

Etablierung zellulärer Testsysteme zur Identifikation von Molekülsonden für chemisch-genetische Untersuchungen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Universität Dortmund
angenommene

DISSERTATION

von

Diplom-Biologe

Sascha Menninger

aus Hagen

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage
1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2009

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Fachbereich Chemie der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund in der Zeit von April 2004 bis Januar 2009 angefertigt.

**Für Evelyn und
meine Familie**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1 <i>Chemische Genetik</i>	3
2.1.1 Grundlagen	3
2.1.2 Substanzbibliotheken.....	6
2.1.3 Biochemische und biologische Testverfahren	8
2.1.4 Methoden zur Identifikation und Validierung des Zielproteins	11
2.2 <i>Ras-Proteine und Ras-abhängige Signalwege</i>	15
2.2.1 Das Onkogen Ras	15
2.2.2 Ras als molekularer Schalter	15
2.2.3 Posttranslationale Modifikationen	17
2.2.4 Ras-abhängige Signalwege.....	19
2.2.5 Der Ras Zyklus und die räumliche Ras Regulierung	21
2.3 <i>Komponenten des Cytoskeletts und ihre Aufgabe bei der Mitose</i>	23
2.3.1 Mikrotubuli	23
2.3.2 Aktinfilamente	25
2.3.3 Der Zellzyklus	27
2.3.4 Zellzyklusregulation und Zellzykluskontrollpunkte	29
3. Ziel der Arbeit	31
4. Material	33
4.1 <i>Plasmide</i>	33
4.2 <i>Eukaryotische Zelllinien</i>	33
4.3 <i>Antikörper und Proteinstandards</i>	34
4.3.1 Antikörper	34
4.3.2 Proteinstandards.....	35
4.4 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	35
4.5 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	38
4.6 <i>Allgemeine Laborgeräte</i>	39
4.7 <i>Puffer und Lösungen</i>	40
4.8 <i>Zellkulturmedien</i>	44

5. Methoden.....	45
5.1 <i>Zellbiologische Methoden.....</i>	45
5.1.1 Auftauen von Zellen.....	45
5.1.2 Subkultivierung von Zellen.....	45
5.1.3 Bestimmung der Zellzahl	45
5.1.4 Kryokonservierung.....	46
5.1.5 Transiente Transfektion von MDCK- und MDCK-F3 Zellen.....	46
5.1.6 Synchronisation von Zellen.....	46
5.1.7 Zelllyse.....	47
5.1.8 PathDetect® Reportergen Assay.....	48
5.1.9 MDCK-F3 Phänotyp Assay	50
5.1.10 BSC-1 Phänotyp Assay	51
5.1.11 Histochemische Färbungen	52
5.1.12 Der MTT-Test	54
5.1.13 Der WST-1 Test.....	55
5.1.14 Der Apo-ONE® Apoptose Assay	57
5.2 <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	59
5.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	59
5.2.2 Immunopräzipitation und Acyl- Austausch.....	59
5.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	60
5.2.4 Tubulin-Polymerisations Assay.....	65
5.3 <i>Mikroskopie</i>	66
5.3.1 Durchlicht und Fluoreszenzmikroskopie in Mikrotiterplatten.....	66
5.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellpräparaten auf Objektträgern	69
5.3.3 Live Cell Imaging	70
5.4 <i>Verwendung des Pipettierroboters Sciclone ALH500.....</i>	71
5.4.1 Durchführung der Substanzapplikationen.....	71
5.4.2 Evaluierung der Pipettiergenauigkeit.....	73
6. Ergebnisse	75
6.1 <i>Der PathDetect®-Reportergen Assay</i>	75
6.1.1 Prinzip.....	75
6.1.2 Etablierung.....	77
6.2 <i>Der BSC-1 Cytoskelett Assay.....</i>	88
6.2.1 Prinzip.....	88
6.2.2 Etablierung.....	90

6.3	<i>Der MDCK-F3 Phänotyp Assay</i>	95
6.3.1	Prinzip und Etablierung.....	95
6.4	<i>Identifikation von aktiven Substanzen aus einer Tetrahydropyran-Bibliothek</i>	98
6.4.1	Screen einer Tetrahydropyran Bibliothek mit dem PathDetect®-Reportergen System	98
6.4.2	Test der aktivsten Substanzen auf MDCK und MDCK-F3 Zellen.	102
6.4.3	Test der aktivsten Substanzen mit dem APO-ONE® Caspase 3/7 Assay	104
6.4.4	Untersuchung der ERK Phosphorylierung	106
6.5	<i>Screen einer Bibliothek von 50 α,β-ungesättigten δ-Lactonen im BSC-1 Cytoskelett Assay</i>	108
6.6	<i>Untersuchung von Indolochinolizin-Derivaten auf ihren Einfluss auf das Cytoskelett und die Mitose</i>	110
6.6.1	Test im BSC-1 Cytoskelett Assay.....	110
6.6.2	„Live Cell Imaging“ und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Mitosespindel.....	112
6.6.3	Einfluss der Substanzen auf die <i>in vitro</i> Tubulin-polymerisation	116
6.6.4	Cytotoxizitäts-Assay mit enantiomeren reinen Formen von Vtk-71 und Vtk-206	118
6.7	<i>Identifikation der Wirkung von Prieurianin auf das Aktinskelett in Pflanzen- und Säugetierzellen</i>	120
6.8	<i>Untersuchung von synthetisch hergestelltem Chondramid C und ausgewählten Stereoisomeren auf das Aktinskelett von BSC-1 Zellen – Eine Struktur-Aktivitäts-Studie</i>	123
6.9	<i>Screen einer selektionierten Substanzbibliothek mit dem PathDetect®-Reportergen Assay, BSC-1 Cytoskelett Assay und dem MDCK-F3 Phänotyp Assay</i>	126
6.10	<i>Identifikation und biologische Evaluierung eines spezifischen APT-1 Inhibitors - Ein rückwärts gerichteter chemisch-genetischer Ansatz</i>	130
7.	Diskussion	140
7.1	<i>Der Pathdetect-Reportergen Assay</i>	140
7.1.1	Eigenschaften	140

7.1.2	Substanztest mit dem Reportergen Assay und erste biologische Evaluierung der gefundenen Hits.....	148
7.2	<i>Der MDCK-F3 Phänotyp Assay</i>	153
7.2.1	Eigenschaften.....	153
7.2.2	Substanztests.....	155
7.3	<i>Der BSC-1 Phänotyp Assay</i>	158
7.3.1	Eigenschaften.....	158
7.3.2	Untersuchung einer Bibliothek von 50 α , β -ungesättigten δ -Lactonen 160	
7.3.3	Einfluss der Indolochinolizin Derivate Vtk-71 und Vtk-206 auf die Mitose.....	162
7.3.4	Wirkung von Prieurianin auf das Aktinskelett.....	167
7.3.5	Struktur-Aktivitäts-Studie von Chondramid C Stereoisomeren.....	168
7.4	<i>Biologische Evaluierung der Funktion von APT1 in vivo</i>	170
8.	Zusammenfassung	175
9.	Ausblick	179
10.	Abkürzungsverzeichnis	180
11.	Literaturverzeichnis	183
12.	Anhang	191
	<i>Danksagung</i>	195
	<i>Lebenslauf</i>	197
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	198

1. Einleitung

Das Leben auf seiner molekularen Ebene zu erforschen, stellt eine erhebliche Herausforderung der heutigen Naturwissenschaften dar. Durch die reduktionistische Herangehensweise der Forschung ist es in den letzten Jahren unabdingbar geworden, dass ehemals getrennte Wissenschaftsbereiche, nun ineinander übergreifend, sich mit den hieraus ergebenden Fragestellungen befassen. Dies wird vor allem durch die im Jahre 2001 veröffentlichte^[1, 2] Sequenzierung des menschlichen Genoms deutlich. Sie stellt zwar in wissenschaftlicher Hinsicht einen Meilenstein dar, liefert aber lediglich die Grundlage für eine sukzessive Erforschung der einzelnen Komponenten, welche in ihrem komplexen Zusammenspiel das Phänomen Leben ausmachen. So überraschte die spätere Erkenntnis, dass das menschliche Genom aus nur ca. 20000-25000 Genen besteht.^[3] Hieraus wurde ersichtlich, dass die Anzahl der Gene nicht unbedingt gleichbedeutend mit der Komplexität des durch sie kodierten Organismus ist. Diese wird vielmehr auf der Ebene des Proteoms erreicht, wobei die Menge verschiedener Proteine, ihr modularer Aufbau, ihre Interaktionen und postrationalen Modifikationen eine wichtige Rolle spielen. Durch Methoden der klassischen Genetik konnten schon viele Erkenntnisse über wichtige biologische Prozesse gewonnen werden. So wurden anhand der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* die Zellteilung^[4], im Nematoden *Caenorhabditis elegans* der programmierte Zelltod^[5] oder anhand der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* die frühembryonale Entwicklung^[6] untersucht. Bei diesen Projekten bedienten sich die Forscher eines vorwärtsgerichteten genetischen Ansatzes. Hierbei wird das Genom des betreffenden Organismus zufällig mutiert, anschließend die Mutanten nach auffälligen Phänotypen untersucht und im letzten Schritt das mutierte Gen, welchem dieser Phänotyp zugrunde liegt, identifiziert. In den letzten Jahren gewann jedoch der wegen seiner entgegengesetzten Vorgehensweise als rückwärtsgerichtete Genetik bezeichnete Ansatz an Bedeutung. Hierbei steht ein spezielles Gen im Mittelpunkt, welches in dem entsprechenden Modellorganismus gezielt mutiert wird. Durch einen Vergleich des Phänotyps der erzeugten Mutante mit dem Wildtyp, können daraufhin Rückschlüsse auf die biologischen Funktionen dieses Gens gezogen werden. Diese Technik ist besonders bei der Erforschung humaner Erbkrankheiten wichtig, da auf diese Art genetische Ursachen für beobachtete Erkrankungen gefunden werden können. Obwohl beide Ansätze bei der Untersuchung biologischer Systeme sehr wirkungsvoll sind, unterliegen sie dennoch einigen Limitierungen: (1) Eine einzige Mutation kann sich auf das Expressionsverhalten verschiedener Gene auswirken und somit die eindeutige biologische Funktion des untersuchten Gens verschleiern.

(2) Wegen der enormen Größe und der Diploidität ihrer Genome sowie der geringen Reproduktionsrate ist ein vorwärtsgerichteter genetischer Ansatz in Säugetieren schwer durchzuführen. (3) Mutationen sind konditional und können nicht nach Belieben wieder rückgängig gemacht werden. (4) Die Mutation von für den untersuchten Organismus essentiellen Genen, ist meist letal und kann somit nicht anhand dieses Ansatzes untersucht werden. (5) Proteine verfügen häufig über mehrere Funktionen. So können sie z.B. als Enzyme chemische Reaktionen katalysieren und gleichzeitig als Gerüstproteine Proteinkomplexe mit anderen Proteinen ausbilden, um so die räumliche Funktionalität dieser Interaktionspartner zu steuern. Durch einen genetischen „knock out“ würden alle diese verschiedenen Funktionen gleichzeitig ausgeschaltet und eine komplexe Differenzierung der einzelnen Funktionen unmöglich gemacht.^[7]

Aufgrund dieser Limitierungen sowie der oben angesprochen Erkenntnis, dass auf der Ebene des Proteoms ein viel detaillierteres und auch komplexeres Netz von Interaktions- und Funktionsbeziehungen zu erforschen ist, hat innerhalb des letzten Jahrzehnts der Ansatz der „Chemischen Genetik“ für Aufmerksamkeit gesorgt. Dieser ist zentraler Teil der vorliegenden Arbeit und soll im Folgenden näher erläutert werden.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Chemische Genetik

2.1.1 Grundlagen

Der Ansatz der Chemischen Genetik beschreibt die Verwendung von niedermolekularen Substanzen als Sonden zur Erforschung von Proteinfunktionen in Zellen oder ganzen Organismen. Die Ursprünge dieses Ansatzes können bis in das späte 18. Jahrhundert zurückverfolgt werden. Viele Forscher vermuteten schon damals, dass in Pflanzenextrakten, welche spezifische Wirkungen aufwiesen, nur einzelne Stoffe für die beobachteten Effekte verantwortlich seien.^[8] Besonders zu beachten sind auch die Arbeiten und Theorien von Paul Ehrlich im 19. Jahrhundert, welcher unter anderem beobachtete, dass Methylen-Blau spezifisch neuronale Zellen anfärbt. Diese Beobachtung ließ ihn erkennen, dass niedermolekulare Substanzen spezifische biologische Ziele, sog. Rezeptoren, haben mit denen sie interagieren.^[8, 9] Dies war zunächst für pharmakologische Ansätze wichtig, welche das Ziel verfolgen, Substanzen zu finden, die spezifisch einen krankheitserregenden parasitären Organismus eliminieren oder modulierend in krankhaft veränderte Prozesse eingreifen. Hierbei steht aber hauptsächlich die Entwicklung von Strukturen im Vordergrund, welche den Anforderungen eines Medikaments entsprechen. Die Vorgehensweise, komplexe biologische Prozesse mit niedermolekularen Substanzen grundlegend zu erforschen, wurde erst von Mitchison 1994 und Schreiber 1998 unter dem Begriff Chemische Genetik formuliert.^[10, 11] Die Chemische Genetik ist in ihrem Vorgehen ganz analog zu dem beschriebenen Vorgehen in der klassischen Genetik. Um die Funktionen eines Proteins in seinem zellulären Kontext zu erforschen, ist es nötig, in diese Funktionen modulierend einzugreifen, um dann die daraus resultierenden Veränderungen in dem biologischen System zu beobachten. Die klassische Genetik führt hierzu Mutationen in die Gene ein, die für dieses Protein kodieren. Diese verstärken oder eliminieren somit seine Wirksamkeit. Bei der Chemischen Genetik werden niedermolekulare Substanzen genutzt, die in analoger Weise spezifisch eine Funktion eines Proteins modulieren. Entsprechend zu den genetischen Ansätzen kann auch hier zwischen vorwärtsgerichteten und rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansätzen unterschieden werden. Das Vorgehen bei den chemisch-genetischen Ansätzen ist in Abb. 1 schematisch gezeigt und wird im Folgenden erläutert.

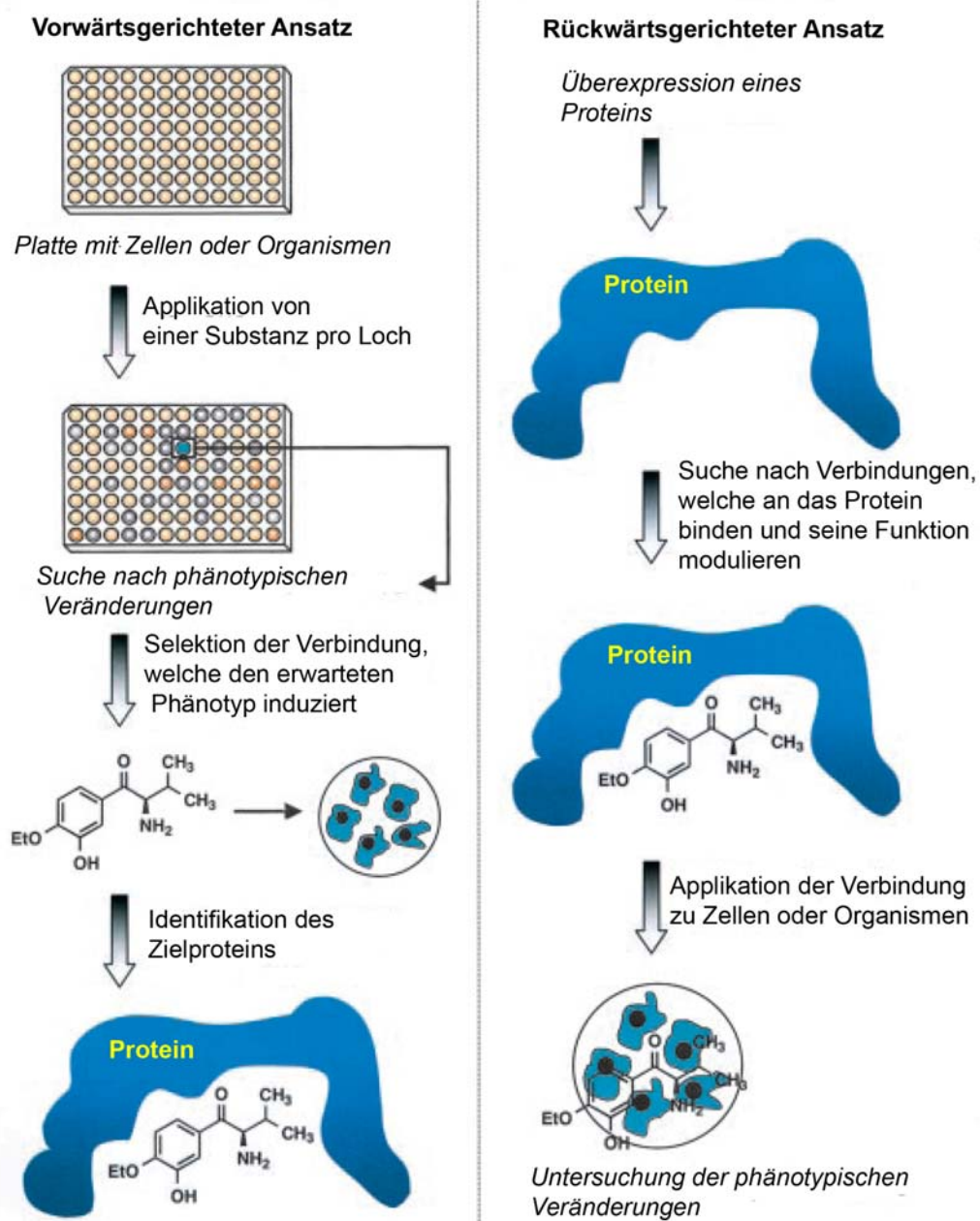


Abb. 1 (modifiziert nach Blackwell und Zhao 2003)^[12]: Generelles Schema der chemisch-genetischen Ansätze. Der vorwärtsgerichtete Ansatz beinhaltet die Suche und Identifikation von niedermolekularen Substanzen, welche in Zellen oder ganzen Organismen bestimmte phänotypische Veränderungen induzieren und die anschließende Identifikation der entsprechenden Zielproteine ermöglichen. Bei dem rückwärtsgerichteten Ansatz wird ein Protein überexprimiert und anschließend nach einer Substanz gesucht, welche die Funktion dieses Proteins moduliert. Diese wird daraufhin zur Phänotypanalyse in Zellen oder ganzen Organismen verwendet. Die blauen Zellen und das dargestellte Molekül repräsentieren jeweils eine phänotypische Veränderung und eine aktive Substanz der Bibliothek.

In einem vorwärtsgerichteten Ansatz werden große Substanzbibliotheken dahingehend getestet, ob sie in Zellen oder Zellextrakten einen interessanten Phänotyp induzieren. Anschließend wird das Zielprotein, an welches ein entsprechendes Molekül bindet, identifiziert. Dieses kann somit in Korrelation mit dem Phänotyp und den zugrunde liegenden Prozessen gebracht werden. Bei dem rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatz wird zunächst ein Protein, dessen Funktion untersucht werden soll, überexprimiert und isoliert. Dann wird nach einer niedermolekularen Substanz gesucht, die die Funktion des Proteins beeinflusst. Im letzten Schritt wird im zellulären Kontext die Auswirkung dieser Funktionsänderung auf den Phänotyp untersucht.

Im Vergleich zu den Ansätzen der klassischen Genetik bietet die Chemische Genetik folgende Vorteile: (1) Der Ansatz kann parallel an verschiedenen Zelllinien oder Organismen durchgeführt werden. (2) Er kann in Systemen angewendet werden, bei denen genetische Methoden nicht verfügbar oder nur schwer durchführbar sind. (3) Hierbei ist es auch möglich, die Produkte von essentiellen oder rezessiven Genen zu untersuchen. (4) Die zeitliche Auflösung des Ansatzes erlaubt auch die Untersuchung von schnellen Prozessen. (5) Man hat die Möglichkeit, die phänotypischen Veränderungen nach der Entfernung einer niedermolekularen Verbindung von ihrem Zielprotein zu beobachten. (6) Durch eine veränderte Konzentration der verwendeten Substanzen lassen sich unterschiedlich starke Ausprägungen des Phänotyps einstellen. (7) Die Wirkung von verschiedenen Kombinationen niedermolekularer Substanzen kann ebenfalls untersucht werden. (8) Chemische Genetik steht als Ansatz in enger Verbindung zur Pharmaforschung. (9) Niedermolekulare Substanzen können auch bei der Kristallographie hilfreich sein.^[13] Der hauptsächliche Nachteil des chemisch-genetischen Ansatzes besteht in der möglichen Unspezifität der niedermolekularen Substanzen. Diese zeigen häufig nicht nur eine Wirkung auf das Zielprotein, sondern auch auf eng verwandte Proteine. Hierdurch kann die Evaluierung der spezifischen Funktion des untersuchten Zielproteins mit diesem Ansatz erschwert sein.^[14]

Es sollte erwähnt werden, dass schon lange vor der Einführung des Begriffs Chemische Genetik viele niedermolekulare Substanzen mit interessanten biologischen Wirkungen nach dieser Vorgehensweise entdeckt wurden. Die genaueren Untersuchungen dieser Wirkungen führten mitunter zu wichtigen biologischen Entdeckungen. So konnte anhand von Colchizin das Protein des Cytoskeletts Tubulin isoliert werden.^[15] Aufgrund von phänotypischen Effekten wurden z.B. der Hsp90 Inhibitor Geldanamycin^[16] und der Hemmer des Proteintransports zwischen dem ER und Golgi-Apparat Brefeldin A^[17] entdeckt. Doch erst mit den in den letzten Jahren zur

Verfügung stehenden technischen Mitteln konnte dieser Ansatz in großem Maßstab durchgeführt werden, um vielleicht irgendwann dem Ziel, für jedes Protein des Proteoms eine spezifisch modulierende niedermolekulare Substanz zu finden^[11], näher zu kommen. Erste ermutigende Erfolge konnten hiermit schon erzielt werden. So identifizierten Mayer et al. aus einer kommerziellen Substanzbibliothek, welche 16320 niedermolekulare Substanzen umfasste, einen Inhibitor des Kinesins Eg5. Aufgrund des induzierten Phänotyps in Form einer sternförmigen monopolaren Mitose-Spindel, wurde die Substanz Monastrol genannt. Sie war der erste entdeckte zellpermeable Inhibitor für dieses Kinesin, und diente im Folgenden dazu, die Funktion von Eg5 und Mechanismen des Mitoseapparates näher zu untersuchen.^[18, 19] Dieses Beispiel erfüllte alle Erwartungen an einen vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatz und bestätigte somit seine Effizienz.

2.1.2 Substanzbibliotheken

Ein zentrales Element des chemisch-genetischen Ansatzes bildet die Substanzbibliothek. Für einem vorwärtsgerichteten Ansatz sollten die Bibliotheken, möglichst viele verschiedenartige Moleküle enthalten um die Chance zu erhöhen, dass sich darunter auch aktive Vertreter befinden. Berechnungen gehen davon aus, dass der Strukturraum von wirkstoffähnlichen Molekülen mit einer molaren Masse bis 500 Da mehr als 10^{60} umfasst.^[20] Diese hohe Anzahl ist auf den ersten Blick schwer zu begreifen und somit der Raum für die Synthese von potentiellen Wirkstoffmolekülen unvorstellbar groß. Wenn man aber bedenkt, dass die Anzahl von verschiedenen niedermolekularen Substanzen in unserem Körper nur wenige tausend umfasst^[21], wird offensichtlich, dass der Strukturraum von biologisch relevanten Substanzen nur einen winzigen Bruchteil hiervon einnimmt.^[22] Hierdurch wird die Chance erheblich verringert, selbst in einer großen Anzahl von Verbindungen umfassenden Bibliothek, auch entsprechend viele aktive Moleküle zu identifizieren. Diese ernüchternde Erkenntnis folgte auch der Euphorie, als im Zuge der Entwicklung von Hochdurchsatz-Screenings und der kombinatorischen Chemie die Entdeckung vieler neuer Leitstrukturen und somit neuer Wirkstoffe erwartet wurde.^[23] Die meisten Bibliotheken, die mit Hilfe der kombinatorischen Chemie erstellt wurden, enthielten nur sehr einfache Moleküle mit wenigen oder gar keinen Stereozentren und wenig Variabilität an funktionellen Gruppen. Sie nahmen somit nur einen sehr engen Bereich des Strukturraums ein und waren daher, verglichen mit Naturstoffen, mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit in biologischen Systemen aktiv.^[24, 25] Die Tatsache, dass innerhalb der letzten 25 Jahre nur eine *de novo* synthetisierte Substanz aus der

kombinatorischen Chemie den Weg zu einem zugelassenen Medikament geschafft hat bestätigt dies.^[26] Von den neu eingeführten Medikamenten der Jahre 2000 bis 2006 waren ungefähr 50 % Naturstoffe oder hiervon abgeleitete Verbindungen.^[26] Die Qualität der neu erstellten Substanzbibliotheken sollte somit der von Bibliotheken aus Naturstoffen und deren Derivaten möglichst nahe kommen. Hierbei sind zwei Qualitätsmaßstäbe wichtig: die Vielfältigkeit und die Komplexität der Strukturen. Besonders für die Chemische Genetik können komplexere Moleküle von Vorteil sein, da sie wahrscheinlich mit einer höheren Selektivität binden als flache einfache Strukturen.^[27] Ein Ansatz zur Synthese von Substanzbibliotheken, welche beide Qualitätsmaßstäbe erfüllen, wurde von Schreiber et al.^[28] unter dem Begriff *Diversitäts-orientierte Synthese* (DOS) eingeführt. Hierbei werden in einer drei- bis fünfstufigen Synthese Gruppen niedermolekularer Verbindungen mit reicher stereochemischer Diversität und Gerüstdiversität erzeugt.^[29] Der Erfolg dieses Ansatzes zeigte sich, als mit Hilfe von DOS erstellte Substanzbibliotheken in verschiedenen Testsystemen untersucht wurden. Die Screens identifizierten einige Moleküle, welche für chemisch-genetische Untersuchungen verwendet werden konnten. Hierunter der Inhibitor HR22C16, welcher das Motorprotein Eg5 viel potenter inhibiert, als das oben erwähnte Monastrol.^[30]

Mit Hilfe der Diversitäts-orientierten Synthese wird der Strukturraum auf Moleküle mit den beschriebenen Qualitätsmerkmalen erheblich eingegrenzt. Dieser wird aber noch immer so umfangreich sein, dass es eine große Herausforderung darstellt, in ihm biologisch aktive Substanzen zu finden. Naturstoffe stellen hingegen schon Strukturen dar, die evolutionär von der Natur dafür selektioniert wurden, mit biologischen Zielstrukturen zu interagieren. Dies verdeutlicht allein die Tatsache, dass sie schon durch ihre enzymatische Synthese innerhalb der entsprechenden Organismen die strukturellen Charakteristika aufweisen müssen, die nötig sind, um mit Proteinen zu interagieren. Waldmann et al. haben daher die zyklischen Grundgerüste der bekannten Naturstoffe statistisch analysiert und klassifiziert (*structural classification of natural products*, SCONP). Es zeigte sich, dass die Anzahl dieser zyklischen Grundgerüste begrenzt ist und sie sich auf einfachere Strukturen zurückführen lassen.^[31] Die Ergebnisse dieser Analyse können somit als Ausgangsbasis für die Entwicklung von neuen vielversprechenderen Substanzbibliotheken dienen. Die daraus folgenden Synthesevorhaben benennen Waldmann et al. mit dem Begriff *Biologie-orientierte Synthese* (BIOS).^[32] Mit einer ähnlichen Betrachtung der eigentlichen Ziele von Wirkstoffen, den Proteinen, versuchen Waldmann et al. den Strukturraum biologisch aktiver Moleküle weiter zu kartieren. Obwohl bei ihnen eine immens große Variation auf der Ebene der Primärstruktur möglich ist, ist die Anzahl

der in der Natur vorkommenden Tertiärstrukturen begrenzt und evolutionär konserviert.^[23] Aufgrund dieser Erkenntnis gruppieren Waldmann et al. die Ligandenbindende Kernbereiche von Proteinen (*Protein Structure Similarity Clustering, PSSC*) und untersuchen dann die Charakteristika der, an Vertreter dieser Gruppen bindenden Strukturen. Diese können dann als Ausgangspunkte für die biologisch orientierte Synthese von Substanzen dienen, welche an andere Vertreter der jeweiligen Gruppen binden.^[33-35] Anhand dieser Überlegungen sollte es möglich sein viel fokussiertere Substanzbibliotheken zu entwickeln.

2.1.3 Biochemische und biologische Testverfahren

Ein weiterer wichtiger Faktor eines chemisch-genetischen Ansatzes stellt der Screen dar. Dieser muss auf den jeweiligen Prozess oder auf das jeweilige Enzym, wofür ein modulierendes Molekül gefunden werden soll, angepasst sein. Daher existieren viele verschiedene Arten von Testsystemen. Dennoch sollten sie alle den folgenden Anforderungen entsprechen. Ein Testsystem sollte stabil und somit die mit ihm gewonnenen Ergebnisse reproduzierbar sein.^[36, 37] Zudem sollte es so weit wie möglich automatisiert und miniaturisiert werden, um einen möglichst hohen Durchsatz mit möglichst geringen Kosten zu erreichen.^[37] Übliche Screens werden auf 96-, 384- oder auf 1536-Lochplatten durchgeführt. Auf jeder Platte sollten Negativ- und Positiv-Kontrollen integriert sein. Die Assays sollten eine hohe Sensitivität aufweisen, um auch Substanzen mit geringerer Potenz zu erfassen.^[36] Des Weiteren müssen statistische Parameter wie der Z-Faktor und Z'-Faktor optimiert sein um qualitativ hochwertige und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.^[36, 38]

Prinzipiell gibt es zwei Arten von Assays, die vor allem von dem jeweiligen chemisch-genetischen Ansatz abhängig sind. Dies sind auf der einen Seite Protein Assays, welche *in vitro* durchgeführt werden. Sie sind meist Bestandteil eines rückwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes, bei dem die Funktionsänderung eines bestimmten Proteins untersucht wird. Die Detektion erfolgt hier hauptsächlich über optische Erfassungssysteme bei denen Lumineszenz-, Absorptions- oder Fluoreszenz-Änderungen betrachtet werden.^[39] Auf der anderen Seite werden ganze Organismen oder Zelllinien von multizellulären Organismen auf bestimmte Veränderungen hin untersucht. Hierbei wird gewährleistet, dass sich die Zielproteine in ihrem zellulären Kontext befinden und die aktiven Substanzen auch zellpermeabel sind.^[39] Sie stehen somit am Anfang eines vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes. Es gibt verschiedene Methoden, um in einem solch komplexen System wie der Zelle Veränderungen von bestimmten Prozessen zu detektieren. Eine schematische Übersicht über gebräuchliche Verfahren von zellulären Assays ist in Abb. 2 gezeigt.

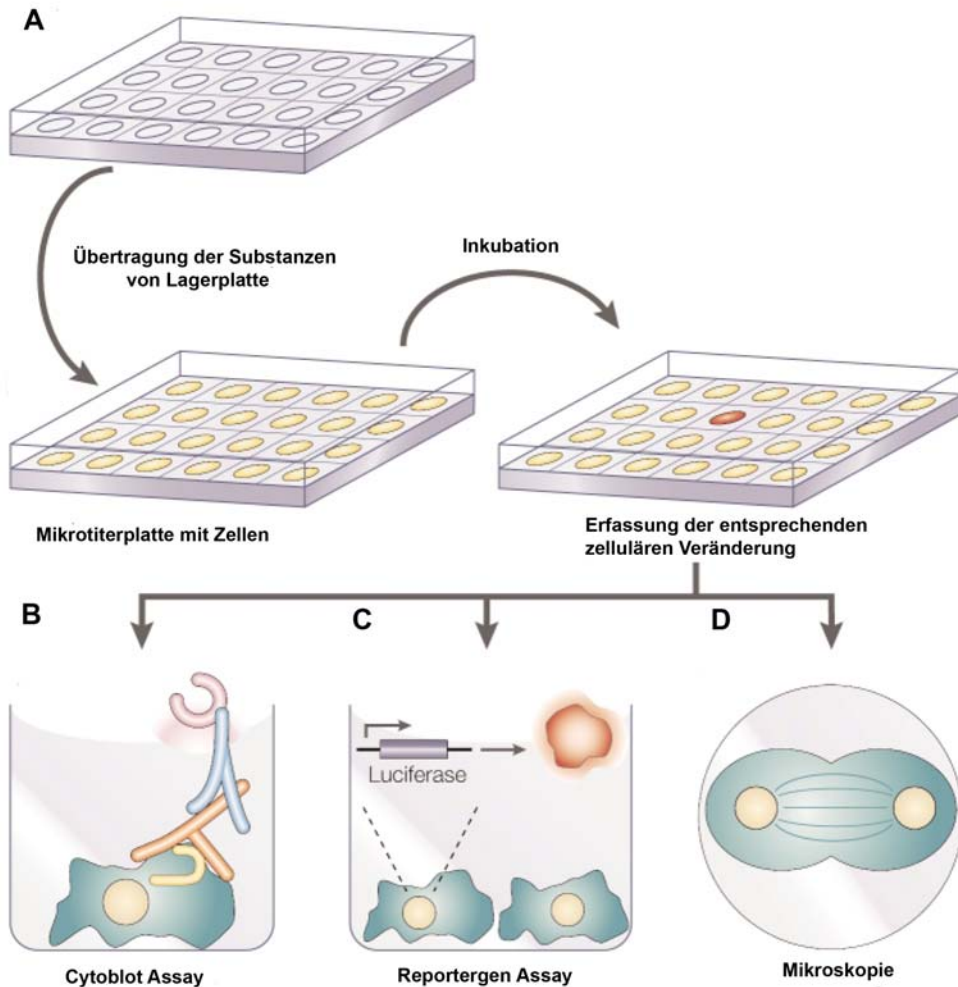


Abb. 2 (modifiziert nach Stockwell 2000)^[40]: Methoden von zell-basierten Hochdurchsatz-Screens. A) Um eine große Menge niedermolekularer Substanzen zu testen, werden in eine Mikrotiterplatte die zu untersuchenden Zellen ausgesät. Von einer Lagerplatte mit den Testsubstanzen wird eine geringe Menge jeder Substanz in die Mikrotiterplatte mit den Zellen überführt. **B) - D)** Verschiedene gebräuchliche Methoden um Effekte der Substanzen in den Zellen zu detektieren. **B)** Ein Antikörper detektiert posttranslationale Modifikationen oder biosynthetische Veränderungen in der Zelle. Ein zweiter Antikörper, welcher spezifisch an den ersten bindet, ist mit einem Enzym gekoppelt, welches eine chemiluminisente Reaktion katalysiert. **C)** Ein Reporter-gen Assay detektiert Veränderungen der Genexpression in Abhängigkeit von einem bestimmten Promotor. **D)** Morphologische oder prozessabhängige Veränderungen werden durch Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Jede Substanz, welche bei den angeführten Verfahren eine Veränderung induziert, wird für weitere Untersuchungen verwendet (gezeigt als rote Markierung in der Mikrotiterplatte).

Manche Prozesse führen in der Zelle zu spezifischen Veränderungen, welche dann mit Hilfe eines Antikörpers detektiert werden können. Dies können z.B. posttranslationale Modifikationen sein. Eine Technik, welche die Veränderungen in

hohem Durchsatz mit einem gekoppelten Antikörpersystem detektiert ist unter dem Namen „Cytoblot“ bekannt (siehe Abb. 2 B).^[7, 19] Ein anderes häufig verwendetes Verfahren ist der Reporter-Gen-Assay (siehe Abb. 2 C). Hierbei wird eine prozessabhängige Promotoraktivität anhand der damit verbundenen Anreicherung eines Proteins untersucht. Das angereicherte Protein besitzt entweder eine leicht zu messende enzymatische Aktivität (z.B. Luciferase) oder ist selbst fluoreszent (z.B. GFP). Mit dieser Methode werden vor allem Signaltransduktionswege in Zellen untersucht, die letztendlich zu der Aktivierung des jeweiligen Promotors führen. Mit dem enormen technischen Fortschritt im Bereich der automatisierten Lichtmikroskopie ist es möglich geworden, ganze Zellen oder Organismen in Mehrloch-Platten abzufotografieren (siehe Abb. 2 D). Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, verschiedene phänotypische Veränderungen gleichzeitig zu beobachten und nicht auf einen bestimmten Prozess limitiert zu sein. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, Proteinen oder spezifisch bindenden Substanzen ist die Hervorhebung bestimmter Strukturen und Proteine im zellulären Kontext möglich. Durch die automatisierte Fluoreszenz-Mikroskopie konnten somit z.B. die Struktur der mitotischen Spindel^[19], die nukleäre Translokation^[41], Proteintransport^[42] oder parasitäre Invasion^[37] im Assay-Format betrachtet werden. Die auf Mikroskopie basierenden Testsysteme produzieren eine sehr hohe Datenmenge, welche entweder durch spezielle Analyseprogramme oder manuell ausgewertet werden müssen. Die automatisierte Auswertung ist zeitsparender und weniger fehleranfällig als die manuelle Auswertung, bei der auch immer eine gewisse Voreingenommenheit des jeweiligen Experimentators berücksichtigt werden muss.^[37] Dafür können bei der manuellen Auswertung viele verschiedene Parameter gleichzeitig analysiert werden. Unter anderem auch Phänotypen, die schwer durch eine automatisierte Bildanalyse erfasst werden können.^[37] Der Grad der Automatisierung ist somit immer von dem geplanten Durchsatz, dem betrachteten Phänotyp sowie den finanziellen Möglichkeiten abhängig. Identifizierte aktive Substanzen müssen anschließend erneut getestet werden um ihre Aktivität zu bestätigen.

Darüber hinaus sollte die Planung von Assays auch weitere Folgeassays miteinbeziehen, mit deren Hilfe die Aktivität des Moleküls weiter verifiziert und evaluiert werden kann.^[43] Dies kann z.B. ein Vitalitätstest sein um die Abschwächung eines Reporter-Gen-Signals durch Inhibition des relevanten Signalweges von der durch Cytotoxizität der Substanz zu unterscheiden.

2.1.4 Methoden zur Identifikation und Validierung des Zielproteins

Der schwierigste und somit auch zeitintensivste Schritt eines vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes stellt die Identifikation des Zielproteins einer aktiven Substanz dar. Die einfachste Vorgehensweise ist eine wissenschaftlich fundierte Schätzung des möglichen Zielproteins und des anschließenden Nachweises. Hierbei kann man Informationen aus dem beobachteten biologischen Effekt, aus Ergebnissen anderer Screens oder durch eine Literaturrecherche nach Wirkungsweisen strukturell ähnlicher Moleküle verwerten.^[37] Die Identifikation von Eg5 als Zielprotein von Monastrol erfolgte durch ein solches Vorgehen. Der von Monastrol induzierte Phänotyp wurde mit den Phänotypen aus einem anderen zellulären Screen, bei dem verschiedenen Kinesine mit spezifischen Antikörpern inhibiert wurden, verglichen. Es stellte sich heraus, dass der Phänotyp bei inhibiertem Eg5 der gleiche wie bei Monastrol war.^[19]

Fehlen entsprechende Daten, um eine fundierte Schätzung zu machen, gibt es eine Vielzahl von Methoden, um das Zielprotein einer aktiven Substanz zu identifizieren. Diese kann man in zwei Bereiche unterteilen. Zum einen direkte Methoden, welche die Interaktion der Substanz mit dem Protein nutzen, um das Protein von den anderen zu isolieren und es anschließend zu analysieren. Zum anderen indirekte Methoden, die durch den Vergleich von spezifischen Veränderungen in Anwesenheit der aktiven Substanz Hinweise auf das gesuchte Zielprotein liefern. Sie geben gleichzeitig Auskunft über den Wirkungsmechanismus und liefern Profile zum Vergleich von bekannten und unbekanntem Wirkmechanismen.^[44, 45] Zu den direkten Methoden gehören die Affinitätsaufreinigung, der Phagen Display, das Three-Hybrid System oder Protein-Microarrays. Zu den indirekten Methoden gehören genomische Methoden wie der DNA-Microarray oder genetische Screens nach Resistenz oder einer erhöhten Sensitivität aufgrund von Haploinsuffizienz. Darüber hinaus gibt es indirekte Methoden in Form von Proteomanalysen und Metabolitanalysen. Jede Methode hat ihre Vor- und Nachteile und ist somit nicht generell einsetzbar, sondern sollte je nach Eigenschaften des Moleküls und der jeweiligen Fragestellung hin verwendet werden.^[46] Eine Übersicht der genannten Methoden ist in Abb. 3 gezeigt. Sie sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

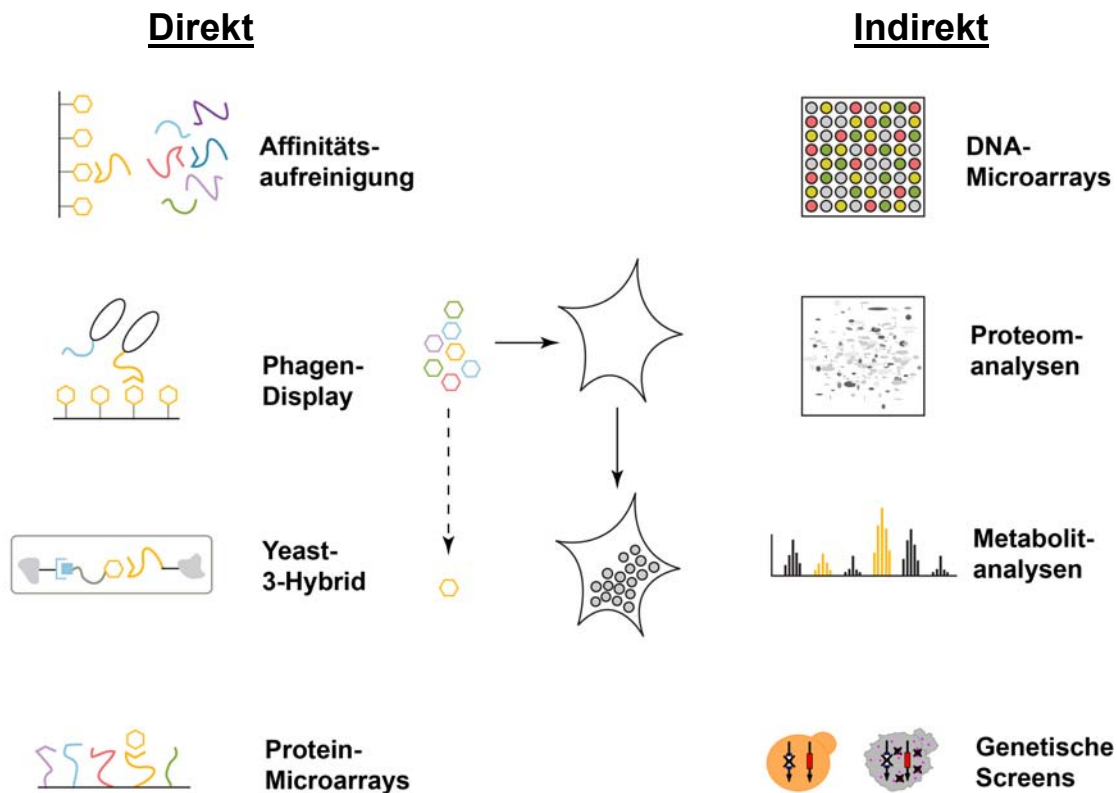


Abb. 3 (modifiziert nach Hart et al. 2005^[44]; Suter et al. 2006^[47]). **Zusammenfassung der Methoden zur Identifikation der Zielproteine von aktiven Substanzen aus zellulären Screens.** Auf der linken Seite (von oben nach unten) sind folgende direkte Identifikationsmethoden gezeigt: Affinitätsaufreinigung, bei der das immobilisierte, aktive Molekül dazu benutzt wird die bindenden Proteine aus Zellextrakten aufzureinigen. Phagen Display, bei dem die Zielproteine als Fusion mit Hüllproteinen des Phagen exprimiert werden. Durch das aktive Molekül isolierte Phagen können in späteren Schritten vermehrt und angereichert werden. Three-Hybrid-System, bei dem die aktive Substanz und mögliche Zielproteine als Fusion, Module eines Transkriptionsfaktors bilden, der nur bei Interaktion zur Expression von Reportergenen führt. Protein-Mikroarrays, bei denen die markierte aktive Substanz an auf einem Chip angeordnete Zielproteine bindet. Auf der Rechten Seite (von oben nach unten) sind zum einen systembiologische Methoden zur Analyse von zellulären mRNAs, Proteinen und Metaboliten gezeigt. Mit ihnen können Hinweise auf mögliche Zielproteine und auf mögliche Wirkmechanismen der aktiven Substanz gefunden werden. Zum anderen können durch genetische Screens die Gene identifiziert werden die, wenn sie mutiert sind, zur Hypersensitivität oder Resistenz von Modellorganismen gegenüber der Substanz führen. Die Abbildung in der Mitte repräsentiert einen zellulären Screen mit phänotypischer Veränderung durch eine aktive Substanz.

Bei der Affinitätsaufreinigung wird das aktive Molekül über einen Linker an eine feste Matrix oder an mit Streptavidin beladene Kügelchen gebunden. Diese werden dann mit dem Proteinextrakten inkubiert und im Folgenden durch wiederholte Waschschrte von unspezifischen Bindungen befreit. Die so isolierten Proteine

werden anschließend aufgetrennt, proteolytisch verdaut und massenspektrometrisch bestimmt.^[44, 48, 49] Bei dieser Methode muss gewährleistet sein, dass das verbundene Molekül noch immer seine biologische Aktivität behält, was die Verwendbarkeit einschränken kann. Zudem ist sie eher zur Detektion von häufig vorkommenden Proteinen geeignet, welche ausserdem eine starke Interaktion mit dem aktiven Molekül aufweisen sollten.^[50]

Um auch die Detektion von wenig vorkommenden Proteinen zu gewährleisten, werden Methoden angewandt, die auf Expressionsklonierungstechniken basieren. Hierbei werden die Zielproteine aus cDNA-Banken als Fusionsproteine exprimiert und somit angereichert. Bei dem Phagen Display wird eine cDNA Bibliothek so in das Genom von Phagen kloniert, dass Fusionen mit dem Gen für ein Hüllprotein erhalten werden. Das exprimierte Fusionsprotein präsentiert dann das Zielprotein auf der Oberfläche der Phagenhülle. Die Phagen werden mit dem immobilisierten Molekül inkubiert und nichtbindende Phagen können gewaschen werden. Die gebundenen Phagen werden in Bakterien vermehrt und erneut dem immobilisierten Molekül ausgesetzt. Auf diese Weise werden die am besten bindenden Proteine in drei bis fünf Runden von Exposition, Vermehrung und erneuter Exposition selektioniert und können anschließend analysiert werden.^[51] Hierbei ist zu beachten, dass die stärkste Bindung eines Proteins *in vitro* nicht unbedingt bedeutet, dass dieses Protein das vorrangige Ziel *in vivo* ist. Darüber hinaus können sie durch die Fusion mit dem Hüllprotein in ihrer Funktion oder Bindungseigenschaft mit dem Molekül verändert worden sein.^[52]

Eine weitere auf Expressionsklonierung basierende Methode stellt das Three-Hybrid-System dar. Dies macht sich den modularen Aufbau eines Transkriptionsfaktors der Hefe zunutze, welcher aus einer DNA-bindenden Domäne und einer Aktivierungsdomäne besteht. Nur wenn beide Domänen in räumliche Nähe gebracht werden, kann der Transkriptionsfaktor funktionell aktiv sein und zur Expression eines von ihm abhängigen Reportergens führen. Im Three-Hybrid-System wird das aktive Molekül mit der DNA-bindenden Domäne verbunden und die cDNA Bibliothek als Fusion mit der Aktivierungsdomäne exprimiert. Nur Fusionsproteine, die mit dem aktiven Molekül interagieren, führen somit zur Expression des Reportergens und können anschließend analysiert werden.^[53] Ein Vorteil dieses Systems ist, dass die Fusionsproteine im zellulären Milieu auf ihre Interaktion mit dem aktiven Molekül hin untersucht werden. Ein Nachteil hierbei ist aber, dass die intrazellulären Konditionen in der Hefe sich von denen höherer Eukaryoten signifikant unterscheiden können.^[46] Bei dem Protein Mikroarray werden die möglichen Zielproteine zu gleichen Mengen in einem Raster auf einen Glaschip aufgetragen. Die so angeordneten Proteine werden

mit dem aktiven Molekül, welches radioisotopisch- oder fluoreszenzmarkiert wurde, inkubiert. Nach mehreren Waschschritten werden diejenigen Proteine identifiziert, welche das markierte Molekül gebunden haben.^[54] Mit dieser Methode können somit auch schwach exprimierte Proteine identifiziert werden, die aber auch hier nicht in ihrem zellulären Kontext untersucht werden.

Bei den indirekten Methoden werden z.B. in einem DNA-Mikroarray Expressionsmuster auf RNA-Ebene in An- und Abwesenheit der aktiven Substanz verglichen.^[55] Ebenso kann man die Expressionsmuster auf der Proteinebene durch 2D-Gelelektrophorese untersuchen.^[56] Ein weiterer Ansatz ist die Untersuchung von Metabolitkonzentrationen und deren Änderungen in Anwesenheit der aktiven Substanz^[57]. Die mit diesen Methoden erfassten Veränderungen dienen als Signatur für den Wirkmechanismus und können mit Signaturen schon bekannter Wirkmechanismen verglichen werden. Hierbei kann man Hinweise über mögliche Zielproteine erhalten.^[44]

In genetischen Screens werden Modellorganismen zufällig oder gezielt mutiert und anschließend auf Resistenz oder Hypersensitivität gegenüber der Substanzwirkung untersucht. Eine Analyse der mutierten Gene kann dann wichtige Anhaltspunkte für die Zielproteine liefern.^[45, 47]

Sobald ein Zielprotein identifiziert wurde, muss bewiesen werden, dass das Molekül spezifisch an dieses Protein bindet und das dieses auch das wichtigste Ziel *in vivo* ist. Dies kann durch RNAi Experimente geschehen, welche denselben Phänotyp herbeiführen sollten, wie die Substanzapplikation. Wenn strukturelle Informationen vorhanden sind, können auch *in silico* Bindungsstudien durchgeführt werden. Hierbei ist eine elegante Methode das Zielprotein so zu mutieren, dass es anschließend, wenn es in der Zelle überexprimiert wird, zu einer Resistenz gegen die aktive Substanz führt.^[58, 59] Zur Validierung des Zielproteins sind noch weitere Ansätze möglich, welche je nach technischen Möglichkeiten und Art des Zielproteins angewendet werden können.^[60, 61]

Die chemische Genetik stellt somit einen Ansatz dar, der additiv zur klassischen Genetik wertvolle Beiträge zur Entschlüsselung von wichtigen biologischen Prozessen liefern kann. Dieses Vorgehen gewinnt umso mehr an Bedeutung, wenn es zu neuen Erkenntnissen von Prozessen führt, die im besonderen Interesse der Pharmakologie stehen. Sie kann hier zur Identifikation von neuen pharmakologischen Zielen beitragen und zugleich zur Entdeckung von Leitstrukturen führen. Im Folgenden soll auf einige biologische Prozesse und Strukturen eingegangen werden, welche im Fokus der in dieser Arbeit vorgestellten zellulären Testsysteme, als auch der aktuellen Pharma-Forschung stehen.

2.2 Ras-Proteine und Ras-abhängige Signalwege

2.2.1 Das Onkogen Ras

Die Zellen multizellulärer Organismen tauschen auf äußerst komplexe Art und Weise Informationen mit ihrer Umgebung aus. Der Informationsaustausch erfolgt hauptsächlich über extrazelluläre Signalmoleküle, die von ihren Zielzellen spezifisch erkannt werden. Diese vermitteln die Information über intrazelluläre Signalproteine zu den eigentlichen Zielproteinen, welche daraufhin eine Änderung erfahren. Die Änderung führt zu einer bestimmten Zellantwort auf das erhaltene Signal. Bei der intrazellulären Signalweiterleitung laufen häufig die Informationen an bestimmten Schaltstellen zusammen, welche das Signal dann moduliert weiterleiten. Die monomeren G-Proteine stellen eine Klasse von wichtigen membran-assoziierten Schaltstellen dar, die an Prozessen wie Vesikeltransport, Zellzyklus, Kernimport, Wachstum, Differenzierung und Fortbestand beteiligt sind. Von den monomeren G-Proteinen ist die Ras-Superfamilie die am besten untersuchte. Sie umfasst über hundert Proteine mit Größen von 20-40 kDa.^[62] Eine Untergruppe dieser Superfamilie wird von den Ras-Proteinen gebildet. Sie besteht aus den drei Isoformen Harvey-Ras (H-Ras), Kirsten-Ras (Kras4A und K-Ras4B) und Neuroblastoma-Ras (N-Ras) sowie R-Ras, TC21, Rheb und den Rap- und Ral-Proteinen.^[63] Da sich die Arbeit hauptsächlich mit den assoziierten Signalwegen der Ras-Isoformen H-, N- und K-Ras befasst, soll im Folgenden auf diese näher eingegangen werden. Ras-Proteine wurden in den achtziger Jahren erstmalig in retroviral ausgelösten Sarkomen von Ratten nachgewiesen, woher sie ihren Namen erhielten (rat sarcoma).^[64] Die kodierenden *ras* Gene sind die ersten entdeckten humanen Protoonkogene^[65-67] und es wird davon ausgegangen, dass ca. 30 % aller humanen Tumore aktivierende Punktmutationen in diesen Genen tragen.^[68] Hierbei haben die konstitutiv aktiven Ras-Proteine einen großen Einfluß auf verschiedene Aspekte des transformierten Phänotyps, wie z.B auf unkontrolliertes Wachstum, Unterdrückung des programmierten Zelltods, Invasivität und Angiogenese.^[69] Aufgrund dieser Korrelation wurde intensiv an den Ras-Proteinen geforscht, um ihre biochemische Funktion, Struktur und posttranslationalen Modifikationen sowie die von ihnen beeinflussten Signaltransduktionswege zu erörtern.^[70] Letztere sind deshalb besonders attraktive Ziele der Krebstherapie.^[71]

2.2.2 Ras als molekularer Schalter

Ras-Proteine wirken wie andere GTP-Bindungsproteine als molekulare Schalter. Sie wechseln zwischen zwei Konformationszuständen, dem aktiven GTP-gebundenen

und dem inaktiven, GDP-gebundenem. Der Übergang von der inaktiven in die aktive Form wird durch GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) stimuliert. Sie katalysieren die Freisetzung von GDP und stabilisieren den nukleotidfreien Zustand des Proteins. Dieses bindet im Folgenden GTP, da dessen Konzentration im Cytosol zehnfach höher als die von GDP ist.^[72] Die GTP gebundene Konformation erlaubt die Interaktion mit sogenannten Effektorproteinen, über die das Signal dann weitergeleitet wird. Die intrinsische GTP-Hydrolyserate von Ras ist mit $2.3 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ sehr niedrig und wird ebenfalls durch regulatorische Proteine, den GAPs (*GTPase activating proteins*) katalysiert.^[73] Die Regulierung der Ras Aktivität ist schematisch in Abb. 4 dargestellt. Punktmutationen bei den Aminosäuren an den Positionen 61 (Glutamin), 12 (Glycin) oder 13 (Glycin) führen zu einer stark abgeschwächten intrinsischen GTP-Hydrolyse und verhindern die durch GAPs katalysierte Inaktivierung von Ras. Hierdurch ist es konstitutiv im aktiven Zustand und wirkt somit onkogen.^[74, 75]

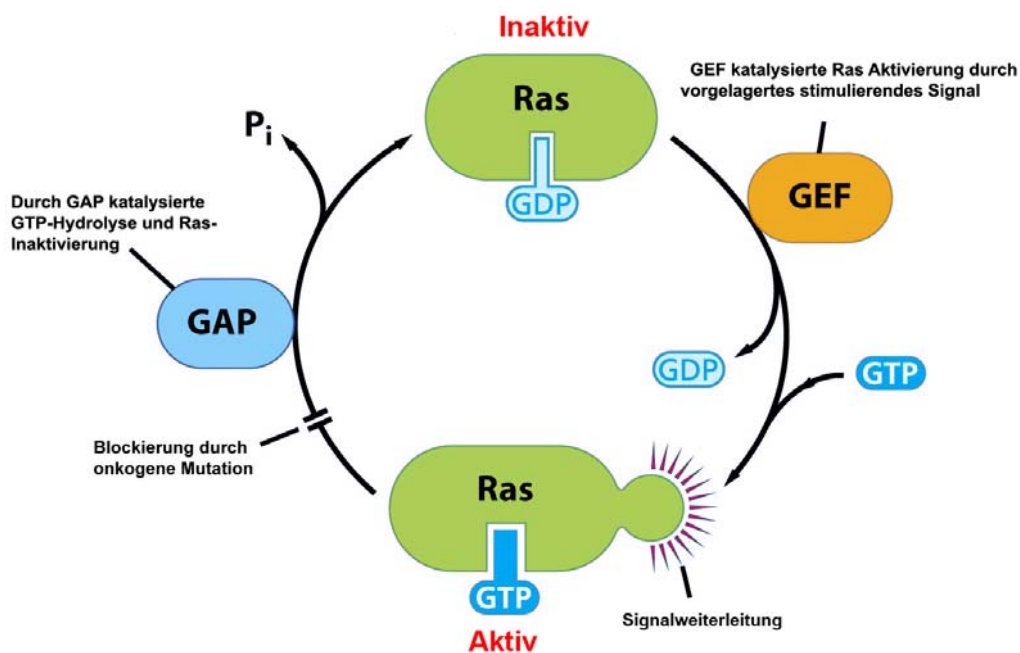


Abb. 4 (modifiziert nach Weinberg 2007)^[76]: Aktivierung und Inaktivierung des molekularen Schalters Ras. Durch ein stimulierendes Signal wird der Austausch von GDP durch GTP durch ein GEF katalysiert und somit Ras aktiviert. Mit Hilfe von GAP wird die Hydrolyse von GTP zu GDP beschleunigt und Ras wieder inaktiviert. Durch onkogene Mutationen wird die Hydrolyse von GTP verhindert, wodurch Ras konstitutiv aktiv bleibt.

2.2.3 Posttranslationale Modifikationen

Ras-Proteine werden an freien Polysomen im Cytosol synthetisiert. Sie erfahren anschließend eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen, durch welche sie erst mit Membranen interagieren können, um ihre biologische Aktivität auszuüben.^[77] Bei den posttranslationalen Modifikationen fungiert ein C-terminaler Sequenzabschnitt als Erkennungssequenz. Dieser wird als CAAX-Motiv bezeichnet, wobei C für ein Cystein, A für eine aliphatische Aminosäure und X für eine beliebige Aminosäure steht.^[78] Das CAAX-Motiv wird von der cytosolischen Farnesyltransferase oder Geranylgeranyltransferase Typ I erkannt. Hierbei ist die Aminosäure an Position X entscheidend dafür, welche Prenyltransferase letztendlich das Protein modifiziert. Bei einem Serin, Methionin, Alanin oder Glutamin an dieser Position wird das Protein am Cystein des CAAX-Motivs farnesyliert und bei einem Leucin geranylgeranyliert.^[79] Nach der Prenylierung wird an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums durch die Endopeptidase Rce1 (*Ras converting enzyme 1*) das AAX-Tripeptid abgespalten.^[80, 81] Das nun terminale Prenylcystein wird anschließend von Icmt (*Isoprenylcystein carboxyl methyltransferase*) methyliert.^[82] Die Ras Isoformen H-, N-Ras und K-Ras4A werden weiter modifiziert, da die Prenylierung noch nicht für eine stabile Membranassoziation reicht. Bei K-Ras4B sorgt eine Polylysin-Sequenz für eine stabile Membranassoziation.^[83] Am Golgi Apparat werden N-Ras und K-Ras4A an einem und H-Ras an zwei Cysteinen der hypervariablen Region zusätzlich palmitoyliert und anschließend über einen sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran befördert. Die Isoform K-Ras4B wird hingegen über einen bisher unbekanntem Transportweg, welcher nicht den Golgi-Apparat einschließt, zur Plasmamembran gebracht.^[84, 85] Eine schematische Übersicht der Prozessierungswege ist in Abb. 5 gezeigt. Es gibt Hinweise, dass die posttranslational modifizierten Ras-Proteine nicht ständig an der Plasmamembran verbleiben, sondern durch unterschiedliche Mechanismen an verschiedene Zellkompartimente und Organellen geleitet werden. Besonders H- und N-Ras befinden sich in einem ständigen Kreislauf zwischen der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat. Dieser Ras Zyklus scheint mit einer isoformspezifischen Signalmodulation in Verbindung zu stehen^[86] und wird in Abschnitt 2.2.5 näher erklärt.

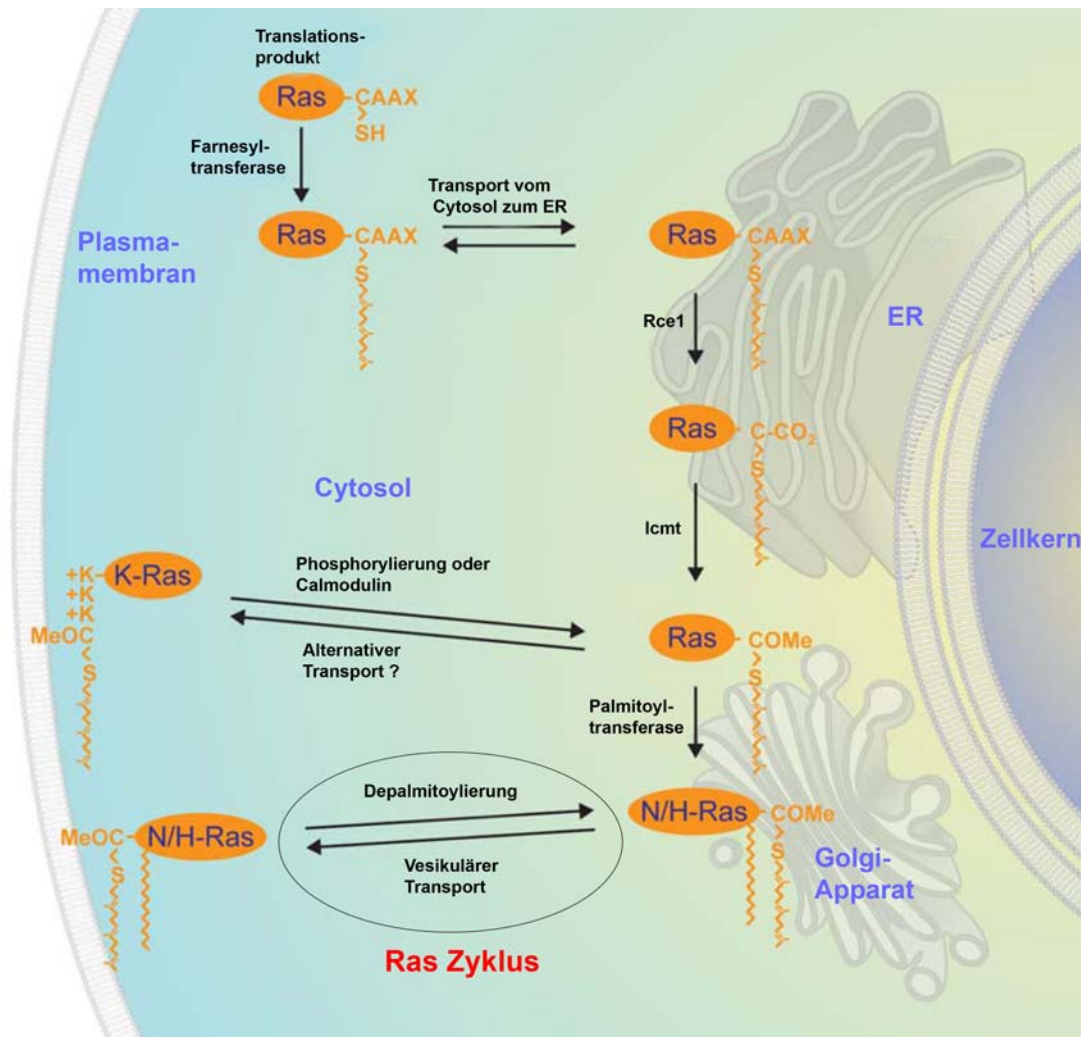


Abb. 5 (modifiziert nach Mor und Philips 2006)^[87]: Intrazelluläre Stationen der Ras Prozessierung. Ras wird an freien Polysomen im Cytosol synthetisiert. Hier bilden sie sofort die Substrate für eine der beiden Prenyltransferasen. Durch die Prenylierung gelangen die Proteine zum ER (Endoplasmatisches Retikulum). Hier werden die letzten drei Aminosäuren durch Rce1 (Ras converting enzyme 1) abgespalten und anschließend das farnesylierte Cystein durch das Enzym Icmt (Isoprenylcystein carboxyl methyltransferase) carboxymethyliert. K-Ras wird dann über einen noch unbekanntem Weg zur Plasmamembran transportiert und kann durch Phosphorylierung der hypervariablen Region oder Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig wieder zu den Endomembranen gelangen. Im Gegensatz dazu werden H- und N-Ras weiter am Golgi Apparat durch eine Palmitoyltransferase palmitoyliert und gelangen anschließend über Vesikeltransport zur Plasmamembran. Der rückwärtsgerichtete Transport zum Golgi Apparat erfolgt aufgrund einer Depalmitoylierung und einer erneuten Repalmitoylierung am Golgi Apparat. Der Kreislauf der Ras-Proteine zwischen Plasmamembran und Golgi Apparat, wird als Ras Zyklus bezeichnet.

2.2.4 Ras-abhängige Signalwege

Ras gelangt erst über die Assoziation mit der Plasmamembran in räumliche Nähe zu den regulatorischen Proteinen, durch welche es aktiviert werden kann, sowie zu Effektorproteinen über die die Signalweiterleitung erfolgt. Die verschiedenen Funktionen, mit denen Ras in Verbindung steht, weisen schon daraufhin, dass seine biologische Aktivität auf sehr komplexe Art und Weise gesteuert wird und auch die Signalwege unterhalb von Ras sehr vielschichtig sein müssen. So wird die Aktivität durch viele verschiedene GAPs und GEFs gesteuert, welche selbst wiederum durch komplizierte Prozesse reguliert werden. Auch die Signalweiterleitung erfolgt über eine Vielzahl von Effektoren welche zu spezifischen Zellantworten führen. Dabei beeinflussen sich die unterschiedlichen Signalwege aber auch gegenseitig, so dass die Zellantwort immer vom aktuellen Zustand der Zelle abhängig ist.^[70] Der am besten untersuchte Ras Signalweg ist der RAS-Raf-MEK-ERK-Signalweg (siehe Abb. 6). Dieser wird unter anderem durch die Bindung von Wachstumsfaktoren (wie z.B. des *Epidermal Growth Factors*, EGF) an ihre zugehörigen Proteintyrosinkinase-Rezeptoren (PTKR) aktiviert. Nach Ligandenbindung dimerisieren die Rezeptoren, wodurch eine gegenseitige Phosphorylierung der Tyrosinreste in den cytosolischen Domänen durch die intrinsische Kinaseaktivität erfolgt.^[88] Hierdurch wird eine Bindestelle für Signal- oder Adapterproteine geschaffen, welche eine *src-homology* (SH2)-Domäne enthalten. Hierzu gehört auch das Protein Grb2 (*growth factor receptor binding 2*) welches mit dem Ras-GEF SOS (*son of sevenless*) über seine SH3-Domäne verbunden ist. Dies bringt SOS in räumliche Nähe zu Ras, welches dadurch aktiviert wird.^[89] Durch den Austausch von GDP durch GTP erfährt Ras eine Konformationsänderung, durch die es an die eng verwandten Raf-Proteine (*rapid fibrosarcoma*), c-Raf1, B-raf und A-Raf binden kann. Diese werden daraufhin auch an die Plasmamembran rekrutiert und dort aktiviert. Die Aktivierung von Raf ist ein mehrstufiger Prozess, der die Dephosphorylierung von inhibitorischen Phosphatresten durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A), sowie aktivierende Phosphorylierungen durch verschiedene Kinasen miteinschließt.^[90, 91] Raf ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche im aktiven Zustand die Tyrosin/Threonin-Kinasen MEK 1 und 2 (*MAP/ERK kinase*) phosphoryliert.^[92-94] Diese phosphorylieren und aktivieren daraufhin ERK1 und 2 (*extracellular regulated kinase*).^[95] Die beiden in Säugern vorkommenden Isoformen von MEK und ERK werden in den meisten Fällen koreguliert, dennoch wird vermutet, dass sie unterschiedliche Funktionen ausüben können.^[96] Phosphoryliertes ERK gilt als der Haupteffektor dieser Signalkaskade und hat mehr als 160 Substrate im Cytosol, Cytoskelett oder Zellkern.^[97] Darunter auch das am besten untersuchte Zielprotein, den Transkriptionsfaktor ELK-1.^[98, 99]

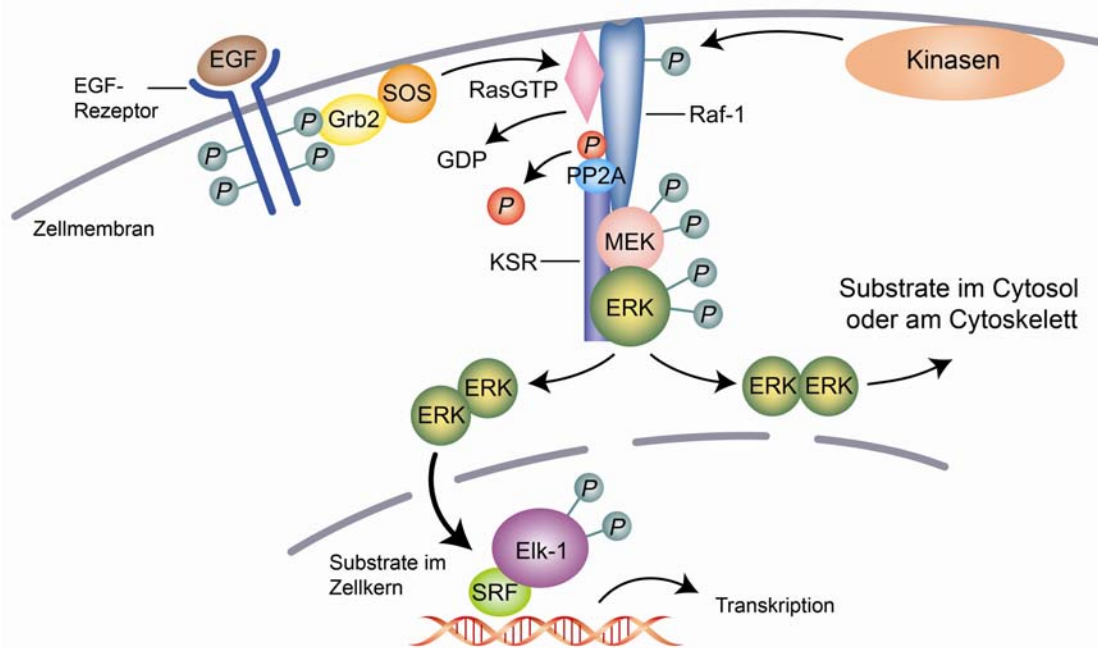


Abb. 6 (modifiziert nach Kolch et al 2002)^[100]: Organisation und Funktion des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweges. Die Bindung von EGF (epidermal growth factor) induziert eine Dimerisierung des EGF-Rezeptors. Dies führt zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinresten auf der cytosolischen Seite. Die Phosphotyrosine dienen als Bindungsstelle für Signalmoleküle wie den Grb2-SOS-Komplex. Hierdurch wird SOS in räumliche Nähe zu Ras gebracht, welches es durch Katalyse des Austausches von GDP zu GTP aktiviert. Ras besitzt in GTP-gebundener Form eine Konformation, die es an Raf-1 binden lässt. Raf-1 gelangt so vom Cytosol zur Plasmamembran. Dort wird es in einen mehrstufigen Prozess, welcher Dephosphorylierungen durch PP2A (Proteinphosphatase 2A) und Phosphorylierungen durch verschiedene Kinasen beinhaltet, aktiviert. Aktiviertes Raf-1 phosphoryliert und aktiviert daraufhin MEK (MAPK/ERK kinase), welche wiederum ERK (extracellular regulated kinase) durch Phosphorylierung aktiviert. Das Modul aus Raf-1, MEK und ERK wird durch das Gerüstprotein KSR (kinase suppressor of Ras) in räumlicher Nähe gehalten. Aktives ERK dimerisiert und besitzt viele verschiedene Substrate im Cytosol und im Zellkern und steht somit mit einer Vielzahl von Prozessen wie der Proliferation, Differenzierung und der Apoptose in Verbindung.

2.2.5 Der Ras Zyklus und die räumliche Ras Regulierung

Lange Zeit glaubte man, dass Ras seine Funktion nur an der Plasmamembran ausübt. Diese Ansicht wurde fragwürdig, als man Komponenten wie Grb2, SOS oder phosphoryliertes Raf-1 für längere Zeit nach EGF-Stimulation auch an Endosomen vorfand.^[101] Bisher war die Internalisation dieser Komponenten eher dem Signalabbruch zugeschrieben worden und weniger einer differenzierten Signalmodulation an diesen Kompartimenten. Die Modulation über verschiedene Internalisationswege, welche zum Abbau länger andauernder Signalweiterleitung oder Rückführung der Rezeptoren zur Plasmamembran führten, erweiterte somit das Bild der Regulation. Eine zusätzliche Facette wurde durch das Auffinden einer signifikanten Menge von N- und H-Ras am Golgi Apparat offenbar.^[84] Es konnte später gezeigt werden, dass über dieses Kompartiment eine Signalweiterleitung erfolgt, die unterschiedliche Kinetiken verglichen mit denen an der Plasmamembran aufweist. Die Aktivierung von H-Ras an der Plasmamembran ist schnell und nur von kurzer Dauer, wohingegen die Aktivierung am Golgi Apparat verspätet und langanhaltend ist.^[102] Somit wurde offensichtlich, dass die Signalregulation auch durch räumliche Separation an verschiedenen Zellkompartimenten stattfindet. Dies wurde durch die Entdeckung von organellspezifischen Gerüstproteinen, wie KSR (*Kinase suppressor of Ras*) an der Plasmamembran, Sef am Golgi Apparat oder MP1 an frühen Endosomen noch erweitert. Die Gerüstproteine bieten an den jeweiligen Organellen eine spezielle Umgebung für die aktiven Ras Isoformen und tragen so zum modulierten Aufbau von verschiedenen Signalkaskaden bei.^[96]

In Abschnitt 2.2.3 wurden die unterschiedlichen posttranslationalen Modifikation der Ras-Isoformen aufgezeigt. Die Tatsache, dass diese Isoformen ähnliche Präferenzen für die verschiedenen Effektoren und Regulatoren aufweisen^[103], wirft die Frage auf inwieweit die Isoformen unterschiedlich agieren oder reguliert werden. Der von Rocks et al. (2005)^[86] vorgestellte Ras-Zyklus stellt einen ersten Hinweis für die Klärung dieser Frage dar. Die Forscher entdeckten, dass die zelluläre Verteilung von H- und N-Ras durch einen Zyklus von De- und Repalmitoylierung kontrolliert wird. Hierbei wird Ras zunächst durch einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus depalmitoyliert. Es wird vermutet, dass dieses durch das Protein APT1 (*acyl protein thioesterase 1*) geschieht.^[104, 105] Weitere Hinweise darauf werden in Teilen dieser Arbeit vorgestellt. Depalmitoyliertes Ras verliert seinen Halt in der Membran und diffundiert so zwischen den Endomembranen im Cytosol hin und her. Am Golgi Apparat wird das einfach farnesylierte Ras wieder repalmitoyliert und bleibt somit stabil in dessen Membran. Über den sekretorischen Transportweg gelangt das repalmitoylierte Ras wieder an die Plasmamembran, wo der Zyklus von neuem

beginnt. Bei diesem Zyklus gibt es Unterschiede in den Kinetiken der Lipidmodifikationen zwischen den einzelnen Isoformen. Während K-Ras4B nicht von dem Zyklus betroffen ist, ist die Kinetik der Depalmitoylierung und anschließender Repalmitoylierung für N-Ras schneller als für H-Ras. Durch eine gleichbleibende Geschwindigkeit des sekretorischen Transports vom Golgi Apparat zur Plasmamembran ergibt sich hieraus eine ungleiche Verteilung dieser beiden Isoformen über das zeitliche Mittel. H-Ras ist somit vorwiegend an der Plasmamembran und N-Ras vorwiegend am Golgi Apparat lokalisiert. Rocks et al. fanden darüberhinaus heraus, dass an der Plasmamembran aktiviertes Ras über diesen Zyklus an den Golgi Apparat gelangt, wo es weiterhin aktiv ist und das Signal weiterleitet. Es gibt immer mehr Hinweise, dass der Golgi Apparat eine Signalplattform darstellt, welche deutlich von der Plasmamembran zu unterscheiden ist. Daher führt die Signalweiterleitung hierüber auch zu differierenden Antworten.^[106] In Anbetracht der unterschiedlichen Kinetiken der einzelnen Isoformen wird so offensichtlich, auf welche feingesteuerte Art die Signalweiterleitung koordiniert wird. Für die Koordination der verschiedenen Ras abhängigen Prozesse ist daher die zeitliche und räumliche Verteilung, sowie die Aktivitätsdauer der einzelnen Ras-Proteine von erheblicher Bedeutung. Mit fortschreitendem Gewinn an Informationen, wie sich die einzelnen Signalwege gegenseitig beeinflussen, erlangt die Art der zellulären Informationsverarbeitung immer mehr an Struktur. Diese wird in Zukunft aber nur mit systembiologischen Ansätzen zu erfassen sein.

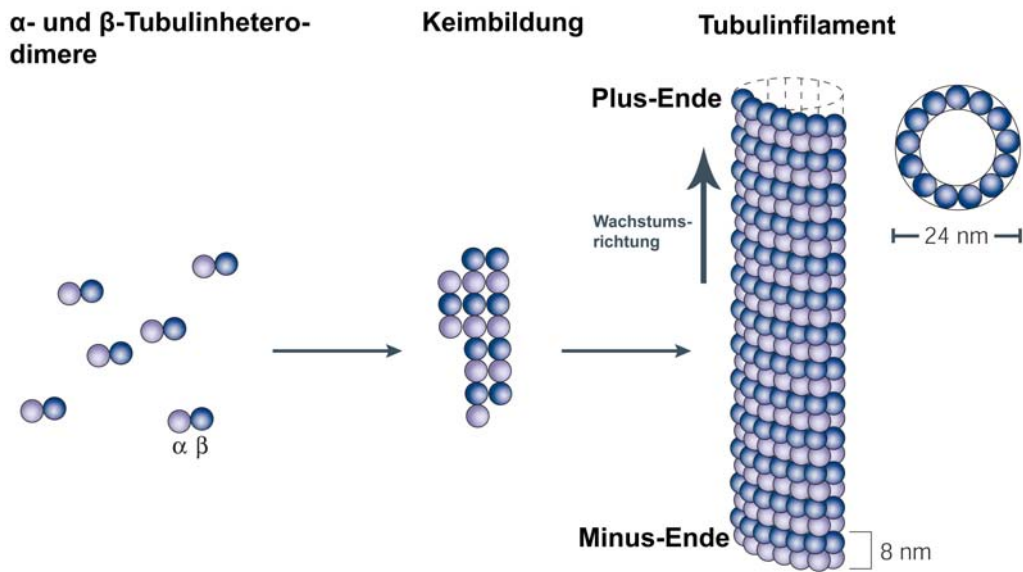
2.3 Komponenten des Cytoskeletts und ihre Aufgabe bei der Mitose

Das Cytoskelett der eukaryotischen Zelle ist ein umfangreiches Fasergeflecht, welches aus den Intermediärfilamenten, den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten zusammengesetzt ist. Seine Hauptfunktionen sind die Formerhaltung der Zelle, die Motilität, intrazelluläre Transportprozesse sowie die Beteiligung bei der Zellteilung. Bei Letzterer kommt vor allem den Mikrotubulistrukturen als Hauptkomponente des Spindelapparates sowie den Aktinfilamenten, als wichtige Komponente bei dem Prozeß der Cytokinese, eine gewichtige Aufgabe zu. Dies ließ sie zu interessanten Zielen bei der Krebstherapie werden. Im Folgenden sollen einige grundlegende Eigenschaften dieser Filamente und ihre Rolle bei dem eukaryotischen Zellzyklus beschrieben werden.

2.3.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind lange röhrenförmige Proteinpolymere mit einem äußeren Durchmesser von 24 nm. Die Röhrenstruktur wird von 13 Protofilamenten gebildet, die wiederum aus den Untereinheiten α - und β -Tubulin bestehen (siehe Abb. 7 A). Die Tubulinuntereinheiten bilden Heterodimere, wobei jede Untereinheit noch ein GTP bzw. GDP-Molekül gebunden hat. Die α -Untereinheit bindet ein GTP-Molekül wohingegen die β -Untereinheit GTP oder GDP binden kann. ^[107] Letzteres ist für die Dynamik des Filaments von Bedeutung. Aufgrund dieser Dynamik können die Tubulin-Polymere die Zellform bestimmen oder, als relativ starre Strukturen, Schienen für Transportprozesse bilden und bei der Zellteilung die Spindel ausbilden. Die Bildung eines Tubulinpolymers beginnt mit der Zusammenlagerung von einigen wenigen Untereinheiten zu einem Keim. Dieser Schritt ist der langsamste, da die kleinen Aggregate durch die lose Bindung der Untereinheiten schnell wieder zerfallen. Je mehr Untereinheiten hinzukommen, desto stabiler wird der Komplex und kann somit als Ausgangsbasis zur Filamentpolymerisation dienen. Diese erfolgt dann auch sehr schnell bis ein bestimmtes Gleichgewicht erreicht ist, bei dem die Konzentration von freien Untereinheiten einen weiteren Einbau nicht mehr zulässt. Das Wachstum eines Filaments kann somit in drei Phasen unterteilt werden: Die Verzögerungsphase, die Wachstumsphase und die Gleichgewichtsphase (siehe Abb. 7 B).

A



B

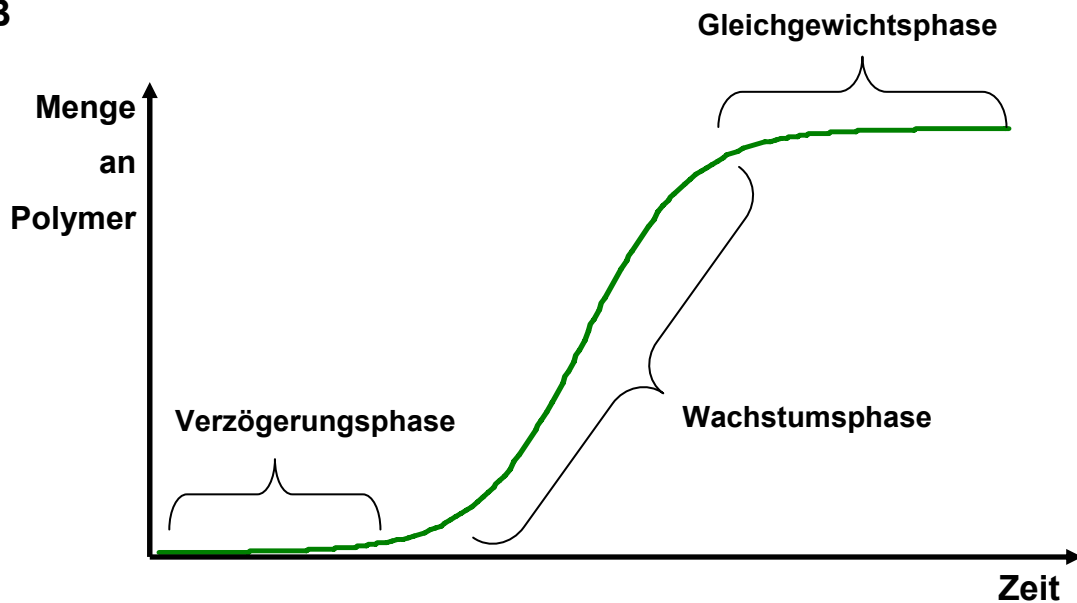


Abb. 7 (modifiziert nach Jordan und Wilson 2004)^[107]: Tubulinpolymerisation.

A) Heterodimere aus α - und β -Tubulin aggregieren zu einem Keim. Darauf erfolgt die Elongation des Tubulinfilaments. Dieses ist wie ein Zylinder aufgebaut der aus 13 Protofilamenten zusammengesetzt ist. Die Enden des Filaments unterscheiden sich in ihren dynamischen Eigenschaften und werden daher als Plus- bzw. Minus-Ende bezeichnet. **B)** Die Zusammenlagerung der Proteinuntereinheiten zu einem Polymer verläuft meist nach folgendem zeitlichen Schema. Wegen der kinetischen Barriere bei der Keimbildung beginnt die Polymerisation mit einer Verzögerungsphase. Nach der Keimbildung können weitere Untereinheiten stabil gebunden werden und es beginnt die Wachstumsphase. Bei der abschließenden Gleichgewichtsphase sind Anlagerung und Abbau ausgeglichen.

Die Tubuline weisen zwei verschiedene dynamische Eigenschaften auf. Zum einen gibt es die als „dynamische Instabilität“ bezeichnete alternierende Verlängerung oder Verkürzung des Polymers. Die Enden eines Tubulinfilaments sind in ihren Kinetiken der Anlagerung und des Abbaus von Untereinheiten nicht identisch. Das sog. Plus-Ende verlängert oder verkürzt sich viel schneller als das sog. Minus-Ende. Dies führt dann bei bestimmten Bedingungen zu einem Nettowachstum oder zu einer Verkürzung. Die einzelnen Phasen können sich sehr schnell abwechseln, was die Dynamik des Filaments ausmacht. Die Bedingungen hängen zum einen von der Konzentration der freien Tubulinuntereinheiten, bestimmten Salzkonzentrationen, Hilfsproteinen sowie von der Hydrolysegeschwindigkeit des von β -Tubulin gebundenem GTP zu GDP ab. Letzteres erfolgt bei oder kurz nach Anbindung der Heterodimere an das Filament und hat Einfluß auf die erforderliche kritische Konzentration von freien Untereinheiten, die überschritten werden muss um eine Nettoanlagerung von Untereinheiten an diesem Ende zu bewirken.^[107-110] Eine weitere dynamische Eigenschaft wird als „Tretmühlenmechanismus“ bezeichnet. Hier sind die Bedingungen so eingestellt, dass am Plus-Ende mit gleicher Geschwindigkeit Untereinheiten angelagert werden, wie sie am Minus-Ende abgebaut werden. Die Länge des Tubulinpolymers bleibt somit konstant, wobei die Untereinheiten kontinuierlich von einem Ende zum anderen wandern.^[107-110]

2.3.2 Aktinfilamente

Aktinfilamente sind zweisträngige helikale Polymere mit einem Durchmesser von 8 nm. Sie werden aus den monomeren globulären Protein G-Aktin gebildet, welches eine Masse von 43 kDa besitzt. Aktin Filamente, das sog. F-Aktin, sind zusammen mit einer großen Anzahl weiterer Proteine an der Festlegung der Zellform, der Zellbewegung und bei der Positionierung von bestimmten Proteinkomplexen an der Zellmembran beteiligt. Im Zusammenspiel mit Myosin werden Zugkräfte für die Muskelkontraktion sowie das Abschnüren der Tochterzellen bei der Cytokinese generiert.^[111, 112] Aktinfilamente weisen in ihren Polymerisationseigenschaften erhebliche Parallelen zu den Tubulinfilamenten auf. So besitzen sie auch eine Polarität, welche die beiden Enden des Polymers unterscheidbar werden läßt. Aufgrund seiner Erscheinungsform wird das Plus-Ende des Aktinfilaments als „Bart“-Ende und das Minus-Ende als „Spitz“-Ende bezeichnet. Aktinmonomere binden Nukleotide in Form von ATP bzw. ADP.

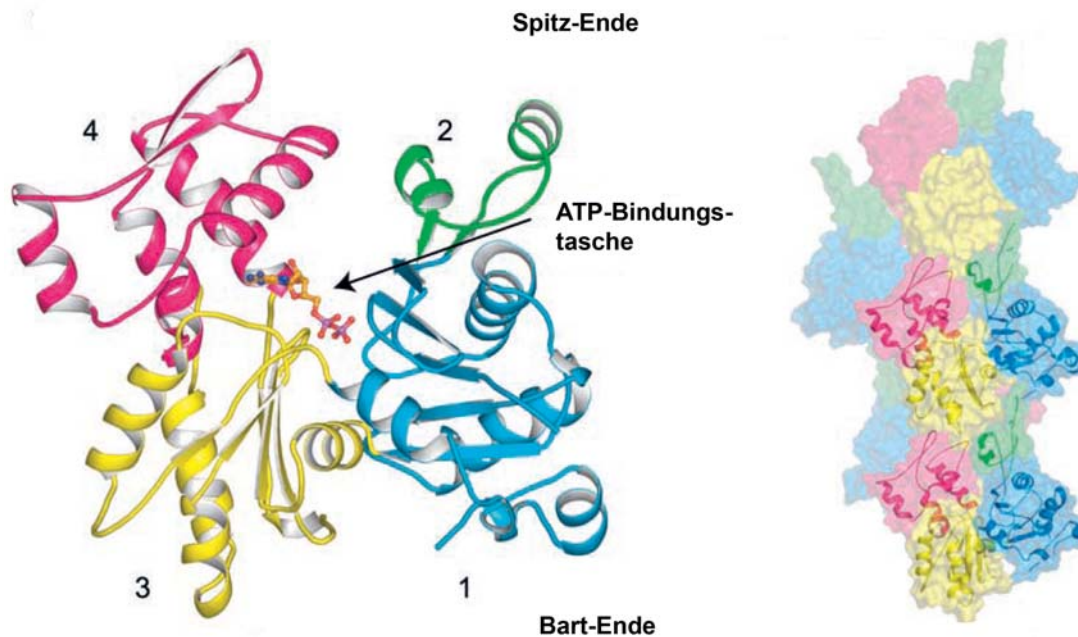


Abb. 8 (modifiziert nach Allingham et al. 2006)^[111]: Strukturen von G- und F-Aktin. Auf der linken Seite ist die Ribbon Darstellung eines Aktinmonomers mit gebundenen Nukleotid gezeigt. Die vier Domänen sind individuell angefärbt. Auf der rechten Seite ist ein Modell eines Aktinfilaments gezeigt, welches aus fünf Monomeren zusammengesetzt ist. Aktin Filamente besitzen eine Polarität und ihre Enden werden aufgrund vom mikroskopischen Erscheinungsbild als Bart- und Spitz-Ende bezeichnet.

Es gelten ähnliche dynamische Eigenschaften, wie sie bereits für das Tubulinfilament beschrieben wurden.^[110, 111, 113] So ist die Polymerisation eines Filaments ebenfalls durch eine Verzögerungsphase, eine Wachstumsphase und eine Gleichgewichtsphase gekennzeichnet. Die kritische Konzentration der freien Monomere ist unter physiologischen Bedingungen am Plus-Ende fast zehnmal niedriger als am Minus-Ende. Hierdurch ist während der Wachstumsphase eine rasche Verlängerung am Plus-Ende zu beobachten. Auch der Tretmühlen-Mechanismus wird bei Aktinfilamenten beobachtet, wobei die Anlagerung am „Bart“-Ende und der Abbau am „Spitz“-Ende geschehen. Im Prinzip könnte auch die dynamische Instabilität bei Aktinfilamenten auftreten, da die ATP-Hydrolyse ähnliche Auswirkungen auf die kritische Konzentration an dem Polymerende hat. Dies wurde aber noch nicht beobachtet.^[110, 111, 113]

2.3.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt den ganzen Lebenszyklus einer Zelle beginnend nach einer erfolgten Zellteilung (Mitose) bis hin zur erneuten Teilung. Dieser wird in verschiedene Phasen unterteilt: Die G1-Phase (*Gap phase 1*), S-Phase (*synthesis phase*), G2-Phase (*Gap phase 2*) und die M-Phase (*mitotic phase*). Der Zeitraum zwischen zwei Mitosen wird auch als Interphase zusammengefasst. In der G1-Phase erfolgt das Wachstum der Zelle, wobei verschiedene Zellbestandteile ergänzt werden und die Zelle auf die nachfolgende Synthesephase vorbereitet wird. Diese Phase ist sehr von äußeren Faktoren beeinflusst durch welche die Zelle das Signal bekommt, einen weiteren Teilungszyklus zu durchlaufen, oder in einem als G₀-Phase bezeichneten Ruhezustand zu verharren (siehe Abb. 9 A). In der S-Phase wird das komplette Genom der Zelle verdoppelt. Die folgende G2-Phase dient der Kontrolle der korrekten DNA-Replikation, sowie der Vorbereitung auf die anschließende Mitose. Bei dieser geschehen starke Umstrukturierungen innerhalb der Zelle, so dass sie selbst in mehrere Phasen unterteilt werden kann (siehe Abb. 9).

In der Prophase verdichten sich die Chromosomen, die Centrosomen wandern auseinander und bewegen sich zu den Zellpolen. Die Centrosomen sind Orte an denen die Keimbildung von den Mikrotubuli unterstützt wird und von denen daher die Ausbildung des Spindelapparates ausgeht. Sie werden ihrer Funktion nach auch als MTOZs (*Mikrotubuli-organisierende Zentren*) bezeichnet.^[114] Während der folgenden Prometaphase zerfällt die Kernhülle und die Spindelmikrotubuli wachsen bis in die Mitte der Zelle wo die Chromosomen weiter kondensieren. Hierbei entstehen Verbindungen dieser Tubulinfasern mit den als Kinetochore bezeichneten Anheftungstellen der Chromosomen. Durch die beiderseitige Anheftung von Spindelfasern, welche von entgegengesetzten Spindelpolen ausgehen, werden die Chromosomen in einer zentralen Ebene der Zelle ausgerichtet. An dieser Stelle existiert ein wichtiger Kontrollpunkt des zelleigenen Zykluskontrollsystems auf den im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. In der zentralen Ebene ausgerichtete Chromosomen werden als Metaphaseplatte bezeichnet. Dies bedeutet, dass in jedem Chromosom die Kinetochore der beiden Schwesterchromatiden über Mikrotubuli mit den beiden Zellpolen verbunden sind und somit der Spindelapparat voll ausgebildet ist. In diesem Zustand befindet sich die Zelle in der Metaphase. Bei der anschließenden Anaphase werden die Schwesterchromatiden durch Verkürzung der Kinetochormikrotubuli zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen. In der abschließenden Telophase bildet sich die Kernhülle zurück, die Chromosomen decondensieren und die Zelle teilt sich in der Cytokinese.^[115, 116] Hierbei wird ein kontraktiler Ring an der Plasmamembran ausgebildet, welcher aus einem Netzwerk

von Aktin- und Myosinfilamenten besteht. Durch die Motoraktivität des Myosins werden die Aktinfilamente so aneinander vorbei bewegt, dass der Ring kontrahiert und so die Zelle in zwei Tochterzellen geteilt wird.^[117]

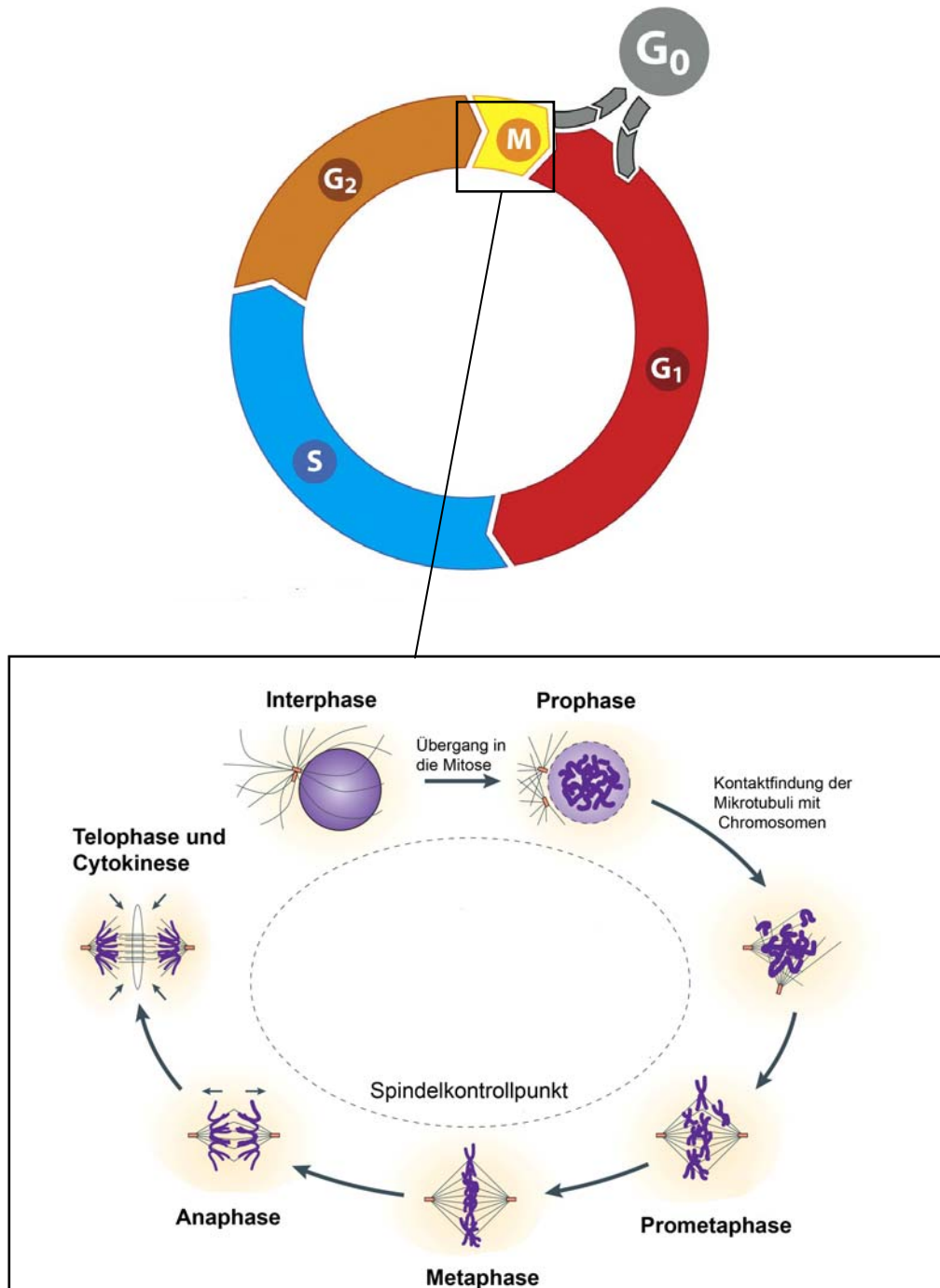


Abb. 9 (modifiziert nach Weinberg et al. 2007 und Jackson et al. 2007)^[76, 118]: **Der Zellzyklus.** Der Zellzyklus wird in die G₁-, S-, G₂-Phase und M-Phase unterteilt. Erhalten Zellen keine Signale zur weiteren Proliferation, können sie in einem Ruhezustand verharren. Dieser wird als G₀-Phase bezeichnet. Die Mitosephase ist selbst in die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt. Letztere schließt mit der Cytokinese ab.

2.3.4 Zellzyklusregulation und Zellzykluskontrollpunkte

Das Durchlaufen des Zellzyklus wird durch verschiedene posttranslationale Modifikationen von regulatorischen Proteinen kontrolliert. Hierbei sind Phosphorylierungen durch Proteinkinasen und Polyubiquitinierungen die dominantesten Modifikationen.^[119] Die wichtigsten und am besten charakterisierten regulatorischen Proteine sind die CDKs (*cyclin dependent kinase*) und ihre regulatorischen Proteine, die Cykline. Die Cyklin-abhängigen Kinasen sind nur aktiv, wenn sie mit einem spezifischen Cyklin einen Komplex bilden. Verschiedene Kombinationen von Cyklin/CDK-Komplexen aktivieren spezifische Prozesse in den einzelnen Phasen des Zellzyklus. Durch koordinierte Expression und Degradierung der Cykline während des Zellzyklus, werden die Aktivitäten der CDKs gesteuert und somit das Voranschreiten im Zellzyklus reguliert.^[120] Allerdings existieren unterschiedliche Kontrollmechanismen innerhalb dieser Abläufe, welche das Fortschreiten im Zellzyklus erst zulassen, wenn bestimmte Bedingungen durch die vorherigen Prozesse erfüllt sind. Während des gesamten Zellzyklus kann man vier wichtige Kontrollpunkte ausmachen.^[76, 121] Am G1-Phase Kontrollpunkt wird überprüft, ob die DNA vor Eintritt in die S-Phase beschädigt ist. Ist dies der Fall, wird der Zyklus für die Dauer der Reparatur angehalten. Der S-Phase Kontrollpunkt verzögert das Voranschreiten der Replikation im Falle von DNA Schäden.^[122] Beim Übergang von der G2-Phase in die M-Phase sichert der G2-Phase Kontrollpunkt die vollständige und fehlerfreie Replikation des Genoms ab, bevor die Zelle in die Mitose übergeht. Während der Mitose kontrolliert der sehr effiziente Spindelkontrollpunkt, ob alle Chromosomen in korrekter Form mit der mitotischen Spindel verbunden sind. Erst dann kann die Anaphase fortgeführt werden. Die Anaphase wird gestoppt, sobald Kinetochore nicht oder in nicht korrekter Weise mit der Spindel verbunden sind und somit keine Zugkraft auf sie ausgeübt wird.^[123] Defekte bei diesem Kontrollpunkt können daher zu fehlerhafter Chromosomenverteilung führen und so erheblich zur Krebsentstehung beitragen. Komponenten, welche in die Prozesse des Spindelkontrollpunktes und der Chromosomentrennung involviert sind, stellen beliebte Ziele der Krebstherapie dar. Dies liegt daran, dass ein dauerhaft aktivierter Spindelkontrollpunkt letztendlich zum Zelltod führt.^[110, 124] Da die Zellteilungsrate bei Krebszellen höher liegt, als bei gesunden Zellen, ist hier ein gewisser Grad an Selektivität gegeben. Substanzen, welche auf Tubulin wirken, können somit die erforderliche Dynamik der Spindel beeinflussen und so zu einem mitotischen Halt führen. Auf diese Weise wirken z.B. Taxol und Vinblastin, welche schon erfolgreich in der Krebstherapie angewendet werden.^[109]

Auf ähnliche Art können auch Substanzen wirken, welche einen Effekt auf Aktin haben. Durch einen Defekt bei der Ausbildung des kontraktilen Rings bei der Cytokinese verhindern sie eine weitere Proliferation und bremsen somit das Tumorwachstum. Des Weiteren treten in transformierten Zellen viele Veränderungen auf, welche mit dem Aktinskelett in Verbindung stehen. Dies führt dann zu den aggressiven Charakteristika von transformierten Zellen wie kontaktunabhängiges Wachstum, Zellwanderung und Invasivität.^[111] Daher sind Substanzen, welche auf das Aktinskelett oder auf die mit ihm im Zusammenhang stehenden Proteine wirken, interessante Kandidaten für die Krebstherapie. Aber auch allgemein können Substanzen welche auf das Cytoskelett direkt oder indirekt wirken, zur weiteren Erforschung der mit ihm in Verbindung stehenden Prozesse und Komponenten dienen.

3. Ziel der Arbeit

Der vorwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz beinhaltet die Herstellung attraktiver Substanzbibliotheken, die anschließende Identifikation von aktiven Substanzen und die Validierung der modulierten Zielproteine. Hierdurch können die biologischen Funktionen der jeweiligen Zielproteine in ihrem zellulären Kontext eingehend analysiert werden.

Das Vorhandensein einer hauseigenen Substanzbibliothek machte daher die Etablierung von geeigneten zellulären Testsystemen zur Identifikation von aktiven Substanzen erforderlich. Bisher wurden diese *in vitro* auf ihre Wirkung auf einige selektionierte Proteine hin untersucht. Durch die Etablierung von zellulären Testsystemen sollte die Möglichkeit geschaffen werden, ein viel breiteres Wirkungsspektrum zu detektieren. Darüber hinaus werden die Fähigkeit der einzelnen Verbindungen, die Zellmembran zu passieren und ihre Wirkungsweise in einem zellulären Kontext erfasst. Die Testsysteme sollten hierbei auf Prozesse fokussiert sein, welche in engem Zusammenhang mit der Krebsentstehung stehen und somit auch pharmakologisch interessant sein können.

Daher sollte ein Reporterger System etabliert und miniaturisiert werden, welches die Signalweiterleitung nach Stimulation von HeLa Zellen mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor bis hin zum Transkriptionsfaktor ELK1 detektiert. Hiermit sollte nach Substanzen gesucht werden, welche auf Komponenten dieser Signalweiterleitungskaskade wirken. Die PathDetect[®]-HLR-ELK1-Zelllinie der Firma Stratagene stellt die notwendigen zellulären Voraussetzungen für das beschriebene Reporterger System dar und sollte daher für die Etablierung verwendet werden.

Mit Hilfe der MDCK-F3 Zelllinie, welche oncogenes H-RasG12V konstitutiv exprimiert, können Modulationen der durch H-RasG12V induzierten Signalweiterleitung durch phänotypische Veränderungen mikroskopisch detektiert werden. Mit dieser Zelllinie sollte ein Testsystem etabliert werden, welches die Identifikation von Substanzen erlaubt, die in der angesprochenen Weise auf diese Zellen wirken. Dieses sollte auf ein 384-Loch-Platten Format miniaturisiert werden.

Durch die spezifische fluoreszente Anfärbung der Cytoskelettelemente Aktin und Tubulin und der DNA von BSC-1 Zellen, können Wirkungsweisen von Substanzen auf die Dynamik dieser Strukturen sowie auf den Zellzyklus fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Auf dieser Grundlage sollte ein weiteres Testsystem etabliert werden, welches ebenfalls die Identifikation von aktiven Substanzen in einem 384-Loch-Platten Format erlaubt.

Mit den etablierten Systemen sollten Substanztests durchgeführt werden und die hierbei identifizierten Verbindungen in ihrer biologischen Wirkung näher charakterisiert werden.

Im Zusammenhang eines rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes konnte ein spezifischer Inhibitor der Acylprotein Thioesterase1 synthetisiert werden. Dieser Inhibitor sollte daher für Studien zur biologischen Funktion von APT1 verwendet werden. Bei diesen Studien sollte auf die Auswirkung der APT1 Inhibition auf den Ras-Zyklus und die damit verbundene Signalweiterleitungseigenschaften untersucht werden.

4. Material

4.1 Plasmide

YFP-H-RasG12V-, Citrine-H-Ras-, Citrine-N-Ras- und Cherry-H-RasC181S,C184S-Plasmide wurden von Dr. Oliver Rocks hergestellt.^[86]

4.2 Eukaryotische Zelllinien

HeLa	Epithelzellen des Zervixkarzinoms einer Frau mit dem Namen <u>Henrietta L</u> acks. ATCC CCL-2
HLR-ELK1	HeLa Zellen, stabil transfiziert mit einer Luciferase Reporter Kasette und dem offenen Leseraster des GAL4 DBD-ELK1 Fusionsproteins unter Kontrolle eines CMV Promotors. (800055; Stratagene, La Jolla, USA)
MDCK	<u>M</u> adine <u>D</u> arby <u>C</u> anine <u>K</u> idney Zellen. Isoliert aus der Niere von <i>Canis familiaris</i> (Cocker Spaniel) ATCC CRL-1651
MDCK-F3	MDCK-Zellen stabil transfiziert mit onkogenem <i>v-H-Ras</i> . Erhalten von Prof. Oliver Müller (Fachhochschule Kaiserslautern)
BSC-1	Epithelzellen isoliert aus der Niere von <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze). ATCC CCL-26
TC21	HeLa Zellen, stabil mit GFP- α -Tubulin und GFP-CENP-A transfiziert. Verwendet im Labor von Prof. Thomas U. Mayer (Universität Konstanz).
HeLa-GFP-H2B	HeLa Zellen, stabil transfiziert mit GFP-Histon2B. Verwendet im Labor von Prof. Anthony A. Hyman (Max-Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik)

U2OS-Cherry-

Tubulin

Zellen isoliert aus einem humanen Osteosarkom, stabil mit Cherry-Tubulin transfiziert. Verwendet im Labor von Prof. Anthony A. Hyman (Max-Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik)

4.3 Antikörper und Proteinstandards

4.3.1 Antikörper

Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper	(9101; Cell Signaling Technology, Danvers, USA)
p44/42 Map Kinase Antikörper	(9102; Cell Signaling Technology, Danvers, USA)
Living Colors [®] Full-Length A.v. Polyklonaler Antikörper	(632460; Clontech, Mountain View, USA)
Monoklonaler Anti-GFP-Antikörper	(G6795; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper, Meerrettichperoxidase konjugiert, Immunopure	(31460; Pierce, Rockford, USA)
IRDye [®] 680 konjugierter Ziege-Anti-Maus Antikörper	(926-32220; LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)
α -Tubulin-FITC Antikörper	(F2168; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

FITC-Anti E-Cadherin Antikörper (612130; Becton Dickinson, Heidelberg, D)

4.3.2 Proteinstandards

Precision Plus Protein™ Dual Color (161-0374; BioRad, Hercules, USA)

Precision Plus Protein™ Kaleidoscope® (161-0375; BioRad, Hercules, USA)

BenchMark™ Prestained (10748-010; Invitrogen, Karlsruhe, D)

Magic Mark™ XP Standard (LC5602; Invotrogen, Karlsruhe, D)

4.4 Chemikalien und Reagenzien

Es wurden Chemikalien, soweit nicht gesondert angegeben, der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, D), Fluka (Neu-Ulm, D), Merck (Darmstadt, D), Riedel-de-Haen (Seelze, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D) oder Serva (Heidelberg, D) in jeweils höchster Reinheit verwendet.

Aminosäuren, nicht-essentiell, 100x (11140; GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

Biotin-BMCC (21900; Pierce, Rockford, USA)

CO₂-unabhängiges Medium (1X) (18045; GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

Coelestin Blau (C7143; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

4. Material

Coenzym A	(C3144; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Coomassie Brilliant Blau G-250	(17524.02; Serva, Heidelberg, D)
Cytochalasin D	(30385; Fluka, Neu-Ulm, D)
DAPI dilaktat	(D9564; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Epidermal Growth Factor	(13247-051; Invitrogen, Karlsruhe, D)
G418	(10131-019; Invitrogen, Karlsruhe, D)
Hygromycin B	(10687-010; Invitrogen, Karlsruhe, D)
IRDye 800CW markiertes Streptavidin	(926-32230; LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)
Kälberserum (FCS)	(10106-185; GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe,D)
Luciferin	(E1602; Promega, Mannheim, D)
Medium DMEM, 1x, high-glucose	(41965; GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe,D)
MTT	(M2128; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Nocodazol	(M1404; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

4. Material

Opti-MEM®-I + GlutaMAX™-I	(51981; GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)
Orange G	(861286; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Penicillin-Streptomycin-Lösung	(P4333; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Phalloidin-TRITC	(P1951; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Rinderserum Albumin (BSA)	(A7906; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Sepharose G	(P3296; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
SlimFast Schoko	(Allpharm Vertriebs GmbH, Messel, D)
Sodium Pyruvat, 100x	(11360070; GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)
Staurosporin	(S4400; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Super Signal West Pico Luminol Enhancer Lösung	(1856136; Pierce, Rockford, USA)
Super Signal West Pico Luminol Peroxide Lösung	(1856135; Pierce, Rockford, USA)
Thymidin	(T1895; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)
Trypsin-EDTA 0,05 %	(25300; GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

Tyrphostin 47 (93940; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

U0126 (U120; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

4.5 Verbrauchsmaterialien

12-Loch Zellkulturplatten (Falcon) (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

24-Loch Zellkulturplatten (Falcon) (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

3,5 cm Petrischalen (Falcon) (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

96-Loch Zellkulturplatten (Falcon) (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

20G x 1.5" Kanülen (Terumo, Leuven, BL)

Aqua Poly/Mount (Polysciences, Warrington, USA)

Deckgläschen (Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, D)

Einmalpipetten (steril) (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Gewebekulturschalen (Falcon) (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

Halbmikroküvette UVette (Eppendorf, Hamburg, D)

Incidur[®] (Ecolab, Wien, AT)

Inject[®]-F 1 ml Einmalspritzen (9166017V; Braun, Melsungen, D)

Kunststoffröhrchen (5 ml) (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Kryoröhrchen (Nalgene, Rochester, USA)

Neubauer Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D)

Objektträger (Super Frost Color) (Menzel, Braunschweig, D)

PVDV-Transfermembran, 0.45 µm (Pierce, Rockford, USA)

Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 und 2 ml) (Eppendorf, Hamburg, D)

Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Röntgenfilm, CL-Xposure, 8"x10" (Pierce, Rockford, USA)

Whatmann 3MM Papier (Schleicher & Schüll, Dassel, D)

Zellschaber (Becton Dickinson, Heidelberg)

4.6 Allgemeine Laborgeräte

Fastblot B44	(Biometra, Göttingen, D)
Inkubator Nuaire DHD Autoflow NU 5510 E	(Nuaire, Fernwald, D)
Luminometer Lumat LB 9501	(Berthold, Wildbad, D)
Miniprotean 3 Gelelektrophorese System	(BioRad, Hercules, USA)
Multigel-Long Gelelektrophorese System	(Biometra, Göttingen, D)
Odyssey® Infrared Imaging System	(LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)
pH-Meter CG 840	(Schott, Mainz, D)
Plattenlesegerät Fluoroscan Ascent FL	(Thermo-Fischer, Waltham, USA)
Plattenlesegerät Infinite M200	(Tecan, Crailsheim, D)
Rührer IKAMAG RH	(Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, D)
Schüttler Eppendorf Thermomixer comfort	(Eppendorf, Hamburg, D)
Sonopuls HD2070	(Bandelin GmbH, Berlin, D)
Spektrometer Eppendorf BioPhotometer	(Eppendorf, Hamburg, D)
Sterilbank Microflow	(NuncNalge, Rochester, USA)
Stuart® mini gyro-rocker SSM3	(Bibby Scientific Limited, Stone, UK)
Stuart® rotator SB3	(Bibby Scientific Limited, Stone, UK)
Trans-Blot Transferkammer	(BioRad, Hercules, USA)
Vortex Genie 2	(Roth, Karlsruhe, D)
Wasserbad Memmert	(Hettich AG, Bäch, CH)
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	(Eppendorf, Hamburg, D)
Zentrifuge Eppendorf Minispin	(Eppendorf, Hamburg, D)

4.7 Puffer und Lösungen

AB-Dil Puffer	2 % BSA in TBS-T
Acyl-Austausch-Lysepuffer	5 mM EDTA 1 % Triton X-100 50 mM NEM 1 mM PMSF 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF in PBS pH 7,4
Anodenpuffer	10 % Roti [®] -Blot A Puffer (10 X) 20 % Ethanol p.A. in H ₂ O
Blotpuffer	48 mM Tris-HCl (pH = 9,2) 39 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % Methanol
Bradford-Lösung	- 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml Ethanol (95 %) lösen - 100 ml Phosphorsäure (85 %) zufügen - Auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen - Abfiltrieren

4. Material

Coelestin Blau Lösung	- 5 % Eisenammoniumalaun in 50 ml H ₂ O - 0,25 g Coelestin Blau zugeben - 3 min kochen - abkühlen lassen, filtrieren - 7 ml Glycerin zugeben
Fixierpuffer	100mM K-Pipes pH 6,8 10mM EGTA 1mM MgCl ₂ 0,1 % Triton X-100 3,7 % Formaldehyd
Isopropanol / HCL-Lösung	40 mM HCL in Isopropanol
Kathodenpuffer	10 % Roti [®] -Blot K Puffer (10 X) 20 % Ethanol p.A. in H ₂ O
Luciferase-Lysepuffer-I	8 mM Tricin (pH 7.8) 10 mM NaCl 400 µM EDTA 200 µM MgSO ₄ 1 mM DTT 1 % Triton X-100
Luciferase-Lysepuffer-II	25 mM Tris-HCl (pH = 7,5) 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 % NP-40 1 mM DTT 5 % Glycerol

4. Material

Luciferase-Reagenz	0,5 mM CoenzymA 0,5 mM EDTA 0,5 mM ATP 10 mM MgCl ₂ 40 mM Tricin 0,5 mM Luciferin - Mit Tris auf pH = 7,8 einstellen 10 mM DTT
Odyssey Blocking Puffer	(927-40000; LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)
PBS	50 mM Na ₂ HPO ₄ 150 mM NaCl pH 7.4 in H ₂ O
PBS-T	0,1 % Triton X-100 in PBS
PBS-Tween (0,1 %)	0,1 % Tween 20 in PBS
Probenpuffer mit erhöhtem Glycerolanteil (2x)	50 M Tris-HCl (pH = 6,8) 4 % SDS 40 % Glycerin 10 % β-Mercaptoethanol 0,12 g Bromphenolblau
Probenpuffer-I (5x)	125 M Tris-HCl (pH = 6,8) 10 % SDS 50 % Glycerin 25 % β-Mercaptoethanol 0,03 % Bromphenolblau
Probenpuffer-II (2x)	3 % SDS 20 % Glycin 10 % 2-Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau in H ₂ O

4. Material

Restore™ Western Blot Stripping Buffer	(21059; Pierce, Rockford, USA)
Ripa-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH = 7,4) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,25 % Natrium-Desoxycholat 1 % NP-40 1 mM PMSF 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF
Roti®-Blot A Puffer (10 X)	(L510.1; Roth, Karlsruhe, D)
Roti®-Blot K Puffer (10 X)	(L511.1; Roth, Karlsruhe, D)
SDS-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris-HCl (pH = 8,3) 192 mM Glycin 0,01 % SDS
TBS	10 mM Tris-HCl (pH = 7,4) 150 mM NaCl
TBS-T	0,1 % Tween 20 in TBS

4.8 Zellkulturmedien

Zellmedium für HeLa, MDCK-, MDCK-F3- und BSC-1- Zellen

10 % FCS, nicht-essentielle Aminosäuren (1x), Natrium-Pyruvat (1x), Penicillin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml) in DMEM Medium

HLR-Medium für HLR-ELK1 Zellen

10 % FCS (hitzeinaktiviert), nicht-essentielle Aminosäuren (1x), G418 (250 µg/m), Hygromycin B (100 µg/ml), Penicillinin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml) in DMEM Medium

HLR-Hungermedium für HLR-ELK1 Zellen

0,5 % FCS (hitzeinaktiviert), nicht-essentielle Aminosäuren (1x), G418 (250 µg/m), Hygromycin B (100 µg/ml), Penicillinin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml) in DMEM Medium

Zellmedium für TC21-, HeLa-GFP-H2B- und U2OS-Cherry-Tubulin Zellen

10 % FCS, nicht-essentielle Aminosäuren (1x), Natrium-Pyruvat (1x), G418 (250 µg/m), Penicillinin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml) in DMEM Medium

5. Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Auftauen von Zellen

Die Zellsuspensionen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kryoröhrchen wurden auf Eis transportiert und in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell unter schütteln aufgetaut. Die Oberfläche der Kryoröhrchen wurde kurz mit Incidur[®] desinfiziert. Die aufgetaute Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Pipette in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt, die 15 ml des entsprechenden Zellmediums enthielt. Das Zellmedium wurde nach 12 h ausgetauscht.

5.1.2 Subkultivierung von Zellen

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 3-5 ml sterilem PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 2-4 ml Trypsin/EDTA gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 2-4 ml Trypsin/EDTA für 3-10 min bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen auf den Zellkulturschalenboden wurde sichergestellt, dass sich alle Zellen ablösen. Anschließend wurden zu den Zellen 10-20 ml des entsprechenden Zellmediums gegeben und die gesamte Zellsuspension mehrmals auf- und abpipettiert. Durch die hierbei wirkenden Scherkräfte werden aneinanderheftende Zellen voneinander getrennt. Die Zellen wurden in der jeweils auszusäenden Zellzahl in neue Kulturflaschen mit 15-30 ml Zellmedium überführt.

5.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D) bestimmt. Zunächst wurde das Deckglas durch Anhauchen befeuchtet und mit leichtem Druck auf die Stege der Zählkammer gelegt. Das Entstehen von Newton'schen Ringen zeigte den festen Sitz des Deckgläschens an. Die Zellsuspension wurde in die von den Stegen gebildete Vertiefung pipettiert bis durch Kapillarkräfte eine luftblasenfreie Befüllung des Zwischenraumes zwischen Deckgläschen und Zählkammer erfolgte. Die Auszählung fand unter dem Mikroskop statt, wobei viermal alle Zellen in den 16 äußeren Quadraten ausgezählt wurden. Diese 16 Quadrate sind jeweils viermal auf einer Hälfte der Zählkammer eingraviert. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und die Zellzahl durch Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ (Zellen/ml) bestimmt.

5.1.4 Kryokonservierung

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % in 175 cm² Kulturschalen angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst und in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen und vereinzelt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in Zellmedium ohne Selektionsantibiotikum mit 10 % DMSO aufgenommen. Die Menge des Mediums richtete sich hierbei nach der Menge der errechneten Gesamtzellzahl. Die erhaltene Zellsuspension in Zellmedium mit 10 % DMSO sollte 5×10^6 (Zellen/ml) enthalten. Hiervon wurden je 200 µl in vorbereitete Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in eine spezielle mit Isopropanol gefüllte Einfrierhilfe (Nalgene, Rochester, USA) gestellt und für 24 h bei – 80°C gelagert. Hierdurch konnte eine langsame Reduktion der Temperatur von 1°C/min gewährleistet werden. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.1.5 Transiente Transfektion von MDCK- und MDCK-F3 Zellen

Alle Zellen wurden mit Hilfe des Effectene[®] Transfektionsreagenz (301425; Quiagen, Hilden, D) mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert.

Es wurden je 2×10^5 Zellen in 2 ml Zellmedium in 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h inkubiert. Für jedes Schälchen wurden 100 µl EC-Puffer, 1 µg DNA, 8 µl Enhancer und 10 µl Effectene[®] Reagenz verwendet. Hierbei wurden zunächst der EC-Puffer, die DNA und der Enhancer zusammen in einem 15 ml Reaktionsgefäß für alle Ansätze zusammenpipettiert. Dieser Ansatz wurde für 1 s gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Effectene[®] Reagenz hinzupipettiert, der Ansatz für 10 s gevortext und dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Zellkulturmedium der Zellkulturschalen wurde durch je 2 ml OPTI-MEM Medium ausgetauscht. Zu jedem Schälchen wurde dann die entsprechende Menge des vorbereiteten Transfektionsansatzes tröpfchenweise hinzupipettiert und das Schälchen dabei geschwenkt. Die Zellen wurden für 12 h inkubiert und dann das OPTI-MEM Medium gegen normales Zellmedium ausgetauscht.

5.1.6 Synchronisation von Zellen

Die Synchronisation der HeLa-Zellen erfolgte mit einem einfachen Thymidin-Block. Hierbei wurden die Zellen zusammen mit 4 mM Thymidindesoxyribose für 21 h

inkubiert. Bei dieser Synchronisationstechnik wird die Ribonukleotid-Reduktase gehemmt. Diese wandelt Ribonukleotid-diphosphate in Desoxyribonukleotid-diphosphate um, welche im Anschluss zu Desoxyribonukleotidtriphosphaten phosphoryliert werden. Diese Endprodukte hemmen die Ribonukleotid-Reduktase (Feedback-Hemmung). Durch den Überschuss an Thymidindesoxyribose wird die Ribonukleotid-Reduktase durch das entstehende Thymidintriphosphat gehemmt, bevor ausreichende Mengen der übrigen drei Deoxynukleotidtriphosphate gebildet werden können. Hierdurch wird die DNA Synthese gehemmt und die Zellen arretieren in der S-Phase. Die Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS und durch den Austausch mit frischem Zellmedium wieder aus dem Arrest befreit.

5.1.7 Zellyse

Es wurden drei unterschiedliche Methoden der Zellyse für jeweils unterschiedliche Ansätze verwendet.

Methode 1 zur Gewinnung von Gesamtprotein für die Western Blot Analyse:

Die Zellen in 3,5 cm Schalen wurden mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen und mit je 100 µl eiskaltem RIPA Puffer für 10 min auf Eis inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass der PBS Puffer vor Zugabe des RIPA-Puffers vollständig entfernt wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgekratzt und das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Diese wurden auf Eis gelagert. Die Lysate wurden anschließend 2 x 10 s mit Ultraschall (40 Watt) behandelt. Unlösliche Bestandteile wurden dann durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Methode 2 zur Gewinnung von Gesamtprotein für die Acyl-Austausch-Methode:

Die Zellen in 3,5 cm Schalen wurden mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen und mit je 300 µl eiskaltem Acyl-Austausch-Lyse Puffer für 3 min auf Eis inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass der PBS Puffer vor Zugabe des Acyl-Austausch-Lyse Puffers vollständig entfernt wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgekratzt und das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Diese wurden auf Eis gelagert. Die Lysate wurden fünfmal durch eine 20G x 1,5" Kanüle gezogen und anschließend für 1h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden dann durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lysate wurden ü.N. bei 4 °C gelagert.

Methode 3 zur Analyse der Luciferaseaktivität von Lysaten aus 3,5 cm Schalen im PathDetect® Reporter-gen-Assay: Die Zellen in 3,5 cm Schalen wurden mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen und mit je 150 µl eiskaltem Luciferase-Lyse Puffer I für 3 min auf Eis inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass der PBS Puffer vor Zugabe des Luciferase-Lyse Puffer I vollständig entfernt wurde. Nach der Inkubation wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgekratzt und das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Unlösliche Bestandteile wurden dann durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die erhaltenen Lysate wurden sofort zur Detektion der Luciferaseaktivität verwendet (siehe Abschnitt 5.1.8.1).

5.1.8 PathDetect® Reporter-gen Assay

Der Reporter-gen Assay wurde sowohl in 3,5 cm Zellkulturschalen, als auch in 96-Loch-Platten durchgeführt. Die angewandte Methodik unterschied sich hier deutlich zwischen den einzelnen Formaten. Daher werden sie getrennt voneinander beschrieben.

5.1.8.1 Durchführung in 3,5 cm Zellkulturschalen

Für jeden Ansatz wurden drei 3,5 cm Schalen mit 2×10^5 Zellen in 2 ml HLR-Medium ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen HLR-Hungermedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 20 h inkubiert. Bei den Ansätzen mit Tyrphostin 47 wurden die Zellen nach den ersten 4 h mit der entsprechenden Menge an Tyrphostin 47 versetzt und für weitere 16 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit den entsprechenden Aktivatoren in den entsprechenden Medien versetzt und für weitere 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die in Abschnitt 5.1.7 beschriebene Lyse der Zellen. In den Lysaten wurde die Aktivität der in den Zellen exprimierten Luciferase gemessen. Die Luciferase wandelt D-Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg²⁺ in Oxyluciferin um. Bei dieser Reaktion wird Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm emittiert. Somit ist bei der Chemielumineszenzreaktion mit den Lysaten die erhaltene Lichtemission proportional zur Luciferasemenge im Lysat. Die Luciferasemenge wiederum ist von der Transkriptionsrate des Reportergens und daher von der Aktivität des untersuchten Promoters abhängig.

Die Luciferaseaktivität wurde für jeden Ansatz in einer Doppelbestimmung ermittelt. Hierfür wurden jeweils exakt 20 µl des Lysats in 5ml Kunststoffröhrchen pipettiert und in

ein Luminometer gestellt. In dem Luminometer wurden automatisch 100 µl Luciferase-Reagenz hinzugegeben und die Lumineszenz für 15 sec detektiert.

5.1.8.2 Durchführung in 96-Loch-Platten

Für den Reportergen Assay wurden weiße 96-Loch-Platten verwendet (655074, Greiner, Solingen, D).

In jede Vertiefung der Platte wurden 2×10^4 Zellen in 200 µl HLR-Medium ausgesät und für 24 h inkubiert. Das HLR-Medium wurde anschließend gegen je 100 µl HLR-Hungermedium ausgetauscht, welches je nach Ansatz mit den entsprechenden Substanzen in den angegebenen Konzentrationen versehen war. Die Zellen, die nur mit EGF stimuliert werden sollten, wurden hierbei nur mit HLR-Hungermedium versehen. Die Zellen wurden dann für 18 h inkubiert. Danach erfolgte der Austausch mit je 100 µl HLR-Hungermedium, welches EGF (200ng/ml) und je nach Ansatz die entsprechende Substanz in der angegebenen Konzentration enthielt. Für die Hintergrundkontrolle wurde das HLR-Hungermedium gegen frisches HLR-Hungermedium ohne EGF ausgetauscht. Es erfolgte eine weitere Inkubation für mindestens 6 h. Dann wurde das Medium komplett entfernt und mit Hilfe einer Mehrkanalpipette sehr schnell 30 µl eiskalter Luciferase-Lysepuffer II in jede Vertiefung hinzupipettiert. Die Zellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Mehrkanalpipette in jede Vertiefung 100 µl Luciferase-Reagenz hinzupipettiert und der Ansatz durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Hierbei sollte Luftblasenbildung vermieden werden, da sie die Lumineszenzmessung erheblich beeinflussen. Sofort nach der Applikation des Luciferase-Reagenz wurde die Lumineszenz in dem Plattenlesegerät (Tecan 200M) detektiert, wobei die Lumineszenzwerte in jeder Vertiefung für eine Sekunde gemittelt wurden.

In Abschnitt 6.4.1 wird die Veränderung der in Abb. 24 gezeigten Plattenbelegung beschrieben. Diese Veränderte Plattenbelegung ist in Abb. 10 gezeigt.

Sie war für alle in Abb. 32 gezeigten Experimente, als auch für die in Abschnitt 6.9 durchgeführten Tests vereinheitlicht und wird weiterhin verwendet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Substanz 1	Substanz 2	Substanz 3	Substanz 4	Substanz 5	Substanz 6	Substanz 7	Substanz 8	Substanz 9	Substanz 10	Substanz 11	0,5 % FCS
B												
C												
D												
E	Substanz 12	Substanz 13	Substanz 14	Substanz 15	Substanz 16	Substanz 17	Substanz 18	Substanz 19	Substanz 20	Substanz 21	EGF	Inhibitor
F												
G												
H												

Abb. 10: Plattenbelegung für den etablierten PathDetect® Reportergen Assay

5.1.9 MDCK-F3 Phänotyp Assay

Der Rücktransformations-Assay wurde in verschiedenen Formaten durchgeführt. Die ausgesäte Zellzahl für das jeweilige Format ist in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Auszusäende Zellzahl für die einzelnen Plattenformate

Format	6-Loch- Platte	24-Loch- Platte	96-Loch- Platte	384-Loch- Platte
Auszusäende Zellzahl / Vertie- fung (Volumen)	1×10^5 (2 ml)	3×10^4 (1 ml)	3×10^3 (200 μ l)	700 (47 μ L)

Die MDCK-F3 Zellen wurden in der entsprechenden Zellzahl in das jeweilige Plattenformat ausgesät und für 24 h inkubiert. Bei 6-, 24- und 96-Lochplatten Formaten wurden klare Zellkulturplatten benutzt (siehe Abschnitt 4.5). Nur für die

Fluoreszenzmikroskopie in 96-Lochplatten wurden schwarze Platten mit klarem Boden (96 WELL, PS, F-Boden (Kaminform), μ CLEAR, High Binding; 655097; Greiner, Solingen, D) benutzt. Bei 384-Loch-Platten wurden, wegen der schlechten Haftung der MDCK-F3 Zellen, schwarze Platten mit durchsichtigem Boden und hoher Zellhaftung verwendet (384WL, FB,BLK/CLR, Corning[®] CellBIND[®] surface; 3683; Corning, Schiphol-Rijk, NL). Danach erfolgte die Applikation der entsprechenden Substanzen. Die Applikation in ein 384-Loch-Platten Format wurde mit Hilfe des Pipettierroboters durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4). Hierbei wurden die Spalten 1 und 2 der Reihen A bis P mit einer entsprechenden Menge an DMSO versetzt. In die Spalten 23 und 24 der Reihen A bis P konnte manuell die Positivkontrolle hinzugefügt werden. Bei diesem Assay wurde die Position und Konzentration der Positivkontrolle standardisiert. Es wurde dabei der MEK Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M in die Vertiefungen der Spalten 23 und 24 in den Reihen A bis D hinzupipettiert. In die Vertiefungen der Spalten 23 und 24 der Reihen E bis H wurde U0126 mit einer Konzentration von 20 μ M appliziert. Bei allen übrigen Formaten war die Belegung der Platten frei wählbar. Es wurde aber darauf geachtet, dass sich bei allen Formaten in Position A 1 eine DMSO Kontrolle befand. Dies erleichterte die automatische Bildaufnahme mit dem Mikroskop. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 14-16 h bei 37°C und 7,5 % CO₂ inkubiert und anschließend fixiert und angefärbt (siehe Abschnitt 5.1.11.2). Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem automatisierten Mikroskop Axiowert 200M unter Verwendung der für das jeweilige Format erforderlichen Einstellungen (siehe Abschnitt 5.3.1)

5.1.10 BSC-1 Phänotyp Assay

Der BSC-1 Phänotyp Assay wurde für die Anzucht der Zellen auf Deckgläschen in klaren 12-Loch-Platten (siehe Verbrauchsmaterialien) und ansonsten auf schwarzen 96-Lochplatten (96 WELL, PS, F-Boden (Kaminform), μ CLEAR, High Binding; 655097; Greiner, Solingen, D) und schwarzen 384-Lochplatten (384WL, FB,BLK/CLR Thick BTM; 3985; Corning, Schiphol-Rijk, NL) durchgeführt. Die jeweils auszusäenden Zellzahlen sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Auszusäende Zellzahl für die einzelnen Plattenformate

Format	24-Loch- Platte	96-Loch- Platte	384-Loch- Platte
Auszusäende Zellzahl / Vertie- fung (Volumen)	2x10 ⁴ (1 ml)	2 x 10 ³ (200 µl)	700 (47 µL)

Die BSC-1 Zellen wurden in der entsprechenden Zellzahl in das jeweilige Plattenformat ausgesät und für 24 h inkubiert. Danach erfolgte die Applikation der entsprechenden Substanzen. Die Applikation in ein 384-Loch Platten Format wurde mit Hilfe des Pipettierroboters durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.1). Hierbei wurden die Spalten 1 und 2 der Reihen A bis P mit einer entsprechenden Menge an DMSO versetzt. In die Spalten 23 und 24 der Reihen A bis P konnte manuell die Positivkontrolle hinzugefügt werden. Bei diesem Assay wurde die Position und Konzentration der Positivkontrollen standardisiert. In die Vertiefungen der Spalten 23 und 24 der Reihen A bis D wurde Cytochalasin B mit einer Konzentration von 40 µM appliziert. In die Vertiefungen der Spalten 23 und 24 der Reihen E bis H wurde Cytochalasin B mit einer Konzentration von 4 µM pipettiert. In die Vertiefungen der Spalten 23 und 24 der Reihen I bis L wurde Nocodazol mit einer Konzentration von 5 µM appliziert. In die Vertiefungen der Spalten 23 und 24 der Reihen M bis P wurde Nocodazol mit der Konzentration von 0,5 µM pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin für weitere 14-16 h 37°C und 7,5 % CO₂ inkubiert, anschließend fixiert und angefärbt (siehe Abschnitt 5.1.11.2). Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem automatisierten Mikroskop Axiowert 200M unter Verwendung der für das jeweilige Format erforderlichen Einstellungen (siehe Abschnitt 5.3.1.)

5.1.11 Histochemische Färbungen

5.1.11.1 Färbung mit Coelestin Blau

Bei der Färbung mit Coelestin Blau wird die ganze Zelle unspezifisch gefärbt. Hierdurch erhöht sich der Kontrast zur mikroskopischen Analyse der Zellform.

Dazu wurde zunächst das Medium aus den Vertiefungen der jeweiligen Zellkulturplatten entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Fixierpuffer fixiert und gleichzeitig die Membran permeabilisiert. Hierfür wurden sie für 15 min mit dem Fixierpuffer behandelt. Anschließend wurde der Fixierpuffer entfernt

und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 2 min in PBS geschwenkt. Anschließend erfolgte die Färbung mit der Coelestin Blau Lösung für 5 min. Nach Entfernung der Coelestin Blau Lösung wurden die Zellen für 2 min in 70 % Ethanol differenziert, und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS bei 4°C gelagert.

Bei der Verwendung von 384-Loch-Platten wurde zum Entfernen der jeweiligen Flüssigkeiten ein Immuno™ Washer (Nunc-Immuno™ Wash 12 ; 470175; Nunc, Langensfeld, D) verwendet. Applikationen wurden rasch mit einer automatischen Mehrkanalpipette durchgeführt.

5.1.11.2 Fluoreszenzfärbung des Cytoskeletts und der DNA

Bei der Fluoreszenzfärbung des Cytoskeletts wurde das Tubulin mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Tubulin, welcher FITC markiert ist, angefärbt. Die Anfärbung von filamentösen Aktinstrukturen erfolgte mit TRITC markiertem Phalloidin. Die DNA Färbung wurde mit dem fluoreszierenden DNA-Interkalator DAPI vorgenommen.

Dazu wurde zunächst das Medium aus den Vertiefungen der jeweiligen Zellkulturplatte entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 15 min mit Fixierpuffer fixiert und permeabilisiert. Nach Entfernung des Fixierpuffers wurde dreimal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 1h bei Raumtemperatur in AB-Dil Puffer inkubiert. Dieser enthält 2 % BSA und dient zum Blockieren von unspezifischen Bindungen. Nach Entfernen des AB-Dil Puffers wurden die Zellen spezifisch gefärbt. Hierzu wurden die Farbstoffe nach Bedarf in den in Tabelle 3 angegebenen Verdünnungen mit AB-Dil Puffer verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur und Dunkelheit auf den Zellen gelassen. Nach Entfernung der Färbelösung wurden die Zellen dreimal mit PBS-T gewaschen und abschließend PBS zugegeben. Die Platten wurden bei Dunkelheit gelagert. Bei einer Färbung von Zellen auf Deckgläsern, wurden die Deckgläschen anschließend mit einer Pinzette aus den Vertiefungen entnommen und das restliche PBS mit einem Papiertuch entfernt. Für jedes Deckglas wurde ein Tropfen Aqua Poly/Mount auf einen Objektträger gegeben und anschließend das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf diesen Tropfen gelegt, so dass keine Luftblasen zwischen Deckglas und Objektträger entstanden. Die Objektträger wurden anschließend bei Raumtemperatur und in Dunkelheit über Nacht gelagert, damit das Aqua Poly/Mount aushärten konnte.

Tabelle 3: Verdünnungen der Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung
Anti- α -Tubulin-FITC	1:500
Phalloidin-TRITC	1:1000
DAPI	1:10000

Bei der Verwendung von 384-Loch-Platten wurde zum Entfernen der jeweiligen Flüssigkeiten und zum Waschen mit PBS-T der Immuno™ Washers der Firma Nunc verwendet. Jede andere Applikation wurde rasch mit einer automatischen Mehrkanalpipette durchgeführt.

5.1.11.3 Fluoreszenzfärbung von E-Cadherin

Die Fluoreszenzfärbung des transmembranen Glycoproteins E-Cadherin erfolgte mit einem spezifischen Antikörper, welcher mit FITC markiert war. Hierzu wurde das Medium aus den Vertiefungen entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit -20°C kaltem Methanol für 5 min auf Eis fixiert. Dann wurde das Methanol entfernt und dreimal mit PBS gewaschen. Der FITC markierte Anti-E-Cadherin Antikörper wurde 1:500 in PBS verdünnt und bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 1 h auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Die Präparate wurden im Dunkeln in PBS gelagert.

5.1.12 Der MTT-Test

Bei dem MTT-Test wird die Proliferation und die Vitalität von Zellen colorimetrisch bestimmt. Hierbei nehmen lebende Zellen das schwach gelbe Tetrazolium-Salz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) und setzen es mit Hilfe mitochondrialen Dehydrogenasen zu dunkelblauen, wasserunlöslichen Formazan um. Die hierbei gebildeten Kristalle werden für die photometrische Messung durch Isopropanol aufgelöst. Darüber hinaus werden durch die Zugabe von Säure, pH-bedingte Störungen des im Zellmedium vorhandenen Indikators Phenolrot, bei der photometrischen Messung vermieden. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der Zellzahl und der metabolischen Aktivität der Zellen.^[125] Daher kann der Assay auch als Cytotoxizitätstest verwendet werden, da nur lebende Zellen metabolisch aktiv sind.

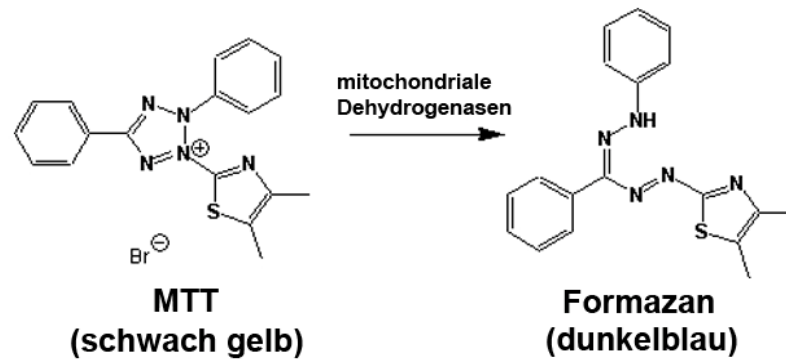


Abb. 11: Reaktion, der durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysierte Spaltung von MTT zu Formazan.

Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Vertiefung in $100 \mu\text{l}$ Medium in eine 96 Loch-Platte ausgesät. Dabei wurden jeweils zwei Löcher nur mit Zellmedium ohne Zellen beladen. Nach 24 h Inkubation wurden die jeweiligen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben und die Zellen mit den Substanzen für weitere 18 h inkubiert. Anschließend wurde in jede Vertiefung $20 \mu\text{l}$ MTT-Lösung gegeben und dreimal auf- und abpipettiert. Die Zellen wurden dann für 1 h inkubiert. Dann wurde in jede Vertiefung $150 \mu\text{l}$ Isopropanol/HCL Lösung hinzugegeben und so lange auf- und abpipettiert, bis die Kristalle gelöst waren. Die Platte wurde anschließend für 45 min auf eine Schüttelplatte gestellt und danach sofort die optische Dichte bei 540 nm bestimmt. Von den erhaltenen Werten wurden die gemittelten Werte der Vertiefungen ohne Zellen subtrahiert.

5.1.13 Der WST-1 Test

Der WST-1 (water soluble tetrazolium) Test funktioniert auf der gleichen Grundlage wie der in Abschnitt 5.1.12 beschriebene MTT-Test. Hierbei wird von mitochondrialen Dehydrogenasen das Tetrazoliumsalz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) in dunkelrotes Formazan umgesetzt (siehe Abb. 12). Der Hauptunterschied zu dem MTT-Test besteht darin, dass das gebildete Formazan wasserlöslich ist und Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm absorbiert. Dies führt dazu, dass die Zellen nicht durch eine Behandlung mit einer Isopropanol/HCL Lösung abgetötet werden und der pH-Indikator Phenolrot keinen Einfluss auf die photometrische Messung hat.

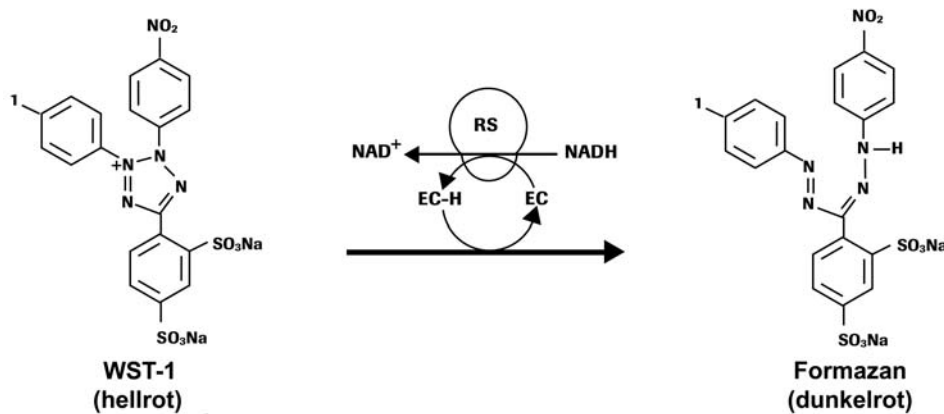


Abb. 12: Durch mitochondriale Dehydrogenasen katalysierte Spaltung von WST-1 zu Formazan. *RS:* mitochondriales Succinat-Tetrazolium Reduktase System; *EC:* Entkopplungsreagenz

Bei diesem Assay werden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte je 1×10^4 Zellen in 100 μ l Medium ausgesät. Auf jeder Platte werden in vier Vertiefungen nur 100 μ l Medium ohne Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert. Anschließend wurden zu den Zellen die jeweiligen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen gegeben. Die Zellen wurden mit den Substanzen für weitere 18 h inkubiert. Dann wurde in jede Vertiefung 10 μ l WST-1 Reagenz pipettiert und vorsichtig durchmischt. Die Zellen wurden für 45 min inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte bei 450 nm detektiert. Die gemittelten Werte aus den Vertiefungen ohne Zellen wurden von den übrigen Werten der jeweiligen Vertiefung subtrahiert. Aufgrund der häufigen Verwendung des Assays im Zusammenhang mit dem Reportergen Assay wurde auch hierfür die Plattenbelegung standardisiert. Sie ist in Abb. 13 gezeigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Substanz 1	Substanz 2	Substanz 3	Substanz 4	Substanz 5	Substanz 6	Substanz 7	Substanz 8	Substanz 9	Substanz 10	Substanz 11	
B												Leer
C												
D												
E	Substanz 12	Substanz 13	Substanz 14	Substanz 15	Substanz 16	Substanz 17	Substanz 18	Substanz 19	Substanz 20	Substanz 21	DMSO	Inhibitor
F												
G												
H												

Abb. 13: Plattenbelegung für den WST-1 Assay

5.1.14 Der Apo-ONE® Apoptose Assay

Das Apo-ONE® System (Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay; G7790; Promega; Mannheim, D) erlaubt die Detektion von Caspase 3- und 7- Aktivitäten in Zellen. Die Aktivitäten dieser Caspasen spielen eine Schlüsselrolle im Prozess der Apoptose.^[126-130] Der von diesem System bereitgestellte Puffer permeabilisiert die Zellen und enthält das nicht-fluoreszierende Peptidsubstrat Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparbinsäureamid; Z-DEVD-R110). Durch die Aktivitäten von Caspase 3 und 7 wird der DEVD Peptidteil abgespalten. Dies führt zu einem Anstieg der Fluoreszenz des Rhodamin 110 bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 538 nm. Das Prinzip ist in Abb. 14 dargestellt. Hierbei ist der Anstieg der Fluoreszenz in der Probe proportional zu der Aktivität der Caspasen 3 und 7 und somit ein direkter Hinweis auf die Menge an apoptotischen Zellen.

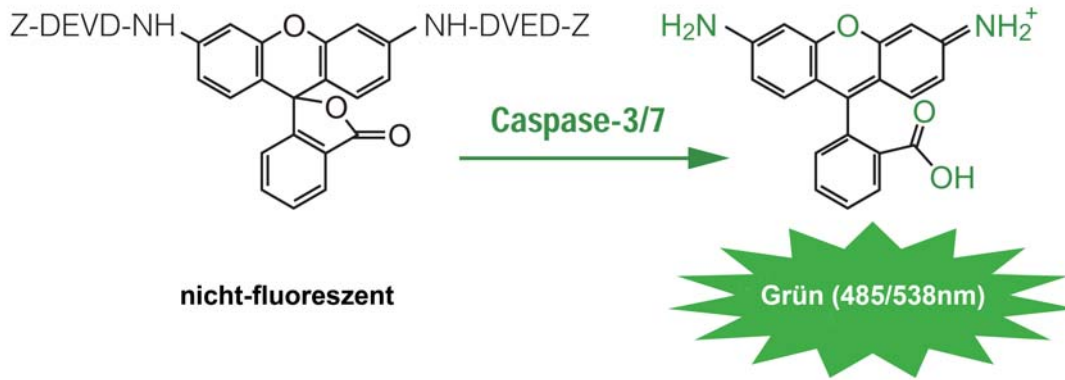


Abb. 14: Prinzip des Apo-ONE[®] Assays. Durch die Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 wird der Z-DEVD Peptidteil des Z-DEVD-R110 Substrats abgespalten. Hierdurch erhöht sich die Fluoreszenzeigenschaft des Rhodamin Restes bei einer Anregungswellenlänge vom 485 nm.

Für den Assay wurden in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Loch-Platte je 1×10^4 HLR-ELK1 Zellen in 100 μ l Medium ausgesät und für 24 h inkubiert. In vier Vertiefungen der Platte wurde zur Bestimmung des Hintergrundes nur 100 μ l Medium ohne Zellen pipettiert. Nach der Inkubation wurden die jeweiligen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen appliziert und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und 22 μ l frisches Medium in jede Vertiefung pipettiert. Hierzu wurden je 22 μ l, nach Angaben des Herstellers, vorbereitetes Substrat gegeben und die Platte bei Raumtemperatur für 1 h im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm. Von den erhaltenen Fluoreszenzwerten wurden die gemittelten Werte der Hintergrundbestimmung subtrahiert. Die gemittelten Werte der DMSO Kontrolle wurden bei der Auswertung auf den Wert 1 normiert. Die Werte der übrigen Proben wurden auf diese Normierung umgerechnet und beschreiben die Erhöhung der Fluoreszenz als ein Vielfaches des DMSO Wertes. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin^[131, 132] verwendet.

5.2 Proteinbiochemische Methoden

5.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde die Methode nach Bradford ^[133] angewendet. Hierbei wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 in Phosphorsäure durch die Interaktion mit den Seitenketten von Arginin, Histidin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin in seiner anionischen Form stabilisiert. ^[134] Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Eichgerade mit Hilfe einer BSA Lösung mit bekannten Konzentrationen erstellt. Zu 1 ml Bradford-Lösung wurden 5 µl der Proteinlösung und 20 µl H₂O pipettiert. Die Proben wurden dreimal invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Probe mit 1 ml Bradfordlösung, 20 µl H₂O und 5 µl Lysepuffer gemessen. Die den Extinktionswerten entsprechenden Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Eichgeraden berechnet.

5.2.2 Immunopräzipitation und Acyl- Austausch

Die Zellysate wurden nach der in Abschnitt 5.1.6 beschriebenen Methode 2 erstellt. Es wurden 1 ml Sepharose G Kügelchen nach Angaben des Herstellers in PBS Puffer vorbereitet. Um unspezifisch bindende Proteine zu extrahieren wurde zu jeder Probe 20 µl vorbereitete Sepharose G Kügelchen gegeben und die Proben für 20 min bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die Sepharose Kügelchen für 2 min bei 3000xg abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu jeder Probe wurden dann je 25 µl Living Colors[®] Full-Length A.v. Polyclonal Antikörper hinzupipettiert. Dieser im Hasen angezogene Antikörper bindet spezifisch an den YFP-Teil des YFP-N-Ras Fusionsproteins in dem Lysat. Die Proben wurden für 30 min bei 4 °C rotiert. Dann wurden zu jeder Probe 40 µl Sepharose G Kügelchen pipettiert und die Proben für 60 min bei 4 °C rotiert. Hierbei entstanden durch die Bindung des G-Proteins an die Fc-Regionen der IgG-Antikörper ^[135] die Konjugate mit dem YFP-N-Ras. Dieses war somit an die Sepharose Kügelchen gebunden, welche daraufhin bei für 2 min bei 3000xg abzentrifugiert wurden. Die Pellets wurden anschließend in 50 mM NEM in PBS resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur rotiert. Hierdurch wurden alle noch freien Thiolgruppen alkyliert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 3000xg abzentrifugiert und die Pellets mit PBS gewaschen um ungebundenes NEM zu entfernen. Dann wurden die Pellets in je 500 µl PBS resuspendiert und je 250 µl in ein Microspin-Röhrchen überführt. Auf diese Weise wurde jede Probe in zwei Microspin-Röhrchen aufgeteilt. Hiervon wurde ein Röhrchen

mit 1 M Hydroxylamin in PBS und das andere Röhrchen nur mit PBS behandelt. Die Proben wurden dabei für 1 h bei Raumtemperatur rotiert. Bei der Behandlung mit Hydroxylamin wurden alle vorhandenen Palmitoylreste von dem YFP-N-Ras abgespalten. Anschließend wurden alle Proben zweimal mit PBS gewaschen und mit 320 μ M 1-Biotinamido-4-[4'-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxamido]butan (Biotin (Btn)-BMCC™) für 1 h bei 4°C rotiert. Hierbei wurden die durch die vorherige Behandlung mit Hydroxylamin frei gewordenen Thiole mit (Btn)-BMMCC™ alkyliert und durch den Biotinrest markiert. Somit dienten die Proben, welche nicht mit Hydroxylamin behandelt wurden als Kontrolle für den Acyl Austausch. Da in diesen Proben noch alle Palmitoylreste vorhanden waren, sollten sie nicht mit (Btn)-BMMCC™ markiert werden können. Fand bei diesen Proben eine Markierung statt, konnte das nur an freien Thiolen geschehen, welche nicht durch die Behandlung mit NEM alkyliert wurden. Daher mussten diese Proben immer mit denen verglichen werden, bei denen der Acyl-Austausch durchgeführt wurde. Damit wurde gewährleistet, dass die Biotin-Markierung nur die vorher vorhandenen Palmitoylgruppen markiert. Die Proben wurden daraufhin dreimal mit PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde das Pellet in 250 μ l PBS resuspendiert und die Proben in Eppendorfgefäße überführt. Im letzten Schritt wurden die Proben für 2 min bei 6000xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit den Pellets wurde, wie in Abschnitt 5.2.3.3 beschrieben, weitergearbeitet.

5.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Zu Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese^[136] durchgeführt. Hierbei werden Proteine durch die Behandlung mit Mercaptoethanol, SDS und hoher Hitze denaturiert. Durch das anionische Detergenz SDS werden die Proteine mit einer negativen Ladung maskiert, so dass sie ein konstantes Masse/Ladungs Verhältnis besitzen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgrund ihrer größenabhängigen Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden anschließend mit Hilfe der Western-Blot Technik auf eine Membran übertragen und so immobilisiert. Die Proteine können dann mit Hilfe eines gekoppelten Antikörpersystems spezifisch nachgewiesen werden.^[137]

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Methoden dieser Techniken angewendet. Daher erfolgt die Beschreibung für die jeweiligen Abschnitte getrennt.

5.2.3.1 Methode für die in Abschnitt 6.4.4 beschriebenen und in Abb. 35 gezeigten Western Blots

Die mit der in Abschnitt 5.1.6 beschriebenen Methode 1 erhaltenen Zellysate wurden mit 1/5 Volumen des 5-fachen Probenpuffers-I versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden danach kurz anzentrifugiert. Für die Gelelektrophorese wurden vorgegossene 12 % SDS-Polyacrylamidgele (Ready Gel Tris-HCl Gel, 12 %, 10-well, 50 microliter 161-1156; Bio-Rad Laboratories) verwendet und in das Mini-Gel System (Bio-Rad) eingesetzt. Von jeder Probe wurde die entsprechende Menge für 40 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zudem wurde ein geeigneter Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS Laufpuffer bei 190 V.

Die Übertragung der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran erfolgte in einem Trans-Blot System der Firma Bio-Rad. Hierfür wurden die Gele nach der Elektrophorese von den Geltaschen befreit und für 15 min in Blot-Puffer geschwenkt. Dann wurde die PVDF-Membran in der Größe des Gels ausgeschnitten und für 2 min in Methanol aktiviert. Danach wurde die Membran ebenfalls für 10 min in Blotpuffer geschwenkt. Anschließend wurden vier Stücke aus Whatmann Papier in der Größe des Gels ausgeschnitten und in Blotpuffer getränkt. Auf die Anodenplatte wurden 2 Stücke des getränkten Whatmann Papiers übereinandergelegt. Darauf wurde die PVDF-Membran luftblasenfrei aufgelegt. Auf die Membran wurde dann das Gel gelegt und darauf wieder zwei getränkte Stücke des Whatmann Papiers. Über das Blotsandwich wurde unter sanftem Druck ein mit Blotpuffer angefeuchtetes Reganzglas gerollt um etwaige Luftblasen herauszudrücken. Dann wurde die Kathode aufgelegt und der Transfer bei 22 V für 50 min durchgeführt.

Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurde die Membran zunächst kurz mit TBS-T gewaschen und anschließend in TBS-T mit 1 % SlimFast für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Hierdurch wurden alle freien Bindungsstellen abgesättigt. Dann erfolgte zuerst die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper gegen die phosphorylierten Formen von ERK1/2. Dieser wurde 1:1000 in TBS-T mit 1 % Slimfast verdünnt und die Membran darin unter leichtem Schwenken über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und der sekundäre Antikörper, an den das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, 1:15000 in TBS-T Puffer verdünnt. Die Membran wurde anschließend für 1h unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur in der verdünnten Antikörperlösung inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und für 5 min in Substratlösung inkubiert. Als Substratlösung wurden die Super Signal West Pico System der Firma Pierce verwendet. Hierdurch wird das in der Lösung enthaltene Luminol in Anwesenheit von

Wasserstoffperoxid durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Das Reaktionsprodukt befindet sich in einem elektronisch angeregtem Zustand und gibt die Energie durch Emission von Licht der Wellenlänge von 428 nm wieder ab. Dieses emittierte Licht belichtet dann einen Röntgenfilm und kann somit detektiert werden. Die Membran wurde für die Detektion etwas abgetropft und in eine Belichtungskassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde der Autoradiografiefilm auf die Membran gelegt und für 2 min belichtet. Anschließend wurde der Film, zur Sichtbarmachung der Signale, entwickelt und fixiert. Der fixierte Film wurde kurz mit Wasser abgespült und getrocknet.

Zur Detektion des gesamten ERK1/2 Proteins auf der Membran wurde diese mit Hilfe des Restore™ Western Blot Stripping Buffer der Firma Pierce von allen gebundenen Antikörpern befreit. Hierfür wurde die Membran einmal mit TBS-T gewaschen und dann für 30 min in dem Restore™ Puffer bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Membran erneut mit PBS-T gewaschen und dann wieder für 1h bei Raumtemperatur in TBS-T mit 5 % Milchpulver blockiert. Der spezifische Antikörper gegen das gesamte ERK1/2 Protein wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnt und die Membran ü.N. darin unter leichtem Schwenken bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgten die Waschschrte, die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und die Detektion der Signale auf dem Röntgenfilm nach der oben beschriebenen Vorgehensweise.

5.2.3.2 Methode für die in Abschnitt 6.10 beschriebenen und in Abb. 54 gezeigten Western Blots

Die für diese Experimente verwendeten Zellysate wurden nach der in Abschnitt 5.1.7. beschriebenen Methode 1 erstellt. Die gelelektrophoretische Trennung der Proteine, sowie die Western Blots wurden in dem Labor von Prof. Jan Hengstler nach der dort etablierten Methode angefertigt.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit dem Multigel-long-System der Firma Biometra durchgeführt. Die Lösungen für die Gele wurden nach dem folgenden Schema zusammenpipettiert:

10 % Trenngel (ausreichend für 2 Gele)

ddH ₂ O	16 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	13,2 ml
3 M Tris-HCl, pH 8,8	10 ml
10 % SDS in Aqua dest.	400 µl
10 % APS in Aqua dest.	400 µl
TEMED	16 µl

5 % Sammelgel (ausreichend für 2 Gele)

ddH ₂ O	14,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	3 ml
0,47 M Tris-HCl, pH 6,7	2,5 ml
10 % SDS in Aqua dest.	200 µl
10 % APS in Aqua dest.	300 µl
TEMED	15 µl

Die Komponenten des gewünschten Gels wurden in der Reihenfolge der oben angegebenen Ausführung in ein Becherglas pipettiert. Mittels einer Pipette wurde die Trenngellösung durch Herunterlaufen am Plattenrand vorsichtig in den Plattenzwischenraum bis zum Erreichen einer zuvor markierten Trennlinie gefüllt, deren Abstand vom Oberrand der Probenaschen 1,5 cm betrug. Zur Bildung einer glatten Randzone und Polymerisierung unter Luftabschluss, wurde ein dünner Film destilliertes H₂O aufgebracht. Die Polymerisation des Trenngels war abgeschlossen, wenn zwischen Gel und destilliertem H₂O eine deutliche optische Diskontinuität als Trennlinie zu erkennen war. Im Anschluss wurde das Wasser an der Geloberfläche abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. Danach wurde der Probenkamm in den Zwischenraum hineingeschoben.

Die verwendeten Zellysate wurden wie in Abschnitt 5.1.6 nach Methode 1 beschrieben erstellt. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden standardmäßig 50 µg Protein eingesetzt. Dazu wurde ein entsprechendes Zellysatvolumen der jeweiligen Probe genommen und mit destilliertem H₂O auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Zu dieser Mischung wurde eine entsprechende Menge an Probenpuffer-II zugegeben. Wichtig war dabei, dass immer ein 2:1 Verhältnis Probe (Zellysat + destilliertes H₂O) zu Probenpuffer eingehalten wurde. Die so vorbereiteten Proben wurden gevortext, kurz abzentrifugiert und dann für 10 min bei 95°C im Heizblock erhitzt. Die Proben wurden danach auf Raumtemperatur abgekühlt und kurz zentrifugiert.

Die auspolymerisierten Gele wurden mit den Klammern, nachdem die Silikonabdichtung entfernt wurde, in der Apparatur befestigt. Der untere und der obere Teil des Elektrophoresebades wurde mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt. Die vorbereiteten Proben wurden in die Taschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein BenchMark[®] Marker, der später den erfolgreichen Übertrag vom Gel auf die Membran zeigt, und einen Molekulargewichtsmarker MagicMark[®] aufgetragen. Der Elektrophoreselauf wurde bei einer Stromstärke von 20 mA und 400 V durchgeführt bis die Proben das Trenngel erreicht haben. Dann wurde die Stromstärke auf 28 mA heraufgesetzt. Je nach Proteingröße und Geldichte wurde der Elektrophoresevorgang nach etwa 2 bis 4 Stunden beendet.

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten abgenommen. Dabei wurde das Sammelgel zurückgelassen. Den Abmessungen des Gels entsprechend wurde eine PVDF-Membran sowie 16 Filterpapiere zurechtgeschnitten. Davon wurden 12 Filterpapiere im Anodenpuffer, die restlichen vier im Kathodenpuffer equilibriert. Das Gel wurde im Kathodenpuffer für fünf Minuten inkubiert. Um die Bindungsstelle der Membran zu polarisieren, wurde die Membran kurz mit Ethanol (70 %) eingesprüht, bevor sie in den Anodenpuffer überführt wurde. Dabei ist wichtig, dass die Membran nur wenige Minuten mit dem Anodenpuffer Kontakt hatte, da sonst die Bindungsstellen für das Protein entpolarisiert werden.

Der Blot wurde mit der Fastblot B44 Apparatur der Firma Biometra durchgeführt. Dafür wurden die 12 Filterpapiere auf die Anodenplatte gelegt und darauf die Membran platziert. Hierauf wurde das Gel gelegt und mit den 4 Filterpapieren, welche in Kathodenpuffer getränkt wurden, bedeckt. Vorhandene Luftblasen, die den Transfer beeinträchtigen, wurden mit einer Glaspipette aus dem Blotstapel herausgewalzt. Das Blotting wurde bei einer konstanten Spannung von 400 V für 45 min durchgeführt. Die Stromstärke wurde je nach Gelgröße berechnet (max. 5 mA pro cm²).

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran mit einer Pinzette vorsichtig entnommen, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und zunächst mit TBS-T gewaschen. Vor der Durchführung der Immunreaktion wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5 % BSA in TBS-T für 2 h blockiert. Dann wurde die Membran über Nacht mit dem ersten Antikörper gegen phosphoryliertes ERK1/2, welcher in TBS-T Lösung mit 5 % BSA 1:1000 verdünnt wurde, bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran viermal mit TBS-T für 15 min gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 1h inkubiert, der in Blockierungslösung 1:10000 verdünnt wurde. Der Antikörper ist ebenfalls mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Nach der Inkubation wurde die Membran viermal

für 15 min mit TBS-T gewaschen und für 5 min in Super Signal West Pico Substrat Lösung inkubiert. Die emittierte Chemiluminiszenz wurde mit Hilfe INTAS Chemi Lux Imager Systems detektiert.

5.2.3.3 Methode für die in Abschnitt 6.10 beschriebenen und in Abb. 55 gezeigten Western Blots

Die hierfür verwendeten Zellysate wurden nach der in Abschnitt 5.1.7 beschriebenen Methode 2 erstellt und nach der in Abschnitt 5.2.2 beschriebenen Methode bearbeitet. Hiernach lagen die Pellets aus Sepharose G Kügelchen, an welche das behandelte YFP-N-Ras Konstrukt über den Anti-YFP Antikörper verbunden war, als Proben vor. Diese Pellets wurden in je 50 µl Probenpuffer mit erhöhtem Glycerolanteil resuspendiert. Anschließend wurden die Proben auf einem Wärmeblock für 10 min bei 95 °C erhitzt, wieder abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Die im Anschluss durchgeführte Gelelektrophorese und der Western Blot wurden im Prinzip wie in Abschnitt 5.2.3.1 beschrieben angefertigt. Abweichungen werden im Folgenden beschrieben: Von jeder Probe wurden jeweils 10 µl auf das Gel aufgetragen. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungen wurde die PVDF-Membran mit dem Odyssey Blocking Puffer für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Als primärer Antikörper wurde der Anti-GFP-Maus Antikörper verwendet. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in dem Odyssey Blocking Puffer verdünnt und hiermit die Membran über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 min mit PBS-Tween (0,1 %) gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde der IRDye 680 Goat Anti-Mouse IgG Antikörper verwendet. Zur Detektion der Biotingruppen wurde das IRDye 800CW Labeled Streptavidin Konjugat verwendet. Der Zweit-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:7500 und das Streptavidin Konjugat in einer Verdünnung von 1:3500 in dem Odyssey Blockierungs Puffer für 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken mit der Membran inkubiert. Dann wurde die Membran zweimal für 15 min mit PBS-Tween (0,1 %) und einmal für 15 min mit PBS gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System.

5.2.4 Tubulin-Polymerisations Assay

Für den Polymerisations Assay wurden zunächst die in Tabelle 4 angegebenen Stammlösungen hergestellt. Das Tubulin wurde aus Schweinehirnen nach Castoldi

und Popov 2003^[138] aufbereitet. Mit diesen Stammlösungen wurden die einzelnen Proben, wie in der Tabelle 4 angegeben bis auf das GTP zusammenpipettiert.

Tabelle 4: Stammlösungen und Zusammensetzung der Proben

Stammlösung	Konzentration/ Stammlösung	Volumen/Probe	Endkonzentration/Probe
H ₂ O	-	35,25 µl	-
Glutamat	2 M	60 µl	0,8 M
MgCl ₂	1 mM	15 µl	100 µM
Tubulin	100 µM	15 µl	10 µM
Substanz	10 mM	0,75 µl	50 µM
o. Nocodazol	50 µM	0,75 µl	250 nM
o. DMSO	-	0,75 µl	-
GTP	2,5 mM	24 µl	0,4 mM

Die Proben wurden anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Quarzküvetten (105.200; Hellma, Müllheim, D) in dem Cary 100Bio Spektrometer (Varian, Darmstadt, D) auf 15 °C äquilibriert. Nach der Inkubation wurde zu jeder Probe GTP zugegeben, die Proben kurz gevortext, abzentrifugiert und in die Küvetten überführt. Sofort wurde das Messprogramm gestartet. Hierbei wurde die Temperatur für 1 min auf 15 °C gehalten und dann auf 30 °C erhöht. Diese Temperatur wurde für weitere 20 min gehalten. Danach erfolgte eine Absenkung der Temperatur auf 15 °C, welche für weitere 17 min gehalten wurde. Während des gesamten Programms wurde die optische Dichte jeder Probe bei 350 nm ca. alle 24 sec detektiert.

5.3 Mikroskopie

5.3.1 Durchlicht und Fluoreszenzmikroskopie in Mikrotiterplatten

Die Aufnahme der Bilddaten für den MDCK-F3- und BSC-1 Phänotyp Assay wurden mit dem automatisierten Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena) in Verbindung mit der Software Metamorph (Molecular Devices, Downingtown, USA) durchgeführt. Die Aufnahmen der Bilder erfolgten mit einer CoolSnap ES Kamera (Roper Scientific Photometrics, Tucson, USA). Das automatisierte System wurde von der Firma Visitron Systems GmbH (Puchheim, Deutschland) bezogen. Das System erlaubt die automatisierte Aufnahme von Bildern in verschiedenen Mikrotiterplatten-Formaten zu unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen. Für alle Anwendungen

wurde als Grundeinstellung für die MetaMorph Software unter „Screen Acquisition“ das Programm „SaschaMTAssayabsviersites“ verwendet. Diese Grundeinstellungen sind besonders für den BSC-1 Phänotyp Assay gedacht. Sie konnten aber einfach auf jedes Plattenformat und jede gewünschte Anregungs- und Emissionswellenlänge verändert werden. Wichtig bei dieser Grundeinstellung war die Einstellung der automatischen Fokussierung unter „Auto Focus“. Diese wurden wie in Abb. 15 gezeigt vorgenommen.

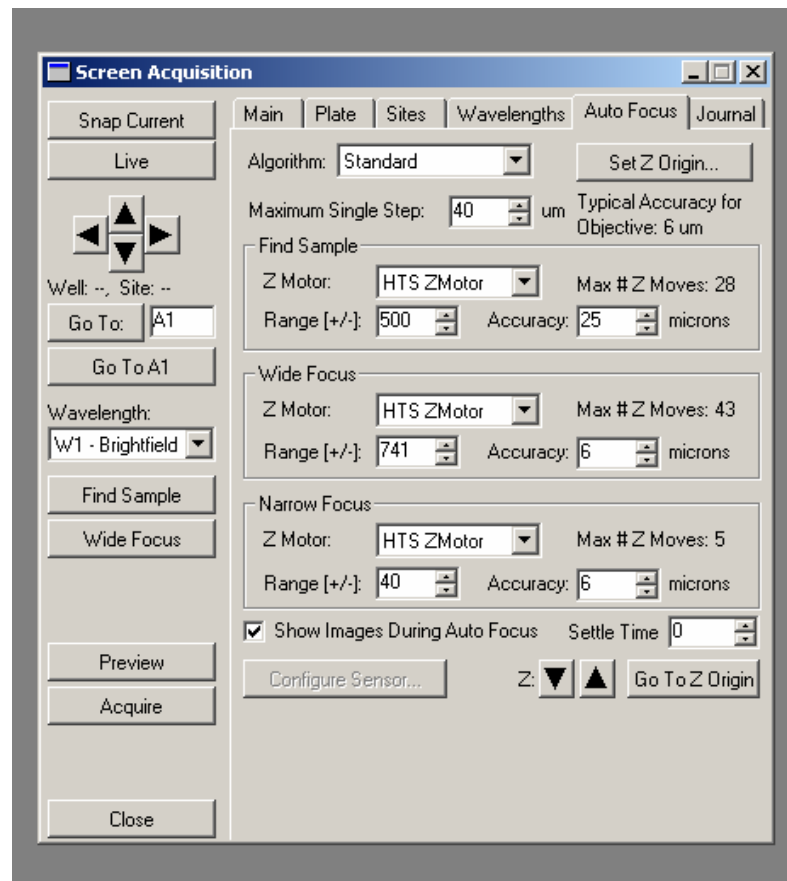


Abb. 15: Bildschirmansicht der Einstellungen des „Auto Focus“ im Menü „Screen Acquisition“ Die hier gezeigten Einstellungen gelten für alle mit dem automatisierten System aufgenommenen Bilddaten.

Um mit Hilfe der Funktion „Screen Acquisition“ Bilddaten aufzunehmen, wurden die Einstellungen für jeden Assay und jedes Plattenformat spezifisch vorgenommen. Die folgenden Schilderungen beziehen sich auf die Aufnahme von Bilddaten für den MDCK-F3- und BSC-1-Phänotyp Assay im 384-Loch-Platten Format. Zunächst wurde in dem Menü „Main“ die Einstellung unter „Load State“ vorgenommen. Hierbei wurde das erwähnte Programm „SaschaMTAssayabsviersites.HTS“ geladen. Daraufhin konnten die Einstellungen nach Wunsch vorgenommen werden. In Tabelle 5 sind die Grundeinstellungen für die einzelnen Assays aufgeführt.

Tabelle 5: Einstellungen innerhalb des Menüs „Screen Acquisition“

Einstellungen in Screen Acquisition	BSC-1 Assay	MDCK-F3 Assay
<p><u>Main:</u> Magnification: Camera Binning: Gain: Multiple Sites Per Well: Multiple Wavelengths: Show Images During Acquisition:</p>	<p>20x 2 Gain 2 (2x) Yes Yes Yes</p>	<p>10x 2 Gain 2 (2x) Yes Yes Yes</p>
<p><u>Plate:</u> Plate Size: First Well For Finding Samples</p>	<p>384 Wells A1</p>	<p>384 Wells A1</p>
<p><u>Sites:</u> Dim [NxN]: Total Sites: Spacing Between Images: Auto Focus Each side:</p>	<p>2 4 0 µm Narrow</p>	<p>2 4 0 µm Wide</p>
<p><u>Wavelengths:</u> Number of Waves: Illumination: <u>Exposure:</u> <u>Target Intensity:</u> <u>Auto Focus Acquisition:</u> Same settings as wavelength: Exposure:</p>	<p>3 1. DAPI 2. Texas Red 3. FITC 500 ms (DAPI) 1000 ms (Texas Red) 2000 ms (FITC) 2000 (für alle Wellenlängen) Wide and Narrow No 120 (DAPI) 700 (Texas Red) 700 (FITC)</p>	<p>1 1. Brightfield 1-3 ms (Brightfield) 2000 (Brightfield) Wide and Narrow Yes</p>

Bin:	4 (DAPI) 2 (Texas Red) 2 (FITC)	
Gain:	Gain 2 (2x) (für alle Wellenlängen)	
Center Quad:	No	No
<u>Alignment Cropping:</u>	X:0, Y:0	X:0, Y:0
<u>Calculate wavelength offset:</u>	No	No
<u>Auto Expose at sart:</u>	No	No
<u>Auto Focus:</u>	Siehe Abb. 15	Siehe Abb. 15

Vor dem Start der Bildaufnahmen war es zusätzlich wichtig die Ausgangspositionen festzulegen. Hierfür wird bei der Vertiefung A1 einer jeden Platte das Objektiv, über manuelles Einstellen, auf die Mitte dieser Vertiefung ausgerichtet. Dann wird im Untermenü „Plate“ unter „Set A1 Center“ die jeweilige Position gespeichert. Nach der Durchführung aller notwendigen Einstellungen wurde die automatische Bildaufnahme durch die Funktion „Acquire“ gestartet.

5.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellpräparaten auf Objektträgern

Die Präparate wurden wie in Abschnitt 5.1.11.2 beschrieben erstellt. Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde an einem Axioplan II Mikroskop (Zeiss) unter Verwendung eines 63x Öl-Immersion-Objektivs durchgeführt. Die Aufnahme der Bildaten erfolgte mit einer Micromax CCD Kamera (Model: CCD-1300-Y, Princeton Instruments, USA) unter Verwendung der MetaView Software (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland).

5.3.3 Live Cell Imaging

5.3.3.1 Durchführung der Live Cell Imaging Mikroskopie in der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas U. Mayer

Für die Live Cell Imaging Aufnahmen wurden Die TC21 Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer 12-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen wurden gleich bei der Aussaat nach der in Abschnitt 5.1.6 beschriebenen Methode synchronisiert. Nach der Entfernung des Thymidinblocks wurden die Zellen mit den jeweiligen Substanzen in CO₂-unabhängigem Medium inkubiert. Die Platte wurde sofort nach Applikation der Substanzen in einem beheizten Plattenhalter (37 °C) auf das Mikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss) positioniert. Durch Verwendung der Software Metamorph (Molecular Devices, Downingtown, USA) wurde die Aufnahme der Bilddaten so eingestellt, dass in jeder Vertiefung zwei Positionen aufgenommen wurden. Hierbei wurde jede Position alle 4 min bei der Anregungswellenlänge für GFP und im Durchlicht für eine Dauer von 16 h abfotografiert. Die erhaltenen Bilddaten konnten mit Hilfe derselben Software als Film betrachtet werden.

5.3.3.2 Durchführung der Live Cell Imaging Mikroskopie in der Arbeitsgruppe von Prof. Anthony A. Hyman

Bei diesen Live Cell Imaging Aufnahmen wurden die Zellen nicht synchronisiert. Die Aufnahme der Bilddaten erfolgte 2 h nach Substanzapplikation. Bei der Untersuchung von GFP-H2B-HeLa-Zellen in 384-Loch-Platten, wurden hierfür 24 h vor der Substanzapplikation je 1000 Zellen / Vertiefung in 50 µl Medium ausgesät. Hierbei konnten 15 Substanzen in den Konzentrationen von 50 nM bis 12,8 µM getestet werden. Die Konzentrationen wurden hierbei beginnend von 50 nM bis 12,8 µM jeweils verdoppelt. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines automatischen Olympus IX81 Mikroskops unter Verwendung der integrierten Software-Funktionen „CellR“ und „ScanR“.

Für die hochauflösenden Live Cell Imaging Aufnahmen wurden die Zellen in 8-Loch Zellkammern (µ-slide 8-well; 80826; Ibidi GmbH, Martinsried, D) zu 4000/Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Substanzen bei einer Konzentration von 30 µM in CO₂-unabhängigem Medium auf die Zellen gegeben und nach 2 h wurden die Aufnahmen der Live Cell Imaging Filme begonnen. Hierfür wurde ein DeltaVision® RT System (Applied Precision, LLC, Issaquah, USA; IX70/71 [Olympus]), welches mit einer CCD Kamera (CoolSnap HQ; Roper Scientific Photometrics, Tucson, USA) ausgestattet war, verwendet. Für diese Aufnahmen

wurde ein 60x 1,42 NA PlanApo N Objektiv bei 37 °C benutzt. Die Aufnahmen wurden in Z-Ebenen mit 2,5 µm Abständen durchgeführt und alle 3 min wiederholt. Die Bilddaten wurden mit der SoftWoRx Software (Applied Precision, LLC, Issaquah, USA) berechnet. Hierdurch konnten hochaufgelöste Filme betrachtet werden, bei denen die scharfen Bereiche aus den Bildern der Z-Ebenen so zusammengeführt werden, dass ein komplett scharfes Abbild der jeweils betrachteten Zelle entsteht.

5.4 Verwendung des Pipettierroboters Sciclone ALH500

5.4.1 Durchführung der Substanzapplikationen

Bei der Verwendung des Pipettierroboters Sciclone ALH500 (Caliper Life Sciences GmbH, Rüsselsheim, D) wurden wie im Abschnitt 6.2.2 beschrieben, Protokolle für die Applikation von Substanzen in ein 384-Loch-Platten Format erstellt. Hierbei war das Format der Platte, welche die Stammlösungen der jeweiligen Substanzen in einer Konzentration von 10 mM enthielten, Ausgangspunkt der hierfür programmierten Pipettierprozeduren (siehe Abschnitt 6.2.2, Abb. 28). Für die Verwendung von Substanzplatten im 384-Loch-Platten Format wurde das Programm „CellScreen384WP_SM.ptc“ erstellt. Die Positionierung der hierfür notwendigen Komponenten auf der Arbeitsoberfläche des Roboters ist in Abb. 16 dargestellt. An den Positionen der einzelnen Felder sind spezielle Halterungen für Platten und Schalen angebracht, in denen diese fest arretiert werden können. Die Position des Ventilators ist gleichzeitig die Position für die Rücksetzung aller Koordinaten auf den Wert Null. Daher sollte hier keine andere Komponente aufgestellt werden. An der Position B 4 befindet sich ein Wasserbecken, welches über eine Wasserpumpe entleert und wieder befüllt werden kann. Außerdem kann in diesem Wasserbad Ultraschall erzeugt werden. An der Position B 2 wurde ein Kissen mit stark saugfähigem Kleenex Ultra Super Soft Papier (Kimberley-Clark®, Koblenz, Deutschland) aufgestellt. Hier wurden die Pipettiernadeln nach Durchführung von im Programm integrierten Waschprotokollen getrocknet. Die Schale (04.072.0340; Nerbe Plus, Winsen/Luhe, D) an Position C 1 wurde mit 70 % Ethanol befüllt und diente wie das Wasserbad zur Reinigung der Pipettiernadeln. Die an Position D 1 befindliche Schale wurde mit Zellmedium befüllt. An Position C 2 wurde die 384-Loch-Platte mit den Stammlösungen der zu testenden Substanzen positioniert.

	1	2	3	4	5
A	-	-	-	-	-
B	-	Tupfer	Zellkulturplatte1	Ultraschallbad	-
C	Schale mit Ethanol (70%)	Substanzplatte	Zellkulturplatte 2	Zellkulturplatte 4	-
D	Schale mit Medium	Vormixplatte	Zellkulturplatte 3	-	Ventilator

Abb. 16: Positionsbelegung der Arbeitsoberfläche für das Pipettierprogramm „CellScreen384WP_SM.ptc“.

Eine 384-Loch-Platte für kleine Volumina (384 Well Small Volume™ HiBase Polystyrol Microplatte, transparent; 784101; Greiner Bio-One GmbH) wurde als Vormixplatte an Position D 2 positioniert. Nachdem die genannten Komponenten an den jeweiligen Positionen aufgestellt wurden, konnte das Programm gestartet werden. Hierdurch wurde die Vormixplatte mit Zellmedium befüllt und eine Vorverdünnung der Substanzen hergestellt (siehe hierzu Abb. 28 A in Abschnitt 6.2.2). Während der einzelnen Schritte wurden die Pipettieradeln des Roboters im Ultraschallbad sowie mit Ethanol gereinigt und anschließend auf dem Tupfer und mit dem Ventilator getrocknet. Nach Erstellung der Vorverdünnungen erscheint ein Dialogfeld mit der Aufforderung, die Zellkulturplatten zu positionieren. Die vorbereiteten 384-Loch-Platten mit den Zellen konnten nun an den angegebenen Positionen aufgestellt werden. Durch Anklicken der Schaltfläche „OK“ wurde das Pipettierprogramm fortgeführt. Hierbei wurden die Substanzen auf die jeweiligen Zellkulturplatten appliziert.

Für die Verwendung von Substanzplatten im 96-Loch-Platten Format, wurde das Programm „CellScreen96WP_SM.ptc“ erstellt. Die Positionierung der einzelnen Komponenten ist bei diesem Programm verändert und in Abb. 17 gezeigt. Bei diesem Programm werden die Substanzen ebenfalls vorverdünnt und anschließend auf eine 384-Loch-Platte mit den vorbereiteten Zellen aufgetragen. Hierbei wird jede Substanz in vier verschiedene Vertiefungen der Platte appliziert (siehe auch Abb. 28 B in Abschnitt 6.2.2).

	1	2	3	4	5
A	Schale mit Ethanol (70%)	-	-	-	-
B	-	Tupfer	-	Ultraschallbad	-
C	-	Vormixplatte	Zellkulturplatte1	-	-
D	Schale mit Medium	Schale mit PBS	Substanzplatte	-	Ventilator

Abb. 17: Positionsbelegung der Arbeitsoberfläche für das Pipettierprogramm „CellScreen96WP_SM.ptc“.

Die an der Position D 2 befindliche Schale mit PBS diente für dieses Programm als Abfallreservoir für evtl. auftretende Substanzreste. Alle übrigen Komponenten sind dieselben, wie sie für das Programm „CellScreen384WP_SM.ptc“ verwendet wurden. Nachdem alle Komponenten, bis auf die Zellkulturplatte, auf den jeweiligen Positionen aufgestellt wurden, konnte das Programm gestartet werden. Hierdurch wurde eine Vorverdünnung der Substanzen erstellt. Nach Erscheinen eines Dialogfeldes wurde die Zellkulturplatte positioniert und das Programm wie oben beschrieben fortgesetzt. Darauf erfolgte die Applikation der Substanzen.

5.4.2 Evaluierung der Pipettiergenauigkeit

Die Pipettiergenauigkeit des Roboters wurde für jedes Programm unter Verwendung einer Orange G-Farblösung optimiert. Hierzu wurde eine Stammlösung von 1 mg / ml Orange G in DMSO erstellt. Diese wurde in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte (MICROPLATTE, 96 WELL, PP, V-BODEN,CLEAR; 651201; Greiner, Solingen, D) bzw. 384-Lochplatte (384WL, RB, CLR, TCT; 3656; Corning, Schiphol-Rijk, NL) pipettiert und diente als Attrappe für die Substanzplatte. Anstelle der Zielplatten mit Zellen wurden entsprechende 384-Loch-Platten mit PBS ohne Zellen verwendet. Nach dem Durchlaufen des Pipettierprogramms wurde die optische Dichte in den einzelnen Vertiefungen der Zielplatten bei 405 nm bestimmt. Abweichungen dieser Werte gaben Aufschluss über die Pipettiergenauigkeit bei dem jeweiligen Programm.

Zur Berechnung der durch das Pipettierprogramm erhaltenen Endkonzentrationen in den jeweiligen Zielplatten, wurde manuell eine Verdünnungsreihe der Orange G Stammlösung erstellt. Hierbei wurden die Verdünnungen in PBS Puffer so angesetzt, wie sie mit einer 10 mM Stammlösung zur Erreichung der jeweiligen Endkonzentrationen durchgeführt werden würde. Auf diese Weise wurden Verdünnungen für die erwarteten Endkonzentrationen von 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM , 35 μM , 40 μM und 45 μM erstellt. Von den einzelnen Verdünnungen wurden je 50 μl in sieben Vertiefungen einer 384-Loch-Platte pipettiert und anschließend die optische Dichte bei 405 nm bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden für die jeweilige Verdünnung gemittelt und mit ihnen eine Eichgerade erstellt. Diese ist in Abb. 18 gezeigt.

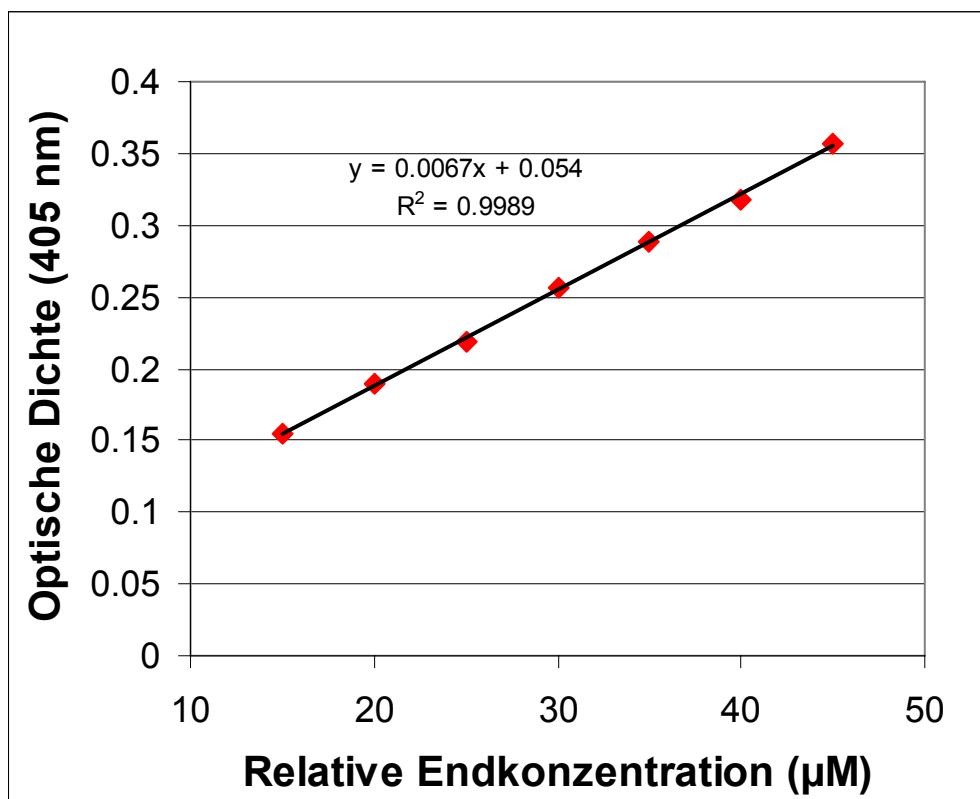


Abb. 18: *Eichgerade zur Bestimmung der relativen Endkonzentrationen in den Zielplatten nach Durchführung der automatisierten Pipettierprogramme mit einer Orange G Stammlösung.*

Mit Hilfe dieser Eichgeraden konnten die gemessenen Extinktionswerte in den Zielplatten, nach Durchführung der einzelnen Pipettierprogramme mit derselben Orange G Stammlösung in Relation zu den voraussichtlich erhaltenen Endkonzentrationen gesetzt werden.

6. Ergebnisse

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse behandeln hauptsächlich den Startpunkt eines vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes: das Screening von Substanzen in zellulären Testsystemen. Mit den hier verwendeten Assays sollten Wirkstoffe identifiziert werden, die in krebsrelevante biologische Prozesse eingreifen. Im Fokus standen Ras-abhängige Signalwege und ihre phänotypischen Auswirkungen, sowie Elemente des Cytoskeletts und ihre Funktion bei der Zellteilung. Es sollen zunächst die Eigenschaften und die Etablierung der hierzu verwendeten Testsysteme beschrieben werden. Daraufhin werden Untersuchungen von Substanzen gezeigt, deren Aktivitäten zunächst in jeweils einem der vorgestellten Testsysteme identifiziert wurden. Darüber hinaus werden Studien zur Evaluierung ihrer biologischen Aktivität vorgestellt. In diesem Zusammenhang wird auch die Bestätigung der biologischen Aktivität einer Substanz in Säugetierzellen aufgezeigt, welche von einer kooperierenden Arbeitsgruppe in einem Reporter-gen Assay in Pflanzen identifiziert wurde. Zudem wird eine Struktur-Aktivitäts-Studie eines synthetisierten Naturstoffes mit Hilfe eines Testsystems beschrieben. Darauf folgen die Ergebnisse der Untersuchungen einer selektionierten Substanzbibliothek in allen drei vorgestellten Testsystemen und eine Darstellung der hierdurch gewonnenen Informationen. Abschließend wird die Analyse der biologischen Aktivität von APT1 im Kontext eines erfolgreichen rückwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes beschrieben.

6.1 *Der PathDetect[®]-Reporter-gen Assay*

6.1.1 Prinzip

Die HLR-ELK1 (*HeLa Luciferase Reporter-ELK1*) Zelllinie von Stratagene wurde erstellt, um *in vivo* die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ELK1 zu detektieren. Diese Aktivierung steht in enger Korrelation mit der Aktivierung der vorgeschalteten Signalkaskade über EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK (siehe Abschnitt. 2.2.4). Die Zelllinie hat hierfür zwei verschiedene DNA-Konstrukte stabil in ihr Genom integriert (siehe Abb. 19). Das eine Konstrukt beinhaltet eine fünffach wiederholte Erkennungssequenz des in der Hefe vorkommenden Transkriptionsfaktors GAL4. Dieser Sequenz folgen eine TATATA-Box und anschließend das offene Leseraster des Luciferase-Gens.

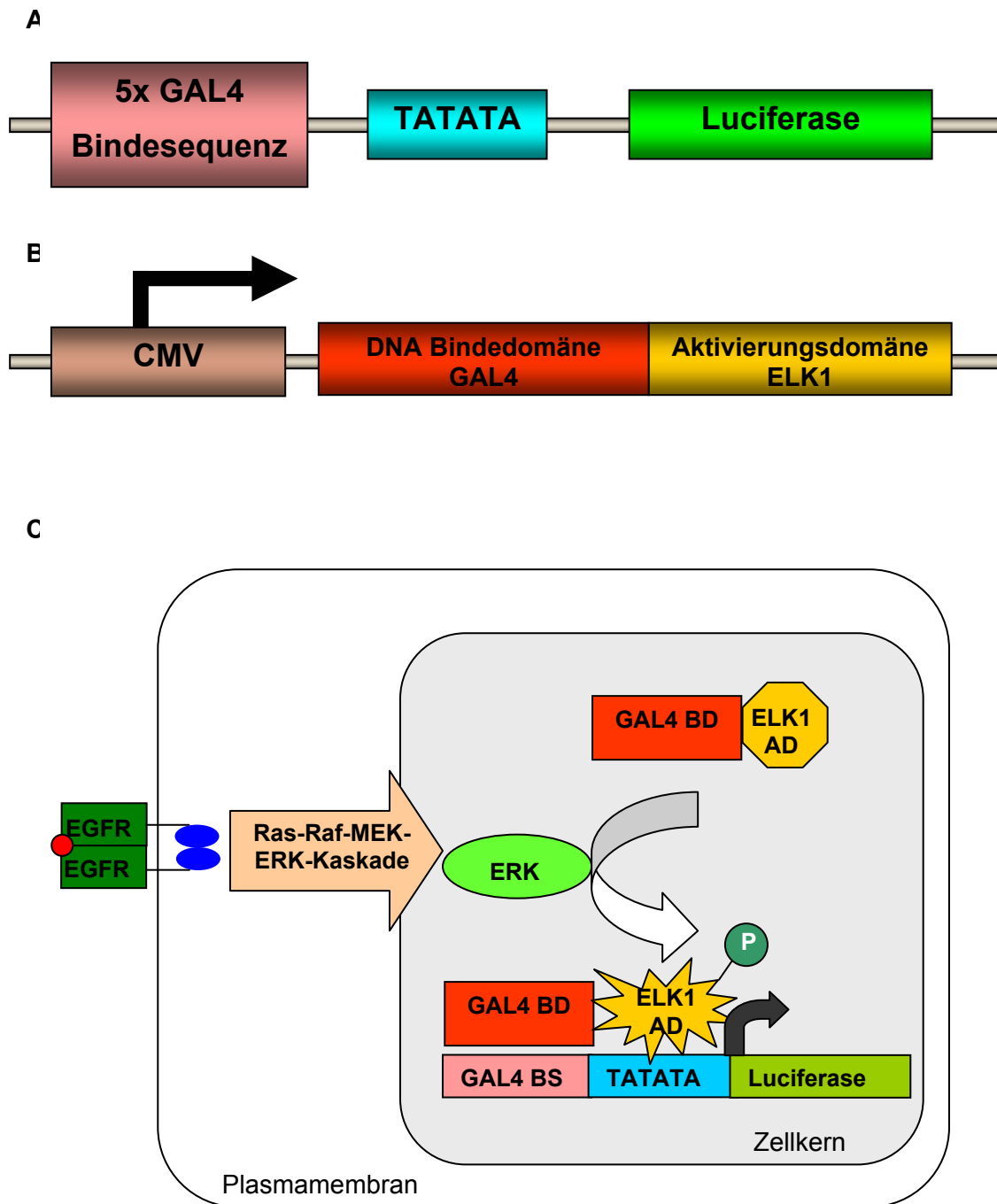


Abb. 19: Prinzip des PathDetect®-Reportergen Systems in der HLR-ELK1 Zelllinie. **A)** Die Reporter-Kassette beinhaltet eine fünffach wiederholte GAL4-Bindesequenz mit anschließender TATATA-Box und dem Luciferase-Gen. **B)** Die Transaktivator-Kassette besteht aus der Fusionssequenz der DNA-Bindedomäne von GAL4 und der Aktivierungsdomäne von ELK1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors. **C)** Durch die Bindung des Epidermalen Wachstumsfaktors (roter Punkt) an den EGF-Rezeptor wird die Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade aktiviert. Aktives ERK phosphoryliert im Zellkern die Aktivierungsdomäne von ELK1, was zu einer Expression des Luciferase Reportergens führt. (EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; Gal4 BD: Gal4 Bindedomäne; ELK1 AD: ELK1 Aktivierungsdomäne; GAL4 BS: GAL4 Bindesequenz).

Das andere Konstrukt enthält die Kodierungssequenz für die Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (Aminosäuren 1-147) als Fusion mit der Aktivierungsdomäne des ELK1 Transkriptionsfaktors (Aminosäuren 307-427) unter der Kontrolle des CMV (*cytomegalovirus*)-Promotors. Das Fusionsprotein wird somit konstitutiv in den Zellen exprimiert. Wenn in diesen Zellen durch Zugabe des Epidermalen Wachstumsfaktors die EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade aktiviert wird, führt dies zur Phosphorylierung der ELK1-Aktivierungsdomäne und somit zu ihrer Aktivierung. Das phosphorylierte Fusionsprotein induziert daraufhin die Transkription des Luciferase Gens.

Durch die Verwendung von Fusionen mit Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 aus der Hefe, wird in der menschlichen HeLa-Zelle ein autonomes System geschaffen, welches einen sehr geringen Signalhintergrund besitzt. Die HLR-ELK1-Zelllinie ist daher geeignet, um den Einfluss von verschiedenen Substanzen auf den aktivierten Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg zu untersuchen.

6.1.2 Etablierung

Es wurden zu Beginn die vom Hersteller vorgeschriebenen Bedingungen für dieses Reportersystem geschaffen und zunächst die Stärke des Reportersignals in Abhängigkeit von verschiedenen Aktivatoren untersucht. Der Versuchsablauf, sowie die Konzentrationen der Aktivatoren und Inkubationszeiten wurden ebenfalls vom Hersteller und aus Kelemen et al. 2002^[139] übernommen. Um ausreichend Lysat für die Messung der Luciferaseaktivität zu erhalten wurden die Zellen in 3,5 cm Petrischalen ausgesät und behandelt. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals wurden die Zellen im Hungermedium mit 0,5 % FCS (*fetal calf serum*) gelassen. Um den Einfluss einer höheren FCS Konzentration zu testen, wurde zu den Zellen frisches Wachstumsmedium gegeben, welches 10 % FCS enthält. Hierbei ist anzumerken, dass bei allen Bedingungen, wie vom Hersteller verlangt, hitzeinaktiviertes Kälberserum verwendet wurde. Somit war zu erwarten, dass die dort erhaltenen Wachstumsfaktoren in denaturierter Form vorlagen und daher kein starker Unterschied zu der Hintergrundkontrolle entstehen sollte. Als erstes Stimulanz wurde der beschriebene Wachstumsfaktor EGF verwendet. Als weiteres Stimulanz der Phorbol-ester PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat). Dieser kann für den endogenen Aktivator der Proteinkinase C das Diacylglycerol substituieren und so über die aktive Form von PKC zur Aktivierung von ERK führen.^[140] Um die maximale Aktivierung zu erhalten, wurden als letzter Ansatz EGF und PMA zusammen in Medium mit 10 % FCS zu den Zellen gegeben. Diese wurden unter den beschriebenen Bedingungen für

6. Ergebnisse

zwei Stunden inkubiert und anschließend die Luciferaseaktivität bestimmt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 20 grafisch dargestellt. Die Messung der Intensität erfolgte in einem Luminometer welches die Intensität des emittierten Lichts in RLU (*relative light units*) angibt. Die Einheiten sind nicht standardisiert und daher von der geräteeigenen Skalierung abhängig.

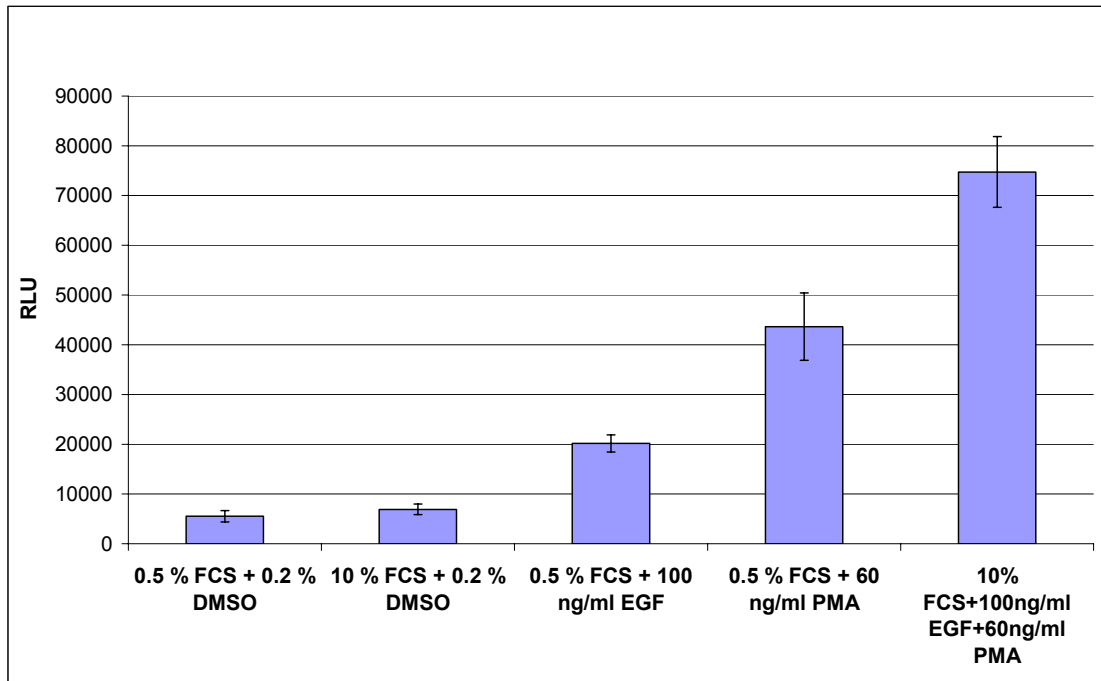


Abb. 20: Abhängigkeit der Luciferaseexpression von verschiedenen extrazellulären Stimuli. HLR-ELK1-Zellen wurden für 20 h in Hungermedium vorinkubiert und anschließend mit gezeigten Ansätzen für 2 h behandelt. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Jeder Ansatz wurde in dreifacher Ausführung getestet. Die erhaltenen Werte wurden aus den drei Ansätzen gemittelt und die Standardabweichungen bestimmt.

Der Mittelwert des Hintergrundsignals mit 0,5 % FCS im Medium beträgt 5536 (\pm 1143) RLU und der des Ansatzes mit 10 % FCS 6905 (\pm 1057) RLU. Wie erwartet, unterscheiden sich die beiden Signalintensitäten kaum voneinander. Bei den mit EGF stimulierten Zellen erhält man einen RLU Wert von 20162 (\pm 1727), was eine 3,7 fache Erhöhung des Signals bedeutet. Durch die Inkubation mit PMA erhält man sogar einen Wert von 43653 (\pm 6770) RLU und somit eine 7,9 fache Erhöhung des Signals. Die maximale Aktivierung führt mit einem Wert von 74747 (\pm 7103) RLU zu einer 13,5 fachen Erhöhung des Hintergrundsignals. Letzterer Wert stimmt mit den Ergebnissen von Kelemen et al. 2002 ^[139] überein, welche eine Verhundertfachtung des Signals unter diesen Bedingungen berichten. Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung eines bekannten Inhibitors dieses Signalwegs, dem Tyrphostin 47, auf das Reportersignal untersucht. Tyrphostin 47 inhibiert Protein- Tyrosinkinasen mit einer hohen Spezifität für den EGF-Rezeptor. ^[141-143] Hierfür wurden die Zellen für

6. Ergebnisse

20 h in Hungermedium inkubiert, wovon die entsprechenden Ansätze für 16 h mit Tyrphostin 47 in einer Konzentration von 50 μM inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Aktivierung mit EGF oder mit EGF, PMA und 10 % FCS in An- oder Abwesenheit des Inhibitors. Hierbei wurde die Konzentration von EGF auf 200 ng/ml verdoppelt, um die Signalintensität zu erhöhen. Die Zellen wurden zwei Stunden nach der Aktivierung lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 21 gezeigt.

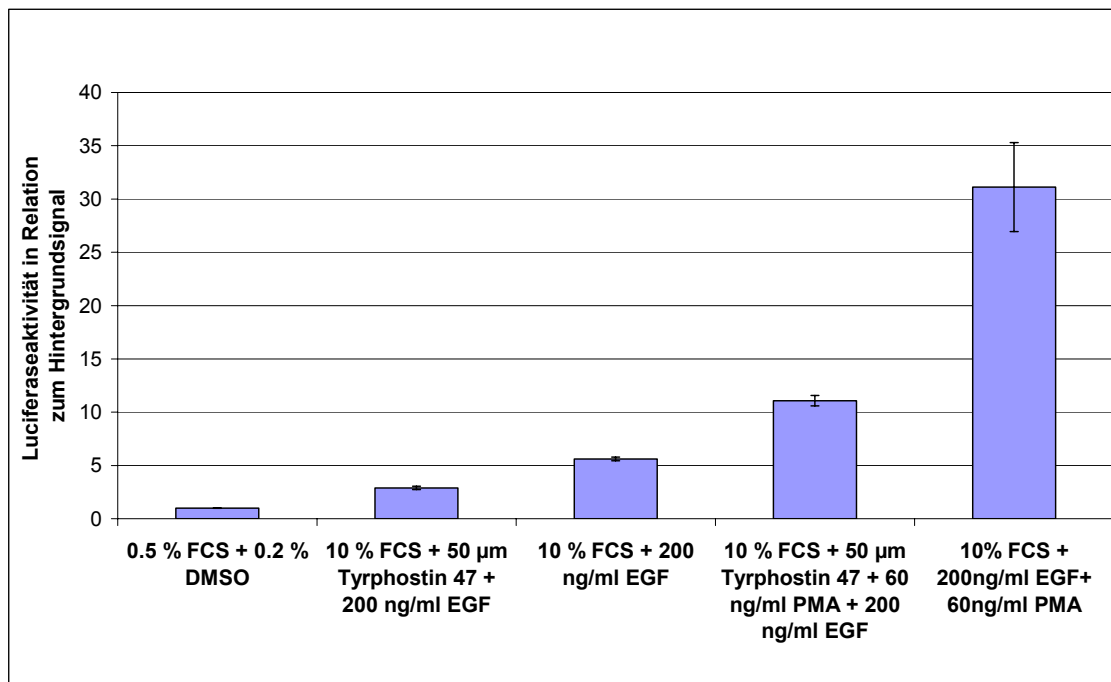


Abb. 21: Auswirkungen des Tyrosinkinase Inhibitors Tyrphostin 47 auf die Reporterexpression bei verschiedenen extrazellulären Stimuli. Das Hintergrundsignal von unstimulierten HLR-ELK1 Zellen wurde auf 1 normiert. Bei mit Tyrphostin 47 behandelten und mit EGF stimulierten Zellen ergibt sich eine dreifache Erhöhung des Signals. Die alleinige Stimulation mit EGF führt zu einem fast sechsfach stärkeren Signal. Tyrphostin 47 verringert bei voller Aktivierung die Signalstärke auf ein elfaches des Hintergrundwertes im Gegensatz zu einer 31-fachen Erhöhung ohne Inhibitor. Jeder Ansatz wurde in dreifacher Ausführung getestet.

Die Stimulation mit EGF führte bei diesem Experiment zu einer 5,6 ($\pm 0,17$) fachen Erhöhung des Reporterensignals im Vergleich zu dem Hintergrundsignal der unstimulierten Zellen. Dies ist etwas höher als bei dem in Abb. 20 gezeigten Experiment. Viel deutlicher ist der Unterschied bei voller Aktivierung mit EGF, PMA und 10 % FCS. Hier wurde eine 31,1 ($\pm 4,18$) fache Erhöhung des Signals erhalten. Die Signalausbeuten schwanken demnach bei diesem zellulären Testsystem erheblich. Somit ist es hierbei besonders wichtig, bei jedem Experiment, welches die Auswirkungen einer Substanz auf die Signalaktivität untersuchen soll, Positiv- und

Negativkontrollen durchzuführen. Der Tyrosinkinaseinhibitor Tyrphostin 47 reduzierte das Signal bei EGF stimulierten Zellen auf das 2,9 (\pm 0,15) fache des Hintergrundsignals und inhibierte bei dieser Konzentration somit um 48 %. Etwas höher fiel die Inhibition bei stark aktivierten Zellen aus. Hier reduzierte Tyrphostin 47 die Aktivität auf das 11,0 (\pm 0,48) fache des Hintergrunds und inhibierte somit um 64 %.

Das Reportergensystem zeigte hiernach eine stimulanabhängige Aktivierung der Reporterexpression und konnte durch einen, für diese Signalkaskade bekannten, Inhibitor inhibiert werden. Die signifikanteste Aktivierung erfolgte bei der Verwendung des Phorbolesters, welcher den Einfluss der Proteinkinase C auf den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg mit einbezieht. Die Aktivierung mit EGF allein führte unter diesen Bedingungen nur zu einer vier- bis fünffachen Erhöhung, was noch nicht ausreichend signifikant ist. Die Verwendung von 3,5 cm Petrischalen limitiert die Durchführung dieses Assays auf nur wenige Ansätze und ist demnach nicht geeignet mehrere Substanzen parallel zu testen. Daher wurde im Folgenden dazu übergegangen, dieses System auf 96-Loch Mikrotiterplatten zu etablieren und dort weiter zu optimieren.

Die größte Schwierigkeit bei der Miniaturisierung eines Testsystems besteht in der parallelen Einstellung verschiedener Parameter, um stabile Signale mit möglichst geringen Standardabweichungen zu erhalten. Die optimalen Bedingungen für die einzelnen Parameter können eigentlich nur mit einem schon funktionierenden System gefunden werden. Doch dies ist zu Beginn nicht gegeben. So ist die Ermittlung der richtigen Bedingungen für ein moderat funktionierendes System der zeitaufwendigste Schritt. Bei der Überführung des Systems in ein Mikrotiterplattenformat mussten zudem die einzelnen Arbeitsschritte so umgewandelt werden, dass der gesamte Prozess innerhalb der jeweiligen Vertiefung der Platte durchlaufen wird. In diesem Zusammenhang wurden die zu verwendende Zellzahl, die optimalen Mengen von Zellkulturmedien, Lysepuffer und Luciferasereagenz und die Handhabung optimiert. Die zu verwendende Zellzahl wurde zunächst durch mikroskopische Untersuchungen der Zelldichte in durchsichtigen Mikrotiterplatten erfasst. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Lyse nicht zu 100 % konfluent gewachsen waren. Dies führt nämlich dazu, dass die Zellen beginnen abzusterben und teilweise eine durch Kontaktinhibition abgeschwächte Signalweiterleitung erfolgt. Die Zellen können zudem leichter bei mechanischer Beanspruchung abgelöst werden und eine gleichmäßige Aktivierung des Signalweges ist nicht mehr gewährleistet. Da die Konstanz der einzelnen Werte innerhalb einer Mikrotiterplatte stark von einer gleich hohen Zellzahl in den jeweiligen Vertiefungen abhängt, sollte hier also eine

etwas geringere Zelldichte gewählt werden, um den geschilderten Effekten vorzubeugen. Nach dem Erhalt eines stabilen Systems wurden die unterschiedlichen Zellzahlen in Bezug auf die zu erhaltenen Signalstärken weiter untersucht. Hierbei wurden die Zellen mit steigender Anzahl ausgesät und unter den Bedingungen des optimierten Systems behandelt. In Abb. 22 sind die erhaltenen Signalstärken nach Stimulation mit EGF und PMA gezeigt. Man erkennt einen proportionalen Anstieg der Signalstärke mit steigender Zellzahl. Bei 40000 Zellen pro Vertiefung ist das Signal verringert und die Standardabweichung erhöht. Dies ist ein Hinweis auf die beschriebenen Effekte aufgrund von zu hohen Zellzahlen.

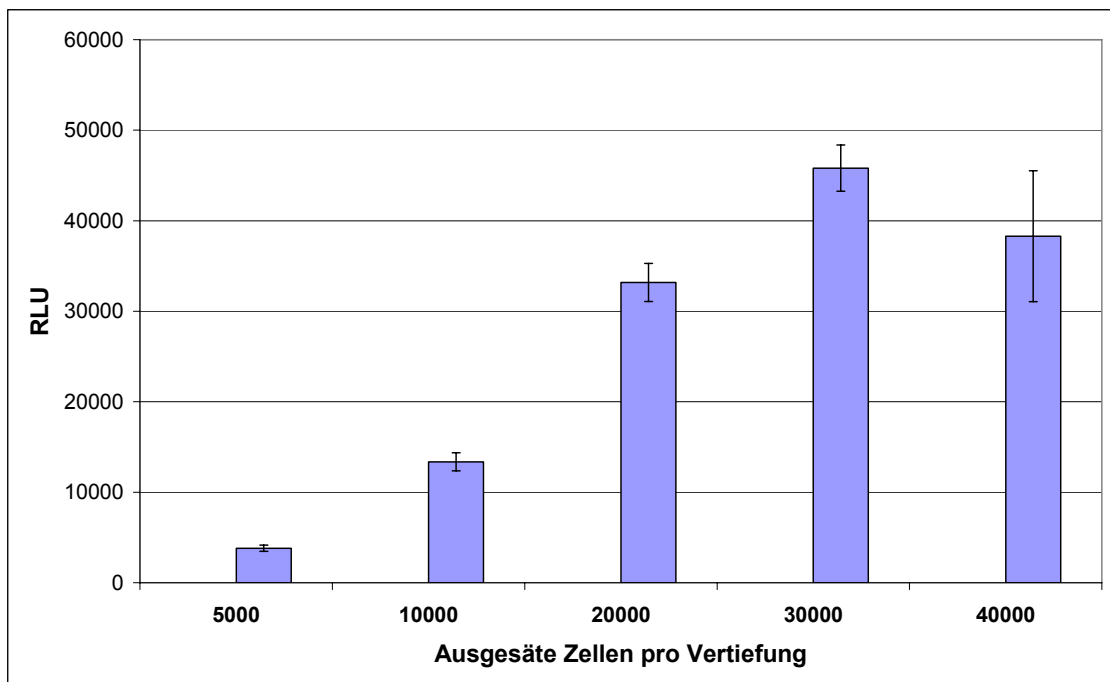


Abb. 22: Auswirkung der ausgesäten Zellzahl auf die zu erreichende Signalstärke. HLR-ELK1-Zellen wurden zu angegebenen Anzahlen in einer 96-Loch Mikrotiterplatte ausgesät. Die Stimulation erfolgte mit EGF und PMA. Bei 5000 bis 30000 ausgesäten Zellen pro Vertiefung steigt die Signalstärke proportional zur Zellzahl. Bei 40000 Zellen ist das Signal abgeschwächt und die Standardabweichung erhöht. Dies ist auf ein verstärktes Ablösen der Zellen aufgrund eines zu dichten Wachstums der Zellen zurückzuführen. Jeder Ansatz wurde in vierfacher Ausführung getestet.

Anhand dieser Ergebnisse wurde die auszusäende Zellzahl auf 20000 Zellen pro Vertiefung festgesetzt, um so zu gewährleisten, dass die Zellen sich noch in der Wachstumsphase befinden und auch etwaige Varianzen in der Wachstumsgeschwindigkeit oder bei der Aussaat keinen Einfluss auf die Signalstabilität haben.

Ein weiterer zu optimierender Faktor war die geringe Stärke des Signals bei EGF Stimulation. Es wurde angestrebt, dieses Testsystem nur unter Verwendung von

EGF als Aktivator der Reporterexpression zu verwenden und die synergistische Aktivierung mit PMA zwecks Fokussierung auf den durch EGFR aktivierten Ras-Raf-MEK-ERK-Weg zu vermeiden (siehe Abschnitt 7.1.1). Daher wurde die Inkubationsdauer nach der EGF Stimulation erhöht um so eine Akkumulation der synthetisierten Luciferase innerhalb der Zellen zu erreichen. Die von der Inkubationsdauer abhängigen Signalstärken sind in Abb. 23 gezeigt.

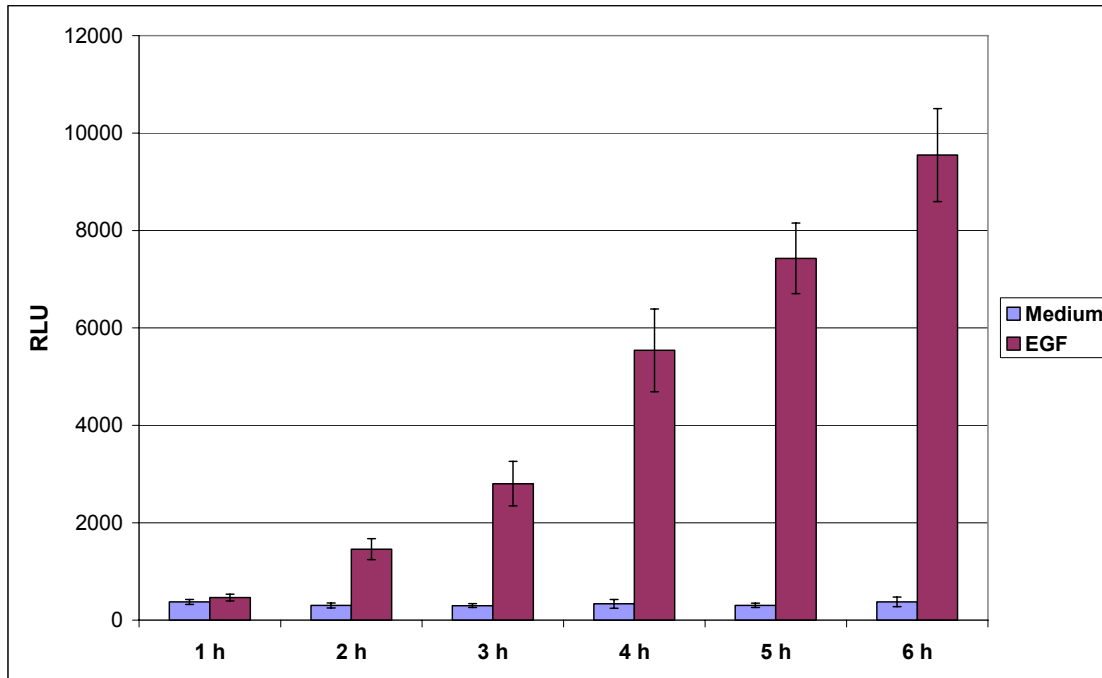


Abb. 23: Abhängigkeit der Signalstärke von der Inkubationsdauer nach EGF Stimulation. HLR-ELK1-Zellen wurden mit EGF stimuliert oder in Hungermedium belassen und zu angegebenen Zeitpunkten die Luciferaseaktivität bestimmt. Das Signal steigt bei zunehmender Inkubationsdauer an und erreicht nach 6h das 25-fache des Hintergrundwertes.

Man erkennt, dass die Signalstärke mit wachsender Inkubationsdauer zunimmt. Schon nach sechs Stunden ist der Wert auf 9548 (\pm 952) im Vergleich zu dem Hintergrundwert von 378 (\pm 98) gestiegen, was eine 25-fache Erhöhung bedeutet. Somit liefert eine längere Inkubationsdauer nach der EGF-Stimulation ein besseres Signal-Hintergrundverhältnis. Dies führt zu einem besseren Z'-Faktor welcher ein statistischer Parameter für die Qualität des Testsystems darstellt.^[38] Der Z'-Faktor wird nach folgender Formel berechnet:

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

Hierbei ist σ_{c+} die Standardabweichung des EGF Signals und σ_{c-} die Standardabweichung des Hintergrundsignals. Die Variable μ_{c+} ist der Mittelwert des EGF Signals und μ_{c-} der Mittelwert des Hintergrundsignals. Der Z'-Wert gibt somit an,

ob der Unterschied zwischen Hintergrund- und Aktivierungssignal groß genug und die Standardabweichungen gering genug sind, um einen genügend großen dynamischen Bereich für ein Testsystem zu erhalten. Der Z'-Faktor sollte für eine ausreichende Qualität zwischen 0,4 und 1 liegen. Der Wert für den Z'-Faktor nach 6 h Inkubationszeit in Abb. 23 liegt bei 0,66 und befindet sich somit in dem gewünschten Bereich. Daher wurde eine minimale Inkubationszeit von 6 h als Bedingung für diesen Assay festgesetzt. Als letzter Schritt bei der Miniaturisierung wurde überprüft, welcher Fehler aufgrund von unterschiedlichen Belüftungsbedingungen und Verdunstungsraten sowie Varianzen in der Handhabung zwischen den einzelnen Vertiefungen einer komplett aktivierten 96-Loch Platte entsteht. Der Mittelwert dieser komplett aktivierten Platte lag bei 6579 (\pm 630) RLU was einen Fehler von 9,6 % bedeutet und für ein zelluläres Testsystem akzeptabel ist. Der Assay war somit miniaturisiert und es wurde im Folgenden ein einheitlicher Belegungsplan für eine 96-Loch Platte zum Testen von verschiedenen Substanzen erstellt. Zu Beginn sollte jede Substanz und jede Kontrolle in fünf verschiedenen Vertiefungen parallel getestet werden. Der sich hieraus ergebende Belegungsplan ist in Abb. 24 gezeigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	0,5 % FCS	EGF	Inhibitor	Substanz 1	Substanz 2	Substanz 3	Substanz 4	Substanz 5	Substanz 6	Substanz 7	Substanz 8	Substanz 9
C												
D												
E												
F	Substanz 10					Substanz 13						
G	Substanz 11					Substanz 14					Leer	Leer
H	Substanz 12					Substanz 15						

Abb. 24: Belegungsplan einer 96-Loch Mikrotiterplatte für einen Substanztest mit dem miniaturisierten Reportersystem. Auf jeder Platte befindet sich eine Kontrolle für den Signalhintergrund bei alleiniger Behandlung mit Hungermedium (gelb). Das maximale Signal wird durch alleinige Stimulation mit EGF erhalten (grün). Ein bekannter kommerzieller Inhibitor dient als Positivkontrolle (rot). Der restliche Platz wurde zum Test von 15 verschiedenen Substanzen verwendet. Jede Testbedingung wird in fünf verschiedenen Vertiefungen parallel getestet.

Für einen initialen Screen mit dem etablierten System auf 96-Loch-Platten Format wurden 30 Substanzen mit großer Verfügbarkeit aus der abteilungseigenen Substanzbibliothek ausgewählt und bei einer Konzentration von 30 μM getestet. Hiermit sollte die Funktionalität des miniaturisierten Assays überprüft werden. Als Positivkontrolle wurde Tyrphostin 47 bei einer Konzentration von 50 μM verwendet. Die maximale Aktivierung wurde durch Stimulation mit EGF (200ng/ml) festgelegt. Die Ergebnisse dieses Screens sind in Abb. 25 gezeigt. Der errechnete Z'-Faktor für beide Platten betrug 0,78 und liegt im geforderten Rahmen. Auch die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Signale ist bei diesem Test sehr hoch. Dies erkennt man an den beiden Werten der Positivkontrolle Tyrphostin 47. Bei der Platte der Abb. 25 A wird das Signal auf 47 % reduziert und bei der Platte der Abb. 25 B auf 49 %. Alle Substanzen, welche das Signal im Vergleich zum EGF-Wert um mehr als 50 % inhibierten, wurden als potentielle Hits betrachtet und somit weiter untersucht. Um die inhibierende Aktivität auf das Reportersignal zu verifizieren, muss in einem weiteren Schritt ausgeschlossen werden, dass das schwächere Signal nicht aufgrund einer cytotoxischen Wirkung der entsprechenden Substanz erreicht wurde. Um dieses zu überprüfen wurde mit den potentiellen Inhibitoren dieses Screens ein MTT-Test durchgeführt. Hierbei wird die Vitalität der Zellen nach Substanzapplikation anhand ihrer mitochondrialen Stoffwechselfähigkeit nachgewiesen. Die mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen wandeln dabei das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) in einer NADH-abhängigen Reaktion in dunkelblaue Formazane um. Bei diesem colorimetrischen Test ist die Farbintensität innerhalb der jeweiligen Vertiefung direkt proportional zu der Vitalität der in ihr befindlichen Zellen.^[125] Die Inkubationsdauer mit den applizierten Substanzen war dabei analog zu der im Reporter Assay. Bei diesem Test wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt. Die Substanzen wurden zudem bei steigenden Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 30 μM , 50 μM und 100 μM getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 gezeigt. Man erkennt die cytotoxischen Eigenschaften der Substanzen an einem starken Abfall der Kurve bei steigender Konzentration. Somit sind die Substanzen IC-81 und EG410Z ab einer Konzentration von 10 μM und an122z9 ab 30 μM cytotoxisch und können nicht als mögliche Inhibitoren der durch EGF induzierten Signalweiterleitung gelten. Bei den Substanzen AN144q und IC123A liegt die Extinktion schon bei 0,1 μM weit unterhalb der DMSO Kontrolle. Bei IC123A ist eine cytotoxische Eigenschaft ab 10 μM zu erkennen. Demgegenüber bleibt die Vitalität bei AN144q über alle Konzentrationen konstant. Dies könnte ein Hinweis auf eine cytostatische Wirkung dieser Substanz sein.

6. Ergebnisse

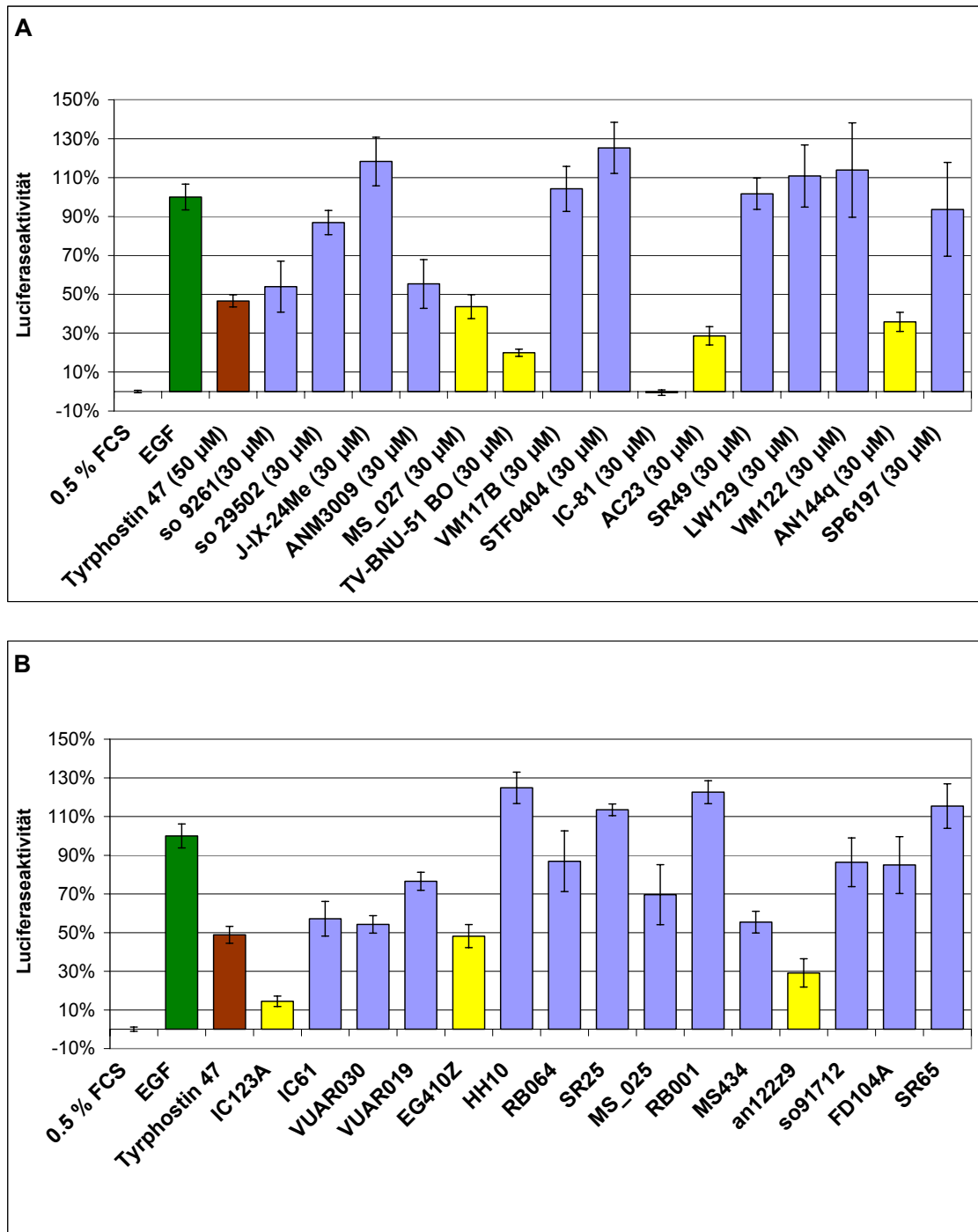


Abb. 25: Test von 30 ausgewählten Substanzen mit dem Reportersystem auf 96-Loch-Platten Format. Der Test der 30 Substanzen wurde auf zwei verschiedenen Mikrotiterplatten durchgeführt. **A) Platte 1, B) Platte 2.** Das gemittelte Hintergrundsignal wurde auf 0 % Aktivierung und das gemittelte EGF-Signal (grün) auf 100 % festgelegt. Tyrphostin 47 (braun) wurde bei einer Konzentration von 50 µM verwendet. Alle zu testenden Substanzen wurden bei einer Konzentration von 30 µM untersucht. Substanzen, die das Luciferasesignal um mehr als 50 % senkten wurde als mögliche Hits betrachtet (gelb). Bei einer geringeren Inhibition des Luciferasesignals wurde die entsprechende Substanz als zu schwach oder nicht aktiv eingestuft (blau).

6. Ergebnisse

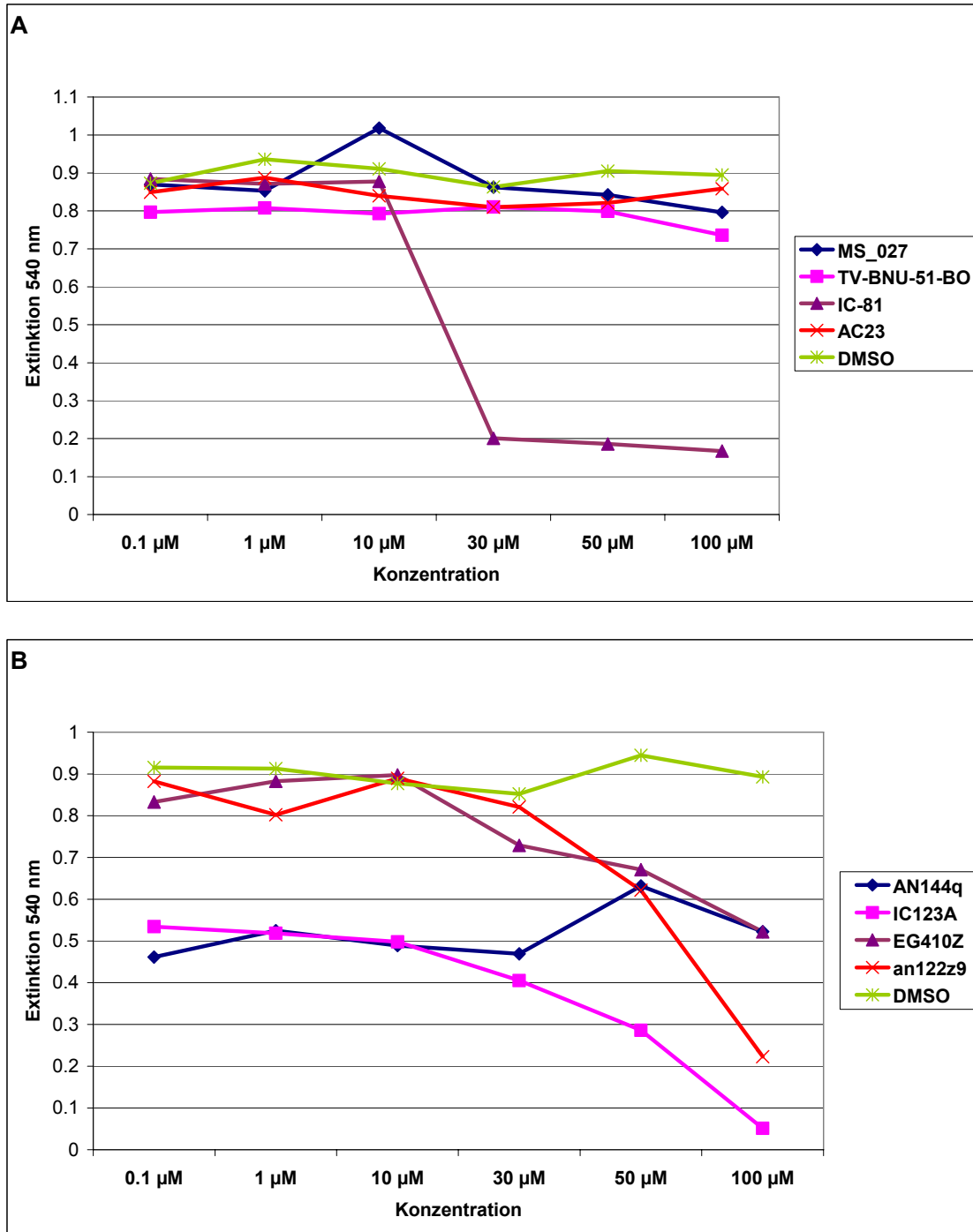


Abb. 26: MTT-Test mit den potentiellen Hits aus dem Reportergen Assay der Abb. 25.
A) Von den auf dieser Platte getesteten Substanzen zeigt IC-81 ab einer Konzentration von 10 µM eindeutig eine cytotoxische Wirkung. Die übrigen Substanzen sind bis zu einer Konzentration von 100 µM nicht toxisch. **B)** Von den in dieser Platte getesteten Substanzen sind an122z9 ab einer Konzentration von 30 µM, EG410Z und IC 123A ab 10 µM cytotoxisch. IC123 A zeigt zusammen mit AN144q eine mögliche cytostatische Wirkung.

Die Positivkontrolle Tyrphostin 47 wurde im Vorfeld auf ihre cytotoxischen Eigenschaft überprüft und zeigte bis zu einer Konzentration von 250 μ M keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Sie wurde daher nicht in diesen Test miteinbezogen.

Von den Hits des Reportergeren Assays, welche im MTT-Test keine cytotoxischen Eigenschaften aufwiesen, war die Substanz TV-BNU-51-BO mit einer Reduzierung des EGF-Signals um 80 % die aktivste. Daher wurde diese Substanz als Ausgangspunkt für einen Screen der kompletten Substanzbibliothek dieser Strukturklasse genommen. Die Ergebnisse aus diesem Screen werden in Abschnitt 6.4 beschrieben.

6.2 Der BSC-1 Cytoskelett Assay

6.2.1 Prinzip

Bei diesem phänotypischen Testsystem werden Zellen mikroskopisch auf etwaige Veränderungen aufgrund von Substanzapplikationen untersucht. Dies ermöglicht die Wirkung einer Substanz auf das ganze System der Zelle zu betrachten. Dieser Ansatz hat daher viele Vorteile gegenüber *in vitro* Testsystemen, bei denen zum Einen die zu untersuchenden Proteine nicht in ihrem zellulären Kontext stehen und zum Anderen nur einzelne isolierte Prozesse betrachtet werden können. Auch gegenüber dem zellulären Reporter-gen Assay ist die Limitierung auf die Aktivität eines einzelnen Transkriptionsfaktors nicht gegeben. Demzufolge bietet diese zum *High-content-Screening* gehörige Methode eine zeitgleiche Betrachtung unterschiedlichster Parameter und Prozesse und birgt daher eine große Quelle an Daten zur Analyse. Diese inhärente Komplexität erschwert aber auch Ansätze zur quantitativen Analyse selektierter Prozesse. Daher kann dieses Testsystem im Zusammenhang mit einem vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatz nur als Ausgangspunkt für die Erforschung des Wirkungsmechanismus einer bestimmten Substanz dienen. Bei dem hier vorgestellten Assay wird die Untersuchung primär auf Elemente des Cytoskeletts, das Aktin und das Tubulin, fokussiert. Hierzu werden diese Proteine mit spezifischen Antikörpern oder spezifisch bindenden Molekülen, welche an einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden sind, markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie in ihrem zellulären Kontext untersucht. Wegen der starken Bedeutung dieser Strukturen bei der Mitose wird zusätzlich die DNA der Zelle mit dem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert um so weitere Hinweise auf etwaige Veränderungen bei diesem Prozess zu erhalten. Für den Assay wurden BSC-1 Zellen (Nierenzellen der Grünen Meerkatze) aufgrund ihres sehr ausgeprägten Cytoskeletts, sowie ihrer erfolgreichen Verwendung bei der Untersuchung von verschiedenen Substanzen auf die Mitose verwendet. ^[19]

Die Zellen werden hierbei in entsprechender Zellzahl ausgesät und für 24 h inkubiert. Dann erfolgt die Applikation der jeweiligen Substanzen sowie der Positivkontrollen oder einer entsprechenden Menge an DMSO als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wird für die Tubulinstrukturen das depolymerisierende Nocodazol verwendet. ^[144] Für das Aktin Cytoskelett wird Cytochalasin B verwendet, welches die Polymerisation von Aktinfilamenten stört. ^[145, 146] Die Zellen werden für 14-16 h mit den Substanzen inkubiert und anschließend fixiert. Nach der Anfärbung der relevanten Strukturen werden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In Abb. 27 sind Bilder

von BSC-1 Zellen nach Aufnahme einzelner Strukturen durch das Fluoreszenzmikroskop gezeigt.

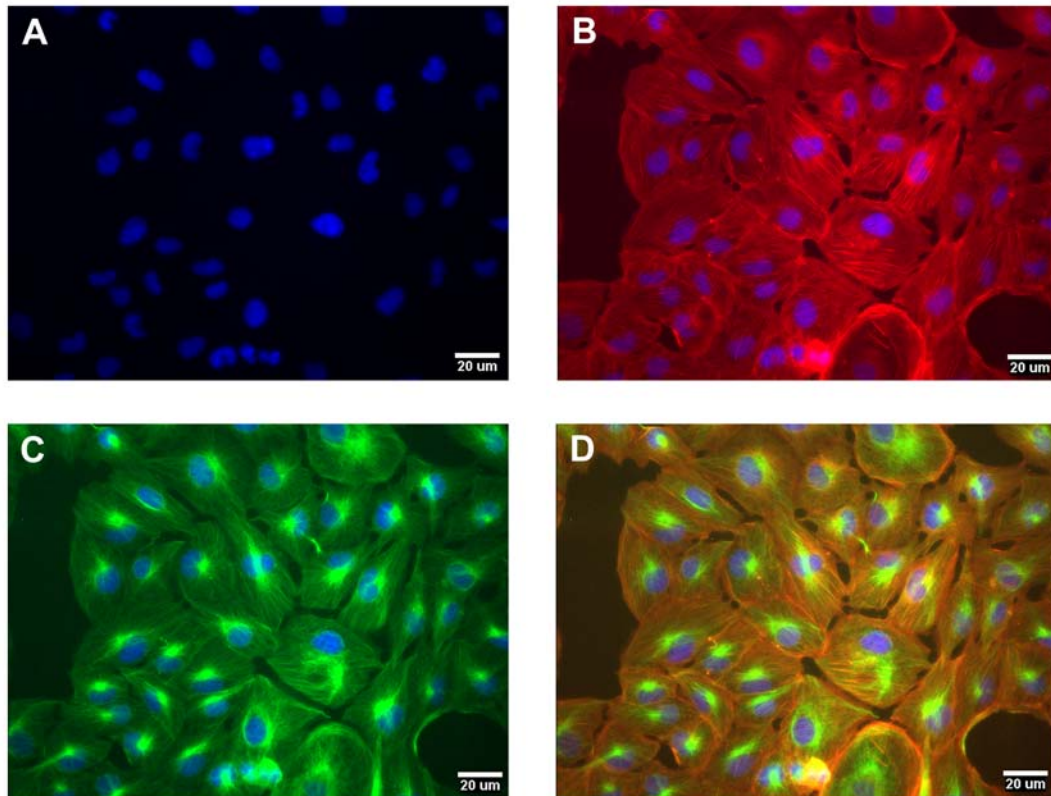


Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen spezifisch markierter BSC-1 Zellen. **A)** Färbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI. **B)** Färbung der Aktinfilamente mit TRITC markiertem Phalloidin (rot), hier als Überlagerung mit der DAPI Färbung (blau) gezeigt. **C)** Färbung des Tubulincytoskeletts mit Hilfe eines FITC markierten Antikörpers gegen α -Tubulin (grün), hier als Überlagerung mit der DAPI Färbung (blau) gezeigt. **D)** Überlagerung der Fluoreszenzbilder der DNA-, Aktin- und Tubulinfärbung. (**DAPI:** 4',6-Diamidino-2-phenylindol; **TRITC:** Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat; **FITC:** Fluorescein-Isothiocyanat)

Die Zellen wurden hierbei nur mit DMSO behandelt. Durch die unterschiedlichen Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe können die einzelnen Strukturen gesondert voneinander aufgenommen und betrachtet werden. Bei Bedarf besteht die Möglichkeit, die jeweiligen Fluoreszenzbilder übereinander zu legen. Dies erlaubt eine detaillierte Analyse der markierten Komponenten sowie eine Betrachtung von Prozessen, bei denen einzelne Komponenten miteinander in Wechselwirkung stehen. Dies ist z.B. bei der Mitose der Fall, wo die Spindelfasern mit den Chromosomen interagieren. Die Methode erlaubt somit die Identifizierung von Substanzen, welche auf die Strukturen des Cytoskeletts sowie auf den Prozess der Zellteilung wirken. Darüber hinaus können Hinweise auf eine mögliche Cytotoxizität oder Apoptose fördernde Wirkung der jeweiligen Substanzen erkannt werden.

6.2.2 Etablierung

Die technischen Voraussetzungen des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M in Verbindung mit der Metamorph-Software erlauben die voll automatisierte Aufnahme von Fluoreszenzbildern von Zellen im 384-Loch-Platten Format. Hierzu mussten die vorgeschalteten Prozesse ebenfalls teilweise automatisiert oder in ihrer Handhabung angepasst werden. Die Handhabung von 384-Loch-Platten im Bereich der Zellkultur stellte keine große Herausforderung dar und konnte manuell durchgeführt werden. Demgegenüber ist die Vorverdünnung und anschließende Applikation von verschiedenen Substanzen in diesem Maßstab nur sehr zeitaufwendig durchzuführen. Dieser Schritt wurde daher durch Programmierung des Pipettierroboters Sciclone ALH500 fast vollständig automatisiert. Der Ausgangspunkt der Erstellung eines automatisierten Pipettierprotokolls waren die Mikrotiterplatten, welche Stammlösungen der zu testenden Substanzen enthalten. Diese lagen im 96-Loch-, sowie im 384-Loch Format vor. Somit musste für jedes Format ein eigenes Pipettierprotokoll erstellt werden. Jede Substanz sollte in vier unterschiedliche Vertiefungen appliziert werden. Der Pipettierkopf des Roboters besitzt 96 Nadeln. Hieraus ergab sich die Möglichkeit, bei einer Substanzplatte im 96-Loch Format, jede Substanz in vier Vertiefungen einer 384-Loch-Platte zu pipettieren. Bei einer Substanzplatte im 384-Loch Format wurden die Substanzen in vier verschiedene 384-Loch Platten pipettiert. Die Stammlösungen haben eine Konzentration von 10 mM. Die Endkonzentration in der 384-Loch-Platte mit den Zellen sollte 30 μM in einem Volumen von 50 μl Zellmedium betragen. Das minimalste Pipettiervolumen des Roboters beträgt 0,5 μl . Daher mussten die Substanzen in einem gesonderten Schritt vorverdünnt werden. Mit diesen Vorgaben wurden zwei Pipettierprotokolle programmiert, welche den jeweiligen Formaten der Substanzplatte angepasst waren. Hierbei ist anzumerken, dass bei dem Pipettierprotokoll für die Verteilung aus einer Substanzplatte im 96-Loch Format Komponenten aus einem bestehenden Protokoll von Dr. Robin Bon (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) übernommen wurden. Die Pipettierstrategien für die jeweiligen Formate sind in Abb. 28 schematisch dargestellt. So werden in beiden Protokollen die Substanzen in einer Vormix-Platte mit Medium im Verhältnis 1:20 verdünnt und anschließend je 3 μl dieser Vorverdünnung in eine Vertiefung der Zielplatte pipettiert, welche 47 μl Medium enthält. Da auf den Substanzplatten keine Positivkontrollen vorhanden sind, mussten diese nachträglich manuell aufgetragen werden. Die finalen Konzentrationen dieser Kontrollen unterschieden sich dabei von den Endkonzentrationen der getesteten Substanzen. So wurde Cytochalasin B bei einer Konzentration von 4 μM und 40 μM und Nocodazol bei 0,5 μM und 5 μM verwendet.

6. Ergebnisse

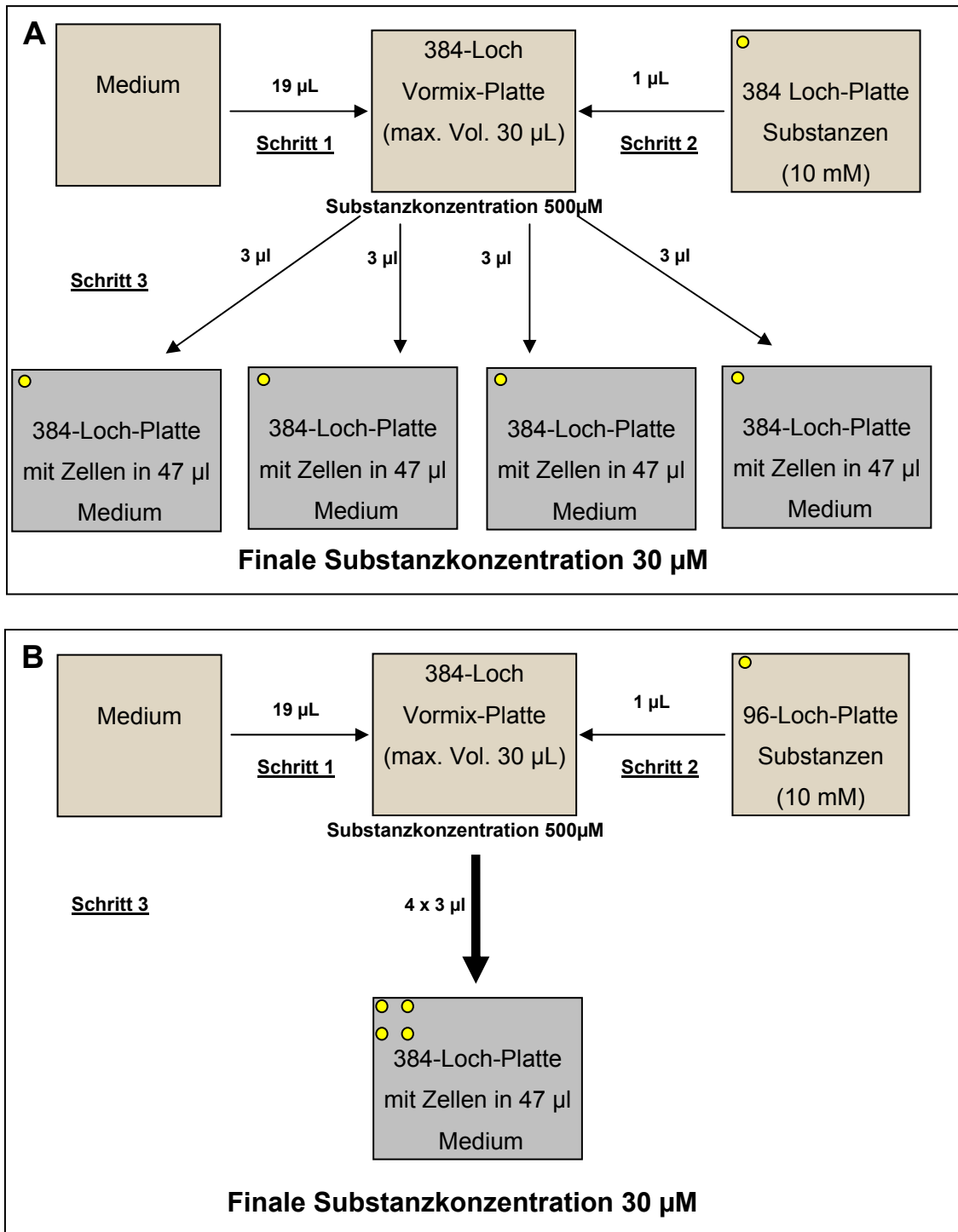


Abb. 28: Programmierte Pipettierschemata für den Pipettierroboter Sciclone ALH500. A) Bei einer Substanzplatte im 384-Loch Format werden die Substanzen in vier verschiedene 384-Loch-Platten pipettiert. Somit ist die Position einer Substanz auf der Substanzplatte mit der Position der Zellen, die mit dieser Substanz behandelt werden auf den Zielplatten identisch (gelber Punkt). **B)** Bei einer Substanzplatte im 96-Loch Format werden die Substanzen in vier verschiedene Vertiefungen auf eine Zielplatte im 384-Loch Format pipettiert. Dies geschieht in dem gezeigten Muster (gelbe Punkte).

Die Programme wurden unter Verwendung einer in DMSO angesetzten Färbelösung mit dem Farbstoff Orange G etabliert und optimiert. Hierbei wurden die Absorptionen bei 405 nm in den einzelnen Vertiefungen der Vormischplatte und/oder der Zielplatten, nach erfolgtem Durchlaufen des Pipettierprogramms, in einem Plattenleser gemessen. Die Abweichungen der Absorptionswerte entsprechen daher den Fehlern des Pipettiervorgangs. Des Weiteren wurde eine Eichgerade der zu erwartenden Konzentrationen nach manueller Verdünnung einer Orange G Stammlösung erstellt. Mit Hilfe dieser Eichgerade konnte die gemittelte Endkonzentration in den Zielplatten bestimmt werden (siehe Abb. 29). Die Programme wurden soweit optimiert, dass die gemittelte Endkonzentration in den Zielplatten 30 μM entspricht. Zudem wurde der relative Pipettierfehler innerhalb einer Platte auf unter 10 % abweichend vom Mittelwert reduziert.

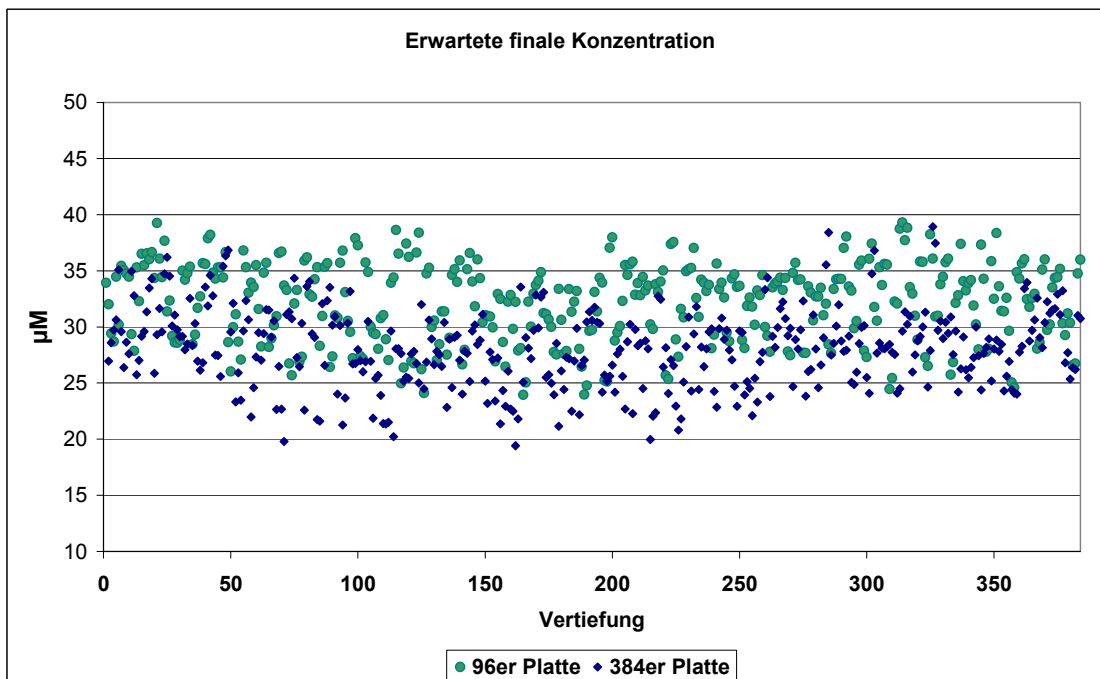


Abb. 29: *Erwartete Endkonzentrationen in den Zielplatten nach Ablauf der automatisierten Pipettierprogramme. Aus einer Orange G Stammlösung wurde manuell eine Verdünnungsreihe pipettiert und eine Eichgerade erstellt. Mit derselben Orange G Stammlösung wurden die programmierten Pipettierprozesse durchlaufen, welche zum Einen eine 96-Loch-Platte, zum Anderen eine 384-Loch-Platte als Ausgangsplatte hatten (Abb. 28). Anschließend wurden die Absorptionen in den Zielplatten bei 405 nm gemessen und mit Hilfe der Eichgeraden die erwarteten Endkonzentrationen bestimmt. Die Ergebnisse von jeweils einer Zielplatte aus jedem Pipettierprogramm sind hier beispielhaft dargestellt.*

Man erkennt anhand der Abb. 29, dass bei einem gemittelten Fehler von unter 10 % innerhalb einer Platte, die erwarteten Endkonzentrationen in den einzelnen Vertiefungen sehr schwanken. Die Endkonzentrationen liegen aber, bis auf zwei Ausnahmen, alle über 20 μM . Die zwei Ausnahmen haben eine berechnete Endkonzentration von 19,4 μM und 19,8 μM und fallen demzufolge nicht zu weit ab. Somit sollte nach Verwendung des Programms jede Vertiefung mindestens eine Substanzkonzentration von etwa 20 μM aufweisen. Für einen Primärscreen von Substanzen auf ihre mögliche Aktivität, ist nach Rücksprache mit anderen Arbeitsgruppen, ein Pipettierfehler innerhalb einer Platte von ca. 10 % besonders bei den verwendeten Endkonzentrationen durchaus vertretbar (pers. Mitteilung Prof. Thomas Mayer, Uni Konstanz).

Neben der automatisierten Substanzapplikation musste zudem die Handhabung zur Fixierung und Anfärbung der Zellen auf das 384-Loch-Platten Format ausgelegt werden. Hierbei wurde die Verwendung eines Immuno™ Washers der Firma Nunc eingeführt. Diese Apparatur erlaubt die schnelle Entfernung von Flüssigkeiten aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte und kann zugleich Waschpuffer applizieren um zu gewährleisten, dass zwischen den einzelnen Schritten die Zellen nicht austrocknen. Durch die zusätzliche Verwendung einer automatischen Mehrkanalpipette, konnte die Handhabung so optimiert werden, dass bis zu sechs 384-Loch-Platten parallel bearbeitet werden können.

Für den letzten Schritt des Screening-Prozesses wurden die Einstellungen der Metamorph-Software für die parallele Aufnahme der Fluoreszenzbilder für alle drei Färbungen angepasst. Hierbei werden pro Vertiefung vier Bilder in unterschiedlichen Segmenten bei den entsprechenden Anregungswellenlängen aufgenommen. Somit erhält man für jede getestete Substanz insgesamt 16 verschiedene Zellbilder aus vier verschiedenen Vertiefungen. Die Auswertung der Bilder erfolgt manuell.

Ein initialer Screen einer Substanzplatte im 384er Format, welche Substanzen einer kommerziell erhältlichen Substanzkollektion enthält, sollte die Etablierung dieses phänotypischen Assays prüfen. Nach Erhalt der entsprechenden Bilddaten wurde vornehmlich ein spezieller Phänotyp bei Zellen, die jedoch mit verschiedenen Substanzen inkubiert wurden, auffällig. Dieser Phänotyp war charakterisiert durch eine sehr langgestreckte Zellform sowie einer hohen Anzahl von Cytokinesebrücken (siehe Abb. 30).

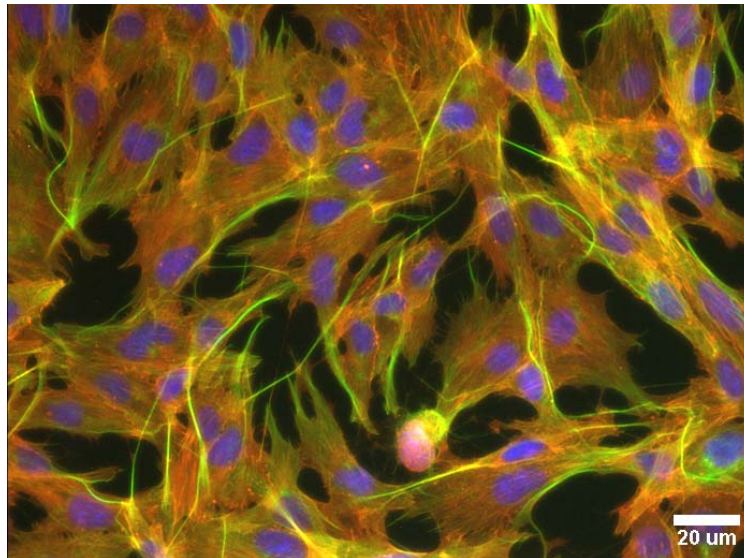


Abb. 30: Durch Digitalisglykoside induzierter auffälliger Phänotyp in BSC-1 Zellen. Ein initialer Screen einer Substanzplatte im 384-Loch Format, welche Substanzen einer kommerziell erhältlichen Substanzkollektion enthielt, zeigte unter anderem den abgebildeten Phänotyp. Dieser wurde in kaum zu unterscheidender Weise von sechs verschiedenen Digitalis Glykosiden induziert. Gezeigt ist eine Überlagerung der Fluoreszenzbilder der DNA- (blau), Aktin- (rot) und Tubulinfärbung (grün).

Er trat in kaum zu unterscheidender Weise bei sechs verschiedenen Substanzen auf. Es stellte sich heraus, dass diese sechs Substanzen alle zu der Gruppe der Digitalisglykoside gehören. Vertreter dieser Digitalisglykoside werden bei der Therapie von Herzinsuffizienz eingesetzt.^[147] Die gleichzeitige Identifikation von verschiedenen Vertretern dieser Stoffklasse innerhalb einer Kollektion von unterschiedlichen Substanzen, anhand des zellulären Phänotyps, bestätigte die erfolgreiche Etablierung dieses phänotypischen Assays.

6.3 Der MDCK-F3 Phänotyp Assay

6.3.1 Prinzip und Etablierung

Dieser phänotypische Assay betrachtet Veränderungen von MDCK (*Madine-Darby canine kidney*) Zellen, welche mit dem viralen H-Ras onkogen stabil transfiziert wurden.^[148] Untransfizierte MDCK Zellen haben eine runde epitheliale Zellmorphologie mit stark ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten und wachsen aneinander in einer Schicht. Sie zeichnen sich zudem durch eine starke Expression von E-Cadherin an der Zelloberfläche aus (siehe Abb. 31 A und B). Demgegenüber zeigen die v-H-Ras transformierten MDCK-F3 Zellen eine spindelförmige Zellform und bilden viel weniger Zell-Zell-Kontakte aus. Die Expression von E-Cadherin ist stark vermindert. Sie erlangen zudem die Fähigkeit, übereinander zu wachsen, was auf einen Verlust von Kontaktinhibition hindeutet (siehe Abb. 31 C und D).^[149]

Aufgrund dieser phänotypischen Unterschiede eignet sich die MDCK-F3 Zelllinie als System zur Identifikation von Wirkstoffen, welche eine modulierende Eigenschaft auf die durch onkogenes H-Ras aktivierten Prozesse haben. So induziert der bekannte MEK Inhibitor U0126^[150] bei einer Konzentration von 20 µM einen deutlichen Effekt auf den Phänotyp von MDCK-F3 Zellen. Die behandelten Zellen zeigen wieder vermehrt die beschriebenen Eigenschaften untransformierter MDCK Zellen (siehe Abb. 31 E und F). Hierdurch ergibt sich eine Korrelation zu dem in Abschnitt 6.1 beschriebenen Reporter Assay, da in beiden Systemen die Inhibition der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade einen zu verwertenden Effekt zeigt. Sollte eine Substanz in beiden Testsystemen eine inhibierende bzw. rücktransformierende Wirkung zeigen, könnte dies ein Hinweis sein, dass sie auf Komponenten dieser Signalkaskade wirkt. Bei diesem Assay werden die MDCK-F3 Zellen in entsprechender Zellzahl in 384-Loch-Platten ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden werden die jeweiligen Substanzen appliziert und die Zellen für weitere 14-16 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgen die Fixierung der Zellen und die Anfärbung mit Coelestin Blau, TRITC markiertem Phalloidin oder einem FITC markiertem Antikörper gegen E-Cadherin (siehe auch Abschnitt 6.10, Abb. 53).

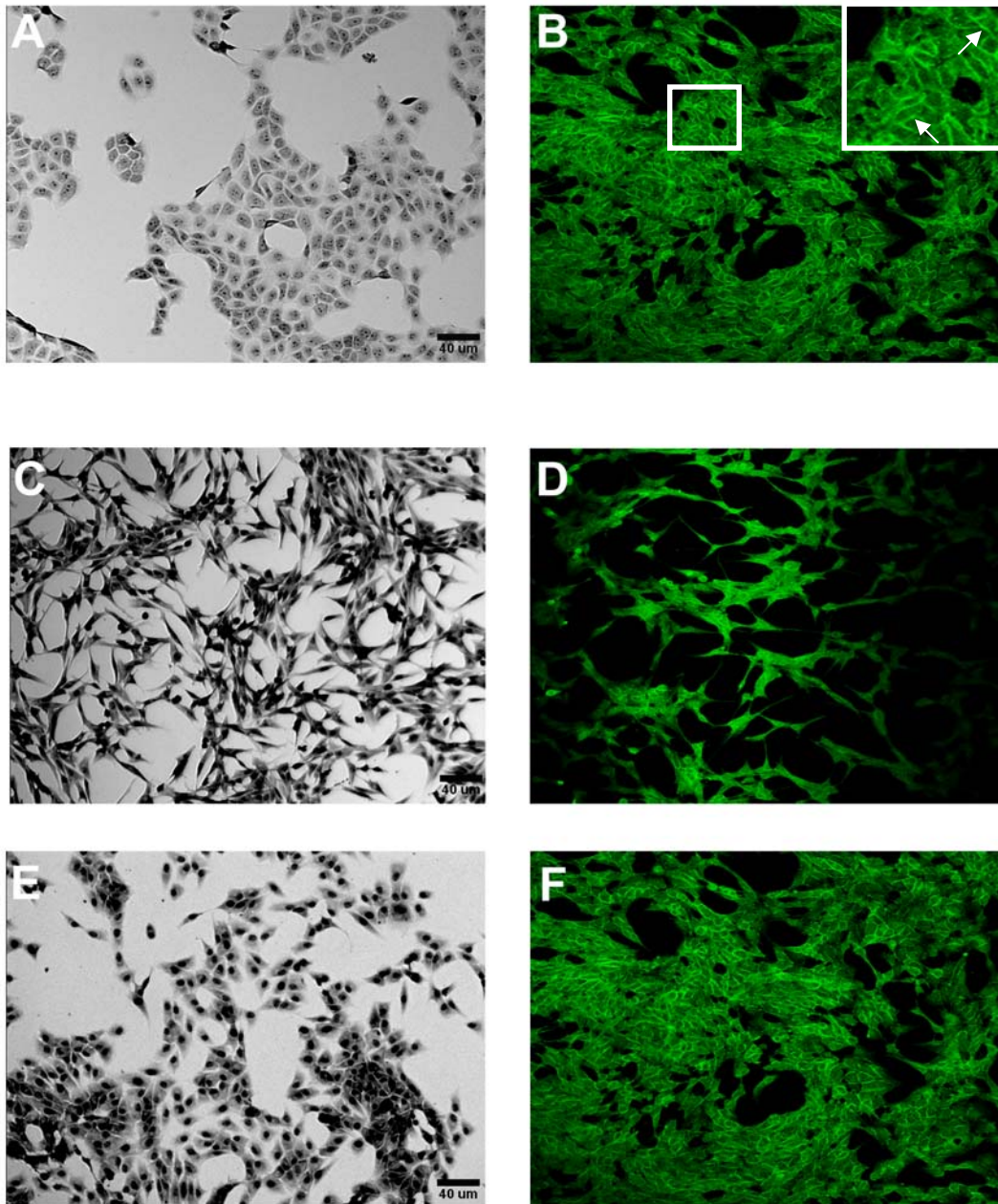


Abb. 31: Phänotypen von MDCK-, MDCK-F3- und rücktransformierten MDCK-F3 Zellen. **A-B)** MDCK Zellen zeigen eine epitheliale Zellform mit Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und eine starke E-Cadherin Expression. Der weiße Ausschnitt in B ist rechts oben vergrößert dargestellt. E-Cadherin an den Zell-Zell-Kontakten ist exemplarisch durch Pfeile markiert. **C-D)** v-H-Ras transformierte MDCK-F3 Zellen sind spindelförmig und wachsen durch Verlust von Kontaktinhibition übereinander. **E-F)** Revertierter Phänotyp von MDCK-F3 Zellen nach Inkubation mit dem MEK Inhibitor U0126 bei 20 μM . Durchlichtaufnahmen nach Coelestin Blau Färbung. Bilder A, C, D zeigen Durchlichtaufnahmen nach Coelestin-Blau Färbung. Bilder B, D und F zeigen Fluoreszenzaufnahmen nach Anfärbung mit einem FITC-markierten Antikörper gegen E-Cadherin, welches hierdurch grün gezeigt ist. Die Fluoreszenzbilder wurden von MSc. Biotech. Nachiket Vartak angefertigt.

Aufgrund der Etablierung des in Abschnitt 6.2.2 beschriebenen BSC-1 Cytoskelett Assays konnten für dieses System dieselben Komponenten verwendet werden. Lediglich die zu verwendende Zellzahl sowie die Handhabung der Zellfixierung und -färbung musste speziell angeglichen werden. Die hauptsächlichsten Probleme bestanden in den schlechten Haftungseigenschaften der MDCK-F3 Zellen an dem Boden der Mikrotiterplatten. Durch eine Reduktion des Vakuumsogs bei den Waschschritten und durch Verwendung von speziellen Mikrotiterplatten (384WL, FB, BLK/CLR, Corning® CellBIND® surface; 3683; Corning, Schiphol-Rijk, NL), welche eine starke Bindung der Zellen am Boden zulassen, konnte diese Prozedur ebenfalls für ein 384-Loch-Platten Format standardisiert werden. Als Positivkontrolle wurde auf jeder Platte der Inhibitor U0126 verwendet. Als Negativkontrolle wurden die MDCK-F3 Zellen nur mit einer entsprechenden Menge an DMSO behandelt. Bei der manuellen Auswertung werden die erhaltenen Phänotypen mit denen der Positiv- und Negativkontrollen verglichen.

Nach der Etablierung der jeweiligen Testsysteme wurden mit ihnen Substanzen aus der abteilungseigenen Kollektion getestet. Die Ergebnisse aus den individuellen Testreihen und ggf. daran anschließende Untersuchungen sollen im Folgenden beschrieben werden.

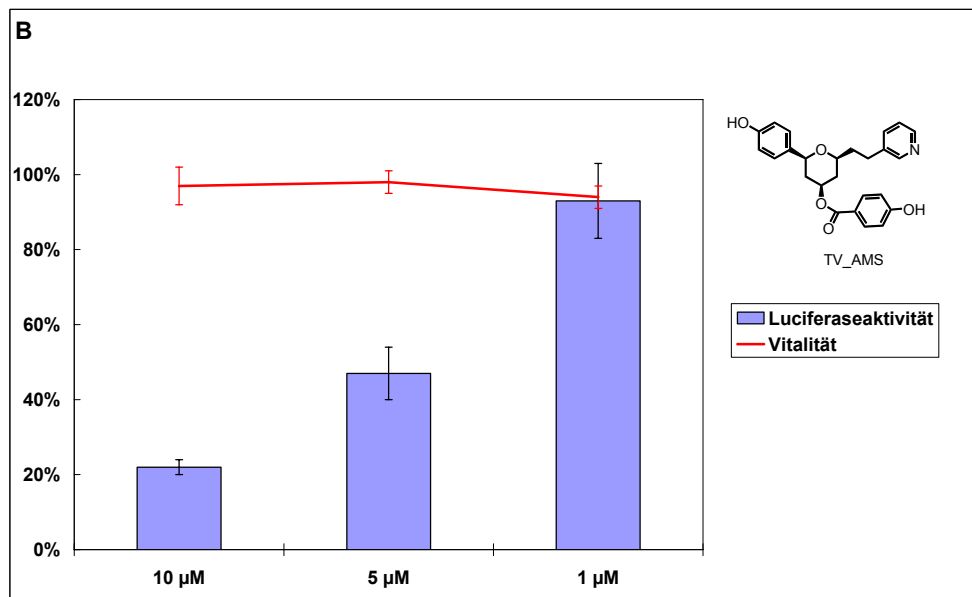
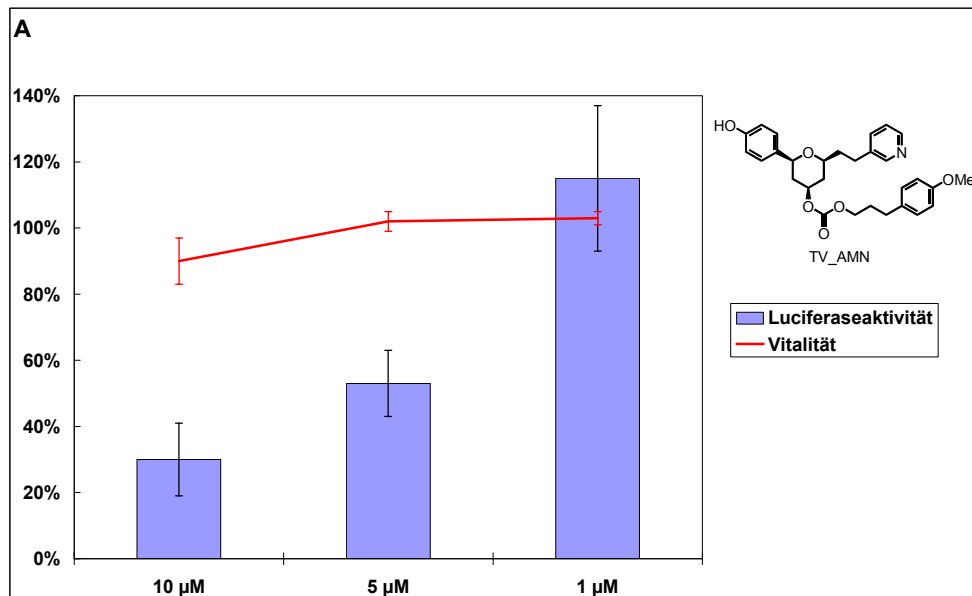
6.4 Identifikation von aktiven Substanzen aus einer Tetrahydropyran-Bibliothek

6.4.1 Screen einer Tetrahydropyran Bibliothek mit dem PathDetect®-Reportergen System

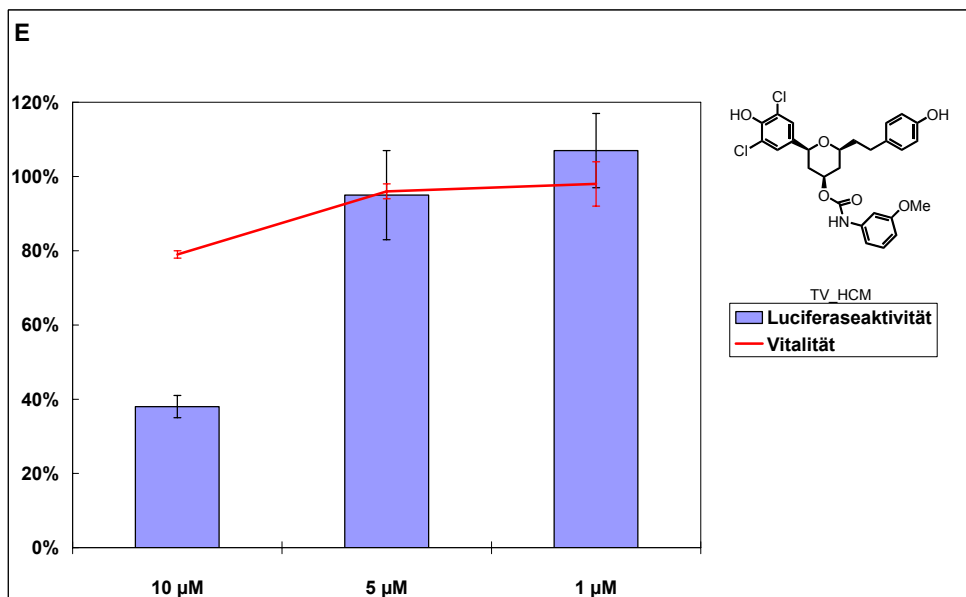
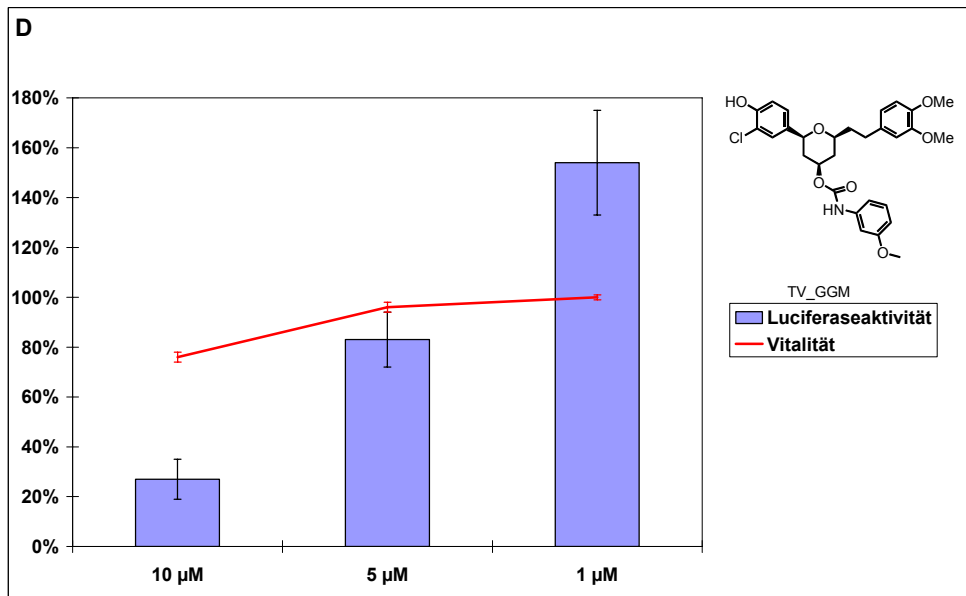
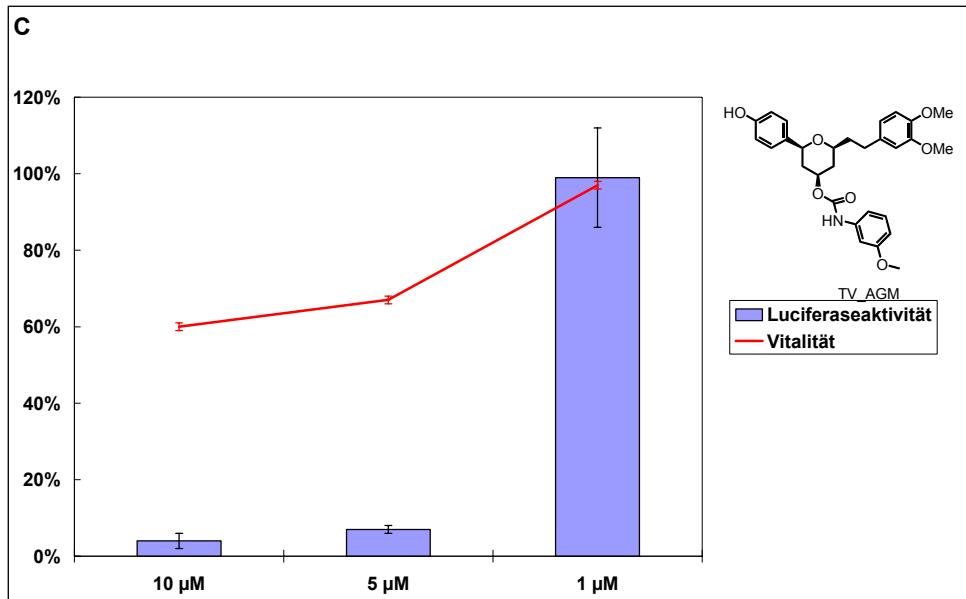
Bei dem in Abschnitt 6.1.2 beschriebenen initialen Screen von 30 verschiedenen Substanzen zeigte die Substanz TV-BNU51-BO die stärkste Aktivität (siehe Abb. 25 und Abb. 26). Diese ist Bestandteil einer Tetrahydropyran-Bibliothek, welche von Dr. Tobias Voigt im Verlauf seiner Promotionsarbeit synthetisiert wurde. Daher wurde die gesamte Tetrahydropyran-Bibliothek unter Einbezug von 10 Tetrahydropyranen, welche von Dr. Miguel A. Sanz synthetisiert wurden, mit Hilfe des etablierten Reportergen-Systems getestet. Um innerhalb dieser Bibliothek noch aktivere Kandidaten als TV-BNU51-BO zu identifizieren, wurden die Substanzen bei einer Konzentration von 10 μM untersucht. Von den 243 getesteten Substanzen zeigten 41 Substanzen eine Inhibition von mehr als 50 %. Hiervon wurden in Absprache mit Dr. Tobias Voigt 31 Substanzen ausgewählt, welche die stärksten Wirkungen zeigten und zudem zu diesem Zeitpunkt in ausreichender Menge und Reinheit vorlagen. Die ausgewählten Substanzen wurden in einem MTT-Test bei den Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 30 μM , 50 μM und 100 μM untersucht. Zudem wurden sie erneut in dem Reportergen-Assay bei den Konzentrationen 10 μM , 5 μM und 1 μM getestet. Hierbei wurden 15 Substanzen als cytotoxisch identifiziert. Bei fünf Substanzen konnte die inhibitorische Wirkung nicht reproduziert werden. Von den restlichen 11 Substanzen konnte die inhibitorische Wirkung bestätigt werden. Hiervon wurden die sieben stärksten Inhibitoren für weitere Untersuchungen verwendet (siehe Abb. 32). Im Verlauf der Untersuchungen wurde ein neues Plattenlesegerät angeschafft. Des Weiteren wurde zur Untersuchung der möglichen Cytotoxizität von Substanzen der einfacher zu handhabende WST-1-Test eingeführt (siehe Abschnitt 5.1.13). Darüber hinaus wurde die Plattenbelegung des Reportergen Assays dahingehend geändert, dass jeder Ansatz in vier verschiedenen Vertiefungen getestet wurde. Hiermit wurde die Untersuchung der Wirkung von 21 verschiedenen Substanzen auf einer 96-Loch Platte ermöglicht. Der entsprechende Belegungsplan ist in Abschnitt 5.1.8.2 in Abb. 10 gezeigt. Im Zuge dieser Neuerungen wurden die sieben Inhibitoren erneut getestet und die Reproduzierbarkeit ihrer Inhibitorischen Wirkung konnte bestätigt werden. Auch die Werte der Cytotoxizitätsmessung waren mit denen des MTT-Systems vergleichbar. In Abb. 32 sind daher die Werte der

6. Ergebnisse

inhibitorischen Wirkung und der Vitalität der Zellen bei entsprechender Substanzbehandlung nach dem erneuerten System zusammengefasst.



6. Ergebnisse



6. Ergebnisse

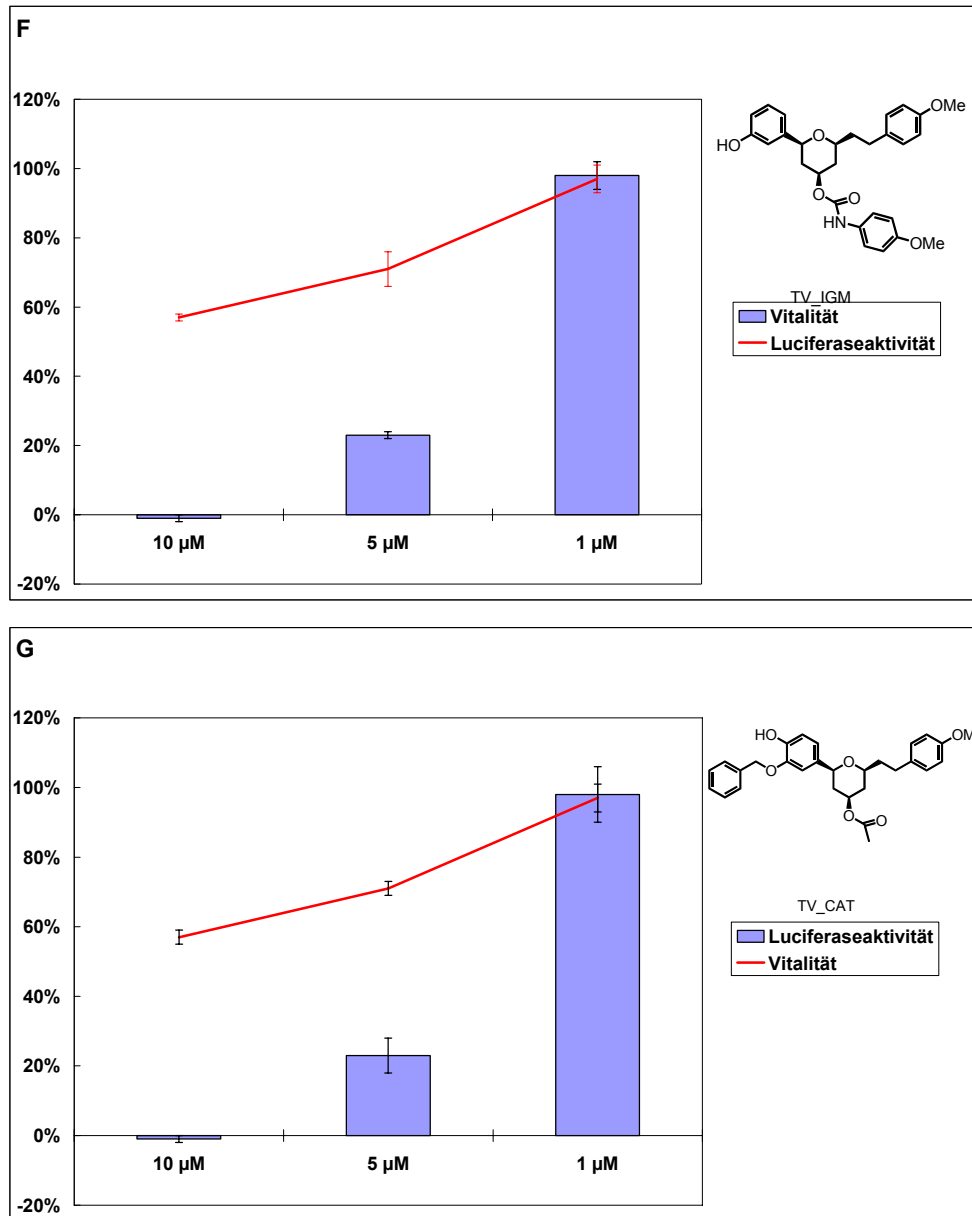


Abb. 32: Einfluss der aktivsten Substanzen aus der getesteten Tetrahydropyran-Bibliothek auf die Vitalität und Luciferaseaktivität der HLR-ELK1- Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration. Blaue Balken zeigen die Luciferaseaktivität bei den jeweils angegebenen Konzentrationen. Die Rote Linie zeigt die Vitalität der Zellen bei den angegebenen Konzentrationen. Aus den einzelnen Abbildungen gehen die Struktur und die Laborkennung der jeweils getesteten Substanz hervor.

Man erkennt, dass bei den Substanzen TV_AMN, TV_AMS, TV_GGM und TV_HCM die Vitalität der Zellen nicht stark beeinträchtigt wird. Dennoch inhibieren sie das Luciferasesignal bei einer Konzentration von 10 µM um mehr als 60 %. Die Substanz TV_AMS ist in diesem Zusammenhang der stärkste Wirkstoff mit einer Inhibition von 78 % und einer im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen unveränderten Zellvitalität. Demgegenüber erkennt man bei den stärksten Inhibitoren TV_AGM, TV_IGM und

TV_CAT einen starken Rückgang der Vitalität. Bei diesen Substanzen wurde in dem vorher durchgeführten MTT-Test bis zu einer Konzentration von 100 μM keine weitere konzentrationsabhängige Reduktion der Vitalität beobachtet. Die Werte blieben bei allen Substanzen über 50 %. Es wurde deshalb vermutet, dass hierfür eventuell proliferationshemmende Eigenschaften dieser Substanzen verantwortlich sind. Da die beobachtete Signalkaskade stark in der Weiterleitung von proliferationsfördernden Signalen involviert ist, könnten sie Prozesse inhibieren, die im engen Zusammenhang mit der Proliferation stehen. Die Substanzen TV_AGM, TV_IGM und TV_CAT wurden daher aus Interesse weiter untersucht, obwohl eine spezifische Inhibition der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade unwahrscheinlich war. Denn bei der verwendeten Positivkontrolle Tyrphostin 47 konnte keine Proliferationshemmung beobachtet werden. Die Substanzen wurden daher weiter untersucht, um deren Wirkung näher zu charakterisieren und hierdurch die Eigenschaften der verwendeten Testsysteme näher zu analysieren.

6.4.2 Test der aktivsten Substanzen auf MDCK und MDCK-F3 Zellen.

Die Substanzen wurden bei einer Konzentration von 10 μM und 30 μM auf MDCK-F3 Zellen getestet. Keine der Substanzen induzierte hierbei eine Reversion des transformierten Phänotyps. Eine dahingehende Änderung der Zellform wurde nur bei der Substanz TV_CAT beobachtet (siehe Abb. 24 A und B). Hier waren die Zellen nicht mehr langgestreckt, sondern eckig. Die Zellen bildeten jedoch keine Zell-Zell-Kontakte aus und waren in ihrer Anzahl dezimiert. In einigen Zellen konnte man fragmentierte Zellkerne erkennen, was ein Hinweis auf eine apoptotische Wirkung sein könnte. Um diesen Phänotyp genauer zu untersuchen wurden MDCK und MDCK-F3 Zellen bei den Konzentrationen von 0,5 μM , 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 7,5 μM und 10 μM mit TV_CAT behandelt und anschließend wurden Aktin und DNA fluoreszent markiert. Hierbei zeigte sich schon ab einer Konzentration von 2,5 μM eine Veränderung der Zellform bei MDCK-F3 Zellen. Auch wurden in beiden Zelllinien vermehrt abgerundete Zellen beobachtet von denen viele in den Randbereichen blasige Ausstülpungen aufwiesen (siehe Abb. 24 C bis F). Dies deutete weiter auf einen apoptoseinduzierenden Phänotyp dieser Substanz hin. Die große Anzahl an abgerundeten Zellen könnte darüber hinaus auch auf einen durch TV_CAT induzierten mitotischen Arrest deuten. Der beschriebenen Effekte konnten hierbei in beiden Zelllinien bei gleichen Konzentrationen beobachtet werden. Somit ist diese Substanz nicht selektiv gegenüber transformierten Zellen.

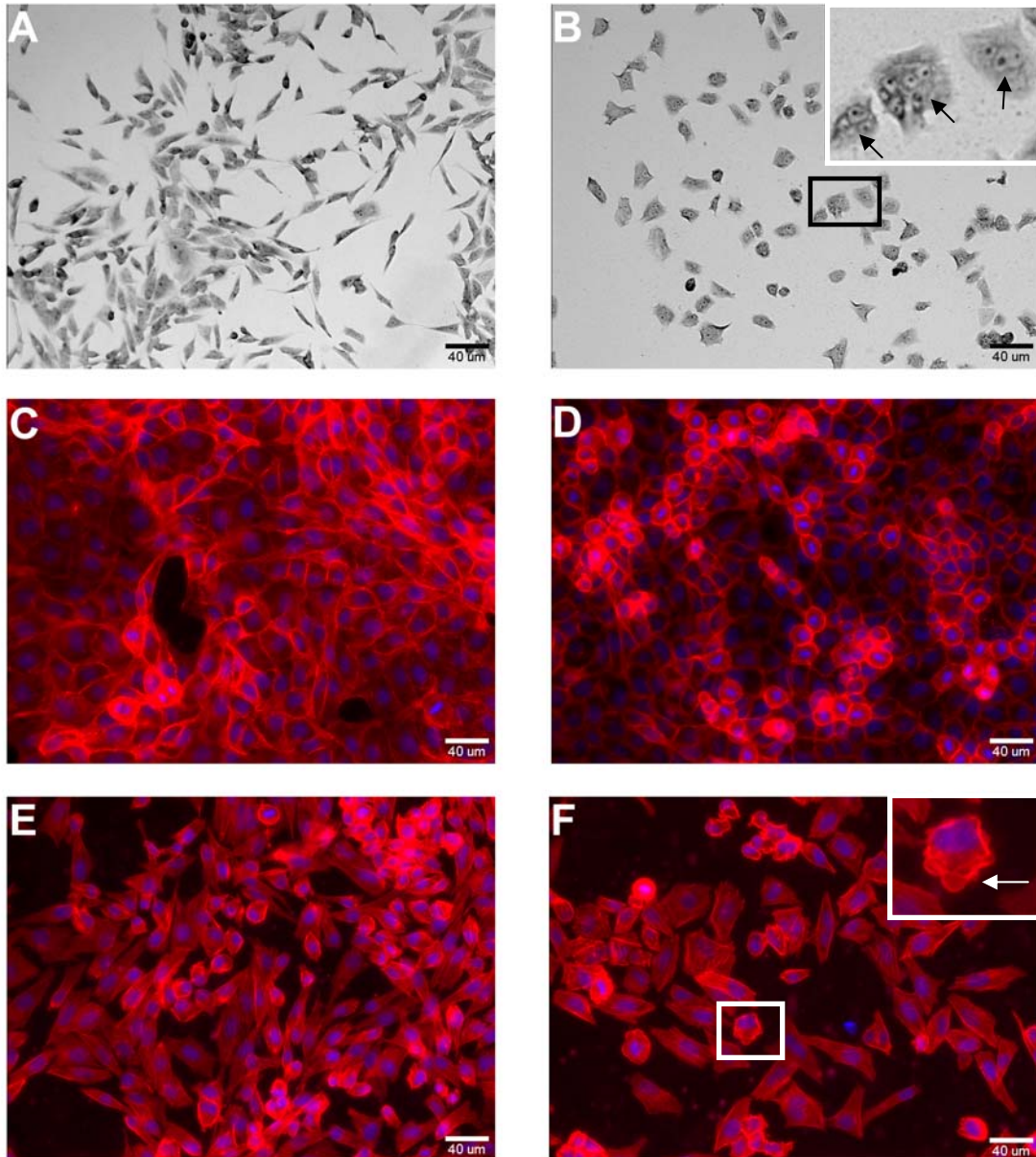


Abb. 33: Einfluß der Substanz TV_CAT auf den Phänotyp von MDCK und MDCK-F3 Zellen. **A)** MDCK-F3 Zellen mit DMSO behandelt. **B)** MDCK-F3 Zellen nach Behandlung mit TV_CAT bei 10 μM . Die Zellen zeigen eine eckige und kompakte Zellform. Ihre Anzahl ist deutlich reduziert. Der schwarz eingerahmte Ausschnitt ist oben rechts vergrößert dargestellt. Hier sind fragmentierte Nuclei zu erkennen (Pfeile). **C)** MDCK Zellen der DMSO Kontrolle. **D)** MDCK Zellen nach Behandlung von TV_CAT bei 2,5 μM . Es zeigen sich viele abgerundete mitotische Zellen. **E)** MDCK-F3 Zellen der DMSO Kontrolle. **F)** MDCK-F3 Zellen nach Inkubation mit TV_CAT bei 2,5 μM . Auch hier ist eine eckige und kompaktere Zellform zu erkennen. Der weiß eingerahmte Ausschnitt ist oben rechts vergrößert dargestellt und zeigt eine abgerundete Zelle mit Blasenbildung der Membran (Pfeil). Bilder in A und B sind Durchlichtaufnahmen nach Coelestin Blau-Färbung. Bilder C bis F sind überlagerte Fluoreszenzaufnahmen nach Aktin- (rot) und DAPI-Färbung (blau).

Der in den MTT- und WST-Tests beobachtete Effekt scheint somit in der apoptotischen Wirkung der jeweiligen Substanzen begründet zu sein. Ein Fehlen der Rücktransformation durch die Substanzen liefert Hinweise, dass die Ras-MEK-ERK-Kaskade durch die betrachteten Substanzen nicht inhibiert wird. Um dieses genauer zu untersuchen sollte die Phosphorylierung von ERK in den Zellen nach der Aktivierung durch EGF in Anwesenheit der Substanz untersucht werden. Damit wird die Signalweiterleitung über das Ras-Raf-MEK-ERK Modul direkt betrachtet und ergibt daher den deutlichste Aussage für diese Vermutung. Des Weiteren soll der beobachtete apoptotische Phänotyp durch einen Apoptose spezifischen Assay bestätigt werden.

6.4.3 Test der aktivsten Substanzen mit dem APO-ONE® Caspase 3/7 Assay

Um die Apoptose-induzierende Wirkung der Substanzen genauer zu untersuchen, wurden sie in einem speziellen Testsystem, welches die Aktivität der Markerproteasen Caspase 3 und 7 ^[126-130] detektiert, untersucht. Hierbei führt die Freisetzung von Rhodamin 110 durch die aktiven Caspasen 3 und 7 aus einem synthetischen Peptidsubstrat zu einer Verstärkung der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm. Bei diesem Test wurden HLR-ELK1 Zellen mit den sieben aktiven Substanzen mit Konzentrationen von 1 µM, 5 µM, 10 µM und 30 µM für 14 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das apoptoseinduzierende Alkaloid Staurosporin ^[131, 132] verwendet. Anschließend wurde die Aktivität der genannten Caspasen mit dem Testsystem erfasst. Die Ergebnisse sind in Abb. 34 dargestellt.

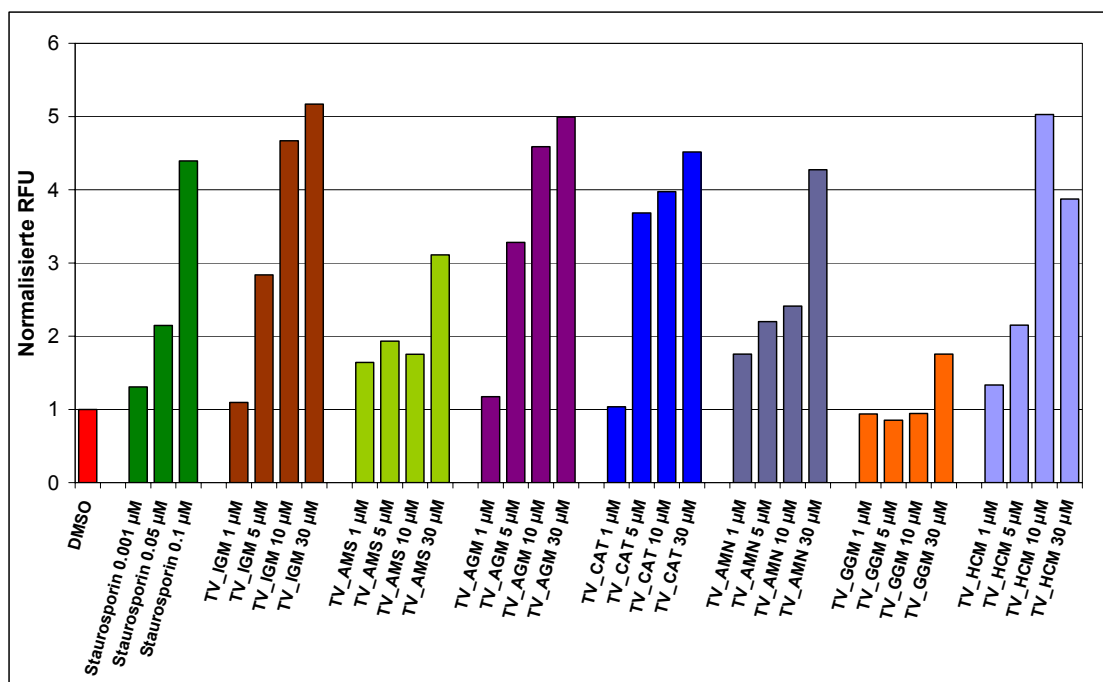


Abb. 34: Analyse der Apoptose induzierenden Wirkung der aktiven Substanzen mit dem APO-ONE® Caspase 3/7 Assay. HLR-ELK1 Zellen wurden für 14 h mit den angegebenen Substanzen in den gezeigten Konzentrationen inkubiert und anschließend getestet. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde durch den Anstieg der Fluoreszenz in den einzelnen Proben bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und der Emissionswellenlänge von 538 nm detektiert. Die erhaltenen Werte aus der Doppelbestimmung wurden gemittelt und auf den Wert der DMSO Kontrolle normiert. **RFU:** Relative Fluorescence Units.

Anhand der Ergebnisse erkennt man, dass alle Substanzen außer TV_GGM in den Zellen bei steigender Konzentration Apoptose induzieren. Hiervon zeigen die Substanzen TV_IGM, TV_AGM, und TV_CAT die stärkste Wirkung. Die Substanz TV_HCM ist bei 5 µM im Vergleich noch nicht stark apoptotisch, zeigt aber bei 10 µM eine fünffache Verstärkung des Signals gegenüber den mit DMSO behandelten Zellen. Bei 30 µM fällt das Signal wieder ab. Dies könnte am raschen Absterben der Zellen oder an einer Varianz des Testes liegen. Mit Ausnahme von TV_HCM korrelieren die Ergebnisse sehr gut mit denen der WST-1 und MTT-Tests. Die Substanzen TV_AMS, TV_AMN und TV_GGM zeigen in Abb. 32 bis zu der Konzentration von 10 µM die höchsten Vitalitätswerte. In dem Apoptose Assay sind sie bei dieser Konzentration nur schwach oder im Fall von TV_GGM gar nicht apoptotisch. Die niedrigeren Vitalitätswerte der Substanzen TV_IGM, TV_AGM, TV_CAT stehen auch im Verhältnis zu ihrer apoptotischen Wirkung und können hierdurch begründet werden.

6.4.4 Untersuchung der ERK Phosphorylierung

Im Folgenden sollte die Inhibition der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade durch diese Substanzen genauer untersucht werden. Aufgrund der Hinweise aus dem MDCK-F3 Rücktransformations Assay (siehe Abschnitt 6.4.2) scheint eine direkte Inhibition unwahrscheinlich. Dies sollte im Folgenden anhand der Phosphorylierung von ERK bestätigt werden. Hierbei wurden HLR-ELK1 Zellen für 14h mit den Substanzen bei einer Konzentration von 10 μM inkubiert und anschließend mit EGF für 10 min stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge an DMSO behandelt. Als Positivkontrolle wurde der MEK Inhibitor U0126 mit einer Konzentration von 10 μM verwendet. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese getrennt. Mit Hilfe der Western-Blot Technik wurde das phosphorylierte ERK Protein im Vergleich mit dem gesamten ERK-Protein erfasst. Hierbei wurde zunächst mit einem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes ERK detektiert. Dann wurde die Membran von den gebundenen Antikörpern befreit und mit einem Antikörper gegen das gesamte zelluläre ERK detektiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 gezeigt. Man erkennt deutlich im Vergleich mit den EGF stimulierten Zellen der Negativkontrolle, dass keine der applizierten Substanzen die Phosphorylierung von ERK inhibiert. Demgegenüber wurde die Phosphorylierung von ERK durch U0126 vollständig verhindert. Somit bestätigt sich die Vermutung, dass die Substanzen nicht direkt auf die Signalkaskade oberhalb von ERK wirken.

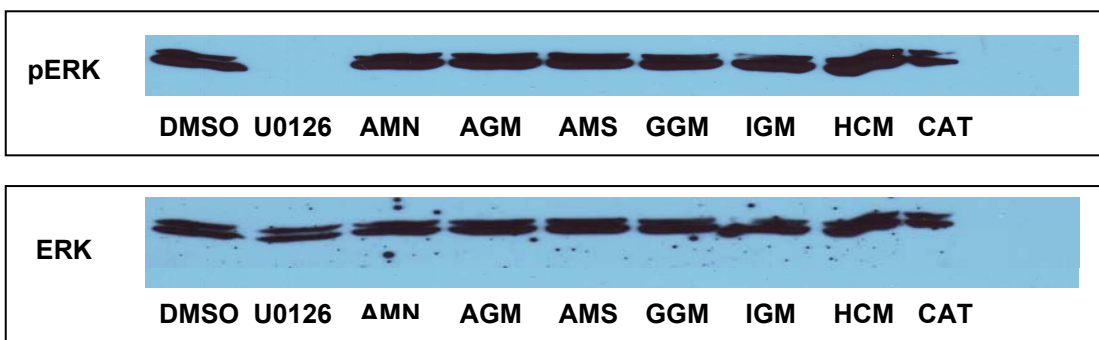


Abb. 35: Einfluss der aktiven Substanzen auf die Phosphorylierung von ERK. HLR-ELK1 Zellen wurden für 14 h mit den angegebenen Substanzen bei einer Konzentration von 10 μM inkubiert und für 10 min mit EGF, in Anwesenheit der Substanz, stimuliert. Als Negativkontrolle dienten mit der entsprechenden Menge an DMSO behandelte Zellen. Als Positivkontrolle wurde der MEK Inhibitor U0126 bei 10 μM verwendet. **Oben:** Anteil von phosphoryliertem ERK. **Unten:** Gesamtes ERK Protein auf derselben Membran. Kennzeichnung der Substanzen erfolgt hier mit den kodierenden letzten drei Buchstaben des Substanznamens.

Ihre inhibitorische Wirkung im Reportergen Assay könnte somit weiter unterhalb dieses Signalwegs liegen oder über einen anderen Signalweg die Aktivierung von ELK-1 verhindern. Eine Inhibitorische Wirkung auf Prozesse der Transkription oder Translation können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Anhand dieser Ergebnisse wurde deutlich, dass die Anfälligkeit des Reportergen Assays für falsch positive Ergebnisse sehr hoch ist. Substanzen, die wahrscheinlich über verschiedene Prozesse apoptotisch wirken, inhibieren das Signal sehr stark. Die verwendeten Vitalitätsassays sind hierbei noch nicht sensitiv genug um diese Wirkung auszuschließen. Daher wurden die Kriterien für folgende Tests dahingehend angepasst, dass nur noch Substanzen weiter untersucht werden, die das Signal um mehr als 50 % senken und darüber hinaus im WST-1 Test die Vitalität um nicht mehr als 20 % reduzieren. Als weiteres Kriterium sollte jede inhibierende Substanz im MDCK-F3 Test und auf die Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht werden. Bleibt hier eine Wirkung aus sollte zudem oder parallel dazu die inhibitorische Wirkung auf die Luciferaseaktivität untersucht werden. Für die Substanz TV_AMS konnte nämlich in einem *in vitro* Test auf die Luciferaseaktivität eine inhibitorische Wirkung bei einer Konzentration von 10 µM festgestellt werden (persönliche Mitteilung Dipl. Biol. Claas Gerding Reimers, Max-Planck Institut für molekulare Physiologie).

6.5 Screen einer Bibliothek von 50 α,β -ungesättigten δ -Lactonen im BSC-1 Cytoskelett Assay

Im Zusammenhang der Naturstoff inspirierten Synthese von Substanzbibliotheken stellt das Strukturmotiv von α,β -ungesättigten δ -Lactonen einen höchst interessanten Ansatzpunkt dar. Dieses Motiv kommt innerhalb der bekannten Naturstoffe mit am häufigsten vor.^[31] Darunter sind Substanzen, von denen eine Wirkung auf das Aktin- oder Tubulinskelett beschrieben wurde.^[151] Dr. Torben Lessmann und Dr. Michele G. Leuenberger (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie) gelang die enantioselektive Synthese von 50 α,β -ungesättigten δ -Lactonen an fester Phase.^[152] Die komplette Substanzbibliothek wurde daraufhin in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas U. Mayer in dem BSC-1 Cytoskelett Assay bei einer Konzentration von 30 μM getestet. Hierbei wurden die Zellen für 8 h mit den Substanzen inkubiert und anschließend fixiert. Anschließend wurden die DNA sowie das Aktin- und Tubulinskelett angefärbt. Bei der nachfolgenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigten 14 Substanzen Wirkungen auf das Cytoskelett. Bei genauerer Betrachtung der Phänotypen zeigten die Substanzen 10a/10 und 11a/1 eine hohe Anzahl von falsch ausgerichteten Chromosomen und eine deutlich veränderte Spindelmorphologie (siehe Abb. 36). Der Abstand der Spindelpole von Zellen, die mit der Substanz 10a/10 bei 100 μM behandelt wurden, ist im Vergleich zur DMSO Kontrolle viel größer. Bei einer Konzentration von 30 μM erscheint die Spindel leicht verbogen und die Chromosomen sind immer noch unausgerichtet. Demgegenüber konnte bei Zellen, die mit 11a/1 bei 30 μM behandelt wurden eine stark gebogene Spindelform beobachtet werden. Die Chromosomen sind hierbei auch viel schwächer ausgerichtet als bei der Substanz 10a/10. Das Aktinskelett war nur bei der Substanz 10a/10 bei einer Konzentration von 100 μM beeinträchtigt. Die Substanz 11a/1 zeigte hierbei keine Wirkung. Um die Induktion der beobachteten Effekte durch abgebaute Formen dieser Substanzen auszuschließen, wurden die Zellen mit den möglichen Abbauprodukten bei einer Konzentration von 100 μM inkubiert und untersucht. Dies war für die Substanz 10a/10 Benzylalkohol und für die Substanz 11a/1 Alanin-methylester. Beide hatten keinen Einfluß auf das Cytoskelett und zeigen somit, dass der beobachtete Effekt tatsächlich durch die Strukturen der Substanzen 10a/10 und 11a/1 induziert wird (siehe Abb. 36).

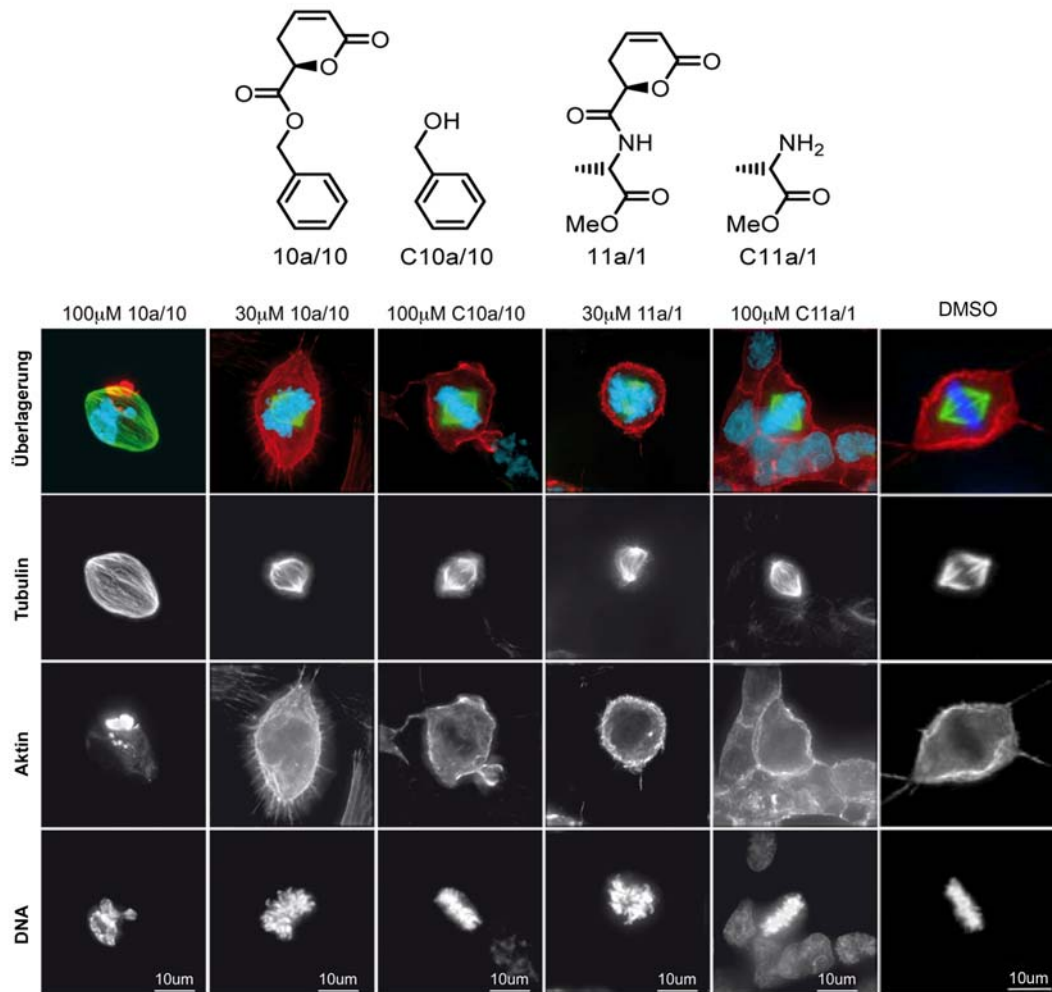


Abb. 36: (aus Lessmann et al. 2007): *Einfluss der Substanzen 10a/10 und 11a/1 sowie ihrer möglichen Abbauprodukte auf das Cytoskelett von BSC-1 Zellen.* Oben sind die Strukturen der getesteten Substanzen 10a/10 und 11a/1 sowie die ihrer möglichen Abbauprodukte C10a/10 und C11a/1 gezeigt. Fluoreszenzbilder der Tubulin-, Aktin- und DNA-Färbung sind jeweils einzeln und farblich übereinandergelagert gezeigt. Hierbei ist das Tubulin in grün, Aktin in rot und die DNA in blau dargestellt.

Die induzierten Phänotypen deuten auf eine mögliche Wirkung der Substanzen auf die Dynamik von Mikrotubuli hin. In weiterführenden Studien inhibierten die Substanzen bei einer Konzentration von 80 μM die Polymerisation von Tubulinfilamenten *in vitro*.^[152] Die hierbei erforderliche hohe Konzentration, lässt vermuten, dass die induzierten Phänotypen nicht ausschließlich auf die inhibitorische Wirkung der Tubulinpolymerisation zurückzuführen sind. Daher sind weitere Untersuchungen für die Erörterung der Spezifität und die Art des Wirkungsmechanismus erforderlich.

6.6 Untersuchung von Indolochinolizin-Derivaten auf ihren Einfluss auf das Cytoskelett und die Mitose

6.6.1 Test im BSC-1 Cytoskelett Assay

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den Tubulin-bindenden Vinka Alkaloiden Vinblastine und Vincetrine^[153] sowie zu Evodiamin^[154], wurden 19 von Dr. Vivek Kedkar (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie) synthetisch hergestellte Indolochinolizin Derivate auf ihre mögliche Wirkung auf das Cytoskelett von BSC-1 Zellen untersucht. Hierbei wurden BSC-1 Zellen mit den entsprechenden Substanzen bei einer Konzentration von 30 μM sowie mit den beschriebenen (siehe Abschnitt 6.2.1) Positiv- und Negativkontrollen für 15 h inkubiert und anschließend fixiert. Nach Fluoreszenzfärbung des Tubulin- und Aktin-Skeletts sowie der DNA, wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Zellen, die mit der Substanz Vtk-71 behandelt wurden zeigten hierbei im Vergleich zu denen, die mit einer entsprechenden Menge an DMSO behandelt wurden, ein stark verändertes Tubulingerüst (siehe Abb. 37 A und C). Alle übrigen Substanzen hatten keinen Effekt auf das Cytoskelett und die DNA der BSC-1 Zellen. Bei den mit Vtk-71 behandelten Zellen ist auffällig, dass ein MTOZ (Mikrotubuli organisierendes Zentrum), von dem die Tubulinfilamente bis zur Zellperipherie hin ausstrahlen, zu fehlen scheint. Die Filamente liegen in ungerichteter Form verteilt vor, so dass das Tubulinskelett diffus erscheint (siehe Abb. 37 C). Zudem befinden sich viele Zellen in der Mitose und die Mitosespindel scheint in ihrer Gestalt ebenfalls beeinträchtigt zu sein (Abb. 37 C). Das Aktingerüst ist demgegenüber nicht verändert und mit dem der DMSO Kontrolle zu vergleichen (siehe Abb. 37 B und D). Der von der Substanz Vtk-71 induzierte Effekt weist eher Parallelen mit dem der Positivkontrolle Nocodazol bei einer Konzentration von 0,5 μM auf (siehe Abb. 37 E und F). Die mit Nocodazol behandelten Zellen zeigen ebenfalls keine MTOZs. Hier liegt Tubulin aber auch hauptsächlich in depolymerisierter Form vor und es sind nur wenige Filamente zu erkennen. Vergleichbar ist hier die Häufigkeit von Zellen in der Mitose. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Substanz Vtk-71, ähnlich wie Nocodazol zu einem mitotischen Arrest führt.^[144] In Abb. 37 D sind einige abgerundete Zellen mit Blasenbildungen in der Membran zu erkennen. Dies könnten Zellen sein, welche als Folge eines mitotischen Arrestes in die Apoptose übergehen. Der durch Vtk-71 induzierte Phänotyp weist somit deutlich auf eine direkte oder indirekte Wirkung auf Prozesse der Tubulindynamik hin.

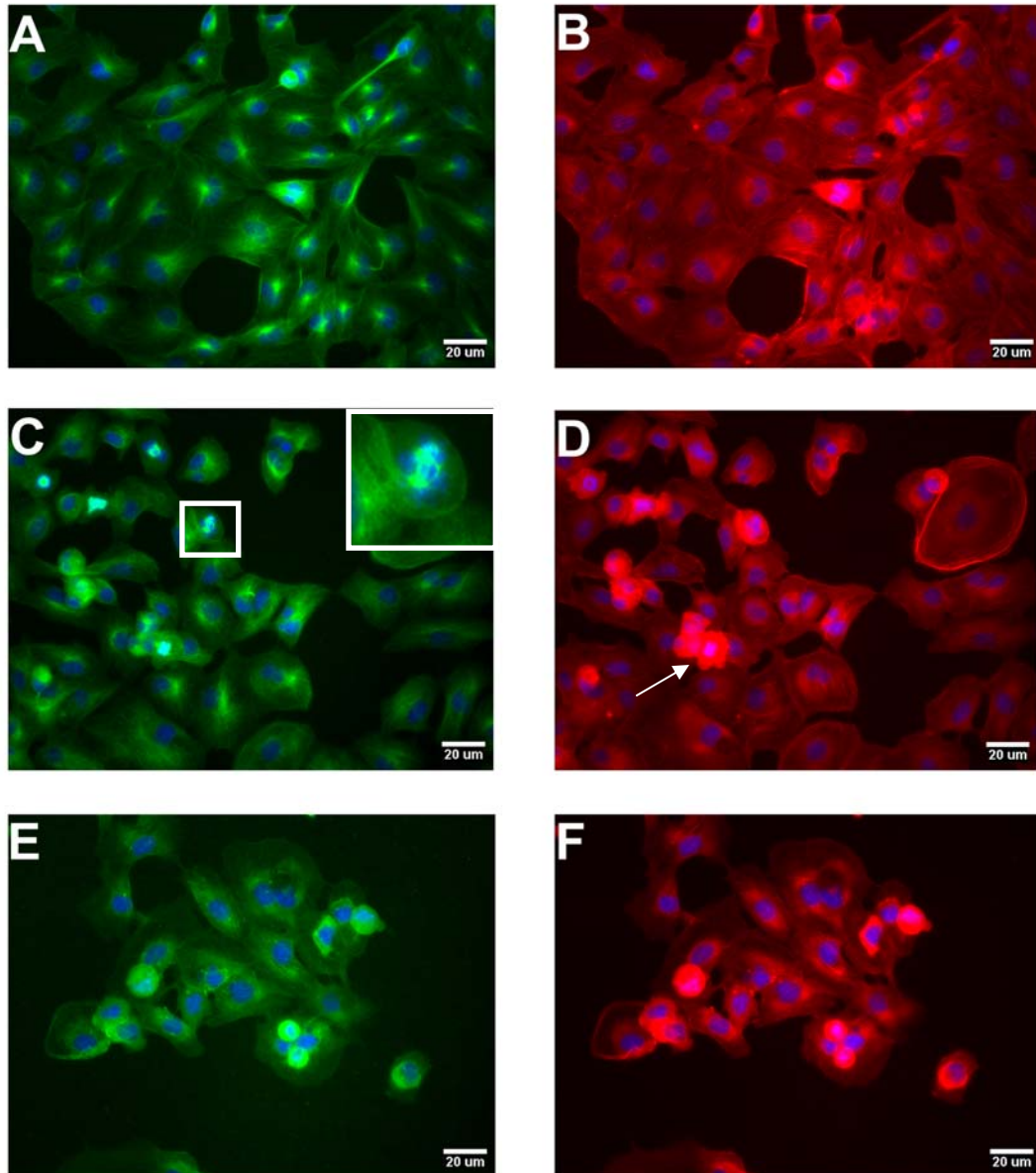


Abb. 37: Einfluss der Substanz Vtk-71 auf das Cytoskelett von BSC-1 Zellen. **A)** Tubulinskelett der DMSO Kontrolle. **B)** Aktinskelett der DMSO Kontrolle. **C)** Tubulinskelett der mit Vtk-71 (30 μM) behandelten Zellen. Das Tubulinskelett erscheint diffus. Es sind vermehrt mitotische Zellen zu erkennen. Die Gestalt der im weißen Ausschnitt rechts oben gezeigten mitotischen Spindel ist gestört. **D)** Aktinskelett der mit Vtk-71 (30 μM) behandelten Zellen. Das Aktinskelett ist nicht beeinträchtigt. Einige mitotische Zellen weisen Blasenbildungen der Membran auf (Pfeil). **E)** Tubulinskelett der mit Nocodazol (0,5 μM) behandelten Zellen. Tubulin liegt zum Großteil in depolymerisierter Form vor. Es sind vermehrt abgerundete Zellen im mitotischen Arrest zu erkennen. **F)** Aktinskelett der mit Nocodazol (0,5 μM) behandelten Zellen. Aktin ist durch die Wirkung von Nocodazol nicht beeinträchtigt.

6.6.2 „Live Cell Imaging“ und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Mitosespindel

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Mayer (Universität Konstanz) wurde die Substanz Vtk-71 sowie 10 weitere Derivate auf TC21 Zellen, welche GFP markiertes Tubulin und CENP-A exprimieren, bei den Konzentrationen von 10 μ M und 20 μ M getestet. Die Zellen wurden zuvor durch einen Thymidin-Block in der S-Phase arretiert und gleichzeitig bei der Zugabe der Substanz von diesem Block befreit. Die so synchronisierten Zellen wurden in Anwesenheit der Substanzen, oder einer entsprechenden Menge an DMSO für 16 h mit einem automatisierten Mikroskop alle 4 min abfotografiert. Hierbei wurden jeweils eine Durchlichtaufnahme sowie eine Fluoreszenzaufnahme bei der Anregungswellenlänge für GFP aufgenommen. Die erhaltenen Aufnahmen konnten anschließend zu einem Film verbunden werden um so das Verhalten der Zellen innerhalb des Beobachtungszeitraums zu analysieren. In diesen Zellen führte die Applikation bei acht Substanzen zu einer verlangsamten Mitose. Drei Substanzen zeigten keinen Unterschied zur DMSO Kontrolle. Zudem konnte beobachtet werden, dass sich einige Zellen nach der Mitose in drei Tochterzellen teilten. Manche Zellen gingen nach längerem Arrest in der Prometaphase in die Apoptose über. Die beschriebenen Effekte waren bei den Substanzen Vtk-71 und Vtk-206 am häufigsten zu beobachten. Die Menge an dreiteilenden Zellen überwog bei Vtk-206 (siehe Abb. 38). In den Fluoreszenzaufnahmen zeigte sich eine lang verzögerte Prometaphase, wobei die Bildung der Mitosespindel, wie schon in Abb. 37 C beobachtet, gestört zu sein schien. Aufgrund der Unschärfe der hierbei erhaltenen Aufnahmen konnten aber noch keine Details über die Struktur der Spindel erfasst werden (siehe Abb. 38 B). Auffällig war das zeitweise Vorhandensein von mehreren Spindelpolen.

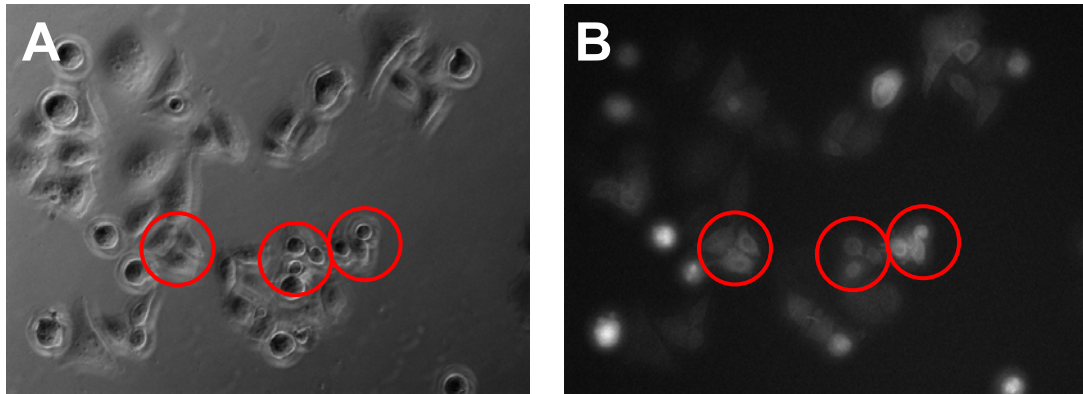


Abb. 38: Dreiteilung von TC21 Zellen in Anwesenheit der Substanz Vtk-206 (20 μM).
A) Standbild der Durchlichtaufnahme. Dreiteilende Zellen sind mit einem roten Kreis markiert.
B) Standbild der zu Bild A entsprechenden Fluoreszenzaufnahme. Dreiteilende Zellen sind ebenfalls mit einem roten Kreis markiert.

Aufgrund der erhaltenen Hinweise auf eine gestörte Formierung der Mitosespindel bei Applikation mit den Substanzen Vtk-71 und Vtk-206 bei einer Konzentration von 20 μM wurden synchronisierte HeLa Zellen erneut für 15 h mit den Substanzen auf Deckgläsern behandelt. Diesmal wurde eine Konzentration von 30 μM verwendet um die Häufigkeit des Effektes zu erhöhen. Die Zellen wurden fixiert und anschließend wurden das Tubulinskelett und die DNA angefärbt. Die Zellen konnten so bei einer stärkeren Vergrößerung (600x) auf Objektträgern betrachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass die Form der Mitosespindeln im Vergleich zu Zellen einer DMSO Kontrolle tatsächlich beeinträchtigt waren (siehe Abb. 39 A, B und C). Außerdem erkannte man einzelne Chromosomen an den Spindelpolen, die nicht in der Metaphaseplatte ausgerichtet werden konnten. Es scheint sich hier um Chromosomen zu handeln, welche nur mit einer Spindelfaser an einem Pol verbunden sind. Die Anzahl der mitotischen Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung lag bei den mit Substanz behandelten Zellen auch ca. 10x höher, als bei der DMSO Kontrolle. Die Zellen befanden sich dabei überwiegend in der Prometa- bzw. Metaphase. Dies könnte durch einen mitotischen Arrest aufgrund von der beschriebenen fehlenden Verbindung von Chromosomen zu einem der beiden Spindelpole erklärt werden. Zudem konnten auch unter den fixierten Zellen Dreiteilungen gefunden werden (siehe Abb. 39 C). Welche Ursachen zu diesem Phänomen führen, konnte aus den bisherigen Beobachtungen nicht erschlossen werden.

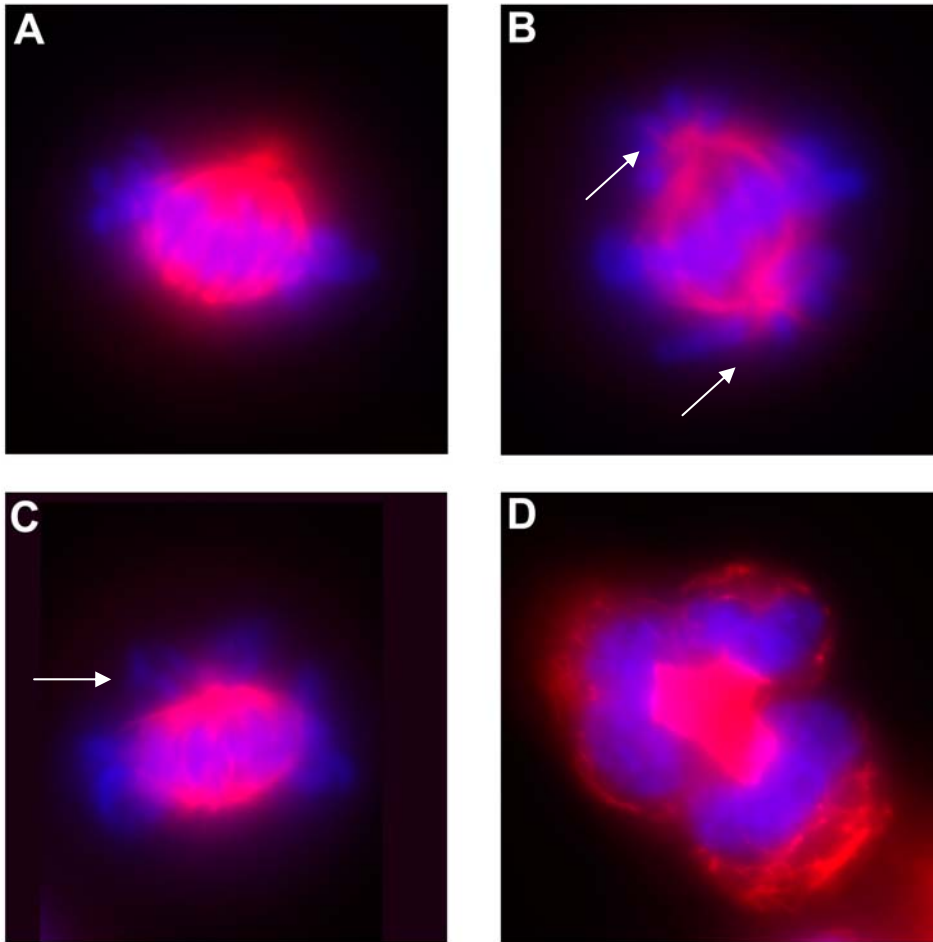


Abb. 39: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Mitosespindel von HeLa Zellen.

A) Mitosespindel einer HeLa Zelle der DMSO Kontrolle. **B)** Mitosespindel einer mit Vtk-71 (30 μM) behandelten HeLa Zelle. An beiden Spindelpolen sind nicht ausgerichtete Chromosomen zu erkennen (Pfeile). **C)** Mitosespindel einer mit Vtk-206 (30 μM) behandelten HeLa Zelle. Auch hier befinden sich Chromosomen an dem zugewandten Spindelpol (Pfeil). **D)** Dreiteilende HeLa Zelle bei Behandlung mit Vtk-206 (30 μM). Die Tubulinfilamente erscheinen bei den gezeigten Bildern in rot und die DNA in blau.

Die beobachteten Phänotypen sollten im Folgenden näher in Abhängigkeit von der verwendeten Substanzkonzentration charakterisiert werden. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Anthony A. Hyman und Dr. Alex W. Bird (Max-Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik) das Auftreten von polständigen Chromosomen sowie das Vorkommen von Dreiteilungen in Abhängigkeit von der Konzentration der jeweiligen Substanzen durch die Aufnahme von „Live Cell Imaging“-Filmen untersucht. Hierbei wurden HeLa Zellen, die GFP markiertes Histon 2B exprimieren, verwendet. In diesem Zusammenhang wurden auch noch einmal alle vorhandenen Derivate getestet und die höchste Aktivität der Substanzen Vtk-71 und Vtk-206 bestätigt. Die Substanz Vtk-206 wurde jeweils in beiden enantiomerenreinen

Formen getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass die Aktivität enantiomerenspezifisch ist. Eine deutlichere Charakterisierung der Phänotypen wurde zusätzlich mit Hilfe von hochauflösten Live Cell Imaging Filmen bei hohen Konzentrationen (30 μM) der Substanzen Vtk-71 und Vtk-206 näher untersucht. Hierbei wurden zusätzlich U2OS Zellen betrachtet, welche Cherry-Tubulin exprimieren. Nach der Analyse aller Bilddaten zeigte sich, dass schon bei einer Konzentration von 1 μM der Substanzen Vtk-71 und Vtk-206 teilweise Chromosomen an den einzelnen Polen auftauchen. Während der Anaphase waren auch vereinzelt missegregierte Chromosomen zu erkennen. Diese Effekte wurden mit steigender Konzentration häufiger und die letztendliche Ausrichtung dauerte länger (siehe Abb. 40 A). Ab einer Konzentration von 13 μM traten vermehrt dreiteilende Zellen auf. In den hochauflösenden Live Cell Imaging Filmen konnte hierbei das Auftauchen von mehreren Spindelpolen beobachtet werden. Die Zellen blieben viel länger in der Prometaphase und die Ausrichtung der Chromosomen war stark gestört. Bei der Dreiteilung waren zum Teil vier verschiedene Spindelpole erkennbar (siehe Abb. 40 B), wobei dann zwei in eine Tochterzelle übergingen. Ob es sich hierbei tatsächlich um echte Centrosomen handelt muss noch näher untersucht werden.

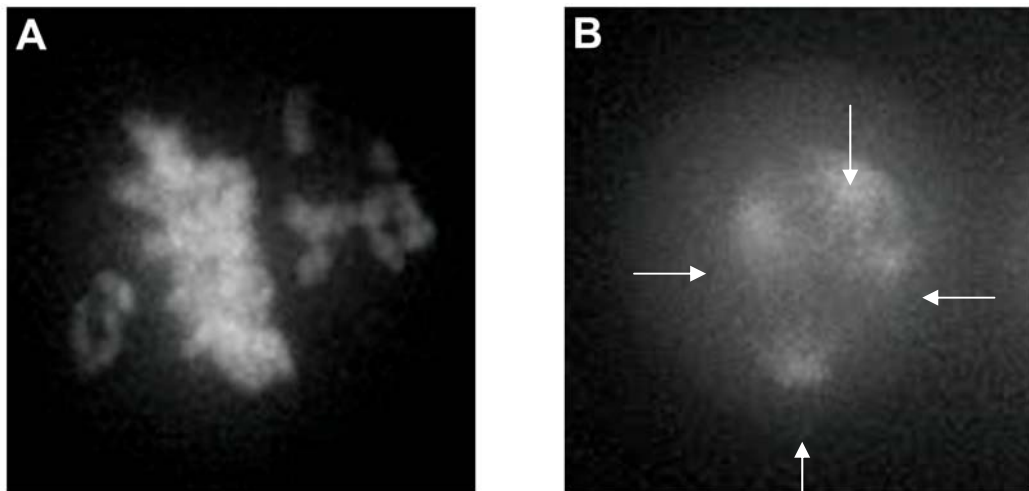


Abb. 40: Analyse der induzierten Phänotypen durch hochauflösende „Live Cell Imaging“ Filme. A) Standbild einer mit Vtk-71 (30 μM) behandelten HeLa GFP-H2B Zelle. Man erkennt an beiden Spindelpolen unausgerichtete Chromosomen. Diese ordnen sich im Verlauf verzögert in der Metaphaseplatte an, woraufhin bei dieser Zelle sogar ein ordentlicher Fortgang der Mitose erfolgt. **B)** Standbild einer mit Vtk-206 (30 μM) behandelten U2OS Cherry-Tubulin Zelle. Es bilden sich vier verschiedene Spindelpole aus (Pfeile). Im weiteren Verlauf teilt sich die Zelle in drei Tochterzellen, wobei in eine von ihnen zwei Centrosomen wandern.

Anhand dieser Beobachtungen kann man darauf schließen, dass mit steigender Konzentration mehrere Wirkungsweisen auftreten, oder aber die stärkere Störung eines Prozesses immer gravierendere Veränderungen in dem System zur Folge hat.

6.6.3 Einfluss der Substanzen auf die *in vitro* Tubulinpolymerisation

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas U. Mayer konnte der Einfluss der Substanzen Vtk-71 und Vtk-206 auf die Tubulinpolymerisation *in vitro* untersucht werden. Dabei wurde isoliertes Tubulin aus Schweinehirnen in Anwesenheit der Substanzen in einer Konzentration von 50 μM polymerisiert. Als Kontrolle wurde die Polymerisation mit einer entsprechenden Menge an DMSO oder mit Nocodazol bei einer Konzentration von 250 nM durchgeführt. Die Proben wurden zunächst bei 15 °C äquilibriert und anschließend wurde durch Erhöhung der Temperatur auf 30 °C die Polymerisation induziert. Die Bildung der Tubulinfilamente wird durch den Anstieg der optischen Dichte bei 350 nm detektiert. Um zu überprüfen, ob dieser Anstieg nur auf die Tubulinpolymerisation und nicht auf zusätzliche Aggregatbildungen zurückzuführen ist, wurde nach 20 min die Temperatur auf 15 °C gesenkt. Die Messung wurde dann für weitere 17 min fortgesetzt. Die Absenkung der Temperatur führte zu einer raschen Depolymerisation der Tubulinfilamente und somit zu einer Senkung der betrachteten optischen Dichte. Es wurden hierbei jeweils zwei Proben für jeden Ansatz hergestellt und gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 41 dargestellt. Weder Vtk-71 noch Vtk-206 beeinträchtigten die Polymerisation bei 50 μM . Die entsprechenden Kurven decken sich mit denen der DMSO Kontrollen. Bei den Proben der Nocodazol Kontrollen konnte nur ein schwacher Anstieg der Absorption gemessen werden, was auf die depolymerisierende Wirkung des Nocodazols zurückzuführen ist.

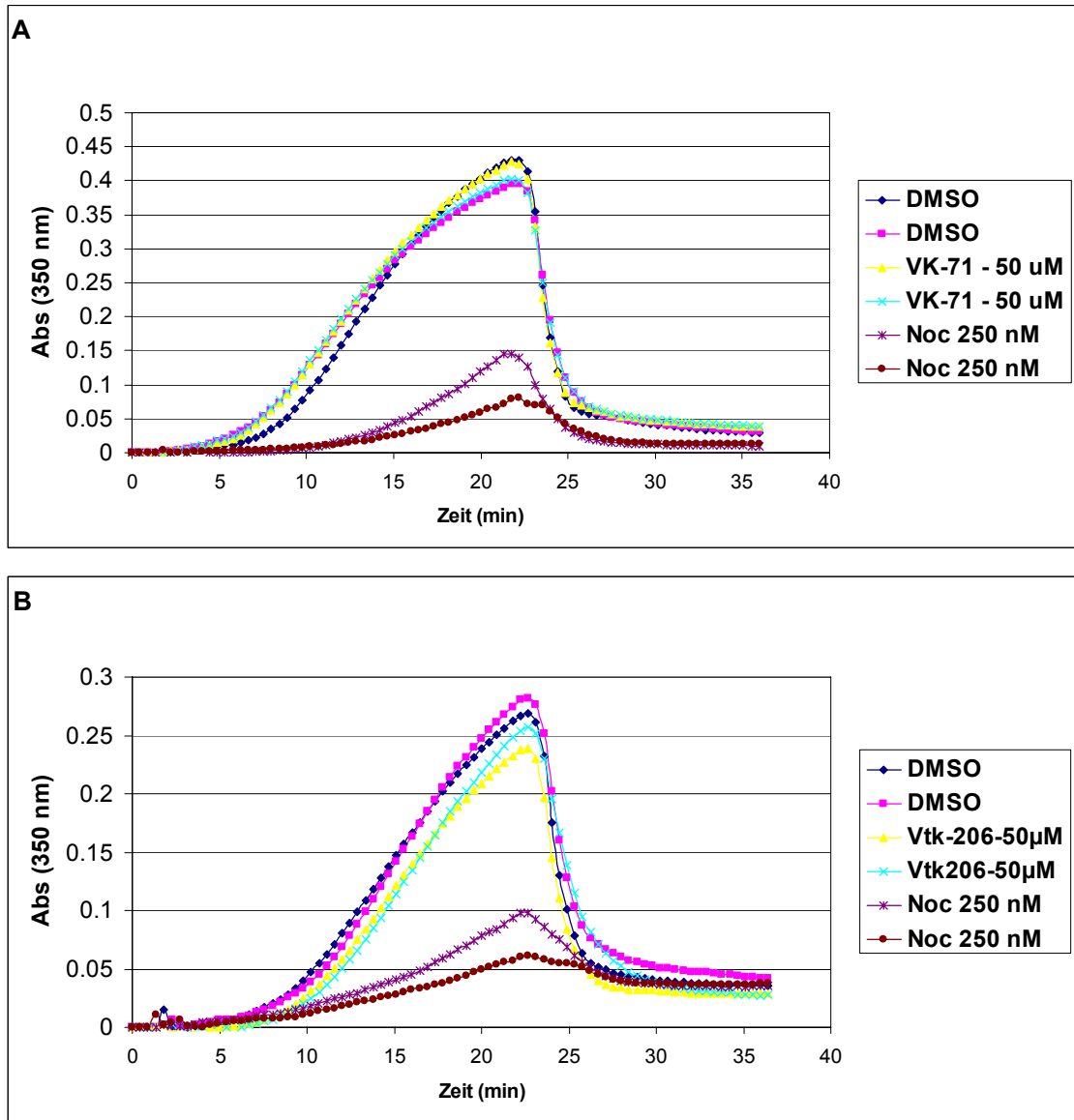


Abb. 41: Einfluss von Vtk-71 und Vtk-206 auf die Tubulinpolymerisation in vitro. Die Polymerisation wird für 20 min bei 30 °C induziert. Dann wird die Temperatur auf 15°C abgesenkt und die Depolymerisation für weitere 17 min detektiert. Alle Ansätze wurden doppelt getestet. **A)** Vtk-71 (50 µM) im Vergleich mit den DMSO- und Nocodazol (250 nM) Kontrollen. **B)** Vtk-206 (50 µM) im Vergleich mit den DMSO- und Nocodazol (250 nM) Kontrollen. **Noc:** Nocodazol

Aufgrund dieser Ergebnisse scheinen die Substanzen nicht direkt auf Tubulin zu wirken. Die beobachteten Effekte sind daher auf die Modulierung von Mikrotubuli assoziierten Proteinen und/oder Prozessen zurückzuführen. Daher soll in Zukunft der Wirkungsmechanismus durch weitere fluoreszenzmikroskopische Analysen sowie durch Identifikation der Zielproteine näher charakterisiert werden.

6.6.4 Cytotoxizitäts-Assay mit enantiomeren reinen Formen von Vtk-71 und Vtk-206

Von Dr. Slava Ziegler (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) wurde die Cytotoxizität der enantiomeren reinen Formen von Vtk-71 und Vtk-206 auf HeLa-Zellen bei den Konzentrationen von 3 μM , 6 μM , 12 μM , 25 μM und 50 μM mit Hilfe eines WST-1 Assays getestet. Hierbei stellen HD448+ bzw. HD448- die enantiomeren reinen Formen von Vtk-71 und HD430+ bzw. HD430- die enantiomeren reinen Formen von Vtk-206 dar. Als Positiv-Kontrolle wurde Doxorubicin verwendet welches über mehrere Wirkungsweisen, wie z.B. der Inhibition der Topoisomerase II zur Apoptose führt.^[155] Doxorubicin wurde bei einer Konzentration von 20 μM verwendet. Die Zellen wurden bei diesem Assay für 19 h mit den Substanzen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 42 gezeigt.

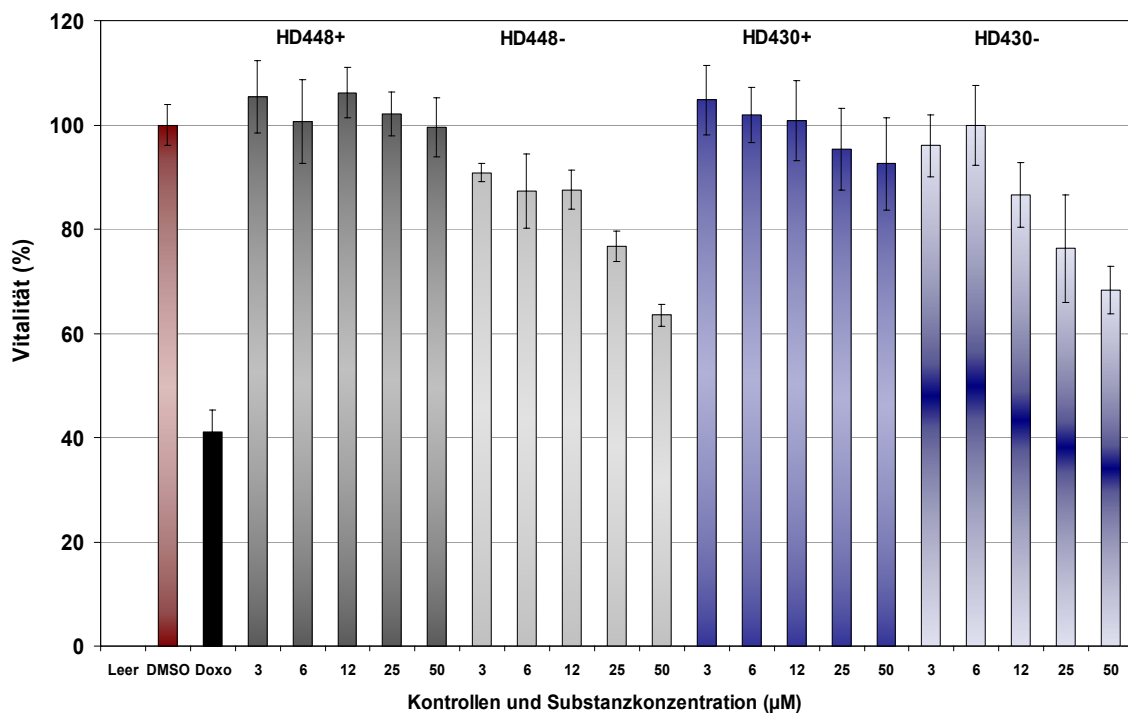


Abb. 42: WST-1 Assay mit den enantiomeren reinen Formen HD448+, HD448-, HD430+ und HD430- auf HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden für 19 h mit den jeweiligen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Als Positiv-Kontrolle diente Doxorubicin (Doxo) bei einer Konzentration von 20 μM . Die Werte der DMSO-Kontrolle wurden als 100 % Vitalität definiert.

Aus ihnen wird ersichtlich, dass die Wirkung tatsächlich enantiomerenspezifisch ist. Die Enantiomere HD448+ und HD430+ waren bis zu einer Konzentration von 50 μM nicht cytotoxisch, wohingegen bei HD448- und HD430- ab einer Konzentration von 25 μM die Vitalität der Zellen unter 80 % lag. Diese Ergebnisse decken sich mit der erwähnten Beobachtung der spezifischen Wirkungsweise der enantiomeren reinen Formen von Vtk-206 in den Live Cell Imaging-Experimenten. Darüber hinaus ist eine Apoptose-induzierende Wirkungsweise der aktiven Enantiomere möglich und sollte in Zukunft näher untersucht werden.

6.7 Identifikation der Wirkung von Prieurianin auf das Aktinskelett in Pflanzen- und Säugetierzellen

In der Arbeitsgruppe von Prof. George Coupland (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung) gelang es Dr. Réka Tóth einen Luciferase basierenden Reporter-gen Assay zu etablieren der in der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) das Expressionsverhalten des Proteins GIGANTEA in Abhängigkeit der Rhythmik der zirkadianen Uhr detektiert. Das Protein GIGANTEA spielt in der Modulation des zirkadianen Rythmus eine zentrale Rolle und seine Expression oszilliert stabil in der Licht-, sowie in der Dunkelphase.^[156] Darüber hinaus kann die Expression durch starke Rot- oder Blaulicht induziert werden.^[157, 158] In dem Reporter-gen Assay wurde die Aktivität des GIGANTEA kontrollierenden Promotors im Dunkeln sowie nach Aktivierung durch Blaulicht beobachtet. Mit diesem Testsystem wurde eine Substanzbibliothek, bestehend aus 718 Substanzen, bei einer Konzentration von 50 µM getestet. Hierbei führten die Substanzen Prieurianin und Prieurianinacetat (siehe Abb. 43) zu einer reproduzierbaren Änderung des betrachteten Expressionsmusters.

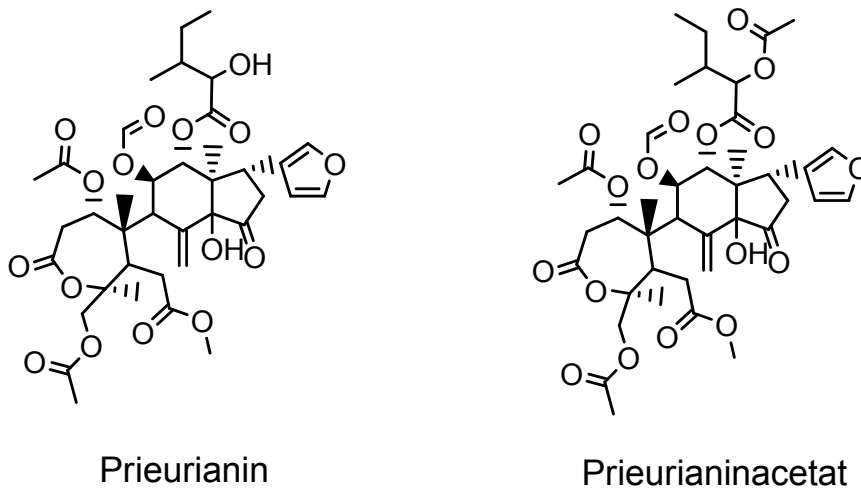


Abb. 43: Strukturen von Prieurianin und Prieurianinacetat

Zudem zeigten mit Prieurianin und Prieurianinacetat behandelte, etoillierte Keimlinge im Vergleich zur DMSO Kontrolle ein verkürztes Hypokotyl, einen offenen apikalen Haken und geöffnete Kotyledonen. Weitere Untersuchungen zeigten auch eine Verkleinerung der Zellen in der Hypokotyl- und der Blattepidermis. Somit schien der beobachtete Phänotyp durch ein verhindertes Längenwachstum der Zellen hervorgegangen zu sein. Es war bekannt, dass Substanzen wie z.B Latrunculin B, welche auf das Aktinskelett wirken, einen vergleichbaren Phänotyp induzieren.^[159] Daher wurde die Wirkung von Prieurianin und Prieurianinacetat auf das Aktinskelett von *Arabidopsis thaliana* Zellen untersucht. Hierbei zeigten beide Substanzen eine

starke Auswirkung auf die Organisation und die Filamentbildung von Aktin. Demgegenüber wurde das Tubulinskelett nicht beeinträchtigt. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt spezifisch für Pflanzenzellen ist, wurden die beiden Substanzen mit den Konzentrationen von 10 μM und 30 μM auf BSC-1 Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 dargestellt.

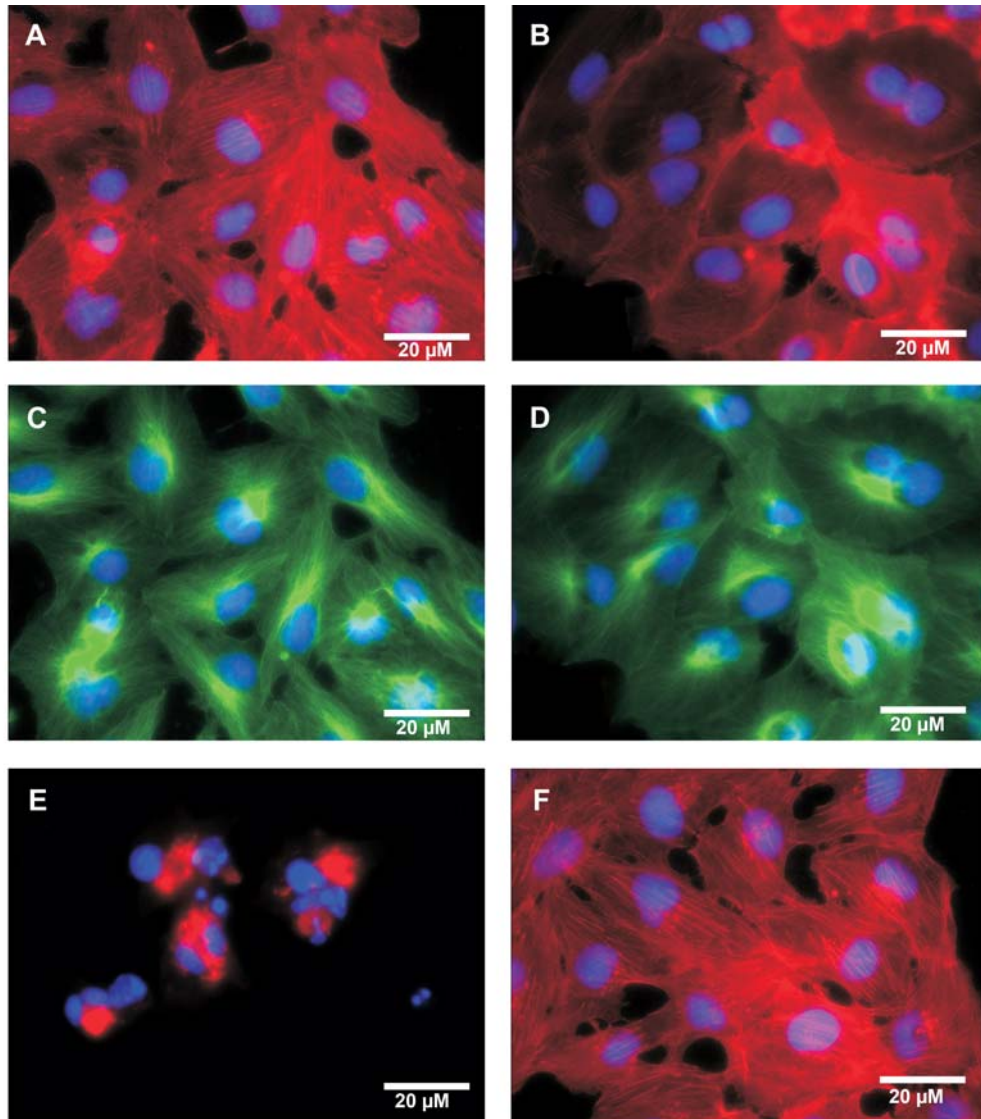


Abb. 44: Einfluss von Prieurianin und Prieurianinacetat auf das Cytoskelett von BSC-1 Zellen. A) Aktin und DNA Färbung der DMSO Kontrolle B) Aktin und DNA Färbung von Zellen, die mit Prieurianin (10 μM) behandelt wurden. C) Tubulin und DNA Färbung der DMSO Kontrolle D) Tubulin und DNA Färbung von Zellen, die mit Prieurianin (10 μM) behandelt wurden. E) Aktin und DNA Färbung von Zellen, die mit Prieurianin (30 μM) behandelt wurden. F) Aktin- und DNA Färbung von Zellen, die mit Prieurianinacetat (30 μM) behandelt wurden. Das Aktinskelett ist in rot, das Tubulinskelett in grün und die DNA ist in blau gezeigt.

Die BSC-1 Zellen wurden für 15 h mit Prieurianin oder Prieurianinacetat mit den Konzentrationen von 5 μM , 10 μM und 30 μM inkubiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der DNA, sowie der Aktin- und Tubulinstrukturen. Hierbei zeigte Prieurianin im Vergleich zur DMSO Kontrolle bei 10 μM einen deutlichen Effekt auf das Aktinskelett (siehe Abb. 44 A und B). Es sind kaum Stressfasern zu erkennen und es bilden sich einige F-Aktin Aggregate in der Zellperipherie. Die mit Prieurianin behandelten Zellen erscheinen größer und sind häufig zweikernig. Das Tubulinskelett dieser Zellen war im Vergleich zur DMSO Kontrolle unverändert (siehe Abb. 44 C und D). Ab einer Konzentration von 30 μM war Prieurianin cytotoxisch (siehe Abb. 44 E). Demgegenüber zeigte Prieurianinacetat bei 30 μM noch keinen Effekt auf das Cytoskelett (siehe Abb. 44 F). Dies steht im Gegensatz zu seiner Wirkung in Pflanzenzellen, wo es mit der Wirkung von Prieurianin vergleichbar war. Somit scheint aber die Wirkungsweise von Prieurianin in Pflanzen- und Säugerzellen konserviert zu sein.

In weiterführenden Versuchen wurde von Dr. Réka Tóth der Einfluss von Prieurianin und Prieurianinacetat auf die Polymerisation von Aktinfilamenten *in vitro* untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Substanzen keine direkte Wirkung auf die Aktinfilamente ausüben. Somit scheinen sie eher indirekt die Aktinfilamentbildung zu stören. Die Entdeckung dieser Wirkung zeigt zum ersten Mal eine Verbindung vom Aktinskelett mit der Orchestrierung der zirkadianen Uhr auf und führte darüber hinaus zur Identifikation einer Aktin-modulierenden Substanz, deren Wirkungsweise in Pflanzen- und Säugetierzellen konserviert ist.

6.8 Untersuchung von synthetisch hergestelltem Chondramid C und ausgewählten Stereoisomeren auf das Aktinskelett von BSC-1 Zellen – Eine Struktur-Aktivitäts-Studie

Das Prinzip des BSC-1 Assays kann zum Vergleich der Aktivitäten von verschiedenen Strukturanaloga verwendet werden. Ein Beispiel einer solchen Struktur-Aktivitäts-Studie soll im Folgenden geschildert werden.

Die Naturstoffe Phalloidin, Jasplakinolid und Chondramid C stabilisieren filamentöses Aktin über jeweils ähnliche Wirkmechanismen.^[160-162] Chondramid C konnte bisher noch nicht synthetisch hergestellt werden und nähere Analysen zur Stereochemie lagen noch nicht vor. In unserer Abteilung gelang Dr. Tai-Shan Hu und Dipl. Chem. René Tannert erstmalig die Totalsynthese von Chondramid C und sieben stereoisomeren Formen.^[163] Diese wurden in den Konzentrationen von 200 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM und 30 µM auf ihre Wirkung auf das Aktinskelett von BSC-1 Zellen getestet. Hierbei wurden die Zellen für 15 h mit den jeweiligen Substanzen inkubiert und anschließend fixiert. Nach Anfärbung der DNA und des Aktinskeletts wurden die Aktivitäten der einzelnen Stereoisomere in Abhängigkeit von der Konzentration betrachtet. Als Positivkontrolle wurde Jasplakinolid bei einer Konzentration von 100 nM verwendet. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit einer entsprechenden Menge an DMSO behandelt. Der durch die F-Aktin stabilisierenden Substanzen Jasplakinolid und Chondramid C induzierte Phänotyp ist charakterisiert durch ein Schrumpfen der Zellen, der Bildung von F-Aktin Aggregaten in der Peripherie des Zellkerns, einer Abnahme von F-Aktinfasern und durch das Auftreten von zweikernigen Zellen. Dieser Phänotyp konnte sowohl für Jasplakinolid und Chondramid C ab einer Konzentration von 100 nM bzw. 200 nM beobachtet werden (siehe Abb. 45 B und E). Diese geschilderten phänotypischen Beobachtungen sind in voller Übereinstimmung mit früheren Studien über Aktin stabilisierende Verbindungen.^[164-167] Das Auftreten des Phänotyps konnte bei fünf weiteren Stereoisomeren von Chondramid C innerhalb des verwendeten Konzentrationsbereichs beobachtet werden. Allerdings unterschieden sich hierbei die dafür erforderlichen Konzentrationen. Daher konnte die Aktivität der jeweiligen Substanz mit der zugehörigen Konformationen verglichen werden. Dies ergab besonders bei dem Vergleich der in Abb. 45 C-F gezeigten konzentrationsabhängigen Phänotypen und den in Abb. 46 gezeigten zugehörigen Strukturen wichtige Erkenntnisse über die Position besonders aktivitätsbeeinflussender Stereozentren.

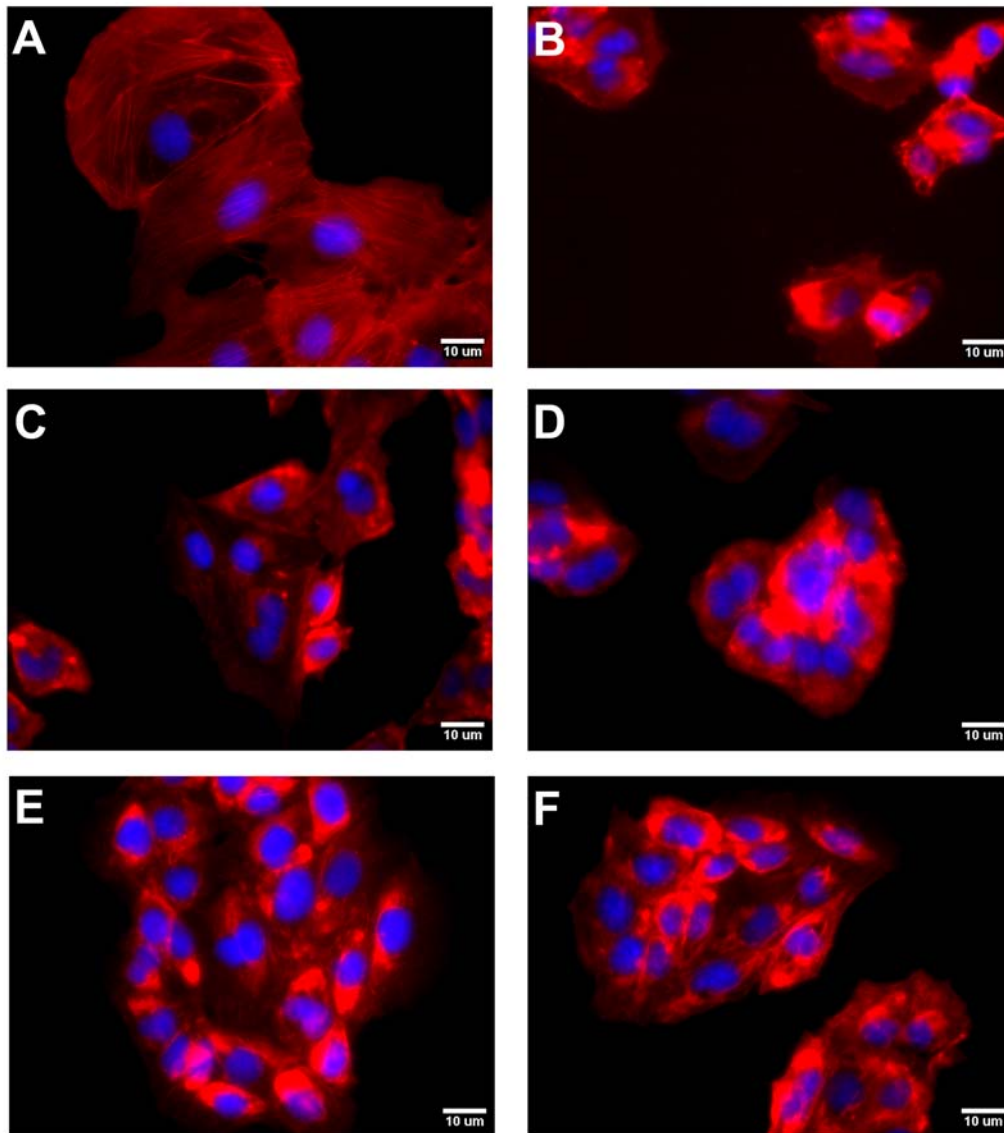


Abb. 45: Beobachtung der F-Aktin stabilisierenden Wirkung von synthetischen Chondramid C und ausgewählten Stereoisomeren in Abhängigkeit ihrer Konzentration. **A)** DMSO Kontrolle **B)** Jasplakinolid (100 nM) **C)** 14a (10 μ M) **D)** 14b (5 μ M) **E)** 14c = Chondramid C (200 nM) **F)** 14d (10 μ M). Das Aktinskelett ist in rot und die DNA in blau dargestellt.

Die Isomeren 14a, 14b und 14d (Abb. 45 C, D und F) zeigten im Vergleich zu Chondramid C (Abb. 45 E) erst bei 5 μ M bis 10 μ M einen vergleichbaren Phänotyp. Bei Betrachtung der in Abb. 46 gezeigten Strukturen, fällt auf, dass die Konfiguration von C7 einen wesentlichen Einfluss auf die stabilisierende Aktivität von F-Aktin hat. Darüber hinaus scheint die Konformation der Doppelbindung zwischen C5 und C6 von ähnlicher Bedeutung zu sein. Verwunderlich ist, dass hier die Z-Konfiguration die inaktivierende S-Konfiguration am C7 teilweise zu kompensieren scheint. Der von 14b induzierte und mit Chondramid C vergleichbare Phänotyp (Abb. 45 D und E) ist schon bei einer Konzentration von 5 μ M zu beobachten.

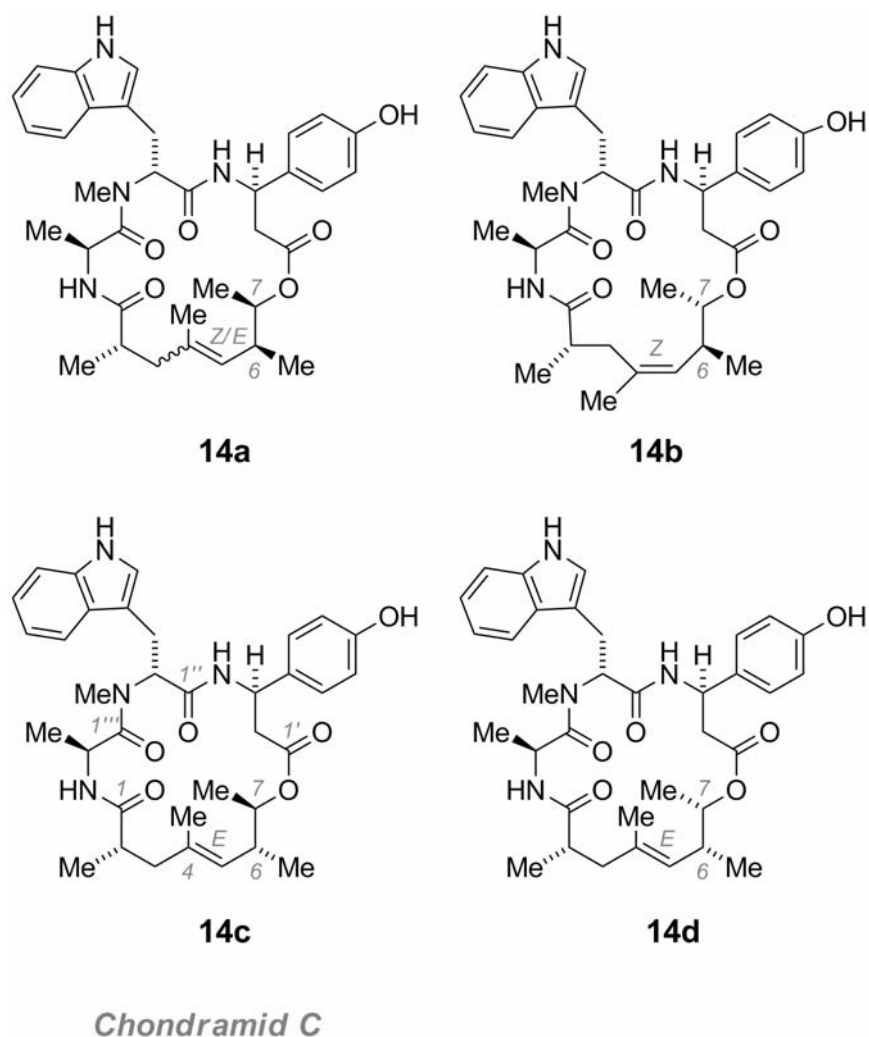


Abb. 46: Strukturen von Chondramid C und drei ausgewählten Stereoisomeren.

Insgesamt ist aber offensichtlich, dass bei der Doppelbindungsgeometrie die E-Konformation und am C7 die R-Konformation, wie sie bei dem Naturstoff vorliegt, zu der höchsten Aktivität führen.

Die Identifikation der entscheidenden stereogenen Elemente für die F-Aktin stabilisierende Aktivität, konnte besonders für die Konfiguration an C7 durch weiterführende computergestützte Bindungsstudien bestätigt werden.^[163] Die Ergebnisse zeigten, dass mit Hilfe des phänotypischen Assays auch Struktur-Aktivitäts-Studien durchgeführt werden können.

6.9 Screen einer selektionierten Substanzbibliothek mit dem PathDetect®-Reporterigen Assay, BSC-1 Cytoskelett Assay und dem MDCK-F3 Phänotyp Assay

Nachdem die erfolgreiche Etablierung aller drei Testsysteme abgeschlossen war, wurde in diesen eine ausgewählte Substanzbibliothek parallel getestet. Hierdurch sollten die in den jeweiligen Assays gewonnenen Daten miteinander in Korrelation gesetzt werden, um so die Wirkungsweisen der aktiven Substanzen und die Aussagefähigkeiten der einzelnen Assays näher charakterisieren zu können.

Da die hauseigene Substanzbibliothek zum derzeitigen Zeitpunkt mehr als 32.000 Strukturen umfasste und diese nicht in allen drei etablierten Testsystemen in einem kurzen Zeitraum getestet werden können, wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dipl. Chem. Stefan Wetzel und Dipl. Biochem. Bernhard Ellinger eine selektierte Auswahl an repräsentativen Substanzen erstellt. Sie entwickelten hierfür spezielle Auswahlkriterien, welche besonders für die Verwendung in zellulären Testsystemen angepasst wurden. So wurden nur Substanzen gewählt, welche in ausreichender Menge vorhanden waren. Das Kriterium war hierbei, dass mehr als 300 µL einer 10 mM Lösung zur Verfügung stehen musste. Ein weiteres Kriterium war die Wasserlöslichkeit. Es wurden nur Substanzen ausgewählt, deren $\text{AlogP} \leq 6$ war. Die Anzahl der Ringe der jeweiligen Strukturen sollte zudem entweder ≥ 1 sein, oder die Substanzen sollen ≥ 3 Heteroatome besitzen oder mindestens ≥ 1 Stereozentren aufweisen. Hiervon erfüllten 4589 Substanzen die beschriebenen Kriterien. Diese Verbindungen wurden mit Hilfe eines Computeralgorithmus so geordnet, dass strukturell ähnliche Substanzen zusammen gruppiert wurden. Im Mittel wurden zehn Verbindungen in einer Gruppe zusammengefasst. Dies resultierte in einer Substanzbibliothek von 479 Substanzen, welche die Vielfältigkeit der gesamten Bibliothek widerspiegeln sollten. Im Falle der Identifikation von aktiven Substanzen innerhalb dieser Auswahl, sollten alle weiteren Moleküle dieser Gruppe getestet werden und so vielleicht zur Identifikation von noch aktiveren Strukturen führen. Dieser Ansatz würde auch erste Informationen für Struktur-Aktivitäts-Studien liefern. Die selektionierte Bibliothek wurde daher in dem BSC-1 Cytoskelett Assay, dem MDCK-F3 Assay und von Dipl. Biol. Claas-Gerding Reimers im PathDetect®-Reporterigen Assay bei einer Konzentration von 30 µM getestet.

Dabei wurde im BSC-1 System jede phänotypische Veränderung, einschließlich einer möglichen Cytotoxizität, protokolliert und als Wirkung betrachtet. Die Analyse der Bilddaten des MDCK-F3 Screens wurde von Dipl. Biol. Claas-Gerding Reimers, Walburga Hecker und Dipl. Biol. Sascha Menninger unabhängig voneinander

durchgeführt. Hierbei wurde die Stärke des Phänotyps individuell bewertet. Dabei wurde die Ähnlichkeit zum Phänotyp der mit U0126 bei 20 µM behandelten MDCK-F3 Zellen betrachtet. Es wurden dafür die Kriterien „leichte Ähnlichkeit“, „mittelstarke Ähnlichkeit“ und „starke Ähnlichkeit“ verwendet. Am Ende wurden nur diejenigen Substanzen als Hits betrachtet, die einen Phänotyp induzierten, der von allen als „mittelstarke Ähnlichkeit“ und „starke Ähnlichkeit“ bewertet wurde. Beim Reporteragen Assay wurden nur die Substanzen als Hits betrachtet, welche die Stärke des Luciferasesignals um mehr als 50 % reduzierten und bei denen die Vitalität der Zellen im WST-1 Test über 80 % lag.

Die Ergebnisse dieses Screens wurden anschließend miteinander verglichen. Ziel hierbei war durch die kombinierte Betrachtung verschiedener Strukturen und Prozesse mehr Informationen über die möglichen Wirkungsweisen der einzelnen Substanzen zu erhalten. In Abb. 47 ist schematisch die Anzahl der einzelnen Hits in den drei Testsystemen dargestellt.

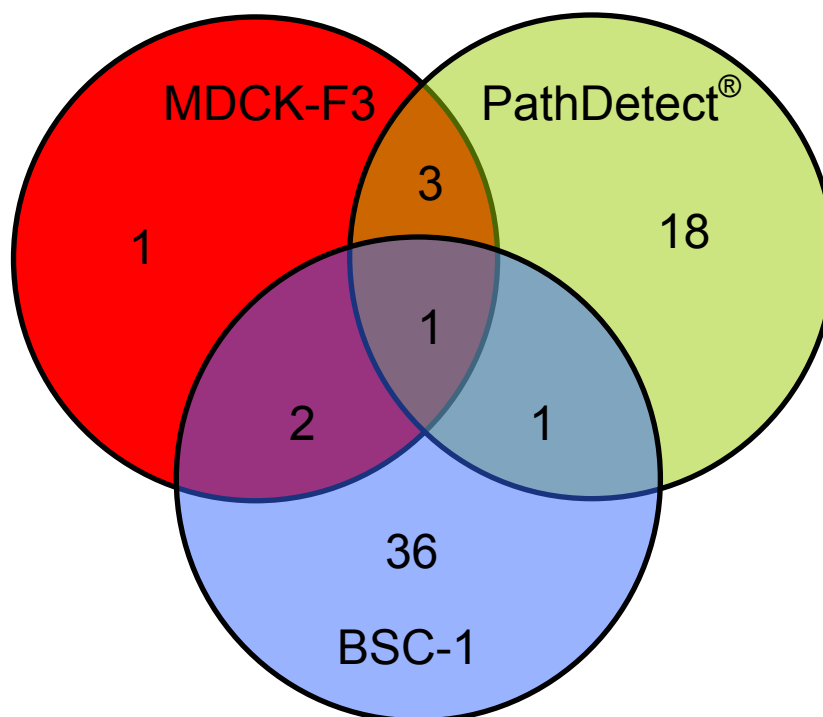


Abb. 47: Anzahl der aktiven Substanzen aus der selektierten Substanzbibliothek von 479 Substanzen in den jeweiligen Testsystemen. Gezeigt ist die Anzahl der aktiven Substanzen, die jeweils nur in einem Testsystem oder in mehreren Testsystemen Wirkung zeigten.

Die Ergebnisse dieser vergleichenden Analyse soll im Folgenden skizziert werden. Bei der Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse fällt auf, dass drei Substanzen sowohl im Reportergeren Assay, als auch im MDCK-F3 Assay Wirkungen zeigten. Dies könnte ein deutlicher Hinweis auf eine Wirkung innerhalb der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade sein. Die Substanz, die in allen drei Testsystemen eine Wirkung zeigt, könnte auf der einen Seite eine Wirkung auf die Ras abhängige Signalkaskade haben, auf der anderen Seite aber auch schwach apoptotisch wirken. Letzteres ist bei Betrachtung der Bilddaten wahrscheinlicher (persönliche Mitteilung von Dr. Christiane Stute, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie), da wie in Abb. 48 A und B gezeigt, die BSC-1 Zellen längere Ausläufer und teilweise Blasenbildung in der Membran aufweisen. Eine ähnlich kritische Betrachtung gilt für Substanzen, die im MDCK-F3 Assay, als auch im BSC-1 Assay eine Wirkung zeigen. Hier scheinen die Substanzen eher auf Komponenten der Cytoskelettdynamik zu wirken, was bei den MDCK-F3 Zellen zu einer Änderung des Phänotyps führt. Ein Beispiel ist in Abb. 48 C und D gezeigt.

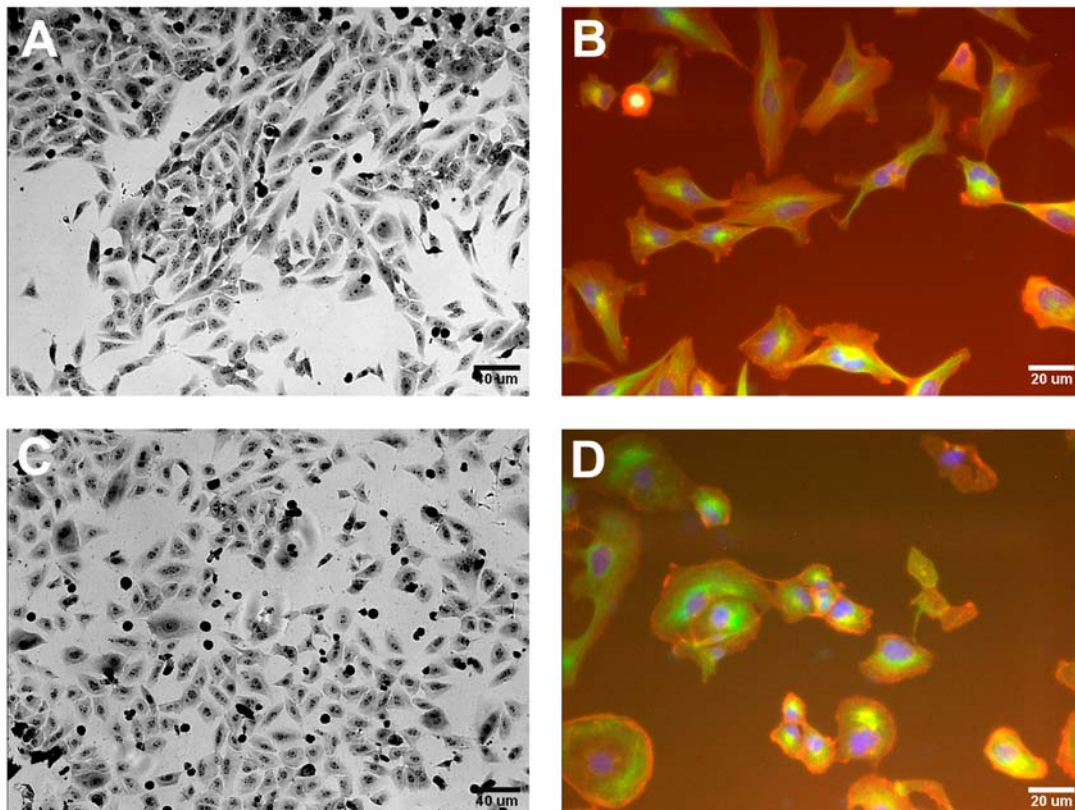


Abb. 48: Zellbilder von aktiven Substanzen im BSC-1 und MDCK-F3 Assay. A) Induzierter Phänotyp der Substanz LBD328 (30 μM) in MDCK-F3 Zellen. Diese Substanz reduzierte darüber hinaus das Reportersignal im PathDetect[®]-Reportergeren Assay um 91 % bei 30 μM . **B)** Induzierter Phänotyp der Substanz LBD328 (30 μM) in BSC-1 Zellen. **C)** Induzierter Phänotyp der Substanz IC-112 (30 μM) in MDCK-F3 Zellen. **D)** Induzierter Phänotyp der Substanz IC-112 (30 μM) in BSC-1 Zellen.

Die Substanz, welche im BSC-1 Assay und im Reportergeren Assay eine Wirkung zeigte, veränderte den Phänotyp der MDCK-F3 Zellen dahingehend, dass sie dort nicht als Hit betrachtet wurden. Hierbei spielt auch die Tatsache eine Rolle, dass Substanzen in verschiedenen Zelllinien ganz unterschiedliche Veränderungen bewirken können. Ähnliches könnte für die Substanz, welche nur im MDCK-F3 Assay identifiziert wurde, gelten. Darüber hinaus sollte diese Verbindung wiederholt im Reportergeren Assay getestet werden, da bei der Durchführung eines Assays Fehler nicht auszuschließen sind. Die Substanzen, die nur im Reportergeren Assay eine Wirkung zeigten, sollten primär auf ihre Wirkung auf die Luciferaseaktivität getestet werden. Dennoch ist bei diesem Ergebnis die hohe Anzahl von aktiven Substanzen nur in diesem Testsystem auffällig.

Unter den aktiven Substanzen im BSC-1 Assay konnten auch solche identifiziert werden, die aufgrund des induzierten Phänotyps wahrscheinlich vielversprechende Inhibitoren der Aktin und Tubulindynamik sind. Die Substanz Chelidonin wurde z.B. in diesem Assay aufgrund ihrer starken Wirkung auf das Tubulinskelett identifiziert. Es stellte sich heraus, dass diese Wirkung schon in der Literatur beschrieben wurde.^[168, 169] Dies bewies die Funktionalität dieses Assays, was vielversprechend für die übrigen in diesem Testsystem identifizierten Substanzen ist.

Durch den Vergleich der Wirkungsweisen der Substanzen in den verschiedenen Assays konnten einige Hinweise auf mögliche Misinterpretationen bei der Analyse der Daten aus einem einzelnen Testsystem gewonnen werden. Dies gilt besonders für den Reportergeren-Assay, als auch für den MDCK-F3 Assay. Bei Letzterem können vor allem leicht apoptotische Substanzen, als auch solche, die eher auf das Cytoskelett wirken, identifiziert werden. Dennoch sind diese Wirkungsweisen nicht uninteressant und sollten in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Die bisher dargestellten Ergebnisse entstanden im Kontext des vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes. Hierdurch konnten Substanzen mit unterschiedlichen Wirkungsweisen durch die etablierten Testsysteme identifiziert werden. Die Identifikation einer aktiven Substanz im Kontext eines rückwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes und die mit ihr durchgeführte Evaluierung der biologischen Funktion ihres Zielproteins soll im Folgenden Abschnitt beschrieben werden.

6.10 Identifikation und biologische Evaluierung eines spezifischen APT-1 Inhibitors - Ein rückwärts gerichteter chemisch-genetischer Ansatz

In Abschnitt 2.2.5 wurde der Ras-Zyklus vorgestellt. Hierbei wird durch reversible De- und Repalmitoylierung der C-Termini von H- und N-Ras, ihre Bindung an die Zellmembran und ihre subzelluläre Lokalisation kontrolliert. Dies führt zu einer Isoform-spezifischen Feinmodulation der jeweiligen Aktivitätsmuster an den verschiedenen Kompartimenten, besonders zwischen Plasmamembran und Golgi-Apparat.^[86] Die generelle Inhibition der Palmitoylierung durch nicht-metabolisierbare Palmitoyl-Analoga wie 2-Bromopalmitat führte zu erheblicher Schädigung der Zellen aufgrund einer pleiotropen Wirkungsweise auf den Zellstoffwechsel.^[170] Demgegenüber könnte die Inhibition der Thioesteraseaktivität zu einer Störung der zeit- und ortsabhängigen Modulation von palmitoylierten Proteinen aufgrund der nun statischen Membranverankerung führen. Es wurde vermutet, dass hierdurch auch die Ras-abhängige Signalweiterleitung gestört werden kann. Eine interessante Thioesterase stellt in diesem Zusammenhang die Acyl-protein-Thioesterase 1 (APT1) dar. Es konnte gezeigt werden, dass APT1 *in vitro* H-Ras depalmitoyliert.^[104, 171] Ihre biologische Funktion *in vivo* war bisher noch ungeklärt.

Um einen potenten Inhibitor für APT1 zu entwickeln wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dipl. Chem Stefan Wetzel und Dr. Steffen Renner, die in Abschnitt 2.1.2 vorgestellte Methode des *Protein Structure Similarity Clustering* (PSSC) angewendet.^[34, 35] Hierbei wurde anhand eines Strukturvergleichs von APT1 mit Strukturen in der Proteindatenbank eine hohe Ähnlichkeit mit der gastrischen Lipase des Hundes festgestellt. Die gastrische Lipase wird durch den Naturstoff Tetrahydrolipstatin (siehe Abb. 49) inhibiert.^[172] Das β -Laktongerüst von Tetrahydrolipstatin diente Dr. Frank Dekker und Dr. Rengarjan Balamurugan im Folgenden als Grundlage für die Synthese einer Substanzbibliothek, welche aus 65 verschiedenen β -Laktonen bestand. Diese wurde in einem enzymatischen Assay von Dr. Frank Dekker und Dr. Christian Hedberg auf ihre inhibitorische Wirkung auf die Aktivität von APT1 getestet. Die vier Stereoisomeren des potentesten Inhibitors wurden Palmostatin A – D genannt und in diastereoisomer und enantiomer angereicherter Form resynthetisiert. Von diesen inhibierte Palmostatin B (siehe Abb. 49) die Aktivität von APT1 am stärksten mit einem IC_{50} -Wert von 670 nM und wies eine relativ hohe Stabilität in wässriger Lösung auf. Somit konnte Palmostatin B als potente Sonde zur Untersuchung der Rolle von APT1 bei der Signalweiterleitung von N-Ras und H-Ras verwendet werden.

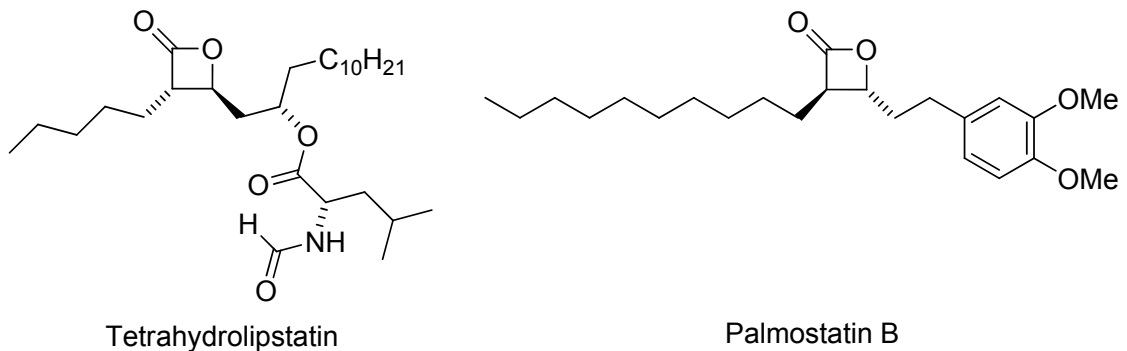


Abb. 49: Strukturen von Tetrahydrolipstatin und Palmostatin B

Die biologische Evaluierung wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Philippe Bastiaens (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) durchgeführt.

Zunächst wurde von Dr. Oliver Rocks anhand der Mikroinjektion von zwei semisynthetischen Ras-Konstrukten überprüft, ob in Anwesenheit von Palmostatin B die Palmitoylierung oder die Depalmitoylierung von Proteinen inhibiert wird. Hierbei ist PalFar ein Modell für ein vollständig lipidiertes N-Ras und dient als Probe für die Depalmitoylierung. CysFar hingegen ist ein Modell für ein nur farnesyliertes aber palmitoylierbares N-Ras und dient als Probe zur Untersuchung der Palmitoylierung. Die erfolgte Reaktion an den jeweiligen Proben wurde durch deren Lokalisation am Golgi-Apparat detektiert. Diese wurde mit der Golgi-Lokalisation von Citrine-N-Ras verglichen. In Anwesenheit von Palmostatin B konnte nur die Lokalisation von CysFar am Golgi Apparat beobachtet werden (siehe Abb. 50 A). PalFar lag während des gesamten Beobachtungszeitraumes über die Endomembranen verteilt vor und wurde daher nicht depalmitoyliert (siehe Abb. 50 B). Hierdurch wurde offensichtlich, dass durch Palmostatin B spezifisch die Deacylierungsreaktion und nicht die Acylierungsreaktion inhibiert wird. Daraufhin wurde von Dr. Oliver Rocks untersucht, wie sich diese Inhibition auf die Lokalisation von N- und H-Ras auswirkt.

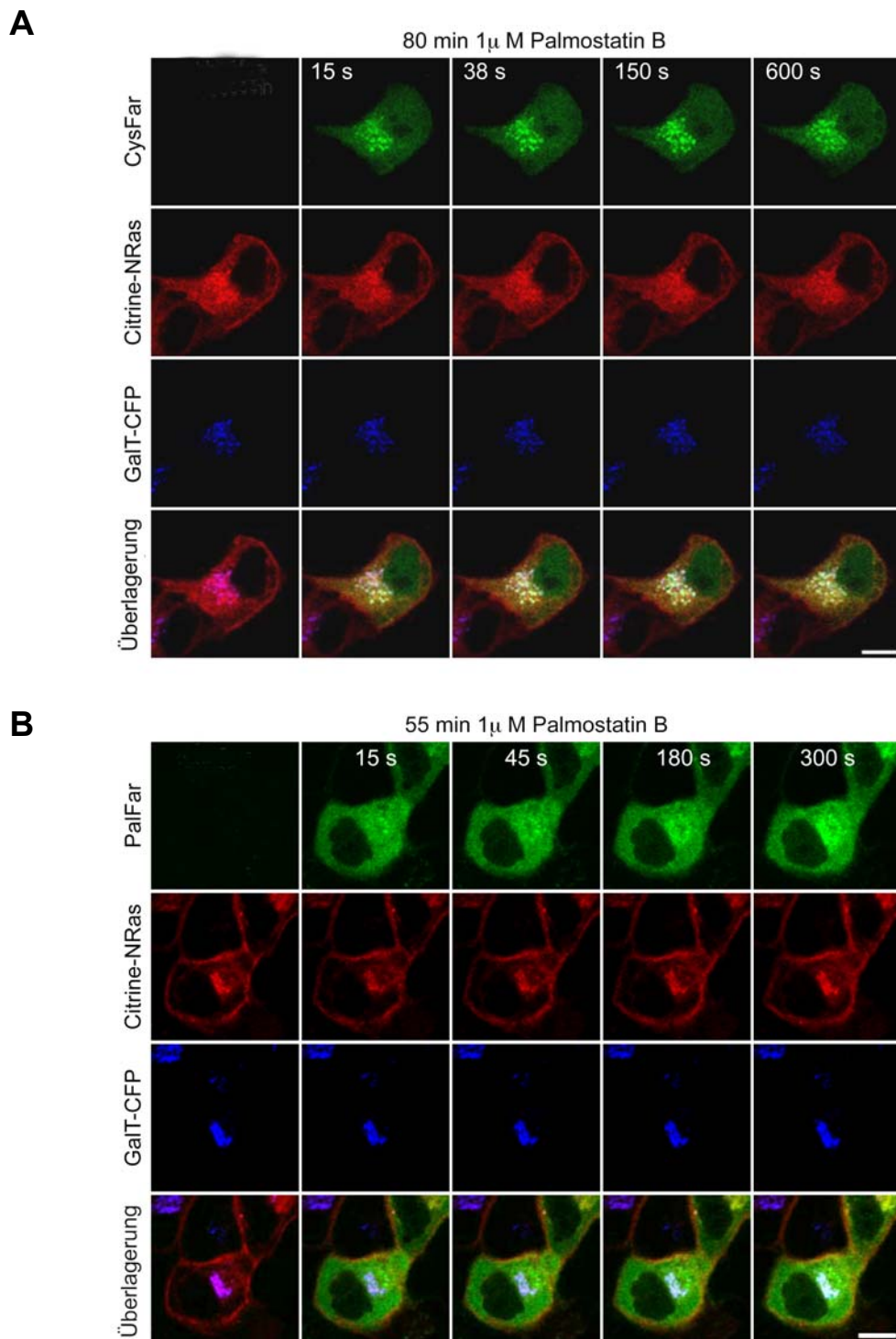


Abb. 50: Palmostatin B inhibiert spezifisch die Depalmitoylierung. **A)** Zeitaufgelöste konfokale Fluoreszenzaufnahmen von MDCK Zellen, welche den Golgi Marker GalT-CFP und Citrine-N-Ras exprimieren. Gezeigt sind Bilder vor und nach der Mikroinjektion von CysFar zu den angegebenen Zeiten. Die Zellen wurden jeweils für 80 min vor der Mikroinjektion mit Palmostatin B bei einer Konzentration von 1 μ M inkubiert. **B)** Zeitaufgelöste konfokale Fluoreszenzaufnahmen von MDCK Zellen, welche den Golgi Marker GalT-CFP und Citrine-N-Ras exprimieren. Gezeigt sind Bilder vor und nach der Mikroinjektion von PalFar zu den angegebenen Zeiten. Die Zellen wurden jeweils für 55 min vor der Mikroinjektion mit Palmostatin B bei einer Konzentration von 1 μ M inkubiert. Maßbalken: 10 μ M

Hierfür wurden MDCK Zellen, welche das fluoreszierende Fusionsprotein Citrine-N-Ras exprimieren, unter Verwendung des Golgi-Markers GalT-CFP, fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Behandlung dieser Zellen mit Palmostatin B bei einer Konzentration von 1 μ M, führte über einen Zeitraum von 100 min zu einer dramatischen Umverteilung von Citrine-N-Ras auf alle Endomembranen (siehe Abb. 51 A). Ein quantitativer Vergleich der Lokalisation des gelb fluoreszierenden Citrine-N-Ras mit der nur farnesylierten, rot fluoreszierenden Cherry-C181184S-H-Ras Mutante zeigte, dass beide Formen vergleichbar über die Endomembranen verteilt vorlagen. Die Umverteilung von N-Ras war bei einer Inkubation mit Palmostatin B über Nacht wieder aufgehoben. Eine ähnliche durch Palmostatin B induzierte Verteilung konnte in MDCK-Zellen beobachtet werden, die Citrine-H-Ras exprimieren. Hier wurde jedoch eine länger anhaltende Lokalisation von Citrine-H-Ras an der Plasmamembran beobachtet (siehe Abb. 51 B). Außerdem wurde kurze Zeit nach der Behandlung mit Palmostatin B ein Verlust von Citrine-H-Ras am Golgi Apparat beobachtet. Mit Hilfe der Herunterregulierung von APT1 durch siRNA wurde von MSc. Biotech. Nachiket Vartak weiter überprüft, ob die Thioesteraseaktivität von APT1 an der Regulation des Ras Zyklus beteiligt ist. Hierbei wurden ratiometrische Messungen der Verteilung von Citrine-N- und -H-Ras zwischen Plasmamembran und Golgi Apparat mit und ohne siRNA- Behandlung durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei der Herunterregulation der APT1 mRNA auf 20 % des Vergleichswertes ohne siRNA Behandlung, das Verhältnis beider Isoformen in Richtung Golgi-Lokalisation verschob.

Die zeitliche Regulierung von aktivem plamitoyliertem Ras wird durch seine subzelluläre Lokalisation gesteuert.^[173] Hierdurch wird die Verbindung zu verschiedenen nachgeschalteten Effektorsignalwegen und letztendlich die zelluläre Antwort beeinflusst.^[102, 174]

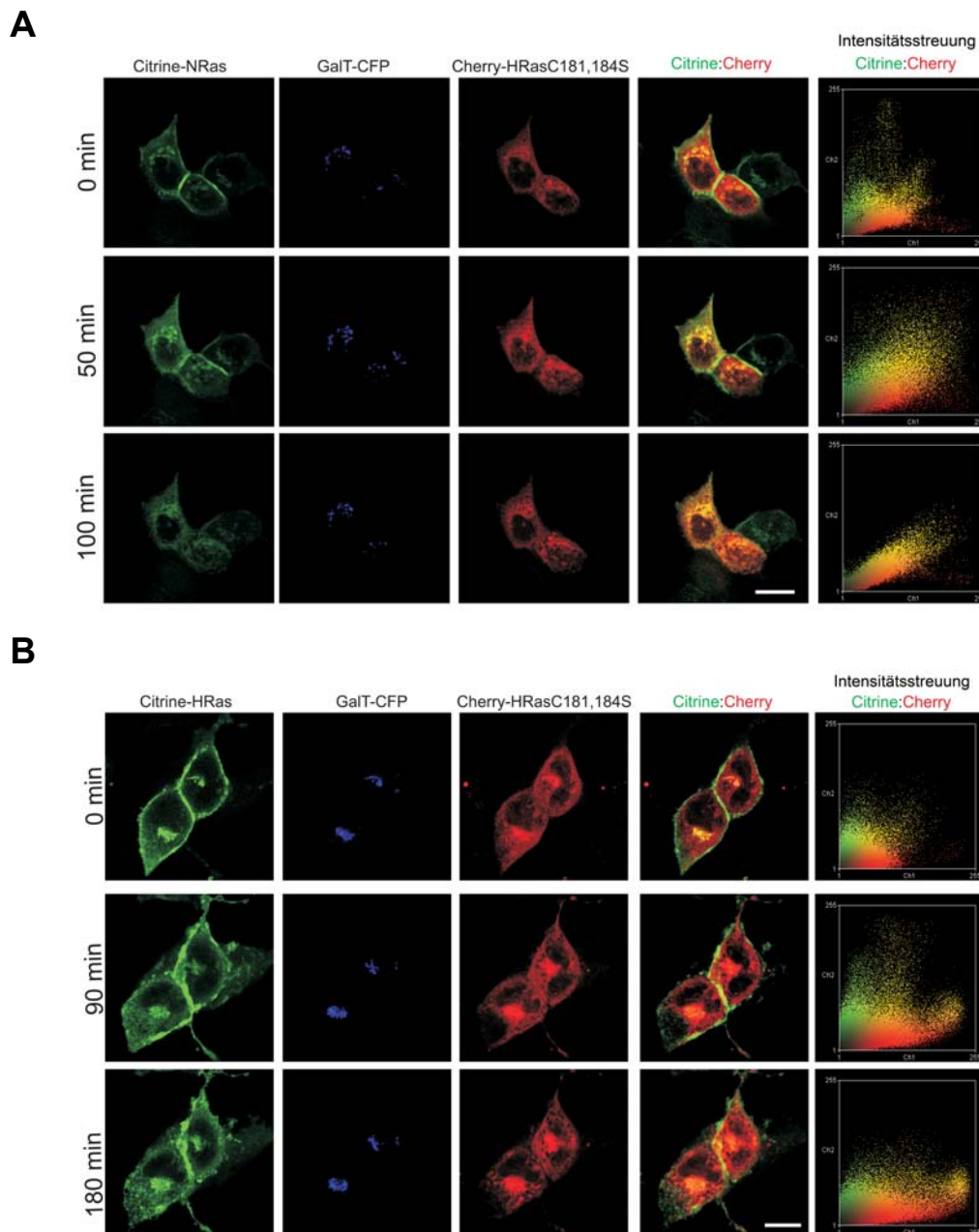


Abb. 51: Palmostatin B induziert eine Entropie-getriebene Umverteilung von plamitoylierten Ras-Isoformen. A) Repräsentatives Beispiel der unterschiedlichen Verteilung von Citrin-N-Ras nach Behandlung von MDCK Zellen mit Palmostatin B ($1 \mu\text{M}$) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Diese Verteilung wurde in Anwesenheit des Golgi-Markers GalT-CFP beobachtet und mit der Verteilung des nur farnesylierten Konstrukts Cherry-H-RasC181S,C184S verglichen. B) Repräsentatives Beispiel der unterschiedlichen Verteilung von Citrine-H-Ras nach Behandlung von MDCK Zellen mit Palmostatin B ($10 \mu\text{M}$) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Diese Verteilung wurde ebenfalls in Anwesenheit des Golgi-Markers GalT-CFP beobachtet und mit der Verteilung des nur farnesylierten Konstrukts Cherry-H-RasC181S,C184S verglichen. Die Beschriftung über den einzelnen Reihen bezeichnet das jeweils beobachtete Konstrukt. Die letzten beiden Reihen zeigen die Überlagerung der Färbungen sowie die Intensitäts-Verteilungs-Plots die die Zunahme der Kolo-kalisation demonstrieren. Meßbalken: $10 \mu\text{m}$.

Daher wurde untersucht, inwieweit sich die Störung der dynamischen Lokalisation durch Palmostatin B auf die Regulierung des räumlichen Aktivierungsstatus von Wildtyp-H-Ras und auf die Signalweiterleitung von onkogenem H-RasG12V auswirkt. Ersteres wurde von Dr. Oliver Rocks fluoreszenzmikroskopisch durch Beobachtung der Translokation einer Cherry-markierten Raf-Binde-Domäne (Cherry-RBD) zu Citrine-markiertem H-Ras nach EGF-Stimulation untersucht. Eine EGF-Stimulation führt normalerweise zu einer raschen aber transienten Aktivierung von H-Ras an der Plasmamembran und zu einer verzögerten aber lang anhaltenden Aktivierung am Golgi-Apparat.^[86, 102] In Anwesenheit von Palmostatin B führte die Stimulation mit EGF zu einer transienten Aktivierung von H-Ras an der Plasmamembran, wohingegen keine H-Ras Aktivität am Golgi Apparat detektiert wurde (siehe Abb. 52).

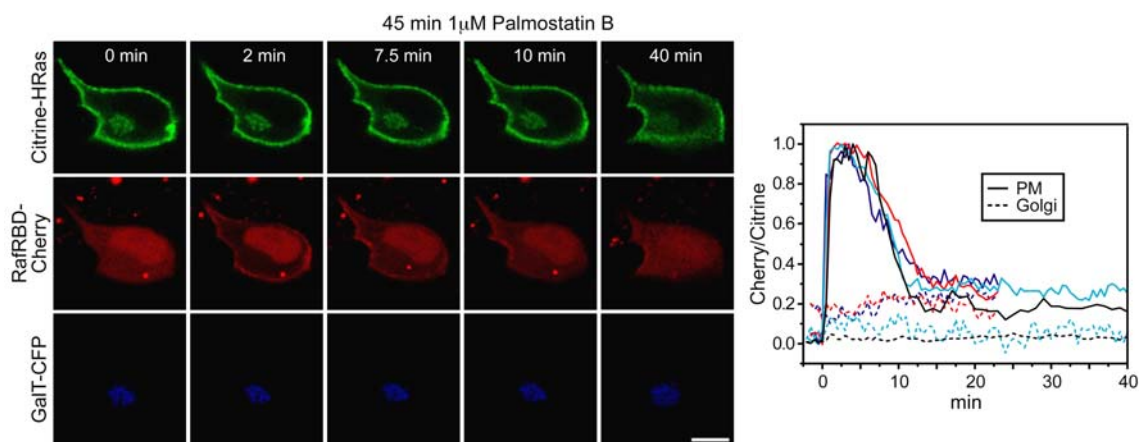


Abb. 52: Verändertes Aktivitätsprofil von H-Ras nach Behandlung mit Palmostatin B
Behandlung. Links: Zeitablauf der Membrantranslokation von RafRBD-Cherry zu Citrine-H-Ras nach EGF-Stimulation in Anwesenheit von Palmostatin B ($1 \mu\text{M}$). Die Aufnahmen wurden in MDCK Zellen aufgenommen, welche GalT-CFP koexprimieren und für 45 min mit Palmostatin preinkubiert waren. Maßbalken $10 \mu\text{m}$. **Rechts:** Ratiometrische Quantifizierung der Translokation von RafRBD-Cherry zur Plasmamembran (durchgehende Linien) und zu Golgi-Apparat (gestrichelte Linien) in Anwesenheit von Palmostatin B. Hierbei wurden die jeweiligen lokalen Intensitäten von Citrine-H-Ras als Referenz verwendet. Die maximalen Werte für die Translokation zur Plasmamembran wurden auf den Wert 1 normalisiert und anhand dieser Normalisierung, die Werte der Translokation zum Golgi-Apparat berechnet.

Um zu untersuchen, ob die durch Palmostatin B induzierte Delokalisation von H-Ras zu einer Reduktion der Signalweiterleitung führt, wurden MDCK-F3 Zellen mit Palmostatin B bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ über Nacht inkubiert. Hierbei wurde untersucht, ob die Behandlung mit Palmostatin B zu einer Aufhebung des transformierten Phänotyps führt, welcher hier zusätzlich zur äußeren Erscheinung

anhand der Expression von E-Cadherin an der Zelloberfläche beobachtet wurde. Die erhaltenen Phänotypen wurden mit DMSO-behandelten MDCK-F3 Zellen, mit U0126- (20 μM) behandelten MDCK-F3 Zellen und untransformierten MDCK-Zellen verglichen (siehe Abb. 53). Es konnte beobachtet werden, dass die Behandlung mit Palmostatin B den transformierten Phänotyp der entsprechenden MDCK-F3 Zellen aufhob. Dies zeigte sich durch eine runde Zellform, das Aneinanderwachsen der Zellen in einer Schicht und somit der Wiederherstellung von Kontaktinhibition durch Expression von E-Cadherin an der Zelloberfläche.^[175] Diese Charakteristika waren mit denen der mit U0126 behandelten sowie mit untransformierten MDCK Zellen vergleichbar.

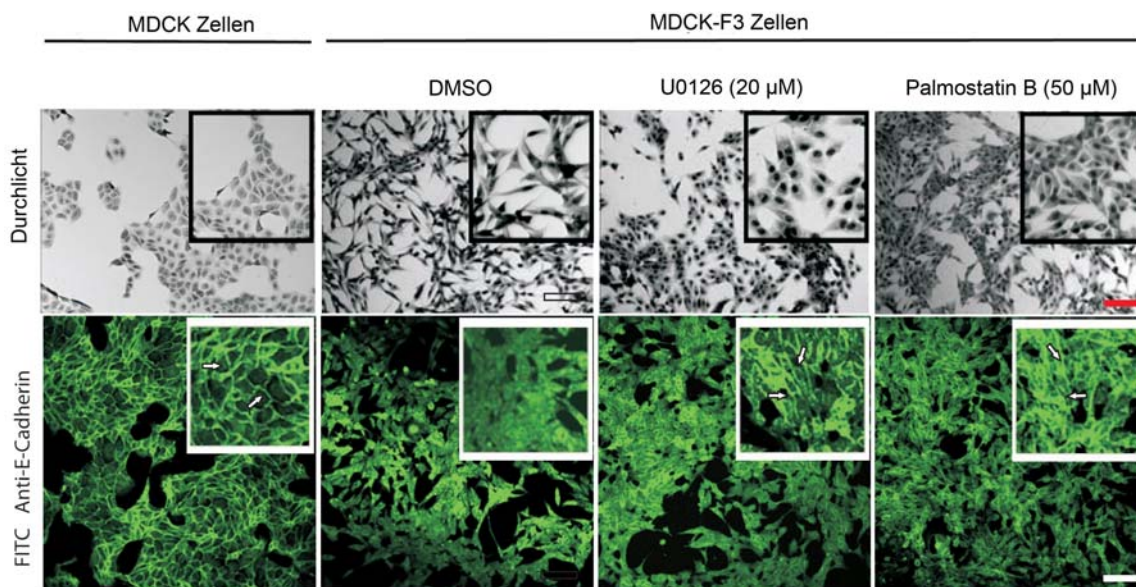


Abb. 53: Palmostatin B induzierte Rücktransformation von MDCK-F3 Zellen. MDCK-F3 Zellen zeigen nach Behandlung mit Palmostatin B (50 μM) über Nacht einen mit MDCK Zellen und mit U0126 (20 μM) behandelten MDCK-F3 Zellen vergleichbaren Phänotyp. In der oberen Reihe sind entsprechende Durchlichtbilder gezeigt. In der unteren Reihe ist der Phänotyp der Zellen nach Immunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin gezeigt. Außer in mit DMSO behandelten MDCK-F3 Zellen ist eine deutliche Expression von E-Cadherin an den Zell-Zell-Kontakten zu erkennen (Pfeile). Messbalken 40 μm

Um zu überprüfen, ob diese Aufhebung des transformierten Phänotyps mit einer verminderten Signalweiterleitung in Effektorsignalwege, wie dem Raf-MEK-ERK1/2 Signalweg einhergeht, wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 in Palmostatin B behandelten MDCK-F3 Zellen zeitabhängig untersucht (siehe Abb. 54).

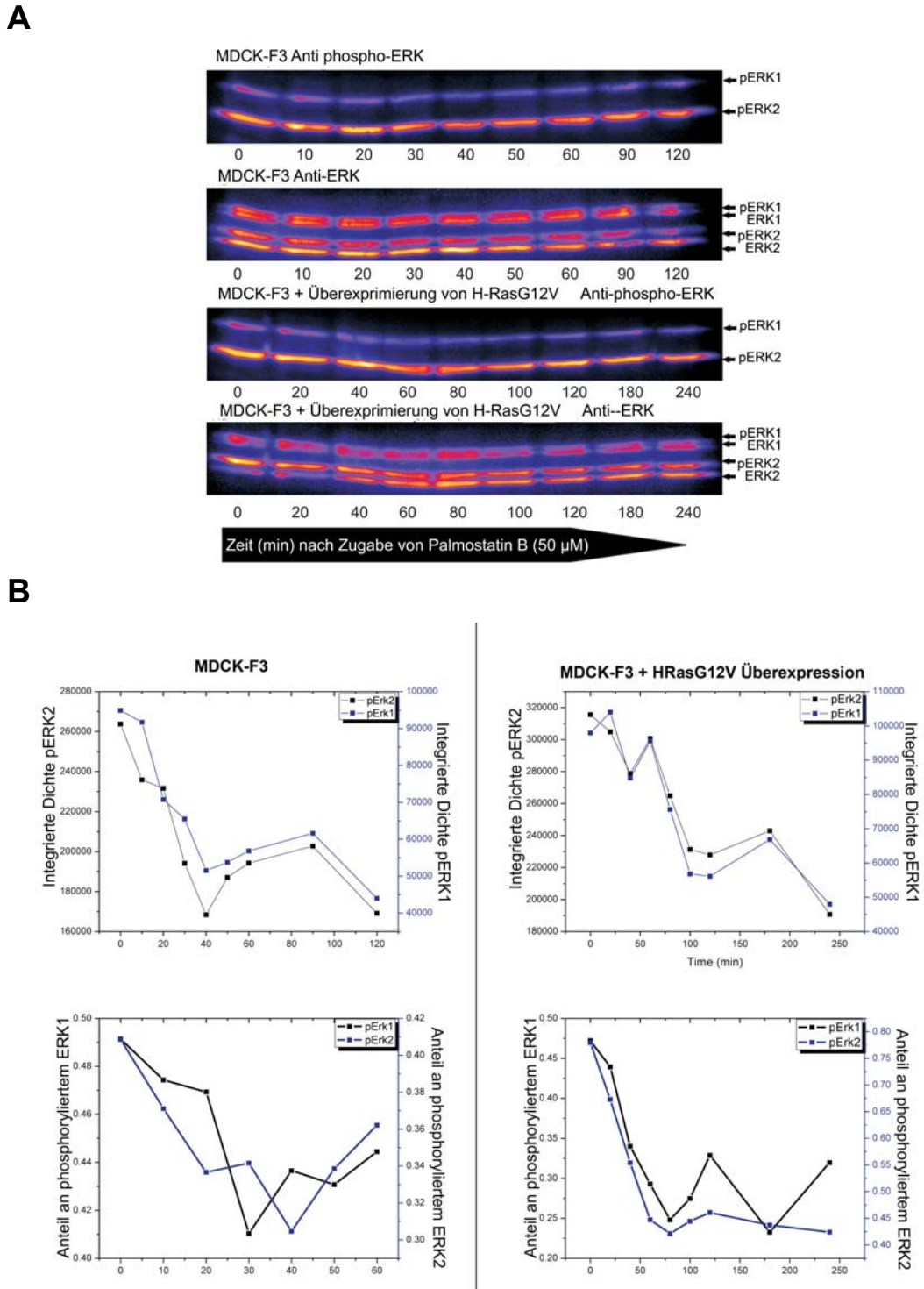


Abb. 54: Untersuchung der ERK1/2-Phosphorylierung in MDCK-F3 Zellen nach Behandlung mit Palmostatin B (50 μ M). **A)** Western Blots der Zellysate von MDCK-F3 Zellen und von MDCK-F3 Zellen, welche zusätzlich H-RasG12V überexprimieren nach Behandlung mit Palmostatin B (50 μ M). Phosphoryliertes ERK wurde entweder durch Färbung mit einem Anti-Phospho-ERK Antikörper oder durch einen Gel-Shift bei der Färbung mit einem Anti-ERK Antikörper detektiert. **B)** Quantitative Auswertung der Färbungsdichte der phosphorylierten ERK-Isoformen (oben) und ratiometrische Berechnung des Anteils an phosphoryliertem ERK im Verhältnis zum Gesamtanteil im selben Wester Blot (unten).

Die Signalweiterleitung über diese Signalkaskade geht sowohl von der Plasmamembran, als auch vom Golgi Apparat aus.^[102] Die Behandlung mit Palmostatin B führte innerhalb von 40 Minuten zu einer Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich mit DMSO behandelten Zellen (siehe Abb. 54). Darüber hinaus führte die Überexpression von H-RasG12V zu einer Verstärkung der ERK1/2-Phosphorylierung und verlängerte die Zeitspanne, in der nach Behandlung mit Palmostatin B ein Rückgang der ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet werden konnte um mehr als das Doppelte (siehe Abb. 54).

Bisher konnte die Inhibition der Deacylierung durch Palmostatin B nur direkt *in vitro* oder indirekt aufgrund der Delokalisation der betrachteten Ras Isoformen *in vivo* nachgewiesen werden. Um zu zeigen, dass die delokalisierten Ras Isoformen tatsächlich erhöht palmitoyliert sind, wurde in MDCK Zellen YFP markiertes N-Ras exprimiert. Die Zellen wurden daraufhin mit Palmostatin B bei einer Konzentration von 30 μM , mit 2-Bromopalmitat bei einer Konzentration von 50 μM oder einer entsprechenden Menge an DMSO für 1h behandelt. Anschließend wurde das YFP-N-Ras mittels Immunopräzipitation isoliert. Mit Hilfe der Acyl-Austauschmethode^[176] wurde der Anteil an palmitoyliertem YFP-N-Ras in Relation zum gesamten isolierten YFP-N-Ras für die jeweiligen Proben quantitativ bestimmt. (siehe Abb. 55 A und B). Es zeigte sich, dass der Anteil an palmitoyliertem YFP-N-Ras in den mit Palmostatin B behandelten Proben signifikant höher im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen war (siehe Abb. 55 A und C). Demgegenüber war der Anteil von palmitoyliertem YFP-N-Ras in den Lysaten von Zellen, welche mit 2-Bromopalmitat behandelt wurden geringer als in der DMSO Kontrolle (siehe Abb. 55 B und C).

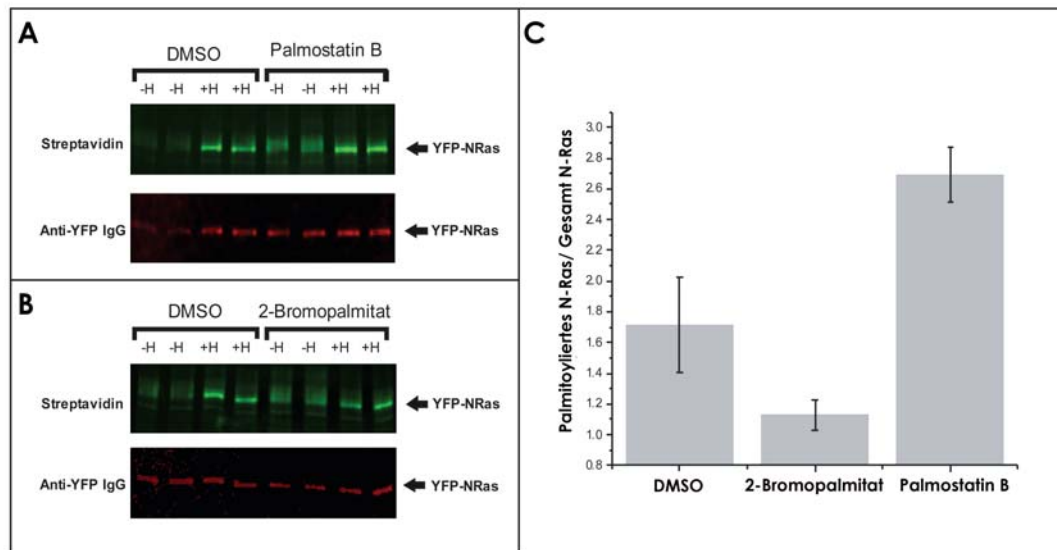


Abb. 55: Die Inhibition von APT1 durch Palmostatin B erhöht den Anteil von palmitoyliertem N-Ras in lebenden Zellen. **A)** Der Anteil von stationär palmitoyliertem YFP-N-Ras bei Behandlung der Zellen mit Palmostatin B, wurde mit Hilfe der Acyl-Austausch-Methode an immunopräzipitiertem YFP-N-Ras detektiert. Die grünen Banden der Detektion mit fluoreszentem Streptavidin geben den Anteil an palmitoyliertem YFP-N-Ras an. Die roten Banden der Detektion mit einem fluoreszentem Anti-YFP-Antikörper zeigen den Gesamtgehalt an immunopräzipitiertem YFP-N-Ras an. Plus H und minus H bedeutet Behandlung oder Nichtbehandlung der jeweiligen Probe mit Hydroxylamin. **B)** wie in A, Blot der mit 2-Bromopalmitat bzw. DMSO behandelten Zellen. **C)** Quantifizierung des Anteils an palmitoyliertem YFP-N-Ras von Zellen, die mit jeweils mit DMSO, Palmostatin B oder 2-Bromopalmitat behandelt wurden. Die Behandlung mit Palmostatin B erhöht den Anteil an palmitoyliertem YFP-N-Ras in den Zellen, wohingegen die Behandlung mit 2-Bromopalmitat den Anteil im Vergleich zur DMSO Kontrolle senkt. Ergebnisse resultieren aus vier unabhängigen Experimenten.

Hierdurch konnte direkt bewiesen werden, dass die Behandlung mit Palmostatin B *in vivo* tatsächlich zu einer höheren Palmitoylierung der Ras-Proteine führt, welche sich daraufhin in diesem Zustand über die Endomembranen verteilen. Somit wurde die depalmitoylierende Funktion von APT1 *in vivo* gezeigt und ihre biologische Relevanz für den Ras-Zyklus und die damit zusammenhängende Signalweiterleitung über aktives H-Ras durch die Verwendung von Palmostatin B verdeutlicht.

7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von zellulären Testsystemen zur Identifikation von niedermolekularen Substanzen, welche auf pharmakologisch interessante biologische Prozesse wirken. Im Mittelpunkt standen hierbei vor allem Ras-abhängige Signaltransduktionswege und zudem Prozesse, die in Verbindung mit der Dynamik von Cytoskelettelementen stehen. Wie in Abschnitt 2 beschrieben, sind diese Vorgänge von besonderem Interesse bei der Krebstherapie, da sie in direktem Zusammenhang mit den typischen Charakteristika von transformierten Zellen stehen. Krebszellen weisen sich durch ein von äußeren Faktoren unabhängiges und unlimitiertes Wachstum, die Unempfindlichkeit gegen wachstumsinhibierende Signale, dem Entgehen der Apoptose, anhaltende Angiogenese, Invasivität und Metastasenbildung aus.^[177] Durch die Etablierung der in dieser Arbeit vorgestellten Testsysteme wurde die Möglichkeit geschaffen, in der abteilungseigenen Substanzbibliothek Strukturklassen zu identifizieren, die eine entsprechende Wirkung auf wichtige Komponenten dieser Prozesse ausüben. Nach einer genaueren biologischen Evaluierung könnten sie dadurch als Ausgangspunkte für die Synthese von weiteren aktiven niedermolekularen Substanzen dienen, welche in ihrer Wirkungsweise und/oder Spezifität erhöht sind. Darüber hinaus könnten sie als neue molekulare Sonden zur Erforschung der jeweiligen Prozesse dienen. Im Folgenden sollen daher die Eigenschaften, Verwendbarkeit und der Informationsgehalt der einzelnen Testsysteme sowie mögliche Wirkungsweisen der mit ihnen identifizierten Substanzen diskutiert werden. Darüber hinaus werden die im Kontext des rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes gewonnenen Informationen zur biologischen Funktion von APT1 näher betrachtet.

7.1 *Der Pathdetect-Reportergen Assay*

7.1.1 Eigenschaften

Die HLR-ELK1 Reportergen Zelllinie wurde verwendet, um die durch EGF induzierte Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade, welche unter anderem zu der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK-1 führt, zu untersuchen. Sowohl die EGF-Rezeptor-Familie, die ihnen nachgeschaltete Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade, als auch der Transkriptionsfaktor ELK1 gehören mit zu den am besten untersuchten Komponenten von Signalübertragungsprozessen.^[178-180] Die Zelllinie erschien deshalb geeignet, um interessante Wirkungsweisen der mit ihr getesteten Substanzklassen zu identifizieren. Darüber hinaus stellen die in der Literatur reichlich vorhandenen Informationen eine günstige Ausgangsbasis für die folgenden biologischen Evaluierungen dar.

Die Zelllinie wurde zunächst darauf hin getestet, inwieweit aufgrund von externen Stimulationen eine Erhöhung des Reporter Signals erfolgt. Hierbei wurden die Zellen in 3,5 cm Schalen behandelt, wodurch genug Lysat für eine erste Herangehensweise an die einzelnen Arbeitsschritte zur Verfügung stand. Basierend auf Arbeiten von von Kelemen et al. ^[139], welche unter Verwendung der HLR-ELK1 Zelllinie die Inhibition des Reporter Signals durch kleine Peptidfragmente untersuchten, zeigte sich, dass bei Stimulation der Zellen mit PMA und EGF für 2 h ähnliche Signalintensitäten erzielt wurden. Die Stimulation mit EGF allein führte allerdings nur zu einer fünffachen Erhöhung des Luciferasesignals verglichen mit dem Hintergrundwert. Diese Erhöhung erschien in Anbetracht des Vorhabens, diesen Assay in einem 96-Loch-Platten-Format zu etablieren, als zu gering um einen ausreichend hohen Z'-Faktor zu erhalten. Die 13- bis 31-fache Verstärkung des Signals bei gleichzeitiger Stimulation mit PMA und EGF lieferte hingegen einen ausreichend großen dynamischen Bereich zwischen Aktivierungs- und Hintergrundsignal. Dennoch sollte zwecks Verringerung der Komplexität der betrachteten Signalprozesse, bei diesem Assay auf eine synergistische Aktivierung verzichtet werden. Hierzu erscheint es sinnvoll, den Einfluss von PMA auf den dem Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg genauer zu betrachten.

Der Phorbol ester PMA aktiviert Mitglieder der Proteinkinase C (PKC) Familie, indem er mit hoher Affinität an die Bindestelle für den endogenen Aktivator Diacylglycerol (DAG) bindet und so zu einer dauerhaften Aktivierung führt.^[181, 182] Die Proteinkinase C-Familie besteht aus mindestens 12 Serin-Threonin Kinasen, welche in drei Hauptgruppen unterteilt sind: klassische (α , β und γ), neue (δ , ϵ , η und θ) und untypische (μ , ξ und ι).^[183, 184] Die Aktivierung erfolgt bei den klassischen Enzymen durch Ca^{2+} und DAG und bei den neuen Enzymen durch DAG. Demgegenüber werden die untypischen Enzyme unabhängig von Ca^{2+} und DAG, wahrscheinlich von anderen PKCs aktiviert.^[185-188] Es wurde schon früh deutlich, dass die Aktivierung von PKC eng mit der Aktivierung der MAPK Kaskade in Verbindung steht. So wurde sowohl die Aktivierung von PKC durch die Stimulation mit EGF ^[189], als auch die Aktivierung von ERK durch Behandlung mit Phorbol estern gezeigt ^[190, 191]. Die Aktivierung von PKC bei EGF-Stimulation erfolgt über die EGFR gesteuerte Aktivierung der Phospholipase C γ .^[192, 193] Dies führt zu einer Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und DAG. Hierbei führt IP_3 zu einer Freisetzung von Ca^{2+} und potenziert so die Aktivierung von klassischen PKCs.^[185] Die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Signalkaskade durch PMA erfolgt zum Teil auch über die Aktivierung der PKCs. Hierbei scheint Raf eine bedeutende Rolle zu spielen. Raf kann durch RKIP (*Raf kinase inhibitor protein*)

inhibiert werden, welches so die Signalweiterleitung negativ reguliert.^[194] Aktivierte PKCs phosphorylieren RKIP an S153, was zu einer Dissoziation von RKIP von Raf führt und dadurch die Signalweiterleitung zu MEK aktiviert.^[195] Zusätzlich existiert noch eine weitere modulierende Verbindung zwischen diesen beiden Signalwegen. ERK kann die Phospholipase A2 aktivieren, was zu einer Produktion von Arachidonsäure (AA) führt.^[196] Diese aktiviert synergistisch mit DAG die PKC, was auf diese Weise zu einer positiven Rückkopplung führt.^[185, 197] Offensichtlich erfolgt die Signalweiterleitung nicht streng linear, sondern sie wird über andere Signalwege vernetzt und durch Rückkopplungsschleifen zusätzlich moduliert. Um die Eigenheiten dieses Netzwerks besser zu verstehen werden von manchen Forschungsgruppen *in silico* Analysen mit allen bekannten Komponenten und Interaktionen durchgeführt und mit experimentellen Daten verglichen. Für die Vernetzung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges mit dem PKC Signalweg haben Bhalla und Iyengar ein Modell erstellt und konnten mit diesem die Dynamik des Systems genauer untersuchen.^[198] Die Reaktion des Systems auf die Menge und Dauer des EGF Stimulus deckte sich mit denen von Laborexperimenten und scheint daher das *in vivo* System gut abzubilden. Das verwendete Modell ist in Abb. 56 dargestellt. Ein solches System gewinnt durch seine Vernetzung und Rückkopplungen die Eigenschaft, Informationen zu verrechnen. So kann es zwischen zwei stationären Zuständen hin und her wechseln, sobald bestimmte Grenzwerte über- oder unterschritten wurden. Man nennt es daher auch ein bistabiles System. Bei dem gezeigten Modell wurde festgestellt, dass die Kinasen PKC und MAPK (ERK) bei schwacher und kurzer Aktivierung mit EGF sofort nach Wegnahme des Stimulus wieder in den inaktiven Zustand zurückfielen. Erst durch Verstärkung und Verlängerung der EGF Stimulation verbleiben die Kinasen auch nach Wegnahme der Stimulanz in ihren aktiven Zuständen.^[198] Diese Eigenschaften des Systems spielen bei der Generierung von unterschiedlichen Zellantworten auf die initialen Aktivierungen der betrachteten Signalkaskade eine entscheidende Rolle. In diesem Zusammenhang wurden die Phäochromocytomzellen (PC12-Zellen) der Ratte zu einem viel verwendeten Modellsystem um die Funktionalität der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade zu untersuchen. Diese Zellen differenzieren bei der Aktivierung mit NGF (*nerve growth factor*) und proliferieren bei der Aktivierung mit EGF.^[199] Die verschiedenen Zellantworten sind auf die unterschiedlichen Aktivitätsprofile nach der Stimulation mit dem entsprechenden Wachstumsfaktor zurückzuführen.

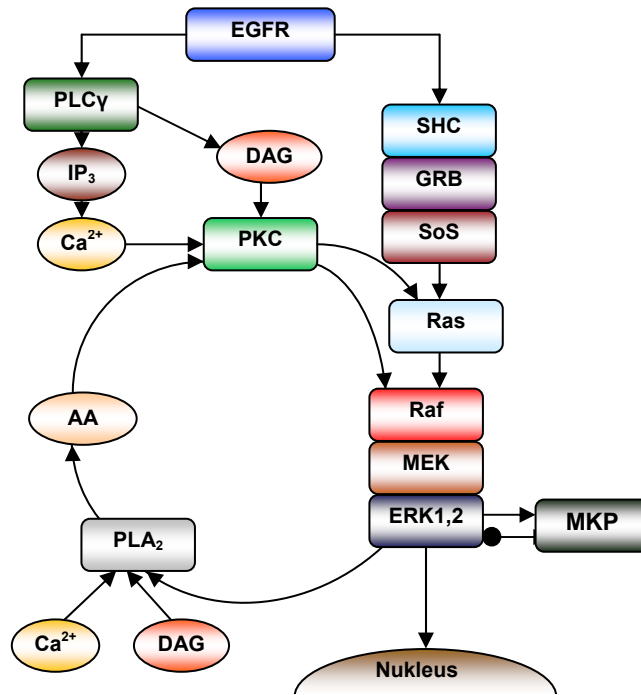


Abb. 56: (nach Bhalla und Iyengar 1999)^[198]: *Modell der EGFR Signalwege für in silico Untersuchungen zur Charakterisierung von Systemeigenschaften.* Enzyme sind rechteckig und Signalmoleküle kreisförmig dargestellt. Die dargestellten Pfeile zeigen aktivierende Verbindungen und der schwarze Punkt eine inhibierende Verbindung, welche von der MAPK-Phosphatase (MKP) ausgeht.

EGF führt hierbei nur zu einer transienten Aktivierung der Signalkaskade, wohingegen NGF zu einer langanhaltenden Aktivierung führt.^[199] Hierdurch wird offensichtlich wie wichtig die Feinmodulation bei der Betrachtung von Signalweiterleitungsprozessen ist. Die tatsächliche Komplexität übertrifft das hier dargestellte System bei weitem und dessen Darstellung würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Es genügt aber, um das mit dem Reporter-gen Assay betrachtete System näher zu charakterisieren und den Einfluss der gleichzeitigen Stimulation mit EGF und PMA zu skizzieren. Hierbei wird das System in einen verlängert anhaltenden aktivierten Zustand versetzt, bei dem vor allem der Einfluss der aktiven PKC Enzyme auf die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade hervortritt. Darüber hinaus existieren neben PKC noch weitere Proteine, die durch DAG bzw. PMA aktiviert werden. Hierunter auch die Proteinfamilie der RasGRPs, welche Ras aktivieren und wahrscheinlich hauptsächlich für die im Modell gezeigte DAG abhängige Aktivierung von Ras verantwortlich sind.^[200] Die Aktivierung mit PMA führt somit zu einer konstitutiven Aktivierung von vielen anderen Substraten, wodurch das eigentliche durch EGF induzierte Signal erheblich beeinflusst werden kann. Es wurde zudem berichtet, dass die Langzeitbehandlung mit Phorbolestern auch zu einer verstärkten Herunterregulation der PKCs führt.^[201] Die Herunterregulation hat in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Kinetiken^[202] und

wurde für die HLR-ELK1 Zelllinie in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Das erhaltene starke Signal bei Behandlung mit PMA+EGF deutet noch nicht auf eine Abschwächung in dem beobachteten Zeitraum hin. Dennoch wird offensichtlich, dass die Behandlung der Zellen mit PMA zu weitreichenden Effekten in der Signalverarbeitung führt, welche den Fokus auf die durch EGF aktivierte Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade erschweren. Zudem wird durch die starke Aktivierung die Identifikation von aktivierenden Substanzen schwer möglich. Letztere sind in Anbetracht des chemisch-genetischen Ansatzes zur Untersuchung der hier beobachteten Prozesse von gleichem Interesse, wie mögliche Inhibitoren. Daher wurde durch eine Erhöhung der EGF Konzentration und eine längere Inkubationszeit der Zellen nach Stimulation mit EGF die Signalstärke in dem Maße erhöht, dass die Detektion von aktivierenden Eigenschaften noch möglich war. Dies erlaubte die Untersuchung der Substanzen in dem angestrebten Rahmen.

Die leichte Verstärkung des Signals bei einer Erhöhung der EGF Konzentration von 100 ng/ml auf 200 ng/ml stellt eine interessante Beobachtung dar, welche im engen Zusammenhang zu weiteren Eigenschaften des untersuchten Systems steht. Diese kann nicht nur durch die Verwendung von Medium mit 10 % FCS erklärt werden, da hiermit kaum eine Verstärkung des Signals erreicht wurde. Es gibt Untersuchungen hinsichtlich der Modulation der Signalweiterleitung in Abhängigkeit von ansteigenden EGF-Konzentrationen. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass die Dauer und Stärke des Signals auch auf der Ebene des EGF-Rezeptors kontrolliert wird. Nach Ligandenbindung wird der Rezeptor verstärkt internalisiert und im weiteren Verlauf über Endosomen zu den Lysosomen transportiert, wo er abgebaut wird. Darüber hinaus existiert noch ein Recycling Prozess, der die Rezeptoren wieder an die Plasmamembran führt.^[203] Dieser Prozess ist komplex moduliert, wobei die Ubiquitin Ligase c-Cbl eine bedeutende Rolle spielt.^[203] Der Rezeptor kann alternativ durch eine Polyubiquitinierung über das 26S Proteasom abgebaut werden, welches zusätzlich komplex reguliert wird.^[203] Die Signalweiterleitung kann bis zur Degradation auch weiterhin von den Endosomen aus erfolgen.^[101] Bei einem systembiologischen Ansatz zur Erforschung der Signalweiterleitung über EGF-Rezeptoren nach EGF Stimulation^[204], konnten an einem Computermodell folgende Beobachtungen in Abhängigkeit zu der EGF-Konzentration gemacht werden. Zum Einen ist die Aktivierung von Ras, MEK und ERK mit steigender EGF Konzentration stärker und schneller. Zum Anderen beinhaltet das System eine inherente Signalamplifikation, welche schon zu hohen Signalausbeuten bei niedrigen EGF Konzentrationen führt. Des Weiteren steigen die Aktivitäten bei Erhöhung der EGF Konzentration sowie die Phosphorylierung von MEK und ERK nicht proportional. Diese Eigenschaft wurde an

HeLa Zellen bestätigt, bei der die maximale Phosphorylierung von ERK durch Stimulation mit EGF bei einer Konzentration 50 ng/ml festgelegt wurde. Dieselbe Phosphorylierungsstärke wurde aber auch schon bei einer Konzentration von 0,5 ng/ml erreicht.^[204] Dieses spricht im Grunde gegen eine Erhöhung der EGF Konzentration um ein stärkeres Signal zu erhalten. Demgegenüber spielt die konzentrationsabhängige Geschwindigkeit, mit der ein initiales Maximum erreicht wird, eine wichtige Rolle für die Stärke des Reporterogensignals. In MCF-7 Zellen konnte eine verstärkte Induktion des *c-fos* Gens, welches in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung von ELK-1 steht, in Abhängigkeit zu der EGF Konzentration beobachtet werden.^[205] Der Prozess der Rezeptorinternalisierung ist daher für hohe EGF Konzentrationen zunächst irrelevant, da das Aktivitätsmaximum der Rezeptoren schon vor dem Beginn dieses Prozesses erreicht ist. Er ist vielmehr bei niedrigeren EGF Konzentrationen und für die Signalweiterleitung zu späteren Zeitpunkten von Bedeutung.^[206] Die veränderte Lokalisation steht auch im Zusammenhang mit einer Entkopplung von Effektorignalwegen. Die Aktivierung der PLC γ stoppt sofort nach Internalisation des Rezeptors.^[207] Bedenkt man den oben beschriebenen aktivierenden Einfluss dieser Lipase auf den Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg, könnte die schnelle und starke Aktivierung bei hoher EGF Konzentration sich hierdurch amplifizierend auf das Reportergensignal auswirken. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass auch über aktive PKCs das Rezeptorrecycling im Gegensatz zum Abbau gefördert wird, was eine weitere Komponente der Amplifikation ausmachen kann.^[208] Allerdings ist die leichte Erhöhung der Signalintensität bei 200 ng/ml EGF ein Anzeichen, dass mit dieser Konzentration das Maximum erreicht wurde. Man erkennt aber durch diese Betrachtungen, dass das erhaltene Reportergensignal das Ergebnis aus der Verrechnung von vielen unterschiedlichen Faktoren ist, welche die Dynamik des Systems zum Zeitpunkt der Untersuchung bestimmen.

Diesbezüglich ist auch die Betrachtung des Zielproteins des Reportergensystems von Bedeutung. Der ELK1 Transkriptionsfaktor gehört zur Unterfamilie der TCF's (*ternary complex transcription factors*) und besitzt strukturell verschiedene Domänen (siehe Abb. 57). Hierbei bildet die N-terminale A-Domäne die DNA-Bindedomäne. Die B-Domäne interagiert mit SRF (*serum response factor*) und das R-Motiv ist eine Repressor Domäne, welche die Aktivität der C-terminalen Aktivierungsdomäne abschwächt. Bei dem artifiziellen Reportergenkonstrukt sind die beschriebenen Domänen A, B und R nicht vorhanden. Hier sind nur die Domänen D, C und F an die GAL4 Bindedomäne fusioniert. Die D- und die F-Domäne bilden die Bindestellen für die MAP-Kinasen zu denen auch ERK1/2 gehört. Diese phosphorylieren bestimmte

Serine bzw. Threonine innerhalb der C-Domäne und aktivieren dadurch die Transkription des Reportergens.



Abb. 57: (Buchwalter et. al. 2004)^[178]: Struktur des ELK1 Transkriptionsfaktors. Die konservierten Domänen sind als farbliche Rechtecke dargestellt und die Positionen anhand der entsprechenden Aminosäurenummierungen angegeben. Die N-terminale A-Domäne (grau) ist die DNA-Bindedomäne. Die B-Domäne (gelb) dient zur Interaktion mit SRF und die R-Domäne (rot) ist eine Repressions-Domäne. Die C-terminale C-Domäne (grün) ist für die transkriptionelle Aktivierung verantwortlich und enthält Phosphorylierungsstellen für die MAP-Kinasen. Diese können an die Sequenzen der D- (blau) und F-Domäne (schwarz) binden.

Hier wird offensichtlich, dass ELK1 über weitere Signalwege, wie den JNK- und p38-Signalweg aktiviert werden kann (siehe Abb. 58). Bei letzterem wird zwar hauptsächlich die Aktivierung durch zellulären Stress verursacht^[209], dennoch gibt es auch Berichte bei denen die Aktivierung durch EGF erfolgt.^[210, 211]

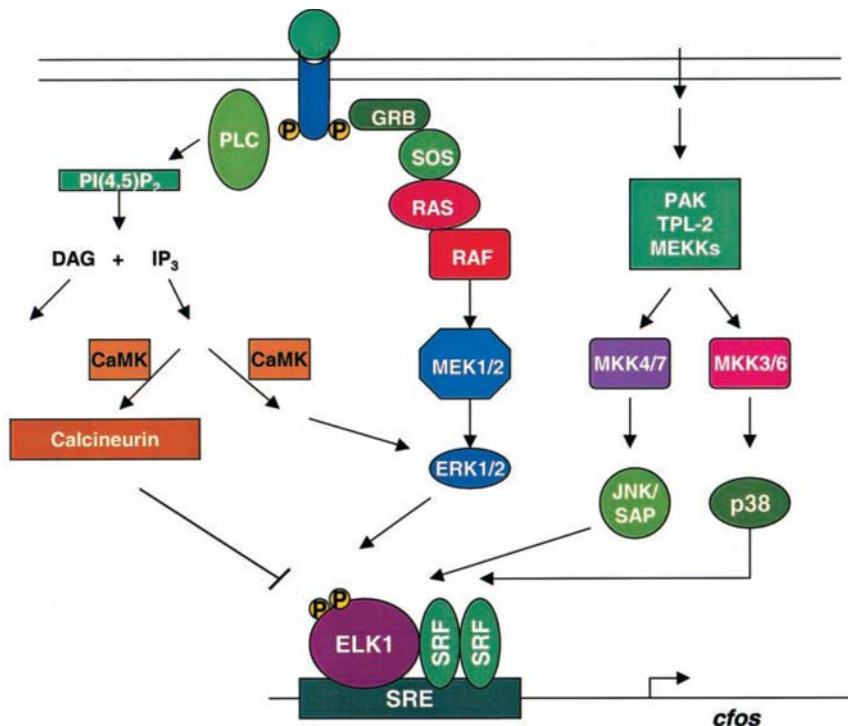


Abb. 58:(Yordy und Muise-Helmericks)^[212]: Schematische Darstellung von Signalwegen, welche die Aktivität von ELK1 kontrollieren. Aktivierung der Signalwege über ERK1/2, JNK/SAP und p38 führen zu einer positiven Regulierung von ELK1. Die Freisetzung von intrazellulären Ca^{2+} durch IP_3 führt einerseits zu einer Aktivierung von ERK1/2 und andererseits zu einer Inhibition von ELK1 über die Phosphatase Calcineurin.

In der gezeigten Abbildung ist zudem eine weitere positive Regulierung von ERK1/2 über die Aktivität von PLC aufgezeigt. Die genauen Mechanismen sind noch nicht ausreichend aufgeklärt, doch es gibt Hinweise auf eine Regulation über Ca^{2+} /Calmodulin Kinase (CaMK) welche oberhalb von ERK1/2 zu deren Aktivierung führt.^[213] Darüber hinaus sollten die gezeigten Signalwege nicht isoliert voneinander betrachtet werden, sondern es sollte von einer gegenseitigen Beeinflussung ausgegangen werden.^[209] Dadurch, dass in der Reporter-gen-Zelllinie im Fusionsprotein nur die D-, C- und F-Domäne vorhanden ist, wird das System nur durch die Aktivität der entsprechenden MAP-Kinasen und der Phosphatase Calcineurin^[214] reguliert. So wird das Reportergensystem auf der einen Seite tatsächlich auf die durch EGF induzierten Signalkaskaden fokussiert, es spiegelt auf der anderen Seite aber nicht die komplette Regulation des Wildtypproteins wieder. Aufgrund der dargestellten Komplexität der Signalverarbeitung wird mit diesem Assay aber schon ein weiter Bereich von wichtigen Prozessen erfasst. Zudem wird durch die Verwendung des GAL4-Systems der Signalhintergrund beträchtlich minimiert, weil dieser Transkriptionsfaktor nicht natürlich in Säugerzellen exprimiert wird.

Bei der Verwendung des Inhibitors Tyrphostin 47 als Positivkontrolle des Reportergensystems, konnte eine sehr gut reproduzierbare Inhibition des Reportergensignals festgestellt werden. Dennoch wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen der spezifischere MEK Inhibitor U0126 verwendet, welcher im Vergleich viel potenter die Signalweiterleitung inhibierte und in seiner Wirkungsweise auch deutlicher charakterisiert ist.^[215] Die Wirkungsweise von Tyrphostin 47 ist noch nicht ausreichend geklärt. So wurde ein inhibitorischer Effekt erst nach einer Inkubationszeit von 16 h festgestellt^[143], obwohl beobachtet wurde, dass der Inhibitor schon nach einer Stunde in den Zellen akkumuliert.^[216] Nach kurzen Inkubationszeiten konnte sogar eine Aktivierung von ERK festgestellt werden.^[217, 218] Daher eignete sich dieser Inhibitor nicht als Kontrolle für weiterführende Untersuchungen von Substanzen, welche in dem Reporter-gen-Assay eine Wirkung zeigten.

Die erfolgreiche Miniaturisierung des Systems auf ein 96-Loch-Platten Format erlaubte es bis zu 21 Substanzen pro Platte zu testen. Die hierfür notwendigen Arbeitsschritte machten eine Automatisierung mit den zur Verfügung stehenden Mitteln schwer möglich, so dass dieser Assay manuell durchgeführt werden musste. Dies kann unter Umständen eine erhöhte Anfälligkeit für Fehler bedeuten. Dennoch war der beschriebene relative Fehler der Signale innerhalb einer Platte niedriger als 10 % und die erhaltenen Z'-Faktoren lagen fast immer im gewünschten Bereich. Der Assay konnte daher unter den etablierten Bedingungen zur Untersuchung von Substanzen erfolgreich verwendet werden. Auf die durchgeführten Substanztests und

weitere biologische Evaluierungen der gefundenen Hits soll im Folgenden näher eingegangen werden.

7.1.2 Substanztest mit dem Reporter-gen Assay und erste biologische Evaluierung der gefundenen Hits.

Bei dem initialen Screen von 30 verschiedenen Substanzen zeigte das Tetrahydropyran TV-BNU-51-BO bei einer Konzentration von 30 μM die stärkste Inhibition des Reporter-gensignals ohne dabei cytotoxisch zu wirken. Daraufhin wurde die gesamte Bibliothek der zu diesem Zeitpunkt synthetisierten Tetrahydropyrane bei einer Konzentration von 10 μM mit dem Reporter-gen Assay getestet. Hierbei sollten Derivate gefunden werden, welche im Vergleich zu TV-BNU-51-BO eine erhöhte Aktivität besitzen. Von allen getesteten Substanzen inhibierten 41 das Reporter-gensignal um mehr als 50 %. Durch weiterführende Tests im Reporter-gen- und WST-1 Assay unter Verwendung von geringeren Konzentrationen, konnten sieben Substanzen identifiziert werden, welche die stärksten Inhibierungs- und Vitalitätsprofile zeigten. Allerdings wurde hierbei auffällig, dass die stärksten Inhibitoren in den WST-Tests auch zu einer Abnahme der Vitalität führten. Es war bei dem initialen Screen die Substanz AN144q aufgefallen, bei der die Vitalität über einen weiten Konzentrationsbereich konstant blieb, obwohl sie nur etwa 60 % der Vitalität der DMSO Kontrolle aufzeigte. Da bei dem MTT- bzw. WST-1 Test die Anzahl der lebenden Zellen indirekt bestimmt wird, könnte diese Substanz einen cytostatischen Effekt bewirkt haben. Auch bei den identifizierten Tetrahydropyranen konnten ausser bei TV_AMS in einem MTT-Test ab einer bestimmten Konzentration keine weiteren proportionalen Abnahmen der Vitalität beobachtet werden (siehe Anhang). Bei diesem Test wurden die Substanzen bis zu einer Konzentration von 100 μM untersucht. Nur die Substanz TV_AMS bewirkte einen Verlust der Zellvitalität in Abhängigkeit der Konzentration und wirkt somit ab 30 μM cytotoxisch. Es wurde daher zunächst vermutet, dass durch die Korrelation der betrachteten Signalwege mit der Proliferation von Zellen^[219] hier ein erster Hinweis auf eine Inhibition innerhalb der EGF aktivierten Signalkaskade gegeben war. Bei der Untersuchung der Substanzen auf MDCK-F3 Zellen induzierte aber keine der Substanzen eine Rücktransformation der Zellen. Somit scheinen sie nicht auf wichtige Schlüsselproteine innerhalb der durch H-Ras aktivierten Signalkaskade zu wirken, welche zu dem charakteristischen Phänotyp führt. Darüber hinaus konnte durch eine Westernblotanalyse gegen aktives ERK1/2 gezeigt werden, dass die Substanzen nicht direkt Proteine des RAF-MEK-ERK-Moduls inhibieren. Bei der Substanz TV_CAT konnte aber schon ab einer Konzentration von 2,5 μM bei MDCK- und MDCK-F3 Zellen ein Phänotyp identifiziert

werden, welcher typisch für Apoptose^[220] ist. Hierbei zeigten die Zellen fragmentierte Nuclei und Blasenbildungen der Membran. Aufgrund dieses Phänotyps wurden die sieben Tetrahydropyrane mit dem Apo-ONE[®] Assay, auf ihre apoptoseauslösenden Eigenschaften hin untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Substanzen TV_IGM, TV_AGM, TV_CAT und TV_HCM schon bei einer Konzentration von 10 μ M apoptotisch wirkten. Ausser für die Substanz TV_HCM steht dies in enger Verbindung mit den niedrigen Vitalitätswerten im WST-1 Test. Die Substanz TV_HCM zeigte aber auch bei einer Konzentration von 30 μ M eine schwächere apoptosefördernde Aktivität als bei 10 μ M und konnte im Rahmen dieser Messung nicht zufriedenstellend charakterisiert werden. Die Resultate des Apoptose-Tests deckten sich somit zum größten Teil mit denen des Vitalitätstest und scheinen damit die niedrigeren Vitalitätswerte zu erklären. Widersprüchlich zu den gemessenen apoptotischen Wirkungen der einzelnen Substanzen stehen die phänotypischen Untersuchungen an den MDCK-F3 und MDCK Zellen. Hier induzierte nur die Substanz TV_CAT in beiden Zelllinien den charakteristischen apoptotischen Phänotyp in gleichem Maße, wohingegen bei den übrigen Substanzen keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden konnten. Daher sollten im Hinblick auf eine weitere Charakterisierung der apoptosefördernden Eigenschaften dieser Substanzen weitere Untersuchungen unternommen werden. Die Substanz TV_CAT ist aber auch schon nach den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen der interessanteste Vertreter für eine Apoptose fördernde Substanz aus dieser Gruppe. So konnte nur bei ihr in allen durchgeführten Untersuchungen deutliche Hinweise auf diese Eigenschaft gefunden werden. Interessant sind diese Resultate auch im Hinblick auf die Eigenschaften des Reportergen-Assays. Die apoptosefördernde Wirkungsweise der Substanzen führte zu einer starken Inhibition des Reportergensignals ohne aber eine Inhibition der Aktivität der ELK1-phosphorylierenden Kinasen ERK1/2 zu bewirken. Die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade spielt bei der Regulation der Apoptose eine geteilte Rolle. So kann sie sowohl mit der Inhibition, als auch mit der Förderung der Apoptose in Verbindung gebracht werden.^[221, 222] Es ist aber wieder das komplexe Zusammenspiel von verschiedenen Signalwegen in dem jeweiligen zellulären Kontext, welche zu der letztendlichen Entscheidung führt, ob die Zelle in den programmierten Zelltod übergeht oder nicht.^[221, 222] In Bezug auf die Ras-abhängigen Signalwege konnten schon einige Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche von ihnen mehr pro- und welche eher antiapoptotisch wirken (siehe Abb. 59).^[221] Aufgrund der Tatsache, dass die aktiven Formen von ERK1/2 mit beiden Wirkungen in Zusammenhang gebracht werden können, ist ihre Aktivierung in Gegenwart der getesteten Tetrahydropyrane nach EGF Stimulation nicht als ungewöhnlich anzusehen.

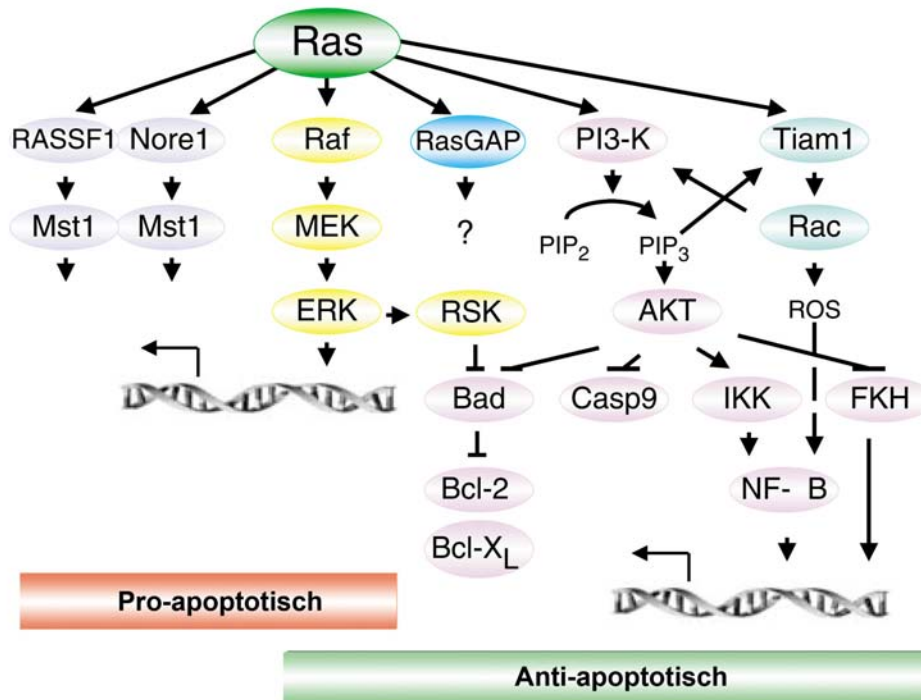


Abb. 59: (modifiziert nach Cox und Der 2003)^[221]: **Pro- und anti-apoptische Effektorsignalwege von Ras.** Die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade kann zu einer pro- oder anti-apoptischen Zellantwort führen.

Nur ist die Abnahme des Reportersignals nicht durch eine verminderte Signalweiterleitung über die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade zu erklären. Das verminderte Signal erscheint eher das Resultat einer apoptotischen Wirkung zu sein, denn auch die zur Aktivierung von ELK1 führenden Signalwege über p38 und JNK/SAP haben eher Apoptose-fördernde Wirkungen.^[223]

Somit ist es wahrscheinlich, dass die Inhibition in späteren Ereignissen, wie z.B. der Transkription oder Translation, stattfindet. Tatsächlich wird die Proteinsynthese bei der Apoptose inhibiert.^[224] Dies wird vor allem durch die Spaltung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4G (eI4G) durch die Caspase 3 initiiert.^[224] Der eukaryotische Initiationsfaktor 4G ist bei der Bildung eines Translationskomplexes von Bedeutung. Seine Spaltung verhindert die Zusammenführung des Komplexes und somit den Start der Proteintranslation.^[224] Somit ist eine direkte Korrelation zwischen der im Apoptose-Assay gemessenen Aktivität der Caspase 3 zu den niedrigeren Reportersignalen gegeben. Es ist daher anzunehmen, dass die niedrigeren Reportersignale bei den apoptotisch wirkenden Substanzen, durch die beschriebene Translationshemmung und eine geringere Zellzahl in den jeweiligen Vertiefungen entstehen. Im Zusammenhang der Wirkungsweise der Substanz TV_CAT wurden bei den phänotypischen Untersuchungen von MDCK-Zellen auch vermehrt mitotische Zellen beobachtet. Es besteht daher die Möglichkeit, dass

TV_CAT durch einen mitotischen Arrest einen Übergang in den programmierten Zelltod herbeiführt. Daher sollte die Wirkungsweise dieser Substanz mit Hilfe von Live Cell Imaging mit synchronisierten Zellen oder durch eine FACS (*fluorescence activated cell sorting*) Analyse näher charakterisiert werden. Wie die Substanzen TV_AMS und TV_GGM eine Reduktion des Reportersignals bewirken kann nach vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig geklärt werden. Es sollte bei diesen Substanzen die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK1 sowie eine mögliche Inhibierung der Luciferase untersucht werden. Es gibt Hinweise, dass TV_AMS auch die Luciferase inhibiert (persönliche Mitteilung Dipl. Biol. Claas Gerding Reimers, Max-Planck Institut für molekulare Physiologie) und somit nicht in der angenommenen Stärke auf zelluläre Prozesse wirkt.

Zusammenfassend konnten durch den Screen der Tetrahydropyran-Bibliothek mit dem Reporter Assay und durch die beschriebenen Folgeuntersuchungen keine Kandidaten identifiziert werden, welche auf Komponenten der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade oder damit in direktem Zusammenhang stehende Prozesse wirken. Die Substanzen führten vielmehr aufgrund ihrer apoptotischen Wirkung zu der detektierten Inhibition. Für folgende Screens mit dem Reporter Assay wurde daher ein weiteres Kriterium für einen Hit eingeführt. Nur Substanzen, welche die Vitalität um nicht mehr als 20 % reduzieren wurden weiter untersucht. Hiermit sollte der Anteil an apoptotisch wirkenden Substanzen deutlich minimiert werden. Diese Beschränkung wurde aufgrund der beobachteten Vitalitätswerte mit den nicht oder nur schwach apoptotischen Substanzen TV_GGM und TV_AMS sowie mit dem MEK Inhibitor U0126 gewählt. Dieser zeigte in allen durchgeführten Untersuchungen nie Vitalitätswerte unter 80 %.

Dennoch zeigt der nachfolgend durchgeführte Screen einer ausgewählten Substanzbibliothek (siehe Abschnitt 6.9), dass in diesem Assay sehr viele Substanzen eine Wirkung zeigten, welche diese Kriterien erfüllten. Von diesen 24 Substanzen zeigten nur vier einen Effekt in MDCK-F3 Zellen wovon eine in BSC-1 Zellen einen leicht apoptotischen Phänotyp zeigte. Es ist daher anzunehmen, dass auch schwach apoptotische Substanzen zu einer sehr starken Inhibition des Reportersignals führen können. Darüber hinaus scheinen die beschriebenen zellulären Prozesse empfindlicher auf verschiedene Substanzwirkungen bei einer EGF-induzierten Aktivierung zu reagieren, als z.B. durch oncogenes H-Ras beim MDCK-F3 Assay. Für eine Fokussierung auf die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade ist der Assay daher im Hinblick auf den zu erreichenden Durchsatz, der aufzuwendenden Arbeit und der Sensibilität für unterschiedlichste Wirkungsweisen als Primärscreen nicht geeignet.

Dennoch eignet er sich hervorragend als Folgeassay und als quantitativer Assay zur Aktivitätsbestimmung von aktiven Substanzen einer Strukturklasse.

7.2 *Der MDCK-F3 Phänotyp Assay*

7.2.1 **Eigenschaften**

Die MDCK-F3 Zelllinie diente ursprünglich der Untersuchung von invasiven Eigenschaften in Abhängigkeit zur Expression von E-Cadherin.^[148] Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass untransformierte MDCK Zellen bei Behandlung mit Antikörpern gegen E-Cadherin eine vergleichbare Morphologie und Invasivität aufwiesen, wie die mit oncogenem Ras transformierten Zellen. Die transformierten Zellen, exprimierten ihrerseits kaum E-Cadherin an der Zelloberfläche, was dessen Relevanz für den observierten Phänotyp unterstrich.^[148] Diese Studie zeigte die hohe Bedeutung von E-Cadherin bei Bildung eines malignen Phänotyps auf, doch sind noch weitere Komponenten und die zugrunde liegenden Prozesse immer noch Gegenstand der derzeitigen Forschung.^[225] Die MDCK-F3 Zelllinie stellt daher aufgrund ihres charakteristischen Phänotyps ein geeignetes Modellsystem dar, um zelluläre Prozesse zu untersuchen, welche im Zusammenhang mit der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) stehen und durch onkogenes H-Ras induziert werden. EMT wird durch folgende Charakteristika definiert: (1) epitheliale Zellen erhalten einen fibroblastischen invasiven Phänotyp; (2) die Expression von epithel-spezifischen Proteinen (wie z.B. E-Cadherin) ist herunterreguliert und die von mesenchymalen Proteinen (wie z.B. Vimetin) wird induziert; (3) die extrazelluläre Matrix wird verdaut und die Zellen wandern durch sie hindurch.^[226] Diese Charakteristika sind neben der Tumorentwicklung auch bei der frühembryonalen Entwicklung, Gewebeumstrukturierungen und bei Wundheilungsprozessen zu beobachten und ihnen scheinen in allen Fällen ähnliche zelluläre Prozesse zugrundezuliegen.^[227, 228] Es ist nicht bekannt, ob die MDCK-F3 Zelllinie auch alle Charakteristika der EMT erfüllen, dennoch sind für das Screening von Substanzen, welche die relevanten Signalwege beeinflussen, die Charakteristika der Spindelform und des Zell-Zell-Kontaktes ausreichende Parameter. Im Zusammenhang mit der EMT wurden die zugrundeliegenden molekularen Prozesse für die Transformation durch onkogenes H-Ras am eingehendsten untersucht. Bei Modellen von Mausepithelzellen konnte der Einfluss der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade auf die EMT deutlich gezeigt werden. Die Zellen wurden mit oncogenen H-Ras-Konstrukten transfiziert, welche aber selektiv die Effektorsignalwege über Raf-MEK-ERK oder die PI3K Signalkaskade aktivierten.^[229, 230] Bei den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine stark erhöhte Raf-MEK-ERK Aktivität in Verbindung mit der durch TGF- β induzierten Signalweiterleitung grundlegend für die EMT ist.^[229] Durch die Verwendung eines MEK Inhibitors konnte auch in diesen Modellen die EMT verhindert

werden.^[229] Bei dem MDCK-F3 Phänotyp Assay konnte mit der Verwendung des MEK Inhibitors U0126 ebenfalls eine Reversion des Phänotyps beobachtet werden und diente daher als Positivkontrolle für die jeweiligen Screens. Diese vorgestellten Untersuchungen zeigen zudem, dass die MDCK-F3 Zelllinie, besonders sensibel für etwaige inhibitorische Wirkungen auf die Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade zu sein scheint. Dennoch sollte nicht ausser Acht gelassen werden, dass die EMT auch über ein komplexes Netz von Signalwegen reguliert wird (siehe Abb. 60).

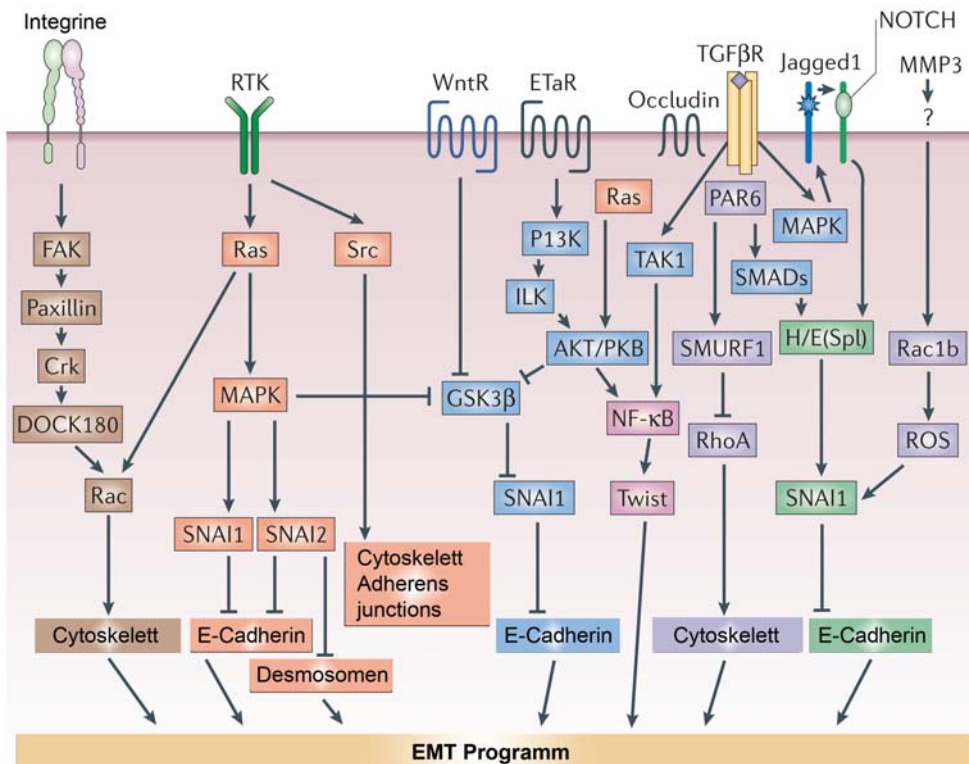


Abb. 60 (modifiziert nach Thiery und Sleeman 2006)^[228]: Übersicht des EMT regulierenden molekularen Netzwerks. Gezeigt ist eine Auswahl von Signalkaskaden, welche durch Regulatoren des EMT aktiviert werden. Die Vernetzung der Signalwege untereinander ist stark vereinfacht dargestellt.

Die Herunterregulation von E-Cadherin infolge der aktivierten Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade geschieht hauptsächlich über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SNAI1 (Snail) und SNAI2 (Slug).^[228] Diese Binden an E-Boxen in der Promotorregion des E-Cadherin Gens *CDH1* und reprimieren so dessen Expression.^[231, 232] Es konnte gezeigt werden, dass in MDCK-Zellen die Expression von Snail1 und Snail2 jeweils zu den gleichen phänotypischen Charakteristika führte, wie sie bei den MDCK-F3 Zellen zu beobachten sind.^[231] Diese Transkriptionsfaktoren sind zudem durch weitere Signalwege reguliert, welche mit EMT in Verbindung stehen.^[233]

Eine weitere wichtige Rolle bei der EMT spielt die Dynamik des Cytoskeletts, welches zu einem wesentlichen Teil über die G-Proteine der Rho Familie Rac, Cdc42 und Rho gesteuert wird.^[234, 235] Hierbei übt die Aktivierung von ERK einen bedeutenden Einfluss auf die Motilität und Invasivität der Zellen aus, indem es über den Transkriptionsfaktor Fra-1 zu einer Inhibition der Aktivität von Rho und seiner Effektor kinase ROCK führt.^[236, 237] Einen weiteren deutlichen Einfluss hat auch aktives Ras auf die Aktivität der Rho Proteine.^[234]

Es wird deutlich, dass mit diesem Zellsystem ein weitreichendes Netzwerk von Signalkaskaden betrachtet wird, welche durch ihre gegenseitige Koordination zu dem beobachteten Phänotyp der MDCK-F3 Zellen führen. Dennoch scheint nach den beschriebenen Erkenntnissen die durch onkogenes H-Ras aktivierte Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade eine wichtige Rolle bei diesen Veränderungen zu spielen. Somit werden gerade Substanzwirkungen auf diese Komponenten einen deutlichen Einfluss auf den Phänotyp der MDCK-F3 Zellen zeigen.

Der phänotypische MDCK-F3 Assay konnte auf ein 384-Loch-Platten Format miniaturisiert werden. Die einfach durchzuführende Färbung mit Coelestin Blau erlaubt hierbei die Selektion von Substanzen, welche die epitheliale Morphologie der MDCK-F3 Zellen induzieren. Zur weiteren biologischen Evaluierung sollten diese Substanzen im Folgenden auf ihren Einfluss auf die Expression von E-Cadherin getestet werden. Darüber hinaus sollte die Aktivierung von ERK in Anwesenheit der entsprechenden Substanzen durch Westernblot Analysen untersucht werden. Hierdurch können wichtige Informationen über die Wirkungsweise der Substanzen erhalten werden und unter Umständen so zu einer Eingrenzung der möglichen Zielproteine führen.

7.2.2 Substanztests

In der vorliegenden Arbeit diente der MDCK-F3 Phänotyp Assay dazu, die mit dem Reporter gen Assay identifizierten Tetrahydropyrane zu untersuchen. Hierbei wurde auffällig, dass auch apoptotisch wirkende Substanzen eine eher runde Zellform induzieren. Dennoch konnten anhand von weiteren charakteristischen morphologischen Eigenschaften eine solche Wirkungsweise direkt identifiziert werden. Dies ist ein deutlicher Vorteil gegenüber dem Reporter gen Assay.

Der erste Substanzscreen einer selektionierten Substanzbibliothek, welche 479 Substanzen umfasste (siehe Abschnitt 6.9), lieferte darüber hinaus deutlich weniger Hits als der Reporter gen-Assay. Von den sieben identifizierten Substanzen bewirkten vier Substanzen auch eine starke Inhibition des Reporter gen Signals. Hiervon zeigte eine Substanz aber auch im BSC-1 Assay eher apoptotische Charakteristika. Diese

Substanz (LBD328) sollte daher erneut in einem Vitalitätstest und auf ihre apoptosefördernde Eigenschaft hin untersucht werden. Zwei Substanzen zeigten im BSC-1 Assay deutliche Wirkungen auf das Cytoskelett und wurden ebenfalls im MDCK-F3 Assay als Hits identifiziert. Sie scheinen daher eine Wirkung auf die Dynamik des Cytoskeletts zu haben, welche eher zu einer epithelialen Zellform führt. Diese Substanzen sollten demzufolge auf ihre Wirkung auf das Cytoskelett genauer untersucht werden. Sie sind vielversprechende Kandidaten für Wirkstoffe, welche den migrierenden, invasiven Phänotyp von transformierten Zellen verhindern. Die einzelne Substanz, welche nur im MDCK-F3 Assay aktiv war, sollte erneut im Reporter-gen Assay getestet werden und ihre Wirkung auf die Expression von E-Cadherin untersucht werden. Hierdurch können Hinweise für eine mögliche Wirkungsweise gewonnen werden, welche in Prozessen unterhalb von aktivem ERK zu finden sind. Die drei Substanzen, welche sowohl im Reporter-gen Assay als auch im MDCK-F3 Assay aktiv sind, sollten dahingehend untersucht werden, ob sie oberhalb von ERK aktiv sind. Sie stellen die vielversprechendsten Kandidaten für neue Effektoren innerhalb der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade dar.

Eine hohe Sensibilität für Veränderungen in der Aktivität der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade zeigten die MDCK-F3 Zellen im Zusammenhang mit der biologischen Evaluierung des APT1 Inhibitors Palmostatin B (siehe Abschnitt 6.10). Hierbei führte eine Abschwächung des Signals schon zu einer starken Reversion des transformierten Phänotyps. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen, dass für eine H-Ras aktivierte Induktion von EMT, eine stark hochregulierte Aktivität der Ras-Raf-MEK-ERK Kaskade benötigt wird.^[226, 229, 230]

Zusammenfassend eignet sich der MDCK-F3 Assay durch seinen höheren Durchsatz, seine geringere Sensibilität und einfachere Detektion hervorragend als Primärscreen. Die Analyse der Zellform kann sogar durch die Verwendung von speziellen Bildanalyseprogrammen automatisiert erfolgen. Das Programm muss dabei die einzelnen Zellen durch Anwendung eines „Watershed“-Algorithmus erkennen. Hierbei wird eine Fläche ausgehend vom farbintensivsten Bereich, welcher bei der Cölestin-Blau-Färbung durch den Zellkern gegeben ist, in immer weniger farbintensive Bereiche sukzessiv vergrößert, bis die einzelnen Flächen aneinander stoßen. Unter Berücksichtigung der gemittelten Intensität des Hintergrundes, welcher als zusätzliche Grenze der Flächenausbreitung dient, können hierdurch die Flächen der einzelnen Zellen innerhalb der Bilddaten erkannt werden. Mit Hilfe dieser Flächen kann man anschließend die Kreisform der Zellen quantitativ bestimmen. Dieses kann nach folgender Formel geschehen.

$$Kreisform = \frac{4\pi(Fläche)}{(Umfang)^2}$$

Hieraus ergeben sich Werte der Kreisform zwischen 0 und 1, wobei der Wert 1 einer kreisrunden Zelle entsprechen würde. Durch einen Vergleich der Kreisform-Werte von MDCK-Zellen, MDCK-F3 Zellen, MDCK-F3 Zellen nach Behandlung mit U0126 und MDCK-F3 nach Behandlung der zu testenden Substanz kann somit eine quantitative Aussage über die Intensität der induzierten Rücktransformation durch die jeweiligen Substanzen erfolgen. Durch eine Etablierung dieses Auswertungsverfahrens kann somit die Analyse der erhaltenen Bilddaten viel zeitsparender und zudem ohne Einflussnahme von subjektiven Auswertungskriterien erfolgen. Mit Hilfe dieses Assays können somit in Zukunft Substanzen selektioniert werden, welche auf wichtige zelluläre Prozesse bei der Krebsentstehung wirken.

7.3 Der BSC-1 Phänotyp Assay

7.3.1 Eigenschaften

Der BSC-1 Phänotyp Assay wurde etabliert, um den Einfluss von Substanzen auf das Cytoskelett von Säugerzellen zu beobachten. Gerade durch die spezifische Anfärbung der Cytoskelettelemente und der DNA, erlaubt dieser Assay die Betrachtung von vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen, welche Auswirkungen in der Formgebung, Haftungseigenschaft, inneren Aufbau der Zellen und den Ablauf des Zellzyklus haben. Dies impliziert jedoch, dass aufgrund der enormen Komplexität der betrachteten Prozesse, dieser Assay nur als erster Ausgangspunkt für die Erforschung der jeweiligen Wirkungsmechanismen dienen kann. Er generiert in kurzer Zeit ein hohes Maß an Informationen in Form von Bilddaten. Daher obliegt es der Art der Analyse, inwiefern diese Bilddaten verwertet werden. Durch die Etablierung des Systems auf ein 384-Loch-Platten Format und der hierzu erforderlichen Prozeduren, ist dieses Testsystem sehr stabil und in einem angemessenen Durchsatz zu verwenden. Der eigentlich limitierende Schritt ist die manuelle Auswertung. Diese birgt neben dem Zeitaufwand als zusätzlichen Nachteil die Abhängigkeit von der menschlichen Objektivität des jeweils Auswertenden. Die Analyse der Bilddaten durch spezielle Computerprogramme, welche bestimmte morphologische Eigenschaften sogar quantitativ erfassen können, würden alle diese Nachteile komplementieren. Doch würde dies auch bedeuten, dass nur ein selektionierter Teil der vorliegenden Daten tatsächlich analysiert werden würde. So könnten diese Computerprogramme z.B. darauf ausgerichtet sein, unter den Bildern solche zu identifizieren, welche eine hohe Anzahl an mitotischen Zellen oder Zellen mit zwei Kernen enthalten. Dies würde aber Phänotypen unberücksichtigt lassen, welche eine längliche Gestalt der Zellen induzieren oder charakteristische Strukturen des Aktinskeletts beeinflussen. Bei der manuellen Auswertung können viele interessante phänotypische Veränderungen gleichzeitig identifiziert werden, welche dem immer geübter werdenden Betrachter spezielle Zusammenhänge erkennen lassen. Diese würden somit evtl. den Anstoß für eine weitere Erforschung der jeweiligen Wirkungsweise geben, welche bei der computergestützten Auswertung unberücksichtigt geblieben wäre. Es liegt also bei dem *High-content* Screening im Anliegen des jeweiligen Verwenders, wie er die generierten Daten nutzt.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der abteilungseigenen Substanzbibliothek, welche Naturstoffe und abgeleitete Formen mit vorraussichtlich ganz unterschiedlichen Wirkmechanismen beinhaltet, ergibt die bisher durchgeführte manuelle Analyse die tiefgreifendste Form der Charakterisierung. Hiervon ausgehend

können dann die Kandidaten ausgesucht werden, deren Wirkungsweise und die damit verbundenen Prozesse nun eingehender untersucht werden sollen. Gerade wegen des in Abschnitt 2.1 dargestellten Vorhabens der chemischen Genetik, zelluläre Prozesse anhand von Molekülsonden eingehender zu erforschen, sollte man sich bei diesem Testsystem nicht auf einige wenige Phänotypen beschränken. Es gibt aber schon Ansätze, die darauf ausgerichtet sind, eine Vielzahl von verschiedenen Phänotypen gleichzeitig automatisch zu verfassen und zu klassifizieren. Hierbei werden z.B. Profile von Substanzen mit bekannter Wirkung anhand von Intensitätsunterschieden ausgewählter fluoreszenz-markierter Proteine in Abhängigkeit zur Substanzkonzentration erstellt. Hiermit ließe sich die mögliche Wirkung unbekannter Substanzen anhand der erstellten Profile einordnen.^[238] Es wurde auch die Entwicklung einer automatisierten Plattform zur Identifikation von unterschiedlichen zellulären Phänotypen beschrieben.^[239] Hierbei wurde die Bildaufnahme durch eine integrierte Bildanalyse so optimiert, dass die erhaltene Bildqualität durchgehend hoch für computergestützte Auswertungen ist. Anschließend wurde eine automatisierte Bildanalyseplattform entwickelt, die es erlaubt verschiedene charakteristische Phänotypen zu klassifizieren und mit einer hohen Genauigkeit auszuwerten.^[239] Ähnliche hochentwickelte automatisierte Bildanalyseprozeduren wurden auch schon zur Auswertung von Life Cell Imaging Daten^[240, 241] oder von Proteinlokalisationen^[242, 243] vorgestellt. Diese Ansätze bedürfen aber einer hochentwickelten technischen Infrastruktur und erfordern die Zusammenarbeit von Spezialisten für Roboter- und Optik-Systeme, IT-Fachleuten zur Handhabung der Datenmengen, Bioinformatikern, Statistikern und Zellbiologen zur Entwicklung von Auswertungsprozeduren.^[240] Die derzeitigen Fortschritte lassen aber hoffen, dass diese Plattformen in naher Zukunft einfacher zu handhaben und auch zugänglicher werden.

Aufgrund der enormen Anzahl von Prozessen, welche mit diesem Assay erfasst werden, würde eine Darstellung der molekularen Komponenten den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Daher sollen im Folgenden, die in dieser Arbeit vorgestellten, identifizierten Substanzen gesondert betrachtet werden. Hierbei werden weitere Eigenschaften des Assays sowie mögliche Wirkungsweisen diskutiert.

7.3.2 Untersuchung einer Bibliothek von 50 α , β -ungesättigten δ -Lactonen

Das Strukturmotiv der α , β -ungesättigten δ -Lactone gehört zu den häufigsten innerhalb der bekannten Naturstoffe.^[31] Es ist das charakteristische strukturelle Grundmotiv von Proliferationshemmern, Immunsuppressiva und Enzyminhibitoren, besonders von Proteinphosphatasen.^[244-249] Dr. Torben Lessmann und Dr. Michele Leuenberger (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie) gelang die enantioselektive Synthese einer Bibliothek von 50 α , β -ungesättigten δ -Lactonen. Diese kleine Substanzbibliothek wurde in dem BSC-1 Phänotyp Assay untersucht und es zeigte sich, dass 14 Substanzen eine Wirkung auf den Phänotyp von BSC-1 Zellen hatten. Hiervon waren die Substanzen 10a/10 und 11a/1 vom induzierten Phänotyp am interessantesten, da sie gerade in der Mitose einen offensichtlichen Effekt auf die Spindelmorphologie und damit zusammenhängend auf die Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphasenplatte hatten. Zudem zeigte die Substanz 10a/10 bei einer Konzentration von 100 μ M auch einen Effekt auf das Aktinskelett. Solche Wirkungsweisen auf das Cytoskelett sind, wie auch in Abschnitt 2.3 geschildert, besonders interessant, da sie zu einer dauerhaften Aktivierung des Spindelkontrollpunktes und somit zur Induktion der Apoptose führen können. Bei einer Konzentration von 80 μ M hemmten diese Substanzen auch die Tubulinpolymerisation *in vitro*. Somit scheinen die beobachteten Effekte bei einer Konzentration von 100 μ M zum Teil durch eine direkte Wirkung der Substanzen auf das Tubulinskelett begründet zu sein. Dennoch ist auch schon bei einer Konzentration von 30 μ M eine erhebliche Störung der Spindel und der Chromosomenausrichtung zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass auch Proteine betroffen sind, welche im Zusammenhang mit der Tubulindynamik *in vivo* stehen. Die Tubulindynamik wird in lebenden Zellen räumlich und zeitlich durch eine sehr große Anzahl von verschiedenen Proteinen reguliert, welche mit Tubulin interagieren. Diese üben ihren Einfluss auf die Eigenschaften der Filamente aus, indem sie die Tubulinfaltung regulieren, als strukturelle Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAPs) direkt an Tubulin binden oder an den Enden der Tubulinfilamente die Dynamik, Lokalisation oder Lebensdauer der Filamente beeinflussen.^[108] Somit besteht eine sehr große Anzahl an möglichen Zielproteinen. Daher sollten in Zukunft mit diesen Substanzen eingehendere mikroskopische Untersuchungen unter Verwendung von Live Cell Imaging und verschiedenen fluoreszenten Proben für unterschiedliche Komponenten des Spindelapparates durchgeführt werden, um die induzierten Phänotypen näher zu charakterisieren. Hiernach sollte sich die Möglichkeit einer Struktur-Aktivitäts-Studie bieten, anhand derer die Aktivität der Substanzen erhöht werden kann. Hierbei bildet die Substanz 5b

7.3.3 Einfluss der Indolochinolizin Derivate Vtk-71 und Vtk-206 auf die Mitose

Bei der Untersuchung von 19 Indolochinolizin Derivaten in dem BSC-1 Cytoskelett Assay fiel bei der Substanz Vtk-71 bei einer Konzentration von 30 μM ein sehr diffuses Tubulingerüst auf. Zudem war die Form der mitotischen Spindel gestört. Anschließende Untersuchungen von Vtk-71 und weiteren Strukturanaloga mit Hilfe von Live Cell Imaging Aufnahmen von synchronisierten TC21 Zellen offenbarten einen weiteren Phänotyp. Die mit Vtk-71 und Vtk-206 bei den Konzentrationen von 10 μM und 20 μM behandelten Zellen zeigten eine deutlich verlängerte Mitose und eine sehr hohe Anzahl an tripolaren Zellteilungen. In dieser Untersuchung besaß die Substanz Vtk-206 eine vergleichbar starke Aktivität bei gleicher Konzentration, wobei sogar eine höhere Anzahl an dreiteilenden Zellen auftrat. Hochauflösende mikroskopische Untersuchungen und weitere Live Cell Imaging Experimente erlaubten eine deutlichere Charakterisierung des induzierten Phänotyps. Schon bei niedrigeren Konzentrationen von 1-10 μM konnten in mitotischen Zellen unausgerichtete Chromosomen an den Spindelpolen entdeckt werden. Diese führten offensichtlich zu der Aktivierung des Anaphasekontrollpunktes, woraufhin die Zellen in der Prometaphase verblieben. Dies dauerte so lange, bis die polständigen Chromosomen letztendlich auch in der Metaphasenplatte ausgerichtet waren. Daraufhin erfolgte rasch die Zellteilung. Es waren hierbei dennoch vereinzelt falsch getrennte Chromosomen zu erkennen. Ab Konzentrationen von 10-30 μM traten vermehrt unausgerichtete Chromosomen sowie multipolare Spindeln auf. Dies führte nach einem längeren Arrest in der Promethaphase zu der schon beobachteten Dreiteilung der Zellen. Es ist hierbei anzumerken, dass auch bei diesen Konzentrationen einzelne Zellen zwar unausgerichtete Chromosomen zeigten, sich aber dennoch in zwei Tochterzellen teilten. Um eine eindeutigere konzentrationsabhängige Charakterisierung der beobachteten Dreiteilungen im Verhältnis zu normalen Teilungen vorzunehmen, ist eine größere Anzahl von Bilddaten nötig. Auch für eine quantitative Aussage für die vermehrte Dreiteilungen bei der Substanz Vtk-206 im Vergleich zu Vtk-71 ab einer Konzentration von 10 μM sollten weitere Live Cell Imaging Experimente erfolgen. Zudem sollte hierbei der Beobachtungszeitraum verlängert werden, da manche Zellen über den ganzen Zeitraum in der Prometaphase verblieben und keine anschließende Teilungen mehr beobachtet werden konnten.

Die enantioselektive Aufreinigung von Vtk-206 ließ erkennen, dass nur eine enantiomere Form aktiv ist. Dieser Effekt wurde auch bei den Cytotoxizitäts Tests aller enantiomeren reinen Formen von Vtk-71 und Vtk-206 bestätigt. Durch die

Abnahme der Vitalität bei den aktiven Formen ab einer Konzentration von 25 μM ergeben sich Hinweise auf eine mögliche Apoptose-induzierende Wirkung. Daher sollten dahingehend weitere Untersuchungen dieser Substanzen besonders nach einem längeren Zeitraum nach Substanzapplikation erfolgen.

Die Substanzen Vtk-71 und Vtk-206 zeigten bei einer Konzentration von 50 μM keinen Effekt auf die Tubulinpolymerisation *in vitro*. Daher scheinen sie indirekt auf die Tubulindynamik zu wirken.

Die Wirkungsweise der Substanzen liegt nach der erfolgten Charakterisierung des Phänotyps bei niedrigen Konzentrationen womöglich in der Beeinflussung von Komponenten, welche mit der Verbindung der Kinetochoren mit dem Mikrotubulinfilamenten der Spindel oder mit der Dynamik der Spindelfasern selbst im Zusammenhang stehen. Dies kann zu den beobachteten unausgerichteten Chromosomen an den Spindelpolen führen. Bei der Verbindung der Mikrotubuli mit den Kinetochoren der Schwesterchromatiden sind eine Vielzahl von Proteinen und Signalwegen involviert, welche diesen Prozess steuern und zudem den Anaphasekontrollpunkt ausmachen.^[123, 124] Eine schematische Übersicht der wichtigsten Komponenten ist in Abb. 62 gezeigt.

Anhand der Live Cell Imaging Daten konnte beobachtet werden, dass der Anaphasekontrollpunkt bei unausgerichteten Chromosomen noch intakt war und folglich die Prometaphase dadurch verlängert wurde. Dennoch wurden vereinzelt falsch getrennte Chromosomen in der Anaphase beobachtet. Letzteres kann aber auch durch einen intrinsisch abgeschwächten Kontrollpunkt in HeLa Zellen begründet sein. Hinweise darauf wurden bei Studien der Funktion des Mikrotubuli assoziierten Proteins HURP (*hepatoma up-regulated protein*) erlangt.^[251]

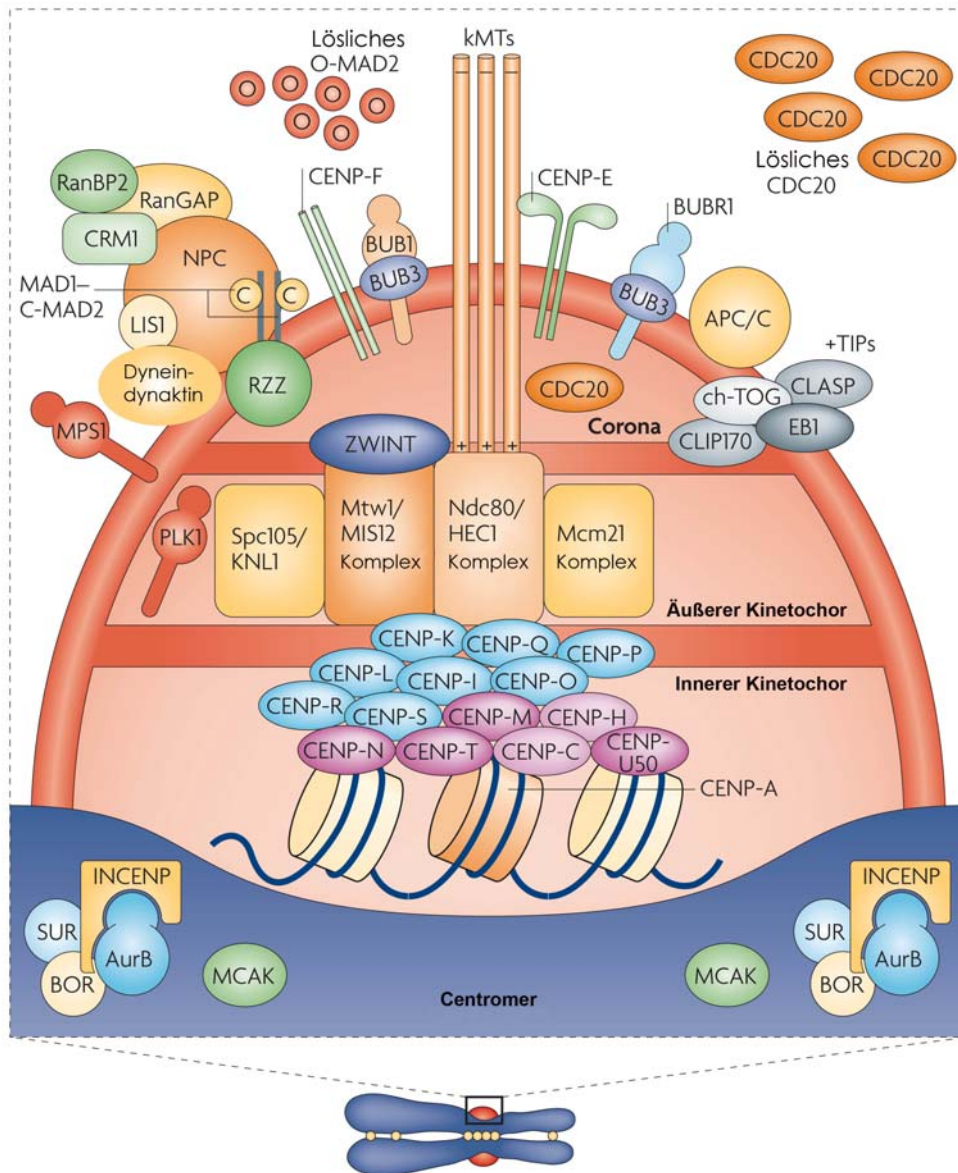


Abb. 62 (modifiziert nach Musacchio und Salmon 2007): Wichtige regulatorische Faktoren der Centromer-Kinetochor-Region. Die gezeigten Komponenten sind für die Verbindung der Kinetochormikrotubuli (kMTs) mit dem Kinetochor, dessen Stabilisierung und der Ausbildung des Anaphasekontrollpunktes zuständig.

HURP fördert die Polymerisation und stabilisiert die Kinetochorfasern der Spindel.^[251, 252] Die Forscher betrachteten den Phänotyp von HeLa Zellen nach Herunterregulation von HURP durch siRNA von mehr als 95%. Die Zellen zeigten unausgerichtete Chromosomen an den Spindelpolen und eine dadurch verlängerte Prometaphase, in der die Chromosomen letztendlich ausgerichtet wurden. Auch sie beobachteten teilweise falsch getrennte Chromosomen in der Anaphase. Weitere Untersuchungen, welche die volle Funktion des Anaphasekontrollpunktes nach

Herunterregulation von HURP anhand der korrekten Lokalisation von Kontrollpunkt-relevanten Proteinen bestätigten, ließen die Forscher schlussfolgern, dass in HeLa Zellen die Sensibilität des Kontrollpunktes intrinsisch herabgesetzt ist.^[251] Die enge Korrelation des induzierten Phänotyps in dieser Studie mit den beobachteten Phänotypen bei niedrigeren Konzentrationen von Vtk-71 und Vtk-206 ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Wirkungsweise womöglich bei diesen Prozessen oder sogar bei HURP selbst zu finden ist. Dennoch traten bei der Studie durch die mehr als 95%ige Herunterregulation von HURP keine multipolaren Spindeln auf.^[251]

Es stellt sich die Frage, ob das Auftreten von multipolaren Spindeln bei höheren Konzentrationen von Vtk-71 und Vtk-206 auf eine konzentrationsabhängige Verminderung der Spezifität zurückzuführen ist, oder die verstärkte Störung einer spezifischen Funktion zu diesem Phänotyp führt. Beides ist möglich. So konnte in derselben Studie durch eine minimale Dosis von Nocodazol (10ng/ml) oder der schwachen Herunterregulierung des Mikrotubuli assoziierten Proteins ch-TOG (*colonic and hepatic tumor over-expressed gene*), durch Verwendung von 1 % der siRNA Menge, welche für eine vollständige Herunterregulation benötigt wird, auch unausgerichtete Chromosomen beobachtet werden. Hierbei beobachteten die Forscher ebenfalls einen Fortgang der Anaphase in Anwesenheit einiger weniger unausgerichteter Chromosomen. Dies war ein weiterer Hinweis auf die Möglichkeit eines intrinsisch herabgesetzten Kontrollpunkts in HeLa Zellen.^[251]

Der geschilderte Phänotyp bei Herunterregulation des Proteins ch-TOG deckt sich sehr stark mit den beobachteten Effekten bei Vtk-71 und Vtk-206. Dieses Protein beschleunigt und stabilisiert ähnlich wie HURP die Polymerisation von Tubulinfilamenten.^[253-255] Gegerly et. al. zeigten, dass eine starke Herunterregulation von ch-TOG von mehr als 70 % in HeLa Zellen zu der Generierung von multipolaren Spindeln führt und dieses Protein somit zudem wichtig für die Organisation der Spindelpole ist.^[256] Hier wäre eine mögliche Korrelation zu den beobachteten Phänotypen gegeben, welche durch eine konzentrationsabhängige verstärkte Störung eines Zielproteins hervorgerufen wird. Auf der anderen Seite könnten auch ch-TOG assoziierte Proteine wie z.B. die TACC (*transforming acidic coiled-coiled-containing*) Proteine durch die Substanzen beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass sie ch-TOG an die Centrosomen rekrutieren.^[257, 258] Gegerly et al. untersuchten daher auch die phänotypischen Effekte nach Herunterregulation von TACC3 in HeLa Zellen.^[256] Sie beobachteten hier das Auftreten von unausgerichteten Chromosomen, was in seiner Häufigkeit proportional zu dem Grad der Herunterregulation von TACC3 war. Darüber hinaus untersuchten sie in diesen Zellen die Lokalisation von ch-TOG. Es zeigte sich dabei, dass die Lokalisation von ch-TOG an den Spindelfasern

vermindert war. Dahingegen war die Lokalisation von ch-TOG an den Centrosomen unverändert. Die Forscher vermuteten, dass die Rekrutierung von ch-TOG an die Centrosomen durch die übrigen TACC Proteine TACC1 und TACC2 aufrechterhalten wurde und somit die Lokalisation von ch-TOG an die Spindelmikrotubuli vornehmlich durch TACC3 gesteuert wird.^[256] Dieses Modell erlaubt weitere interessante Spekulationen in Bezug auf die Wirkungsweisen von Vtk-71 und Vtk-206. Es könnte sein, dass diese Substanzen bei niedrigeren Konzentrationen TACC3 modulieren und dadurch ch-TOG nicht mehr an die Spindelfasern rekrutiert wird. Dieses würde zu deren Destabilisierung und der daraus resultierenden fehlerhaften Ausrichtung von Chromosomen führen. Mit steigenden Konzentrationen der Substanzen könnten neben TACC3 auch die eng verwandten^[259] Proteine TACC1 und TACC2 beeinflusst werden, wodurch zusätzlich die Rekrutierung von ch-TOG an die Centrosomen gestört werden würde. Das würde dann zum Auftreten von multipolaren Spindeln führen.

Das sind, wie schon erwähnt, nur Spekulationen aufgrund derer aber eine genauere mikroskopische Untersuchung der induzierten Phänotypen mit verschiedenen fluoreszierenden Sonden gegen die beteiligten Komponenten erfolgen sollte. Darüber hinaus können Affinitätsaufreinigungsexperimente weitere Aufschlüsse über mögliche Zielproteine geben. Die Durchführung dieser Experimente kann sich aber als schwierig herausstellen, da die besagten Proteine vornehmlich in der M-Phase exprimiert werden.^[251, 256, 260, 261] Es sollte deshalb versucht werden, Zelllysate von mitotischen Zellen zu erhalten und/oder die Phage Display Technik verwendet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Substanzen einen Phänotyp induzieren, welcher gerade in Bezug auf die Krebsentstehung und Krebstherapie interessant ist. Die fehlerhafte Trennung von Chromosomen führt besonders bei multipolaren Teilungen zur Aneuploidie, welche häufig die Tumorentstehung vorantreiben kann.^[262] In Zellen in denen die mitotischen Kontrollpunkte aber noch aktiv sind, könnte dies oder die Verhinderung der Chromosomenausrichtung zu einem dauerhaften Arrest führen, der letztlich die Apoptose induziert.^[263] Darüber hinaus ist die Überlebenschance von Zellen nach multipolaren Teilungen deutlich reduziert.^[124] Eine starke Generierung von chromosomaler Instabilität könnte daher ein Ansatz zur Krebstherapie sein.^[124]

7.3.4 Wirkung von Prieurianin auf das Aktinskelett

Die Identifikation von Prieurianin und Prieurianinacetat als Wirkstoffe, welche das Aktinskelett beeinflussen, stellt ein weiteres Beispiel für einen erfolgreichen chemisch-genetischen Ansatz dar. Diese Substanzen wurden von Dr. Réka Tóth (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung) in einem Reporter-gen Assay identifiziert, welcher das Expressionsverhalten des Proteins GIGANTEA in Abhängigkeit der Rhythmik der zirkadianen Uhr detektiert. Nachfolgende Untersuchungen zeigten zudem morphologische Veränderungen von etoilerten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen, welche auf ein verkürztes Längenwachstum der Zellen zurückzuführen war. Aufgrund der Ähnlichkeit dieses Phänotyps mit dem Phänotyp, welcher durch die aktindepolymerisierende Substanz Latrunculin B^[111, 264] induziert wird, wurde die Wirkung von Prieurianin und Prieurianinacetat auf das Aktinskelett untersucht. Sowohl in *Arabidopsis thaliana* Zellen, als auch in BSC-1 Zellen wurde das Aktinskelett durch Prieurianin stark beeinträchtigt. Prieurianinacetat zeigte hingegen nur in *Arabidopsis thaliana* Zellen eine entsprechende Wirkung. Die unterschiedliche Wirkung von Prieurianinacetat in BSC-1 Zellen, kann auf eine andere Metabolisierung in Pflanzen zurückzuführen sein oder auf eine tatsächlich herabgesetzte Wirkung in diesem Zellsystem. Das Tubulinskelett war in allen Untersuchungen unbeeinträchtigt. Beide Substanzen hatten keinen Effekt auf die Aktinpolymerisation *in vitro*, was auf eine indirekte Wirkung auf die Aktindynamik schließen lässt. Diese Befunde zeigten das Aktinfilamente eine wichtige Rolle bei der lichtinduzierten Regulation der zirkadianen Uhr von *Arabidopsis thaliana* spielen.

Die beobachteten Phänotypen in BSC-1 Zellen nach Applikation von Prieurianin bei einer Konzentration von 10 μM zeigen eine deutliche Reduktion von Aktinfilamenten und eine große Anzahl von zweikernigen Zellen. Die wenigen Stressfasern waren im Vergleich zur DMSO Kontrolle auch stark verkürzt. Die Zellform hingegen blieb weitgehend unverändert. Dieser Phänotyp deckt sich stark mit dem beschriebenen Phänotyp von NIL8 Zellen, welche mit Latrunculin B über einen längeren Zeitraum behandelt wurden.^[264] Er unterschied sich deutlich von dem Phänotyp von BSC-1 Zellen, welche mit Chondramid C oder Jasplakinolid behandelt wurden (siehe Abschnitt 6.8, Abb. 45 B und E). Es ist somit wahrscheinlich, dass die Aktinfilamente durch die Wirkung von Prieurianin indirekt destabilisiert werden. Bei 30 μM waren die induzierten Effekte schon so stark, dass sie toxisch für die Zellen waren. Es sollten daher weitere konzentrationsabhängige Studien durchgeführt werden, um den Phänotyp näher zu charakterisieren. Die Tatsache, dass Prieurianin wahrscheinlich indirekt die Aktinpolymerisation beeinflusst, ist eine vielversprechende Erkenntnis. Der hierdurch beeinflusste Prozess scheint in Pflanzen und Tieren sehr essentiell zu sein.

Die Komponenten des Cytoskeletts und ihre Organisation sind hoch konserviert. Dennoch zeigte die biochemische Charakterisierung von Aktin-Bindeproteinen von Pflanzen und Tieren, dass zwar die Primärsequenz oft hochkonserviert ist, aber die spezifischen Aktivitäten sehr deutlich zwischen den Spezies differieren.^[265] Darüber hinaus ist der Hinweis auf einen indirekten Wirkmechanismus auch sehr interessant für die Suche nach Wirkstoffen, welche einen Einfluss auf die Aktindynamik ausüben. Die bisher gefundenen Substanzen üben ihre Wirkung durch eine direkte Bindung an Aktin aus.^[111, 112] Daher werden zukünftige Bemühungen, den betroffenen Wirkungsmechanismus zu entschlüsseln, ein hohes Maß an wichtigen neuen Erkenntnissen erbringen.

7.3.5 Struktur-Aktivitäts-Studie von Chondramid C Stereoisomeren

Die Untersuchung der Aktivität von synthetisiertem Chondramid C und drei stereoisomeren Formen auf das Aktinskelett von BSC-1 Zellen, konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie erfolgreich durchgeführt werden. Hierbei wurde vor allem deutlich, dass die Konformation an C7 und die Konformation der Doppelbindung zwischen C5 und C6 stark die Aktivität beeinflussen (siehe Abschnitt 6.8, Abb. 45 u. Abb. 46). Hierbei zeigte die R-Konformation an C7 und die E-Konformation der Doppelbindung, so wie sie bei Chondramid C vorliegen, die höchste Aktivität. Die S-Konformation an C7, bei dem Stereoisomer 14d führte zu einem Aktivitätsverlust um den Faktor 50. Eine ähnliche Abschwächung der Aktivität wurde bei einem Gemisch der E- und Z-Isomere festgestellt (siehe Abb. 46 Struktur 14a und Abb. 45 C). Erstaunlich war, dass die Aktivität des Stereoisomers 14b, bei der die S-Konformation an C7 und die Z-Konformation der Doppelbindung vorliegt, eine leicht höhere Aktivität aufwies als 14a und 14d. Hierbei wird aber der Nachteil einer manuellen Auswertung der entsprechenden Bilddaten deutlich. Die getesteten Substanzen beeinflussten über einen breiteren Konzentrationsbereich das Aktinskelett der BSC-1 Zellen. Bei niedrigeren Konzentrationen waren die phänotypischen Veränderungen schwächer, welches sich in einem ersten Auftreten von F-Aktin Aggregaten zeigte. Mit zunehmender Konzentration verstärkten sich die phänotypischen Veränderungen des Aktinskeletts mit deutlicheren Aggregatbildungen und der Entstehung von kleineren Zellen bis hin zu cytotoxischen Erscheinungsformen. Bei der Analyse wurde daher der in Abb. 45 gezeigte Phänotyp bei den getesteten Substanzen gesucht und die hierfür erforderliche Konzentration angegeben. Dies ließ zwar die oben geschilderten Aktivitäten erkennen, ist aber für eine quantitative Analyse unzureichend. Um genauere Aktivitätsprofile in Bezug auf die jeweiligen Konformationen zu erhalten, würde eine computergestützte

Bildauswertung exaktere Daten liefern. Hierbei könnten Parameter, wie Zellgröße und die Häufigkeit von zweikernigen Zellen schon ausreichend sein. Eine Studie im Zusammenhang mit weiteren Stereoisomeren würde in diesem Zusammenhang zu einem deutlicheren Struktur-Aktivitäts-Profil führen. Dennoch konnten mit diesen Ergebnissen schon richtungsweisende Erkenntnisse gewonnen werden, aufgrund derer weitere Stereoisomere zur eingehenderen Analyse synthetisiert werden können.

Der BSC-1 Phänotyp Assay ist zusammenfassend sehr informationsreich und erfolgreich etabliert. Die manuelle Auswertung zeigt bei den dargestellten Ergebnissen viele Vorteile. Die Charakterisierung vieler verschiedener Phänotypen bei dem Screen einer selektionierten Substanzbibliothek (siehe Abschnitt. 6.9) konnte wichtige Informationen zu möglichen Wirkungsweisen von Substanzen geben, welche im Reporter- oder MDCK-F3 Assay aktiv waren. Darüber hinaus zeigte die hohe Menge an aktiven Substanzen in diesem Screen das große Potential der hauseigenen Substanzbibliothek und eröffnet hiermit die Verfolgung mehrerer interessanter Projekte in einem chemisch-genetischen Kontext. Die computergestützte Auswertung sollte aber in Zukunft zur quantitativen Charakterisierung von Phänotypen und Substanzaktivitäten, sowie zur schnellen Identifikation von gesuchten Wirkungsmechanismen innerhalb der vorhandenen Datenmenge genutzt werden.

7.4 Biologische Evaluierung der Funktion von APT1 *in vivo*

Diese Studie ist ein attraktives Beispiel eines erfolgreichen rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes. Die Entdeckung des in Abschnitt 2.2.5 vorgestellten Ras-Zyklus veranschaulichte die große Bedeutung der räumlichen und zeitlichen Regulierung von Ras im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Prozessen, welche durch die Aktivität dieser GTPase gesteuert werden.^[86, 87, 173] Der Ras-Zyklus bietet daher eine neue Plattform, um die Modulation der Signalweiterleitung über Ras mit niedermolekularen Substanzen zu beeinflussen. Aufgrund der erheblichen Schädigung der Zellen durch Inhibition der Palmitoylierung^[170], stellte die Inhibition der Depalmitoylierung einen vielversprechenderen Ansatzpunkt dar. Rocks et al. beobachteten die Verteilung eines palmitoylierten aber nicht depalmitoylierbaren semi-synthetischen N-Ras-Proteins über alle Endomembranen nach dessen Mikroinjektion.^[86] Durch die Inhibition der Depalmitoylierung bleiben daher die palmitoylierten Ras-Proteine vornehmlich in den Membranen verankert. Dies bedeutet, dass weniger ihre Wirkungsweise, sondern vielmehr durch die ungerichtete Verteilung über die Endomembranen, ihre räumlich-zeitliche Regulierung gestört wird. Demgegenüber würde eine kurze Verweildauer von nicht-palmitoylierten Ras-Proteinen an den Membranen ihre Funktion fast komplett unterbinden.

Die einzige bisher bekannte Thioesterase, für die eine depalmitoylierende Aktivität von H-Ras *in vitro* beschrieben wurde, ist die Acyl-Protein-Thioesterase 1 (APT1).^[104, 171] Da die Kristallstruktur von APT1 bekannt war^[266], konnte mit ihr die Methode des PSSC angewendet werden. Weil das Protein eine katalytische Triade, bestehend aus Ser-114, His-203 und Asp-169 enthält, wurde um Ser-114 ein sogenannter Liganden-Spürender-Kern mit einem Radius von 15 Å definiert. Für sekundäre Strukturelemente wurde hier herum dieser Kern auf 25 Å erweitert und aus der Kristallstruktur extrahiert. Dann wurde nach strukturell ähnlichen Proteinen gesucht und anschließend geprüft, inwieweit die Liganden-Spürenden-Kerne dieser Proteine dem Kern von APT1 gleichen. Dabei zeigte die gastrische Lipase des Hundes eine große Übereinstimmung. In diesem Zusammenhang bestätigen sich die dem PSSC zugrunde liegenden Annahmen^[33, 35], da die Sequenzhomologie beider Proteine gering ist. Aufgrund der Struktur von Tetrahydrolipstatin, eines bekannten Inhibitors der gastrischen Lipase^[172], wurde eine Bibliothek aus 65 β-Laktonen synthetisiert. Das β-Lakton dient bei seiner Interaktion mit dem Protein als Elektrophil für den nukleophilen Angriff des Serins.^[267] Nach der Evaluierung des potentesten und stabilsten Inhibitors von APT1 *in vitro*, sollte dieser verwendet werden, um die biologische Funktion von APT1 genauer zu untersuchen. Dieser Inhibitor erhielt den Namen Palmostatin B.

Da gezeigt werden konnte, dass APT1 *in vitro* auch als Acyltransferase fungiert^[268], wurde untersucht, in welcher Weise die De- und Reacylierung von Ras durch Palmostatin B *in vivo* beeinflusst wird. Durch die Verwendung des Cys-Far Konstrukts konnte die Palmitoylierungsreaktion anhand seiner Akkumulation am Golgi-Apparat beobachtet werden. Es wurde anhand dieser Probe schon gezeigt, dass die Palmitoylierung von Ras vornehmlich an diesem Kompartiment stattfindet und dann in den Zyklus integriert wird.^[269] Durch die Verwendung von PalFar konnte die Depalmitoylierungsreaktion ebenfalls durch die Akkumulation am Golgi-Apparat beobachtet werden. Hierbei wird folgender Mechanismus zugrunde gelegt. Das injizierte PalFar Konstrukt verteilt sich zunächst über alle Endomembranen. Dort wird es depalmitoyliert und letztendlich durch eine Repalmitoylierung am Golgi-Apparat wieder eingefangen. Die Studien mit diesen semisynthetischen Proteinen offenbarten daher schon interessante Charakteristika der De- und Repalmitoylierungsmaschinerie in Säugetierzellen.^[269] Es wurde vorher vermutet, dass die Palmitoylierungsreaktion an verschiedenen Membranen stattfindet.^[86, 270-273] Durch die Akkumulation von injiziertem Cys-Far am Golgi-Apparat, konnte dieses Kompartiment als vornehmliche Plattform dieser Reaktionen definiert werden. Demgegenüber erfolgt die Depalmitoylierung an allen Endomembranen. Denn nur so kann PalFar in der beobachteten Geschwindigkeit am Golgi-Apparat akkumulieren. Darüber hinaus ist die Geschwindigkeit dieser Reaktionen um zwei Größenordnungen höher, als aufgrund vorheriger Pulse-Chase Experimente vermutet wurde.^[272, 274, 275]

In Anwesenheit von Palmostatin B akkumulierte das injizierte CysFar-Konstrukt mit derselben Geschwindigkeit am Golgi-Apparat, wie bei unbehandelten Zellen. Im Gegensatz dazu konnte keine Akkumulation von PalFar am Golgi-Apparat detektiert werden. Das Konstrukt blieb in Anwesenheit von Palmostatin B über alle Membranen verteilt. Hierdurch wurde deutlich, dass durch Palmostatin B nur die Depalmitoylierungsreaktion inhibiert wird.

Aufgrund dessen wurde die Lokalisierung von Citrine-N-Ras, Citrine H-Ras in Anwesenheit von Palmostatin B beobachtet. Die Verteilung beider Konstrukte über alle Endomembranen zeigte dieselben Konsequenzen einer dauerhaften Palmitoylierung, wie sie schon mit einem nicht depalmitoylierbaren N-Ras Konstrukt zu beobachten waren^[86]. Allerdings konnten hier weitere Eigenschaften in der Verteilung und Kinetik der einzelnen Isoformen, besonders im Vergleich mit dem Cherry-C181,184S-H-Ras Konstrukt, ausgemacht werden. So lag Cherry-C181,184S-H-Ras schnell in der ganzen Zelle verteilt vor. Citrine N-Ras erreichte einige Zeit später dieselbe Verteilung. Citrine-H-Ras verteilte sich hingegen langsamer und eine Lokalisierung an der Plasmamembran war im Gegensatz zu den anderen Konstrukten

über den gesamten Zeitraum zu beobachten. Dies zeigt, dass die stärkere Verankerung an der Plasmamembran durch zwei Palmitoylreste die Verteilung stark beeinflusst. Darüber hinaus kann die Verteilung über alle Endomembranen nicht nur durch den Membranfluss in der Zelle erklärt werden. Da sich dann die Delokalisationskinetiken von N- und H-Ras gleichen müssten. Somit kann eine Entropie getriebene Verteilung vermutet werden, bei der die verankerten Proteine zu anderen Membranen wechseln. Dieses wird entsprechend der Stärke der Verankerung erschwert. Die anhaltende Lokalisation von Citrine-H-Ras an der Plasmamembran kann durch den anhaltenden sekretorischen Transportweg erklärt werden, welcher durch die langsamere Verteilung nicht vollständig ausgeglichen wird.^[276] In diesem Zusammenhang wurde auch kurz nach Inkubation mit Palmostatin B ein Rückgang von Golgi-lokalisiertem Citrine-H-Ras beobachtet, was durch den Abtransport über den sekretorischen Weg begründet ist.

Die Verteilung von Citrine-N-Ras war nach Inkubation mit Palmostatin B über Nacht wieder aufgehoben. Dies liegt an dem kovalenten Inhibierungsmodus, bei dem der β -Lakton-Ring durch den nucleophilen Angriff des Serins-114 aufgebrochen wird und die entstehende Esterbindung mit der Zeit hydrolysiert wird.^[267] Hierdurch wird der vorhandene Inhibitor sukzessiv verbraucht und das Enzym reaktiviert.

Dass es sich bei den beobachteten Delokalisierungen von Citrin-N-Ras und Citrine-H-Ras tatsächlich um palmitoylierte Proteine handelt, konnte exemplarisch für N-Ras mit Hilfe der Acyl-Austausch Methode bewiesen werden. Da in unbehandelten Zellen die Ras-Proteine einen ständigen Kreislauf von Palmitoylierung und Depalmitoylierung durchlaufen, liegt im Mittel immer ein gewisser Anteil palmitoyliert vor. Nach Inkubation mit Palmostatin B wird durch die selektive Inhibition der Depalmitoylierungsreaktion der Anteil an palmitoyliertem Ras-Proteinen erhöht. Demgegenüber wird durch Inhibition der Palmitoylierung durch 2-Bromopalmitat der Anteil an palmitoylierten Ras-Proteinen erniedrigt. Die quantitative Bestimmung des Anteils von palmitoyliertem N-Ras im Verhältnis zu der gesamten immunopräzipitierten N-Ras-Menge, nach entsprechender Inkubation, zeigte die erwarteten Verhältnisse.

Dadurch, dass die Palmitoylierung von Ras am Golgi-Apparat durch Palmostatin B nicht inhibiert wird und die Verteilung über die Endomembranen aber zu einer verminderten Lokalisation an der Plasmamembran führt, kann die Lokalisation an diesen Membranen in ein Verhältnis gesetzt werden. Dieses Verhältnis diene als Parameter für die Aktivität von APT1. Bei der Herunterregulation von APT1 durch siRNA, wurde dieses Verhältnis in Richtung Golgi-Apparat verschoben und zeigt,

dass der durch Palmostatin B induzierte Effekt tatsächlich auf eine inhibierte APT1 Aktivität zurückzuführen ist.

Nachdem die Effekte der Wirkung von Palmostatin B auf die Lokalisation der beiden Ras Isoformen untersucht worden war, stellte sich die Frage, inwieweit hierdurch die Signalweiterleitung von diesen Proteinen gestört wird. Die Aktivierung von Ras über den EGF-Rezeptor an der Plasmamembran ist transient, wohingegen die Aktivierung am Golgi-Apparat verspätet aber dafür langanhaltend ist.^[86, 102] H-/N-Ras wird hierbei zunächst an der Plasmamembran aktiviert. Nach anschließender Depalmitoylierung wird es am Golgi-Apparat wieder repalmitoyliert, woraufhin es die Signalweiterleitung von diesem Kompartiment aus fortsetzt.^[86] Durch die Beobachtung der Lokalisation der Cherry-Raf-Bindedomäne nach EGF-Stimulation in An- und Abwesenheit von Palmostatin B, konnte gezeigt werden, dass durch Palmostatin B der Transport der aktivierten Ras Isoform zum Golgi-Apparat inhibiert wird. Hierdurch eröffnet sich die Möglichkeit, mit Hilfe von Palmostatin B die Signalweiterleitung über Ras an der Plasmamembran getrennt von der am Golgi-Apparat zu untersuchen.

Die Auswirkung der dauerhaften Inkubation mit Palmostatin B auf die Signalweiterleitung von onkogenem H-Ras, konnte mit Hilfe der MDCK-F3 Zelllinie untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen für 15 Stunden mit Palmostatin B bei einer Konzentration von 50 μM behandelt. Die hohe Konzentration stellte eine ausreichende Menge an Inhibitor zur Verfügung, so dass nach der Inkubationsdauer das onkogene H-Ras immer noch über die Endomembranen delokalisiert war. Die dauerhafte Delokalisierung beeinflusste die Signalweiterleitung von onkogenem H-Ras derart, dass die Zellen wieder zu dem epithelialen Phänotyp revertierten. Dies konnte durch Analyse der Morphologie und durch die Expression von E-Cadherin an der Membranoberfläche beobachtet werden. In Abschnitt 7.2.1 wurde die Abhängigkeit des charakteristischen Phänotyps der MDCK-F3 Zellen von der Signalweiterleitung über die Raf-MEK-ERK Kaskade diskutiert. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Signalweiterleitung von aktiviertem Ras in dieses Modul von der Plasmamembran und vom Golgi-Apparat aus erfolgt.^[102] Daher scheint die oben beschriebene Entkopplung zu einer Abschwächung des Signals zu führen, welches in der phänotypischen Änderung zur Geltung kam. Anhand von Western-Blots, bei denen die Anteile an phosphoryliertem ERK1/2 im Verhältnis zum Gesamtanteil von ERK1/2 detektiert wurden, konnte innerhalb von 40 min nach der Zugabe von Palmostatin B eine deutliche Reduktion von phosphoryliertem ERK1/2 beobachtet werden. Dies bestätigte somit die verminderte Signalweiterleitung über diese Kaskade und zeigt auch hier, dass für die Aufrechterhaltung des für EMT charakteristischen Phänotyps eine hyperaktivierte Signalweiterleitung über die Raf-MEK-ERK Kaskade

erforderlich ist.^[226] Die Entkopplung der Signalweiterleitung an der Plasmamembran von der am Golgi-Apparat, konnte anhand der Überexpression von onkogenem H-Ras in den MDCK-F3 Zellen gezeigt werden. Die Reduktion der ERK1/2 Phosphorylierung wurde in diesen Zellen erst nach 100 min detektiert. Die Überexpression von H-RasG12V führte nach der Zugabe von Palmostatin B zur Akkumulation einer viel größeren Menge dieses Proteins an der Plasmamembran als in untransfizierten MDCK-F3 Zellen. Die Signalweiterleitung von diesem Kompartiment aus war abgesättigt. Die einsetzende Delokalisierung reduzierte allmählich den Anteil von H-RasG12V an der Plasmamembran, bis die Menge für eine voll ausgelastete Signalweiterleitung unterschritten wurde. Dies dauerte in den überexprimierenden MDCK-F3 Zellen aus geschilderten Gründen länger. Hiermit wurde gezeigt, dass oncogenes H-Ras die Signalweiterleitung über die Raf-MEK-ERK Kaskade hauptsächlich von der Plasmamembran aus induziert. Darüber hinaus führt die Delokalisierung von onkogenem H-Ras durch Palmostatin B tatsächlich zu einer verminderten Signalweiterleitung über die Raf-MEK-ERK Kaskade. Dies bietet somit einen neuen vielversprechenden Ansatzpunkt um mit der Ras-abhängigen Signalweiterleitung zu interferieren. Besonders im Hinblick auf die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Krebstherapie, ist die Modulierung der Ras-abhängigen Signalweiterleitung ein vielversprechender Ansatz.^[175]

Somit konnten mit Hilfe dieses rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes erfolgreich die biologische Funktion von APT1 und damit einhergehend neue Eigenschaften des Ras Zyklus charakterisiert werden.

8. Zusammenfassung

Der Ansatz der Chemischen Genetik verfolgt das Ziel, niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, welche spezifisch die Funktionen von Proteinen in ihrem zellulären Kontext modulieren. Mit Hilfe dieser Verbindungen soll die Möglichkeit geschaffen werden, die Funktionen der Proteine innerhalb von biologischen Prozessen näher zu charakterisieren. Hiermit soll ihr komplexes Zusammenspiel, welches in seiner Gesamtheit das Phänomen Leben ausmacht sukzessiv entschlüsselt werden. Der dadurch geschaffene Erkenntnisgewinn kann somit als Grundlage für Ansätze dienen, welche die Heilung von Krankheiten, der Bereitstellung von Nahrungsgrundlagen oder der Überwindung von negativen Auswirkungen aufgrund von drastisch veränderten Umweltbedingungen zum Ziel haben.

Neben der Planung und Synthese von attraktiven Substanzbibliotheken stellt die Entwicklung und Bereitstellung von geeigneten Testsystemen zur Identifikation von aktiven Substanzen einen wichtigen Aspekt dieses Ansatzes dar. Hierbei erlauben zelluläre Testsysteme, die Wirkungsweisen der Verbindungen auf bestimmte Proteine innerhalb ihres natürlichen Kontextes zu betrachten.

In dieser Arbeit ist es gelungen drei verschiedene zelluläre Testsysteme zu etablieren, welche biologische Prozesse betrachten, die mitunter attraktive Ziele der Krebstherapie darstellen. Im Anschluss daran konnten mit diesen Assays aktive Substanzen innerhalb der abteilungseigenen Substanzbibliothek identifiziert werden. Durch weiterführende Untersuchungen konnten einige von ihnen in ihren biologischen Wirkungsweisen näher charakterisiert werden. Damit wurden Ausgangspunkte für die Synthese von aktiveren Derivaten dieser Verbindungen und Hinweise auf mögliche Zielproteine geschaffen.

Im Zusammenhang eines erfolgreichen rückwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes gelang die Charakterisierung der biologischen Funktion der Acylprotein thioesterase 1. Darüber hinaus konnte ihre Bedeutung auf die räumliche und zeitliche Modulation der Signalweiterleitung über N- und H-Ras erschlossen werden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen sich im Einzelnen wie folgt zusammenfassen:

1. Unter Verwendung der PathDetect[®] HLR-ELK1 Zelllinie der Firma Stratagene konnte ein Reportergen Assay etabliert werden, mit dem die Wirkungsweisen von Substanzen auf die EGF induzierte Signalweiterleitung bis zum Transkriptionsfaktor ELK1 untersucht werden können. Dieses Testsystem wurde erfolgreich auf ein 96-Loch-Platten Format miniaturisiert.

2. Es konnte ein phänotypischer Assay eingerichtet werden, der Substanzwirkungen auf das Cytoskelett und die DNA von BSC-1 Zellen detektiert. Durch die Verwendung eines automatisierten Fluoreszenzmikroskops und der Automatisierung von Substanzapplikationsprozeduren konnte dieses Testsystem auf ein 384-Loch-Platten Format miniaturisiert werden.
3. In Analoger Weise zu dem in Punkt 2 dargestellten Testsystem konnte unter Verwendung der MDCK-F3 Zelllinie ein weiterer phänotypischer Assay eingerichtet werden. Mit ihm werden Wirkungsweisen von Verbindungen auf die Signalweiterleitung durch onkogenes H-Ras anhand der Zellmorphologie erfasst. Auch dieses Testsystem konnte erfolgreich in einem 384-Loch-Platten Format angewendet werden.
4. Durch die Untersuchung einer Substanzbibliothek von 243 Tetrahydropyranen anhand des Reportergergen Assays konnten mehrere aktive Verbindungen identifiziert werden. Hiervon wurden die sieben aktivsten durch weitere biologischen Untersuchungen in ihrer Wirkungsweise näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass die meisten von ihnen ihren inhibitorischen Effekt auf das Reportergergsignal durch eine Induktion der Apoptose bewirkt haben. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der am stärksten apoptotisch wirkenden Substanz, ergaben erste Hinweise auf eine mögliche Mitose-arretierenden Wirkung und einer daraus resultierenden Induktion der Apoptose.
5. Bei der Untersuchung einer Substanzbibliothek von 50 α,β -ungesättigten δ -Lactonen im BSC-1 Cytoskelett Assay induzierten 14 Substanzen eine phänotypische Veränderung der Zellen. Hiervon war bei zwei Substanzen eine deutlich veränderte Spindelmorphologie und eine starke Falschausrichtung von Metaphasenchromosomen zu beobachten. Eine Substanz wirkte in höheren Konzentrationen auch auf das Aktinskelett. Zudem inhibierten sie bei einer Konzentration von 80 μM auch die Polymerisation *in vitro*. Die hohe Anzahl von aktiven Substanzen innerhalb dieser kleinen Bibliothek bestätigte die Effektivität des in dieser Abteilung verfolgten Konzepts der Naturstoff inspirierten Wirkstoffsynthese.

6. Die Untersuchung von mehreren Indolochinolizin Derivaten anhand des BSC-1 Cytoskelett Assays führte zur Identifikation von Verbindungen, welche die Tubulindynamik beeinflussen. In weiterführenden Untersuchungen unter Verwendung von Live Cell Imaging Aufnahmen konnte der induzierte Phänotyp in Abhängigkeit der Konzentration näher charakterisiert werden. Dies erlaubte darüber hinaus die Identifikation der aktivsten Substanzen und offenbarte deren enantiomerenspezifische Wirkung. Die aktivsten Substanzen inhibierten nicht die Tubulinpolymerisation *in vitro* und scheinen auf Prozesse zu wirken, welche mit der Verbindung von Spindelmikrotubuli mit den Kinetochoren der Chromosomen im Zusammenhang stehen. Bei höheren Konzentrationen führen sie zu der Entstehung von multipolaren Spindeln, was darauf schließen läßt, dass sie auf Proteine wirken, die bei der Stabilisierung der Tubulinfasern und der Centrosomenbildung eine bedeutende Rolle spielen.
7. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte die destabilisierende Wirkung von Prieurianin auf das Aktinskelett in Säugetierzellen bestätigt werden. Diese Substanzwirkung wurde im Rahmen einer Kooperation in Pflanzenzellen identifiziert. Prieurianin inhibierte nicht die Aktinpolymerisation *in vitro*. Es scheint daher auf Proteine zu wirken, die in Verbindung mit der Aktindynamik stehen und zwischen Pflanzen und Säugetieren konserviert sind.
8. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des Aktinskeletts von BSC-1 Zellen konnte erfolgreich eine Struktur-Aktivitäts-Studie von synthetisierten Chondramid C und drei isomeren Derivaten durchgeführt werden. Dies führte zur Identifikation von aktivitätsbeeinflussenden Stereozentren und Konformationen.
9. In einem Screen einer Substanzbibliothek, welche darauf ausgelegt ist die Vielfältigkeit der abteilungseigenen Substanzkollektion zu repräsentieren und aus 479 Verbindungen besteht, wurden in allen drei Testsystemen insgesamt 62 aktive Substanzen identifiziert. Durch einen Vergleich der Ergebnisse aus den jeweiligen Testsystemen konnten interessante Hinweise auf mögliche Wirkungsweisen der identifizierten Substanzen sowie weitere Aufschlüsse über die Eigenschaften der Testsysteme gewonnen werden.

10. Im Kontext eines rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes gelang die Synthese und Identifikation eines spezifischen Inhibitors der Acylprotein thioesterase 1 (APT1). Dieser wurde verwendet um die biologische Funktion von APT1 im Zusammenhang des De- und Repalmitoylierungs abhängigen Zyklus von N- und H-Ras zwischen Plasmamembran und Golgi-Apparat näher zu untersuchen. Es zeigte sich, dass durch Inhibition von APT1 *in vivo* die Depalmitoylierung dieser Isoformen inhibiert wird. Dies führte zu ihrem Austritt aus dem Zyklus und einer Entropie getriebenen Verteilung über alle Endomembranen. Die dadurch gestörte zeitliche und örtliche Modulation der Signalweiterleitung resultierte in einer verminderten Aktivierung der Raf-MEK-ERK Kaskade und einer Reversion des transformierten Phänotyps von MDCK-F3 Zellen. Mit diesen Studien konnten somit neue Ansätze zur Modulation einer onkogen aktivierten Signalweiterleitung von N- und H-Ras sowie neue Charakteristika des Ras-Zyklus entdeckt werden.

9. Ausblick

Durch die Etablierung der zellulären Testsysteme wurde die Möglichkeit geschaffen in der abteilungseigenen Substanzbibliothek Substanzen zu identifizieren, welche Wirkungsweisen auf die beobachteten zellulären Prozesse ausüben. Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Informationen über die Eigenschaften dieser Assays kann somit eine Strategie zur Verwendung der einzelnen Testsysteme in Verbindung mit den gezeigten und vorgeschlagenen Folgeuntersuchungen erstellt werden. Ein Vorschlag eines solchen Konzeptes ist in Abb. 63 gezeigt.

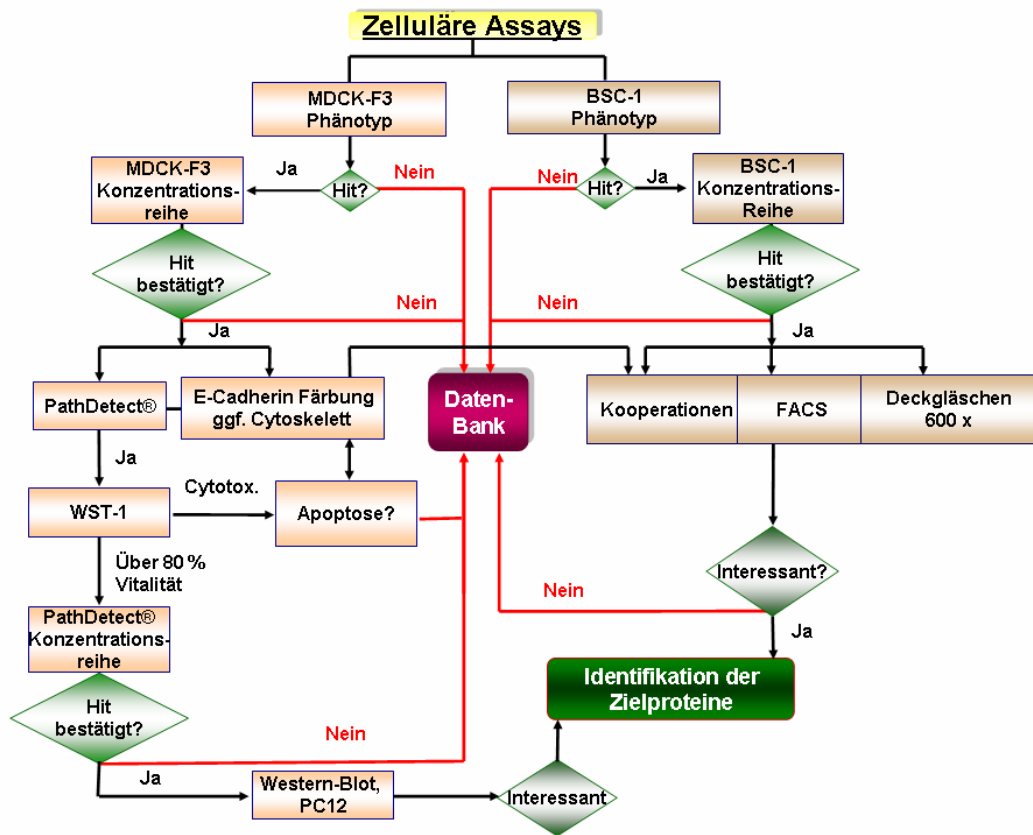


Abb. 63: Strategie zur Verwendung der etablierten Assays zur Identifikation von aktiven Substanzen in der abteilungseigenen Substanzbibliothek.

Hiermit sollte eine effektive Ausnutzung der mit diesen Testsystemen zu erhaltenen Informationen gewährleistet sein. Die weitere Untersuchung der in dieser Arbeit vorgestellten Wirkungsweisen wird in Zukunft womöglich neue Erkenntnisse über wichtige Proteinfunktion und die mit ihnen verbundenen zellulären Prozesse erbringen. Darüber hinaus wird die Synthese aufgrund von Struktur-Aktivitäts-Studien womöglich viel aktivere Derivate hervorbringen. Diese könnten eventuell neue Ansatzpunkte für die Medikamentenentwicklung sein.

10. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APT1	Acyl protein thioesterase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BIOS	Biologie-orientierte Synthese
(Btn)-BMCC	1-Biotinamido-4-[4'-(maleimidomethyl) cyclohexanecarboxamido]butan
BSA	Rinder-Serum-Albumin
ca.	circa
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin Kinase
c-Cbl	Casitas b-lineage lymphoma
Cdc42	cell division cycle 42
CDK	cyclin dependent kinase
ch-TOG	colonic and hepatic tumor over expressed gene
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOS	Diversitäts-orientierte Synthese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	epithelialen mesenchymalen Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular regulated kinase
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GFP	Green fluorescent
ggf.	gegebenenfalls

10. Abkürzungsverzeichnis

Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HURP	hepatoma up-regulated protein
lcmt	Isoprenylcystein carboxyl methyltransferase
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KSR	Kinase supressor of Ras
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEK	MAP/ERK-Kinase
min	Minute
MP1	MEK partner 1
MTOZ	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
NGF	Nerve growth factor
Noc	Nocodazol
PBS	Phosphate buffered saline
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PSSC	Protein Structure Similarity Clustering
PTKR	Proteintyrosinkinaserzeptoren
PVDV	Polyvinylidifluorid
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf	Rapid fibrosarcosis
Ras	Rat sarcoma
RBD	Raf-Binde-Domäne
Rce1	Ras converting enzyme 1
RFU	Relative Fluorescence Units
Rho	Ras-homology
RKIP	Raf kinase inhibitor protein
RLU	Relative light units
ROCK	Rho-associated kinase

10. Abkürzungsverzeichnis

rpm	revolutions per minute
SCONP	Structural Classification Of Natural Products,
Sef	Similar expression to fgf genes
SH2	Src-homology 2
siRNA	Small interfering RNA
sog.	sogenannte
SOS	Son-of-sevenless
TACC	transforming acidic coiled-coiled-containing
TBS	Tris buffered saline
TCF	Tenary complex transcription factors
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
WST	Water soluble tetrazolium
YFP	Yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

11. Literaturverzeichnis

- [1] *Nature* **2001**, 409, 860.
- [2] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. D. Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R.-R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Y. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M.-H. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, et al., *Science* **2001**, 291, 1304.
- [3] *Nature* **2004**, 431, 931.
- [4] L. H. Hartwell, *Genetics* **1991**, 129, 975.
- [5] S. Brenner, *Genetics* **1974**, 77, 71.
- [6] C. Nusslein-Volhard, E. Wieschaus, *Nature* **1980**, 287, 795.
- [7] B. R. Stockwell, *Trends Biotechnol* **2000**, 18, 449.
- [8] J. Parascandola, *J Hist Med Allied Sci* **1981**, 36, 19.
- [9] A. S. Travis, *Sci Context* **1989**, 3, 383.
- [10] T. J. Mitchison, *Chem Biol* **1994**, 1, 3.
- [11] S. L. Schreiber, *Bioorg Med Chem* **1998**, 6, 1127.
- [12] H. E. Blackwell, Y. Zhao, *Plant Physiol* **2003**, 133, 448.
- [13] N. J. Westwood, *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **2004**, 362, 2761.
- [14] K. Shokat, M. Velleca, *Drug Discovery Today* **2002**, 7, 872.
- [15] M. L. Shelanski, E. W. Taylor, *J Cell Biol* **1967**, 34, 549.
- [16] L. Whitesell, E. G. Mimnaugh, B. De Costa, C. E. Myers, L. M. Neckers, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, 8324.
- [17] P. Chardin, F. McCormick, *Cell* **1999**, 97, 153.
- [18] T. M. Kapoor, T. U. Mayer, M. L. Coughlin, T. J. Mitchison, *J Cell Biol* **2000**, 150, 975.
- [19] T. U. Mayer, T. M. Kapoor, S. J. Haggarty, R. W. King, S. L. Schreiber, T. J. Mitchison, *Science* **1999**, 286, 971.
- [20] R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med Res Rev* **1996**, 16, 3.
- [21] S. Goto, Y. Okuno, M. Hattori, T. Nishioka, M. Kanehisa, *Nucleic Acids Res* **2002**, 30, 402.
- [22] C. M. Dobson, *Nature* **2004**, 432, 824.
- [23] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, 41, 2879.
- [24] D. E. Root, S. P. Flaherty, B. P. Kelley, B. R. Stockwell, *Chem Biol* **2003**, 10, 881.
- [25] I. Smukste, B. R. Stockwell, *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2005**, 6, 261.
- [26] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J Nat Prod* **2007**, 70, 461.
- [27] A. Bender, S. Fergus, W. R. J. D. Galloway, F. G. Glansdorp, D. M. Marsden, R. L. Nicholson, R. J. Spandl, G. L. Thomas, E. E. Wyatt, R. C. Glen, D. R. Spring, in *Chemical Genomics* (Eds.: S. Jaroch, H. Weinmann), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2006**, pp. 47.
- [28] S. L. Schreiber, *Science* **2000**, 287, 1964.
- [29] M. D. Burke, S. L. Schreiber, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, 43, 46.

- [30] S. Hotha, J. C. Yarrow, J. G. Yang, S. Garrett, K. V. Renduchintala, T. U. Mayer, T. M. Kapoor, *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 2379.
- [31] M. A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaulta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 17272.
- [32] A. Noren-Muller, I. Reis-Correa, Jr., H. Prinz, C. Rosenbaum, K. Saxena, H. J. Schwalbe, D. Vestweber, G. Cagna, S. Schunk, O. Schwarz, H. Schiewe, H. Waldmann, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 10606.
- [33] F. J. Dekker, M. A. Koch, H. Waldmann, *Curr Opin Chem Biol* **2005**, *9*, 232.
- [34] M. A. Koch, H. Waldmann, *Drug Discov Today* **2005**, *10*, 471.
- [35] M. A. Koch, L. O. Wittenberg, S. Basu, D. A. Jeyaraj, E. Gourzoulidou, K. Reinecke, A. Odermatt, H. Waldmann, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 16721.
- [36] K. Hubel, T. Lessmann, H. Waldmann, *Chem Soc Rev* **2008**, *37*, 1361.
- [37] G. E. Ward, K. L. Carey, N. J. Westwood, *Cell Microbiol* **2002**, *4*, 471.
- [38] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, *J Biomol Screen* **1999**, *4*, 67.
- [39] T. U. Mayer, *Trends Cell Biol* **2003**, *13*, 270.
- [40] B. R. Stockwell, *Nat Rev Genet* **2000**, *1*, 116.
- [41] G. J. Ding, P. A. Fischer, R. C. Boltz, J. A. Schmidt, J. J. Colaianne, A. Gough, R. A. Rubin, D. K. Miller, *J Biol Chem* **1998**, *273*, 28897.
- [42] H. E. Pelish, N. J. Westwood, Y. Feng, T. Kirchhausen, M. D. Shair, *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 6740.
- [43] J. Inglese, R. L. Johnson, A. Simeonov, M. Xia, W. Zheng, C. P. Austin, D. S. Auld, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 466.
- [44] C. P. Hart, *Drug Discov Today* **2005**, *10*, 513.
- [45] X. S. Zheng, T. F. Chan, H. H. Zhou, *Chem Biol* **2004**, *11*, 609.
- [46] G. C. Terstappen, C. Schlupen, R. Raggiaschi, G. Gaviraghi, *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*, 891.
- [47] B. Suter, D. Auerbach, I. Stajlgjar, *Biotechniques* **2006**, *40*, 625.
- [48] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 198.
- [49] D. Guiffant, D. Tribouillard, F. Gug, H. Galons, L. Meijer, M. Blondel, S. Bach, *Biotechnol J* **2007**, *2*, 68.
- [50] L. Burdine, T. Kodadek, *Chem Biol* **2004**, *11*, 593.
- [51] P. P. Sche, K. M. McKenzie, J. D. White, D. J. Austin, *Chem Biol* **1999**, *6*, 707.
- [52] W. Van Criekinge, R. Beyaert, *Biol Proced Online* **1999**, *2*, 1.
- [53] E. J. Licitra, J. O. Liu, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 12817.
- [54] H. Zhu, M. Snyder, *Curr Opin Chem Biol* **2003**, *7*, 55.
- [55] L. J. Browne, L. M. Furness, G. Natsoulis, C. Pearson, K. Jarnagin, *TARGETS* **2002**, *1*, 59.
- [56] H. Towbin, K. W. Bair, J. A. DeCaprio, M. J. Eck, S. Kim, F. R. Kinder, A. Morollo, D. R. Mueller, P. Schindler, H. K. Song, J. van Oostrum, R. W. Versace, H. Voshol, J. Wood, S. Zabudoff, P. E. Phillips, *J Biol Chem* **2003**, *278*, 52964.
- [57] S. M. Watkins, J. B. German, *Curr Opin Mol Ther* **2002**, *4*, 224.
- [58] S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, *Biochem J* **2000**, *351*, 95.
- [59] P. A. Eyers, I. P. van den, R. A. Quinlan, M. Goedert, P. Cohen, *FEBS Lett* **1999**, *451*, 191.
- [60] C. S. Flordellis, A. S. Manolis, H. Paris, A. Karabinis, *Curr Top Med Chem* **2006**, *6*, 1791.
- [61] R. Kramer, D. Cohen, *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 965.
- [62] Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki, *Physiol Rev* **2001**, *81*, 153.
- [63] J. L. Bos, *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1333*, M19.
- [64] E. M. Scolnick, A. G. Papageorge, T. Y. Shih, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76*, 5355.
- [65] C. J. Der, T. G. Krontiris, G. M. Cooper, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982**, *79*, 3637.
- [66] A. Hall, C. J. Marshall, N. K. Spurr, R. A. Weiss, *Nature* **1983**, *303*, 396.

- [67] E. P. Reddy, R. K. Reynolds, E. Santos, M. Barbacid, *Nature* **1982**, 300, 149.
- [68] H. W. Alfred Wittinghofer, *Angewandte Chemie* **2000**, 39, 4192.
- [69] J. M. Shields, K. Pruitt, A. McFall, A. Shaub, C. J. Der, *Trends Cell Biol* **2000**, 10, 147.
- [70] M. Malumbres, M. Barbacid, *Nat Rev Cancer* **2003**, 3, 459.
- [71] J. Downward, *Nat Rev Cancer* **2003**, 3, 11.
- [72] C. Lenzen, R. H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1998**, 37, 7420.
- [73] H. H. Chung, D. R. Benson, V. W. Cornish, P. G. Schultz, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 10145.
- [74] D. R. Lowy, B. M. Willumsen, *Annu Rev Biochem* **1993**, 62, 851.
- [75] M. Trahey, F. McCormick, *Science* **1987**, 238, 542.
- [76] R. A. Weinberg, *The Biology of Cancer*, Garland Science, New York, **2007**.
- [77] B. M. Willumsen, K. Norris, A. G. Papageorge, N. L. Hubbert, D. R. Lowy, *EMBO J* **1984**, 3, 2581.
- [78] S. Clarke, J. P. Vogel, R. J. Deschenes, J. Stock, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, 85, 4643.
- [79] F. L. Zhang, P. J. Casey, *Annu Rev Biochem* **1996**, 65, 241.
- [80] S. Clarke, *Annu Rev Biochem* **1992**, 61, 355.
- [81] E. Kim, P. Ambroziak, J. C. Otto, B. Taylor, M. Ashby, K. Shannon, P. J. Casey, S. G. Young, *J Biol Chem* **1999**, 274, 8383.
- [82] Q. Dai, E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis, M. R. Philips, *J Biol Chem* **1998**, 273, 15030.
- [83] J. F. Hancock, K. Cadwallader, C. J. Marshall, *EMBO J* **1991**, 10, 641.
- [84] E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, M. R. Philips, *Cell* **1999**, 98, 69.
- [85] T. Magee, C. Marshall, *Cell* **1999**, 98, 9.
- [86] O. Rocks, A. Peyker, M. Kahms, P. J. Vermeer, C. Koerner, M. Lumbierres, J. Kuhlmann, H. Waldmann, A. Wittinghofer, P. I. Bastiaens, *Science* **2005**, 307, 1746.
- [87] A. Mor, M. R. Philips, *Annu Rev Immunol* **2006**, 24, 771.
- [88] J. Schlessinger, *Cell* **2002**, 110, 669.
- [89] L. Buday, J. Downward, *Cell* **1993**, 73, 611.
- [90] D. Abraham, K. Podar, M. Pacher, M. Kubicek, N. Welzel, B. A. Hemmings, S. M. Dilworth, H. Mischak, W. Kolch, M. Baccarini, *J Biol Chem* **2000**, 275, 22300.
- [91] H. Chong, J. Lee, K. L. Guan, *EMBO J* **2001**, 20, 3716.
- [92] P. Dent, W. Haser, T. A. Haystead, L. A. Vincent, T. M. Roberts, T. W. Sturgill, *Science* **1992**, 257, 1404.
- [93] W. Huang, A. Alessandrini, C. M. Crews, R. L. Erikson, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 10947.
- [94] J. M. Kyriakis, H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, J. Avruch, *Nature* **1992**, 358, 417.
- [95] R. Seger, E. G. Krebs, *FASEB J* **1995**, 9, 726.
- [96] W. Kolch, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, 6, 827.
- [97] S. Yoon, R. Seger, *Growth Factors* **2006**, 24, 21.
- [98] H. Gille, A. D. Sharrocks, P. E. Shaw, *Nature* **1992**, 358, 414.
- [99] R. Marais, J. Wynne, R. Treisman, *Cell* **1993**, 73, 381.
- [100] W. Kolch, A. Kotwaliwale, K. Vass, P. Janosch, *Expert Rev Mol Med* **2002**, 4, 1.
- [101] G. M. Di Guglielmo, P. C. Baass, W. J. Ou, B. I. Posner, J. J. Bergeron, *EMBO J* **1994**, 13, 4269.
- [102] V. K. Chiu, T. Bivona, A. Hach, J. B. Sajous, J. Silletti, H. Wiener, R. L. Johnson, 2nd, A. D. Cox, M. R. Philips, *Nat Cell Biol* **2002**, 4, 343.
- [103] A. Peyker, O. Rocks, P. I. Bastiaens, *ChemBiochem* **2005**, 6, 78.
- [104] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J Biol Chem* **1998**, 273, 15830.

- [105] J. A. Duncan, A. G. Gilman, *J Biol Chem* **2002**, 277, 31740.
- [106] T. G. Bivona, M. R. Philips, *Curr Opin Cell Biol* **2003**, 15, 136.
- [107] M. A. Jordan, L. Wilson, *Nat Rev Cancer* **2004**, 4, 253.
- [108] S. Honore, E. Pasquier, D. Braguer, *Cell Mol Life Sci* **2005**, 62, 3039.
- [109] M. A. Jordan, K. Kamath, *Curr Cancer Drug Targets* **2007**, 7, 730.
- [110] M. A. Jordan, L. Wilson, *Curr Opin Cell Biol* **1998**, 10, 123.
- [111] J. S. Allingham, V. A. Klenchin, I. Rayment, *Cell Mol Life Sci* **2006**, 63, 2119.
- [112] A. Giganti, E. Friederich, *Prog Cell Cycle Res* **2003**, 5, 511.
- [113] A. Disanza, A. Steffen, M. Hertzog, E. Frittoli, K. Rottner, G. Scita, *Cell Mol Life Sci* **2005**, 62, 955.
- [114] S. Doxsey, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, 2, 688.
- [115] B. Alberts, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition*, Garland Science, New York, **2002**.
- [116] J. Pines, C. L. Rieder, *Nat Cell Biol* **2001**, 3, E3.
- [117] M. Glotzer, *Science* **2005**, 307, 1735.
- [118] J. R. Jackson, D. R. Patrick, M. M. Dar, P. S. Huang, *Nat Rev Cancer* **2007**, 7, 107.
- [119] E. A. Nigg, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, 2, 21.
- [120] M. Malumbres, M. Barbacid, *Nat Rev Cancer* **2001**, 1, 222.
- [121] L. H. Hartwell, T. A. Weinert, *Science* **1989**, 246, 629.
- [122] N. Rhind, P. Russell, *Curr Biol* **2000**, 10, R908.
- [123] A. Musacchio, K. G. Hardwick, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**, 3, 731.
- [124] G. J. Kops, B. A. Weaver, D. W. Cleveland, *Nat Rev Cancer* **2005**, 5, 773.
- [125] T. Mosmann, *J Immunol Methods* **1983**, 65, 55.
- [126] T. Fernandes-Alnemri, R. C. Armstrong, J. Krebs, S. M. Srinivasula, L. Wang, F. Bullrich, L. C. Fritz, J. A. Trapani, K. J. Tomaselli, G. Litwack, E. S. Alnemri, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, 7464.
- [127] D. W. Nicholson, A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik, et al., *Nature* **1995**, 376, 37.
- [128] M. Tewari, L. T. Quan, K. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D. R. Beidler, G. G. Poirier, G. S. Salvesen, V. M. Dixit, *Cell* **1995**, 81, 801.
- [129] N. A. Thornberry, H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins, et al., *Nature* **1992**, 356, 768.
- [130] G. M. Cohen, *Biochem J* **1997**, 326 (Pt 1), 1.
- [131] R. Bertrand, E. Solary, P. O'Connor, K. W. Kohn, Y. Pommier, *Exp Cell Res* **1994**, 211, 314.
- [132] M. D. Jacobsen, M. Weil, M. C. Raff, *J Cell Biol* **1996**, 133, 1041.
- [133] M. M. Bradford, *Anal Biochem* **1976**, 72, 248.
- [134] S. J. Compton, C. G. Jones, *Anal Biochem* **1985**, 151, 369.
- [135] U. Sjobring, L. Bjorck, W. Kastern, *J Biol Chem* **1991**, 266, 399.
- [136] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680.
- [137] J. Renart, J. Reiser, G. R. Stark, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, 76, 3116.
- [138] M. Castoldi, A. V. Popov, *Protein Expr Purif* **2003**, 32, 83.
- [139] B. R. Kelemen, K. Hsiao, S. A. Goueli, *J Biol Chem* **2002**, 277, 8741.
- [140] M. S. Chang, B. C. Chen, M. T. Yu, J. R. Sheu, T. F. Chen, C. H. Lin, *Cell Signal* **2005**, 17, 299.
- [141] A. Gazit, P. Yaish, C. Gilon, A. Levitzki, *J Med Chem* **1989**, 32, 2344.
- [142] A. Levitzki, A. Gazit, *Science* **1995**, 267, 1782.
- [143] R. M. Lyall, A. Zilberstein, A. Gazit, C. Gilon, A. Levitzki, J. Schlessinger, *J Biol Chem* **1989**, 264, 14503.
- [144] M. A. Jordan, D. Thrower, L. Wilson, *J Cell Sci* **1992**, 102 (Pt 3), 401.
- [145] A. L. Rampal, H. B. Pinkofsky, C. Y. Jung, *Biochemistry* **1980**, 19, 679.
- [146] P. Sampath, T. D. Pollard, *Biochemistry* **1991**, 30, 1973.

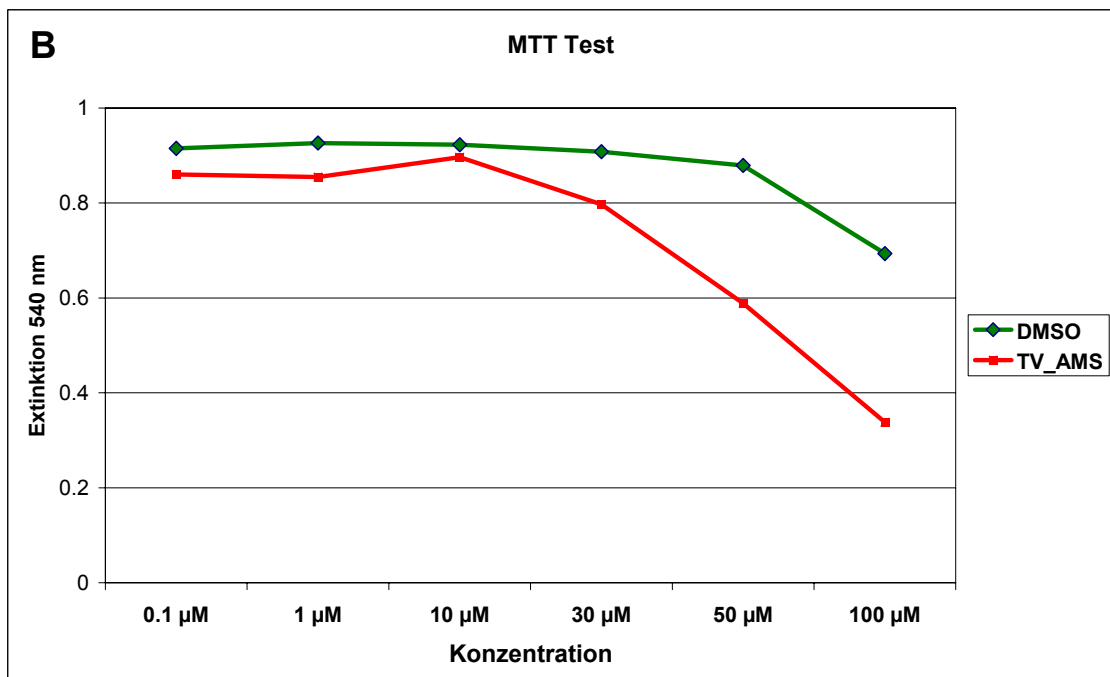
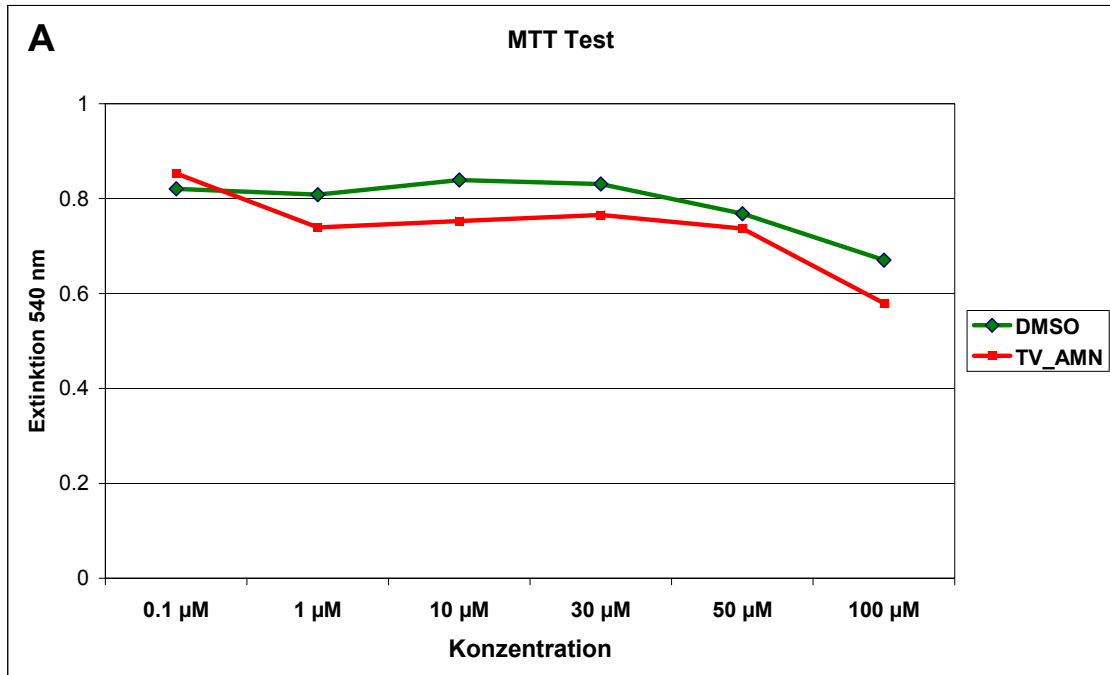
- [147] A. T. Demiryurek, S. Demiryurek, *Auton Autacoid Pharmacol* **2005**, *25*, 35.
- [148] J. Behrens, M. M. Mareel, F. M. Van Roy, W. Birchmeier, *J Cell Biol* **1989**, *108*, 2435.
- [149] I. M. Karaguni, P. Herter, P. Debruyne, S. Chtarbova, A. Kasprzyński, U. Herbrand, M. R. Ahmadian, K. H. Glusenkamp, G. Winde, M. Mareel, T. Moroy, O. Müller, *Cancer Res* **2002**, *62*, 1718.
- [150] M. F. Favata, K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, W. S. Feeser, D. E. Van Dyk, W. J. Pitts, R. A. Earl, F. Hobbs, R. A. Copeland, R. L. Magolda, P. A. Scherle, J. M. Trzaskos, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18623.
- [151] T. Usui, *Biosci Biotechnol Biochem* **2007**, *71*, 300.
- [152] T. Lessmann, M. G. Leuenberger, S. Menninger, M. Lopez-Canet, O. Müller, S. Hummer, J. Bormann, K. Korn, E. Fava, M. Zerial, T. U. Mayer, H. Waldmann, *Chem Biol* **2007**, *14*, 443.
- [153] A. Duflos, A. Kruczyński, J. M. Barret, *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2002**, *2*, 55.
- [154] J. Gertsch, S. Meier, N. Tschopp, K.-H. Altmann, *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2007**, *61*, 368.
- [155] D. A. Gewirtz, *Biochemical Pharmacology* **1999**, *57*, 727.
- [156] T. Mizoguchi, L. Wright, S. Fujiwara, F. Cremer, K. Lee, H. Onouchi, A. Mouradov, S. Fowler, H. Kamada, J. Putterill, G. Coupland, *Plant Cell* **2005**, *17*, 2255.
- [157] E. L. Martin-Tryon, J. A. Kreps, S. L. Harmer, *Plant Physiol* **2007**, *143*, 473.
- [158] J. Paltiel, R. Amin, A. Gover, N. Ori, A. Samach, *Planta* **2006**, *224*, 1255.
- [159] F. Baluska, J. Jasik, H. G. Edelman, T. Salajova, D. Volkmann, *Dev Biol* **2001**, *231*, 113.
- [160] M. Lorenz, D. Popp, K. C. Holmes, *J Mol Biol* **1993**, *234*, 826.
- [161] T. Oda, K. Namba, Y. Maeda, *Biophys J* **2005**, *88*, 2727.
- [162] M. O. Steinmetz, D. Stoffler, S. A. Müller, W. Jahn, B. Wolpensinger, K. N. Goldie, A. Engel, H. Faulstich, U. Aebi, *J Mol Biol* **1998**, *276*, 1.
- [163] H. Waldmann, T. S. Hu, S. Renner, S. Menninger, R. Tannert, T. Oda, H. D. Arndt, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 6473.
- [164] M. R. Bubb, I. Spector, B. B. Beyer, K. M. Fosen, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 5163.
- [165] B. Kunze, R. Jansen, F. Sasse, G. Hofle, H. Reichenbach, *J Antibiot (Tokyo)* **1995**, *48*, 1262.
- [166] F. Sasse, B. Kunze, T. M. Gronewold, H. Reichenbach, *J Natl Cancer Inst* **1998**, *90*, 1559.
- [167] I. Spector, F. Braet, N. R. Shochet, M. R. Bubb, *Microsc Res Tech* **1999**, *47*, 18.
- [168] A. Panzer, A. M. Joubert, P. C. Bianchi, E. Hamel, J. C. Seegers, *Eur J Cell Biol* **2001**, *80*, 111.
- [169] J. Wolff, L. Knipling, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13334.
- [170] M. D. Resh, *Methods* **2006**, *40*, 191.
- [171] D. C. Yeh, J. A. Duncan, S. Yamashita, T. Michel, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 33148.
- [172] E. K. Weibel, P. Hadvary, E. Hochuli, E. Kupfer, H. Lengsfeld, *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, *40*, 1081.
- [173] O. Rocks, A. Peyker, P. I. Bastiaens, *Curr Opin Cell Biol* **2006**, *18*, 351.
- [174] D. Matallanas, V. Sanz-Moreno, I. Arozarena, F. Calvo, L. Agudo-Ibanez, E. Santos, M. T. Berciano, P. Crespo, *Mol Cell Biol* **2006**, *26*, 100.
- [175] M. Takeichi, *Curr Opin Cell Biol* **1993**, *5*, 806.
- [176] R. C. Drisdell, W. N. Green, *Biotechniques* **2004**, *36*, 276.
- [177] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57.
- [178] G. Buchwalter, C. Gross, B. Wasyluk, *Gene* **2004**, *324*, 1.
- [179] J. Mendelsohn, J. Baselga, *Oncogene* **2000**, *19*, 6550.
- [180] J. S. Sebolt-Leopold, R. Herrera, *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 937.

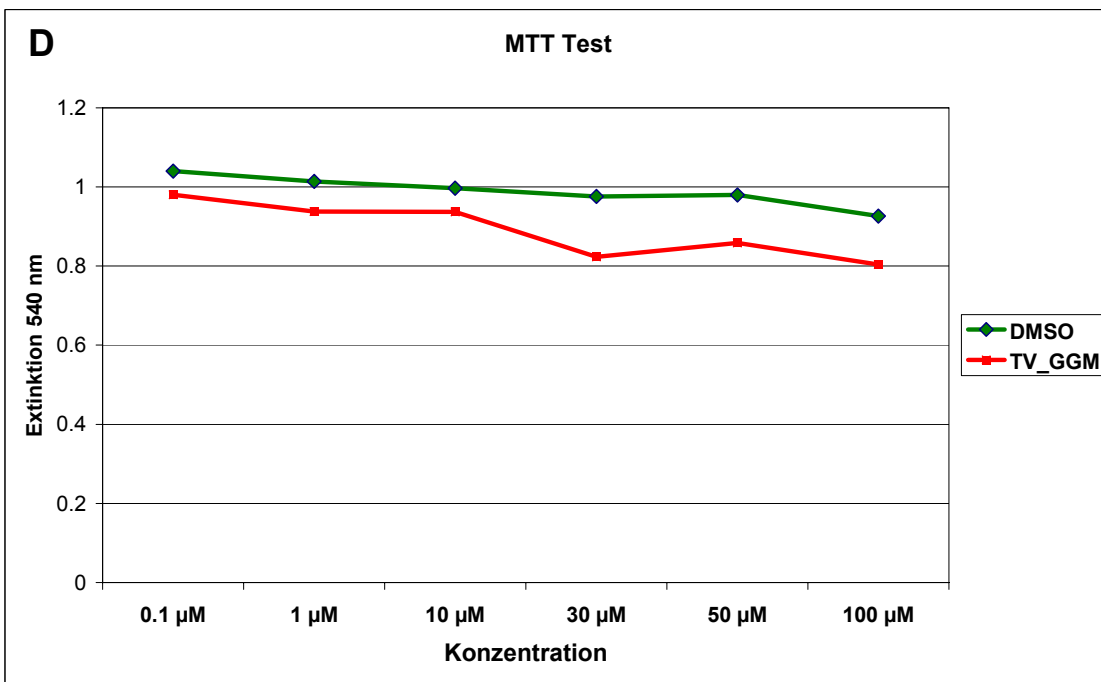
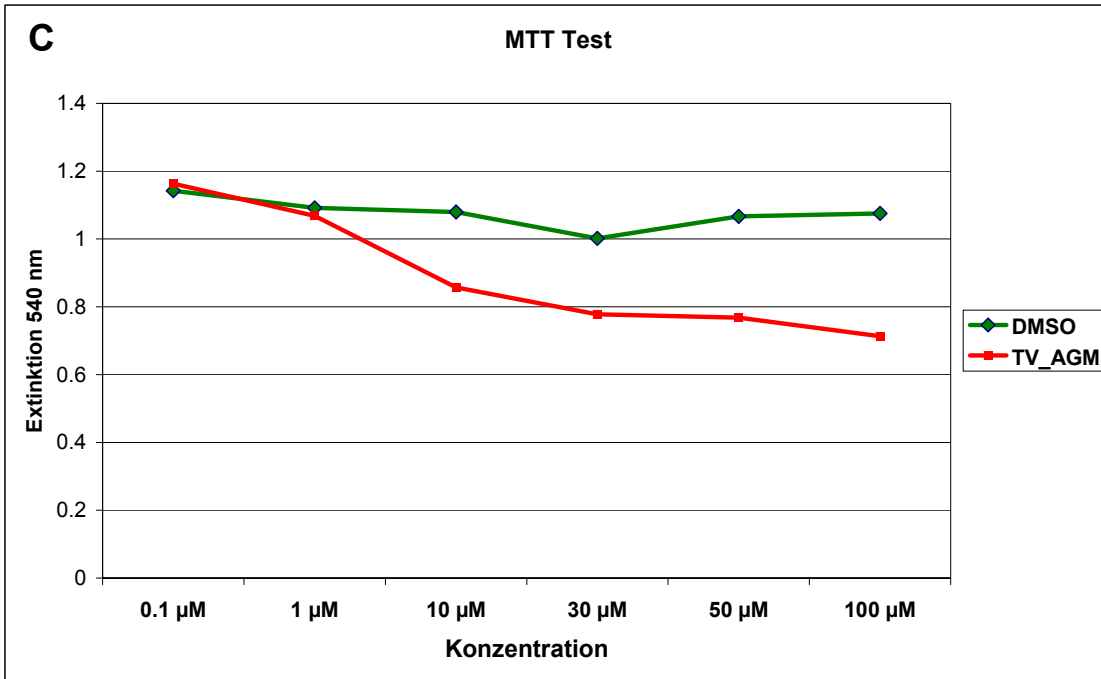
- [181] P. M. Blumberg, S. Jaken, B. Konig, N. A. Sharkey, K. L. Leach, A. Y. Jeng, E. Yeh, *Biochem Pharmacol* **1984**, *33*, 933.
- [182] N. A. Sharkey, K. L. Leach, P. M. Blumberg, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81*, 607.
- [183] J. Koivunen, V. Aaltonen, J. Peltonen, *Cancer Lett* **2006**, *235*, 1.
- [184] D. C. Schonwasser, R. M. Marais, C. J. Marshall, P. J. Parker, *Mol Cell Biol* **1998**, *18*, 790.
- [185] Y. Nishizuka, *Science* **1992**, *258*, 607.
- [186] Y. Nishizuka, *FASEB J* **1995**, *9*, 484.
- [187] L. Paolucci, E. Rozengurt, *Cancer Res* **1999**, *59*, 572.
- [188] J. L. Zugaza, J. Sinnett-Smith, J. Van Lint, E. Rozengurt, *EMBO J* **1996**, *15*, 6220.
- [189] B. M. Burgering, A. M. de Vries-Smits, R. H. Medema, P. C. van Weeren, L. G. Tertoolen, J. L. Bos, *Mol Cell Biol* **1993**, *13*, 7248.
- [190] M. Hoshi, E. Nishida, H. Sakai, *Eur J Biochem* **1989**, *184*, 477.
- [191] A. J. Rossomando, D. M. Payne, M. J. Weber, T. W. Sturgill, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86*, 6940.
- [192] S. Nishibe, M. I. Wahl, S. M. Hernandez-Sotomayor, N. K. Tonks, S. G. Rhee, G. Carpenter, *Science* **1990**, *250*, 1253.
- [193] D. Rotin, B. Margolis, M. Mohammadi, R. J. Daly, G. Daum, N. Li, E. H. Fischer, W. H. Burgess, A. Ullrich, J. Schlessinger, *EMBO J* **1992**, *11*, 559.
- [194] K. Yeung, T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy, W. Kolch, *Nature* **1999**, *401*, 173.
- [195] K. C. Corbit, N. Trakul, E. M. Eves, B. Diaz, M. Marshall, M. R. Rosner, *J Biol Chem* **2003**, *278*, 13061.
- [196] L. L. Lin, M. Wartmann, A. Y. Lin, J. L. Knopf, A. Seth, R. J. Davis, *Cell* **1993**, *72*, 269.
- [197] T. Shinomura, Y. Asaoka, M. Oka, K. Yoshida, Y. Nishizuka, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 5149.
- [198] U. S. Bhalla, R. Iyengar, *Science* **1999**, *283*, 381.
- [199] C. J. Marshall, *Cell* **1995**, *80*, 179.
- [200] N. Brose, C. Rosenmund, *J Cell Sci* **2002**, *115*, 4399.
- [201] Z. Lu, D. Liu, A. Hornia, W. Devonish, M. Pagano, D. A. Foster, *Mol Cell Biol* **1998**, *18*, 839.
- [202] J. C. Adams, W. J. Gullick, *Biochem J* **1989**, *257*, 905.
- [203] M. D. Marmor, Y. Yarden, *Oncogene* **2004**, *23*, 2057.
- [204] B. Schoeberl, C. Eichler-Jonsson, E. D. Gilles, G. Muller, *Nat Biotechnol* **2002**, *20*, 370.
- [205] T. Nagashima, H. Shimodaira, K. Ide, T. Nakakuki, Y. Tani, K. Takahashi, N. Yumoto, M. Hatakeyama, *J Biol Chem* **2007**, *282*, 4045.
- [206] G. Liu, M. T. Swihart, S. Neelamegham, *Bioinformatics* **2005**, *21*, 1194.
- [207] J. M. Haugh, K. Schooler, A. Wells, H. S. Wiley, D. A. Lauffenburger, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 8958.
- [208] J. Bao, I. Alroy, H. Waterman, E. D. Schejter, C. Brodie, J. Gruenberg, Y. Yarden, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 26178.
- [209] M. J. Robinson, M. H. Cobb, *Curr Opin Cell Biol* **1997**, *9*, 180.
- [210] M. R. Frey, R. S. Dize, K. L. Edelblum, D. B. Polk, *EMBO J* **2006**, *25*, 5683.
- [211] J. Inostroza, L. Saenz, G. Calaf, G. Cabello, E. Parra, *Biol Res* **2005**, *38*, 163.
- [212] J. S. Yordy, R. C. Muise-Helmericks, *Oncogene* **2000**, *19*, 6503.
- [213] J. M. Schmitt, G. A. Wayman, N. Nozaki, T. R. Soderling, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24064.
- [214] J. Tian, M. Karin, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 15173.
- [215] J. V. Duncia, J. B. Santella, 3rd, C. A. Higley, W. J. Pitts, J. Wityak, W. E. Fietze, F. W. Rankin, J. H. Sun, R. A. Earl, A. C. Tabaka, C. A. Teleha, K. F. Blom, M. F. Favata, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, K. Horiuchi, R.

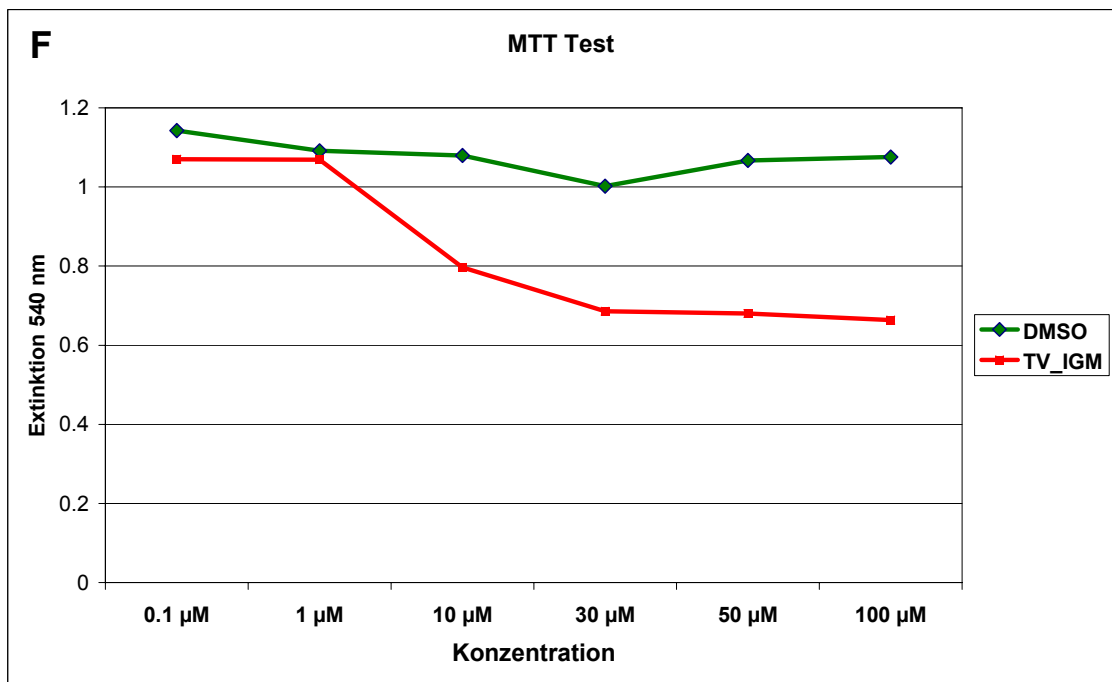
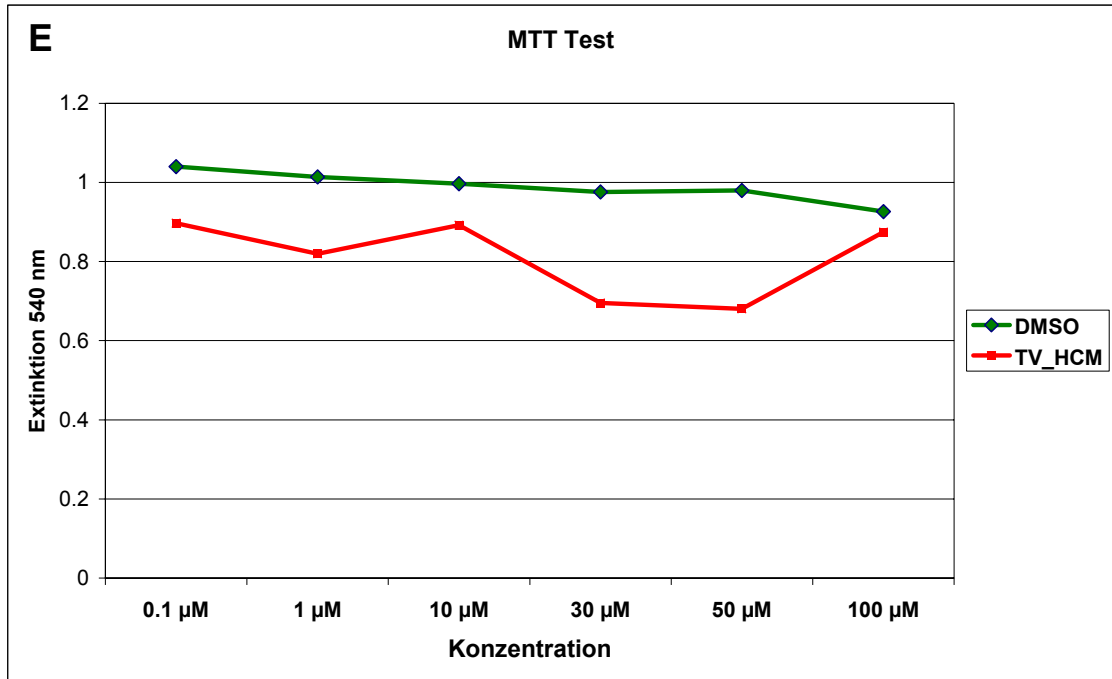
- A. Copeland, P. A. Scherle, J. M. Trzaskos, R. L. Magolda, G. L. Trainor, R. R. Wexler, F. W. Hobbs, R. E. Olson, *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8*, 2839.
- [216] C. A. Faaland, F. H. Mermelstein, J. Hayashi, J. D. Laskin, *Mol Cell Biol* **1991**, *11*, 2697.
- [217] W. K. Agbotounou, S. Mousset, S. Piperno, M. Pierre, A. Jacquemin-Sablon, J. Pierre, *Biochem Pharmacol* **1994**, *48*, 505.
- [218] F. Nowak, A. Jacquemin-Sablon, J. Pierre, *Biochem Pharmacol* **1997**, *53*, 287.
- [219] G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, M. H. Cobb, *Endocr Rev* **2001**, *22*, 153.
- [220] J. D. Lane, V. J. Allan, P. G. Woodman, *J Cell Sci* **2005**, *118*, 4059.
- [221] A. D. Cox, C. J. Der, *Oncogene* **2003**, *22*, 8999.
- [222] J. Downward, *Curr Opin Genet Dev* **1998**, *8*, 49.
- [223] C. E. Canman, M. B. Kastan, *Nature* **1996**, *384*, 213.
- [224] M. J. Clemens, M. Bushell, I. W. Jeffrey, V. M. Pain, S. J. Morley, *Cell Death Differ* **2000**, *7*, 603.
- [225] J. P. Thiery, *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 442.
- [226] S. Grunert, M. Jechlinger, H. Beug, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *4*, 657.
- [227] C. Cordon-Cardo, C. Prives, *J Exp Med* **1999**, *190*, 1367.
- [228] J. P. Thiery, J. P. Sleeman, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 131.
- [229] E. Janda, K. Lehmann, I. Killisch, M. Jechlinger, M. Herzig, J. Downward, H. Beug, S. Grunert, *J Cell Biol* **2002**, *156*, 299.
- [230] E. Janda, G. Litos, S. Grunert, J. Downward, H. Beug, *Oncogene* **2002**, *21*, 5148.
- [231] V. Bolos, H. Peinado, M. A. Perez-Moreno, M. F. Fraga, M. Esteller, A. Cano, *J Cell Sci* **2003**, *116*, 499.
- [232] C. R. Schmidt, Y. J. Gi, T. A. Patel, R. J. Coffey, R. D. Beauchamp, A. S. Pearson, *Surgery* **2005**, *138*, 306.
- [233] B. De Craene, F. van Roy, G. Berx, *Cell Signal* **2005**, *17*, 535.
- [234] A. Hall, *Science* **1998**, *279*, 509.
- [235] A. K. Pullikuth, A. D. Catling, *Cell Signal* **2007**, *19*, 1621.
- [236] E. Sahai, M. F. Olson, C. J. Marshall, *EMBO J* **2001**, *20*, 755.
- [237] E. Vial, E. Sahai, C. J. Marshall, *Cancer Cell* **2003**, *4*, 67.
- [238] T. J. Mitchison, *Chembiochem* **2005**, *6*, 33.
- [239] C. Conrad, H. Erfle, P. Warnat, N. Daigle, T. Lorch, J. Ellenberg, R. Pepperkok, R. Eils, *Genome Res* **2004**, *14*, 1130.
- [240] R. Pepperkok, J. Ellenberg, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7*, 690.
- [241] G. Rabut, J. Ellenberg, *J Microsc* **2004**, *216*, 131.
- [242] X. Chen, M. Velliste, R. F. Murphy, *Cytometry A* **2006**, *69*, 631.
- [243] K. Huang, R. F. Murphy, *BMC Bioinformatics* **2004**, *5*, 78.
- [244] L. A. Collet, M. T. Davies, D. E. A. Rivett, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1998**, *75*, 182.
- [245] M. T. Davies, D. E. A. Rivett, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1989**, *55*, 1.
- [246] M. Kalesse, M. Christmann, *Synthesis* **2002**, *2002*, 0981.
- [247] D. S. Lewy, C. M. Gauss, D. R. Soenen, D. L. Boger, *Curr Med Chem* **2002**, *9*, 2005.
- [248] P. V. Ramachandran, M. V. R. Reddy, H. C. Brown, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 583.
- [249] H. Watanabe, H. Watanabe, M. Bando, M. Kido, T. Kitahara, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 9755.
- [250] W. Wang, L. Chen, Y. Ding, J. Jin, K. Liao, *J Cell Sci* **2008**, *121*, 1334.
- [251] J. Wong, G. Fang, *J Cell Biol* **2006**, *173*, 879.
- [252] A. Wilde, *J Cell Biol* **2006**, *173*, 829.
- [253] D. L. Gard, M. W. Kirschner, *J Cell Biol* **1987**, *105*, 2203.
- [254] J. Howard, A. A. Hyman, *Curr Opin Cell Biol* **2007**, *19*, 31.
- [255] A. V. Popov, F. Severin, E. Karsenti, *Curr Biol* **2002**, *12*, 1326.
- [256] F. Gergely, V. M. Draviam, J. W. Raff, *Genes Dev* **2003**, *17*, 336.

- [257] C. F. Cullen, H. Ohkura, *Nat Cell Biol* **2001**, 3, 637.
- [258] M. J. Lee, F. Gergely, K. Jeffers, S. Y. Peak-Chew, J. W. Raff, *Nat Cell Biol* **2001**, 3, 643.
- [259] F. Gergely, *Bioessays* **2002**, 24, 915.
- [260] U. de Lichtenberg, L. J. Jensen, S. Brunak, P. Bork, *Science* **2005**, 307, 724.
- [261] M. L. Whitfield, G. Sherlock, A. J. Saldanha, J. I. Murray, C. A. Ball, K. E. Alexander, J. C. Matese, C. M. Perou, M. M. Hurt, P. O. Brown, D. Botstein, *Mol Biol Cell* **2002**, 13, 1977.
- [262] A. B. D'Assoro, W. L. Lingle, J. L. Salisbury, *Oncogene* **2002**, 21, 6146.
- [263] K. Fukasawa, *Nat Rev Cancer* **2007**, 7, 911.
- [264] I. Spector, N. R. Shochet, D. Blasberger, Y. Kashman, *Cell Motil Cytoskeleton* **1989**, 13, 127.
- [265] C. J. Staiger, L. Blanchoin, *Curr Opin Plant Biol* **2006**, 9, 554.
- [266] Y. Devedjiev, Z. Dauter, S. R. Kuznetsov, T. L. Jones, Z. S. Derewenda, *Structure* **2000**, 8, 1137.
- [267] P. Hadvary, W. Sidler, W. Meister, W. Vetter, H. Wolfer, *J Biol Chem* **1991**, 266, 2021.
- [268] P. Deck, D. Pendzialek, M. Biel, M. Wagner, B. Popkirova, B. Ludolph, G. Kragol, J. Kuhlmann, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, 44, 4975.
- [269] M. P. Gerauer, *Dissertation* **2008**.
- [270] A. E.-D. El-Husseini, E. Schnell, S. Dakoji, N. Sweeney, Q. Zhou, O. Prange, C. Gauthier-Campbell, A. Aguilera-Moreno, R. A. Nicoll, D. S. Bredt, *Cell* **2002**, 108, 849.
- [271] C. S. Fishburn, P. Herzmark, J. Morales, H. R. Bourne, *J Biol Chem* **1999**, 274, 18793.
- [272] M. E. Linder, R. J. Deschenes, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, 8, 74.
- [273] W. van't Hof, M. D. Resh, *J Cell Biol* **1997**, 136, 1023.
- [274] T. L. Baker, H. Zheng, J. Walker, J. L. Coloff, J. E. Buss, *J Biol Chem* **2003**, 278, 19292.
- [275] J. Y. Lu, S. L. Hofmann, *J Biol Chem* **1995**, 270, 7251.
- [276] J. R. Silvius, A. S. Sidney, J. M. Thomas, in *Current Topics in Membranes*, Vol. Volume 52, Academic Press, **2002**, pp. 371.

12. Anhang







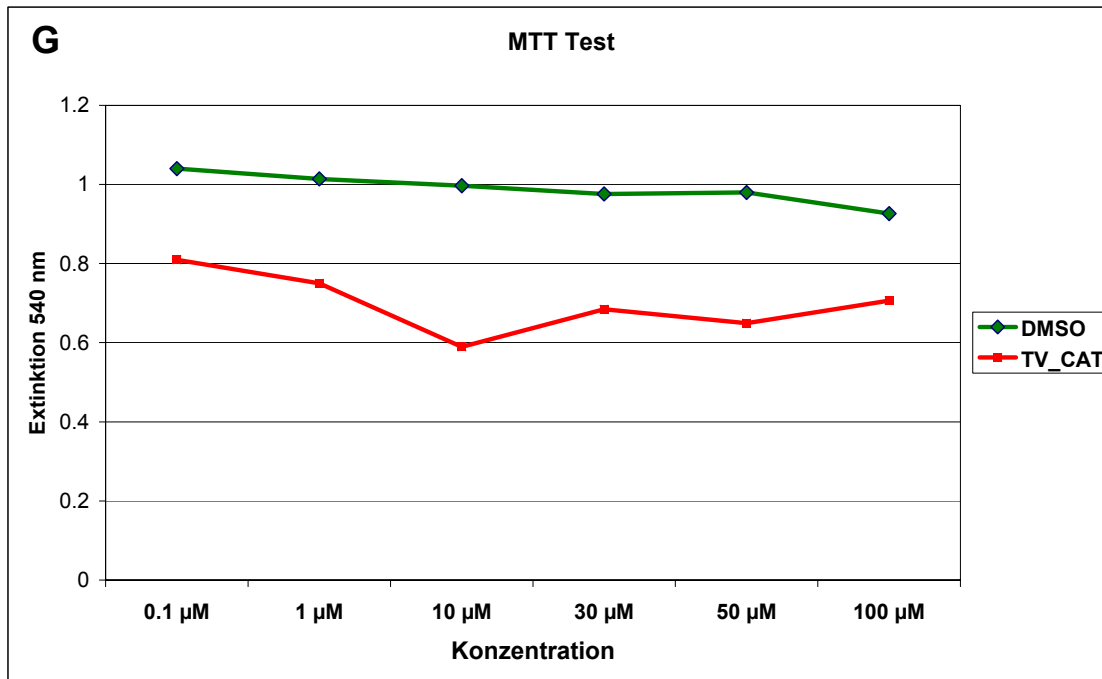


Abb. 64: Ergebnisse der MTT-Tests mit den aktivsten Substanzen der im Reporter-gen Assay getesteten Tetrahydropyran Bibliothek.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, anregende Diskussionen, aufmunternde Worte und die Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Roger Goody möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. Oliver Müller danke ich besonders für die Bereitstellung eines Laborplatzes und die Betreuung meiner Arbeit in der Anfangszeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch der ehemaligen Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Oliver Müller, insbesondere Sonja Röhrs, Dr. Sonja Sievers, Annica Vlad, Oliver Hauss, Ingrid Hoffmann und Carolin Koerner für die freundliche Aufnahme des „Fremden“ in ihrem Labor, das nette Arbeitsklima sowie für die ständige Hilfsbereitschaft danken. Mein ganz besonderer Dank gilt hier Anette Langerak für die Einführung in die Methoden der Zellkultur, viele spannenden Stunden im Labor und viele schöne Gespräche während meiner ganzen Zeit am Institut. Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Sabine Arndt und Dr. Katja Hübel für die weitere Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas U. Mayer und seiner ganzen Arbeitsgruppe danke ich für die Gastfreundschaft, die gute Kooperation und für die schöne Zeit in Martinsried.

Herrn Prof. Dr. Anthony A. Hyman, seinen Mitarbeiter Dr. Alex Bird und Dr. Zoltan Maliga danke ich ebenfalls für die Gastfreundschaft, die Unterstützung bei der Durchführung der Life Cell Imaging Aufnahmen und die schöne Zeit in Dresden.

Herrn Prof. Dr. Philippe Bastiaens, Nachiket Vartak und Dr. Oliver Rocks danke ich für die enge Kooperation und Diskussionsbereitschaft.

Den Mitarbeitern der Abteilung Waldmann, vor allem meinen Bürokollegen Dirk Pendzialek, Bernhard Ellinger, Karin Warburg und Tanja Knoth sei für die gute Atmosphäre, die vielen Diskussionen und die vielen schönen Erlebnisse auch außerhalb des Instituts gedankt. Matthias Riedrich möchte ich in diesem Zusammenhang ganz besonders für die gemeinsame Zeit während des Verfassens dieses Manuskripts bedanken. Diese Nachtschichten werden uns immer in Erinnerung bleiben und haben mir das nötige Durchhaltevermögen gesichert.

Der „Biotruppe“ bestehend aus Dirk Pendzialek, Bernhard Ellinger, Karin Warburg, Verena Effenberger, Claas Gerding-Reimers, Sascha Baumann, Nancy Martinez, Dr. Slava Ziegler und Dr. Katja Hübel sei für die gute Zusammenarbeit viele Diskussionen und die gute Arbeitsatmosphäre gedankt. In diesem Zusammenhang

möchte ich mich auch sehr bei Beate Schölermann für das hervorragende Teamwork und den unermüdlichen Einsatz bei den APT1 Experimenten bedanken.

Dr. Katja Hübel, Bernhard Ellinger, Karin Warburg und Tanja Knoth danke ich darüber hinaus für die Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Während meiner Zeit am Max-Planck-Institut sind im ständigen Kommen und Gehen mir neben den schon genannten Personen auch Lars Arve, Tobias Voigt (danke für den TGIF Job!), Stefan Wetzel (danke für die Mitübernahme des TGIF Jobs und die Hilfe mit bösen Computerprogrammen), Sebastian Koch, Robin Bon, Marion Müller, Yongxiang Chen, Torben Lessmann, Stefanie Schlummer, Dr. Petra Janning (danke für viele Gespräche beim TGIF), Robin Vetter und besonders Nicola Bisek und René Tannert ans Herz gewachsen.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden außerhalb des Arbeitskreises besonders bei den „Jungs“(Vedo, Obi, Resta, Ali und Sto) sowie bei meinem „Metal-Bruder“ Robin Hilicke für viele Unternehmungen und Feiern, die mir die notwendige Ablenkung gewährt haben, bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für jegliche Unterstützung und Aufopferung bedanken. Ohne Euch wäre dieser Lebensabschnitt so nicht möglich gewesen.

Evelyn, mein größter Dank gilt Dir! Deine Liebe, Fürsorge und Unterstützung haben mir sehr geholfen und machen mein Leben so schön, wie es im Moment ist und hoffentlich noch lange sein wird.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sascha Menninger
Geburtsdatum und -ort	24. Januar 1976, Hagen
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1982 – 07/1986	Grundschule, Breckerfeld
08/1986 – 06/1995	Theodor-Heuss-Gymnasium, Hagen
06/1995	Abitur

Universitätsausbildung

10/1996 – 01/2000	Studiengang Biologie/Diplom, Ruhr-Universität Bochum
01/2000	Vordiplom
04/2000 – 08/2003	Hauptstudium Biologie/Diplom, Ruhr-Universität Bochum
09/2002 – 08/2003	Anfertigung der Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum am Lehrstuhl für Allgemeine und Molekulare Botanik (PD. Dr. Pöggeler): <i>“Funktionelle Charakterisierung des Entwicklungsgens pro11 aus dem Hyphenpilz Sordaria macrospora“</i>
08/2003	Diplom
04/2004 – 01/2009	Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Universität Dortmund, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Waldmann: <i>“Etablierung zellulärer Testsysteme zur Identifikation von Molekülsonden für chemisch-genetische Untersuchungen“</i>

Dortmund, Januar 2009.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, 28.05.2009

Sascha Menninger