

Abb. 1: Ein Tumor funktioniert das Blutgefäßsystem für seine Zwecke um.

Robotersystem sucht Stickstoffmonoxid-Antagonisten: Sag NO zum Überleben!

S. Reiter
I. Radtke
W. Schuhmann
R. Heumann

Tumore funktionieren Blutgefäße für die eigene Energieversorgung um, indem sie selbst den Wachstumsfaktor der Gefäße bilden. Dafür gibt das kleine vielseitige Stickstoffmonoxid-Molekül (NO) ein Überlebens-Signal. Könnten die Forscher seine Wirkung unterdrücken, dann würde das Gefäßwachstum hin zum Tumor blockiert werden und er müsste "verhungern". Mit einem speziell entwickelten Robotik-System prüfen sie nun den Einfluss unterschiedlichster Wirkstoffe auf die NO-Ausschüttung von Blutgefäßzellen.

Das kleine gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) ist ein interessantes und vielseitiges Molekül. Schon 1772 von Joseph Priestley entdeckt, wurde seine biologische Relevanz erst in den letzten 20

Jahren mehr und mehr erkannt. Das Gasmolekül faszinierte durch seine besonderen Eigenschaften so sehr, dass es die renommierte Zeitschrift Science 1992 zum Molekül des Jahres kürte. Stickstoffmonoxid ist als Signalüber-

träger in ganz verschiedenen Prozessen aktiv: Es leitet Signale von Nervenzelle zu Nervenzelle weiter, zirkuliert in der Blutbahn und wirkt hier blutdrucksenkend und ist wichtig für die Immunabwehr (Abb. 2). Dass die

Natur ein gasförmiges und so winziges Molekül als Signalüberträger verwendet, war für die Wissenschaft ein völlig neues Konzept. Für ihre Entdeckungen zum Stickstoffmonoxid erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Physiologie/Medizin.

Die zellulären Reaktionen dieses Radikals sind sehr komplex. Es kann extrem schnell durch Zellmembranen diffundieren bei einer "Lebensdauer" von weniger als 20 Sekunden. Im Blutgefäßsystem spielt Stickstoffmonoxid eine zentrale Rolle: Wenn es freigesetzt wird, dann stellt das einen Risikofaktor für Erkrankungen der Herzkranzgefäße (koronare Herzkrankung) und für Gefäßverkalkungen (Arteriosklerose) dar. Ausreichende NO-Ausschüttung bildet einen "anti-arteriosklerotischen Schutz", indem es das Wachstum wuchernder Zellen hemmt und verhindert, dass sich Blutplättchen und Blutkörper-

chen an der Gefäßwand anheften. Hinzu kommt seine gefäßerweiternde Wirkung, auf der die Anwendung von "Nitrospray" bei akutem Herzanfall (Angina pectoris) beruht. Neuerdings hat man einen Helfershelfer für diesen positiven Einfluss ausgemacht: Das Potenzmittel Viagra unterstützt die gefäßerweiternde Wirkung von NO, indem es verhindert, dass ein die NO-Freisetzung regelndes Enzym abgeschaltet wird. Auch einige "Hausmittel" wie der regelmäßige Genuss von Rotwein scheinen einen Einfluss auf die NO-Produktion von Zellen zu haben.

Die Dosis macht das Gift

In der Gefäßwand wird NO im Endothel gebildet, einer einzelligen Schicht, die das gesamte Gefäßsystem auskleidet und nach innen abschließt. NO entsteht in den Zellen durch enzymatische Reaktion (Biokatalyse) aus der

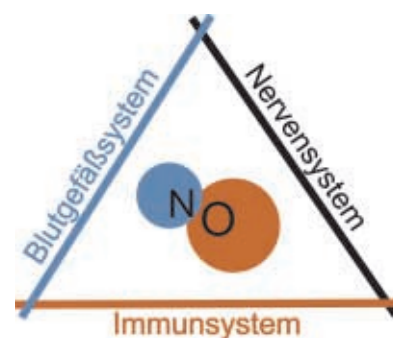


Abb. 2: Stickstoffmonoxid als Signalüberträger ganz verschiedener Prozesse

Aminosäure Arginin. Die Menge und die Zeitdauer der NO-Herstellung und -Ausschüttung werden fein reguliert – offenbar gilt auch hier der Paracelsus'sche Grundsatz: Erst die Dosis macht das Gift. Denn wenn die Feinabstimmung des Systems versagt und zuviel oder zuwenig NO hergestellt wird, kann das schwerwiegende Folgen für

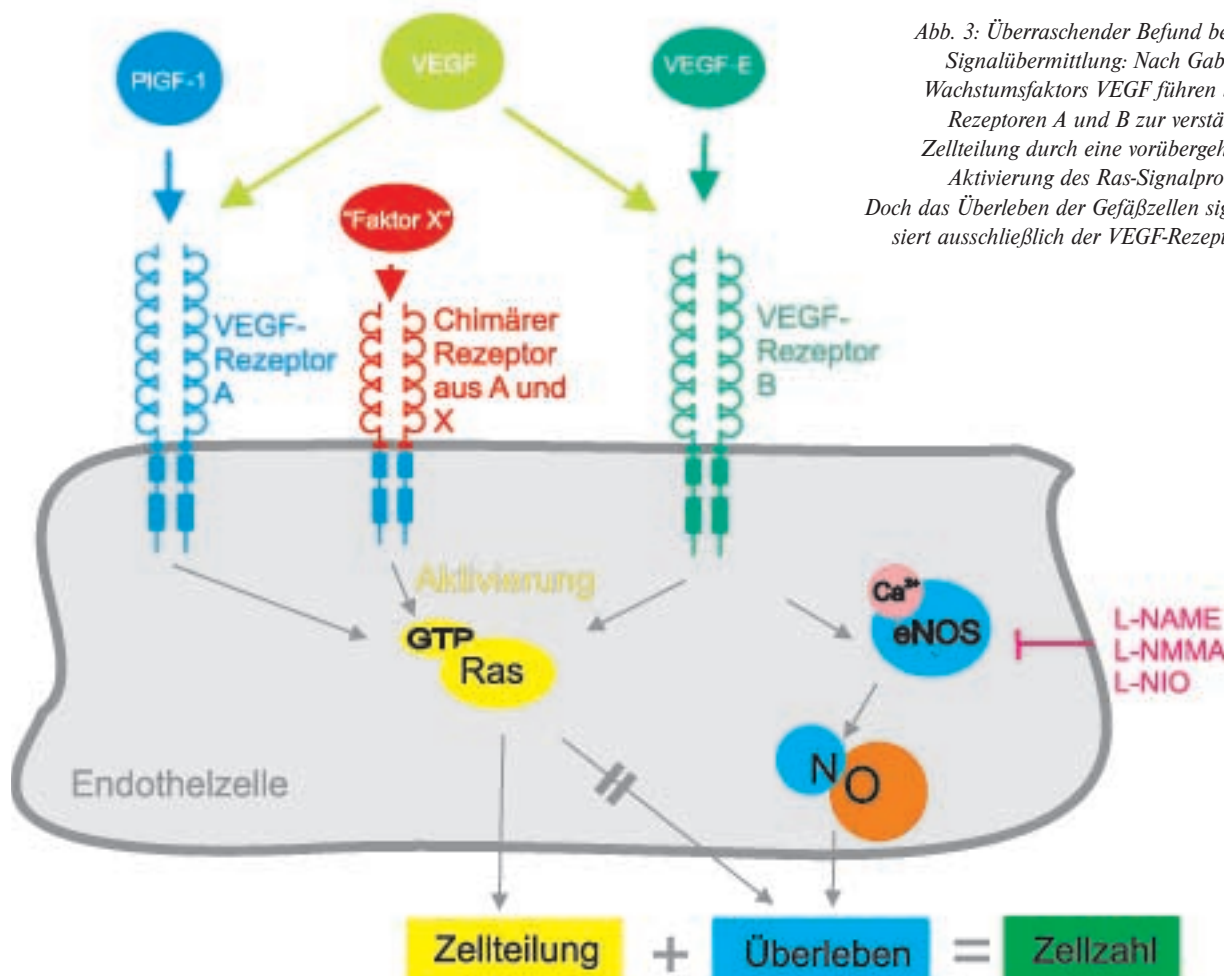
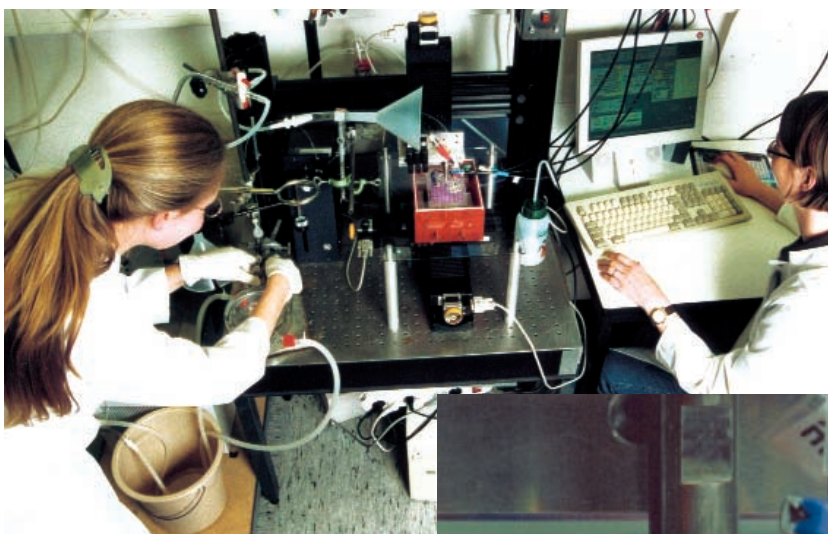


Abb. 3: Überraschender Befund bei der Signalübermittlung: Nach Gabe des Wachstumsfaktors VEGF führen beide Rezeptoren A und B zur verstärkten Zellteilung durch eine vorübergehende Aktivierung des Ras-Signalproteins. Doch das Überleben der Gefäßzellen signalisiert ausschließlich der VEGF-Rezeptor B.



die Wanderung und das Überleben von Zellen haben.

Das Überleben von Gefäßzellen spielt eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen: Auch Tumore versorgen sich über die Blutgefäße mit Sauerstoff und Nährstoffen, denn sie benötigen viel Energie für das Wachstum der entarteten Zellen. Deshalb funktionieren sie das Blutgefäßsystem für die eigene Energieversorgung um, indem sie selbst den Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) des Endothels bilden. Gelänge es, durch pharmakologische Behandlung das Überleben der vom Tumor

Gefäße wachsen zum Tumor

induzierten Gefäßzellen zu verhindern, dann ließe sich auch das Tumorstromung stoppen.

Aus unseren früheren Untersuchungen war bekannt, dass das Signalprotein und Proto-Onkogen Ras (Ratten Sarkom) in Nervenzellen das zelluläre

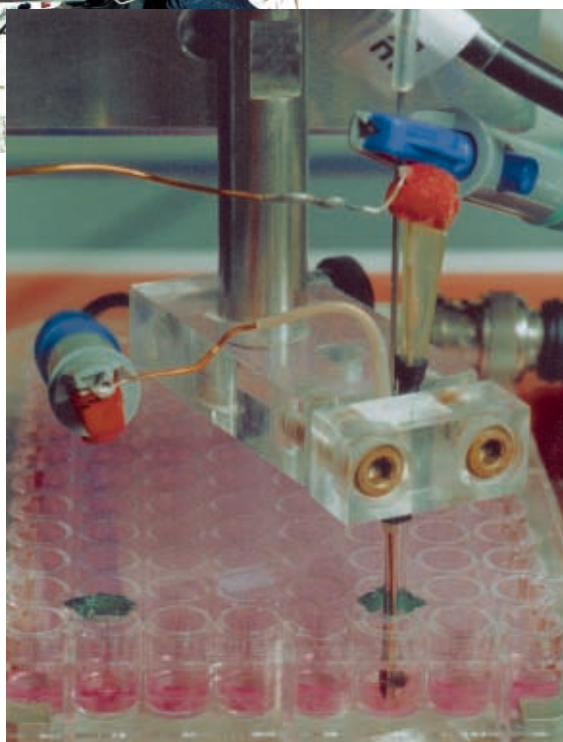


Abb. 4: Die technische Plattform:
Ein spezielles Robotik-System führt elektrochemische Messungen automatisch in großer Zahl unter reproduzierbaren Bedingungen durch.

Überleben fördert und ihr Absterben verhindern kann. Aber auch bei geringen NO-Konzentrationen überlebten bestimmte Nervenzellen (Motoneuro-

nen). Es ist die Frage, ob diese Wirkung auch bei Blutgefäßzellen nachgewiesen werden kann.

Als Modell für unsere Versuche an Blutgefäßen verwenden wir Zellen aus menschlichen Nabelschnurvenen (sog. HUVEC). Der Wachstumsfaktor VEGF wirkt über zwei verschiedene Rezeptoren (A und B) auf die Blutgefäßzellen ein. Erstaunlicherweise haben diese beiden Rezeptoren bei der Entwicklung des Blutgefäßsystems im Embryo völlig unterschiedliche Funktionen. Es war deshalb sinnvoll, auch die spezifische intrazelluläre Signalgebung der Rezeptoren A und B getrennt zu charakterisieren: Dazu diente folgender Trick: Zunächst wurde der äußere Teil des Rezeptors A gentechnologisch so verändert, dass er nicht mehr durch den Wachstumsfaktor VEGF aktiviert werden konnte, sondern ausschließlich von einem anderen Wachstumsfaktor X. Der innere signalgebende Teil des VEGF-Rezeptors A blieb jedoch unverändert. Es entstand ein chimärer Rezeptor, mit dem die intrazellulären Signalwege der Rezeptoren A und B getrennt untersucht werden können.

Dabei ergab sich ein überraschender Befund: Beide Rezeptoren A und B

untersucht werden können.

Dabei ergab sich ein überraschender Befund: Beide Rezeptoren A und B

des Wachstumsfaktors VEGF führen zur verstärkten Zellteilung durch eine vorübergehende Aktivierung des Ras-Signalproteins. Doch das Überleben der Gefäßzellen signalisiert ausschließlich der VEGF-Rezeptor B (Abb. 3). Überleben und Zellteilung sind zwei voneinander unabhängige Phänomene, die aber beide die Gesamtzahl vorhandener Zellen bestimmen: $Zellanzahl = \text{Überleben} + \text{Zellteilungsaktivität}$. Wenn alle Zellen bei einer bestimmten Behandlung überleben, ohne sich zu teilen, bleibt die Zellzahl konstant. Dieses Überlebenssignal vermittelt der VEGF-Rezeptor B. Ist nur der VEGF-Rezeptor A aktiv, dann sterben die Zellen ab. Wenn zusätzlich die Zellteilung aktiviert wird, dann steigt die Zahl der Zellen an. In diesem Fall sind die Rezeptoren A und B aktiv, was durch das zelluläre Signalprotein Ras vermittelt wird. Für eine mögliche Tumorthherapie haben "Überleben" und "Zellteilung" unterschiedliche Bedeutung: Über den Signalweg des Überlebens greift man in die Prozesse entwickelter Blutgefäße ein, während eine verringerte Zellteilungsaktivität die Neubildung von Blutgefäßen verhindert.

Wie unsere Versuche zeigen, ist das Proto-Onkogen Ras nicht mit dem Überleben der Gefäßzellen gekoppelt. Doch vielleicht kann Stickstoffmonoxid analog zu seiner Wirkung im Nervensystem auch Blutgefäßzellen überleben lassen? Wir prüfen diese Frage mit den Mitteln der Elektrochemie,

die es erlaubt, NO direkt am Ort seiner Freisetzung zu messen.

Zunächst wurde dafür ein System zur zeitaufgelösten und automatisierten NO-Messung entwickelt, das verschiedene Einflussfaktoren auf die NO-Ausschüttung in kultivierten Zellen erfasst. Diese zeit- und orts aufgelöste elektrochemische NO-Bestimmung ist nur mithilfe von Mikroelektroden möglich und liefert umfangreichere und schnellere Informationen als andere Messtechniken: So wird bei optischen Tests wie dem sog. Griess-Reagenz die NO-Konzentration anhand der Färbung nur indirekt und diskontinuierlich über das Reaktionsprodukt Nitrit bestimmt.

Bei der elektrochemischen Detektion von Stickstoffmonoxid machen wir

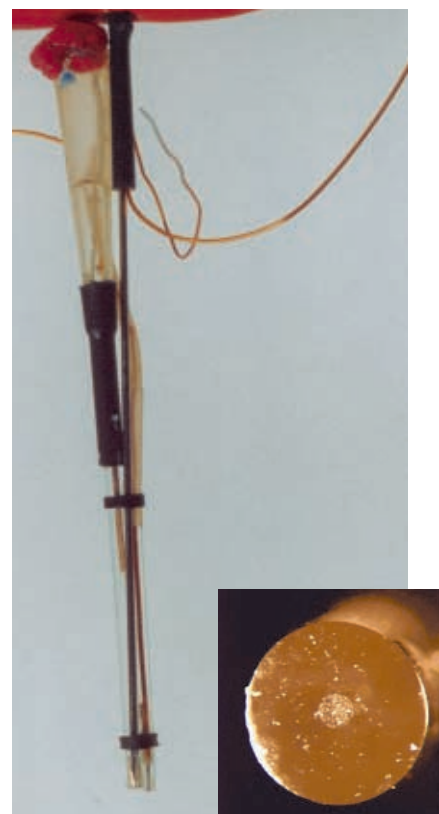


Abb. 5:
Sensor, Referenzelektrode und Zupumpkanüle befinden sich in einem Kanal: Spezielle mit Metallporphyrinen beschichtete NO-Sensoren binden und oxidieren das reaktive NO-Molekül selektiv.

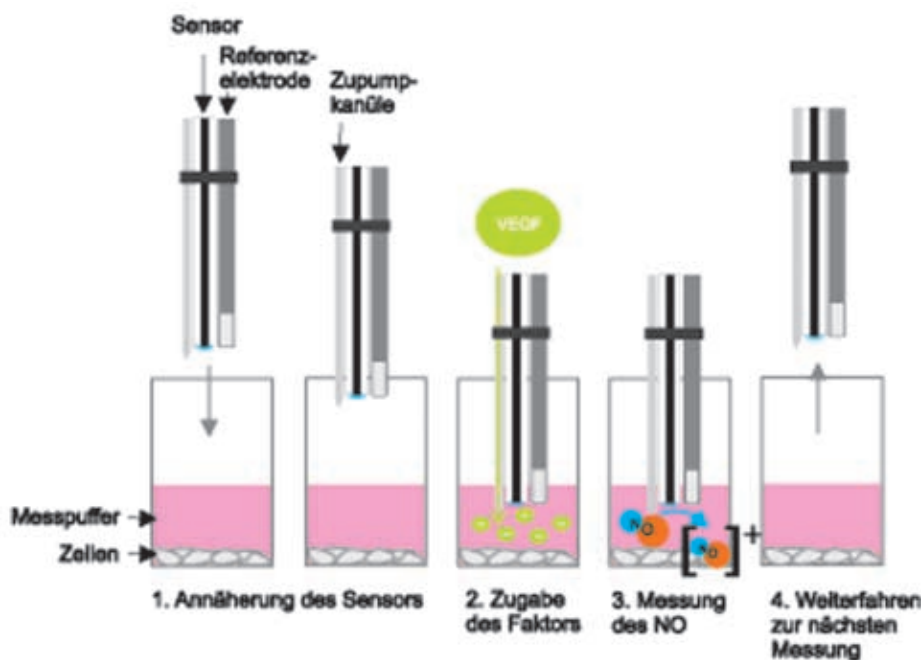


Abb. 6: Wird Stickstoffmonoxid bei dieser Probe freigesetzt? Die Distanz zwischen Zellen und Sensor entscheidet über die Güte des Messsignals.

uns die Bindungsfreudigkeit des Moleküls zunutze: Es reagiert mit dem Metall-Ion im Zentrum eines Porphyrins. NO-Sensoren sind mit Metallporphyrinen beschichtet, die elektrokatalytisch NO zu NO^+ oxidieren

Optimierte Sensoren

(Abb. 5). Der daraus resultierende Oxidationsstrom ist proportional zur Konzentration des NO-Moleküls. Da das Oxidationspotential des Nitrits fast dem des NO entspricht, verhindert eine zusätzliche Beschichtung des Sensors mit negativ geladenem Nafion[®] eine Verfälschung des Messsignals. Mit dieser optimierten Sen-

sorstruktur lässt sich NO selektiv bestimmen.

Doch erst mit der in unserer Arbeitsgruppe Elektroanalytik und Sensorik entwickelten technischen Plattform werden jetzt elektrochemische Messungen auch automatisch in einem Robotik-System durchgeführt (Abb. 4). Damit lässt sich der Einfluss von Substanzen wie etwa Pharmaka auf die NO-Sekretion in großer Wiederholung und reproduzierbar untersuchen. Die integrierte Temperierung auf 37 °C gewährleistet, dass die "normale Körpertemperatur", bei der die Stoffwechselprozesse in den Zellen kontrolliert ablaufen können, strikt eingehalten wird. Wir kultivieren die Zellen in her-

kömmlichen Mikrotiterplatten (Plastikplatten, die 96 Vertiefungen enthalten) in einem Zellmedium. Erst kurz vor der Messung wird das Zellmedium durch einen physiologischen Messpuffer ausgetauscht. Damit verhindern wir, dass das äußerst reaktive NO-Molekül sofort mit Bestandteilen des Mediums reagiert und erhalten so ein deutlich höheres Messsignal. Die Stoffwechselaktivität der Zellen zeigt, dass sie sich auch im Messpuffer über mehrere Stunden hinweg "wohl fühlen". Während der Messung wird die Mikrotiterplatte mit einer Glasscheibe abgedeckt und der NO-Sensor durch kleine Öffnungen automatisch auf eine definierte Distanz zu den Zellen abgesenkt (Abb. 6). Die Distanz zwischen Zellen und Sensor ist ein entscheidendes Kriterium für die Güte des Messsignals, denn das reaktive NO-Molekül darf auf seinem Diffusionsweg zum Sensor nicht mit anderen Molekülen reagieren. Über eine Pumpe werden Stimulanzien oder andere Substanzen automatisch zugegeben. Alle Schritte der Messung werden schon im Vorfeld des Versuchs in einem einfachen Skriptformat programmiert und in das Messprogramm eingelesen. Der elektrochemischen Messung selbst dient das Verfahren der Differentialpulsamperometrie, einer

graduierntenkolleg

Hirnforschung an der Fakultät für Chemie

Was Hänchen nicht lernt, lernt Hans nimmermehr. Diese Ansicht vertrat im übertragenen Sinne die Forschung noch vor nicht allzu langer Zeit: Man nahm an, dass sich nur im Kindesalter neue Hirnnervenzellen bilden können, sich also bei Erwachsenen ihre Anzahl allenfalls verringern könne. Neue Forschungsergebnisse zeigen, dass der Fall anders liegt. Wie genau, das erforscht die Biologin Pauline Lafenêtre, Teilnehmerin des Graduiertenkollegs "Entwicklung und Plastizität des Nervensystems: Molekulare,

synaptische und zelluläre Mechanismen" in ihrem Projekt "Neurogenese im erwachsenen Gehirn" am Lehrstuhl Molekulare Neurobiochemie (Prof. Dr. Rolf Heumann). Sie untersucht z. B. den Einfluss von Umwelt und Lebensstil auf die Neubildung von Nervenzellen und den Zusammenhang zwischen der Neurogenese und der Gedächtnisleistung. Chemiker, Biologen und Mediziner sind am Graduiertenkolleg (Sprecherin: Prof. Dr. Petra Wahle) beteiligt.

hochsensitiven Strommessung in Abhängigkeit von einer pulsformig an die Messelektrode angelegten Spannung (Abb. 7).

Die NO-Messungen im elektrochemischen Robotik-System liefern folgende Ergebnisse: Die Aktivierung des VEGF-Rezeptors B führte im Gegensatz zu der des VEGF-Rezeptors A zur Bildung von Stickstoffmonoxid (s. Abb. 3). Nach Zugabe von Pharmaka, welche die NO-Bildung durch den VEGF-Rezeptors B verhinderten, überlebten auch die Gefäßzellen nicht. Damit ist das Rätsel entschlüsselt: Die

Aktivierung des VEGF-Rezeptor B führt über eine Signalkaskade zur Produktion von Stickstoffmonoxid. Dabei wirkt das in den Gefäßzellen gebildete NO autokrin, d.h. es gibt wiederum selbst das Signal für das Überleben jener Zellen, die NO herstellen.

Wir erproben derzeit unser Robotik-System für die Untersuchung von etablierten und neuen Wirkstoffen der Pharmaindustrie. Aber auch andere Substanzen, die eine NO-Ausschüttung in verschiedenen Zellsystemen beeinflussen könnten, beziehen wir

mit ein: z.B. Naturstoffe oder die NO-Synthase-Inhibitoren (z.B. L-NAME, L-NIO, L-NMMA, s. Abb. 3). Im nächsten Schritt wollen wir prüfen, ob sich die autokrine Wirkung von NO in Endothelzellen für eine neue Tumorthherapie nutzen lässt: Wenn die lokale NO-Bildung am Tumor pharmakologisch unterdrückt werden kann, dann müssten nach unserer Hypothese auch die Blutgefäße zum Tumor hin absterben. Wir hoffen, dass der Tumor auf diese Weise "ausgehungert" werden kann.

Dank:

Die Autoren danken PD Dr. A. Blöchl, Dr. T. Erichsen, Dr. V. Ryabova, H. Breuker für wertvolle Diskussion und Unterstützung. Teile der Arbeiten wurden durch die EU (Projekt Cellsens - QLK3-CT-2001-002244) und das Allgemeine Promotionskolleg der RUB finanziert.

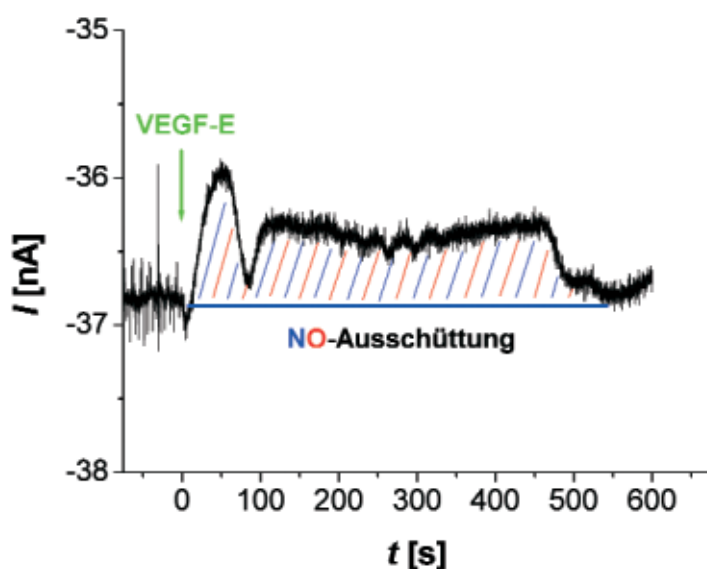


Abb. 7: Das Messprotokoll: Bereits kurze Zeit nach der Stimulation mit dem Wachstumsfaktor VEGF-E wird Stickstoffmonoxid in einem zweiphasigen Prozess aus den Endothelzellen freigesetzt.

■ Dipl.-Biochem. Sabine Reiter,
Prof. Dr. Wolfgang Schuhmann,
Analytische Chemie,
Elektroanalytik und Sensorik,
Dipl.-Biochem. Ina Radtke,
Prof. Dr. Rolf Heumann,
Biochemie II,
Molekulare Neurobiochemie

sonderforschungsbereich

SFB 509 "NEUROVISION": Chemiker kooperieren mit Medizinern und Psychologen

Vom Lichtstrahl, der uns ins Auge fällt, bis zum Bild, das wir sehen, ist es ein weiter Weg: Was genau in unserem Kopf abläuft, wenn wir sehen, fragen sich die Wissenschaftler im Sonderforschungsbereich "Neuronale Mechanismen des Sehens - NEUROVISION" (Sprecher: Prof. Dr. Ulf Eysel). 1996 hat der SFB mit 18 Teilprojekten seine Arbeit aufgenommen, seit 1999 ist die Fakultät für Chemie dabei. Das aktuelle Projekt im Bereich Chemie ist die "Regulation der neuronalen RAS-Aktivität durch Licht". Das RAS-Pro-

tein ist ein Botenstoff der Signalübertragung in Nervenzellen, eine Art Schalter. Es kann z. B. dazu beitragen, dass Nervenzellen wachsen, sich miteinander verschalten und ihre Funktion verändern. Neue Forschungen haben ergeben, dass sich die Lichtintensität, der ein Organismus ausgesetzt ist, in der RAS-Aktivität niederschlägt. Diesem Zusammenhang sind die Biochemiker um Prof. Dr. Rolf Heumann gemeinsam mit Prof. Dr. Onur Güntürkün (Psychologie) und Prof. Dr. Ulf Eysel (Medizin) auf der Spur.

abstract

Say NO to survival!

Tumours utilise blood vessels for their own nutrient supply by producing the growth factor for the blood vessels on their own. In this process, the small and versatile molecule nitric oxide (NO) acts as a survival signal. If scientists could suppress its effect, the nutrient supply for a growing tumour might be blocked. By means of a specifically designed robotic system they investigate the influence of a variety of active compounds on the NO release of blood vessel cells.