

## 5. Zusammenfassung

Die Mechanismen der Krebsentstehung zu verstehen ist von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung neuer Medikamente, besonders dann, wenn man gezielt Krebs behandeln will, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen. In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte im Hinblick auf diese übergeordneten Ziele untersucht. Zum einen wurde die Rolle von APT1 bei der Regulation von Ras, einem für die Entstehung von Krebs äußerst wichtigen Enzym, untersucht. Zum anderen wurden die zellulären Ziele einer ursprünglich als APT1 Inhibitor synthetisierten Substanz bzw. Substanzgruppe bestimmt. Gerade der zweite Ansatz ist für die Entwicklung zukünftiger Medikamente von Bedeutung. Denn die Identifizierung der Bindungspartner auf zellulärer Ebene ermöglicht erste Rückschlüsse über mögliche Nebenwirkungen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse und deren Bedeutung im Bezug auf die oben genannten Aspekte zusammengefasst:

1. In einem *in vitro* Depalmitoylierungs-Assay konnte gezeigt werden, dass APT1 sowohl L- als auch D-Peptide, welche dem C-Terminus von H-Ras entlehnt waren, gleichermaßen depalmitoyliert. Damit ist die Grundvoraussetzung für die putative Palmitoyltransferase, nämlich die Stereotoleranz, erfüllt (s. Deck *et al.*, 2005). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass APT1 *in vitro* in der Lage ist, ein fluoreszenzmarkiertes Substratpeptid, welches ebenfalls dem C-Terminus von H-Ras entlehnt war, zu palmitoylieren. Die Relevanz für Zellen und ganze Organismen muss jedoch noch überprüft werden, da hier nur eine Überprüfung *in vitro* erfolgreich durchgeführt wurde.
2. Die Wirkung von Raspalin 4 konnte mit Hilfe von Zellexperimenten und biochemischen Versuchen eingehend analysiert werden. In HLR Zellen, einer Reporterzelllinie, welche bei Inhibition der Ras-MAPK Kaskade, mit einer verminderten Expression von Luziferase reagiert, führte Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Raspalin 4 zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität auf 50 % ausgehend von der Maximalaktivität. Dies gab bereits erste

Hinweise darauf, dass die Raspaline den Ras-MAPK Signalweg möglicherweise auf indirektem Wege beeinflussen.

In MDCK-f3 Zellen, einer Zelllinie welche konstitutiv aktives H-Ras exprimiert und auf Inhibition des Ras-MAPK Signalweges mit einer Änderung des Phänotyps reagiert, zeigte Raspalin 4 ebenfalls einen Effekt. Gewöhnlich reagieren diese Zellen, bei Substanzen, welche auf den Ras-MAPK Signalweg wirken, mit epithelialelem Wachstum und der vermehrten Ausbildung von Zell-Zell Kontakten. Raspalin 4 hingegen bewirkte ein Abrunden der Zellen und vereinzelt blasige Ausstülpungen bei 10  $\mu$ M, einer Konzentration bei der keine Cytotoxizität messbar war. Dies lieferte erste Hinweise auf eine mögliche Induktion der Apoptose.

Die Überprüfung der Phosphorylierung von ERK und Elk-1 zeigte, dass diese durch Raspalin 4 unbeeinflusst bleibt. Da die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 der letzte Schritt im Signalweg ist, deutet dies daraufhin, dass Raspalin 4 den Ras-MAPK Signalweg entweder auf der Ebene der Transkription/Translation oder auf indirektem Weg beeinflusst.

3. Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Affinitätssonden, JC10 und AM42, miteinander verglichen und evaluiert. Mit beiden Affinitätssonden konnte APT1 aus Zelllysaten isoliert werden. Neben APT1 war auch eine große Anzahl weiterer Proteine im SDS-Gel erkennbar. Daraufhin wurden weitere Schritte unternommen um die Aufreinigung zu optimieren (stringente Waschprotokolle mit hohen Salzkonzentrationen und Auftrennung des Lysats in Cytosol-, Membran-, und Nukleusfraktion und Entfernung des Cytoskeletts). Anschließend gelang es mit Hilfe der HPLC-ESI Massenspektrometrie folgende Proteine zu identifizieren:

**Cytosol:** Elongation Factor 1-alpha 2

**Membran:** Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor, ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor, Sodium/Potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor, ADP/ATP translocase 2, Coiled-coil domain-containing protein 47

precursor, Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein, Elongation Factor 1-alpha 1, Synaptotagmin 1

**Nukleus:** Lamin A, Polypyrimidine tract-binding protein 1, Nucleophosmin (Nuclear Phosphoprotein B23), Nuclear pore complex protein Nup107

Eine umfassende Literaturrecherche, bei der die Proteine im Hinblick auf ihre Bedeutung für das Neuritenwachstum untersucht wurden, ergab, dass Ruspalin 4 das Neuritenwachstum vermutlich auf drei Ebenen beeinflusst:

1. Direkte Beeinflussung des Neuritenwachstums (Elongation Factor 1-alpha 1, Synaptotagmin 1)
2. Indirekte Beeinflussung des Neuritenwachstums durch Begünstigung proapoptotischer Faktoren (Elongation Factor 1-alpha 2, ADP/ATP translocase 2, Nucleophosmin (Nuclear Phosphoprotein B23))
3. Indirekte Beeinflussung des Neuritenwachstums durch Beeinträchtigung des Energiehaushaltes und des Fettsäuremetabolismus (Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor, ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor, Sodium/Potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor, ADP/ATP translocase 2, Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein)

Bei diesen drei Punkten kommt den ersten beiden eine größere Bedeutung zu, da Punkt drei sich zumindest nicht in einer erhöhten Toxizität bemerkbar macht. Allerdings könnte die Störung der allgemeinen Zellhomeostase ebenfalls die Apoptose zusätzlich begünstigen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass APT1 nach wie vor als Palmitoyltransferase in Frage kommt, wobei eine Überprüfung *in vivo* notwendig ist, um dies zu bestätigen.

Die Inhibition des Neuritenwachstums in PC2 Zellen durch Ruspalin 4 geht vermutlich auf einen umfassenden Effekt auf mehreren Ebenen zurück. Ein Beitrag durch Inhibition von APT1 bzw. Beeinflussung des Palmitoylierungszustandes von Ras ist hierbei nicht auszuschließen. Auch hier sind weitere Experimente nötig, um Klarheit zu erlangen.