

Untersuchung Naturstoff-basierter Substanzklassen als  
chemische Modulatoren für biologische Prozesse mit Hilfe  
des vorwärts-, sowie rückwärtsgerichteten chemisch-  
genetischen Ansatzes

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

**DISSERTATION**

von  
Diplom-Biologin  
**Karin Warburg**  
aus Salzbergen

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

**Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 2010**



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 Januar 2006 bis April 2010 angefertigt.



So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muß sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Mögliche getan hat.

(aus *Italienreise* von Johann Wolfgang von Goethe)

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Chemische Biologie .....	5
1.2 Biologische Testverfahren.....	8
1.3 Der vorwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz zur Untersuchung des Ras-Signalwegs mit Hilfe der Naturstoffklasse der Tetransäuren.....	17
1.3.1 Signalwege.....	17
1.3.2 Der Ras-Signalweg .....	18
1.3.3 Tetransäuren, Melophlin A .....	21
1.4 Der rückwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz, die Suche nach spezifischen Phosphataseinhibitoren.....	24
1.4.1 Protein-Phosphatasen .....	24
1.4.2 Spirooxindole .....	29
1.5 Zielsetzung .....	32
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>34</b>
2.1 Material.....	34
2.1.1 Vektoren.....	34
2.1.2 Bakterien.....	34
2.1.3 Hefen .....	34
2.1.4 Zelllinien.....	35
2.1.5 Zellkulturmedien .....	36
2.1.6 Protein- und DNA/RNA-Standards.....	37
2.1.7 Antikörper.....	37
2.1.8 Chemikalien und Reagenzien.....	37
2.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	39
2.1.10 Allgemeine Laborgeräte .....	39
2.1.11 Software.....	40
2.1.12 Reagenziensätze (Kits) .....	41
2.1.13 Enzyme .....	41
2.1.14 DNA Oligonucleotide/Primer.....	42
2.1.15 Inhibitoren und verwendete Substanzen.....	44

<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>47</b>
2.2.1	Zellbiologische Methoden	47
2.2.1.1	Subkultivierung von Zellen	47
2.2.1.2	Bestimmung der Zellzahl	48
2.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen	48
2.2.1.4	PathDetect® Reporter-gen-Assay	49
2.2.1.5	Wnt-Reporter-gen-Assay mit transient transfizierten HEK293-Zellen	51
2.2.1.6	Zytotoxizitätstest	55
2.2.1.7	Morphologische Veränderungen des BSC-1-Zytoskeletts	56
2.2.1.8	Untersuchungen zur Beeinflussung des Ras/MAPK- Signalwegs in PC12-Zellen	57
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	60
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	60
2.2.2.2	Untersuchungen zur MAPK-Aktivität	60
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	67
2.2.3.1	RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen	67
2.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	68
2.2.3.3	RNA Qualitätskontrolle mit dem Bioanalyzer	68
2.2.3.4	Mkroarray-Analyse	68
2.2.3.5	Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR)	72
2.2.3.6	Bereitstellung von Phosphatasen für den Roboterscreen in Kooperation mit der Dortmund Protein Facility	77
2.2.4	Enzymkinetik/ Biophysikalisch chemische Methoden	79
2.2.4.1	Bestimmung der in vitro Phosphatase Aktivität	80
2.2.4.2	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten $K_M$	81
2.2.4.3	Aktivitätsscreening mit Testsubstanzen	82
2.2.4.4	$IC_{50}$ -Bestimmung	83
2.2.4.5	Bestimmen des Inhibitionstyps und der Dissoziationskonstanten $K_i$	84
2.2.4.6	Hefe basierte chemische Genomik	87
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>89</b>
3.1	<i>Der vorwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz zur Untersuchung des Ras-Signalwegs mit Hilfe der Naturstoffklasse der Tetransäuren</i>	89
3.1.1	PathDetect® Reporter-gen-Assay	89
3.1.2	Wirkung der Tetransäuren auf v-H-Ras-transformierte MDCK-F3-Zellen	91
3.1.3	Struktur-Wirkungs-Beziehung	91
3.1.4	Einfluss auf den Ras/MAPK-Signalweg in PC12-Zellen	94
3.1.4.1	Wirkung von Meloplin A auf die PC12-Zell-Differenzierung	96
3.1.4.2	Wirkung von Meloplin A auf die PC12-Zell-Proliferation	96

3.1.4.3	Kombinatorische Analyse .....	97
3.1.4.4	Quantitative Auswertung des Neuritenwachstums in PC12-Zellen.....	101
3.1.4.5	Reversibilität des Melophlin A-Effekt .....	102
3.1.5	Untersuchungen zur MAPK-Aktivität.....	102
3.1.6	Einfluss von Melophlin A auf die Genexpression in PC12-Zellen.....	108
3.1.7	Validierung des Mikroarrays .....	116
3.1.8	Effekt von Melophlin A auf den Wnt-Signalweg .....	120
3.1.8.1	Wnt Reportergen-Assay mit transient transfizierten HEK293-Zellen .....	120
3.1.8.2	Wnt-Reportergen-Assay mit stabil transfizierten HEK293-Zellen.....	122
3.1.9	Biologische Wirkung von Melophlin A im Vergleich zu Dynasore.....	123
3.1.10	Untersuchungen zur morphologischen Veränderungen des BSC-1-Zytoskelett .....	125
3.1.11	Hefe basierte chemische Genomik.....	126
3.2	<i>Der rückwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz, die Suche nach spezifischen Phosphataseinhibitoren.....</i>	127
3.2.1	Messprinzip und Bestimmung kinetischer Parameter .....	128
3.2.1.1	Bestimmung der in vitro Phosphatase Aktivität .....	128
3.2.1.2	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten $K_M$ .....	130
3.2.2	Erstes Aktivitätsscreening mit Testsubstanzen .....	131
3.2.3	Charakterisierung des Inhibitionstyps und Bestimmung des $IC_{50}$ -Werts, sowie der Dissoziationskonstanten $K_i$ für ausgewählte Substanzen .....	138
3.2.4	Bereitstellung von Phosphatasen für das Roboterscreening in Kooperation mit der Dortmund Protein Facility.....	150
3.2.4.1	Aktivitätskontrolle der rekombinant eprimierten VHR und PP1 jeweils mit und ohne Tag .....	151
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>153</b>
4.1	<i>Melophlin A oder der vorwärts gerichtete chemisch genetische Ansatz....</i>	<i>154</i>
4.1.1	Ras/MAPK-Reportergen-Assay in HLR-Zellen .....	154
4.1.2	Morphologischer Effekt auf H-Ras transformierte MDCK- Zellen .....	156
4.1.3	Aufstellen einer Struktur-Wirkungs-Beziehung .....	157
4.1.4	Untersuchungen zur Beeinflussung des Ras/MAPK-Signalwegs in PC12-Zellen.....	158
4.1.5	Untersuchung der ERK1/2-Aktivität .....	159
4.1.6	Indirekte Identifikation von Melophlin A Zielproteinen in PC12-Zellen mittels Mikroarray-Analyse.....	164
4.1.7	Wnt Reportergen-Assay .....	170
4.2	<i>Der rückwärtsgerichtete chemische genetische Ansatz.....</i>	<i>170</i>



---

<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>175</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>179</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>192</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>197</b>
<i>Dankeschön .....</i>	<i>205</i>
<i>Lebenslauf (außer für Online-Version).....</i>	<i>208</i>
<i>Eidesstattliche Erklärung .....</i>	<i>209</i>

# 1. Einleitung

## 1.1 *Chemische Biologie*

In den letzten beiden Jahrzehnten begannen die klassische Biologie bzw. die klassische Chemie sich neu zu orientieren, so dass der interdisziplinäre Forschungsansatz der Chemischen Biologie entstand. Der Begriff Chemische Biologie grenzt sich ab von der biologischen bzw. der bioorganischen Chemie. Während man in der biologischen Chemie unter Anderem sehr an Biosynthese-Intermediaten und – Wegen interessiert war, versuchte man in der zeitlich folgenden bioorganischen Chemie, eher mechanistisch orientiert, mit synthetischen Modellen biologische Prozesse nachzustellen. Die Chemische Biologie verfolgt dagegen einen neuen Ansatz. Hier werden die Methoden der organischen, physikalischen und anorganischen Chemie genutzt, um Moleküle mit einem bestimmten Eigenschaftsprofil möglichst maßgeschneidert herzustellen, die dann helfen, biologische Prozesse zu analysieren und zu modulieren. <sup>[1]</sup>

Die Untersuchung biologischer Prozesse spielt gleichermaßen in der Biologie und unter Anderem in der Genomforschung eine wichtige Rolle. Nachdem man mit Hilfe neuer gentechnischer Methoden in der Biologie grundlegende Informationen über tausende von Genen erhalten hatte (siehe [2]), besteht die Herausforderung des sogenannten 'Post Genomics'-Zeitalters darin, den gesamten verfügbaren, noch rohen Sequenz-Datensatz, der in den Genen des Menschen<sup>[3]</sup>, aber auch im Genom von Modellorganismen, abgelegt ist, zu analysieren und zu nutzen. Dabei gelangte man von der reinen Genom- und Proteomforschung sehr schnell in den zellulären Kontext, wo Proteine auf molekularer Ebene miteinander und mit zellulären Substrukturen, wie Membranen, wechselwirken. Hier wurde zunehmend ein Zusammenhang mit der Chemie deutlich, da alle biologischen Vorgänge im Grunde auf chemischen Prozessen beruhen und durch die Struktur der beteiligten Moleküle und ihre Wechselwirkungen bestimmt werden. Die Biologie ist molekular und biologische Vorgänge können daher auch als chemische Transformationen angesehen und unter diesem Gesichtspunkt im Detail untersucht und erklärt werden. Durch die Zusammenarbeit zwischen Biologen und Chemikern kann also entsprechend auch eine umfassende Untersuchung noch dazu mit unterschiedlichen praktischen Herangehensweisen, Denkansätzen und Ideen stattfinden. Eine solche Möglichkeit der Zusammenarbeit bietet unter Anderem der neue Forschungsansatz der Chemischen Genetik <sup>[4, 5]</sup>, auf den im Abschnitt biologische Testverfahren (1.2) noch näher eingegangen werden soll. Er beinhaltet eine Kombination chemischer und genetischer Methoden, wobei man sich darauf konzentriert, die Funktion der Proteine

und ihre Wechselwirkung mit niedermolekularen Substanzen (Modulatoren) aufzuklären.

Dabei bietet die Chemische Genetik gegenüber der Mutationsgenetik oder der Knockout-Technik, bei der die dauerhafte Deletion eines Gens unter Umständen letal ist, Vorteile: Eine zeitliche Kontrolle der Wirkdauer der zu untersuchenden Substanzen, die für dynamische Funktionsuntersuchungen wichtig sein kann, ist möglich. Auch lassen sich die Untersuchungen zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung des betreffenden Organismus durchführen. Die Wirkung ist meist reversibel und der Effekt kann über die Wirkstoffkonzentration leicht beeinflusst werden. Im Gegensatz zu Knockout-Studien, bei denen zwischen Proteinen, die vom gleichen Gen kodiert werden, nicht weiter differenziert wird, ist es hier möglich, auf einzelne Proteine zu wirken. Schließlich kann der Wirkeffekt jederzeit und überall reproduziert werden. Nachteile stellen allerdings die geringe Spezifität und Löslichkeit sowie eine mögliche Zytotoxizität dar. <sup>[6]</sup>

Interessant ist die Chemische Biologie aber nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern insbesondere auch im Bezug auf die Suche nach neuen Wirkstoffen und damit potentieller, innovativer Arzneimittel, für die angewandte, medizinische und pharmazeutische Forschung. Auch hier ergänzen sich die Biologie und die Chemie. So können beispielsweise Naturstoffe als Ausgangspunkt und Grundgerüst für den Entwurf und die Synthese von Stoffen dienen, die später als Vorlage für die Entwicklung von Medikamenten oder zur Untersuchung biologischer Fragestellungen dienen können. Das Wissen um viele Naturstoffe und ihre Wirkung auch auf bestimmte menschliche Stoffwechselprozesse nutzt man bereits seit Jahrtausenden. <sup>[7, 8]</sup> Tatsächlich basiert fast die Hälfte aller derzeit verfügbaren Arzneimittel auf Naturstoffen oder naturstoffähnlichen Verbindungen. In der Krebsmedizin trifft dies sogar auf rund drei Viertel aller Präparate zu. Naturstoffe spielen außerdem bei der Entwicklung von neuen antibakteriellen, antifungalen, antiviralen und antihypertensiven (blutdrucksenkenden) Medikamenten eine Rolle und gelten durch die Evolution als „vorvalidiert“. <sup>[9]</sup>

Wenn in einem Testverfahren eine bioaktive Substanz, z.B. ein Naturstoff, identifiziert wird, ist die Forschung noch lange nicht bei einem fertigen Wirkstoff angelangt. Die nächste Hürde besteht in einer Optimierung der Leitstruktur. Dieser Optimierungsprozess ist ein multidisziplinärer und komplexer Vorgang, bei dem die enge Zusammenarbeit von Chemikern, Biologen und z.T. auch Medizinern und Informatikern notwendig ist.

Auf der einen Seite steht die Chemie, die über ein Repertoire leistungsfähiger Methoden verfügt, um niedermolekulare Wirkstoffe mit Hilfe der klassischen

organischen Synthese herzustellen oder vorhandene zu modifizieren, was u.A. per Wirkstoff-Design mit dem Computer (*in-silico*) unterstützt werden kann. Die chemische Synthese wird dabei weder durch Design-Aspekte oder die synthetische Machbarkeit allein gesteuert, noch erfolgt sie rein intuitiv oder beliebig, sondern sie wird vielmehr ganz wesentlich durch die Biologie in Form der biologischen Prüfung beeinflusst. (1.2)

Die biologischen Untersuchungen liefern dem medizinischen Chemiker Informationen darüber, welche Substanzvariationen eventuell zu einer verbesserten Wirkung führen können. Dies wird an verschiedenen Kriterien gemessen: der Spezifität, Wirkstärke, Wirkdauer und Bioverfügbarkeit inklusive Metabolismus.

Lipinski hat 2001 in diesem Zusammenhang bezüglich der Anforderungen einige Regeln aufgestellt, die helfen, lösliche, membrangängige Moleküle auszuwählen. Das ist die sogenannte „*Rule of 5*“, da alle Kriterien ein Vielfaches von 5 enthalten: So soll

- das Molekulargewicht  $M_w$  kleiner sein als 500 g/mol
- der  $c \log P$  (ein berechneter Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) kleiner sein als 5
- es weniger als 5 Wasserstoffbrückendonoren pro Molekül geben
- die Gesamtzahl der N- und O-Atome kleiner sein als 10 (Wasserstoffbrückenakzeptoren) <sup>[10]</sup>

Der Optimierungsprozess wird also durch das Wechselspiel zwischen neu synthetisierten chemischen Verbindungen und den biologischen Ergebnissen vorangetrieben. Der Prozess pendelt in Lernzyklen hin und her, wobei durch Untersuchungen die chemischen, biologischen, physikalischen oder pharmakologischen Eigenschaften eines Moleküls mit der chemischen Struktur in Verbindung gebracht werden (Struktur-Aktivitäts-Beziehung). Die Substanz, die den Anforderungen am besten entspricht, soll schließlich herausgefiltert werden.

Durch die vielversprechenden Entwicklungen zur Automatisierung und Parallelisierung von chemischer Synthese und anschließender biologischer Analyse erhoffte man sich hierbei zunächst große Fortschritte sowohl für die systematische Suche nach neuen Arzneimitteln, als auch für die Untersuchung biologischer Phänomene mit bestimmten chemischen Wirkstoffen.

Man begann also Anfang der 1990er Jahre damit, mit Hilfe der kombinatorischen Chemie, durch Kombination und Variation verschiedener Reste an einem Grundgerüst, eine Vielzahl von unterschiedlichen chemischen Verbindungen (sogenannte Bibliotheken) zu erzeugen und diese in Hochdurchsatzscreenings zu testen. Leider fiel aber die Anzahl an gefundenen bioaktiven Substanzen relativ zu der Anzahl an synthetisierten und getesteten Substanzen nur sehr gering aus. Man kam zu dem Schluss, dass die erzielbare Quantität an zu testenden Substanzen allein

nicht ausreiche und begann mit der gezielten Herstellung von aufgereinigten und gut charakterisierten Einzelverbindungen. Dabei werden verschiedene Ansätze verfolgt: die diversitätsorientierte Synthese (Schreiber <sup>[11]</sup>), die funktionsorientierte Synthese (Wender <sup>[12]</sup>) oder die biologisch orientierte Synthese (Waldmann <sup>[13]</sup>).

Die hier dargestellten Verfahren und Fragestellungen sind Ergebnisse einer erfolgreichen, interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Biologen und Chemikern, die gerade an den Schnittstellen beider Fachrichtungen innovative Ideen und Konzepte zur Erforschung bioaktiver Substanzen, sowohl für die Grundlagen- als auch für die pharmazeutische Forschung, hervorbringt.

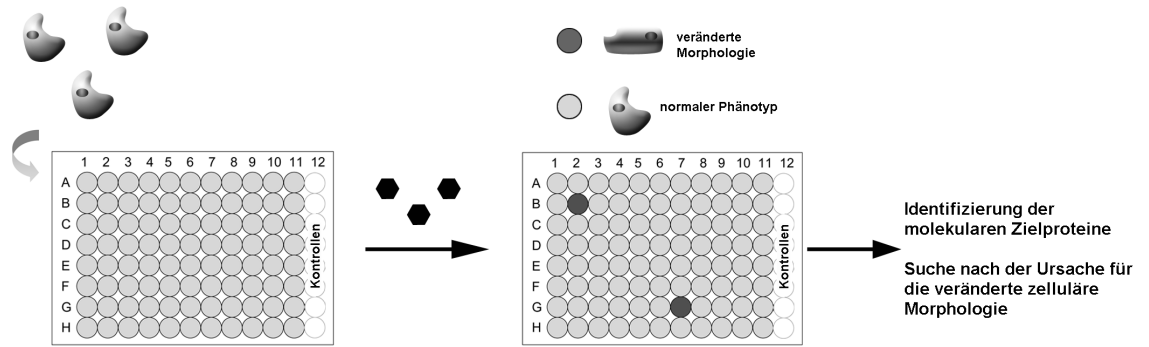
### **1.2 Biologische Testverfahren**

Substanzen, die auf der Grundlage von Naturstoffen basieren oder durch Kombinatorische Chemie erzeugt wurden, können wie zuvor beschrieben (1.1) als ein Werkzeug für ausführliche biologische Untersuchungen dienen. Im Fall eines aufgefundenen, therapeutisch relevanten biologischen Effekts können sie als "Leitstruktur" für die Entwicklung neuer Medikamente eingesetzt werden

In verschiedenen biochemischen und zellbasierten Testverfahren werden die Substanzen also zunächst hinsichtlich einer potentiellen Wirkung untersucht. Findet man dabei eine chemische Verbindung, die einen bestimmten biologischen Effekt hat, so dient diese dann wiederum als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen, um diesen Effekt genauer zu analysieren und z.B. das dazu passende Zielprotein zu identifizieren.

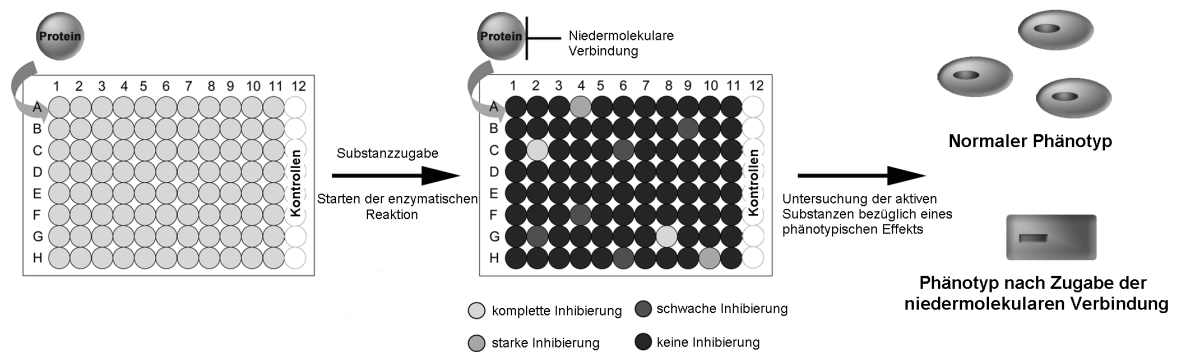
Beim bereits zuvor beschriebenen Forschungsansatz der Chemischen Genetik unterscheidet man je nach Vorgehensweise zwischen vorwärts- und rückwärtsgerichteter chemischer Genetik:

Im Fall der vorwärtsgerichteten Chemischen Genetik wird zunächst eine Substanzbibliothek generiert und diese dann an Zellen (Zelllinien, Bakterien, Pilze) oder ganzen Organismen (z.B. Wurm, Maus, Zebrafische, Hefe oder Pflanzen) getestet. Für die Substanzen, die einen abweichenden Phänotyp erzeugen, wird anschließend mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Methoden versucht, das Zielprotein zu identifizieren.



**Abbildung 1: Testverfahren in der vorwärtsgerichteten chemischen Genetik** (Hübel, Lessmann, Waldmann, 2008)<sup>[6]</sup>

Bei der rückwärtsgerichteten chemischen Genetik wird eine Substanzbibliothek an einem bestimmten Protein oder auch einer Gruppe von Proteinen (z.B. einer bestimmte Enzymklasse) getestet. Sobald ein Modulator entdeckt ist, wird dieser in lebenden Systemen getestet. Auf diese Weise erhält man anhand der hervorgerufenen Veränderungen Informationen über die Funktion des jeweiligen Proteins im betreffenden Organismus.



**Abbildung 2: Testverfahren in der rückwärtsgerichteten chemischen Genetik** (Hübel, Lessmann, Waldmann, 2008)<sup>[6]</sup>

Viele niedermolekulare Substanzen mit interessanten biologischen Wirkungen wurden nach diesem Vorgehen entdeckt - auch schon vor der Einführung des Begriffs „Chemische Genetik“.

Innerhalb der beiden beschriebenen Ansätze (vorwärts- und rückwärtsgerichtete chemische Genetik) stehen verschiedene Arten von biologischen Testsystemen zur Verfügung. Zum einen gibt es die beschriebenen *in vitro* Untersuchungen innerhalb des rückwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatzes, bei denen die Funktionsänderung eines bestimmten Proteins untersucht wird. (Abbildung 2) Die

Detektion erfolgt hier hauptsächlich über die Erfassung von Lumineszenz-, Absorptions- oder Fluoreszenz-Änderungen mit optischen Systemen. Zum anderen stehen die Untersuchungen im Rahmen des vorwärtsgerichteten chemisch genetischen Ansatzes zur Verfügung, bei dem Modellorganismen oder Zelllinien auf bestimmte Veränderungen hin untersucht werden und somit ein zellulärer Kontext gegeben ist (Abbildung 1). Hier gibt es verschiedenste Methoden, um in einem solch komplexen, zellulären System Veränderungen von bestimmten Prozessen zu detektieren: So stehen Antikörper zur Verfügung um posttranslationale Protein-Modifikationen oder biosynthetische Veränderungen in der Zelle nachzuweisen. Die primären Protein-spezifischen Antikörper werden dabei von einem für sie spezifischen sekundären Antikörper gebunden, der entweder eine sichtbare Enzym-gekoppelte Reaktion hervorruft oder selbst fluoreszierend markiert ist. Weiter können z.B. Signaltransduktionswege mit Hilfe eines Reporter-gen-Assays untersucht werden und hier z.B. Substanz-induzierte Veränderungen der Genexpression durch Modulation der Aktivität bestimmter Promotoren detektiert werden. Die Promotoraktivität wird hierbei dadurch gemessen, dass ein künstlich eingebrachtes Gen (Reporter-gen) ebenfalls unter die Expressionskontrolle des zu untersuchenden Promotors gebracht wird. Veränderungen der Promotoraktivität lassen sich nun durch die damit verbundenen An- oder Abreicherungen des Reporter-gen-Produkts messen. Das Reporter-gen wird deshalb so genannt, weil sein Genprodukt vergleichsweise einfach nachzuweisen ist, etwa durch eine leicht zu messende enzymatische Aktivität (z.B. Luziferase) oder durch Fluoreszenz, wenn das Fusionsprotein selbst fluoreszierend ist (z.B. GFP). Schließlich können morphologische oder prozessabhängige Veränderungen in Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, Proteinen oder spezifisch bindenden Substanzen im zellulären Kontext sichtbar gemacht werden. <sup>[14-16]</sup>

Welches Testverfahren zur Anwendung kommt, entscheidet sich dabei jeweils anhand der zu bearbeitenden Fragestellung. Jedes Verfahren hat seine speziellen Vor- und Nachteile, die im Folgenden noch genauer erläutern werden. Generell sollten einige wichtige Anforderungen erfüllt sein: So sollte ein Testverfahren möglichst reproduzierbare Daten liefern und eine hohe Sensitivität aufweisen, um ein sicheres Ergebnis zu erhalten und auch Substanzen mit geringerer Aktivität erfassen zu können. In jedem Experiment sollten Positiv- und Negativ-Proben als Kontrolle integriert sein. Statistische Parameter wie z.B. der z-Faktor und z'-Faktor <sup>[17]</sup> sollten berechnet werden, um qualitativ hochwertige und aussagekräftige Ergebnisse belegen zu können. Ferner sollten die Testverfahren soweit wie möglich miniaturisiert

und automatisiert werden, um Kosten zu sparen und die Fehleranfälligkeit zu reduzieren. <sup>[6, 18]</sup>

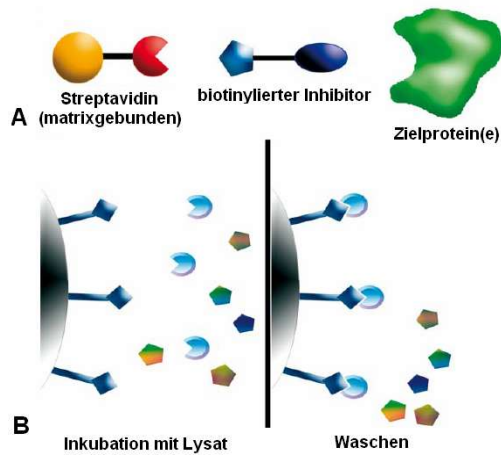
Während die rückwärtsgerichtete chemische Genetik in erster Linie ein Werkzeug der Grundlagenforschung, z.B. zur Funktionsanalyse von Enzymen, ist, kommt die vorwärtsgerichtete chemische Genetik auch noch weiterführend bei der Entdeckung und Entwicklung neuer Medikamente zum Einsatz. Hier gibt es zwar eine Vielzahl von direkten und indirekten Methoden, um das Zielprotein einer aktiven Substanz zu identifizieren, dennoch ist dieser Prozess in Abhängigkeit von der Stärke der Protein-Modulator-Bindung zumeist zeitaufwendig und schwierig. Die Auswahl einer geeigneten Methode sollte passend zur Fragestellung und den Eigenschaften des Moleküls sowie unter Abwägung der Vor- und Nachteile verschiedener Systeme erfolgen.

So kann einerseits versucht werden, die direkte Interaktion der Substanz mit dem Protein zu nutzen, um das Protein gezielt zu isolieren und es anschließend zu analysieren. Andererseits kann man durch den indirekten Vergleich von spezifischen Veränderungen in Anwesenheit der aktiven Substanz Hinweise auf das gesuchte Zielprotein und den Wirkmechanismus bekommen.

Zu den erwähnten, direkten Methoden um ein Zielprotein zu identifizieren zählen beispielsweise die Affinitätsaufreinigung, der Phagen Display, das Hefe-3-Hybrid System oder die Protein-Mikroarrays.

Bei der Affinitätsaufreinigung wird das aktive Molekül über einen Linker an eine feste Matrix gebunden. Diese wird dann mit Zellysat inkubiert, so dass das Zielprotein bzw. die Zielproteine binden können. Unspezifisch gebundene oder ungebundene Proteine sollen anschließend durch wiederholte Wachschriffe entfernt werden (Abbildung 3). Die gebundenen Proteine dagegen werden zum Schluss eluiert, und können nach einem proteolytischen Verdau massenspektrometrisch charakterisiert werden.



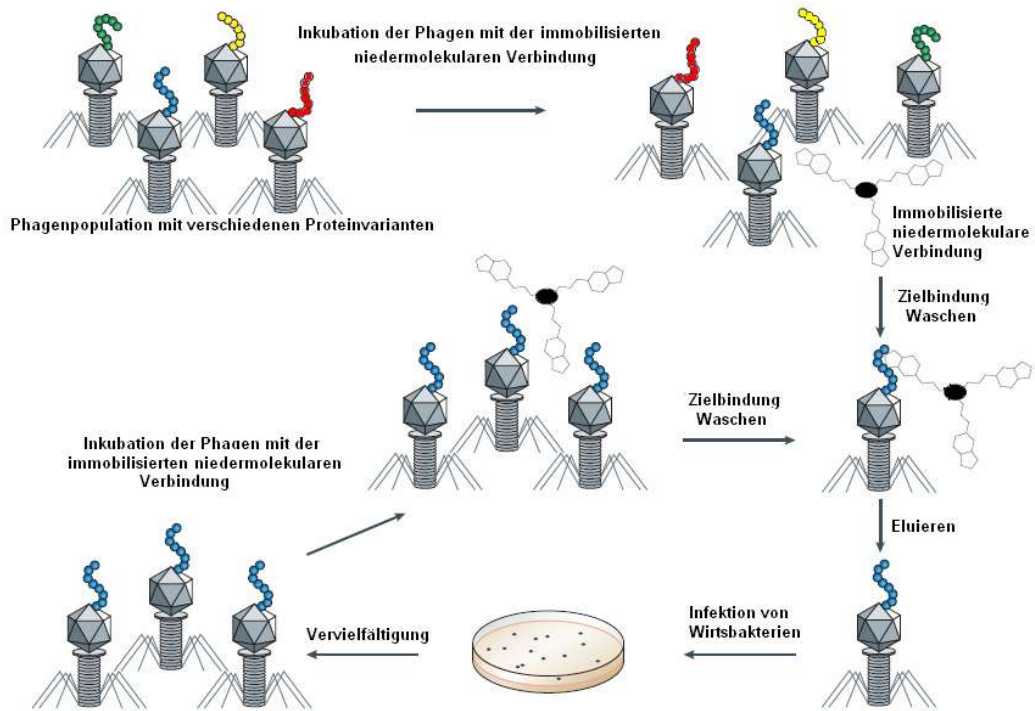


**Abbildung 3: Das Prinzip der Affinitätsaufreinigung**

A: Matrixgebundenes Streptavidin, der an Biotin gekoppelte Inhibitor; Biotin bindet an Streptavidin, der Inhibitor an das Zielprotein bzw. die Zielproteine. B: Der immobilisierte Inhibitor wird mit Lysat inkubiert, nach dem Waschen bleiben nur die Zielproteine am Inhibitor gebunden. (Entnommen der Dissertation von Dirk Pendzialek)

Wichtig ist hierbei, dass das Molekül trotz der Immobilisierung bzw. der Kopplung an den Linker seine biologische Aktivität behält. Ferner gilt es zu bedenken, dass es zu unspezifischen Bindungen kommen kann (z.B. bei sehr lipophilen Substanzen) und dass diese Methode sich vor allem dazu eignet, häufig vorkommende Proteine und solche, die eine starke Interaktion mit dem aktiven Molekül aufweisen, zu identifizieren.

Zum Nachweis schwach exprimierter, potentieller Zielproteine, werden Methoden angewandt, bei denen durch gezielte Proteinexpression aus cDNA-Banken mögliche Zielproteine angereichert angeboten werden. Beim Phagen-Display wird eine cDNA Bibliothek so in das Genom von Phagen kloniert, dass die Proteine und Peptide jeweils mit einem Hüllprotein fusionieren. Die Phagenpopulation, die nun verschiedene Proteinvarianten auf ihrer Oberfläche präsentiert, wird zu der immobilisierten, aktiven Substanz zugeben. Nach einer Affinitätsselektion wird die eluierte Phagenpopulation vervielfältigt und für eine oder auch mehrere neue Runden der Affinitätsanreicherung benutzt. Am Ende der Prozedur kann die monoklonale Phagenpopulation für die Zielproteinsuche analysiert werden (Abbildung 4).

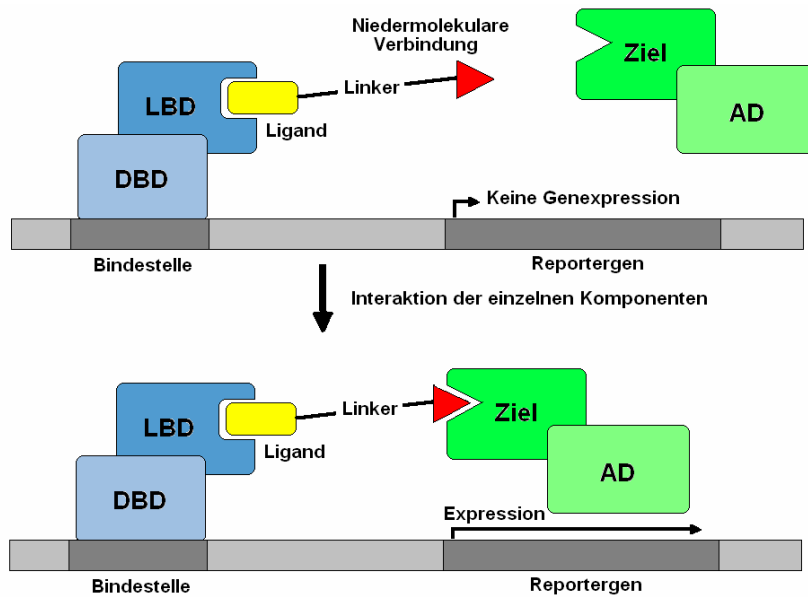


**Abbildung 4: Das Prinzip des Phagendisplay** (Terstappen, Schlüpen, Raggiacchi and. Gaviraghi, 2007) <sup>[19]</sup>

Die Phagenpopulation, die verschiedene Proteinvarianten an ihrer Oberfläche präsentiert, wird zu der immobilisierten Substanz zugeben, so dass diese Phagen an die aktive Substanz binden können. Nichtbindende Phagen können gewegewaschen werden. Die gebundenen Phagen werden in Bakterien vermehrt und nochmals mit dem immobilisierten Molekül inkubiert. Auf diese Weise werden die am besten bindenden Proteine in ca. 3 bis 5 Runden von Exposition, Vermehrung und erneuter Exposition selektiert und können anschließend analysiert werden.

Man sollte allerdings berücksichtigen, dass das Protein welches in diesem *in vitro*-Experiment unter den Anreicherungs-Bedingungen die stärkste Bindung aufweist, nicht unbedingt das vorrangige Zielprotein unter *in vivo*- Bedingungen ist. Außerdem können hier durch die Fusion mit dem Hüllprotein die Bindungseigenschaften oder die Funktionen der möglichen Zielproteine verändert sein, so dass z.B. die Bindung mit dem Molekül verbessert oder verschlechtert wird, was zusätzlich das Ergebnis beeinflusst.

Das Hefe-3-Hybrid-System <sup>[20]</sup> ist ein hefebasiertes System, welches aus drei Komponenten besteht (Abbildung 5). Die Bindung der niedermolekularen Substanz an das Zielprotein führt zur Interaktion dieser einzelnen Komponenten in einem trimeren Komplex. Dieser Komplex aktiviert dann die Expression eines Reportergens, welches schließlich die Detektion der Interaktion ermöglicht.



**Abbildung 5: Das Prinzip des Hefe-3-Hybrid-System** (modifiziert nach Terstappen, Schlüpen, Raggiaschi and Gaviraghi, 2007)<sup>[19]</sup>

Das System besteht aus den drei Komponenten: Einer Komponente, die eine DNA-bindende Domäne (DBD) fusioniert mit einer Ligand-bindenden Domäne (LBD) beinhaltet (blau dargestellt), einer Komponente, die aus dem Liganden für das Molekül (gelb dargestellt) gebunden an die niedermolekulare, reaktive Substanz (rot dargestellt) besteht und einer Komponente, die aus einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD) fusioniert mit einem Protein aus einer cDNA-Bibliothek - möglicherweise dem Zielprotein - besteht (grün dargestellt). Die Bindung der niedermolekularen Substanz an das Zielprotein führt zur Interaktion dieser einzelnen Komponenten in einem trimeren Komplex. Dieser aktiviert dann die Expression des Reportergens und ermöglicht somit die Detektion der Interaktion.

Vorteilhaft ist, dass bei Anwendung dieser Technik die Proteine im zellulären Kontext auf ihre Wechselwirkung mit dem aktiven Molekül hin untersucht werden können. Nachteilig ist, dass gerade diese intrazellulären Bedingungen in der Hefe sich von denen in höheren Eukaryonten deutlich unterscheiden können. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Interaktionen der beteiligten Komponenten zur Expression des Reportergens in der Hefe unter den Milieu-Bedingungen erfolgen, wie sie im Zellkern vorliegen. Interaktionen, die aufgrund transientser Signalmoleküle (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ) im Zytoplasma erfolgen, können so möglicherweise nicht detektiert werden, da sich die für die Interaktion erforderlichen Bedingungen nie im Zellkern einstellen.

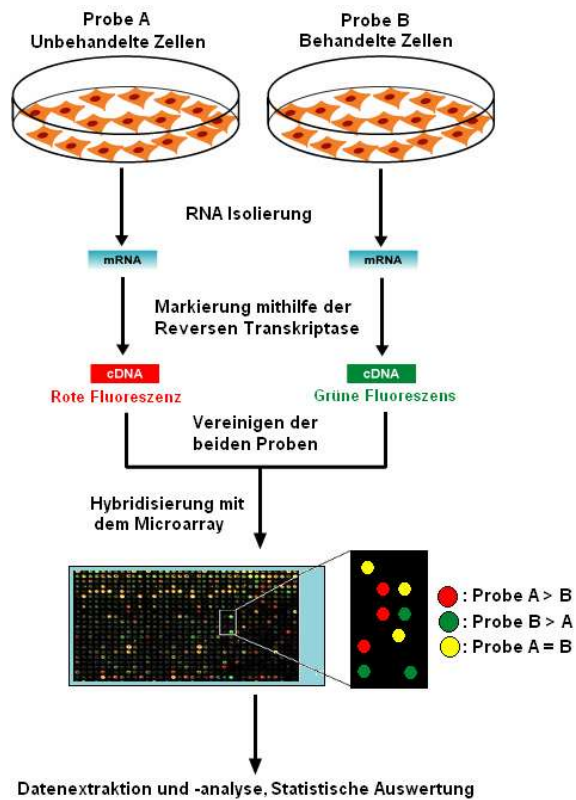
Eine weitere, direkte Methode stellt der Protein-Mikroarray dar. Hier werden die möglichen Zielproteine zu gleichen Mengen in einem Raster auf einen Glaschip

aufgetragen und mit dem aktiven Molekül, welches radioisotopisch- oder fluoreszenzmarkiert wurde, inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen werden wiederum diejenigen Proteine identifiziert, welche das markierte Molekül gebunden haben. Mit diesem Hochdurchsatzverfahren können viele, auch schwach exprimierte Proteine gleichzeitig untersucht werden, allerdings ist ein zellulärer Kontext nicht gegeben.

Neben den gerade beschriebenen, direkten Methoden, stehen auch einige indirekte Methoden zur Verfügung, so z.B. der DNA-Mikroarray, Proteom- bzw. Metabolitanalysen, sowie genetische Tests bezüglich einer Resistenz oder einer erhöhten Sensitivität mit Modellorganismen:

Beim DNA-Mikroarray werden, wie in

Abbildung 6 gezeigt, Expressionsmuster auf RNA-Ebene in An- und Abwesenheit der aktiven Substanz verglichen.



**Abbildung 6: Das Prinzip des DNA-Mikroarray**

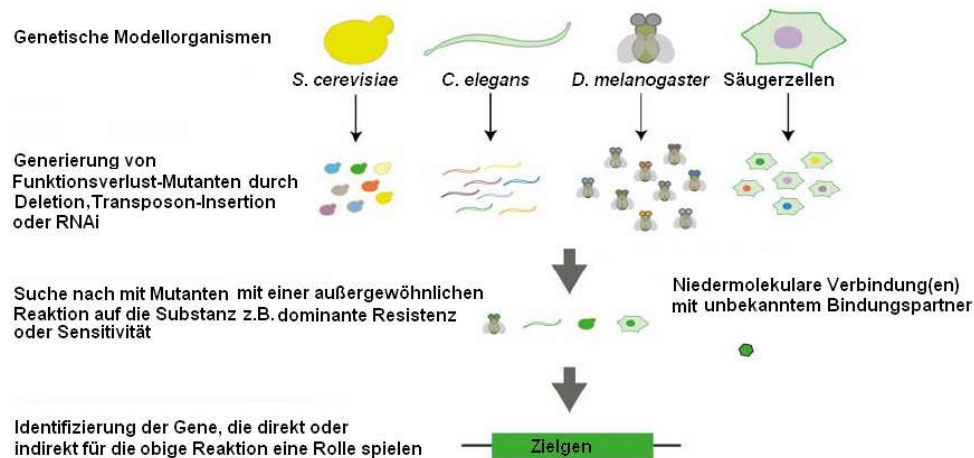
Die RNA von zur Kontrolle mit DMSO behandelten und mit der aktiven Substanz behandelten Zellen wird extrahiert und bei der anschließenden reversen Transkription fluoreszierend markiert, so dass eine Unterscheidung der beiden Proben möglich ist (rote, grüne Markierung). Anschließend werden die Proben vereinigt und auf dem DNA-Mikroarray hybridisiert. Anhand

der Fluoreszenz können nun die Expressionsmuster der beiden Proben miteinander verglichen werden.

Der DNA-Mikroarray geht zwar von einem zellulären Kontext aus, liefert aber streng genommen keine Informationen über die Konzentration der beteiligten Proteine (den eigentlichen Modulatoren) in der Zelle, sondern lediglich Informationen über die Transkriptionsaktivität der Gene oder möglicherweise einer veränderten Stabilität der mRNA. Nicht zuletzt produzieren Mikroarray-Experimente, ebenso wie der zuletzt beschriebene Protein-Mikroarray, eine riesige Datenmenge, die es zu bewerten und zu analysieren gilt. Alternativ kann die Expression auch auf der Proteinebene durch 2D-Gelelektrophorese untersucht werden.

Weiter lassen sich Metabolitkonzentrationen und deren Änderungen in Anwesenheit der aktiven Substanz bestimmen. Die zu beobachtenden Veränderungen dienen als Muster für den Wirkmechanismus und können mit Mustern schon bekannter Wirkmechanismen verglichen werden, um Hinweise auf mögliche Zielproteine zu erhalten.

Schließlich werden Modellorganismen für genetische Tests zufällig oder gezielt mutiert und anschließend auf Resistenz oder Hypersensitivität gegenüber der Substanz untersucht. Eine Analyse der mutierten Gene kann dann wichtige Anhaltspunkte für die Zielproteine liefern (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Das Prinzip der genetischen Tests** (Zheng et al., 2004) <sup>[21]</sup>

Mit Hilfe erzeugter Mutanten von verschiedenen genetischen Modellorganismen kann ein Resistenz- bzw. Sensitivitätsprofil nach Behandlung mit einer niedermolekularen Verbindung erstellt werden. Anhand dieses Profils lassen sich Gene, die dabei direkt oder indirekt eine Rolle spielen, als mögliche Zielgene identifizieren.

Neben dieser experimentellen, direkten oder indirekten Vorgehensweise, kann man auch theoretisch an die Suche nach dem Zielprotein herangehen, indem man versucht anhand von Literaturdaten zu einem ähnlichen beobachteten, biologischen Effekt oder durch mit strukturell ähnlichen Molekülen erzielte Ergebnisse ein potentiell Zielprotein zu postulieren.

Sowohl theoretisch angenommene Zielproteine, als auch durch experimentelle Methoden identifizierte Bindungspartner sollten anschließend noch, je nach technischen Möglichkeiten und Art des Zielproteins, durch passende alternative Experimente belegt werden. Dies kann z.B. durch RNAi Experimente, Bindungsassays (z.B. Biacore), bestimmte Biomarker, durch den Vergleich mit anderen Substanzen oder durch eine quantitative RT-PCR geschehen.

Zusammenfassend wird in diesem Abschnitt die Vielfalt und Komplexität der Methoden und Testverfahren für das wachsende Forschungsgebiet der Chemischen Biologie/Genetik deutlich. Mit Hilfe der beschriebenen Verfahren und anhand der unterschiedlichen Möglichkeiten können so biologisch relevante chemische Substanzen als Leitstrukturen identifiziert werden, neue pharmakologisch interessante Ziele entdeckt werden und Lösungsansätze für unterschiedliche Problematiken bzw. Fragestellungen gefunden werden, was schließlich zur Entschlüsselung von wichtigen biologischen Prozessen führen kann.

Im Folgenden soll ein vorwärts-, und einen rückwärtsgerichteten Ansatz zur Untersuchung zweier Naturstoff-basierter Substanzklassen und die involvierten biologischen Prozesse vorgestellt werden.

### ***1.3 Der vorwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz zur Untersuchung des Ras-Signalwegs mit Hilfe der Naturstoffklasse der Tetransäuren***

#### **1.3.1 Signalwege**

Signaltransduktionsvorgänge sind für einzellige und mehrzellige Organismen von essentieller Bedeutung, sowohl um auf Veränderungen der Umwelt reagieren zu können, als auch bei der Verarbeitung innerer und äußerer Reize. Ferner werden viele wichtige biologische Prozesse durch die Signaltransduktion reguliert. An diesen Signalübertragungsprozessen sind oft eine Vielzahl von Enzymen und sekundären Botenstoffen (sogenannte „*second messenger*“) in einer oder mehreren nachgeschalteten Ebenen beteiligt (Signalkaskade). Dabei wird teilweise das ursprüngliche Signal verstärkt (Signalamplifikation). Signale mehrerer Signalkaskaden

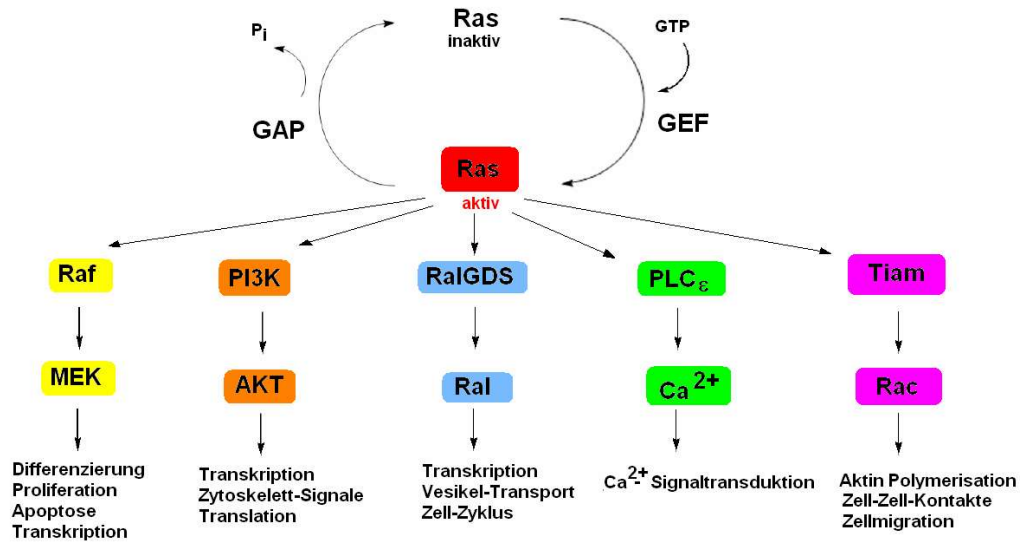
werden oft durch 'Crosstalk' im Zytoplasma oder im Zellkern integriert. Die Gesamtheit der Signalkaskaden in einem Zelltyp wird auch als dessen Signalnetzwerk bezeichnet. Der Anfangspunkt eines Signaltransduktionsprozesses ist ein intra- oder extrazellulärer Stimulus. Mit Hilfe von Proteinen in der Zellmembran und innerhalb der Zelle, auch Rezeptoren genannt, werden dann die extrazellulären Signale aufgenommen, an intrazelluläre Effektorproteine weitergeleitet und so im Zellinneren verarbeitet. Zu den am meisten untersuchten Signaltransduktionswegen zählen die Signalwege über G-Proteine (Guaninnukleotid-bindende Proteine oder auch GTP-bindende Proteine).<sup>[22]</sup>

### 1.3.2 Der Ras-Signalweg

Ras (*Rat sarcoma*) ist ein bekanntes Proto-Onkogen, das für ein kleines G-Protein kodiert.

Es gibt mehrere Ras-Isoformen. Die bekanntesten und am besten untersuchten sind H(arvey)-Ras, N(euroblastoma)-Ras und K(irsten)-Ras4A & 4B. Der Unterschied der Isoformen besteht in erster Linie in der C-terminalen Aminosäuresequenz, sowie der Art der Lipidierung des C-Terminus. Trotz der hohen Homologie führt die Aktivierung der einzelnen Ras-Isoformen zu unterschiedlichen biologischen Antworten. Als Grund wird unter anderem die unterschiedliche Lokalisation der Isoformen diskutiert.<sup>[23]</sup>

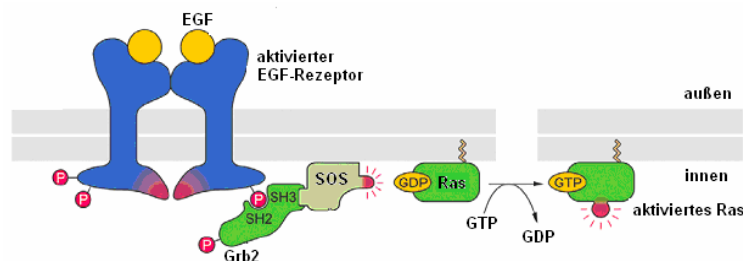
Ras ist ein zentrales Glied verschiedener Signaltransduktionswege und kontrolliert wichtige zelluläre Prozesse, indem es als molekularer Schalter zwischen aktiver GTP- (Guanosin-Triphosphat) und inaktiver GDP- (Guanosin-Diphosphat) gebundener Form hin- und herwechselt (Abbildung 8). Ras besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, die dazu führt, dass Ras automatisch wieder vom aktiven in den inaktiven Zustand überführt wird. Da diese intrinsische GTPase-Aktivität aber an sich gering ist, können Proteine vom GAP-Typ (GAP = GTPase Activating Protein) die GTP-Hydrolyse und damit die Ras-Inaktivierung beschleunigen. Proteine vom GEF-Typ (GEF = Guanine Nucleotide Exchange Factors) katalysieren den Wechsel von der GDP- zur GTP-gebundenen Form und führen so zu einer effizienten Aktivierung von Ras.<sup>[24,25]</sup>



**Abbildung 8: Überblick über die Ras-assozierten Signalwege.** Für Ras sind fünf Klassen von Effektoren beschrieben. Am bekanntesten ist die Serin/Threonin-Kinase Raf. Ebenfalls gut beschrieben sind die PI3K-Kinasen. GEFs wie Ral-GDS sind Aktivatoren der kleinen GTPasen RalA und RalB. Die GEFs Tiam1 und Tiam2 stimulieren die kleine GTPase Rac. Die Ras-Aktivierung von Phospholipase C $\epsilon$  führt zur Umwandlung von PIP $_2$  zu sekundären Botenstoffen. Aus der dargestellten Vielfalt an aktivierbaren Effektoren von Ras ist erkennbar, dass die Signalweiterleitung über das Ras-Protein sehr komplex ist <sup>[26]</sup>

Ein elementarer Signalweg, der durch Ras in Gang gesetzt wird, ist die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade. Da diese für die vorliegende Arbeit eine wichtige Rolle spielt, wird ihre Regulation im Folgenden näher beschrieben.

Bindet EGF (*E*pidermal *G*rowth *F*actor) an seinen Rezeptor, autophosphoryliert und dimerisiert dieser und rekrutiert den Grb2-Sos-Komplex, wobei Sos als GEF dann den GDP-GTP-Austausch in Ras katalysiert (Abbildung 9).

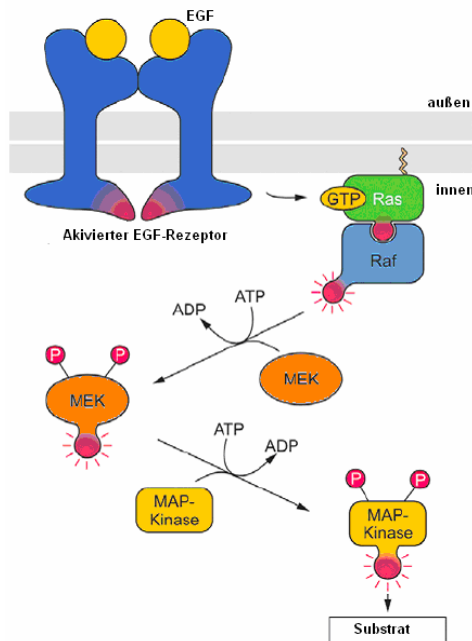


**Abbildung 9: Rezeptorbindung und Ras-Aktivierung** (Müller-Esterl, 2004) <sup>[27]</sup>

GTP-Ras treibt daraufhin die MAP-Kaskade über drei enzymatische Zwischenstufen an: Raf (*R*as-*A*ktivierende *F*aktor), MEK (*M*AP/*E*RK-*K*inase) und ERK (*E*xtracelluläre *S*ignal *R*egulierte *K*inase). Diese Kinasen werden sukzessiv phosphoryliert und



dadurch aktiviert; dabei dient jeweils die nachgeordnete Kinase als spezifisches Substrat für das vorgeschaltete Enzym (Abbildung 10). Die beiden wichtigsten Typen von MAP-Kinasen sind ERK-1 und ERK-2. Daneben sind in Säugetieren aber auch die MAP-Kinasen JNK 1/2 (c-Jun N-terminale Kinase), p38 Kinasen (p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ / $\delta$ ) und ERK5 beschrieben. Während ERK-1 und -2 allerdings durch Wachstumsfaktoren, die an Oberflächenrezeptoren binden, aktiviert werden, werden JNK, p38 und ERK-5 vor allem durch Stress und Wachstumsfaktoren aktiviert. <sup>[28]</sup>



**Abbildung 10: Ras/Raf-MAPK-Signalkaskade** (Müller-Esterl, Biochemie 2004)<sup>[27]</sup>. Nach der Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung von EGF wird Ras aktiviert und dadurch wiederum die Raf-MAPK-Signalkaskade in Gang gesetzt. Die Kinase ERK ist hier als MAP-Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase) bezeichnet.

ERK1/2 hat verschiedene zytosolische Substrate, es kann aber auch in den Zellkern eintreten und somit die Genexpression durch Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren kontrollieren. So phosphoryliert die in den Kern translozierte MAP-Kinase z.B. Elk-1 (engl. *Ets-like Protein*), das im Komplex mit SRF (engl. *Serum Responsive Factor*) an die regulatorische Promotorsequenz SRE (engl. *Serum Responsive Element*) bindet. Der aktivierte Komplex aus Elk-1 und SRF stimuliert die Expression zahlreicher Zielgene. <sup>[29]</sup>

Für die vorgestellte Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade zeigten Kolch et al. erst kürzlich, wie diese auf verschiedenen Ebenen reguliert wird, wodurch ERK vermittelte wichtige Entscheidungen über das zelluläre Schicksal bestimmen. So spielt das eingehende

Signal und die zeitliche Dauer der Reaktion eine wichtige Rolle bei PC12-Zellen. Eine Stimulierung mit EGF und die folgende Aktivierung des EGF-Rezeptors führen zur Zellteilung in dieser Zelllinie. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Stimulation mit NGF die Ausbildung von neuritenartigen Fortsätzen. <sup>[30]</sup>

Ein deutlicher Unterschied zwischen Stimulierung mit EGF und NGF, die zu so verschiedenen Antworten, wie der Proliferation auf der einen Seite und der Differenzierung auf der anderen Seite führt, liegt in der Integration der Signale: Während EGF zu einer transienten Aktivierung von ERK führt, bei der der Höhepunkt bereits nach wenigen Minuten erreicht ist, führt die NGF Stimulierung zu einer anhaltenden Aktivierung des Signalweges. <sup>[31, 32]</sup>

Die genauen Regulations-Mechanismen und Protein-Proteinwechselwirkungen sowie positive und negative Rückkopplungsschleifen usw. sind allerdings sehr komplex.

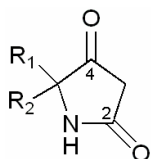
Neben dieser zeitlichen Kontrolle (hier: Dauer der ERK-Aktivierung) spielt auch die räumliche Regulation bzw. die subzelluläre Lokalisation eine wichtige Rolle für die Ras-Aktivität sowie für die Signalweiterleitung. Es ist bekannt, dass neben der Regulation der GTPase-Aktivität auch bestimmte dynamische Mechanismen wichtig sind. So werden beispielsweise spezifische Lokalisationsmuster der Ras Isoformen (H-, K-, N-Ras) und anderer Elemente der Signalkaskade (z.B. der Gerüstproteine) generiert und dadurch lokale Signalreaktionen reguliert. <sup>[33 - 35]</sup>

Die vorgestellte Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade stellt eines der zentralen Module für die korrekte Funktion der Zelle dar, und so nimmt Ras eine entscheidende Rolle in der Regulation dieses Signalweges ein. Die Bedeutung des Signalwegs und von Ras machen deutlich, warum Störungen und Fehlfunktionen zu solch ernsthaften Erkrankungen wie Krebs führen können: Punktmutationen des *Ras*-Gens wurden in 20 bis 30 % aller menschlichen Tumoren gefunden. Das Verständnis der molekularen Mechanismen dieses Signalweges könnte also für die Entwicklung neuer Krebstherapien hilfreich sein. <sup>[36,37]</sup>

### 1.3.3 Tetransäuren, Melophlin A

Eine Beeinflussung und Untersuchung des Ras-Signalweges ist mit Hilfe chemischer Modulatoren (Tetransäuren) möglich.

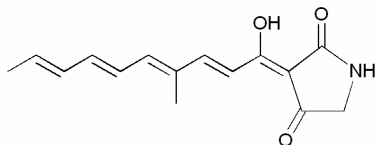
Als Tetransäuren werden Derivate des heterozyklischen Pyrrolidin-2,4-Dion-Grundgerüsts bezeichnet (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Struktur der Pyrrolidin-2,4-Dion (Tetramsäure) Einheit, R1 und R2 sind Reste, die offen sind für Diversifikation.**

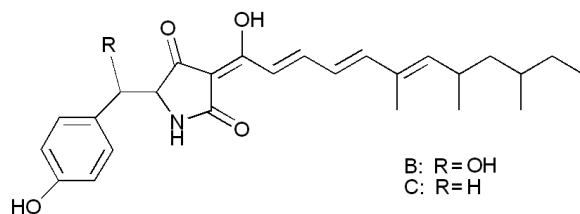
Das große Interesse an dieser Substanzklasse manifestiert sich u. A. in einigen erschienenen Übersichtsartikeln <sup>[38 - 40]</sup> zu diesem Themengebiet sowie einer Vielzahl isolierter Naturstoffe sowohl aus terrestrischen, als auch marinen Spezies, wie z.B. Schwämmen, Bakterien und Pilzen. Die auf der Struktur der Tetramsäuren basierenden Substanzen zeigen vielfältige biologische Aktivitäten von antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften über Zyto- und Mycotoxizität bis hin zu Antitumoraktivität.

Die Raveninsäure (Abbildung 12) ist ein strukturell einfacher Vertreter aus der Klasse der Polyenoiltetramsäuren. Sie wurde ursprünglich aus *Penicillium sp.* isoliert und zeigt antibiotische Aktivität gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Bakterienstämme. <sup>[41]</sup>



**Abbildung 12: Struktur Ravenische Säure**

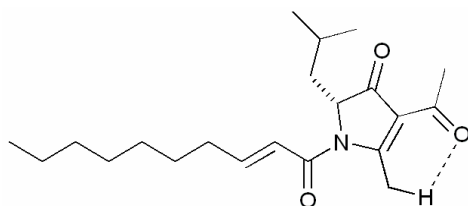
Hamburger et al. <sup>[42]</sup> fanden in dem Pilz *Paecilomyces militaris* die beiden Trienoiltetramsäuren Militarion B und C (Abbildung 13). Beide zeichnen sich durch geringe neurotogene Aktivität in PC12-Zellen aus, was sie potentiell interessant z.B für die Behandlung von Alzheimer macht.



**Abbildung 13: Struktur Militarion B und C**

Als Vertreter der Klasse der N-Acyltetramsäuren ist das aus dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus reuteri* gewonnene Reutericyclin (Abbildung 14) zu

nennen. Es wirkt gegen Gram-positive Bakterien und kann Lebensmittel vor dem Verderb schützen.<sup>[43]</sup>

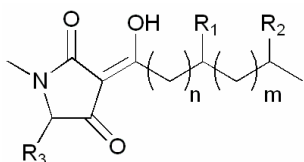


**Abbildung 14: Überwiegendes Tautomer von Reutericyclin**

Wie man z.B. in Abbildung 14 für Reutericyclin sieht, tragen viele Naturstoffe in 3-Position einen Acylrest und können dadurch verschiedene Tautomere bilden. Dabei liegen die Tetramsäuren in Lösung überwiegend in der Diketoform und nicht in der Enolform vor.<sup>[44]</sup>

Aufgrund der im Molekül auftretenden Wasserstoffbrücken koordinieren 3-Acyltetramsäuren Metallionen als Chelatkomplexe zwischen dem 3-Acyl-Sauerstoff und der 2-Carbonylgruppe. Die Stabilität einiger Tetramsäuren beruht auf der Chelatisierung bestimmter Metallkationen und kann auch den Transport der Naturstoffe durch Zellmembranen ermöglichen.<sup>[45]</sup>

Die Melophline sind *N*-Methyl-3-Acyltetramsäuren, die sich lediglich in ihren Substituenten am C5 des Pyrrolidin-2,4-Dionsystems (H oder Methyl) und in ihren Acyl-Seitenketten unterscheiden. Die Seitenketten erreichen eine Länge von 12 bis 16 Kohlenstoffatomen, sie kommen sowohl verzweigt als auch unverzweigt vor.



**Abbildung 15: Grundstruktur natürlich vorkommender Melophline**

Insgesamt wurden 19 natürlich vorkommende Melophline (A bis S) isoliert und ihre zytotoxische bzw. zytostatische Wirkung auf verschiedene Krebszelllinien sowie ihre antibakteriellen Eigenschaften durch verschiedene Arbeitsgruppen untersucht.<sup>[46-49]</sup>

Dabei fiel auf, dass die getesteten, antibakteriell wirkenden Melophline nur das Wachstum Gram-positiver Bakterien inhibierten, während kein Einfluss auf Gram-negative Bakterien beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse sind auch für andere Tetramsäuren beschrieben und unterstützen eine vom Arbeitskreis Janda

veröffentlichte Hypothese, dass ein Zusammenhang mit der Wirkung an der bakteriellen Zellwand z.B. auf die Protonenpumpen besteht. <sup>[45]</sup>

Neben den in diesem Abschnitt beschriebenen Eigenschaften der Tetransäuren und Melophline an sich, erschien vor allem eine Substanz -Melophlin A - als besonders interessant.

Diese Tetransäure wirkte zum einen zytotoxisch gegenüber gegen HL-60-Zellen, die von einem Patienten mit akuter maligner Leukämie stammen. <sup>[50]</sup>

Zum anderen führte sie zu einer Arretierung von NIH3T3-Maus-Fibroblasten in der G1-Phase. Vor allem aber konnte durch eine Behandlung mit Melophlin A der Phänotyp von *Ras*-Transformierten NIH3T3-Fibroblasten revertiert werden. <sup>[51]</sup>

Insbesondere diese letzte Beobachtung machte Melophlin A zu einem attraktiven Kandidaten als Modulator für die Untersuchung des Ras-Signalwegs.

## 1.4 Der rückwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz, die Suche nach spezifischen Phosphataseinhibitoren

### 1.4.1 Protein-Phosphatasen

Die Phosphorylierung wird von lebenden Organismen eingesetzt, um vielfältigste zelluläre Prozesse zu regulieren. Man nimmt an, dass etwa 30 % aller zellulären Proteine an einem oder mehreren Resten phosphoryliert sind. <sup>[52]</sup>

Die Kontrolle biologischer Ereignisse und das Vermeiden von Störungen, die zu ernsthaften Erkrankungen führen würden, erfordert die strikte Kontrolle durch komplexe Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Strategien.

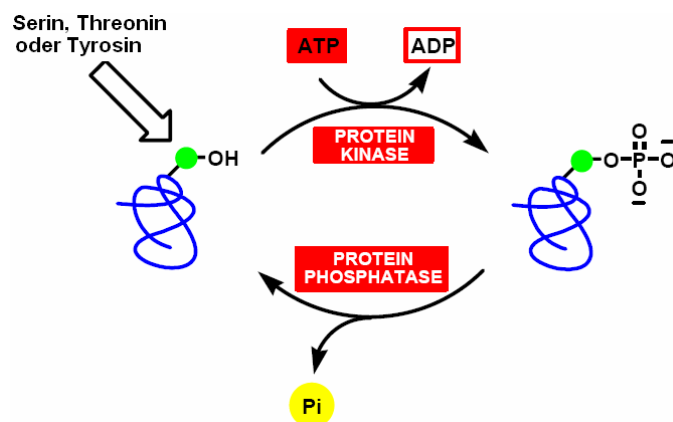


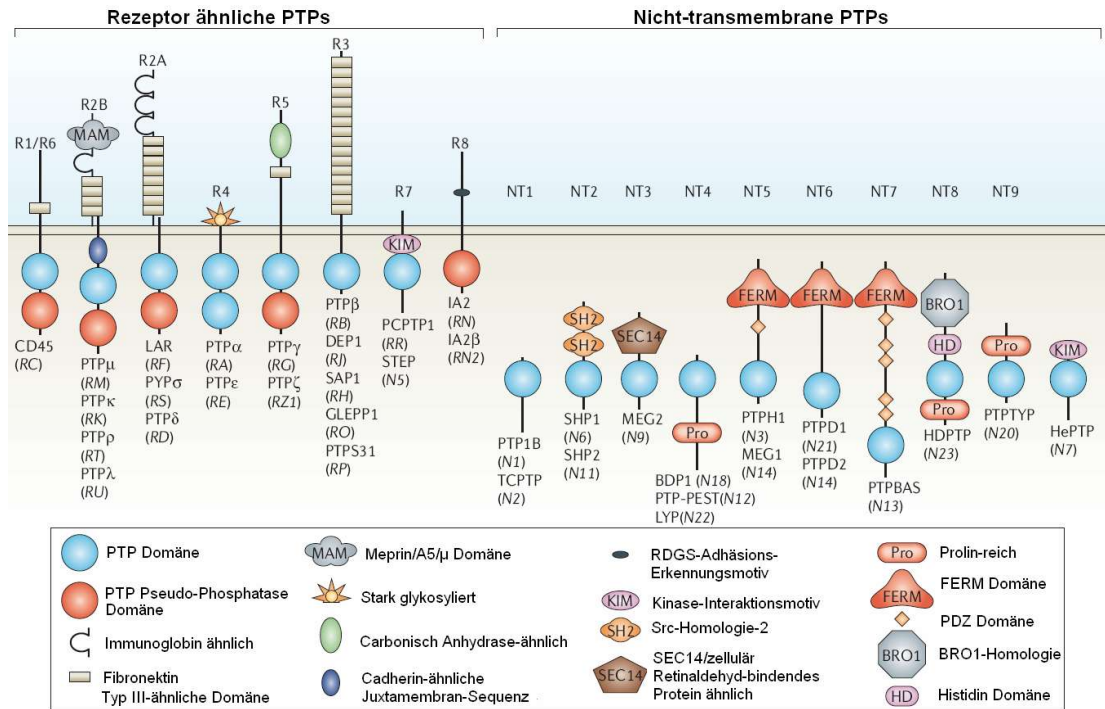
Abbildung 16: Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Reaktionen katalysiert durch Kinasen bzw. Phosphatasen

Dabei spielen Phosphatasen in Kombination mit Kinasen eine essentielle Rolle (Abbildung 16): Kinasen katalysieren die Phosphorylierung von Proteinen und stehen schon länger im Fokus der pharmazeutischen Forschung. Daneben kommt den Phosphatasen, die die Dephosphorylierung katalysieren, zunehmend Bedeutung zu. [53-55]

Kinasen sind in größerer Zahl vorhanden und weisen durch das Konsensus-Motiv des Substrates eine klare Spezifität auf. Hingegen ist die Familie der Phosphatasen zahlenmäßig unterlegen, weist keine bzw. keine offensichtliche Substratspezifität auf und kommt mit einigen wenigen katalytischen Untereinheiten aus. Allerdings werden die Phosphatasen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Regulatoren kontrolliert, so dass die Spezifität, Selektivität und die Lokalisierung dieser bedeutenden Enzyme über eine komplexe Regulation ermöglicht wird.

Um die Diversität zu erhöhen, exprimieren Organismen beispielsweise unterschiedliche regulatorische Untereinheiten in unterschiedlichen Geweben und zu unterschiedlichen Zeiten. Die hochspezifische Wirkung der Serin-Threonin-Phosphatasen wird also über verschiedene Mechanismen, wie z.B. ihren modularen Aufbau, die Steuerung über Regulatoren und ihre differentielle Expression sichergestellt. [56]

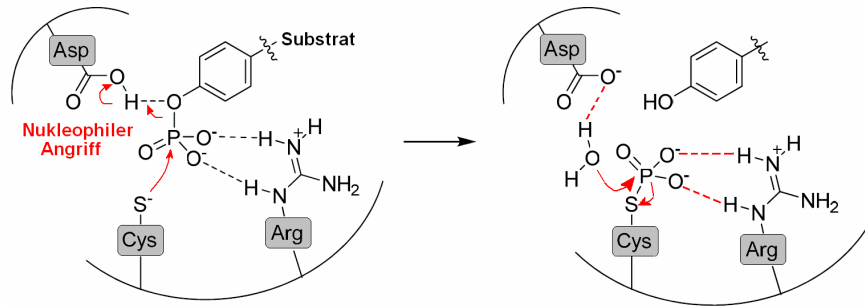
Protein Phosphatasen können anhand ihrer Struktur und Substratspezifität in zwei große Familien eingeteilt werden: die Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen (Abkürzung: PPs) und die Protein Tyrosin Phosphatasen (Abkürzung: PTPs). Die Serin/Threonin Phosphatasen sind eine Gruppe von Metalloprotein-Phosphatasen, die Phosphatester-modifizierte Serin- oder Threonin-Reste hydrolysieren. Sie haben sehr unterschiedliche Funktionen in der Zelle, z. B. spielen sie eine Rolle für die Muskelkontraktion, den Zellzyklusverlauf und den Glycogen-Metabolismus. [57, 58]



**Abbildung 17: Strukturelle Subtypen der Familie der Phosphatasen.** (Tonks, 2006) <sup>[59]</sup> Die unterschiedlichen Struktur motive der Domänen sind durch Symbole (Erläuterung in der Legende) definiert.

Strukturell bestehen die PPs aus mehreren Untereinheiten: einer katalytischen Untereinheit mit einem Metallion als Kern, meist  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$  Ionen, und einer oder mehrerer regulatorischen Untereinheiten. Man nimmt an, dass die Phosphat-Ester-Hydrolyse den Angriff des Phosphats über ein Metall-aktiviertes Wassermolekül beinhaltet und über die Bildung eines Phosphoenzym-Intermediats erfolgt. <sup>[60]</sup>

Die zweite große Familie sind die Protein Tyrosin Phosphatasen. Sie spielen eine bedeutende Rolle sowohl bei der positiven als auch bei der negativen Regulation von Signaltransduktionswegen. Allen gemeinsam ist das Aminosäure-Motiv  $HGX_5R$  (C = Cystein, X = eine beliebige Aminosäure, R = Arginin) im aktiven Zentrum. Das Phosphotyrosin wird für den Hydrolyseschritt zunächst vom Arginin des PTP-Motivs vorkoordiniert und bringt es so in die direkte Nachbarschaft des Cysteins. Ein von Asparaginsäure katalysierter nukleophiler Angriff der Cysteinseitenkette auf das Phosphotyrosin führt zu einem Phosphocystein-Intermediat, welches schließlich durch ein aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert wird. Durch die Beteiligung des Cysteins im katalytischen Mechanismus ist diese Enzymklasse sensibel gegenüber reversibler Oxidation. <sup>[60]</sup>



**Abbildung 18: Dephosphorylierungs-Mechanismus der Phospho-Tyrosin-Phosphatasen**

PTP1B ist der Prototyp eines Mitglieds der Familie der PTPs. Dieses Enzym spielt eine Rolle im Stoffwechsel, indem sie Tyrosinreste verschiedener Proteine wie c-Src,  $\beta$ -Catenin, des Insulin- und EGF-Rezeptors dephosphoryliert. Ferner sind PTP1B Knockout-Mäuse resistent gegen Übergewicht, welches durch die Aufnahme hochkalorischer Nahrung hervorgerufen wird und haben eine verstärkte Insulin Antwort. Dies lässt annehmen, dass die PTP1B eine Rolle bei der Regulation der Wachstumstumsfaktor-Antwort spielt. [60-64]

SHP-2 ist eine nicht-Rezeptor PTP, die die zelluläre Signaltransduktion über Wachstumsfaktoren und Zytokinen und den Einfluss auf den Ras/MAPK-Weg kontrolliert. [65] Übereinstimmend mit ihrer allgegenwärtigen Rolle bei der Signaltransduktion spielt die SHP-2 unter Anderem eine Rolle bei der Krebstherapie. Hier werden Mutationen des SHP-2 Genes mit dem Noonan-Syndrom, einer Entwicklungskrankheit, die häufig mit einer verringerten Körpergröße und unterschiedlichen Leukämien vor allem im Kindesalter einhergeht, in Zusammenhang gebracht. Ferner spielt die SHP-2 Hyperaktivität auch eine Rolle bei Infektionskrankheiten. [60, 66, 67]

Die PTPN2 (Protein Tyrosin Phosphatase, nicht-Rezeptor Typ 2, auch TC-PTP), ist eine T-Zell-Phosphatase, die viele Phosphoproteine wie z. B. p52Shc und die Rezeptoren für EGF, Insulin und andere Wachstumshormone dephosphoryliert. Obwohl man sie in vielen Zelltypen und Geweben findet, kommt sie vor allem in hämatopoietischen (blutbildenden) Zelltypen vor. PTPN2-Knockout-Mäuse werden vital geboren, zeigen allerdings 3 bis 5 Wochen nach der Geburt erste Defekte bei der Erythrozythen- und Lymphozythenbildung, die auf eine kritische Funktion der PTPN2 bei der Reifung des Knochenmarks schließen lassen. [68-70]

Die humane Phosphatase h-PTP  $\beta$  spielt genauso wie das Maus-Analogon VE-PTP (Homologie 95 %) eine Rolle in der vaskulären Biologie, da sie mit Tie-2, einem Tyrosin-Kinase-Rezeptor, assoziiert vorliegt und ihn negativ reguliert. Tie-2, wie auch Tie-1, beeinflussen die Signaltransduktion und die Aktivität der Angiopoietine, die für



die Bildung von Blutgefäßen nötig sind. Die Tie-2 Aktivierung kommt bei der adulten Vaskulation (Durchwachsung von Gefäßen) und bei der Entwicklung der kollateralen Blutgefäße vor und stellt den Blutfluss zum ischämischen, also blutleeren oder minderdurchbluteten Gewebe wieder her. <sup>[71]</sup>

Eine Inhibierung der h-PTP  $\beta$  sollte demzufolge die Tie-2 Aktivität erhöhen und damit die vaskuläre Funktion aufrechterhalten bzw. den Blutfluss zum ischämischen Gewebe erhöhen. Für diese Phosphatase sind eine Reihe von Malonat-Ester abgeleiteten Aryl-Sulfaminsäuren als selektive Inhibitoren beschrieben. <sup>[72]</sup>

Einige Bakterien wie *Salmonella* and *Yersinia* Stämme produzieren und benutzen PTPs für ihre Pathogenität. <sup>[73]</sup> *Mycobacterium tuberculosis* besitzt zwei funktionale PTPs, MPTPA and MPTPB, die in den Kulturüberstand der wachsenden bakteriellen Zellen sekretiert werden. Sie sollen durch die Dephosphorylierung von Wirtsproteinen, die in den Interferon- $\gamma$ -Signalweg involviert sind, das Überleben des Erregers in den Makrophagen des Wirtes sichern. Tatsächlich stoppte ein Knockout der mycobakteriellen Phosphatasen das Wachstum der Bakterien bei infizierten Meerschweinchen. <sup>[74 - 76]</sup> Die Tuberkulose ist eine der schwersten Krankheiten mit vielen Todesfällen weltweit: ein Drittel der Weltbevölkerung ist infiziert; ca. 35 Mio. werden erwartungsgemäß noch im 21. Jahrhundert an dieser Krankheit sterben. Traditionelle Mittel gegen diese Krankheit führen vielfach nach 6 bis 12 Monaten zu Resistenzen, daher erscheinen MPTPA/B als potentielle neue Ziele für eine Therapie sehr interessant. <sup>[77]</sup>

Neben den klassischen Phosphotyrosin-spezifischen Phosphatasen gehören auch die dualspezifischen Phosphatasen (DUSP) zu den PTPs. Diese besitzen zwar das gleiche Aminosäure-Motiv im aktiven Zentrum wie die klassischen PTPs, sind jedoch in der Lage neben Phosphotyrosin- auch Phosphoserin- oder Phosphothreonin-Reste zu dephosphorylieren. Über das klassische HCX<sub>5</sub>R Motiv hinaus zeigen sie untereinander wenig Ähnlichkeit in Struktur und Sequenz. Sie spielen eine entscheidende Rolle für intrazelluläre Signalwege, beispielsweise bei der Deaktivierung der MAP Kinasen, welche ein YXT Phosphorylierungs-Motiv (Y= Tyrosin, X = eine beliebige Aminosäure, T = Threonin) in der Kinase-Aktivierungsschleife aufweisen. Die sogenannten MAP Kinase- Phosphatasen (MKP) zeigen hohe Spezifität gegenüber verschiedenen MAP Kinasen. Sie wirken nach kontrollierter Aktivierung den MAPK induzierten Signalwegen durch Dephosphorylierung beider phosphorylierten Aminosäuren entgegen. <sup>[78-80]</sup>

Die VHR (Abkürzung für VH1-related) ist eine solche MKP und bekannt dafür, dass sie den MAPK-Signalweg reguliert. Es wurde gezeigt, dass sie verschiedene

Mitglieder der MAP Kinase Familie wie ERK-1, ERK-2 und JNK Kinasen dephosphoryliert. <sup>[81-85]</sup>

Die Cdc25- und Cdc14-Familien stellen weitere DUSPs dar und spielen als Regulatoren des Zellzyklus eine Rolle bei der Krebstherapie. Cdc25 Inhibitoren und ihre antiproliferativen Eigenschaften sind dabei bereits beschrieben, während man die Cdc14 Inhibierung bisher nicht genauer untersucht hat. <sup>[86]</sup>

Die zentrale Rolle der Phosphatasen in Signalwegen macht sie zu interessanten Forschungszielen zur Aufklärung der durch ihre Fehlfunktionen hervorgerufenen Erkrankungen. Dabei werden im Zuge eines rückwärtsgerichteten Ansatzes mit niedermolekularen Verbindungen neue, spezifische bioaktive Inhibitoren der Phosphatasen gesucht. Wichtige Voraussetzungen für ein zielgerichtetes und erfolgreiches Design selektiver Inhibitoren sind bereits gegeben. So sind strukturelle Informationen über die Aktivierungsdomäne und die katalytischen PTP-Domänen insgesamt vorhanden. Darüber hinaus sollte auch die gut untersuchte Beziehung zwischen der Tiefe der Bindungstaschen und der Substratspezifität das Design entsprechender bioaktiver Substanzen erlauben. <sup>[87, 88]</sup>

Es sind bereits einige am aktiven Zentrum wirkende Inhibitoren, die ein Phosphatanalogon beinhalten, sowie andere, allosterische Inhibitoren beschrieben. Viele industrielle und akademische Gruppen haben sich bereits mit dem Inhibitor design beschäftigt, allerdings erreichen aus Gründen der Spezifität, Zellpermeabilität oder der Potenz nur wenige Substanzen die klinische Phase. <sup>[89-92]</sup>

### 1.4.2 Spirooxindole

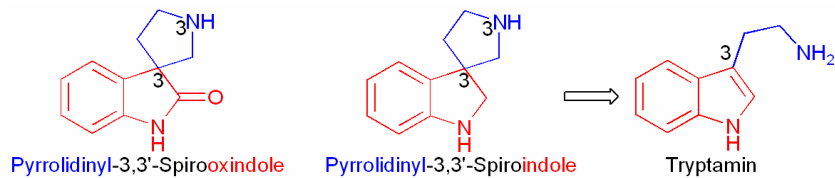
Naturstoffe bieten eine reiche Quelle an Phosphataseinhibitoren und stellen somit einen guten Ausgangspunkt für die Entwicklung synthetischer Analoga dar. <sup>[53]</sup>

Die 3,3'-Pyrrolidinyl-Spirooxindol Einheit ist ein privilegiertes, heterozyklisches Motiv, welches den Kern einer großen Familie von Alkaloiden mit stark bioaktivem Profil und interessanten strukturellen Eigenschaften bildet.

Signifikante Fortschritte in der Synthese dieses fusionierten heterozyklischen Systems haben kürzlich das Interesse an der Entwicklung neuer verwandter Substanzen als potentielle medizinische Agenzien oder biologischen Proben verstärkt.

Der 3,3'-Pyrrolidinyl-Spirooxindol Heterozyklus in Naturstoffen basiert auf einem Kern, der sich strukturell von Tryptamin ableiten lässt. <sup>[93]</sup> Tryptamin selbst ist vom 2-(Indol-3-yl)-ethylamin abgeleitet und ist ein Stoffwechselprodukt zahlreicher Lebewesen, vor allem Pflanzen. Es zählt zu den Indolalkaloiden, zu denen z.B. die Neurotransmitter

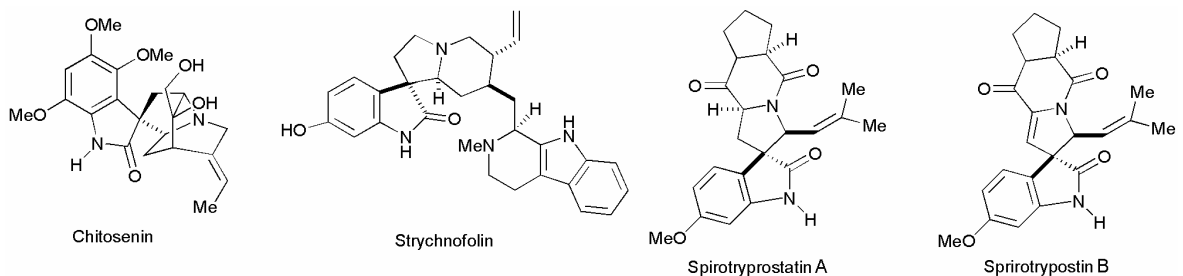
Serotonin und Melatonin, die Aminosäure Tryptophan und das Halluzinogen Psilocin gehören.



**Abbildung 19: Strukturmerkmale der Naturstoffklasse und Ableitung von Tryptamin**

Spirooxindol-Alkaloide gehören zu einer Familie von Naturstoffen, deren Isolation aus Pflanzen der Familien *Apocynaceae* (Hundsgiftgewächse) und *Rubiaceae* (Rötegewächse, auch Krappgewächse oder Kaffeegewächse) bereits 1973 beschrieben wurde. <sup>[94]</sup> Erst 2003 publizierten Carreira and Marti einen Übersichtsartikel zur Synthese von Naturstoffen mit dem fusionierten heterozyklischen System. <sup>[95]</sup>

Das strukturelle Schlüsselcharakteristikum dieser Substanzen ist die Spiro-Ring-Fusion an Position 3 des Oxindol-Kerns mit unterschiedlichen Substitutionsgraden rund um den Pyrrolidin- und Oxindol-Ring. Zusätzlich zu der interessanten molekularen Architektur und dem dicht funktionalisierten Kern zeigen einige Naturstoffe mit diesem heterozyklischen Motiv eine signifikante Bioaktivität. <sup>[93]</sup>



**Abbildung 20: Biologisch aktive Spirooxindole**

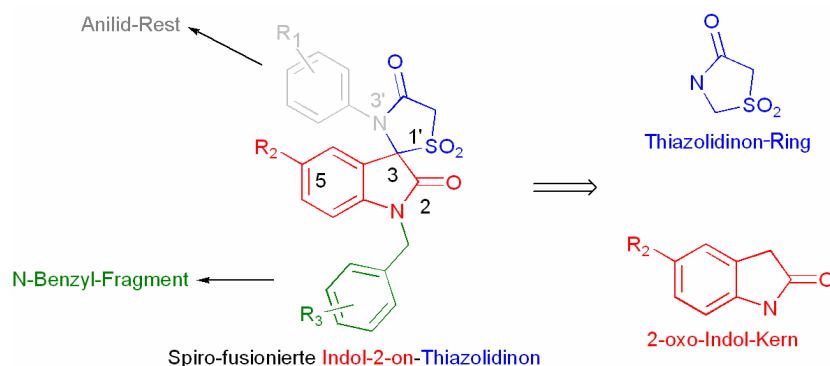
Chitosenin ist beispielsweise ein strukturell interessanter Naturstoff, der kurzlebige inhibitorische Aktivität gegenüber ganglionischer Transmission (Signalübertragung an den Nervenknotten) *in vivo* bei Ratten und Kaninchen zeigt. <sup>[96-98]</sup>

Strychnofolin inhibiert die Mitose in einer Reihe von Krebs-Zelllinien. <sup>[99]</sup>

Die Spirotryprostatine A and B wurden aus einer Fermentationsbrühe von *Aspergillus fumigatus* isoliert und zeigten, wie der Name „Statin“ schon andeutet, eine komplette Inhibierung der G2/M Progression in bestimmten Säugerzellen. <sup>[100, 101]</sup>

Die beschriebenen Eigenschaften dieser heterozyklischen Naturstoffe, ihre Funktionen in biologischen Prozessen, die sie meist aufgrund ihrer Fähigkeit zur Komplexbildung, seltener auch aufgrund ihrer Brønsted-Basizität besitzen, machen Heterozyklen generell zum Ausgangspunkt pharmazeutischer Wirkstoffe.<sup>[102]</sup>

Bei einem Hochdurchsatz-Screening auf der Suche nach Phosphatseinhilatoren innerhalb der abteilungseigenen Substanzbibliothek erschienen in diesem Zusammenhang die heterozyklischen Spiro-fusionierten Indol-2-on-Thiazolidone (Abbildung 21) als spezifische MPTPB-Phosphataseinhibitoren interessant.



**Abbildung 21: Spiro-fusionierte-Indol-2-on-Thiazolidinone** mit dem 2-oxo-Indol-Kern, der in vielen Naturstoffen vorkommt, und dem Thiazolidinon-Ring als zusätzlicher, synthetischer Heterozyklus.<sup>[103]</sup>

## 1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten biologische Prozesse mit Hilfe von chemisch-genetischen Ansätzen und mittels Naturstoff-basierter Substanzklassen untersucht werden.

In einem vorwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatz sollte die Modulation des Ras-Signalweges durch die Naturstoffklasse der Tetransäuren untersucht werden. Im Zusammenhang mit dem Ras-Signalweg erschien vor allem die von Aoki et al. isolierte Tetransäure Melophlin A interessant, da hier erste biologische Untersuchungen zeigten, dass die Substanz eine Reversion des Phänotyps H-*Ras*-transformierter NIH3T3-Fibroblasten bewirkte. Auch durch vorangegangene Untersuchungen innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe gab es verschiedene Hinweise, dass sich das makromolekulare Ziel von Melophlin A im Ras/MAPK-Signalweg befindet.

Zunächst sollte dies mit einem phänotypischen Assay in H-*Ras*-transformierten MDCK-F3-Zellen und mit dem HLR-Elk-1 *Trans*-Reportersystem, sowohl für Melophlin A als auch für weitere, synthetisierte Derivate überprüft werden. Hierbei sollten die erhaltenen Daten gleichzeitig zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Analyse genutzt werden.

Außerdem sollte zur Bestätigung der Hypothese, dass der Ras/MAPK-Weg tatsächlich direkt betroffen ist, dieser mit Hilfe eines unabhängigen, zweiten Ras-Modellsystems untersucht werden. Hierfür sollten EGF- und NGF-stimulierte PC12-Zellen mit Melophlin A behandelt und beobachtete Effekte weiter untersucht werden.

Darüber hinaus sollte der Phosphorylierungszustand der zentralen Kinase des Signalwegs mit Hilfe eines phosphospezifischen ERK-Westernblots analysiert werden, um den Ansatzpunkt des Melophlin A im Ras/MAPK-Signalweg oberhalb oder unterhalb zu bestimmen. Eine ausbleibende Phosphorylierung dieser Kinase wäre dabei ein Zeichen dafür, dass die Signalkaskade an bzw. ab dieser Stelle unterbrochen ist.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte es schließlich möglich werden, mit Hilfe zweckmäßiger, weiterführender Testverfahren die molekularen Angriffspunkte von Melophlin A zu charakterisieren und seinen Wirkmechanismus so genauer zu beschreiben. Letztlich sollte validiert werden, dass ein Zusammenhang zwischen diesen potentiellen molekularen Angriffspunkten von Melophlin A und dessen biochemischen Funktionen in der Zelle und dem Ras-Signalweg existiert, so dass der beobachtete phänotypische Effekt auf molekularer Ebene erklärt wäre.

Ein rückwärts gerichteter chemisch-genetischer Ansatz sollte für die Suche nach spezifischen Phosphataseinhibitoren innerhalb der Naturstoffklasse der Spirooxindole genutzt werden.

Im Rahmen eines Roboter-unterstützten Screenings innerhalb der eigenen AG wurden sieben Spiro-fusionierte-Indol-2-on-Thiazolidinone identifiziert, die spezifisch MPTPB inhibieren aber keine Aktivität gegenüber Cdc25, PTP1B, MPTPA, VHR, PP1, SHP-2, VE-PTP bzw. PTPN2 zeigten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Daten zunächst manuell validiert werden, bevor ausgehend von der Inhibitor-Struktur des primären Screenings verschiedene, synthetisierte Analoga bezüglich ihrer potentiellen inhibitorischen Wirkung auf MPTPB und 6 weiteren ausgewählten Phosphatasen (MPTPA, PTP1B, VHR, SHP-2, h-PTP  $\beta$  bzw. PTPN2) getestet werden sollten.

Die generierten Daten sollten auch hier zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Analyse dienen. Außerdem sollten potentielle, potente Substanzen identifiziert werden und die Bestimmung ihrer Steady-State-Kinetiken zur Aufklärung ihrer Wirkmechanismen beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Vektoren

##### Wnt Reportergen-Assay

Topflash<sup>[104]</sup>

pEQ176<sup>[105]</sup>

##### Phosphatase-Expression

pET22b<sup>[106]</sup>: Ursprungsvektor PP1 Expression  
5.493 bp  
Ampicillin Resistenz

PT7-7<sup>[107]</sup>: Ursprungsvektor PTP1B und VHR Expression  
2.473 bp  
Ampicillin Resistenz

Außerdem wurden die Expressions-Vektoren pOPINE' (Multiple Klonierungsstelle, His-Tag), pOPINF (Multiple Klonierungsstelle, 3 Cysteine + Histidin-Tag), pOPINM (Multiple Klonierungsstelle, 3 Cysteine, MBP- und Histidin-Tag) und pOPINS (Multiple Klonierungsstelle, 3 Cysteine, SUMO- und His-Tag) von der Dortmund Protein Facility verwendet.

#### 2.1.2 Bakterien

*E. coli* BL21(DE3) Genotyp: *ompT*, *hsdSB* (*rB*-,*mB*-), *gal*( $\Delta$ *clts857 ind1*, *sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7gene1*), *dcm* (DE3)<sup>[108]</sup>

#### 2.1.3 Hefen

*Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a<sup>[109]</sup>

*Saccharomyces cerevisiae* BY4716<sup>[109]</sup>

## 2.1.4 Zelllinien

### HeLa

Epithelzellen des Zervixkarzinoms einer 31-jährigen Frau mit dem Namen Henrietta Lacks (CCL-2; ATCC, Rockville, Maryland, USA bzw. ACC57; DSMZ, Braunschweig)

### HLR-Elk-1

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

Epitheliale Madine Darby Canine Kidney Zellen.

Isoliert aus der Niere von *Canis familiaris* (Cocker Spaniel)  
(CCL-34; ATCC, Rockville, Maryland, USA)

### MDCK-F3

MDCK-Zellen stabil transfiziert mit onkogenem v-H-*Ras*.

MDCK-F3-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. O. Müller, Fachhochschule Kaiserslautern überlassen

### BSC-1

Epithelzellen isoliert aus der Niere von *Cercopithecus aethiops* (Grüne Meerkatze).  
(CCL-26; ATCC, Rockville, Maryland, USA)

### HEK293

Humane embryonale Nierenzellen (Human Emryonic Kidney), die auch als HEK-Zelllinie oder 293-Zellen bezeichnet werden.

(CRL-1573; ATCC, Rockville, Maryland, USA bzw. ACC 305; DSMZ, Braunschweig)

### PC12

Phäochromocytomzellen der Nebenniere aus *Rattus norvegicus* (Ratte)

(CRL-1721; ATCC, Rockville, Maryland, USA bzw. ACC 159; DSMZ, Braunschweig)

### L-Zellen

Subkutane Bindegewebszelllinie der Maus



### **L-Wnt-3a-Zellen**

Subkutane Bindegewebszelllinie der Maus, transfiziert mit Wnt-3a-Expressionsvektor  
L-Zellen und L-Wnt-3a-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. L. Tickenbrock,  
(heute Hochschule Hamm-Lippstadt) überlassen

## **2.1.5 Zellkulturmedien**

### **Zellmedium für HeLa-, MDCK-, MDCK-F3-, HEK293-, L- und BSC-1-Zellen**

10 % FCS (Fötales Kälberserum, *fetal calve serum*), nicht-essentielle Aminosäuren  
(100 µM), Natrium-Pyruvat (1 mM), Penicillin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml) in  
DMEM Medium (D-Glucose (4,5 mg/l), L-Glutamat darin bereits zugesetzt)

### **Zellmedium für PC12-Zellen**

10 % HS, 5% FCS, nicht-essentielle Aminosäuren (100 µM), Natrium-Pyruvat (1 mM),  
Penicillin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml) in DMEM Medium (mit D-Glucose (4,5  
mg/l) und L-Glutamat)

### **Zellmedium für HLR-Elk-1-Zellen**

10 % FCS (hitzeinaktiviert), nicht-essentielle Aminosäuren (100 µM), G418 (250  
µg/m), Hygromycin B (100 µg/ml), Penicillin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml) in  
DMEM Medium (mit D-Glucose (4,5 mg/l) und L-Glutamat)

### **Hungermedium für HLR-Elk-1-Zellen**

0,5 % FCS (hitzeinaktiviert), nicht-essentielle Aminosäuren (100 µM), Geneticin G418  
(250 µg/ml), Hygromycin B (100 µg/ml), Penicillin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml)  
in DMEM Medium (mit D-Glucose (4,5 mg/l) und L-Glutamat)

### **Zellmedium für L-Wnt-3a-Zellen**

10 % FCS, nicht-essentielle Aminosäuren (100 µM), Natrium-Pyruvat (1 mM),  
Penicillin (50 U/ml)/ Streptomycin (50 µg/ml), Geneticin G418 (400 µg/ml) in DMEM  
Medium (mit D-Glucose (4,5 mg/l) und L-Glutamat)

## 2.1.6 Protein- und DNA/RNA-Standards

Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color (BioRad, Hercules, USA)

Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Kaleidoscope® (BioRad, Hercules, USA)

Gene Ruler 1 kB (Fermentas, St. Leon Rot, D)

Gene Ruler 100 bp (Fermentas, St. Leon Rot, D)

## 2.1.7 Antikörper

$\alpha$ -Tubulin-FITC Antikörper, F2168 (Sigma, Steinheim, D)

### **Primäre Antikörper:**

Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper (9101 bzw. 9106; Cell Signaling Technology, Danvers, USA) aus Kaninchen

p44/42 MAP Kinase Antikörper aus Maus (9102; Cell Signaling Technology, Danvers, USA)

$\beta$ -Tubulin-Antikörper, monoklonal, aus Maus (T8660; Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

### **Sekundäre Antikörper:**

Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper, HRP-konjugiert (31460; Pierce, Rockford, USA)

IRDye 680 Ziege-Anti-Maus Antikörper (926-32220; LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)

IRDye 800CW Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (926-32211; LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)

## 2.1.8 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden Chemikalien 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 siehe Tabelle 1.

**Tabelle 1: Reagenzien und Bezugsquellen**

<b>Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aminosäuren, nicht-essentiell, 100x	Invitrogen, Karlsruhe, D
Coelestinblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Coenzym A	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Collagen R	Serva, Heidelberg, D
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva, Heidelberg, D
DAPI Dilaktat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DMSO	Serva, Heidelberg, D
dNTP Mix RNase free	Ambion Biosystems, Darmstadt, D
Epidermal Growth Factor (EGF)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Geneticin G418	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe, D
Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Luciferin	Promega, Mannheim, D
Medium DMEM, mit hohem Glucosegehalt (4,5 g/l) und L-Glutamin-Zusatz	Invitrogen, Karlsruhe, D PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Natrium-Pyruvat, 100x	Invitrogen, Karlsruhe, D
Nerve Growth Factor (NGF), 7S, aus Maus	Millipore (CHEMICON / Upstate / Linco), Schwalbach, Taunus, D
ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Pferdeserum (HS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
para-Nitrophenolphosphat (pNPP)	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Poteinaseinhibitorcocktail	Roche, Mannheim, D
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RNase Away	Molecular Bio Products, San Diego, CA, USA
SlimFast Schoko	Allpharm Vertriebs GmbH, Messel, D
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Super Signal West Pico Luminol Enhancer Lösung	Pierce, Rockford, USA
Super Signal West Pico Luminol Peroxide Lösung	Pierce, Rockford, USA
Trypsin-EDTA 0,05 %	Invitrogen, Karlsruhe, D

## 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

12- und 24-Loch Zellkulturplatten (Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, D)  
3,5 cm Petrischalen (Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, D)  
96-Loch Platten, klar (Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, D)  
384-Loch Platten, klar (Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, D)  
96-Loch Platten, schwarz für Fluoreszenzmessung (3916, Corning, NY, USA)  
20G x 1.5“ Kanülen (Thermo, Leuven, BL)  
Einmalpipetten, steril (Sarstedt, Nümbrecht, D)  
Gewebekulturschalen (Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, D)  
Incidur® (Ecolab, Wien, AT)  
Inject®-F 1 ml Einmalspritzen (9166017V; Braun, Melsungen, D)  
Kunststoff-Küvette, (Sarstedt, Nümbrecht, D)  
Kryoröhrchen (Nalgene, Rochester, USA)  
Neubauer Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D)  
Pipettenspitzen (Gilson, Limburg-Offheim, D, Eppendorff, Hamburg, D)  
PVDF-Transfermembran, 0.45 µm (Pierce, Rockford, USA)  
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 und 2 ml) (Eppendorff, Hamburg, D)  
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) (Sarstedt, Nümbrecht, D)  
Restore™ Westernblot Stripping Puffer (Pierce, Rockford, USA)  
Röntgenfilm, CL-Xposure, 8”x10” (Kodak, Stuttgart, D)  
Safe Seal Tips, 10 µl (693010, Biozym, Hessisch Oldendorf, D)  
Safe Seal Tips, 200 µl (692069, Biozym, Hessisch Oldendorf, D)  
Safe Seal Tips, 1000 µl (691000, Biozym, Hessisch Oldendorf, D)  
Spitzen für Pipettenboxen als Stecksystem (Brand, Wertheim, D)  
Thermo Fast 96 Detection Plate, (AB-1100/W, Abgene, Hamburg, D)  
Ultra clear cap strips, (AB-0866, Abgene, Hamburg, D)  
Whatmann 3MM Papier (Schleicher & Schüll, Dassel, D)  
Zellschaber (Falcon Becton Dickinson, Heidelberg, D)

## 2.1.10 Allgemeine Laborgeräte

Accu-Jet (Brand, Wertheim, D )  
Autoklav Varioklav® 400 (Thermo, D)  
2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen, D)  
Brutschrank (Binder, Tuttlingen, D)  
Einfrierhilfe (Nalgene, Rochester, USA)

ELISA-Photometer (MR 5000, Dynatech, D)  
Feinwaage (BP301S, Sartorius, D)  
Gelscanner Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, Stuttgart, D)  
Gene Amp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosciences, Darmstadt, D)  
GenePulser XCell Totalsystem (BioRad, Hercules, USA)  
Hybridisierungskammer (G2534A; Agilent Technologie, Böblingen, D)  
Hybridisierungsofen (G2545A; Agilent Technologie, Böblingen, D)  
Inkubator Nuaire DHD Autoflow NU 5510 E (Nuaire, Fernwald, D)  
Luminometer Lumat LB 9501 (Berthold, Wildbad, D)  
Mikroarray Scanner (G2565BA; Agilent Technologie, Böblingen, D)  
NanoDrop (ND-1000; NanoDrop Technologies, USA)  
Mikroskope (Labovert (Leica), Axiophot und Axiovert 200M (Zeiss))  
Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, D)  
pH-Meter CG 840 (Schott, Mainz, D)  
Pipetten und Multikanalpipetten (Gilson; Limburg-Offheim, Eppendorf, Hamburg, D)  
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)  
Trans-Blot Transferkammer (BioRad, Hercules, USA)  
Vortex Genie 2 (Roth, Karlsruhe, D)  
Wasserbad Memmert (Hettich AG, Bäch, CH)  
Whole Rat genome Microarray Kit 4x44K 60mer (Agilent Technologie, Böblingen, D)  
Zentrifuge Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Hamburg, D)  
Zentrifuge Eppendorf Minispin (Eppendorf, Hamburg, D)

### **2.1.11 Software**

Agilent Feature Extraction (7.5) (Agilent Technologie, Böblingen, D)  
Advanced Image Data Analyzer (*AIDA*, *raytest* Isotopenmessgeräte, Berlin, D)  
ExcelFit (Zusatz Excel, Microsoft Office, Windows)  
Gene Amp 5700 SDS (Applied Biosciences, Darmstadt, D)  
LinRegPCR (Free download: [gene-quantification.com/download.html](http://gene-quantification.com/download.html); Ramakers et al., Neuroscience Letters 339, 2003, Ruijter et al., Nucleic Acids Research 2009)  
Origin 7 (Origin MicroCal Originlab®)

Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, USA, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)

Rosetta Resolver System (Rosetta Biosoftware, Seattle, USA)

### **2.1.12 Reagenziensätze (Kits)**

ATP Determination Kit (Invitrogen, Karlsruhe, D)

ImmoMix – qPCR Mix (Bioline, Luckenwalde, D) bzw. QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Hilden, D)

Low RNA Input Linear Amplification (Agilent Technologies, Böblingen, D)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, D)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D)

RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Böblingen, D)

RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen, Hilden, D)

SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, D)

SuperScript™ Plus Direct cDNA Labeling System mit Alexa Fluor® aha-dUTPs (Invitrogen, Karlsruhe, D)

### **2.1.13 Enzyme**

Superscript II (Reverse Transkriptase) (Invitrogen, Karlsruhe, D)

#### **Phosphatasen**

Die humane Protein Tyrosin Phosphatase h-PTP  $\beta$  wurde von Beate Schölermann (Max-Planck-Institut Dortmund) kloniert, exprimiert und isoliert.

Die mycobakterielle Phosphatase MPTPB wurde von Ana Mesias (Chemical Genomics Center, Dortmund) kloniert und von Alexander Giffey (Max-Planck-Institut Dortmund) exprimiert und isoliert.

Die Phosphatasen VHR und PTP1B wurden von Dr. Kirill Alexandrov (Max-Planck-Institut Dortmund) kloniert, exprimiert und isoliert.

MPTPA und SHP2 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. H. Schwalbe (Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt.

Die mit einem GST-Label versehene Phosphatase PTPN2 wurde von Firma Stratagene (Amsterdam, NL) bezogen.

Die Cdc14B-Gensynthese wurde bei Mr. Gene (Regensburg, D) in Auftrag gegeben.

## 2.1.14 DNA Oligonucleotide/Primer

Oligo dT Primer<sub>12-18</sub> für die reverse Transkription (283117, Invitrogen, Karlsruhe, D)

### Primer für qRT-PCR:

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen und sind jeweils in 5'-3'-Richtung angegeben.

β-Aktin (Haushaltsgen 1)

Kürzel: **β-Aktin**

LEFT PRIMER: CCTGTGGCATCCATGAAACT  
RIGHT PRIMER: GCCACCAATCCACACAGAGT  
PCR-Produktgröße: 218 bp

GAPDH\_Ratte (Haushaltsgen 2)

Kürzel: **GAPDH**

LEFT PRIMER: AAGTTCAACGGCACAGTCAAGGCT  
RIGHT PRIMER: TTCTCGTGGTTCACACCCATCACA  
PCR-Produktgröße: 254 bp

(Die verwendeten Primersequenzen für die Haushaltsgene wurden freundlicherweise von Dr. Robin Vetter (Max-Planck Institut Dortmund) zur Verfügung gestellt.)

### Programm für Primerdesign: Primer 3 (s. 2.1.11)

#### Parameter für Primerdesign:

Produktgröße: 100-200 bp  
Primerlänge: 18-30 bp  
GC Gehalt: 30 - 80 % (idealerweise: 40 – 60 %)  
T<sub>m</sub> (Schmelztemperatur) 63 – 67 °C (idealerweise 64 °C)  
TA (Annealingtemperatur) 58 – 62 °C (idealerweise 59 °C)  
T<sub>m</sub> Produkt 65 – 85 °C (idealerweise 75 °C)

Δ T<sub>m</sub> vorwärts- und rückwärtsgerichteter Primer ≤ 4 °C

keine 3 oder mehr Gs oder Cs am 5'Primerende, kein T am 3'Ende

**Tabelle 2: Genspezifische Primer für die quantitative RT-PCR**

<b>Gen (englische Bezeichnung) mit Angabe der Accessionnr. und des verwendeten Namens Kürzel</b>	<b>Primersequenz (L= left, R= right)</b>	<b>PCR-Produktgröße [bp]</b>
Rattus norvegicus early growth response 1, mRNA. NM_012551 Kürzel: <b>Egr-1</b>	L: aaccoccttttcagcctagtcagtg R: ctgagtaaatgggactgctgtcgt	162
Rattus norvegicus uPAR-3 gene, partial CDS. X76129 Kürzel: <b>uPar-3</b>	L: acattccaggcagaagaaaagagg R: aacttcctccctagccaaaggact	175
Rattus norvegicus plasminogen activator, urokinase receptor (Plaur), mRNA. NM_134352 Kürzel: <b>Plaur</b>	L: tttccatagcaaccagacctttca R: tcaatgaggacgtctcttcgtagg	168
PREDICTED: Rattus norvegicus similar to serum response factor, mRNA. XM_576514 Kürzel: <b>sim. Srf</b>	L: ataggggaggggtgtttaccctgt R: ttgtcagcagatcatccccactat	209
Rattus norvegicus frizzled homolog 5 (Drosophila) (Fzd5), mRNA. NM_173838 Kürzel: <b>Fzd5</b>	L: cctgaaggagtcacaccactcta R: gtagcacgcagacaggaagatgat	238
Rattus norvegicus dual specificity phosphatase 5 (Dusp5), mRNA. NM_133578, XM_346588 Kürzel: <b>Dusp5</b>	L: tctgactcattggagtttcttgc R: tggtttttggctctagggctctgaca	156
PREDICTED: Rattus norvegicus docking protein 3, mRNA XM_225170 Kürzel: <b>Dok-3</b>	L: cctccagtcctctatgcgtctgtgt R: ctccagctcctcgctgttatggtag	193
Rattus norvegicus P11 gene, complete cds. AF465254 Kürzel: <b>P11</b>	L: cgcgttaacagagcattttgtttc R: aaatgtgctggatgcttacacgtt	218
Rattus norvegicus Bcl2 modifying factor (Bmf), mRNA. NM_139258 Kürzel: <b>Bmf</b>	L: gaacagacattctgggaggacaga R: ccttaggaactcaaccagcagaca	190
PREDICTED: Rattus norvegicus vinculin, mRNA. XM_223781 Kürzel: <b>Vcl</b>	L: acctcctgcttacctttgatgagg R: cctgctgtctctcatcgatcattt	180
Rattus norvegicus $\beta$ -catenin 1 gene, promoter region and exon 1 AF486617 Kürzel: <b><math>\beta</math>-Catenin</b>	L: cttcagggttggtggtgcag R: cccacacctcacccaagtca	188
Predicted: Rattus norvegicus rho/rac exchange factor (GEF); Arhgef18_predicted XM_221775 Kürzel: <b>A18</b>	L: ggcttgtccaaaggctgctt R: aaaagccacattgcgttgga	174
Interferon-related development regulator 1 NM_019242	L: tcggctcctgagcgcgatgat R: cgggcttttgttcgagcttt	238



Kürzel: <b>lfrd</b> Matrix metalloprotease 10 NM_133514 Kürzel: <b>Mmp10</b>	L: cacgagccaagccaacattc R: aattcaggctcgggattcca	246
Regulator of G-protein signaling 4 NM_017214 Kürzel: <b>Rgs-4</b>	L: aacagggcaaaactaaattaactgc R: gtgtcagtcagacagcagagtttt	193
Bcl2-binding component 3 NM_173837 Kürzel: <b>Bbc3</b>	L: ctggagccccagaaatggag R: agggctccccaagtccgat	236
<b>Rab 15</b> NM_198749 Kürzel: Rab15	L: tctgcctttgcttctgctg R: cctcaggccttgatcccatc	210
Actin-binding Rho activating protein NM_175844 Kürzel: <b>Abra</b>	L: gatatggccgccccaaaagag R: gcaccagtcagtggtttcctg	228

### 2.1.15 Inhibitoren und verwendete Substanzen

RNase out (10777019, Invitrogen, Karlsruhe, D)

Alle Substanzen lagen, soweit nicht anders angegeben, als 10 mM Stammlösung in DMSO vor.

**Melophlin A** synthetisiert durch Dr. Tanja Knoth

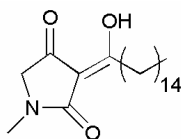


Abbildung 22: Strukturformel Melophlin A

**Kontrollen für die Affinitätschromatographie** synthetisiert durch Dr. Tanja Knoth

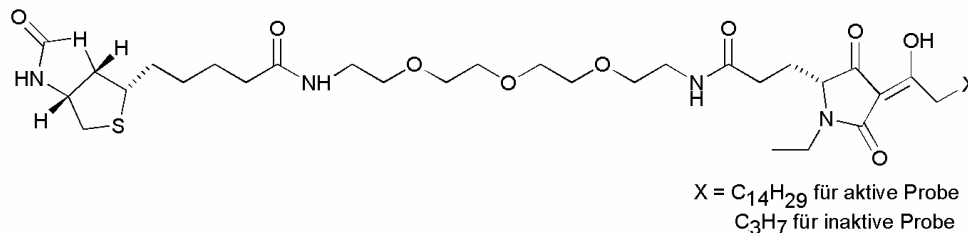
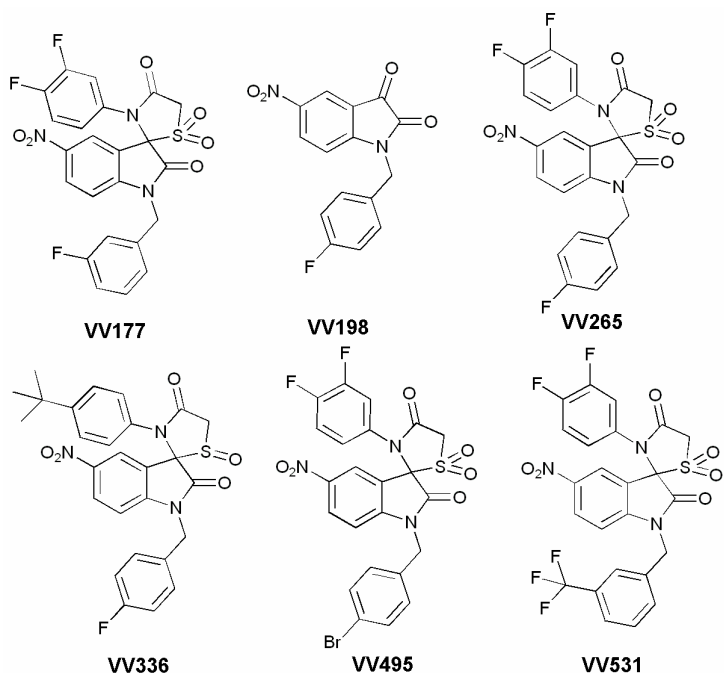


Abbildung 23: Biotinylierte, aktive und inaktive Affinitätschromatographiesonde mit PEG-Linker.

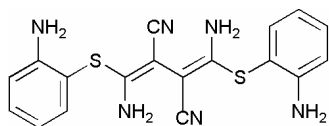
**VV177, VV265, VV336, VV495, VV531, VV198**

Synthetisiert durch Dr. Viktor Vintonyak:



**Abbildung 24: Strukturformeln VV177, VV198, VV265, VV336, VV495, VV531**

**U0126, MEK Inhibitor** (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)



**Abbildung 25: Strukturformel U0126**

MW 380,5

U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadien) ist ein selektiver MEK1 und MEK2 Inhibitor. Im Vergleich zu PD98059 besitzt U0126 eine signifikant höhere Affinität zu MEK1. U0126 und PD98059 binden in derart an dieses Enzym, dass eine gleichzeitige Bindung ausgeschlossen ist, was einen gemeinsamen Mechanismus vermuten lässt. U0126 inhibiert MEK1 und MEK2 gleichermaßen, wohingegen PD98059 MEK1 stärker als MEK2 inhibiert. <sup>[110]</sup>

**Natriumorthovanadat  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Phosphataseinhibitor** (Sigma-Aldrich, Steinheim, D)

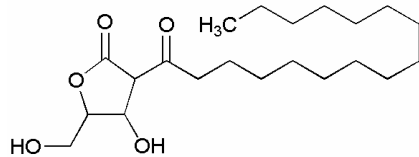
MW= 183,9

Das Orthovanadat ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) funktioniert als ein Analogon des Phosphat-Ions und ist daher ein kompetitiver, reversibel an das aktive Zentrum bindender Inhibitor der Protein-Tyrosin-Phosphatasen, vieler alkalischer Phosphatasen und einer Reihe von ATPasen.

Natriumorthovanadat wird in Konzentrationen zwischen 0,1 - 1 mM zugesetzt.

Gelegentlich wird die Konzentration auf 2 - 5 mM erhöht. <sup>[111, 112]</sup>

**RK682, VHR Inhibitor** (ENZO Life Sciences, Lörrach, D)



**Abbildung 26: Struktur RK682**

MW=368.5

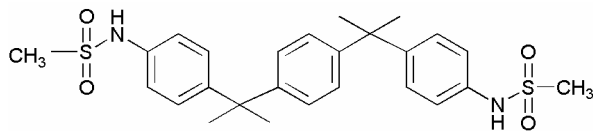
RK682 ist ein neuartiger, aus *Streptomyces sp.* isolierter Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor. Er inhibiert die dual-spezifische Phosphatase VHR ( $\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$ ) selektiv gegenüber CD45 und Cdc25B1. <sup>[113]</sup>

**Protein Tyrosin Phosphatase Inhibitor IV**

(bis-(4-Trifluoromethylsulfonamidophenyl)-1,4-diisopropylbenzene) (Calbiochem, Merck, Darmstadt, D bzw. synthetisiert durch Dr. Viktor Vintonyak)

MW= 608,6

Ungeladenes, 1,4-di-substituiertes, phenyl-gekoppeltes, bis-trifluoromethylsulfonamido (TFMS) Phosphat-Ion-Analogon, welches als potenter, reversibel bindender und an das aktive Zentrum bindender Inhibitor von Protein-Tyrosin-Phosphatasen wirkt (PTP;  $\text{IC}_{50} = 1.8, 2.5 \mu\text{M}$  für SHP-2 bzw. PTP1B). <sup>[114]</sup>



**Abbildung 27: Strukturformel PTP Inhibitor IV**

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Subkultivierung von Zellen**

Alle beschriebenen Zelllinien wurden bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % (HeLa-, MDCK-, MDCK-F3-, HEK293-, BSC-1-, HLR-Elk-1-Zellen) bzw. 10 % (L-, L-Wnt-3a-, PC12-Zellen) kultiviert.

Um darüber hinaus die Adhäsion speziell der PC12-Zellen zu verbessern, wurden die Wachstumsflächen der Kulturgefäße für diese Zellen mit Poly-L-Lysin oder Kollagen beschichtet.

Waren die adhärenen Zellen konfluent, d.h. bedeckten sie den kompletten Boden des Kulturgefäßes, sollten sie, um weiterhin optimale Bedingungen für sie erhalten zu können, zu diesem Zeitpunkt passagiert werden.

Hierbei wurden die Zellen zweimal mit 3-5 ml warmer, steriler PBS-Lösung gewaschen, um tote Zellen und Serumreste zu entfernen.

PBS (*Phosphate buffered saline*):

80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
100 mM NaCl
pH 7,4 eingestellt mit HCl

Anschließend wurden ca. 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugeben und die Zellen für ca. 3 -10 min mit Trypsin inkubiert, um sie danach durch leichtes Klopfen vom Boden des Kulturgefäßes ablösen zu können. Die Zellsuspension wurde nun in mindestens der doppelten Menge frischem Medium aufgenommen und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Zellzahl ausgesät oder in neue Kulturflaschen überführt.

Zur Vitalitätserhaltung bzw. um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, wurde darüber hinaus auf die Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie abgestimmt, in regelmäßigen Abständen verbrauchtes Medium durch frisches, warmes Medium ersetzt.

### ***2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl***

Vor einem Experiment wurde in der Regel die Anzahl der Zellen ermittelt, um eine ganz definierte Zahl an Zellen aussähen zu können.

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 dabei den festen Sitz des Deckgläschens an. Die Zellsuspension wurde nun 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, wobei jedes große Quadrat eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup> hat. Diese ergibt sich aus einer Tiefe von 0,1 mm und einem Volumen von 0,1 µl. Die Zellzahl berechnete sich schließlich anhand des Mittelwerts aus den vier Quadraten. Dieser wurde mit 10<sup>4</sup> multipliziert, was entsprechend des Volumens der ausgezählten Fläche die Zellzahl pro Milliliter ergab. Aus dieser Zellzahl und dem Volumen der Zellsuspension ergab sich schließlich dann die Gesamtzellzahl.

### ***2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen***

#### **2.2.1.3.1 Einfrieren von Zellen**

Eine Tieftemperaturlagerung von Zellen eingetaucht in flüssigen Stickstoff erlaubt die Erhaltung der Vitalität.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % in 75 cm<sup>2</sup> Kulturschalen angezogen. Anschließend wurden die Zellen, die sich somit in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wie unter 2.2.1.1 beschrieben durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst, in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und vereinzelt. Dann wurden die Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (300 x g, 10 min). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 1-2 ml Zellmedium mit 10 % DMSO aufgenommen. Von der erhaltenen Zellsuspension wurden je 200-300 µl in vorbereitete Kryoröhrchen überführt. Um eine langsame, schonende Reduktion der Temperatur zu gewährleisten, wurden die befüllten Kryoröhrchen zunächst 30 min im Kühlschrank bei 4 °C, dann 2 Stunden bei -20 °C und schließlich 24 Stunden bei -80 °C gelagert.

Alternativ dazu wurde auch eine spezielle mit Isopropanol gefüllte Einfrierhilfe (Nalgene, Rochester, USA) verwendet, diese bei Raumtemperatur befüllt und dann für 24 Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zum Schluss wurden die Kryoröhrchen jeweils in flüssigem Stickstoff (ca.  $-196^{\circ}\text{C}$ ) konserviert.

### **2.2.1.3.2 Auftauen von Zellen**

Vor dem Auftauen wurde ein Zellkulturgefäß mit warmem Medium bereitgestellt. Dann wurde ein im Flüssigstickstofftank gelagertes Kryoröhrchen mit Zellen entnommen, dieses auf Eis transportiert, die Zellsuspension unter leichtem Schütteln im Wasserbad aufgetaut und zügig in das bereitgestellte Kulturgefäß mit Medium gegeben. Um Zellen, die diesen Vorgang nicht überlebt hatten und um das zum Einfrieren benötigte DMSO zu entfernen, fand nach ca. 12 Stunden ein Mediumwechsel statt. Nach einer Erholungsphase z.B. nach dem ersten oder zweiten Passagieren, konnten die Zellen für Experimente verwendet werden.

### **2.2.1.4 PathDetect<sup>®</sup> Reporteragen-Assay**

Um den Einfluss von Substanzen auf den Ras/MAPK-Signalweg zu untersuchen, wurde der Pathdetect<sup>®</sup> Reporteragen-Assay (Stratagene) verwendet. <sup>[115]</sup>

Bei den HLR-Elk-1-Zellen ist die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Elk-1 stabil mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4 Promoters fusioniert, welcher die Expression eines Luziferase-Reportergens steuert. Das bedeutet, dass eine Inhibition des Ras/MAPK-Signalweges mit einer verminderten Expression der Luziferase und somit mit einem geringeren Signal einhergeht. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt entsprechend über die Messung der Lumineszenz.

Der Reporteragen-Assay wurde in weißen 96-Lochplatten durchgeführt. Pro Vertiefung wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in 200  $\mu\text{l}$  Medium ausgesät und für 24 h inkubiert. Das HLR Medium wurde anschließend für eine Inkubationszeit von 18 Stunden gegen 100  $\mu\text{l}$  HLR-Hungermedium ausgetauscht, welches mit den zu testenden Substanzen versetzt war. Es wurde zunächst für jede Substanz der Effekt bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  bestimmt. Für aktive Verbindungen wurde ferner eine Konzentrationsreihe (30, 10, 5  $\mu\text{M}$  oder 100, 50, 25, 12, 6, 3  $\mu\text{M}$  für die  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung) vermessen. Hiernach erfolgte die 6 bis 8-stündige Aktivierung durch einen weiteren Austausch des Hungermediums gegen HLR-Hungermedium mit EGF (200 ng/ml) und den Substanzen in den angegebenen Konzentrationen. Als Hintergrundkontrolle dienten mit HLR-Hungermedium und DMSO behandelte Zellen und als Positivkontrolle Zellen,

die mit HLR-Hungermedium, DMSO und EGF behandelt wurden. Nun wurde das Medium gründlich entfernt und es wurde mit einer Mehrkanalpipette möglichst schnell eiskalter Luziferase-Lysepuffer (30 µl) auf die Zellen gegeben.

Luziferase- Lysepuffer 5x:

- 40 mM Tricine
- 50 mM NaCl
- 2 mM EDTA
- 1 mM MgSO<sub>4</sub>
- 5 mM DTT
- 1 % Triton X-100

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 10 min lysiert. Anschließend wurden mit der Mehrkanalpipette je 100 µl Luziferase-Reagenz in jede Vertiefung pipettiert und durch dreimaliges Hochpipettieren unter der Vermeidung von Blasenbildung vermischt.

Luziferase Reagenz:

- 40 mM Tricine
- 0,5 mM ATP
- 10 mM MgSO<sub>4</sub>
- 0,5 mM EDTA
- 0,5 mM Coenzyme A
- 0,5 mM Luciferin
- pH 7,8 einstellen mit Tris
- + 10 mM DTT

Sofort nach Zugabe wurde die Lumineszenz am Plattenlesegerät (Tecan 200M) gemessen. Die Lumineszenz jeder Kavität wurde für eine Sekunde gemittelt.

Bei der Auswertung wurden jeweils die Mittelwerte aus 4-5 Messungen verwendet und die relative Aktivität im Vergleich zur Positivkontrolle (mit DMSO behandelte und mit EGF aktivierte Zellen) bestimmt.

Da der Rückgang der Lumineszenz allerdings nicht zwangsläufig auf eine Inhibierung der Elk-1 Transkription verursacht sein muss, sondern auch durch eine Inhibierung der Luziferase zustande kommen kann, wurde die inhibitorische Wirkung auf die Luziferaseaktivität getestet. Dafür wurden die aktiven Substanzen jeweils auf eine mögliche Hemmung der Luziferaseaktivität untersucht. Man verwendete einerseits das ATP Determination Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers (*in vitro* Test) oder

gab andererseits die Substanzen erst nach der EGF Aktivierung und Lyse zu um eine Wirkung auf die von den HLR-Zellen exprimierte Luziferase *in vivo* zu überprüfen.

### **2.2.1.5 Wnt-Reportergen-Assay mit transient transfizierten HEK293-Zellen**

Um den Einfluss von Substanzen auf den Wnt-Signalweg zu untersuchen, wurde ein Reportergen-Assay mit transient transfizierten HEK293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit dem Topflash-Vektor, der durch optimale TCF/LEF-Bindestellen vom Transkriptionsfaktor TCF gebunden wird, transfiziert. TCF steuert dann die Expression eines Luziferase-Reportergens. Dies ermöglichte wie bereits unter 2.2.1.4 beschreiben die Bestimmung der Aktivität des Signalwegs über die Messung der Lumineszenz.

Da es sich hierbei um einen Assay mit transient transfizierten Zellen handelt, wurde ferner ein weiteres Reporterplasmid (pEQ176) kotransfiziert, in welchem das  $\beta$ -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors steht.

Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität diente als interner Standard für den Zustand der Zellen, um die Signifikanz von Schwankungen der Luziferase-Aktivität festzustellen. Die Enzymaktivität wurde kolorimetrisch durch die Umsetzung von nicht physiologischem ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosid) nachgewiesen. Mit Hilfe der  $\beta$ -Galactosidase-Werte wurden dann die Luziferase-Werte normiert.

#### **2.2.1.5.1 Herstellung von konditioniertem Medium zur Bereitstellung von Wnt-3a**

Die Herstellung von konditioniertem Medium von L- und L-Wnt-3a-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von ATCC (Rockville, USA): In einer Kulturschale mit 10 cm Durchmesser wurden je  $2 \times 10^5$  Zellen ausgesät und vier Tage kultiviert. Die L-Zellen wurden in Medium ohne, die L-Wnt-3a-Zellen in Medium mit Geneticin kultiviert. Nach vier Tagen wurde das Medium abgenommen, steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt (erste Charge). Zu den Zellen wurde frisches Medium gegeben, und die Zellen wurden für weitere zwei Tage kultiviert. Anschließend wurde das Medium 3 min bei 400 x g und 4°C zentrifugiert und steril filtriert (zweite Charge). Vor der Zugabe des konditionierten Mediums auf andere Zellen wurden die erste und zweite Charge 1:1 gemischt



### 2.2.1.5.2 Transfektion durch $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation

Hier wurde die transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode <sup>[116]</sup> eingesetzt. Für die Transfektion der HEK293-Zellen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium in Gewebekulturschalen (d= 3,5 cm) bzw.  $1,5$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in 1 ml Medium in einer 24-Loch-Platte ausgesät und weiter bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Nach 16-18 Stunden erfolgte die Transfektion. Insgesamt wurden je  $5 \mu\text{g}$  DNA pro Schale bzw. Vertiefung transfiziert, wobei jedes Konstrukt im Doppelansatz getestet wurde. In sterile 12 ml Reaktionsgefäße mit rundem Boden wurden pro Ansatz  $100 \mu\text{l}$  (Schale mit 3,5 cm Durchmesser) bzw.  $50 \mu\text{l}$  (24-Loch-Platte) 2 x HEPES-Lösung vorgelegt.

2x HEPES-Puffer (sterilfiltriert):	140 mM NaCl
	1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	50 mM Hepes
	pH 7,05 mit NaOH eingestellt;

Dazu wurde  $100$  bzw.  $50 \mu\text{l}$  mit  $\text{CaCl}_2$  versetzte DNA tropfenweise zugegeben und das Gemisch etwa 20 s geschüttelt.

Transfektionslösung:	250 mM steriles $\text{CaCl}_2$
	DNA (max. $5 \mu\text{g}/\text{Ansatz}$ ):
	Topflash $1,5 \mu\text{g}$
	pEQ176 $0,25 \mu\text{g}$
	pBS SK <sup>+</sup> (leerer Vektor) auf $5 \mu\text{g}$
	steriles $\text{H}_2\text{O}$ ad $100$ bzw. $50 \mu\text{l}$ pro Ansatz

Das entstehende Präzipitat aus DNA und Calciumphosphat wurde nach 2 min auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 4 bis 6 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Medium versetzt.

### 2.2.1.5.3 Substanzzugabe und Wnt-Signalweg-Aktivierung

16 bis 18 Stunden nach dem Einbringen der DNA wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit dem konditioniertem Medium und den zu testenden Substanzen bzw. DMSO bei den üblichen Bedingungen weiter inkubiert.

Die eine Hälfte der Zellen wurde mit Wnt-3a aktiviert, d.h. man gab jeweils 2 bzw. 1 ml Wnt-3a-haltiges Medium Ansatz dazu. Die andere Hälfte der Zellen diente als Kontrolle, d.h. hier gab man jeweils 2 bzw. 1 ml L-Zell-Medium pro Ansatz dazu, um direkten Vergleich zu haben. In dem konditionierten Medium gab man jeweils gleichzeitig die zu testenden Substanzen (20 bzw. 50  $\mu$ M) bzw. DMSO zu. Alle Messungen erfolgten jeweils in doppelter bzw. dreifacher Ausführung.

#### **2.2.1.5.4 Zellyse und Messungen**

Wiederum 16 bis 18 Stunden nach Wnt-Signalwegaktivierung und Substanzzugabe wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann lysiert. Dies erfolgte mit 200 bzw. 100  $\mu$ l Lysepuffer pro Ansatz.

Lysepuffer:                    25 mM Tris/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,8  
                                      2 mM EDTA  
                                      10 % Glycerin  
                                      1% Triton X-100  
                                      2 mM DTT

Nach 5 bis 10 min wurden die Zellen abgeschabt und die Lysate 4 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Je zweimal 20  $\mu$ l des Lysats wurden in den Luziferase- und  $\beta$ -Galactosidase-Messungen eingesetzt.

Die enzymatische Aktivität der Luziferase im jeweiligen Ansatz wurde in einer Doppelbestimmung gemessen. Zu diesem Zweck wurden 20  $\mu$ l Zelllysate in ein 5 ml Kunststoff-Röhrchen (Sarstedt) pipettiert. Im Luminometer erfolgte dann die automatische Injektion von 100  $\mu$ l Luziferase-Reagenz.

Luziferase-Reagenz:            20 mM Tricine  
    1 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> Mg(OH)<sub>2</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
    3 mM MgSO<sub>4</sub>  
    0,1 mM EDTA  
    33 mM DTT  
    270  $\mu$ M Coenzym A  
    470  $\mu$ M Luciferin

Die entstehenden Lichtblitze wurden über einen Zeitraum von 15 s gemessen und sind proportional zur Luziferase-Enzymmenge und damit auch zur Luziferase-Genaktivität.

Zur Ermittlung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wurden in einer Doppelbestimmung je 20  $\mu$ l Zellysat in die Löcher einer 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde 30 min bei 4°C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 200  $\mu$ l Z-Puffer.

Z-Puffer:                    60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                  40 mM NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                  10 mM KCl  
                                  1 mM MgSO<sub>4</sub>  
                                  2 mM DTT  
                                  1 mg/ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosid (ONPG) pH 7,0

Nach 20 bis 60 min bzw. sobald eine Gelbfärbung sichtbar wurde, wurde die Absorption bei 405 nm in einem ELISA-Photometer (MR 5000, Dynatech) gemessen.

### 2.2.1.5.5 Auswertung

Zunächst wurden die doppelt gemessenen Luziferase- ( $I_1$  und  $I_2$ ) bzw.  $\beta$ -Galactosidase-Werte ( $g_1$  und  $g_2$ ) gemittelt, wodurch die Mittelwerte  $I$  und  $g$  erhalten wurden. Die Abweichung vom Mittelwert durfte nicht größer als 5 % sein.

Die Rohwerte der Luziferasemessung waren aufgrund schwankender Transfektionsraten nicht vergleichbar. Dies lässt sich korrigieren, indem die Mittelwerte der Rohwerte der Luziferasemessung durch die entsprechenden Mittelwerte der  $\beta$ -Galactosidase-Messung geteilt wurden, da die  $\beta$ -Galactosidase-Werte bezeichnend für die Transfektionsrate sind. Je höher die Transfektionsrate, desto höher sind die Werte. Man erhält auf diese Weise die korrigierte Luziferase-Aktivität

$$I_K = \frac{\text{Mittelwert } I}{\text{Mittelwert } g}$$

#### Formel 1: Berechnung der korrigierten Luziferaseaktivität

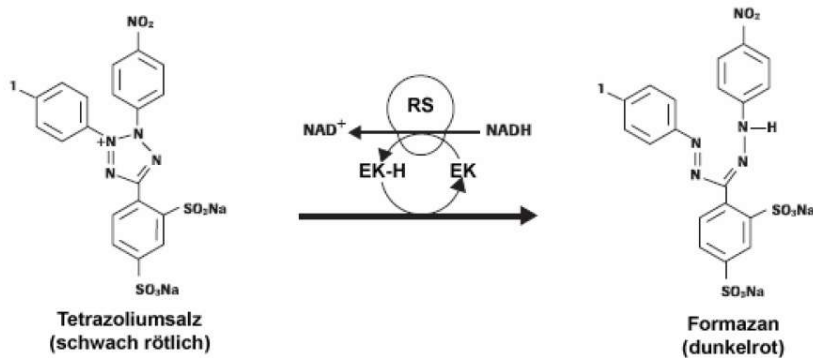
Bei der Auswertung bezüglich der Wirkung der Substanzen wurden weiter jeweils die Mittelwerte aus 2 bis 3 Messungen verwendet und die relative Aktivität im Vergleich

zur Positivkontrolle (mit DMSO behandelte und mit Wnt-3a bzw. LiCl-aktivierte Zellen) bestimmt.

### 2.2.1.6 Zytotoxizitätstest

Zur Beurteilung der zuvor beschriebenen Reporter-Gen-Assays (2.2.1.4, 2.2.1.5) war es wichtig zu wissen, ob der Rückgang des Reporter-Gen-Signals tatsächlich auf eine Inhibition des Ras-MAPK- bzw. Wnt-Signalwegs zurückzuführen waren oder durch reine Zytotoxizität der Substanzen verursacht wurde. Um dies zu untersuchen, wurde jeweils ein kolorimetrischer Test mit WST-1® (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt.

Die Zellen wurden jeweils unter Assaybedingungen mit den verschiedenen zuvor getesteten Substanz-Konzentrationen inkubiert. Dann wurde im Verhältnis 1:10 Tetrazolium-Salz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat) zugegeben. Nach 45 min wurde schließlich die Spaltung von WST-1 zu Formazan durch Dehydrogenasen intakter Zellen photometrisch bei 405 nm gemessen.



**Abbildung 28: Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 zu Formazan.** EK = Elektronenkupplungsreagenz, RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium Reduktase System

Über die erhaltene optische Dichte ( $OD_{405}$ ) ließ sich dann quantitativ die Stoffwechselaktivität der Zellen bestimmen. Dies geschah im Vergleich zu reinem Medium, welches in leere Vertiefungen auf dergleichen Platte gegeben wurde bzw. mit DMSO behandelten Zellen. Die Bestimmungen wurden vierfach durchgeführt.

### **2.2.1.7 Morphologische Veränderungen des BSC-1-Zytoskeletts**

Das Zytoskelett der eukaryotischen Zelle, welches aus den Intermediärfilamenten, den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten zusammengesetzt ist, ist neben seiner Hauptaufgabe der Formerhaltung der Zelle, auch an der Motilität, intrazellulären Transportprozessen, sowie an der Zellteilung beteiligt. Diese vielfältigen Funktionen machen es zu einem interessanten Angriffspunkt u.A. für die Krebstherapie, indem man z.B. nach Substanzen sucht, die die Zellteilung der Krebszellen inhibieren oder deren Motilität und damit das Streuen von Tumoren unterbinden.

Beim BSC-1 Zytoskelett Assay wurde für die Anzucht der Zellen auf Deckgläschen in klaren 12-Loch-Platten durchgeführt. Pro Vertiefung und Milliliter Medium wurden jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Melophlin A (30 und 50  $\mu\text{M}$ ), sowie der entsprechende Menge DMSO als Kontrolle. Jede Konzentration bzw. DMSO wurde dreifach getestet. Nach einer Inkubationsphase von 14 bis 16 Stunden mit den Substanzen wurden die Zellen fixiert und gefärbt: Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und für 10 min mit 4 % Formaldehyd fixiert. Dieses wurde dann durch dreimaliges, 5-minütiges Waschen mit PBS-T (PBS mit 0,1 % Tween 20) entfernt. Um unspezifische Farbstoffanlagerungen zu vermeiden, wurden die Zellen vor der Färbung für eine Stunde bis über Nacht mit 5 % BSA in PBS blockiert. Nach dem Entfernen der Blockierlösung erfolgte die Färbung mit ca. 40  $\mu\text{l}$  Färbelösung für mindestens eine Stunde unter Lichtausschluss.

Färbelösung:            DAPI (1: 15000)  
                              Phalloidin-TRITC (1:1000)  
                              Anti-Tubulin FITC (1: 500)  
                              5 % BSA  
                              in PBS-T

Die Aufnahmen erfolgten anschließend am Axiophot Mikroskop (Zeiss). Die Farbgebung für die einzelnen Kanäle war dabei wie folgt: DAPI (DNA): blau, FITC (Mikrotubuli): grün und TRITC (Aktingerüst): gelb.

### **2.2.1.8 Untersuchungen zur Beeinflussung des Ras/MAPK-Signalwegs in PC12-Zellen**

Die Phäochromocytomzelllinie PC12 stammt von Zellen aus dem Nebennierenmark der Ratte ab. Die Zugabe von Nervenwachstumsfaktor NGF (*Nerve Growth Factor*) führt zu einer langanhaltenden Aktivierung der MAPK und zur Differenzierung, wohingegen die Zugabe des Epidermalen Wachstumsfaktors EGF (*Epidermal Growth Factor*) zur kurzfristigen Aktivierung der MAPK und zur Proliferation führt.<sup>[117]</sup>

Die Zelllinie stellt somit ein gutes Modell dar, mit dem man die Wirkung von Substanzen auf den Ras/MAPK-Signalweg anhand der verschiedenen zellulären Effekten überprüfen kann.

#### **2.2.1.8.1 Untersuchungen zur Wirkung von Substanzen auf die PC12-Zell-Differenzierung**

Um festzustellen, ob und inwieweit das Ausmaß der Differenzierung bzw. die Ausbildung von neuritenartigen Ausläufern nach der Stimulierung mit NGF und nach der Zugabe von Substanzen beeinflusst wird, wurden jeweils  $0,75 \times 10^4$  Zellen pro 1 ml Medium und pro Vertiefung in einer mit Poly-L-Lysin beschichteter 24 Loch-Platte ausplattiert. Am nächsten Tag und darauf folgend in 2-tägigen Abständen erfolgte die Substanzzugabe (25 und 50  $\mu\text{M}$ ), sowie die Aktivierung mit NGF (100 ng/ml).

Als Kontrolle für eine Inhibition des Neuritenwachstums wurde der MEK-Inhibitor U0126 (25 und 50  $\mu\text{M}$ ) verwendet bzw. die Zellen mit DMSO, nicht aber mit dem Nervenwachstumsfaktor behandelt. Um das Neuritenwachstum zum Vergleich sichtbar zu machen, wurden einige Zellen als Kontrolle mit DMSO-haltigem Medium und NGF behandelt. Jede Bedingung wurde mindestens zweifach getestet.

#### **2.2.1.8.2 Zellfärbung mit Coelestinblau**

Um den Effekt auf das Neuritenwachstum nach ca. 10-14 Tagen besser festhalten zu können, wurden die Zellen fixiert und mit Coelestinblau angefärbt. Coelestinblau färbt unspezifisch die ganze Zelle einschließlich der Neuriten.

Zuerst wurde das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 min mit Formaldehyd (4 % in PBS) fixiert. Das Formaldehyd wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend für 1 bis 3 min (je nach Alter der Färbelösung) mit Coelestinblau gefärbt.

Coelestinblau Färbelösung: 5 % Eisenammoniumalaun  
0.5 % Coelestinblau aufgeköcht in Wasser,  
versetzt mit 14 % Glycerin

Überschüssiger Farbstoff wurde durch zweimaliges Waschen mit 70 % Ethanol und PBS entfernt und die Zellen schließlich zum Mikroskopieren in PBS gelagert. Alle mikroskopischen Bilder wurden mit dem Axiovert 200M (Zeiss) bei 20facher Vergrößerung und im Durchlicht aufgenommen.

### **2.2.1.8.3 Quantitative Auswertung**

Da die aufgenommenen Zellbilder (2.2.1.8.2) nur einen relativ subjektiven Eindruck vermitteln konnten, sollte zudem eine quantitative Auswertung stattfinden. Hierbei wurden die Zellen ohne Fortsätze, mit kurzen Fortsätzen und mit Fortsätzen die mindestens der dreifachen Länge des Zellkörpers im Durchschnitt entsprachen gezählt. Auf diese Weise konnte die Anzahl von unbehandelten, aktivierten, mit Substanzen behandelten und mit Substanzen behandelten aktivierten Zellen, die jeweils Neuriten ausgebildet hatten direkt miteinander verglichen werden. Beim Auszählen wurde darauf geachtet, dass eine ausreichende Stückzahl verwendet wurde (mindestens 100 Zellen).

### **2.2.1.8.4 Untersuchungen zur Wirkung von Substanzen auf die PC12-Zell-Proliferation**

Um festzustellen, ob die Proliferation nach der Stimulierung mit EGF und nach der Zugabe von Substanzen beeinflusst wird, wurden jeweils 1 oder  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro 1 ml Medium und pro Vertiefung in einer mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-Loch-Platte ausplattiert. Am nächsten Tag und darauf folgend in 2-tägigen Abständen erfolgte die Substanzzugabe (25 und 50  $\mu\text{M}$ ), sowie die Aktivierung mit EGF (200 ng/ml). Als Kontrolle für eine Inhibition der Zellvermehrung wurde der MEK-Inhibitor U0126 (25 und 50  $\mu\text{M}$ ) verwendet bzw. die Zellen mit DMSO, nicht aber mit dem Wachstumsfaktor behandelt. Um die vermehrte Zellteilung zum Vergleich sichtbar zu machen wurden einige Zellen als Kontrolle mit DMSO-haltigem Medium und EGF behandelt. Jede Bedingung wurde mindestens zweifach getestet.

Wie unter 2.2.1.6 beschrieben, ließ sich anhand der gemessenen optischen Dichte nach Zugabe des Farbstoffs WST-1 quantitativ die Stoffwechselaktivität der Zellen

bestimmen (hier abweichend zu 2.2.1.6 nach 1, 2 bzw. 4 Stunden). Somit ließ sich indirekt auf die Zellteilung zurück schließen, denn je mehr Zellen sich vermehrt haben, umso größer ist die Stoffwechselaktivität bzw. umso stärker die Umsetzung des Farbstoffes.

Die nach ca. 10 bis 14 Tagen erhaltenen Werte für nicht aktivierte Zellen wurden mit denen von EGF-stimulierten, demzufolge proliferierenden Zellen, verglichen. Anhand dessen die relative Proliferationsrate von mit Substanzen behandelten Zellen bestimmt.

### **2.2.1.8.5 Kombinatorische Analyse**

Zusätzlich zu den beschriebenen Untersuchungen hinsichtlich einer Wirkung auf die Differenzierung oder die Proliferation (2.2.1.8.1 und 2.2.1.8.4) fand auch eine sogenannte kombinatorische Analyse statt. Hierbei sollte festgestellt werden, wie sich Meloplin A einzeln bzw. in Kombination mit dem MEK-Inhibitor U0126 auf ansonsten unbehandelte oder mit NGF- bzw. EGF- bzw. PMA-aktivierte Zellen verhielt. Zum Vorgehen bezüglich Aussaat, Substanzzugabe, Aktivierung, Experimentierdauer, Färbung und Auswertung sei hier auf 2.2.1.8.1 und 2.2.1.8.4 verwiesen

### **2.2.1.8.6 Auswaschexperiment**

Um die Frage beantworten zu können, ob es sich bei der beobachteten Beeinflussung der Differenzierung wie auch der Proliferation um einen spezifischen durch die Substanz bewirkten, sowie um einen reversiblen oder irreversiblen Effekt handelte, wurde ein Auswaschexperiment durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.8.1 und 2.2.1.8.4 zuerst mit Meloplin A behandelt bzw. mit NGF und EGF aktiviert. Dabei wurde jeder zuvor beschriebene Ansatz hier doppelt angelegt, so dass es möglich war, die eine Hälfte der Zellen nach 8 Tagen erneut mit Meloplin A zu behandeln und mit NGF und EGF zu aktivieren. Gleichzeitig sollte die andere Hälfte der Zellen nach dem Auswaschen des Meloplin A lediglich erneut aktiviert werden. In den darauf folgenden 2 Tagen sollte beobachtet werden, ob der durch Meloplin A bewirkte Effekt zurückging. Schließlich wurden eben diese Zellen wieder mit Meloplin A behandelt, um zu sehen, ob ein möglicher zurückgegangener Effekt wiederkehrte. Die andere Hälfte der Zellen wurde dabei, wie bereits angedeutet, durchgängig mit Meloplin A behandelt und aktiviert, um einen direkten Vergleich zu haben.



## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### ***2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen***

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford<sup>[118]</sup> angewandt. Der Farbstoff Coomassieblau reagiert mit basischen Aminosäuren. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum hin zu 595 nm. Durch die Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge kann die Konzentration einer unbekanntem Proteinlösung bestimmt werden. Rinder-Serum-Albumin (BSA) hat sich als anerkannter Standard für die Eichung durchgesetzt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine Eichgerade mit Hilfe von BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen (25, 125, 250, 500 und 1000 µg/ml) erstellt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration, indem man zu je 1 ml Bradford-Lösung insgesamt 25 µl Proteinlösung verdünnt mit Puffer pipettierte. Nach 10 min bei Raumtemperatur und erfolgte die Messung in Plastikkuvetten (Schichtdicke 1 cm, Halbmikrokuvetten) bei 595 nm gegen eine Referenz von Puffer (25 µl) in Bradford-Lösung (1 ml). Anhand der Extinktionswerte wurde die Proteinkonzentration unter Zuhilfenahme der Eichgeraden berechnet.

Bradford-Lösung:                    20 mg Coomassie blue G in 25 ml 96%igem Ethanol  
    50 ml 85%ige o-Phosphorsäure  
    ad 500 ml mit Wasser;  
    durch Faltenfilter filtriert, dunkel und kühl aufbewahrt

### ***2.2.2.2 Untersuchungen zur MAPK-Aktivität***

#### **2.2.2.2.1 Gewinnung von Gesamtprotein für die nachfolgende Westernblot Analyse**

Pro Ansatz wurden je zwei Schalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm mit  $1 \times 10^5$  HeLa- bzw. MDCK-F3-Zellen bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen PC12-Zellen in 2 ml Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen je nach Zelllinie und Fragestellung auf verschiedene Art weiterbehandelt.

Zum einen wurden die HeLa- und MDCK-F3-Zellen für 16 bis Stunden mit Melophrin A A in 1 ml Medium ohne Serum, die PC12 mit der entsprechenden Konzentration in

1 ml Medium behandelt. Zum anderen ließ man die HeLa- und MDCK-F3-Zellen in 1 ml Medium ohne Serum, die PC12-Zellen in 1 ml frischen Medium zunächst über Nacht hungern und gab dann für 30 min bzw. eine Stunde Melophlin A zu.

Parallel wurden Zellen mit dem bekannten MEK-Inhibitor U0126 sowie mit DMSO behandelt.

**Tabelle 3: Verwendete Melophlin A-Konzentrationen nach Zelllinie**

Zelllinie	Verwendete Melophlin A-Konzentration
MDCK-F3	20 und 50 $\mu$ M
HeLa	5, 10, 20 und 30 $\mu$ M
PC12	50 $\mu$ M

Nach der lang- bzw. kurzfristigen Behandlung mit Substanzen, U0126 bzw. DMSO wurden die HeLa-Zellen mit EGF (200 ng/ml), die MDCK-F3-Zellen mit 10 % Serum und die PC12-Zellen mit EGF (200 ng/ml) bzw. NGF (100 ng/ml) aktiviert.

Die Aktivierung mit Serum und EGF fand soweit nicht anders angegeben für 5 bis 10 min, die Aktivierung mit NGF für 20 min statt, da hier das stärkste Signal für die Aktivierung erreicht sein sollte.

Um das Gesamtprotein für die Westernblot-Analyse zu erhalten, wurden die Zellen mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und mit je 100  $\mu$ l eiskaltem RIPA-Puffer für 10 min auf Eis lysiert.

RIPA-Puffer:            50 mM Tris-HCl, pH 7,4  
                               1 % NP-40  
                               150 mM NaCl  
                               1 mM EDTA  
                               1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
                               Proteaseinhibitorcocktail (Roche)

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 oder durch mehrmaliges Aufziehen durch eine feine Kanüle weiter aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden dann durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration der Probe bestimmt. (2.2.2.1)

### 2.2.2.2 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihren Massen getrennt <sup>[119]</sup>. Die Trennung der Proteine findet nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit statt.

Es wurden 5 % Sammel- und 12,5 % Trenngel verwendet. <sup>[120]</sup> Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit 2-Propanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das 2-Propanol entfernt und das Sammelgel gegossen.

**Tabelle 4: SDS-PAGE. Zusammensetzung für 2 Gele**

Reagenzien	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12,5 %)
30 % Acrylamid	0,66 ml	4,16 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	-	2,5 ml
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)	1 ml	-
Wasser	2,26 ml	3,08 ml
SDS	40 µl	100 µl
APS	20 µl	60 µl
TEMED	10 µl	20 µl

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen des 5-fachen Probenpuffers versetzt Die Gesamtproteinkonzentration betrug mindestens 40 µg.

5x Probenpuffer: Tris 0,313 M, pH 6,8  
 SDS 10 %  
 Glycerol 50 %  
 β-Mercaptoethanol 25 %  
 (bzw. DTT als Reduktionsmittel)  
 Spatelspitze Coomassie  
 in Wasser

Die Proteine wurden zur Denaturierung 5 bis 10 min bei 95°C inkubiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in vertikalen Kammern der Firma BioRad. Dabei ließ man die Proben zunächst zügig in das Sammelgel einlaufen, bevor die Auftrennung im Trenngel bei konstanten Bedingungen d.h. 20 mA oder 150 V stattfand. Der Lauf wurde gestoppt, sobald die rote 25 kDa-Bande des Markers die untere Gelkante erreicht hatte, da man so eine besonders deutliche Auftrennung der ERK 1/2-Doppelbande bekam.

10x Laufpuffer:      250 mM Tris  
                             1,92 M Glycin  
                             0,1% SDS  
                             pH 8,3

### **2.2.2.2.3 Westernblot**

Auf Membranen immobilisierte Proteine lassen sich per Westernblot <sup>[121]</sup> spezifisch nachweisen. Die Proteine werden mit dem Elektrobplotverfahren aus einem SDS-Gel (2.2.2.2.2) auf eine PVDF Membran übertragen. Nacheinander geschichtet wurde auf die Anodenplatte in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier, die im Methanol aktivierte PVDF Membran, das mit Transferpuffer gewaschene Gel, sowie in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier gelegt. Den Abschluss bildete die Kathodenplatte, wobei zuvor darauf geachtet wurde, dass alles luftblasenfrei aufeinander lag. Die Stromspannung während des 45-minütigen Elektrotransfers betrug konstant 22 V.

Transferpuffer:      48 mM Tris  
                             39 mM Glycin  
                             20 % Methanol (*direkt vor Gebrauch frisch dazugegeben*)  
                             0,0375 % SDS  
                             pH 9,2

Der Erfolg des Transfers vom Gel auf die Membran konnte durch die Verwendung des vorgefärbten Protein Markers überprüft werden.

Der immunologische Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte mit zwei Antikörpern. Der primäre Antikörper bindet spezifisch das entsprechende Protein und wird wiederum von einem sekundären Antikörper gebunden. Der sekundäre Antikörper ist entweder Enzym-gekoppelt (2.2.2.2.3.1) oder mit einem Farbstoff markiert. (2.2.2.2.3.2)

#### **2.2.2.2.3.1 Chemilumineszenter Nachweis**

Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurden alle freien Bindungsstellen durch Inkubation in einer Blockierlösung 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper und dann mit dem sekundären Antikörper,

wobei die Membran zwischen den einzelnen Schritten dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen wurde. Die Antikörperverdünnungen, die Inkubationsbedingungen und die verwendeten Puffer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

TBS-T:                    10 mM Tris HCl pH 7,4  
                               150 mM NaCl  
                               0,1 % Triton X100 oder wahlweise Tween20

Blockierlösung:        TBS-T mit 1,5-2 % Slimfast Schoko

**Tabelle 5 Inkubationsbedingungen und Antikörperverdünnungen für den immunologischen Nachweis mittels Chemilumineszenz**

Antikörper	Verdünnung	Puffer	Inkubationsbedingungen
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	1:1000	TBS-T mit 1,5 % Slimfast Schoko	4 °C, Schüttler, über Nacht
p44/42 MAP Kinase	1:1000	TBS-T mit 1,5 % Slimfast Schoko	4 °C, Schüttler, über Nacht
β-Tubulin	1:1000	TBS-T mit 1,5 % Slimfast Schoko	4 °C, Schüttler, über Nacht
Ziege-Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	1:10 000	TBS-T	Raumtemperatur, Schüttler mind. 1 Stunde

Nachdem nicht gebundene Antikörper von der Membran gewaschen wurden, wurden die Proteinbanden visualisiert. Hierfür wurde das SuperSignal West Pico Detection System (Pierce) nach Angaben des Herstellers benutzt. Das Luminol (Lösung 1) wird mit Wasserstoffperoxid durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert. Diese ausgelöste Chemilumineszenz wird dabei durch die Anwesenheit von so genannten „Enhancern“ (Lösung 2) verstärkt. Die entstehende Lichtemission kann zur Belichtung von Röntgenfilmen benutzt werden. Die mit den Lösungen 1 und 2 behandelte Membran wurde auf einen Film (CL-Xposure, Kodak) gelegt und je nach Intensität des Signals entsprechend lange abgedeckt belichtet. Der Film wurde in eine Entwicklerlösung getaucht, bis die belichteten Stellen sichtbar wurden, mit Wasser gespült, und dann einige Minuten in Fixierer gelegt, abschließend in Wasser gewaschen und getrocknet.

### 2.2.2.2.3.2 Verwendung des Odyssey® LICOR-Systems mit IR-markierten sekundären Antikörper

Diese Methode mit fluoreszent markierten sekundären Antikörpern wurde bewusst gewählt, weil sie zumeist sensitiver ist als der Chemilumineszenz-Nachweis und weil das Ergebnis besser quantifizierbar ist.

Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurde diese zunächst mit PBS gewaschen, um Methanol und SDS aus dem Transferpuffer zu entfernen. Dann wurden alle freien Bindungsstellen durch Inkubation mit Odyssey® Blockierpuffer 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln abgesättigt. Anschließend erfolgte die simultane Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern und dann mit den sekundären Antikörpern, wobei die Membran zwischen den einzelnen Schritten dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen wurde. Die Antikörperverdünnungen, die Inkubationsbedingungen und die verwendeten Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

PBS-Puffer:            80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                           20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                           100 mM NaCl  
                           pH 7,4 eingestellt mit HCl

PBS-T:                PBS mit Triton X100 oder wahlweise Tween20

**Tabelle 6: Inkubationsbedingungen und Antikörperverdünnungen für den immunologischen Nachweis mit IR-markierten sekundären Antikörpern**

Antikörper	Verdünnung	Puffer	Inkubationsbedingungen
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	1:1000	Odyssey® Blockier-Puffer	4 °C, Schüttler, über Nacht
p44/42 MAP Kinase	1:1000	Odyssey® Blockier-Puffer	4 °C, Schüttler, über Nacht
β-Tubulin	1:1000	Odyssey® Blockier-Puffer	4 °C, Schüttler, über Nacht
IRDye 680 Ziege-Anti-Maus	1:5000 bis 1: 3500	Odyssey® Blockier-Puffer	Raumtemperatur, 1 Stunde, unter Lichtausschluss!
IRDye 800CW Ziege-Anti-Kaninchen	1:5000 bis 1: 3500	Odyssey® Blockier-Puffer	Raumtemperatur, 1 Stunde, unter Lichtausschluss!

Nachdem nicht gebundene Antikörper von der Membran gewaschen und das Tween 20 bzw. Triton X100 mit PBS ausgewaschen wurde, wurden die Proteinbanden am Odyssey®-Scanner visualisiert. Die Laserintensität für die gewählten Infrarot-Kanäle richtete sich dabei nach der Signalstärke. Für den abschließenden Scan-Vorgang wurde die maximal einstellbare Qualität gewählt.

#### **2.2.2.2.4 Quantitative Auswertung mit dem Programm AIDA**

Bei feinen Unterschieden zwischen den Signalintensitäten und der Beeinflussung durch das Hintergrundrauschen auf der Membran ist es nicht möglich, eine erzeugte Bilddatei nur mit dem bloßen Auge auszuwerten. Dabei hilft das Programm AIDA (*raytest* Isotopenmessgeräte), welches die Helligkeitsintensitäten in einem festgelegten Bereich quantitativ mit der Einheit „Light Arbitrary Units“ (LAU) erfasst. Der Messbereich muss festgelegt werden, d.h. bei Auswertung wird um jede Bande ein Rechteck gelegt. Der Rahmen wird so positioniert, dass er die Bande möglichst komplett und möglichst eng umschließt. Es wird dabei vermieden, dass dieser Rahmen eine Bande schneidet. Ein gleichgroßes Rechteck markiert den Hintergrund. Die Gelspuren bzw. Proben werden von links nach rechts durchnummeriert, so dass eine eindeutige Zuordnung möglich ist. Die Fläche, welche das Rechteck umschließt, wird in Quadratmillimetern angegeben. Die Helligkeit der Fläche des Rechtecks wird in „Light Arbitrary Units (LAU)“ angegeben. Die LAU-Werte des Rechtecks, das den Hintergrund markiert, werden als Hintergrund (Background, BKG) bezeichnet.

Das Programm gibt automatisch die Differenz der LAU des Proben-Rechtecks und der LAU des Hintergrunds an. Die Differenz wird als LAU-BKG bezeichnet.

Die LAU-Werte aus AIDA wurden als Tabelle in Excel exportiert und mit diesem Programm weiter bearbeitet. Dabei wurden die MAPK-Daten der aktivierten Form im Bezug auf die MAPK- bzw.  $\beta$ -Tubulin-Ladekontrolle und DMSO-Kontrolle normiert und das Ergebnis graphisch dargestellt.

#### **2.2.2.2.5 Entfernen der membrangebundenen Antikörper**

Je nach Bedarf konnten alle gebundenen Antikörper mit speziellen Puffern oder einem kommerziell erhältlichen Restore™ Westernblot Stripping Puffer (Pierce) entfernt werden, um die Membran anschließend für eine weitere Färbung wieder zu verwenden.

Stripp-Puffer:	7 M Guanidin Hydrochlorid
	50 mM Glycin, pH 10,8
	0,05 mM EDTA
	0,1 mM KCl
	20 mM Mercaptoethanol (frisch dazugegeben)

Hierfür wurde die Membran zunächst gewaschen und dann für ca. 4 min oder bis die Membran klar wurde im Stripp-Puffer bzw. für 30 min in dem Restore™ Puffer bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen, bis die mit Stripp-Puffer behandelte Membran wieder weiß wurde, und wie zuvor blockiert. Die anschließenden Waschschrte, die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern und die Detektion des Signals verliefen nach der oben beschriebenen Vorgehensweise. (2.2.2.2.3.1 und 2.2.2.2.3.2)

*Bemerkung: Das Strippen war ca. 3-4x möglich, es eignet sich allerdings nicht für jeden Antikörper, so erwies es sich hier auch als schwierig.*

## **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

### ***2.2.3.1 RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen***

Pro beschichtete Schale mit 3,5 cm Durchmesser wurden je  $1 \times 10^6$  PC12-Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Diese sollten für 2 Tage mit 100 ng/ml NGF synchronisiert werden, wobei nach drei Tagen Inkubation die Ausbildung von Ausläufern beobachtet werden konnte.

Das NGF wurde mit PBS gründlich von den Zellen gespült. Die Zellen wurden nun mit neuem Medium ohne NGF versetzt und weitere zwei Tage inkubiert. Während dieser Zeit bildeten sich die Ausläufer zurück. Schließlich wurden die Zellen je 1 Stunde mit DMSO (Kontrolle, 2 Schalen) bzw. Melophlin A (50  $\mu$ M, 2 Schalen) behandelt, mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Isolierung von Gesamt-RNA, sowie die DNase Behandlung und Reinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Plus Kit (Qiagen). Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.



### **2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

Die Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung kann spektralphotometrisch bestimmt werden. Dazu wurde die Extinktion (E) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Spektralphotometer (NanoDrop) bestimmt.

Ein  $E_{260}$ -Wert von 1 entspricht dabei ca. 50 µg/ml dsDNA, 33 µg/ml ssDNA bzw. 40 µg/ml RNA.

Durch Bestimmung des Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  lässt sich die Reinheit der Lösung beurteilen, wSeite: 68

eil die größten Abweichungen nicht selten durch Salze oder Detergenzien (aus der Isolationsmethode) verursacht werden.

RNA sollte ein Verhältnis von  $E_{260}/E_{280}$  von annähernd 1,9 haben.

### **2.2.3.3 RNA Qualitätskontrolle mit dem Bioanalyzer**

Die RNA Proben, die für die Mikroarray-Analyse (**Error! Reference source not found.**) verwendet werden sollten, wurden auf ihre Qualität am Bioanalyzer (Agilent Technologies Böblingen) analysiert. Hierbei handelt es sich um ein miniaturisiertes Gel, bei dem die Qualität von 12 RNA-Proben innerhalb von 60 Minuten analysiert werden kann. Es wurde das RNA nano Kit (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Vorbereitung des Gels wurde dieses mit einer Spritze in die Kapillaren des Chips gepresst. In die Vertiefungen für die Proben wurden 5 µl Marker und 1 µl der RNA-Probe gegeben. Durch die Anlegung einer elektrischen Spannung wurden die RNA-Proben durch ein System von Kapillaren geleitet, getrennt und mit einer optischen Einheit analysiert. Das Ergebnis wird als Elektropherogramm dargestellt, in welchem die gemessenen Fluoreszenz-Einheiten gegen die Zeit aufgetragen sind. Bei intakter RNA sollte die ribosomale 18S und 28S RNA detektiert werden. Zwei große einzelne Peaks deuten auf die 18S und 28S rRNA hin, ein breiter Peak deutet auf abgebaute rRNA hin. Die Software berechnet zusätzlich das Verhältnis der 18S und 28S rRNA, die Konzentration der RNA und die RNA Integrity Number (RIN). Die RIN ist ein Maß für die Qualität der RNA und sollte über 9.0 liegen.

### **2.2.3.4 Mikroarray-Analyse**

Die Mikroarray-Analyse dient der differentiellen Genexpressionsanalyse und erlaubt die Untersuchung und den Vergleich von zwei oder mehr Expressionsprofilen unter unterschiedlichen Bedingungen.

Die isolierte RNA (2.2.3.1) wird in cRNA oder cDNA umgeschrieben, wobei ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid eingebaut wird. Die cRNA / cDNA wird auf dem Array hybridisiert. Anschließend kann analysiert werden, welches Gen in welcher Probe stärker oder schwächer exprimiert war. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist abhängig von der Kopienzahl der entsprechenden mRNA.

Es wurde ein System von der Firma Agilent verwendet. Da es sich bei den Arrays um hochdichte Arrays handelt, wurde fluoreszenzmarkierte cRNA benötigt. Für die Synthese der cRNA wurde das Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit verwendet. Die einzelnen Schritte bis zur gereinigten cRNA sind im Folgenden kurz aufgeführt, sowie in Abbildung 29 veranschaulicht.

Zunächst wurden 500 ng RNA mit 1,2 µl T7 Promotor Primer vermischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 11,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 10 min bei 65°C und dann 5 min auf Eis inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden die in der Tabelle 7 gelisteten Substanzen beigefügt:

**Tabelle 7: cDNA Synthese**

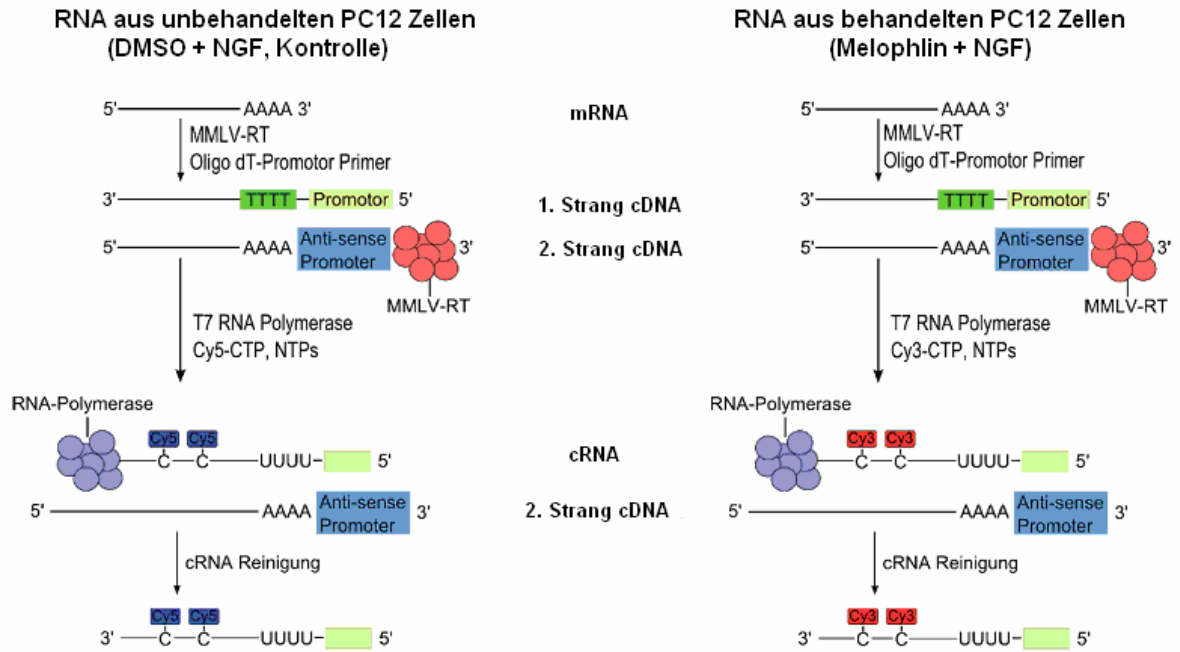
Komponente	Volumen
5 x Erststrang Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
MMLV Reverse Transkriptase	1 µl
RNase OUT	0,5 µl

Der Gesamtansatz von 20 µl wurde 2 Stunden bei 40°C, anschließend 15 Minuten bei 65°C und dann auf Eis inkubiert. Abschließend folgte die Synthese der fluoreszenzmarkierten cRNA. Zu den 20 µl cDNA wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Substanzen pipettiert.

**Tabelle 8: cRNA Ansatz**

Komponente	Volumen
DEPC-Wasser	15,3 µl
4 x Transkriptionspuffer	20 µl
0,1 M DTT	6 µl
10 mM dNTP Mix	8 µl
50 % PEG	6,4 µl
RNase OUT	0,5 µl
Inorganische Pyrophosphatase	0,6 µl
T7 RNA Polymerase	0,8 µl
Cy3 CTP bzw. Cy5 CTP	2,4 µl

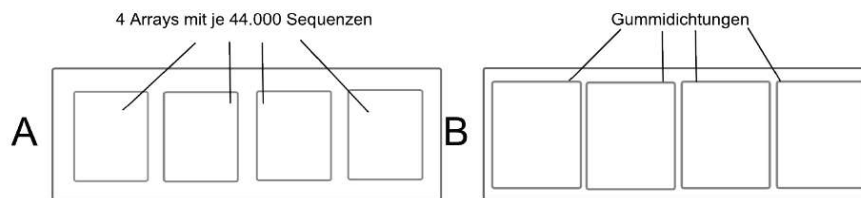
Gesamtvolumen	60 µl
---------------	-------



**Abbildung 29: Übersicht zur Synthese fluoreszenzmarkierter cRNA** Die Vorgehensweise ist im Text detailliert beschrieben.

Der Gesamtansatz von 80 µl wurde 2 Stunden bei 40 °C inkubiert, die synthetisierte fluoreszenzmarkierte cRNA wurde anschließend mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die cRNA wurde hierfür mit 20 µl RNase freiem Wasser, einem Puffer zur Bindung auf der Säule und 250 µl 100 % Ethanol versetzt und auf Zentrifugationssäulen überführt. Die Säulen wurden mehrmals zentrifugiert, die cRNA mit Puffer gewaschen und schließlich mit 50 µl RNase freiem Wasser eluiert. Der Einbau der fluoreszenzmarkierten Nucleotide und die Konzentration der cRNA wurden spektroskopisch bestimmt.

Für die Hybridisierung auf dem Array wurden je 825 ng der Cy3 und der Cy5 markierten cRNA mit 11 µl 10 x Blockierlösung und 2,2 µl 25 x Fragmentierungspuffer versetzt, mit nukleasefreiem Wasser auf 55 µl aufgefüllt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 55 µl 2 x Hybridisierungspuffer versetzt, kurz zentrifugiert und auf einen Objektträger mit Gummidichtungen überführt. Auf diesen Objektträger wurde dann der Array gelegt und in der Hybridisierungskammer verschraubt und rotierend 17 Stunden bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen inkubiert.



**Abbildung 30: A: Objektträger mit 4 Mikroarrays; B: Objektträger mit Gummidichtungen**

Nach der Hybridisierung wurde nicht gebundene cRNA vom Array gewaschen (Tabelle 9), dieser sofort getrocknet und anschließend gescannt.

**Tabelle 9: Waschen der Arrays**

Schritt	Waschpuffer	Temperatur	Dauer
Auseinanderbauen der Arrays	1	60 °C	
1. Waschen	1	37 °C	10 min
2. Waschen	1	RT	10 min
3. Waschen	2	RT	5 min
4. Waschen	2	RT	5 min

Waschpuffer 1: 6x SSC, 0,0005% TritonX-102

Waschpuffer 2: 0,1x SSC, 0,0005% TritonX-102

Die Arrays wurde mit einer Auflösung von 10 µm in einem Agilent G2565BA Microarray Scanner gescannt und die Bilder anschließend mit der Agilent Feature Extraction Software ausgewertet und die Daten extrahiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Rosetta Resolver® Gene Expression Analysis System (Rosetta Biosoftware, Seattle). Die Hybridisierung der Proben sowie das Scannen der Arrays und eine Einführung in die Datenanalyse erfolgten bei Dr. Hans-Joachim Mollenkopf am MPI für Infektionsbiologie in Berlin.

#### 2.2.3.4.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte durch reverse Transkription von 1 µg Gesamt-RNA (s. 2.2.3.1) mit 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer und 1 µl SuperScript™ II Reverser Transkriptase gemäß Herstellerangaben.

Die Reaktion von 1 µl Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer (Invitrogen), 1 µl 10 mM dNTPs (Ambion), 1 µg RNA in insgesamt 12 µl (mit —DEPC-Wasser aufgefüllt) wurde zunächst 5 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl Erststrangbuffer (Superscript II Kit, Invitrogen), 2 µl DTT (Superscript II Kit, Invitrogen) und 1 µl RNase Out (Invitrogen)

wurde 2 min bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurde 1 µl Superscript II (Invitrogen) zugegeben und die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für 50 min.

Diese wurde schließlich durch 15 min bei 70°C gestoppt. Die erhaltene ssDNA wurde entweder direkt in der qRT-PCR (2.2.3.5) untersucht oder bis auf weiteres bei - 80 °C gelagert.

### **2.2.3.5 Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR)**

Zur Validierung der Ergebnisse des Mikroarrays (**Error! Reference source not found.**) anhand von Stichproben bzw. um differentielle Expression ausgewählter Zielgene in einem unabhängigen Experiment zu bestätigen, wurde eine quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) durchgeführt.

Die quantitative Echtzeit-PCR ermöglicht die Bestimmung der Produkt-Menge bei einer PCR in einer Weise, dass Aussagen über die Ausgangsmenge des amplifizierten Templates möglich sind. So können die Mengen einer bestimmten mRNA in zwei verschiedenen Proben quantitativ verglichen werden, weshalb die qRT-PCR häufig für die Expressionsanalyse eingesetzt wird. Bei einer qRT-PCR wird nicht die absolute Produktmenge bestimmt, sondern es wird die Produktbildung während der PCR mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen verfolgt (Echtzeit-Detektion). Dafür wird dem PCR-Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugefügt, der an doppelsträngige DNA binden kann und dessen Fluoreszenz dadurch steigt. SYBR Green I lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein, wodurch seine emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt wird. Die Zunahme des Produkts von Zyklus zu Zyklus korreliert dabei mit der Zunahme der Fluoreszenz. Ein Nachteil bei der Verwendung von DNA-bindenden Fluorophoren ist, dass sie sowohl an das spezifische Produkt als auch an unspezifische Produkte binden. Es war daher bei der erstmaligen Verwendung eines Primerpaares nötig, das Produkt gelelektrophoretisch zu überprüfen (2.2.3.5.3) und gegebenenfalls auch zu sequenzieren. Zusätzlich konnte die Produktreinheit nach jeder qRT-PCR durch die Aufnahme einer Schmelzkurve überprüft werden. Die Primerpaare für die Amplifikation von Genen mit Hilfe der qRT-PCR wurden so gewählt, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen von ungefähr 64°C hatten und zu Produkten von 100 bis 200 bp führten.

Die qRT-PCR wurde in weißen 96-well-Reaktionsplatten mit transparentem Deckel (ABgene, Hamburg) durchgeführt. Es wurde entweder der ImmoMix™ (Bioline, Luckenwalde) mit SYBR Green versetzt oder der QuantiTect SYBR Green Mastermix

(Qiagen, Hilden) jeweils nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Template diente cDNA (siehe 2.2.3.4.1). Es wurde je 10 ng ursprüngliche RNA als Template eingesetzt. Im Gesamt-Ansatz von 25  $\mu$ l befanden sich zusätzlich 12,5  $\mu$ l 2x ImmoMix™/ QuantiTect SYBR Green Mastermix , 2  $\mu$ l des genspezifischen Primerpaargemisches (10  $\mu$ M vorwärtsgerichteter-Primer und 10  $\mu$ M rückwärtsgerichteter-Primer) sowie 10,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Je Probe und Gen erfolgte eine Dreifachbestimmung. Zusätzlich gab es für jedes Primerpaar Kontrollen ohne Template-DNA (NTC: no template control). Die qRT-PCR-Reaktion wurde mit Hilfe des GeneAmp® 5700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) nach folgendem Programm durchgeführt und mit der GeneAmp® 5700 SDS Software ausgewertet:

Vorwärmen des Geräts: 2 min 50°C

Initiale Aktivierung: 7 min 95°C

40 Zyklen bestehend aus:

Denaturierung: 15 s 95°C

Annealing: 30 s 60°C (Temperatur je nach Schmelztemperatur der Primer)

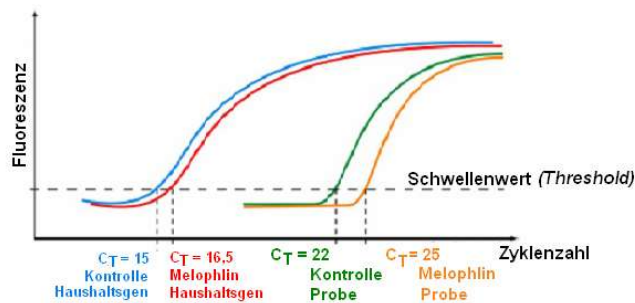
Extension: 30 s 72°C

Nach der PCR wurde zudem eine Schmelzkurve von 60°C an aufsteigend aufgenommen, um die Produktbildung zu kontrollieren.

### **2.2.3.5.1 Auswertung mit der $\Delta\Delta$ -CT-Methode**

Während einer PCR findet ein exponentieller und quantifizierbarer Anstieg der Produktmenge statt. Der Beginn und die Dauer des Anstiegs hängen von der vorhandenen Transkriptmenge ab und enden in einer Sättigung. Bei der Auswertung der qRT-PCR Daten wurde daher mit einem Schwellenwert gearbeitet, dem CT-Wert (Threshold Cycle), der den Zyklus der PCR beschreibt, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und sich dabei am Anfang der exponentiellen Amplifikationsphase befindet. Dieser Wert befindet sich bei linearer Darstellung des Fluoreszenzsignals gegen die Zykluszahl in der Mitte des linearen Anstiegs. Ist in einer Probe nur wenig Ausgangsmaterial, wird der Schwellenwert-Zyklus später erreicht, während er bei viel Ausgangsmaterial mit einem kleineren CT-Wert korreliert. In dieser Arbeit wurde für jeden qRT-PCR-Datensatz ein für die jeweiligen Proben geeigneter Schwellenwert eingesetzt. Zur

Auswertung der Daten stehen unterschiedliche mathematische Methoden zur Verfügung. <sup>[122]</sup> Hier wurde zunächst die 2- $\Delta\Delta$ CT Methode verwendet. Bei dieser Methode wird die unterschiedliche Expression zwischen zwei Proben (A und B) als n-fache Expression von A zu B angegeben und ermöglicht so die relative Quantifizierung der qRT-PCR-Daten. Damit Variationen in der eingesetzten cDNA ausgeglichen werden können, ist eine interne Kontrolle notwendig. In dieser Arbeit wurden dafür die häufig verwendeten normalerweise stabil exprimierten Referenzgene (auch genannt Haushaltsgene) GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und  $\beta$ -Aktin genutzt, wobei man für einen weiteren Abgleich zwei anstelle von einem Haushaltsgen wählte.



**Berechnung:**

$$\frac{2^{(C_T \text{ Kontrolle Probe} - C_T \text{ Melophlin Probe})}}{2^{(C_T \text{ Kontrolle Haushaltsgen} - C_T \text{ Melophlin Haushaltsgen})}} = \frac{2^{(\Delta C_T \text{ Probe})}}{2^{(\Delta C_T \text{ Haushaltsgen})}} = x$$

x \* 100 = Ergebnis in %

**Abbildung 31: Veranschaulichende Darstellung der  $\Delta\Delta$ CT Methode.** Das Verhältnis zweier Expressionsniveaus kann aus den CT-Werten der jeweiligen Proben berechnet werden. Die unterschiedliche Expression eines Gens in zwei Proben (hier: Melophlin A behandelte NGF-stimulierte PC12-Zellen vs. DMSO behandelte NGF stimulierte PC12-Zellen) wird zunächst anhand der CT-Werte quantifiziert. Schließlich wird die n-fache Expression der einen Probe zu anderen Probe berechnet und ermöglicht so die relative Quantifizierung der qRT-PCR-Daten. Damit Variationen in der eingesetzten cDNA ausgeglichen werden können ist eine interne Kontrolle notwendig. Dazu verwendet man die sogenannten Haushaltsgene (hier: GAPDH und  $\beta$ -Aktin).

### 2.2.3.5.2 Auswertung bei zusätzlicher Berücksichtigung der PCR-Effizienz

Wie unter 2.2.3.5.1 beschrieben, lässt sich das Verhältnis zweier Expressionsniveaus aus den CT-Werten der jeweiligen Proben berechnen.

$$CT_{\text{(Zielgen)}} - CT_{\text{(Referenzgen)}} = \Delta CT$$

$$\Delta CT_{\text{(behandelt)}} - \Delta CT_{\text{(unbehandelt)}} = \Delta\Delta CT$$

$$2^{-\Delta\Delta CT} = n\text{-fache Expression}_{\text{(behandelt zu unbehandelt)}}$$

#### Formel 2: Berechnung der Expressionsrate mit der $\Delta\Delta$ -CT-Methode

Allerdings werden in **Error! Reference source not found.** optimale Amplifikationsbedingungen vorausgesetzt, d.h. Verdopplung der Produktmenge bei jedem PCR-Zyklus, die in der Realität nicht immer gegeben sind. Somit muss die Gleichung um die reale Amplifikationseffizienz E korrigiert werden zu

$$\frac{A}{B} = E^{CT_B - CT_A}$$

Die Amplifikationseffizienz E ist vom verwendeten Primerpaar und von den PCR-Bedingungen abhängig und wird z.T. auch als Primereffizienz bezeichnet. Sie kann über die Messung der CT-Werte zweier definierter Ausgangsmengen  $A_0$  und  $B_0$  wie folgt berechnet werden:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}(\lg B_0 - \lg A_0 / CT_B - CT_A)}$$

In der Praxis wurde E hier nach der Messung mit der LinRegSoftware bestimmt, dabei werden die CT-Werte der einzelnen Verdünnungen gegen den dekadischen Logarithmus ihrer jeweiligen Konzentration aufgetragen. Dabei erhält man eine Gerade, deren Steigung m mittels linearer Regression berechnet werden kann. Diese Steigung steht in direktem Zusammenhang mit E:

$$E = 10^{-1/m}$$

Die letzten beiden Gleichungen entsprechen dabei bei Normalisierung der Daten über ein Referenzgen dem von Pfaffl <sup>[122]</sup> vorgeschlagenen Modell zur Auswertung von qRT-PCR-Daten. Bei den hier vorgestellten Experimenten wurden nur Primerpaare, deren PCR-Effizienz größer als 1,7 war (entsprechend einer ca. 70%igen PCR-Effizienz), verwendet.



### 2.2.3.5.3 Überprüfung der genspezifischen Primer

Vor der erstmaligen Verwendung eines genspezifischen Primerpaares bei der quantitativen RT-PCR war es nötig, die Produktgröße gelelektrophoretisch zu überprüfen. Um Material für die Größenbestimmung zu erhalten wurde zunächst eine Standard-PCR mit den genspezifischen Primern durchgeführt.

**Tabelle 10: Standard PCR-Ansatz (100 µl)**

Reagenzien	Volumen [µl]
10x PCR-Puffer	10
dNTPs [20 mM]	0,5
Genspez. Primer fwd	1
Genspez. Primer rev.	1
ddH <sub>2</sub> O	83,85
Taq-Polymerase	0,7
cDNA (4.3.5.)	1

**Tabelle 11: PCR-Programm**

Temperatur	Dauer	Anzahl Wiederholungen
94 °C	3 min	1
94 °C	30 sec	25
56 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	2 min	1
4 °C	Bis zur Probenentnahme	1

Dann erfolgte die Größenbestimmung mittels DNA-Gelelektrophorese. Die relativ kleinen, 100-200 bp großen PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gekocht, bis sie vollständig gelöst war. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6 x Probenpuffer vermischt.

TAE-Puffer: 40 mM Tris  
5 mM EDTA  
pH 8,0

6 x DNA-Probenpuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,325 % (w/v) Xylencyanol  
30 % (v/v) Glycerol

Zusätzlich zu den Proben wurde ein DNA-Größenstandard (s. 2.1.6) aufgetragen. Dieser ermöglicht eine spätere Bestimmung der Größe der Fragmente. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 V/cm Gellänge. Nach der Auftrennung wurde das Gel 5 bis 10 Minuten in eine Ethidiumbromid-Färbelösung gelegt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert mit seinen aromatischen Ringen zwischen die heteroaromatischen Ringe der Basen der Nukleinsäuren. Er kann durch UV-Licht (254 bis 366 nm) angeregt werden und emittiert Licht im orangeroten Bereich (590 nm). Diese Emission wurde nach Färbung auf einem UV-Transluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht und mit einem Gelscanner (s. 2.1.10) dokumentiert.

### **2.2.3.6 Bereitstellung von Phosphatasen für den Roboterscreen in Kooperation mit der Dortmund Protein Facility**

#### **2.2.3.6.1 Transformation von E. coli**

Pro Transformationsansatz wurden 200 µl elektrokompetente *E.coli BL21 (DE3) RIL* Bakterienzellen zunächst langsam auf Eis aufgetaut und anschließend mit ca. 100 ng DNA (pET22/PP1, PT7-7/PTP1B, pT7-7/VHR) versetzt. Dann erfolgte der Elektroschock und damit die Aufnahme der DNA in die Zellen. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurde der Ansatz 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an diese Regenerationsphase wurden die Zellen durch Zentrifugation (2 min, 13000 rpm) sedimentiert, 950 µl des Überstandes abgenommen, die Zellen in den verbleibenden 50 µl resuspendiert und auf LB-Agarplatten (mit Ampicillin-haltigem Selektionsmedium) ausgestrichen. Die Platten wurden schließlich über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

LB-Flüssigmedium:            10 g NaCl  
   5 g Hefeextrakt  
   10 g Bacto-Trypton  
   auf 1000 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,4

LB-Amp-Agar-Platten: 10 g NaCl  
5 g Hefeextrakt  
10 g Bacto-Trypton  
10 g Bacto-Agar  
auf 1000 ml H<sub>2</sub>O, 50 µg/ml Ampicillin

### **2.2.3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ nach Angaben des Herstellers. Von positiven Klonen wurde eine 5 ml Mini-Kultur (LB-Amp) angeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 2 Minuten bei 5000 U/min in einer Eppendorf Tischzentrifuge sedimentiert. Die Bakterienzellwand wurde mit EDTA-haltigem Puffer destabilisiert und dann durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die Ansätze wurden 10 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit (13000 U/min) zentrifugiert, und der Überstand, in dem sich unter anderem die Plasmid-DNA befindet, wurde auf die Miniprep-Säule überführt. Durch die Silika-Matrix der Miniprep-Säule wurde die Plasmid-DNA, die an die Matrix bindet, von den restlichen Bestandteilen der Bakterienzellen getrennt. Nach zwei Waschschritten wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl Wasser eluiert und deren Konzentration am Nanodrop bestimmt (Verweis zum Nanodrop z.B.).

### **2.2.3.6.3 Umklonierung und Aufreinigung durch die DPF**

Für die Umklonierung der Phosphatasen PP1, PTP1B, VHR in die Vektoren pOPINE, pOPINF, pOPINM, pOPINS wurden pro Klonierungsansatz je 10 µl Stammlösung von 100 ng/µl zusammen mit der codierenden Sequenz bei der Dortmund Protein Facility abgegeben.

Für die Aufreinigung wurden die folgenden Bedingungen bestellt:

VHR: Vektor: pOPINS  
Autoinduktion 25 °C  
PP1: Vektor: pOPINS  
Autoinduktion 25 °C

Der pH-Wert wurde entsprechend dem isoelektrischen Punkt der Proteine ausgewählt.

Nach der Aufreinigung wurden die Proben aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung für den Roboterscreen eingefroren.

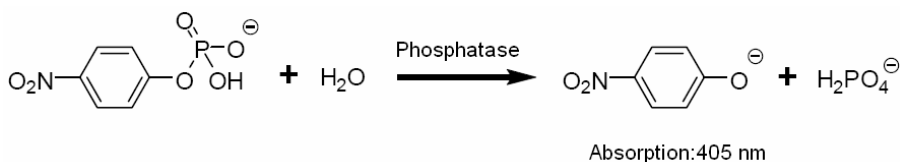
#### 2.2.3.6.4 Sequenzierung

Um einige der, durch genspezifischen Primer amplifizierten Sequenzen bei der qRT-PCR (2.2.3.5) und die verwendete PTP1B-Sequenz zu überprüfen, wurde zunächst die entsprechende DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Die Sequenzierung fand anschließend durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg), die Überprüfung mit Hilfe des Blast-Online-Tools statt. <sup>[123]</sup>

### 2.2.4 Enzymkinetik/ Biophysikalisch chemische Methoden

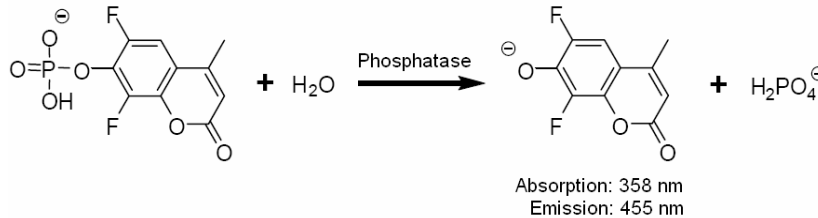
Zur Messung der Enzymaktivität und -inhibierung von Phosphatasen wurden verschiedene Substrate und Testsysteme beschrieben. Eine sehr oft angewandte Methode zur Aktivitätsbestimmung von Phosphatasen verwendet para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat. Dieses wird durch die Phosphatase dephosphoryliert und bildet Nitrophenol, einen gelben Farbstoff, der bei 405 nm sein Absorptionsmaximum hat <sup>[124,125]</sup> und einen molaren Extinktionskoeffizienten von 16500 Mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> <sup>[126]</sup> besitzt (Abbildung 32) pNPP ist ein unspezifisches Substrat und es kann eine Aktivitätsbestimmung nur bei gereinigten Phosphatasen vorgenommen werden.



**Abbildung 32: Phosphatase katalysiert Umsetzung von pNPP**

Vergleicht man dieses kolorimetrische Verfahren mit Fluoreszenz-basierten Assays so zeigt sich, dass diese sowohl höhere Präzision als auch Empfindlichkeit aufweisen. Als Substrate für Fluoreszenzmessungen eignen sich Substanzen, die ihre Fluoreszenzeigenschaften durch enzymatische Dephosphorylierung verändern. Beispiele hierfür sind 4-Methyl-umbelliferylphosphat (MUP) und

Fluoresceindiphosphat (FDP).<sup>[127]</sup> Eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit konnte mit dem fluorogenen Substrat 6,8-Difluoro-4-methyl-umbelliferylphosphat (DiFMUP) erreicht werden<sup>[128]</sup>



**Abbildung 33: Phosphatase katalysiert Umsetzung von DiFMUP**

In der vorliegenden Arbeit wurde, sofern nicht anders vermerkt, der auf Nitrophenolphosphat (pNPP) basierte Enzymtest verwendet. In einigen, gesondert aufgeführten Fällen wurde die Phosphataseaktivität nach der der Zugabe von Substanzen auch mit dem sensitiveren, auf DiFMUP basierenden, Enzymtest überprüft.

#### **2.2.4.1 Bestimmung der *in vitro* Phosphatase Aktivität**

Um die Aktivität der einzelnen Phosphatasen zu überprüfen und um die Detektierbarkeit der Dephosphorylierung zu gewährleisten, fand zunächst ein Vorversuch statt, bei dem die nötige bzw. optimale Enzymkonzentration festgelegt wurde.

In einer 96-Lochplatte wurden zu 50 µl Enzymlösung (10 Verdünnungen) jeweils 50 µl pNPP-Lösung (10 Verdünnungen) pipettiert. Bei 405 nm und 37°C konnte die Absorption des dephosphorylierten Substrats alle 75 sec insgesamt 40mal gemessen werden. Alle Messungen wurden dreifach ausgeführt. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurden 50 µl Puffer mit 50 µl pNPP vermessen. Schließlich wurde eine Enzymverdünnung gewählt, bei der ein linearer Anstieg der Absorption gewährleistet werden konnte (Tabelle 12).

Auch die Aktivität der, von der DPF aufgereinigten Phosphatasen (VHR, PP1) wurde auf diese Weise überprüft.

VHR-Puffer:

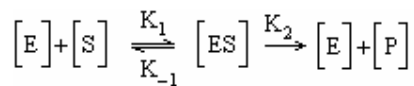
Puffer: 25 mM MOPS, 5 mM EDTA, pH 6,5, 1 mM DTT, 0,025 % NP40

PP1-Puffer:

40 mM Tris, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, pH 8,1, 1mM DTT, 0,025 % NP40

### 2.2.4.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten $K_M$

Für den Ablauf einer Enzymreaktion spielt neben der Aktivität des Enzyms auch die Affinität des Substrates zum Enzym eine entscheidende Rolle. Eine enzymatische Reaktion lässt sich mittels der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben. <sup>[129]</sup>



**Formel 3: Allgemeine Reaktionsgleichung einer Enzymreaktion.** E: Enzym, S: Substrat, ES: Enzym-Substrat-Komplex, P: Produkt

$K_2$  (auch  $K_{cat}$  oder „turnover number“ genannt) ist ein Maß für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung ( $v_{Max}$ ).

Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  (Formel 4) ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes [ES].

Ist die Substratkonzentration gleich dem  $K_M$ -Wert, so liegt die Hälfte des Enzyms im [ES]-Komplex vor, die andere Hälfte ist frei ([E]).

$$K_M = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}$$

**Formel 4: Definition der Michaelis-Menten-Konstante.**

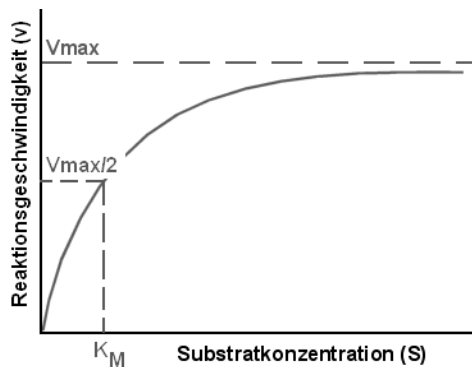
Die Michaelis-Menten Konstante ( $K_M$ ) für die verschiedenen, verwendete Phosphatasen wurde jeweils in einem kontinuierlichen Verfahren bestimmt: Hierfür wurden die konzentrationsabhängigen Umsatzgeschwindigkeiten (Formel 5) bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt.

$$V = \frac{V_{Max} \cdot [S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{Max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

**Formel 5: Michaelis-Menten Gleichung**

$V$  = Geschwindigkeit in mmol s<sup>-1</sup>,  $V_{Max}$  = maximale Geschwindigkeit in mmol s<sup>-1</sup>,  
 $S$  = Substratkonzentration in mmol,  $K_M$  = Michaelis-Menten-Konstante in mmol.

Nach Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  gegen die Substratkonzentration  $[S]$  können  $K_M$  und  $V_{Max}$  direkt aus dem Graphen erhalten werden (Abbildung 34).



**Abbildung 34** :Graphische Ermittlung von  $K_M$  durch Auftragung der Umsatzgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

Zur Bestimmung des  $K_M$ -Wertes wurden 10 verschiedene Konzentrationen des Substrates  $pNPP$  verwendet. Die Dephosphorylierung wurde durch Zugabe der jeweiligen Phosphatase in der zuvor bestimmten optimalen Endverdünnung gestartet. Bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $405\text{ nm}$  wurden alle 75 sec insgesamt 40 Messpunkte gesammelt. Auch in diesem Experiment wurden Dreifachbestimmungen, sowie eine Hintergrundmessung durchgeführt.

Durch Auftragung der Absorption bzw. Fluoreszenz gegen die Substratkonzentration wurden mit Hilfe einer Regressionskurve (Michaelis-Menten Fit, Programm XL Fit) oder der Lineweaver-Burk-Auftragung die  $K_M$ -Werte ermittelt.

### **2.2.4.3 Aktivitätsscreening mit Testsubstanzen**

In einer 96-Lochplatte wurden Substanzlösungen ( $25\text{ }\mu\text{L}$ , Endkonzentrationen  $50$ ,  $5$  und  $0.5\text{ }\mu\text{M}$  in Puffer s. Tabelle 12) vorgelegt und  $15\text{ min}$  mit der jeweiligen, zu testenden Phosphatase ( $65\text{ }\mu\text{l}$ , Endkonzentration und Puffer s. Tabelle 12) bei RT inkubiert. Nach Zugabe des Substrats  $pNPP$  ( $10\text{ }\mu\text{l}$ , Endkonzentration s. wiederum Tabelle 12) wurde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  über  $30\text{ min}$  alle  $75\text{ sec}$  die Absorption bei  $405\text{ nm}$  detektiert. Zur Normierung wurde parallel die Absorptionsänderung bei einer Reaktion ohne Enzym (Hintergrund) und einer Reaktion ohne Inhibitor (Positivkontrolle) vermessen. Als Vergleichssubstanz dienten ferner jeweils die unter 2.1.15 beschriebenen Standardinhibitoren. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

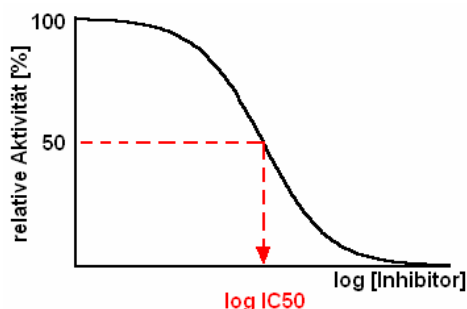
**Tabelle 12: Assaybedingungen für die verschiedenen verwendeten Phosphatasen**

Enzym	Enzymverd.	Substratkonz.	Puffer
PTP1B (13 mg/ml)	1: 8000	2 mM pNPP	25 mM Hepes, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA pH 7,2 1 mM DTE, 0,025% NP40
PTPN2 (1,4 mg/ml)	1:2000	2 mM pNPP	25 mM Hepes, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA pH 7,2 1 mM DTE, 0,025% NP40
MPTP A (0,4 mg/ml)	1:80	2 mM pNPP	25 mM Hepes, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA pH 7,2 1 mM DTE, 0,025% NP40
His-MPTP B (3,2 mg/ml)	1:2000	2 mM pNPP	25 mM Hepes, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA pH 7,2 1 mM DTE, 0,025% NP40
PTP-SHP2 (0,4mg/ml)	1:40	2 mM pNPP	25 mM Hepes, 50 mM NaCl, 2,5 mM EDTA pH 7,2 1 mM DTE, 0,025% NP40
h-PTP $\beta$ (2,1 mg/ml)	1:16 000	1 mM pNPP	50 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA pH 8.0 1mM DTE, 0,025% NP40
VHR (12,5 mg/ml)	1:800	10 mM pNPP	25 mM MOPS, 5 mM EDTA pH 6,5 1 mM DTE, 0,025 % NP40

#### **2.2.4.4 IC<sub>50</sub>-Bestimmung**

Zur genaueren Untersuchung der Inhibition der Phosphatasen, unter Anderem für die Struktur-Wirkungs-Beziehung, wurden die IC<sub>50</sub>-Werte der inhibierenden Verbindungen bestimmt. Der IC<sub>50</sub>-Wert stellt die Inhibitorkonzentration dar, bei der die Aktivität des untersuchten Enzyms noch 50 % der Ausgangsaktivität beträgt.





**Abbildung 35: Schematische Darstellung zur Ermittlung des  $IC_{50}$ -Wertes** durch Auftragung der Enzymaktivität in % gegen die logarithmisch aufgetragene Inhibitorkonzentration.

Durch Auftragung der Inhibitorkonzentrationen gegen die jeweils ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten erhielt man Inhibitions-Kurven, aus denen der relative  $IC_{50}$ -Wert nach einer nichtlinearen Regression direkt abgelesen werden kann (vergleiche Abbildung 35).

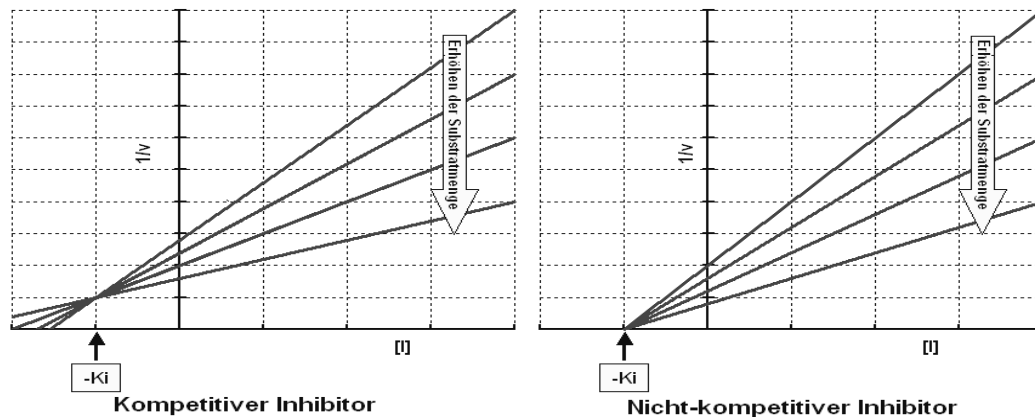
Die Durchführung der Experimente erfolgte analog zu 2.2.4.3. In einer 96-Lochplatte wurden Inhibitorlösungen (25  $\mu$ L, Endkonzentrationen z.B. 100/ 50 / 25 / 12,5 / 6,25 / 3,13 / 1,57 / 0,78 / 0,39 und 0,19  $\mu$ M in Puffer s. Tabelle 12) vorgelegt und 15 min mit der jeweiligen zu testenden Phosphatase (65  $\mu$ L, Endkonzentration und Puffer s. Tabelle 12) bei RT inkubiert. Nach Zugabe des Substrats pNPP (10  $\mu$ L, Endkonzentration s. Tabelle 12) wurde bei 37  $^{\circ}$ C über 30 min alle 75 sec die Absorption bei 405 nm detektiert. Die Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Kontrollen wurde parallel die Absorptionsänderung bei einer Reaktion ohne Enzym (Hintergrund) und einer Reaktion ohne Inhibitor (Positivkontrolle) vermessen. Durch Auftragung der normierten Reaktionsgeschwindigkeiten (Positivkontrolle entspricht 100 %) gegen die logarithmische Inhibitorkonzentration konnte mit einer sigmoiden Regressionskurve (Boltzmann Fit, Programm XL Fit) der  $IC_{50}$ -Wert für die Substanz ermittelt werden.

#### **2.2.4.5 Bestimmen des Inhibitionstyps und der Dissoziationskonstanten $K_i$**

Zunächst wurden analog zu 2.2.4.4 die  $IC_{50}$ -Werte bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen (z.B. bei  $1/2 K_M$ , bei  $K_M$ , bei 4mal  $K_M$  und 20mal  $K_M$ ) und 10 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen ermittelt. Die erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte wurden miteinander verglichen und gaben einen ersten Hinweis, inwieweit die Substratkonzentration einen Einfluss auf die Wirkung der Substanz hatte.

Die Dissoziationskonstanten  $K_i$  sowie die Unterscheidung zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver Art der Hemmung wurden anschließend nach der klassischen Methode für reversible Inhibitoren nach Dixon <sup>[130]</sup> bestimmt. Dabei wurden die Messungen jeweils bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen (z.B. bei  $\frac{1}{4} K_M$ , bei  $K_M$ , bei 2mal  $K_M$  und 10mal  $K_M$ ) und mindestens vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt. Ein kritischer Punkt stellte dabei die Inhibitorkonzentration dar: Um gute Daten zu erhalten, sollten die Inhibitorkonzentrationen so gewählt werden, dass die Enzymaktivität jeweils zwischen 35 und 70 % lag. <sup>[131]</sup>

Die Berechnung der  $K_i$ -Werte erfolgte durch lineare Regression der reziproken Reaktionsrate für die variierenden Inhibitor- und Substratkonzentrationen. Die Werte für  $K_i$  wurden aus dem Schnittpunkt der Geraden für die vier Substratkonzentrationen ermittelt.



**Abbildung 36: Schematische Darstellung eines Dixon-Plots** (modifiziert Homepage D.A. Bender, London's Global University) <sup>[132]</sup>  $K_i$ : Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplex,  $v$ : Reaktionsgeschwindigkeit,  $[I]$ : Inhibitorkonzentration

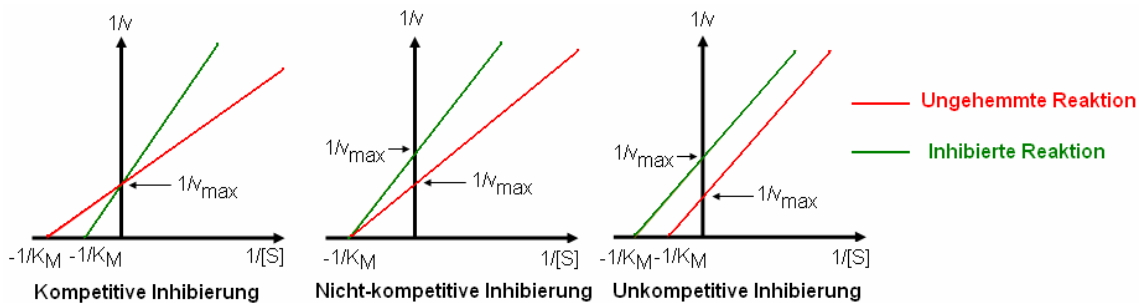
Zum Vergleich mit diesen experimentell ermittelten  $K_i$ -Werten wurden die Dissoziationskonstanten der Enzym-Inhibitor Komplexe ( $K_i$ ) für die kompetitiven Inhibitoren auch über die Cheng-Prusoff Gleichung <sup>[133]</sup> (Formel 6) ermittelt

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S]/K_M}$$

**Formel 6 Berechnung von  $K_i$  aus dem  $IC_{50}$ -Wert, der Substratkonzentration  $S$  und der Michaelis-Menten Konstante  $K_M$ .**  $K_i$ : Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor Komplex,  $[S]$ : Substratkonzentration,  $K_M$ : Michaelis-Menten-Konstante

Alternativ zum Dixon-Plot ist die doppelt reziproke Auftragung ( $1/v$  vs  $1/[S]$ ) nach Lineweaver-Burk <sup>[134]</sup> möglich.

Die Art der Auftragung bzw. der Verlauf der Geraden ermöglicht es hierbei nicht nur zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver Inhibierung zu unterscheiden, sondern erlaubt auch die Differenzierung der nicht-kompetitiven Hemmung in eben nicht-kompetitive und unkompetitive Inhibierung bzw. kann gegebenenfalls eine gemischte Form der Inhibierung anzeigen (Schnittpunkt der Geraden oberhalb der x-Achse, nicht aber auf der y-Achse, in der Abbildung 37 nicht gezeigt).



**Abbildung 37: Schematische Darstellung des Lineweaver-Burk-Plots** (modifiziert Lerneinheit: Einführung in die kinetischen Verfahren in der Pharmazie, <sup>[135]</sup>)  $v$ : Reaktionsgeschwindigkeit,  $v_{\max}$ : maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $K_M$ : Michaelis-Menten-Konstante

Hier wurden die Messungen jeweils bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen (z.B. bei  $\frac{1}{4} K_M$ ,  $\frac{1}{2} K_M$ ,  $K_M$ ,  $2,5 K_M$ ,  $5 K_M$ ,  $10 K_M$ ,  $15 K_M$ ,  $20 K_M$ ) und mindestens 3 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen, bei denen die Enzymaktivität jeweils wiederum bei 35 bis 70 % lag, durchgeführt. Einen kritischen Punkt stellten hier die unterschiedlichen Substratkonzentrationen dar: Es erwies sich als hilfreich, bei genügend verschiedenen Konzentrationen zu messen um eine ausreichende Anzahl Datenpunkten zur exakten Ermittlung des Schnittpunkts zu haben. Die Auftragung der Werte erfolgt wie oben beschrieben doppelt reziprok für die variierenden Inhibitor- und Substratkonzentrationen. Der Inhibitionstyp konnte anhand des typischen Verlaufs der Geraden abgelesen werden.

Alle hier unter 2.2.4 beschriebenen Messungen wurden dreifach und in mindestens drei unabhängigen Experimenten validiert. Die Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert aus diesen drei Versuchen dar.

Die beschriebenen Verfahren und Berechnungen (2.2.4) beziehen sich allesamt auf reversible Inhibitoren und sind im Falle eines irreversiblen Inhibitors nicht anwendbar.

### **2.2.4.6 Hefe basierte chemische Genomik**

(Kooperation mit AG Prof. Dr. S.L. Schreiber, Broad Institute of Harvard and MIT, Boston)

Um den Wirkmechanismus spezifischer Substanzen wie z.B. der Tetransäurebibliothek aufzudecken, sollte ein chemisch genetisches Testverfahren mit Hefe (vgl. [109]) in der Arbeitsgruppe etabliert werden.

Dabei war es zuerst nötig, nur die niedermolekularen Verbindungen auszuwählen, die zu einer Wachstumsverzögerung oder –hemmung bei den Hefe-Elternstämmen führten. Dieses fand daher im ersten Teil des Testverfahrens dem sogenannten `bioactivity profiling` oder `dose response assay` statt. Das normale Wachstum der Hefen und die Möglichkeit der Inhibierung sollte durch eine Reihe von OD-Messungen festgestellt werden. Das Experiment fand in 384-Loch-Platten bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) statt.

Die Übernachtskulturen (*RM11-1a* and *BY4716*) wurden 1:2000 verdünnt und mit den Substanzen in 4 verschiedenen Konzentrationen (55 µM, 5,6 µM, 2,8 µM and 1,4 µM) in Medium behandelt.

YPE Medium:            10 g Hefeextrakt  
                              20 g Pepton  
                              1 Liter dest. Wasser  
                              pH 5.8

YPD Medium:            YPE Medium, dem nach dem Autoklavieren und Abkühlen  
                              (bis ca. 65 °C), 50 ml sterile 40% Glukose zugeben wurden

15 bis zu 72 Stunden nach der Substanzzugabe wurden nun jeweils in regelmäßigen Abständen die OD<sub>600</sub> Werte bestimmt. Zusätzlich zur Testplatte mit YPE-Medium gab es eine zweite Replikatplatte mit YPD- Medium, so dass man Messdaten von je zwei unabhängigen Experimenten, einem mit Glukose als zusätzlicher Energiequelle, einem ohne, erhielt. Man erhielt somit gleichzeitig eine Aussage wie die Hefen bei verschiedenen Nahrungsangeboten und damit verbunden einem unterschiedlich regulierten Stoffwechsel reagierten. Einige Zellen wurden ferner jeweils parallel mit einer äquivalenten Menge DMSO (Kontrolle) behandelt.

Niedermolekulare Verbindungen mit zytostatischen Eigenschaften wurden daraufhin in einer Reihe von Konzentrationen getestet (`titration assay`), um die minimal notwendige Konzentration festzustellen, die die Wachstumsverzögerung verursachte.

Schließlich sollte die Hypersensitivität von 104 verschiedenen, lebensfähigen Nachkommen, die durch meiotische Rekombination aus den Elternstämmen generiert wurden, gegenüber eben diesen Substanzen getestet werden.

Die Substanzkonzentration im Test entsprach dabei dem  $IC_{90}$  aus dem vorangegangenen Test. Das Ergebnis sollte schließlich mit dem einer Sammlung von kommerziell erworbenen Substanzen, deren Funktion bzw. deren zelluläre Ziel-Signalwege bekannt waren, verglichen werden. Hierbei half die Darstellung als `heatmap`, die es ermöglichte ein Profil von Sensitivitäten/Resistenzen der 104 diploiden F1 Nachkommen gegenüber den getesteten Substanzen zu erstellen. Dieses konnte nun mit den Profilen von käuflichen Substanzen, deren Wirkmechanismus bekannt war (z.B. Rapamycin) verglichen werden, um gegebenenfalls Ähnlichkeiten zwischen diesen chemisch-genetischen Profilen festzustellen.

Das Testverfahren lieferte also eine Möglichkeit, den Wirkmechanismus einer noch unerforschten/neuen Substanz festzustellen (vergleiche Abbildung 38).

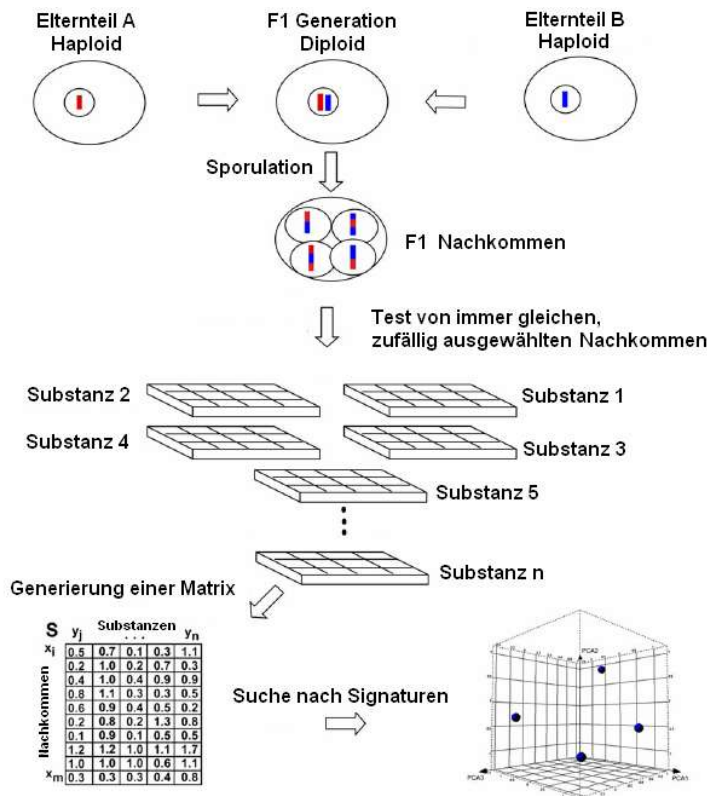


Abbildung 38: Funktionale Klassifizierung von Substanzen aufgrund ihres Sensitivitätsprofils <sup>[109]</sup>

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 ***Der vorwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz zur Untersuchung des Ras-Signalwegs mit Hilfe der Naturstoffklasse der Tetransäuren***

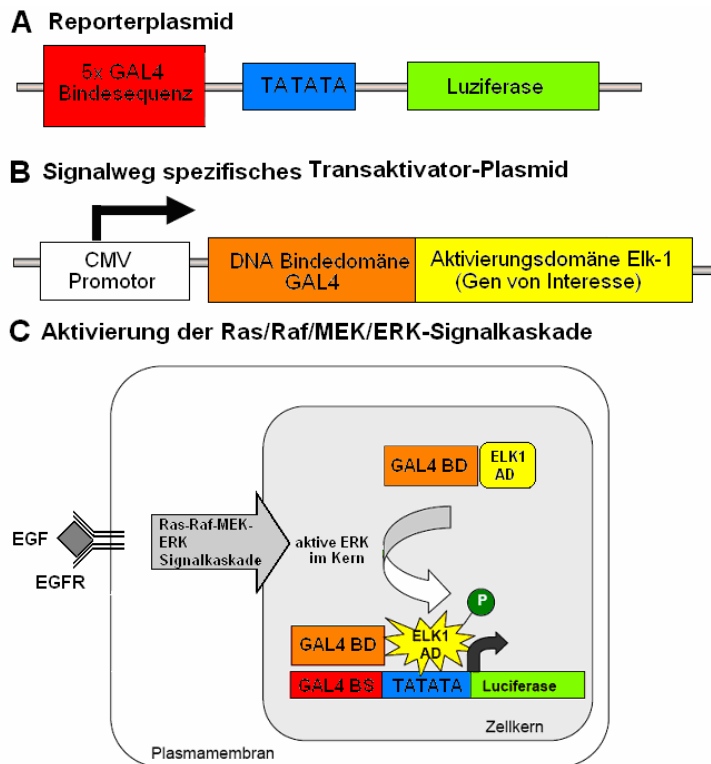
Der Ras-Signalweg kontrolliert wichtige Zellprozesse. Fehlfunktionen können daher zu ernsthaften Erkrankungen, wie Krebs, führen. Modulatoren in Form von niedermolekularen Substanzen sollen entsprechend dabei helfen, den Signalweg an sich und seine Regulation zu untersuchen und besser zu verstehen und stellen darüber hinaus potentielle Krebs-Therapeutika dar. Insbesondere die von Aoki et al. isolierte Tetransäure Melophlin A schien hierfür besonders geeignet, da Melophlin A und einige synthetische Analoga bereits in verschiedenen, vorangegangenen, biologischen Tests in Zusammenhang mit dem Ras/MAPK-Signalweg gebracht werden konnten. Im Folgenden wird die Suche nach dem makromolekularen Ziel von Melophlin A im Ras/MAPK-Signalweg anhand verschiedener vorwärtsgerichteter chemisch-genetischer Ansätze und Experimente beschrieben. Einige davon erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Tanja Knoth (MPI Dortmund).

##### 3.1.1 PathDetect<sup>®</sup> Reporteragen-Assay

Mit der HLR-Elk-1 (*HeLa Luciferase Reporter-Elk-1*) Zelllinie von Stratagene, lässt sich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 (1.3.2) *in vivo* detektieren <sup>[115]</sup>. Die Zelllinie hat zwei verschiedene DNA-Konstrukte stabil in ihr Genom integriert (Abbildung 39). Zum einen ein Reporterplasmid, welches eine fünffach wiederholte Erkennungssequenz des in der Hefe vorkommenden Transkriptionsfaktors GAL4, eine TATATA-Box und das offene Leseraster des Luziferase-Gens beinhaltet, zum anderen das Signalweg-spezifische Transaktivator-Plasmid, welches die Kodierungssequenz für die Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (Aminosäuren 1-147) als Fusion mit der Aktivierungsdomäne des Elk-1 Transkriptionsfaktors (Aminosäuren 307-427) unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalievirus)-Promotors enthält. Das Fusionsprotein wird somit konstitutiv in den Zellen exprimiert.

Durch die Verwendung von Fusionen mit Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 aus der Hefe wird in der menschlichen HeLa-Zelllinie ein autonomes System geschaffen, welches einen sehr geringen Signalhintergrund besitzt.

Das Pathdetect® Reporter-gen System wurde hier verwendet, um den Einfluss der Tetransäurederivate auf den Ras/MAPK-Signalweg zu untersuchen. Wird in den HLR-Elk-1-Zellen durch Zugabe des Epidermalen Wachstumsfaktors EGF die Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade aktiviert, führt dies zur Phosphorylierung der Elk1-Aktivierungsdomäne und somit zu ihrer Aktivierung. Das phosphorylierte Fusionsprotein induziert daraufhin die messbare Transkription des Luciferase-Gens.



**Abbildung 39: Prinzip des PathDetect®-Reporter-gen Systems in der HLR-Elk-1 Zelllinie.**

**A** Die Reporter-Kassette mit der fünffach wiederholten GAL4-Bindesequenz, der TATATA-Box und dem Luciferase-Gen. **B** Das signalweg spezifische Transaktivator-Plasmid bestehend aus der Fusionssequenz der DNA-Bindedomäne von GAL4 und der Aktivierungsdomäne von Elk-1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors. **C** Durch die Bindung des Epidermalen Wachstumsfaktors (graues Quadrat) an den EGF-Rezeptor wird die Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade aktiviert. Aktives ERK phosphoryliert im Zellkern die Aktivierungsdomäne von Elk-1, was zu einer Expression des Luciferase Reportergens führt. (EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; GAL4 BD: Gal4 Bindedomäne; ELK1 AD: Elk-1 Aktivierungsdomäne; GAL4 BS: GAL4 Bindesequenz).

Von den ca. 70 getesteten Substanzen der Tetransäure-Kollektion zeigten Meloplin A und 13 Derivate eine inhibitorische Aktivität im Reporter-gen-Assay ohne dabei zytotoxisch zu sein.

Ihre Strukturen sind in Tabelle 13 dargestellt. Dort wird im Zusammenhang mit der Struktur-Aktivitäts-Beziehung (3.1.3) auch noch näher auf diese Derivate und die für die Aktivität wichtigen strukturellen Eigenschaften eingegangen.

Da eine Inhibierung der Luziferase an sich nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde die Luziferaseaktivität nach Inkubation mit den Substanzen zusätzlich *in vitro* und *in vivo* überprüft. Für die erwähnten Substanzen konnte eine solche Hemmung der Luziferase allerdings nicht festgestellt werden.

### **3.1.2 Wirkung der Tetransäuren auf v-H-Ras-transformierte MDCK-F3-Zellen**

MDCK-Zellen zeichnen sich durch eine epitheliale Morphologie und die Ausbildung von Zell-Zellkontakten aus. MDCK-F3-Zellen ähneln Fibroblasten und bilden keine ausgeprägten Zell-Zellkontakte, was mit einem Verlust der E-Cadherin Expression auf der Zelloberfläche einhergeht.<sup>[136]</sup>

In einem zellbiologischen, phänotypischen Assay, bei dem die Zell-Morphologie beurteilt wurde, untersuchte Dr. Tanja Knoth den Einfluss von Meloplin A und seiner Derivate auf die Rücktransformation von MDCK-F3-Zellen und damit indirekt auch auf den Ras/MAPK-Signalweg.

Neben Meloplin A selbst konnte sie von den knapp 70 Tetransäuren der Bibliothek zwei weitere Tetransäuren identifizieren, die ebenfalls eine Reversion des Phänotyps v-H-Ras-transformierter MDCK-F3-Zellen herbeiführten. Diese als aktiv identifizierten Substanzen, zählten dabei unter Anderem auch zu den dreizehn neben Meloplin A im Reporter-gen-Assay als aktiv hervorgetretenen Verbindungen (3.1.1).

### **3.1.3 Struktur-Wirkungs-Beziehung**

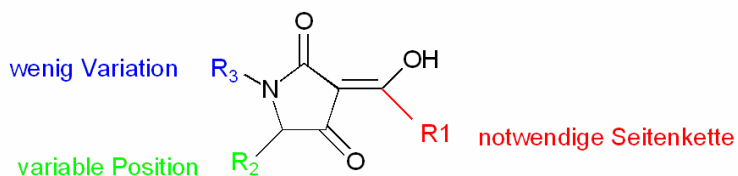
Aus den Ergebnissen der beiden Assays (3.1.1, 3.1.2) ließ sich eine Struktur-Wirkungs-Beziehung ablesen (angedeutet bzw. skizziert in Tabelle 13).

Wie auch in der Abbildung oberhalb der Tabelle 13 veranschaulicht, konnte bezüglich der variablen Reste (R1, R2, R3) zusammenfassend Folgendes festgestellt werden:



- Die C14-Kette des Naturstoffs, d.h. die lange Lipidkette des 3-Acylsubstituenten (R1) ist bei beiden Testverfahren für die Aktivität unverzichtbar und somit für den beobachteten biologischen Effekt von großer Bedeutung. Bereits eine Verkürzung um ein oder zwei C-Atome führte zum Verlust der Aktivität (Verbindungen TK174, TK67A und TK203A). Mit nur acht bzw. zehn Methylengruppen (Substanzen TK499E und TK499D) konnte dagegen noch eine Inhibition des Ras-Signalwegs bewirkt werden. Eine weitere Verkürzung der Kette hob diesen Effekt allerdings wieder auf.
- Am Tetramsäurekopf des Moleküls (R3) können kleinere Variationen vorgenommen werden, ohne die Aktivität negativ zu beeinflussen. Beispielsweise führen größere Substituenten als die Methylgruppe des Naturstoffs am Ring-Stickstoff zu einem Aktivitätsverlust im phänotypischen Assay. Im Reporter-gen-Assay zeigt sich diese Position ein wenig flexibler, wobei die Substituenten am Amin allerdings auch nicht bedingungslos vergrößert werden konnten. Lediglich Verbindung TK210B mit einem 2,4-Dimethoxybenzyl-Substituenten fiel dabei etwas aus dem Trend.
- Die größten Veränderungen, ohne Verlust der Aktivität in beiden Assays können an Position fünf des Rings (R2) eingeführt werden. So tragen die aktiven Verbindungen des phänotypischen Assays (TK236A und TK236C, s. auch **Error! Reference source not found.**) an dieser Stelle eine Methyl- bzw. 1-Methylpropylgruppe, während im Reporter-gen-Assay auch Tetramsäuren mit sterisch anspruchsvolleren Resten (verschiedene Alkylresten, Verbindungen, die von Phenylalanin oder Glutaminsäure abgeleitet wurden, z.B. Substanz TK377-1 und TK378TFA) inhibitorische Aktivität zeigten.

Tabelle 13: Datenauszüge für das SAR



Bezeichnung	R1	R2	R3	MDCK-F3 Assay [ED <sub>50</sub> ]	Pathdetect [IC <sub>50</sub> ]
Melophlin A	Pentadecyl (C16)	Methyl	H	30µM	18,1 ± 1,2 µM
TK210B	Pentadecyl	2,4-Dimethoxybenzyl (DMB)	H	Kein Effekt	30 µM

## Ergebnisse

TK236A	Pentadecyl	Methyl	Methyl	20 $\mu$ M	16,8 $\pm$ 3,4 $\mu$ M
TK236B	Pentadecyl	Methyl	Isopropyl	Kein Effekt	30 $\mu$ M
TK236C	Pentadecyl	Methyl	1-Methylpropyl	20 $\mu$ M	30 $\mu$ M
TK284C	Pentadecyl	Ethyl (C2)	Benzyl	Kein Effekt	30 $\mu$ M
TK377-1	Pentadecyl	Naphtyl	t-Butylpropionat	Kein Effekt	36,5 $\pm$ 5 $\mu$ M
TK499A	Nonyl (C10)	Ethyl	t-Butylpropionat	Kein Effekt	10 $\mu$ M
TK499D	Nonyl	Ethyl	H	Kein Effekt	23,8 $\pm$ 0,8 $\mu$ M
TK499E	Heptyl (C8)	Propyl	H	Kein Effekt	30 $\mu$ M
TK436A	Undecyl (C12)	Propyl	t-Butylpropionat	Kein Effekt	10 $\mu$ M
TK437	Heptyl	Propyl	t-Butylpropionat	Kein Effekt	10 $\mu$ M
TK378TFA	Pentadecyl	(2E, 4E)-Deca-2,4-dienyl	Propansäure	Kein Effekt	30 $\mu$ M
TK364TFA	Pentadecyl	Ethyl	Propansäure	Kein Effekt	30 $\mu$ M
TK174	Tridecyl (C2)	Methyl	H	Kein Effekt	Kein Effekt
TK67A	Undecyl	Methyl	H	Kein Effekt	Kein Effekt
TK210C	Pentadecyl	Hexyl	H	Kein Effekt	Kein Effekt
TK203A	Butadecyl (C4)	Methyl	H	Kein Effekt	Kein Effekt

Bemerkung zur Tabelle: Für den Rücktransformationsassay ist die Konzentration angegeben, bei der 50 % der MDCK-F3-Zellen eine Reversion des Phänotyps zeigten [ED<sub>50</sub>]. Bezüglich des Pathdetect<sup>®</sup> Ras/MAPK Reportergergen-Assays sind entweder die IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen für eine Inhibition im Reportergergen-Assay angegeben oder, wenn dieser nicht bestimmt wurde, die niedrigste Konzentration (30,10, 5  $\mu$ M) bei der noch eine Inhibition um mehr als 30 % sichtbar war. Alle in der Tabelle aufgeführten Substanzen waren in den angegebenen Konzentrationen nicht toxisch gegenüber den im Experiment verwendeten Zelllinien (MDCK-F3, HLR). Zytotoxizität wurde definiert als die Rest-Vitabilität der Zellen von weniger als 75 % der Zellen gemessen mit WST-1.

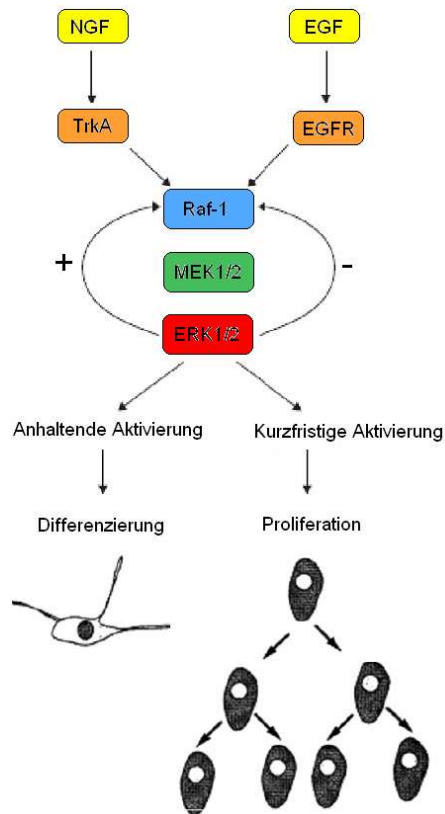
Basierend auf den Ergebnissen des Reportergen- und des phänotypischen Assays und der daraus abgeleiteten Struktur-Wirkungs-Beziehung, konnte Dr. Tanja Knoth ein aktives, biotinyliertes Analogon von Melophlin A synthetisieren. Außerdem gelang es ein inaktives, aber strukturell sehr ähnliches Analogon zu synthetisieren. (Abbildung 23) Beide wurden von ihr zur Identifizierung der Bindungspartner von Melophlin A durch die Affinitätschromatographie eingesetzt.

Um sicher zu gehen, dass die eine Kontrollsubstanz trotz der Derivatisierung mit dem PEG-Biotin-Linker noch Aktivität aufwies, wohingegen die zweite Kontrollsubstanz inaktiv sein sollte, wurden beide Verbindungen in den biologischen Assays getestet: Die Positivprobe zeigte dabei im Reportergen-Assay einen inhibitorischen Effekt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $25,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$  (vergleiche Melophlin A mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $18,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ), im Rücktransformationsassay jedoch keinen Effekt. Dies konnte aber aufgrund der vermutlich schlechtere Membrangängigkeit der biotinylierten Substanz und des komplexeren Zellmechanismus, der einer Phänotyp-Reversion zugrunde liegt, toleriert werden. Die Negativprobe zeigte keine Aktivität. Auch das Polyethylenglykol-gekoppelte Biotin alleine erwies sich als inaktiv. Schließlich konnte eine Zytotoxizität der beiden biotinylierten Moleküle ausgeschlossen werden. Somit erfüllten beide Verbindungen die Grundvoraussetzungen für die Affinitätsaufreinigung.

### **3.1.4 Einfluss auf den Ras/MAPK-Signalweg in PC12-Zellen**

Die Phäochromocytomzelllinie PC12 stammt von Zellen aus dem Nebennierenmark der Ratte ab. Die Zugabe von Nervenwachstumsfaktor NGF führt zu einer langanhaltenden Aktivierung der MAPK und zur Differenzierung, wohingegen die Zugabe des Epidermalen Wachstumsfaktors EGF zur kurzfristigen Aktivierung der MAPK und zur Proliferation führt. <sup>[117]</sup>(Abbildung 40)

Die Zelllinie stellt somit ein gutes Modell dar, mit dem die Wirkung von Melophlin A auf den Ras/MAPK-Signalweg anhand der daraus resultierenden verschiedenen zellulären Effekte überprüft werden kann.



**Abbildung 40: Unterschiedliche zelluläre Antworten nach der Aktivierung des Ras-Signalwegs über NGF bzw. EGF in PC12-Zellen.**

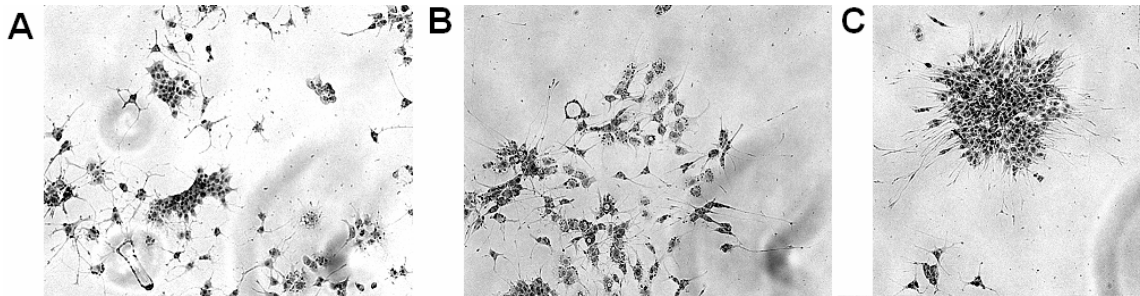
Bei einer anhaltenden ERK1/2-Aktivierung über NGF wachsen in PC12-Zellen Neuriten, wohingegen die Zellen bei einer kurzfristigen ERK1/2- Aktivierung über EGF beginnen, sich zu teilen.

Es ist allerdings auch bekannt, dass die Signalwege, die zum Neuritenwachstum bzw. zur Zellteilung führen weitaus komplexer sind, als in Abbildung 40 dargestellt. Das Netzwerk besitzt beispielsweise die Möglichkeit, auf verschiedenste eingehende Signale von verschiedenen Wachstumsfaktor-Rezeptoren aus und über diverse positive und negative Rückkoppelungsmechanismen zu koordinieren und zu prozessieren. <sup>[137, 138]</sup> Wie dies im Einzelnen geschieht, so dass spezifische biologische Antworten ausgelöst werden ist bisher aufgrund der enormen Komplexität und Dynamik noch nicht vollständig verstanden.

### **3.1.4.1 Wirkung von Melophlin A auf die PC12-Zell-Differenzierung**

Um festzustellen, ob und inwieweit das Ausmaß der Differenzierung bzw. die Ausbildung von neuritenartigen Ausläufern durch Melophlin A nach der Stimulierung mit NGF beeinflusst wird, wurden die Zellen zunächst mit der Substanz behandelt und anschließend mit NGF (100ng/ml) aktiviert.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Melophlin A in Kombination mit einer Stimulierung durch NGF zu einer Verstärkung des Neuritenwachstums führte. (Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Mit NGF stimulierte PC12-Zellen nach Behandlung mit DMSO als Kontrolle (A) und nach Behandlung mit Melophlin A (50 µM) (B und C)

Dieser Effekt von Melophlin A war zunächst einmal unerwartet, da der Naturstoff in den vorangegangenen, biologischen Assays (3.1.1, 3.1.2) immer inhibierend, ähnlich wie der MEK Inhibitor U0126, nicht aber stimulierend gewirkt hatte.

### **3.1.4.2 Wirkung von Melophlin A auf die PC12-Zell-Proliferation**

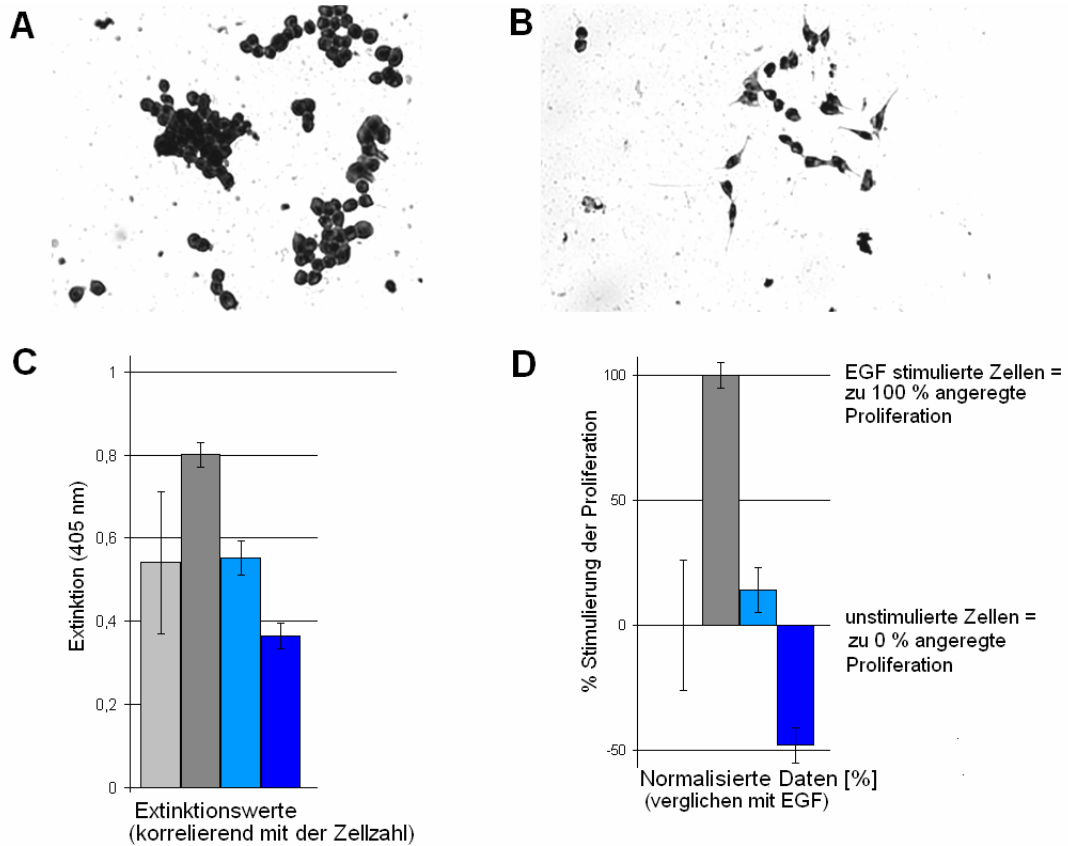
Um festzustellen, ob die Proliferation in Gegenwart von Melophlin A auch nach der Stimulierung mit EGF beeinflusst wird, wurden jeweils Zellen mit der Substanz behandelt und mit EGF (200 ng/ml) aktiviert.

Wie unter 2.2.1.6 noch beschrieben wird ließ sich anhand der gemessenen Extinktion ( $OD_{405}$ ) nach Zugabe des Farbstoffs WST-1 quantitativ die Stoffwechselaktivität der Zellen und somit indirekt auch die Zellteilungsrate bestimmen.

Die nach ca. 10-14 Tagen erhaltenen Werte für nicht aktivierte Zellen (Hintergrund) wurden mit denen von EGF-stimulierten, demzufolge proliferierenden Zellen (100 % Kontrolle) verglichen. Anhand dessen wurde die relative Proliferationsrate von mit

Melophlin A behandelten Zellen bestimmt. Wie in Abbildung 42 C und D deutlich zu sehen ist, führte die Behandlung mit Melophlin A zu einer Inhibierung der Proliferation, die ab 50  $\mu\text{M}$  sogar unter die basale Vermehrungsrate absinkt. Dies wird auch durch bloße Betrachtung der Anzahl an Zellen deutlich (Abbildung 42 A und B).

Ein toxischer Effekt kann ausgeschlossen werden da, die Zellen bei derselben Melophlin A-Konzentration lange Neuriten bilden (3.1.4.1), also sehr aktiv sind und keineswegs sterben.



**Abbildung 42: Der Einfluss von Melophlin A auf die EGF-stimulierte Proliferation**

**A** mit DMSO behandelte und mit EGF stimulierte PC12-Zellen die sich sichtbar teilen. **B** mit 50  $\mu\text{M}$  Melophlin A behandelte und mit EGF stimulierte PC12-Zellen, die sich im Gegensatz zur Kontrolle (**A**) klar nicht teilen. **C** Die gemessenen Extinktionswerte für unstimulierte (hellgrauer Balken), stimulierte (dunkelgrauer Balken) und mit 25 und 50  $\mu\text{M}$  Melophlin A behandelte Zellen (hellblauer und dunkelblauer Balken) **D** Die entsprechend normalisierten Werte für unstimulierte, stimulierte und mit Melophlin A (25 und 50  $\mu\text{M}$ ) behandelte Zellen.

### 3.1.4.3 Kombinatorische Analyse

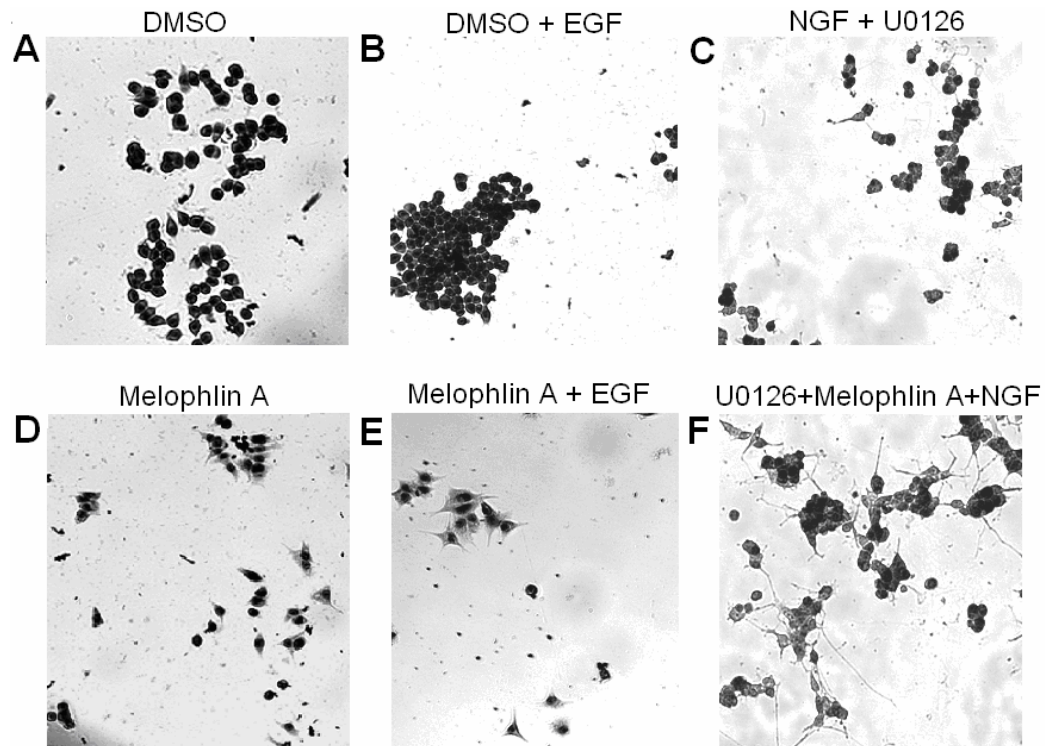
Zusätzlich zu den beschriebenen Untersuchungen hinsichtlich einer Wirkung auf die Differenzierung oder die Proliferation in PC12-Zellen fand auch eine kombinatorische

Analyse statt. Hierbei wurde untersucht, wie sich Melophlin A einzeln bzw. in Kombination mit dem MEK-Inhibitor U0126 auf unbehandelte oder mit NGF bzw. EGF aktivierte Zellen verhielt, um daraus weitere Schlüsse ziehen zu können.

**Tabelle 14: Ergebnisse der kombinatorischen Analyse in PC12-Zellen**

Stimulus, Behandlung	Neuritenwachstum	Proliferation
Melophlin A (50 $\mu$ M)	+	-
NGF + Melophlin A (50 $\mu$ M)	+	-
EGF + Melophlin A (50 $\mu$ M)	+	-
NGF + U0126 + Melophlin A (je 50 $\mu$ M)	+	-

Zeichenerklärung: + = Verstärkung, - = Reduktion; jeweils im Vergleich zur DMSO-Kontrolle



**Abbildung 43: Durch Melophlin A ausgelöste Differenzierung bzw. Wiederherstellung des Neuritenwachstums nach Zugabe des MEK Inhibitors U0126 in PC12-Zellen**

**A** DMSO behandelte PC12-Zellen, die keine Neuriten ausgebildet haben. **B** Mit DMSO behandelte und mit EGF stimulierte Zellen PC12-Zellen, die sich sichtbar teilen, aber keine Neuriten ausgebildet haben. **C** Gleichzeitig mit NGF stimulierte und mit dem MEK Inhibitor U0126 behandelte PC12-Zellen, bei denen das Wachstum der Neuriten deutlich gehemmt ist. **D** Melophlin A (50  $\mu$ M) behandelte PC12-Zellen mit kleinen Neuriten. **E** Mit 50  $\mu$ M Melophlin A behandelte und mit EGF stimulierte PC12-Zellen, die sich im Gegensatz zur Kontrolle (**A**) nicht

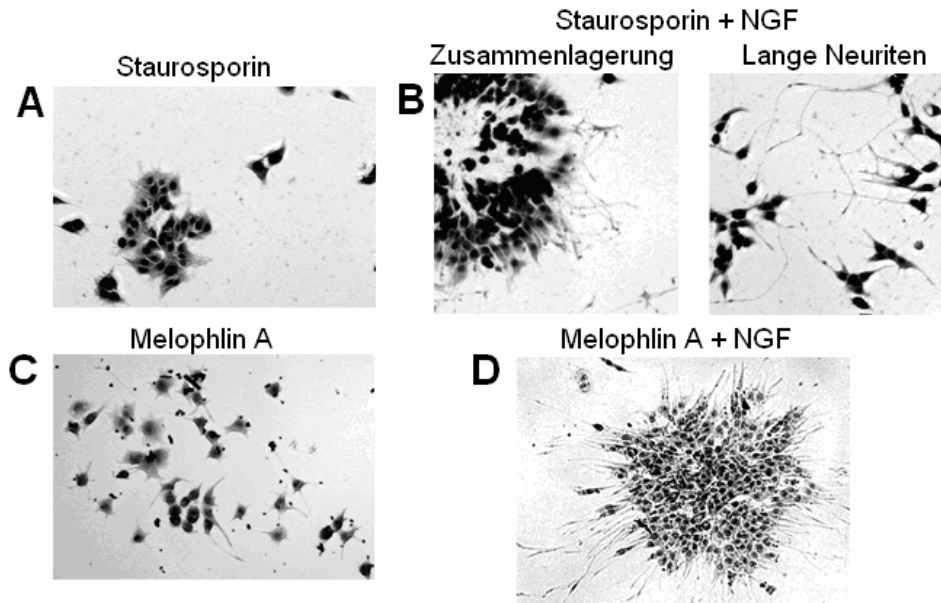
teilen, aber kleine Neuriten ausgebildet haben. F Gleichzeitig mit NGF stimulierte und mit dem MEK Inhibitor U0126 behandelte PC12-Zellen, bei denen das Wachstum der Neuriten durch Meloplin A (50  $\mu$ M wieder angeregt wurde.(Abbildungen zu den Beobachtungen bei einer Behandlung mit DMSO der Meloplin A und gleichzeitiger Stimulierung mit NGF s.Abbildung 41)

Anhand der ersten Versuche (3.1.4.1, 3.1.4.2), der Tabelle 14 und der Abbildungen wird ganz klar ein antagonistischer Effekt bei PC12-Zellen deutlich: Meloplin A stimuliert hier auf der einen Seite die Differenzierung und inhibiert auf der anderen Seite die Proliferation. Ferner kann durch die Behandlung mit Meloplin A der hemmende Effekt des MEK Inhibitors U0126 auf das Neuritenwachstum aufgehoben werden. Dies lässt darauf schließen dass der Wirkungsort des Naturstoffs innerhalb der beteiligten Signalkaskade der Kinase MEK nachgeschaltet ist.

Neben den in Tabelle 14 aufgeführten Bedingungen wurde auch der Phorbolester PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) als zusätzliches Stimulanz verwendet, da dieser den endogenen Aktivator (Diacylglycerol) der Proteinkinase C (PKC) substituieren kann und so über die aktive Form von PKC zur Aktivierung von ERK führen kann. <sup>[139]</sup> Bastiaens et. al. beschreiben ferner, dass die PKC Aktivität oberhalb des MAPK Moduls eine positive Rückkopplungsschleife induziert, die schließlich bei Aktivierung mit PMA und EGF zu einer Umkehrung der EGF-Reaktion von Proliferation zur Differenzierung, führen kann. <sup>[31]</sup>

Ein möglicher Einfluss auf die PKC Aktivität könnte zudem aufgrund einer zufällig beobachteten morphologischen Ähnlichkeit zwischen mit Meloplin A und Staurosporin (PKC Inhibitor) behandelten PC12-Zellen vermutet werden.





**Abbildung 44: Morphologische Ähnlichkeit zwischen mit Melophlin A und Staurosporin (PKC Inhibitor) behandelten PC12-Zellen**

**A** mit Staurosporin behandelte PC12-Zellen, die kleine Neuriten ausgebildet haben, sich aber nicht teilen im Vergleich zu **C** mit Melophlin A behandelten Zellen. **B** mit Staurosporin behandelte und mit NGF stimulierte PC12-Zellen, die sich zusammenlagern und denen lange Neuriten wachsen im Vergleich zu **D** mit Melophlin A behandelten und NGF stimulierten Zellen. Sowohl die Reaktion, wie auch die jeweils leicht veränderte Zellform bzw. das Zusammenlagern sind in beiden Fällen ähnlich vorhanden.

Melophlin A wurde in Kombination mit PMA, mit PMA und EGF und mit PMA und NGF getestet, um gegebenenfalls einen Einfluss auf die beschriebene positive Rückkopplungsschleife feststellen zu können. Es konnten keine Veränderungen im Vergleich zur DMSO Kontrolle beobachtet werden, womit ein möglicher Einfluss auf das Signalnetzwerk an dieser Stelle wahrscheinlich auszuschließen ist.

Auch diese Ergebnisse lassen einen möglichen Wirkort unterhalb der Kinase MEK vermuten, den bereits die Reversion des U0126-Effektes durch Melophlin A nahe legte.

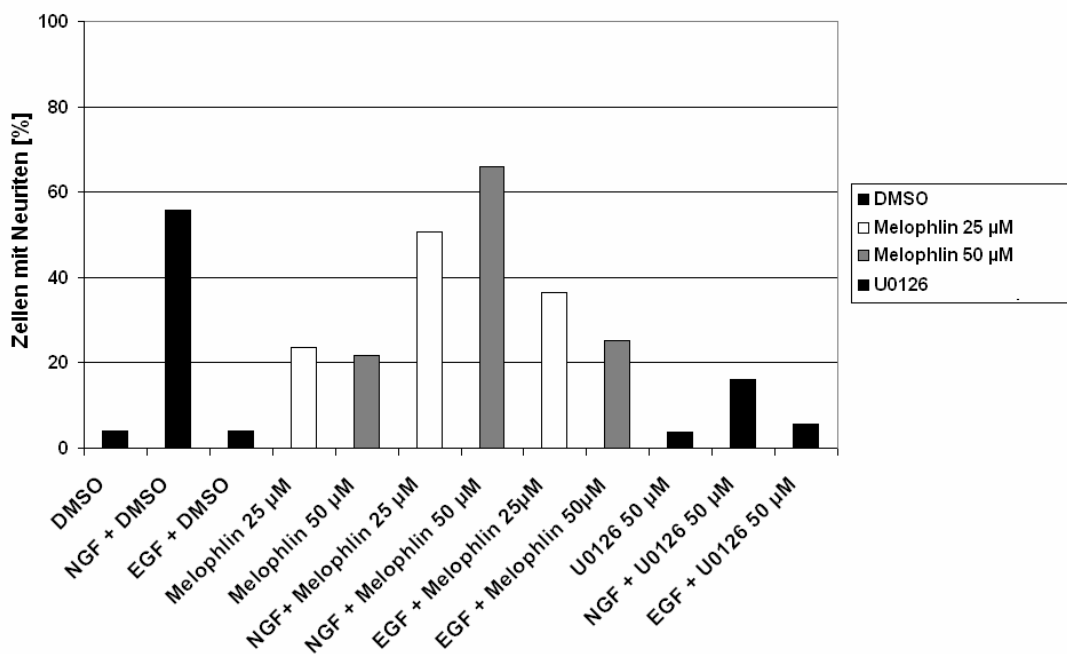
Der phänotypischen Ähnlichkeit der Reaktion nach Behandlung mit Melophlin A und Staurosporin liegt wahrscheinlich eine komplexere Ursache zugrunde. Diese Richtung wurde aber nicht weiter verfolgt, da Staurosporin an sich sehr unspezifisch wirkt und z.B. auch verschiedene andere Kinasen inhibiert <sup>[140, 141]</sup> Zudem besitzt die PKC andere Effektoren als den Ras/MAPK-Weg <sup>[142]</sup>, so dass es schwierig ist, Schlüsse aus dem Vergleich beider Substanzen zu ziehen.

### 3.1.4.4 Quantitative Auswertung des Neuritenwachstums in PC12-Zellen

Da aufgenommenen Zellbilder (3.1.4.1, 3.1.4.2, 3.1.4.3) nur einen relativ subjektiven Eindruck vermitteln können, wurde das Neuritenwachstum quantitativ bewertet.

Hierzu wurden jeweils die Zellen ohne Nervenfortsätze, mit kurzen Fortsätzen und mit Fortsätzen die mindestens der dreifachen Länge des Durchmessers des Zellkörpers entsprachen, gezählt.

Auf diese Weise konnte die Anzahl von unbehandelten, aktivierten, mit Substanzen behandelten und mit Substanzen behandelten und aktivierten Zellen, die jeweils Neuriten ausgebildet hatten direkt miteinander verglichen werden (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Anteil differenzierten Zellen in PC12-Zellen**

Die Anzahl Neuriten in PC12 nach Behandlung mit Meloplin A im Vergleich zu einer DMSO- und einer U0126-Kontrolle wurde quantifiziert. Es wurden in mindestens 2 unabhängigen Versuchen insgesamt mindestens 100 Zellen für die Auswertung verwendet. Eine Angabe des Fehlers (Fehlerbalken) ist aufgrund dieser Art der Auswertung leider nicht möglich.

Wie Abbildung 45 zeigt, liegt tatsächlich eine Verstärkung des Neuritenwachstums um ca. 10% bei Aktivierung mit NGF und gleichzeitiger Behandlung mit Meloplin A im Gegensatz zur DMSO-Kontrolle vor. Ferner kann eine deutlichere Steigerung (ca. 25-35 %) des Neuritenwachstums in mit EGF stimulierten, sowie rein mit Meloplin A

behandelten Zellen beobachtet werden. Weiter fällt auf, dass U0126 das Neuritenwachstum konzentrationsabhängig um bis zu 50 % hemmt, wohingegen kein Effekt auf die Neuritenbildung bei Stimulierung mit EGF zu beobachten ist. Ähnliches Verhalten war aufgrund der vorangegangenen biologischen Tests (3.1.1, 3.1.2) auch für Meloplin A zu erwarten.

Bei einer detaillierten Auswertung, bei der zusätzlich die Zellen mit Neuriten und die Zellen mit langen Neuriten getrennt betrachtet wurden, zeigte sich neben den gegebenen Informationen lediglich, dass kein signifikanter Einfluss auf die Neuritenlänge vorhanden ist. Es fiel lediglich auf, dass den PC12-Zellen durch Meloplin A Behandlung alleine oder in Kombination mit EGF-Stimulierung vor allem kurze Neuriten und kaum lange Neuriten (dreifacher Durchmesser des Zellkörpers) wuchsen.

#### ***3.1.4.5 Reversibilität des Meloplin A-Effekt***

Um beurteilen zu können, ob es sich bei der beobachteten Beeinflussung der Differenzierung wie auch der Proliferation durch Meloplin A in PC12-Zellen um einen spezifischen durch die Substanz bewirkten, sowie um einen reversiblen oder irreversiblen Effekt handelte, wurde ein Auswaschexperiment durchgeführt. Hierbei konnte beobachtet werden, wie der durch Meloplin A bewirkte Effekt, nach dessen Entfernen zurückging und schließlich nach erneuter Behandlung wiederkehrte. Die Wirkung von Meloplin A beruht demzufolge auf einen reversiblen, Substanz-spezifischen Effekt.

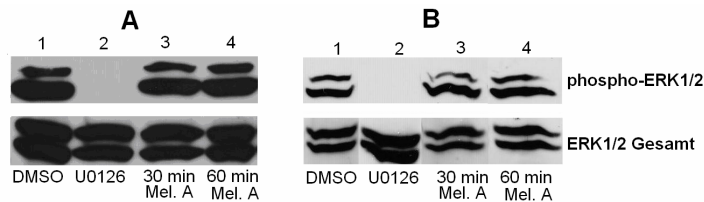
#### **3.1.5 Untersuchungen zur MAPK-Aktivität**

Wie zuvor beschrieben stand vorallem die Beeinflussung des Ras/MAPK-Signalweges durch Substanzen immer wieder im Vordergrund. Ein wichtiges Element dieses Signalweges ist die MAP Kinase ERK. Hier wurde die Aktivität dieser Kinase nach Zugabe von Meloplin A in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dies geschah mit spezifischen Antikörpern, die gezielt nur die aktivierte, phosphorylierte Form der MAPK1/2 detektierten. Zur Kontrolle wurden außerdem MAPK1/2 Gesamtantikörper (erkennen sowohl die aktivierte, als auch nicht-aktivierte Kinase) oder Tubulin-Antikörpern eingesetzt, die als interne Ladekontrolle u.A. für eine spätere quantitative Auswertung dienen.

Zuerst wurden die Westernblots mit chemilumineszentem Nachweis durchgeführt. Im Laufe der Arbeit wurde festgestellt, dass die Verwendung des Odyssey® LICOR-

Systems mit IR-markierten sekundären Antikörpern zur Detektion der phosphorylierten Kinase sensitiver ist und das Ergebnis deutlich besser quantifizierbar ist.

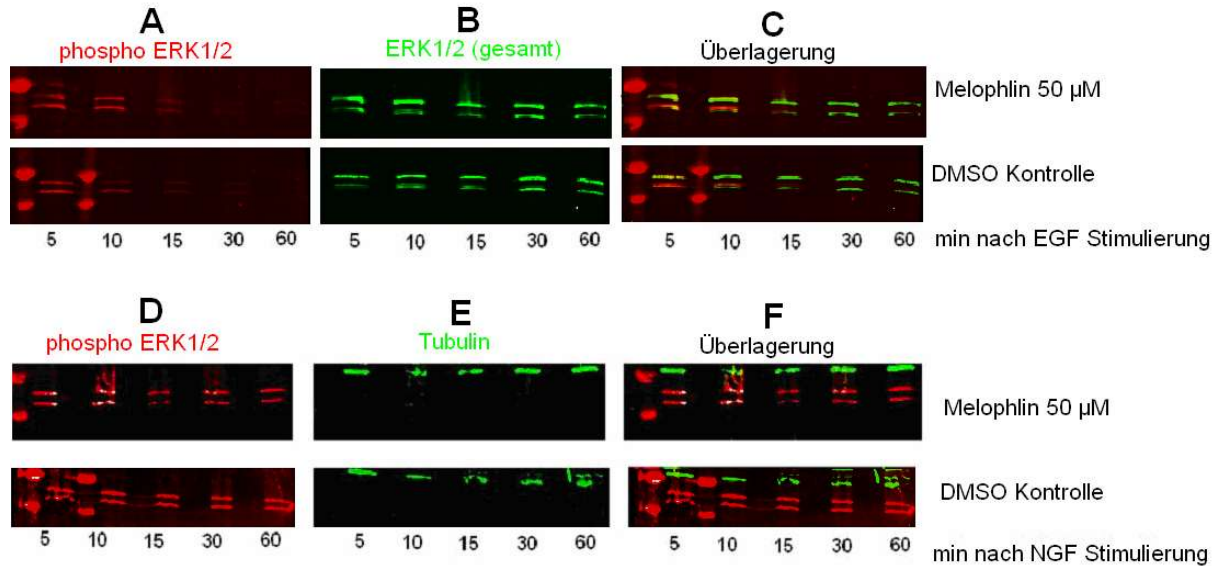
Die im Folgenden aufgeführten Abbildungen der Immunofärbung zeigen jeweils die ERK1/2 Aktivität (sichtbar als phospho-ERK Signal) in den verschiedenen verwendeten Zelllinien nach Zugabe von Meloplin A. Die Behandlung mit dem Naturstoff fand zum einen kurzfristig, zum anderen längerfristig vor der Aktivierung statt, um einen direkten bzw. indirekten Effekt beobachten zu können.



**Abbildung 46: ERK1/2 Aktivität nach kurzfristiger Behandlung mit Meloplin A in MDCK-(A) und HeLa-Zellen (B)**

**A** MDCK-F3-Zellen wurden für 30 min /1 Stunde mit Meloplin A bzw. DMSO bzw. dem MEK Inhibitor U0126 als Kontrolle behandelt. Dann erfolgte die Aktivierung mit Serum und die Zellen wurden lysiert. **B** HeLa-Zellen wurden für 30 min /1 Stunde mit Meloplin A bzw. DMSO bzw. dem MEK Inhibitor U0126 als Kontrolle behandelt. Dann erfolgte die Aktivierung mit EGF und die Zellen wurden lysiert. Anschließend wurden unter **A** und **B** gleiche Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Schließlich erfolgte der immunologische Nachweis des phosphorylierten, aktiven ERK1/2 (42 und 44 kDa Banden) bzw. der insgesamt vorhandenen ERK1/2 über einen sekundären HRP gekoppelten Antikörper; **1**: mit DMSO behandelte Zellen, **2**: mit U0126 behandelte Zellen, **3**: mit Meloplin A behandelte Zellen (30 min), **4**: mit Meloplin A behandelte Zellen (1 Stunde).

Nach einer kurzfristigen Behandlung der MDCK-F3- und HeLa-Zellen mit Meloplin A ist keine direkte Beeinflussung der ERK1/2 Aktivität zu beobachten. Die ERK1/2 Aktivität in mit Meloplin A behandelten Zellen entspricht der ERK1/2 Aktivität, die für DMSO behandelte Zellen ermittelt werden konnte. Dahingegen ist nach Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 ein vollständiger Rückgang der ERK1/2 Phosphorylierung zu erkennen.



**Abbildung 47: Kurzfristige ERK1/2 Aktivierung nach EGF Stimulierung bzw. anhaltende ERK1/2 Aktivierung nach NGF Stimulierung in PC12-Zellen nach Behandlung mit Melophlin A.**

PC12-Zellen wurden für 1 Stunde mit Melophlin A bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Dann erfolgte die Aktivierung mit EGF (**A, B, C**) oder NGF (**D, E, F**) und die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 10, 15, 30 und 60 min) nach der Aktivierung lysiert. Anschließend wurden jeweils gleiche Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Schließlich erfolgte der immunologische Nachweis des phosphorylierten, aktiven ERK1/2 (42 und 44 kDa Banden) bzw. der insgesamt vorhandenen ERK1/2, sowie Tubulin (55 kDa Bande) über einen sekundären IR-markierten Antikörper.

**A und D:** Anfärbung des phosphorylierten ERK1/2 (rot), **B und E:** Tubulinfärbung (grün), **C und F:** Überlagerung der beiden Färbungen. Dargestellt ist im oberen sowie unteren Teil jeweils der Zeitverlauf nach kurzfristiger Melophlin A Behandlung (1 Stunde) im Vergleich zum Zeitverlauf nach DMSO Behandlung (ebenfalls 1 Stunde). In **A, C, D** und **F** sind zusätzlich jeweils die unspezifisch angefärbten Markerbanden bei 50 (obere Bande) und 37 kDa (untere Bande) zu erkennen.

Nach einer kurzfristigen Behandlung der PC12-Zellen mit Melophlin A ist, wie auch bei den MDCK-F3- und Hela-Zellen keine direkte Beeinflussung der ERK1/2 Aktivität zu beobachten. Die ERK1/2 Aktivität in mit Melophlin A behandelten Zellen entspricht der ERK1/2 Aktivität, die für DMSO behandelte Zellen ermittelt werden konnte.

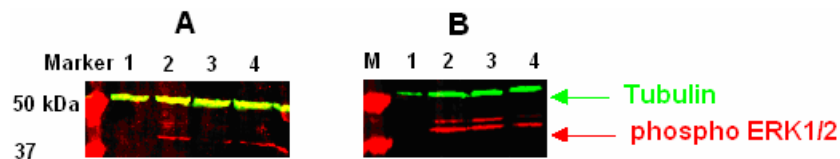
Ferner wurde die in der Literatur beschriebene kurzfristige Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulierung mit EGF (Abbildung 47 A-C) und die anhaltende Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulierung mit NGF (Abbildung 47 D-F) bestätigt. Die

Phosphorylierung der Kinase ist in den mit EGF-aktivierten Zellen bereits nach 15 min nicht mehr detektierbar, wohingegen für die NGF aktivierten Zellen kaum ein Rückgang der Phosphorylierung detektiert werden kann.

Zur Überprüfung eines direkten Effekts, wurde Meloplin A jeweils in der Konzentration verwendet, bei der zuvor ein Effekt in der jeweiligen Zelllinie beobachtet werden konnte. Das phospho-ERK1/2 Signal der Meloplin A Probe wurde jeweils mit dem Signal der DMSO Probe (Positivkontrolle, hier deutliches Signal zu erwarten) und in einem weiteren Experiment (Abbildung 46) zusätzlich mit der U0126-Probe (Negativkontrolle, hier kein bzw. ein abgeschwächtes Signal zu erwarten) verglichen. Zudem wurde das Signal jeweils im Verhältnis zur Ladekontrolle (ERK1/2 gesamt bzw. Tubulin) bewertet, welches gleichmäßig verteilt sein sollte.

Wie die Abbildung 46 und Abbildung 47 jedoch zeigen, hat die kurzfristige Behandlung mit Meloplin A (30 bis 60 min vor der Aktivierung) keinen Effekt auf die ERK1/2 Phosphorylierung und damit keinen Einfluss auf die Aktivität der Kinase.

Im Folgenden sind die Ergebnisse zum Einfluss auf die ERK1/2 Phosphorylierung nach einer längerfristigen Behandlung mit Meloplin A aufgeführt.

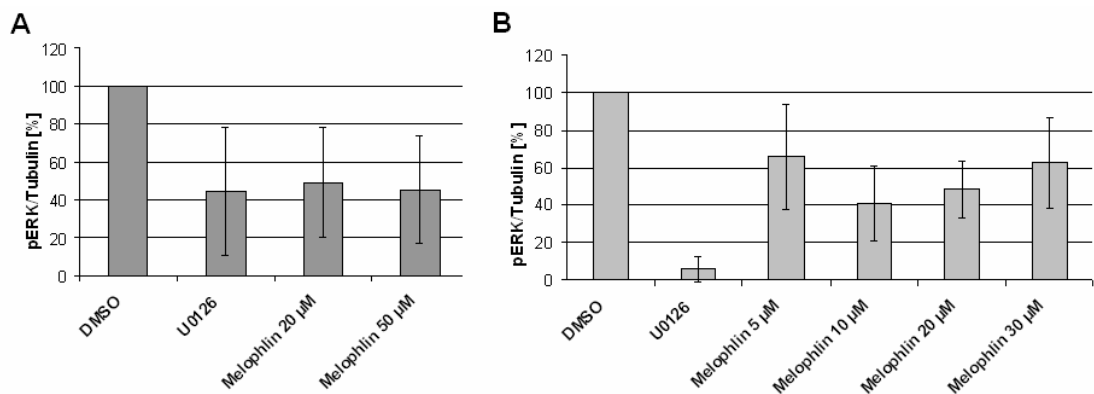


**Abbildung 48: ERK1/2 Aktivität nach längerfristiger Behandlung mit Meloplin A in MDCK- (A) und HeLa-Zellen (B)**

**A** MDCK-F3-Zellen wurden über Nacht (16 bis 18 Stunden) mit Meloplin A bzw. DMSO bzw. dem MEK Inhibitor U0126 als Kontrolle behandelt. Dann erfolgte die Aktivierung mit Serum und die Zellen wurden lysiert. **B** HeLa-Zellen wurden über Nacht (16 bis 18 Stunden) mit Meloplin A bzw. DMSO bzw. dem MEK Inhibitor U0126 als Kontrolle behandelt. Dann erfolgte die Aktivierung mit EGF und die Zellen wurden lysiert. Anschließend wurden unter **A** und **B** gleiche Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Schließlich erfolgte der immunologische Nachweis des phosphorylierten, aktiven ERK1/2 (42 und 44 kDa Banden) bzw. von Tubulin über einen sekundären IR-markierten Antikörper; **1**: mit U0126 behandelte Zellen, **2**: mit DMSO behandelte Zellen, **3**: mit Meloplin A behandelte Zellen (20  $\mu$ M in A, 5  $\mu$ M in B), **4**: mit Meloplin A behandelte Zellen (50  $\mu$ M in A, 30  $\mu$ M in B). In **A** und **B** sind zusätzlich jeweils die unspezifisch angefärbten Markerbanden bei 50 (obere Bande) und 37 kDa (untere Bande) zu erkennen.

Nach einer längerfristigen Behandlung der MDCK-F3- und HeLa-Zellen mit Melophlin A ist eine verspätete und daher eventuell indirekte Beeinflussung der ERK1/2 Aktivität zu beobachten.

Die sehr geringen Unterschiede zwischen den Signalintensitäten und das Hintergrundrauschen auf der Membran ließen jedoch eine zuverlässige, rein visuelle Auswertung der erzeugten Bilddatei nicht zu. Um also das Ausmaß der ERK1/2 Inhibierung in HeLa- und MDCK-F3-Zellen bestimmen zu können, fand in diesen Fällen eine quantitative Auswertung mit dem Programm AIDA statt. Die ermittelten Werte für die jeweiligen Helligkeitsintensitäten wurden in Excel exportiert und mit diesem Programm weiter bearbeitet. Dabei wurden die Signalintensitäten der aktivierten Form im Bezug auf die ERK1/2 (gesamt)- bzw. Tubulin-Ladekontrolle und auf die DMSO-Kontrolle normiert und das Ergebnis graphisch dargestellt (Abbildung 49).

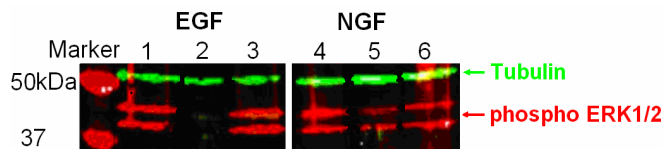


**Abbildung 49: Quantitative Analyse der phospho-ERK1/2 in MDCK-F3- und HeLa-Zellen.**

**A** Lysate von MDCK-F3-Zellen, die mit DMSO, U0126 und Melophlin A behandelt wurden, wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit Antikörpern gegen Tubulin als Ladungskontrolle und phospho-ERK1/2 inkubiert. Die Signalintensität jeder Blotbande wurde bestimmt. Weiterhin wurde jeweils das Verhältnis phospho-ERK- zu Tubulin-Signal der jeweiligen Bande berechnet und gegen die DMSO-Kontrolle (100 %) normalisiert. **B** Lysate von HeLa-Zellen, die mit DMSO, U0126 und Melophlin A behandelt wurden, wurden per SDS aufgetrennt und im Immunoblot mit Antikörpern gegen Tubulin als Ladungskontrolle und phospho-ERK1/2 inkubiert. Die Signalintensität jeder Blotbande wurde bestimmt. Weiterhin wurde jeweils das Verhältnis phospho-ERK- zu Tubulin-Signal der jeweiligen Bande berechnet und gegen die DMSO-Kontrolle (100 %) normalisiert. Behandlung der HeLa-Zellen mit Melophlin A führte zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang der ERK-Phosphorylierung. Die Auswertung erfolgte jeweils in **A** und **B** mit der AIDA Software. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichung von 6 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dar.

Wie Abbildung 49 A zeigt, führt die Behandlung der MDCK-F3-Zellen mit Meloplin A zu einem Rückgang der ERK-Phosphorylierung. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist dabei nicht feststellbar, so bewirken 20 und 50  $\mu\text{M}$  Meloplin A eine in etwa gleich starke Hemmung. Dabei geht die Phosphorylierung von ERK1/2 ging um 50-55 % zurück. Der bekannte MEK-Inhibitor U0126 zeigte im Vergleich dazu bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  eine ähnlich starke Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung um über 50 %.

Wie Abbildung 49 B zeigt, führt die Behandlung der HeLa-Zellen mit Meloplin A zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang der ERK-Phosphorylierung. Eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Meloplin A bewirkte die stärkste Hemmung. Unter diesen Bedingungen ging die Phosphorylierung von ERK1/2 um ca. 60 % zurück. Der bekannte MEK-Inhibitor U0126 zeigte im Vergleich dazu bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  eine Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung um über 95 %. Die Reduktion der Hemmung bei höheren Meloplin A-Konzentrationen kann durch Aggregatbildung von Meloplin A in wässrigem Medium bei höheren Konzentrationen erklärt werden. Versuche dazu wurden von der Dr. Tanja Knoth durchgeführt.



**Abbildung 50.: ERK1/2 Aktivität nach längerfristiger Behandlung mit Meloplin A in PC12-Zellen** PC12-Zellen wurden über Nacht (16 bis 18 Stunden) mit Meloplin A bzw. DMSO bzw. dem MEK Inhibitor U0126 als Kontrolle behandelt. Dann erfolgte die Aktivierung mit EGF (1 bis 3) oder NGF (4 bis 6) und die Zellen wurden lysiert. Anschließend wurden gleiche Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Schließlich erfolgte der immunologische Nachweis des phosphorylierten, aktiven ERK1/2 (42 und 44 kDa Banden) bzw. von Tubulin über einen sekundären IR-markierten Antikörper; 1 und 4: mit DMSO behandelte Zellen, 2 und 5: mit U0126 behandelte Zellen, 3 und 6: mit Meloplin A behandelte Zellen (50  $\mu\text{M}$  ).Die unspezifisch angefärbten Markerbanden bei 50 (obere Bande) und 37 KDa (untere Bande) sind zusätzlich zu erkennen.

Nach einer längerfristigen Behandlung der PC12-Zellen mit Meloplin A ist im Gegensatz zu den mit der Substanz behandelten MDCK-F3- und HeLa-Zellen keine direkte Beeinflussung der ERK1/2 Aktivität zu beobachten. Die ERK1/2 Aktivität in mit Meloplin A behandelten Zellen entspricht der ERK1/2 Aktivität, die für DMSO behandelte Zellen ermittelt werden konnte. Dahingegen ist nach Behandlung der



Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 ein Rückgang der ERK1/2 Phosphorylierung erkennbar.

Auch zur Überprüfung des indirekten Effekts, wurde Meloplin A jeweils in der Konzentration verwendet, bei der es zuvor einen Effekt bei der jeweiligen Zelllinie hervorgerufen hatte. Das phospho-ERK1/2 Signal der Meloplin A Probe wurde wie zuvor jeweils unter Beachtung des Signals der DMSO Probe (Positivkontrolle, hier deutliches Signal zu erwarten), der U0126-Probe (Negativkontrolle, hier kein bzw. ein abgeschwächtes Signal zu erwarten) und der Ladekontrolle (ERK1/2 gesamt bzw. Tubulin) bewertet.

Wie die Ergebnisse zeigen, hat die längerfristige Behandlung mit Meloplin A (über Nacht, bis zur Aktivierung) einen schwach inhibierenden Effekt auf die ERK1/2 Phosphorylierung und damit einhergehend auf die Aktivität der Kinase bei MDCK-F3- und HeLa-Zellen (Abbildung 48), wohingegen kein Effekt bei PC12-Zellen festgestellt werden konnte (Abbildung 50).

### **3.1.6 Einfluss von Meloplin A auf die Genexpression in PC12-Zellen**

Meloplin A hatte in verschiedenen biologischen Assays zu Ergebnissen geführt, die eine Verbindung zum Ras/MAPK-Signalweg vermuten liessen. Allerdings führte die Behandlung von NGF-aktivierten PC12-Zellen zu einem unerwarteten stimulierenden und nicht wie zuvor beobachtet zu einem inhibierenden Effekt auf den Ras/MAPK-Weg. Da ferner die genaue Ursache für das verstärkte Neuritenwachstum mit den beschriebenen zellbiologischen und biochemischen Versuchen (3.1.4, 3.1.5) nicht bestimmt werden konnte, wurde versucht mit Hilfe einer Mikroarray-Analyse diese Diskrepanz aufzuklären.

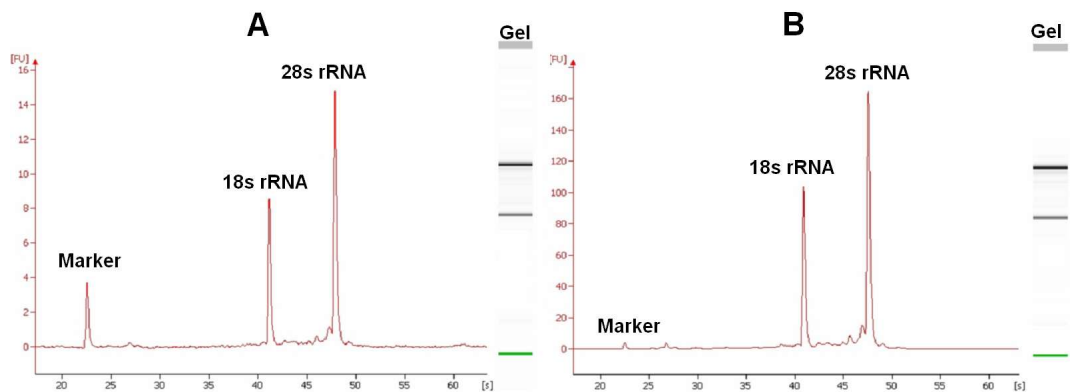
Die Mikroarray-Analyse dient der differentiellen Genexpressionsanalyse und erlaubt die Untersuchung und Vergleich des Expressionsprofils unterschiedlicher Zellen, hier von mit DMSO und mit Meloplin A behandelten und jeweils mit NGF-stimulierten PC12-Zellen.

Eine mögliche Veränderung in der Genexpression von mit Meloplin A behandelten, NGF-stimulierten PC12-Zellen würde demzufolge Rückschlüsse auf mögliche Zielgene -eventuell solche, die in einen Kontext mit dem Ras/MAPK-Weg gebracht werden können- zulassen.

Für die Analysen wurden synchronisierte PC12-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden für eine Stunde mit DMSO (Kontrolle) bzw. Meloplin A (Probe) vorinkubiert

und dann mit NGF stimuliert. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde mit NGF wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und hieraus fluoreszenzmarkierte cRNA für die Mikroarray-Analyse synthetisiert. Die kurzzeitige, einstündige Behandlung mit Melophlin A und NGF sollte dabei Informationen über schnell reagierende Gene liefern.

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit dem Bioanalyzer überprüft. Die RNA wurde in einem Kapillarsystem gelelektrophoretisch getrennt und passierte anschließend eine Optik, welche dann die verschiedenen Untereinheiten der ribosomalen RNA (5S, 18S, 28S) detektierte. Das Ergebnis wird als Elektropherogramm, in welchem die Zeit gegen die gemessene Fluoreszenz (FU *fluorescence units*) aufgetragen ist, ausgegeben. In Abbildung 53 ist das Elektropherogramm für die beiden Proben gezeigt. Neben den dominanten Peaks zwischen 40 und 50 Sekunden, welche die 18S und 28S rRNA darstellen, sind noch zwei kleine Peaks zwischen 20 und 30 Sekunden zu erkennen. Bei dem früheren handelt es sich um einen Marker, bei dem späteren um die 5S rRNA.



**Abbildung 51: Bioanalyzer Ergebnisse für die Qualität der, für die cRNA Markierung verwendeten RNA. A: Kontrolle (DMSO und NGF-Stimulierung,) B: Melophlin A Probe.**

Dargestellt ist die relative Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Elutionsdauer. Rechts ist in jedem Diagramm jeweils ein aus den Daten berechnetes Gel gezeigt; Die Signale des Markers und der 5S, 18S und 28S RNA sind gut zu erkennen (von links nach rechts).

Die RNA war in beiden Fällen intakt und nicht degradiert, da jeweils die einzelnen Unterheiten in den Diagrammen (Abbildung 53) klar identifiziert werden konnten. Dies ist wesentlich für die Akzeptanz einer ausreichenden RNA-Qualität, da neben den dominanten rRNA Signalen keine weiteren signifikanten Signale zu erkennen sind, die ein Hinweis auf einen Abbau der rRNA und damit auch der mRNA hätten sein können. Die mRNA selbst ist bei dieser Analyse methode nicht zu erkennen, da sie

einerseits einen zu geringen Anteil an der Gesamt-RNA darstellt und andererseits aufgrund ihrer sehr variablen Größe nicht in einem Peak fokussiert.

Anhand der Diagramme wurde ferner auch die Konzentration der RNA, das Verhältnis von 18S zu 28S rRNA und der RIN-Faktor (*RNA Integrity Number*) berechnet:

Die RNA Konzentration in der Kontrolle betrug 42 ng/μl, die in der Meloplin A-Probe 550 ng/μl. Der RIN-Faktor entsprach in beiden Fällen 9,9. Das rRNA Verhältnis (Quotient aus der Quantität der 28s rRNA und der 18s rRNA) für die Kontrolle war 1,8 und für Meloplin A 1,4. Dazu sei angemerkt, dass für die für die cRNA Synthese nur RNA Proben eingesetzt sollten, für welche eine RIN von mindestes 9 bis maximal 10 erreicht werden. Das rRNA Verhältnis sollte eigentlich zwischen 1,8 und 2,0 liegen, diese wurde hier nur nahezu erreicht.

Die Synthese der fluoreszenzmarkierten cRNA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Synthese und Reinigung der der fluoreszenzmarkierten cRNA wurde die Konzentration und die Effizienz des Einbaus der Cy3- beziehungsweise Cy5-fluoreszenzmarkierten Nukleotide mit dem NanoDrop bestimmt. Über die Konzentration der RNA und der Fluorophore konnte die Effizienz des Einbaus der Cy3- beziehungsweise Cy5-fluoreszenzmarkierten Nukleotide berechnet werden. Sie lag bei ca. 15 %.

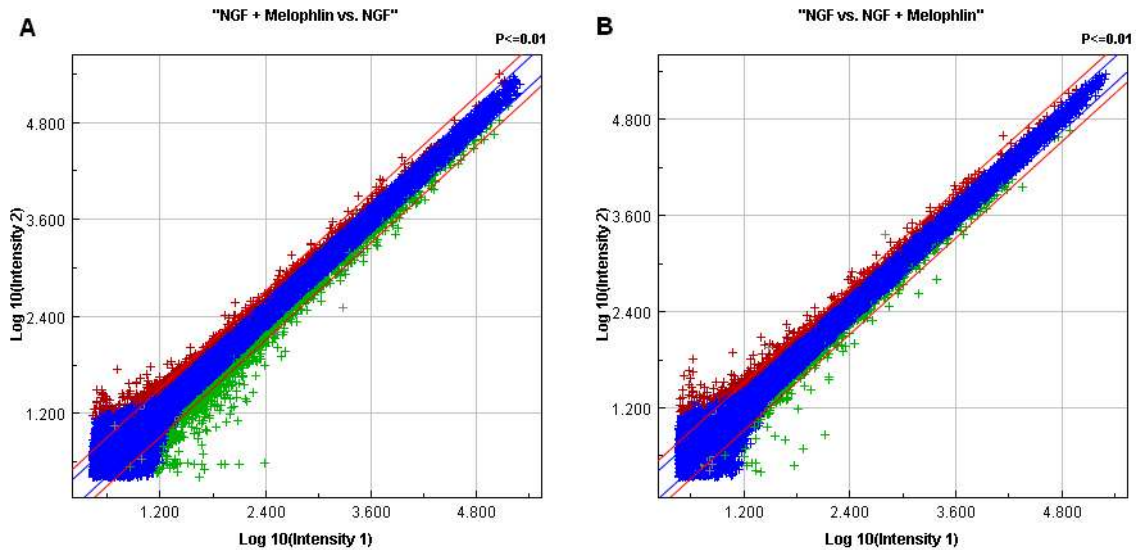
Mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 wurde ein Zwei-Farben-System verwendet. Weil dabei Cy3- und Cy5-markiertes CTP mit unterschiedlichen Raten eingebaut werden, sollte zum Ausgleich der unterschiedlichen Einbauraten ein Farbtasch (color swap) durchgeführt werden. Das heißt, dass die RNA beider Proben sowohl in Cy3-, als auch in Cy5-markierte cRNA umgeschrieben wurde.

Die zuletzt aufgeführten Arbeitsschritte wurden mit und z.T. freundlicherweise von Dr. Robin Vetter (Max Planck Institut, Dortmund) durchgeführt.

Die Mikroarray-Analyse an sich wurde anschließend in Berlin am MPI für Infektionsbiologie bei Dr. Hans-Joachim Mollenkopf durchgeführt. Hier stand neben der technischen Ausstattung auch die Expertise zur Verfügung.

Die fluoreszenzmarkierte cRNA wurde fragmentiert, mit einem Hybridisierungspuffer versetzt und auf dem Array hybridisiert. Nach dem Waschen der Arrays konnten diese gescannt werden. Mit der Software *Feature Extraction* (Agilent Technologies) wurden die Bilder ausgewertet. Die Daten wurden extrahiert und die einzelnen Spots dem Raster der Arrays zugeordnet. Die Fluoreszenzintensitäten des Cy3 und Cy5 eines jeden Spots wurden den in der Arrayliste des Herstellers hinterlegten Nukleotidsequenzen und damit letztlich den korrespondierenden Proteinen zugeordnet. Anschließend wurden die Daten von jedem Array ausgewertet, indem die Cy3 und Cy5 Fluoreszenzintensitäten miteinander verglichen und daraus die

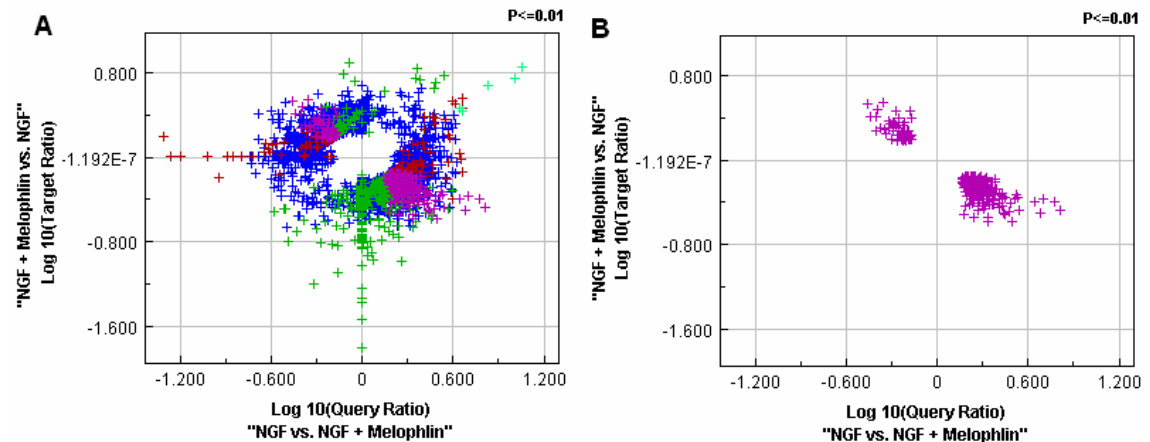
Expressionsunterschiede quantifiziert wurden. Die Daten wurden gefiltert, so dass nur Expressionsveränderungen von mindestens 1,5-fach und antikorrelierte Sequenzen berücksichtigt wurden. Die Resultate eines Arrays wurden mit dem korrespondierenden Array des Farbtasches wie folgt und in Abbildung 52 und Abbildung 53 dargestellt, verrechnet.



**Abbildung 52: Intensitätsplot der Mikroarray-Analysen.** NGF stimulierte mit Meloplin A behandelte Zellen vs. NGF stimulierte mit DMSO behandelte Zellen (**A**) und NGF stimulierte mit DMSO behandelte Zellen Kontrollzellen vs. NGF stimulierte mit Meloplin A behandelte Zellen (**B**). Blaue Kreuze: kein Unterschied in der Expression; rote Kreuze stärker exprimierte Sequenzen; grüne Kreuze schwächer exprimierte Sequenzen.

In der Abbildung 52 A und B sind die Diagramme der miteinander verrechneten Fluoreszenzintensitäten der gescannten Arrays für jede Bedingung gezeigt. In A ist das Expressionsprofil von NGF stimulierten mit Meloplin A behandelten Zellen (Cy3 markiert) mit dem der NGF stimulierten mit DMSO behandelten Zellen (Cy5 markiert) verglichen, in B umgekehrt (NGF stimulierte mit DMSO behandelte Zellen Cy3 markiert und NGF stimulierte mit DMSO behandelte Zellen Cy5 markiert). Ein blaues Kreuz repräsentiert Sequenzen, die in der Cy3 und der Cy5 Färbung gleiche Intensitäten aufwiesen. Rote und grüne Kreuze stehen für Sequenzen, für die eine unterschiedliche Intensität der beiden Fluoreszenzsignale gemessen wurde (rot: stärker exprimiert; grün: geringer exprimiert). Die rote Linie in den Diagrammen entspricht einer 1,5-fachen Veränderung in der Expression. Das bedeutet, je weiter ein Kreuz von dieser Linie entfernt ist, desto größer ist der Unterschied in der Transkriptions- und damit voraussichtlich auch in der Expressionstärke der beteiligten

Trankripte bzw. Proteine. Beim Vergleich der beiden Diagramme ist zu erkennen, dass einmal die Reduktion der Expression (A) und einmal die Erhöhung der Expression (B) leicht überwiegt. Durch die Inkubation mit Meloplin A wurde die Expression einer Vielzahl von Genen induziert. Das heißt, verglichen mit Kontrollzellen (Behandlung mit DMSO) ist die Expression dieser Gene in den Kontrollzellen reduziert (A). Beim Vergleich des Expressionsniveaus von Kontrollzellen mit Meloplin A behandelten Zellen sind diese Gene stärker exprimiert (B).



**Abbildung 53: Vergleich der Mikroarray-Analysen NGF stimulierte mit Meloplin A behandelte Zellen vs. stimuliert mit DMSO behandelte Zellen und umgekehrt.**

**A:** 2594 Sequenzen hatten in beiden Analysen eine Veränderung von mindestens 1,5-fach; blaue Kreuze: kein Unterschied in der Expression; rote Kreuze stärker exprimierte Sequenzen; grüne Kreuze schwächer exprimierte Sequenzen, lila Kreuz antikorrelierende Sequenzen **B:** 308 Sequenzen sind antikorreliert gemessen worden und bilden einen Datensatz

Die anschließende Verrechnung zweier Analysen ergibt einen Datensatz, der die unterschiedlichen Einbauraten von Cy3- und Cy5-CTP berücksichtigt (Abbildung 53). Alle Sequenzen beider Analysen (Abbildung 52 A und B), die in der Expression eine Veränderung von mindestens 1,5 aufgewiesen haben, sind in Abbildung 53 A gezeigt. Es handelt sich dabei um 2594 Sequenzen. Die antikorrelierten Sequenzen, also die, die in beiden Analysen zu gegensätzlichen Ergebnissen geführt haben, sind in der Abbildung 53 B abgebildet. Dabei handelt sich um 308 Sequenzen, anhand derer nun nach einer statistischen Auswertung und Filterung der Daten (siehe oben) ein Einfluss des Meloplin auf das Genexpressionsprofil von PC12-Zellen verzeichnet werden konnte. Die 60 minütige Inkubation mit dem Naturstoff (50 µM) führte nur zu eine

Veränderung in der Expression von 308 Genen, die mindestens 1,5-fach und maximal 3,8-fach bzw. 3-fach geringer im Vergleich mit Kontrollzellen war (Komplette Auflistung in Tabelle im Anhang). In etwa zwei Drittel dieser Sequenzen konnte dabei für die weiteren Analysen und den Abgleich mit bereits veröffentlichten Daten nicht verwendet werden, da sie keinem Gen zugeordnet und als unbekannte Sequenzen (*unknown sequences*) und transkribierte Loci (*transcribed loci*) aufgeführt sind. Für die Sequenzen, zu denen Daten vorhanden waren, gilt, dass ca. drei Viertel eine höhere Expression und ein Viertel eine niedrige Expression zeigen.

Teilt man die differentiell exprimierten Gene mit Hilfe der Daten in der Rat Genome Data Base <sup>[143]</sup> nach ihrer Funktion in verschiedene Gruppen ein, so spielen ein Fünftel eine Rolle bei der Signaltransduktion, ein Zehntel haben einen Einfluss auf das zelluläre Wachstum, die Proliferation oder den Zellzyklus, ein Zehntel kann mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung gebracht werden, ein weiteres Zehntel ist verknüpft mit dem Nervensystems, ein Viertel spielt eine Rolle bei der Ionenbindung und dem Ionentransport z.T. über Kanäle, ein Viertel wirkt sich auf die Transkription, Translation oder das Splicing aus und ein Drittel hat sonstige Funktionen die mit dem Stoffwechsel, dem Immunsystem, zellulärem Transport, Peptidprozessierung usw. zusammenhängen.

Nach dieser funktionalen Einteilung sind in Tabelle 15 gezielt Gene aufgeführt, die im Zusammenhang mit dem beobachteten verstärkten Neuritenwachstum durch die Melophlin A Behandlung eine Rolle spielen könnten.

**Tabelle 15: Potentielle Zielgene von Melophlin A in PC12 Zellen, die eine Rolle für die Verstärkung der Differenzierung spielen könnten** <sup>[143]</sup> (fettgedruckt, die durch die qRT-PCR überprüften)

Name + Kürzel	Relative Änderung	Funktionale Zuordnung	Funktion im Detail
Homer 1 (Homolog)	+3,8	Signaltransduktion	Aktiviert MAPK Signalwege
<b>Dualspezifische Phosphatase 5 (Dusp5)</b>	+1,8	Signaltransduktion	MAP-Kinase spezifische Phosphatase. Inaktiviert MAP-Kinasen (ERK, p38, JNK), die Expression wird durch Homer Aktivierung induziert
<b>Voraussichtlich bei der Ratte: Kopplungsprotein 3 mRNA (Docking protein 3, Dok-3)</b>	+1,6	Signaltransduktion	Adaptorprotein, negative Regulation von ERK unterhalb der Proteintyrosin-Kinasen (PTKs), Dok-3 trennt Grb2 von Shc und inhibiert die Fähigkeit des Grb2-Sos Komplex Ras zu aktivieren

## Ergebnisse

<b>Frizzled Homolog 5 (Fzd5)</b>	-1,7	Signaltransduktion	Bildet einen Rezeptor Komplex mit Lpr6, das Wnt-7A Proteine bindet, Element des G-Protein gekoppelten Signalweg, Wnt-Rezeptor
<b>u-Par-3 Gen, Teile der kompletten Sequenz (uPar3)</b>	+2,7	Signaltransduktion	Rezeptor für den Urokinase-Plasminogen Aktivator
<b>Plasminogen Aktivator, Urikinase Rezeptor (Plaur)</b>	+1,7	Signaltransduktion	Spielt eine Rolle bei der Zellmotilität und -migration
<b>Gen für frühe Wachstumsreaktion 1 (Early Growth Response 1, Egr-1)</b>	+1,6	Signaltransduktion	Transkriptionsaktivator, trägt zur NGF-stimulierten PC12-Zelldifferenzierung bei
<b>Bei der Ratte voraussichtlich ähnlich dem Serum Reaktions Faktor (sim. Srf), mRNA</b>	+1,6	Signaltransduktion	Transkriptionsfaktor, negative Regulation der Zellproliferation und – migration
<b>Regulator der G-Protein Signaltransduktion 4 (Rgs4)</b>	-1,7	Signaltransduktion	Element des G-Protein gekoppelten Rezeptorproteinsignalwegs GTPase Aktivator, reguliert die Signaltransduktion und Calmodulin Bindung negativ
<b>Aktin bindendes, Rho aktivierendes Protein (Abra)</b>	-2,0	Signaltransduktion  Aktin Zytoskelett  Transkription, Splicing, Translation	Transkriptions-Coaktivator, Bindet an Aktin, reguliert die Rho vermittelte Signaltransduktion positiv, spielt eine Rolle beim Proteintransport
<b>β-Catenin Gen, Promotorregion und Exon 1 (β-Catenin)</b>	+2,6	Signaltransduktion  Aktin Zytoskelett  Transkription, Splicing, Translation	Vermittelt die Interaktion zwischen Cadherinen und dem Aktinzytoskelett, Strukturmolekül, Schlüsselprotein im Wnt - Signalweg
<b>Vorraussichtlich bei der Ratte: Rho/Rac Guanin-Austauschfaktor 18 (A18)</b>	+1,9	Signaltransduktion  Aktin Zytoskelett	Regulation der Rho vermittelten Signaltransduktion, Spielt eine Rolle bei der Aktinzytoskelettorganisation und – biogenese

## Ergebnisse

<b>Bcl2 modifizierender Faktor (Bmf)</b>	-1,7	Zellwachstum, Proliferation, Zellzyklus	Positive Regulation der Apoptose
<b>Bcl2 bindende Komponente 3 (Bbc3)</b>	-1,9	Zellwachstum, Proliferation, Zellzyklus	BH3-Domänen Mitglied der Bcl2 verwandten Familie, spielt wahrscheinlich eine Rolle bei ER Stress induzierter Apoptose, reguliert das Zellwachstum negativ
Nocturin Homolog	+1,9 und +1,5	Aktin Zytoskelett	Spielt eine Rolle bei der Aktin Polymerisierung und/oder Depolymerisierung
<b>Voraussichtlich Vinculin (Vcl pred.)</b>	+1,7	Aktin Zytoskelett	Bindet an $\alpha$ -Catenin, spielt eine Rolle in der Zellmotilität
<b>Matrix Metallopeptidase 10 (Mmp 10)</b>	+1,7	Aktin Zytoskelett  Ionenkanäle, Ionenbindung und -transport	Enzym-und Transformationsassoziiertes Protein, bindet an Zink und Calciumionen, aktiviert die Prokollagenase und baut Fibronectin und einige Gelatine ab
Plasma Membran Calcium Isoform 1 Gen	+1,8	Ionenkanäle, Ionenbindung und -transport	ATPase: reguliert den intrazellulären $Ca^{2+}$ Level, bindet an Calmodulin
<b>P11 Gen (P11)</b>	+1,7	Ionenkanäle, Ionenbindung und -transport	Spielt eine Rolle beim neuronalen Wachstum und der Differenzierung, bindet Calciumionen
Gen für frühe Wachstumsreaktion (Early Growth Response 2, Egr-2)	+1,8	Ionenkanäle, Ionenbindung und -transport  Nervensystem	Bindet an Zink und Metallionen  Transkriptionsfaktoraktivität
<b>Interferon-verwandter Entwicklungs-Regulator 1 (Ifrd 1)</b>	+1,8 und +1,7	Nervensystem  Signaltransduktion	Spielt eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems, Expression wird durch NGF induziert
Cyclin L1	+1,9	Transkription, Splicing, Translation	Wird reguliert durch CREB (cAMP response element binding protein); involviert in RNA Prozessierung, z.B. durch alternatives Splicing
Rattenleber Steroid Hydroxylase IIA2 Gen	+2,5 und +2,2	Übrige Funktionen	Spielt eine Rolle bei der Verstoffwechslung von Medikamenten



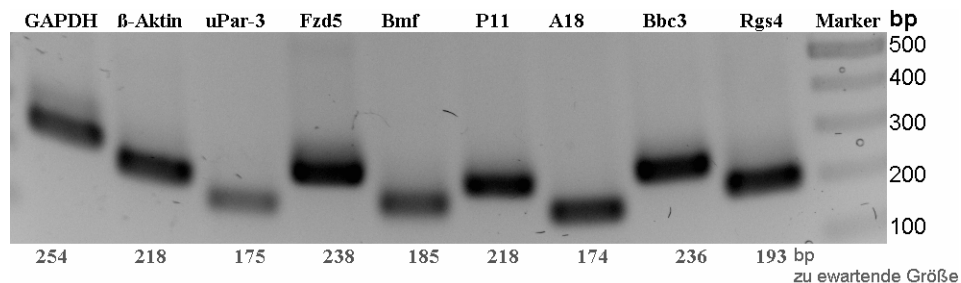
### 3.1.7 Validierung des Mikroarrays

Zur Validierung der Ergebnisse der Mikroarray-Analyse (3.1.6) wurde versucht, die differentielle Expression von 18 ausgewählten Zielgenen (s. Tabelle 15) in einem unabhängigen Experiment zu bestätigen. Dazu wurde eine quantitative RT-PCR anhand von Stichproben durchgeführt.

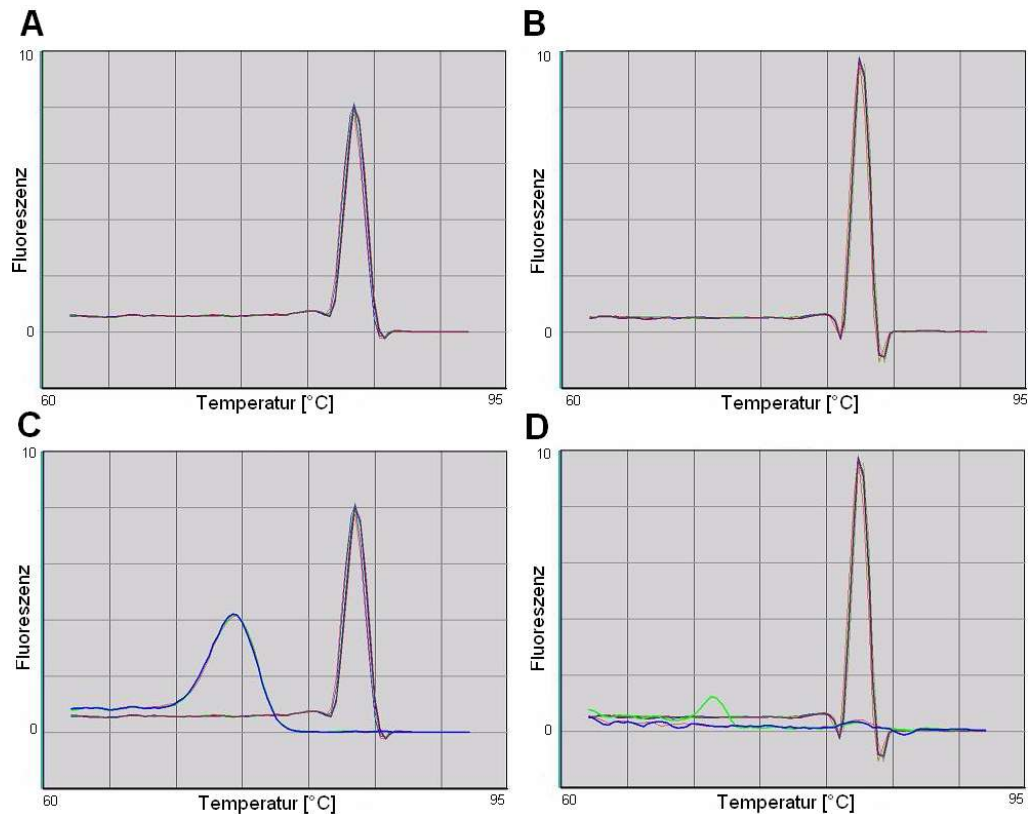
Die quantitative Echtzeit (Real-Time) PCR (qRT-PCR) ermöglicht die Bestimmung der PCR-Produkt-Menge während des (nahezu) gesamten Verlaufs einer PCR. Hierdurch werden Aussagen über die ursprüngliche Ausgangsmenge des amplifizierten Templates möglich. So können die Mengen einer bestimmten mRNA in zwei verschiedenen Proben quantitativ verglichen werden, weshalb die qRT-PCR - so wie hier - häufig für die Expressionsanalyse eingesetzt wird.

Ein Nachteil bei der Verwendung von sequenzspezifischen DNA-bindenden Fluorophoren (hier SYBR Green) ist, dass sie sowohl an das spezifische Produkt als auch an unspezifische Produkte binden. Es war daher nötig bei der erstmaligen Verwendung eines Primerpaares das PCR-Produkt gelelektrophoretisch auf seine korrekte Größe zu überprüfen. Zusätzlich konnte die Produktreinheit nach jeder qRT-PCR durch die Aufnahme einer Schmelzkurve überprüft werden.

Wie beispielhaft in den folgenden Abbildungen für einige, relevante Gene gezeigt, konnte sowohl jeweils die richtige Produktgröße bestätigt werden (Abbildung 54), wie auch jeweils die Produktreinheit im Zuge der Etablierung der qRT-PCR bestätigt und verbessert werden (Abbildung 55).



**Abbildung 54: Ergebnis der Gelelektrophoretischen Analyse der PCR-Produkte zur Größenbestimmung** Durch sequenzspezifische Primer wurden Fragmente der Gene GAPDH, β-Aktin, uPar-3, Fzd5, Bmf, P11, A18, Bbc3, Rgs4 mittels Standard-PCR amplifiziert. Je 10 µl der PCR-Produkte wurden durch ein 2%iges Agarosegel aufgetrennt. Die zusätzliche Auftragung eines DNA-Größenstandard (Marker) ermöglichte die Bestimmung der Größe der Fragmente. An der Unterseite sind die zu erwartenden Größen der PCR-Produkte aufgeführt. Sie entsprechen der experimentell ermittelten Größe (s. Banden).



**Abbildung 55: Nachweis der qRT-PCR-Produktreinheit am Beispiel von  $\beta$ -Aktin, sowie Optimierung im Laufe der Etablierung des qRT-PCR-Verfahrens**

Dargestellt ist jeweils die erste Ableitung der gewonnenen Schmelzkurven in einer inversen (zur besseren Anschaulichkeit in positive Werte umgewandelte) Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur. Die Kurvenmaxima beschreiben die Temperatur, bei der die Abnahme der Fluoreszenz durch das Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA maximal ist. **A** und **B** zeigen die Schmelzkurven der genspezifischen PCR-Produkte; **A** vor der Optimierung **B** nach der Optimierung. Die aufgenommenen Schmelzkurven unter **C** und **D** zeigen die Schmelzkurven der genspezifischen PCR-Produkte und der Negativkontrolle; **C** vor der Optimierung **D** nach der Optimierung. Die Schmelzkurven der Negativkontrollen zeigen jeweils ein Signal bei ca. 70°C, wohingegen die Schmelzkurven der genspezifischen  $\beta$ -Aktin-PCR-Produkte jeweils ein Signal bei 80 bis 85°C liefern. Somit ist eine klare Unterscheidung zwischen der Schmelztemperatur des Amplikons und eventuell auftretenden Primerdimeren möglich. Idealerweise bilden sich insgesamt nur wenige Primerdimere (siehe Verringerung des Signals unter **D**).

Während einer PCR findet ein exponentieller und quantifizierbarer Anstieg der Produktmenge statt. Zur Auswertung der Daten stehen unterschiedliche mathematische Methoden zur Verfügung, ein Vergleich dieser ist in einer Veröffentlichung von Pfaffl *et al.* zu finden. <sup>[122]</sup> Hier wurde zunächst die  $\Delta\Delta CT$

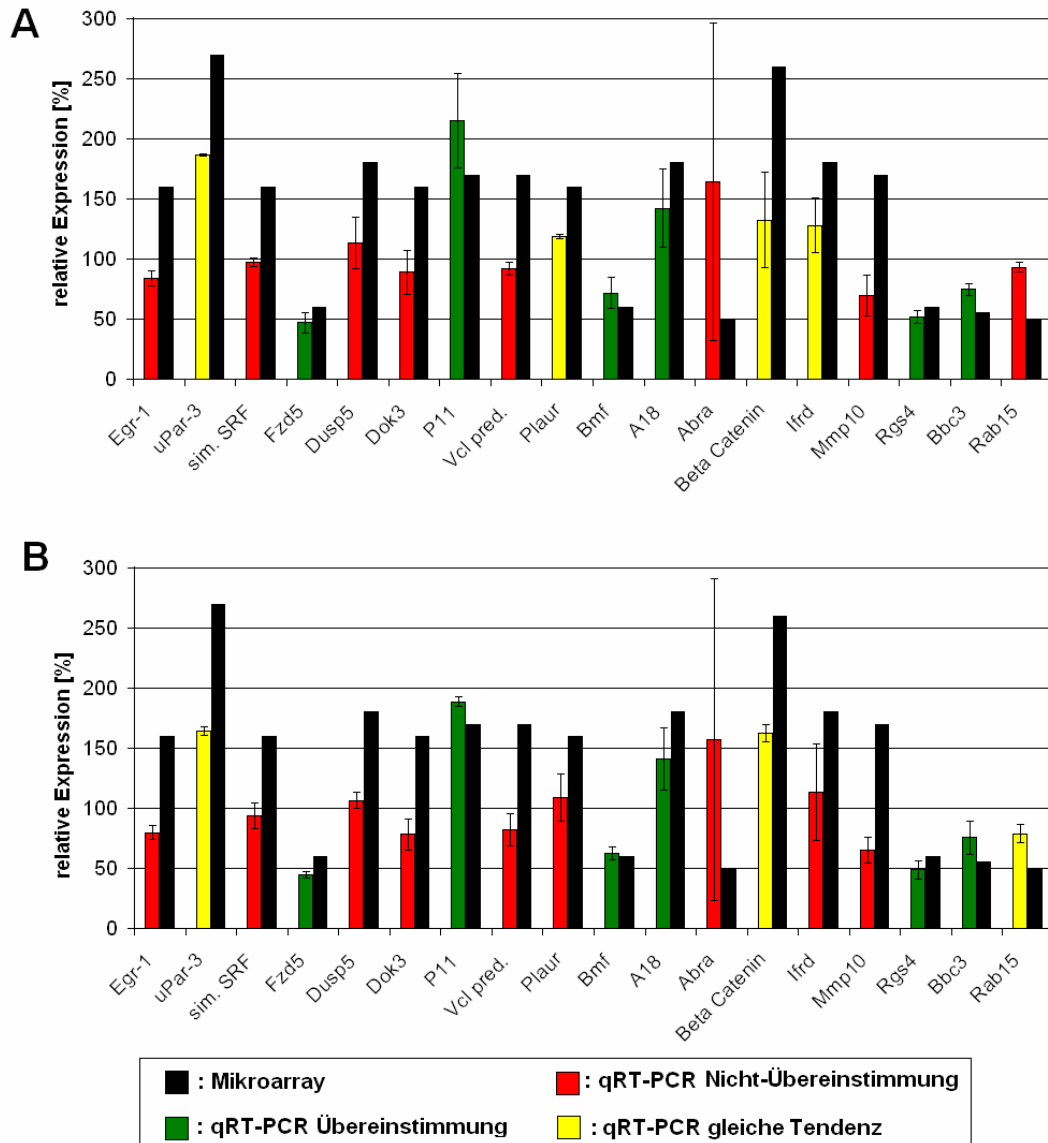
Methode verwendet. Allerdings werden in dieser Formel optimale Amplifikationsbedingungen vorausgesetzt (Verdopplung der Produktmenge bei jedem PCR-Zyklus, 2 als Basis für die Berechnung, Abbildung 31), die in der Realität nicht immer gegeben sind. Somit muss die Gleichung um die reale Amplifikationseffizienz korrigiert werden. Die Amplifikationseffizienz ist vom verwendeten Primerpaar und von den PCR-Bedingungen abhängig und wird z.T. auch als Primereffizienz bezeichnet. Sie wurde hier nach der Messung mit der LinRegSoftware bestimmt.

**Tabelle 16: Auflistung der ermittelten PCR Effizienzen für die verwendeten Primerpaare.**

<b>Primerkürzel</b>	<b>Ermittelte PCR-Effizienz</b>
GAPDH	2,0
β-Aktin	2,0
P11	1,7
Vcl pred	1,8
Plaur	1,7
Bmf	1,7
Egr-1	2,0
uPar-3	1,7
sim. SRF	1,8
Fzd5	1,8
Dusp5	1,8
Dok-3	1,8
A18	1,7
Abra	1,7
B-Catenin	1,7
Bbc3	1,7
Ifrd	1,9
Mmp10	1,7
Rab15	1,7
Rgs4	1,9

Bei den hier vorgestellten Experimenten wurden entsprechend nur Primerpaare, deren PCR Effizienz größer oder gleich 1,7 war (entsprechend einer mindestens ca. 70%igen PCR-Effizienz), verwendet. Primerpaare die diese PCR-Effizienz nicht erreichten, wurde durch andere ersetzt.

## Ergebnisse



**Abbildung 56: Expressionsanalyse für 18 ausgewählte Gene.** Im Balkendiagramm wird die relative Expression, die durch mindestens sechs unabhängige qRT-PCR-Experimente festgestellt wurde (farbige Balken), mit der beim Mikroarray-Analyse ermittelten relativen Expression (schwarze Balken) verglichen. Im Abbildungsteil **A** diente GAPDH als Referenzgen für die qRT-PCR, im Abbildungsteil **B**  $\beta$ -Aktin.

Wie Abbildung 56 zeigt kann die Expressionsanalyse durch einen einmaligen Mikroarray nur einen ersten Hinweis über potentielle Zielgene geben. Somit ist die Überprüfung des Ergebnisses z.B. durch die quantitative RT-PCR unbedingt erforderlich. Vergleicht man die mit beiden Methoden ermittelten Expressionsdaten, stellt man fest, dass die Daten zu 50 % nicht übereinstimmen (siehe die Gene Egr-1, sim. SRF, Dusp5, Dok-3, Vcl pred., Plaur, Abra, Ifrd und Mmp10). Für die andere Hälfte der Daten gilt, dass die ermittelten Expressionsraten mehr oder weniger genau

übereinstimmen (so für die Gene uPar-3,  $\beta$ -Catenin, Rab15 mit tendenziell ähnlicher Expressionsrate bzw. für die Gene Fzd5, P11, A18, Bmf, Bbc3, Rgs4 für die in beiden Experimenten in etwa die gleiche relative Expression ermittelt werden konnte).

Der Rho/Rac Guanin Austauschfaktor (A18) und das P11 Gen (P11) werden also in mit Meloplin A behandelten NGF-stimulierten PC12-Zellen stärker exprimiert, wohingegen der Regulator der G-Protein Signaltransduktion 4 (Rgs4), der Bcl2 modifizierende Faktor (Bmf), die Bcl-2 bindende Komponente 3 (Bbc3) und Frizzled 5 (Fzd5) schwächer exprimiert werden.

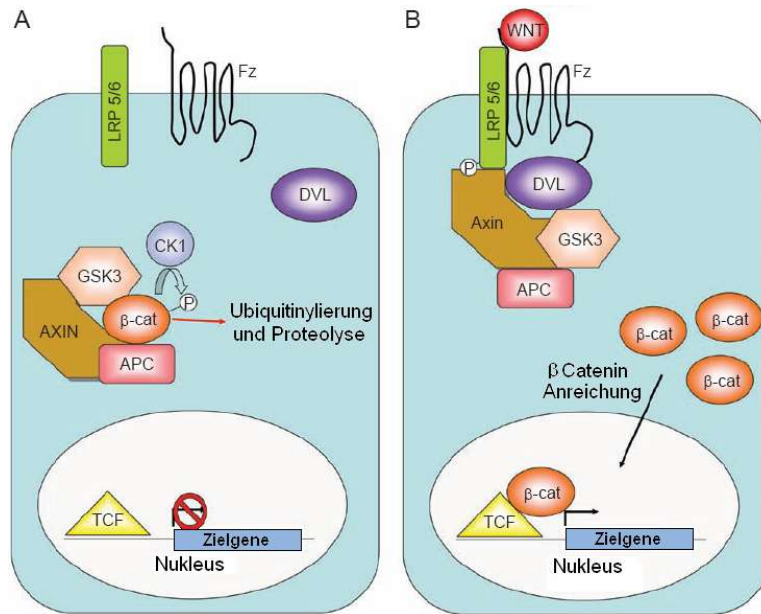
### **3.1.8 Effekt von Meloplin A auf den Wnt-Signalweg**

#### ***3.1.8.1 Wnt Reportergen-Assay mit transient transfizierten HEK293-Zellen***

Da einige Gene, die für Komponenten des Wnt-Signalwegs kodieren, durch Meloplin A reguliert werden, wurde der Einfluss von Substanzen auf den kanonischen Wnt-Signalweg (Abbildung 57) untersucht. Hiefür wurde ein Wnt-Reportergen-Assay mit transient transfizierten HEK293-Zellen verwendet.

Wnt-Proteine können neben dem kanonischen oder Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg auch zwei weitere Signalwege aktivieren, nämlich den Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ - und den Wnt/planaren Zellpolarität-Signalweg. Auf Letztere, sowie ihre Funktionen soll allerdings an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

Der im Folgenden näher untersuchte Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg reguliert die Zellproliferation und -differenzierung, spielt eine wichtige Rolle bei embryonaler Entwicklung und ist in adulten Organismen bei einer Fehlregulation des Signalwegs mit der Tumorentstehung in verschiedenen Organen verbunden.



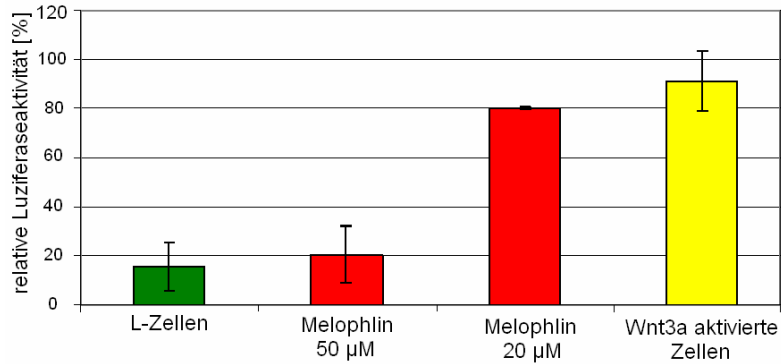
**Abbildung 57: Überblick über den kanonischen Wnt-β-Catenin Signalweg** (Lai, Chien, R. Moon, 2009) <sup>[144]</sup> **A** In Abwesenheit von Wnt wird β-Catenin (β-cat) zum Abbaukomplex bestehend aus APC (Adenomatöse Polyposis Coli) und Axin rekrutiert und durch die Casein Kinase 1 (CK1) und die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert. Dies führt schließlich zu einer Ubiquitinierung und der Proteolyse von β-Catenin. **B** Bindet Wnt an Frizzled (Fz) und LDL Rezeptor abhängige Proteine 5/6 (LRP5/6), rekrutiert aktives Dishevelled (DVL) den Abbaukomplex an die Plasmamembran und bewahrt β-Catenin so vor seinem Abbau. Akkumuliertes, zytosolisches β-Catenin transloziert schließlich in den Kern (Nucleus), wo durch die Anwesenheit von β-Catenin Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (engl. TCF: T-Cell Factor, LEF: Lymphoid Enhancer Factor) in den Promotorbereichen der Wnt-Zielgene binden, so dass diese abgelesen werden.

Die HEK293-Zellen wurden mit dem Topflash-Vektor, der durch die Bindung des Transkriptionsfaktors TCF die Expression eines Luziferase-Reportergens steuern kann, transfiziert. Dies ermöglichte wie bereits unter 2.2.1.4 beschrieben die Bestimmung der Aktivität des Signalwegs über die Messung der Lumineszenz.

Da es sich hierbei um einen Assay mit transient transfizierten Zellen handelt, wurde ferner ein weiteres Reporterplasmid (pEQ176) kotransfiziert, in welchem das β-Galactosidase-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors steht. Die β-Galactosidase-Aktivität diente als interner Standard bzw. ermöglichte die Ermittlung der Transfektionseffizienz.

Wie Abbildung 58 zeigt, inhibiert Melophlin A bei einer Konzentration von 50 μM den kanonischen Wnt-Signalweg in HEK293-Zellen um ca. 70 %. Gleichzeitig wirkte Melophlin A bei denselben Konzentrationen d.h. ab ca. 50 μM zytotoxisch (2.2.1.6, Vitalität der Zellen bei Zugabe von 10 μM Melophlin A 97 %, Vitalität der Zellen bei

Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Melophlin A 65 %), so dass es wahrscheinlicher ist, dass sich die inhibierende Wirkung sich auf die Toxizität nicht aber auf eine Hemmung des Signalweges bezieht.



**Abbildung 58: Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Melophlin A (rote Balken) in HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden mit dem Topflash-Konstrukt transfiziert, mit Melophlin A bzw. DMSO und mit L- bzw. Wnt-3a-Zellmedium behandelt. Gezeigt ist die relative Luziferaseaktivität in mit Melophlin A behandelten, Wnt-3a aktivierten HEK293-Zellen. Sie wurde normiert auf die Aktivität der Wnt-3a-aktivierten, mit DMSO behandelten HEK293-Zellen (gelber Balken), als Negativkontrolle wurden die Zellen mit L-Zellmedium und DMSO behandelt (grüner Balken).

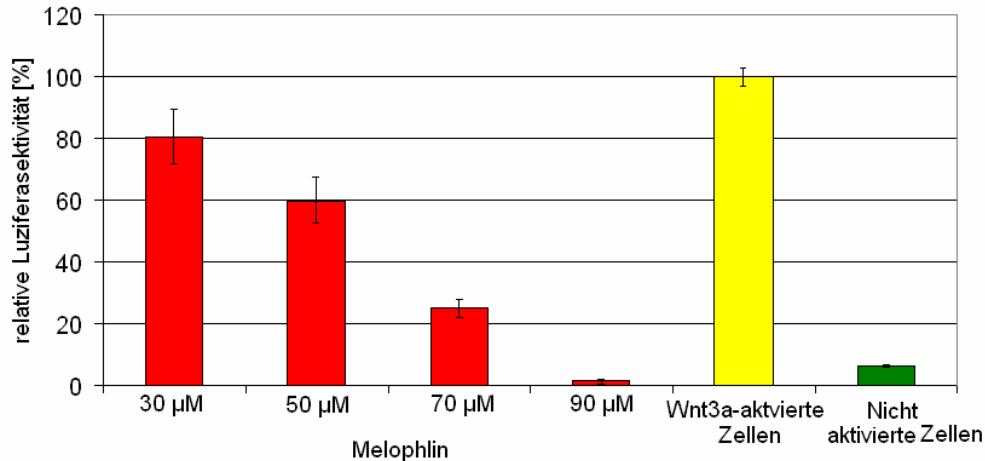
### **3.1.8.2 Wnt-Reportergen-Assay mit stabil transfizierten HEK293-Zellen**

Zur Überprüfung des Ergebnisses, welches mit den transient transfizierten HEK293-Zellen erhalten werden konnte, wurde der Wnt Reportergen-Assay zusätzlich mit stabil transfizierten HEK293-Zellen von Diplom Biochemiker Bernhard Ellinger durchgeführt.

Bei der hier verwendeten Zelllinie handelt es sich um HEK293-Zellen die zwei stabil in das Genom integrierte Transgene tragen. Zum einen besitzen diese Zellen ein Luziferase Reportergen unter der Kontrolle eines Promotors, der auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs reagiert. Zum anderen überexprimieren diese Zellen den humanen Wnt-3a Rezeptor Frizzled-1 und reagieren deshalb mit einer sehr hohen Aktivität des Wnt-Signalwegs auf Wnt-3a angereichertes Medium.

Wie Abbildung 59 zeigt, inhibiert Melophlin A ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  den kanonischen Wnt-Signalweg in den stabil transfizierten HEK293-Reportergen-Zellen. Gleichzeitig wirkte Melophlin A hier erst ab einer Konzentrationen von 70  $\mu\text{M}$  zytotoxisch, so dass die inhibierende Wirkung hier im Gegensatz zu dem Verfahren

mit den transient transfizierten HEK293-Zellen tatsächlich Resultat einer Hemmung des Signalweges sein kann. Die Hemmwirkung ist allerdings in Anbetracht der vergleichsweise hohen Meloplin A-Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$ ) eher gering.



**Abbildung 59: Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Meloplin A in stabil transfizierten HEK293-Zellen (rote Balken)** Gezeigt ist die relative Luziferaseaktivität nach Wnt-3a-Aktivierung und Behandlung der HEK293-Zellen mit ansteigender Meloplin A Konzentration. Sie wurde normiert gegen Wnt-3a-aktivierte, mit DMSO behandelte HEK293-Zellen (gelber Balken), als Negativkontrolle wurden die Zellen mit L-Zellmedium und DMSO behandelt (grüner Balken).

Ob und welcher Zusammenhang zwischen der schwächeren Fzd5 Expression in Meloplin A behandelten NGF-stimulierten PC12-Zellen mit der schwächeren Reporterogenaktivität in HEK293 besteht, ist schwer zu sagen. Man kann aber in beiden Systemen einen Effekt auf den Wnt-Signalweg feststellen.

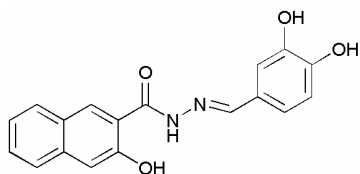
### 3.1.9 Biologische Wirkung von Meloplin A im Vergleich zu Dynasore

Nach der Affinitätsaufreinigung durch Dr. Tanja Knoth, ihrem Auffinden und ihrer Bestätigung von Dynamin 2 als Bindungspartner von Meloplin A bei HeLa-Zellen, wurde die biologische Wirkung von Meloplin A mit der von Dynasore (Abbildung 60) verglichen.

Dynasore ist ein bekannter Dynamin Inhibitor, für den unter anderem die Hemmung der Endozytose beschrieben ist.<sup>[145]</sup> Um die Wirkung von Dynasore auf den Ras-

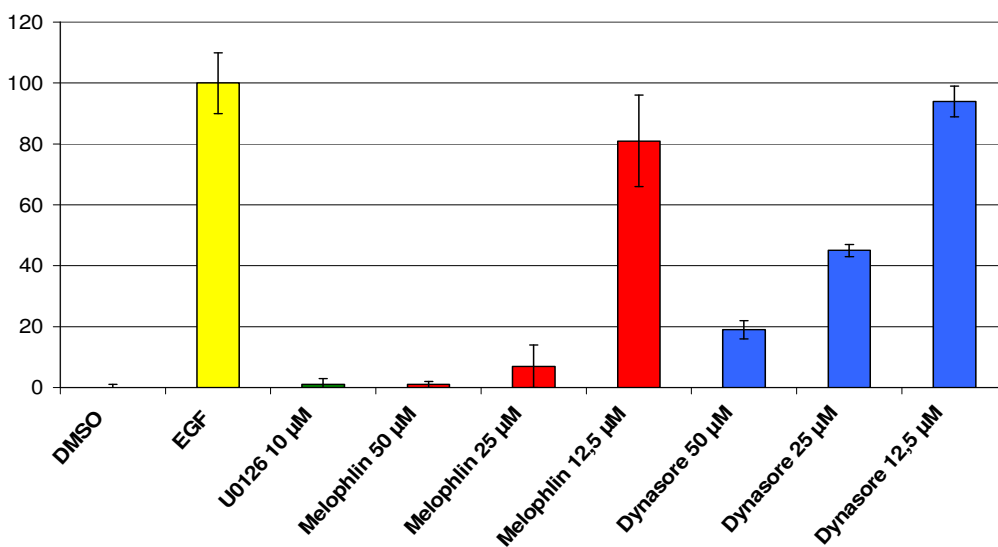


Signalweg mit der von Meloplin A vergleichen zu können, wurde der Reporteragen-Assay in stabil transfizierten HeLa-Zellen sowie ERK-Westernblots eingesetzt.



**Abbildung 60: Struktur des Dynamin-Inhibitors Dynasore**

Dynasore weist mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $24,8 \mu\text{M}$  eine ähnliche Wirkung im Ras/MAPK spezifischen Reporteragen-Assay auf wie Meloplin A ( $IC_{50} = 18,2 \mu\text{M}$ ). Dynasore erwies sich außerdem bei den gemessenen Konzentrationen als nicht toxisch.



**Abbildung 61: Konzentrationsabhängige Inhibierung des Ras/MAPK-Signalwegs durch Meloplin A und Dynasore.** Gezeigt ist die relative Luziferaseaktivität normiert gegen EGF-aktivierte, mit DMSO behandelte HLR-Zellen, als Negativkontrolle wurden die Zellen nicht aktiviert und mit DMSO behandelt oder nach der Aktivierung mit dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt.

Bezüglich des Effektes auf die ERK1/2 Aktivität nach Behandlung der Zellen mit Dynasore konnte trotz mehrfacher Wiederholung (sechs unabhängige Versuche) leider kein eindeutiges Westernblot-Ergebnis erzielt werden. Dies lässt sich

wahrscheinlich dadurch erklären, dass Dynasore unter den gegebenen Bedingungen äußerst instabil ist. Die Versuche in diese Richtung wurden daraufhin abgebrochen.

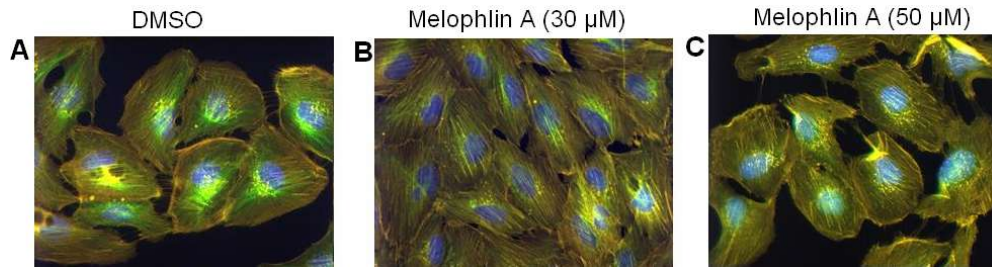
### **3.1.10 Untersuchungen zur morphologischen Veränderungen des BSC-1-Zytoskelett**

In der Chemischen Genetik werden die Funktionen und Wechselwirkungen der Proteine mittels niedermolekularer Substanzen untersucht, die als Modulatoren komplexer biochemischer Mechanismen der Zelle und dynamischer Zellprozesse fungieren können (1.1).

Das Zytoskelett der eukaryotischen Zelle, welches aus den Intermediärfilamenten, den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten zusammengesetzt ist, ist neben seiner Hauptaufgabe der Formerhaltung der Zelle auch an der Motilität und intrazellulären Transportprozessen, sowie an der Zellteilung beteiligt. Diese vielfältigen Funktionen machen es zu einem interessanten Ziel u.A. für die Krebstherapie, indem man z.B. nach Substanzen sucht, die die Zellteilung der Krebszellen inhibieren oder deren Motilität und damit das Streuen von Tumoren vermeiden.

Da Melophlin A bereits im MDCK-F3-Assay einen Effekt auf die Zellmorphologie gezeigt hatte, sollte die Wirkung der Substanz auch bezüglich eines möglichen morphologischen Effekts in BSC-1-Zellen, bei denen die einzelnen Komponenten des Zytoskeletts gut zu erkennen sind, mit einem im Haus entwickelten Testverfahren (Dr. Sascha Menninger) überprüft werden.

Wie Abbildung 62 allerdings zeigt, konnten nach Behandlung mit Melophlin A (30 und 50  $\mu$ M) keine phänotypischen Auffälligkeiten im Gegensatz zu den mit DMSO behandelten BSC-1-Zellen (Kontrolle) festgestellt werden. Das Zytoskelett ist gut strukturiert und die Zellkerne sind regelmäßig geformt.



**Abbildung 62: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von BSC-1-Zellen, die mit DMSO und mit Meloplin A wurden.** BSC-1-Zellen wurden über Nacht mit (A) und Meloplin A (B und C) inkubiert, anschließend fixiert und gefärbt. Die DNA ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt (blau). Die Färbung der Aktinfilamente fand mit TRITC markiertem Phalloidin (rot) statt. Das Tubulinzytoskelett wurde mit Hilfe eines FITC markierten Antikörpers gegen  $\alpha$ -Tubulin sichtbar gemacht (grün). Die Abbildung zeigt eine Überlagerung der Fluoreszenzbilder der DNA-, Aktin- und Tubulinfärbung. (DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol; TRITC: Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat; FITC: Fluorescein-Isothiocyanat)

### 3.1.11 Hefe basierte chemische Genomik

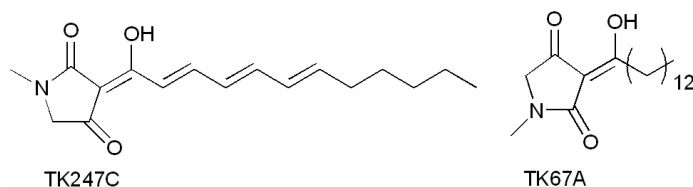
(Kooperation mit AG Prof. Dr. S. L. Schreiber, Broad Institute of Harvard and MIT, Boston)

Um den Wirkmechanismus spezifischer Substanzen wie z.B. der Tetramsäurebibliothek aufzudecken, sollte ein chemisch genetisches Testverfahren in Hefen <sup>[109]</sup> vor Ort in Boston erlernt und dann in der Arbeitsgruppe in Dortmund etabliert werden.

Interessant erschien vor allem, dass mit diesem Verfahren ein Profil von Sensitivitäten/Resistenzen von 104 definierten, diploiden F1 Nachkommen gegenüber den getesteten Substanzen erstellt werden kann. Dieses Profil kann dann mit Profilen von Substanzen, deren Wirkmechanismus bekannt ist, verglichen werden, um gegebenenfalls Ähnlichkeiten zwischen diesen chemisch-genetischen Profilen festzustellen.

Das Testverfahren lieferte also eine Möglichkeit den Wirkmechanismus einer noch unerforschten bzw. neuen Substanz zu untersuchen (vergleiche Abbildung 38).

Die in der Abbildung 63 gezeigten Tetramsäuren, führten hierbei in den ersten Tests, dem sogenannten `bioactivity profiling`, zu einer Wachstumsverzögerung oder – hemmung bei den Hefe-Elternstämmen. Damit erschienen sie zunächst als aussichtsreiche Kandidaten für die weitere Profilierung.



**Abbildung 63: Struktur TK247C und B TK67A**

Weitere Tests und die Etablierung des Assays sollten im Institut in Dortmund erfolgen. Unerwarteter Weise bereitete hier bereits die Kultivierung der Hefen Probleme, was möglicherweise in der deutlich verschiedenen gerätetechnischen Ausstattung der Labore begründet liegt. Die Sensibilität des Assays gegenüber Veränderungen (z.B. Klimaanlageinstellungen) war jedoch bereits in der AG in Boston bekannt, die eigentlichen Ursachen konnten jedoch nicht gefunden werden. Aufgrund dieser und anderer Schwierigkeiten bei der Etablierung des Testverfahrens, die mit einem angemessenen Zeit- und Arbeitsaufwand nicht zu beheben waren, konnte das Projekt daher leider nicht fortgeführt werden.

### ***3.2 Der rückwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz, die Suche nach spezifischen Phosphataseinhibitoren***

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der rückwärtsgerichtete chemisch-genetische Ansatz für die Suche nach spezifischen Phosphataseinhibitoren innerhalb der Naturstoffklasse der Spirooxindole genutzt.

Über Phosphorylierungen werden wichtige Zellprozesse reguliert. Sie stehen ferner in Zusammenhang mit einigen ernsten Erkrankungen wie beispielsweise Krebs oder Diabetes. Neue Inhibitoren der Phosphatasen sind somit als potentielle Therapeutika von großem Interesse.

Substanzen aus der Naturstoffklasse der Spirooxindole mit einem vielfältigen biologischen Aktivitätsspektrum wurden im Rahmen eines Screenings innerhalb der eigenen AG als Inhibitoren der mykobakteriellen Phosphatase MPTPB identifiziert. Da MPTPB einen möglichen Angriffspunkt für die Tuberkulosetherapie darstellt und sich die aktiven Substanzen zudem als spezifisch für diese Phosphatase herausstellten, wurden ausgehend von der Spiro-fusionierten-Indol-2-on-Thiazolidinon-Struktur verschiedene, von Dr. Viktor Vintonyak synthetisierte Analoga bezüglich ihrer potentiellen inhibitorischen Wirkung auf MPTPB und 6 ausgewählte Phosphatasen (MPTPA, PTP1B, VHR, SHP-2, h-PTP  $\beta$  bzw. PTPN2) getestet. Die dabei erhaltenen Daten, die zur Struktur-Wirkungs-Analyse genutzt werden konnten, sowie die

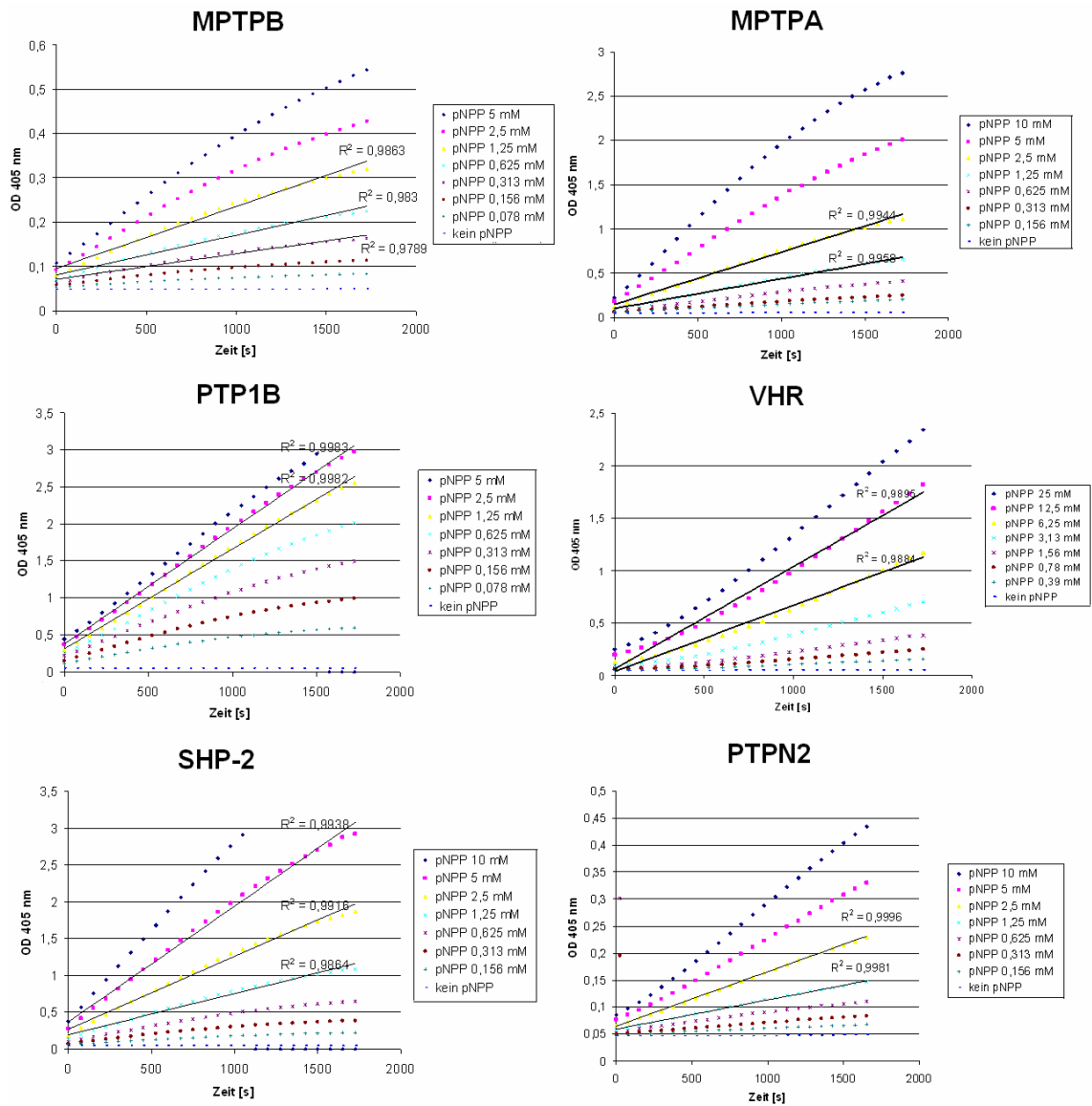
Aufklärung der Wirkmechanismen ausgewählter Inhibitoren mit Hilfe von Steady-State-Kinetiken, werden im Folgenden dargestellt.

### **3.2.1 Messprinzip und Bestimmung kinetischer Parameter**

Zur Messung der Enzymaktivität von Phosphatasen wurden verschiedene Substrate und Testsysteme beschrieben (s. 2.2.4.1). Hier wurde das kolorimetrische Verfahren mit *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat verwendet. <sup>[124,125]</sup>

#### ***3.2.1.1 Bestimmung der in vitro Phosphatase Aktivität***

Um die Aktivität der einzelnen Phosphatasen zu überprüfen und um die Detektierbarkeit der Dephosphorylierung zu gewährleisten, wurde zunächst die nötige bzw. optimale Enzymkonzentration bestimmt.



**Abbildung 64: Ermittlung der geeigneten Enzymkonzentration für MPTPB; MPTPA, PTP1B, VHR, SHP-2 und PTPN2** Die Umsetzung unterschiedlicher Substratmengen durch die verschiedenen Phosphatasen bei unterschiedlichen Enzymverdünnungen konnte durch die damit verbundene Absorptionsänderung bei 405 nm verfolgt werden. In der Abbildung wurde die Absorptionsänderung gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Ein linearer Anstieg der Messwerte deutet auf geeignete Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Enzym- und Substratkonzentrationen hin.

Entsprechend der Experimente (Abbildung 64) erwiesen sich die folgenden Enzymkonzentrationen als ideal: MPTPB: 1,6 µg/ml, MPTPA: 5 µg/ml, PTP1B: 1,6 µg/ml, VHR: 15,6 µg/ml, SHP-2: 10 µg/ml und: PTPN2: 0,7 µg/ml. Die optimale Enzymkonzentration von 0,13 µg/ml für die h-PTP β wurde von Beate Schölermann (MPI Dortmund) ermittelt und hier übernommen.

Zusätzlich zur ermittelten, geeigneten Enzymkonzentration für die Detektierbarkeit galt es, darauf zu achten, dass die Enzymkonzentration in jedem Fall deutlich geringer als die Substrat- bzw. Inhibitorkonzentration war. Das Substrat und der Inhibitor müssen im Überschuss (mind. zehnfach) vorliegen, damit die Bedingungen bzw. das richtige Gleichgewicht für die späteren kinetischen Berechnungen und Verfahren gegeben sind.

### **3.2.1.2 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten $K_M$**

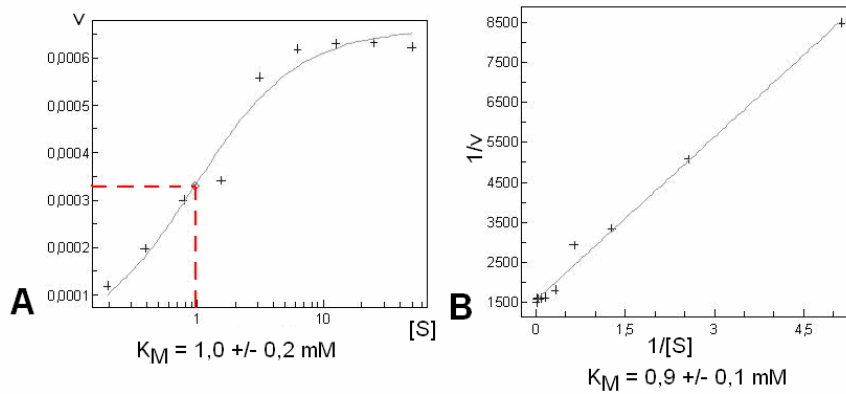
Für den Ablauf einer Enzymreaktion spielt neben der Aktivität des Enzyms auch die Affinität des Substrates (S) zum Enzym (E) eine entscheidende Rolle. Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes [ES].

Ist die Substratkonzentration gleich dem  $K_M$ -Wert, so liegt die Hälfte des Enzyms im [ES]-Komplex vor, die andere Hälfte ist frei ([E]). Diese Bedingung sollte bei der Messung mit Substanzen bzw. potentiellen Inhibitoren genau gegeben sein, um einerseits ein detektierbares Signal zu bekommen und andererseits die Bindung des Inhibitors an das Enzym zu ermöglichen.

Die Michaelis-Menten Konstanten ( $K_M$ ) für die verschiedenen, verwendeten Phosphatasen wurden jeweils in einem kontinuierlichen Verfahren bestimmt: Hierfür wurden die konzentrationsabhängigen Umsatzgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt.

Durch Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gegen die Substratkonzentration [S] wurden mit Hilfe einer Regressionskurve (Michaelis-Menten Fit, Programm XL Fit, Abbildung 65 A) oder der doppelten reziproken Lineweaver-Burk-Auftragung ( $1/v$  gegen  $1/[S]$ , Abbildung 65 B) die folgenden  $K_M$ -Werte ermittelt:

$K_M$ pNPP für MPTPB :	$3,3 \pm 0,1$ mM
$K_M$ pNPP für MPTPA:	$3,4 \pm 0,1$ mM
$K_M$ pNPP für PTP1B:	$1,8 \pm 0,1$ mM
$K_M$ pNPP für PTPN2:	$1,9 \pm 0,1$ mM
$K_M$ pNPP für SHP-2:	$1,5 \pm 0,2$ mM
$K_M$ pNPP für VHR:	$10,8 \pm 0,1$ mM
$K_M$ pNPP für h-PTP $\beta$ :	$1,0 \pm 0,2$ mM



**Abbildung 65: Ermittlung des  $K_M$ -Wertes am Beispiel der h-PTP  $\beta$**

Die unter den Graphiken angegebenen  $K_M$ -Werte wurden A nach Michaelis-Menten durch Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  gegen die Substratkonzentration  $[S]$  mit Hilfe der Regressionskurve oder B anhand der doppelten reziproken Lineweaver-Burk-Auftragung ( $1/v$  gegen  $1/[S]$ ) ermittelt.

### 3.2.2 Erstes Aktivitätsscreening mit Testsubstanzen

Durch ein Roboter-gestütztes Screening wurden diverse Substanzen der abteilungseigenen Substanzsammlung auf eine Inhibition verschiedener Phosphatasen untersucht. Dabei wurden Substanzen aus der Gruppe der Spirooxindole, genauer 5-Nitro-substituierte Indol-2-on-thiazolidinone (Abbildung 21) entdeckt, die spezifisch MPTPB inhibierten, nicht aber weitere getestete Phosphatasen. Diese beobachtete Aktivität und Spezifität sollte zunächst manuell bestätigt werden.

So wurden die entsprechenden 98 Substanzen dieser Sammlung hinsichtlich ihrer inhibierenden Wirkung auf MPTPB bei einer Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$  getestet. Neben ihrer Wirkung auf die Aktivität der mycobakteriellen Phosphatase MPTPB wurden alle aktiven Substanzen auch bezüglich ihrer Spezifität, d.h. bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung auf verschiedene andere Phosphatasen überprüft. Neben der dualspezifischen Phosphatase VHR wurden verschiedene PTPs getestet, unter anderem eine Rezeptor-ähnliche PTP (h-PTP  $\beta$ ) und vier klassische PTPs (PTP1B, SHP2, PTPN2 darunter auch die mit MPTPB verwandte MPTPA).



**Tabelle 17: Die Aktivität der der untersuchten Substanzen gegenüber den sieben getesteten Phosphatasen**

Aufgeführt ist jeweils die Substanzkennung (Spalte ganz links), dann folgen von links nach rechts die gemessene relative Phosphataseaktivität (in % der Aktivität der nicht-inhibierten Phosphatase) für MPTPB, MPTPA, PTP1B, PTP-SHP-2, PTPN2, h-PTP  $\beta$  und die VHR nach Zugabe von 50  $\mu$ M der Testsubstanz. Eine grüne Unterlegung zeigt Nichtaktivität an, eine gelbe Unterlegung geringe Aktivität und in rot unterlegt sind die Messwerte, die eine Inhibition der Enzymaktivität auf unter 50 % der Ausgangsaktivität anzeigen und damit auf aktive Verbindungen hindeuten.

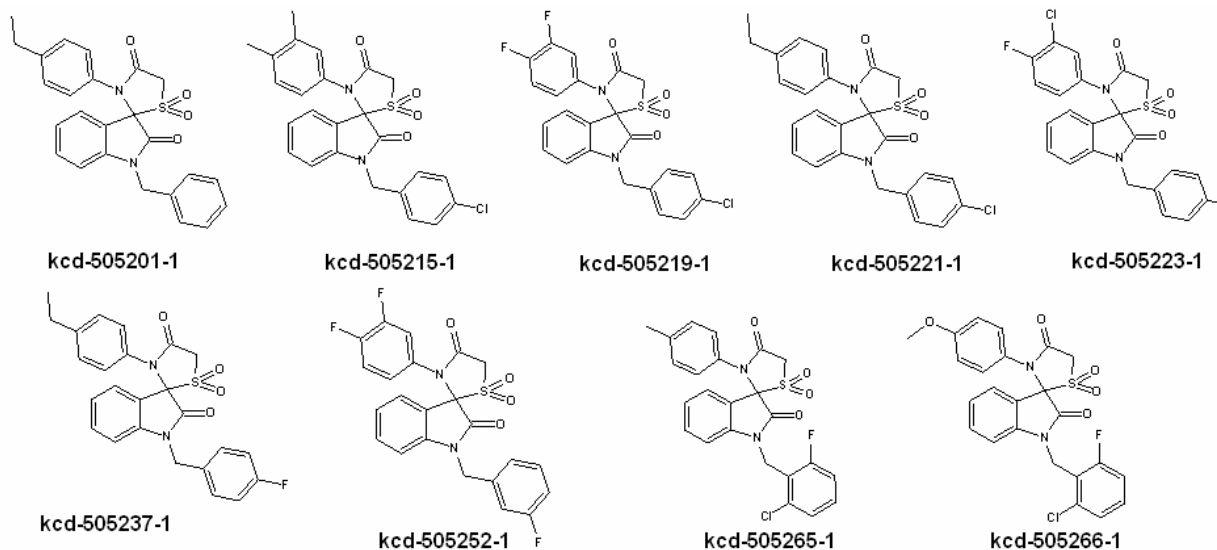
Substanz-ID	MPTPB	MPTPA	PTP1B	PTP-SHP2	PTPN2	h-PTP $\beta$	VHR
kcd-320959-1	91	78	94	103	77	120	94
kcd-320960-1	71	77	93	103	78	106	88
kcd-320961-1	94	98	108	103	87	114	84
kcd-321083-1	104	98	115	108	85	114	83
kcd-321084-1	99	88	113	106	83	124	84
kcd-321085-1	94	90	115	107	78	128	89
kcd-321086-1	105	85	111	106	82	139	91
kcd-505175-1	112	91	100	90	75	132	98
kcd-505176-1	132	86	95	87	80	88	97
kcd-505177-1	146	81	99	86	80	85	89
kcd-505178-1	158	84	101	91	91	94	88
kcd-505179-1	145	80	99	85	80	89	81
kcd-505180-1	160	87	100	94	91	107	89
kcd-505181-1	153	90	102	95	94	92	91
kcd-505182-1	157	73	99	91	85	118	90
kcd-505183-1	163	81	93	84	87	124	96
kcd-505184-1	135	100	87	109	75	115	92
kcd-505185-1	129	93	105	105	73	114	92
kcd-505186-1	116	71	100	102	94	114	84
kcd-505187-1	112	84	98	97	90	128	86
kcd-505188-1	124	93	104	102	67	95	84
kcd-505189-1	110	88	98	99	78	123	85
kcd-505190-1	112	98	109	101	82	132	83
kcd-505191-1	89	71	95	90	85	147	88
kcd-505192-1	71	89	92	88	77	97	94
kcd-505193-1	76	94	108	92	89	94	89
kcd-505194-1	72	90	96	87	70	95	83
kcd-505195-1	67	95	103	87	84	89	83
kcd-505195-1	82	88	89	90	86	85	84
kcd-505197-1	76	81	90	90	71	96	88
kcd-505198-1	80	83	84	92	67	104	89
kcd-505199-1	67	81	94	86	68	117	92
kcd-505200-1	61	97	98	100	65	107	92
<b>kcd-505201-1</b>	<b>34</b>	76	89	106	79	102	89
kcd-505202-1	67	83	88	104	66	107	84
kcd-505203-1	73	98	100	104	90	103	85
kcd-505204-1	70	88	99	104	78	111	86
kcd-505205-1	58	92	96	100	91	94	85
kcd-505206-1	73	77	92	102	79	112	89
kcd-505207-1	67	73	94	92	69	114	92
kcd-505208-1	68	95	84	90	84	105	91

Ergebnisse

Substanz-ID	MPTPB	MPTPA	PTP1B	PTP-SHP2	PTPN2	h-PTP $\beta$	VHR
kcd-505209-1	66	88	103	93	82	111	84
kcd-505210-1	68	89	97	95	68	106	80
kcd-505211-1	64	89	110	92	86	109	83
kcd-505212-1	64	92	109	90	80	112	86
kcd-505213-1	74	90	101	94	71	133	80
kcd-505214-1	63	84	107	92	87	120	88
<b>kcd-505215-1</b>	32	90	90	80	73	133	90
kcd-505216-1	93	95	102	96	83	89	93
kcd-505217-1	53	87	99	95	67	87	86
kcd-505218-1	72	85	106	94	89	77	85
<b>kcd-505219-1</b>	46	83	103	95	71	91	83
kcd-505220-1	64	88	106	96	87	98	85
<b>kcd-505221-1</b>	35	82	101	91	67	94	86
kcd-505222-1	63	74	103	96	74	111	91
<b>kcd-505223-1</b>	41	84	99	87	64	121	92
kcd-505224-1	76	104	65	100	68	84	100
kcd-505225-1	89	101	89	106	66	108	90
kcd-505226-1	95	104	101	106	79	93	88
kcd-505227-1	81	101	109	99	64	95	83
kcd-505228-1	87	98	111	99	70	101	82
kcd-505229-1	100	104	116	98	65	120	88
kcd-505230-1	96	96	127	98	84	108	91
kcd-505231-1	99	105	88	93	79	100	98
kcd-505232-1	85	97	90	87	87	103	98
kcd-505233-1	81	90	97	86	88	105	90
kcd-505234-1	88	91	89	92	76	106	84
kcd-505235-1	77	89	98	84	86	110	86
kcd-505236-1	79	90	94	91	80	114	86
<b>kcd-505237-1</b>	27	88	95	83	83	110	90
kcd-505238-1	83	90	98	91	83	121	93
kcd-505239-1	80	95	88	80	82	111	92
kcd-505240-1	96	83	96	102	81	97	97
kcd-505241-1	89	75	98	105	82	94	94
kcd-505242-1	106	84	88	106	67	93	85
kcd-505243-1	110	82	89	103	74	86	84
kcd-505244-1	85	83	91	102	68	98	83
kcd-505245-1	116	86	103	108	91	100	90
kcd-505246-1	98	87	99	106	80	106	90
kcd-505247-1	86	91	88	97	88	104	85
kcd-505248-1	92	95	90	108	83	83	97
kcd-505249-1	76	82	94	106	84	95	90
kcd-505250-1	75	94	90	102	80	82	85
kcd-505251-1	57	95	92	100	73	80	84
<b>kcd-505252-1</b>	17	94	94	105	88	81	86
kcd-505253-1	97	93	94	106	82	116	89
kcd-505254-1	69	93	90	101	76	113	90
kcd-505255-1	94	104	88	92	86	119	92
kcd-505256-1	100	95	98	95	77	118	101
kcd-505257-1	94	91	103	99	95	101	95
kcd-505258-1	93	100	99	89	84	106	110
kcd-505259-1	61	96	97	88	85	111	111
kcd-505260-1	65	91	90	86	72	109	91
kcd-505262-1	70	93	101	89	91	109	93
kcd-505263-1	104	94	103	95	94	118	101

Substanz-ID	MPTPB	MPTPA	PTP1B	PTP-SHP2	PTPN2	h-PTP $\beta$	VHR
kcd-505264-1	59	97	87	80	90	125	103
kcd-505265-1	35	85	91	98	93	117	113
kcd-505266-1	47	88	97	105	96	109	107

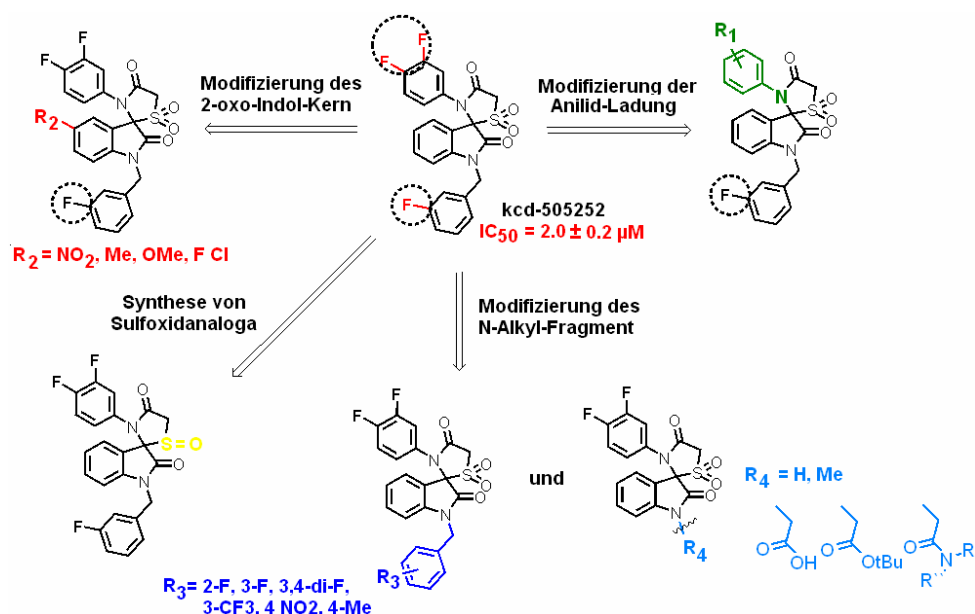
Wie anhand der farblich unterlegten Tabelle 17 deutlich wird, ist eine spezifische Aktivität gegenüber der MPTPB klar gegeben. Insgesamt konnten 9 MPTPB Inhibitoren ermittelt werden, die in Abbildung 66 dargestellt sind.



**Abbildung 66: Strukturen zu den MPTPB Inhibitoren, die in dem Phosphatase-Screening identifiziert werden konnten**

Zusätzlich zu der grundsätzlichen Aktivitätsbestimmung nach Zugabe von 3 verschiedenen Substanzkonzentrationen (50, 5 und 0,5  $\mu\text{M}$ ), bestimmte Dr. Viktor Vintonyak sämtliche  $\text{IC}_{50}$ -Werte.

Anhand dieses erweiterten Datensatzes konnte eine erste Struktur-Wirkungs-Beziehung erstellt werden. Ausgehend von der aktivsten Substanz (kcd505252-1) mit einem  $\text{IC}_{50}$  von  $2 \pm 0,2 \mu\text{M}$  wurden die in Abbildung 67 gezeigten Modifizierungen vorgenommen.



**Abbildung 67: Modifizierung der kcd-505252-1 Struktur und den Resten R1, R2, R3 und R4, sowie die Synthese von Sulfoxidanaloga (Dr. Viktor Vintonyak)**

Bei der Synthese wurden Isatinderivate als Zwischenstufe verwendet. Da für diese ist ein nukleophiler Angriff der Carbonylgruppe des Isatin auf Cystein Proteasen beschrieben ist, der eventuell hier auch eine kovalente, reversible Inhibierung einer Phosphatase bewirken könnte <sup>[146]</sup>, wurde die Verbindung VV198 beispielhaft mitgetestet.

Insgesamt wurde in mehreren Durchläufen eine Auswahl von 80 Substanzen der von Dr. Viktor Vintonyak synthetisierten Derivate hinsichtlich ihrer Aktivität und Spezifität getestet. Dabei verwendete Dr. Viktor Vintonyak jeweils zwischen den einzelnen Durchläufen neue Erkenntnisse bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehung um sinnvolle Modifizierungen der Leitstruktur vornehmen zu können.

**Tabelle 18: Die Aktivität der synthetisierten Substanzen gegenüber den sieben getesteten Phosphatasen**

Aufgeführt ist jeweils die Substanzkennung (Spalte ganz links), dann folgen von links nach rechts die gemessene relative Phosphataseaktivität (in % der Aktivität der nicht-inhibierten Phosphatase) für MPTPB, MPTPA, PTP1B, PTP-SHP-2, h-PTP  $\beta$  und die VHR nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  der Testsubstanz. Eine grüne Unterlegung zeigt Nichtaktivität an, eine gelbe Unterlegung geringe Aktivität und in rot unterlegt sind die Messwerte, die eine Inhibition der Enzymaktivität auf unter 50 % der Ausgangsaktivität anzeigen und damit auf aktive Verbindungen hindeuten.

Ergebnisse

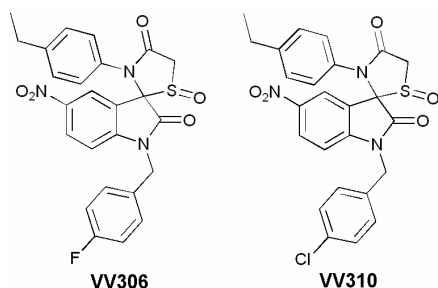
Substanz-ID	MPTPB	MPTPA	PTP1B	PTP-SHP2	PTPN2	h-PTP $\beta$	VHR
VV138	59	94	89	95	57	70	87
VV177	13	93	92	100	95	85	98
VV189	93	95	90	98	90	64	88
VV193	89	90	91	90	98	80	88
VV196	61	90	90	97	86	81	88
<b>VV198</b>	15	93	84	88	89	3	84
VV23	101	99	94	103	98	92	97
VV255	82	92	89	100	91	84	86
VV260	72	94	90	86	55	93	80
VV265	13	91	94	97	90	108	94
VV265F1	16	90	94	102	80	90	90
VV265F2	-1	98	100	97	90	99	95
VV275C	2	88	93	98	82	77	90
VV294	28	97	92	100	84	61	87
<b>VV306</b>	-3	90	92	97	88	19	89
<b>VV310</b>	0	90	90	97	85	35	88
VV313	2	95	95	98	86	80	94
VV317	76	93	93	100	91	71	82
VV320	1	98	94	98	88	75	94
VV321	0	94	86	91	78	74	104
VV329	1	92	92	95	95	90	101
VV331	2	93	96	99	97	72	106
VV334	1	88	94	94	92	81	99
VV335	1	86	91	94	84	61	95
VV336	0	88	103	95	82	90	91
VV337	-4	91	92	94	83	67	98
VV339	0	93	105	96	97	129	101
VV340	-6	83	81	82	84	121	105
VV342	6	95	101	98	100	125	96
VV414	2	77	90	77	75	91	95
VV415	-4	75	82	74	59	94	90
VV416	-4	74	83	70	57	89	86
VV417	-2	77	85	75	61	95	82
VV419	0	77	85	74	68	89	83
VV420	1	79	84	73	64	65	83
VV421	-1	81	84	74	59	98	89
VV422	-2	83	86	64	65	79	98
VV423	-5	78	81	69	62	130	95
VV424	-5	77	82	72	61	73	90
VV425	3	71	87	81	81	167	85
VV429	7	74	87	78	79	158	85
VV431	2	74	83	76	73	162	85
VV432	1	76	87	74	84	165	89
VV434	1	78	81	78	86	171	91
VV435	2	73	79	73	87	235	96
VV437	1	81	88	60	80	225	84
VV438	3	76	85	59	86	199	86
VV442	-2	76	82	58	71	189	80
VV443	-3	75	83	55	71	190	83
VV444	-3	75	90	54	87	195	83
VV445	-3	77	84	51	75	209	81
VV446	-4	79	84	53	76	222	88
VV447	0	70	76	61	72	179	93

Substanz-ID	MPTPB	MPTPA	PTP1B	PTP-SHP2	PTPN2	h-PTP $\beta$	VHR
VV449	-3	84	87	60	88	93	91
VV450	4	83	90	71	90	200	89
VV451	2	79	87	62	80	202	86
VV452	-9	79	81	57	79	202	85
VV456	12	66	58	55	96	136	85
VV457	2	53	55	51	62	160	79
VV460	13	72	59	57	88	176	93
VV470	19	89	92	90	87	73	82
VV476	68	89	93	99	83	78	84
VV478	52	90	91	96	76	99	81
VV482	34	95	98	92	89	72	83
VV483	34	92	90	98	94	77	88
VV487F2	50	89	88	94	84	69	95
VV495	8	82	95	76	73	74	83
VV523	53	82	90	82	68	70	71
VV526	41	84	93	81	61	77	68
VV527	27	94	93	80	80	114	71
VV528	51	98	87	87	70	74	75
VV529	36	97	97	80	79	83	76
VV530	1	93	90	85	78	56	75
VV531	24	92	94	79	76	91	87
VV532	76	91	81	74	87	89	75
VV533	30	84	77	69	77	72	72
VV534	55	88	79	78	73	70	66
VV535	36	81	78	68	78	68	69
VV536	42	93	81	62	80	78	63
VV537	21	95	76	75	69	77	72

Für alle unter 3.2.2 beschriebenen Messungen wurden jeweils der z'-Faktor als statistischer Parameter bestimmt. Er lag jeweils zwischen mindestens 0,5 bis nahezu 1. Das bedeutet, dass ideale Experimentbedingungen vorlagen und ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt wurde. Durch den z'-Faktor <sup>[17]</sup> wird die Differenz zwischen Positiv- und Negativkontrolle unter Einbeziehung der jeweiligen Standardabweichungen bestimmt. Der Wert kann zwischen 0 und 1 liegen und sollte möglichst groß (mind. 0,5, idealerweise 1) sein.

Wie anhand der farbig unterlegten Tabelle deutlich wird, weist die Mehrzahl aller getesteten Substanzen eine MPTPB-spezifische Inhibition auf. Insgesamt konnten 65 MPTPB Inhibitoren ermittelt werden.

Lediglich drei Substanzen, nämlich VV198 (Abbildung 24), VV306 und VV310 (Abbildung 68) inhibieren zusätzlich zur MPTPB auch die h-PTP  $\beta$  mit IC<sub>50</sub>-Werten von  $1,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$  für VV198,  $8,7 \pm 2,2 \mu\text{M}$  für VV306 und  $6,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$  für VV310.



**Abbildung 68: Strukturen von VV306 und VV310**

Die Substanzen VV306 und VV310 gehören, wie die Abbildung 68 zeigt, zu den Sulfoxiden, die sich nach Untersuchungen von Dr. Viktor Vintonyak generell als aktiver als die Sulfon-Derivate zeigten. Leider musste auch festgestellt werden, dass die Sulfon- und Sulfoxid-Derivate unterschiedlich stabil sind. So werden die Sulfoxid-Derivate in DMSO zu einem reaktiven Abbauprodukt degradiert, welches die Inhibition hervorruft. Dieses konnte allerdings leider nicht isoliert und strukturell charakterisiert werden, so dass man sich auf die Isatinderivate und dort insbesondere auf VV198 konzentrierte.

In einem von Frau Sigrid Rosin-Steiner durchgeführten automatisierten Screening konnten von weiteren 47 getesteten Isatinen 31 aktive identifiziert werden, die  $IC_{50}$ -Werte zwischen 1 und 3  $\mu$ M aufwiesen.

Zusammenfassend konnten beim ersten Aktivitätsscreening mit Testsubstanzen, 5-Nitro-substituierte Indol-2-on-thiazolidinone als potente, selektive MPTPB Inhibitoren ausgemacht werden. Die SAR-Untersuchungen zeigten, dass Sulfoxide aktiver als Sulfone sind, dass ein halogenisiertes N-Benzyl-Fragment ausschlaggebend für die Aktivität ist, dass 3,4-Difluoro, 3-Chloro-4-Fluoro and 4-Alkyl-substituierte Anilide Fragmente am aktivsten sind und dass die Konfiguration des Spiro-Zentrums die Aktivität beeinflusst.

### 3.2.3 Charakterisierung des Inhibitionstyps und Bestimmung des $IC_{50}$ -Werts, sowie der Dissoziationskonstanten $K_i$ für ausgewählte Substanzen

Für die potentesten, enantiomerenreinen MPTPB-Inhibitoren, VV177, VV265, VV495, VV531 (jeweils Fraktion 2), das reaktive Sulfoxid-Abbauprodukt von VV336 und die MPTPB- und h-PTP  $\beta$  inhibierende Substanz VV198 (Abbildung 24), wurde jeweils der  $IC_{50}$ -Wert, die Dissoziationskonstante  $K_i$  und der Inhibitions-Typ ermittelt.

Der  $IC_{50}$ -Wert stellt die InhibitorKonzentration dar, bei der die Aktivität des untersuchten Enzyms noch 50 % der Ausgangsaktivität beträgt. Da der  $IC_{50}$ -Wert allerdings stark von den jeweiligen Assay-Bedingungen abhängt, wurden zusätzlich die Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitor Komplexes ( $K_i$ ) ermittelt.

Bezüglich des Inhibitionstyps unterscheidet man zwischen irreversiblen und reversiblen Inhibitoren, wobei Letztere zusätzlich in Substrat-kompetitive, nicht-kompetitive, selten auch unkompetitive oder gemischte Inhibitoren unterteilt werden.  
[131]

Zunächst wurden die  $IC_{50}$ -Werte bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen (z.B. bei  $1/2 K_M$ , bei  $K_M$ , bei  $4 K_M$  und  $20 K_M$ ) und 10 verschiedenen InhibitorKonzentrationen ermittelt. Die erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte wurden miteinander verglichen und gaben einen ersten Hinweis darauf, ob die Substratkonzentration einen Einfluss auf die Wirkung der Substanz hatte.

Die Dissoziationskonstante  $K_i$  sowie die Unterscheidung zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver Art der Hemmung wurde anschließend nach der klassischen Methode für reversible Inhibitoren nach Dixon <sup>[130]</sup> bestimmt. Dazu wurden die Messungen jeweils bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen (z.B. bei  $1/4 K_M$ , bei  $K_M$ , bei  $2 K_M$  und  $10 K_M$ ) und mindestens vier verschiedenen InhibitorKonzentrationen durchgeführt.

Einen kritischer Punkt stellte dabei die InhibitorKonzentration dar: Um gute Daten zu erhalten sollten die InhibitorKonzentrationen so gewählt werden, dass die Enzymaktivität jeweils zwischen 35 und 70 % liegt.<sup>[131]</sup>

Der jeweilige  $K_i$ -Wert wurde anhand der  $x$ -Achsenkoordinate des Schnittpunkt der Geraden für die vier Substratkonzentrationen ermittelt. (Vgl. Abbildung 36)

Zum Vergleich mit diesen experimentell ermittelten  $K_i$ -Werten wurden die Dissoziationskonstanten der Enzym-Inhibitor Komplexe ( $K_i$ ) für die kompetitiven Inhibitoren auch über die Cheng-Prusoff Gleichung <sup>[133]</sup> (Formel 6) ermittelt.

Alternativ zum Dixon-Plot ist die doppelt reziproke Auftragung ( $1/v$  vs  $1/[S]$ ) nach Lineweaver Burk möglich.<sup>[134]</sup>

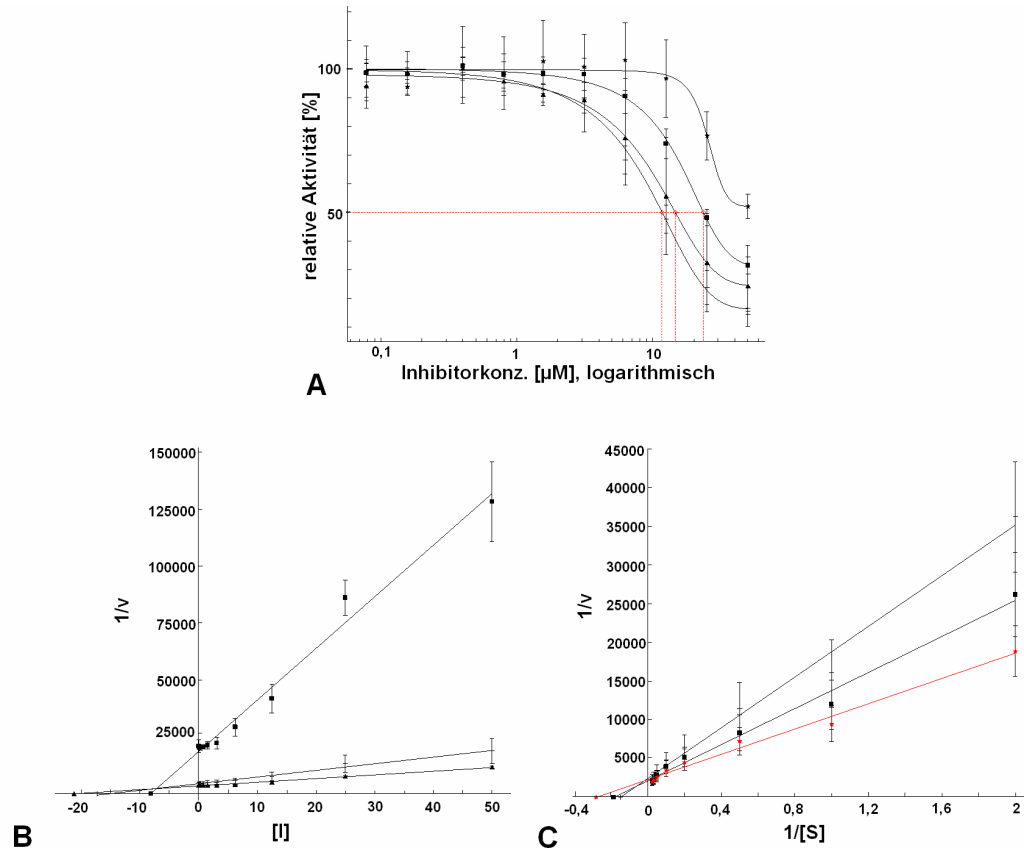
Die Art der Auftragung bzw. der Verlauf der Geraden ermöglicht es hierbei nicht nur zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver Inhibierung zu unterscheiden, sondern erlaubt auch die Differenzierung der nicht-kompetitiven Hemmung in nicht-kompetitive und unkompetitive Inhibierung bzw. kann gegebenenfalls eine gemischte Form der Inhibierung anzeigen. (Vgl. Abbildung 37)

Hier wurden die Messungen jeweils bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen (z.B. bei  $1/4 K_M$ ,  $1/2 K_M$ ,  $K_M$ ,  $2,5 K_M$ ,  $5 K_M$ ,  $10 K_M$ ,  $15 K_M$ ,  $20 K_M$ ) und mindestens 3 verschiedenen InhibitorKonzentrationen, bei denen die Enzymaktivität jeweils



wiederum bei 35 bis 70 % lag, durchgeführt. Einen kritischen Punkt stellten hier die unterschiedlichen Substratkonzentrationen dar: Es erwies sich als notwendig, bei genügend verschiedenen Konzentrationen zu messen um eine ausreichende Anzahl von Datenpunkten zur exakten Ermittlung des Schnittpunkts zu haben. Die Auftragung der Werte erfolgt wie oben beschrieben doppelt reziprok für die variierenden Inhibitor- und Substratkonzentrationen. Der Inhibitionstyp konnte anhand des typischen Verlaufs der Geraden abgelesen werden. Alle hier unter 3.2.3 beschriebenen Messungen wurden dreifach durchgeführt und zusätzlich in mindestens drei unabhängigen Experimenten validiert. Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse stellen jeweils den Mittelwert aus diesen Messwerten dar.

Zunächst wurden die beschriebenen Experimente und Berechnungen mit dem bereits gut charakterisierten, reversiblen, kompetiven Inhibitor PTPI IV (Abbildung 27) als Kontrolle durchgeführt.



**Abbildung 69: Kinetische Charakterisierung von PTPI IV als Kontrolle**

**A** IC<sub>50</sub>-Bestimmung bei 4 verschiedenen Substratkonzentrationen (+: 1/20 K<sub>M</sub>, ▲: K<sub>M</sub>, ■: 2 K<sub>M</sub> und \*: 20 K<sub>M</sub>) **B** Dixon Plot bei 3 verschiedenen Substratkonzentrationen (+: 1/20 K<sub>M</sub>, ▲: K<sub>M</sub>, ■: 2 K<sub>M</sub>) Der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden liegt oberhalb der x-Achse, was auf eine kompetitive Inhibition hindeutet. Die x-Achsenkoordinate des Schnittpunkts der Geraden stellt den K<sub>i</sub> dar, hier bei etwa 8 µM. **C** Lineweaver Burk Plot: Die Messungen wurden bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen (1/4 K<sub>M</sub>, 1/2 K<sub>M</sub>, K<sub>M</sub>, 2,5 K<sub>M</sub>, 5 K<sub>M</sub>, 10 K<sub>M</sub>, 15 K<sub>M</sub>, 20 K<sub>M</sub>) und 2 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (+: 14 µM und ■: 7 µM), sowie ohne Inhibitor (\*, rote Markierung) durchgeführt.

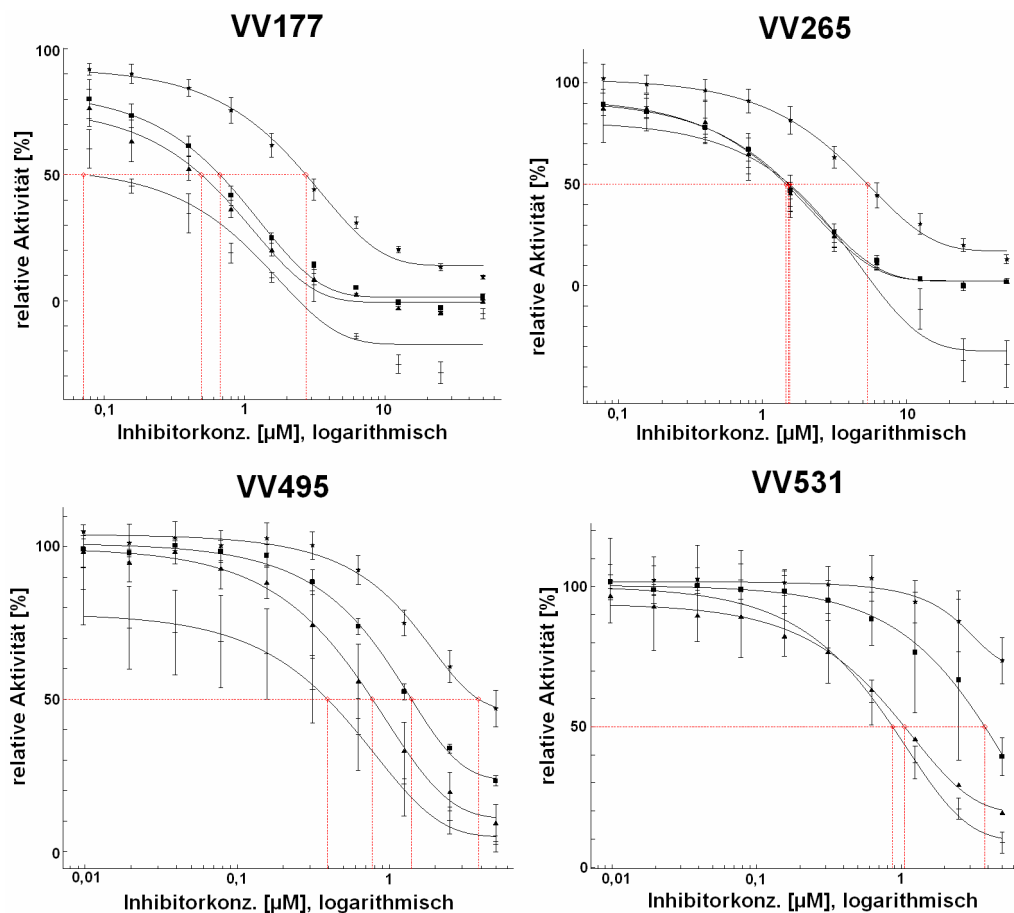
Abbildung 69 A zeigt, dass die als IC<sub>50</sub>-Wert dargestellte Aktivität, deutlich von der Substratkonzentration abhängt. So variiert der IC<sub>50</sub>-Wert in Abhängigkeit von der pNPP Konzentration zwischen über 50 µM, 24 µM und 15 µM bis zu 12 µM. (Standardabweichung jeweils ≤ 10 %). Dies bestätigte die beschriebene kompetitive Inhibition für PTPI IV in einem ersten Versuch.

Beim Dixon-Plot (Abbildung 69 B) liegt der gemeinsame Schnittpunkt aller Geraden oberhalb der x-Achse, was auch auf eine kompetitive Inhibition hindeutet. Die x-Achsenkoordinate des Schnittpunktes der Geraden stellt den K<sub>i</sub> dar, der hier bei etwa

8  $\mu\text{M}$  bestimmt wurde. Der laut Cheng-Prusoff berechnete  $K_i$  mit  $8,7 \pm 1,6 \mu\text{M}$  entspricht dabei diesem experimentell ermittelten  $K_i$ .

Auch bei der Darstellung der Messwerte in einem Lineweaver Burk Plot (Abbildung 69 C), bestätigt die Lage des Schnittpunkts aller Geraden auf der Y-Achse (d.h. bei  $x = 0$ ), den kompetitiven Inhibitionstyp.

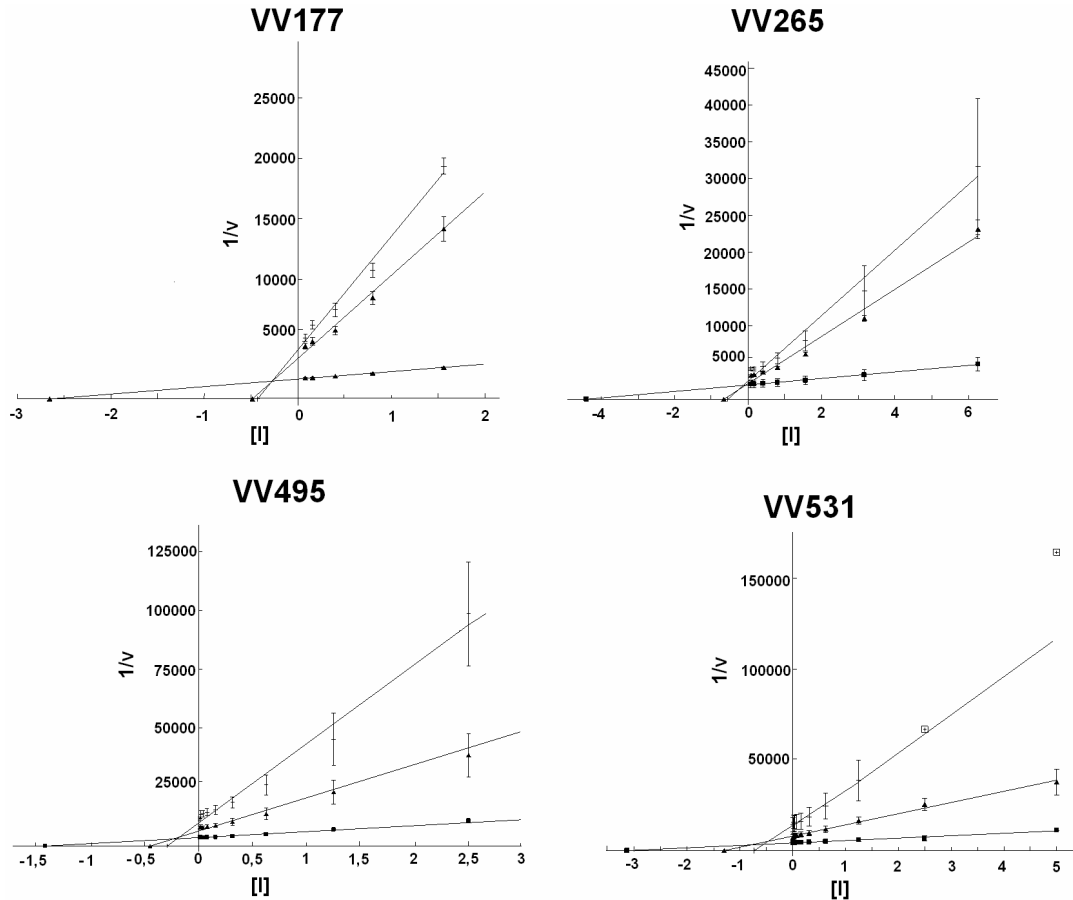
Mit Hilfe dieser Kontrollmessungen konnte der zur Charakterisierung des Inhibitionstyps der neu entdeckten Inhibitoren erforderliche experimentelle Umfang festgelegt werden, um ausreichend präzise Ergebnisse für eine valide Aussage zu erhalten. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse dieser Charakterisierungen für die Substanzen VV177, VV265, VV495, VV531 (jeweils Fraktion 2).



**Abbildung 70:  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung bei vier verschiedenen Substratkonzentrationen (+: 1/10 oder 1/4  $K_M$ ,  $\blacktriangle$ :  $K_M$ ,  $\blacksquare$ : 2 oder 4  $K_M$  and \*: 20  $K_M$ ) für VV177, VV265, VV495 und VV531.**

Abbildung 70 zeigt, dass für alle getesteten Substanzen eine Abhängigkeit der Aktivität von der Substratkonzentration vorliegt. So variieren die  $\text{IC}_{50}$ -Werte zwischen

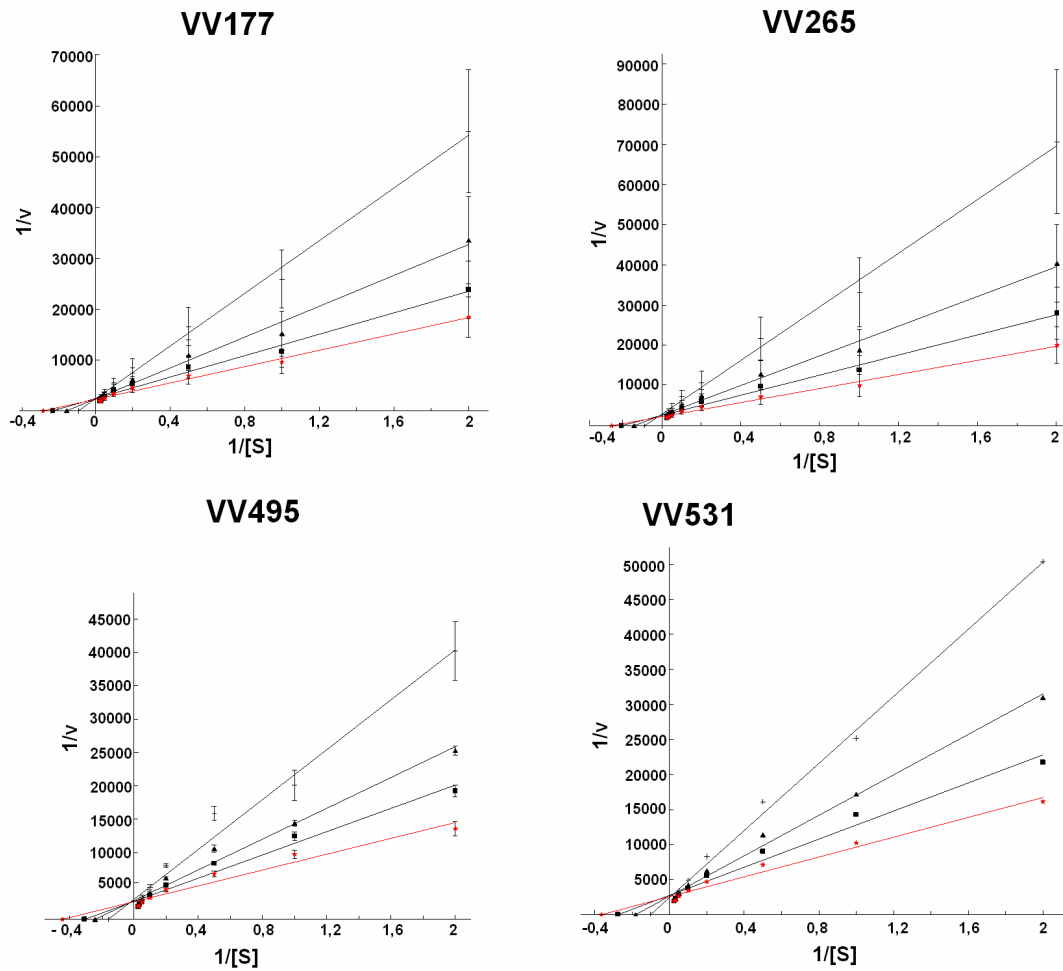
hoher und niedriger pNPP-Konzentration zwischen 2,7 und 0,1  $\mu\text{M}$  für VV177, zwischen 5,4 und 1,5  $\mu\text{M}$  für VV265, zwischen 3,9 und 0,4  $\mu\text{M}$  für VV495 und zwischen 5,0 und 0,9  $\mu\text{M}$  für VV531.



**Abbildung 71: Dixon Plots bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen** ( $+$ :  $K_M$ ,  $\blacktriangle$ :  $2 K_M$  and  $\blacksquare$ :  $20 K_M$ ) für VV177, VV265, ( $+$ :  $\frac{1}{4} K_M$ ,  $\blacktriangle$ :  $K_M$  and  $\blacksquare$ :  $4 K_M$ ) für VV495 und VV531.

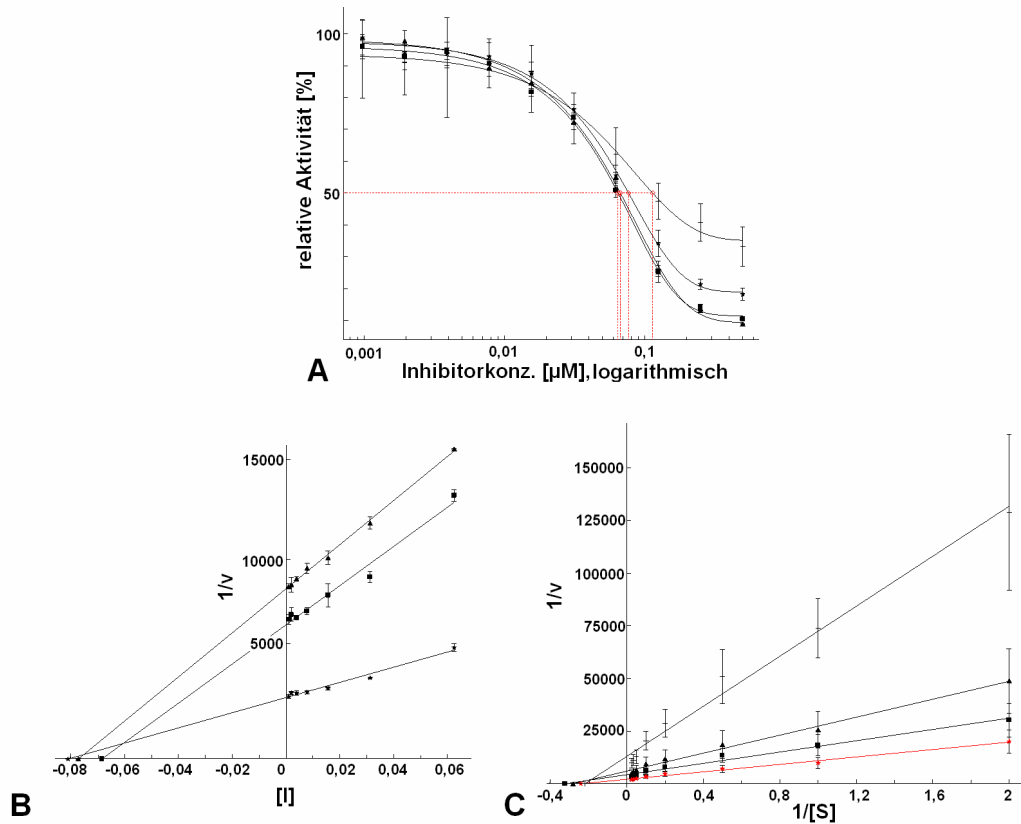
Wie Abbildung 71 zeigt, liegt der Schnittpunkt der Geraden für die vier Inhibitoren und wie für kompetitive Inhibitoren beschrieben, jeweils bei positiven y-Werten und der x-Wert der Schnittpunktkoordinate stellt den  $K_i$  dar. Hier im Falle von VV177 bei 0,2  $\mu\text{M}$ , von VV265 bei 0,4  $\mu\text{M}$ , von VV495 bei 0,4  $\mu\text{M}$  und im Falle von VV531 bei 0,5  $\mu\text{M}$ .

Diese experimentell ermittelten Werte liegen in derselben Größenordnung wie die nach der Cheng-Prusoff (Formel X) berechneten Werte:  $K_i$  VV177 berechnet: 0,2  $\pm$  0,1  $\mu\text{M}$ ;  $K_i$  VV265 berechnet: 0,8  $\pm$  0,3  $\mu\text{M}$ ;  $K_i$  VV 495 berechnet: 0,3  $\pm$  0,1  $\mu\text{M}$  und  $K_i$  VV531 berechnet: 0,7  $\pm$  0,1  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 72: Lineweaver Burk Plots für VV177, VV265, VV495F2 und VV531.** Die Messungen wurden bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen ( $1/4 K_M$ ,  $1/2 K_M$ ,  $K_M$ ,  $2.5 K_M$ ,  $5 K_M$ ,  $10 K_M$ ,  $15 K_M$ ,  $20 K_M$ ) und bei 3 Inhibitorkonzentrationen (+:  $1/2 \text{ IC}_{50}$ ,  $\blacktriangle$ :  $\text{IC}_{50}$  und  $\blacksquare$ :  $2 \text{ IC}_{50}$ ) und ohne Inhibitor (\*, rote Markierung) durchgeführt.

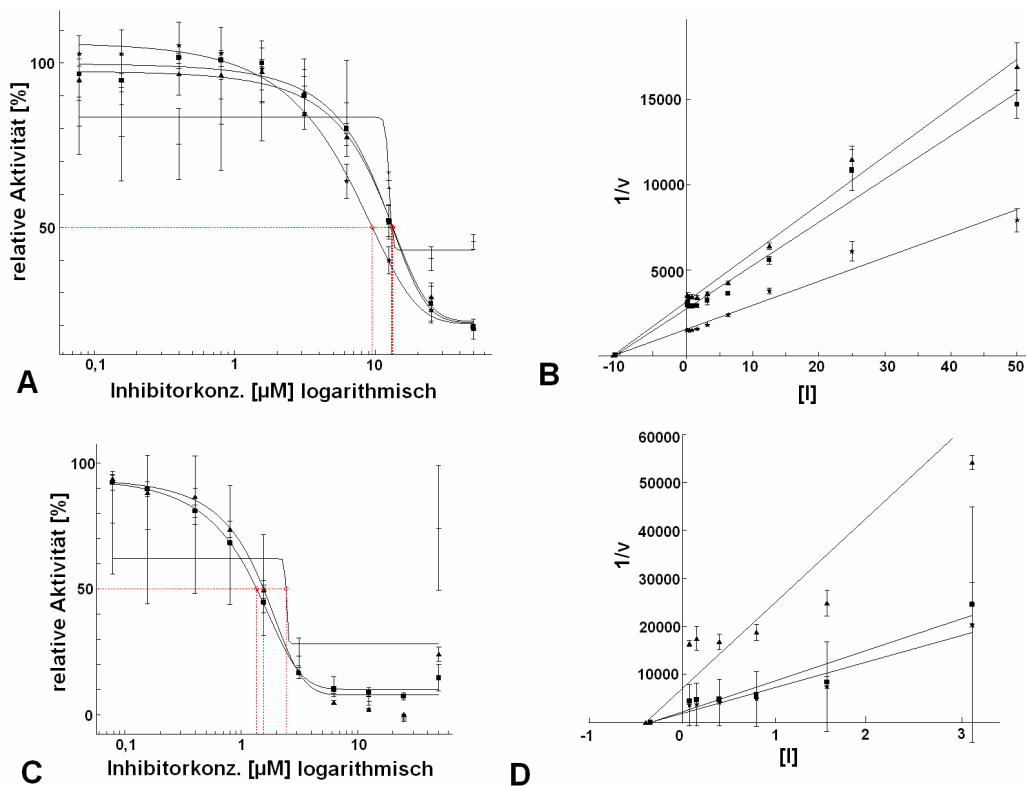
Auch die Lineweaver-Burk Plots mit dem Schnittpunkt der Geraden auf der Y-Achse liegend (Abbildung 72), bestätigen eine kompetitive Inhibierung durch VV177, VV265, VV495 und VV531.



**Abbildung 73: Kinetische Charakterisierung von VV336 bzw. dessen reaktivem Abbauprodukt A**  $IC_{50}$ -Bestimmung bei 4 verschiedenen Substratkonzentrationen (+:  $1/20 K_M$ ,  $\blacktriangle$ :  $K_M$ ,  $\blacksquare$ :  $2 K_M$  und  $*$ :  $20 K_M$ ) **B** Dixon Plot bei 3 verschiedenen Substratkonzentrationen ( $\blacktriangle$ :  $K_M$ ,  $\blacksquare$ :  $2 K_M$  und  $*$ :  $20 K_M$ ) Der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden liegt auf der x-Achse, was auf eine nicht-kompetitive Inhibierung hindeutet. Der x-Wert des Schnittpunkts stellt den  $K_i$  dar, hier bei etwa  $0,08 \pm 0,01 \mu M$ . **C** Lineweaver Burk Plot: Die Messungen wurden bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen ( $1/4 K_M$ ,  $1/2 K_M$ ,  $K_M$ ,  $2,5 K_M$ ,  $5 K_M$ ,  $10 K_M$ ,  $15 K_M$ ,  $20 K_M$ ) und 3 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (+:  $2 \cdot IC_{50}$ ,  $\blacktriangle$ :  $IC_{50}$ ,  $\blacksquare$ :  $1/2 \cdot IC_{50}$ ) sowie ohne Inhibitor (\*, rote Markierung) durchgeführt.

Wie man anhand Abbildung 73 A sieht, hängt die Aktivität, dargestellt als  $IC_{50}$ -Wert in diesem Fall nicht von der Substratkonzentration ab. Der  $IC_{50}$  liegt unabhängig davon, ob bei  $K_M$ ,  $2 K_M$  oder  $20 K_M$  gemessen wurde, bei  $0,7 \mu M$ . Lediglich der Wert bei  $1/20 K_M$  weicht mit  $0,1 \mu M$  ein wenig ab, was aber auch mit der sehr geringen Substratkonzentration erklärt werden kann, da dann die Sensitivität und Präzision der Messung etwas eingeschränkt ist. Beim Dixon-Plot (Abbildung 73 B) liegt der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden auf der x-Achse, was auch auf eine nicht-kompetitive Inhibierung hindeutet. Die x-Achsenkoordinate des Schnittpunkts der Geraden stellt den  $K_i$  dar, der hier bei etwa bei  $0,08 \pm 0,01 \mu M$  liegt. Auch die Lineweaver Burk Darstellung (Abbildung 73 C) der Messergebnisse bestätigt den

nicht-kompetitiven Inhibitionstyp, da hier der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden auf der x-Achse liegt.



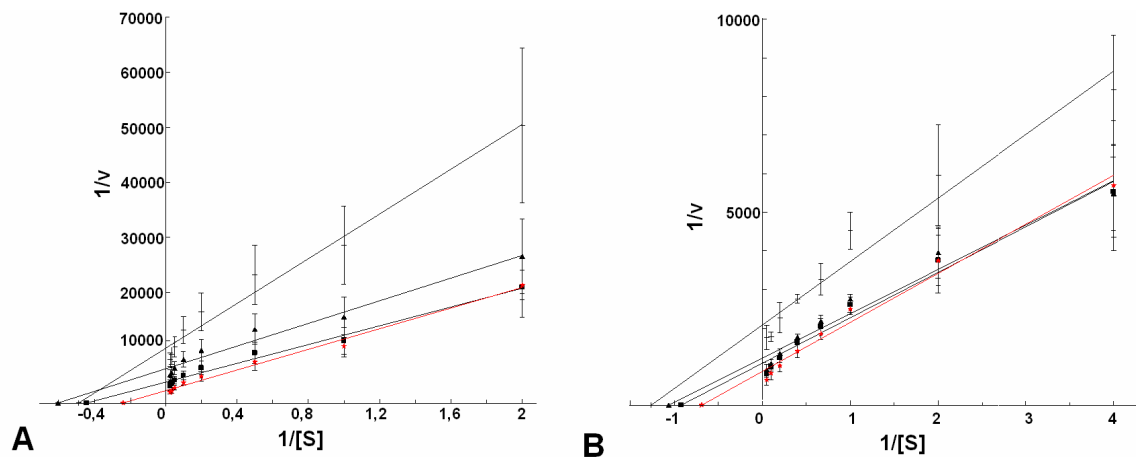
**Abbildung 74: Kinetische Charakterisierung von VV198**

**A**  $IC_{50}$ -Bestimmung bei 4 verschiedenen Substratkonzentrationen (+:  $1/10 K_M$ ,  $\blacktriangle$ :  $K_M$ ,  $\blacksquare$ :  $2 K_M$  und \*:  $20 K_M$ ) für die MPTPB **B** Dixon Plot bei 3 verschiedenen Substratkonzentrationen ( $\blacktriangle$ :  $K_M$ ,  $\blacksquare$ :  $2 K_M$  und \*:  $20 K_M$ ) für die MPTPB. Der Schnittpunkt der Geraden liegt auf der x-Achse, was auf eine nicht-kompetitive Inhibition hindeutet. Der x-Wert der Schnittpunktkoordinate stellt den  $K_i$  dar, hier bei etwa  $10 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . **C**  $IC_{50}$ -Bestimmung bei 3 verschiedenen Substratkonzentrationen (+:  $1/4 K_M$ ,  $\blacktriangle$ :  $K_M$  und  $\blacksquare$ :  $2 K_M$ ) für die h-PTP  $\beta$  **D** Dixon Plot bei 3 verschiedenen Substratkonzentrationen ( $\blacktriangle$ :  $1/4 K_M$ ,  $\blacksquare$ :  $K_M$ , \*:  $2 K_M$ ) für die h-PTP  $\beta$ . Der Schnittpunkt der Geraden liegt auf der x-Achse, was auf eine nicht-kompetitive Inhibition hindeutet. Der x-Wert der Schnittpunktkoordinate stellt den  $K_i$  dar, hier bei etwa  $0,3 \pm 0,03 \mu\text{M}$ .

Die Messwerte zeigen (Abbildung 74 A) dass die inhibitorische Aktivität von VV198 auf die MPTPB (dargestellt als  $IC_{50}$ -Wert), nicht von der Substratkonzentration abhängt. Der  $IC_{50}$  liegt bei  $12 \pm 1,4 \mu\text{M}$  unabhängig davon, ob bei einer Substratkonzentration gemessen wurde, die  $1/10 K_M$ ,  $K_M$ ,  $2 K_M$  oder  $20 K_M$  entsprach. Beim Dixon-Plot (Abbildung 74 B) liegt der gemeinsame Schnittpunkt aller Geraden auf der x-Achse, was erneut auf eine nicht-kompetitive Inhibition der MPTPB

hindeutet. Der x-Wert der Schnittpunktcoordinate stellt den  $K_i$  dar, hier bei etwa bei  $10 \pm 0,6 \mu\text{M}$ . Wie man anhand Abbildung 74 C klar sieht, hängt die Aktivität, dargestellt als  $\text{IC}_{50}$ -Wert auch für die h-PTP  $\beta$  nicht von der Substratkonzentration ab, der  $\text{IC}_{50}$ -Wert liegt bei etwa  $1,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$  unabhängig davon, ob bei  $1/4 K_M$ ,  $K_M$  oder  $2 K_M$  gemessen wurde. Beim Dixon-Plot (Abbildung 74 D) liegt der Schnittpunkt der Geraden auf der x-Achse, was auch auf eine nicht-kompetitive Inhibierung der h-PTP  $\beta$  hindeutet. Der x-Wert der Schnittpunktcoordinate stellt den  $K_i$  dar, hier bei etwa bei  $0,3 \pm 0,01 \mu\text{M}$ . Die Ergebnisse der  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung bei verschiedenen Substratkonzentrationen und die Dixon-Plots zeigen also ein eindeutiges Ergebnis für VV198 im Bezug auf die MPTPB- und h-PTP  $\beta$ -Inhibierung. So kann in beiden Fällen eine nicht-kompetitive Inhibierung angenommen werden.

Mit dem Lineweaver Burk-Plot konnte diese nicht kompetitive Inhibierung allerdings nicht weiter charakterisiert werden. Denn wie in Abbildung 75 gezeigt, konnte kein gemeinsamer Schnittpunkt und auch kein paralleler Verlauf aller Trendgeraden gefunden werden. Damit konnte der Inhibitionstyp keiner der folgenden Klassen zugeordnet werden: Schnittpunkt auf der x-Achse (nicht-kompetitive Inhibierung), paralleler Verlauf der Geraden (unkompetitive Inhibierung), Schnittpunkt der Geraden oberhalb der x-Achse, nicht aber auf der y-Achse (gemischte Inhibierung).



**Abbildung 75: Lineweaver Burk Plots für VV198**

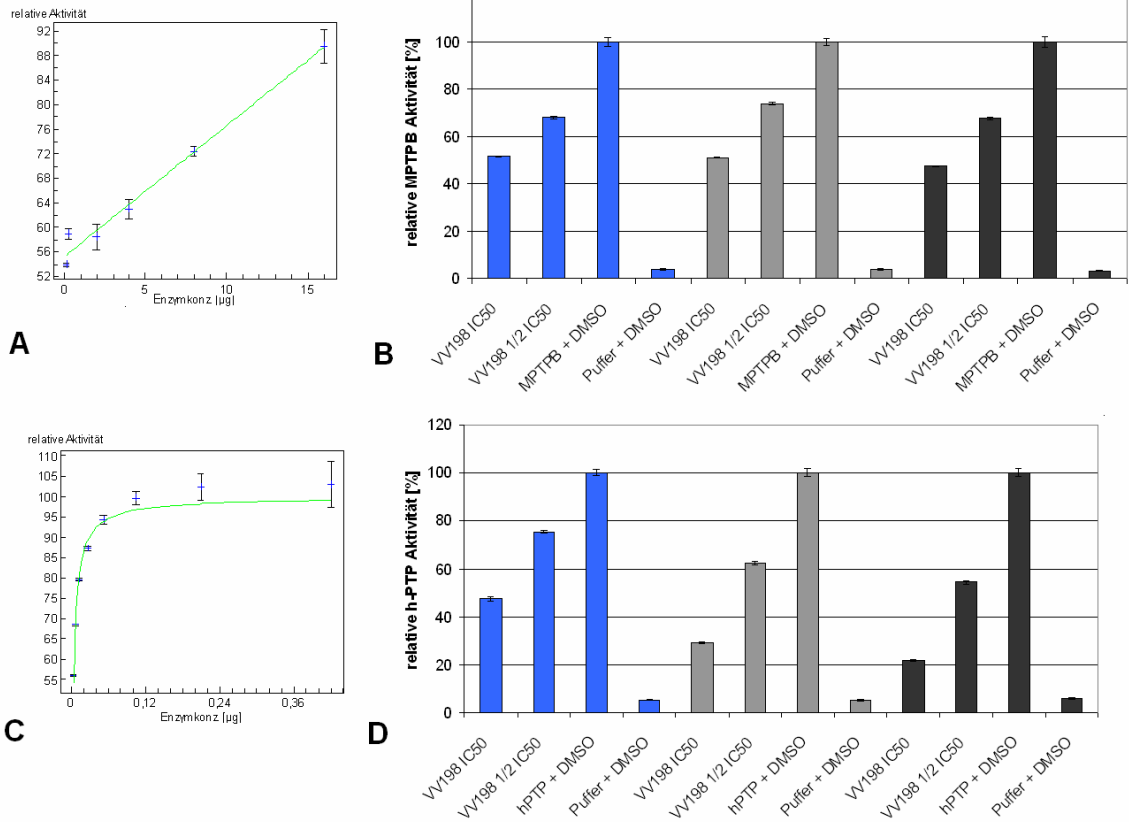
A Die Messungen im Bezug auf die MPTPB wurden bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen ( $1/4 K_M$ ,  $1/2 K_M$ ,  $K_M$ ,  $2,5 K_M$ ,  $5 K_M$ ,  $10 K_M$ ,  $15 K_M$ ,  $20 K_M$ ) und 3 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (+:  $2 \text{ „IC}_{50}$ “,  $\blacktriangle$ :  $\text{„IC}_{50}$ “,  $\blacksquare$ :  $1/2 \text{ „IC}_{50}$ “), sowie ohne Inhibitor (\*, rote Markierung) durchgeführt. B Die Messungen im Bezug auf die h-PTP  $\beta$  wurden bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen ( $1/4 K_M$ ,  $1/2 K_M$ ,  $K_M$ ,  $2,5 K_M$ ,  $5 K_M$ ,  $10 K_M$ ,  $15 K_M$ ,  $20 K_M$ ) und 3 verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (+:  $2 \text{ „IC}_{50}$ “,  $\blacktriangle$ :  $\text{„IC}_{50}$ “,  $\blacksquare$ :  $1/2 \text{ „IC}_{50}$ “), sowie ohne Inhibitor (\*, rote Markierung) durchgeführt.



Die soeben beschriebenen Verfahren und Berechnungen zur näheren Charakterisierung des Inhibitionstyps beziehen sich allesamt auf reversible Inhibitoren und sind im Falle eines irreversiblen Inhibitors so nicht anwendbar. Da man diese Art der Hemmung - die kovalente Bindung und irreversible Inhibierung - für die Verbindung VV198 allerdings aufgrund ihrer Struktur (Abbildung 24, Keto-Gruppe, die an Cystein im Enzym binden könnte, vgl. [146]) vermuten könnte, wurde dies weiter überprüft. Dabei wurden die wesentlichen Merkmale der irreversiblen Bindung (Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit) als Kriterien zur Überprüfung des Inhibitionstyps genutzt. Zum einen wurde die Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen, indem jeweils acht verschiedene Enzymkonzentrationen in Kombination mit einer festgelegten Konzentration des Inhibitors („ $IC_{50}$ “) getestet wurde. Zum anderen wurde die Zeitabhängigkeit anhand einer Zeitreihe ermittelt.

Das Enzym wurde hierzu jeweils 30 und 15 min oder direkt vor der Messung (Zeitrahmen ca. 1 min) mit zwei relativ geringen Inhibitorkonzentrationen („ $1/2 IC_{50}$ “, „ $IC_{50}$ “) inkubiert und anschließend die Enzymaktivität gemessen. Dabei wurde verfolgt, welche Änderungen in der Aktivität sich aufgrund der unterschiedlichen Inkubationszeiten vom Enzym mit dem Inhibitor ergaben. Die Ergebnisse der beiden Messungen sind in Abbildung 76 dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 76: Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der VV198 Aktivität**

In **A** und **C** ist jeweils die relative Aktivität in % gegen die Enzymkonzentration in µg aufgetragen (100 % Aktivität entspricht der Aktivität des Enzyms ohne Inhibitor); in **A** für die MPTPB, in **C** für die h-PTP β. In **B** und **D** fand die Aktivitäts-Messung jeweils nach unterschiedlichen Inkubationszeiten des Enzyms mit dem Inhibitor statt. Die blauen Balken zeigen die relative Aktivität nach 30 min Inkubation, die grauen Balken die relative Aktivität nach 15 min Inkubation und die schwarzen Balken die relative Aktivität unmittelbar nach Zugabe des Inhibitors an. In **B** ist die Zeitreihe für MPTPB, in **D** die Zeitreihe für die h-PTP β dargestellt.

Wie in Abbildung 76 A und C dargestellt ist eine Konzentrationsabhängigkeit klar vorhanden. Diese ist allerdings nicht ausschließlich für die irreversible, sondern auch im Fall einer reversiblen Inhibierung gegeben. Die Zeitabhängigkeit wäre ein sicherer Indikator für eine irreversible Hemmung, aber wie in Abbildung 76 B und D, gezeigt, nimmt die inhibitorische Aktivität nicht mit der Inkubationszeit zu, obwohl ein klarer Überschuss an Inhibitor vorhanden ist, der ausreichend groß wäre, im Falle einer irreversiblen Inhibierung, das Enzym im Laufe der Zeit komplett zu inaktivieren. Denkbar ist allerdings auch, dass eine sehr schnelle Reaktion (< 1 min) stattfindet, wobei Letztere mit den hier verwendeten Methoden der Steady-State-Kinetiken nicht

messbar ist. Ferner kann VV198 die MPTPB und die h-PTP  $\beta$  nicht nur irreversibel sondern auch reversibel nach einem komplexeren Hemm-Mechanismus (gemischter Typ) hemmen. Sicher kann an dieser Stelle nur postuliert werden, dass die Inhibierung nicht-kompetitiv erfolgt (s.  $IC_{50}$ -Bestimmungen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen, Dixon-Plot in Abbildung 74) und dass die h-PTP  $\beta$  Phosphatase deutlich stärker als die MPTPB inhibiert wird.

### **3.2.4 Bereitstellung von Phosphatasen für das Roboterscreening in Kooperation mit der Dortmund Protein Facility**

In Kooperation mit der Dortmund Protein Facility (DPF; Zentrale Einrichtung des MPI in Dortmund) wurde für die bereits als Proteinpräparation vorhandenen Phosphatasen PTP1B, PP1 und VHR ein geeigneteres Expressionssystem gesucht, um die Aufreinigung zu erleichtern bzw. ggf. die Löslichkeit zu verbessern. Ferner wurde versucht, die Cdc14B zu exprimieren. Diesbezüglich wurde zunächst die DNA-Synthese bei Mr. Gene (Regenburg, D) in Auftrag gegeben. Für den Syntheseauftrag (Cdc14B) wurden die folgenden Einstellungen gewählt:

- Mr. Gene Cloning Sites (Standard): 5' Cloning site KpnI, 3' Cloning site SacI
- Codonoptimierung für *E. coli* (Expression)
- Ausschluss der 10 häufigsten Schnittstellen

Die hierfür erforderlichen Sequenzinformationen wurde der folgenden Veröffentlichung von Gray, Tonks und Barford (2003) <sup>[147]</sup> entnommen, die der Cdc14B-Sequenz, die unter Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/O60729>) abgelegt ist, entspricht.

Auf diese Weise sollten dann Phosphatasen für ein neues geplantes Hochdurchsatzscreening mit dem abteilungseigenen Roboter zur Verfügung gestellt werden bzw. eventuell Inhibitoren für die Cdc14B gesucht werden, für die bisher noch keine solchen beschrieben worden sind.

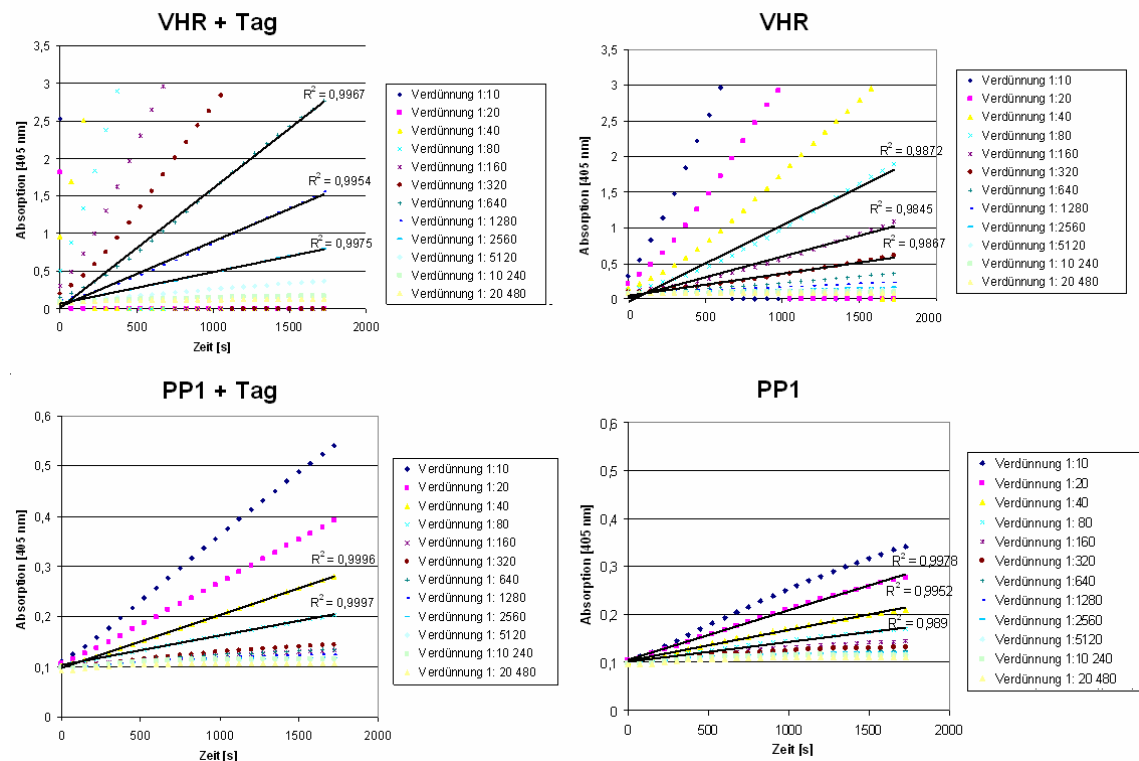
Nach der erfolgreichen *E. coli* Transformation zur Vermehrung der in Plasmiden klonierten cDNA und der anschließenden Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte die Umklonierung der cDNAs der Phosphatasen PP1, PTP1B, VHR in die Vektoren pOPINE, pOPINF, pOPINM, pOPINS. Analog dazu wurde versucht die Cdc14B-cDNA in diese Vektoren zu klonieren.

Dabei konnten die cDNAs für VHR und die PP1 jeweils erfolgreich durch die DPF in den Vektor pOPINS kloniert werden und letztlich deren Proteine bei 25 °C und nach Autoinduktion exprimiert werden. Die PTP1B Umklonierung scheiterte wiederholt aufgrund von Problemen bei der Primerbindung bei der PCR zur Vervielfältigung der

PTP1B cDNA und bei der Cdc14B Klonierung wurde nach der anfänglichen PCR zur Vervielfältigung der Sequenz immer wieder ein verkürztes PCR-Degradationsprodukt anstelle der eigentlichen Sequenz eingebaut, so dass in letzteren beiden Fällen keine Expression dieser Phosphatasen stattfinden konnte.

### 3.2.4.1 Aktivitätskontrolle der rekombinant exprimierten VHR und PP1 jeweils mit und ohne Tag

Um die Aktivität der von der DPF aufgereinigten Phosphatasen VHR und PP1 zu überprüfen, fand mit beiden Phosphatasen – jeweils mit und ohne His- und SUMO-Tag – eine Messung ihrer Aktivität bei verschiedenen Enzymkonzentrationen und unter geeigneten Bedingungen statt (siehe 2.2.4.1).



**Abbildung 77: Aktivitätstest Ermittlung der geeigneten Enzymkonzentration für VHR und PP1 jeweils mit und ohne Tag.** Die Umsetzung unterschiedlicher Substratmengen durch die verschiedenen Phosphatasen bei unterschiedlichen Enzymverdünnungen konnte durch die damit verbundene Absorptionsänderung bei 405 nm verfolgt werden. In der Abbildung wurde die Absorptionsänderung gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Ein linearer Anstieg der Messwerte deutet auf geeignete Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Enzymkonzentrationen hin.

Beide Phosphatasen waren sowohl mit dem His-SUMO-Tag für die Aufreinigung, wie auch nach seinem Entfernen aktiv und können demzufolge für das Roboterscreening in den folgenden Konzentrationen eingesetzt werden: 0,51 mg/ml VHR mit Tag, 0,13mg/ml VHR, 0,04 mg/ml PP1 mit Tag und 0,03 mg/ml PP1.

## 4. Diskussion

In der Chemischen Biologie sollen Substanzen, die anhand von Naturstoffen oder durch Kombinatorische Chemie erzeugt wurden, entweder als Werkzeug für ausführliche biologische Untersuchungen dienen oder im Falle eines aufgefundenen, therapeutisch relevanten biologischen Effekts als "Leitstruktur" für die Entwicklung neuer Medikamente eingesetzt werden.

Der Forschungsansatz der Chemischen Genetik beinhaltet dabei eine Kombination chemischer und genetischer Methoden, mit dem Ziel, die Funktion der Proteine und ihre Wechselwirkung mit niedermolekularen Substanzen (Modulatoren) aufzuklären.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte sowohl der Ansatz der vorwärtsgerichten, als auch der Ansatz der rückwärtsgerichteten chemischen Genetik unter Verwendung verschiedener biologischer Testsysteme und Naturstoffklassen zum Einsatz kommen.

Zum einen wurde durch *in vivo* Untersuchungen innerhalb des vorwärts gerichteten chemisch genetischen Ansatzes die Modulation des Ras/MAPK-Signalweges in MDCK-F3-, HeLa- bzw. HLR-Zellen und PC12-Zellen durch den Naturstoff Melophlin A näher charakterisiert. Hier standen zunächst verschiedenste Testsysteme zur Verfügung, die es ermöglichten, in den komplexen, zellulären Systemen Veränderungen von bestimmten Prozessen zu detektieren: So wurden morphologische oder prozessabhängige Veränderungen durch die Behandlung mit Tetransäuren bei den PC12-Zellen durch Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie durch unspezifische Färbung mit Coelestinblau im zellulären Kontext sichtbar gemacht. Weiter konnte der Signaltransduktionsweg und der Effekt der Tetransäuren auf diesen mit Hilfe des Ras/MAPK Pathdetect<sup>®</sup> Reportergen-Assay in HeLa- bzw. HLR-Zellen untersucht werden. Für alle Zelllinien wurden phospho-spezifische MAPK-Antikörper genutzt, um die Phosphorylierung und damit die Aktivität der Kinase ERK nach Behandlung mit Melophlin A in der Zelle nachzuweisen.

Zum anderen sollte mittels *in vitro* Untersuchungen innerhalb des rückwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes, die Funktionsänderung und damit in diesem Fall die Inhibierung von Phosphatasen durch Spirooxindole untersucht werden. Die Detektion erfolgt hier über die Erfassung von Absorptions-Änderungen mit optischen Systemen.

Bei diesen ersten biochemischen und zellbasierten Testverfahren konnte jeweils für die Tetransäuren, im Speziellen für Melophlin A sowie für die Spirooxindole eine potentielle Wirkung festgestellt werden. Das war der Ausgangspunkt für genauere,

z.B. kinetische Analysen und im Fall von Meloplin A für die Suche nach dem molekularen Ziel.

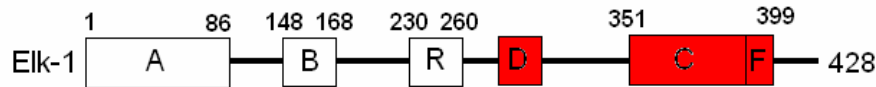
## **4.1 Meloplin A oder der vorwärts gerichtete chemisch genetische Ansatz**

### **4.1.1 Ras/MAPK-Reportergen-Assay in HLR-Zellen**

Unter Verwendung der PathDetect<sup>®</sup> HLR-Elk-1-Zelllinie der Firma Stratagene konnte die Wirkungsweise der Tetransäurebibliothek auf die EGF induzierte Signalweiterleitung bis zum Transkriptionsfaktor Elk-1 untersucht werden.

Der Elk-1 Transkriptionsfaktor gehört zur TCF-Unterfamilie (*ternary complex transcription factors*) und besitzt sechs strukturell verschiedene Domänen (siehe Abbildung 78). Die N-terminale A-Domäne bildet 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. 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. Bei dem artifiziellen Reportergenkonstrukt sind drei der beschriebenen Domänen, A, B und R, allerdings nicht vorhanden, sondern lediglich die Domänen D, C und F. Sie sind mit der GAL4-Bindedomäne fusioniert. Dadurch, dass in der Reportergen-Zelllinie nur die D-, C- und F-Domäne vorhanden sind, wird das System nur durch die Aktivität der entsprechenden MAP-Kinasen und der Phosphatase Calcineurin reguliert. <sup>[148]</sup>

Somit wird das System auf die durch EGF induzierten Signalkaskaden fokussiert, es spiegelt aber gleichzeitig auch nicht die komplette Regulation des Wildtypproteins wieder, wenngleich schon ein weiter Bereich von wichtigen Prozessen erfasst wird. Durch die Verwendung des GAL4-Systems kann der Signalhintergrund zudem beträchtlich minimiert werden, weil dieser Transkriptionsfaktor nicht natürlich in Säugerzellen exprimiert wird.



**Abbildung 78: Struktur des Elk-1 Transkriptionsfaktors.** (Modifiziert nach Sharrocks, 2002)

<sup>[149]</sup> Die sechs konservierten Domänen sind als Rechtecke dargestellt und die Positionen anhand der entsprechenden Aminosäurenummerierungen angegeben. Die N-terminale A-Domäne ist die DNA-Bindedomäne. Die B-Domäne dient zur Interaktion mit SRF und die R-Domäne ist eine Repressions-Domäne. Die C-terminale C-Domäne ist für die transkriptionelle Aktivierung verantwortlich und enthält Phosphorylierungsstellen für die MAP-Kinasen. Diese können an die Sequenzen der D- und F-Domäne binden. Die rote Markierung deutet das Vorhandensein bei dem artifiziellen Reporter-genkonstrukt an. D.h. D, E und F sind vorhanden, wohingegen A, B, R dort nicht vorkommen.

Melophlin A und 13 Tetransäurederivate führten im Reporter-gen-Assay jeweils zu einer Inhibierung der Elk-1-Transkription ohne dabei zytotoxisch zu sein. D.h. diese Substanzen hemmen den durch EGF-aktivierten Signalweg oberhalb von Elk-1.

Da die Elk-1-Aktivierung aber nicht nur über den Ras-Signalweg und die Kinase ERK1/2, sondern auch über andere MAPKs wie JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und p38 erfolgen kann <sup>[150, 151]</sup>, kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, wo und auf welche Weise dies genau geschieht.

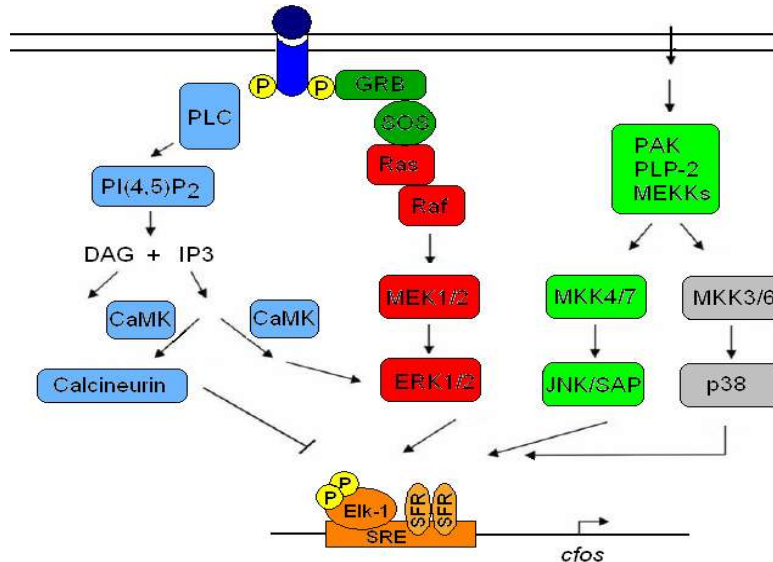
Die Wirkung auf letztere Kinasen und die entsprechenden Signalwege ist jedoch unwahrscheinlicher, weil sie vor allem durch Stress <sup>[152]</sup> und in seltenen Fällen durch EGF <sup>[153, 154]</sup> aktiviert werden.

Insgesamt ist das erhaltene Reporter-gensignal das Ergebnis aus der Verrechnung von vielen unterschiedlichen Faktoren. Bei der Ras/MAPK-Signalkaskade handelt es sich keineswegs um einen streng linearen Signalweg von der Plasmamembran aus. So können Ras und ERK von verschiedenen Zellkompartimenten aus aktiviert werden und durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) die Ras/ERK-Signaltransduktion von dieser Stelle aus modulieren. Weiterhin sind verschiedene Gerüstproteine beschrieben, die eine kritische Rolle spielen, wenn es um die Stärke, die Dauer und die Lokalisation des RTK-vermittelten ERK Signaltransduktion geht. <sup>[155]</sup>

Ferner handelt es sich um ein dynamisches, komplexes System, bei dem die angesprochenen MAPK-Signalwege (p38, JNK, ERK) nicht streng isoliert voneinander betrachten werden können, weil eine gegenseitige Beeinflussung der Signalwege untereinander möglich ist. Schließlich ist auch der Einfluss durch weitere Signalwege und Faktoren nicht ausgeschlossen. So wurde beispielsweise eine positive Regulierung von ERK1/2 über die Proteinkinase C (PKC) beschrieben. <sup>[156]</sup> Außerdem



kann die Phospholipase C $\gamma$  (PLC) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) spalten, wodurch Ca<sup>2+</sup> durch IP<sub>3</sub> freigesetzt wird. In der Folge wird einerseits ERK1/2 durch die Calmodulin Kinase aktiviert und andererseits Elk-1 über die Phosphatase Calcineurin inhibiert. <sup>[157, 158]</sup>



**Abbildung 79: Schematische Darstellung von Signalwegen, welche die Aktivität von Elk-1 kontrollieren.** (Modifiziert nach Yordy, Muise-Helmericks, 2000) <sup>[159]</sup> Aktivierung der Signalwege über ERK1/2 JNK/SAP und p38 führen zu einer positiven Regulierung von Elk-1. Die Freisetzung von intrazellulären Ca<sup>2+</sup> durch IP<sub>3</sub> führt einerseits zu einer Aktivierung von ERK1/2 und andererseits zu einer Inhibition von Elk-1 über die Phosphatase Calcineurin. PLC: Phospholipase C, PI(4,5)P<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trisphosphat, CaMK: Calmodulin Kinase, DAG: Diacylglycerol, MKK: MAP Kinase Kinase, PAK: p21 aktivierte Kinase, PLP-2: Proteolipid Protein 2, MEKK: MEK Kinase, SRE: Serum Response Element, SRF: Serum Response Factor, P: Phosphat.

Zusammen genommen sind all diese Faktoren im *in vivo*-System wichtig, damit die Zellen auf unterschiedliche Situationen schnell und mit unterschiedlichen biologischen Reaktionen immer passend agieren können.

#### 4.1.2 Morphologischer Effekt auf H-Ras transformierte MDCK-Zellen

Mittels eines phänotypischen Assays untersuchte Dr. Tanja Knoth die Wirkungsweise von Meloplin A und verschiedener Tetramsäurederivate auf die Signalweiterleitung durch onkogenes H-Ras anhand der Zellmorphologie. Die verwendeten MDCK-F3-Zellen sind analog zu den NIH3T3-Zellen, mit denen Aoki et al. <sup>[51]</sup> die ersten

Experimente durchführten, *H-Ras* transformiert. Die *Ras*-Transformation insbesondere von Epithelzellen (MDCK = Nierenepithel Hund) durch onkogenes *Ras* führt dabei unter Mitwirkung von TGF $\beta$ -Rezeptor-Signalen (transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ ) zu epithelial-mesenchymaler Transition (EMT). Die EMT ist charakterisiert durch eine spindelähnliche Zellgestalt, den Verlust epithelialer Marker und die Induktion mesenchymaler Marker. <sup>[160]</sup>

Zu den Effekten der neoplastischen Transformation in Fibroblasten zählen das ankerunabhängige Wachstum und der Verlust der dichteabhängigen Wachstumskontrolle. Die Proliferation der Zellen wird bei hoher Dichte nicht gehemmt und es bilden sich fokal wachsende Zellaggregate (Foci). Die verschiedenen *Ras*-Gene zeigen dabei je nach Zelltyp ein unterschiedliches Transformationspotential. <sup>[161]</sup> Permanent aktives, onkogenes *H-Ras* führt zu anhaltenden transkriptionellen Veränderungen, wodurch zelluläre Gene entweder stärker oder schwächer exprimiert werden. <sup>[162, 163]</sup>

Wie bereits für die *H-Ras*-transformierten NIH3T3-Zellen beschrieben <sup>[51]</sup>, konnte Melophlin A den durch die Transformation hervorgerufenen Effekt revertieren. Zwei strukturell sehr ähnliche Derivate hatten den gleichen Effekt, d.h. die fibroblastenartige Morphologie der transformierten Zellen wurde wieder aufgehoben und die mit den Substanzen behandelten Zellen glichen wieder den Wildtyp-MDCK-Zellen mit einer epithelialen Morphologie. Die Ursache für diese Wirkung auf *Ras*-transformierte Zellen bzw. den *Ras*-Signalweg sollte in weiteren Untersuchungen z.B. bezüglich der ERK-Aktivität in den MDCK-F3-Zellen (Westernblot-Analyse) geklärt werden. An dieser Stelle ist jedoch die Beobachtung, dass es sich bei beiden *Ras*-transformierten Zelllinien um die *H-Ras*-Isoform handelte, wichtig anzumerken, weil diese Tatsache später noch eine Rolle spielen wird (4.1.5).

### 4.1.3 Aufstellen einer Struktur-Wirkungs-Beziehung

Wie zuvor beschrieben hatten nur Melophlin A selbst und zwei strukturell sehr ähnliche Analoga einen revertierenden Einfluss auf den transformierten Phänotyp der MDCK-F3-Zellen. Beim mit dem Reporter-gen-Assay untersuchten Effekt der Substanzen auf den Signalweg oberhalb des Transkriptionsfaktors Elk-1 konnte Melophlin A und 13 Derivate als aktiv ermittelt werden. Es gab also mehr Substanzen, die im Reporter-gen-Assay inhibierten, als solche die die Rücktransformation auslösten. Dies legt nahe, dass der Rücktransformation im Vergleich zum Reporter-gen-Assay, in dem durch das künstliche System mit den drei ausgewählten Elk-1 Domänen und durch die Art der Aktivierung eine Fokussierung auf EGF-

aktivierte Signalkaskaden stattfindet, ein komplexerer zellulärer Mechanismus zugrunde liegt und sie dadurch empfindlicher gegenüber Veränderungen der Modulatorstruktur macht. Dennoch konnten, bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehung in beiden biologischen Testsystemen vergleichbare Trends festgestellt werden.

#### **4.1.4 Untersuchungen zur Beeinflussung des Ras/MAPK-Signalwegs in PC12-Zellen**

Die PC12-Zelllinie stellt ein weiteres Modell zur Untersuchung der Wirkung von Melophrin A auf den Ras-Signalweg dar. Verschiedene zelluläre Effekte wurden zunächst visuell überprüft. So fanden Untersuchungen hinsichtlich einer Wirkung auf die NGF-ausgelöste Differenzierung oder die EGF-ausgelöste Proliferation sowie eine verschiedene Aspekte umfassende kombinatorische Analyse statt. D.h. man konnte feststellen, wie sich Melophrin A einzeln bzw. in Kombination mit dem MEK-Inhibitor U0126 auf ansonsten unbehandelte oder mit NGF bzw. EGF aktivierte Zellen verhielt. Bei all diesen Experimenten wurde ganz klar ein antagonistischer Effekt im Bezug auf die PC12-Zellen deutlich: Das heißt Melophrin A stimulierte auf der einen Seite die Differenzierung und inhibierte auf der anderen Seite die Proliferation. Dieser Effekt tritt auch natürlicherweise in Kombination auf, da die Neuritenbildung immer auch eine Unterdrückung der Zellvermehrung bedeutet. Beide Wirkungen scheinen also durch die Behandlung verstärkt zu werden.

Ferner kann durch die Behandlung mit Melophrin A der hemmende Effekt des MEK Inhibitors U0126 auf das Neuritenwachstum aufgehoben werden. Dies lässt darauf schließen, dass der Wirkungsort des Naturstoffs unterhalb der Kinase MEK liegt.

Ferner wurde auch der Phorbolester PMA als zusätzliches Stimulanz verwendet, um ERK über die Proteinkinase C (PKC) zu aktivieren.<sup>[164]</sup> Auf diese Weise sollte ein möglicher Einfluss auf die PKC Aktivität aufgrund einer zufällig beobachteten morphologischen Ähnlichkeit zwischen mit Melophrin A und Staurosporin (u.A. PKC Inhibitor) behandelten PC12-Zellen genauer untersucht werden.

Eine wichtige Funktion für PKC besteht in der neuronalen Differenzierung. Diese Funktion wurde zunächst von der Tatsache abgeleitet, dass das Gehirn eines der PKC-reichsten Gewebe darstellt. Dort werden die einzelnen PKC-Isoenzyme im Verlauf der Differenzierung unterschiedlich exprimiert.<sup>[165]</sup> Ferner hatte man festgestellt, dass neuroendokrine PC12-Zellen durch den Nervenwachstumsfaktor (NGF) zur Ausbildung von neuritenartigen Ausläufern angeregt werden konnten und dass dieser Prozess durch PMA verstärkt oder durch PKC-Inhibition vermindert

werden konnte.<sup>[166]</sup> Es konnten jedoch keine Veränderungen im Vergleich zur DMSO Kontrolle beobachtet werden. Somit kann ein Einfluss auf die von Bastiaens et al. beschriebene positive Rückkopplungsschleife<sup>[31]</sup> bzw. ein möglicher Einfluss auf das Signalnetzwerk an dieser Stelle ausgeschlossen werden.

Dies bestätigte darüber hinaus auch erneut einen möglichen Wirkort unterhalb der Kinase MEK, den die Reversion des U0126-Effektes durch Melophlin A nahe legt. Der phänotypischen Ähnlichkeit der Reaktion nach Behandlung mit Melophlin A und Staurosporin liegt wahrscheinlich eine komplexere Ursache zugrunde. Diese Richtung wurde aber nicht weiter verfolgt, da Staurosporin an sich sehr unspezifisch wirkt und z.B. verschiedene Kinasen inhibiert.<sup>[140,141]</sup> Weiterhin besitzt die PKC andere Effektoren als den Ras/MAPK-Signalweg<sup>[142]</sup>, so dass es schwierig wäre Schlüsse aus dem Vergleich beider Substanzen zu ziehen.

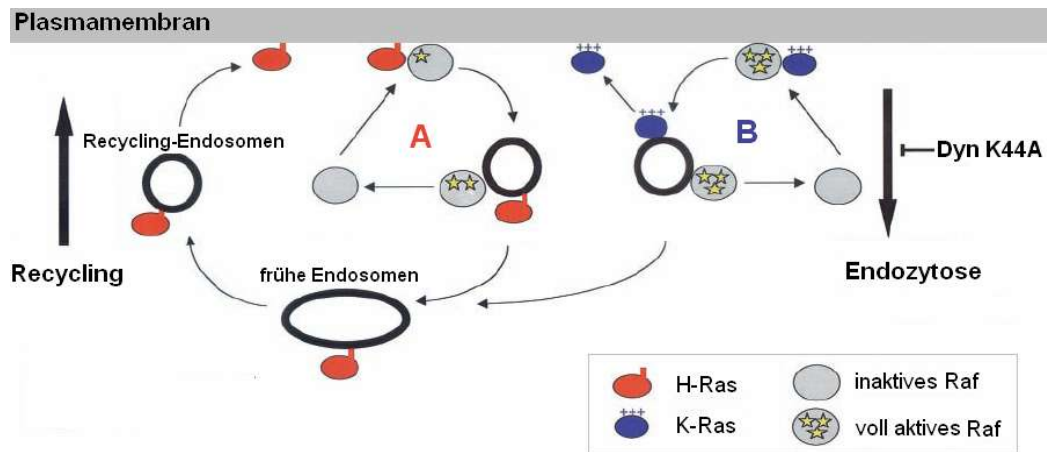
#### **4.1.5 Untersuchung der ERK1/2-Aktivität**

Da man durch die bisherigen Untersuchungen nur einen ersten Anhaltspunkt über den Effekt von Melophlin A auf den Ras/MAPK-Signalweg hatte, wurde versucht, anhand der ERK1/2-Phosphorylierung, ein genaueres Bild des Ansatzpunktes im Signalweg zu erhalten. Es zeigte sich, dass die Aktivität von ERK1/2 in MDCK-F3-, HeLa- und PC12-Zellen nach kurzzeitiger d.h. 30- bis 60-minütiger Behandlung mit Melophlin A unbeeinträchtigt blieb. Hingegen führte eine langfristige 16- bis 18-stündige-Behandlung zur Inhibierung der Kinase in MDCK-F3- und HeLa-Zellen nicht aber in den PC12-Zellen. Dieser indirekte, verspätete Einfluss auf die ERK Aktivität als sekundäre Reaktion lässt sich erklären, wenn die Ergebnisse zusammen mit den von Dr. Tanja Knoth im Rahmen ihrer Dissertation erhaltenen Ergebnissen betrachtet werden. Sie konnte mittels der Affinitätsaufreinigung, einer direkten Methode zur Identifizierung eines Bindungspartners, eine Interaktion von Melophlin A mit Dynaminen feststellen, die die Hemmung endozytotischer Prozesse bewirkte. Die Westernblot Ergebnisse bestätigen, dass wie in der Literatur beispielsweise für inaktive Dynamin-Mutanten beschrieben, die Hemmung der Endozytose zu einer Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 führen kann. So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Ras-Signaltransduktion nicht allein von der Plasmamembran aus, sondern auch über die Endosomen stattfindet.<sup>[33, 167]</sup>

Dies ist besonders interessant, weil somit gerade die H- und N-Ras, aber nicht die K-Ras Signaltransduktion von der Endozytose abhängig ist.<sup>[33, 168]</sup> (Abbildung 80)

Dies erklärt dann auch speziell den Effekt von Melophlin A als Endozytose-Modulator auf die H-Ras transformierten MDCK-F3 und NIH3T3-Zellen. Hätte man auch K-Ras

transformierte Zellen zur Verfügung, ließe sich dies noch zusätzlich, auf relativ einfache Art weiter untersuchen und ggf. bestätigen.



**Abbildung 80: Modell zum differenziellen endosomalischen Transport von H- und K-Ras.** (Roy, Wyse, Hancock, 2002) <sup>[169]</sup> Im Kreislauf A rekrutiert aktiviertes H-Ras Raf zur Plasmamembran, wo Raf dann aktiviert wird. H-Ras und Raf werden zusammen internalisiert, weil sie dieselben Mikrodomänen für die Plasmamembran besitzen. Raf wird direkt von den Endosomen in Zytosol freigegeben, während H-Ras aufgrund seines C-terminalen Membranankers auf endozytotisches Recycling angewiesen ist, um zur Plasmamembran zurückzukehren. Die Endozytose des H-Ras/Raf Komplexes ist also für die H-Ras vermittelte Raf Aktivierung nötig. Im Kreislauf B rekrutiert aktiviertes K-Ras Raf an die Plasmamembran. Die Raf Aktivierung wird in der K-Ras Mikrodomäne initiiert und komplettiert. K-Ras und aktiviertes Raf werden zusammen durch Endozytose aufgenommen. K-Ras diffundiert anschließend direkt entlang des elektrostatischen Gradienten an die negative geladene Plasmamembran zurück. Raf wird durch die Endosomen ins Zytosol abgegeben. Das K-Ras Recycling ist demzufolge nicht abhängig von der Endozytose. Die Inhibition der Endozytose durch die dominant negative Dynamin-Mutante wird durch den Pfeil angedeutet.

Ferner wird ersichtlich, warum die Inhibition der Kinase ERK bei den MDCK-F3-Zellen nicht direkt, sondern erst indirekt als sekundäre Reaktion nach längerer Inkubationszeit mit Melophlin A erfolgt. Die Endozytose spielt insgesamt, so auch in den HeLa-Zellen, auf verschiedenen Ebenen der Ras-vermittelten Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade eine Rolle. Zum einen bei der Rezeptorinternalisierung und zum anderen bei der Kompartimentierung des Signalwegs, da einzelne Komponenten an Endosomen lokalisiert sind und/oder von dort aus wirken. Wie die Inhibition der Endozytose durch die Überexpression von inaktiven Dynamin (Mutante K44) zur Unterdrückung der ERK Phosphorylierung führt, dazu gibt es allerdings

unterschiedliche Theorien. Eine besagt, dass die Dynamin Inhibierung die EGFR Internalisierung und dadurch die Ras Aktivierung verhindert. <sup>[170]</sup>

Eine andere besagt, dass die Dynamin Inhibierung den endosomalen Transport von an der Plasmamembran aktiviertem MEK durch das Zytosol hin zu ERK und damit dessen Aktivierung verhindert. <sup>[171]</sup>

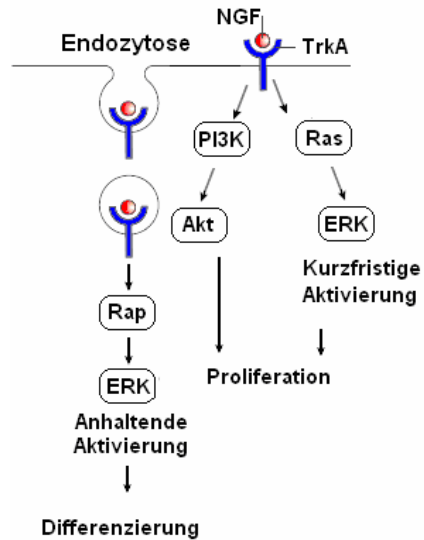
Wieder eine andere Theorie bezieht sich auf den Transport der H-Ras/Raf Komplexe, die das endosomale Kompartiment erreichen müssen, um die MEK/ERK Aktivierung, die an der Plasmamembran initiiert wurde, zu komplettieren. <sup>[169]</sup>

Somit wird auch die Unterdrückung der ERK-Aktivierung in HeLa-Zellen erklärbar. Das heißt, die mit für die MDCK-F3- und HeLa-Zellen erhaltenen Ergebnisse der Phänotyp-, Reporter-gen-Assay-, Affinitätsaufreinigungs- und Westernblot-Experimente zeigen eindeutig einen Zusammenhang zwischen der Meloplin A-Behandlung, der Endozytose-Hemmung durch Interaktion mit Dynaminen und der indirekten Inhibierung der Kinase ERK1/2 und stimmen somit mit den beschriebenen Theorien in diesem Zusammenhang überein.

Offen bleiben an dieser Stelle Fragen, deren Beantwortung weitere Einblicke in die Regulation dieses Signalweges geben können: Was passiert in den PC12-Zellen nach Meloplin A Behandlung? Warum wird die Differenzierung verstärkt und die Proliferation abgeschwächt? Warum ist nach einer Stunde und nach über-Nacht-Behandlung mit der Substanz als Dynamin-Modulator (zumindest in HeLa- und wahrscheinlich in MDCKF3-Zellen) keine Inhibierung oder Stimulierung der ERK Phosphorylierung zu beobachten? Warum führt die Behandlung der PC12-Zellen mit Meloplin A nicht zu einem Rückgang der Differenzierung wie ihn Hancock et al. <sup>[169]</sup> für die Dynamin Mutante K44 in PC12-Zellen beschreiben?

Vielleicht helfen die Arbeiten von Segal et. al. <sup>[172]</sup> im Ansatz weiter: Sie benutzten eine temperatursensitive Dynamin-Mutante (G273D) und konnten zeigen, dass die Dynamin-Funktion für die ligandenabhängige Endozytose des Trk Rezeptors nötig ist. Sie beschreiben, wie die unterschiedlichen Effekte (Proliferation, Differenzierung) durch Signalrezeptoren von unterschiedlichen Stellen innerhalb der Zelle kontrolliert werden. Die neuronale Differenzierung wird durch katalytisch aktive Trks in den Endosomen innerhalb der Zelle reguliert. Im Gegensatz dazu wird die Zellteilung durch aktivierte Rezeptoren an der Zelloberfläche initiiert, wo sie die verlängerte Aktivierung der Kinase Akt lenkt.

Zusammen mit der Arbeit von Gonzalez-Gaitan <sup>[173]</sup>, der allgemein den Einfluss der Endozytose auf die Signaltransduktion beschreibt, lässt sich folgendes in Abbildung 81 dargestelltes Schema entwickeln.



**Abbildung 81: Unterschiedliche Signalkinetiken in PC12- Zellen**

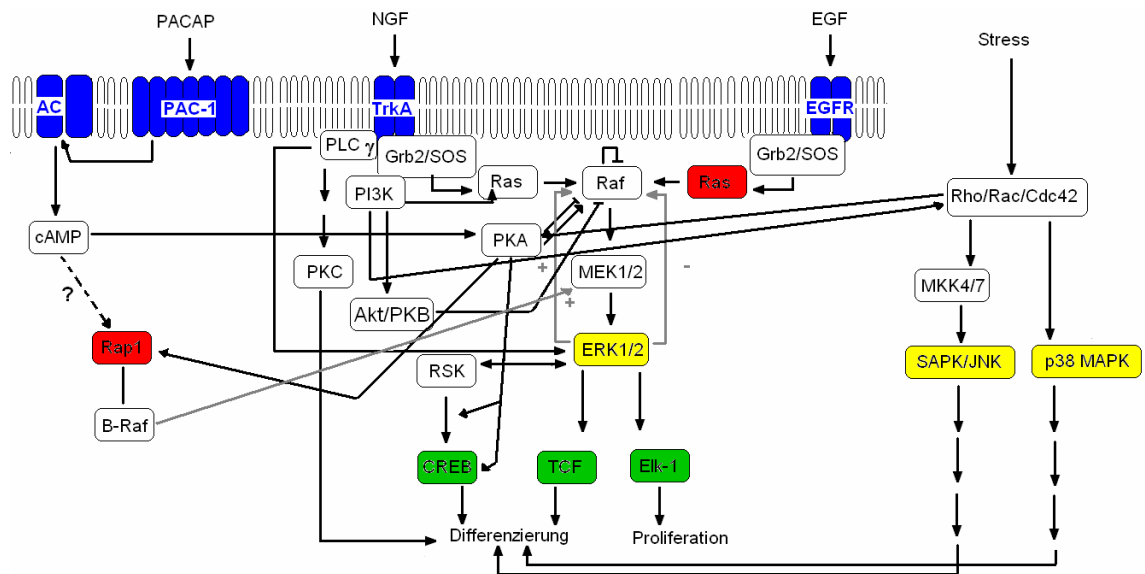
In PC12 Zellen führt die Bindung von NGF an den TrkA Rezeptor entweder zur Proliferation oder zur Differenzierung. Die Aktivierung des Rezeptors an der Plasmamembran führt zur kurzfristigen Aktivierung von ERK über einen Signalweg, der Ras beinhaltet. Die kurzfristige Aktivierung von ERK führt zur Vermehrung der Zellen. Die Proliferation kann außerdem auch durch Akt, welches über PI3K aktiviert wird, ausgelöst werden. Wird dagegen der Rezeptor durch Endozytose internalisiert, wird eine anhaltende Aktivierung von ERK über Rap (eine Ras ähnliche GTPase) ausgelöst. Die langanhaltende ERK Aktivierung führt zum Neuritenwachstum.

Die beschriebenen Beobachtungen helfen in Ansätzen die eigenen zu verstehen: Zum einen wird deutlich, dass es ein Zusammenhang zwischen der Differenzierung und der Proliferation besteht, insofern als dass beide gegensätzlich reguliert werden. Zum anderen spielt die Endozytose eine Rolle, weil sie die Lokalisation einzelner Komponenten bestimmt. Schließlich spielt auch die Dauer der ERK-Aktivierung eine entscheidende Rolle für die zelluläre Antwort. Dazu wurde beobachtet, dass bei der Inkubation von PC12-Zellen mit Meloplin A die Differenzierung und Proliferation gegensätzlich reguliert werden. Das Neuritenwachstum wird noch weiter angeregt, die Vermehrung der Zellen noch stärker inhibiert. Ferner ist bekannt, dass Meloplin A in HeLa-Zellen mit Dynaminen interagiert und die Endozytose und ERK-Aktivierung inhibiert (vergleichbar MDCK-F3). In PC12-Zellen konnte aber im Laufe einer Stunde bzw. nach über-Nacht-Behandlung mit der Substanz keine Veränderung der ERK-Aktivität beobachtet werden. Das heißt, dieser PC12-Zell-spezifische Effekt lässt sich weder mit dem obigen Modell noch mit einer offensichtlichen Wirkung auf den Ras/ERK-Signalweg erklären.

Zur Überprüfung, ob der Effekt eventuell in den PC12-Zellen gar nicht mit einer Dynamin-Interaktion zusammenhängt, wurden die PC12-Zellen analog zu Meloplin A mit dem Dynamin-Inhibitor Dynosore behandelt. Dabei zeigte sich, dass Dynosore zumindest in hohen Konzentrationen (50 und 100µM) einen sehr ähnlichen Effekt wie Meloplin A selbst hervorrief. Demzufolge kann eine Dynamin-Interaktion und wahrscheinlich auch Inhibierung durch Meloplin A auch für PC12-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Der Effekt lässt sich allerdings nach wie vor nicht oder nicht mit einem direkten Einfluss von Meloplin A auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Weg erklären.

Wo die Substanz gewissermaßen als Schalter zwischen Differenzierung und Proliferation bzw. verstärkend auf die beiden Effekte wirkt konnte anhand der Untersuchungen nicht geklärt werden. Es wurde lediglich deutlich, dass beispielsweise die ERK-Aktivität zumindest nach 5 bis 60 min und auch nach 16 Stunden Inkubation mit Meloplin A nicht verändert ist.

Das Signalnetzwerk in PC12-Zellen ist, wie in Abbildung 82 angedeutet allerdings sehr komplex. So wird auch ersichtlich, dass noch zahlreiche Angriffsmöglichkeiten für Meloplin A, als Ursache für die beobachteten Effekte möglich sind.



**Abbildung 82: Das komplexe Signalnetzwerk in PC12-Zellen.** Dargestellt sind u.A. verschiedene Rezeptoren (EGFR, TrkA, PACAP in blau dargestellt), verschiedene Effektoren (Ras, Rap, rot dargestellt) verschiedene involvierte MAP-Kinasen (ERK1/2, p38 MAPK, SAPK/JNK, in rot dargestellt), der kritischen Dauer der ERK-Aktivität (graue Pfeile) und verschiedene Transkriptionsfaktoren (CREB, TCF, Elk-1, in grün dargestellt)



Zur genaueren Untersuchung der Reaktionen des Netzwerks nach Behandlung mit Meloplin A, könnten beispielsweise ähnlich wie für ERK, phosphospezifische Westernblots mit Akt-, JNK- und p38-Antikörpern durchgeführt werden. Möglich wäre auch ein sogenannter Ras-, Rac- oder Rho-Aktivitätstest, mit dem über die Bindung an eine spezielle Matrix und gezielte Elution spezifisch GTP-gebundenes Protein nachwiesen werden könnte. Somit könnte der Effekt auf verschiedene in Abbildung 82 gezeigte Signaltransduktionswege festgestellt werden. Zeitreihen sowohl für die Behandlung mit der Substanz als auch für die Aktivierung des Signalwegs würden Aussagen über den Reaktions-Verlauf erlauben. Eventuell ließe sich auch feststellen, ob der Signalweg über cAMP betroffen ist. <sup>[174]</sup>

Da zuvor die Aufhebung der U0126 ausgelösten MEK Inhibierung durch Meloplin A beobachtet wurde, könnte man außerdem versuchen die Wirkart und die Wirkung unterhalb von MEK herauszufinden. Dazu müsste eventuell eine erweiterte kombinatorische Analyse mit zusätzlichen Inhibitoren durchgeführt werden.

Die vorgeschlagenen Untersuchungen könnten somit zu der Entdeckung von Komponenten der Signalmodulation führen, welche unabhängig von der Ras/Raf/MEK/ERK-Kaskade, einen wichtigen Einfluss auf die Differenzierung bzw. Proliferation von PC12-Zellen haben.

#### **4.1.6 Indirekte Identifikation von Meloplin A Zielproteinen in PC12-Zellen mittels Mikroarray-Analyse**

Bei der Mikroarray-Analyse wurden Expressionsmuster auf RNA-Ebene in An- und Abwesenheit von Meloplin A verglichen. Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass Meloplin A das Neuritenwachstum bei NGF-Stimulierten PC12-Zellen verstärkte und dieser Effekt nicht erklärbar war, wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt. Hierdurch sollte der Einfluss der Substanz auf das Genexpressionsprofil von PC12-Zellen und ggf. auf NGF induzierte Gene analysiert werden. Die Differenzierung von PC12-Zellen nach Stimulation mit NGF wurde 1976 zum ersten Mal beschrieben. <sup>[117]</sup>

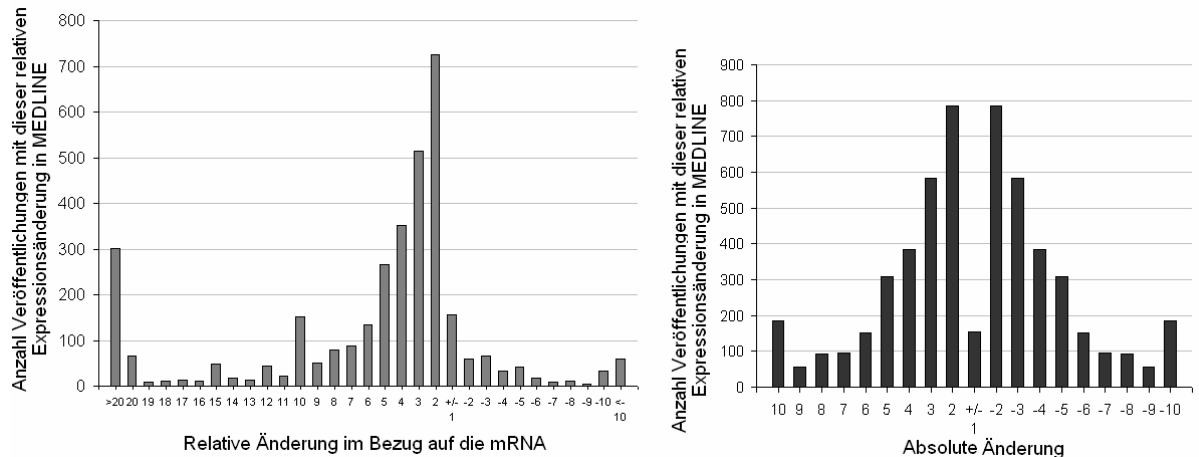
Die morphologische Veränderung durch diese Stimulierung mit NGF wird durch zahlreiche Gene reguliert. Zur Analyse der differentiell exprimierten Gene nach NGF Aktivierung wurden bereits einige Studien durchgeführt. Im Zuge derer wurden neben unterschiedlichen Methoden wie das Genom-Scanning RLGS (*Restriction Landmark Genomic Scanning*) <sup>[175]</sup>, die serielle Analyse der Genexpression (SAGE) <sup>[176]</sup>, EST Sequenzierung <sup>[177]</sup> und cDNA Mikroarray-Analysen <sup>[178]</sup> angewendet, sowie

unterschiedliche Zeitpunkte zur Analyse der NGF induzierten Gene gewählt. So reicht die Zeitspanne von 30 min <sup>[179]</sup> bis zu 12 Tagen <sup>[177]</sup>.

Umfassende Analysen der sogenannten *early response genes* (schnell reagierenden Gene) wurden bisher erstmalig von Dr. Robin Vetter im Rahmen seiner Dissertation am MPI Dortmund durchgeführt. So wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit parallel mit ihm das Genexpressionsprofil von PC12-Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit Meloplin A und 60 minütiger Stimulierung mit NGF analysiert.

Unter günstigen Bedingungen können Zielsequenzen mit bis zu 300.000-fachem Expressionsunterschied detektiert werden. <sup>[180]</sup> Dies war hier nicht der Fall, mit der Mikroarray-Analyse konnte lediglich ein relativ geringer Einfluss des Melophlins A auf die Genexpression festgestellt werden. Es wurden 308 Sequenzen, die eine Veränderung in der Expression von mindestens 1,5-fach und maximal 3,8-fach stärker bzw. 3-fach geringer im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwiesen, gefunden.

Eine geringe relative Expressionsänderung ist aber durchaus üblich, dies geht aus einer Vielzahl von Veröffentlichungen hervor. (Abbildung 83). Daraus kann gefolgert werden, dass die Natur auf eine energiearme Lösung bei der transkriptionalen Kontrolle setzt.



**Abbildung 83: Statistik über die relative Expressionsänderung anhand von Veröffentlichungen.** (Entnommen einer Vorlesung zum Thema Mikroarray von Prof. Dr. J. D. Wren, Ph.D., University of Oklahoma, Norman, OK)

So zeigte beispielsweise eine umfassende Betrachtung durch Zeitreihenuntersuchungen und Clusteranalysen, dass distinkte Expressionsprofile einzelnen Gengruppen zuordnet werden können, da wiederholt solche Gene gemeinsam reguliert werden, deren Produkte für verschiedene Schritte eines gemeinsamen Prozesses verantwortlich sind. <sup>[181]</sup> Ein anderes Beispiel ist die Erstellung von Expressionsprofilen in Hefezellen. Hier gelingt die Zuordnung bislang

uncharakterisierter Gensequenzen zu Prozessen im Steroidstoffwechsel, der Proteinsynthese und der mitochondrialen Atmung.<sup>[182]</sup>

Die Mikroarray-Analyse im Rahmen dieser Arbeit liefert zwar nur eine Momentaufnahme des zellulären Geschehens, dennoch konnten erste Hinweise über potentielle Zielgene erhalten werden. Außerdem konnten die differentiell exprimierten Gene mit Hilfe der Daten in der Rat Genome Data Base<sup>[143]</sup> nach ihrer Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt werden und diese Einteilung wiederum in einen Zusammenhang mit dem verstärkten Neuritenwachstum nach der Behandlung mit Meloplin A gebracht werden.

Diese Einteilung offenbarte im Zusammenhang mit dem verstärkten Neuritenwachstum nach der Behandlung mit Meloplin A, eine Abhängigkeit des Neuritenwachstum von der Signaltransduktion. Es besteht auch ein Zusammenhang mit dem Zellwachstum, der Proliferation und dem Zellzyklus, da die Proliferation während der Differenzierung unterdrückt wird und die Differenzierung zum Wachstum von kleinen zellulären Fortsätzen führt. Hierbei verändert sich das Zytoskelett bzw. der Zellkörper und durch die Neuritenbildung ist ein Zusammenhang zum Nervensystem gegeben. Im Bezug darauf spielen Ionenkanäle, Ionenbindung und –transport eine Rolle für die Depolarisation und neuronale Anregung und z.B. Calciumionen können als sekundärer Botenstoff dienen. Die Beeinflussung der Transkription, der Translation und des Splicing durch niedermolekulare Verbindungen ist oft beobachtet worden und ist Ausdruck eines Einflusses auf das zelluläre, regulatorische Netzwerk. Bezüglich der übrigen Auswirkungen auf den Metabolismus, den zellulären Transport, die Peptidprozessierung usw. ist eine Aussage über den direkten Zusammenhang mit dem beobachteten Effekt schwierig. Diese Funktionen spielen wahrscheinlich auch eher eine untergeordnete Rolle bzw. wirken sich indirekt auf das Wachstum der Neuriten aus.

Zur statistischen Absicherung der Expressionsanalyse durch den einmaligen Mikroarray war die Überprüfung des Ergebnisses (hier durch die quantitative RT-PCR) erforderlich. Ein Vergleich der mit beiden Methoden ermittelten Expressionsdaten zeigte, dass die Daten zu 50 % übereinstimmten. Die Tatsache, dass Mikroarray- und qRT-PCR-Ergebnisse nicht vollständig korrelieren, ja sogar z.T. große Unterschiede festzustellen sind, ist bekannt. Dies kann durch die Unterschiede beider Methoden bezüglich ihrer Eignung zur präzisen Quantifizierung und durch die statistische Auswertung erklärt werden.<sup>[183]</sup>

Der Rho/Rac Guanin Austauschfaktor (A18) und das P11 Gen (P11) werden in mit Meloplin A behandelten NGF-stimulierten PC12-Zellen bestätigt stärker exprimiert, wohingegen der Regulator der G-Protein Signaltransduktion 4 (Rgs4), der Bcl2

modifizierende Faktor (Bmf), die Bcl-2 bindende Komponente 3 (Bbc3) und Frizzled 5 (Fzd5) schwächer exprimiert werden.

Der Rho/Rac Guanin Austauschfaktor spielt unter Anderem für die Aktinzytoskelettorganisation und die Entwicklung eine Rolle und ist von Bedeutung, wenn sich der Zellkörper im Laufe der Differenzierung verändert und sich Neuriten bilden. Somit ist die stärkere Expression nach Meloplin A Behandlung im Einklang mit der Funktion des Rho/Rac Guanin Austauschfaktors. <sup>[184]</sup>

Für das P11 Protein (auch bekannt als S100 A10) ist eine Bindung an den sekundären Botenstoff  $Ca^{2+}$  beschrieben. Darüber hinaus ist seine Rolle für das neuronale Zellwachstum und die Differenzierung sowie seine NGF induzierte Expression bekannt. Auch hier ist also ein Zusammenhang mit der stärkeren Expression in den mit Meloplin A behandelten PC12-Zellen gegeben. <sup>[185]</sup>

Da für den Regulator der G-Protein Signaltransduktion 4 unter Anderem eine negative Regulation der Signaltransduktion über G-Proteine beschrieben wurde <sup>[186-188]</sup>, ist entsprechend eine schwächere Expression und eine stärkere Differenzierungsreaktion denkbar. Ferner könnte auch seine Bindung an Calmodulin, welches wiederum als Calcium-bindendes Protein bei der Signalübertragung über sekundäre Botenstoffe eine Rolle spielt <sup>[189]</sup>, von Bedeutung sein.

Für Rgs14, einen Verwandten von Rgs4, ist sogar eine Beeinflussung der H-Ras vermittelten Neuritogenese und des Ras/MAPK-Signalwegs im Einzelnen beschrieben. <sup>[190]</sup> Inwiefern dies auch auf Rgs4 aufgrund der Familienzugehörigkeit zutrifft, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden.

Der Bcl-2 modifizierende Faktor und die Bcl-2 bindende Komponente 3 stehen beide über Bcl-2 in Zusammenhang mit der Apoptose und der zellulären Stressantwort. <sup>[191]</sup>

Für die Bcl-2 Überexpression werden in PC12-Zellen und neuronalen Zellen morphologische Veränderungen beschrieben. Im Fall der PC12-Zellen zudem eine reduzierte ERK Aktivität. <sup>[192]</sup>

Ferner konnte gezeigt werden, dass molekulare Mechanismen, auf denen die Überlebensfaktorfunktion von NGF aufbaut, der kontinuierlichen Inaktivierung der MAPK p38 als Bcl-2 modifizierendem Enzym unterliegen. <sup>[193]</sup> Diese Tatsache könnte hier vielleicht durch die Herunterregulierung der Expression des Bcl-2 modifizierenden Faktors und der Bcl-2 bindende Komponente 3 gegeben sein.

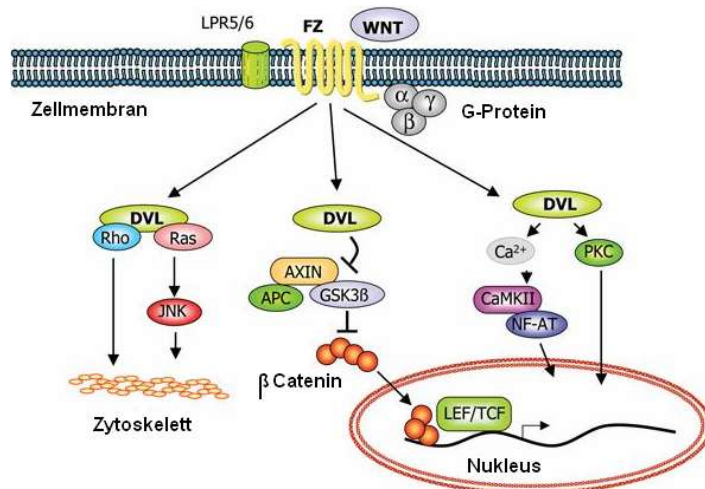
Der Wnt-Signalweg ist wichtig für die axonale Verzweigung, die Dendritenmorphologie und die Synapsenbildung bei neuronalen Zellen. <sup>[194]</sup> Entsprechend könnte auch ein enger Zusammenhang zwischen der Neuritenbildung bei den PC12-Zellen und der Beeinflussung der Fzd5 Expression durch die Meloplin A Behandlung bestehen.

Frizzled 2 und 5 sind die einzigen Frizzled Rezeptoren, die in PC12-Zellen exprimiert werden. <sup>[195, 196]</sup> Folglich sollte Fzd5 mit vielfältigen Reaktionen verknüpft sein.

Beispielsweise könnte der kanonischen oder der nicht-kanonische Wnt-Signalweg aktiviert werden, <sup>[197]</sup> wobei für Fzd5 beschrieben ist, dass es den kanonischen Wnt-Weg nach Stimulation mit Wnt-5a aktiviert. <sup>[198-200]</sup>

Eine beschriebene positive Rückkopplungsschleife <sup>[201]</sup> zwischen dem Wnt- und dem ERK-Signalweg bietet weitere Möglichkeiten, inwiefern sich eine Beeinflussung der Fzd5 Expression auf die PC12-Zellreaktion nach Melophlin A Behandlung auswirken könnte.

In Abbildung 84 sind verschiedene Angriffspunkte zusammengefasst, an denen die Expressionsänderung von Frizzled 5, dem Rac/Rho-Austauschfaktor A18, dem G-Protein Regulator 4 und von P11 zusammengenommen wirken könnte, so dass ein verstärktes Neuritenwachstum über Wachstum-/Entwicklungsprozesse und Veränderungen des Zytoskeletts ausgelöst wird.



**Abbildung 84: Überblick über die Wnt-Signalwege** (Klipp et al. 2006) <sup>[202]</sup> Das extrazelluläre Signalmolekül Wnt aktiviert drei Signalwege: 1) Frühe Entscheidungen über das zelluläre Schicksal werden über den kanonischen Weg (Mitte) kontrolliert: Er beinhaltet die Regulation der Genexpression über  $\beta$ -Catenin vermittelte transkriptionale Aktivität. Die Interaktion von Wnt mit dem Transmembranrezeptor Frizzled (FZ) aktiviert Dishevelled (DVL), was das Auflösen des Komplexes bestehend aus Axin, APC (Adenomatosis polypsis coli), GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) und  $\beta$ -Catenin bewirkt. In nicht-stimulierten Zellen phosphoryliert die GSK3 $\beta$   $\beta$ -Catenin, was zu dessen Abbau führt. Die Aktivierung des Signalwegs bewirkt eine Erhöhung der  $\beta$ -Catenin-Menge im Zytoplasma, von wo es schließlich in den Kern transloziert wird. Hier bildet sich der  $\beta$ -Catenin-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor-Komplex, der die Transkription der Zielgene aktiviert. 2) Der planare Zellpolaritätsweg (links): FZ funktioniert über G-Proteine und aktiviert DVL, welches ein Signal an die Rho GTPasen (Rho, Rac oder beide) weiterleitet. Durch DVL aktiviertes Ras leitet ein Signal über die c-Jun N-Terminale Kinase (JNK) weiter. Die Aktivierung der Rho-Kinasen führt zu Veränderungen des Zytoskeletts. Bei Neuronen ist dieser Signalweg an der Ausrichtung der Dendriten beteiligt. 3) Der Wnt Calcium-Weg (rechts): die Aktivierung von DVL aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und induziert dadurch die Freigabe von intrazellulärem Calcium, welches die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) bewirkt.

Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung von Melophlin A auf die angesprochenen, stärker exprimierten Gene und auf Proteinebene weiter zu charakterisieren, wäre eine Untersuchung des Effekts auf Rac/Rho mittels Rac/Rho Aktivitätsassay. Des Weiteren könnte die Phosphorylierung von durch Rac/Rho aktivierten Enzymen wie z.B. von Akt untersucht werden.

Bezüglich der durch die Behandlung mit Melophlin A schwächer exprimierten Gene gäbe es im Zusammenhang mit der Stressantwort und der Auslösung der

Differenzierung durch JNK und p38, die Möglichkeit die Aktivität dieser Kinasen zu untersuchen.

#### **4.1.7 Wnt Reportergen-Assay**

Der Einfluss von Meloplin A auf den Wnt-Signalweg wurde mittels zweier Reportergen-Assay-Systeme untersucht. Meloplin A inhibierte bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  den kanonischen Wnt-Signalweg in transient transfizierten HEK293-Zellen. Gleichzeitig wirkte Meloplin A bei denselben Konzentrationen d.h. ab ca. 50  $\mu\text{M}$  zytotoxisch, so dass die inhibierende Wirkung sich auf die Toxizität nicht aber auf eine Hemmung des Signalweges beziehen muss. Weiter inhibierte Meloplin A ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  den kanonischen Wnt-Signalweg in den HEK-293-Reportergen-Zellen. Zugleich wirkte Meloplin A hier aber erst ab einer Konzentrationen von 70  $\mu\text{M}$  zytotoxisch, so dass die inhibierende Wirkung hier im Gegensatz zu dem Verfahren mit den transient transfizierten HEK293 Zellen aus der Hemmung des Signalweges resultieren kann.

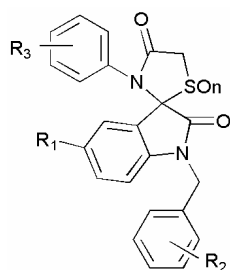
Auch wenn für die beiden Systeme verschiedene Toxizitätsgrenzen festgestellt wurden und auch wenn Unterschiede in der Transfizierungsmethode bestanden (transient vs. stabil transfizierte Zelllinie) ist doch eine gemeinsame Tendenz zu erkennen und ein schwacher inhibitorischer Effekt von Meloplin A auf den Wnt-Signalweg zu beobachten. Inwiefern die Wirkung bei den HEK293-Zellen in Zusammenhang mit der Wirkung bei PC12-Zellen, speziell mit der niedrigen Frizzled 5 Expression steht, kann aufgrund der zelltypspezifische Unterschiede nicht abschließend geklärt werden. Ferner kann aus einem Effekt einerseits auf Rezeptorseite und andererseits auf der Transkriptionsebene nicht bestimmt werden, wo und wie der Signalweg beeinflusst wird, denn auch dieser zentrale Signalweg wird streng kontrolliert und ist mit sechs Rezeptoren – u.A. Frizzled mit verschiedenen Co-Faktoren, der Möglichkeit von Crosstalk etc. sehr komplex reguliert. <sup>[203,204]</sup>

## **4.2 *Der rückwärtsgerichtete chemische genetische Ansatz***

Ein rückwärts gerichteter chemisch-genetischer Ansatz wurde für die Suche nach spezifischen Phosphataseinhibitoren innerhalb von Naturstoffen inspirierten Spirooxindolen genutzt. Im Rahmen eines Roboter-unterstützten Screenings innerhalb der eigenen AG wurden zuvor sieben Spiro-fusionierte-Indol-2-on-Thiazolidinone als MPTPB Inhibitoren identifiziert, die bei physiologischen

Konzentrationen spezifisch MPTPB inhibieren, aber keine Aktivität gegenüber Cdc25, PTP1B, MPTPA, VHR, PP1, SHP-2, VE-PTP bzw. PTPN2 zeigten.

Diese Daten wurden zunächst manuell validiert, bevor ausgehend von der dargestellten Struktur (Abbildung 85) verschiedene, synthetisierte Analoga bezüglich ihrer potentiellen inhibitorischen Wirkung auf MPTPB und 6 weiteren ausgewählten Phosphatasen (MPTPA, PTP1B, VHR, SHP-2, h-PTP  $\beta$  bzw. PTPN2) getestet wurden.

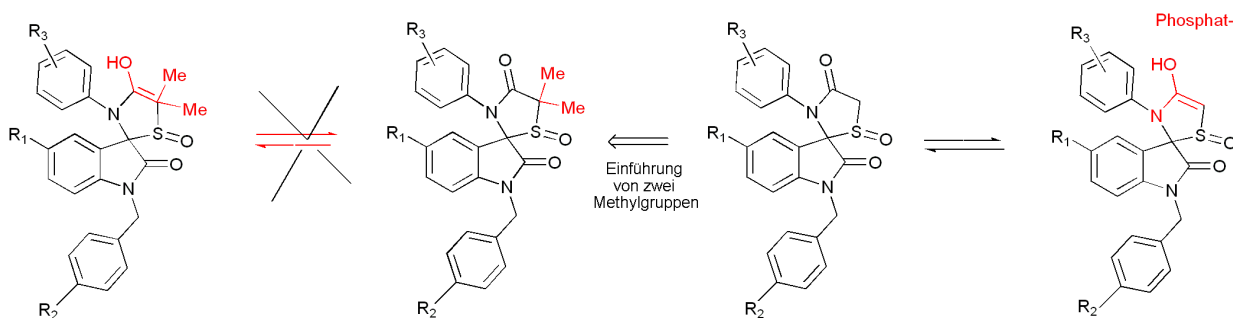


**Abbildung 85: Spiro-fusionierte-Indol-2-on-Thiazolidinon Struktur, R1-3 offen für Diversifikation**

Die generierten Daten wurden zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Analyse genutzt. Anhand dieser gelang es Dr. Viktor Vintonyak einige potente Substanzen zu synthetisieren. Die Bestimmung ihrer Steady-State-Kinetiken im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dabei zur Aufklärung ihrer Wirkmechanismen beitragen. So konnte für vier Derivate VV177, VV265, VV495, VV531 (jeweils Fraktion 2) jeweils ein kompetitiver Inhibitionstyp und für das reaktive Abbauprodukt von VV336 ein nicht-kompetitiver Inhibitionstyp im Bezug auf die MPTPB festgestellt werden.

Die kompetitive Hemmung durch VV177, VV265, VV495, VV531 lässt sich anhand ihrer Struktur erklären. So könnte postuliert werden, dass die acide Enol-Form als Phosphat-Analogen wirkt und damit mit dem negativ geladenen aktiven Zentrum der Phosphatase interagiert. (Abbildung 86)





**Abbildung 86: Tautomerisierung der Spirooxindole** und Einführung von zwei Methylgruppen am Thiazolidinon-Ring, die die Tautomerisierung verhindern sollten, so dass lediglich die Amid-, nicht aber die Enolform gebildet werden kann.

Tatsächlich konnte Dr. Viktor Vintonyak feststellen, dass die Einführung der zwei Methylgruppen (Abbildung 86) zu einem vollständigen Verlust der Aktivität führte, was diese Theorie bestätigt.

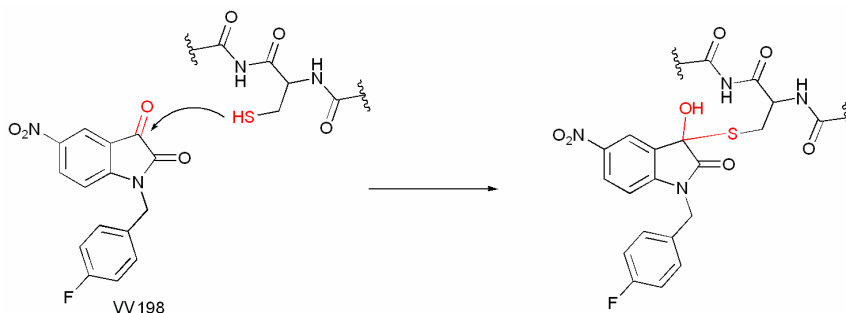
Bleibe die Frage warum die Substanzen als Phosphatanalogen die MPTPB Aktivität inhibieren, aber nicht in derselben Art und Weise auch auf die anderen getesteten Phosphatasen wirken. Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass die MPTPB über eine sehr große, flexible Bindetasche verfügt <sup>[205]</sup>, die sich wahrscheinlich sehr gut an die Spirooxindol-Struktur anpasst, wohingegen die Interaktion der reaktiven Gruppe mit den anderen Phosphatasen sterisch gehindert ist.

Für die Sulfoxid-Derivate konnte allgemein eine sehr viel bessere Aktivität festgestellt werden als für die Sulfon-Derivate. Leider stellte sich auch heraus, dass sie - unter anderem VV306 und VV310 - nach einiger Zeit nach dem Auflösen in DMSO abgebaut wurden und dass die Aktivität durch dieses Abbauprodukt entstand.

Auch wenn sich nicht feststellen ließ, um was es sich bei diesem Abbauprodukt handelte, sollte das Abbauprodukt von VV336, welches sich als sehr aktiv erwiesen hatte, kinetisch näher charakterisiert werden. Dabei wurde eindeutig eine nicht kompetitive-Inhibierung für die MPTPB gefunden. Das erklärt in diesem Fall auch die Spezifität, denn nicht kompetitiv bedeutet, dass der Inhibitor, außerhalb des aktiven Zentrums bindet, was zu einer Konformationsänderung führen kann, die dann verhindert, dass das Substrat binden kann. <sup>[131]</sup>

Die Bindestelle kann also im Fall von MPTPB durchaus spezifisch für diese Phosphatase sein, womit die Nicht-Aktivität bezüglich einer Inhibierung der anderen Phosphatasen einherginge.

Für die MPTPB- und h-PTP  $\beta$  inhibierende Substanz VV198 konnte der Inhibitionsmechanismus noch nicht eindeutig ermittelt werden. Die Wirkung ist klar von der Substratmenge unabhängig, was auf einen nicht-kompetitiven Inhibitionstyp schließen lässt. Allerdings konnte dieser mit dem Lineweaver-Burk-Plot nicht weiter definiert werden, was entweder auf einen komplexeren, gemischten Inhibitionstyp zurückzuführen ist oder auch eine irreversible Inhibierung nicht ausschließt. Letztere Möglichkeit war aufgrund der Struktur durchaus denkbar (Abbildung 87).



**Abbildung 87: Möglicher Inhibitionsmechanismus für VV198** Es erfolgt ein nukleophiler Angriff durch eine Cystein-Gruppe im aktiven Zentrum der Phosphatase. Dadurch wird der Inhibitor kovalent gebunden. Es kann zu einer irreversiblen Inhibierung kommen.

Bei der entsprechenden Überprüfung wurde eine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes der Substanz auf unterschiedliche Enzymmengen klar festgestellt. Diese ist allerdings nicht ausschließlich für die irreversible sondern auch im Fall einer reversiblen Inhibierung gegeben. Die Zeitabhängigkeit wäre ein sicherer Indikator für eine irreversible Hemmung, aber bei Inkubationszeiten von 1 bis 30 Minuten von der Substanz mit dem Enzym nahm die inhibitorische Aktivität nicht mit der Zeit zu, obwohl ein klarer Überschuss an Inhibitor vorhanden war, der im Falle einer irreversiblen Inhibierung das Enzym im Laufe der Zeit komplett inaktiviert hätte. Denkbar wäre allerdings auch, dass eine nicht vollständige, hundertprozentige Inhibierung (Affinity Labelling) oder eine sehr schnelle Reaktion ( $< 1$  min) stattfindet, wobei Letztere mit den hier verwendeten Methoden der Steady-State-Kinetiken nicht messbar ist. Die Steady-State-Kinetiken lassen also lediglich den Schluss zu, dass VV198 die MPTPB und die h-PTP  $\beta$  nicht nur irreversibel sondern auch reversibel nach einem komplexeren Hemm-Mechanismus (gemischter Typ) hemmen kann. Außerdem konnte klar belegt werden, dass die Inhibierung in jeden Fall nicht-kompetitiv ist und dass die h-PTP  $\beta$  deutlich stärker als die MPTPB inhibiert wird. Entsprechend könnte eine Erklärung anhand struktureller Merkmale gefunden werden. Diesbezüglich könnten Co-Kristallisationsexperimente weitere Informationen über die Bindungsart

liefern. Die Isatin-Derivate, unter ihnen VV198, haben sich u.A. als relativ kleine, gut lösliche niedermolekulare Verbindungen (MW = 250-350 Da, logP < 3) als interessant für weitere Untersuchungen erwiesen. In Kooperation mit Prof. Dr. D. Vestweber am MPI Münster soll die Interaktion von h-PTP  $\beta$  mit Tie-2 nach Behandlung mit den Substanzen und mit Hilfe von Westernblot Analysen näher untersucht werden (1.4.1).

Bei einem von Herrn Dr. Matthias Baumann und Herrn Dr. Sascha Giegold am LDC (Lead Discovery Center) durchgeführten Permeabilitätsassay PAMPA konnte für die getesteten Substanzen eine relativ gute Löslichkeit, aber moderate Membrangängigkeit festgestellt werden. Da der Assay, als künstliches Membransystem allerdings nur „relative“ Daten über passiven Transport liefern kann, müssen diese Daten nicht mit zellulären Aktivitätsdaten korrelieren. Dies ließe sich in zellulären Experimenten wie beispielweise dem CaCO<sub>2</sub>-Test klären. Für die Untersuchungen werden Zell-Schichten von CaCO<sub>2</sub>-Zellen verwendet. Diese kultivierten Zellen eines Dickdarm-Karzinoms verhalten sich sehr ähnlich wie die Mucosazellen und sind deshalb u.A. auch als Modell für die Aufnahme von Substanzen über den Magen-Darm-Trakt ins Blut gut geeignet

Insgesamt kann festgehalten werden, dass einige Spirooxindole-Derivate als potente spezifische MPTPB Inhibitoren identifiziert werden konnten. Ferner stellen die Isatin-Derivate als MPTPB und h-PTP  $\beta$  Inhibitoren den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dar. Die Substanzen könnten sich u.A im Zusammenhang mit der MPTPB-Inhibition nützlich für die Tuberkulose-Forschung und Therapie sowie im Fall der h-PTP  $\beta$  Hemmung für die Aufrechterhaltung der vaskulären Funktion bzw. die Erhöhung des Blutflusses zum ischämischen Gewebe erweisen (1.4.1).

In Kooperation mit der Dortmund Protein Facility (DPF; Zentrale Einrichtung des Instituts) konnten schließlich die Phosphatasen PP1 und VHR in ein geeigneteres Expressionssystem umklontiert werden. Ferner konnten Vorbereitungen für die Klonierung der cDNA der Phosphatase Cdc14B in einen Expressionsvektor getroffen werden, um auch diese später rekombinant exprimieren zu können. Diese Phosphatasen konnten bzw. können für ein neues geplantes Roboter-unterstütztes Screening auf der Suche nach Inhibitoren zur Verfügung gestellt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Weiterleitung intrazellulärer Signale ist essenzielle Voraussetzung allen Lebens. Einer der wichtigsten Mechanismen zur Rezeption und Weiterleitung von Signalen ist die kaskadenartige Phosphorylierung und Dephosphorylierung immer neuer Elemente/Proteine, wobei diese Vorgänge ihrerseits durch Enzyme (Kinasen, Phosphatasen) kontrolliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Prinzipien dieser Signalweiterleitung untersucht und dazu zwei unterschiedliche Herangehensweisen gewählt:

- a) in einem vorwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatz wurde die Ras Signalkaskade mit dem Einsatz von Naturstoffen (Tetramsäuren) als Modulatoren untersucht und
- b) in einem rückwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatz wurden Inhibitoren diverser Phosphatasen die der Naturstoffklasse der Spirooxindole analog sind, gesucht und deren Wirkmechanismus charakterisiert.

Bereits in ersten Untersuchungen konnte eine Modulation des Ras-Signalweges durch die Tetramsäure Melophlin A bestätigt werden. So konnte Dr. Tanja Knoth zeigen, dass Melophlin A, wie bereits für die H-Ras-transformierten NIH3T3-Zellen beschrieben, den durch die Transformation hervorgerufenen Effekt revertieren konnte. Zwei strukturell sehr ähnliche Derivate hatten den gleichen Effekt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten neben Melophlin A ferner 13 Tetramsäurederivate identifiziert werden, die jeweils zu einer Inhibierung im Ras-Reporter-Gen-Assay führten ohne dabei zytotoxisch zu sein. D.h. diese Substanzen hemmen den durch EGF-aktivierten Signalweg oberhalb von Elk-1. Die mit den beiden Experimenten erhaltenen Daten wurden gleichzeitig zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Analyse genutzt, die Dr. Tanja Knoth beim Design der Affinitätschromatographie-Kontrollproben half.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Melophlin A auf den Ras/MAPK-Weg mit Hilfe eines unabhängigen, zweiten Ras-Modellsystems wurden EGF- und NGF-stimulierte PC12-Zellen mit Melophlin A behandelt. Hier konnte beobachtet werden dass der Effekt auch normalerweise in Kombination auftretende Effekt (Neuritenbildung + Unterdrückung der Zellteilung) durch die Behandlung mit Melophlin A jeweils auf beiden Seiten verstärkt wurde. Ferner konnte durch die Behandlung mit Melophlin A der hemmende Effekt des MEK Inhibitors U0126 auf das Neuritenwachstum aufgehoben werden. Dies ließ darauf schließen, dass der Wirkungsort des Naturstoffs unterhalb der Kinase MEK liegt. Die Wirkung in Kombination mit PMA blieb unbeeinflusst.

Darüber hinaus wurde der Phosphorylierungszustand der zentralen Kinase des Signalwegs mit Hilfe eines phosphospezifischen ERK-Westernblots analysiert. Es erwies sich, dass die Aktivität von ERK1/2 in MDCK-F3-, HeLa- und PC12-Zellen nach kurzzeitiger Behandlung mit Meloplin A unbeeinträchtigt blieb. Hingegen führte eine langfristige Behandlung zur Inhibierung der Kinase in MDCK-F3- und HeLa-Zellen nicht aber in den PC12-Zellen. Dieser indirekte, verspätete Einfluss auf die ERK Aktivität in HeLa und MDCK-F3 als sekundäre Reaktion lässt sich erklären, wenn man die Ergebnisse zusammen mit den von Dr. Tanja Knoth im Rahmen ihrer Dissertation erhaltenen Ergebnissen betrachtet. Sie konnte mittels Affinitätsaufreinigung, eine Interaktion von Meloplin A mit Dynaminen feststellen, die die Hemmung endozytotischer Prozesse bewirkte. Die HeLa-Westernblot Ergebnisse bestätigen, dass wie in der Literatur beispielsweise für inaktive Dynamin-Mutanten beschrieben, die Hemmung der Endozytose zu einer Reduktion der Phosphorylierung von ERK1/2 führen kann. Eine Hemmung der Endozytose ist besonders interessant, weil somit gerade die H- und N-Ras, aber nicht die K-Ras Signaltransduktion von der Endozytose abhängig ist. Somit wird auch die Unterdrückung der ERK-Aktivierung in MDCK-F3-Zellen erklärbar. Das heißt, die mit für die MDCK-F3- und HeLa-Zellen erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig einen Zusammenhang zwischen der Meloplin A-Behandlung, der Endozytose-Hemmung durch Interaktion mit Dynaminen und der indirekten Inhibierung der Kinase ERK1/2 und stimmen mit den beschriebenen Theorien in diesem Zusammenhang überein

Der PC12-Zell-spezifische Effekt ließ sich nicht mit einem offensichtlichen Effekt auf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg erklären. Ein rückwirkender Effekt auf diesen bzw. eine Dynamin-Interaktion (Ähnlichkeit mit Dynasore) konnte aber auch für PC12-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Da das Signalnetzwerk in PC12-Zellen aber durchaus recht komplex ist, gibt es noch zahlreiche Angriffsmöglichkeiten für Meloplin A, die den Effekt erklären können. Mit der Mikroarray-Analyse konnte z.B. ein Einfluss von Meloplin A auf die Genexpression festgestellt werden. Es wurden 308 Sequenzen, die eine Veränderung in der Expression von mindestens 1,5-fach und maximal 3,8-fach stärker bzw. 3-fach geringer im Vergleich mit Kontrollzellen aufwiesen, gefunden. Von diesen Genen konnten mit Hilfe einer qRT-PCR der Rho/Rac Guanin Austauschfaktor und das P11 Gen in mit Meloplin A behandelten NGF-stimulierten PC12-Zellen als stärker exprimiert, sowie der Regulator der G-Protein Signaltransduktion 4, der Bcl2 modifizierende Faktor, die Bcl-2 bindende Komponente 3 und Frizzled 5 als schwächer exprimiert bestätigt werden. In Zusammenhang mit der niedrigen Frizzled 5 Expression in PC12-Zellen konnte

zudem ein schwacher inhibitorischer Effekt von Meloplin A auf den Wnt-Signalweg in einem Wnt-Reporter-Gen-Assay mit HEK293 Zellen festgestellt werden.

Mit Hilfe verschiedene Testverfahren und Unterwendung verschiedener Zelllinien konnten also die molekularen Angriffspunkte von Meloplin A näher charakterisiert und seinen Wirkmechanismus untersucht werden. Ein Zusammenhang zwischen den potentiellen molekularen Angriffspunkten von Meloplin A, deren Funktionen in der Zelle und dem Ras-bzw. zusätzlich Wnt-Signalweg konnte klar aufgezeigt werden und somit Erklärungen oder Anhaltspunkte für die Ursache der beobachtete phänotypische Effekt in MDCK-F3- und PC12-Zellen, sowie für eine Inhibierung im Ras-Reporter-Gen-Assay gefunden werden.

Im Rahmen des rückwärts gerichteter chemisch-genetischen Ansatzes konnten Spiro-fusionierte-Indol-2-on-Thiazolidinone zunächst als spezifische MPTPB Inhibitoren bestätigt werden, bevor ausgehend von der Inhibitor-Struktur des primären Screenings verschiedene, synthetisierte Analoga bezüglich ihrer potentiellen inhibitorischen Wirkung auf MPTPB und 6 weiteren ausgewählten Phosphatasen (MPTPA, PTP1B, VHR, SHP-2, h-PTP  $\beta$  bzw. PTPN2) getestet wurden. Die generierten Daten dienten zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Analyse und halfen bei der Identifizierung von potenteren Substanzen als die Ausgangssubstanzen. Diese Inhibitoren konnten außerdem durch die Bestimmung ihrer Steady-State-Kinetiken ihr Wirkmechanismen näher charakterisiert werden.

Eine nachgewiesene kompetitive Hemmung durch VV177, VV265, VV495, VV531 ließ den Schluss zu, dass die acide Enol-Form als Phosphat-Analogon wirken und damit mit dem negativ geladenen aktiven Zentrum der Phosphatase interagieren könnte. Die ausschließliche Wirkung auf MPTPB wäre in diesem Fall durch eine sehr große, flexible Bindetasche der Phosphatase, die sich der Spirooxindol-Struktur anpasst, wohingegen die Interaktion der reaktiven Gruppe mit den anderen Phosphatasen sterisch gehindert ist, erklärbar

Bei der kinetischen Charakterisierung des sehr aktiven Abbauprodukt von VV336, wurde eindeutig eine nicht kompetitive-Inhibierung für die MPTPB gefunden. Da nicht kompetitiv bedeutet, dass der Inhibitor, außerhalb des aktiven Zentrums bindet, geht dies mit der Nicht-Aktivität bezüglich der anderen Phosphatasen einher.

Für die MPTPB- und h-PTP  $\beta$  hemmende Substanz VV198 konnte der Inhibitionsmechanismus noch nicht eindeutig ermittelt werden. Anhand der Steady-State-Kinetiken kann man nur sagen, dass VV198 die MPTPB und die h-PTP  $\beta$  nicht nur irreversibel sondern auch reversibel nach einem komplexeren Hemm-Mechanismus (gemischter Typ) hemmen kann. Außerdem konnte klar belegt werden,

dass die Inhibierung in jeden Fall nicht-kompetitiv ist und dass die h-PTP  $\beta$  deutlich stärker als die MPTPB inhibiert wird.

Zusammenfassend konnten Spirooxindole-Derivate als potente spezifische MPTPB Inhibitoren identifiziert werden konnten. Ferner stellen die Isatin-Derivate als MPTPB und h-PTP  $\beta$  Inhibitoren den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dar. Die Substanzen könnten sich so u.A im Zusammenhang mit der MPTPB Inhibition nützlich für die Tuberkulose-Forschung und Therapie sowie im Fall der h-PTP  $\beta$  Hemmung für die Aufrechterhaltung der vaskulären Funktion bzw. die Erhöhung des Blutflusses zum ischämischen Gewebe als nützlich erweisen.

Insgesamt konnten also durch den Ansatz der vorwärtsgerichteten chemischen Genetik MelophlinA als Ras- und Endoytose-Modulator und durch den Ansatz der rückwärtsgerichteten chemischen Genetik Spirooxindole und davon abgeleitete Isatin-Derivate als Phosphatase-Inhibitoren (MPTPB, h-PTP  $\beta$ ) identifiziert und näher charakterisiert werden.

Der Erfolg dieser Arbeit kam dabei u.A. durch die Kooperation von der Chemie und Biochemie (Dr. Tanja Knoth, Dr. Viktor Vintonyak) und der Biologie (vorliegende Arbeit) zustande, da sich die Arbeiten und Untersuchungen jeweils hilfreich/synergistisch ergänzten und so insgesamt weiterführten.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Auszüge eines Interview zum Thema „Chemische Biologie“ mit Prof. Dr. H. Waldmann und Prof. Dr. Niemann
- [2] Link zu bisher sequenzierten Genomen:  
[http://www.genomenewsnetwork.org/resources/sequenced\\_genomes/genome\\_guide\\_p1.shtml](http://www.genomenewsnetwork.org/resources/sequenced_genomes/genome_guide_p1.shtml)
- [3] J. Craig Venter, et al., The Sequence of the Human Genome, *Science* 2001 291, 1304-1351
- [4] S. L. Schreiber, Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry, *Bio. Med. Chem.* 1998, 6, 1127–1152
- [5] T. J. Mitchison, Towards a pharmacological genetics, *Chem. Biol.* 1994, 1, 3–6
- [6] K. Hübel T. Lessmann, H. Waldmann, Chemical biology – identification of small molecule modulators of cellular activity by natural product inspired synthesis, *Chem. Soc. Rev* 2008, 37, 1361-1374
- [7] H.-F. Ji, X.-J. Li, H.-J. Zhang, Natural products and drug discovery, *EMBO reports* 2009, 10, 194-199
- [8] Bericht der DECHEMA (Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V.) – Vorbild Natur; Stand und Perspektiven der Naturstoffforschung in Deutschland
- [9] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002, *Journal of Natural Products* 2003, 66, 1022-1037
- [10] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Delivery Reviews* 2001, 46, 3-26.
- [11] S. L. Schreiber, Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery, *Science* 2000, 287, 1964–1969.
- [12] P. A. Wender, V. A. Verma, T. J. Paxton and T. H. Pillow, Function-Oriented Synthesis, Step Economy, and Drug Design, *Acc. Chem. Res.* 2008, 41 (1), 40–49
- [13] a) F. J Dekker, M. A Koch and H. Waldmann, Protein structure similarity clustering (PSSC) and natural product structure as inspiration sources for drug development and chemical genomics, *Current Opinion in Chemical Biology* 2005, 9, 232–239
- b) M. A. Koch, L.-O. Wittenberg, S. Basu, D. A. Jeyaraj, E. Gourzoulidou, K. Reinecke, Compound library development guided by protein structure similarity clustering and natural product structure, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2004, 101, 16721-16726
- c) M. A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaulta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann, Charting Biologically Relevant Chemical Space: A Structural Classification of Natural Products (SCONP), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2005, 102, 17272-17277



- [14] T. U. Mayer, Chemical genetics: tailoring tools for cell biology, *Trends Cell Biol* 2003, 13, 270-277.
- [15] B. R. Stockwell, Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function, *Nat Rev Genet* 2000, 1, 116-125
- [16] D. R. Spring, Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights, *Chem. Soc. Rev.* 2005, 34, 472–482
- [17] J. H. Zhang, T. D. Y. Chung and K. R. Oldenburg, A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *Journal of Biomolecular Screening* 1999, 4, 2, 67-73
- [18] G. E. Ward, K. L. Carey, N. J. Westwood, Using small molecules to study big questions in cellular microbiology, *Cell Microbiol* 2002, 4, 471-482
- [19] G. C. Terstappen, C. Schlüpen, R. Raggiaschi and G. Gaviraghi, Target deconvolution strategies in drug discovery, *Nature reviews in drug discovery* 2007, 6, 891-903
- [20] B. Suter, D. Auerbach, I. Stagljar, Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond, *BioTechniques* 2006, 40, 625–644
- [21] X. S. Zheng, T.-F. Chan, H. H. Zhou, Genetic and Genomic Approaches to Identify and Study the Targets of Bioactive Small Molecules, *Chemistry and Biology* 2004, 11, 609 – 618
- [22] B. Alberts, et al., *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* 2001, 2. Auflage, Verlag: Wiley-VCH.
- [23] E. Choy et al., Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi, *Cell* 1999, 98, 69-80
- [24] J. Downward, Targeting Ras signalling pathways in cancer therapy, *Nature Reviews Cancer* 2003, 3, 11-22
- [25] A. Wittinghofer, H. Waldmann, Ras - ein molekularer Schalter bei der Tumorentstehung, *Angewandte Chemie-International Edition* 2000, 39, 4193-4214
- [26] G. A. Repasky, E. J. Chenette and C. J. Der, Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis, *Trends Cell Biol.* 2004, 14, 639-647
- [27] Müller-Esterl, *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Springer Verlag 2004
- [28] J. M. Kyriakis and J. Avruch, Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation; *Physiol Rev* 2001, 81:807-869
- [29] W. Kolch, A. Kotwaliwale, K. Vass, P. Janosch, The role of Raf kinases in malignant Transformation, *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2002, 4, 1-18.
- [30] A. von Kriegsheim, D. Baiocchi, M. Birtwistle, D. Sumpton, W. Bienvenut, N. Morrice, K. Yamada, A. Lamond, G. Kalna, R. Orton, D. Gilbert and W. Kolch, Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome, *Nature Cell Biology* 2009, 11, 1458-1479
- [31] S. D. M. Santos, P. J. Verveer and P. I. H. Bastiaens; Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate; *Nature letters* 2007, 1-13
- [32] B. N. Kholodenko, Cell-signalling dynamics in time and space, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 2006, 165-176

- [33] J. F. Hancock, Ras Proteins: Different signals from different locations. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4, 373-384
- [34] A. Mor and M. R. Philips, Compartmentalized Ras/MAPK signalling, *Annu.Rev. Immunol.* 2006, 24, 771-800
- [35] O. Rocks, A. Peyker and P. I. H Bastiaens, Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors, *Curr Opin. in Cell Biol.* 2006, 18, 351-357
- [36] L. K. Shawver, D. Slamon, A. Ullrich, Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy, *Cancer Cell* 2002, 1, 117-123
- [37] W. Kolch, Ras/Raf signalling and emerging pharmacotherapeutic targets, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2003, 3, 709-718
- [38] A. Gossauer, In *Progress in the chemistry of Organic Natural Products*, Springer, 2003, 86
- [39] E.L. Ghisalberti, In *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier 2003, 28, 109-163.
- [40] B. Royles, Naturally Occurring Tetramic Acids: Structure, Isolation, and Synthesis *Chem.Rev.* 1996, 95, 1981-2001
- [41] A. P. Michael; E. J. Grace; M. Kotiw; R. A. Barrow, Ravenic Acid, a New Tetramic Acid Isolated from a Cultured Microfungus, *Penicillium sp.*, *J. Nat. Prod.* 2002, 62, 1360-1362
- [42] U. Riese, E. Ziegler, M. Hamburger, Militarinone A induces differentiation in PC12 cells via MAP and Akt kinase signal transduction pathways, *FEBS Letters* 2004, Volume 577, 3, 455-459
- [43] A. Hölzel; M. G. Gänzle; G. J. Nicholson; W. P. Hammes; G. Jung, Studies on the Mode of Action of Reutericyclin, *Angew. Chem.* 2000, 112, 2886-2888
- [44] G. F. Kaufmann, R. Sartorio, S. H. Lee, C. Rogers, M. M. Meijler, J. A. Moss, B. Clapham, A. P. Brogan, T. J. Dickerson, K. D. Janda, Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 2005, 102, 309 - 314
- [45] R. Schobert, A. Schlenk, Tetramic and tetronic acids: An update on new derivatives and biological aspects, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008, 16, 4203-4221
- [46] C. Y. Wang, B. G. Wang, S. Wiryowidagdo, et al., Melophlins C-O, Thirteen Novel Tetramic Acids from the Marine Sponge *Melophlus sarassinorum*, *Journal of Natural Products* 2003, 66, 51-56.
- [47] J. Z. Xu, M. Hasegawa, K. Harada, et al., Melophlins P, Q, R, and S: Four new tetramic acid derivatives, from two palauan marine sponges of the genus *Melophlus*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2006, 54, 852-854.
- [48] T. Oda, A. Fujita, J. Z. Xu, et al., Effects of Melophlins on Colony Formation of Chinese Hamster V79 Cells and IL-8 Production in PMA-stimulated HL-60 Cells, *Marine Drugs* 2007, 5, 1-5.
- [49] B. Biersack, R. Diestel, C. Jagusch, et al., First syntheses of melophlins P, Q, and R, and effects of melophlins on the growth of microorganisms and tumor cells, *Chemistry & Biodiversity* 2008, 5, 2423-2430
- [50] G. D. Birnie, The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid celldifferentiation, *Br. J. Cancer* 1988, 58, Suppl. IX, 41-45

- [51] S. Aoki, K. Higuchi, Y. Ye, R. Satari, M. Kobayashi, Melophrins A and B, Novel Tetramic Acids Reversing the Phenotype of ras-Transformed Cells, from the Marine Sponge Melophrus sarassinorum, *Tetrahedron.Lett.* 2000, 56, 1833-1836
- [52] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 2001, 409, 860-921
- [53] L. Bialy, H. Waldmann, Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases: Next-Generation Drugs?, *Angew.Chem.Int.Ed.* 2005, 44, 3814-3839
- [54] N. K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, 833–846
- [55] A. Östmann, C. Hellberg, F. Böhmer, Protein-tyrosine phosphatases and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 307-320
- [56] D. M. Virshup and S. Shenolikar, From Promiscuity to Precision:Protein Phosphatases Get a Makeover, *Molecular Cell* 2009, 33, 537-545
- [57] J. M. Denu, J. A. Stuckey, M. A. Saper, J. E. Dixon, Form and Function in Protein Dephosphorylation, *Cell* 1996, 87, 361-364
- [58] T. W. Cohen, Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J. Cell Sci.* 2002, 115, 241-256
- [59] N. K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7: 833–846.
- [60] V. Vintonyak, A. Antonchick, D. Rauh, H. Waldmann, The therapeutic potential of phosphatase inhibitors, *Current Opinion in Chemical Biology* 2009, 13, 272-283
- [61] N. K. Tonks, PTP1B: From the sidelines to the front lines!, *FEBS Lett.* 2003, 546, 140-148.
- [62] J. D. Bjorge, A. Pang, D. J. Fujuta, Identification of PTP1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines, *J.Biol.Chem.* 2000, 275, 41439-41446.
- [63] G. Liu, J. M. Trevillyan, Protein tyrosine phosphatase 1B as a target for the treatment of impaired glucose tolerance and type II diabetes, *Curr Opin Investig Drugs* 2002 ;3 (11):1608-1616
- [64] L. Lessard, M. Stuible, M.L. Tremblay, The two faces of PTP1B in cancer, *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804(3), 613-619
- [65] A. Ostman, C. Hellberg, F.D. Bohmer, Protein-tyrosine phosphatases and cancer, *Nat Rev Cancer* 2006, 6, 307-320
- [66] M. Tartaglia, E. L. Mehler, R. Goldberg, G. Zampino, H. G. Brunner, H. Kremer, I. van der Burgt, A. H. Crosby, A. Ion, S Jeffery et al., Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome, *Nat Genet* 2001, 29, 465-468
- [67] M. Tartaglia, C. M. Niemeyer, A. Fragale, X. Song, J. Buechner, A. Jung, K. Hahlen, H. Hasle, J. D. Licht, B. D. Gelb, Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia, *Nat Genet* 2003, 34, 148-150.
- [68] T. Tiganis, B. E. Kemp, N. K. Tonks, The protein-tyrosine phosphatase TCPTP regulates epidermal growth factor receptor-mediated and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signalling, *J Biol Chem.* 1999; 274(39), 27768-75

- [69] T. Tiganis, A. M. Benett, K. S. Ravichandran, N. K. Tonks, Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase, *Mol Cell Biol.* 1998;18 (3), 1622-34.
- [70] A. Bourdeau, N. Dube, K. M. Heinonen, J. F. Theberge, K. M. Doody, M. L. Trembay, TC-PTP-deficient bone marrow stromal cells fail to support normal B lymphopoiesis due to abnormal secretion of interferon- $\gamma$ , *Blood* 2007;109(10), 4220-4228
- [71] M. Winderlich, L. Keller, G. Cagna, A. Broermann, O. Kamenyeva, F. Kiefer, U. Deutsch, A. F. Nottebaum, D. Vestweber, VE-PTP controls blood vessel development by balancing Tie-2 activity, *J Cell Biol.* 2009;185(4), 657-671
- [72] K. K. D. Amarasinghe et al., Design and synthesis of potent, non-peptidic inhibitors of HPTPb, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 4252-4256
- [73] I. DeVinney, I. Steele-Mortimer, B. B. Finlay, Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens, *Trends Microbiol.* 2000, 8, 29-33
- [74] A. Koul, A. Choidas, M. Treder, A. K. Tyagi, K. Drlica, Y. Sigh, A. Ullrich, Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Bacteriol.* 2000;182(19), 5425-32
- [75] N. Beresford, S. Patel, J. Armstrong, B. Szöör, A. P. Fordham-Skelton and L. Taberner, MtpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity, *Biochem. J.* 2007, 406, 13-18
- [76] R. Singh, V. Rao, H. Shakila, R. Gupta, A. Khera, N. Dhar, A. Singh, A. Koul, Y. Singh, M. Naseema, et al., Disruption of mtpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs, *Mol. Microbiol.* 2003, 50, 751-762
- [77] G. R. Stewart, Tuberculosis: a problem with persistence, *Nat. Rev. Microbiol.* 2003, 1, 97-105
- [78] J. M. Denu, J. E. Dixon, A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 5910-5914
- [79] K. Kondoh, E. Nishida, Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 2007, 1773, 1227-1237
- [80] Y. S. Liu, E. G. Shepherd, L. D. Nelin, MAPK phosphatases - regulating the immune response, *Nat. Rev Immunol.* 2007, 7, 202-212
- [81] J. L. Todd, K. G. Tanner, J. M. Denu, Extracellular regulated kinases (ERK) 1 and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR. A novel role in down-regulating the ERK pathway, *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 13271-13280
- [82] A. Alonso, M. Saxena, S. Williams, T. Mustelin, Inhibitory role for dual specificity phosphatase VHR in T cell antigen receptor and CD28-induced Erk and Jnk activation, *J. Biol. Chem.* 2001, 276 (7), 4766-4771
- [83] A. Alonso, S. Rahmouni, S. Williams et al., Tyrosine phosphorylation of VHR phosphatase by ZAP-70, *Nat. Immunol.* 2003, 4 (1), 44-8
- [84] T. Ishibashi, D. P. Bottaro, A. Chan et al., Expression cloning of a human dual-specificity phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 89(24), 12170-12174

- [85] S. Rahmouni, F. Cerignoli, A. Alonso et al., Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence, *Nat. Cell Biol.* 2006, 8(5), 524–31
- [86] A. Sidhu, M.-O. Contour-Galcera, D. Bigg and G. Prevost, Toward Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases for Cancer Treatment, *Current Enzyme Inhibition* 2008, 4, 1-9
- [87] B. T. Hoffman, M. R. Nelson, K. Burdick and S. M. Baxter, Protein Tyrosine Phosphatases: Strategies for Distinguishing Proteins in a Family Containing Multiple Drug Targets and Anti-Targets, *Current Pharmaceutical Design* 2004, 10, 1161-1181
- [88] J. Yuvaniyama, J. M. Denu, J. E. Dixon, M. A. Saper, Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR, *Science* 1996, 272, 1328-1331
- [89] B. G. Szczepankiewicz, G. Lui, P. J. Hadjuk, C. Abad-Zapatero, Z. Pei, Z. Xin, T. H. Lubben, J. M. Trevillyan, M. A. Stashko, S. J. Ballaron, H. Liang, F. Huang, C. W. Hutchins, S. W. Fesik, M. R. Jirousek, Discovery of a Potent, Selective Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor Using a Linked-Fragment Strategy, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 4087-4096
- [90] Z.-X. Jiang and Z.-Y. Zhang, Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment, *Cancer Metastasis Rev.* 2008, 27, 263-272
- [91] R. Srinivasan, M. Uttamchandani, S. Q. Yao, Rapid Assembly and in Situ Screening of Bidentate Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases, *Org.Lett.* 2006, 8, 713-716
- [92] L. Pheng Tan, H. Wu, P.-Y. Yang, K. A. Kalesh, Xi. Zhang, M. Hu, R. Srinivasan and S. Q.Yao, High-Throughput Discovery of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase B (MtpB) Inhibitors Using Click Chemistry, *Org. Lett.* 2009, 11(22), 5102–5105
- [93] C. V. Galliford and K. A. Scheidt, Pyrrolidinyl-Spirooxindole Natural Products as Inspirations for the Development of Potential Therapeutic Agents, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 8748 – 8758
- [94] J. S. Bindra, *The Alkaloids*, Vol. 14 (Ed.: R. H. F. Manske), Academic Press, New York, 1973, 84 – 121
- [95] C. Marti, E. M. Carreira, Construction of Spiro[Pyrrolidine-3,3'-Oxindoles] - Recent Applications to the Synthesis of Oxindole Alkaloids, *Eur. J. Org. Chem.* 2003, 2209 – 2219
- [96] S. Sakai, N. Aimi, K. Yamaguchi, H. Ohhira, K. Hori, J. Haginiwa, Gardneria alkaloids -IX structures of chitosenine and three other minor bases : From Gardneria multiflora makino *Tetrahedron Lett.* 1975, 16, 715 – 718
- [97] N. Aimi, K. Yamaguchi, S. Sakai, J. Haginiwa, A. Kubo, Transformation of indole alkaloids. IV. Reinvestigation of C/D ring closing reaction on indole alkaloid synthesis and the synthesis of heteroyohimbines, aricine and reserpine, *Chem. Pharm. Bull.* 1978, 26, 3444 – 3449
- [98] S. Sakai, N. Aimi, K. Yamaguchi, E. Yamanaka, J. Haginiwa, Studies of plants containing indole alkaloids. IX. Quantitative analysis of tertiary alkaloids in various parts of *Uncaria rhynchophylla* MIQ, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1982, 1, 1257 – 1262
- [99] O. Dideberg, J. Lamotte-Brasseur, L. Dupont, H. Campsteyn, M. Vermeire, L. Angenot, Structure cristalline et moléculaire d'un nouvel alcaloïde bisindolique: complexe moléculaire 1:2 strychnofoline-ethanol (C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.2C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), *Acta Crystallogr. Sect. B* 1977, 33, 1796 –1801

- [100] C. B. Cui, H. Kakeya, H. Osada, Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M Phase, *Tetrahedron* 1996, 52, 12651 –12666
- [101] C. B. Cui, H. Kakeya, H. Osada, Spirotryprostatin B, a novel mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*, *J. Antibiot.* 1996, 49, 832 – 835
- [102] J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, 4. Auflage, 2000, Blackwell Oxford, 543–549
- [103] T. F. Tam, R. Leung-Toung, W. Li, M. Spino and K. Karimian, *Medicinal Chemistry and Properties of 1,2,4-Thiadiazoles*, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2005, 5, 367-379
- [104] a) V. Korinek, N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers, Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma, *Science* 1997, 275, 1784-1787
- b) P. J. Morin, A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein and K. W. Kinzler, Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC, *Science* 1997, 275, 1787-1790
- [105] R. Janknecht, W. H. Ernst, V. Pingoud and A. Nordheim, Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases, *EMBO J.* 1993, 12, 5097-5104
- [106] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J.J. Dunn, and J. W. Dubendorff, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Meth. Enzymol.* 1990, 185, 60-89
- [107] S. Tabor, C.C. Richardson, A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985, 82(4), 1074-8
- [108] F.W. Studier, .A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J Mol Biol.* 1986;189(1), 113-30
- [109] E.O. Perlstein, D. M. Ruderfer, G. Ramachandran, S. J. Haggarty, L. Kruglyak, S. L. Schreiber, Revealing complex traits with small molecules and naturally recombinant yeast strains, *Chemistry and Biology* 2006, 13, 319-327
- [110] M F. Favata et al., MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products, *J Biol Chem* 1998, 273, 18623-32
- [111] N. Greenwood; E. Earnshaw, *Chemistry of the Elements* 1997 (2nd ed.)
- [112] O. Butterworth-Heinemann, G. Swarup et al., Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1982, 107, 1104-1109
- [113] T. Hamaguchi et al., RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G1phase, *FEBS Lett.* 1995, 372 354
- [114] P. Huang et al., Structure-Based design and discovery of novel inhibitors of protein tyrosine phosphatases, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 1835-1849
- [115] L. Hexdall, C. F. Zheng, Stable luciferase reporter cell lines for signal transduction pathway readout using GAL4 fusion transactivators, *Biotechniques* 2001, (5) 1134-1138

- [116] M. Jordan, A. Schallhorn and F. M. Wurm, Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 596-601
- [117] L. A. Greene and A. S. Tischler, Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1976, 73, 2424–2428
- [118] M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254
- [119] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970, 227, 680–685
- [120] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 1989, (2nd ed.)
- [121] J. Renart, J. et al., Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979, 76, 3116–3120
- [122] a) M. W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research* 2001, 29(9), 45-51  
b) M.W. Pfaffl, G. W. Horgan and L. Dempfle, Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Research* 2002, 30(9), e36
- [123] Blast Online Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [124] W. W. Carmichael, J. An, Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins *Nat Toxins.* 1999, 7(6), 377-85
- [125] H. Brandenberger and R. Hanson, Spectrophotometric Determination of Acid and Alkaline Phosphatases, *Helv. Chim. Acta* 1953, 36, 900-?
- [126] C. MacKintosh, In D.G. Hardie 1993 (Ed.), *Protein Phosphorylation: A Practical Approach*, 221. New York: IRL Press
- [127] H. N. Fernley and P. G. Walker, Kinetic Behaviour of Calf-Intestinal Alkaline Phosphatase with 4-Methylumbelliferyl Phosphate, *Biochem. J.* 1965, 97 (1), 95-103
- [128] S. Welte, K. H. Baringhaus, W. Schmider, G. Müller, S. Petry, N. Tennagels, 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate: a fluorogenic substrate for protein tyrosine phosphatases., *Anal Biochem* 2005, 338, 32-38
- [129] L. Michaelis und M. L. Menten, Die Kinetik der Invertin-Wirkung, *Biochemische Zeitschrift* 1913, 49, 333–369
- [130] M. Dixon, The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.* 1953, 55, 170–171
- [131] R. A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley, New York, 2000
- [132] Link zur Abb.: <http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzass/inhibition.htm>

- [133] Y.-C. Cheng, W. H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* 1973, 22, 3099-3108
- [134] H. Lineweaver, D. Burk, The Determination of Enzyme Dissociation Constants; *J. Am. Chem. Soc.* 1934, 56 (3), 658–666
- [135] ChemgaPedia Link: <http://www.chemgapedia.de>
- [136] J. Berends, M. M. Mareel, F. M. van Roy, W. Birchmeier, Dissecting Tumor Cell Invasion: Epithelial Cells Acquire Invasive Properties after the Loss of Uvomorulin-Mediated Cell-Cell Adhesion, *J. of Cell Biology* 1989, 108, 2435-2447
- [137] E. O'Neill and W. Kolch, Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway, *Br. J. Cancer* 2004, 90, 283–288
- [138] B. N. Kholodenko et al., Untangling the wires: a strategy to trace functional interactions in signaling and gene networks, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002, 99, 12841–12846
- [139] W.J. Ryves, A. T. Evans, A. R. Olivier, P. J. Parker, F. J. Evans, Activation of the PKC-isotypes alpha, beta 1, gamma, delta and epsilon by phorbol esters of different biological activities, *FEBS Lett.* 1991, 288(1-2), 5-9
- [140] U.T. Rüegg, G. M. Burgess, Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases, *Trends in Pharmacological Science* 1989, 10(6), 218-220
- [141] M. W. Karaman, et. al., A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity, *Nat. Biotechnol.* 2008, 26(1), 127–132
- [142] Link zu diversen PKC Substraten:  
<http://www.kinasource.co.uk/Database/P%20substrates/PKC%20substrates.html>
- [143] Link zur Rat Genome Database: <http://rgd.mcg.edu/>
- [144] S. - L. Lai, A. J. Chien, R. T. Moon, Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in Tumorigenesis; *Cell Research* 2009, 19, 532-545
- [145] T. Kirchhausen, E. Macia and H. E. Pelish, Use of Dynasore, the Small Molecule Inhibitor of Dynamin, in the Regulation of Endocytosis, *Methods in Enzymology* 2008, 438,77-93
- [146] S. E. Webber, J. Tikhe, S. T. Worland, S. A. Fuhrman, T. F. Hendrickson, D. A. Matthews, R. A. Love, A. K. Patick, J. W. Meador, R. A. Ferre, E. L. Brown, D. M. DeLisle, C. E. Ford and S. L. Binford, Design, Synthesis, and Evaluation of Nonpeptidic Inhibitors of Human Rhinovirus 3C Protease, *J. Med. Chem.* 1996, 39, 5072-5082
- [147] C.H. Gray, N.K. Tonks, D. Barford, The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase, *EMBO J.* 2003, 3524-3535
- [148] J. Tian, M. Karin, Stimulation of Elk1 Transcriptional Activity by Mitogen-activated Protein Kinases Is Negatively Regulated by Protein Phosphatase 2B (Calcineurin), *J Biol Chem* 1999, 274, 15173
- [149] A. D. Sharrocks, Complexities in ETS-Domain Transcription Factor Function and Regulation: Lessons from the TCF (Ternary Complex Factor) Subfamily, *Biochemical Society Transactions* 2002, 30, 1–9



- [150] J. M. Kyriakis and J. Avruch, Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation, *Physiological Reviews* 2001, 81(2), 807-869
- [151] M. Raman, W. Chen and M.H. Cobb, Differential regulation and properties of MAPKs, *Oncogene* 2007, 26, 3100–3112
- [152] M. J. Robinson and M. H. Cobb, Mitogen-activated protein kinase pathways, *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9, 180-186
- [153] M. R. Frey, R. S. Dize, K. L. Edelblum, D. B. Polk, p38 kinase regulates epidermal growth factor receptor downregulation and cellular migration, *EMBO J* 2006, 25, 5683-5692
- [154] J. Inostroza, L. Saenz, G. Calaf, G. Cabello, E. Parra, Role of the phosphatase PP4 in the activation of JNK-1 in prostate carcinoma cell lines PC-3 and LNCaP resulting in increased AP-1 and EGR-1 activity, *Biol Res* 2005, 38, 163-178
- [155] M.M. McKay and D.K. Morrison, Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK, *Oncogene* 2007, 26, 3113–3121
- [156] A. J. Rossomando, D. M. Payne, M. J. Weber, T. W. Sturgill, Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86, 6940-6943
- [157] S. Nishibe, M. I. Wahl, S. M. Hernandez-Sotomayor, N. K. Tonks, S. G. Rhee, G. Carpenter, Increase of the catalytic activity of phospholipase C-gamma 1 by tyrosine phosphorylation, *Science* 1990, 250, 1253-1256
- [158] J. M. Schmitt, G. A. Wayman, N. Nozaki, T. R. Soderling, Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I, *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 24064-72
- [159] J. S. Yordy, R. C. Muise-Helmericks, Signal transduction and the Ets family of transcription factors., *Oncogene*. 2000,19 (55), 6503-6513
- [160] E. Janda, K. Lekmann, I. Killisch, M. Jechlinger, M. Herzig, J. Downward, H. Beug and S. Grünert, Ras and TGFβ cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways, *J. Cell Biol.* 2002, 156(2), 299-314
- [161] J. K. Voice, R. L. Klemke, A. Le and J. H. Jackson, Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 17164-17170
- [162] A. Aoyama and R. Klemenz, Oncogene-mediated effects on cellular gene expression. *Crit. Rev. Oncog.* 1993, 4, 53-94
- [163] M. Groudine and H. Weintraub, Activation of cellular genes by avian RNA tumor viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, 77, 5351-5354
- [164] M. S. Chang, B. C. Chen, M. T. Yu, J. R. Sheu, T. F. Chen, C. H. Lin, Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways., *Cell Signal* 2005, 17, 299-310
- [165] S. Shimohama, Y. Uehara-Kunugi, K Terai, T Taniguchi, J. Kimura, T. Saitoh, Expression of protein kinase C isozymes in primary neuronal cultures of the rat cerebellum., *J Neurosci Res.* 1991;29(2), 261-270

- [166] D Rasouly, E Rahamim, D Lester, Y Matsuda, and P Lazarovici, Staurosporine-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of protein kinase C inhibition, *Mol Pharmacol* 1992, 42, 35-43
- [167] A. Mor and M. R. Philips, Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu.Rev. Immunol.* 2006, 24, 771-800
- [168] J. Goodwin, K. Drake, C. Rogers, L. Wright, J. Lippincott-Schwartz, M. Philips and A. Kenworthy, Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* 2005, 170, 261–272
- [169] S. Roy, B. Wyse, and J. F. Hancock, H-Ras Signaling and K-Ras Signaling Are Differentially Dependent on Endocytosis , *Molecular and cellular Biology* 2002, 5128–5140
- [170] O. Kranenburg, I. Verlaan, W. H. Moolenaar, Dynamin Is Required for the Activation of Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase by MAP Kinase Kinase, *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 35301-35304.
- [171] A. V. Vieira, C. Lamaze, S. L. Schmid, Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis, *Science* 1996, 274, 2086-2089
- [172] Y. Zhang, D. B. Moheban, B. R. Conway, A. Bhattacharyya and R. A. Segal, Cell Surface Trk Receptors Mediate NGF-Induced Survival While Internalized Receptors Regulate NGF-Induced Differentiation *The Journal of Neuroscience* 2000, 20(15), 5671–567
- [173] M. Gonzalez-Gaitan, Signal Dispersal and Transduction through the Endocytic pathway, *Nature, Molecular Cell Biology* 2003, 4, 212-224
- [174] Persönliche Korrespondenz mit Prof. Dr. W. Kolch, Beatson Institut, Glasgow
- [175] K. Mayumi et al., Improved restriction landmark cDNA scanning and its application to global analysis of genes regulated by nerve growth factor in PC12 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1399, 10-18
- [176] J. M. Angelastro et al., Identification of diverse nerve growth factor-regulated genes by serial analysis of gene expression (SAGE) profiling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000, 97, 10424-10429
- [177] N.H. Lee et al., Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995, 92, 8303-8307
- [178] K.H. Lee, C. J. Ryu, H. J. Hong, J. Kim and E.H. Lee, CDNA microarray analysis of nerve growth factor-regulated gene expression profile in rat PC12 cells, *Neurochem. Res.* 2005, 30, 533-540
- [179] A.J. Brown, C. Hutchings, J. F. Burke and L. V. Mayne, Application of a rapid method (targeted display) for the identification of differentially expressed mRNAs following NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells, *Mol. Cell Neurosci.* 1999, 13, 119-130
- [180] D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton and E.L. Brown, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, *Nat Biotechnol.* 1996; 14(13),1675-80

- [181] P. T. Spellman, G. Sherlock, M. Q. Zhang, R. Vishwanath R. et al., Comprehensive Identification of Cell Cycle-regulated Genes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Microarray Hybridization, *Molecular Biology of the Cell* 1998,9, 3273–3297
- [182] T. Hughes, M. Marton, A. Jones, C. Roberts, R. Stoughton, C. Armour, H. Bennett, E. Coffey, H. Dai, Y. He, Functional Discovery via a Compendium of Expression Profiles, *Cell* 2000, 102(1), 109-126
- [183] J. S. Morey, J. C. Ryan and F. M. Van Dolah, Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR, *Biol. Proced. Online* 2006; 8(1): 175-193.
- [184] A. Schmidt and A. Hall, Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch, *Genes and Development* 2002, 16, 1587–1609
- [185] P. Masiakowski and E. M. Shooter, Nerve growth factor induces the genes for two proteins related to a family of calcium-binding proteins in PC12 cells, *PNAS Neurobiology*, 1988, 85, 1277-1281
- [186] T. M. Cabrera-Vera, J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger et al., Insights into G protein structure, function, and regulation, *Endocr Rev* 2003, 24,765–781
- [187] C.R. McCudden, M. D. Hains, R J. Kimple, D. P. Siderovski, F. S. Willard FS, G-protein signaling: back to the future, *Cell Mol Life Sci* 2005, 62, 551–577
- [188] K. L. Pierce, R.T. Premont, R. J. Lefkowitz, Seven-transmembrane receptors, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3, 639–650
- [189] W. Y. Tsang, A. Spektor, D. J. Luciano, V. B. Indjeian, Z. Chen, J. L. Salisbury, I. Sanchez, B. D. Dynlacht, CP110 cooperates with two calcium-binding proteins to regulate cytokinesis and genome stability, *Mol. Biol. Cell* 2006, 17, 3423-3434
- [190] F. S. Willard, M. D. Willard, A. J. Kimple, M. Soundararajan, E. A. Oestreich, X. Li, N A. Sowa, R. J. Kimple, D. A. Doyle, C. J. Der, M. J. Zylka, W. D. Snider, D. P. Siderovski; Regulator of G-Protein Signaling 14 (RGS14) Is a Selective H-Ras Effector; *PLoS ONE* 2009, 4(3),1-13
- [191] M. R. Hansen, P. C. Roehm, N. Xu, S. H. Green, Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL Prevents Spiral Ganglion Neuron Death and Inhibits Neurite Growth, *Developmental Neurobiology* 2006, 316-326
- [192] Z. Mi, Z. K. Mirnics, N. F. Schor, Bcl2 overexpression disrupts the morphology of PC12 cells through reduced ERK activation, *Brain Research* 2006, 1112, 46 – 55
- [193] M. Torcia, G. De Chiara, L. Nencioni, S. Ammendola, D. Labardi, M. Lucibello, P. Rosini, L. N. J. L. Marlier, P. Bonini, P. D Sbarba, A. T. Palamara, N. Zambrano, T. Russo, E. Garaci, and F. Cozzolino, Nerve Growth Factor Inhibits Apoptosis in Memory B Lymphocytes via Inactivation of p38 MAPK, Prevention of Bcl-2 Phosphorylation, and Cytochrome c Release, *The Journal of biological chemistry* 2001, 276(42), 39027–39036
- [194] S. D. Speese, V. Budnik, Wnts: up-and-coming at the synapse, *Trends in Neurosci.* 2007, 30 (6), 268-275

- [195] A. Caricasole, T. Ferraro, L. Iacovelli, E. Barletta, A. Caruso, D. Melchiorri, G. C. Terstappen, F. Nicoletti, Functional Characterisation of WNT7A Signaling in PC12 Cells, *Journal Biol. Chem.* 2003, 278 (39), 37024-37031
- [196] M. H. Magdesian, M. M. V. F. Carvalho, F. A. Mendes, L. M. Saraiva, M. A. Juliano, L. Juliano, J. Garcia-Abreu, S. T. Ferreira, Amyloid- $\beta$  binds to the extracellular cysteine-rich domain of frizzled and inhibits WNT/ $\beta$ -catenin signaling, *J. Biol. Chem.* 2008, 9359-9368
- [197] M. Boutros, J. Mihaly, T. Bouwmeester, M. Mlodzik, Signaling Specificity by Frizzled Receptors in *Drosophila*, *Science* 2000, 288, 1825-1828
- [198] A. Caricasole, T. Ferraro, L. Iacovelli, E. Barletta, A. Caruso, D. Melchiorri, G. C. Terstappen, F. Nicoletti, Functional Characterisation of WNT7A Signaling in PC12 Cells, *Journal Biol. Chem.* 2003, 278 (39), 37024-37031
- [199] H. Wang, T. Liu, C. C. Malbon, Structure-function analysis of Frizzleds, *Cellular Signalling* 2006, 18, 934-941
- [200] C. R. Kemp, E. Willems, D. Wawrzak, M. Hendrickx, T. A. Agbor, L. Leyns, Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical wnt signaling, *Developmental Dynamics* 2007, 236, 2011-2019
- [201] D. Kim, O. Rath, W. Kolch and K.-H. Cho, A hidden oncogenic positive feedback loop caused by crosstalk between Wnt and ERK Pathways, *Oncogene* 2007, 26, 4571–4579
- [202] E. Klipp, W. Liebermeister, Mathematical modeling of intracellular signaling pathways, *BMC Neuroscience* 2006, 710-26
- [203] Y. Komiya and R. Habas, Wnt signal transduction pathways, *Organogenesis* 2008, 4(2), 68-75
- [204] H. A. Kestler and M. Kühl, From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network, *Phil. Trans. R. Soc.* 2007, 2251, 1-15
- [205] C. Grundner, D. Perrin, R. Hooft van Huijsduijnen, D. Swinnen, J. Gonzalez, C. L. Gee, T. N. Wells and T. Alber Structural Basis for Selective Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase PtpB, *Structure* 2007, 15, 499–509

## 7. Abkürzungsverzeichnis

[E]	Enzymkonzentration
[ES]	Konzentration Enzym-Substrat-Komplex
[I]	Inhibitorkonzentration
[P]	Produktkonzentration
[S]	Substratkonzentration
A18	Rho/Rac Guanin-Austauschfaktor 18
Abb.	Abbildung
Abra	Aktin bindendes, Rho aktivierendes Protein
APS	Ammonium-Persulfat
Bbc3	Bcl2 bindende Komponente 3
Bmf	Bcl2 modifizierender Faktor
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin Kinase
Cdc25 bzw. Cdc14B	cell division cycle 25 bzw. 14B
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CMV	cytomegalovirus
COP	Coatomer
cRNA	complementary RNA
CT	threshold cycle
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Binde-Dömane
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DiFMUP	6,8-Difluoro-4-methyl-umbelliferylphosphat
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNM1L	Dynamin-1-like protein
Dok-3	Docking protein 3,
DPF	Dortmund Protein Facility
DTT	Dithiothreitol
Dusp5	Dualspezifische Phosphatase 5
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor

## Abkürzungen

---

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Egr-1	Early Growth Response 1
Elk-1	Ets-like protein 1
EMT	epithelialen mesenchymalen Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular regulated kinase
evtl.	eventuell
FCS	Fetal calve serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fzd5	Frizzled Homolog 5
G418	Geneticin
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GFP	Green fluorescent protein
ggf.	gegebenenfalls
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour (Stunde)
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N</i> -2-ethansulfonsäure
h-PTP $\beta$	humane vaskuläre endotheliale Phosphatase beta
HRP	horse radish peroxidase
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
Ifrd 1	Inferon-verwandter Entwicklungs-Regulator 1
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPO	Importin
IQGAP	IQ motif containing GTPase activating protein
IRDye	Infrarot markierter Farbstoff
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k <sub>cat</sub>	Geschwindigkeitskonstante
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante des Inhibitors
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten Konstante
KSR	Kinase supressor of Ras
LAU	Light Arbitrary Units
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MBP	Maltose-Binde-Protein

## Abkürzungen

---

MDCK	Madine-Darby canine kidney cell
MDCK-F3	<i>Ras</i> -transformed Madine-Darby canine kidney cell
MEK	MAP/ERK-Kinase
MEKK	MEK Kinase
min	Minute
MKK	MAP Kinase Kinase
Mmp 10	Matrix Metallopeptidase 10
MOPS	N-Morpholinopropanesulfonic Acid
MP1	MEK partner 1
MPTPA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protein Tyrosin Phosphatase A
MPTPB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protein Tyrosin Phosphatase B
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
NGF	Nerve growth factor
NP40	Polyethylenglycol-40-nonylphenoether
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactosid
P	Phosphat
P11	P11-Gen
p38	p38 MAP-Kinase
PAK	p21 aktivierte Kinase
PBS	Phosphate buffered saline
PC12	Phäochromocytoma
PEG	Polyethylenglykol
PH	Pleckstrin-Homology
PI(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
Plaur	Plasminogen Aktivator, Urikinase Rezeptor
PLC	Phospholipase C
PLP-2	Proteolipid protein 2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pNPP	para-Nitrophenolphosphat
PP1	Protein-Phosphatase 1
PR	Prolin rich
pSer	Phosphoserin
pThr	Phosphothreonin
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
PTPN2	Protein Tyrosin Phosphatase, non-Rezeptor Typ 2
pTyr	Phosphotyrosin
PVDV	Polyvinylidifluorid
qRT-PCR	quantitative realtime polymerase chain reaction
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate

## Abkürzungen

---

Raf	Rapid fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RBD	Raf-Binde-Domäne
RFU	Relative Fluorescence Units
Rgs4	Regulator der G-Protein Signaltransduktion 4
Rho	Ras-homology
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RKIP	Raf kinase inhibitor protein
RLU	Relative light units
RNA	ribonucleic acid
RP-LCMS	Reversed Phase LCMS
rpm	revolutions per minute
SAR	Structure activity relationship
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SH2	Src-homology 2
SHP2	Src Homologie 2 enthaltende Tyrosine Phosphatase
sim. Srf	ähnlich dem Serum Reaktions Faktor
siRNA	Small interfering RNA
sog.	sogenannte
SOS	Son-of-sevenless
SPR	Surface Plasmon Resonance
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TCF	Tenary complex transcription factors
TEMED	<i>N, N, N, N</i> -Tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
TrkA	Tyrosinkinase A
u.A.	unter Anderem
uPar3	u-Par-3 Gen
usw.	und so weiter
v	Reaktionsgeschwindigkeit
Vcl pred.	Voraussichtlich Vinculin
VE-PTP	Vasculär endotheliale Protein Tyrosin Phosphatase
VHR	VH1 related phosphatase
$v_{Max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Wnt	Wingless <i>Int-1</i>



## Abkürzungen

---

WST-1 benzendisulfonat	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-
YFP	Yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl.Chem.* 1982, 54, 1517 und 1525).

## 8. Anhang

**Tabelle 19:** Komplette Auflistung aller differenziel exprimierten Gene, fettgedruckt sind Sequenzen zu denen eine Funktion bekannt ist

<b>Fold Change</b>	<b>Primary Sequence Name</b>	<b>Accession #</b>	<b>Sequence Description</b>
3,9	<b>Homer1</b>	AF050659	Homer homolog 1 (Drosophila)
3,8	TC533255		Unknown
3,5	TC550912		Unknown
3,4	TC532764		Q86F59 Clone ZZD1083 mRNA sequence, partial (9%)
3,3	<b>TC543897</b>		Q8NH31 Seven transmembrane helix receptor, partial (6%)
3,1	TC547414		Unknown
3,1	TC526597		Unknown
3,1	<b>Apol2_predicted</b>	XM_235465	PREDICTED: Rattus norvegicus apolipoprotein L, 2, mRNA.
3,0	TC561629		Unknown
3,0	<b>Cd44</b>	BM299612	CD44 antigen
2,9	TC561304		Unknown
2,8	TC562016		Unknown
2,7	<b>uPAR-3</b>	X76129	Rattus norvegicus uPAR-3 gene, partial CDS.
2,7	TC562078		Unknown
2,7	AB072252	AB072252	CDNA, clone:bA7, differentially expressed in pylorus
2,7	<b>TC549439</b>		Q9NRB6 Mutant fibroblast growth factor receptor 3 (Fragment), partial (9%)
2,7	TC542653		Unknown
2,6	<b>Ctnnb1</b>	AF486617	Rattus norvegicus beta-catenin (Ctnnb1) gene, promoter region and exon 1.
2,6	<b>Nppc</b>	NM_053750	Natriuretic peptide precursor type C
2,6	TC561474		Unknown
2,5	TC528328		Unknown
2,5	TC566074		Unknown
2,5	<b>Cyp2a2</b>	M33313	Rat hepatic steroid hydroxylase IIA2 (CYP2A2) gene, exons 1 and 2.
2,5	A_44_P737531		Unknown
2,5	Ubp1_predicted	AI556563	Transcribed locus
2,4	AI060246	AI060246	Transcribed locus
2,4	TC544530		Unknown
2,4	TC534269		Unknown
2,4	<b>Kcnc3</b>	M84211	Potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 3
2,4	<b>LOC365226</b>	XM_344878	similar to OVO-like 1 binding protein
2,4	unknown	U40628	Rattus norvegicus clone BB.1.4.1 unknown mRNA.
2,4	BU760453	BU760453	Transcribed locus
2,4	<b>Prss22_predicted</b>	XM_220222	PREDICTED: Rattus norvegicus protease, serine, 22, mRNA.
2,4	AA899198	AA899198	Transcribed locus

## Abkürzungen

---

2,3	AI030162	AI030162	Transcribed locus
2,3	TC562851		Q7TQ12 Aa1114, partial (9%)
2,3	TC527950		Unknown
2,3	TC564474		Unknown
2,3	<b>TC543443</b>		Q7Z288 Binding protein 2 like protein (Fragment), partial (7%)
2,3	TC552003		Q7TQ12 Aa1114, partial (10%)
			WWP2_MOUSE Nedd-4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2, partial
2,3	<b>TC542260</b>		(47%)
2,2	Tpm1	M16433	Rat alpha-tropomyosin gene, exons 5-9.
2,2	Lag3	NM_212513	Parathymosin
2,2	Cyp2a2	M33313	Rat hepatic steroid hydroxylase IIA2 (CYP2A2) gene, exons 1 and 2.
			Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVBJ38 3' end, mRNA
2,2	AI176008	AI176008	sequence.
			Rattus norvegicus cDNA clone RGIFR64 5' sequence, mRNA
2,2	BF286629	BF286629	sequence.
			Q9HD28 Retinitis pigmentosa GTPase regulator (Fragment), partial
2,1	<b>TC551983</b>		(5%)
2,1	TC544937		Unknown
2,1	<b>Csnk2a1</b>	AA899254	Casein kinase II, alpha 1 polypeptide
2,1	TC533023		Unknown
2,1	TC534656		Q6TXJ5 LRRGT00004, partial (32%)
2,1	TC544264		Unknown
2,1	<b>Rbm14</b>	BG670091	RNA binding motif protein 14
2,1	A_44_P914137		Unknown
2,1	TC527025		Unknown
2,1	TC562477		Unknown
			Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-cr-e-03-0-UI 3', mRNA
2,1	AA899996	AA899996	sequence.
			Rattus norvegicus chromosome 3, 19 clones, whole genome shotgun
2,1	AABR03024169	AABR03024169	sequence
2,1	AI030727	AI030727	Transcribed locus
2,1	TC539606		Unknown
2,1	RGD1564957_predicted	BF564914	Transcribed locus
			PREDICTED: Rat myosin regulatory light chain interacting protein,
2,0	<b>Myliip_predicted</b>	XM_225220	mRNA.
2,0	AA899661	AA899661	Transcribed locus
2,0	<b>Npuk68</b>	BF567896	Nuclear protein UKp68
2,0	TC527564		Unknown
2,0	<b>Slc16a6</b>	BF552049	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6
2,0	RGD1311455_predicted	AW915875	Transcribed locus
2,0	TC566041		Unknown
			Bento Soares Rattus norvegicus cDNA clone RGIHT39 5' end, mRNA
2,0	AW921395	AW921395	sequence.
2,0	AA963280	AA963280	Transcribed locus
2,0	<b>Nexn</b>	NM_139230	Nexilin
2,0	TC542112		Unknown
2,0	TC561998		Unknown
2,0	Cstf3_predicted	BF553091	Unknown mRNA

## Abkürzungen

---

2,0	<b>TC563011</b>		Q8R4C3 Csr1, partial (28%)
2,0	A_44_P630109		Unknown
2,0	<b>Hnrpa1</b>	AW915082	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
2,0	ENSRNOT00000048767	BF289485	Rattus norvegicus cDNA clone RGIHH80, mRNA sequence.
2,0	TC530801		Unknown
2,0	<b>TC550297</b>		Q91Z7 Lipogenin, partial (15%)
2,0	F3	NM_013057	Coagulation factor III
1,9	A_44_P567789		Unknown
1,9	<b>Ccn11</b>	AA963699	Cyclin L1
1,9	TC551918		Q7TQ12 Aa1114, partial (10%)
1,9	TC532661		Unknown
1,9	BM391518	BM391518	Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7327246 3', mRNA sequence. Rattus norvegicus cDNA clone MGC:72274 IMAGE:5598788,
1,9	Timm17a	BC061982	complete cds.
1,9	RGD1562563_predicted	AW920082	Similar to RIKEN cDNA G430041M01 (predicted)
1,9	<b>Brd2</b>	NM_212495	Bromodomain containing 2
1,9	TC559915		Unknown
1,9	<b>Sfpq</b>	AI502676	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)
1,9	<b>TC546204</b>		AF271035 odorant receptor {Rattus norvegicus;} , partial (5%)
1,9	TC544981		Unknown
1,9	TC559109		Q7PG24 ENSANGP00000023115, partial (14%)
1,9	TC563170		Q7TQ12 Aa1114, partial (10%)
1,9	TC568188		Unknown
1,9	A_44_P255694		Unknown
1,9	AW920832	AW920832	Bento Soares Rattus norvegicus cDNA clone RGIHD35 5' end, mRNA sequence.
1,9	TC560897		Unknown
1,9	TC526771		Unknown
1,9	<b>LOC310395</b>	XM_227134	similar to Nocturnin (CCR4 protein homolog)
1,9	TC526462		Unknown
1,9	AW143472	AW143472	Transcribed locus
1,9	TC566914		Unknown
1,9	<b>TC565908</b>		O23471 Glycine-rich protein homolog, partial (26%) PREDICTED: Rat cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, mRNA.
1,9	<b>Cstf3_predicted</b>	XM_342477	
1,9	<b>Pls3</b>	AI556541	Plastin 3 (T-isoform)
1,9	AA899244	AA899244	Transcribed locus
1,9	TC543194		Unknown
1,8	A_44_P966657		Unknown
1,8	TC550160		Unknown
1,8	<b>Arhgef18_predicted</b>	XM_221775	PREDICTED: Rat rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18, mRNA.
1,8	A_44_P382002		Unknown
1,8	<b>Dusp5</b>	NM_133578	Dual specificity phosphatase 5
1,8	AI010816	AI010816	Transcribed locus
1,8	AW143623	AW143623	Transcribed locus
1,8	<b>Zmynd17_predicted</b>	XM_214130	Zinc finger, MYND domain containing 17 (predicted)

## Abkürzungen

---

1,8	TC560958		Unknown
1,8	A_44_P903287		Unknown
1,8	<b>lfrd1</b>	NM_019242	Interferon-related developmental regulator 1
1,8	AI599192	AI599192	Transcribed locus
1,8	BF547565	BF547565	Transcribed locus
1,8	AI029491	AI029491	Transcribed locus
1,8	<b>Atp2b1</b>	L04739	Rat plasma membrane calcium ATPase isoform 1 gene, partial cds.
1,8	<b>Egr2</b>	NM_053633	Early growth response 2
1,8	TC534199		Unknown
1,8	TC536203		Unknown
1,8	TC543764		Unknown
1,8	A_44_P128820		Unknown
1,8	<b>Onecut1</b>	NM_022671	One cut domain, family member 1 PREDICTED: Rattus norvegicus similar to cDNA sequence
1,8	RGD1310168_predicted	XM_219540	BC032204, mRNA.
1,8	TC542511		Unknown
1,8	CB608947	CB608947	Transcribed locus Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BO1-ajl-b-08-0-UI 5', mRNA
1,8	BF565420	BF565420	sequence.
1,8	TC552020		Q7TQ12 Aa1114, partial (9%)
1,8	TC562246		Unknown Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIBH22 5' end, mRNA
1,8	AW914778	AW914778	sequence.
1,8	TC528133		Unknown
1,8	BF567739	BF567739	Transcribed locus
1,8	<b>TC535167</b>		Rho guanine nucleotide exchange factor 7, partial (4 %)
1,8	BQ211845	BQ211845	Transcribed locus
1,8	CF113751	CF113751	Rattus norvegicus cDNA clone CP8325 5', mRNA sequence.
1,8	TC561882		O61095 TcC31.7, partial (7%) similar to Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 3
1,8	<b>LOC502710</b>	BF566516	homolog
1,8	TC534010		Unknown
1,8	BG671918	BG671918	Transcribed locus Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIBH22 5' end, mRNA
1,8	AW914778	AW914778	sequence.
1,8	TC523509		Unknown
1,8	CK594771	CK594771	Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7111049 5', mRNA sequence.
1,8	TC555681		Unknown
1,8	<b>Pfc_mapped</b>	XM_216784	PREDICTED: Rat properdin factor, complement (mapped), mRNA. PREDICTED: Rattus norvegicus sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae),
1,8	<b>Srxn1</b>	XM_215887	mRNA.
1,8	<b>LOC316507</b>	XM_237255	similar to src homology 2 domain-containing transforming protein D
1,8	<b>Errfi1</b>	NM_001014071	ERBB receptor feedback inhibitor 1
1,7	<b>Kcnq3</b>	NM_031597	Potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 3
1,7	<b>RGD1311715_predicted</b>	XM_341080	Rattus norvegicus similar to HSPC314, mRNA
1,7	<b>Ctsk</b>	NM_031560	Cathepsin K
1,7	TC563659		Unknown
1,7	<b>TC523126</b>		Q6WKZ4 Rab11-family interacting protein 1B, partial (4%)

## Abkürzungen

---

1,7	<b>Vcl_predicted</b>	CB546076	strongly similar to PREDICTED: similar to Vinculin (Metavinculin)
1,7	<b>Eif4a2</b>	BF558764	Eukaryotic translation initiation factor 4A2
1,7	AW915141	AW915141	Transcribed locus
1,7	<b>Idi1</b>	NM_053539	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase
			PREDICTED: Rattus norvegicus vinculin (predicted) (Vcl_predicted),
1,7	<b>Vcl_predicted</b>	XM_223781	mRNA.
1,7	<b>Map3k2</b>	AF487544	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 2
1,7	<b>LOC257650</b>	NM_147142	hippyragranin
1,7	TC562837		Unknown
			Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BJ0p-age-b-10-0-UI 3', mRNA
1,7	AW520848	AW520848	sequence.
1,7	<b>Ugt1a8</b>	NM_175846	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6
1,7	Brd2	NM_212495	Bromodomain containing 2
1,7	TC526052		Unknown
1,7	<b>Ppig</b>	AW142801	Peptidylprolyl isomerase G
1,7	TC526530		Unknown
1,7	<b>Mmp10</b>	NM_133514	Matrix metalloproteinase 10
1,7	TC561199		Unknown
1,7	<b>Ugt1a8</b>	NM_175846	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6
1,7	P11	AF465254	Rattus norvegicus P11 gene, complete cds.
			Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIBH22 5' end, mRNA
1,7	AW914778	AW914778	sequence.
			Mus VPS10 domain receptor protein SORCS, full insert sequence
1,7	<b>TC541960</b>		(3%)
1,7	<b>Crkrs</b>	NM_138916	Cdc2-related kinase, arginine/serine-rich
1,7	<b>Rnpc2</b>	AW918729	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2
1,7	<b>Plaur</b>	NM_134352	Plasminogen activator, urokinase receptor
1,7	<b>Ifrd1</b>	NM_019242	Interferon-related developmental regulator 1
1,7	<b>Hmgcs1</b>	NM_017268	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
1,7	<b>RGD1563508_predicted</b>	XM_574543	Similar to PI-3-kinase-related kinase SMG-1 isoform 2 (predicted)
1,7	AW142501	AW142501	Transcribed locus
1,7	TC530682		Unknown
1,7	<b>TC532273</b>		Q14886 Mucin (Fragment), partial (10%)
1,7	TC533017		Q6TUG9 LRRGT00075, partial (3%)
1,6	TC543860		Q6TXI1 LRRGT00018, partial (5%)
1,6	<b>EII2</b>	BF553675	Elongation factor RNA polymerase II 2
1,6	BF559342	BF559342	Transcribed locus
1,6	<b>Idi1</b>	NM_053539	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase
1,6	<b>Kcnj3</b>	NM_031610	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3
1,6	AI547778	AI547778	Transcribed locus
1,6	A_44_P816824		Unknown
1,6	<b>Dctn2</b>	BF523160	Dynactin 2
1,6	TC562125		Unknown
1,6	<b>Hspa4</b>	AW530749	Heat shock protein 4
1,6	<b>Ankrd1</b>	NM_013220	Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
1,6	<b>Gadd45a</b>	NM_024127	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
1,6	<b>Zbtb24_predicted</b>	XM_345114	PREDICTED: Rat zinc finger and BTB domain containing 24, mRNA.
1,6	TC520941		Q7VCS4 Predicted protein, partial (10%)

## Abkürzungen

---

1,6	<b>Kcna3</b>	X16001	Rat mRNA for putative potassium channel subunit protein (RCK3). Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIBH22 5' end, mRNA
1,6	AW914778	AW914778	sequence.
1,6	BF558804	BF558804	Transcribed locus
1,6	<b>Zfand2a</b>	NM_001008363	Zinc finger, AN1-type domain 2A
1,6	TC520941		Q7VCS4 Predicted protein, partial (10%) PREDICTED: Rattus norvegicus similar to serum response factor, mRNA.
1,6	<b>RGD1559787_predicted</b>	XM_576514	
1,6	TC527977		AY558538 YML122C {Saccharomyces cerevisiae;} , partial (12%)
1,6	TC558857		Q7TPB8 AA673488 protein (Fragment), partial (6%)
1,6	<b>Dok3_predicted</b>	XM_225170	PREDICTED: Rattus norvegicus docking protein 3, mRNA.
1,6	<b>Cpt1b</b>	NM_013200	Carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle
1,6	TC558494		Unknown
1,6	RGD1561597_predicted	BF558507	Similar to mKIAA0518 protein (predicted)
1,6	<b>Serpina5</b>	NM_022957	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 5
1,6	TC566643		Unknown
1,6	TC541222		Unknown
1,6	TC545568		Unknown
1,6	<b>Egr1</b>	NM_012551	Early growth response 1
1,6	TC546713		Unknown DRG Library Rattus norvegicus cDNA clone DRN05G10 5', mRNA
1,6	BG669136	BG669136	sequence.
1,6	TC562629		Q7TQ12 Aa1114, partial (10%)
1,6	<b>PRP-2</b>	XM_573205	proline-rich protein Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIBH22 5' end, mRNA
1,6	AW914778	AW914778	sequence.
1,6	<b>Sfrs5</b>	NM_019257	Splicing factor, arginine/serine-rich 5
1,6	TC562469		Unknown
1,6	AA925323	AA925323	Transcribed locus PREDICTED: Rat cleavage and polyadenylation factor subunit
1,6	<b>Pcf11_predicted</b>	XM_341883	homolog, mRNA.
1,5	TC528746		Unknown
1,5	AI548017	AI548017	Transcribed locus
1,5	TC559490		Unknown
1,5	TC542347		Unknown
1,5	TC543219		Unknown
1,5	<b>LOC257646</b>	XM_343077	Rattus norvegicus FERM-domain-containing protein 163SCII, mRNA
1,5	<b>Cd68</b>	XM_213372	Rattus norvegicus CD68 antigen (Cd68), mRNA. Q9P5K7 Related to GLUCAN 1, 3-BETA-GLUCOSIDASE protein, partial (3%) PREDICTED: Rat cytoplasmic polyadenylation element binding protein
1,5	<b>TC555136</b>		4, mRNA.
1,5	<b>Cpeb4_predicted</b>	XM_220269	
1,5	<b>Insig1</b>	NM_022392	Insulin induced gene 1 PREDICTED: Rat TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase, mRNA.
1,5	<b>Tiparp_predicted</b>	XM_227217	
1,5	AI013671	AI013671	Transcribed locus
1,5	<b>RGD1562341_predicted</b>	XM_579843	Hook homolog 3
1,5	TC526396		Unknown

## Abkürzungen

---

1,5	<b>Sertad2</b>	XM_573672	Rattus norvegicus SERTA domain containing 2, mRNA.
1,5	<b>LOC310395</b>	XM_227134	similar to Nocturnin (CCR4 protein homolog)
1,5	TC565036		Unknown
1,5	<b>LOC365791</b>	NM_001014252	similar to T-cell activation Rho GTPase-activating protein isoform b
-1,5	<b>RGD1560795_predicted</b>	XM_216190	Similar to Sepiapterin reductase (predicted) Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C3-sy-b-07-0-UI 3', mRNA
-1,5	AI535444	AI535444	sequence.
-1,5	<b>TC537679</b>		Q7TN32 Fscn1 protein, complete
-1,5	<b>Galnt6_predicted</b>	XM_235663	Rat similar to N-acetyl-alpha-D-galactosamine, mRNA PRED.: Rat dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated
-1,5	<b>Dyrk2_predicted</b>	XM_235179	kinase 2.
-1,5	MGC114464	XM_576334	Rattus norvegicus similar to expressed sequence AI836003, mRNA.
-1,5	<b>Rab30</b>	XM_218916	Rattus norvegicus RAB30, member RAS oncogene family, mRNA.
-1,6	<b>Socs2</b>	NM_058208	Suppressor of cytokine signaling 2
-1,6	BM384088	BM384088	Transcribed locus PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Actin related protein M1,
-1,6	<b>RGD1561457_predicted</b>	XM_345198	mRNA.
-1,6	<b>Hoxb2_predicted</b>	XM_220894	PREDICTED: Rattus norvegicus homeo box B2, mRNA.
-1,6	<b>Pwwp2_predicted</b>	XM_341955	PREDICTED: Rattus norvegicus PWWP domain containing 2, mRNA.
-1,6	RGD1306932	XM_222005	Rattus norvegicus similar to CG9117-PA, mRNA.
-1,6	TC546786		Unknown Rattus norvegicus cDNA clone RGIHV17 5' sequence, mRNA
-1,6	BF290343	BF290343	sequence.
-1,6	TC522471		Unknown
-1,6	TC557413		Unknown
-1,6	LOC313450	NM_001014791	similar to RIKEN cDNA 2810428C21
-1,6	<b>Slc40a1</b>	NM_133315	Solute carrier family 39 (iron-regulated transporter), member 1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BT1-aka-a-11-0-UI 3', mRNA
-1,6	AW529005	AW529005	sequence.
-1,6	<b>Foxq1</b>	NM_022858	Forkhead box Q1
-1,6	<b>Bat4</b>	NR_002153	Rattus norvegicus Bat4 gene on chromosome 20 PREDICTED: Rattus norvegicus protocadherin 1 (cadherin-like 1),
-1,6	<b>Pcdh1_predicted</b>	XM_225997	mRNA.
-1,6	<b>Serpine1</b>	NM_012620	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
-1,6	TC538420		Unknown
-1,7	<b>Ascl1</b>	NM_022384	Achaete-scute complex homolog-like 1 (Drosophila) PREDICTED: Rat similar to breast cancer membrane protein 101,
-1,7	<b>RGD1562236_predicted</b>	XM_235349	mRNA. Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CT0-bua-e-02-0-UI 3', mRNA
-1,7	BG380705	BG380705	sequence.
-1,7	<b>Rgs4</b>	NM_017214	Regulator of G-protein signaling 4
-1,7	<b>Slnf2_predicted</b>	XM_220779	PREDICTED: Rattus norvegicus schlafen 2, mRNA. PREDICTED.: similar to Solute carrier family 39 (zinc transport),
-1,7	<b>Slc39a10_predicted</b>	AA943587	member 10 Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMAZ30 3' end, mRNA
-1,7	AI008579	AI008579	sequence.
-1,7	<b>Bmf</b>	NM_139258	Bcl2 modifying factor
-1,7	<b>RGD1562236_predicted</b>	CB547196	PREDICTED: similar to breast cancer membrane protein 101 [Rattus



## Abkürzungen

---

			norvegicus]
-1,7	<b>Fzd5</b>	NM_173838	Frizzled homolog 5 (Drosophila)
-1,7	<b>Cebpd</b>	NM_013154	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
-1,8	<b>RGD1560731_predicted</b>	XM_573364	PREDICTED: Rat similar to G protein-coupled receptor 146, mRNA.
-1,8	<b>TC558413</b>		TBX2_HUMAN T-box transcription factor TBX2 (T-box protein 2), partial (6%) Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CN0-blx-a-09-0-UI 3', mRNA
-1,8	BF417776	BF417776	sequence.
-1,9	<b>Bbc3</b>	NM_173837	Bcl-2 binding component 3
-1,9	AI045762	AI045762	Transcribed locus Similar to low density lipoprotein receptor-related protein binding
-1,9	<b>RGD1565715_predicted</b>	XM_341434	protein.
-1,9	<b>MGC94192</b>	NM_001004272	similar to PHD zinc finger containing protein JUNE1
-1,9	<b>Spsb2</b>	NM_001009660	SplA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2
-2,0	<b>Gdnf</b>	NM_019139	Glial cell line derived neurotrophic factor PRED.: Rat potassium channel tetramerisation domain containing 14,
-2,0	<b>Kctd14_predicted</b>	XM_218935	mRNA.
-2,0	<b>Gsg1</b>	NM_001013166	Germ cell associated 1
-2,0	<b>Rab15</b>	NM_198749	RAB15, member RAS oncogene family
-2,0	RGD1564045_predicted	CA507012	PREDICTED: Rattus norvegicus hypothetical LOC361225, mRNA
-2,0	<b>LOC500110</b>	XM_575461	Rattus norvegicus similar to zinc finger protein EZI, mRNA.
-2,1	LOC310926	XM_227769	Rattus norvegicus hypothetical protein LOC310926, mRNA.
-2,1	<b>Abra</b>	NM_175844	Actin-binding Rho activating protein
-2,1	<b>Hes1</b>	NM_024360	Hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)
-2,2	A_44_P545948		Unknown
-2,2	<b>Ccl2</b>	NM_031530	Chemokine (C-C motif) ligand 2
-2,3	A_44_P985259		Unknown
-2,5	<b>G0s2</b>	NM_001009632	G0/G1 switch gene 2 Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMBB18 3' end, mRNA
-2,6	AI008646	AI008646	sequence.
-2,7	<b>X52757</b>	X52757	R.norvegicus mitochondrial D-loop region.
-2,8	<b>RGD1562186_predicted</b>	XM_221409	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to stefin 2-like, mRNA.
-3,0	<b>LOC500300</b>	XM_575649	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein MGC6835, mRNA.

## Dankeschön

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann für die interessante Themenstellung, sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen danken.

Herrn Prof. Dr. Roger Goody danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und für seine sehr guten Tipps und Anregungen bei der kinetischen Charakterisierung.

Ebenso danke ich der Dritprüferin Frau Dr. Monika Wyszogrodzka.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Katja Hübel, die mich sehr nett und hilfsbereit betreut hat.

Danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz besonders meinen Projektpartnern Tanja Knoth und Viktor Vintonyak - u.A. für die gute Zusammenarbeit.

Für die Unterstützung bei den verschiedensten Untersuchungen und Techniken möchte ich mich ferner besonders bei Bernhard Ellinger (Wnt-Reporterassay, Hilfe mit XL-Fit), Robin Vetter (Zusammenarbeit beim Mikroarray), Thilo Walther (Einführung Phosphataseassay), Beate Schölermann und Sigrid Rosin-Steiner (h-PTP  $\beta$  Bereitstellung samt Assaybedingungen, h-PTP  $\beta$ -Roboter-Screening der Isatin-Derivate), Tim Bergbrede und allen Mitarbeitern der DPF ((Um)klonierung einiger Phosphatasen), Anette Langerak (Einführung in die Zellkultur) und Hans Mollenkopf am MPI in Berlin (Mikroarray, statistische Auswertung) bedanken, nicht zu vergessen bei Slava Ziegler und Daniel Rauh, die in den letzten Monaten bzw. projektbezogen als Ansprechpartner da waren.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Stuart Schreiber für die Gastfreundschaft in seiner Arbeitsgruppe und da Ethan Perlstein und Dr. Letian Kuia für die Unterstützung bei der Durchführung der Hefeassays sowie meiner ersten PC12-Experimente und eine insgesamt lehrreiche, interessante Zeit in Cambridge/Boston.

Die projektbezogenen Diskussionen und Überlegungen mit Sascha Menninger, Dirk Pendzialek, Bernhard Ellinger, Tanja Knoth und Viktor Vintonyak waren oft sehr hilfreich. Danke hier auch Tanja Knoth und Viktor Vintonyak für ihre allzeit geduldige Beantwortung von Fragen zur Chemie.

Für das zügige Korrigieren dieser Arbeit geht ein herzlicher Dank an Katja Hübel, Slava Ziegler und Max Koltzsch.

Allen Mitarbeitern in der Abteilung Chemische Biologie am Max-Planck-Institut Dortmund möchte ich für die gute, kollegiale Arbeitsatmosphäre danken. Dabei denke ich insbesondere an die „Biotruppe“, unser Büro A 3.28 bzw. die ehemalige Station IV samt Mittagspausengästen, Kathrin, Kristina, Kirti, Frau Rose sowie alle die, die dafür gesorgt haben, dass ich mich gerne an die Zeit am MPI und in Dortmund erinnern werde vor allem Bernhard, Anja, Sascha, Dirk, Thilo, Tanja, Beate und Sigi.

Allen Freunden und nicht zuletzt meiner Familie, die zwar nicht unmittelbar beteiligt waren, danke ich für ihre moralische Unterstützung und die schönen Wochenenden, Konzerte, Festivals, lustigen, langen Telefonate, aufheiternden Emails, Kraftpakete etc., die einem wenn es mal schwierig war und/oder jetzt in der Endphase geholfen haben, wieder weiterzumachen. Ganz offiziell an dieser Stelle also Dankeschön an meine Eltern, Bine, Michael, Oana, Oma, Klaus, Tante Agnes, Vera, Eva, Andrea, Marieke, Claudia, Sandra, Milena, Anja, Pia, Bernhard, Max, Erik, Daniel, Martin, Thomas, Sven und nicht zuletzt Christian. Alles Weitere mal inoffiziell ;-)



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Karin Warburg  
Geburtsdatum und -ort 26 Juli 1981, Lingen (Ems)  
Familienstand ledig

### Schulbildung

08/1987 – 07/1991 Grundschule, Salzbergen  
08/1991 – 06/2000 Gymnasium Dionysianum, Rheine  
06/2000 Abitur

### Universitätsausbildung

10/2000 – 10/2004 Studiengang Biologie/Diplom, Universität Münster  
10/2004– 10/2005 Diplomarbeit, Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, Arbeitskreis Medizinische Biochemie Prof. Dr. V. Gerke: *“Biochemische Charakterisierung des atypischen Annexins Nexin 4 aus C. elegans”*  
10/2005 Diplom  
01/2006 – 4/2010 Doktorarbeit, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und Universität Dortmund, Arbeitskreis Chemische Biologie Prof. Dr. H. Waldmann: *“Untersuchung Naturstoff-basierter Substanzklassen als chemische Modulatoren für biologische Prozesse mit Hilfe des vorwärts-, sowie rückwärtsgerichteten chemische-genetischen Ansatzes”*

Dortmund, März 2010.

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

Dortmund, 18. März, 2010

Karin Warburg