltete MAPKKK gehört zu der Familie der MEKK (MAPK/ERK Kinase Kinase) 1-4 [Wagener, 1999; Krauss, 2001].

2.1.3 Der cAMP-Signalweg

Beim cAMP-Signalweg bewirkt das Anlagern eines Signalstoffes an einen 7-Helix Membranrezeptor (G-protein coupled receptor, GPCR) eine konformative Änderung auf der zytosolischen Seite, so dass ein heterotrimeres G-Protein anlagern kann.

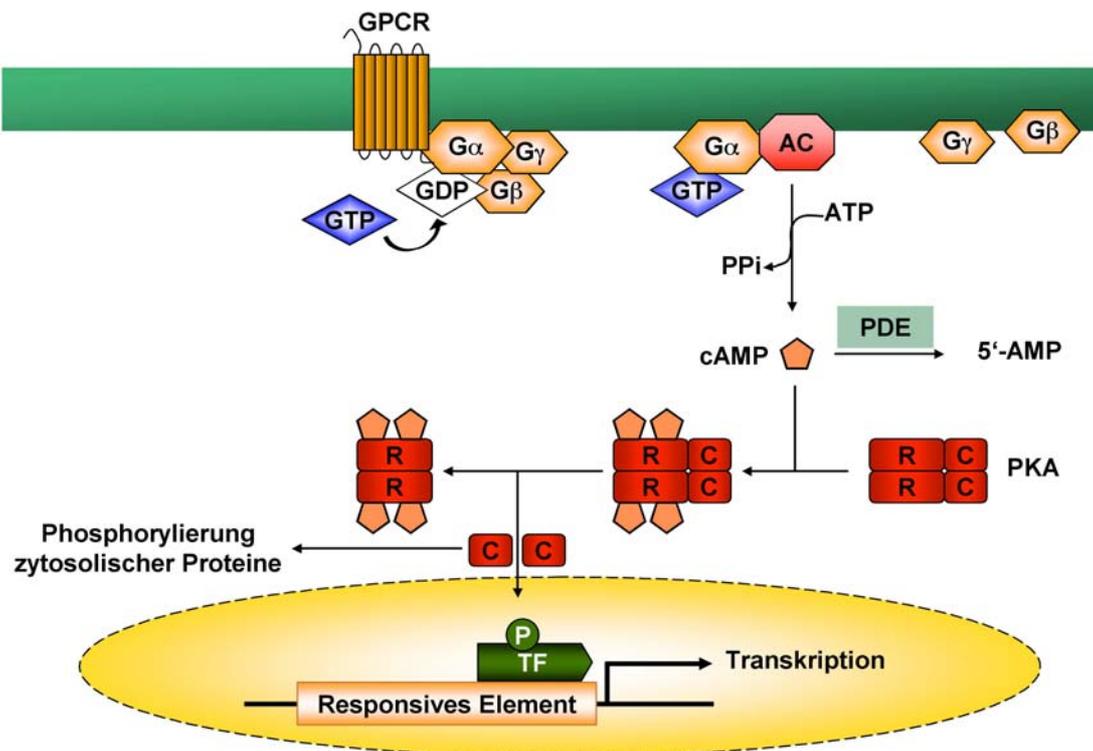


Abbildung 19: Schematische Darstellung des cAMP-Signalweges. GPCR: G protein coupled receptor, AC: Adenylat-Zyklase, PDE: Phosphodiesterase, PKA: Protein Kinase A, regulatorische (R) und katalytische (C) Untereinheit, TF: Transkriptionsfaktor [Jakobs, 2002].

Wie in Abb. 19 dargestellt, führt die Wechselwirkung des G-Proteins mit dem aktiven Rezeptor zur Freisetzung von GDP aus der Bindungstasche und zur Einlagerung von GTP. Dadurch wird das G-Protein aktiviert, dissoziiert vom Rezeptor und zerfällt in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die GTP-bindende α -Untereinheit lagert an die membrangebundene Adenylat-Zyklase (AC), die aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) generiert. Der Abbau des cAMPs zu biologisch inaktivem 5'-AMP wird von Phosphodiesterasen durchgeführt, die eine Ringöffnung durch Hydroxylierung bewirken [Sutherland, 1962].

2.1.3.1 Die Proteinkinase A

Ein Effektor des sekundären Botenstoff cAMP ist die Protein Kinase A (PKA). Im inaktiven Zustand liegt die PKA als Tetramer aus zwei inhibierend wirkenden regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten im Zytosol vor. In Abb. 20 ist der Aufbau der R- und C-Untereinheit schematisch gezeigt.

Es gibt 3 Isoformen der C-Untereinheit (a,b,g) mit identischen kinetischen und physiochemischen Eigenschaften [Taylor et al., 1990]. Im Gegensatz dazu zeigen die 4 Isoformen der R-Untereinheit unterschiedliche cAMP-Affinitäten und Lokalisationen in der Zelle auf. Der RI-Typ (RIa, RIb) verteilt sich im Zytoplasma, während der RII-Typ (RIIa, RIIb) über diverse Ankerproteine, sog. AKAPs (A-kinase anchoring proteins) an zelluläre Strukturen und Organellen gebunden vorliegt [Scott, 1991].

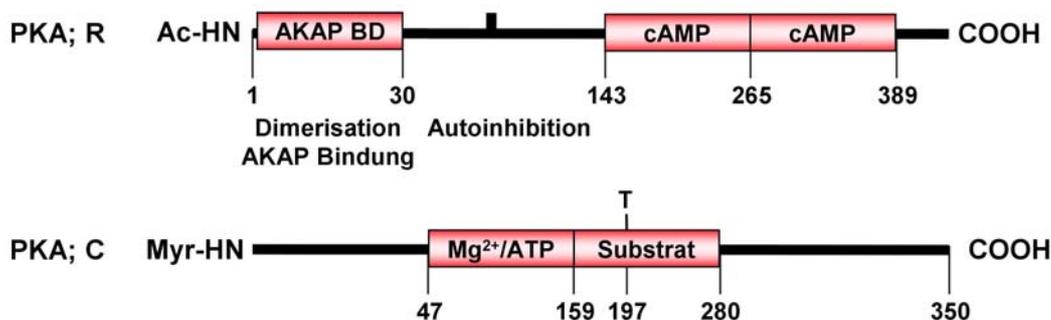


Abbildung 20: Funktionelle Domänen der Protein Kinase A (PKA). Dargestellt ist die regulatorische Einheit (R) und die katalytische Einheit (C). Myr: Myristinsäurerest, Ac: Acetylrest [Krauss, 2001; modifiziert].

Die R-Untereinheit besteht aus einer N-terminalen Dimerisationsdomäne, einer Bindungsdomäne für die katalytische Untereinheit, einer inhibitorisch wirksamen Autophosphorylierungsstelle und zwei cAMP-Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität. Die ersten 30 Aminosäuren der RII-Untereinheit werden für die AKAP Bindung und die Dimerisation benötigt [Colledge & Scott, 1999]. Über diese Ankerproteine wird die RII-PKA z. B. an Strukturen wie das Actinskelett, Mitochondrien und den Golgiapparat gebunden [Felicciello et al., 2001].

Die C-Untereinheit enthält die Bindungsstelle für Mg²⁺/ATP, die Substratbindungsstelle für verschiedene zytosolische oder nukleäre Zielproteine mit der Konsensussequenz RRXSX (R= Arginin; S= Serin; X= bel. Aminosäure), sowie einen aminoterminalen Myristinsäurerest mit unbekannter Funktion [Taylor et al., 1990; Krauss, 2001]. Die katalytische Einheit kann durch Autophosphorylierung des Thr197-Restes innerhalb des sog. „activation loop“ eine Erhöhung der ATP-Affinität erreichen [Krauss, 2001].

Die Aktivierung der PKA erfolgt durch Anlagern von je zwei Molekülen cAMP pro regulatorischer Untereinheit. Danach dissoziieren die katalytischen Untereinheiten ab und liegen enzymatisch aktiv vor. Die katalytischen Einheiten sind Ser/Thr-Kinasen und phosphorylieren zum einen zytosolische Proteine, zum anderen translozieren sie in den Zellkern und aktivieren dort Transkriptionsfaktoren wie z. B. CREB (cAMP-responsive element binding protein) durch Phosphorylierung an Ser133 [Beebe, 1994]. CREB reguliert die Transkription von Genen, die ein „cAMP-responsive element“ (CRE) in ihrer Promotorregion besitzen [Foulkes & Sassone-Corsi, 1996]. Zu den cAMP-abhängigen Genen zählen z. B. Cyclin A und Cyclin D1, die beide über eine CRE-Sequenz in ihrer Expression reguliert werden [Henglein et al., 1994; Watanabe et al., 1996]. Für die Regulation des Gehaltes an aktiver PKA existiert zudem ein Rückkopplungs-Mechanismus, bei dem die PKA eine Aktivierung cAMP-hydrolysierender Phosphodiesterasen bewirkt. Dadurch kann, solange cAMP nachgeliefert wird, ein stationärer Zustand aktiver PKA erzielt werden. Bei Inaktivierung des Membranrezeptors erfolgt nur noch der Abbau von cAMP und somit die Terminierung des cAMP-Signalweges [Krauss, 2001].

2.1.3.2 3',5'-zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen

Bisher sind 11 humane Phosphodiesterase (PDE)-Isoenzymfamilien bekannt (PDE1-11), die von mehr als 20 verschiedenen Genen (Subtypen) codiert werden und mehr als 40 verschiedene Splicevarianten ausbilden. Die PDEs sind in die Regulation zyklischer Nukleotide (cAMP und cGMP) involviert, indem sie diese hydrolysieren und in ihr inaktives aliphatisches Pendant umwandeln. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität, den K_M -Werten und ihrer Sensitivität gegenüber selektiven Modulatoren [Fujishige et al., 1999; Fawcett et al., 2000; Beavo, 1995]

Die PDEs setzen sich aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne, einer katalytischen Domäne und einem variablen C-terminalen Teil zusammen. Die katalytische Domäne besteht aus etwa 300 AS und enthält die Bindungsdomäne für das Substrat, welches kompetitiv durch Hemmstoffe verdrängt werden kann. Die regulatorische Domäne enthält je nach PDE-Isoenzymfamilie die entsprechende Bindungssequenz für Modulatoren. Des Weiteren ist diese Domäne für die Bindung der PDE4 an die Plasmamembran mitverantwortlich [Houslay, 1998].

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die PDE4 die am stärksten exprimierte PDE-Isoenzymfamilie in einer Vielzahl humaner Tumorzellen ist [Marko et al., 2000]. Da eine Erhöhung des cAMP-Spiegels zur Apoptoseinduktion führen kann, stellt gerade die Hemmung der PDE4 bei Tumoren ein vielversprechendes Mittel zur Auslösung des Zelltods dar.

2.1.4 Integrin-abhängige Signaltransduktion

Die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix wird über Integrine vermittelt. Integrine sind heterodimere transmembrane Glycoproteine aus einer α - und einer β -Untereinheit. Bisher sind 16 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten identifiziert. Die Bindungsspezifität eines Integrins hängt von der Kombination der Untereinheiten ab. Beide Integrinuntereinheiten bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einem transmembranen hydrophoben Segment sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (Ausnahme β_4 -Integrin). Die Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen ist ein Merkmal von malignen Zelltransformationen und geht mit dem Verlust geordneter Gewebestrukturen und der adhäsionsunabhängigen Proliferation einher [Wagener, 1999].

Die Adhäsion der Integrine an die Extrazellulärmatrix (ECM) bewirkt das Zusammenlagern (Clustern) von Integrienen und das Binden einer Vielzahl von Proteinen. Diese sog. „fokalen Komplexe“ interagieren sowohl mit proliferationsregulierenden Proteinen (z. B. MAPK-Kaskade, PI3K) als auch mit Bestandteilen des Zytoskeletts (u. a. Tubulin und Actin).

2.1.4.1 Integrin-vermittelte Proliferationsregulation

Der Verlust der Adhäsion bewirkt auch in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren eine Blockade der MAPK-Kaskade. Bei Fibroblasten führt der Adhäsionsverlust zu einem reversiblen Zellzyklusarrest [Aplin et al., 1999a und b], bei epithelialen Zellen zum Zelltod (Apoptose durch Adhäsionsverlust wird auch „Anoikis“ genannt) [Frisch & Ruoslahti, 1997].

Die MAPK-Blockade in NIH 3T3 Fibroblasten ist Resultat einer PKA-Induktion [Howe & Juliano, 2000]. Erst nach Inhibierung der PKA kann eine vorübergehende, adhäsionsunabhängige MAPK-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren erzielt werden. Die MAPK-Signalweiterleitung korrelierte dabei mit der Dauer der Phosphorylierung verschiedener adhäsionsrelevanter Proteine, wie z. B. Paxillin oder der fokalen Adhäsionskinase (FAK). Bisher geht man davon aus, dass der Adhäsionsverlust über eine Aktivierung der PKA Phosphatasen induziert, die in der Folge die fokalen Komplexe dephosphorylieren und dadurch deren Auflösung bewirken. Möglicherweise spielt die Fehllokalisation der p21-aktivierte Kinase (PAK), die zudem durch die PKA gehemmt werden kann, eine wesentliche Rolle bei der MAPK-Blockade [Frisch, 2000].

In Abb. 21 ist vereinfacht der Zusammenhang zwischen den fokalen Komplexen und der Proliferationsregulation dargestellt, die u. a. über die MAPK-Kaskade erfolgt. Die Adhäsion an die ECM führt zur Bildung fokaler Komplexe unter Beteiligung der FAK und dem Adapterprotein Paxillin. Paxillin rekrutiert eine Vielzahl von Proteinen, darunter auch PIX

(PAK-interagierender Guanine Nukleotid Austauschfaktor). PIX aktiviert die membranständigen kleinen GTP-bindenden Proteine Rac und cdc42, die ihrerseits PAK aktivieren. Mittels Autophosphorylierung verringert PAK die Affinität zu PIX und transloziert ins Zytosol. Dort kann MEK-1 durch PAK phosphoryliert werden, was für die Aktivierbarkeit durch Raf-1 und für die Weiterleitung eines mitogenen Signals über die MAPK-Kaskade Voraussetzung ist [Turner, 2000]. Die Nähe zwischen Integrinen und den Wachstumsfaktorrezeptoren (RTK: Rezeptor-Tyrosin-Kinase) wird über das Adapterprotein Nck vermittelt. Nck besitzt eine SH (SRC-homologe) 2- und drei SH3-Domänen und kann die Bindung zwischen PAK und aktivierten RTKs vermitteln [Turner et al., 1999; Turner, 2000].

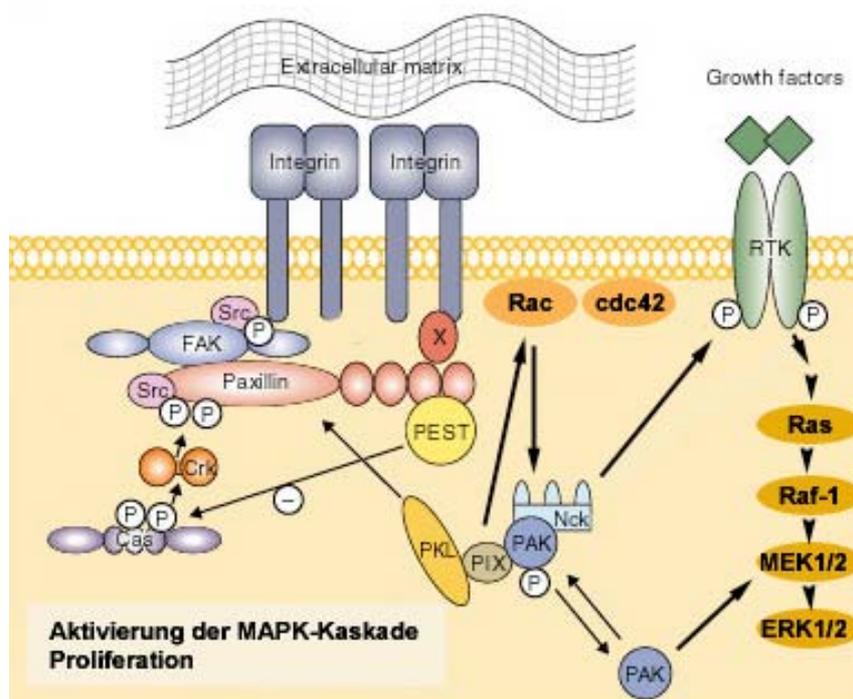


Abbildung 21: Integrin-vermittelte Signaltransduktion. Die Adhäsion aktiviert die Fokale Adhäsionskinase (FAK) und SRC. Das Adapterprotein Paxillin lagert an FAK an und transloziert komplexstabilisierende Proteine (u. a. Crk, Cas) und Proliferationsvermittler PIX (PAK-interagierender Guanine Nukleotid Austauschfaktor) aktiviert Rac und cdc42, die wiederum PAK (p21-aktivierte Kinase) aktivieren. Pak ermöglicht die MAPK-Signaltransduktion. Die Tyr-Phosphatase PEST dephosphoryliert Cas und trägt zur Auflösung der fokalen Komplexe bei. Cas: Crk-assoziierte Substrat, PKL: Paxillin Kinase Linker, Vin: Vinculin [Angers-Loustau et al., 1999; Turner, 2000; modifiziert].

2.1.4.2 Integrin-vermittelte Zytoskelettorganisation

Die fokalen Komplexe verbinden die zyttoplasmatische Integrinuntereinheit nicht nur mit proliferationsregulierenden Signalelementen, sondern auch mit dem Actin- und Tubulinskelett. Das Actinskelett, welches über die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) an das Tubulinskelett anknüpft, ist allerdings nicht nur ein Endpunkt dieses Signalweges. Über das Actinskelett wird gleichzeitig auch die Voraussetzung für eine koordinierte Signalweiterleitung innerhalb der Zelle geschaffen. So muss mindestens in den kortikalen Bereichen das Actinskelett intakt sein, um eine Aktivierbarkeit der MAPK-Kaskade zu ermöglichen [Aplin & Juliano, 1999b].

Abb. 22 zeigt einige zytoskelettorganisierenden Vermittler des Integrin-Signalweges, die für Zellmotilität, Adhäsion und Zellform relevant sind.

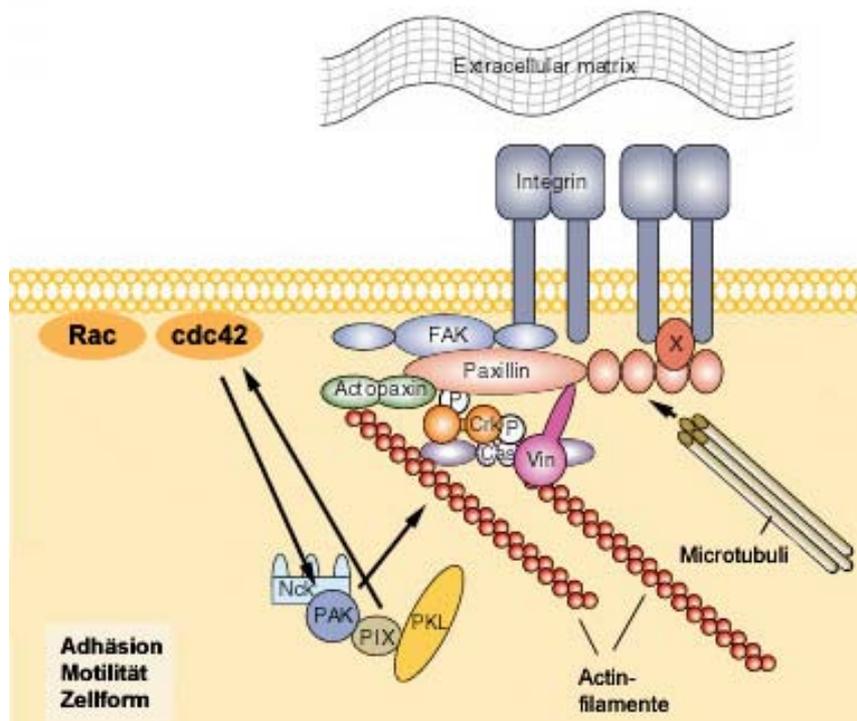


Abbildung 22: Integrin-vermittelte Zytoskelettorganisation erfolgt über die Fokale Adhäsionskinase (FAK) und das Adapterprotein Paxillin; Paxillin rekrutiert Actopaxin und Vinculin und kann dadurch Actin regulieren. Zudem wird über die Aktivierung der kleinen GTP-bindenden GTPasen Rac und cdc42 die p21-aktivierte Kinase (PAK) aktiviert. PIX: PAK-interagierender Guanine Nukleotid Austauschfaktor, Csk: C-terminale SRC-Kinase, Cas: Crk-assoziiertes Substrat, PKL: Paxillin Kinase Linker, Vin: Vinculin [Turner, 2000; modifiziert].

Auch bei der Organisation des Zytoskeletts spielen FAK und Paxillin eine zentrale Rolle. Paxillin ist direkt mit dem Tubulinskelett verknüpft. Zudem erfolgt über Actopaxin bzw. Vinculin die Anlagerung des Actinskeletts [Turner, 2000].

Die Regulation des Actinskeletts kann über die kleinen GTP-bindenden Proteine Rac und cdc42 (sowie Rho, wird allerdings durch Rac und cdc42 gehemmt) erfolgen [Aplin & Juliano, 1999]. Diese GTP-hydrolysierenden Proteine, die bereits als Ausgangspunkte des stress-aktivierten Moduls des MAPK-Signalweges erwähnt wurden, sind zentrale Vermittler morphologischer Veränderungen der Zelle. In Fibroblasten induziert cdc42 spikeartige Auswüchse, die sog. „Filopodien“. Rac, welches durch cdc42 aktiviert werden kann, ist für die Ausbildung von wellenartigen Bewegungen der Zellrandpartie zuständig. Diese sog. „Lamellipodien“ ermöglichen ein gewisses Maß an Migration. „Stressfasern“ werden durch Rho ausgebildet und sind die Zelle durchspannende Actinfilamente [Zhao et al., 1998].

Des Weiteren lagert an Paxillin auch der Paxillin Kinase Linker (PKL) an. Der PKL-gebundene GTP-Austauschfaktor PIX stimuliert cdc42 und Rac, was wiederum PAK aktiviert. PAK modifiziert das Actinskelett unter Aktivierung der LIM Kinase, die Cofilin deaktiviert. Cofilin ist ein Protein, das seitlich an F-Actin anlagert und depolymerisierend wirkt. Somit resultiert eine PAK-Aktivierung in der Stabilisierung vorhandener Actinfilamente. Über die Hemmung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase verhindert PAK die Zellkontraktion und das Abrunden der Zelle [Frisch, 2000].

Bisher sind die Bestandteile und Eigenschaften der einzelnen Komponenten von fokalen Komplexen bei weitem nicht vollständig geklärt. Im Folgenden soll auf die Struktur und Bindungsdomänen der zentralen Proteine FAK und Paxillin eingegangen werden.

2.1.4.3 Die fokale Adhäsionskinase FAK

FAK besteht aus 1052 Aminosäuren und enthält eine zentral liegende Tyrosin-Kinase Domäne [Hanks et al., 1992]. In Abb. 23 ist die FAK vereinfacht dargestellt.

Die Aktivierung der FAK erfolgt durch Anlagerung an aktivierte Integrine. Die Autophosphorylierung der FAK generiert SH2-Bindungsstellen für Vermittler verschiedener Signaltransduktionswege. Darunter lagern auch Kinasen wie z. B. SRC (Protein des humanen Homologen des viralen Onkogens aus dem Rous-Sarkoma-Virus) (an Phospho-Tyr397) an, die eine zusätzliche FAK-Phosphorylierung bewirken. Ebenfalls an Phospho-Tyr397 kann auch die 85kDa-Untereinheit der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) binden. Sowohl SRC als auch FAK selbst können das Adapterprotein Paxillin binden und darüber eine Vielzahl adhäsionsrelevanter Struktur- oder Signalproteine anlagern [Wagener, 1999].

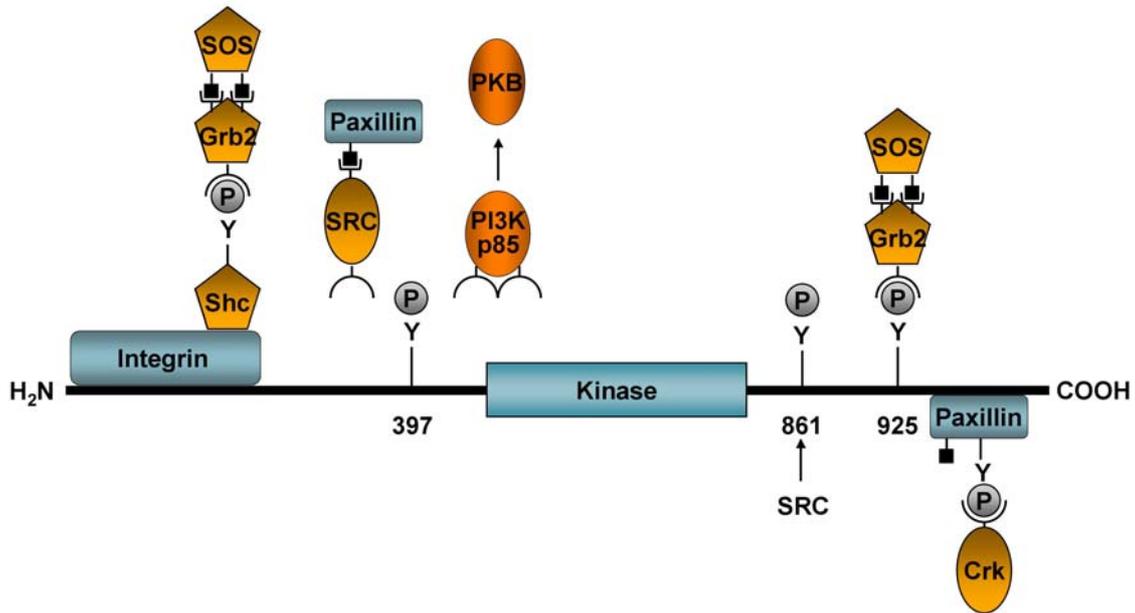


Abbildung 23: Bindungsstellen an der fokalen Adhäsionskinase (FAK) für die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Crk und SRC: Nicht Rezeptor Kinasen. SRC: Protein des humanen Homologs des viralen Onkogens aus dem Rous-Sarcoma-Virus, Grb2: growth factor receptor-bound protein 2, Shc: SH2-domain containing collagen-related proteins [Wagener, 1999; modifiziert].

In Fibronectin-spezifischen Integrinen bindet das Adapterprotein Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) an einen Phosphotyrosinrest im C-terminalen Teil der FAK. Andere Integrin β -Untereinheiten benötigen das Adapterprotein Shc (SH2-domain containing collagen-related protein) um über Grb2 die Verbindung zu Ras gefolgt vom MAPK-Signalweg herzustellen [Wagener, 1999; Bellis et al., 1997]. FAK scheint hauptsächlich durch Anlagerung verschiedener Enzyme wie PI3K, Grb2 und SRC Einfluss auf Zellmigration und Proliferation zu nehmen [Shen & Guan, 2001]. Der regulatorische Gegenspieler ist die Phosphotyrosin Phosphatase SHP-2 (früher auch: PTP-1D, SH-PTP2 und PTP-2C), die z. B. nach Insulinstimulus die Tyrosinreste der FAK dephosphoryliert [Ouwens et al., 1996].

Im Folgenden soll auf das Adapterprotein Paxillin eingegangen werden, das sowohl bei Adhäsionsprozessen über Integrine als auch bei mitogenem Stimulus ein zelluläres Substrat von Tyrosin-Kinasen ist [Turner, 2000].

2.1.4.4 Das Adapterprotein Paxillin

Paxillin (siehe Abb. 24) ist ein 68 kDa Protein, welches innerhalb verschiedener Spezies hoch konserviert erhalten und in einer Vielzahl bösartiger Tumoren der Lunge, Niere und Brust überexprimiert ist. Zwei weitere Isoformen (b, g) verfügen über zusätzliche kurze Sequenzen im N-Terminus, die wahrscheinlich die proliferative Kapazität fördern. Paxillin besteht aus

559 Aminosäuren und vermittelt über verschiedene Bindungsdomänen das Anlagern von Struktur- und Signalproteinen [Turner, 2000].

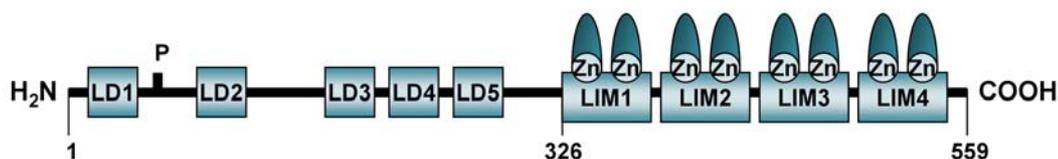


Abbildung 24: Struktur von Paxillin [Turner, 2000; modifiziert].

Die C-terminale Domäne (AS 326-559) besteht aus 4 hintereinander geschalteten LIM-Domänen (LIM1-4; LIM ist abgeleitet von den Transkriptionsfaktoren Lin-11, Isl-1 und Mec-3, in denen diese Domäne zuerst identifiziert wurde) mit doppeltem Zinkfinger-Motiv. Allerdings sind diese nicht für eine DNA-Bindung wie bei Transkriptionsfaktoren zuständig, sondern für eine Protein-Protein-Interaktion. Ebenfalls über den C-Terminus ist Paxillin mit dem Tubulin-Netzwerk verknüpft [Turner, 2000; Brown et al., 1996].

Die N-terminale Domäne (AS 1-325) besteht aus 5 leucinreichen LD-Motiven (LDXLLXXL-Sequenz mit L= Leucin, D= Asparagin, X= bel. Aminosäure) und einer recht kurzen prolinreichen SH3-Bindungsdomäne, die über SRC die Bindung an FAK realisiert [Turner, 2000].

Die LD-Motive lagern Proteine mit einer Paxillin-Bindungssequenz (PBS) an. In Tabelle 1 sind die einzelnen LD-Motive und ihre Bindungspartner aufgeführt.

Tabelle 1: Paxillin-LD-Bindungspartner [Turner, 2000; modifiziert; Nikolopoulos & Turner, 2001]. PKL: Paxillin Kinase Linker, PIX: PAK-interagierender Guanine Nukleotid Austauschfaktor, PAK: p21-aktivierte Kinase, Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2, Cas: Crk-assoziierte Substrat.

Paxillin LD-Motiv	Direkte Bindungspartner	Indirekte Bindungspartner
LD1: ⁴ LDALLADL ¹¹	Actopaxin, Vinculin, Integrin-linked Kinase (ILK)	Actin (über Actopaxin und Vinculin)
LD2: ¹⁴⁵ LDRLLEL ¹⁵²	Vinculin, Fokale Adhäsionskinase FAK	Cas, SRC, Grb2, Talin (jeweils über FAK)
LD3: ²¹⁸ VESLLDEL ²²⁵	-	-
LD4: ²⁶⁷ LDELMASL ²⁷⁴	Vinculin, FAK, PKL, Clathrin	PIX (über PKL), PAK (über PIX), Nck (über PAK)
LD5: ³⁰² LDTMLGSL ³⁰⁹	-	-

Die LD-Motive 1, 2 und 4 binden über Vinculin filamentöses Actin (F-Actin) und Actinin [Critchley, 2000]. Actopaxin bindet ebenfalls F-Actin, ist aber nur in fokalen Adhäsionen an der Frontseite migrierender Zellen zu finden [Nikolopoulos & Turner, 2000].

Ebenfalls an LD1 bindet die Integrin-verknüpfte Kinase (Integrin-linked kinase, ILK), die selektiv nur bei Zell-Fibronectin-Adhäsionen vorübergehend aktiviert wird [Nikolopoulos & Turner, 2001; Li et al., 1999]. Im aktivierten Zustand phosphoryliert ILK nicht nur Paxillin, sondern auch PKB und GSK3b [Delcommenne et al., 1998]. In MCF-7 Zellen konnte gezeigt werden, dass ILK Cyclin D1 über die Aktivierung der PKB und Hemmung der GSK3b beeinflusst [Gille & Downward, 1999; Muise-Helmericks et al., 1998; D'Amico et al., 2000].

Der Komplex aus Paxillin Kinase Linker (PKL), PIX (PAK-interacting guanine nucleotide exchange factor), PAK (p21-aktivierte Protein Kinase) und dem Adapterprotein Nck bindet über LD4 [Turner et al., 1999].

Über eine FAK-induzierte Phosphorylierung von Tyrosinresten (Tyr31 und Tyr118) werden SH2-Bindungsdomänen generiert. Diese Bindungsdomänen dienen z. B. der Csk (C-terminale SRC-Kinase; hemmt SRC) bzw. den Adapterproteinen der Crk-Familie (s. Abb. 21) zur Anlagerung des Strukturproteins Cas, welches zur Stabilität des fokalen Komplexes beiträgt [Angers-Loustau et al., 1999].

Paxillin-Phosphorylierungen von Ser/Thr-Resten erfolgen hauptsächlich während des Adhäsionsprozesses und bei Wachstumsfaktor-Stimulierung durch PAK, ILK und die Extrazellulärsignal-regulierte Kinase (ERK). Die Ser-Phosphatase 2A (PP2A) ist für das Abspalten der Phosphatgruppen zuständig [Bellis et al., 1997]. Bisher sind die Auswirkungen der einzelnen Komponenten nur ansatzweise geklärt. Der Schwerpunkt der Forschung beruht auf der Identifikation der beteiligten Proteine und der Lokalisation der Wechselwirkungen.

2.2 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus kann, wie in Abb. 25 gezeigt, in 4 Hauptphasen eingeteilt werden. In der S (Synthese)-Phase wird eine Kopie des genetischen Materials erzeugt, während in der M (Mitose)-Phase die Aufteilung der duplizierten DNA sowie aller anderen Zellkomponenten auf zwei gleiche Tochterzellen stattfindet. Die jeweils dazwischen liegenden Phasen des Zellzyklus bezeichnet man als G_1 (Gap 1) und G_2 (Gap 2)-Phase. Während der G_1 -Phase bereitet sich die Zelle durch die Synthese von Proteinen auf ein fehlerfreies Duplizieren der DNA vor, während in der G_2 -Phase überprüft wird, ob die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen ist und alle Voraussetzungen für die erfolgreiche Durchführung der Zellteilung erfüllt sind. Nach erfolgter Zellteilung kann die Zelle entweder in einen neuen Zellzyklus oder in eine Wachstums- und Differenzierungsphase ohne Teilungsvorgang (G_0 -Phase) eintreten.

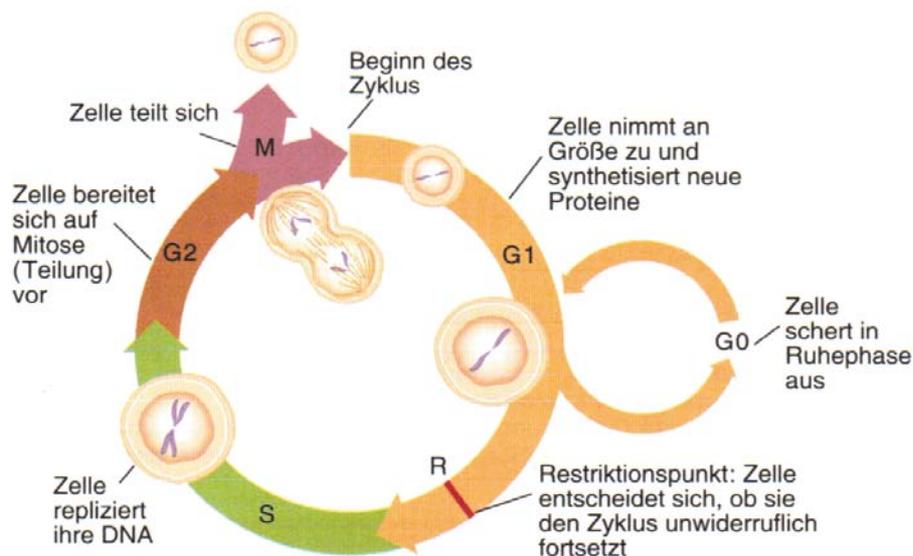


Abbildung 25: Stadien des Zellzyklus [Weinberg, 1999].

Der fehlerfreie Ablauf des Zellzyklus wird an sog. Kontrollpunkten überprüft, die sich z. B. am Ende der G_1 -Phase (sog. Restriktionspunkt), in der späten G_2 -Phase (sog. G_2/M -Kontrollpunkt) und in der M-Phase (Spindel-Kontrollpunkt) befinden. Werden Fehler festgestellt, so wird (in nicht transformierten Zellen) der Übergang in die nächste Phase bis zur Beseitigung der aufgetretenen Mängel verzögert. Sind die Fehler irreparabel, leitet die Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) ein [Pines, 1999].

2.2.1 Die regulatorischen Mitspieler des Zellzyklus

Die zentralen Kontrollproteine des Zellzyklus sind die Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs), die alle spezifisch Serin- und Threoninreste phosphorylieren. Bisher sind 9 CDKs (CDK1-9) in Säugerzellen identifiziert worden, wobei nach derzeitigem Wissensstand nur CDK1-4, 6 und 7 direkt an der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Die katalytisch wirksamen CDKs werden erst im Komplex mit bestimmten regulatorisch wirksamen Cyclinen aktiv [Yang & Kornbluth, 1999]. Diese binden an die CDKs und begünstigen über konformative Änderungen die ATP-Bindung an die CDK-Einheit. Bisher sind 16 Cycline in Säugerzellen bekannt. Während die Konzentration der CDKs im Verlauf des Zellzyklus weitgehend konstant bleibt, schwankt die Konzentration der Cycline zellzyklusabhängig. Die Verfügbarkeit der verschiedenen Cycline ist maßgeblich an der Regulation der temporären Aktivität der Cyclin/CDK-Komplexe in den verschiedenen Zellzyklusphasen (s. Abb. 26) beteiligt.

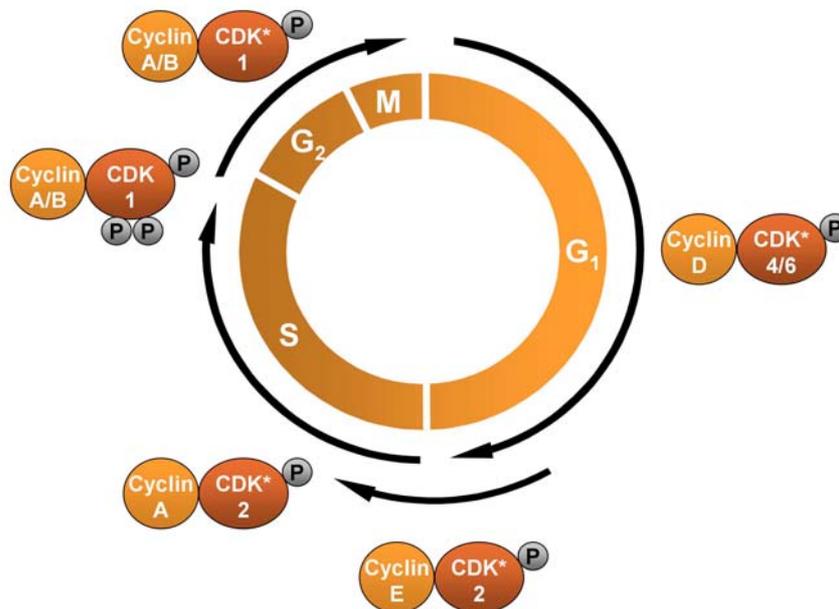


Abbildung 26: Bildung der Cyclin/CDK (Cyclin dependent kinase)-Komplexe im Verlauf des Zellzyklus als aktive (CDK*)- bzw. inaktive (CDK)-Komplexe.

In der G₁-Phase sind hauptsächlich die Cyclin D/CDK4/6-Komplexe aktiv. In der späten G₁- und der frühen S-Phase wird zudem Cyclin E/CDK2 aktiv, welches anschließend durch Cyclin A/CDK2 ersetzt wird. Ab der späten S-Phase wird die CDK1 die dominierende Kinase, die entweder im Komplex mit Cyclin A oder Cyclin B vorliegt. Die Aktivierung der Cyclin/CDK1-Komplexe erfolgt jedoch erst mit dem Überschreiten des G₂/M-Kontrollpunktes [Wagener, 1999].

Die verschiedenen Möglichkeiten der Regulation von CDKs sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Eine Hemmung der CDKs erfolgt entweder durch proteolytischen Abbau der aktivierenden Cycline (i. d. Regel nach Ubiquitinierung) oder durch Binden eines Inhibitors. Die inhibitorisch wirksamen Regulatoren werden generell unter dem Begriff CDK Kinase Inhibitoren (CKI) zusammengefasst. CKIs binden entweder an die CDK-Einheit und verhindert das Anlagern der aktivierenden Cycline, oder sie binden an den aktiven Cyclin/CDK-Komplex und hemmen die katalytische Aktivität der CDKs. Zudem können Kinasen und Phosphatasen die Cyclin/CDK-Komplexe über ihren Phosphorylierungsstatus beeinflussen. Als Beispiel sei die aktivierende Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit durch die CDK-aktivierende Kinase (CAK) bzw. die inaktivierenden Phosphorylierungen durch die zytosolische Kinase Myt1 und die nukleär vorliegende Kinase Wee1 erwähnt [Pines, 1999].

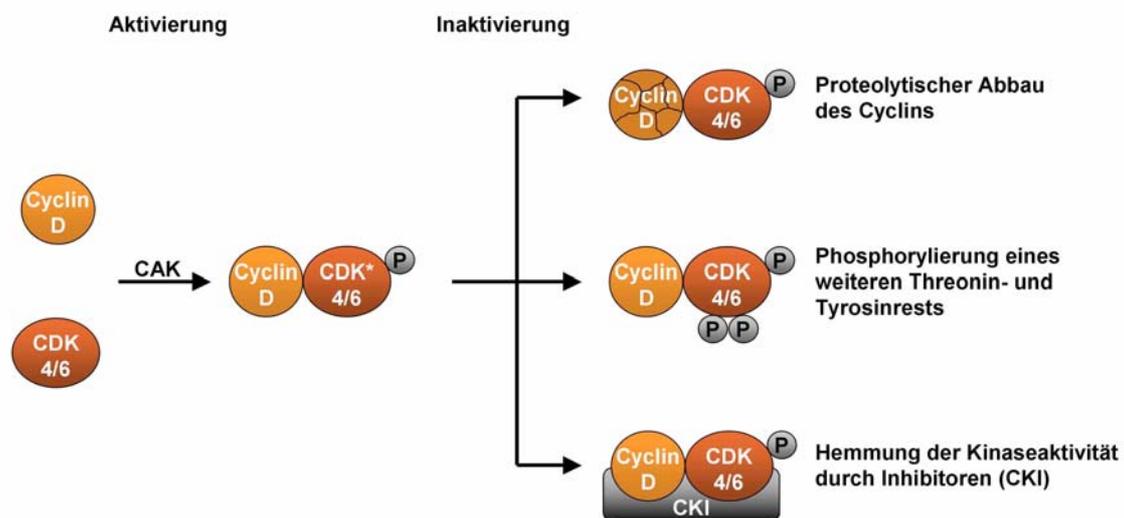


Abbildung 27: Möglichkeiten der Regulation Cyclin-abhängiger Kinasen (ungeachtet der zeitlichen Abfolge) (Bsp.: CDK4/6). Die Regulation anderer Cyclin/CDK-Komplexe erfolgt ähnlich [Wagener, 1999].

2.2.2 Regulation des Zellzyklus

Der Eintritt in die G₁-Phase des Zellzyklus wird durch einen mitogenen Stimulus, z. B. durch Wachstumsfaktoren, ausgelöst (s. Abb. 28). Über die mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK)-Kaskade (siehe Kapitel 2.1.2) wird die Expression der D-Cycline gesteuert, während gleichzeitig über den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg (siehe Kapitel 2.1.1) die Glykogen Synthase Kinase 3b gehemmt und dadurch der Cyclin D1-Abbau verhindert wird [Malumbres & Barbacid, 2001]. Von den insgesamt 3 Isoformen der D-Cycline werden Cyclin D2 und D3 bereits in der frühen G₁-Phase exprimiert [Johnson & Walker, 1999], Cyclin D1 erst nach andauerndem mitogenem Stimulus in der mittleren G₁-Phase [Welsh et al., 2001]. Die regulatorisch wirksamen D-Cycline assoziieren im Zytoplasma mit ihren Partnern CDK4 und CDK6. Diese Cyclin D/CDK-Komplexe translozieren in den Zellkern und werden über verschiedene Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen in die letztendlich aktive Form überführt [Nigg, 1996].

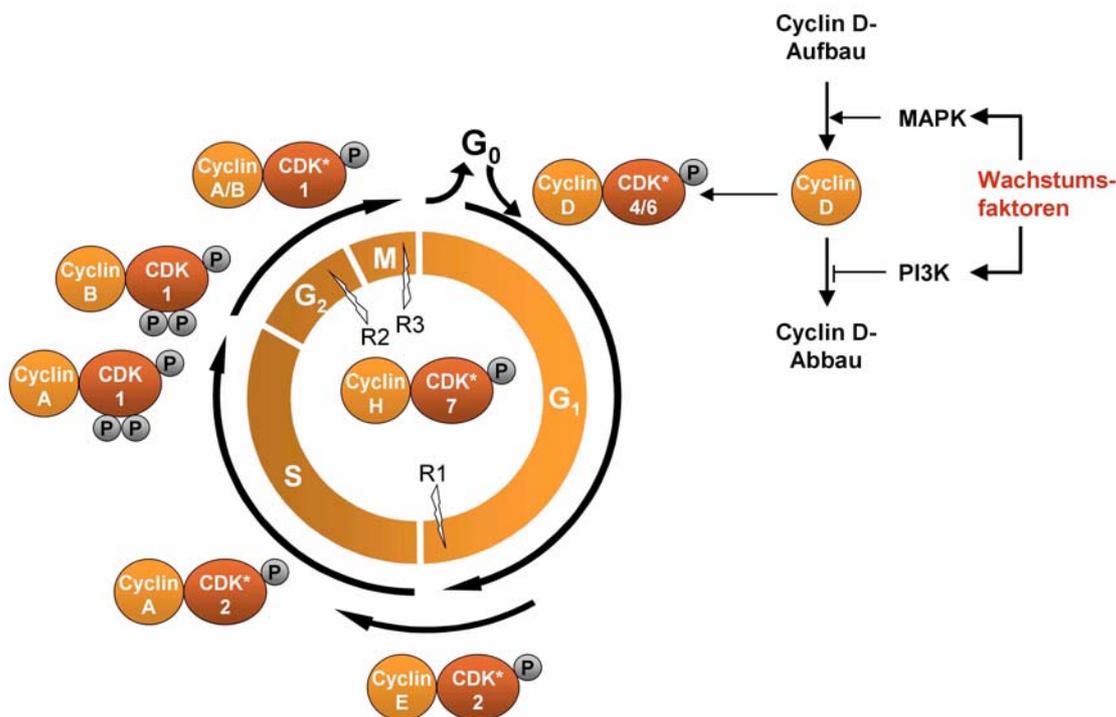


Abbildung 28: Zellzyklus unter Beteiligung des MAPK (mitogen-aktivierte Protein Kinase)- und des PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)-Signalweges mit den Cyclin/CDK (Cyclin dependent kinase)-Komplexen (*=CDK aktiv); R1-R3: Kontrollpunkte.

Das primäre Substrat der Cyclin D/CDK-Komplexe stellt das Retinoblastoma-Protein (pRb) (siehe Kapitel 2.2.4 und Abb. 29) dar. Nach inaktivierender Phosphorylierung dieses Proteins

durch die Cyclin D/CDK-Komplexe wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt. In der Folge werden in der späten G₁-Phase Gene transkribiert, die für Proteine codieren, die den G₁/S-Übergang und das Durchlaufen der S-Phase ermöglichen (Cyclin E und A, CDK1, CDC25A, DNA-Polymerase α , Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase) [Johnson & Walker, 1999].

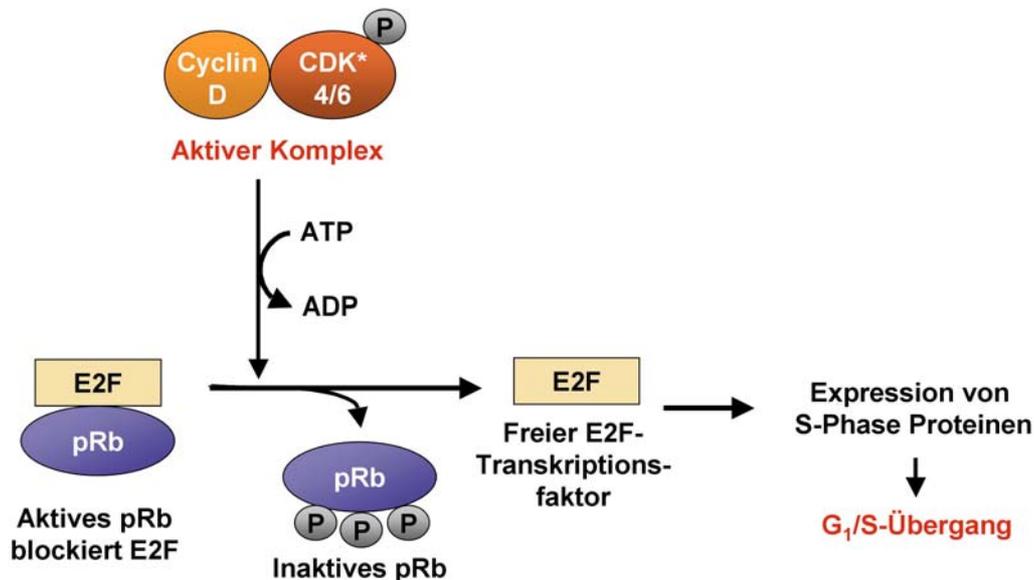


Abbildung 29: Regulatorische Mitspieler des G₁/S-Übergangs. Der aktive Cyclin D/CDK-Komplex (Cyclin D/CDK*4/6) phosphoryliert das Retinoblastoma-Protein pRb. Daraufhin wird der E2F-Transkriptionsfaktor freigesetzt und veranlasst die Expression von Proteinen, die für den Übergang in die S-Phase benötigt werden.

Die Cyclin E-Expression leitet das Überschreiten des Restriktionspunktes in der späten G₁-Phase ein. Der aktive Cyclin E/CDK2-Komplex ist, wie auch die Cyclin D/CDK-Komplexe, in der Lage, das pRb-Protein zu phosphorylieren. Gleichzeitig wird auch die Phosphatase PP1A, die an pRb gebunden und für dessen Dephosphorylierung zuständig ist, phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Somit wird gewährleistet, dass das pRb-Protein in seinem stark phosphorylierten Zustand verharrt und eine vollständige E2F-Aktivierung stattfindet [Liu et al., 1999].

Im weiteren Verlauf der S-Phase wird Cyclin E im Komplex mit CDK2 durch Cyclin A, welches ebenfalls der E2F-Kontrolle unterliegt, ausgetauscht. Cyclin A/CDK2 sorgt am Ende der S-Phase für die negative Regulation verschiedener Mitglieder der E2F-Familie, wodurch die weitere Transkription von S-Phase Genen unterbunden wird. Der Abbau der G₁-Phasen Cycline erfolgt ebenfalls während der S-Phase. Durch die aktive Glykogen Synthase Kinase 3b (GSK3b) wird z. B. Cyclin D1 an Thr286 phosphoryliert und nach Translokation aus dem Zellkern ubiquitiniert [Diehl et al., 1997]. Auch für Cyclin E wird ein Ubiquitin-abhängiger

Abbau in dieser Zellzyklusphase vermutet [Won & Reed, 1996]. Mit Abschluss der DNA-Replikation erreicht die Zelle die G₂-Phase [Wagener, 1999; Krauss, 2001].

In der G₂- und M-Phase ist die CDK1 die dominierende Kinase, die im Komplex mit A- und B-Cyclinen vorliegt. Allerdings werden die Cyclin B/CDK1-Komplexe auf dem Weg in den Zellkern durch die dualspezifischen Kinasen Myt1 (an Thr14) und Wee1 (an Tyr15) phosphoryliert und gehemmt (Abb. 30). Eine anschließende komplexstabilisierende Phosphorylierung durch die nukleäre CAK verhindert den Zerfall des inaktiven Komplexes [Krauss, 2001; Sielecki et al., 2000]. Eine aktivierende Dephosphorylierung kann über die Phosphatase CDC25C (cell division cycle protein) erfolgen, die allerdings während der DNA-Reparatur durch die aktive Checkpoint-Kinase 1 (CHK1) an mehreren Stellen phosphoryliert wird und somit inaktiv vorliegt [Lopez-Girona et al., 1999].

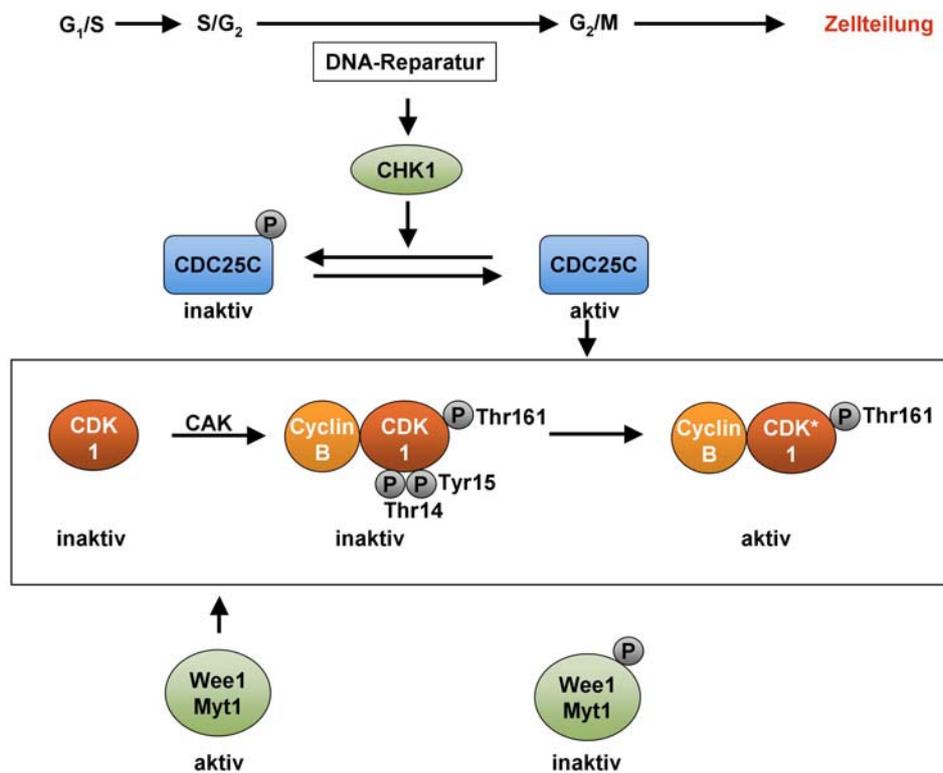


Abbildung 30: Regulation der Cyclin B/CDK (Cyclin dependent kinase) 1-Aktivität. DNA-Schäden bewirken eine Aktivierung der Checkpoint-kinase (CHK) 1, so dass die Phosphatase CDC25 (Isoform C) inaktiv wird. Die Kinasen Wee1, Myt1 inaktivieren CDK1 im Komplex mit Cyclin B durch Phosphorylierung. CAK (CDK aktivierende Kinase) wirkt stabilisierend. Erst nach der DNA-Reparatur kann CDC25C Cyclin B/CDK1 aktivieren.

Erst mit Überschreiten des G₂/M-Kontrollpunktes setzt die dephosphorylierende Eigenschaft der Phosphatase CDC25C ein. Es erfolgt eine stufenweise Aktivierung der Cyclin/CDK1-Komplexe [Borgne & Meijer, 1996]. Die Aktivität der Cyclin B/CDK1-Komplexe schafft die Voraussetzungen für die Zellteilung, indem Veränderungen im Zytoplasma und im Zellkern in Gang gesetzt werden. Damit die Mitose jedoch beendet werden kann, müssen Cyclin B/CDK1 und Cyclin A/CDK1 noch in der M-Phase deaktiviert werden. Dies geschieht durch den Anaphase-promoting-complex (APC), einer Ubiquitin-Ligase, der zuvor jedoch durch die Cyclin B/CDK1-Komplexe aktiviert werden muss [Sielecki et al., 2000].

2.2.3 CDK Inhibitoren

Die CDK-Inhibitoren (CKI) lassen sich in zwei Familien mit unterschiedlicher Wirkungsweise unterteilen (s. Abb. 31). Die Inhibitoren der Cip/Kip (CDK/kinase interacting protein)-Familie besitzen eine CDK- und Cyclin-spezifische Bindungsdomäne und hemmen die katalytische Aktivität der im Komplex mit Cyclin A, D und E befindlichen CDKs. Die vier Mitglieder der INK4-Familie (Inhibitor of CDK4: p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D}) binden hingegen spezifisch an CDK4 und CDK6 und verhindern das Anlagern der D-Cycline [Sherr & Roberts, 1995; Sherr & Roberts, 1999; Johnson & Walker, 1999; Reynisdóttir & Massagué, 1997].

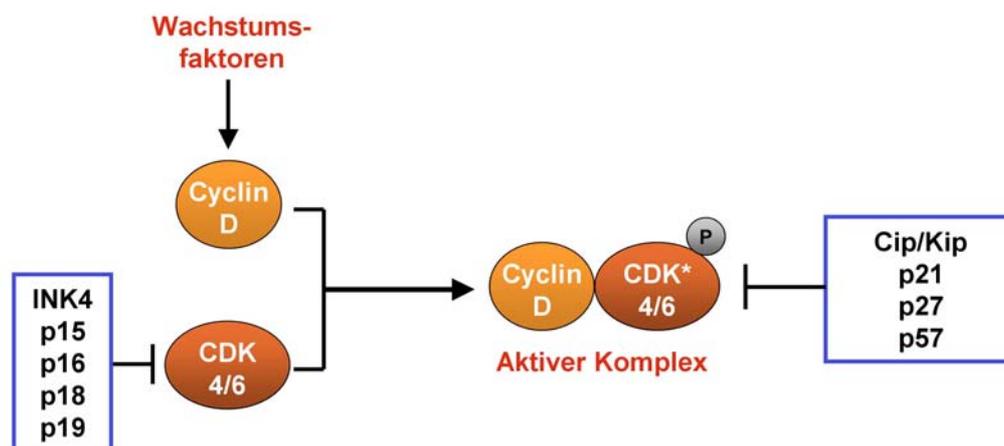


Abbildung 31: Regulation der Cyclin D/CDK (Cyclin dependent kinase) 4/6-Aktivität. Wachstumsfaktoren fördern die Cyclin D Expression und ermöglichen die Bildung des aktiven Komplexes. CDK-Inhibitoren (CKIs) der INK4 bzw. Cip/Kip-Familie hemmen entweder die Bildung des aktiven Komplexes oder dessen Aktivität.

Die Familie Cip/Kip besteht aus p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} [Sherr & Roberts, 1995; Sherr & Roberts, 1999]. Am sensitivsten reagieren Cyclin E/CDK2 und Cyclin A/CDK2 auf die inhibitorische Anlagerung der Cip/Kip-Mitglieder. Niedrige Mengen werden jedoch von den Cyclin D/CDK4-Komplexen zur Stabilisierung benötigt, was die Aktivität der sensitiven Cyclin E/CDK2-Komplexe bis zu einem gewissen Grad sicherstellt [Blain et al., 1997; LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999].

p21 liegt in einem quarternären Komplex vor, der neben Cyclin D und CDK auch PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ , enthält [Zhang et al., 1993; El-Deiry et al., 1993]. Die C-terminale NLS (nuclear localization signal)-Sequenz sorgt für die Translokation aus dem Zytoplasma in den Nukleus und bindet PCNA. p21 kann den Zellzyklus somit durch Interaktion mit Cyclin/CDK-Komplexen und durch Hemmung der DNA-Replikation hemmen [El-Deiry, 2001; Li et al., 1994].

p27 und p57 besitzen keine PCNA-Bindungssequenz. Sie inhibieren den Zellzyklus durch Blockieren der ATP-Bindungsstelle innerhalb der Cyclin/CDK-Komplexe [Russo et al., 1996; Sherr & Roberts, 1999].

Die Regulation der CDK-Inhibitoren erfolgt, ebenso wie die der D-Cycline, hauptsächlich durch Signalelemente des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/PKB)- und des mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK)-Signalweges (s. Abb. 32).

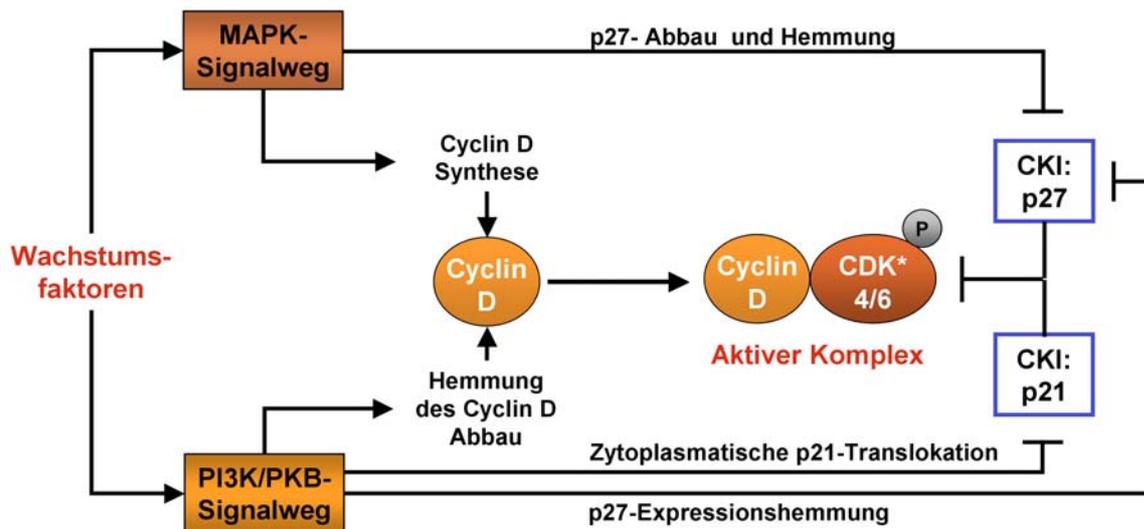


Abbildung 32: Einflussmöglichkeiten auf den aktiven Komplex über die Regulation von p21/p27 und Cyclin D über den PI3K- und MAPK-Signalweg.

Über die PKB kann z. B. p21 an Thr145 innerhalb der NLS-Sequenz phosphoryliert werden. Dadurch wird die Translokation von p21 aus dem Zytosol in den Nukleus verhindert und die im Kern befindlichen Cyclin/CDK-Komplexe sowie PCNA bleiben unbeeinflusst. Dieser Wirkmechanismus ist z. B. für die erhöhte Proliferationsrate von Brustkrebszellen verantwortlich, bei denen der PI3K/PKB-Signalweg unabhängig von extrazellulären Signalen aktiv ist [El-Deiry, 2001; Zhou et al., 2001].

Ebenfalls über die PKB werden die Transkriptionsfaktoren der FKHR (Forkhead in rhabdo-mysarcoma)-Familie gehemmt, die ihrerseits für die Aktivierung der p27-Expression verantwortlich sind [Medema et al, 2000; Graff et al., 2000].

Über den MAPK-Signalweg kann die Phosphorylierung von p27 an Thr187 induziert werden, wodurch ein p27-Abbau nach Ubiquitinierung erfolgt [Lenferink et al., 2001]. Zudem kann die Bindung von p27 an Cyclin/CDK-Komplexe durch eine MAPK-vermittelte Phosphorylierung von p27 gehemmt werden [Lloyd, 1998].

2.2.4 Das Retinoblastoma-Protein (pRb)

Das Retinoblastoma-Protein ist an Vorgängen der Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt. Als Tumorsuppressorprotein führt der Funktionsverlust zur Fehlregulation des Zellzyklus und fördert das progressive Wachstum von Tumoren. In über 60 % aller humanen Tumoren ist das Retinoblastoma-Gen modifiziert und inaktiv [Shim et al., 2000; Harbour & Dean, 2000 a; Wagener, 1999; Knudsen et al., 1999; Nevins, 1992]. Die Wirkung des pRb-Proteins basiert auf seiner Fähigkeit, im unphosphorylierten Zustand Proteine der DNA-Replikationsmaschinerie und Transkriptionsfaktoren abzufangen und zu hemmen [Tamrakar et al., 2000].

2.2.4.1 Struktur des pRb

Das pRb-Protein besteht aus 928 Aminosäuren und wird durch Cyclin/CDK-abhängige Phosphorylierungen an Threonin- und Serinresten in seiner Bindungsaffinität zu anderen Proteinen reguliert. Da die Phosphorylierungsstellen, wie in Abb. 33 dargestellt, über das ganze Protein verteilt sind, kann eine selektive Phosphorylierung eines AS-Restes den Bindungsverlust eines bestimmten Proteins bewirken.

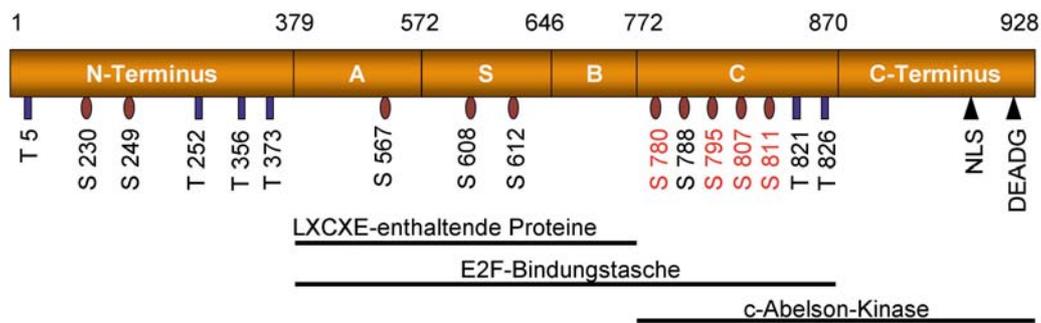


Abbildung 33: Struktur des pRb-Proteins. Die sog. „kleine Bindungstasche“ besteht aus der „A-Tasche“ (A), „Spacer Region“ (S) und der „B-Tasche“ (B). Die sog. „große Bindungstasche“ beinhaltet zusätzlich noch die „C-Tasche“ (C). NLS: nuclear localization signal, DEADG: Caspase-spezifische Abbausequenz [Tamrakar et al., 2000; modifiziert].

Der N-Terminus, bestehend aus AS 1-379, ist wahrscheinlich für die Oligomerisierung von Bedeutung. Der Bereich AS 379-772 wird als „kleine Bindungstasche“ bezeichnet und besteht aus der sog. A-Tasche, einer Spacer-Region und der sog. B-Tasche [Wagener, 1999]. Proteine mit einer LXCXE-Sequenz, wie z. B. D-Cycline und die DNA-Polymerase δ , können in diese Bindungstasche einlagern. Die Ser/Thr-Phosphatase 1 (PP-1), die für die aktivierende Dephosphorylierung des Tumorsuppressors pRb zuständig ist, bindet ebenfalls in diesem Bereich [Tamrakar et al., 2000].

Die sog. „große Bindungstasche“, welche die sog. C-Tasche und die kleine Bindungstasche zusammenfasst, bindet die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Ferner befindet sich im C-Terminus die NLS (nuclear localization signal)-Sequenz für die nukleäre Lokalisation des pRb-Proteins, sowie eine DEADG-Sequenz zur Spaltung durch Caspasen [Wagener, 1999].

2.2.4.2 Zellzyklusabhängige Regulation und Wirkung des pRB

Die Regulation des pRb-Proteins erfolgt hauptsächlich über den Phosphorylierungsstatus (s. Abb. 34) und ist eng an den Zellzyklus gebunden. Die wesentliche Funktion des pRb-Proteins ist die Kontrolle des G_1/S -Übergangs.

Das pRb-Protein befindet sich vor und nach dem G_1/S -Übergang in funktionell unterschiedlichen Zuständen:

- Nach Abschluss der Mitose bis zum Erreichen des Restriktionspunktes am Ende der G_1 -Phase liegt das pRb in einem sog. „hypophosphorylierten“ Zustand vor. In dieser aktiven, wachstumshemmenden Form bindet und blockiert pRb den Transkriptionsfaktor E2F, so dass die Expression von S-Phase Genen verhindert wird.

- Nach dem Überschreiten des G₁/S-Übergangs liegt pRb in einem sog. „hyperphosphorylierten“ Zustand vor, der bis zum Ende der Mitose aufrecht erhalten wird. In diesem Zustand wirkt pRb wachstumsfördernd. Transkriptionsfaktoren der E2F Familie sowie Proteine der DNA-Replikationsmaschinerie sind nicht an pRb gebunden.

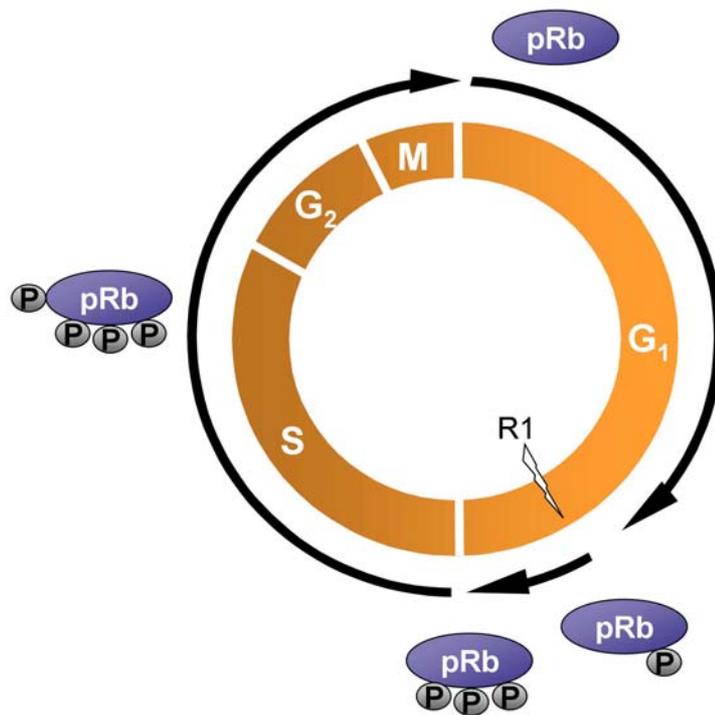


Abbildung 34: Phosphorylierungszustände des Retinoblastoma-Proteins (pRb) im Verlauf des Zellzyklus. Vor dem Kontrollpunkt am Ende der G₁-Phase existiert das pRb im sog. „hypophosphorylierten“ Zustand, nach dem Übergang in die S-Phase im sog. „hyperphosphorylierten“ Zustand. Der G₁/S-Phasen-Übergang steht unter der Kontrolle des stufenweise phosphorylierten pRb-Proteins.

Der Übergang von der „hypo“- in den „hyperphosphorylierten“ Zustand unterliegt der Kontrolle des G₁/S-Restriktionspunktes und erfolgt stufenweise, wie in Abb. 35 dargestellt. Die ersten Phosphorylierungen des pRb-Proteins finden in der carboxyterminalen Region durch CDK4/6 im Komplex mit Cyclin D statt [Malumbres & Barbacid, 2001].

Die Phosphorylierung von Ser826 ermöglicht dem gebundenen Transkriptionsfaktor E2F eine minimale Transkriptionsaktivität in Bezug auf das Cyclin E-Gen [Harbour et al. 1999; Harbour & Dean, 2000 b; Zhang et al. 2000]. Mit dem Entstehen von Cyclin E bilden sich die ersten Cyclin E/CDK2-Komplexe, die nun zum einen die gegenregulierende Phosphatase PP1A inaktivieren und zum anderen weitere Stellen des pRb-Proteins phosphorylieren [Liu et al., 1999; Lundberg & Weinberg, 1998].

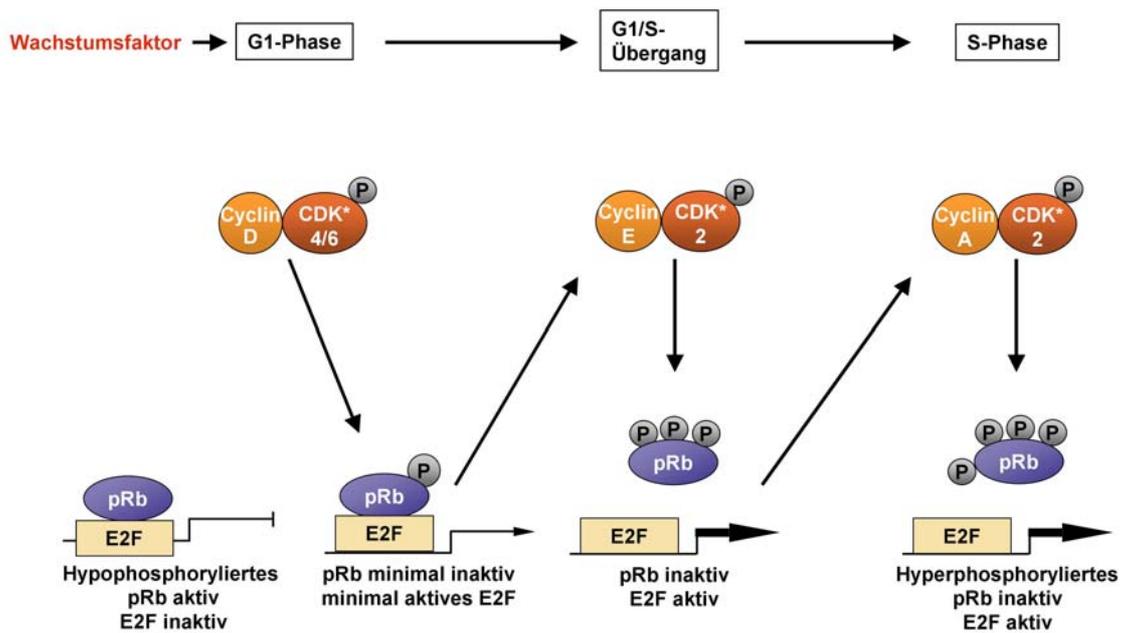


Abbildung 35: Modell zur Regulation des pRb (Retinoblastoma)-Proteins und der Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F. CDK: Cyclin abhängige Kinase.

Die Phosphorylierung von Ser780 durch Cyclin D/CDK-Komplexe setzt den Transkriptionsfaktor E2F vollständig frei. Dadurch wird die Transkription der Gene für Cyclin A, Cyclin E, CDK1, Thymidinkinase, DNA-Polymerase α und E2F aktiviert und die Progression in die S-Phase ermöglicht [Harbour & Dean, 2000 a und b; Tamrakar et al., 2000]. In der Folge steigt die Konzentration an aktivem Cyclin E/CDK2 und Cyclin A/CDK2, was endgültig die „Hyperphosphorylierung“ des pRb-Proteins bewirkt.

Die Aminosäuren Ser795, Ser807 und Ser811 werden ebenfalls von Cyclin D/CDK4 phosphoryliert. Ser795 scheint wesentlich für die wachstumshemmende Wirkung des pRb-Proteins zu sein, denn Mikroinjektion einer nicht phosphorylierbaren S795A-Mutante in pRB-negative Zellen bewirkt einen G₁-Arrest [Connell-Crowley et al., 1997]. Über die Reste Ser807 und Ser811 wird z. B. die Abelson-Kinase (c-Abl) gebunden, die für die aktivierende Phosphorylierung der RNA-Polymerase II zuständig ist.

Der Übergang vom „hyperphosphorylierten“ in den „hypophosphorylierten“ Zustand am Ende der Mitose erfolgt durch Mitglieder der PP-1, die pRb dephosphorylieren und in den aktiven, wachstumshemmenden Zustand zurücksetzen [Tamrakar et al., 2000].

2.3 Apoptose

Die Apoptose ist ein genetisch programmierter Prozess, der einen geregelten Abbau von überflüssigen oder geschädigten Zellen ermöglicht und die Zellhomöostase reguliert. Die morphologischen Merkmale der Apoptose sind in Abb. 36 dargestellt. Zuerst schrumpft der Zellkern und das Chromatin verdichtet sich. Schließlich stülpen sich Bläschen aus der Plasma- und Kernmembran. Membranumschlossene Vesikel, die sog. „Apoptose-Körperchen“, schnüren sich ab [Wagener, 1999]. Dem gegenüber wird die Nekrose (s. Abb. 36, unten) meist durch physikalische oder chemische Schädigungen verursacht. Aufgrund einer gestörten Osmoregulation schwellen die Zellen an und platzen schließlich. Im Gegensatz zur Apoptose, bei der keine Zellbestandteile in die Umgebung austreten, ist bei der Nekrose die Phagozytose von entzündlichen Prozessen begleitet [Wagener, 1999].

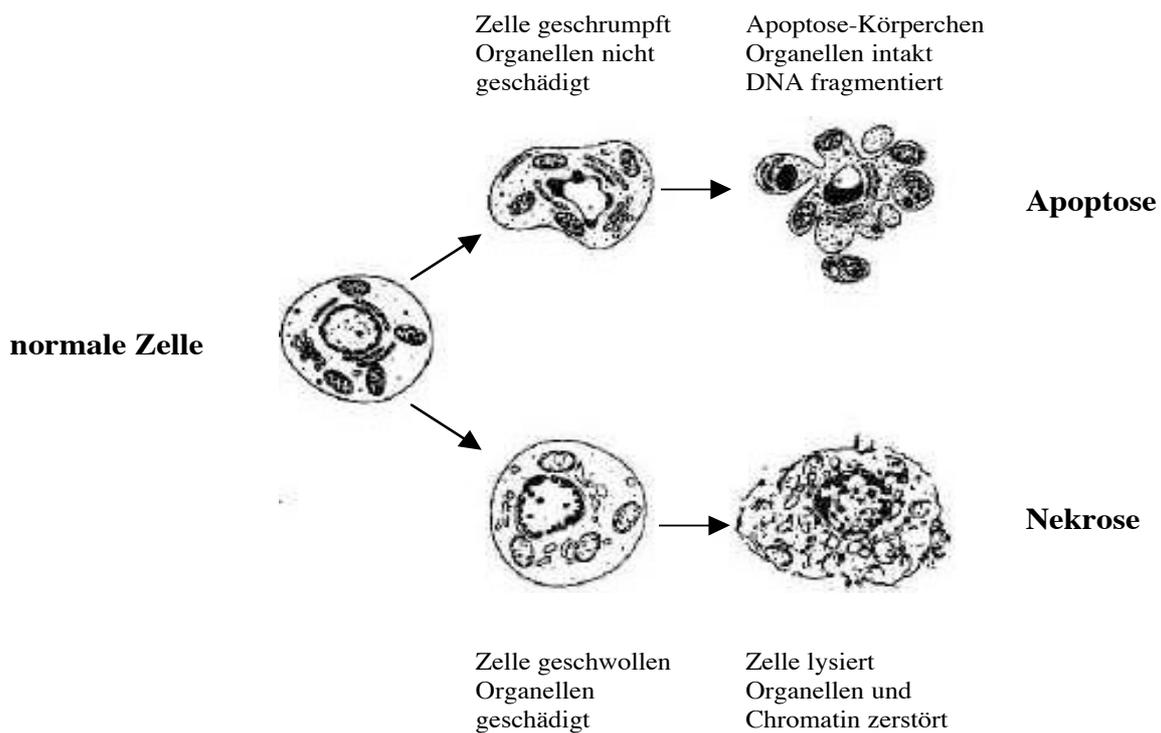


Abbildung 36: Morphologie der Apoptose [Darzynkiewicz et al., 1997].

2.3.1 Die Caspasen als Vermittler der Apoptose

Die Induktion der Apoptose ist sowohl durch interne als auch externe Signale möglich. Apoptose kann durch den Verlust des Zell-Zellkontaktes, durch die Besetzung von sog. „Todesrezeptoren“ mit Botenstoffen, durch genotoxische Substanzen und durch Erhöhung des cAMP-Spiegels (s. Kapitel 2.3.2) ausgelöst werden. Ebenso können UV- oder Röntgenstrahlung über eine irreparable Schädigung des genetischen Materials zur Apoptose führen.

Trotz der unterschiedlichen Induktionsmöglichkeiten besitzen alle Apoptoseauslöser ein gemeinsames Ziel, die Aktivierung einer Caspase-Kaskade. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Der Name Caspase setzt sich zusammen aus Cystein-Proteinase mit Aspartat-Substratspezifität.

Beim Menschen sind bisher 14 verschiedene Caspasen bekannt, die hierarchisch in einer Kaskade angeordnet sind. Die Kaskade beginnt mit der Aktivierung von Initiator-Caspasen, die aus ihrer inaktiven Zymogen-Form in die aktive Form überführt werden. Diese Initiator-Caspasen aktivieren wiederum die sog. Effektor-Caspasen. Am Ende der Kaskade aktivieren oder inaktivieren die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 kritische Proteinsubstrate, die letztendlich die Apoptose erzwingen [Wagener, 1999; Zhivotovsky et al., 1999].

Alle Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert, bestehend aus einer Prodomäne und einer großen und einer kleinen Untereinheit. Die Proenzyme werden durch Entfernen der Prodomäne und Spaltung zwischen der großen und kleinen Untereinheit prozessiert. Die große und die kleine Untereinheit bilden ein Heterodimer. Im aktiven Enzym sind zwei Heterodimere zu einem Tetramer zusammengelagert (s. Abb. 37).

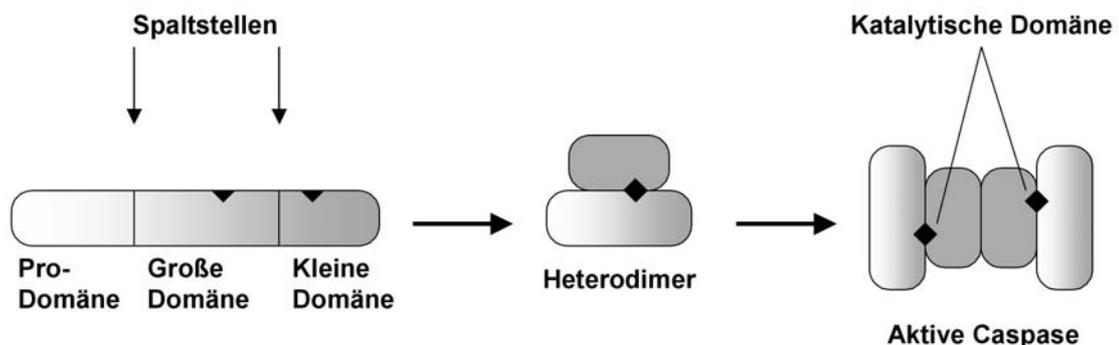


Abbildung 37: Struktur und Aktivierungsmechanismus von Caspasen. Das aktive Enzym ist ein aus zwei Heterodimeren bestehendes Tetramer [Wagener, 1999].

Je nach Zelltyp und Auslöser kann Apoptose über drei verschiedene Signalwege ausgelöst werden (s. Abb. 38) Bei dem extrinsischen Weg werden die „Todesrezeptoren“ durch Bindung von Liganden wie FasL oder TNF (tumor necrosis factor) aktiviert und lösen die Initiator-Caspasen-8 und -10 aus.

Bei dem intrinsischen Weg, der z. B. nach DNA-Schädigung über das Tumorsuppressorprotein p53 induziert wird, spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle. Bei Aktivierung öffnen sich Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran und lassen Cytochrom C in das Zytosol austreten. Im Zytoplasma bildet sich aus Cytochrom C, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) und der Procaspase-9 das sog. „Apoptosom“. Aus dem Apoptosom wird mit dATP (Desoxyadenosintriphosphat) proteolytisch die aktive Caspase-9 freigesetzt.

Ein dritter, durch Stress ausgelöster Signalweg vermittelt über eine Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum die Aktivierung der Caspase-12.

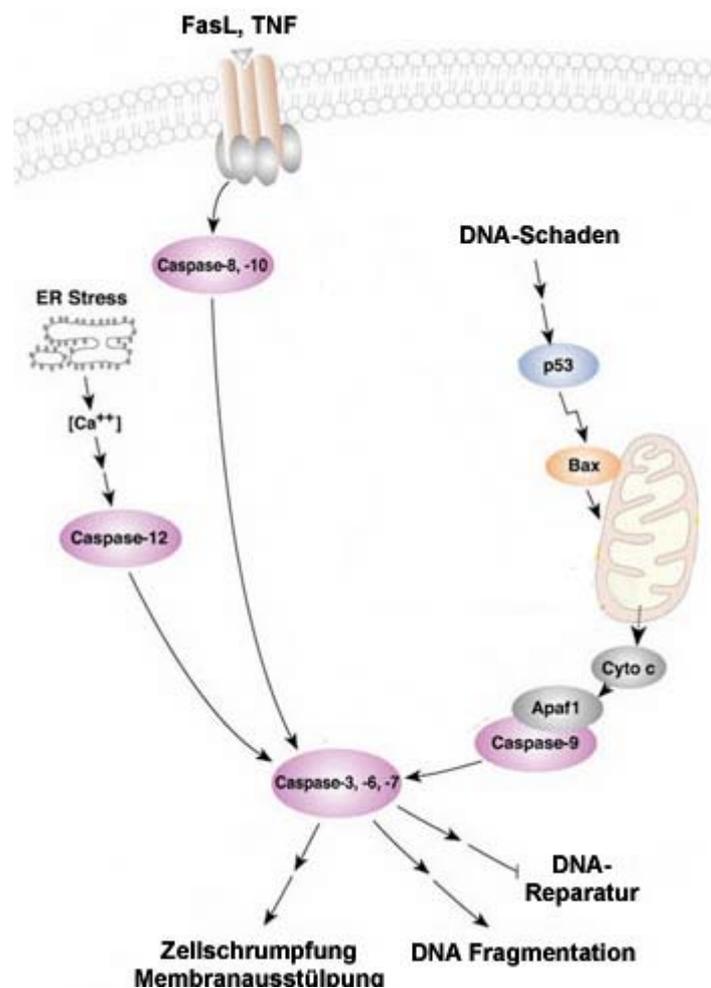


Abbildung 38: Regulation der Apoptoseinduktion und Ablauf der Caspase-Kaskade. Cyto c: Cytochrom C, Apaf1: apoptotic protease activating factor, Bax: apoptosevermittelndes Mitglied der BCL-2 Familie (B-Cell-Lymphom) [Cell Signaling TECHNOLOGY™; modifiziert].

Das gemeinsame Ziel der drei Wege ist die Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Diese Caspasen spalten letztendlich die Enzyme, die das Absterben der Zelle herbeiführen. Als Beispiel ist z. B. die Fragmentierung der DNA Resultat der Aktivierung von Endonukleasen. Die Wirkung der Caspasen führt zur Auflösung der Umgebungskontakte und zur Reorganisation des Zytoskeletts. Zudem wird die DNA-Synthese verhindert und vorhandene DNA abgebaut [Wagener, 1999].

2.3.2 Apoptoseinduktion durch cAMP-erhöhende Substanzen

In der Literatur gibt es zahlreiche Belege, dass durch Erhöhung des cAMP-Spiegels Apoptose ausgelöst werden kann. Mikroinjektion der katalytischen Untereinheit der PKA in Zellen der myeloischen Leukämiezelllinie IPC-81 führt, ebenso wie die Behandlung mit cAMP-Analogen, zur Induktion von Apoptose [Lanotte et al., 1991; Vintermyr et al., 1993]. In der murinen Spindelzellkarzinomzelllinie CarB und in der großzelligen Bronchialkarzinomzelllinie LXFL529L führt die Hemmung der cAMP-hydrolysierenden PDE4 zu einem lang anhaltenden Anstieg des cAMP-Spiegels und zur Apoptoseinduktion [Marko et al., 1998].

Es gibt eine Reihe von cAMP-erhöhenden Wirkstoffen. So bewirkt die Aktivierung der Adenylat-Zyklase durch das aus *Coleus forskohlii* gewonnene Triterpen Forskolin einen signifikanten Anstieg des cAMP-Gehaltes. Ebenso verursacht eine Hemmung des cAMP-Abbaus durch unspezifische PDE-Inhibitoren, wie dem ebenfalls in der folgenden Abbildung dargestellten Isobutylmethylxanthin (IBMX), einen cAMP-Anstieg in der Zelle.

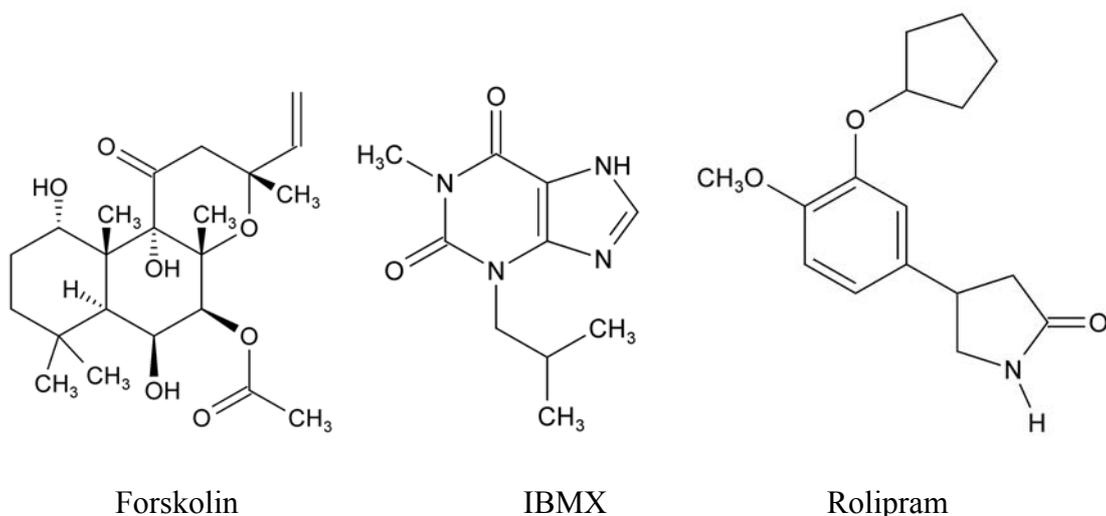


Abbildung 39: Strukturformeln von Forskolin, Isobutylmethylxanthin (IBMX) und Rolipram.

Ein weiteres Beispiel ist die durch den PDE4-Hemmstoff Rolipram (s. Abb. 39) in B-CLL Zellen (B-cell chronic lymphocytic leukemia) ausgelöste Apoptose. Als wirkungsrelevant stellte sich eine PKA-abhängige Expressionssenkung des anti-apoptotischen BCL-2 sowie eine Expressionssteigerung des pro-apoptotischen BAX heraus [Siegmond et al.; 2001].

2.3.3 Apoptoseinduktion durch Pteridine

Die Substanzklasse der Pteridine ist in der Natur weit verbreitet als Pigment in Augen und Flügeln von Insekten. In unserem Arbeitskreis konnte gezeigt werden, dass substituierte Pteridine zum Teil potente Inhibitoren der PDE4 und des Wachstums maligner Tumorzelllinien sind. Aus einer Vielzahl untersuchter Derivate dieser Substanzklasse zeigt das 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin, kurz E481 (s. Abb. 40) die stärkste Hemmwirkung auf die PDE4. E481 hemmt die Aktivität von isolierter PDE4 aus Tumormaterial im nanomolaren Bereich ($IC_{50} = 16 \text{ nM}$) [Merz et al., 1998].

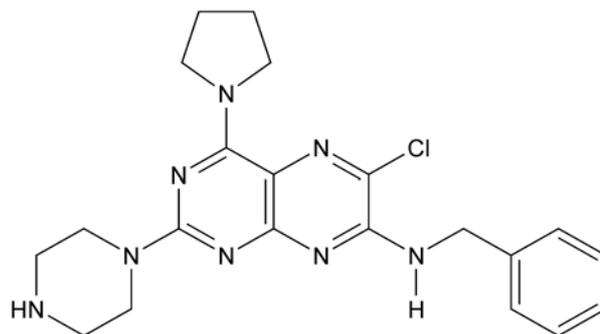


Abbildung 40: Strukturformel von 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin (E481).

In allen bisher untersuchten Tumorzelllinien konnte durch Inkubation mit E481 eine konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden. E481 bewirkt eine Arretierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase des Zellzykluses, während eine verlängerte Inkubation oder höhere Substanzkonzentrationen zur Apoptose führen [Marko et al., 1998]. In der hochmalignen murinen Spindelzellkarzinomzelllinie CarB konnte ein signifikanter und lang anhaltender cAMP-Anstieg gemessen werden. Der erhöhte cAMP-Gehalt bewirkt eine verstärkte Bindung nukleärer Proteine an das cAMP responsive element (CRE) [Wagner, 1998; Wagner, 2002; Jakobs, 2002]. Aus konfokalmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass E481 hauptsächlich mit dem endoplasmatischen Retikulum kolokalisiert ist. Da aber das Targetenzym PDE4 zu mehr als 80 % im Zytosol zu finden ist, ist der Inhibitor nur bedingt zu einer effektiven Hemmung in der Lage [Marko et al., 2002].

In unserer Arbeitsgruppe wurde von Merz et al. (1998) und Müller (2000), basierend auf der Leitstruktur des potenten PDE4-Inhibitors E481, eine Reihe unterschiedlich substituierter Pteridine synthetisiert. Struktur-Aktivitätsuntersuchungen deuten darauf hin, dass der lipophile Substituent in 4-Position und das basische Zentrum in 4'-Position des Piperazinringes für die biologische Wirksamkeit von entscheidender Bedeutung sind. Die Bedeutung des Chlor-Atoms in 6-Position konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Der Ersatz durch ein H-Atom führt allerdings zu einer schwächeren Wirkung in Bezug auf die Wachstums- und PDE4-Hemmung.

Das 2-(2-Aminoethylamino)-substituierte Derivat E584 (s. Abb. 41) hat im Vergleich zu E481 ein um den Faktor 200 geringeres PDE-hemmendes Potential am isolierten Enzym [Merz et al., 1998]. In der humanen großzelligen Lungenkarzinomzelllinie LXFL-529L konnte bis zu einer Konzentration von 5 μM E584 keine signifikante PDE-Hemmung detektiert werden [Kunz, 2000]. Trotzdem zeigt E584 eine mit E481 vergleichbare Wachstumshemmung im Bereich von 2 bis 3 μM [Merz et al., 1998].

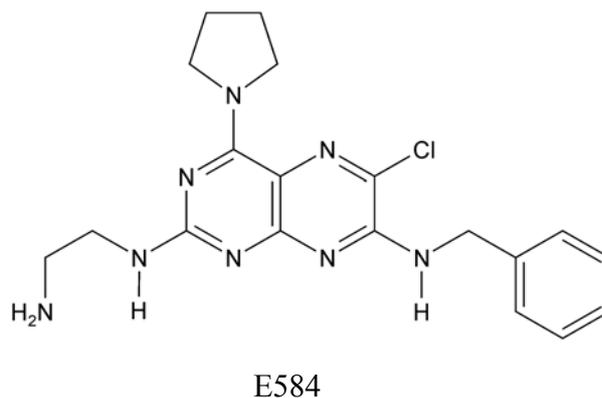


Abbildung 41: Strukturformel von 2-(2-Aminoethylamino)-7-benzylamino-6-chloro-4-pyrrolidino-pteridin (E584).

Die substanzspezifischen Wirkungsunterschiede legen den Schluss nahe, dass neben dem cAMP-Signalweg auch andere Proliferation- und Apoptose-regulierende Signalelemente durch Pteridine beeinflusst werden können. Erste Untersuchungen in der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 haben gezeigt, dass E481 in wachstumhemmenden Konzentrationen eine Hemmung der PI3K bewirkt [Kemény, 1998]. Inwieweit eine Beeinflussung des PI3K/PKB- bzw. des MAPK-Signalweges die wachstumhemmende Eigenschaft der Pteridine erklären könnte, war unter anderem Ziel dieser Arbeit.

3 Problemstellung und Zielsetzung

7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin (E481) ist ein potenter Hemmstoff der spezifisch cAMP-hydrolysierenden Phosphodiesterase-Isoenzymfamilie 4 (PDE4). E481 hemmt das Wachstum humaner Tumorzellen im unteren mikromolaren Bereich [Marko et al., 2000]. Bereits innerhalb einer Stunde bewirkt E481 morphologische Veränderungen des Zytoskeletts an der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und an der Vulvakarzinomzelllinie A431 [Meiers, 1996; Kemény, 1998].

E584 ist ein Derivat von E481, das anstelle des Piperazinosubstituenten in Position 2 des Pteridinringes einen 2-Aminoethylaminorest trägt. E584 erreicht eine vergleichbar starke Wachstumshemmung wie E481, bewirkt jedoch keine morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts. An isolierter PDE4 besitzt E584 eine um den Faktor 200 geringere Hemmwirkung. Hieraus ist zu schließen, dass nicht allein das PDE4-hemmende, cAMP-erhöhende Potential der Substanzen wirkungsrelevant sein kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Wirkmechanismus substituierter Pteridine im Hinblick auf die Beeinflussung weiterer potentiell relevanter proliferations- und zytoskelettregulierender Signaltransduktionswege. Von zentraler Bedeutung sind diesbezüglich der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Transduktionsweg und die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade. In A431-Zellen konnte bereits eine Hemmung der PI3K-Aktivität durch E481, nicht aber durch E584 nachgewiesen werden. Die Beeinflussung des MAPK-Signalweges durch E481 und E584 ist ebenfalls bekannt [Meiers, 2000]. Ein Anfangselement des MAPK-Signalweges, die Tyrosinkinaseaktivität des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, epidermal growth factor) Rezeptors, wird durch E584 besser gehemmt als durch E481. Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK1 (Ets like kinase 1), der als Endpunkt des MAPK-Transduktionsweges untersucht wurde, wird hingegen in wachstumshemmenden Konzentrationen nur von E481 effektiv gehemmt. Weder die PI3K-Aktivitätshemmung noch die Hemmung des MAPK-Signalweges können somit die wachstumshemmenden Eigenschaften beider Derivate erklären. Möglicherweise tragen sie aber wesentlich zu den durch E481 induzierten morphologischen Veränderungen in A431 und MCF-7 Zellen bei [Kemény, 1998].

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Relevanz des Substituenten in Position 6 für die Beeinflussung des MAPK-Signalweges zu klären. Anhand von 6-Alkyl- und 6-Alkoxyderiv-

aten sollten Struktur-Wirkungsuntersuchungen bzgl. der Beeinflussung der EGF-Rezeptor Tyrosinkinaseaktivität sowie der ELK1-Phosphorylierung durchgeführt werden.

Im Hinblick auf die Interaktion mit dem PI3K-Signalweg sollte vergleichend festgestellt werden, ob durch Behandlung von MCF-7 Zellen mit dem potenten PDE4-Hemmstoff E481 und dem deutlich schwächeren PDE4-Hemmer E584 die PI3K-Aktivität in ähnlicher Weise wie in A431 Zellen beeinflusst wird. Ferner sollte ein in Position 2 morpholinosubstituiertes Derivat von E481 (E495) sowohl an MCF-7 als auch an A431 Zellen untersucht werden. Mittels morphologischer Untersuchungen sollte bestimmt werden, inwieweit eine eventuelle Beeinflussung der PI3K mit einer Veränderung des Actinskeletts einhergeht.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Wirkung der E481-vermittelten PI3K-Aktivitätshemmung auf nachgeschaltete Signalelemente. Die PI3K vermittelt die Aktivierung der Protein Kinase B (PKB), wodurch proliferations- und apoptoseregulierende Enzyme beeinflusst werden. Eine Hemmung der PI3K-Aktivität könnte über eine Aktivierung der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) eine Arretierung der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus und dadurch Wachstumshemmung bewirken. Eine Dephosphorylierung von BAD (BCL-2 antagonist; causing cell death) könnte wesentlich für die Apoptoseinduktion sein. Da auf allen Ebenen Wechselwirkungen mit dem cAMP-Signalweg stattfinden können, war es von Interesse, ob in A431 Zellen die Hemmung des PI3K-Signals überwiegt oder durch die Aktivierung des cAMP-Signalweges eine gegenregulierende Phosphorylierung erfolgt. Hierzu sollte mittels Western Blot-Technik der Phosphorylierungszustand der PKB, der GSK3b und des pro-apoptotischen BADs überprüft werden. Ergänzend dazu sollte die Auswirkung von E481 auf die Phosphorylierung des zellzyklusregulierenden Retinoblastoma-Proteins aufgezeigt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt waren Untersuchungen zum Mechanismus der zytoskelettmodulierenden Wirkung von E481. Han & Rubin (1996) konnten in murinen Y1-Zellen der Nebennierenrinde durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels eine minutenschnelle Tyrosin-Dephosphorylierung des Adhäsionsproteins Paxillin und dessen Translokation ins Zytoplasma hervorrufen. Die Zellen zeigten ein morphologisches Erscheinungsbild, das sowohl im Hinblick auf die Zellform als auch hinsichtlich Veränderungen des Actinskeletts große Ähnlichkeit mit den Veränderungen aufwies, die nach E481 Behandlung von A431 Zellen beobachtet wurden. Deshalb sollte die Beeinflussung der Tyrosin-Phosphorylierung von Paxillin durch E481 sowie die möglichen Veränderungen der Paxillinlokalisation untersucht werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Wirkung ausgewählter Pteridin-Derivate auf den Signalweg der mitogen-aktivierten Protein Kinase

Der potente PDE4-Hemmer 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin (E481) inhibiert das Zellwachstum der humanen großzelligen Lungenkarzinomzelllinie LXFL529L und der epidermalen Vulvakarzinomzelllinie A431. Strukturähnliche Derivate mit geringer PDE4-Hemmkapazität weisen ebenfalls wachstumshemmende Eigenschaften auf. Ein alternativer Weg zur Induktion von Wachstumshemmung besteht in der Inhibierung des EGF-Rezeptors und des nachgeschalteten mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK)-Signalweges [Partik et al., 1999]. Eine Vielzahl von E481-Derivaten wurde bereits von Meiers (2000) auf eine Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptors aus A431 Zellen untersucht. Zur Ergänzung der Struktur-Wirkungsuntersuchungen sollten 6-Alkyl- und 6-Alkoxyderivate folgen. Des Weiteren sollte der Wirkungsgrad der Substanzen auf die ELK1-Phosphorylierung mit Hilfe eines Luciferase-Reportergen-Assays bestimmt werden. Beide Testsysteme wurden von Meiers in unserem Arbeitskreis etabliert (2000).

4.1.1 Untersuchung zur Hemmbarkeit der Protein Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors aus A431 Zellen anhand eines Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Die Zelllinie A431 zeichnet sich durch eine hohe EGF-Rezeptordichte von 2×10^6 Rezeptoren pro Zelle aus [Davidson et al., 1987]. Der EGF-Rezeptor in A431 Zellen besteht zu 10 % aus der kinasedefizienten ErbB3- und zu 90 % aus der ErbB1-Isoform [Gillham et al., 1999; Yarden & Sliwkowski, 2001]. Die Aufreinigung erfolgt mittels Weizenkeimlektin-Agarose, die selektiv die N-Acetylglucosaminreste der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors bindet [Gastpar, 1997]. Diese EGF-Rezeptor-Präparation, die keine weiteren Membranproteine mit Tyrosinkinase-Aktivität enthält, wird im 96-well-Mikrotiterplatten-ELISA eingesetzt. Als Substrat werden die Platten mit dem synthetischen Peptid Poly (Glu, Tyr) im Verhältnis 4:1 beschichtet. Die Reaktion erfolgt nach Zugabe von ATP-haltigem Assaypuffer über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 35-37 °C. Für die Detektion wurde von dem ursprünglich ver-

wendeten Peroxidase-gekoppelten Phosphotyrosin-Antikörper der Firma Boehringer Mannheim (Klon 3-365-10) auf den der Firma Santa Cruz (sc-7020) gewechselt. Das Peroxidase-Substrat ist das 2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolinsulfonat] (ABTS). Da das Reaktionsprodukt nur über einen Zeitraum von 60 Minuten stabil ist, wird die Verdünnung der EGF-Rezeptor-Präparation so eingestellt, dass die Reaktion der unbehandelten Probe nach 30 Minuten eine optische Dichte von 1,2 bei 405 nm aufweist. Als positive Kontrolle einer Tyrosinkinase-Hemmung wird Tyrphostin AG 1478 ($IC_{50} = 2,4 \mu\text{M}$) in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ eingesetzt [Meiers, 2000].

4.1.1.1 Das Tyrosinkinase-hemmende Potential der in Position 6 substituierten E481 Derivate E276, E281 und E286

Untersucht wurden das 6-Methyl-(E276), 6-Methoxy-(E281) und 6-Ethoxy-(E286) Derivat von E481 (Strukturen siehe Tabelle 2). Die Wirkung der verschiedenen substituierten Pteridine wurde bei $30 \mu\text{M}$ verglichen. Diese Konzentration wurde bereits von Meiers (2000) als Vergleichskonzentration eingeführt und ist die höchste Konzentration, bei der alle bisher getesteten Pteridine in DMSO löslich waren.

Die verbleibende Tyrosinkinase-Aktivität bei den entsprechenden Substanzkonzentrationen ist in Abb. 42 dargestellt. In Tabelle 2 sind die dazugehörigen Werte bei einer Substanzkonzentration von $30 \mu\text{M}$ aufgeführt. Die Ergebnisse der Leitsubstanz E481 und der in Position 6 unsubstituierten Verbindung E586 wurden im Hinblick auf eine bessere Diskutierbarkeit nachfolgender Ergebnisse mit in die Tabelle aufgenommen.

Das 6-methylsubstituierte Derivat E276 hemmt die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) bei $30 \mu\text{M}$ um 11 %, während das Methoxyderivat E281 bei $30 \mu\text{M}$ eine Verringerung der Kinaseaktivität von 8 % erreicht. Bei höheren Konzentrationen inhibiert E281 die RTK stärker als E276. Das Ethoxyderivat E286 verringert die Kinase-Aktivität bei $30 \mu\text{M}$ um 21 % und erreicht damit einen vergleichbaren Wert wie E481 [Meiers, 2000].

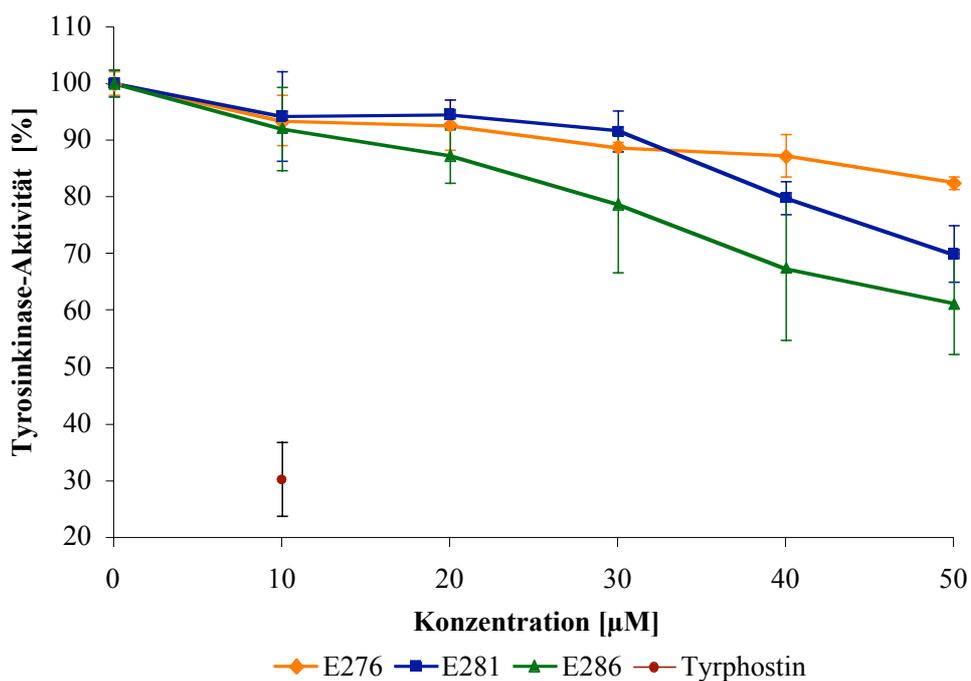


Abbildung 42: RTK-ELISA der Substanzen Tyrphostin, E276, E281 und E286. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von mindestens 2 unabhängigen Versuchsdurchführungen mit Dreifachbestimmung.

Tabelle 2: Werte der RTK-Hemmung durch die Substanzen E481, E586, E276, E281 und E586; (^M) [Meiers, 2000]. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von mindestens 2 unabhängigen Versuchsdurchführungen mit Dreifachbestimmung.

Substanz	Position 6	Hemmung der Kinase-Aktivität bei 30 µM [%]
E481	Chloro-	$22 \pm 7,2^M$ ($IC_{50} = 47,7 \pm 3,5 \mu M^M$)
E586	H	0^M
E276	Methyl-	$11 \pm 0,8$
E281	Methoxy-	$8 \pm 3,6$
E286	Ethoxy-	$21 \pm 12,0$

4.1.2 Untersuchung zur Hemmbarkeit der ELK1 Phosphorylierung anhand eines Luciferase-Reportergen-Assays

Innerhalb des MAPK-Signalweges (siehe 2.1.2) erfolgt nach EGF-Stimulierung eine Signalweiterleitung vom EGF-Rezeptor über verschiedene Enzyme bis in den Zellkern. Dort findet eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK1 statt. In unserem Arbeitskreis wurde von Meiers (2000) ein Reportergen-Assay in A431 Zellen etabliert, der geeignet ist, eine Aussage über das Ausmaß der ELK1-Phosphorylierung nach Substanzeinfluss im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu machen.

Im MAPK-Reportergenassay wird die ELK1-Phosphorylierung indirekt über die Expression eines Luciferasegens gemessen. Dazu werden die A431 Zellen mit einem Fusionsplasmid pFA2-ELK1 und dem Reporterplasmid pFR-Luc mittels FuGENE™6 transfiziert (Abb. 43). Das pFA2-ELK1 Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein, welches aus einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne (GAL4-dbd) und dem phosphorylierbaren Fragment des ELK1 Transkriptionsfaktors, der ELK1-Aktivierungsdomäne besteht [Stratagene Online, Sadowski et al., 1989; Sharif & Sharif, 1999]. Das Protein GAL4 ist ein spezifisch in Hefen exprimierter Transkriptionsaktivator, der die Transkription von Enzymen des Galactose-Metabolismus steuert. Die GAL4-dbd weist keine effizienten Kreuzreaktionen mit Transkriptionsfaktoren von Säugern auf und ermöglicht dadurch ein Arbeiten mit geringer Hintergrund-Luciferase-Aktivität [Stratagene Online]. Das Reportergenplasmid pFR-Luc enthält fünf hintereinander liegende 17mer GAL4 bindende Elemente, auch GAL4 upstream activating sequences (UAS) genannt, die als Promotor fungieren und die Expression des Luciferasegens kontrollieren [Webster et al., 1988].

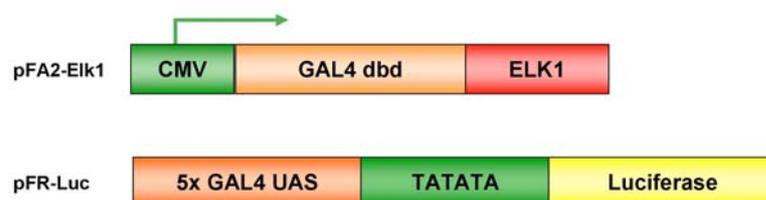


Abbildung 43: Aufbau der verwendeten Plasmide im Reportergen-Assay. dbd: DNA-Bindungsdomäne, UAS: upstream activating sequences, ELK1: ets ähnliche Kinase [Stratagene Online; modifiziert].

Als Kontrollansatz werden Zellen mit einem pFC2-dbd Plasmid, das nur die GAL4-dbd ohne das ELK1-Fragment enthält, und dem Reporterplasmid transfiziert. Dieser Ansatz dient der Erfassung von GAL4-Bindung an das Reporterplasmid, die unabhängig von einer ELK1-Phosphorylierung stattfindet. Ein weiterer Ansatz wird zusätzlich zu dem Reporterplasmid und dem Fusionsplasmid mit einem pFC-MEK1 Plasmid transfiziert. Dieses Plasmid kodiert für eine konstitutiv aktive MEK1 (S217Q, S221Q) und bewirkt eine Phosphorylierung des ELK1 Fragmentes im Fusionsprotein. Der Austausch von Ser217 und Ser221 gegen Glutamin bewirkt einen 7 bis 30-fachen Anstieg der MEK-Aktivität gegenüber dem der Wildtyp-MEK [Alessi et al., 1994]. Des Weiteren fehlt dem Kontrollplasmid pFC-MEK1 die Aminosäuresequenz 35-51, wodurch eine weitere Erhöhung der Basalaktivität um den Faktor 45 erfolgt. Diese Aminosäuresequenz ist im Wildtyp für die Stabilisierung der inaktiven MAPKK zuständig [Mansour et al., 1994]. Dieser Kontrollansatz dient der Überprüfung der Transfektionseffizienz. Eine schematische Darstellung des MAPK-Reporterplasmid-Assays ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

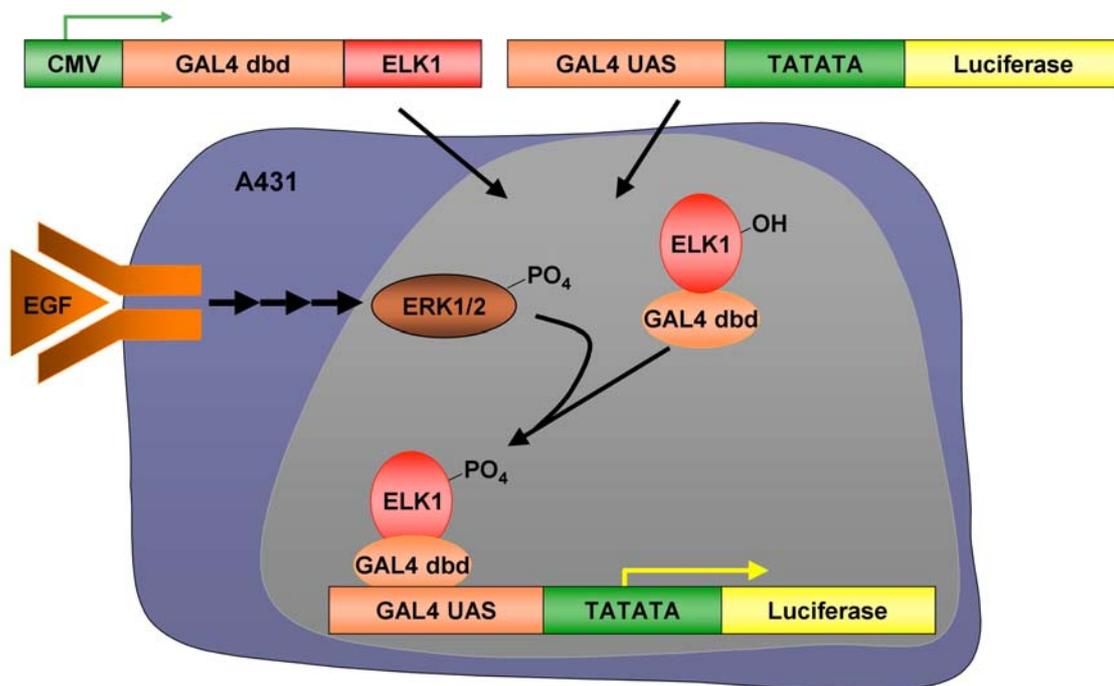


Abbildung 44: Schema des MAPK-Reporterplasmid-Assays. ERK1/2: Extrazellulärsignal-regulierte Kinase, ELK1: Ets ähnliche Kinase (Transkriptionsfaktor), EGF: epidermale Wachstumsfaktor, dbd: DNA-Bindungsdomäne, UAS: upstream activating sequence [Meiers et al., 2001; modifiziert].

Die Transfektion erfolgt am dritten Tag der Zellkultivierung, wobei die A431 Zellen am ersten Tag mit Serum versorgt werden und ab dem zweiten Tag serumdepletiert wachsen. Nach der Transfektion der entsprechenden Ansätze wird weitere 24 Stunden gewartet, bevor die Substanzinkubation stattfindet. Ein Wachstumsstimulus wird 30 Minuten nach Substanzgabe durch 100 ng/ml EGF gesetzt. Weitere 4,5 Stunden später werden die Proben lysiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt.

Durch den EGF-Stimulus kommt es zur Aktivierung der MAPK-Kaskade. Die endogen vorliegende MAPK wird aktiviert und phosphoryliert die Aktivierungsdomäne des Fusionsproteins. Durch eine konformative Änderung bindet GAL4-dbd im Kern an das GAL4-UAS. Dadurch wird die Transkription des Luciferasegens aktiviert. Die Luciferase, die endogen nicht in der Zelle vorhanden ist, kann nach dem Lysieren der Zelle mit Substrat versetzt und die luminochemische Reaktion vermessen werden.

4.1.2.1 Die Hemmung der ELK1 Phosphorylierung durch E281, E286 und E586

Das 6-Methoxy-(E281), 6-Ethoxy-(E286) und das in 6-Position unsubstituierte E586 Derivat von E481 wurden im MAPK-Reporterassay getestet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abb. 45 zu finden. Das Methylderivat E276 und die Leitsubstanz E481 wurden bereits von Meiers (2000) beschrieben und werden aufgrund einer besseren Vergleichbarkeit in der tabellarischen Auflistung der Werte (siehe Tabelle 3) mitgeführt.

Alle drei Derivate hemmen die Luciferase-Aktivität in einem ähnlichen Konzentrationsbereich. Ihr hemmendes Potential wird in Form des IC_{50} -Wertes angegeben. Dieser Wert entspricht der Konzentration, die eine Reduktion der Aktivität um 50 % bewirkt. Die unsubstituierte Verbindung E586 weist einen IC_{50} -Wert von $15 \pm 1,5 \mu\text{M}$ auf. Die Alkoxyverbindungen sind leicht stärkere Hemmer der ELK1-Phosphorylierung und weisen IC_{50} -Werte von $11 \pm 2,1 \mu\text{M}$ (E281) und $9 \pm 1,5 \mu\text{M}$ (E286) auf. Keine der Substanzen zeigt somit ein stärkeres inhibitorisches Potential als die Leitsubstanz E481, die einen IC_{50} von $3 \mu\text{M}$ besitzt. Das zuvor untersuchte methylierte Derivat E276 erreicht einen vergleichbaren Wert wie die in 6-Position unsubstituierte Substanz E584.

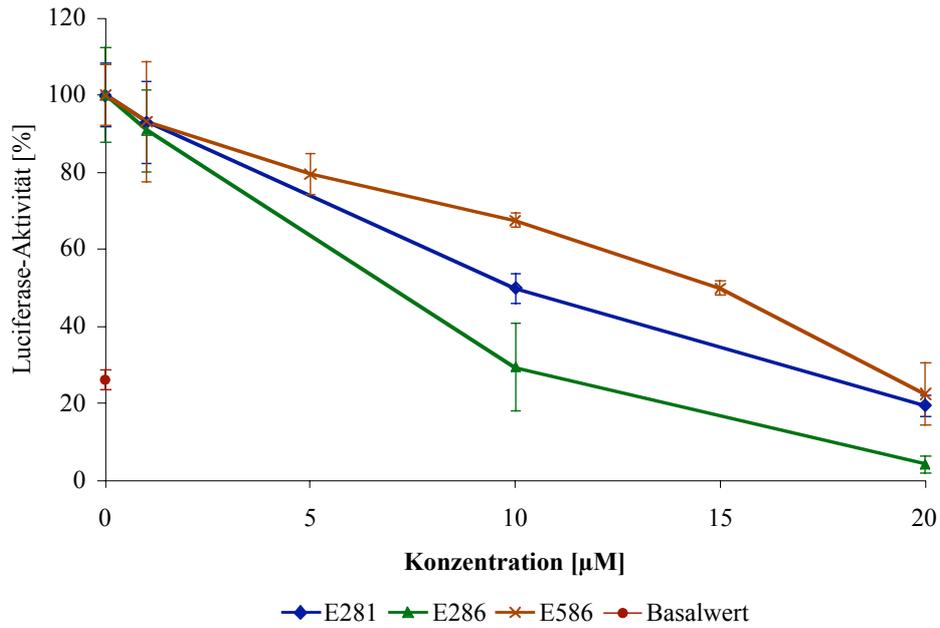


Abbildung 45: Indirekte Bestimmung der ELK1-Phosphorylierung nach Inkubation mit E281, E286 und E586 mittels eines Luciferase-Reporter-Gen-Assays. Der Basalwert zeigt die Luciferaseaktivität ohne EGF-Stimulierung. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD und basieren auf mindestens 2 unabhängigen Versuchsdurchführungen mit Zweifachbestimmung.

Tabelle 3: Werte der ELK1-Phosphorylierung durch die Substanzen E481, E586, E276, E281 und E286; (^M) [Meiers, 2000]. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD von mindestens 2 unabhängigen Versuchsdurchführungen mit Zweifachbestimmung.

Substanz	Position 6	Hemmung der ELK1-Phosphorylierung IC ₅₀ [µM]
E481	Chloro-	ca. 3 µM ^M
E586	H	15 \pm 1,5 µM
E276	Methyl-	ca. 15 µM ^M
E281	Methoxy-	11 \pm 2,1 µM
E286	Ethoxy-	9 \pm 1,5 µM

4.1.3 Diskussion der Ergebnisse der Tyrosinkinase-Hemmung und der ELK1-Phosphorylierung

Anhand verschiedener Derivate der Leitsubstanz E481 sollte die Relevanz des Substituenten in Position 6 für die Hemmung der Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors und für die eventuell resultierende ELK1-Phosphorylierung ermittelt werden. In Tabelle 4 (Seite 61) sind die Hemmungen der Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK), der Luciferaseaktivität, der PDE4 und des Wachstums zusammengestellt. Die in 2-Position veränderten Derivate E495 (2-Morpholino-Derivat) und E584 (2-(2-Aminoethylamino)-Derivat) wurden der Vollständigkeit halber mit aufgeführt, da sie in morphologischen Versuchen (s.4.3) ebenfalls getestet wurden.

Untersuchungen von Meiers (2000) zeigten, dass E584 eine stärkere Hemmwirkung auf die Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors aufweist als die Leitsubstanz E481. Das 2-Morpholino-Derivat, bei dem die basische Aminfunktion in der 4'-Position des Piperazinrestes durch einen Elektronenakzeptor (Sauerstoff des Morpholinorestes) ersetzt wurde, zeigte hingegen keine Hemmwirkung auf die RTK.

Ebenfalls scheint auch der Substituent in Position 6 wesentlich zu sein, denn ein Wasserstoff an dieser Stelle führt zum völligen Verlust der Hemmwirkung [Meiers, 2000]. Die Substitution durch eine Methyl (E276)- oder Methoxygruppe (E281) zeigt bei 30 μM eine schwache Hemmung der RTK. Das Ethoxyderivat (E286) hingegen zeigt im Vergleich zu dem kleineren Methoxysubstituenten eine um den Faktor 2 verstärkte Hemmwirkung und erreicht damit annähernd den Wirkungsgrad der Leitsubstanz (bei 30 μM). Die Wechselwirkung mit der RTK scheint somit durch die Größe der Substituenten nicht behindert zu werden.

Die RTK-Hemmbarkeit wird somit wesentlich durch das stark elektronegative Chlor in 6-Position und durch die Elektronendonorfunktion in der 4'-Position des Restes in 2-Position geprägt.

Aus den Untersuchungen über die ELK1-Phosphorylierung ergibt sich folgendes Bild:

Der Bereich für die Hemmung der Luciferase-Aktivität liegt weit unterhalb der Konzentration für eine Hemmung der RTK. Hierbei ist zu bedenken, dass der RTK-ELISA ein artifizielles System ist. Der EGF-Rezeptor könnte als Bestandteil der Plasmamembran eine andere Konformation besitzen als nach der Solubilisierung im RTK-ELISA. Zudem wird das Substrat der Tyrosinkinase am Boden der Mikrotiterplatte fixiert, so dass möglicherweise seine Zugänglichkeit für die gelöste Tyrosinkinase erschwert ist. Betrachtet man den für Tyrphostin AG1478 literaturbekannten IC_{50} -Wert der EGF-Rezeptor-Hemmung von 3 nM [Partik et al., 1999] gegenüber dem im RTK-ELISA ermittelten von 2,4 μM [Meiers, 2000], so kann man eine stark verminderte Hemmwirkung innerhalb des Testsystems erkennen. Es ist also durch-

aus möglich, dass die EGF-Rezeptor-Hemmung durch Pteridine in der intakten Zelle in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich wie die Hemmung der ELK1-Phosphorylierung stattfindet.

Unter diesem Gesichtspunkt sind neben den RTK- und ELK1-Hemmkonzentrationen der Alkoxyverbindungen auch die Werte der Leitsubstanz E481 und die des Methoxyderivats miteinander vergleichbar. Die zunehmende Hemmung der RTK in der Reihenfolge E276 (Methylderivat), E281 (Methoxyderivat), E286 (Ethoxyderivat) und E481 (Chlorderivat) ist auch bei der Luciferase-Hemmung wieder zu finden. Bei der Wachstumshemmung an LXFL529L Zellen sowie an den sensitiveren A431 Zellen ist diese Reihenfolge ebenfalls erhalten.

Die auffälligste Abweichung ergibt sich aus der Betrachtung von E584. Dieses, in Position 2 des Pteridinsystems, 2-Aminoethylamino-substituierte Derivat ist der potenteste RTK-Hemmer unter den hier diskutierten. E584 zeigt aber bei der Luciferase-Inhibierung eine vergleichsweise niedrige Hemmkapazität und rangiert dort, wie auch bei der Wachstumshemmung an LXFL529L Zellen, im Bereich der Methoxyverbindung E281. Eine Erklärung für diese Abweichung könnte die um den Faktor 200 geringeren PDE4-Hemmung am isolierten Enzym im Vergleich zu E481 sein. Möglicherweise wird durch eine PDE4-Hemmung und die daraus resultierende Aktivierung der PKA [gezeigt in LXFL529L Zellen; Wagner, 1998] entweder direkt oder über Hemmung der p21-aktivierten Proteinkinase (PAK) zusätzlich der MAPK-Signalweg blockiert. Somit könnte der starke PDE4-Hemmer E481 sowohl durch Hemmung des EGF-Rezeptors als auch durch Blockierung des MAPK-Signalweges auf der Stufe von Raf zur Reduktion der ELK1-Phosphorylierung beitragen.

Bei den Alkoxyderivaten und der Alkylverbindung findet allerdings trotz der relativ starken PDE4-Hemmung am isolierten Enzym nur eine vergleichbar schwache Hemmung der ELK1-Phosphorylierung statt. Da ein PDE4-Hemmer unterhalb des EGFR in die Signaltransduktion eingreift, ist anzunehmen, dass eine Reduktion der ELK1-Phosphorylierung in erster Linie von dem PDE4-hemmenden Potential der Substanz bestimmt wird. Ein weiteres Kriterium für die Wirksamkeit ist die Aufnahme der Substanz in die Zelle. An LXFL529L Zellen wurde von Müller (2000) nach 6-stündiger Inkubation für die Leitsubstanz mit 1 μM eine Aufnahme ins Zytosol von 0,44 μg Substanz / mg Protein detektiert. Im Gegensatz dazu zeigen die Alkyl- und Alkoxyderivate E276 und E281 eine um den Faktor 3 bessere Aufnahme ins Zytosol. Somit fehlt auch hier die eindeutige Korrelation zur Hemmung der ELK1-Phosphorylierung. Das Morpholinoderivat E495 wurde aufgrund seiner fehlenden RTK-Hemmwirkung nicht im Luciferase-Reporter-Gen-Assay untersucht.

Des Weiteren könnten die durch E481 bewirkten Zytoskelettveränderungen, auf die später noch eingegangen wird, über den Integrin-Signalweg eine zusätzliche Beeinflussung des MAPK-Signalweges bewirken.

Tabelle 4: Zusammenstellung der Ergebnisse der EGFR-, ELK1-, PDE4- und Wachstumshemmung von E276, E281, E286, E481, E495, E584, E586;

Substanz	Position 2	Position 6	Hemmung der RTK-Aktivität bei 30 μM [%]		Hemmung der ELK1-Phosphorylierung		Wachstumshemmung		PDE4-Hemmung ¹	
			IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ A431 [μM]	IC ₅₀ A431 [μM]	IC ₅₀ LXFL529L [μM]	IC ₅₀ A431 [μM]	IC ₅₀ [μM]	
E481	Piperazino	Chloro	22 \pm 7,2 % ^M 47,7 \pm 3,5 μM ^M	ca. 3 ^M	2,3 \pm 0,3* 1,1 \pm 0,1 ^M	0,016 \pm 0,0005*				
E584	2-Amino-ethylamino	Chloro	42 \pm 10,3 % ^M 34,8 \pm 1,2 μM ^M	ca. 12 ^M	3,2 \pm 0,4* 2,3 \pm 0,4 ^M	3,7 \pm 0,5*				
E495	Morpholino	Chloro	0 % ^M	n.t.	> 20* n.t.	2,5 \pm 0,4*				
E586	Piperazino	H	0 % ^M	15 \pm 1,5	7,3 \pm 0,7* 4,2 \pm 0,3 ^M	0,36 \pm 0,09*				
E276	Piperazino	Methyl	11 \pm 0,8 %	ca. 15 ^M	4,1 \pm 0,3** 3,7 \pm 0,7 ^M	0,2 \pm 0,2**				
E281	Piperazino	Methoxy	8 \pm 3,6 %	11 \pm 2,0	3,5 \pm 0,2** n.t.	0,09				
E286	Piperazino	Ethoxy	21 \pm 12,0 %	9 \pm 1,5	2,7 \pm 0,3** n.t.	0,7				

^(M) [Meiers, 2000]; (*) [Merz et al., 1998]; (**) [Müller, 2000]; (n.t.) not tested; ¹ (persönliche Mitteilung von Kunz und Pahlke) Werte ohne Standardabweichung konnten nur einmal bestimmt werden und müssen für eine endgültige Betrachtung noch einmal bestätigt werden.

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Tyrosinkinase-Hemmung und der ELK1-Phosphorylierung

Die Hemmung der RTK-Aktivität wurde anhand einer EGF-Rezeptor-Aufarbeitung aus A431 Zellen in einem ELISA-System bestimmt. Der Einfluss auf die ELK1-Phosphorylierung wurde indirekt über die Senkung der Luciferase-Aktivität in einem Reporter-Gen-Assay bestimmt. Die gefundenen Werte der RTK-Hemmung liegen weit unterhalb wachstumsinhibierender Konzentrationen, was möglicherweise auf die fehlende Sensitivität des gewählten Testsystems zurückzuführen ist.

Das RTK-hemmende Potential der in Position 6 veränderten Verbindungen liegt ausnahmslos unter dem der Leitsubstanz E481. Es nimmt vom Methylderivat E276 über das Methoxyderivat E281 zur Ethoxyverbindung E286 zu. Während die Methyl- und Methoxyverbindungen bei 30 μM eine Hemmung von ungefähr 10 % aufweisen, erreicht E286 bereits einen mit der Leitsubstanz E481 vergleichbaren Wert von 21 %. Nach Entfernen des Substituenten in Position 6, wie in Verbindung E586 realisiert, kann keine Hemmung der RTK-Aktivität mehr detektiert werden.

In Position 2 kann durch Einführung eines Morpholinosubstituenten keine RTK-Hemmung erzielt werden, während der frei bewegliche Substituent der Verbindung E584 zu einer Verbesserung der Leitsubstanz um den Faktor 2 führt.

Die ELK1-Phosphorylierung wird durch das Zusammenspiel mehrerer Parameter und Signalwege beeinflusst. Die Hemmung des EGF-Rezeptors, die PDE4-Hemmung bei gleichzeitiger Aktivierung des cAMP-Signalweges, die Verfügbarkeit der Pteridinderivate in der Zelle sowie das Zytoskelett sind mögliche einflussnehmende Faktoren. Welcher Signalweg in welchem Ausmaß an der Reduktion der Luciferase-Aktivität beteiligt ist, kann durch die bisherigen Daten nicht geklärt werden.

E481 hemmt die Luciferase-Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von ca. 3 μM und ist damit stärkster Inhibitor der ELK1-Phosphorylierung. Danach folgen die Substanzen E286, E281, E584, E276 und E586 mit IC_{50} -Werten im Bereich von 9 bis 15 μM .

Während die Abnahme der ELK1-Phosphorylierung durchaus mit einer gesteigerten Wachstumshemmung in Zusammenhang gebracht werden kann, existiert für keinen der oberhalb von ELK1 eingreifenden Signalwege eine eindeutige Korrelation zur ELK1-Hemmung.

4.2 Wirkung ausgewählter Pteridin-Derivate auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase

Aus Untersuchungen von Meiers (2000) über die Beeinflussung des MAPK-Signalweges (siehe 4.1) konnte für die Leitsubstanz E481 und für das 2-(2-Aminoethylamino)-Derivat E584 eine geringe Beeinflussung der RTK-Aktivität abgeleitet werden. Für das Morpholino-derivat E495 konnte keine EGF-Rezeptorhemmung detektiert werden (siehe Tabelle 4, Seite 61). Des Weiteren ist aus Arbeiten von Meiers (1996) bekannt, dass E481 in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 binnen einer Stunde Zytoskelettveränderungen bewirkt. Die Zellen schrumpfen und runden sich ab, während gleichzeitig eine Reduktion des Actin- und Tubulinfilamentsaums stattfindet [Meiers, 1996].

Aufgrund dieser Zytoskelettveränderungen richtete sich bereits 1998 das Augenmerk auf den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg. Dieser Transduktionsweg reguliert, z. T. ausgehend vom EGF-Rezeptor, sowohl das Überleben der Zelle als auch deren Morphologie. Für E481 konnte bereits eine Reduktion der PI3K-Aktivität in proliferierenden A431 Zellen und eine Actinskelettveränderung nachgewiesen werden. Die Erhöhung des cAMP-Gehaltes durch E481 scheint jedoch nicht wirkungsrelevant zu sein, da die Inkubation mit der cAMP-erhöhenden Substanzkombination Forskolin/IBMX keine Hemmung der PI3K erzielte. Für E584 konnte keine Hemmung gefunden werden [Kemény, 1998].

Aufbauend auf diesen Daten sollte nun geklärt werden, ob auch in MCF-7 Zellen eine Hemmung der PI3K-Aktivität durch E481 detektiert werden kann, was eine Beteiligung der PI3K an den Zytoskelettveränderungen denkbar machen würde. Vergleichend dazu sollten das 2-Aminoethylamino-Derivat E584 sowie das Morpholino-Derivat E495 untersucht werden.

4.2.1 Untersuchung zur Hemmbarkeit der Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität in MCF-7 Zellen im Vergleich mit A431 Zellen

Die Untersuchung der PI3K erfolgt analog zu der im Arbeitskreis etablierten Methode, welche auf einer Vorschrift der Firma Upstate Biotechnology basiert [Kemény, 1998]. 3×10^6 Zellen/Petrischale werden 2 Tage lang serumhaltig kultiviert und dann serumfrei mit Substanz inkubiert. Nach 20 Minuten erfolgt die Stimulierung der PI3K durch 100 ng/ml EGF für weitere 10 Minuten, bevor die Zellen lysiert werden. Nach der Immunopräzipitation mit Protein G-Sepharose und dem monoklonalen Antikörper gegen die p85-Untereinheit der PI3K

wird das Präzipitat mehrmals gewaschen. Die Bestimmung der PI3K-Aktivität erfolgt in Gegenwart von Phosphatidylinositol als Substrat durch Zugabe von radioaktiv markiertem $g^{33}\text{P}$ -ATP. Die Detektion des enzymatisch entstandenen ^{33}P -gelabelten Phosphatidylinositol-3-monophosphats erfolgt nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung mittels eines Instant-Counters.

Untersucht wurden die Substanzen E481, E584 (2-(2-Aminoethylamino)-Derivat) und E495 (2-Morpholino-Derivat) im Vergleich zu den PI3K-Inhibitoren Wortmannin und 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-on (Ly294002). Die Strukturen der Inhibitoren sind in Abb. 46 wiedergegeben.

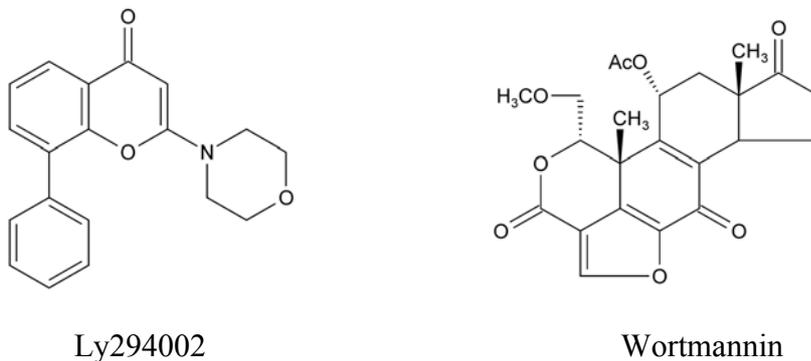


Abbildung 46: PI3K-Inhibitoren Ly294002 und Wortmannin.

Bei Wortmannin handelt es sich um einen aus *Penicillium wortmannii* isolierten Pilzmetaboliten. Ursprünglich wurde Wortmannin wegen seiner immunosuppressiven und entzündungshemmenden Eigenschaften erwähnt [Brain et al., 1957; Gunther et al., 1989; Wiesinger et al., 1974]. Wortmannin reagiert über seinen Furanring mit dem primären Amin eines Lysinrestes in unmittelbarer Nachbarschaft zur katalytischen Domäne der PI3K. Der resultierende kovalente Komplex, der die irreversible Hemmung verursacht (IC_{50} -Wert ≈ 3 nM), konnte auch röntgenstrukturanalytisch bestätigt werden [Yano et al., 1993; Ui et al., 1995; Walker et al., 2000; Wymann et al., 1996]. Weitere Effektoren von Wortmannin sind die Myosin-leichte-Ketten Kinase, die Phospholipasen D (PLD) und A₂ (PLA₂) sowie eine PI 4-Kinase [Nakanishi et al., 1992; Arcaro & Wymann, 1993]. Ly294002 wurde erstmals in der Gruppe von Vlahos et al. (1994) synthetisiert. Dieses Chromon inhibiert die isolierte PI3K aus Rinderhirn mit einem IC_{50} -Wert von 1,4 μM [Walker et al., 2000] und zeigt in diesem Konzentrationsbereich keine Hemmwirkung auf andere Kinasen.

Die Versuche wurden in einem dreifachen Ansatz immunopräzipitiert und dann auf je drei Teile aliquotiert. Die PI3K-Assay wurden mindestens zweimal, in der Regel allerdings dreimal durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind Mittelwerte \pm SD, wobei die dazu verwendete Anzahl der Proben in Tabelle 5 in Klammern vermerkt ist.

4.2.1.1 Einfluss von Wortmannin und Ly294002 auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität

Wortmannin und Ly294002 (s. Abb. 28) wurden als bekannte Hemmstoffe der PI3K bei einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Die Inkubation der MCF-7 Zellen erfolgte analog zu der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und in Abb. 47 zusammen mit den aus meiner Diplomarbeit stammenden Daten an A431 Zellen aufgelistet [Kemény, 1998].

Tabelle 5: PI3K-Aktivität nach Inkubation der Zellen mit Wortmannin und Ly294002. (*) [Kemény, 1998]. Die Daten sind Mittelwert \pm SD, wobei die dazu verwendeten unabhängigen Proben in Klammern angegeben sind.

Konzentration [μM]	Wortmannin [Anzahl der Proben]		Ly294002 [Anzahl der Proben]	
	MCF-7	A431*	MCF-7	A431*
0	100 \pm 9,9 [22]	100 \pm 11,6 [17]*	100 \pm 9,9 [22]	100 \pm 11,6 [17]*
10	41 \pm 9,0 [6]	11 \pm 3,3 [5]*	50 \pm 8,7 [6]	64 \pm 15,7 [5]*

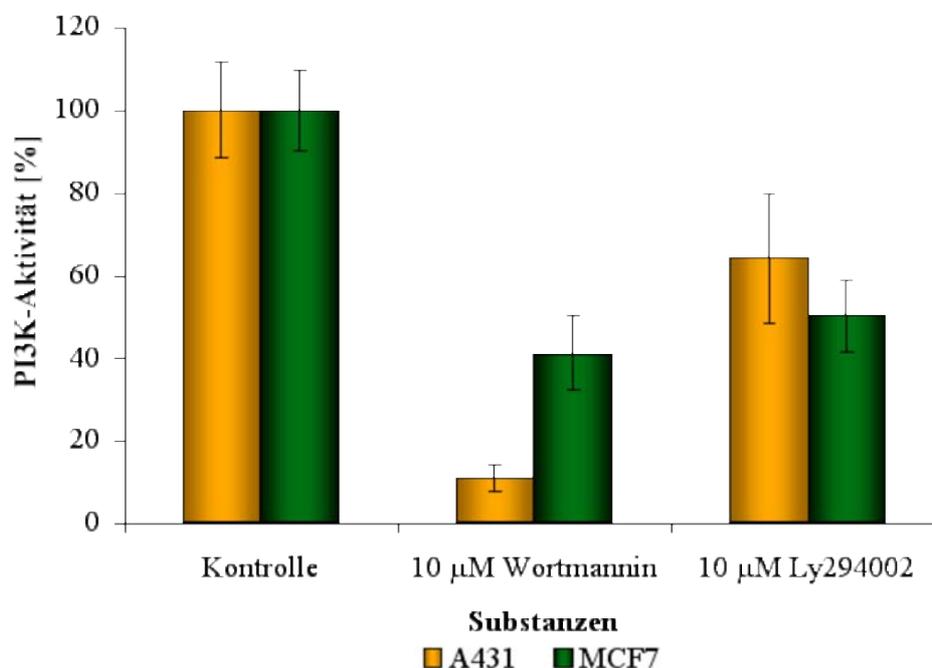


Abbildung 47: Hemmung der PI3K-Aktivität in A431* und MCF-7 Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin und Ly294002. (*) [Kemény, 1998].

Wortmannin hemmt nach halbstündiger Inkubation die PI3K-Aktivität in MCF-7 Zellen um $59 \pm 9,0$ %. Der Inhibitor Ly294002 kann die PI3K-Aktivität auf $50 \pm 8,7$ % senken. Die im Vergleich dazu aufgetragenen Werte aus den A431 Zellen zeigen, dass die PI3K-Hemmung in A431 Zellen stärker zutage tritt als in MCF-7 Zellen. Die Berechnung der Signifikanz der Daten war hier aufgrund der Schwankungen der spezifischen Radioaktivität nur über die Einzelmessungen einer Testreihe möglich. Wortmannin erzielte bei allen Durchläufen eine signifikante Hemmung.

4.2.1.2 Einfluss von E481 auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität in MCF-7 und A431 Zellen

Die E481-Inkubation wurde bei einem DMSO-Anteil von 0,3 % für 30 Minuten in Konzentrationen von 0,1 bis 20 μM durchgeführt. In Tabelle 6 sind die Werte der PI3K-Hemmung aufgelistet, während in Abb. 48 die graphische Darstellung erfolgt.

E481 ist in MCF-7 Zellen nicht in der Lage die PI3K-Aktivität zu hemmen. Im Vergleich dazu konnte in A431 Zellen bereits ab einer Konzentration von 1 μM eine Hemmung der PI3K-Aktivität bis auf einen Wert von $64 \pm 14,7$ % gemessen werden, die auch durch höhere Konzentrationen nicht weiter verstärkt werden konnte [Kemény, 1998].

Tabelle 6: PI3K-Aktivität nach 30-minütiger Inkubation von MCF-7 und A431 Zellen* mit E481 (*) [Kemény, 1998]. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD, wobei die Anzahl der dazu verwendeten unabhängigen Proben in Klammern angegeben ist.

E481 [Anzahl der Proben]		
Konzentration [μM]	MCF-7	A431*
0	$100 \pm 9,9$ [22]	$100 \pm 11,6$ [17]*
0,1	$115 \pm 24,6$ [3]	$97 \pm 20,0$ [4]*
1	$110 \pm 14,6$ [4]	$64 \pm 14,7$ [5]*
10	$93 \pm 15,9$ [5]	$63 \pm 20,1$ [4]*
20	$96 \pm 17,8$ [6]	$62 \pm 30,3$ [4]*

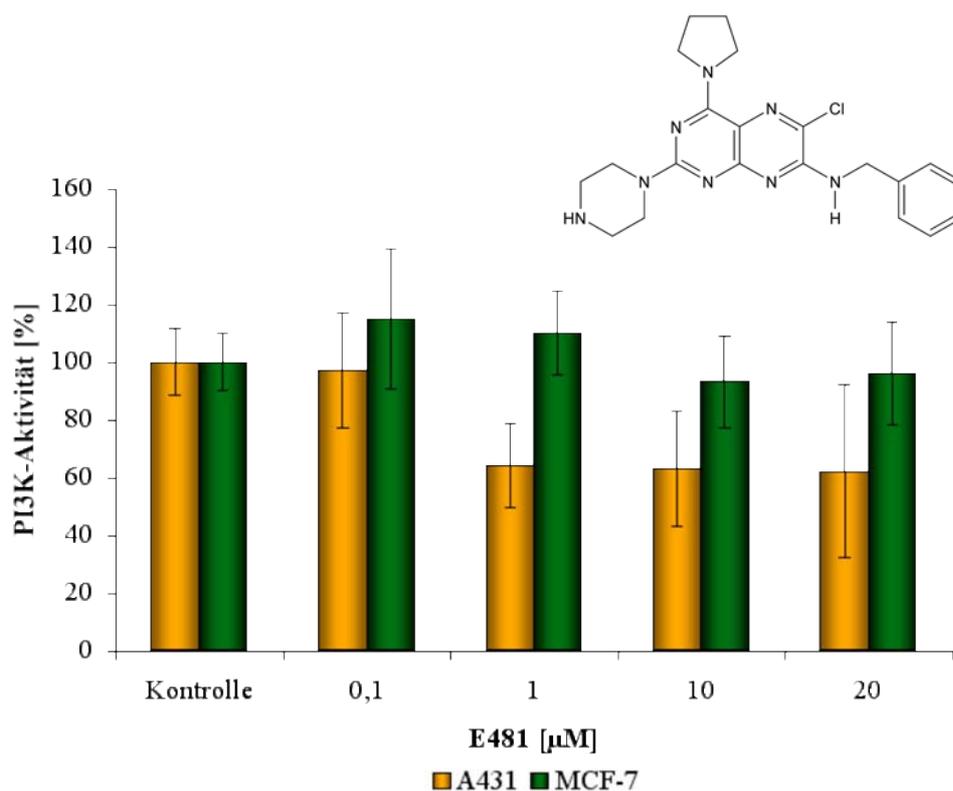


Abbildung 48: Hemmung der PI3K-Aktivität in A431 Zellen* und MCF-7 Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit E481. (*) [Kemény, 1998]. Die Anzahl der unabhängigen Proben ist in Tabelle 6 aufgeführt.

4.2.1.3 Einfluss von E584 und E495 auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität in MCF-7 und A431 Zellen

Das 2-(2-Aminoethylamino)-Derivat E584 (s. Abb. 49) wurde in den Konzentrationen 1 µM, 10 µM und 20 µM an MCF-7 Zellen getestet. Das Morpholinoderivat E495 (s. Abb. 50) wurde sowohl an MCF-7 als auch an A431 Zellen auf eine Beeinflussung der PI3K-Aktivität untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Die Daten der Untersuchung mit E584 und E495 sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: PI3K-Aktivität nach Inkubation mit E584 und E495 in MCF-7 und A431 Zellen*. (*) [Kemény, 1998]. Die Daten sind Mittelwert \pm SD, wobei die Anzahl der verwendeten unabhängigen Proben in Klammern angegeben sind.

Konzentration [μ M]	E584 2-(2-Aminoethylamino)-Derivat [Anzahl der Proben]		E495 2-Morpholino-Derivat [Anzahl der Proben]	
	MCF-7	A431*	MCF-7	A431
0	100 \pm 9,9 [22]	100 \pm 11,6 [17]*	100 \pm 9,9 [22]	100 \pm 11,6 [17]*
1	110 \pm 33,0 [4]	82 \pm 26,8 [6]*	90 \pm 14,9 [4]	86 \pm 27,5 [5]
10	238 \pm 46,8 [5]	91 \pm 12,8 [3]*	98 \pm 22,1 [6]	97 \pm 40,8 [4]
20	201 \pm 42,4 [5]	81 \pm 24,8 [6]*	127 \pm 24,4 [5]	94 \pm 38,8 [6]

E584 zeigt in MCF-7 Zellen, anders als in A431 Zellen, eine beachtliche Wirksamkeit. Bei einer Konzentration von 10 μ M steigt die Lipidkinase-Aktivität um 138 % an und bleibt auf einem ähnlich hohen Niveau auch bei 20 μ M erhalten. Das Morpholino-Derivat E495 zeigt in beiden Zellen keinen Einfluss auf die PI3K-Aktivität.

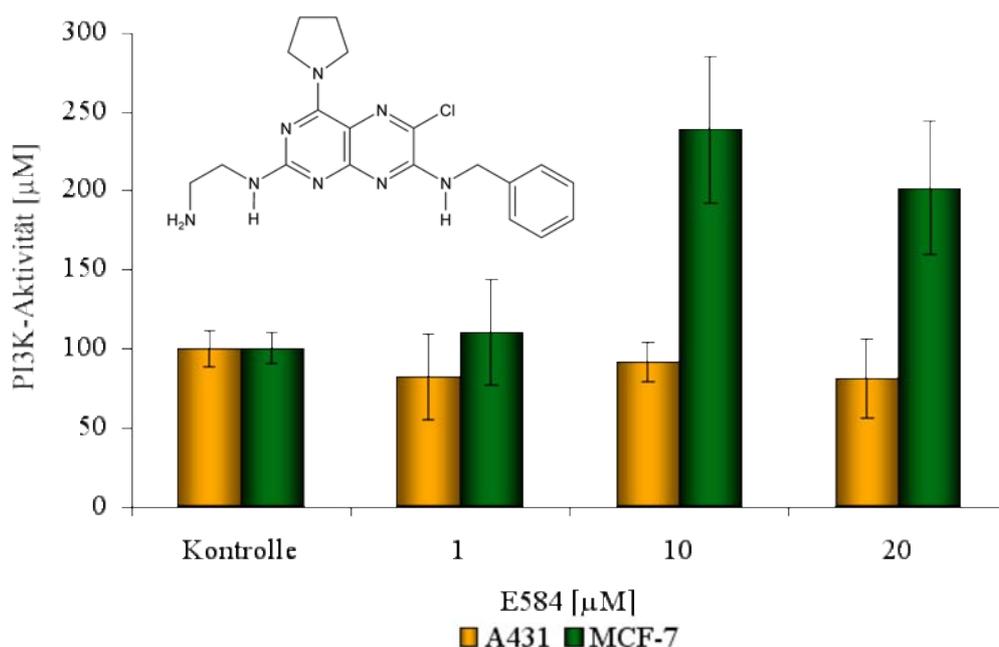


Abbildung 49: Hemmung der PI3K-Aktivität in A431* und MCF-7 Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit E584. (*) [Kemény, 1998]. Die Anzahl der unabhängigen Proben ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

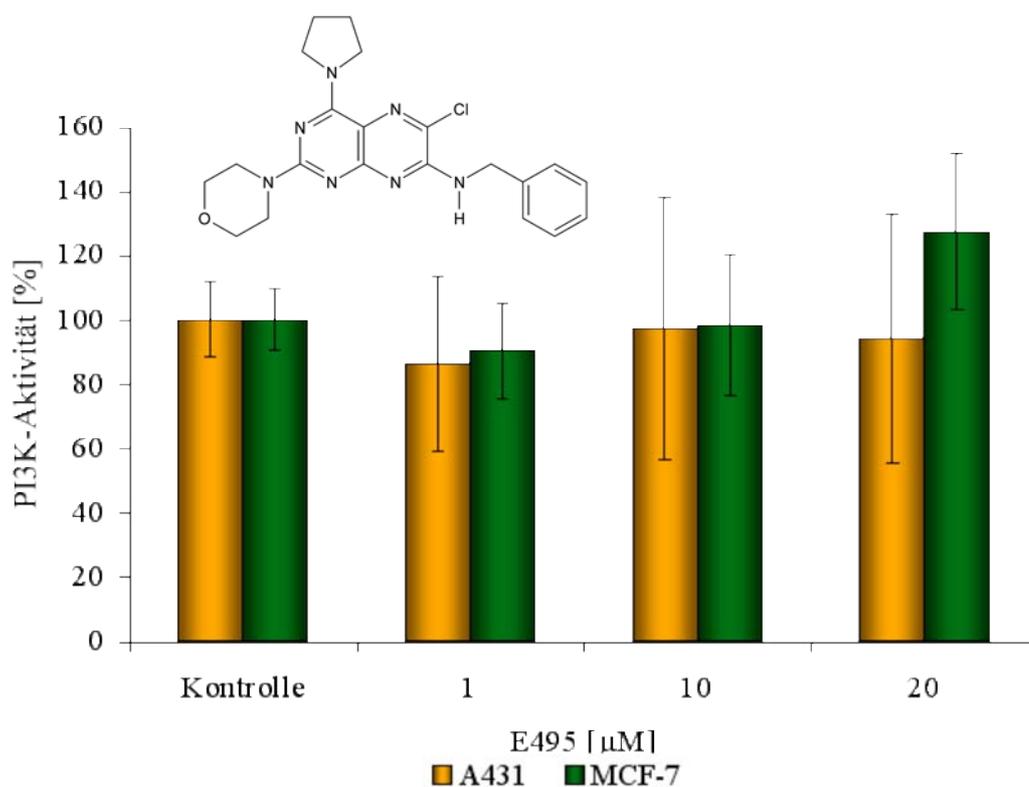


Abbildung 50: Hemmung der PI3K-Aktivität in A431 und MCF-7 Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit E495. Die Anzahl der unabhängigen Proben ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse zur Beeinflussung der Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität

Aus Untersuchungen in A431 Zellen mit der cAMP-erhöhenden Substanzkombination Forskolin/IBMX war bekannt, dass durch eine alleinige Erhöhung der cAMP-Konzentration keine Hemmung der PI3K-Aktivität erzielt werden kann. Durch die Kombination Forskolin/E481 kann zwar die cAMP-erhöhende Wirkung von E481 verstärkt werden, jedoch hemmen Forskolin/E481 und E481 die PI3K-Aktivität in vergleichbarem Ausmaß. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Hemmung der PI3K-Aktivität durch E481 auf die Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle zurückzuführen ist [Kemény, 1998].

Offen blieb damals die Frage, ob die in A431 Zellen gefundene Senkung der PI3K-Aktivität auch in MCF-7 Zellen auftritt und dadurch möglicherweise die Zytoskelettveränderungen bewirkt werden. Ferner war von Interesse, ob durch Hemmung der PI3K in A431 Zellen eine Hemmung nachgeschalteter Signalelemente bewirkt wird. Zur Beantwortung der ersten Frage wurde die PI3K-Beeinflussung in MCF-7 Zellen analog zu den Arbeiten an A431 Zellen untersucht.

Die Inkubation der MCF-7 Zellen mit den Inhibitoren Wortmannin und Ly294002 bewirkt eine Reduktion der PI3K-Aktivität um 59 bzw. 50 %. Vergleicht man dies mit den Daten der A431 Zellen, so besitzt Wortmannin in MCF-7 Zellen ein geringeres Hemmpotential. Im Gegensatz dazu ist die PI3K-Hemmung durch Ly294002 in MCF-7 Zellen vergleichbar mit der in A431 Zellen.

Die Versuche mit E481 an MCF-7 Zellen zeigten bei keiner Konzentration einen annähernd signifikanten Unterschied zur PI3K-Aktivität der Kontrolle. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der durch E481 sowohl in A431 als auch in MCF-7 Zellen induzierte G₀/G₁-Arrest [Meiers, 2000; Wagner, 1998] nicht PI3K-abhängig ist. Dass in A431 Zellen die Zellzyklusarretierung durch die Senkung der PI3K-Aktivität beeinflusst wird, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Auswirkung der PI3K-Hemmung durch E481 auf Effektoren in A431 Zellen wurde deshalb ein weiteres Ziel dieser Arbeit (s. 4.4).

Das Gleiche gilt auch für die durch E481 in A431 und MCF-7 Zellen bewirkten Veränderungen des Zytoskeletts [Meiers, 1996; Kemény, 1998]. Auch diese können nicht ursächlich auf der Senkung der PI3K-Aktivität beruhen. Andererseits kann eine Beeinflussung des Zytoskeletts in A431 Zellen durch die Inhibition des PI3K/PKB-Signalweges nicht ausgeschlossen werden.

Umgekehrt stellt sich allerdings die Frage, inwieweit die nach einer halben Stunde detektierbaren Zytoskelettveränderungen in A431 Zellen mitverantwortlich für die Hemmung der PI3K-Aktivität sein könnten. Untersuchungen von Gillham et al. (1999) schließen eine Beeinflussung der PI3K-Aktivität und der PI3K-Translokation zur Plasmamembran durch Störung des Zytoskeletts weitgehend aus. Erst eine Hemmung der RTK kann eine Lokalisation der PI3K zur Plasmamembran und damit deren Aktivierung durch EGF verhindern.

Da E584, wie in Kapitel 4.1.1.1 beschrieben, eine stärkere Hemmung der RTK bewirkt als E481, trotzdem aber keine Hemmung der PI3K in A431 Zellen, ja sogar eine Aktivierung in MCF-7 Zellen festzustellen ist, scheint hier noch keine wesentliche PI3K-Beeinflussung durch Hemmung der RTK stattzufinden.

Eine weitere Frage wirft die Erhöhung der PI3K-Aktivität durch E584 um 138 % in MCF-7 Zellen auf. Welche morphologischen Veränderungen bewirkt diese Substanz in MCF-7 Zellen, wenn eine so deutliche PI3K-Aktivitätssteigerung erzielt wird? Zur Klärung dieser

Frage sollten Actinskelettuntersuchungen beitragen, die im Anschluss (siehe 4.3) vorgestellt sind.

Das Morphinoderivat E495 zeigt in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die PI3K-Aktivität. Insofern deutet auch die fehlende Wachstumshemmung auf die Erhaltung des PI3K/PKB-Signals hin, das entscheidend für das Überleben der Zelle ist.

Sicher ist, dass die Substanzen innerhalb der Versuchsdauer genügend Zeit haben, in die Zelle zu gelangen. Aus Untersuchungen zur Substanzaufnahme von E481 in die großzellige Lungenkarzinomzelllinie LXFL-529L ist bekannt, dass E481 bereits nach 12 Minuten im Zytosol und nach 21 Minuten im Partikular halbmaximal angereichert ist [Müller, 2000]. Auch fluoreszenzmikroskopisch ist bei Behandlung mit E481, E584 und E495 eine zelluläre Aufnahme innerhalb von 30 Minuten beobachtbar.

Gründe für die unterschiedlichen Auswirkungen in den beiden Zelllinien könnten in der Rezeptorausstattung der Zellen liegen.

Die EGF-Rezeptorausstattung der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 Zellen basiert auf einem überexprimierten ErbB1 und einem normal exprimierten ErbB3-Rezeptor mit ca. 2×10^6 Rezeptoren / Zelle [Davidson et al., 1987]. Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ist im Gegensatz dazu eine den EGF-Rezeptor normal exprimierende Zelllinie mit 2400 Rezeptoren / Zelle, wobei der Rezeptorbesatz auf die Isoformen ErbB1, ErbB2 und ErbB3 zurückzuführen ist [Tan M. et al., 1999; Gillham et al., 1999; Biscardi et al., 1998; Davidson et al., 1987]. Der ligandenunabhängige ErbB2 Rezeptor ist der bevorzugte Partner der Heterodimerisation in EGF-Rezeptoren und dimerisiert sowohl mit ErbB3 als auch mit ErbB1. Das ErbB2/ErbB3-Heterodimer ist allerdings nicht, im Gegensatz zu ErbB1/ErbB2 und ErbB1/ErbB3, durch EGF (sondern nur durch Heregulin) aktivierbar [Yarden & Sliwkowski, 2001].

In A431 Zellen erfolgt nach EGF-Stimulierung eine direkte Anlagerung der PI3K an das YXXM-Motiv auf ErbB3, während an der ErbB1 Untereinheit, wahrscheinlich aufgrund der fehlenden Kinase-Aktivität von ErbB3, keine wesentliche PI3K-Anlagerung detektiert werden kann [Gillham et al., 1999]. Im Gegensatz dazu kann in MCF-7 Zellen eine Anlagerung an das ErbB1/ErbB2 Heterodimer wahrscheinlich nur über das Adapterprotein p120^{Cbl} erfolgen [Soltoff et al., 1996; Yarden & Sliwkowski, 2001]. Unterschiede in der Hemmung könnten dementsprechend auf die kinetischen Eigenheiten der zellspezifischen Aktivierung der PI3K zurückzuführen sein.

4.3 Die Wirkung von E481 auf das Actingerüst

Die PI3K kann als genereller Vermittler der durch E481-induzierten morphologischen Veränderungen in A431 [Kemény, 1998] und MCF-7 Zellen [Meiers, 1996] ausgeschlossen werden, da E481 nur in A431 Zellen eine Hemmung der PI3K-Aktivität verursacht. Es stellt sich aber die Frage, ob zumindest die Zytoskelettveränderungen in A431 durch eine PI3K-Hemmung verursacht sein könnten. Bereits eine serumfreie Inkubation der A431 Zellen für 30 Minuten führt ab 1 μM E481 zu einer leichten, bei 10 μM zu einer deutlichen Verdichtung des Actinfilamentnetzwerkes [Kemény, 1998].

Die Rolle der PI3K im Hinblick auf die Regulation des Actinskeletts ist vielseitig. Eine Hemmung der PI3K bewirkt in Neutrophilen fluktuierende Veränderungen des F-Actingehalts [Arcaro & Wymann, 1993] und in humanen myeloischen U937 Blutzellen eine teilweise Unterdrückung der Insulin-induzierten Actinpolymerisation [Walters et al., 1996]. Ferner wirkt die PI3K auf Guanin-Austauschfaktoren der kleinen GTP-bindenden Proteine aus der Rho-Familie (cdc42, Rac, Rho; s. Abb. 51) [Fleming et al., 2000].

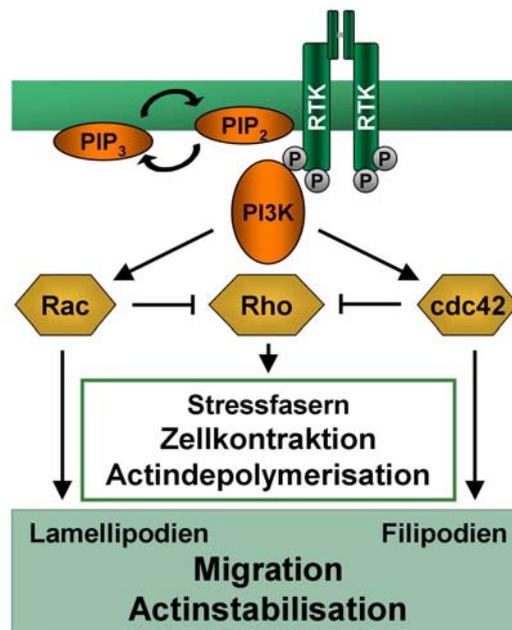


Abbildung 51: Die aktive PI3K beeinflusst die GTPasen cdc42, Rac und Rho.

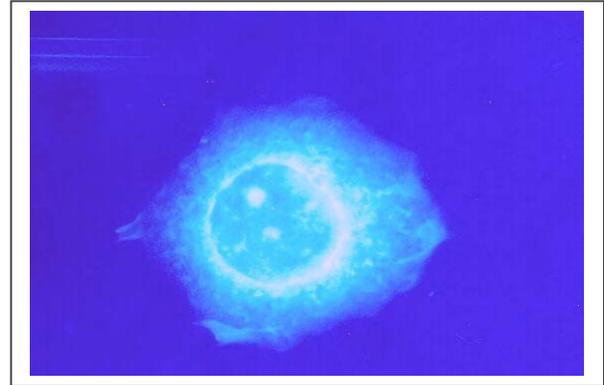
So ist z. B. die PI3K-abhängige Translokation von Rac an die Plasmamembran hinreichend für die Ausbildung von Lamellipodien [Sander et al., 1998; Fleming et al., 2000], während die Aktivierung von cdc42 über die regulatorische PI3K-Untereinheit zur Ausbildung von Filopodien führt. Sowohl cdc42 als auch Rac hemmen Rho und dadurch die Ausbildung von Stressfasern [Jiménez et al., 2000].

4.3.1 Morphologische Untersuchungen des Actinskeletts

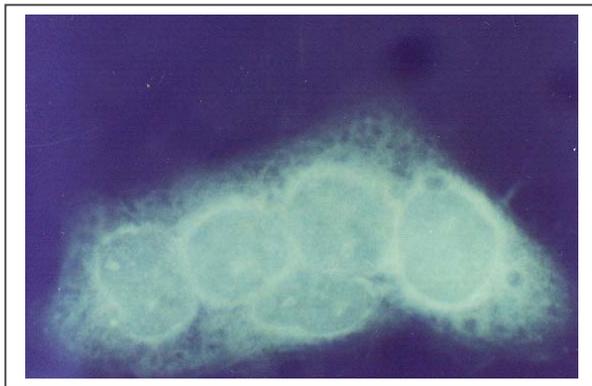
Die morphologischen Untersuchungen des Actinskeletts wurden mit Coumarinphenylisothiocyanat (CPITC)-gelabeltem Phalloidin an A431 und MCF-7 Zellen durchgeführt. In der folgenden Abb. 52 ist links die Zelllinie A431 und rechts die Zelllinie MCF-7 dargestellt.



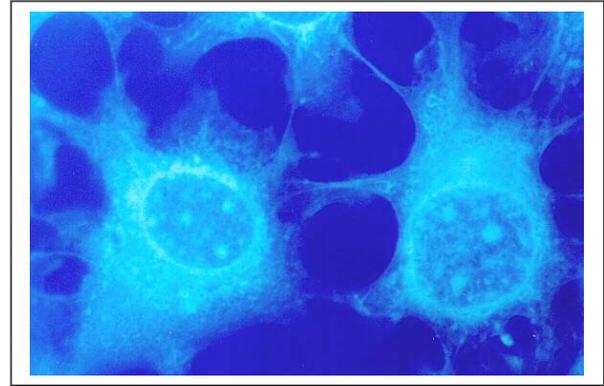
A) A431; Kontrolle (0,3 % DMSO); 30 min.



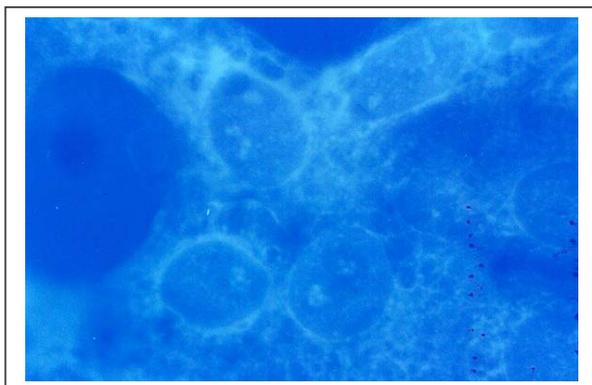
B) MCF-7; Kontrolle (0,3 % DMSO); 30 min.



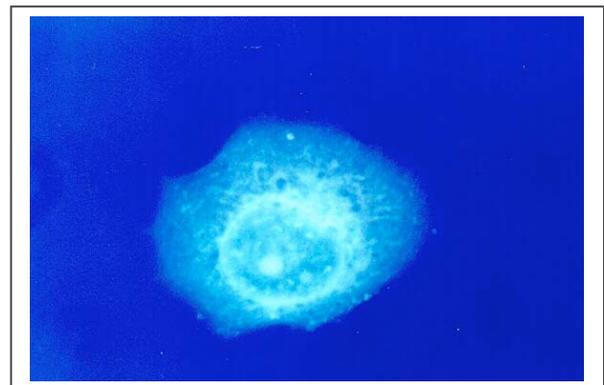
C) A431; 10 μM Ly294002; 30 min.



D) MCF-7; 10 μM Ly294002; 30 min.



E) A431; 10 μM Wortmannin; 30 min.

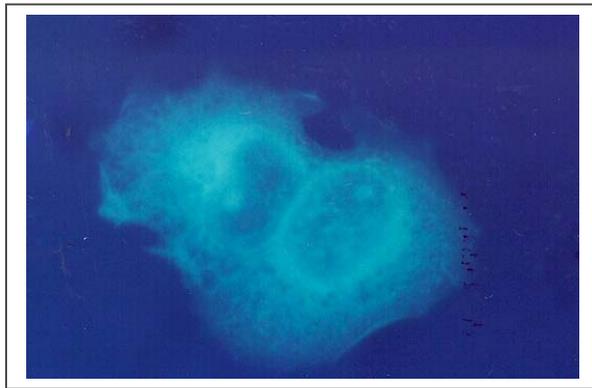


F) MCF-7; 10 μM Wortmannin; 30 min.

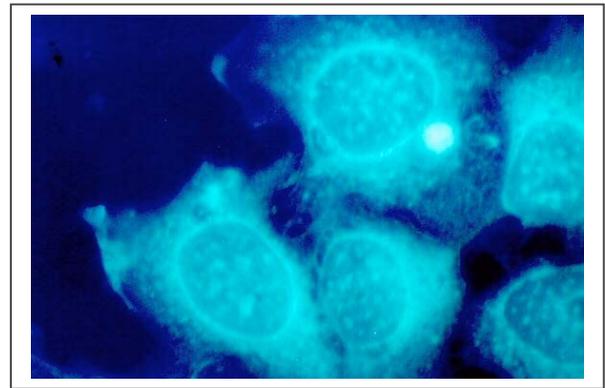
Abbildung 52: Actin-Fluoreszenzfärbung mit CPITC-gelabeltem Phalloidin. 30 Minuten serumfrei inkubiert: (A-B) Kontrolle 0,3 % DMSO; (C-D) 10 μM Ly294002, (E-F) 10 μM Wortmannin (Vergrößerung 250x).

Die Zellen der Kontrolle zeigen einen breiten und gleichmäßigen Actinsaum, der nur um den Kern verdichtet erscheint. Die Inkubation mit Ly294002 bewirkt bei A431 und MCF-7 Zellen wenig Veränderungen. Der Actinsaum ist weiterhin fein vernetzt, aber die Zellen verlieren ihre gleichmäßige Form. Es sieht so aus, als ob die Zellen ihre Kontaktpunkte untereinander aufgeben. Es wurde nach Inkubation mit Ly294002 bzw. Wortmannin eine „Transparenz der Zellen“ (siehe Bild E) beobachtet. Die Inkubation mit Wortmannin schließlich zeigt ein ebenfalls vernetztes Actinskelett in beiden Zellen.

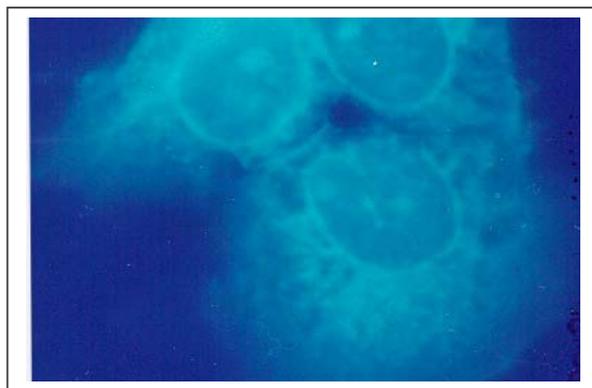
In Abb. 53 sind die Aufnahmen der 30-minütigen Inkubationen mit dem 2-(2-Aminoethylamino)-Derivat E584 und dem Morpholino-Derivat E495 zusammengefasst. Links sind die A431 und rechts die MCF-7 Zellen abgebildet. Von Interesse war, ob E584 in MCF-7 Zellen aufgrund des PI3K-Aktivitätsanstieges (s.4.2.1.3) eine Veränderung des Zytoskeletts aufweist. Des Weiteren sollten eventuelle Veränderungen durch das Morpholinoderivat E495 dokumentiert werden.



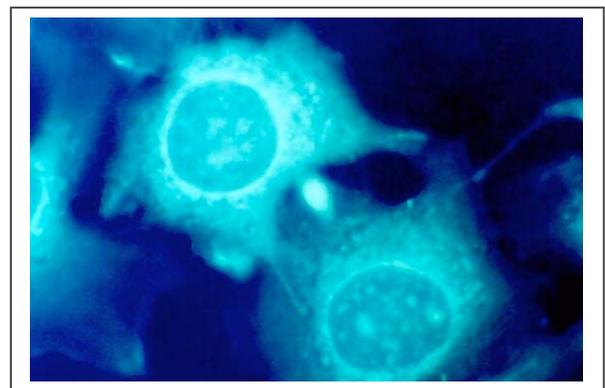
A) A431 Zellen; 10 µM E584; 30 min.



B) MCF-7 Zellen; 10 µM E584; 30 min.



C) A431 Zellen; 10 µM E495; 30 min.



D) MCF-7 Zellen; 10 µM E495; 30 min.

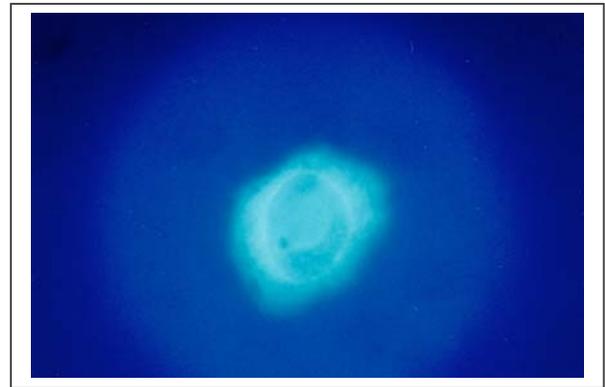
Abbildung 53: Actin-Fluoreszenzfärbung mit CPITC-gelabeltem Phalloidin. 30 Minuten serumfrei inkubiert: (A-B) E584 10 µM; (C-D) E495 10 µM (Vergrößerung 250x).

Sowohl in A431 als auch in MCF-7 Zellen konnte keine Veränderung des Actinzytoskeletts festgestellt werden, wie sie typischerweise nach Inkubation mit E481 auftreten.

In Abb. 54 ist die durch E481-induzierte Actinskelettveränderung in A431 Zellen gezeigt [Kemény, 1998]. Deutlich ist die Verdichtung des Actinsaumes zu erkennen. Ansonsten rundet sich die Zelle ab und schrumpft. Während nach Inkubation mit 1 μM E481 die Zellen zum Teil noch vernetzte Actinstrukturen aufweisen, sind die meisten Zellen ab einer Konzentration von 10 μM gleichmäßig um den Kern verdichtet.



A) A431; 1 μM E481; 30 min.



B) A431; 10 μM E481; 30 min.

Abbildung 54: Actin-Fluoreszenzfärbung mit CPITC-gelabeltem Phalloidin an A431 Zellen. 30 Minuten serumfrei mit E481 inkubiert: (A) 1 μM ; (B) 10 μM (Vergrößerung 250x).

4.3.2 Diskussion der morphologischen Untersuchungen

Die PI3K-Untersuchungen (siehe 4.2) ergaben keine Korrelation zwischen der Beeinflussung der PI3K und den durch E481 verursachten Zytoskelettveränderung. Es stellte sich aber die Frage, ob zumindest die in A431 Zellen bewirkten Zytoskelettveränderungen durch eine PI3K-Hemmung verursacht sein könnten.

Betrachtet man die mit Ly294002 und Wortmannin behandelten Zellen, so zeigt sich bei gleichbleibender Vernetzung des Actinsaumes eine gewisse „Transparenz“ der Zelle. Die mit E481 behandelten Zellen weisen allerdings ein verdichtetes und akkumuliertes Actinskelett auf. Dementsprechend kann man davon ausgehen, dass die durch E481-verursachte Morphologie nur geringfügig von den PI3K-vermittelten Veränderungen geprägt sind.

Als Folge der Inaktivierung der PI3K könnten der Rac-spezifische Austauschfaktor Tiam-1 und die nachgeschaltete Rho-GTPase Rac beeinflusst werden [Fleming et al., 2000]. Fehlende PI3K-Aktivität kann auch über eine verringerte Phosphorylierung von BAD (BCL-2/BCL-X_L-antagonist, causing cell death) zur Apoptoseinduktion führen. Durchflusszytometrische Untersuchungen an MCF-7 und A431 Zellen ergaben allerdings nach Kurzzeitinkubation mit E481 keinen Hinweis auf apoptotische Veränderungen. Es ist jedoch nicht ausschließbar, dass die morphologischen Veränderungen durch frühe apoptotische, zytoskelettbeeinflussende Vor-

gänge verursacht werden, die durchflusszytometrisch noch nicht detektierbar sind [Kemény, 1998].

Aufgrund der PDE4-hemmenden Eigenschaft von E481 ist es wahrscheinlich, dass in A431 Zellen, genau wie in LXFL-529L Zellen [Wagner, 1998], ein cAMP Anstieg, gefolgt von einer Aktivierung der PKA, stattfindet. Die Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP2 und Tau werden PKA-abhängig über ihre Phosphorylierung in der Bindung an Tubulin reguliert [Brugg & Matus, 1991; Tsujio et al., 2000]. Möglicherweise beeinflusst die PKA durch Hemmung der Tubulinbindung die Integrität des ebenfalls assoziierten Actinskeletts.

Eine weitere Möglichkeit der Actinbeeinflussung besteht in der Phosphorylierung von MAP2C und Tau durch die GSK3b, die nach PI3K-Inhibierung aktiv vorliegen könnte. [Sánchez et al., 2000; Friedrich & Aszodi, 1991].

Ebenso könnte das Abrunden der A431 Zellen nach Inkubation mit E481 ursächlich durch eine cAMP-abhängige Induktion von Phosphatasen bedingt sein. Es stellte sich die Frage, ob E481 eine Tyrosin-Dephosphorylierung von Paxillin bewirkt. Dies könnte die Auswirkungen auf das Actinskelett, das Abrunden der Zellen durch Auflösen der fokalen Adhäsionen und eventuell auch den Zellzyklusarrest durch Störung des Integrin-Signaltransduktionsweges erklären. Auf diesbezügliche Untersuchungen wird später (siehe Kapitel 4.6.2) eingegangen.

Die Substanzen E584 und E495 bewirken keine Veränderungen der MCF-7 Zellen. Insofern induziert eine durch E584-erhöhte PI3K-Aktivität innerhalb von 30 Minuten keine morphologischen Veränderungen. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Daten mit den im Arbeitskreis bisher durchgeführten morphologischen Studien, wurde auf eine EGF-Stimulierung der Zellen wie im PI3K-Assay (siehe 4.2) verzichtet. Insofern kann es sein, dass sowohl die Hemmung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase als auch die in den PI3K-Versuchen durch E584 induzierte Aktivitätssteigerung hier nicht zur Wirkung kommen. Die Aussage aus diesen Versuchen ist allerdings insofern eindeutig, dass keine zu E481 vergleichbaren Actinbeeinflussungen stattfinden.

Es ist nicht auszuschließen, dass E481 entweder direkt oder über einen bisher unbekanntem Mechanismus die Actinskelettveränderungen steuert.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die durch E481 induzierten Actinskelettveränderungen nicht mit denen von Wortmannin bzw. Ly294002 vergleichbar sind. Wenn überhaupt, dann sind die Actinskelettveränderungen durch E481 nur geringfügig von den PI3K-vermittelten Veränderungen geprägt. E584 und E495 zeigen unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Zytoskelettveränderungen. Da die PDE4 nur durch E481 effektiv gehemmt wird, könnten die Actinskelettveränderungen durch die Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle erklärbar sein.

4.4 Die Wirkung von E481 auf den Phosphatidylinositol 3-Kinase- / Protein Kinase B-Signalweg

Um die Auswirkungen der Hemmung der PI3K-Aktivität in A431 Zellen zu überprüfen und einen möglicherweise stattfindenden Crosstalk mit dem cAMP-Signalweg aufzuspüren, sollten verschiedene Enzyme des PI3K/PKB-Signalweges bezüglich ihres Phosphorylierungsstatus untersucht werden.

Der Grundgedanke bestand darin, dass eine Weiterleitung des gehemmten PI3K-Signals sowohl den Zellzyklusarrest in der G₁-Phase als auch die Apoptoseinduktion nach E481-Inkubation erklären könnte (s. Abb. 55). Die Aktivierung der Glycogen Synthase Kinase 3b (GSK3b) könnte aufgrund einer gehemmten PKB erfolgen, wenn die Phosphorylierung von Ser9 unterbleibt. Eine aktive GSK3b kann die Phosphorylierung von Cyclin D1 (an Thr286) und dadurch den proteosomalen Abbau und die Freisetzung des CDK (Cyclin dependent kinase)-Inhibitors p27 bewirken. Folglich könnte dadurch der Zellzyklusarrest in der G₁-Phase erklärt werden. Allerdings wird Ser9 auch von der PKA phosphoryliert, so dass die E481-abhängige Aktivierung des cAMP-Signalweges die Aktivierung der GSK3b verhindern könnte.

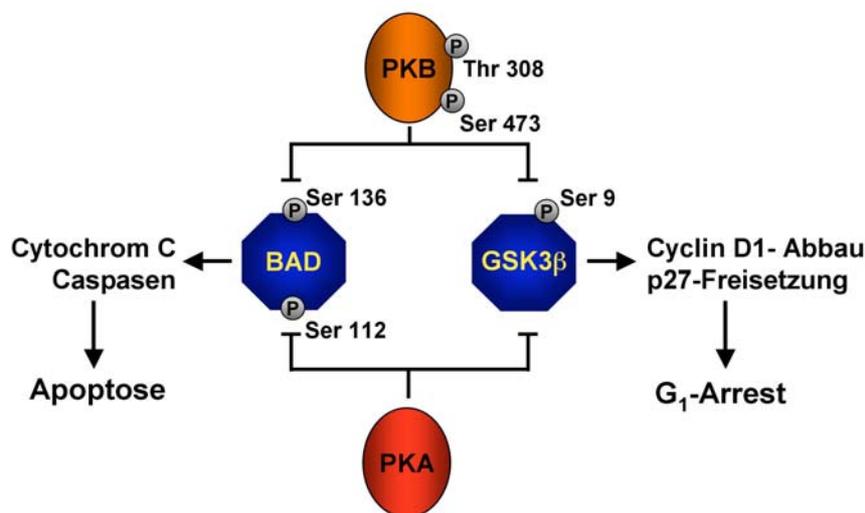


Abbildung 55: Hemmenden Phosphorylierungsstellen an BAD und der Glycogen Synthase Kinase (GSK)3b durch Protein Kinasen A (PKA) und B (PKB).

Ferner könnte die Apoptoseinduktion durch die fehlende Phosphorylierung des proapoptisch wirkenden BADs erklärt werden. Allerdings findet auch hier eine Wechselwirkung mit dem cAMP-Signalweg statt. Die PKA phosphoryliert BAD aber an Ser112, während die PKB

Ser136 phosphoryliert. Es war insofern von Interesse herauszufinden, ob sich das gehemmte PI3K-Signal durchsetzt oder durch die PKA die Wirkung aufgehoben wird.

Zu diesem Zweck sollte die Phosphorylierung der PKB an Thr308 und Ser473 sowie die PKB-Effektoren BAD und GSK3b untersucht werden. Von der GSK3b ist bekannt, dass eine Phosphorylierung bereits 5 Minuten nach Stimulierung der A431 Zellen mit EGF feststellbar ist [Saito et al., 1994]. Insofern war die Dauer der Signalweiterleitung vom EGF-Rezeptor bis zur GSK3b bekannt und eine EGF-Stimulierung wurde auf 10 Minuten beschränkt. Inwieweit E481 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer Veränderungen im Phosphorylierungsstatus bewirkt, sollte über eine Bestimmung des Phosphorylierungsstatus nach 30 Minuten sowie nach 6, 18 und 24 Stunden bestimmt werden.

Durchflusszytometrische Messungen ergaben, dass E481 bei einer 24-stündigen Inkubation ab 12 μ M in A431 Zellen einen starken Anstieg des Debris-Anteils bewirkt [Meiers, 2000]. Da der Debris-Anteil auf apoptotischen und terminal fragmentierten Zellen beruht, sollte eine ebenfalls über 24 Stunden ausgedehnte Detektierung des Phosphorylierungsgrades von BAD Aufschluss über dessen Beteiligung an der Apoptoseinduktion geben.

4.4.1 Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von PKB, GSK3b und BAD

Die Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus der PKB, GSK3b und BAD wurden mit dem Phospho-Akt Pathway Sampler der Firma Cell Signaling TECHNOLOGY™ durchgeführt. Dieser Kit besteht aus einem Set von Antikörpern, die zur Detektion der phosphorylierten Proteine der PKB, GSK3b, BAD und FKHR anhand von Western Blots geeignet sind. Dabei wurden die Zellen nach Vorschrift in Medium mit 0,5 % Serum für 2 Tage kultiviert und vor der Substanzinkubation für 2 Stunden serumdepletiert. Die Substanzzugabe erfolgte ebenfalls serumfrei, nur in den letzten 10 Minuten der Inkubation wurde mit EGF stimuliert.

Die Detektion der Phosphoproteine erfolgte aus dem Gesamtzellysate. Als Vergleich wurde eine Probe ohne EGF-Stimulierung und eine Wortmannin-Probe mit EGF-Stimulierung aufgetragen. Die Auswertung der Banden erfolgte chemoluminometrisch am Lumi-Imager der Firma Boehringer Mannheim in Boehringer Light Units (BLU).

Alle Versuche wurden für jede Konzentration und jeden Zeitpunkt mindestens dreimal wiederholt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte \pm SD dieser unabhängigen Proben dar und sind in Prozent der Bandenintensität der unbehandelten Kontrolle nach 10-minütiger EGF-Stimulierung (100ng/ml) angegeben. Die Bandenintensität in BLU der unbehandelten Kontrolle nach 10-minütiger EGF-Stimulierung wurde dabei auf 100 % festgesetzt.

4.4.1.1 Untersuchung der Phosphorylierung der PKB an Ser473 und Thr308

Die Inkubation der A431 Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 30 Minuten mit E481 in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 20 μM . Eine Stimulierung mit 100 ng/ml wurde bei allen Proben, bis auf die unstimulierte Kontrolle K_0 , in den letzten 10 Minuten der Inkubation durchgeführt. Die Banden konnten nach SDS-PAGE im 12 % igen Gel als scharfe Banden bei 62 kDa detektiert werden.

4.4.1.1.1 Einfluss von E481 und Wortmannin auf die Bandenintensität der PKB

Um eine gleichmäßige Beladung der Geltaschen zu überprüfen, wurde in verschiedenen Gelen auch die unphosphorylierte PKB detektiert. Abb. 56 zeigt exemplarisch die gleichmäßige Bandenintensität der Proben nach Detektion mit dem Antikörper gegen PKB. Weder die Stimulierung mit 100 ng/ml EGF noch die Inkubationen mit E481 oder Wortmannin verändern die Bandenintensität.

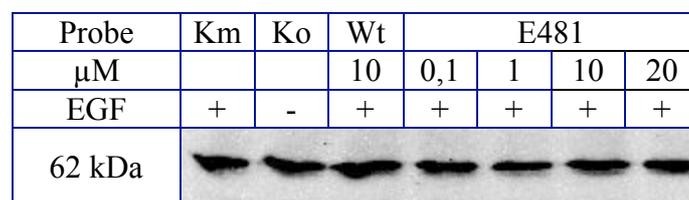


Abbildung 56: Gleichmäßige Bandenintensität der unphosphorylierten PKB in A431 Zellen nach Inkubation mit E481, Wortmannin (Wt) oder 0,3 % DMSO für 30 Minuten und EGF-Stimulierung für 10 Minuten. Ko ist die Kontrolle ohne EGF-Stimulierung, Km die mit EGF-Stimulierung.

4.4.1.1.2 Einfluss von E481 und Wortmannin auf die Bandenintensität der Phospho-Ser473-PKB

Die Ergebnisse der Bandenintensitäten der an Ser473 phosphorylierten PKB sind in Tabelle 8 aufgelistet. In Klammern stehen die für die Berechnung des Mittelwertes tatsächlich benutzten Einzelmessungen. In Abb. 57 sind die Werte graphisch aufgetragen.

Die unstimulierte Probe erreicht im Vergleich zur stimulierten Kontrolle nur 57 % der Bandenintensität. Mit 0,1 μM E481 kann eine Verstärkung der Bande auf 138 % detektiert werden, die aber schon bei 1 μM auf 109 % absinkt. Ab einer Konzentrationen von 10 μM E481 ist eine signifikante Abnahme ($p < 0,005$) der Bandenintensität auf einen Wert von $67 \pm 10,4$ % im Vergleich zur Kontrolle detektierbar. Die Konzentration bei 20 μM ergibt einen analoge Wert von $69 \pm 7,8$ % ($p < 0,05$). 10 μM Wortmannin führen zu einer signifikanten Abnahme der Ser473-Bande um 75 % ($p < 0,05$).

Tabelle 8: Bandenintensität der Phospho-Ser473-PKB nach 30-minütiger Substanzinkubation mit E481, Wortmannin (Wt) oder 0,3 % DMSO. Ko ist die Kontrolle ohne EGF-Stimulierung, Km die mit EGF-Stimulierung. In Klammern ist die Probenanzahl zur Berechnung des Mittelwertes \pm SD angegeben.

Substanz [μM]	EGF [100 ng/ml]	Phospho-Ser473-PKB Bandenintensität [%] [N] Anzahl der unabhängigen Proben
Ko (0,3 % DMSO)	-	$57 \pm 19,3$ [4]
Km (0,3 % DMSO)	+	$100 \pm 6,0$ [4]
E481 [0,1 μM]	+	$138 \pm 17,3$ [3]
E481 [1 μM]	+	$109 \pm 20,9$ [5]
E481 [10 μM]	+	$67 \pm 10,4$ [5]
E481 [20 μM]	+	$69 \pm 7,8$ [3]
Wortmannin [10 μM]	+	$25 \pm 12,2$ [4]

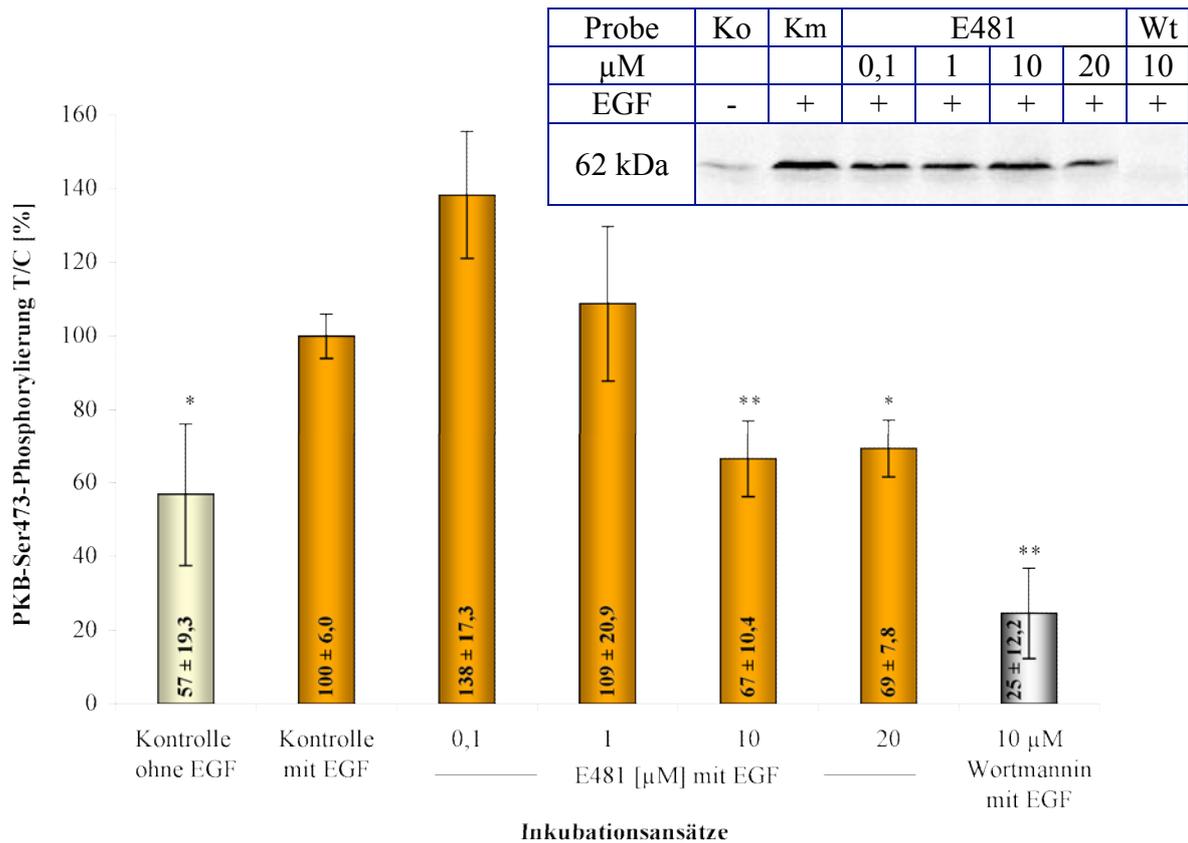


Abbildung 57 : a) Graphische Darstellung der in Tabelle 8 aufgeführten Bandenintensitäten der an Ser473 phosphorylierten PKB nach E481 Inkubation für 30 Minuten (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,005 = **$). b) Exemplarischer Western Blot. Ko ist die Kontrolle ohne EGF-Stimulierung, Km mit EGF-Stimulierung, Wortmannin (Wt).

4.4.1.1.3 Einfluss von E481 und Wortmannin auf die Bandenintensität der Phospho-Thr308-PKB

Die Ergebnisse der Bandenintensitäten der Phosphorylierung des Thr308-Restes der PKB sind in Tabelle 9 aufgelistet. In Klammern steht die Anzahl der in die Berechnung des Mittelwertes eingegangenen Einzelmessungen. In Abb. 58 sind die Werte graphisch aufbereitet.

Die Phosphorylierung der Aminosäure Thr308 ist unter den gewählten Bedingungen weder EGF-stimulierbar noch Wortmannin-hemmbar. E481 bewirkt an Thr308 der PKB eine Reduktion der Phosphorylierung. Diese ist vergleichbar mit der Hemmung der Ser473-Phosphorylierung. Nur bei 0,1 µM E481 erfolgt eine verstärkte Thr308-Phosphorylierung, während ab 10 µM eine signifikante Hemmung der Phosphorylierung auf $66 \pm 9,9 \%$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle erreicht wird. Diese wird von dem Inkubationsansatz mit 20 µM E481 nicht weiter unterschritten.

Tabelle 9: Bandenintensität der Phospho-Thr308-PKB nach 30-minütiger Substanzinkubation mit E481, Wortmannin oder 0,3 % DMSO. Ko ist die Kontrolle ohne EGF-Stimulierung, Km mit EGF-Stimulierung. In Klammern ist die Probenanzahl zur Berechnung des Mittelwertes \pm SD angegeben.

Substanz [μ M]	EGF [100 ng/ml]	Phospho-Thr308-PKB Bandenintensität [%] [N] Anzahl der unabhängigen Proben
Ko (0,3 % DMSO)	-	104 \pm 15,9 [3]
Km (0,3 % DMSO)	+	100 \pm 11,4 [3]
E481 [0,1 μ M]	+	111 \pm 21,3 [4]
E481 [1 μ M]	+	90 \pm 23,9 [4]
E481 [10 μ M]	+	66 \pm 9,9 [4]
E481 [20 μ M]	+	67 \pm 12,5 [4]
Wortmannin [10 μ M]	+	129 \pm 24,1 [3]

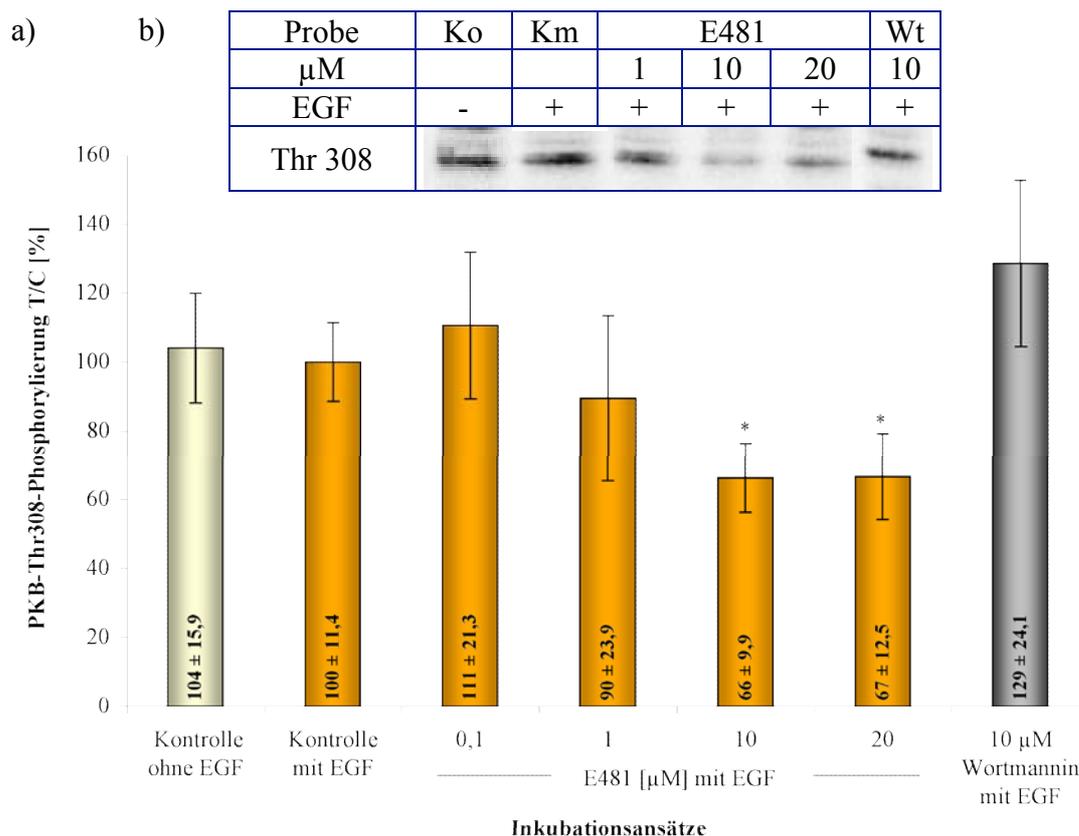


Abbildung 58: a) Graphische Darstellung der in Tabelle 9 aufgeführten Bandenintensitäten der Thr308 phosphorylierten PKB nach E481-Inkubation für 30 Minuten (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$). b) exemplarischer Western Blot.

4.4.1.2 Diskussion der Auswirkungen von E481, Wortmannin und EGF auf die Phosphorylierung der PKB

Anhand der Detektion der gesamten PKB in A431 Zellen konnte gezeigt werden, dass innerhalb von 30 Minuten keine Veränderung der PKB-Menge erfolgt. Alle unterschiedlichen Bandenintensitäten, die mit den phosphospezifischen Antikörpern detektiert wurden, resultierten somit aus schnellen Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen.

Betrachtet man sich die Phosphorylierung des Ser473-Restes, so zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit der Aktivität der PI3K. Wortmannin führt zu einer Reduktion der Bandenintensität auf verbleibende $25 \pm 12,4$ %, während unter den selben Versuchsbedingungen eine Aktivität der PI3K von 11 % nachgewiesen werden konnte (s.4.2.1.1).

Ebenso ist der Anstieg der Bandenintensität nach EGF-Stimulierung um 47 % vergleichbar mit der Zunahme der PI3K-Aktivität. In der Gruppe Soltoff et al. (1994) konnte mit einem Antikörper gegen die p 85-Untereinheit der PI3K nach einer 5-minütigen EGF-Stimulierung mit 100 ng/ml eine um den Faktor 11 gesteigerte PI3K-Aktivität in A431 Zellen festgestellt werden. Die PI3K-Aktivität war weder mit dem EGF-Rezeptor-Isoform ErbB1 noch mit ErbB2, sondern nur mit ErbB3 signifikant nachweisbar. Die mit dem ErbB3-Protein kolokalisierte PI3K-Aktivitätssteigerung nach EGF-Stimulierung wurde je nach verwendetem Antikörper mit einem Wert zwischen dem drei- und sechsfachen angegeben. Insofern liegt eine Verdopplung der Intensität der PKB-Ser473-Bande nach EGF-Stimulus durchaus innerhalb des zu erwartenden Bereichs.

Vergleicht man die PI3K-Aktivitätssteigerung und die PKB-Bandenintensität nach EGF-Stimulierung, so scheint keine Signalamplifikation stattzufinden. Das Signal der PI3K wird in etwa äquivalent auf die PKB übertragen. Analog fällt auch die Hemmung der PI3K-Aktivität durch Wortmannin stärker aus als die Hemmung der Phospho-Ser473-PKB-Bande.

Die durch E481 ab einer Konzentration von 10 μ M erreichte Hemmung der phosphorylierten Ser473-Bande erreicht mit 67 % fast den Wert der PI3K-Aktivitätssenkung auf 63 % der Kontrollaktivität. Parallel zur PI3K-Aktivität erfolgt auch bei der PKB-Bandenintensität keine weitere Senkung bei Inkubation mit 20 μ M. Allerdings kommt zu der geringen Abschwächung des PI3K-Signals auch eine dosisabhängige Verzögerung, denn während die PI3K-Aktivität schon ab einer Konzentration von 1 μ M um 36 % fällt, zeigt sich die Tendenz der Phospho-Ser473-Bandenschwächung erst ab 10 μ M.

Die PKB-Phosphorylierung an Ser473 ist mit dem Ausmaß der PI3K-Aktivierung vergleichbar. Da die Phosphorylierung auch mit der Translokation an die Plasmamembran korrelieren soll [Scheid & Woodgett, 2001], könnte dies für eine E481-abhängige Verminderung der PKB-Translokation an die Plasmamembran sprechen.

Die Intensität der PKB-Phosphorylierung an Thr308 ist weder EGF-stimulierbar noch Wortmannin-hemmbar. Laut Literatur [Scheid & Woodgett, 2001; Filippa et al., 1999; Sable et al., 1997; Yano et al., 1998] ist eine Phosphorylierung an Thr308 nach Translokation an die Membran PDK1-vermittelt. PI3K-unabhängig ist die PKB an Thr308 entweder durch die PKA oder durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase Kinase (CaMKK) phosphorylierbar. Filippa et al. (1999) konnten durch die gleichzeitige Inkubation mit cAMP-erhöhenden Substanzen und Wortmannin eine Translokation der PKB an die Plasmamembran verhindern, nicht aber die Phosphorylierung an Thr308. Die Daten aus der Literatur geben keine plausible Erklärung. Die Inkubation mit Wortmannin und EGF zeigt, dass in A431 Zellen eine unabhängig von der PI3K und der Membranlokalisation stattfindende Phosphorylierung an Thr308 möglich zu sein scheint, während die Ser473-Phosphorylierung mit der PI3K-Aktivierung korreliert.

Im Vergleich dazu stimmen die E481-induzierte Phosphorylierungsintensität an Thr308 mit der PI3K-Aktivität in A431 Zellen gut überein. Bei der niedrigsten Konzentration zeigt sich eine leichte Steigerung der Phosphorylierung, die schon ab 1 μM revidiert und ab 10 μM in einer signifikanten ($p < 0,05$) Hemmung der Thr308-Phosphorylierung resultiert.

Da es sich bei E481 um einen PDE4-Hemmstoff handelt [Merz et al., 1998], könnte eine PKA-abhängige Phosphorylierung des Thr308-Restes stattfinden [Filippa et al., 1999]. Aufgrund der Vergleichbarkeit von Bandenschwächung und PI3K-Inhibierung scheint hier keine PKA-Phosphorylierung stattzufinden.

Betrachtet man die E481-abhängige Reduzierung der Phosphorylierung an Ser473 und Thr308 als Indiz für eine verminderte PKB-Kinaseaktivität, dann könnte eine geschwächte GSK3b und BAD-Phosphorylierung resultieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Phosphorylierung der PKB an Ser473 und Thr308 nach E481-Inkubation mit der Inhibierung der PI3K korreliert. Nur die Phosphorylierung an Ser473 zeigt eine Abhängigkeit von einer EGF-Stimulierung bzw. einer Inhibierung der PI3K durch Wortmannin.

4.4.1.3 Untersuchung der Ser9-Phosphorylierung der GSK3b

Die Inkubation der A431 Zellen mit E481 erfolgte bei der Kurzzeitinkubation über einen Zeitraum von 30 Minuten in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 20 μM , und über einen Zeitraum von 6, 18 und 24 Stunden in den Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM und 6 μM . Eine Stimulierung mit 100 ng/ml EGF wurde bei allen Proben, bis auf die unstimulierte Kontrolle K_0 , in den letzten 10 Minuten der Inkubation durchgeführt. Die Banden konnten nach SDS-PAGE im 10-12 % igen Gel als scharfe Doppelbanden bei 47-49 kDa detektiert werden.

4.4.1.3.1 Einfluss von E481 auf die Phosphorylierung der GSK3b an Ser9 bei einer Kurzzeitinkubation über 30 Minuten

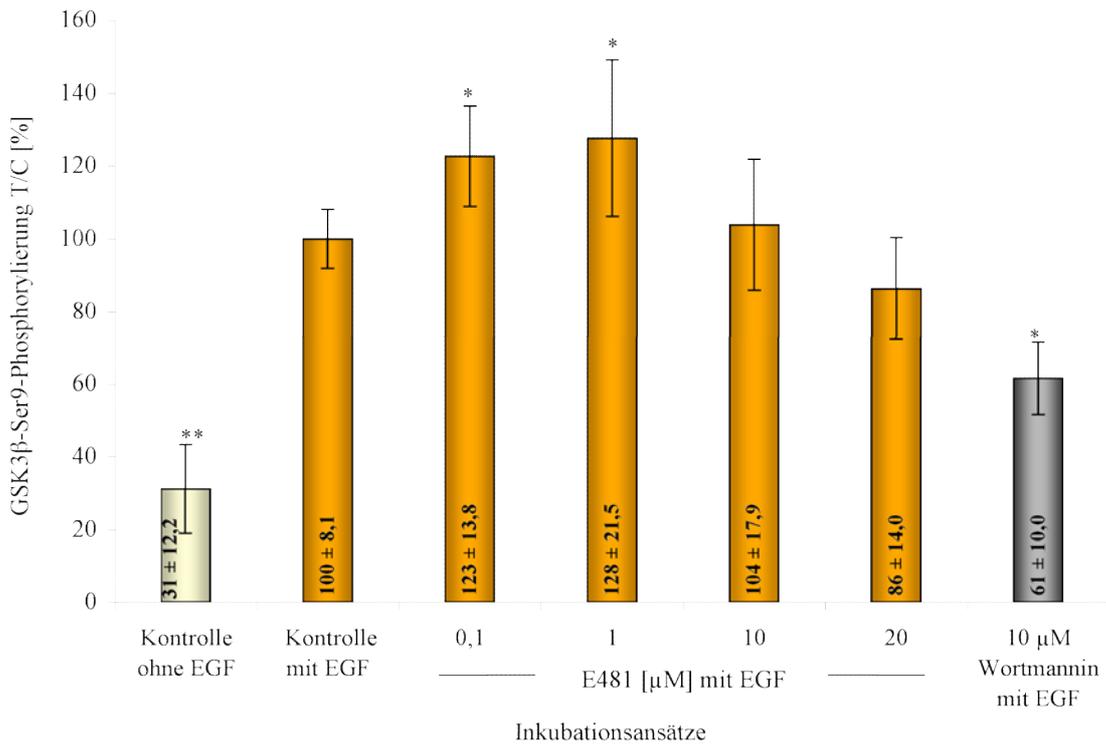
Die Ergebnisse der Bandenintensitäten der an Ser9 phosphorylierten GSK3b sind in Tabelle 10 aufgelistet. In Klammern steht die Anzahl der Einzelmessungen, die für die Berechnung des Mittelwertes tatsächlich benutzt wurden. In Abb. 59 sind die Werte graphisch aufgetragen.

Tabelle 10: Bandenintensität der Phospho-Ser9-GSK3b nach 30-minütiger Substanzinkubation mit E481, Wortmannin oder 0,3 % DMSO. Kontrolle ohne EGF(K_0), Kontrolle mit EGF(K_m). In Klammern ist die Probenanzahl zur Berechnung des Mittelwertes \pm SD angegeben

Substanz [μM]	EGF [100 ng/ml]	Phospho-Ser9-GSK3b Bandenintensität [%] [N] Anzahl der unabhängigen Proben
K_0 (0,3 % DMSO)	-	$31 \pm 12,2$ [4]
K_m (0,3 % DMSO)	+	$100 \pm 8,1$ [5]
E481 [0,1 μM]	+	$123 \pm 13,8$ [5]
E481 [1 μM]	+	$128 \pm 21,5$ [6]
E481 [10 μM]	+	$104 \pm 17,9$ [6]
E481 [20 μM]	+	86 ± 14 [7]
Wortmannin [10 μM]	+	$61 \pm 10,0$ [4]

Die unstimulierte Probe (Ko) erreicht im Vergleich zur stimulierten Kontrolle (Km) nur 31 % der Phosphorylierung von Ser9 und ist damit in ihrer Aktivität signifikant ($p < 0,005$) gegenüber der Kontrolle vermindert. Mit 0,1 μM E481 kann eine signifikante ($p < 0,05$) Verstärkung der Ser9-Phosphorylierung auf 123 % detektiert werden, die bei 1 μM auf 128 % steigt ($p < 0,05$). Ab einer Konzentrationen von 10 μM E481 zeigt sich keine erhöhte Phosphorylierung. Die Inkubation mit 20 μM E481 bewirkt eine Abnahme der Bande auf 86 %, die sich aber innerhalb der Fehlertoleranz der Kontrolle befindet. Wortmannin zeigt auch hier eine signifikant verringerte Phosphorylierung auf 61 % der Kontrolle ($p < 0,05$).

a)



b)

Probe	Ko	Km	E481				Wt
μM			0,1	1,0	10,0	20,0	20,0
EGF	-	+	+	+	+	+	+
47-49 kDa							

Abbildung 59 : a) Graphische Darstellung der in Tabelle 10 aufgeführten Bandenintensitäten der an Ser9 phosphorylierten GSK3 β nach E481-Inkubation für 30 Minuten (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,005 = **$). b) exemplarischer Western Blot, Kontrolle ohne EGF-Stimulierung (Ko), Kontrolle mit EGF-Stimulierung (Km), Wortmannin (Wt).

4.4.1.3.2 Einfluss von E481 auf die Phosphorylierung der GSK3b an Ser9 bei einer Langzeitinkubation über 6, 18 und 24 Stunden

Aus Transfektionsversuchen in PC12 Zellen ist bekannt, dass eine konstitutiv aktive GSK3b trotz Anwesenheit von Wachstumsfaktoren Apoptose auslöst [Pap & Cooper, 1998]. Zudem führt die Hemmung des EGF-Rezeptors in A431 Zellen mit Tyrphostin nach 20 Stunden über den PI3K-Signalweg zu einem G₁-Arrest [Busse et al., 2000]. Da in A431 Zellen ein Arrest in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus durch 24-stündige Inkubation mit 6 µM E481 induziert werden kann, sollte der Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der GSK3b über 24 Stunden untersucht werden. Analog zu der Kurzzeitinkubation wurde der Phosphorylierungsstatus nach 6, 18 und 24 Stunden E481-Inkubation mit 0,1 µM, 1 und 6 µM E481 bestimmt.

Die Ergebnisse zur Beeinflussung der Phospho-Ser9-Bandenintensität der GSK3b sind in Tabelle 11 aufgelistet. In Klammern steht die Anzahl der Einzelmessungen, die in die Berechnung des Mittelwertes eingegangen sind. In Abb. 60 sind die Daten graphisch zusammen mit den Ergebnissen der Kurzzeitinkubation über 0,5 Stunden (s. 4.4.1.3.1) aufgetragen.

Tabelle 11: Intensität der Phospho-Ser9-GSK3b-Bande nach 6-, 18- und 24-stündiger Substanzinkubation mit E481 bzw. Wortmannin. Alle Angaben beziehen sich auf die Kontrolle mit 100 %. In Klammern ist die Probenanzahl zur Berechnung des Mittelwertes ± SD angegeben.

Substanz [µM]	EGF [100 ng/ml]	Phospho-Ser9-GSK3b Bandenintensität [%]		
		[N] Anzahl der unabhängigen Proben		
		6 h	18 h	24 h
E481 [0,1 µM]	+	98 ± 38,9 [4]	98 ± 17,8 [5]	108 ± 22,8 [3]
E481 [1 µM]	+	107 ± 19,0 [5]	115 ± 30,4 [4]	127 ± 39,6 [4]
E481 [6 µM]	+	84 ± 20,5 [3]	98 ± 18,8 [4]	182 ± 18,3 [3]
Wortmannin [10 µM]	+	46 ± 11,3 [3]	92 ± 22,3 [3]	112 ± 21,5 [3]

Die Inkubation mit E481 in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 6 µM bewirkte weder nach 6 noch nach 18 Stunden eine Veränderung der GSK3b-Phosphorylierung an Ser9. Nur die höchste Konzentration von 6 µM führte nach 24 Stunden zu einer gesteigerten Phosphorylierung.

Eine 6-stündige Inkubation mit Wortmannin (10 µM) bewirkte, ebenso wie die Kurzzeitinkubation über 0,5 Stunden, eine verminderte GSK3b-Phosphorylierung. Nach 18 bzw. 24-stündiger Inkubation war jedoch keinen Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrolle feststellbar.

Nicht mit in der Tabelle aufgeführt sind die Werte der unstimulierten Kontrolle, die zu jedem Zeitpunkt eine Bandenintensität von etwa 32 % im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen.

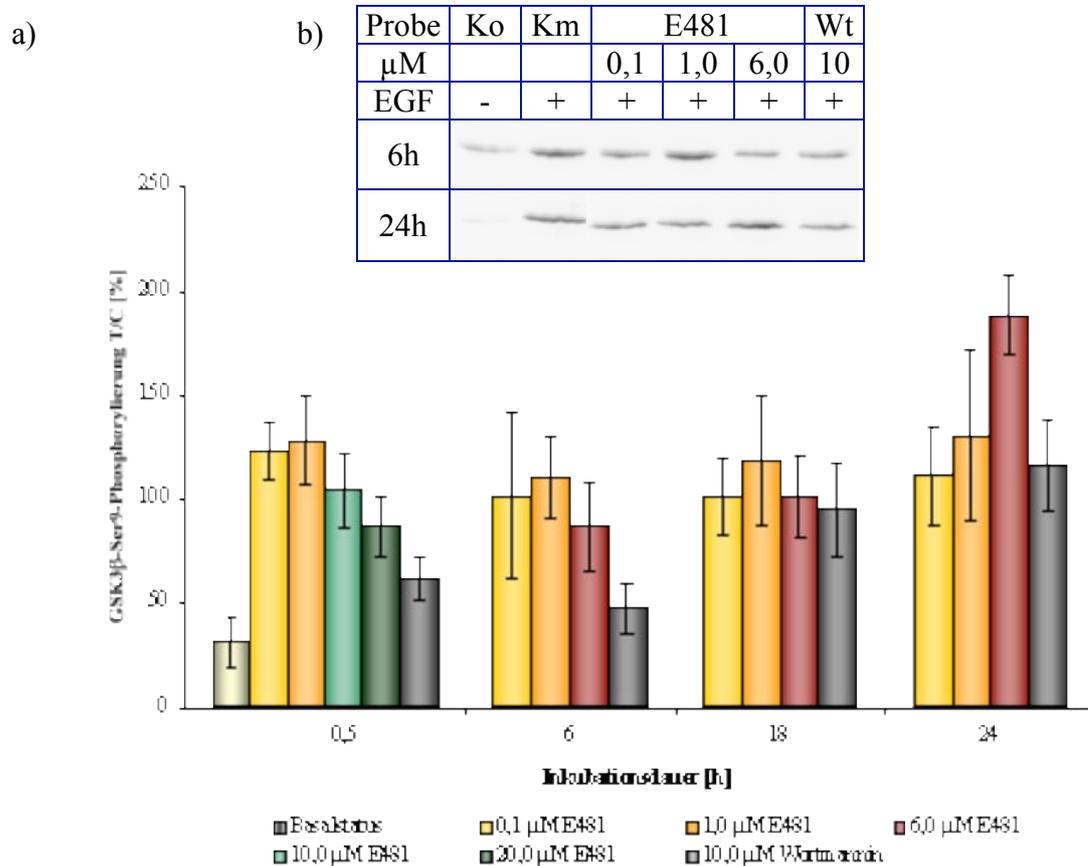


Abbildung 60: a) Graphische Darstellung der Ser9-GSK3b Phosphorylierung nach E481 Inkubation über 30 Minuten sowie 6, 18 und 24 Stunden. b) exemplarischer Western Blot der 6 und 24 Stunden Inkubation. Kontrolle ohne EGF-Stimulierung (Ko), Kontrolle mit EGF-Stimulierung (Km), Wortmannin (Wt).

4.4.1.4 Diskussion der Auswirkungen von E481, Wortmannin und EGF auf die Phosphorylierung der GSK3b

Die Phosphorylierung der GSK3b an Ser9 weist über den gesamten Zeitraum keine maßgeblichen Abweichungen vom Kontrollwert auf. Entweder wird das verminderte PKB-Signal durch eine weitere Kinase ausgeglichen oder die Phosphorylierung der GSK3b in A431 Zellen erfolgt unabhängig von der PKB.

Bei der E481-Kurzzeitinkubation (0,5 h) konnte in den niedrigen Konzentrationen von 0,1 μM und 1 μM eine Verstärkung der Ser9-Phosphorylierung detektiert werden. Betrachtet man die höheren Konzentrationen, so zeichnet sich erst bei 20 μM E481 andeutungsweise eine Verringerung der Ser9-Phosphorylierung auf 86 % ab. Die Reduktion der Phospho-Ser9-Bande ist bei weitem nicht so stark, wie es aufgrund der erzielten PKB-Bandenreduktion zu erwarten gewesen wäre. Nachdem die Phosphorylierung der PKB nach E481-Inkubation mit 10 und 20 μM sowohl an Ser473 als auch an Thr308 auf eine Bandenintensität von weniger als 70 % der Kontrolle fällt, hätte man an der GSK3 β eine stärkere Reduktion der Phospho-Ser9 Bande erwartet. Dies spricht dafür, dass die GSK3 β nicht nur einer verminderten Phosphorylierung durch die PKB ausgesetzt ist, sondern zusätzlich durch andere Signalwege phosphoryliert wird. In Frage kommt hierbei besonders der cAMP-Signalweg [Fang et al., 2000], der aufgrund der PDE4-Hemmung ebenfalls durch E481 beeinflusst wird [Wagner, 1998].

Auch über den MAPK-Signalweg kann die GSK3 β von der MAPKAP-K1 phosphoryliert werden. In Fibroblasten ist die MAPKAP-K1 für etwa 10 Minuten in der Lage, auf eine EGF-Stimulierung die GSK3 β zu phosphorylieren [Shaw & Cohen, 1999]. Allerdings könnte die E481-abhängige Aktivierung der PKA auch den MAPK-Signalweg auf der Stufe von Raf unterbinden [Mason et al., 1999].

Bei der längsten Inkubation in der höchsten Konzentration (24 h; 6 μM E481) findet eine Verstärkung der GSK3 β -Phosphorylierung statt. Auch Wortmannin (10 μM) bewirkt nur bis zu einer Inkubationsdauer von 6 Stunden eindeutig eine Verringerung der GSK3 β -Phosphorylierung. Danach findet jedoch eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades bis auf das Kontrollniveau statt. In der Literatur wird eine nachträgliche Verstärkung der Ser9-Phosphorylierung in humanen Neuroblastomzellen (SY5Y) durch Wortmannin beschrieben. Die Inhibierung des PI3K/PKB-Signalweges wirkt nur über einen Zeitraum von 3 Stunden dephosphorylierend auf die GSK3 β . Danach ist trotz einer weiterhin inaktiven PKB ein Anstieg der GSK3 β -Phosphorylierung durch PKC δ detektierbar [Tsuji et al., 2000]. Diese Kinase wird als Folge des gehemmten PI3K-Signalwegs nachweislich von Caspase-3 gespalten und als aktive Untereinheit freigesetzt.

Eine Caspase-Induktion könnte bei der 24-stündigen Behandlung mit 6 μM E481 bzw. Wortmannin (10 μM) Grund für die gesteigerte Phosphorylierung der GSK3 β sein. Möglicherweise führt eine reduzierte PKB-Aktivität zu einer verminderten Ser136-BAD-Phosphorylierung und folglich zu einer Caspase-Induktion. Angesichts der erkennbar starken Zellschäden nach 24-stündiger serumfreier Inkubation mit 10 μM E481 hat mit großer Wahrscheinlichkeit bereits Apoptose eingesetzt.

Da die GSK3 β über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden keine wesentliche Veränderung der Phosphorylierung an Ser9 aufweist, ist es wahrscheinlich, dass sie im inaktiven Zustand

gehalten wird. Somit kann die GSK3b keine Phosphorylierung von Cyclin D1 mit anschließendem proteosomalen Abbau verursachen, was einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase erklärt hätte. Aufgrund der vorliegenden Daten scheinen hier eher andere Signalwege für den Zellzyklusarrest in der G₁-Phase verantwortlich zu sein. So könnte die Hemmung des MAPK-Signalweges durch E481 eine verminderte Expression von Cyclin D1 mit der Folge der „Hypophosphorylierung“ des Retinoblastoma (pRb)-Proteins und des Zellzyklusarrestes in der G₁-Phase bewirken. Auch über den cAMP-Signalweg können Cyclin A und D1 reguliert werden. Von Jakobs (2002) konnte bereits nach 6-stündiger E481-Inkubation eine durch E481 bedingte Expressionsverminderung von Cyclin A nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in A431 Zellen die Hemmung des PI3K/PKB-Signalweges durch E481 keine reduzierte Phosphorylierung der GSK3b an Ser9 bewirkt und somit keine Aktivierung der GSK3b zu erwarten ist. Möglicherweise wird eine verminderte PKB-abhängige Phosphorylierung von Ser9 durch die PKA vermittelte Phosphorylierung des gleichen Restes ausgeglichen. Der durch E481 induzierte Zellzyklusarrest ist nicht Resultat einer Aktivierung der GSK3b als Folge einer Hemmung des PI3K/PKB-Signalweges durch E481.

4.4.1.5 Untersuchung der Ser112-Phosphorylierung des pro-apoptischen BAD

Das pro-apoptische BAD kann über mehrerer Signaltransduktionswege phosphoryliert und inaktiviert werden. Die Phosphorylierung von Ser112 erfolgt laut Literatur über den cAMP- und MAPK-Signalweg, während Ser136 über den PI3K-Signalweg phosphoryliert wird [Harada et al., 1999; Bonni et al., 1999; Lizcano et al., 2000]. Angesichts der verminderten PKB-Phosphorylierung nach E481 Inkubation ist eine verringerte PKB Aktivität und eine Reduktion der Phosphorylierung an Ser136 denkbar. Demzufolge war es von Interesse, ob durch die E481-induzierte Aktivierung des cAMP-Signalweges möglicherweise eine gesteigerte Phosphorylierung von Ser112 stattfindet. Deshalb wurde hier nicht die PKB-abhängige Phosphorylierungsstelle, sondern nur Ser112 untersucht.

Die Inkubation der A431 Zellen mit E481 erfolgte analog zu der Vorgehensweise bei der GSK3b-Untersuchung in Form einer Kurzzeitinkubation und einer Langzeitinkubation. Die Phospho-Ser112-BAD-Bande konnte nach SDS-PAGE in einem 14 % igen Gel bei 23 kDa mit einem monoklonalen Antikörper in einer Verdünnung von 1/500 detektiert werden.

4.4.1.5.1 Einfluss von E481 auf die Phosphorylierung des pro-apoptischen BAD an Ser112 bei einer Kurzzeitinkubation

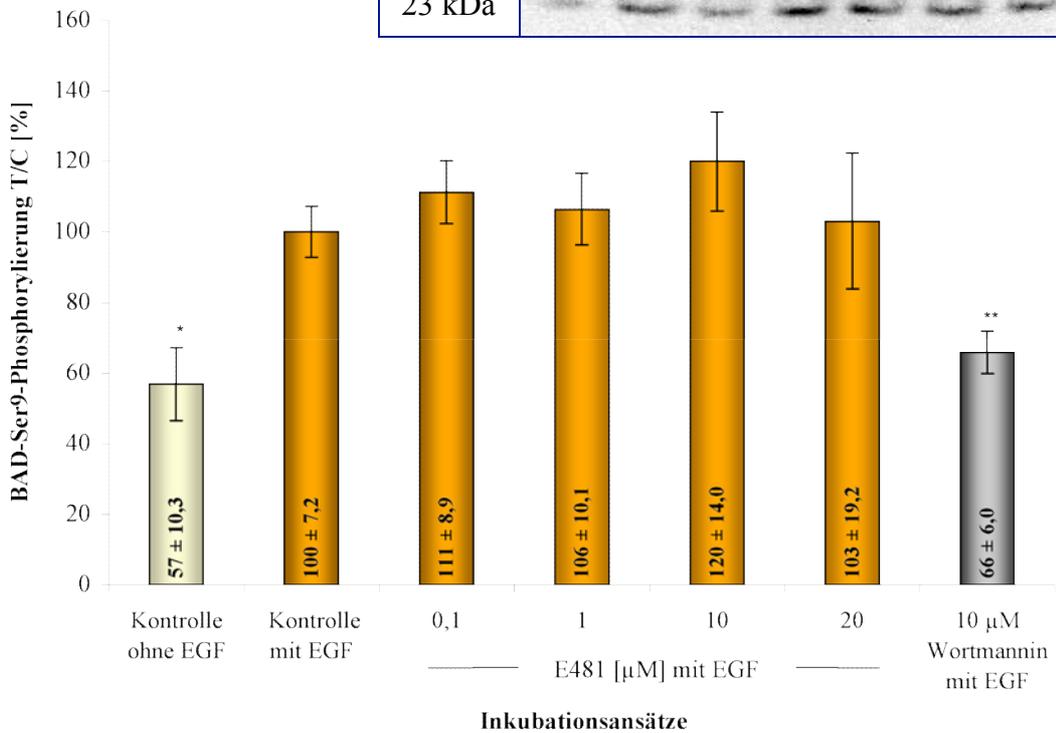
Die Ergebnisse der Bandenintensitäten des, an Ser112 phosphorylierten, BADs nach 30-minütiger Inkubation mit E481 und Wortmannin sind in Tabelle 12 aufgelistet. In Klammern ist die Anzahl der Einzelmessungen angegeben, die für die Berechnung des Mittelwertes tatsächlich benutzt wurden. In Abb. 61 sind die Werte graphisch aufgetragen.

Die mit 100 ng/ml EGF für 10 Minuten stimulierten Zellen weisen annähernd eine Verdopplung der Bandenintensität für Phospho-Ser112-BAD auf. Wird die stimulierte Kontrolle auf 100 % als Bezug gesetzt, ergibt sich für die unstimulierte Kontrolle eine Bandenintensität von 57 %. Die 30-minütige Inkubation mit E481 bewirkt bei keiner Konzentration eine Veränderung der Bandenintensität im Bezug auf die Kontrolle mit EGF. Wortmannin zeigt auch hier eine auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle verringerte Bandenintensität.

Tabelle 12: Phosphorylierung von Ser112-BAD nach 30-minütiger Substanzinkubation mit E481, Wortmannin bzw. 0,3 % DMSO. In Klammern ist die Probenanzahl zur Berechnung des Mittelwertes \pm SD angegeben. Kontrolle ohne EGF-Inkubation (Ko), Kontrolle mit EGF-Stimulation (Km).

Substanz [μ M]	EGF [100 ng/ml]	Phospho-Ser112-BAD Bandenintensität [%] [N] Anzahl der unabhängigen Proben
Ko (0,3 % DMSO)	-	57 \pm 10,3 [4]
Km (0,3 % DMSO)	+	100 \pm 7,2 [3]
E481 [0,1 μ M]	+	111 \pm 8,9 [4]
E481 [1 μ M]	+	106 \pm 10,1 [3]
E481 [10 μ M]	+	120 \pm 14,0 [3]
E481 [20 μ M]	+	103 \pm 19,2 [4]
Wortmannin [10 μ M]	+	66 \pm 6,0 [4]

a)



b)

Probe	Ko	Km	Wt	E481			
[μ M]			10,0	0,1	1,0	10,0	20,0
EGF	-	+	+	+	+	+	+
23 kDa							

Abbildung 61: a) Graphische Darstellung der in Tabelle 12 aufgeführten Intensitäten der Phospho-Ser112-BAD-Banden nach Wortmannin- bzw. E481-Inkubation für 30 Minuten (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,005 = **$). b) exemplarischer Western Blot. Kontrolle ohne EGF-Inkubation (Ko), Kontrolle mit EGF-Stimulation (Km), Wortmannin (Wt).

4.4.1.5.2 Einfluss von E481 auf die Phosphorylierung von BAD an Ser112 nach Langzeitinkubation über 6, 18 und 24 Stunden

In A431 Zellen können apoptotische Veränderungen in Folge einer serumhaltigen E481 Inkubation bereits nach 24 Stunden durchflusszytometrisch detektiert werden [Meiers, 2000]. Insofern war das Ausmaß der Phosphorylierung von BAD an Ser112 über einen Zeitraum von 24 Stunden von Interesse.

Analog zu der Kurzzeitinkubation wurde nach 6-, 18- und 24-stündiger E481-Inkubation (0,1 μM , 1 μM und 6 μM) die Intensität der Phospho-Ser112-BAD-Bande bestimmt. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse zusammen mit der Anzahl der Einzelmessungen aufgeführt, die in die Berechnung des Mittelwertes eingegangen sind. In Abb. 61 sind die Werte graphisch zusammen mit den Werten der Kurzzeitinkubation über 30 Minuten (s. 4.4.1.5.1) wiedergegeben.

Tabelle 13: Phosphorylierung von BAD an Ser112 nach 6-, 18- und 24-stündiger Substanzinkubation mit E481. Alle Angaben beziehen sich auf die Kontrolle mit 100 %. In Klammern ist die Probenanzahl zur Berechnung des Mittelwertes \pm SD angegeben.

Substanz [μM]	EGF [100 ng/ml]	Phospho-Ser112-BAD Bandenintensität [%]		
		[N] Anzahl der unabhängigen Proben	6 h	18 h
E481 [0,1 μM]	+	107 \pm 20,4 [3]	88 \pm 15,0 [3]	108 \pm 38,2 [3]
E481 [1 μM]	+	108 \pm 21,0 [3]	68 \pm 4,6 [3]	77 \pm 20,3 [3]
E481 [6 μM]	+	115 \pm 14,0 [3]	52 \pm 5,4 [2]	70 \pm 16,5 [3]

Die Inkubation mit 0,1 μM E481 bewirkt ungeachtet der Inkubationsdauer keine Veränderung zur Kontrolle. Erst bei den höheren Konzentrationen kann sowohl eine dosisabhängige als auch zeitabhängige Verringerung der Phospho-Ser112-Bande detektiert werden. E481 verursacht ab einer Konzentration von 1 μM und einer Inkubationsdauer von 18 Stunden eine Abnahme der Phosphorylierung. Aufgrund der hohen Standardabweichung der Einzelversuche ist bei der Anzahl der Versuche keine Signifikanz der Daten feststellbar. Jedoch ist tendenziell eine verminderte Phosphorylierung erkennbar.

Eine Inkubation für 2 Stunden in der Konzentration 1 μM E481 [n=4] ergab eine deutliche Bandenintensivierung (154 \pm 23,7 %). Da für diese Inkubationsdauer kein weiterer Vergleichswert existiert, wurde dieser Wert nicht mit in die Graphik aufgenommen. Wortmann zeigte in der eingesetzten Konzentration von 10 μM bei jeder Inkubationsdauer eine Reduktion der Bandenintensität um 20 bis 40 % (nicht gezeigt).

a)

b)

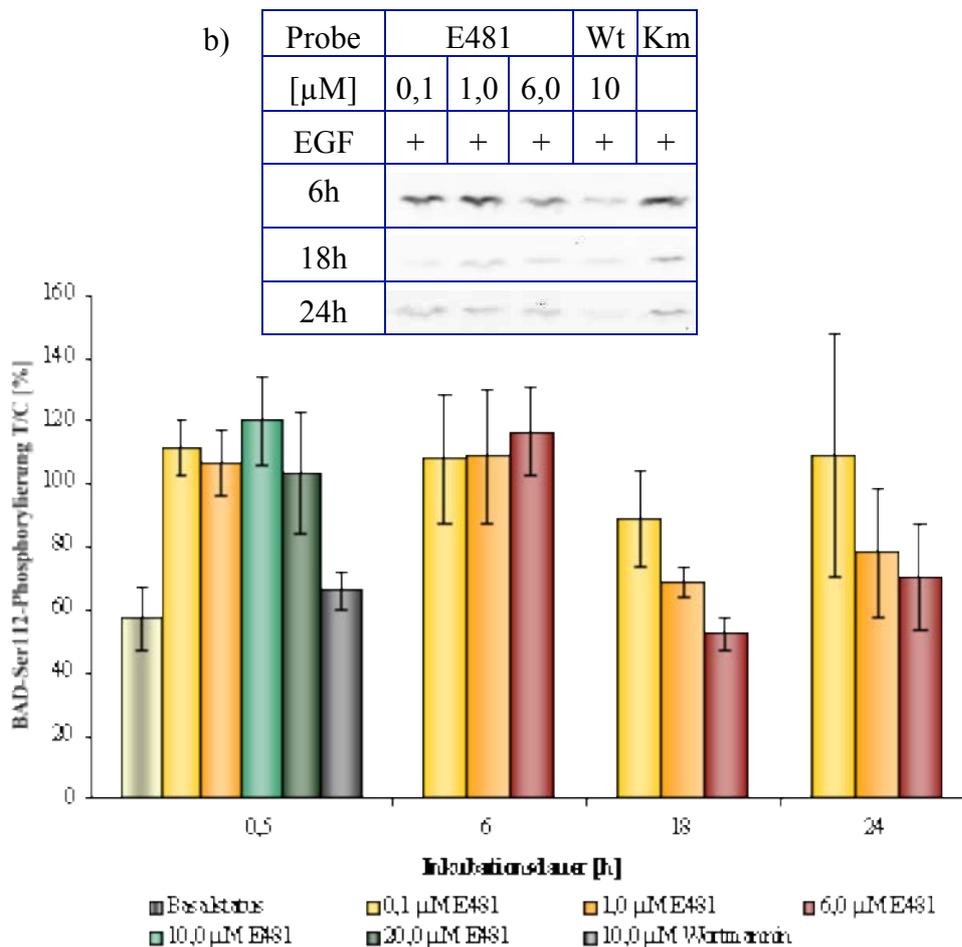


Abbildung 62: a) Graphische Darstellung der Ser112-BAD Phosphorylierung nach E481 Inkubation in verschiedenen Konzentrationen über 30 Minuten sowie 6, 18 und 24 Stunden. b) exemplarische Western Blots über 6, 18 und 24 Stunden. Wt = Wortmannin, Km = Kontrolle mit EGF.

4.4.1.6 Diskussion der Auswirkungen von E481, Wortmannin und EGF auf die Phosphorylierung von BAD an Ser112

Das pro-apoptotisch wirkende BAD kann PKA- bzw. MAPK-vermittelt an Ser112 und PKB-vermittelt an Ser136 phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierung an einem der beiden Reste wird eine Inaktivierung von BAD durch Bindung an das zytosolische 14-3-3 Protein bewirkt. E481 wirkt konzentrationsabhängig apoptoseinduzierend, möglicherweise durch Hemmung der PKB-Phosphorylierung. Nachdem auch der MAPK-Signalweg durch E481 gehemmt ist, war von beiden Signalwegen eine pro-apoptotische Wirkung aufgrund einer verminderten BAD-Phosphorylierung zu erwarten. Allerdings bewirkt E481 auch eine Aktivierung der PKA, so dass über diesen Weg am ehesten eine apoptosehemmende BAD-Phosphorylierung stattfinden könnte. Um die apoptosevermindernde Phosphorylierung abschätzen zu können, wurde bei diesen Untersuchungen ein Antikörper gewählt, der die durch PKA bzw. MAPK phosphorylierbare Aminosäure Ser112 erkennt.

Die 10-minütige Stimulierung der A431 Zellen mit EGF führte zu einer ungefähren Verdopplung der Bandenintensität. Dabei erfolgt die Signalweiterleitung laut Literatur vom EGF-Rezeptor über den Ras/MAPK-Signalweg zur MAPKAP-K1 [Lizcano et al., 2000]. Wortmannin zeigt eine signifikante Hemmung der Ser112-BAD-Phosphorylierung, die nicht weiter in der Literatur beschrieben ist. Wortmannin sollte eigentlich, da es den PI3K/PKB-Signalweg unterbricht, keine Auswirkungen auf Ser112 haben. Grund für die verminderte Phosphorylierung könnte zum einen ein zellspezifischer Crosstalk mit der MAPK-Kinase in A431 Zellen sein. Zum anderen wurde in der Literatur [Lizcano et al., 2000] im Zusammenhang mit dem hier verwendeten Antikörper auch von Kreuzreaktionen mit dem Phospho-Ser155 und dem Phospho-Ser136 berichtet. Unter der Annahme, dass der Antikörper nicht nur Ser112, sondern auch Ser155 und Ser136 detektiert, kann aus den Bandenintensitäten nur auf eine Gesamtphosphorylierungsrate als Summenparameter aus PKA-, PKB- und MAPK-vermittelter Phosphorylierung geschlossen werden.

Für E481 zeigt sich nach 0,5 Stunden konzentrationsunabhängig keine Veränderung der Phosphorylierung an Ser112-BAD. Nach 2 Stunden bei 1 μM wird eine Steigerung auf 154 % beobachtet, die allerdings bereits nach 6 Stunden verschwunden ist. Ab 18 Stunden ist eine konzentrationsabhängige Reduktion der BAD-Ser112-Phosphorylierung bei 1 μM auf 68 %, bei 6 μM auf 52 % nachweisbar. Nach 24 Stunden nimmt die Phosphorylierung von Ser112-BAD wieder leicht auf etwa 70 % der Kontrolle zu.

Der Anstieg der BAD-Phosphorylierung innerhalb der ersten 2 Stunden könnte auf die Aktivierung der PKA durch E481 zurückzuführen sein. Nach 6 Stunden scheint die BAD-Phosphorylierung allerdings gegenreguliert zu werden und nach 18 Stunden serumfreier

Inkubation mit E481 setzt sich eine Reduktion der Phosphorylierung von Ser112-BAD durch. Wenig später sind unter serumhaltigen Bedingungen auch die ersten apoptotischen Zellzyklusveränderungen durchflusszytometrisch detektierbar [Meiers, 2000]. Die Zunahme der BAD-Phosphorylierung nach 24 Stunden serumfreier Inkubation könnte Resultat einer bereits einsetzenden Apoptose sein. Da apoptotische Zellen sich leicht vom Untergrund ablösen und dann mit dem Kulturmedium verworfen werden, könnte bei fortgeschrittener Apoptose eine Fehlverteilung zugunsten der adhären, BAD-phosphorylierten Zellen auftreten.

Wodurch könnte die Abnahme der anfänglich erhöhten Ser112-Phosphorylierung bedingt sein? Harada et al. (1999) konnte anhand von Versuchen mit Oligopeptiden zeigen, dass vor allem die RII-Typ PKA, die an mitochondriale A-kinase anchoring proteins (AKAPs) gebunden ist, für die BAD-Phosphorylierung an Ser112 verantwortlich ist. Der PDE4-Hemmer E481 ist fluoreszenzmikroskopisch maximal 60 Minuten lang als diffus verteilte Komponente im Zytosol beobachtbar, danach findet eine bevorzugt perinukleäre Lokalisation statt [Marko et al., 2002]. Die Aktivierung der AKAP-gebundenen PKA könnte somit durch die Lokalisationsveränderung von E481 zeitlich begrenzt sein. Die Abnahme der anfänglich erhöhten Ser112-Phosphorylierung könnte auch Resultat einer langfristigen Aktivierung der PDE4 sein. In der Spindelzellkarzinomzelllinie CarB konnte bereits eine Stunde nach beginnender E481-Inkubation eine beginnende PDE-Reaktivierung nachgewiesen werden [Marko, 1994]. Möglich ist sowohl eine posttranslationale Aktivierung der cAMP-spezifischen PDEs über den Feedbackmechanismus der PKA (s. 2.1.3.2; Krauss, 2001) sowie eine de novo-Synthese der PDEs [Sette et al., 1996].

Ferner konnte gezeigt werden, dass die p21-aktivierte Kinase PAK ebenfalls in der Lage ist, BAD an Ser112 und Ser136 zu phosphorylieren. Als Folge der Zytoskelettveränderungen bzw. der PKA-Aktivierung durch E481 könnte möglicherweise eine Reduktion der PAK-Aktivität erfolgen [Schürmann et al., 2000].

Die nach 18 Stunden bewirkte Hemmung der BAD Phosphorylierung könnte ausreichend sein für die Heterodimerisation von BAD (s. Kapitel 2.1.1.4) mit dem anti-apoptotisch wirksamen BCL-Protein. Daraufhin könnte die Initiierung der apoptoseauslösenden Caspase-Kaskade bewirkt werden [Reed JC, 1998].

Zudem ist für den PDE4 Inhibitor Rolipram eine Verringerung der BCL-Expression und eine Erhöhung der BAX Expression in B-Zellen aus Patienten mit chronisch lymphozytärer Leukämie beschrieben worden [Siegmond et al., 2001]. Da E481 ein sehr viel potenterer PDE Inhibitor als Rolipram ist, könnten diese differentiellen Effekte der Expression von BCL und BAX die Apoptoseinduktion nach BAD-Dephosphorylierung zusätzlich unterstützen.

4.4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 4.4.1

Die Untersuchung der Auswirkungen von E481 auf den PI3K/PKB-Signalweg zeigen, dass E481 in MCF-7 Zellen, im Gegensatz zu der Wirkung in A431 Zellen [Kemény, 1998], keine Hemmung der PI3K bewirkt. Die Hemmung der PI3K-Aktivität in A431 Zellen führt allerdings zu einer reduzierten PKB-Phosphorylierung. Eine Gegenregulation durch die PKA scheint auf dieser Stufe nicht stattzufinden. Eine E481-induzierte Phosphorylierungsabnahme, die vermutlich gleichbedeutend mit einer PKB-Hemmung ist [Datta et al., 1999], könnte als Folge einer verminderten Translokation der PKB an die Plasmamembran auftreten [Scheid & Woodgett, 2001].

Die nachgeschaltete GSK3b zeigt über einen Zeitraum von 24 Stunden keine Reduktion der Phosphorylierung an Ser9, obwohl die reduzierte PKB-Phosphorylierung dies erwarten lässt. Möglicherweise wird die vermutlich gehemmte PKB durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung von Ser9 ausgeglichen. Folglich liegt die GSK3b nach E481 Behandlung im phosphorylierten, inaktiven Zustand vor [Pap & Cooper, 1998]. Eine durch E481 induzierte, GSK3b-vermittelte Phosphorylierung von Cyclin D1 [Diehl et al., 1998] kann aufgrund der Daten weitgehend ausgeschlossen werden. Folglich kann durch E481 kein GSK3b-vermittelter Cyclin D-Abbau, einhergehend mit einer p27-Freisetzung und Hemmung der Cyclin E/CDK2-Komplexe [Busse et al., 2000; Collado et al., 2000] induziert werden. Bei dem durch E481 induzierten Zellzyklusarrest spielen somit vermutlich alternative Effekte auf Signaltransduktionswege, wie z. B. die Hemmung des MAPK-Signalweges [Meiers, 2000] und die Phosphorylierung von PKA-modulierten Transkriptionsfaktoren [Jakobs, 2002], eine wesentliche Rolle.

Weiterhin wurde die apoptosevermindernde Phosphorylierung von BAD, die entweder PKA-, MAPK- oder PKB-vermittelt an verschiedenen Resten auftritt, untersucht. Dabei interessierte vor allem, ob durch die E481 induzierte Aktivierung der PKA eine mögliche PKB- und MAPK-vermittelte Apoptoseinduktion ausgeglichen wird. An der PKA-Phosphorylierungsstelle Ser112 konnte nach 18-stündiger Inkubation mit E481 eine abnehmende Phosphorylierung von BAD gefunden werden. Die Reduktion der BAD-Phosphorylierung an Ser112 könnte wesentlich zur E481-induzierten Apoptose in A431 beitragen [Reed, 1998].

4.5 Die Wirkung von E481 auf die pRb-Phosphorylierung

Eine Zellzyklus-Arretierung in der G₁-Phase, wie sie durch E481 in allen bisher untersuchten Tumorzelllinien [A431 Zellen: Meiers, 2000] induziert wird, könnte durch die Hemmung der G₁-Phase-Cyclin/CDK-Komplexe erfolgen. Dafür existieren verschiedene Möglichkeiten (s. Abb. 32, Seite 39), u. a. die Hemmung der Cyclin D/CDK4,6- und Cyclin E(A)/CDK2-Komplexe durch Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27, der vermehrte Abbau von Cyclin D1, sowie die verminderte Expression von Cyclin D1.

Aus den Untersuchungen zur E481-vermittelten Beeinflussung des PI3K/PKB-Signalweges (s. 4.4) lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen, dass E481 einen GSK3b-vermittelten Cyclin D1-Abbau in A431 Zellen induziert.

Eine verstärkte Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 nach 24-stündiger Inkubation mit 5 µM und 10 µM E481 findet in der großzelligen Lungenkarzinomzelllinie LXFL-529L nicht statt [Kunz, 2000].

Für das Überschreiten des sog. G₁-Restriktionspunktes ist die Phosphorylierung des pRb-Proteins unerlässlich. Dadurch wird die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F ermöglicht, der für den G₁/S-Übergang der Zelle nötig ist (s. Abb. 35, Seite 43). Der Transkriptionsfaktor E2F aktiviert die Transkription der Cyclin E- und Cyclin A-Gene und leitet dadurch die Anreicherung der Cycline ein, die am Ende der G₁-Phase für den Übergang in die S-Phase benötigt werden.

Erst das Eingreifen aktiver Cyclin E/CDK2-Komplexe ermöglicht die effektive Phosphorylierung des pRb, da gleichzeitig die Inaktivierung der Ser/Thr-spezifischen Proteinphosphatase PP-1 erfolgt [Liu et al., 1999; Tamrakar et al., 2000].

4.5.1 Untersuchung der pRb- Phosphorylierung

Für die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus des pRb-Proteins nach Inkubation mit E481 wird der PhosphoPlus Rb (Ser780, Ser795, Ser807/811) Antibody Kit der Firma Cell Signaling TECHNOLOGY™ verwendet.

Die Aufarbeitung der A431 Zellen erfolgt nach Vorschrift im Anschluss an eine 3-tägige Kultivierung der Zellen in serumreduziertem (0,2 % FKS) MEM-Medium. Der Serumentzug bedingt eine Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase und die Dephosphorylierung des pRB. Mit der serumhaltigen (10 % FKS) Inkubation über 24 Stunden mit E481 treten die Zellen synchron in den Zellzyklus ein und erreichen den sog. G₁-Restriktionspunkt.

Nach der Aufarbeitung der Zellen wird das Gesamtzelllysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12 % ige Acrylamidgel) und Western Blots mit den Antikörpern gegen die Phosphorylierungsstellen Ser780, Ser795 und Ser807/811 des pRb-Proteins durchgeführt. Der Antikörper Ser807/811 bindet sowohl an Ser807 als auch Ser811. Eine Phosphorylierung beider Serinreste ist für die Antikörperbindung nicht notwendig. Die Banden erscheinen bei einer Größe von 110 bis 120 kDa. Diese Serinreste werden alle von Cyclin D/CDK4,6-Komplexen phosphoryliert [Tamrakar et al., 2000].

4.5.1.1 Einfluss von E481 und Ly294002 auf das pRb

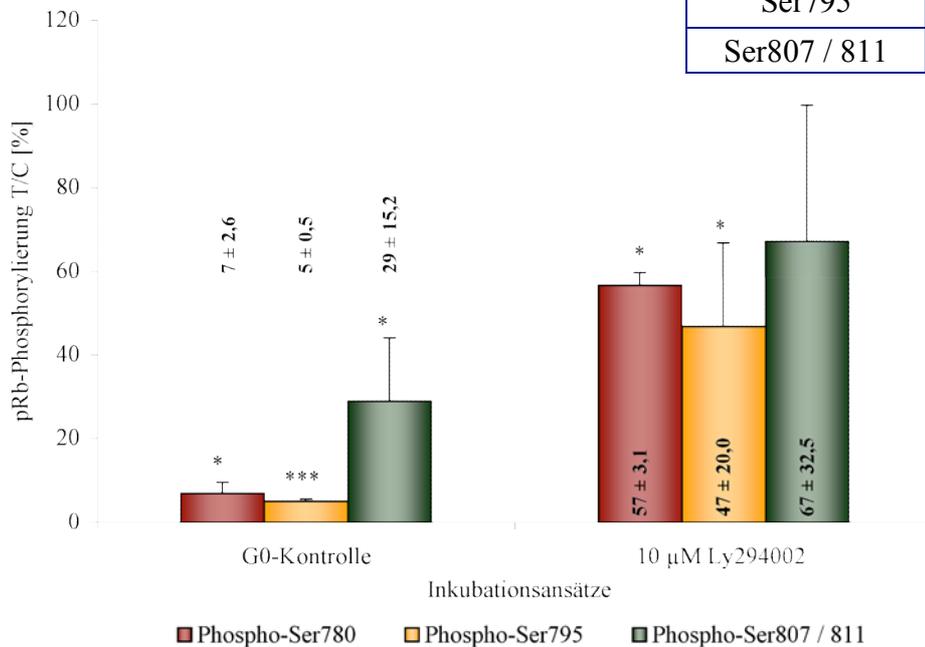
Die Ergebnisse der Bandenintensitäten der verschiedenen Phosphorylierungsstellen des pRb-Proteins nach 24-stündiger Inkubation mit E481 in den Konzentrationen 1 µM, 6 µM und 10 µM sowie mit 10 µM Ly294002 sind in Tabelle 14 aufgelistet. Des Weiteren ist die G₀-Kontrolle (G₀) aufgeführt, die den sog. „hypophosphorylierten“ Zustand des pRb-Proteins nach der dreitägigen Serumreduktion belegt.

Alle Proben beziehen sich auf die Bandenintensität der Kontrolle (K), die nach der dreitägigen Serumreduktion für 24 Stunden serumhaltig mit 0,3 % DMSO kultiviert wurde. Das Ausmaß der pRb-Phosphorylierung durch den Wiedereintritt in den Zellzyklus wurde auf 100 % festgelegt. In Klammern ist die Anzahl der Einzelmessungen angegeben, die für die Berechnung des Mittelwertes benutzt wurden. Die graphische Darstellung der G₀-Kontrolle und der Inkubation mit 10 µM Ly294002 erfolgt in Abb. 63, in Abb. 64 sind die E481-Inkubationen wiedergegeben.

Tabelle 14: Phosphorylierung der pRb-Aminosäuren Ser780, Ser795 und Ser807/811. Aufgeführt sind die Bandenintensitäten der G₀-Kontrolle (serumdepletierte Zellen vor dem Wiedereintritt in den Zellzyklus) sowie die der E481- bzw. Ly294002-Proben (24 Stunden nach Wiedereintritt in den Zellzyklus). In Klammern ist die Probenanzahl zur Berechnung des Mittelwertes ± SD angegeben.

Probe	pRb-Bandenintensität T/C [%]		
	[N] Anzahl der unabhängigen Proben		
	Phospho-Ser780	Phospho-Ser795	Phospho-Ser807/811
G ₀ -Kontrolle	7 ± 2,6 [3]	5 ± 0,5 [4]	29 ± 15,2 [4]
E481 [1 µM]	86 ± 21,7 [3]	121 ± 7,1 [3]	82 ± 8,3 [3]
E481 [6 µM]	52 ± 3,7 [3]	85 ± 11,6 [3]	69 ± 10,8 [4]
E481 [10 µM]	33 ± 3,8 [3]	28 ± 9,4 [4]	40 ± 11,9 [4]
Ly294002 [10 µM]	57 ± 3,1 [3]	47 ± 20,0 [4]	67 ± 32,5 [4]

a)



b)

Probe	G ₀	K	Ly
[µM]			10
EGF	-	+	+
Ser780			
Ser795			
Ser807 / 811			

Abbildung 63: a) Bandenintensität der phosphorylierten pRb-Aminosäuren Ser780, Ser795, Ser807/811. 100%-Marke entspricht der Bandenintensität der Kontrolle K : 24 Stunden serumhaltige Inkubation ohne Hemmstoff. G₀-Kontrolle: serumdepletierte Zellen vor dem Wiedereintritt in den Zellzyklus; Ly294002: 24 Stunden serumhaltige Inkubation mit Hemmstoff (Signifikanzen: p<0,05=*; p<0,005=**; p<0,001=***). b) Exemplarische Western Blots, G₀-Kontrolle (G₀), Ly294002 (Ly), Kontrolle (K).

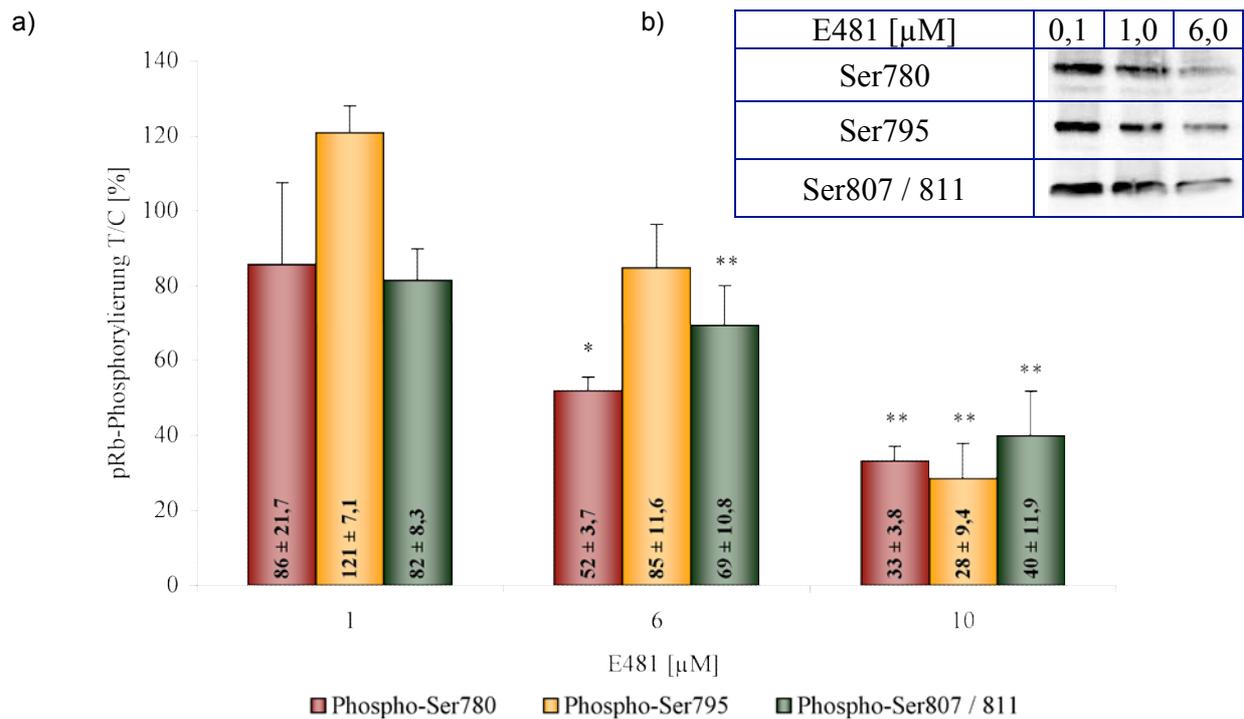


Abbildung 64: a) Bandenintensität des an Ser780, Ser795 und Ser807/811 phosphorylierten pRb nach 24-stündiger serumhaltiger Inkubation mit E481 in verschiedenen Konzentrationen. Die 100%-Marke entspricht der Bandenintensität der Kontrolle K, die 24 Stunden serumhaltig ohne Hemmstoff inkubiert wurde. (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,005 = **$; $p < 0,001 = ***$). b) Exemplarische Western Blots für E481.

Die G_0 -Kontrolle bestätigt den sog. „hypophosphorylierten“ Zustand der arretierten A431 Zellen. Dabei zeigen vor allem Ser780 und Ser795 eine stark verminderte Phosphorylierungstendenz im Vergleich zu der Kontrolle K, die 24 Stunden serumhaltig mit 0,3 % DMSO inkubiert und als Bezug auf 100 % festgelegt wurde.

Der PI3K-Inhibitor Ly294002 hemmt alle drei Phosphorylierungsstellen, wobei die Signifikanz ebenfalls an Ser780 und Ser795 zutage tritt.

Auch E481 hemmt alle drei Phosphorylierungsstellen. Ab einer Konzentration von 6 µM, bei der die A431 Zellen auch einen Anstieg in der G_1 -Phase aufweisen [Meiers, 2000], wird die Phosphorylierung signifikant an Ser807/811 ($p < 0,005$) und an Ser780 ($p < 0,05$) gehemmt. Ab einer Inkubationskonzentration von 10 µM zeigen alle drei Phosphorylierungsstellen eine signifikante Hemmung ($p < 0,005$) um ca. 60 %.

4.5.2 Diskussion der Ergebnisse zur pRb-Phosphorylierung

Die Phosphorylierung des pRb nach serumhaltiger Inkubation mit 10 μM Ly294002 an A431 Zellen ist an allen drei untersuchten Phosphorylierungsstellen (Ser780, Ser795 und Ser807/811) zu etwa 30-50 % gehemmt. Alle drei Phosphorylierungsstellen sind Substrate der Cyclin D/CDK4,6-Komplexe. Eine Hemmung des Wachstums von A431 Zellen auf 50 % der Kontrolle erfolgt bei Inkubation mit Ly294002 in einem Konzentrationsbereich von $23 \pm 5,1$ μM (eigene Daten). Insofern ist eine Hemmung der pRb-Phosphorylierung bereits vor einer effektiven Wachstumshemmung detektierbar. Die Ly294002-induzierte Zellzyklusarrestierung (ab 25 μM) in A431 Zellen ist durch einen p27-Anstieg gekennzeichnet [Busse et al., 2000]. In primären Mäuseembryonen-Fibroblasten wurde zusätzlich eine Hemmung des Cyclin E/CDK2-Komplexes nachgewiesen, die unabhängig von p21 und den CDK-Inhibitoren der INK4-Familie erfolgt [Collado et al., 2000].

Veränderungen des pRb-Phosphorylierungsmusters konnten nach 24-stündiger E481-Inkubation bei 1 μM nicht gefunden werden. Bei einer Konzentration von 6 μM E481 ist die Phospho-Ser795-Bande unwesentlich, Phospho-Ser780- um 48 % und die Phospho-Ser807/811-Bande um ca. 30 % reduziert. Ab einer Konzentration von 10 μM E481 werden die Cyclin D/CDK4,6-abhängigen Phosphorylierungen signifikant ($p < 0,005$) gehemmt.

Die möglichen Auswirkungen der E481-induzierten PI3K-Hemmung auf den Zellzyklus könnten teilweise infolge der Serum- bzw. Wachstumsfaktor-induzierten Aktivierung der MAPK unterdrückt werden. Denkbar ist eine Auswirkung auf die Einstellung des p27- bzw. Cyclin E/CDK2-Gleichgewichts. Die Hemmung der PKB-Phosphorylierung könnte die Erhöhung der p27-Expression zur Folge haben und nachfolgend die Hemmung der Cyclin E/CDK2-Komplexe vermitteln. Andererseits könnte die mitogen-abhängige Aktivierung der Cyclin E/CDK2-Komplexe den Abbau von p27 verstärken [Vlach et al., 1997; Collado et al., 2000]. Für den E481-induzierten Zellzyklusarrest scheint allerdings keine p21/p27-Expressionssteigerung [Kunz, 2000] und auch keine GSK3b-Abhängigkeit zu existieren [s. 4.4.1.3.2].

Aus Untersuchungen an großzelligen Bronchialkarzinom LXFL-529L Zellen mit Pteridin-Derivaten (E481, 2-(2-Aminoethylamino)-Derivat E584 und das in 6-Position unsubstituierte E586), die stark unterschiedliche Hemmwirkung auf PDE4 haben obwohl sie in etwa gleich stark wachstumshemmend wirken, ergab sich kein Hinweis für eine Korrelation zwischen der PDE4-Hemmung und der pRb-Hypophosphorylierung. Eine Beteiligung der PKA an der Hypophosphorylierung des pRb-Proteins wird andererseits durch Ergebnisse von Untersuchungen mit Forskolin nahegelegt [Jakobs, 2002].

Eine PKA-induzierte Dephosphorylierung des pRB-Proteins könnte auch über die Aktivierung der Protein-Phosphatase-1 (PP-1) erfolgen. Das pRb-Protein kann erst dann effektiv phosphoryliert werden, wenn aktive Cyclin E/CDK2-Komplexe die PP1 inaktivieren [Liu et al., 1999]. Forskolin bewirkt bereits nach 30 Minuten eine PKA-induzierte Aktivierung und Freisetzung der PP-1 [Montminy, 1997]. E481 ist als PDE4-Hemmer ebenfalls in der Lage, den cAMP-Signalweg zu aktivieren und könnte über die PKA auf die PP1 aktivierend wirken [Wagner, 1998].

Eine weitere Möglichkeit, die pRb-„Hypophosphorylierung“ herbeizuführen, besteht z. B. über eine Beeinflussung zellzyklusregulierende Kinasen (wie z. B. Wee1 und Myt1) und Phosphatasen. Eine Hemmung der CDK2 könnte eine Phosphorylierung des pRb-Proteins verhindern. Allerdings kann eine direkte Hemmwirkung von E481 auf CDK1 oder CDK2 anhand von Ergebnissen an rekombinanten Enzymen ausgeschlossen werden [Eisenbrand et al., unpublizierte Ergebnisse]. Denkbar ist auch, dass eine Hemmung der CDK4 als Folge einer Senkung der Cyclin D1-Expression z. B. über cAMP-abhängige Induktion von CREM (cAMP responsive element modulator) Isoformen stattfindet [Jakobs, 2002]. Ebenso ist es möglich, dass der negativen Beeinflussung des MAPK-Signalweges eine Schlüsselrolle bei der pRb-„Hypophosphorylierung“ zukommt. Die „Hypophosphorylierung“ des pRb-Proteins trägt vermutlich wesentlich zu dem G₁-Arrest bei, obwohl natürlich auch weitere Faktoren beim Zellzyklusarrest eine Rolle spielen können.

4.6 Die Wirkung von E481 auf Paxillin

Aus den Actinskelettuntersuchungen (s. 4.3) mit den Pteridin-Derivaten E481 (Leitsubstanz), E584 (2-Aminoethylamino-Derivat) und E495 (Morpholino-Derivat) ging hervor, dass nur E481 das Zusammenfallen des Actinnetzwerkes und das Schrumpfen der Zelle bewirkt. Dabei bestand keine Korrelation mit der Hemmung der PI3K, wohl aber eine mit der Hemmung der PDE4 in der Zelle.

Von vergleichbaren morphologischen Veränderungen in murinen Nebennierenzellen berichtete Han & Rubin (1996) nach Inkubation mit einem zellgängigen cAMP-Analogen. Durch Aktivierung einer Tyrosinphosphatase wird dabei Paxillin dephosphoryliert, löst sich aus den fokalen Komplexen und wandert ins Zytoplasma. Gleichzeitig akkumuliert F-Actin und die fokalen Komplexe lösen sich auf.

Dieser Befund warf die Frage auf, ob E481 über eine cAMP-vermittelte Aktivierung einer Phosphatase die Tyrosin-Dephosphorylierung von Paxillin bewirkt. Dies könnte die Auswirkungen auf das Actinskelett, das Abrunden der Zellen durch Auflösen der fokalen Adhäsionen und eventuell auch den Zellzyklusarrest durch Störung des Integrin-Signaltransduktionsweges erklären.

Insofern sollte untersucht werden, ob E481 in A431 und MCF-7 Zellen Veränderungen der Paxillinlokalisation bewirkt, und falls ja, ob diese mit einer Tyrosin-Dephosphorylierung korrelieren könnten.

Dazu wurden zum einen morphologische Untersuchungen und zum anderen Immunopräzipitationen mit Paxillin und Phosphotyrosin durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden.

4.6.1 Morphologische Untersuchungen der Paxillinverteilung

Die Paxillin-Immunofluoreszenzanalyse wurde analog zu der von Han & Rubin (1996) beschriebenen Weise durchgeführt. Inklusiv der Inkubation wurden alle Proben 90 Minuten ohne Serum behandelt. Die Fixierung erfolgte in 4 % Paraformaldehyd. Der primäre Paxillin-Antikörper wurde mit einem Cy3-gelabeltem Sekundärantikörper nachgewiesen.

Da Actinskelettveränderungen bereits nach 30 bis 60 Minuten auftreten, wurde eine Inkubationsdauer mit 6 μM E481 von $t= 5, 10, 15, 30, 60$ und 90 Minuten gewählt. Neben der reinen morphologischen Dokumentation war dadurch zusätzlich eine kinetische Charakterisierung der Veränderungen möglich.

Der Grad der Veränderung wurde in 3 Stadien eingeteilt, die in Abb. 65 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit E481 exemplarisch dargestellt sind. In das Stadium I der Zellveränderung wurden alle Zellen eingeordnet, die eine definierte Lokalisation des Paxillins am Zellrand in Form von separaten Plaques aufweisen (mittlere Zelle und oben rechts). Stadium II zeichnet sich durch beginnendes Schrumpfen, eine Anreicherung von Paxillin im Zytoplasma und einen unregelmäßigen Paxillinsaum aus (Zelle links oben und unten). Phase III der Veränderungen ist entweder durch vollständiges Verschwinden des Paxillinsaums bzw. eine quasi vollständige Abrundung der Zelle definiert (Zelle Mitte rechts).

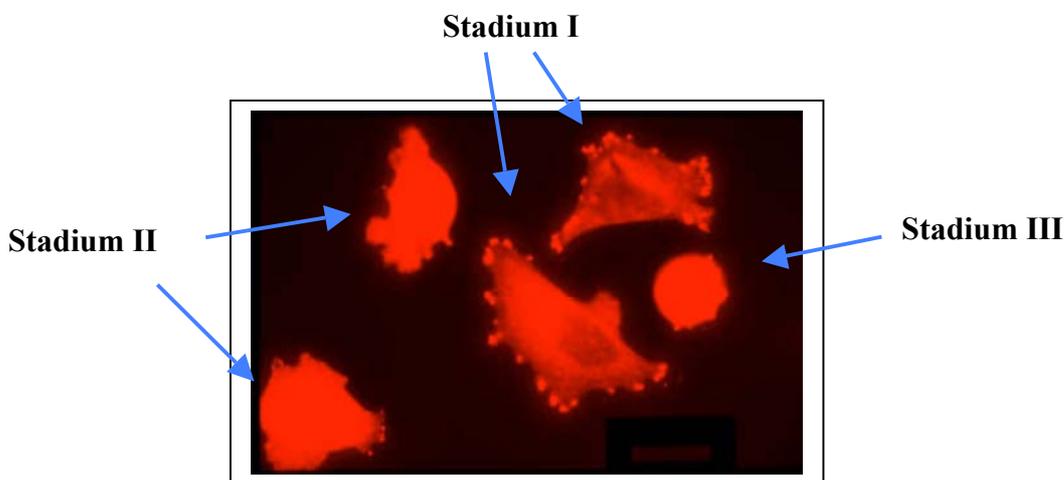
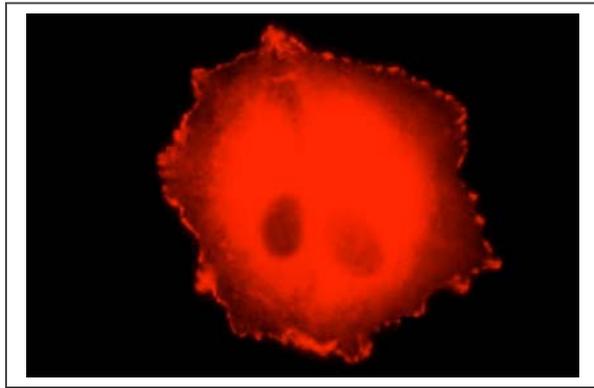
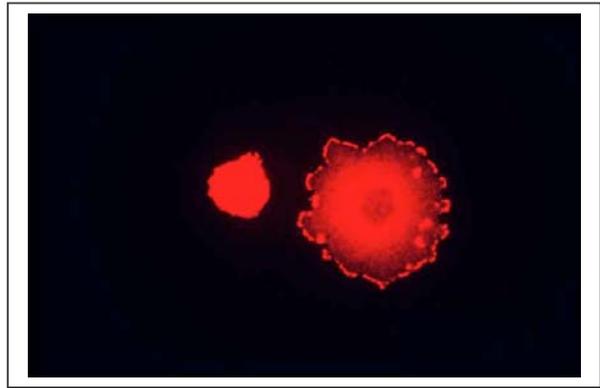


Abbildung 65: Darstellung der Zellen in den Stadien I bis III nach einer Paxillin-Fluoreszenzfärbung an MCF-7 Zellen. Serumfrei Inkubation über 90 Minuten mit E481 (6 μM). (Vergrößerung 250x).

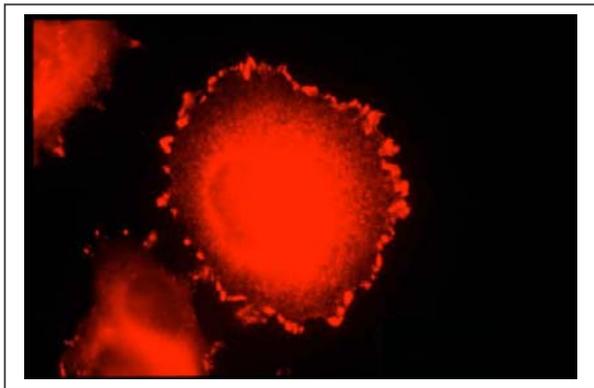
Um die Beteiligung von Phosphatasen bzw. der PKA beurteilen zu können, wurden zusätzlich Objektträger mit dem Phosphatasehemmer Natriumorthovanadat (200 μM) bzw. dem PKA-Inhibitor H89 (1 μM) inkubiert. Die morphologischen Veränderungen sind anhand der 90-minütigen Inkubationen an MCF-7 Zellen in Abb. 66 zusammengestellt.



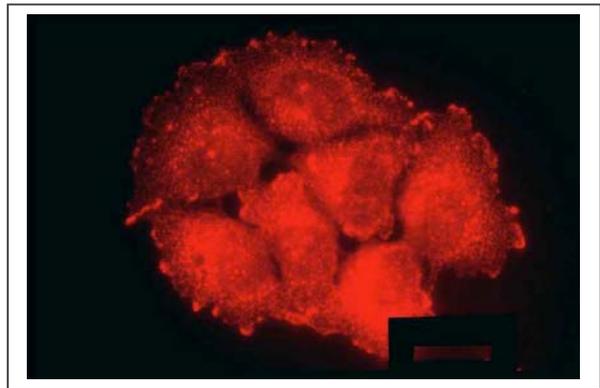
A) MCF-7; Kontrolle (0,3 % DMSO); 90 min.



B) MCF-7; 6 µM E481; 90 min.



C) MCF-7; 200 µM Na₃VO₄; 90 min.

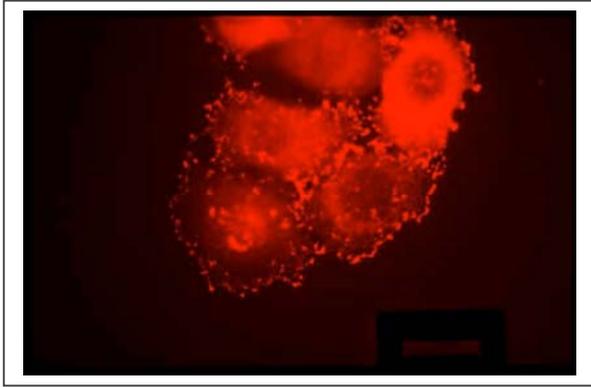


D) MCF-7; 1 µM H89; 90 min.

Abbildung 66: Immunofluoreszenzfärbung von Paxillin in MCF-7 Zellen. Exemplarische Abbildungen nach 90-minütiger Inkubation mit verschiedenen Substanzen (Vergrößerung 250x).

Die Zellen der Kontrolle in Abb. 66 A) zeigen stäbchenförmige Paxillinakkumulationen am Rand der Zelle. Zwischen den Zellen existieren kaum Paxillinakkumulationen. Das Zytoplasma ist zum Kern hin stärker gefärbt, während der Kern gut sichtbar ist. Insofern könnte die stärkere Färbung auf der Schichtdicke des Zytoplasmas basieren, die am Kern wieder minimiert ist. Abb. 66 B) zeigt links eine typische Stadium III Zelle nach E481 Behandlung und rechts eine anscheinend unbeeinflusste Stadium I Zelle. Die rechte Zelle zeigt aber schon Paxillinakkumulationen innerhalb der Zelle. Abb. 66 C) und D) zeigen die Auswirkungen einer Phosphatasehemmung und einer PKA-Hemmung. Ohne aktive Phosphatasen ist der Paxillinsaum stärker ausgeprägt, ohne aktive PKA wird der Paxillinsaum geringer und die Zellen zeigen zumeist einen verringerten Zell-Zell-Kontakt. Keiner der beiden Hemmstoffe führt allerdings zum Abrunden der Zelle.

Um die Wirkung von E481 beurteilen zu können, wurden Koinkubationen mit dem Phosphatasehemmer Natriumorthovanadat (200 µM) bzw. dem PKA-Inhibitor H89 (1 µM) durchgeführt (s. Abb. 67 und 68).

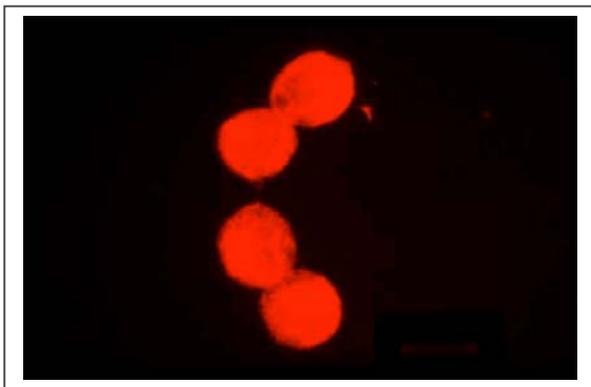


MCF-7; 200 μM Na_3VO_4 + 6 μM E481; 90 min.

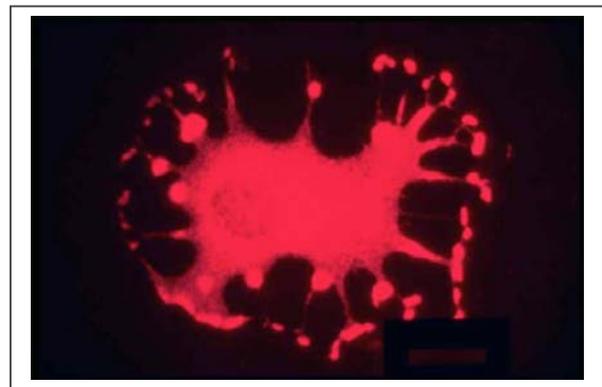
Abbildung 67: Immunofluoreszenzfärbung von Paxillin in MCF-7 Zellen nach 90-minütiger Koinkubation mit E481 und Natriumorthovanadat (Vergrößerung 250x).

Das Abrunden der Zellen ist bei der Koinkubation von E481 (6 μM) mit Natriumorthovanadat (200 μM) weniger stark ausgeprägt als bei den Zellen, die nur mit E481 behandelt wurden. Der Paxillinsaum ist im Vergleich zu den allein mit Natriumorthovanadat behandelten Zellen verringert und es zeigen sich auch hier die Paxillinakkumulationen im Zytoplasma.

Die in Abb. 68 dargestellten, mit E481 und H89 koinkubierten Zellen, zeigen die gravierendsten Veränderungen. Bis auf sehr wenige Ausnahmen, wie sie z. B. in Abb. 68 B) zu sehen ist, waren nach 90-minütiger Inkubation sämtliche Zellen abgerundet.



A) MCF-7; 1 μM H89 + 6 μM E481.



B) MCF-7; 1 μM H89 + 6 μM E481.

Abbildung 68: Immunofluoreszenzfärbung von Paxillin in MCF-7 Zellen nach 90-minütiger Koinkubation mit E481 und H89 (Vergrößerung 250x).

In A431 Zellen sind die gleichen morphologischen Veränderungen zu finden, allerdings bildet Paxillin weniger definierte Plaques und ist stark im Zytoplasma vertreten, wodurch die Bilder weniger strukturiert sind als die der MCF-7 Zellen. Nur in einer Hinsicht unterscheiden sich A431 Zellen in ihren morphologischen Veränderungen. Mit E481 bildeten sich bei den 5- bis 30-minütigen Inkubationen innerhalb der Zelle blasenartige Segmente, die nach 90 Minuten

nicht mehr vorzufinden waren. Wahrscheinlich sind diese Zellen in das Stadium III übergegangen. In den folgenden Abbildungen sind die *Ergebnisse* der kinetischen Charakterisierung der morphologischen Veränderungen und die Verteilung der Zellen auf die 3 Stadien nach verschiedenen Substanzinkubationen dargestellt. Pro Inkubationsansatz wurden mindestens 3 unabhängige Färbungen durchgeführt, 24h später wurden pro Objektträger 100 Zellen ausgezählt und die Anzahl der Zellen pro Veränderungsgrad bestimmt. Tabelle 15 zeigt die entsprechenden Zahlenwerte zusammengefasst.

Tabelle 15: Verteilung der MCF-7 und A431 Zellen auf die 3 Stadien der Veränderungen nach Substanzbehandlung über verschiedene Zeiträume. Zur Berechnung der Mittelwerte \pm SD wurden 3 unabhängige Versuche ausgezählt.

6 μ M E481 Inkubation [min] Ko-Substanz	Anzahl der MCF-7 Zellen im Stadium			Anzahl der A431 Zellen im Stadium		
	I	II	III	I	II	III
0 min	62 \pm 2,5	31 \pm 3,3	7 \pm 2,0	66 \pm 11,0	29 \pm 12,7	5 \pm 1,7
5 min	52 \pm 3,0	38 \pm 6,2	10 \pm 4,6	28 \pm 16,1	61 \pm 14,6	11 \pm 2,0
10 min	39 \pm 19,1	46 \pm 18,2	15 \pm 1,0	26 \pm 14,2	58 \pm 17,6	15 \pm 3,8
15 min	28 \pm 7,5	47 \pm 9,7	24 \pm 3,1	19 \pm 15,0	57 \pm 9,7	24 \pm 6,1
30 min	27 \pm 14,5	48 \pm 10,7	25 \pm 6,4	16 \pm 11,0	48 \pm 10,7	36 \pm 9,5
60 min	26 \pm 7,2	45 \pm 5,9	29 \pm 1,5	15 \pm 5,5	44 \pm 9,8	41 \pm 4,6
90 min	16 \pm 15,6	55 \pm 21,9	29 \pm 6,4	14 \pm 10,1	36 \pm 11,8	50 \pm 16,1
90 min 200 μ M Na ₃ VO ₄	41 \pm 1,4	41 \pm 1,4	18 \pm 2,8	28 \pm 6,2	49 \pm 8,1	23 \pm 8,7
90min 1 μ M H89	0 \pm 0,0	0 \pm 1,0	100 \pm 1,0	3 \pm 2,5	8 \pm 5,0	89 \pm 7,5

In A431 Zellen erfolgt der Übertritt von Stadium I nach II bereits massiv in den ersten 5 Minuten. Danach steigt kontinuierlich der Anteil abgerundeter Zellen bis auf 50 % nach 90 Minuten an. In MCF-7 Zellen erfolgt die Verringerung der Stadium I und II Zellen in das jeweils folgende Stadium gleichmäßig. Nach 90 Minuten sind Stadium II Zellen dominant. Besonders sensitiv reagierten die MCF-7 Zellen auf die Koinkubation mit dem PKA-Inhibitor H89.

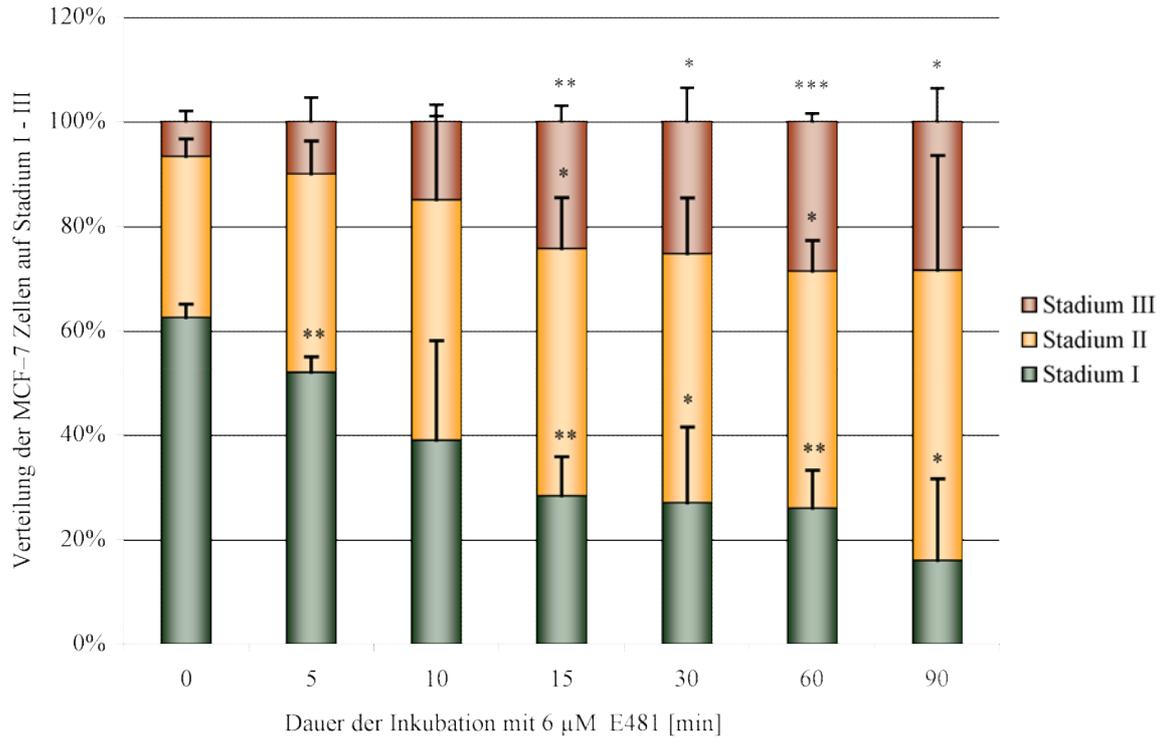


Abbildung 69: Zeitabhängige Verteilung der MCF-7 Zellen nach Inkubation mit 6 µM E481 auf die Stadien I bis III (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,005 = **$; $p < 0,001 = ***$).

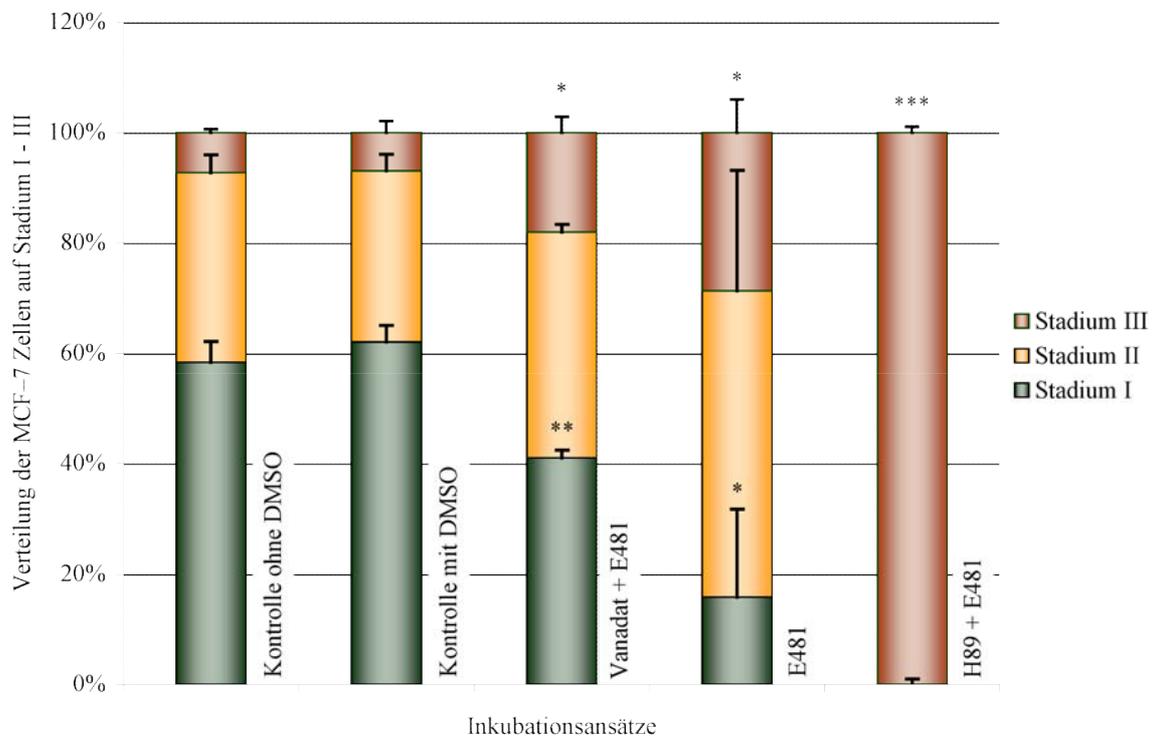


Abbildung 70: Substanzabhängige Verteilung der MCF-7 Zellen nach 90-minütiger Inkubation auf die Stadien I bis III (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,005 = **$; $p < 0,001 = ***$).

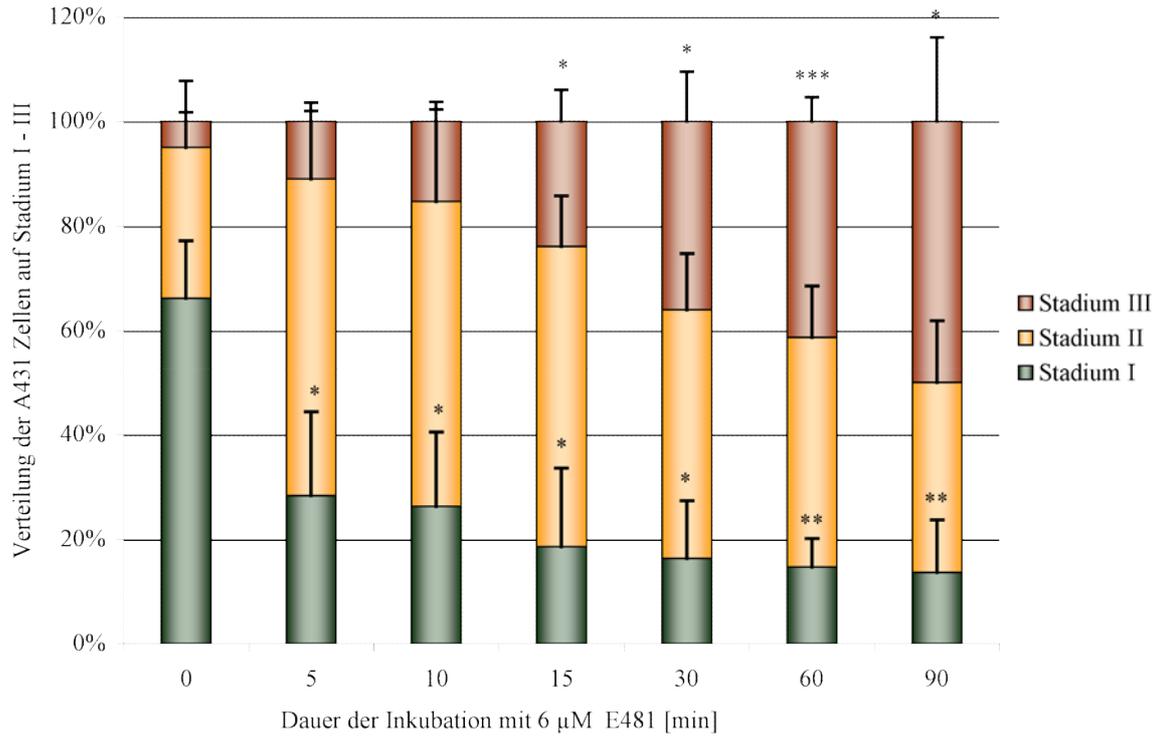


Abbildung 71: Zeitabhängige Verteilung der A431 Zellen nach Inkubation mit 6 µM E481 auf die Stadien I bis III (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,005 = **$; $p < 0,001 = ***$).

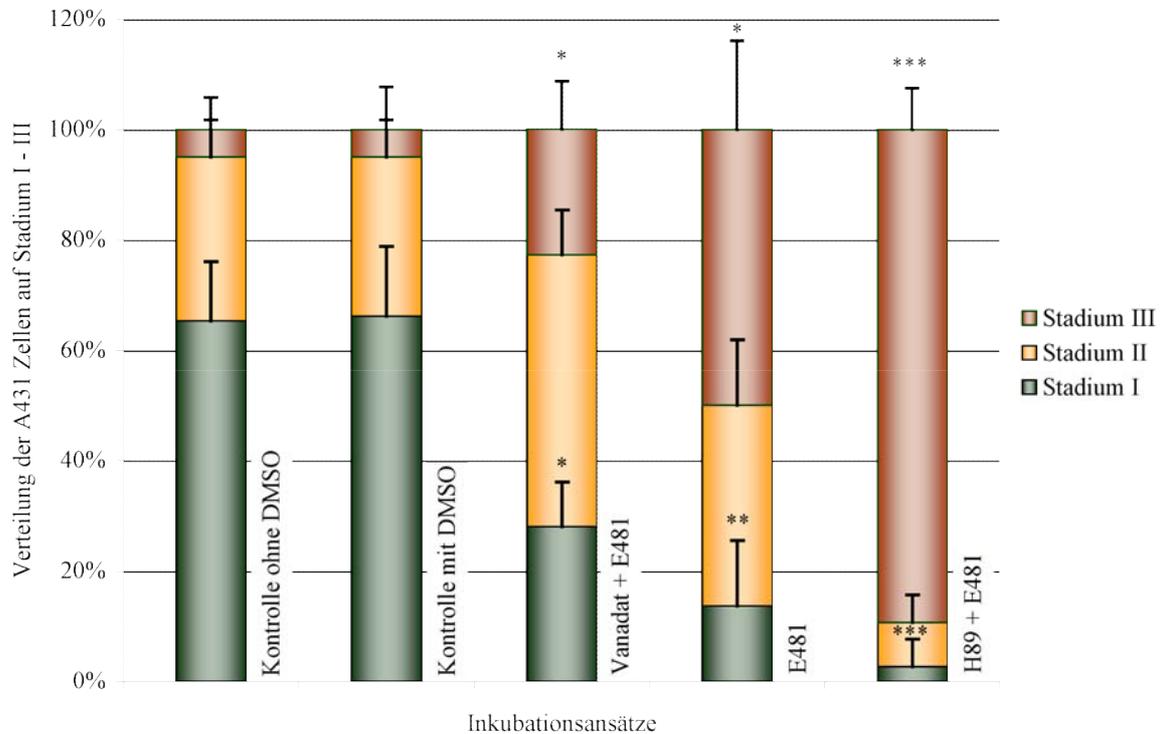


Abbildung 72: Substanzabhängige Verteilung der A431 Zellen nach 90-minütiger Inkubation auf die Stadien I bis III (Signifikanzen: $p < 0,05 = *$; $p < 0,005 = **$; $p < 0,001 = ***$).

4.6.2 Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von Paxillin

Grundgedanke hinter den Versuchen, den Phosphotyrosinanteil von Paxillin zu bestimmen, war die Überlegung, dass vielleicht die Dephosphorylierung von Paxillin bzw. der fokalen Adhäsionskinase FAK durch die PKA zu einer Auflösung der fokalen Komplexe führt. Da hierüber das Actinskelett mit der Plasmamembran verknüpft ist, hätte eine Auflösung der fokalen Komplexe sowohl den Verlust der Actinskelettintegrität, als auch das Abrunden der Zellen erklären können.

Aufgrund der morphologischen Untersuchungen ist eine Abwanderung von Paxillin ins Zytosol nach E481-Inkubation wahrscheinlich und eine Beteiligung von Phosphatasen durchaus denkbar. Eine Beteiligung der PKA scheint allerdings weniger relevant für die Verringerung des Paxillinsaums zu sein, als dass sie dem Prozess der Abrundung entgegenwirkt.

Als erstes wurde in A431 Zellen versucht, nach der Methode von Carter & Bellido (1999) eine Trennung der partikulären und zytosolischen Paxillinfraktion zu erreichen. Es gelang jedoch nicht, Paxillin in der partikulären Fraktion nachzuweisen (was vermutlich an der Pufferzusammensetzung lag).

Daraufhin wurde analog zu der von Han & Rubio (1996) durchgeführten Methode an zwei getrennten Aufarbeitungen zum einen Paxillin, zum anderen Phosphotyrosin immunopräzipitiert, und dann der Western Blot mit dem jeweils anderen Antikörper gegendetektiert. Die verwendeten Antikörper waren ein monoklonaler Anti-Paxillin-Antikörper (Transduction Lab.) und ein monoklonaler Phosphotyrosin-Antikörper (P-Tyr-100) der Firma Cell Signaling TECHNOLOGY™.

Um die Vollständigkeit der Immunopräzipitation zu überprüfen, wurden auf die SDS-Gele sowohl die Immunopräzipitate als auch die Überstände aufgetragen. Nach der Detektion mit dem entsprechend anderen Antikörper wurden die Antikörper von der Membran entfernt (sog. „Strippen“ der Membran) und durch eine Gegendetektion mit dem bei der Immunopräzipitation verwendeten Antikörper die Effektivität der Immunopräzipitation überprüft.

Die Inkubation der A431 Zellen mit 6 μ M E481 erfolgte serumfrei über einen Zeitraum von $t=$ 1, 10 und 90 Minuten und wurde mit den serumfrei inkubierten 0,3 % DMSO-Kontrollen verglichen. Paxillin konnte als diffuse Bande bei 68 kDa detektiert werden.

4.6.2.1 Einfluss von E481 auf die Tyrosin-Phosphorylierung von Paxillin

In Abb. 73 ist ein Western Blot abgebildet, bei dem aus Paxillin-Immunopräzipitaten Phospho-Tyrosinreste nachgewiesen wurden. Die Paxillinbande ist bei 68 kDa zu erkennen. Bei 54 kDa erscheint die Immunglobulin G (IgG)-Bande des Antipaxillinantikörpers (Präzipitationspuffer mit Antikörper (PP m. AK)) und unterhalb von 34 kDa war eine Doppelbande der Protein-G Sepharose (Kontrolle ohne Antikörper, K o. AK) detektierbar. Die Überstände (nicht gezeigt) wiesen eine Bande bei 125 kDa auf, die vermutlich von der fokalen Adhäsionskinase (FAK) herrühren. Eine Gegendetektion mit Paxillin führte nur in den Immunopräzipitaten zu einer 68 kDa-Bande, so dass die Vollständigkeit der Paxillin-Immunopräzipitation abgesichert war.

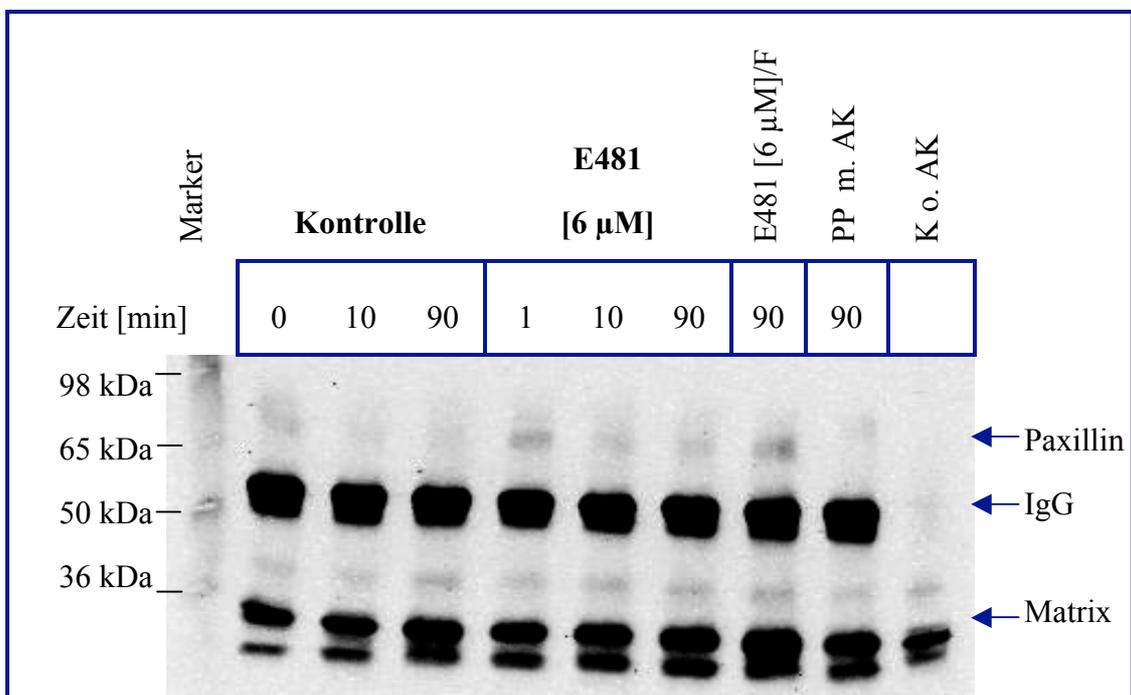


Abbildung 73: Western Blot der Phosphotyrosinreste der Paxillinimmunopräzipitate. Exemplarischer Western Blot, stellvertretend für drei unabhängige Versuche mit gleichem Bandenmuster in Bezug auf die Kontrollen und E481 [6 µM] Inkubationen. M= Marker, K= 0,3 % DMSO, F= 50 µM Forskolin, PP m. AK= Präzipitationspuffer mit Antikörper immunopräzipitiert, K o. AK = Kontroll-Zellysate ohne Antikörper.

Deutlich ist eine Abnahme des Phosphotyrosinanteils in den Paxillin-Immunopräzipitaten mit E481 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu erkennen. Die Auswertung der Banden zeigt aber, dass die Abnahme mit der Dauer der serumfreien Inkubation korreliert. Eine Koinkubation aus 50 µM Forskolin und 6 µM E481 zeigte trotz einer 90-minütigen Inkubation ohne Serum eine Verstärkung der Phosphorylierung der Paxillin-Tyrosinreste. Dieses Ergebnis

entstammt einer Voruntersuchung und muss noch bestätigt werden. Aus der Gegendetektion mit Paxillin und dem Vergleich der Bandenintensitäten konnte auf den ungefähren Anteil des an Tyrosinresten phosphorylierten Paxillins an dem gesamten Paxillinvorkommen in der Zelle geschlossen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Tyrosin-phosphorylierte Anteil weniger als 5 % beträgt.

In Abb. 74 ist die Auswertung des Phosphotyrosinanteils in Paxillinimmunopräzipitaten und der Paxillinanteil in Phosphotyrosinpräzipitaten wiedergegeben. Eindeutig wurde hier eine Abnahme durch den Serumentzug und kein Substanzeinfluss detektiert. Inwieweit zusätzlich ein Effekt durch E481 stattfindet, ist unter diesen Bedingungen nicht vorhersagbar.

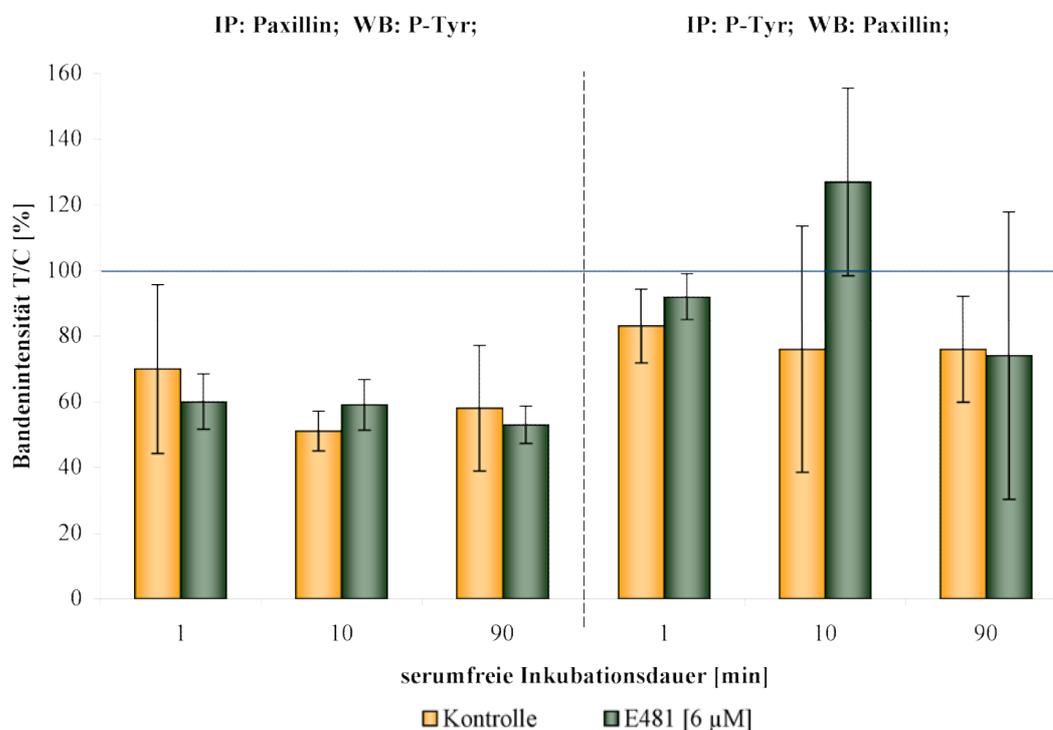


Abbildung 74 Vergleich der Bandenintensitäten (bezogen auf die Kontrolle mit 100 %) von A431 Zellen der Kontrollen mit den E481 [6 µM]-Inkubationen über 1, 10 und 90 Minuten (serumfrei). Links: Phosphotyrosinanteil in Paxillinpräzipitaten; Rechts: Paxillinanteil in Phosphotyrosinpräzipitaten. Die Mittelwerte \pm SD stammen aus 3 unabhängigen Versuchen.

Das Bandenmuster der Phosphotyrosin-Immunopräzipitate nach Detektion mit dem Paxillinantikörper zeigte im Präzipitat eine schwache 68 kDa Bande, im Überstand eine ausgeprägte Bande. Ferner erschien im Präzipitat die 54 kDa-Bande der IgG sowie die Doppelbande der Matrix. Die relativ großen Fehlerbalken bei der Detektion des Paxillins aus den Phosphotyrosin-Immunopräzipitaten basieren auf einer unvollständigen Immunopräzipitation. So

zeigte sich bei der Gegendetektion mit dem Phosphotyrosin-Antikörper sowohl in dem Präzipitat als auch im Überstand eine Bande bei 125 kDa (wahrscheinlich FAK) und eine schwache Paxillin-Bande bei 68 kDa. Auch an diesen Blots bestätigte sich der Anteil des phosphorylierten Paxillins in Bezug auf die Gesamtmenge an Paxillin auf unter 5 %.

4.6.3 Diskussion der Paxillin-Untersuchungen

Die Immunofluoreszenzanalyse der A431 und MCF-7 Zellen zeigt bei der Inkubation mit 6 μM E481 ein Abrunden der Zellen und das Abwandern von Paxillin in das Zytoplasma. Dabei sind die stärksten Veränderungen innerhalb der ersten 15 Minuten zu beobachten. Eine Detektion ohne primären Antikörper wurde als Kontrolle durchgeführt und zeigte keine unspezifische Fluoreszenz im Absorptionsband von Cy3 (nicht gezeigt).

Für eine genauere Charakterisierung des Verlaufs der morphologischen Veränderungen wurden die Zellen in drei unterschiedliche Stadien eingeteilt. Zellen in Stadium I zeigen ein ausgebreitetes Zytoplasma und einen Paxillinsaum, Stadium II ist die Übergangsphase mit bereits erkennbar geschrumpftem Zytoplasma und verringertem Paxillinsaum, während Stadium III die quasi vollständig abgerundeten Zellen mit stark verdichtetem Paxillin im Zytoplasma beinhaltet.

In MCF-7 Zellen ist nach 15 Minuten der Großteil der Zellen in Stadium III (ca. 25 %) und bis zum Endpunkt der Beobachtung verringert sich der Anteil der Stadium I-Zellen weiter. In A431 Zellen erfolgt in den ersten 5 Minuten eine enorme Reduktion der Stadium I-Zellen um mehr als 30 %. Die Zunahme der Stadium III-Zellen erfolgt kontinuierlich bis zum Ende der Beobachtungsdauer und beinhaltet nach 90 Minuten mehr als 50 % der Zellpopulation.

Aufgrund der Geschwindigkeit, mit der die morphologischen Veränderungen erfolgen, kann auf eine post-translationale Modifikation von Proteinen geschlossen werden. Ob darüber hinaus gegen Ende hin bereits eine Expressionsveränderung von Proteinen oder der Abbau von Paxillin eine Rolle spielt, kann gegenwärtig nicht beantwortet werden.

Der Phosphatase-Hemmer Natriumorthovanadat alleine führt zu einer Verstärkung des Paxillinsaums. Der PKA-Hemmer H89 scheint eine Paxillinreduktion und gleichzeitig eine Verringerung der Zell-Zell-Kontakte zu bewirken. Beide Substanzen alleine führen nicht zur Abrundung der Zellen.

Um zu untersuchen, ob die durch E481 bewirkte Verringerung des Paxillinsaums ein Phosphatase-vermittelter Prozess ist, wurde zusätzlich zu E481 mit Natriumorthovanadat inkubiert. Dadurch konnte in beiden Zelllinien eine deutliche Verzögerung der Paxillinabwanderung und der Zellabrundung bewirkt werden. Dies lässt vermuten, dass die Wirkung von E481 zum Teil phosphatasebedingt ist.

Die Koinkubation mit dem PKA-Inhibitor H89 führt zu einer signifikanten Erhöhung der abgerundeten Zellen. Daraus ist zu schließen, dass die PKA in Bezug auf die Abrundung der Zellen eher eine protektive Wirkung hat. In Bezug auf eine PKA-vermittelte Phosphataseaktivierung hätte man bei Inkubation mit H89 eine Verstärkung des Paxillinsaumes wie bei Natriumorthovanadat erwartet. Ob andere, durch die Inhibitoren beeinflusste Enzyme für die Wirkung ausschlaggebend sind, kann anhand der Versuche nicht beurteilt werden. Ergänzende Versuche mit verschiedenen Phosphatase- und PKA-Inhibitoren könnten bei der Beantwortung behilflich sein. Nicht auszuschließen ist, dass der sekundäre Botenstoff cAMP für die Vermittlung der morphologischen Veränderungen ausschlaggebend ist. Dafür müssten weitere Versuche unternommen werden, die eine Anreicherung von cAMP nach Inkubation mit E481 verhindern.

Um zu erfahren, inwieweit die sichtbare Abwanderung des Paxillins in das Zytosol mit einer Phosphatase-induzierten Dephosphorylierung korreliert, wurden A431 Zellen nach serumfreier Inkubation mit E481 lysiert und mit einem Paxillin- bzw. Phosphotyrosin-Antikörper immunopräzipitiert.

Die serumfreie Versuchsdurchführung zur Bestimmung des Substanzeinflusses von E481 auf die Dephosphorylierung von Paxillin erwies sich als ungeeignet. Bereits nach 1-minütiger Inkubation war eine deutliche Abnahme der Phosphotyrosin-haltigen Paxillinbande sowohl in der Kontrolle als auch in der E481-Probe zu detektieren. Ein eventuell stattfindender Substanzeinfluss wurde von der durch Serumentzug bedingten Dephosphorylierung verdeckt. Insofern sollte auf eine serumfreie Inkubation verzichtet werden. Eine einmalig durchgeführten Koinkubation mit dem Substanzgemisch 50 μ M Forskolin / 6 μ M E481 (90 min), mit 10-minütiger Forskolin-Vorinkubation, deutet allerdings eher auf eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung am Paxillin hin. Die zusätzliche Verstärkung des cAMP-Signalweges scheint somit in A431 Zellen nicht die erwartete Dephosphorylierung zu bewirken. Insofern wäre es interessant, die Hinweise aus dem Versuch mit dem PKA-Hemmer H89 (siehe 4.6.1) auf einen möglicherweise vorhandenen protektiven Einfluss der PKA auf die Zellabrundung über eine Koinkubation mit Forskolin / E481 fluoreszenzmikroskopisch zu prüfen.

Aus dem Vergleich der Bandenintensität der Paxillin-Immunopräzipitation nach Detektion mit dem Phosphotyrosin-Antikörper und dem Paxillin-Antikörper kann auf einen an Tyrosinresten phosphorylierten Anteil von unter 5 % geschlossen werden. Allerdings reagierte der verwendete Phosphotyrosin-Antikörper (P-Tyr-100) bei der Immunopräzipitation nicht quantitativ. Anscheinend ist der Antikörper zwar in der Lage, im Western Blot quantitativ zu detektieren, nicht aber aus dem Zelllysate zu immunopräzipitieren. Dies könnte daran liegen, dass aufgrund der nativen Bedingungen während der Immunopräzipitation die tertiäre Struktur des Paxillinproteins einen gewissen Anteil der Phosphotyrosin-Epitope verdeckt, die erst nach der hitze- und chemobedingten Denaturierung der Proben frei wird.

Nachdem der Anteil an Tyrosin-phosphoryliertem Paxillin nur bedingt eine Aussage über die Lokalisation von Paxillin an FAK macht [Thomas et al., 1999] und allgemein die Konsequenzen einer FAK bzw. Paxillinphosphorylierung nicht geklärt sind, sollte in künftigen Untersuchungen zusätzlich zu einer etwaigen Tyrosinphosphorylierung auch eine Serin/Threoninphosphorylierung in Betracht gezogen werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass unter dem Einfluss von E481 bereits innerhalb von 15 Minuten eine Abnahme des Paxillins am Rand der Zellen erfolgt. Es besteht begründeter Verdacht auf eine durch E481 induzierte Aktivierung einer Tyrosin-Phosphatase, allerdings scheint dies kein PKA vermittelter Prozess zu sein. Eine Inaktivierung der PKA führt zusätzlich zu einer Verstärkung der morphologischen Veränderungen durch E481. Der Anteil von phosphoryliertem Paxillin am Gesamtpaxillin liegt in A431 Zellen unter 5 %. Eine E481 bedingte Dephosphorylierung von Paxillin, gefolgt von einer Auflösung der fokalen Komplexe, kann jedenfalls aufgrund der Immunoprecipitations-Versuche nicht ausgeschlossen werden. Es ist durchaus denkbar, dass die Veränderungen der Paxillinverteilung modulierend auf zelluläre Signalwege wirkt.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der wirkmechanistischen Untersuchung substituierter Pteridine im Hinblick auf die Beeinflussung zentraler Regulationswege der Proliferation, der Apoptose und des Zytoskeletts. Diesbezüglich sollte die Interaktion mit dem MAPK- bzw. dem PI3K-Transduktionsweg erforscht werden, welche neben der potenten Hemmung der PDE4 für diese Substanzklasse wirkungsrelevant sein könnte.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Relevanz des Substituenten in Position 6 von E481 auf die Beeinflussung des wachstumregulierenden MAPK-Signalweges zu klären. Untersucht wurden das unsubstituierte Derivat E586, das 6-Methyl-Derivat E276, das 6-Methoxy-Derivat E281 und das 6-Ethoxy-Derivat E286. Alle Substanzen sind hinsichtlich einer Hemmung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Aktivität bzw. der ELK1-Phosphorylierung weniger wirksam als die Leitsubstanz E481. Die Hemmwirkung verstärkt sich mit größer werdendem Substituenten. Eine Hemmung der ELK1-Phosphorylierung und des Zellwachstums erfolgt nur bei E481 in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich. Alle anderen Substanzen hemmen die ELK1-Phosphorylierung erst in einem Konzentrationsbereich, der um den Faktor 3 bis 4 über dem der Wachstumshemmung liegt.

Ferner sollte die Relevanz des PI3K-Signalweges für morphologische und wachstumsregulierende Wirkungen substituierter Pteridine bestimmt werden. Die untersuchten Pteridin-Derivate E481, das 2-Aminoethylamino-Derivat E584 sowie das Morpholino-Derivat E495 zeigen in Abhängigkeit von der Zelllinie (A431 oder MCF-7) stark unterschiedliche PI3K-Beeinflussung. Eine Hemmung der PI3K kann nur durch E481 in A431 Zellen erreicht werden. Morphologische Veränderungen werden ebenfalls nur durch E481, aber in beiden Zelllinien, induziert. Aufgrund der zellspezifischen Differenzen kann die PI3K als genereller Wirkungsvermittler der wachstumshemmenden Eigenschaft substituierter Pteridine ausgeschlossen werden. Auch die morphologischen Effekte durch E481 (Zellabrundung und Kondensation des Actinskeletts) können aufgrund der unterschiedlichen PI3K-Beeinflussung in den beiden Zelllinien nicht PI3K-vermittelt sein.

Ein wesentlicher Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage, ob die Hemmung der PI3K in A431 Zellen durch E481 eine Rolle spielt für die Arretierung im Zellzyklus und die Apoptoseinduktion. Der PI3K-Effektor PKB zeigt nach 30-minütiger Inkubation mit E481 eine verminderte Phosphorylierung, was auf eine Hemmung der PKB-Aktivität deutet. Anhand der nachgeschalteten Glycogen Synthase Kinase 3b (GSK3b) sollte eine mögliche Beeinflussung des Zellzyklus untersucht werden. Die GSK3b kann sowohl von der PKB als auch von der PKA durch eine Phosphorylierung der Aminosäure Ser9 inaktiviert werden. Trotz der wahrscheinlich gehemmten PKB fand jedoch innerhalb von 24 Stunden keine

Abnahme der Phosphorylierung statt, so dass die GSK3b (möglicherweise PKA-vermittelt) im inaktiven Zustand verbleibt. Für E481 kann somit eine Phosphorylierung von Cyclin D1 durch die GSK3b, was den Zellzyklusarrest in der G₁-Phase erklären würde, ausgeschlossen werden.

Die apoptoseverhindernde Phosphorylierung von BAD kann ebenfalls sowohl PKB- als auch PKA-vermittelt stattfinden. Allerdings phosphorylieren beide Kinasen unterschiedliche Aminosäuren. Da von einer verminderten PKB-Aktivität ausgegangen werden kann, war von Interesse, in welchem Maße die PKA-spezifische Phosphorylierung an Ser112 einer möglichen PKB-vermittelten Apoptoseinduktion entgegenwirkt. Die Untersuchung zeigt ab einer 18-stündigen E481 Behandlung eine verminderte BAD-Phosphorylierung an Ser112. Begleitet von einer vermutlich reduzierten Phosphorylierung des PKB-abhängigen Restes Ser136 könnte dies eine Erklärung für die E481-vermittelte Apoptoseinduktion in A431 Zellen sein. Ferner konnte nach 24-stündiger Inkubation mit E481 eine konzentrationsabhängige Reduktion der Phosphorylierung des Retinoblastoma (pRb)-Proteins an allen untersuchten Phosphorylierungsstellen (Ser780, Ser795, Ser807/811) beobachtet werden. Die „Hypophosphorylierung“ von pRB trägt vermutlich wesentlich zum G₁-Arrest bei.

Anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen der E481-vermittelten Paxillinlokalisation sollten mögliche Wechselwirkungen zwischen dem cAMP-Signalweg und den morphologischen Veränderungen aufgedeckt werden. E481 bewirkt in MCF-7 und A431 Zellen eine Abwanderung des Paxillins von der Plasmamembran. Dieser Prozess erfolgt unter Beteiligung einer Phosphatase und ist nicht PKA-, vielleicht aber cAMP-vermittelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Wirkmechanismus substituierter Pteridine, insbesondere von E481, wesentlich komplexer ist als bislang vermutet. Neben der potenten Hemmung der Phosphodiesterase 4 greift E481 in eine Reihe zentraler Signalübertragungswege (MAPK- und PI3K-Signalweg) ein. Darüber hinaus interagiert E481 wirkungsvoll mit Signalelementen, welche die Integrität des Zytoskeletts gewährleisten. Hierbei scheinen PKA-unabhängige, möglicherweise aber cAMP-vermittelte Phosphataseinduktionen eine bedeutende Rolle zu spielen.

6 Beschreibung der Methoden

6.1 Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Untersuchungen

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

ATP-Mix, Buffer A, EGF, Kaliumoxalat-Lösung, MgCl₂-Lösung, PBS, Phosphatidylinositol, PI3K-Waschpuffer, Präzipitationspuffer, TNE

Benötigte Reagenzien:

CHCl₃, CH₃OH, 6 N HCl, Igepal, NH₄OH, monoklonaler PI3K-Antikörper, Protein G-Sepharose, Phosphatidylinositol-4-monophosphat

6.1.1 Kultivierung und Inkubation der Zellen

Es werden 3×10^6 Zellen in große Petrischalen (145 cm²) ausgesät. Die Kultivierung erfolgt über einen Zeitraum von 2 Tagen in serumhaltigem Medium. Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit jeweils 5 ml PBS erfolgt die Inkubation mit Substanz für 30 Minuten serumfrei. Nach 20 Minuten werden 100 ng/ml EGF zupipettiert und die Inkubation die restlichen 10 Minuten fortgesetzt.

6.1.2 Gewinnung der Zellproteine

Nach der Inkubation erfolgt die Aufarbeitung der Zellen. Die Zellen werden auf Eis 1x mit 10 ml und 2x mit 5 ml eiskaltem Buffer A gewaschen. Je Petrischale werden 200 µl Präzipitationspuffer aufgetropft und die Zellen mit einem eiskalten Policemanrubber abgeschabt. Danach die Zellsuspension von 3 Petrischalen in einen eiskalten Potter überführen und 50x pottern. Nichtlösliche Zellfragmente werden 10 Minuten bei 14000 rpm (4 °C, Eppendorfzentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand wird in ein neues Probengefäß überführt. Die Proteinmenge wird mit Hilfe der Methode nach Bradford (1976) (siehe Kapitel 6.2) bestimmt.

6.1.3 Immunopräzipitation der PI3K

Ein über die Proteinmenge (ca. 2,25 mg) definiertes Volumen des Zelllysates wird in ein 15 ml PVC-Röhrchen überführt und auf Eis gekühlt. Das Zelllysate wird auf ungefähr 1 mg/ml Proteingehalt mit eiskaltem PBS verdünnt und dann pro mg Gesamtprotein mit 2 µl des monoklonalen PI3K-Antikörpers für 1 bis 2 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Während dieser Zeit wird die Protein G-Sepharose vorbereitet. Eine Menge von 150 µl Protein G-Sepharose ist ausreichend für eine Dreifachbestimmung des Zelllysates. Um die Verluste bei der Waschung möglichst gering zu halten, wird die für alle Proben benötigte Menge Protein G-Sepharose in ein Probengefäß gefüllt und nach den Waschungen auf die Immunkomplex-Proben per Multipette verteilt.

Das Vorbereiten der Protein G-Sepharose beinhaltet folgende Schritte:

- Abzentrifugieren des Überstandes (3500 rpm, 4 °C, 5 Minuten)
- 2x mit eiskaltem PBS waschen
- Protein G-Sepharose in der doppelten Menge PBS aufnehmen

Die so vorbereitete Sepharose wird nun mit Hilfe einer Multipette gleichmäßig auf die Immunkomplexe verteilt und die Matrix-Immunkomplex-Proben über Nacht auf einem Überkopfschüttler im Kühlschrank bei 4 °C durchmischt.

6.1.4 Waschung des Immunopräzipitats

Die Matrix-Immunkomplex-Proben werden am nächsten Tag abzentrifugiert (3 Minuten, 4 °C, 3500 rpm) und der Überstand verworfen. Die Pellets werden 3x mit jeweils 2 ml Buffer A, welchem 1 % Igepal zugesetzt ist, gewaschen. Anschließend wird 3x mit jeweils 2 ml PI3K-Waschpuffer und 1x mit 2 ml TNE, welchem 0,1 mM aktiviertes Natriumorthovanadat zugesetzt ist, gewaschen. Die Pellets in jeweils 2 ml TNE, welchem 0,1 mM aktiviertes Natriumorthovanadat zugesetzt ist, aufnehmen und auf jeweils 3 Eppendorfgefäße gleichmäßig per Multipette verteilen. Proben zentrifugieren (3 Minuten, 4 °C, 3500 rpm) und Überstand mit Prot/Elec-Pipettenspitzen möglichst restlos entfernen.

6.1.5 Durchführung des PI3K-Assays

Nach den Waschungen werden die Proben aus dem Eis genommen und nacheinander mit folgenden Substanzen versetzt:

- 50 µl TNE
- 10 µl (20 µg) Phosphatidylinositol (PI)
- 10 µl MgCl₂-Lösung (100 mM)

Der Reaktionsstart erfolgt durch Zugabe von 10 µl ATP-Mix und die Reaktion wird unter ständigem Schütteln auf dem Thermomixer bei 30 °C für 30 Minuten durchgeführt. Beendet wird die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 6 N HCl. Zum Eluieren der Proben werden 400 µl eines CH₃OH:CHCl₃-Gemisches (1:1) zugegeben und auf einem Heizschüttler für 10 Minuten gevortext. Anschließend wird für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die untere Chloroform-Phase wird mit Prot/Elec-Pipettenspitzen (BioRad) in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Pellet erneut mit 500 µl des CH₃OH:CHCl₃-Gemisches (1:1) und 500 µl 6 N HCl versetzt. Noch einmal wird für 10 Minuten gevortext und 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert um dann die Chloroformphasen zu vereinen und die Proben in der Speedy-vac vom Lösungsmittel zu befreien. Die Proben werden in 35 µl CH₃OH:CHCl₃ (1:1) aufgenommen und auf die vorbehandelte DC-Platte auftragen.

Die Dünnschichtchromatographie wird in einem Gemisch aus CHCl₃/MeOH/H₂O/NH₄OH (60:47:11,3:2 [ml]) durchgeführt und ist nach ungefähr 2 Stunden beendet. Als Referenzsubstanz wurde Phosphatidylinositol-4-monophosphat mitgeführt. Dieses kann mit Hilfe von sublimiertem Jod sichtbar gemacht werden.

6.1.6 Bestimmung der PI3K-Aktivität

Nach dem Entwickeln der Dünnschichtchromatographie-Platten kann das ³³P-gelabelte Phosphatidylinositol-3-phosphat quantitativ per Autoradiographie oder über einen Instant Counter vermessen werden. Die Quantifizierung der Aktivität erfolgt in Bezug zur unbehandelten Probe, die auf 100 % gesetzt wird.

6.1.7 Präparation der Kieselgel-Platte

Die Vorbehandlung der Kieselgel-Platten erfolgt in Anlehnung an die Methode von Traynor-Kaplan (1989). Dabei wird die Kieselgel-Platte über Nacht in eine Kammer gestellt, welche 130 ml einer 1,2 % igen Kaliumoxalat-Lösung enthält. Als Lösungsmittel wird ein Methanol:Wasser-Gemisch im Verhältnis 2:3 (v:v) verwendet.

6.2 Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

Bradford-Reagenz

Benötigte Reagenzien:

BSA-Standard (2 mg/ml)

Die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (1976) beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G250 an Zellproteine. Durch die Bindung kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm, die sich in einem Anstieg der Absorption bei 595 nm äußert. Die Ausbildung des Protein-Farbstoff-Komplexes ist nach ca. 2 Minuten abgeschlossen und bleibt über 1 Stunde konstant.

Die Eichgerade wird mit Hilfe eines BSA (bovine serum albumin)-Proteinstandards der Konzentration 2 mg/ml erstellt, wobei Konzentrationen zwischen 0,05 und 1 mg/ml eingestellt werden. Die Proben werden mit H₂O bidest auf 1/10 verdünnt um eine Beeinflussung der Nachweisreaktion durch Triton X-100 im Präzipitationspuffer zu minimieren. Bei der Bestimmung der Proteinmenge darf der Faktor 10 also nicht vergessen werden.

- 10 µl der auf 1/10-verdünnten Probe bzw. des unverdünnten Proteinstandards werden mit 1000 µl des Bradford-Reagenzes vereint, kurz gevortext
- Nach 5 Minuten werden pro well einer 96-Well-Platte 150-200 µl der Probe eingefüllt, so dass der Ansatz für eine Dreifachbestimmung ausreicht

Die Vermessung erfolgt bei 595 nm im Mikrotiterplattenleser. Die Proteinkonzentration der Proben kann nach Abzug des jeweiligen Reagenzienblindwertes (Wasser bzw. 10 % iger Präzipitationspuffer) anhand der Eichgeraden durch lineare Regression berechnet werden.

6.3 Western Blotting

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

Blockingpuffer, Blottingpuffer, LumiGLO[®]-Lösung, Elektrophorese-Puffer, Tris/HCl (1,5 M), Tris/HCl (0,5 M), SDS-Lösung (10 % w/v), SDS-Probenpuffer (6x), TBST

Benötigte Reagenzien:

Acrylamid (30 %), APS (10 % w/v), HRP-konjugierter Zweitantikörper, Primärantikörper, TEMED

6.3.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Charakterisierung von Proteinen erfolgt über die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Vertikalsystem mit einer MiniProtean II der Fa. BioRad. Die Glasplatten werden nach Anleitung im Gießstand fixiert und dienen anschließend als Wände der Kathodenpufferkammer. Je nach Größe des zu charakterisierenden Proteins wurden Trenngele mit einem Polyacrylamidanteil von 8, 10 oder 12 % verwendet. In Tabelle 16 ist das Pipettierschema für die Erstellung von Trenngelen dargestellt, wobei die angegebenen Mengen für 2 Mini-Gele der Dicke 1 mm bei einer Breite von 8,3 cm und einer Höhe von bis zu 5 cm ausreichen.

Tabelle 16: Pipettierschema für 2 Trenngele

Acrylamidgelstärke	8 % iges	10 % iges	12 % iges
H ₂ O bidest	4,76 ml	4,1 ml	3,44 ml
1,5 M Tris·HCl (pH 8,8)	2,46 ml	2,46 ml	2,46 ml
Acrylamid (30 %)	2,62 ml	3,3 ml	3,94 ml
SDS-Lösung (10 % w/v)	98,4 µl	98,4 µl	98,4 µl
APS (10 % w/v)	49,2 µl	49,2 µl	49,2 µl
TEMED	4,92 µl	4,92 µl	4,92 µl

Das Trenngel wird bis auf eine Höhe von ungefähr 4,7 cm gegossen und anschließend mit Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das Butanol abgesaugt, der Zwischenraum mit Wasser ausgespült und mit einem Papiertuch vorsichtig getrocknet. Vor dem Aufgießen des Sammelgels werden die Freiräume für die Probenaschen

durch Einfügen eines Kammes gewährleistet. In Tabelle 17 ist das Pipettierschema von Sammelgelen aufgeführt, wobei auch hier die Menge für 2 Gele ausreichend ist.

Tabelle 17: Pipettierschema für 2 Sammelgele

H₂O bidest	2,4 ml
0,5 M Tris·HCl(pH 6,8)	1 ml
Acrylamid (30 %)	0,5 ml
SDS (10 % w/v)	40 µl
APS (10 % w/v)	40 µl
TEMED	4 µl

Beim Einfüllen des Sammelgels ist darauf zu achten, dass entstandene Luftblasen frühzeitig aus dem Gel entfernt werden. Nach Auspolymerisieren wird der Kamm entfernt und die Probetaschen mit Elektrophorese-Puffer gespült. Die Proben werden mit SDS-Probenpuffer (6x) versetzt, für 5-10 Minuten auf 95 °C erhitzt und dann in die Geltaschen gefüllt.

Zur Ermittlung des Molekulargewichts werden in einer Tasche 16 µl des Protein-Molekulargewichtstandards (SeeBlue Pre-Stained Standards, Novex) aufgetragen. Die Elektrophorese wird nach Einfüllen des Elektrophorese-Puffers in Anoden- und Kathodenkammer gestartet und im Kühlschrank durchgeführt. Der Lauf wird mit einer Spannung von 100 V gestartet, kann aber nach dem Übertreten der Proben in das Trenngel bis auf 150 V erhöht werden.

6.3.2 Proteintransfer und Detektion

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel erfolgte als semi-dry-Blot auf eine Nitrozellulosemembran. Die Whatmanpapiere, die Nitrozellulosemembran und das SDS-Gel werden vor Beginn des Blots in Blottingpuffer äquilibriert. Beim Auflegen der Membranen ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bilden. Der Transfer erfolgt bei 50 mA/Gel über 90 Minuten. Anschließend wird die Membran den Empfehlungen des Herstellers folgend behandelt.

Je nach verwendetem Primärantikörper kann sich der Ablauf der Detektion und die Zusammensetzung der Puffer geringfügig verändern. Das Prinzip ist im Folgenden zusammengestellt:

- Blocken der Nitrozellulose: Entweder wird die Nitrozellulose für 1 Stunde bei 25 °C oder über Nacht bei 4 °C in Blockingpuffer geblockt.

- Inkubation mit Erstantikörper: Nitrozellulose mit Primärantikörper laut Empfehlungen des Herstellers in Bezug auf Dauer, Temperatur, Verdünnung und Puffer inkubieren.
- Waschen der Nitrozellulose: 3x 10 Minuten im Schüttelbad mit TBST waschen
- Inkubation mit Zweitantikörper: Nitrozellulose mit dem Horseradish-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in Blockingpuffer für 90 Minuten inkubieren
- Waschen der Nitrozellulose : 3x 10 Minuten im Schüttelbad mit TBST waschen
- Detektion: Inkubation der Nitrozellulose in 10 ml LumiGLO[®]-Lösung für eine Minute
- Dokumentation: Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt am Lumi-Imager.

Die RF-Werte der Proteinbanden verhalten sich linear zum dekadischen Logarithmus des entsprechenden Molekulargewichtes. Der Vergleich der unbekannt Probe mit den Banden des Standards mit bekanntem Molekulargewicht ermöglicht die Berechnung des Molekulargewichts der isolierten Proteine.

6.4 Bestimmung der Phospho-Tyrosinkinase-Aktivität des EGF-Rezeptors

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

ABTS[®]-Lösung, Assaypuffer, CaCl₂·2 H₂O-Lösung, DTT-Lösung, KMP-Puffer, KMPT-Puffer, N-Acetylglucosamin-haltiger Säulenpuffer, NaCl-Lösung, PBS, Poly (Glu, Tyr) 4:1-Lösung, Säulenpuffer, Trypsin/EDTA-Lösung, Waschpuffer

Benötigte Reagenzien:

Anti-Phosphotyrosin-Peroxidase sc-7020 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), BSA, Natriumazid, Tyrphostin AG 1478

6.4.1 Isolierung des EGF-Rezeptors

40 große Petrischalen (145cm²) werden mit jeweils 3,5·10⁶ A431 Zellen in 20 ml serumhaltigem MEM-Medium ausgestreut. Die Gewinnung des EGF-Rezeptors erfolgt nach Erreichen einer Zelldichte von 80-90 % (Gastpar, 1997). Dafür werden die Zellen 2x mit jeweils 3 ml PBS gespült, dann mit 3 ml Trypsin/EDTA für 2 Minuten inkubiert und nach Entfernen des Überstandes wird für weitere 8-12 Minuten bei 37 °C nachinkubiert. Die Zellen werden mit 2 ml Medium von der Oberfläche der Petrischale gespült. Die Zellsuspension wird in 50 ml-

Falcontubes auf Eis gesammelt und anschließend für 8 Minuten bei 2000xg (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand kann verworfen und die Zellpellets mit PBS gespült und vereint werden. Nach erneutem 8-minütigem Zentrifugieren bei 2000xg (4 °C) wird die Waschlösung verworfen und das Zellpellet gewogen (Zellfeuchtgewicht von 40 Platten sollte ca. 2 g betragen). Das Zellpellet wird jetzt in 10 ml KMP-Puffer resuspendiert und für 3 x 10 sec mit Ultraschall auf Eis behandelt. Zwischen den einzelnen Crackschritten sollte die Suspension auf Eis gekühlt werden.

Das Auswaschen der gelösten EGF-Rezeptor-haltigen Membran erfolgt durch 4 Zentrifugationsschritte in der Ultrazentrifuge, wobei jeweils für 18 Minuten bei 15000xg bei 2-4 °C zentrifugiert wird und die Überstände auf Eis gesammelt werden. Das Pellet wird jeweils in 10 ml KMP-Puffer resuspendiert und erneut mit Ultraschall für 3x 5-10 sec behandelt. Danach wird das Pellet verworfen und die gesammelten Überstände mit 1 M CaCl₂-Lösung auf einen Gehalt von 0,01 mol Ca²⁺ eingestellt. Nach 15 Minuten ist eine deutliche Trübung der Suspension aufgrund des Aggregierens von intrazellulären Membranbestandteilen eingetreten. Die aggregierten Membranbestandteile werden 30 Minuten bei 2 °C und 7000xg in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wird halbiert, austariert und bei 2-4 °C und 100000xg für 60 Minuten abzentrifugiert. Diese abzentrifugierten Membranpellets können bei -80 °C im Biofreezer für 1 Jahr gelagert werden.

6.4.2 **Aufreinigung des EGF-Rezeptors**

Die Aufreinigung des EGF-Rezeptors erfolgt mittels Weizenkeim-Lectin-Agarose-Affinitätschromatographie (Gastpar, 1997). Dazu werden ca. 5 ml der in Natriumazid gelagerten Weizenkeim-Lectin-Agarose in eine Säule gefüllt und über Nacht mit 1 M NaCl gespült (Flow von 100 entspricht etwa 0,3 ml/min) um restliches Azid zu entfernen.

- 500 ml Säulenpuffer ansetzen und Säulenmaterial mit 50-100 ml Säulenpuffer spülen
- Tiefgefrorenes Membranpellet von 20 Platten mit 10 ml KMPT-Puffer (4 °C) versetzen und für 1 Stunde auf Eis rühren
- Bei 100000xg in der Ultrazentrifuge für 1 h, bei 2 °C abzentrifugieren
- Überstand auf die äquilibrierte Säule geben
- Eluat in einem Falcontube auffangen und erneut auf die Säule geben
- Säule mit ca. 200 ml Säulenpuffer innerhalb von 1,5-2h gut spülen
- Anschließend eluieren des EGF-Rezeptors mit 100 ml 0,3 mol N-Acetylglucosamin-haltigem Säulenpuffer und auffangen von 8 Fraktionen zu je 4,5 ml auf Eis
- Jede Fraktion mit 500 µl einer 10 mM DTT-Lösung versetzen

➤ Fraktionen zu je 500 µl aliquotieren (1 x 200 µl für Vortest) und bei - 80 °C lagern

Das Säulenmaterial wird über Nacht mit einer 1 M NaCl-Lösung gespült und in einer 1 M NaCl-Lösung mit 0,02 % Natriumazid (w/v) bei 4 °C aufbewahrt.

6.4.3 Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Substrat

96-Loch-Immunoplatten mit hoher Proteinbindungskapazität werden je Loch mit 100 µl einer Poly (Glu, Tyr) 4:1-Lösung befüllt und über Nacht bei 35 °C inkubiert. Anschließend werden die Platten entleert und 3x mit jeweils 200 µl/well Waschpuffer gewaschen. Abschließend erfolgt das Trocknen im Trockenschrank bei 35 °C.

6.4.4 Testung der einzelnen EGF-Rezeptor-Fractionen auf ihre Phosphorylierungsaktivität

Um die Fraktion mit dem aktiven EGF-Rezeptor zu detektieren reicht es zumeist aus, die ersten vier Fraktionen der Affinitätschromatographie zu untersuchen. Die Vortestproben werden mit PBS/0,1 % BSA im Verhältnis 1:2; 1:4; 1:6 und 1:8 auf ein Volumen von ungefähr 500 µl verdünnt. Die Durchführung erfolgt ohne Mehrfachbestimmung wie unter Kapitel 6.4.5 beschrieben. Die Fraktion der Wahl ist diejenige, bei der die enzymvermittelte Immunoreaktion innerhalb von 60 Minuten bei 35 °C bei 405 nm eine Extinktion von 1,2 erreicht. Alle weiteren EGF-Rezeptor Aktivitätsuntersuchungen werden mit der so gefundenen EGF-Rezeptorlösung durchgeführt.

6.4.5 Aktivitätsuntersuchungen der EGF-Rezeptor-assoziierten Protein-Tyrosin-Kinase

Um den Einfluss einer Substanz auf die Protein-Tyrosin-Kinase des EGF-Rezeptors zu untersuchen wird eine enzymvermittelte Immunoreaktion durchgeführt. Dabei wird pro Loch folgende Substanzmenge pipettiert.

- Es werden 10 µl der zu untersuchenden Substanz in 10 % iger DMSO-Lösung vorgelegt. Vergleichend dazu wird die Normalreaktion mit einer 10 % igen DMSO-Lösung und die positive Hemmkontrolle mit einer 100 µM Tyrphostin-Lösung bei 10 % DMSO-Anteil durchgeführt.
- Anschließend fügt man in alle wells 40 µl der unter Kapitel 6.4.4 gefundenen und auf Eis getauten EGF-Rezeptorlösung zu und lässt diese 10 Minuten bei Raumtemperatur aufeinander einwirken.
- Während der Blindwert mit 50 µl H₂O _{bidest} versetzt wird, erfolgt die Kinasereaktion durch Zugabe von 50 µl vortemperiertem Assaypuffer (37 °C)
- Die Reaktion wird nach 30 Minuten im Trockenschrank bei 37 °C durch Entfernen des Assaypuffers und dreimaliges Waschen mit jeweils 200 µl Waschpuffer gestoppt
- In jedes Loch werden 75 µl Anti-Phosphotyrosin-Peroxidase-Lösung in PBS/1 % BSA (1/2000) pipettiert und über 60 Minuten bei 35 °C inkubiert
- Nach Entleeren der Titerplatte wird erneut 3x mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen
- Die Peroxidasereaktion wird durch Zugabe von 100 µl ABTS[®]-Puffer gestartet und äußert sich in einer Grünfärbung der Lösung. Die Extinktion wird bei 405 nm am Mikrotiterplattenleser vermessen

Die Auswertung der Daten erfolgt als Test over Control [T/C]-Wert in Bezug auf den auf 100 % gesetzten Mittelwert der Normalreaktionen. Die Formel für den Test over Control-Wert ist nachfolgend aufgeführt:

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

- T/C: Test over Control- Wert
T: Optische Dichte der Testsubstanz
C_N: Optische Dichte der Normalreaktion
C_B: Optische Dichte des Blindwertes

6.5 Bestimmung der Aktivität der mitogen-aktivierten Protein Kinase

6.5.1 Amplifikation der Plasmide

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

Agarosegel (1,3 %), Ampicillin-Stammlösung, Gelladungspuffer (6x), Kanamycin-Stammlösung, LB-Agar, LB-Medium, TAE-Puffer (50x).

Benötigte Reagenzien:

Glycerolstock kompetenter Bakterien *E. coli* DH5a, Glycerol, Ethidiumbromid, Plasmide pFR-Luc und pFA2-ELK1 aus dem PathDetect™ ELK trans-Reporting System (Stratagene), QIAGEN Plasmid Maxi Kit mit den enthaltenen Puffern, Restriktionsendonuklease Bam HI (Boehringer Mannheim), Restriktionsendonuklease Eco RI (Boehringer Mannheim), SuRE/Cut Puffer (10x) (Boehringer Mannheim), 1 Kb DNA ladder (GIBCOBRL Life Technologies).

6.5.1.1 Ansetzen einer Übernachtskultur von kompetenten *E. coli* DH5a

Um eine Übernachtskultur kompetenter *E. coli* DH5a zu kultivieren werden einige Mikroliter eines entsprechenden Glycerolstocks unter sterilen Bedingungen in 5 ml LB-Medium überführt. Das dazu verwendete Reagenzglas wird mit einem Übernachtskulturdeckel verschlossen und für 10-16 Stunden bei 37 °C und ca. 160 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Diese Übernachtskultur kann nun für die Transformation eingesetzt werden oder in Form eines Glycerolstocks bis zur Transformation bei - 80 °C gelagert werden [Sambrook et al., 1989; Bertram & Gassen, 1991].

6.5.1.2 Transformation der kompetenten E. coli DH5a

100 µl der Übernachtskultur kompetenter E. coli DH5a werden in einem sterilen Eppendorfgefäß mit 50 ng Plasmid versetzt und vorsichtig gemischt. Als Kontrollprobe sollte auf jeden Fall ein Eppendorfgefäß mit kompetenten E. coli DH5a aber ohne Plasmid mitgeführt werden. Beide Proben werden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für genau 90 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten und dann für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend werden 900 µl LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben und für 45-60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Mit diesen Bakteriensuspensionen werden zwei LB-Agar-Platten mit 100 µl geimpft. Dabei enthält die eine LB-Agar-Platte kein Antibiotikum und die andere in Abhängigkeit vom verwendeten Plasmid entweder 20 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin. Das Plasmid pFR-Luc enthält ein Ampicillinresistenzgen während das Plasmid pFA2-ELK1 ein Kanamycinresistenzgen enthält. Die Petrischalen werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.5.1.3 Amplifikation eines Plasmids in E. coli DH5a

Die bewachsenen Petrischalen werden bis zum Anlegen einer Übernachtskultur bei 4 °C gelagert. Eine isolierte Kolonie der auf Antibiotikum-behandelten LB-Agarplatten gewachsenen Bakterien wird gepickt und dann in 7 ml LB-Medium mit 10 µl Ampicillin-Stammlösung vorsichtig resuspendiert. Dieses Reagenzglas wird mit Übernachtskulturdeckel im Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 rpm bis zum nächsten Morgen inkubiert.

6.5.1.4 Anlegen eines Glycerolstocks transformierter E. coli DH5a

Von einer wie in Kapitel 6.5.1.3 hergestellten Übernachtskultur werden Aliquote zu je 425 µl auf Cryoröhrchen verteilt und mit 75 µl sterilem Glycerol versetzt. Diese Stocks transformierter Bakterien können bei - 80 °C eingefroren werden.

6.5.1.5 Ansetzen einer Übernachtskultur für Maxipräparation

250 ml handwarmes LB-Medium werden in Abhängigkeit von dem zu amplifizierenden Plasmid entweder mit 50 µg/ml Kanamycin oder mit 20 µg/ml Ampicillin versetzt. Zu diesem Medium werden 200 µl des transformierten Bakterienstocks zugegeben und über Nacht im Schüttelinkubator bei 160 rpm (37 °C) inkubiert.

6.5.1.6 Plasmidmaxipräparation

Die Isolierung der Plasmide aus transformierten E. coli DH5a erfolgt mittels QIAGEN Plasmid Maxi Kit in der dort beschriebenen Weise. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der DNA-Gehalt wird mittels UV-Spektroskopie bei 260 nm bestimmt und die Überprüfung der amplifizierten Plasmide erfolgt durch Restriktionsverdau und anschließender Auftrennung im Agarosegel.

6.5.1.7 Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgt durch Messung der Absorption der Proben bei 260 und 280 nm mittels UV-Spektroskopie [Sambrook et al., 1989].

Die DNA-Konzentration berechnet sich folgendermaßen:

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

Die Reinheit der Plasmid-DNA berechnet sich aus dem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$. Bei einem Wert von 1,8 ist die Aufarbeitung sauber.

6.5.1.8 Überprüfung der amplifizierten Plasmide

Die Plasmide aus der Maxipräparation werden durch einen Restriktionsverdau und anschließende Auftrennung der Fragmente im Agarosegel auf ihre Richtigkeit hin überprüft [Meiers, 2000]. Der Restriktionsverdau erfolgt für 120 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad nach dem in Tabelle 18 aufgeführten Schema. Nach dem Verdau werden $4\text{ }\mu\text{l}$ Gelladungspuffer (6x) zu $20\text{ }\mu\text{l}$ der verdauten Probe gegeben und gut gemischt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem 1,3 % igen Agarosegel, welches mit $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid markiert ist. Das mini-Gel wird pro Tasche mit $20\text{ }\mu\text{l}$ der vorbereiteten Proben und DNA-Marker beladen, mit TAE-Puffer überschichtet und dann eine Spannung von 40 V für 30 Minuten angelegt. Anschließend wird die Spannung auf 60 V erhöht. Nach Auftrennung der DNA erfolgt die Detektion im UV-Licht.

Tabelle 18: Restriktionsverdau der amplifizierten Plasmide

Plasmidgröße	pFR-Luc		pFA-ELK1		
	5748 bp		4935 bp		
Plasmidmenge	0,3 µl (1 µg)	0,3 µl (1 µg)	1,1 µl (3 µg)	1,1 µl (3 µg)	1,1 µl (3 µg)
H ₂ O _{bidest}	16,7 µl	19,7 µl	14,9 µl	15,9 µl	18,9 µl
SuRE/Cut Puffer	2 µl		1 µl	2 µl	
Restriktionsenzym	1 µl EcoRI		1 µl EcoRI 1 µl BamHI	1 µl EcoRI	
Schnittstellen	2835 bp 3457 bp		1461 bp 1086 bp	1461 bp	
Fragmente	622 bp 5126 bp	5748 bp (sc)	375 bp 4560 bp	4935 bp	4935 bp (sc)

6.5.2 MAPK-Aktivitätsbestimmung über einen Luciferase-Reportergen-Assay in A431 Zellen

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

EGF-Lösung

Benötigte Reagenzien:

FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim), Plasmide pFR-Luc, pFA2-ELK1, pFC-MEK1, pFC2-dbd aus dem PathDetect™ ELK trans-Reporting System (Stratagene)

6.5.2.1 Durchführung des Reportergen-Assays

Der Reportergen-Assay basiert auf einer an die Aktivität der MAPK gekoppelten Expression eines Reportergens. Eine verminderte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK1 dient hier als Maß für die MAPK-Hemmung. Der Versuch wird an 4 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Die Vorgehensweise ist wie folgt:

- In einer 24-Lochplatte werden je well 30.000 A431 Zellen in 10 % FKS-haltigem MEM-Medium für 24 Stunden anwachsen gelassen.

- Serumfrei für weitere 24 Stunden kultivieren
- Transfektionsansatz wie in Tabelle 19 aufgeführt ansetzen. Dafür die Plasmid-DNA in einem sterilen Eppendorfgefäß vorbereiten. In einem weiteren sterilen Eppendorfgefäß wird serumfreies Medium vorgelegt und mit FuGENE™6 für 5 Minuten inkubiert
- Danach werden die zwei Eppendorfgefäße vereint und nach weiteren 15 Minuten Inkubation werden jeweils 10 µl Transfektionssuspension in jedes Well tropfenweise einpipettieren
- 24 Stunden später erfolgt die serumfreie Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Substanzkonzentrationen
- 30 Minuten nach Substanzzugabe wird mit 100 ng/ml EGF stimuliert
- 4,5 Stunden nach der Stimulierung wird das Medium entfernt, mit 1ml PBS gespült, abgesaugt und dann 200 µl des 1x Lysepuffers für 20 Minuten aufgegeben
- Den Überstand mehrfach durch eine Pipettenspitze resuspendieren und dann in der 24 Lochplatte bei -80 °C lagern und zu gegebener Zeit am Luminometer vermessen

Tabelle 19: Pipettierschema der Transfektionsreagenzien pro well der 24-Lochplatte

	pFR-Luc	pFA2-ELK1	Kontrollplasmid	FuGENE™6	Medium
Probe	150 ng	2,5 ng		0,46 µl	10 µl
Positivkontrolle	150 ng	2,5 ng	2,5 ng pFC-MEK11	0,46 µl	10 µl
Negativkontrolle	150 ng		2,5 ng pFC2-dbd	0,46 µl	10 µl

6.6 Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus der Proteinkinase B, Glycogen Synthase Kinase 3b, sowie von BAD in A431 Zellen

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

EGF-Lösung, RIPA-Puffer mit EDTA.

Benötigte Reagenzien:

HRP-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG Sekundärantikörper (Santa Cruz Biotechnology), Phospho-Akt Pathway Sampler (Cell Signaling TECHNOLOGY™)

6.6.1 Kultivierung und Inkubation der Zellen

Je Probe werden $3,0 \cdot 10^6$ A431 Zellen in 0,5 % FKS-haltigem MEM-Medium in einer mittleren Petrischale ($56,7 \text{ cm}^2$) morgens ausgestreut. Am nächsten Tag wird 18 Stunden vor der geplanten Inkubation das Medium erneuert und 2 Stunden vor der Inkubation werden die Zellen mit PBS gewaschen und auf serumfreies Medium umgestellt. Die Substanzinkubation erfolgte in serumfreiem Medium mit 0,3 % DMSO im Ansatz. Bis auf die unstimulierte Probe werden alle anderen Proben 10 Minuten vor Ende der Substanzinkubation zusätzlich mit 100 ng/ml EGF inkubiert.

6.6.2 Gewinnung der Zellproteine und Western-Blotting

- Petrischale auf Eis stellen, entleeren und 2x mit eiskaltem PBS spülen
- Rückstände mit Papierstreifen möglichst restlos aufsaugen
- 2x 100 μl RIPA-Puffer mit EDTA auftropfen, Zellen abschaben und in Eppendorfgefäß überführen
- 3x 10 sec im eisgekühltem Ultraschallbad behandeln und zwischendurch vortexen
- 10 Minuten bei 14000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge bei 4 °C zentrifugieren
- Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 6.2) durchführen und Proteingehalt der Aliquote auf 2 mg/ml mit 1 mM PMSF/ Na_3VO_4 -haltigem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (4 °C) einstellen
- Die Proben können bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert werden oder direkt mit dem SDS-Probenpuffer (6x) gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert werden.
- Proben gut resuspendieren und zum Abtrennen der unlöslichen Bestandteile kurzzeitig anzentrifugieren.

Die Auftrennung des Lysats sowie die Detektion spezifisch phosphorylierter Formen der Proteine erfolgt über einen Western Blot (s. Kapitel 6.3). Der zur Detektion verwendeten Phospho-Akt Pathway Sampler kann über Cell Signaling TECHNOLOGY™ bezogen werden und enthält folgende Komponenten:

- Phospho-Akt (Ser473) Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Phospho-Akt (Thr308) Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Akt Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Phospho-GSK-3b (Ser9) Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Phospho-FKHR (Ser256) Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Phospho-PTEN (Ser380) Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)

Phospho-BAD (Ser112) 7E11 monoklonaler Antikörper (Maus IgG)

LY294002 (PI3 Kinase Inhibitor)

HRP-konjugierter Anti-Kaninchen Sekundärantikörper

Geblockt wurde die Nitrozellulosemembranen eine Stunde in TBS (1x), 0,1 % Tween-20 mit 5 % Magermilchpulver. Alle polyklonalen Primärantikörper dieses Kits werden in einer Verdünnung von 1/1000 in TBS (1x), 0,1 % Tween-20 mit 5 % Milchpulver angesetzt und über Nacht bei 4 °C auf die Membran einwirken gelassen. Der monoklonale Phospho-BAD Antikörper wird in einer Verdünnung von 1/500 in TBS (1x), 0,1 % Tween-20 mit 5 % BSA angesetzt. Die HRP-konjugierten Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1/2000 in TBS (1x), 0,1 % Tween-20 mit 5 % Magermilchpulver angesetzt.

6.7 Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des Retinoblastoma Tumorsuppressorproteins in A431 Zellen

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

PBS (4 °C), Rb-SDS-Puffer

Benötigte Reagenzien:

PhosphoPlus Rb (Ser780, Ser795, Ser807/811) Antibody Kit (Cell Signaling TECHNOLOGY™)

6.7.1 Kultivierung und Inkubation der Zellen

Je Probe werden 2 große Petrischalen (145 cm²) mit 3·10⁶ A431 Zellen in MEM-Medium mit 10 % FKS ausgestreut und für 2 Tage kultiviert. Nach Erreichen von 70 % iger Konfluenz werden die Zellen mit PBS gespült und für 3 Tage mit serumreduziertem Medium bei einem FKS-Anteil von 0,2 % arretiert. Zwei Platten werden als G₀-Kontrolle ohne Serumstimulation aufgearbeitet. Bei allen weiteren Platten erfolgt der erneute Zellzykluseintritt mit der Substanzinkubationen in 10 % FKS-haltigem MEM-Medium bei einem DMSO Gehalt von 0,3 % für 24 h.

6.7.2 Gewinnung der Zellproteine und Western-Blotting

- Petrischalen auf Eis stellen, entleeren und 2x mit eiskaltem PBS spülen
- 200 µl Rb-SDS-Puffer gleichmäßig verteilen und Platten für mindestens 2 Stunden bei -80 °C lagern
- Platte leicht antauen lassen und das gefrorene Lysat abkratzen und in Eppendorfgefäß überführen
- Lysat 5x durch eine 18er Kanüle ziehen, für 5 Minuten bei 95 °C kochen, dann sofort auf Eis kühlen
- Proteinbestimmung nach Bradford (s. Kapitel 6.2) und Einstellen des Proteingehaltes der Aliquote auf 2 mg/ml

Die Auftrennung des Lysats sowie die Detektion spezifisch phosphorylierter Formen des humanen Retinoblastoma Tumorsuppressorproteins erfolgt über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kapitel 6.3). Der zur Detektion verwendeten PhosphoPlus® Rb (Ser780, Ser795, Ser807/811) Antibody Kit kann über Cell Signaling TECHNOLOGY™ bezogen werden und enthält folgende Komponenten:

- Rb-Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Phospho-Ser780-Rb-Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Phospho-Ser795-Rb-Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Phospho-Ser807/811-Rb-Antikörper (Kaninchen polyklonal IgG)
- Rb Kontrollproteine
- Phototope®-HRP Western Detection Kit mit LumiGLO®
- HRP-konjugierter Anti-Kaninchen Sekundärantikörper
- HRP-konjugierter Anti-Biotin Sekundärantikörper

Geblockt wurden die Nitrozellulosemembranen in TBS (1x), 0,1 % Tween-20 mit 5 % Magermilchpulver. Alle verwendeten Primärantikörper dieses Kits werden in einer Verdünnung von 1/500 in TBS (1x) mit 0,1 % Tween-20 und 5 % BSA angesetzt und über Nacht bei 4 °C auf die Membran einwirken gelassen. Der HRP-konjugierte Anti-Kaninchen Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1/2000 in TBS (1x), 0,1 % Tween-20 mit 5 % Magermilchpulver angesetzt.

6.8 Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des Gerüstproteins Paxillin in A431 Zellen

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

Inhibitor-PBS (4 °C), Na₃VO₄ (aktiviertes), PBS (4 °C), PEMS-Präzipitationspuffer, Stripping-Solution;

Benötigte Reagenzien:

HRP-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG Sekundärantikörper (Santa Cruz Biotechnology), Paxillin 349 monoklonaler Antikörper (Maus IgG1) (Transduction Laboratories), Phospho-Tyrosine monoklonaler Antikörper (P-Tyr-100) (Cell Signaling TECHNOLOGY™);

6.8.1 Kultivierung und Inkubation der Zellen

Je Probe wird eine große Petrischale (145 cm²) mit 3·10⁶ A431 Zellen in MEM-Medium mit 10 % FKS ausgestreut und für 2 Tage kultiviert. Nach Erreichen von 70 % iger Konfluenz werden die Zellen 16 Stunden vor der geplanten Substanzinkubation mit frischem serumhaltigen Medium versorgt. Die Substanzinkubationen erfolgt nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS in serumfreiem Medium bei einem DMSO Gehalt von 0,3 %.

6.8.2 Gewinnung der Zellproteine

- Petrischalen auf Eis stellen, entleeren und 2x mit eiskaltem PBS spülen, welches mit 1 mM Na₃VO₄ versetzt wurde
- Rückstände mit Papierstreifen möglichst restlos aufsaugen
- 500 µl PEMS-Präzipitationspuffer (4 °C) gleichmäßig verteilen und Zellrasen abschaben
- Zellsuspension in Potter überführen und mit 30 Hüben auf Eis pottern
- Zelllysate in Eppendorfgefäß überführen und 10 Minuten auf Horizontalschüttler inkubieren
- Abtrennen der Zelldebris durch Zentrifugieren bei 4 °C/14000 rpm für 10 Minuten
- Proteinbestimmung nach Bradford (s. Kapitel 6.2)
- Eine 100 µg-Proben abtrennen und mit SDS-Puffer (6x) versetzen, 10 Minuten aufkochen und bis auf weiteres bei -20 °C lagern

- Abtrennen von 2x 400 µg Zellprotein für die Immunopräzipitation der Paxillin- und P-Tyrosin-haltigen Proteine

6.8.3 Immunopräzipitation von Paxillin und Phospho-Tyrosin-haltigen Proteinen aus A431 Zellen

Die für die Immunopräzipitation abgetrennten Proben mit 400 µg Proteingehalt werden auf ein Volumen von 200 µl mit eiskaltem PBS/1mM Na₃VO₄ aufgefüllt. Über Nacht erfolgt die Inkubation der Proben mit 6 µl Anti-Paxillin Antikörper (1,5 µl/100 µg) bzw. 4 µl Anti-Phospho-Tyr-100 Antikörper (1,0 µl/100 µg). Am nächsten Tag wird die Protein G-Sepharose vorbereitet. Um die Verluste bei der Waschung möglichst gering zu halten, wird die für alle Proben benötigte Menge Protein G-Sepharose in ein Probengefäß gefüllt und nach den Waschungen auf die Immunokomplex-Proben per Multipette verteilt.

Das Vorbereiten der Protein G-Sepharose beinhaltet folgende Schritte:

- Abzentrifugieren des Überstandes von der Protein G-Sepharose (3500 rpm, 4 °C, 5 Minuten)
- 2x mit eiskaltem PBS waschen
- Abschließend die Protein G-Sepharose in der doppelten Menge Inhibitor-PBS, aufnehmen und mit Hilfe einer Multipette 100 µl gleichmäßig auf die Immunokomplexe verteilen
- Die Matrix-Immunokomplex-Proben für 2 Stunden per Horizontalschüttler im Kühlschrank bei 4 °C durchmischen

6.8.4 Aufarbeiten der Matrix-Immunokomplexe und Western-Blotting

- Abzentrifugieren der Sepharose (7000 rpm / 4 °C / 2 Minuten)
- Überstand mit ProtElec-Tips in neues Eppendorfgefäß überführen
- Beads 1x mit 300 µl PEMS-Präzipitationspuffer waschen
- Beads 2x mit 300 µl Inhibitor-PBS waschen
- Proben mit ProtElec-Tips trockenziehen
- Sepharose mit 80 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzen und für 10 Minuten auf 95 °C erwärmen, Präzipitate bei - 20 °C lagern

- Überstände an der Speedy-Vac trockenziehen, in 80 µl 2x SDS-Probenpuffer aufnehmen und gut resuspendieren. Danach für 10 min bei 95 °C kochen. Proben bei -20 °C lagern

Die Auftrennung der Proben sowie deren Detektion erfolgt über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kapitel 6.3). Geblockt werden die Nitrozellulosemembranen in 1xTBS mit 0,1 % Tween-20 und 5 % Magermilchpulver. Der Paxillin Primärantikörper wird in einer Verdünnung von 1/5000 in TBS (1x), 0,1 % Tween-20 und 5 % Magermilchpulver eingesetzt, der Phospho-Tyrosine Antikörper in einer Verdünnung von 1/2000 in TBS (1x), 0,1 % Tween-20 und 5 % BSA. Die Inkubation der Nitrozellulose erfolgt über Nacht bei 4 °C. Der HRP-konjugierte Anti-Maus Sekundärantikörper wird in einer Verdünnung von 1/2000 in Blockingpuffer verwendet.

6.8.5 Entfernen der Antikörper von der Membran

Das Entfernen der Antikörper von der Membran („Strippen“) erfolgt mit der Stripping-Solution im Schüttelwasserbad bei 50 °C für 30 Minuten. Danach ist ein Überprüfen der Effektivität unerlässlich, indem man erneut eine Detektion mit Lumi-Glo durchführt. Wenn keine Signale sichtbar sind und das Strippen somit erfolgreich war, kann man die Membran erneut mit einem Erst- und Zweitantikörper inkubieren.

6.9 Morphologische Untersuchungen

6.9.1 Kultivierung von Zellen auf Objektträgern

Die Zellen werden vorzugsweise in Quadripermschalen auf Objektträgern Superfrost® ausgestreut. Nach ca. 24-stündiger serumhaltiger Kultivierung im Brutschrank können die Objektträger mit Substanz inkubiert oder direkt fixiert werden.

6.9.2 Fixierungs- und Permeabilisierungsmethoden

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

PBS, PBS/Triton X-100 (0,5 %), Paraformaldehyd-Lösung

Benötigte Reagenzien:

Methanol, Aceton

6.9.2.1 Methanolfixierung

Die Methanolfixierung ist eine schnelle Methode zur Fixierung von Zellen, wie sie üblicherweise auch für das Mycoplasmascreening verwendet wird. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass unpolare Substanzen durch die Fixierung aus den Zellen gelöst werden. Zur Fixierung der Zellen auf den Objektträgern werden diese mit Methanol (-20 °C) gespült und in ein Methanolbad von -20 °C für mindestens 15 Minuten gestellt. Eine Lagerung der Objektträger ist unter diesen Bedingungen auch über eine längere Zeit möglich. Zur Permeabilisierung der Zellmembran stellt man die Objektträger für 5 Minuten in Aceton bei -20 °C und spült danach einmal mit PBS oder PBS/Triton X-100 (0,5 %). Anschließend wird noch 2x für 5 Minuten mit reinem PBS gespült.

6.9.2.2 Paraformaldehydfixierung

Diese Fixierungsmethode erhält unpolare Substanzen in der Zelle, ist dafür aber zeitaufwendiger als die Methanolfixierung. Die Objektträger werden in frisch hergestellte, eiskalte Paraformaldehyd-Lösung für 15 Minuten auf Eis gestellt.

Nach dem Fixieren der Zellen wird 3x mit PBS gewaschen und dann die Zellmembranen in PBS/Triton X-100 (0,5 %) innerhalb von 5 Minuten permeabilisiert. Reste von Triton X-100 werden durch dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten entfernt.

6.9.3 Färbungsmethoden

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

Actin-Markierungssubstanz, Propyl-Gallat, PBS, PBS/BSA (1 %)

Benötigte Reagenzien:

Anti- α -Tubulin Antikörper, Neugeborenen Kälberserum, Cy3TM-konjugierter Ziegen anti-Maus IgG, Paxillin 349 monoklonaler Antikörper (Maus IgG1) (Transduction Laboratories), Ziegenserum

6.9.3.1 Durchführung einer Actin-Fluoreszenzfärbung

Die Zellen werden, wie in Kapitel 6.9.1 beschrieben, in Quadripermschalen serumhaltig kultiviert und dann mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen inkubiert. Die Fixierung erfolgt entweder mit Methanol (s. Kapitel 6.9.2.1) oder mit Paraformaldehyd (s. Kapitel 6.9.2.2). Zum Blockieren der Objektträgeroberfläche wird mit 90 μ l einer Mischung aus 90 %

Ziegenserum und 10 % Neugeborenen Kälberserum eingedeckelt und für 45 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird das Deckglas durch Schwenken des Objektträgers in PBS entfernt und 80 µl der Actin-Markierungssubstanz je Objektträger aufgetragen. Die Inkubation erfolgt ebenfalls bei 37 °C in einer feuchten Kammer für eine Stunde. Danach wird der Objektträger in einem Schüttelbad 4x für jeweils 5 Minuten mit PBS gespült. Um ein Photobleaching zu vermeiden, wird der Objektträger mit n-Propyl-Gallat bedeckt und das Deckglas mit Nagellack versiegelt. Die Photographie erfolgt mit einer Belichtungszeit von ungefähr 120 Sekunden.

6.9.3.2 Durchführung einer Paxillin-Fluoreszenzfärbung

Die Zellen werden, wie in Kapitel 6.9.1 beschrieben, in Quadriperschalen serumhaltig kultiviert und dann mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen inkubiert. Die Fixierung erfolgt in Paraformaldehyd (s. Kapitel 6.9.2.2). Die Objektträgeroberfläche wird mit 90 µl Ziegenserum geblockt, eingedeckelt und für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird das Deckglas durch Schwenken des Objektträgers in PBS entfernt und die Zellen mit 100 µl des monoklonalen Paxillin 349 Antikörpers (Maus IgG1) (Transduction Laboratories) bei einer Verdünnung von 1/500 in PBS/BSA (1 %) in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten werden 100 µl des Sekundärantikörpers Cy3TM-konjugierter Ziegen anti-Maus IgG bei einer Verdünnung von 1/150 in PBS/BSA (1 %) aufgetragen. Für 1 Stunde wird in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert und dann der Objektträger 3x 5 Minuten in PBS gewaschen. Nach Auftragen von Propyl-Gallat kann der Objektträger eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt werden. Das Auszählen der Zellen und die Aufnahmen werden immer einen Tag nach dem Färben durchgeführt. Dadurch sind Veränderungen an den Zellen nach der Färbung auf ein Zeitfenster von ca. 12 Stunden reduzierbar. Ausgezählt werden je Objektträger 100 Zellen, die in 3 Stadien der Paxillininformation eingeteilt werden.

6.10 Zellkultur

Benötigte Zubereitungen (s. Kapitel 6.11):

DAPI/SR 101-Lösung, PBS, Trypsinlösung

Benötigte Reagenzien:

DMSO, Fetales Kälberserum, L-Glutamin, Kulturmedien, Penicillin / Streptomycin

6.10.1 Zelllinien

6.10.1.1 A431 Zelllinie

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um ein Epidermoidkarzinom der Vulva (Giard et al., 1973). Es wurde einer Patientin im Alter von 85 Jahren entnommen und als Monolayer in Kulturflaschen passagiert. Die fibroblastenähnlichen Zellen zeigen auch nach langer Kultivierung in Zellkultur ihre maligne Charakteristik. Der Karyotyp der Zelle ist hypertriploid mit einer modalen Chromosomenanzahl von 74.

6.10.1.2 MCF-7 Zelllinie

1970 wurde aus dem pleuralen Erguß einer 69 jährigen Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom nach Strahlen- und Hormontherapie die humane Zelllinie MCF-7 gewonnen (Soule, 1973). Diese Mammakarzinomzelllinie ist gut differenziert und stellt ein etabliertes in-vitro Testsystem mit einer ungefähren Verdopplungsdauer von 50 Stunden dar. MCF-7 wachsen als Xenograft-Modell auf Nacktmäusen (Gotthardis & Jordan, 1988). Der Karyotyp der Zelle ist hypotetraploid.

6.10.2 Zellkultivierung

Alle verwendeten Zelllinien werden in Kulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die A431-Zelllinie wird in Minimum essential Medium (MEM) nach Zugabe von 4,5 g/l L-Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die MCF-7 Zellen werden in RPMI 1640-Medium versetzt mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

6.10.3 Mediumwechsel

Alle zwei bis drei Tage zeigt das Medium einen deutlichen Farbumschlag, welcher auf einem Anstieg des pH-Wertes basiert. Dieser wird durch Anreicherung von Abfallprodukten im Medium bewirkt und geht mit einer Abnahme von zugesetzten Nährstoffen einher. Befinden sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt in einer subkonfluenten Wachstumsphase, so wird das verbrauchte Medium abgegossen und durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium ersetzt.

6.10.4 Einfrieren und Lagern von Zellen

Die Zellen werden wie beim Passagieren abtrypsiniert und in 20 % FKS-haltigem Medium auf eine Zelldichte von $1 - 3 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Aliquote von 1 ml der Zellsuspension werden in Kryoröhrchen vorgelegt und anschließend mit 100 µl DMSO versetzt. Danach werden die Präparate für einen Tag bei -20 °C eingefroren, weitere 24 Stunden bei -80 °C zwischengelagert bevor sie zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

6.10.5 Auftauen von Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und möglichst schnell mit der 10fachen Menge an frischem Medium versetzt. Danach wird die Zellsuspension für 4 Minuten bei 800 rpm (RT) zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wird in serumhaltigem Medium resuspendiert und die Suspension in eine kleine Kulturflasche überführt und bei 37 °C kultiviert.

6.10.6 Passagieren von Monolayerkulturen

Nach Erreichen von konfluentem Wachstum werden die Zellen durch Passagieren ausgedünnt. Bei Monolayerkulturen wird dabei das Medium abgegossen und der Zellrasen mit ungefähr 5 ml PBS gespült. Anschließend wird der Zellrasen dünn mit Trypsin überschichtet. Die Einwirkzeit beträgt bei 37 °C für A431 Zellen ca. 8 Minuten, für MCF-7 Zellen 2 Minuten. Durch anschließendes Klopfen auf den Boden der Zellkulturflasche werden die Zellen abgelöst und in ca. 10 ml frischem Medium resuspendiert. Die Kultivierung erfolgt in einer 1:10 Verdünnung.

6.10.7 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung werden 100 µl Zellsuspension und 100 µl Trypanblau (Serva) gemischt und lichtmikroskopisch mittels einer Neubauerzählkammer ausgezählt (Lindel & Bauer, 1994).

6.10.8 Mycoplasmascreening

Mycoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten und können die Sterilfilter ungehindert passieren. Aus diesem Grund ist eine regelmäßige Kontrolle der Zellen auf eine eventuelle Mycoplasmenkontamination sehr wichtig.

Methanolfixierte Zellen werden kurz getrocknet und mit DAPI/SR 101-Lösung betropft. Nach dem Eindeckeln des Objektträgers können unter dem Fluoreszenzmikroskop Mycoplasmenkontamination an fluoreszierenden Punkten im Zytoplasma als blaue Punkte erkannt werden, da sich die Mycoplasmen-DNA mit DAPI gut anfärben lässt.

6.11 Alphabetische Auflistung der Zubereitungen

ABTS [®] -Lösung:	50 mg	ABTS [®] (Tablette) in 50 ml ABTS [®] -Puffer lösen
Actin-Markierungssubstanz:	PBS	
	3-4 %	CPITC-gelabeltes Phalloidin (blau) oder TRITC-gelabeltes Phalloidin (rot)
	1 %	BSA
Agarosegel (1,3 %):	300 mg	Agarose
	30 ml	TAE-Puffer
		Schmelzen der Agarose, Abkühlen auf ca. 60 °C
	0,5 µg/ml	Ethidiumbromid zusetzen mini-Gel gießen und abkühlen lassen
Ampicillin-Stammlösung:	20 mg	Ampicillin
	1ml	H ₂ O bidest
		sterilfiltrieren (Ø= 0,2 µm) und bei -20 °C lagern
Assaypuffer:	50 mM	HEPES·NaOH
	10 mM	MgCl ₂ ·6 H ₂ O
	2 mM	MnCl ₂
	200 µM	ATP
		pH 7,2 einstellen in 5 ml Aliquoten und bei -20 °C lagern
ATP-Mix (160 µl):	16 µl	MgCl ₂ -Lösung
	8,78 µl	8 mM ATP-Stammlösung
	110,22 µl	H ₂ O bidest
	25 µl	g- ³³ P-ATP (250 µCi; ca. 2000 Ci per mmol)

Blockingpuffer:	100 ml	TBS (1x)
	5 g	BSA oder Magermilchpulver (je nach verwendetem Antikörper)
	0,1 %	Tween-20
Blottingpuffer:	25 mM	Tris (pH 8,5)
	0,2 M	Glycin
	20 %	Methanol
Bradford-Reagenz:	100 mg	Coomassie Brilliant Blue G-250 in
	50 ml	EtOH absolut und
	100 ml	85 % ige H ₃ PO ₄ lösen
		mit H ₂ O bidest auf 1000ml auffüllen
		Die Lösung sollte vor Benutzung abgedunkelt
		ca. 4 Wochen gelagert werden.
Buffer A:	137 mM	NaCl
	20 mM	Tris·HCl
	1 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
		pH 7,4 einstellen
		erst direkt vor der Verwendung zugeben:
	0,1 mM	aktiviertes Na ₃ VO ₄
CaCl ₂ -Lösung:	1 M	CaCl ₂ ·2 H ₂ O
LumiGLO [®] -Lösung	9 ml	H ₂ O bidest
	0,5 ml	LumiGLO [®] -Lösung 1: 20x Peroxid
	0,5 ml	LumiGLO [®] -Lösung 2: 20x Luminol

DAPI/SR 101-Lösung:	0,2 M	Tris
	0,2 M	NaCl
	8 µM	DAPI
	50 µM	SR 101
		pH 7,6 einstellen
DDT-Lösung:	10 mM	Dithiothreitol
EGF-Lösung:	100 µg	EGF
	10 ml	Essigsäure/BSA-Lösung
Elektrophoresepuffer:	14 g	Glycin
	3 g	Tris
	1 g	SDS
		auf 1000 ml mit H ₂ O bidest auffüllen
Essigsäure/BSA-Lösung	10 mM	Essigsäure
	0,1 %	BSA
Gelladungspuffer (6x):	0,25 %	Bromphenolblau
	40 %	Glukose in H ₂ O bidest (w/v)
Inhibitor-PBS:		PBS
		erst direkt vor der Verwendung zugeben:
	2mM	Na ₃ VO ₄ (aktiviertes)
	2,5 mM	NaF
	1 mM	PMSF
	10 µg/ml	Leupeptin und Pepstatin
Kaliumoxalat-Lösung:	96 ml	MeOH
	144 ml	H ₂ O
	2,88 g	Kaliumoxalat

Kanamycin-Stammlösung:	50 mg	Kanamycin
	1ml	H ₂ O bidest
		sterilfiltrieren (Ø= 0,2 µm) und bei -20 °C lagern
KMP-Puffer-Stammlösung:	20 mM	PIPES·NaOH
	1 mM	MgCl ₂ ·6 H ₂ O
	5 mM	KCl
		pH 7,2 einstellen
KMP-Puffer:	10ml	KMP-Puffer-Stammlösung
	0,2 mM	PMSF (entsp. 22 µl PMSF-Stammlösung)
KMP-T-Puffer:	10ml	KMP-Puffer-Stammlösung
	100 µl	Triton X-100
	0,2 mM	PMSF (entsp. 22 µl PMSF-Stammlösung)
LB-Agar:	3,75 g	Agar
	1,25 g	Select Yeast Extract
	2,5 g	Tryptone
	2,5 g	NaCl
	200 ml	H ₂ O bidest
		pH 7,0 einstellen
		mit H ₂ O bidest auf 250 ml auffüllen, autoklavieren
		Danach jeweils 20 ml unter sterilen Bedingungen
		in 10 cm Petrischalen geben, auskühlen lassen
		und bei 4 °C lagern.
LB-Medium:	10 g	Tryptone
(Luria-Bertani-Medium)	5g	Select yeast extract
	10g	NaCl
	950ml	H ₂ O bidest
		pH 7,0 einstellen
		mit H ₂ O bidest auf 1000ml auffüllen, autoklavieren

MgCl ₂ -Stammlösung:	100 mM	MgCl ₂
NaCl-Lösung:	1 mM	NaCl
N-Acetylglucosaminhaltiger Säulenpuffer (0,3 mol):		
	9,95 g	N-Acetyl-D-Glucosamin
	150 ml	Säulenpuffer

Na₃VO₄ (aktiviertes):

Um Natriumorthovanadat zu depolymerisieren und dadurch größtmögliche Tyrosin-Phosphatase Inhibierung zu gewährleisten, wird das Natriumorthovanadat folgendermaßen aktiviert. Die Na₃VO₄-Lösung wird mit 1 N NaOH oder 1 N HCl auf pH 10,0 eingestellt. Bei diesem pH-Wert zeigt die Lösung eine intensiv gelbe Farbe. Daraufhin erhitzt man die Lösung bis sie farblos wird und lässt sie wieder abkühlen. Wenn die pH Einstellung zu keiner erneuten Verfärbung führt, kann man die depolymerisierte Orthovanadat-Lösung bei -20 °C in Aliquoten lagern.

Paraformaldehyd-Lösung	4 %	Paraformaldehyd in PBS aufkochen bis zum vollständigen Lösen abkühlen auf Eis
	0,1 %	Glutaraldehyd zugeben
PBS (steril):	5 g	NaCl
	0,72 g	Na ₂ HPO ₄
	0,125 g	KCl
	0,125 g	KH ₂ PO ₄
		mit H ₂ O bidest auf 500 ml auffüllen pH 7,4 einstellen und autoklavieren
PBS/BSA (1 %)	1 %	BSA (w/v) in PBS
PBS/Triton X-100 (0,5 %)	0,5 %	Triton X-100 in PBS
PEMS-Präzipitationspuffer:	35 mM	PIPES
	5 mM	EGTA

	5 mM	MgCl ₂
	0,2 M	Sucrose
	0,5 %	Triton X-100
		pH 7,1 einstellen
		erst direkt vor der Verwendung zugeben:
	2 mM	Na ₃ VO ₄ (aktiviertes)
	2,5 mM	NaF
	1 mM	PMSF
	je 10 µg/ml	Leupeptin und Pepstatin
Phosphatidylinositol:		Pro Probe 20 µg Phosphatidylinositol
		Lösungsmittel per Speedy-vac entfernen
		10 µl Sonicationbuffer zugeben
		10 Sekunden suspendieren (Ultraschall, 4 °C)
		Lagerung bei -20 °C möglich
PI3K-Waschpuffer:	0,1 M	Tris·HCl
	5 mM	LiCl
		pH 7,4 einstellen
		erst direkt vor der Verwendung zugeben:
	0,1 mM	aktiviertes Na ₃ VO ₄
PMSF-Stammlösung:	170 mg	PMSF
	10 ml	Isopropanol
Poly (Glu, Tyr) 4:1-Lösung:	0,1 mg	Poly (Glu, Tyr) 4:1 in 1 ml PBS

Präzipitationspuffer:	10 mM	Tris pH 7,4
	1 %	Triton X-100
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	0,5 %	Igepal
		pH 7,4 einstellen
		erst direkt vor der Verwendung zugeben:
	0,2 mM	PMSF
0,2 mM	aktiviertes Na_3VO_4	
Propyl-Gallat	Glycerin	
	5 %	n-Propyl-Gallat
Rb-SDS-Puffer:	25 mM	Tris·HCl
	1 %	SDS
	5 %	Glycerin
		pH 6,8 einstellen
		erst direkt vor der Verwendung zugeben:
	50 mM	NaF
2 mM	aktiviertes Na_3VO_4	
RIPA-Puffer mit EDTA	790 mg	Tris
	900 mg	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 ml	Igepal
		pH 7,4 einstellen
		auf 100 ml mit H_2O bidest auffüllen
		erst direkt vor der Verwendung zugeben:
	1 mM	PMSF
	1 mM	NaF
1 mM	aktiviertes Na_3VO_4	
1 $\mu\text{g/ml}$	Leupeptin und Pepstatin	

Säulenpuffer:	40 mM	HEPES·NaOH
	500 mM	NaCl
	10 %	Glycerol
	0,05 %	Triton X-100
		pH 7,2 einstellen erst direkt vor der Verwendung zugeben:
	1 mM	PMSF
SDS-Lösung (10 % w/v):	10 g	SDS auf 100 ml mit H ₂ O _{bidest} auffüllen
SDS-Probenpuffer (6x):	50 ml	Tris 0,5 M
	40 ml	Glycerin
	5 %	Mercaptoethanol
	1,24 g	SDS
	0,16 g	Bromphenolblau pH 6,8 einstellen auf 100 ml mit H ₂ O _{bidest} auffüllen
Sonicationbuffer:	10 mM	Tris·HCl
	1 mM	EGTA pH 7,4 einstellen
SRB-Lösung:	0,4 %	Sulforhodamin B in 1 % iger Essigsäure
Stripping-Solution:	62,5 mM	Tris
	100 mM	2-Mercapto-Ethanol
	2 %	SDS (w/v) pH 6,7 einstellen
TAE-Puffer (50x):	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0 pH 8,5 einstellen auf 1000 ml mit H ₂ O _{bidest} auffüllen

TBS (10x) -Lösung	0,2 M	Tris·HCl
	1,3 M	NaCl
		pH 7,6 einstellen
TBST-Waschlösung:	1x	TBS
	0,3 %	Tween-20
TNE:	10 mM	Tris·HCl
	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
		pH 7,4 einstellen
Tris-Base:	10 mM	Tris
		pH 10,5 einstellen
Tris/HCl (1,5 M)	1,5 M	Tris
		pH 8,8 einstellen
Tris/HCl (0,5 M)	0,5 M	Tris
		pH 6,8 einstellen
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,25 g	Trypsin
	0,35 g	EDTA
		mit PBS auf 500 ml auffüllen und steril filtrieren
Trypsinlösung:	0,25 g	Trypsin
	0,125 g	EDTA
		in 500 ml PBS lösen und steril filtrieren,
		in 5 ml Aliquoten bei -20 °C lagern
Waschpuffer:	0,1 %	Tween-20 in PBS

7 Geräte und Materialien

7.1 Verwendete Geräte

Autoradiographie:	Instant-Counter (DKFZ Heidelberg)
Blotting:	Semi-Phor™ (Hoefer Scientific Instruments)
Chemilumineszenz:	Lumi-Imager (Boehringer Mannheim)
Elektrophorese:	Mini-Protean II (Biorad) Spannungsgerät Power PAC 200 / 300 (Biorad)
Elisa-Reader:	Modell 450 (Biorad)
Fraktionssammler:	LKB FRAC-100 (Pharmacia)
Gel-Dokumentation:	Lumi-Imager (Boehringer Mannheim)
Mikroskopie:	Durchlicht- / Fluoreszenz-Mikroskop, Typ Axioskop (Zeiss) Fluoreszenzfiltereinsatz 365, FT 395, LP 420 (Farbgläser mit Breitbandcharakter, UV-Anregung: 365/366 nm) Fluoreszenz- filtereinsatz BP 450-490, FT 510, LP 520 Objektive: Plan Neofluar 100 x/1,30 oil Plan Neofluar 63 x/1,25 oil Okular: PL 10x
pH-Meter:	pH 521 (WTW)
Pipetten / Zubehör:	Multipette (Eppendorf) Pipetten (Abimed, Eppendorf) Pipettierhilfe Pipettus Akku (Tecnomara)
Pumpe:	Minipuls 2 (Abimed Gilson)
Rüttler:	Cat RM5 (M. Zipperer GmbH) Schüttelwasserbad (Köttermann) Thermomixer Modell 5436 (Eppendorf) Überkopfschüttler Heto Lab Equipment Type RK 10-VS
Rührer:	Magnetrührer MR 2002 (Heidolph)
Spektralphotometer:	Uvikon 810 (Kontron)
Trockenschrank:	Heraeus; Memmert
Ultraschallbad:	Sonorex RB255 (Bandelin)
Vortex:	Vortex Genie (Bender Hobein)
Waagen:	Analysenwaage AE 163 (Mettler) Grobwaage Sartorius 1104 (Sartorius)
Zellkultur:	Biofreezer Model MDF-460865 (Sanyo) Brutschrank (Binder GmbH) Lichtmikroskop Labovert (Leitz) Sterilwerkbank LaminAir® HLB 2472 BS (Heraeus) Systec 5075 EL Autoklav (Systec) Vakuumsaugpumpe (KNF-Neuberger)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge 5415 (Heraeus) Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus) Ultrazentrifuge Centrikon T-2055 (Kontron) Zentrifuge Mode J2-21 (Beckman)

7.2 Reagenzien

Chemikalien allgemein:	ABTS [®] -Tabletten (Boehringer Mannheim) ABTS [®] -Puffer (Boehringer Mannheim) N-Acetyl-D-Glucosamin (Sigma) Agar-Agar (Roth) Ammoniumpersulfat, APS (Serva) Ampicillin (Invitrogen [®]) Aprotinin (Boehringer Mannheim) Adenosin-5'-triphosphat (Boehringer Mannheim) BSA Albumin Fraktion V (Roth) Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma) 4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, DAPI (Sigma) Dimethylsulfoxid, DMSO (Fluka) DNA ladder 1 kb (GIBCOBRL Life Technologies) Ethidiumbromid (Sigma) FuGENE [™] 6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim) Glycerin (Boehringer Mannheim) Glycin (Serva) Kanamycin (Invitrogen [®]) Leupeptin (Boehringer Mannheim) Mercaptoethanol (Sigma) Methanol (Riedel-de-Häen) Pepstatin (Boehringer Mannheim) Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF (Boehringer Mannheim) Phosphatidylinositol (Sigma) Phosphatidylinositol-4-monophosphat (Sigma) Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) PIPES (Sigma) Poly (Glu, Tyr) 4:1 Sodium salt (Sigma) Select Yeast Extract (GIBCOBRL Life Technologies) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED (Biorad) Trypanblau (Serva) Tryptone (Invitrogen) Tween-20 (Sigma)
Antikörper:	Anti-Phosphoinositol 3-Kinase p85, N-SH3, monoklonal, (Upstate Biotechnology) Anti- α -Tubulin; monoklonal, (Clone DM1A) (Sigma) Cy3 [™] -konjugierter Ziegen anti-Maus IgG (Sigma) HRP-konjugierter Anti-Maus IgG Sekundärantikörper (Santa Cruz Biotechnology) HRP-konjugierter Anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper (Cell Signaling TECHNOLOGY [™]) Paxillin 349 Antikörper (Maus IgG1), monoklonal (Transduction Laboratories) Phospho-Tyrosin-Peroxidase p-Tyr (PY99) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) Phospho-Tyrosine Antikörper (P-Tyr-100), monoklonal (Cell Signaling TECHNOLOGY [™])

Chemilumineszenz:	LumiGLO [®] (Cell Signaling TECHNOLOGY [™]) SeeBlue [™] Pre-Stained Standards (Novex)
Enzyme:	Restriktionsendonuklease Bam HI (Boehringer Mannheim) Restriktionsendonuklease Eco RI (Boehringer Mannheim)
Kits:	Luciferase Assay System (Promega) Phospho-Akt Pathway Sampler (Cell Signaling TECHNOLOGY [™]) PhosphoPlus [®] Rb (Ser780, Ser795, Ser807/811) Antibody Kit (Cell Signaling TECHNOLOGY [™]) QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)
Markierungssubstanzen:	CPITC-gelabeltes Phalloidin (Sigma) TRITC-gelabeltes Phalloidin (Sigma)
Modulatoren:	E481 (Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach) Epidermal Growth Factor, Human, Recombinant, Ecoli (Calbiochem) Forskolin aus coleus forskohlii (Calbiochem) H89 (Alexis) Ly294002 (Alexis) Natriumorthovanadat (Sigma) Tyrphostin AG 1478 (Alexis) Wortmannin (Calbiochem)
Lipide:	L- α -Phosphatidylinositol (Sigma) L- α -Phosphatidylinositol-4-monophosphat (Sigma)
Plasmide:	PathDetect [™] ELK-trans-Reporting System (Stratagene)
Präzipitation:	Protein G-Sepharose 4 fast flow (Sigma)
Radiochemikalien:	Adenosin 5'-[γ - ³³ P]-triphosphat; (Hartmann Analytic GmbH)
Zellkultur:	Fetales Kälberserum, FKS (Gibco) L-Glutamine (Sigma) Minimum Essential Medium Eagle with Earle's salts and aminoacids [MEM] (Sigma) Neugeborenen Kälberserum, NKS (Gibco) PBS, Phosphate buffered saline (Gibco) Penicillin/Streptomycin 10000 I.U./ml; 10000 μ g/ml (GIBCOBRL Life Technologies) RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (GIBCOBRL Life Technologies) Ziegenserum (Gibco)

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren im Hause vorrätig und können über die Firmen Boehringer Mannheim, Fluka, Pharmacia, Merck, Riedel de Häen, Roth, Serva oder Sigma bezogen werden.

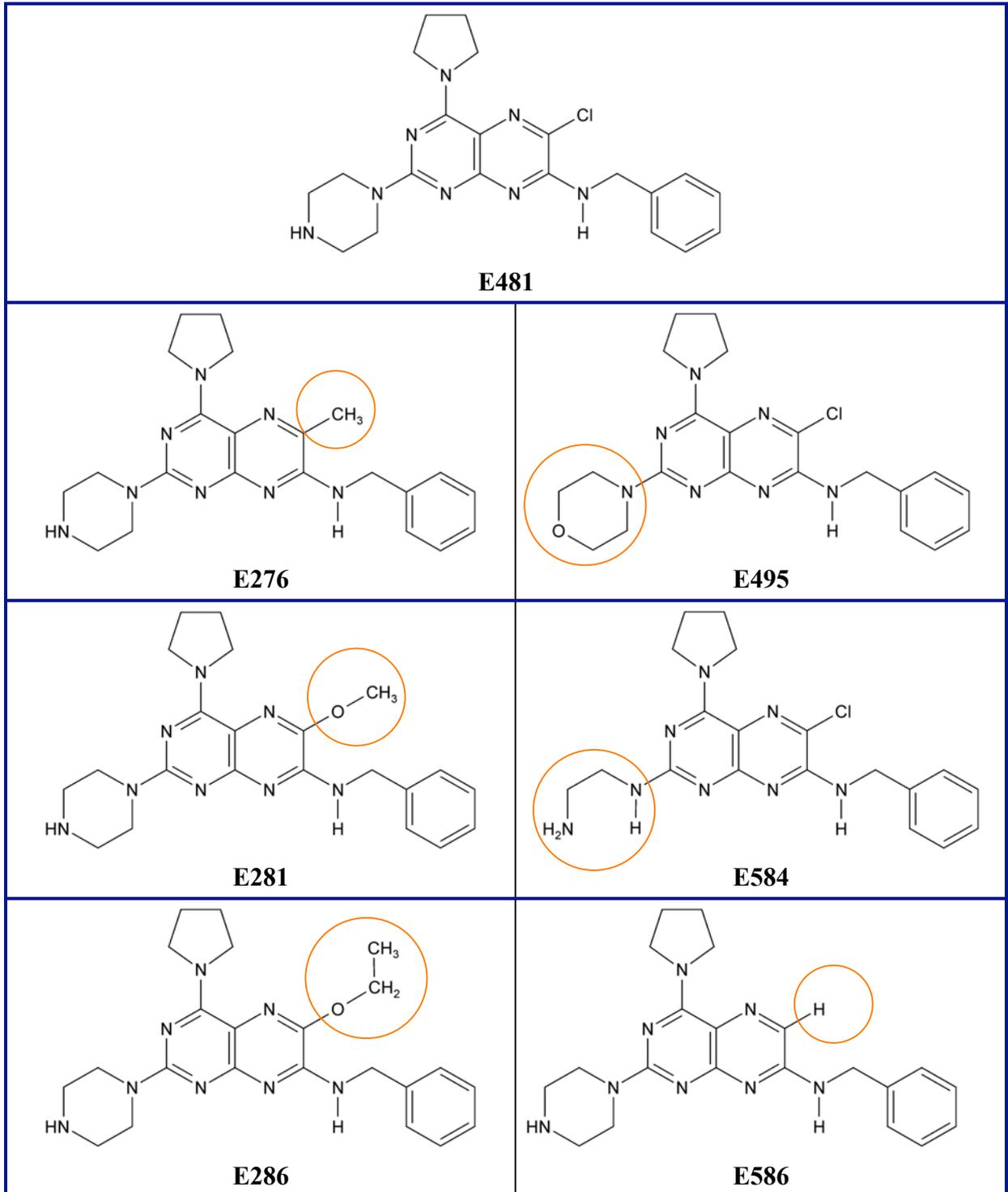
7.3 Verbrauchsmaterialien

Autoradiographie:	Kieselgel 60 mit Konzentrierungszone 2,5x20, 20x20 DC-Alu- folien (Merck)
Elektrophorese:	Hybond™-C, Nitrozellulose-Membran 0,45 µm (Amersham) 3MM-Papiere (Whatman)
PTK-Aufarbeitung:	Agarose-Wheat Germ Lectin (AmershamPharmacia Biotech) Filter Kit HR 10 (Pharmacia Biotech) Immuno-Platten-Microlon Platte F (Greiner)
Zellkultur:	Deckgläser (Roth) Neubauer-Zählkammer (Roth) Quadriperm (Fischer) Superfrost® Objektträger (Roth)

Alle hier nicht aufgeführten sterilen Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Sarstedt, Greiner, Nunc oder Falcon bezogen.

8 Anhang

8.1 Strukturformeln der untersuchten Pteridine



9 Literaturverzeichnis

- Alessi DR**, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* **13**, 1610-1619;
- Alessi DR**, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P (1996) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* **399**, 333-338;
- Aman MJ**, Lamkin TD, Okada H, Kurosaki T, Ravichandran KS (1998) The Inositol Phosphatase SHIP Inhibits Akt/PKB Activation in B Cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 33922-33928;
- Angers-Loustau A**, Côté J-F, Charest A, Dowbenko D, Spencer S, Lasky LA, Tremblay ML (1999) Protein Tyrosine Phosphatase-PEST Regulates Focal Adhesion Disassembly, Migration, and Cytokinesis in Fibroblasts. *J. Cell Biol.* **144**, 1019-1031;
- Antonsson B**, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou J-C (2000) BAX oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* **345**, 271-278;
- Aplin AE**, Howe A, Alahari SK, Juliano RL (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* **50**, 197-263;
- Aplin AE**, Howe AK, Juliano RL (1999) Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 737-744;
- Aplin AE**, Juliano RL (1999) Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *J. Cell Science* **112**, 695-706;
- Arcaro A**, Wymann MP (1993) Wortmannin is a potent Phosphatidylinositol 3-Kinase inhibitor: The role of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* **296**, 297-301;
- Armstrong JL**, Bonavaud SM, Toole BJ, Yiaman SJ (2001) Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 952-956;
- Auger KR**, Serunian LA, Soltoff SP, Libby O, Cantley LC (1989) *Cell* **57**, 167-175;
- Beavo JA** (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* **75**, 725-748;
- Beebe SJ** (1994) The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Seminars in Cancer Biology* **5**, 285-294;
- Bell RM**, Exton JH, Prescott SM (1996) Handbook of Lipid Research Vol. **8**, New York: Plenum Press;
- Bellacosa A**, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **254**, 274-277;
- Bellis SL**, Perrotta JA, Curtis MS, Turner CE (1997) Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. *Biochem. J.* **325**, 375-381;

- Bertram S**, Gassen HG (1991) *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Biggs WH 3rd**, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 7421-7426;
- Biscardi JS**, Belsches AP, Parsons SJ (1998) Characterization of Human Epidermal Growth Factor Receptor and c-Src Interactions in Human Breast Tumor Cells. *Mol. Carcinogenesis* **21**, 261-272;
- Bokemeyer D**, Sorokin A, Dunn MJ (1996) Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. *Kidney Internat.* **49**, 1187-1198;
- Blain SW**, Montalvo E, Massague J (1997) Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27^{Kip1} with cyclin A-Cdk2 and Cyclin D-Cdk4. *J. Biol. Chem.* **272**, 25863-25872;
- Bonni A**, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* **286**, 1358-1362;
- Borgne A**, Meijer L (1996) Sequential dephosphorylation of p34^{cdc2} on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J. Biol. Chem.* **271**, 27847-27854;
- Bradford MM** (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;
- Brain PW**, Curtis PJ, Hemming HG, Norris GLF (1957) *Trans. Br. Mycol. Soc.* **40**, 365-368;
- Brown MC**, Perrotta JA, Turner CE (1996) Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J. Cell Biol.* **135**, 1109-1123;
- Brugg B**, Matus A (1991) Phosphorylation Determines the Binding of Microtubule-associated Protein 2 (MAP2) to Microtubules in Living Cells. *J. Cell Biol.* **114**, 735-743;
- Brunet A**, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999a) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868;
- Brunet A**, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J (1999b) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.* **18**, 664-674;
- Bullock BP**, Habener JF (1998) Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry* **37**, 3795-3809;
- Busse D**, Coughty RS, Ramsey TT, Russell WE, Price JO, Flanagan WM, Shawver LK, Arteaga CL (2000) Reversible G₁ Arrest Induced by Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Requires Up-regulation of p27^{KIP1} Independent of MAPK Activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 6987-6995;

- Cardone** MH, Roy N, Stennicke HR, Salvaseen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321;
- Carpenter** CL, Cantley LC (1998) A flattened face for membranes. *Nature Struct. Biol.* **5**, 843-845;
- Carter** CA, Bellido T (1999) Decrease in Protein Tyrosine Phosphorylation is Associated With F-Actin Reorganization by Retinoic Acid in Human Endometrial Adenocarcinoma (RL95-2) Cells. *J. Cell. Phys.* **178**, 320-332;
- Cheng** M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of Cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* **18**, 1571-1583;
- Chu** ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW (1997) Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**, 10057-10062;
- Coffer** PJ, Jin J, Woodgett JR (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of Phosphatidylinositol 3-Kinase activation. *Biochem. J.* **335**, 1-13;
- Cohen** P, Frame S (2001) The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **2**, 769-776;
- Collado** M, Medemqa RH, García-Cao I, Dubuisson MLN, Barradas M, Glassford J, Rivas C, Burgering BMT, Serrano M, Lam EW-F (2000) Inhibition of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway Induces a Senescence-Like Arrest Mediated by p27^{Kip1}. *J. Biol. Chem.* **275**, 21960-21968;
- Colledge** M, Scott JD (1999) AKAPs: from structure to function. *Cell Biol.* **9**, 216-221;
- Connell-Crowley** L, Harper JW, Goodrich DW (1997) Cyclin D1/cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **8**, 287-301;
- Dajani** R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105**, 721-32;
- Dale** TC (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* **329**, 209-223;
- Dalton** S, Marais R, Wynne J, Treisman R (1993) Isolation and characterization of SRF accessory proteins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **340**, 325-332;
- D'Amico** M et al. (2000) The Integrin-linked Kinase Regulates the Cyclin D1 Gene through Glycogen Synthase Kinase 3b and cAMP-responsive Element-binding Protein-dependent Pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 32649-32657;
- Darzynkiewicz** Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27**, 1-20;
- Datta** SR, Brunet A, Greenerg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* **13**, 2905-2927;
- Datta** SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* **6**, 41-51;
-

- Davidson** NE, Gelmann EP, Lippman ME, Dickson RB (1987) Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines. *Mol. Endocrinol.* **1**, 216-223;
- Delcommenne** M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S (1998) Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/Akt by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**, 11211-11216;
- Deprez** J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J. Biol. Chem.* **272**, 17269-17275;
- Diehl** JA, Zindy F, Sherr CJ. (1997) Inhibition of Cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **11**, 957-972;
- Diehl** JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates Cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**, 3499-511;
- Du** K, Montminy M (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* **273**, 32377-32379;
- El-Deiry** WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825;
- El-Deiry** WS (2001) Akt takes centre stage in cell-cycle deregulation. *Nature Cell Biol.* **3**, E1-E3;
- Fang** X, Yu SX, Bast RC, Jr., Woodgett JR, Bills GB (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 11960-11965;
- Feliciello** A, Gottesman ME, Avvedimento EV (2001) The Biological Functions of A-Kinase Anchor Proteins. *J. Mol. Biol.* **308**, 99-114;
- Filippa** N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B, Van Obberghen E (1999) Mechanism of Protein Kinase B Activation by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4989-5000;
- Fleming** IN, Gray A, Downes CP (2000) Regulation of the Rac1-specific exchange factor Tiam1 involves both phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent components. *Biochem. J.* **351**, 173-182;
- Foulkes** NS, Sassone-Corsi P (1996) Transcription factors coupled to the cAMP-Signaling pathway. *Biochem. Biophys. Acta* **1288**, F101 – F121;
- Frame** S, Cohen P, Biondi RM (2001) A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol. Cell* **7**, 1321-1327;
- Friedrich** P, Aszodi A (1991) MAP2: a sensitive cross-linker and adjustable spacer in dendritic architecture. *FEBS* **295**, 5-9;
- Frisch** SM (2000) cAMP takes control. *Nature Cell Biol.* **2**, E167-E168;
- Frisch** S, Ruoslahti E (1997) Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 701-706;

- Fujishige K**, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, Omori K (1999) Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *J. Biol. Chem.* **274**, 18438-18445;
- Gawler DJ** (1998) Points of convergence between Ca²⁺ and Ras signalling pathways. *Biochim. Biophys.* **1448**, 171-182;
- Gastpar R** (1997) Dissertation, Immunchemische Protein-Tyrosin-Kinase-Assays für die wirkmechanistischen Untersuchungen neuer 2-Phenylindol- und 2-Phenylbenzo[b]thiophenderivate. Universität Regensburg.
- Giannis A** (2000) b-Catenin, Cycline und mehr: neue Erkenntnisse zur Pathogenese, Behandlung und Prävention von Dickdarmkrebs. *Angew. Chem.* **112**, 2349-2351;
- Giard DJ**, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dorsik H, Parks WP (1973) *J. Nat. Cancer Inst.* **51**, 1417-1423;
- Gil-Gómez G**, Berns A, Brady HJM (1998) A link between cell cycle and cell death: BAX and BCL-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.* **17**, 7209-7218;
- Gille H**, Downward J (1999) Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **274**, 22033-40;
- Gillham H**, Golding MCHM, Pepperkok R, Gullick WJ (1999) Intracellular Movement of Green Fluorescent Protein-tagged Phosphatidylinositol 3-Kinase in Response to Growth Factor Receptor Signaling. *J. Cell Biol.* **146**, 869-880;
- Graff JR**, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, Paul JD, Hbairu A, Goode RG, Sandusky GE, Vessella RL, Neubauer BL (2000) Increased AKT Activity Contributes to Prostate Cancer Progression by Dramatically Accelerating Prostate Tumor Growth and Diminishing p27^{Kip1} Expression. *J. Biol. Chem.* **275**, 24500-24505;
- Gunther R**, Kishore PN, Abbas HK, Mirocha CJ (1989) *Immunotoxicology* **11**, 559-570;
- Hajduch E**, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS (1998) Constitutive activation of protein kinase Ba by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis and inactivation of glycogen synthase kinase-3 in L6 muscle cells. *Diabetes* **47**, 1006-1013;
- Haldar S.**, Chintapalli J., Croce C. M. (1996) Taxol Induces BCL-2 Phosphorylation and Death of Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **56**, 1253-1255;
- Han J-D**, Rubin CS (1996) Regulation of Cytoskeleton Organization and Paxillin Dephosphorylation by cAMP. *J. Biol. Chem.* **271**, 29211-29215;
- Hanks SK**, Calalb MB Harper MC, Patel, SK (1992) *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**, 8487-8491;
- Harada H**, Becknell, B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ (1999) Phosphorylation and Inactivation of BAD by Mitochondria-Anchored protein kinase A. *Mol. Cell* **3**, 413-422;
- Harbour JW**, Dean DC (2000a) Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2**, E65-67;
- Harbour JW**, Dean DC (2000b) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**, 2393-2409;

- Harbour JW**, Luo RX, Dei Sante A, Postigo AA, Dean DC (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G₁. *Cell* **98**, 859-869;
- Harpur AG**, Layton MJ, Das P, Bottomley MJ, Panayotou G, Driscoll PC, Waterfield MD (1999) Intermolecular Interactions of the p85 α Regulatory Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 12323-12332;
- Henglein B**, Chenivresse X, Wang J, Eick D, Brechot C (1994) Structure and cell cycle-regulated transcription of the human cyclin A gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91**, 5490-
- Hickie RA**, Walker CM, Croll GA (1974) Decreased basal cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in morris hepatoma5123 t.c. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **59**, 167-173;
- Houslay MD**, Sullivan M, Bolger GB (1998) The Multienzyme PDE4 Cyclic Adenosine Monophosphate-Specific Phosphodiesterase Family: Intracellular Targeting, Regulation, and Selective Inhibition by Compounds Exerting Anti-inflammatory and Anti-depressant Actions. *Advances in Pharmacology* **44**, 225-342;
- Howe AK**, Juliano RL (2000) Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat. Cell Biol.* **2**, 593-600;
- Jakobs S** (2002) Dissertation, Beeinflussung cAMP-spezifischer Signalwege und Transkriptionsfaktoren in Tumorzellen. Universität Kaiserslautern, Fachbereich Biologie
- Janknecht, R.** and Hunter, T. (1997) Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor SAP-1a. *EMBO J.* **16**, 1620-1627;
- Jiménez C**, Portela RA, Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Collard J, Serrano A, Martínez-A C, Avila J, Carrera AC (2000) Role of the PI3K Regulatory Subunit in the Control of Actin Organization and Cell Migration. *J. Cell Biol.* **151**, 249-261;
- Johnson DG**, Walker CL (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 295-312;
- Kauffmann-Zeh A**, Rodriguez-Viciano P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* **385**, 544-548;
- Kemény M** (1998) Diplomarbeit; Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie;
- Kennedy SG**, Kandel ES Cross TK, Hay N (1999) Akt/Protein Kinase B Inhibits Cell Death by Preventing the Release of Cytochrome c from Mitochondria. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5800-5810;
- Khwaja A** (1999) Akt is more than just a BAD kinase. *Nature* **401**, 33-34;
- Knudsen EK**, Weber E, Arden KC, Cavenee WK, Feramisco JR, Knudsen ES (1999) The Retinoblastoma tumor suppressor inhibits cellular proliferation through two distinct mechanisms: inhibition of cell cycle progression and induction of cell death. *Oncogene* **18**, 5239-5245;
- Kohn AD**, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996) Expression of a constitutively active Akt ser/thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* **271**, 31372-31378;
- Koolman J**, Röhm K-H (1998) Taschenatlas der Biochemie; Thieme Verlag;

- Kops** GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**, 630-634;
- Krauss** G (2001) Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, Second Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Krugmann** S, Welch H (1998) PI 3-kinases. *Curr. Biol.* **8**, 828;
- Kunz** C-E (2000) Dissertation, Untersuchungen zur PDE-Ausstattung unterschiedlicher Zelllinien und Xenograft-Tumoren sowie zum Wirkmechanismus substituierter Pteridine. Universität Kaiserslautern;
- LaBaer** J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* **11**, 847-62;
- Lanotte** M, Riviere JB, Hermouet S, Houge G, Vintermyr OK, Gjertsen BT, Doskeland SO (1991) Programmed cell death (apoptosis) is induced rapidly and with positive cooperativity by activation of cyclic adenosine monophosphate-kinase I in a myeloid leukemia cell line. *J. Cell Physiol.* **146**, 73-80;
- Lenferink** AEG, Busse D, Flanagan WM, Yakes FM, Arteaga CL (2001) ErbB2/neu Kinase Modulates Cellular p27 Kip1 and Cyclin D1 through Multiple Signaling Pathways. *Cancer Res.* **61**, 6583-6591;
- Li** F, Zhang Y, Wu C (1999) Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J. Cell Science* **12**, 4589-4599;
- Li** R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994) Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* **371**, 534-537;
- Lindl** T, Bauer J (1994) Zell- und Gewebekultur Stuttgart: Gustav Fischer Verlag;
- Liu** X, Marengere LE, Koch CA, Pawson T (1993) The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'kinase. *Mol. Cell Biol.* **13**, 5225-5232;
- Liu** CW, Wang RH, Dohadwala M, Schonthal AH, Villa-Moruzzi E, Berndt N (1999) Inhibitory phosphorylation of PP1 α catalytic subunit during the G₁/S transition. *J. Biol. Chem.* **274**, 29470-29475;
- Lizcano** JM, Morrice N, Cohen P (2000) Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser 155. *Biochem. J.* **349**, 547-557;
- Lloyd** AC (1998) Ras versus cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr. Opin. Genet Dev.* **8**, 43-48;
- Lopez-Girona** A, Furnari B, Mondesert O, Russell P (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**, 172-175;
- Lundberg** AS, Weinberg RA (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-Cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 753-761;
- Malumbres** M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer* **1**, 222-231;
-

- Mansour** SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **265**, 966-970;
- Marko** D (1994) Dissertation, Zur Bedeutung cAMP-spezifischer Phosphodiesterasen für Tumorwachstum und Therapie. Universität Kaiserslautern;
- Marko** D, Romanakis K, Zankl H, Fürstenberger G, Steinbauer B, Eisenbrand G (1998) Induction of apoptosis by an inhibitor of cAMP-specific PDE in malignant murine carcinoma cells overexpressing PDE activity in comparison to their nonmalignant counterparts. *Cell. Biochem. Biophys.* **28**,75-101;
- Marko** D, Pahlke G, Merz KH, Eisenbrand G (2000) Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterases: potential targets for anticancer therapy. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 944-948;
- Marko** D, Merz KH, Kunz C, Müller A, Tarasova N, Eisenbrand G (2002) Intracellular localization of 7-benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridine in membrane structures impeding the inhibition of cytosolic cyclic AMP-specific phosphodiesterase. *Biochemical Pharmacology* **63**, 669-676.
- Mason** CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R (1999) Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* **18**, 2137-2418;
- Mayo** MW, Madrid LV, Westerheide SD, Jones DR, Yuan XJ, Baldwin AS Jr, Whang YE (2002) PTEN blocks TNF-induced NF-kappa B-dependent transcription by inhibiting the transactivation potential of the p65 subunit. *J Biol Chem.* [epub ahead of print]
- McKinsey** TA, Chu ZL, Ballard DW (1997) Phosphorylation of the PEST domain of IkkappaBbeta regulates the function of NF-kappaB/IkkappaBbeta complexes. *J. Biol. Chem.* **272**, 22377-22380;
- Medema** RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404** 782-787;
- Meiers** S (1996) Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie;
- Meiers** S (2000) Dissertation, Wirkmechanistische Untersuchungen zur Beeinflussung von zellulären Signalübertragungswegen durch antineoplastische Substanzen. Universität Kaiserslautern;
- Meiers** S, Kemény M, Weyand U, Gastpar R, von Angerer E, Marko D (2001) The Anthocyanidins Cyanidin and Delphinidin Are Potent Inhibitors of the Epidermal Growth-Factor Receptor. *J. Agric. Food. Chem.* **49**, 958-962;
- 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. *J. Med. Chem.* **41**, 4733-4743;
- Montminy** M (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 807-822;
- Müller** A (2000) Dissertation, Struktur-Aktivitätsuntersuchungen an Hemmstoffen der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase PDE4 mit 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridin (E481) als Leitsubstanz. Universität Kaiserslautern;

-
- Muise-Helmericks** RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsiichlis PN, Rosen N (1998) Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 29864-29872;
- Muslin** AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-897;
- Nakae** J., Park BC, Accili D (1999) Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 36 through a wortmannin-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 15982-15985;
- Nakae** J, Barr V, Accili D (2000) Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR. *EMBO J.* **19**, 989-96;
- Nakanishi** S., Kakita S., Takahashi I., Kawahara K., Tsukuda E., Sano T., Yamada K., Yoshida M., Kase H., Matsuda Y., Hashimoto Y., Nonomura Y. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2157-2163;
- Nevins** JR (1992) E2F: A Link Between the Rb Tumor Suppressor Protein and Viral Oncoproteins. *Science* **258**, 424-429;
- Nigg** EA (1996) Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 312-317;
- Nikolakaki** E, Coffey PJ, Hemelsoet R, Woodgett JR, Defize LH (1993) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Jun family members in vitro and negatively regulates their transactivating potential in intact cells. *Oncogene* **8**, 833-840;
- Nikolopoulos** SN, Turner CE (2000) Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J. Cell. Biol.* **151**, 1435-1448;
- Nikolopoulos** SN, Turner CE (2001) Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J. Biol. Chem.* **276**, 23499-23505;
- Oreña** SJ, Rotchia AJ, Farofalo RS (2000) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 15765-15772;
- Ouwens** DM, Mikkers HMM, Van der Zon GCM, Stein-Gerlach M, Ullrich A, Maassen JA (1996) Insulin-induced tyrosine dephosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase requires active phosphotyrosine phosphatase 1D. *Biochem. J.* **318**, 609-614;
- Ozes** ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB (1999) NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82-85;
- Pap** M, Cooper GM (1998) Role of glycogen synthase kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 19929-19932;
- Partik** G, Hochegger K, Schorkhuber M, Marian B (1999) Inhibition of epidermal-growth-factor-receptor-dependent signalling by tyrphostins A25 and AG1478 blocks growth and induces apoptosis in colorectal tumor cells in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **125**, 379-388;
- Peyrollier** K, Hajdich E, Gray A, Litherland G, Prescott AR, Leslie NR, Hundal HS (2000) A role for the actin cytoskeleton in the hormonal and growth-factor-mediated activation of protein kinase B. *Biochem. J.* **352**, 617-622;
- Pines** J (1999) Cell cycle. Checkpoint on the nuclear frontier. *Nature* **397**, 104-105.
-

- Price MA**, Cruzalegui FH, Treisman R. (1996) The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate ternary complex factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J.* **15**, 6552-6563;
- Price JT**, Tiganis T, Agarwal A, Djakiew D, Thompson EW (1999) Epidermal Growth Factor Promotes MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration through a Phosphatidylinositol 3-Kinase and Phospholipase C-dependent Mechanism. *Cancer Res.* **59**, 5475-5478;
- Reed JC** (1998) BCL-2 family proteins; *Oncogene* **17**, 3225-3236;
- Reynisdóttir I**, Massagué J (1997) The subcellular locations of p15^{INK4b} and p27^{KIP1} coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* **11**, 492-503;
- Rodriguez-Viciano P**, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature (London)* **370**, 527-532;
- Rodriguez-Viciano P**, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J.* **15**, 2442-2451;
- Romanshkova JA**, Makarov SS (1999) NF- κ B is a target of Akt in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* **401**, 86-89;
- Rubio I.**, Rodriguez-Viciano, Downward J., Wetzder R. (1997) *Biochem. J.* **326**, 891-895;
- Sable CL**, Filippa N, Hemmings B, Van Obberghen E (1997) cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. *FEBS Lett.* **409**, 253-257;
- Sadowski I**, Ptashne M (1989) A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 7539;
- Saito Y**, Vandenheede JR, Cohen P (1994) The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem. J.* **303**, 27-31;
- Sambrook J**, Fritsch EF, Manniatis T (1989) Molecular cloning – A Laboratory manual. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez C**, Pérez M, Avila J (2000) GSK3 β -mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2 C (MAP2C) prevents microtubule bundling. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 252-260;
- Sander EE**, van Delft S, ten Klooster JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, Collard JG (1998) Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Cell Biol.* **143**, 1385-1398;
- Schürmann A**, Mooney AF, Sanders LC, Sells MA, Wang HG, Reed JC, Bokoch GM (2000) p21-Activated Kinase 1 Phosphorylates the Death Agonist BAD and protects Cells from Apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **20**, 453-461;
- Scott JD** (1991) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol. Ther.* **50**, 123-45.
- Scheid MP**, Woodgett JR (2001) PKB/Akt: Functional Insights from Genetic Models. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **2**, 760-768;
- Sears R**, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* **14**, 2501-2514;

- Serunian** LA, Auger KR, Roberts TM, Cantley LC (1990) *J. Virol.* **64**, 4718-4725;
- Sette** C, Conti M (1996) Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 16526-16534;
- Sharif** TR, Sharif M (1999) A high throughput system for the evaluation of protein kinase C inhibitors based on ELK1 transcriptional activation in human astrocytoma cells. *Int. J. Oncol.* **14**, 327-335;
- Shaw** M, Cohen P (1999) Role of protein kinase B and the MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* **461**, 120-124;
- Shen** T-L, Guan J-L (2001) Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts. *FEBS Lett.* **499**, 176-181;
- Shepherd** PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* **333**, 471-490;
- Sherr** CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G₁ cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163;
- Sherr** CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-Phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512;
- Sheta** ES, Harding MA, Conaway MR, Theodorescu D (2000) Focal Adhesion Kinase, Rap1, and Transcriptional Induction of Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1065-1073;
- Shim** J, Park H-S, Kim MJ, Park J, Park E, Cho S-G, Eom S-J, Lee H-W, Joe CO, Choi E-J (2000) RB Protein Down-regulates the Stress-activated Signals through Inhibiting c-Jun N-Terminal Kinase/Stress-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 14107-14111;
- Siegmund** B, Welsch J, Loher F, Meinhardt G, Emmerich B, Endres S, Eigler A (2001) Phosphodiesterase type 4 inhibitors suppresses expression of anti-apoptotic members of the BCL-2 family in B-CLL cells and induces caspase-dependent apoptosis. *Leukemia* **15**, 1564-1571;
- Sielecki** TM, Boylan JF, Benfield PA, Trainor GL (2000) Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J. Med. Chem.* **43**, 1-18;
- Soltoff** SP, Carraway KL 3rd, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC (1994) ErbB3 is involved in activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* **14**, 3550-3558;
- Soltoff** SP, Cantley LC (1996) p120^{cb1} Is a cytosolic Adapter Protein That Associates with Phosphoinositide 3-Kinase in Response to Epidermal Growth Factor in PC12 and Other Cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 563-567;
- Soule** H (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1409-1413;
- Stambolic** V, Woodgett JR (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3b in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem. J.* **303**, 701-704;
- Stratagene Online**, http://www.stratagene.com/vectors/signal_trans/pathdetect_trans.htm
-

- Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ (1998)** Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell Biol.* **18**, 5457-5464;
- Sutherland EW (1962)** *J. Biol. Chem.* **237**, 1244-1251;
- Symons M (1995)** The Rac and Rho pathways as a source of drug targets for Ras-mediated malignancies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 668-674;
- Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW (2000)** Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci.* **5**, D121-137;
- Tan Y, Ruan H, Demeter MR, Comb MJ (1999)** p90(RSK) blocks BAD-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 34859-34867;
- Tan Y, Demeter MR, Ruan H, Comb MJ (2000)** BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/BCL-X_L interaction and cell survival. *J. Biol. Chem.* **275**, 25865-25869;
- Tanti J-F, Grillo S, Gremeaux T, Coffier PJ, van Oberghen E, le Marchand-Brustel Y (1997)** Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* **138**, 2005-2010;
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990)** cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 971-1005;
- Traynor-Kaplan AE, Thompson BL, Harris AL, Taylor P, Omann GM, Sklar LA (1989)** *J. Biol. Chem.* **264**, 15668-15673;
- Tsuji I, Tanaka T, Kudo T, Nishikawa T, Shinozaki K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M (2000)** Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C delta: implications for regulation of tau phosphorylation. *FEBS Lett.* **469**, 111-117;
- Turner CE, Brown MC, Perrotta JA, Riedy MC, Nikolopoulos SN, McDonald AR, Bagrodia S, Thomas S, Leventhal PS (1999)** Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J. Cell Biol.* **145**, 851-863;
- Turner CE (2000)** Paxillin and focal adhesion signalling (review). *Nature Cell Biol.* **2**, E231-E236;
- Ui M, Okada T, Hazeki K, Hazeki O (1995)** Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *TIBS* **20**, 303-307;
- Vanhaesebroeck B, Leevers S. J, Panayotou G, Waterfield MD (1997)** Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *TIBS* **22**, 267-272;
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000)** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* **346**, 561-576;
- Vintermyr OK, Gjertsen BT, Lanotte M, Doskeland SO (1993)** Microinjected catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase induces apoptosis in myeloid leukemia (IPC-81) cells. *Exp. Cell Res.* **206**, 157-61;
- Vlach J, Hennecke S, Amati B (1997)** Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *EMBO J.* **16**, 5334-5344;
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994)** A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241-5248;

- Wagener C** (1999) Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren, 2. veränderte Auflage, Thieme Verlag.
- Wagner B** (1998) Dissertation, Universität Kaiserslautern, Fachbereich Lebensmittelchemie;
- Wagner B**, Jakobs S, Habermeyer M, Hippe F, Cho-Chung YS, Eisenbrand G, Marko D (2002) 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridine, a potent inhibitor of cAMP-specific phosphodiesterase, enhancing nuclear protein binding to the CRE consensus sequence in human tumour cells. *Biochemical Pharmacology* **63**, 659-668.
- Walker EH**, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL (2000) Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin Ly294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Molecular Cell* **6**, 909-919;
- Walker KS**, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR (1998) Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in vitro: Comparison with protein kinase B alpha. *Biochem. J.* **331**, 229-308;
- Walters RJ**, Hawkins P, Cooke FT, Eguinoa A, Stephens LR (1996) Insulin and ATP stimulate actin polymerization in U937 cells by a wortmannin-sensitive mechanism. *FEBS Lett.* **392**, 66-70;
- Wang H-G**, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC (1999) Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339-343;
- Wang Q**, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myocytes. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4008-4018;
- Watanabe G**, Howe A, Lee RJ, Albanese C, Shu IW, Karnezis AN, Zon L, Kyriakis J, Rundell K, Pestell RG (1996) Induction of Cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 12861-12866;
- Webster N**, Jin JR., Green S, Hollis M, Chambon P (1988) The yeast UAS_G is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL5 *trans*-activator. *Cell* **52**, 169-178;
- Weinberg RA** (1999) Wie Krebs entsteht. Spektrum der Wissenschaft Spezial: Krebsmedizin. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, 7-17;
- Welsh CF**, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK (2001) Timing of Cyclin D1 expression within G₁ phase is controlled by Rho. *Nature Cell Biol.* **3**, 950-957;
- Wennström S**, Downward J (1999) Role of Phosphoinositide 3-Kinase in Activation of Ras and Mitogen-Activated Protein Kinase by Epidermal Growth Factor. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4279-4288;
- Whitmarsh, AJ**, Yang S-H, Su MS-S, Sharrocks AD, Davis RJ (1997) Role of p38 and JNK MAP kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2360-2371;
- Wiesinger D**, Gubler HU, Haefliger W, Hauser D (1974) *Experientia* **30**, 135-136;
- Won KA**, Reed SI (1996) Activation of Cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of Cyclin E. *EMBO J.* **15**, 4182-4193;

- Wu X**, Senechal K, Neshat MS, Whang YE, Sawyers CL (1998) The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. **95**, 15587-15591;
- Wymann MP**, Bulgarelli-Leva G, Zwelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G (1996) Wortmannin Inactivates Phosphoinositide 3-Kinase by Covalent Modification of Lys-802, a Residue Involved in the Phosphate Transfer Reaction. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1722-1733;
- Yaffe MB**, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997) The structural basis for 14-3-3: Phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-971;
- Yang J**, Kornbluth S (1999) All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol.* **9**, 207-210;
- Yang**, S-H, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Sharrocks AD (1998a) The ELK-1 ETS-domain transcription factor contains a MAP kinase targeting motif. *Mol. Cell Biol.* **18**, 710-720;
- Yang**, S-H, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Sharrocks AD (1998b) Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor ELK-1. *EMBO J.* **17**, 1740-1749;
- Yano H**, Nakanashi S, Kimura K, Hani N, Saitoh Y, Fumkui Y, Nonomura Y, Matsuda Y (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25846-25856;
- Yano S**, Tokumitsu H, Soderling TR (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase B pathway. *Nature* **396**, 584-587;
- Yarden Y**, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB Signalling Network. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **2**, 127-137;
- You Z**, Ouyang H, Lopatin D, Polver PJ, Wang CY (2001) Nuclear factor-kappa B-inducible death effector domain-containing protein suppresses tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting caspase-8 activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 26398-26404.
- Zha J**, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X_L. *Cell* **87**, 619-628;
- Zhang H**, Xiong Y, Beach D (1993) Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol. Biol. Cell.* **4**, 897-906;
- Zhao Z-S**, Manser E, Chen X-Q, Chong C, Leung T, Lim L (1998) A Conserved Negative Regulatory Region in PAK: Inhibition of PAK Kinases Reveals Their Morphological Roles Downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol. Cell Biol.* **18**, 2153-2163;
- Zhivotovsky B**, Samali A, Gahm A, Orrenius S (1999) Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **6**, 644-651;
- Zhou BP**, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee M-H, Hung M-C (2001) Cytoplasmic localization of p21^{Cip1/WAF1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biol.* **3**, 245-252;
- Zimmermann S**, Moelling K (1999) Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science* **286**, 1741-1744;
- Zou H**, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549-11556;

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Kemény M, Meiers S, Marko D and Eisenbrand G (2000) The influence of substituted pteridines on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). International Symposium Oncology of the GDCH: New Aspects, 18-20 Oktober 2000 in Schliersee

Kemény M, Meiers S, Marko D and Eisenbrand G (2000) Impairment of cytoskeleton integrity and phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by substituted pteridines. 11th NCI EORTC AACR Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, 7-10 November 2000 in Amsterdam

Kemény M, Meiers S, Marko D and Eisenbrand G (2001) The influence of substituted pteridines on elements of the mitogen-activated protein kinase cascade. 11th AEK Congress of the German Cancer Society, 4-6 April 2001 in Heidelberg

Dank

Mein Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitskreise Eisenbrand, Schrenk und Trommer, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei:

- Frau Dr. Doris Marko für das lockere Miteinander, die Betreuung sowie die kritische Durchsicht meines Manuskriptes
 - den Korrekturlesern: Edda Bernardy, Michael Habermeyer, Dr. Sandra Jakobs, Dr. Heike Kemény, Karl-Heinz Schneider, Sandra Vatter und Zeck
 - Frau Dr. Sandra Jakobs, die mit ihrer fachlichen Kompetenz und ihrer Hilfsbereitschaft wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat
 - Meiner Laborkollegin Frau Sandra Vatter, die mir schon seit einem Jahr von meinem Doktorhut vorschwärmt und bei der ich weiß, dass er wirklich schön werden wird
 - Herrn Michael Habermeyer für seine stete Unterstützung bei Rechnerproblemen und für ein neues Hobby. Insofern möchte ich mich auch bei Herrn Holger Müller bedanken, der mir eine unvergessliche Promotionsfeier versprochen hat!
 - Meinen Kollegen für die gute Atmosphäre am Arbeitsplatz: Edda Bernardy, Michael Habermeyer, Sandra Jakobs, Sabine Meditz, Susanne Meiers, Ellen Niederberger, Gudrun Pahlke, Simone Schätzle und Sandra Vatter
 - „Meinen“ Diplomanden Frau Ulrike Weyand und Herrn Michael Habermeyer für die engagierte Arbeit im Labor
 - Frau Ingrid Hemm, Frau Ingrid Romani und Frau Heike Syring für mehr als nur die Bewältigung diverser Verwaltungsarbeiten
 - Herrn Aribert Vetter und Herrn Wolfgang Petri für ihre Hilfe bei technischen Problemen sowie bei Herrn Rainer Scheuermann für die schönen Grillfeiern und seine experimentellen Darbietungen
 - Dem DFKI-Team für die vielfältige Unterstützung während meiner Diplom- und Doktorarbeit sowie Herrn Alexander Gäng von der Firma Theile Computer-Systeme GmbH in Speyer für die Möglichkeit, das Apple Beratungszentrum während der Phase des Zusammenschreibens zu nutzen
-

-
- Frau Vera Fritzingler und Frau Kathrin Kießner-Wieser für ihre Einführung in die Geheimnisse des Durchflußzytometers und ihre stete Hilfsbereitschaft bei allen nur möglichen Meßproblemen
 - Herrn Dr. Heinz Schmeiser und Volker Arlt vom DKFZ in Heidelberg für die gute Zusammenarbeit während meiner Messungen am Instant-Counter
 - Frau Ulrike Herbrand und Herrn Dr. Mohammad Reza Ahmadian vom Max Planck Institut in Düsseldorf für die wissenschaftliche Kooperation und die Gastfreundschaft
 - Meiner langjährigen Freundin Edda Bernardy sowie meiner WG-Mitbewohnerin Ute Kaul für die aufbauenden Worte in den letzten Monaten der Promotionszeit
 - Meiner GSXR600 und meiner Moto Morini

Mehr als allen anderen möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder Gunther sowie seiner Frau Heike für die Unterstützung und die Zuneigung danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Monika Kemény
Wohnort: St. Franziskusstr. 7
67655 Kaiserslautern
Geburtsdatum: 04.11.1969
Geburtsort: Speyer am Rhein / Pfalz
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1976 - 1989 Grundschule und Gymnasium mit Abschluss Abitur
11/1989 – 12/1998 Studium Diplom-Chemie an der Universität Kaiserslautern

Vordiplom am 06.07.1993
Diplom am 18.12.1998

Thema der Diplomarbeit: „Einfluß von 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidino-pteridin auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität in der Vulvakarzinomzelllinie A431“

01/1999 – 04/2002 Promotion im Fachbereich Lebensmittelchemie und
Umwelttoxikologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard
Eisenbrand

Berufliche Tätigkeiten:

1995 Firmengründung Datatech Monika Kemény
01/1996 – 12/1997 Aufbau und Pflege des Gefahrstoffkatasters der Firma Adam Opel AG
Kaiserslautern

Zusätzliche Qualifikationen in der Zeit von 1999 - 2001:

Diverse Fortbildungskurse bei der DGPT:

Chemische Kanzerogenese und Mutagenese
Fremdstoffmetabolismus
Grundlagen der Organtoxikologie und –pathologie Teil I und II
Regulatorische Toxikologie
Reproduktionstoxikologie
Versuchstierkunde I und Biostatistik

Strahlenschutz – Grundkurs an der Technischen Akademie Südwest e.V.
