

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 (Tetransäuren) 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 Tetransäure Melophlin A bestätigt werden.

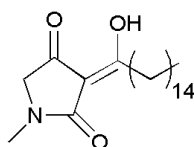


Abbildung 1: Strukturformel Melophlin A

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 Tetransäurederivate 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 Meloplin A jeweils auf beiden Seiten verstärkt wurde. Ferner konnte durch die Behandlung mit Meloplin 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 Dynamine-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 Dynamine-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 Melophrin 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 Melophrin A näher charakterisiert und seinen Wirkmechanismus untersucht werden. Ein Zusammenhang zwischen den potentiellen molekularen Angriffspunkten von Melophrin 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 Spirofusionierte-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 β bzw. PTPN2) getestet wurden.

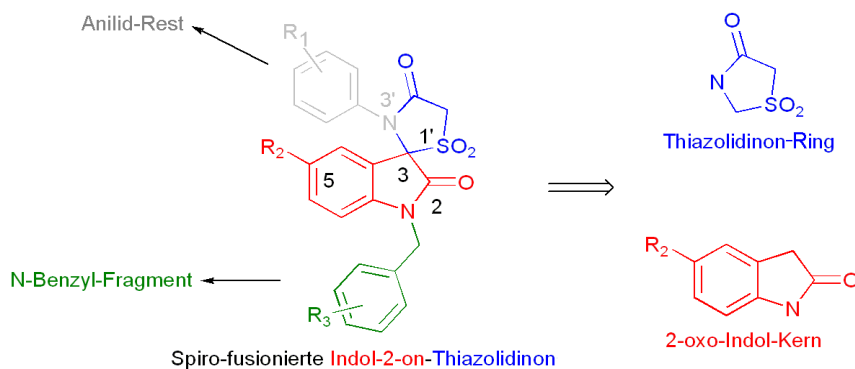


Abbildung 2: Spiro-fusionierte-Indol-2-on-Thiazolidinone mit dem 2-oxo-Indol-Kern, der in vielen Naturstoffen vorkommt, und dem Thiazolidon-Ring als zusätzlicher, synthetischer Heterozyklus.

Die generierten Daten dienen zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Analyse und helfen 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 β 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 β 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 β 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 β 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 β 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 Endozytose-Modulator und durch den Ansatz der rückwärtsgerichteten chemischen Genetik Spirooxindole und davon abgeleitete Isatin-Derivate als Phosphatase-Inhibitoren (MPTPB, h-PTP β) 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.