

Zusammenfassung der Doktorarbeit:  
“Etablierung von Testverfahren zur Evaluation niedermolekularer  
Modulatoren des Wnt Signalwegs und anderer biologischer  
Prozesse”

Ein Ziel der Chemischen Biologie ist die Identifizierung und Bereitstellung neuer biologisch aktiver Substanzen. Diese Substanzen dienen idealerweise nicht nur als Sonden zur Aufklärung grundlegender Fragestellungen sondern auch als Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung. Es war deshalb ein wichtiges Ziel dieser Arbeit - in Kooperation mit organischen Chemikern der Abteilung - neue, biologisch aktive Moleküle und Sonden zu entwickeln.

Eine Kooperation mit Dr. L.-G. Milroy (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) befasste sich mit der Erstellung einer detaillierten Struktur-Wirkungsbeziehung für aktinbindende Analoga aus der Gruppe der Jaspamide und Chondramide. Diese marinen Naturstoffe sind potente Aktinstabilisatoren und verhindern dadurch die Zellteilung. Sie sind deshalb als mögliche Ausgangspunkte für die Entwicklung von Krebsmedikamenten interessant. Es wurden in zwei relevanten Zelllinien für 25 Verbindungen Dosis-Wirkungsbeziehungen erstellt. Diese Daten ermöglichten zum einen den Vergleich der Aktivitäten der Analoga mit denen der bereits bekannten Naturstoffe und zum anderen wurden sie für die Entwicklung einer detaillierten Struktur-Wirkungsbeziehung genutzt, welche als Ausgangspunkt weiterer Arbeiten diene.

Eine weitere Kooperation mit S. Schoof und S. Baumann unter Leitung von Dr. Arndt (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) zielte auf die Analyse antibiotischer Naturstoffderivate des Thiostreptons, eines in der Veterinärmedizin zugelassenen Antibiotikums. Durch Semisynthese war es der Gruppe von Dr. Arndt gelungen eine Kollektion modifizierter Thiostreptonderivate herzustellen, welche im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirksamkeit untersucht wurden. Neben antibiotischen Tests wurden auch Untersuchungen in eukaryontischen Zellkulturen durchgeführt. Da das molekulare Ziel der Thiopeptide, zu denen auch Thiostrepton gehört, das bakterielle Ribosom ist, wurde eine Wechselwirkung mit dem dazu ähnlichen mitochondrialen Ribosom vermutet. Anfärbungen von BSC-1-Zellen mit einer fluoreszenten Thiostreptonsonde im

Rahmen dieser Arbeit und auch biochemische Studien von S. Baumann bestätigten eine Wechselwirkung mit dem mitochondrialen Ribosom.

Eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Niemeyer an der Technisch Universität Dortmund beschäftigte sich mit einer gänzlich anderen Fragestellung. Diese Arbeitsgruppe entwickelt Methoden zur Mikrostrukturierung von Oberflächen. Im Rahmen der Kooperation wurde in Zusammenarbeit mit Dr. H. Schröder der Einsatz von Mikroarrayoberflächen in der Zellkultur untersucht. Die Herausforderung bestand in der Entwicklung einer geeigneten Kultivations-bedingung, die eine effektive Besiedelung der Mikrostrukturen erlaubte. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden verschiedene Peptidkonjugate zur stabilen Verankerung der Zellen auf den Mikrostrukturen untersucht. Zyklische RGD-Peptide erwiesen sich dabei als überlegen gegenüber linearen RGD-Peptiden, ein Ergebnis, das die verschiedenen Affinitäten dieser Peptide zum Integrin-Rezeptor widerspiegelt. Interessanterweise konnten eukaryontische Zellen auch effizient Mikrostrukturen aus DNA-Konjugaten binden.

In einer weiteren Kooperation mit S. Koch (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) wurde eine Sonde zur Untersuchung der zellulären Palmytylierungsmaschinerie erzeugt. Die dynamische De- und Repalmytylierung des Ras-Proteins spielt eine wichtige Rolle im EGF-Signalweg, weshalb die Regulation dieses Proteins von großem onkologischen Interesse ist. Um die Spezifität der de- und repalmytylierenden Enzyme zu untersuchen, war es nötig, ein künstliches Substrat für diesen Prozess herzustellen. Zu diesem Zweck wurde ein EGFP-Konstrukt mit einem zusätzlichen Cystein am C-Terminus kloniert. Nach Expression des EGFP-Konstrukts durch C. Nowak konnte sie mittels MIC-Ligation ein palmytylierbares Peptid, welches dem C-Terminus des Ras-Proteins entsprach, mit dem EGFP-Protein verknüpfen. Durch die so erhaltene Sonde waren zelluläre Studien möglich, die den Prozess und die Spezifität der De- und Repalmytylierung weiter aufklärten.

Im Rahmen der der vorliegenden Arbeit wurde in Kooperation mit S. Wetzel eine Methode entwickelt, welche es erlaubte aus der abteilungseigenen Substanzdatenbank eine geeignete Auswahl an Verbindungen zu erzeugen, welche repräsentativ in zellulären Testsystemen untersucht werden konnten. Hierfür wurden zunächst durch die Aufstellung von vier einfachen Kriterien, welche die Löslichkeit, die Verfügbarkeit und die chemische Struktur der Verbindungen umfassten, diejenigen Substanzen aus der abteilungseigenen Substanzdatenbank ausgewählt, die für zelluläre Tests besonders

geeignet waren. Diese Substanzen wurden durch den OptiSim-Algorithmus nach chemischer Ähnlichkeit in Gruppen mit durchschnittlich zehn Mitgliedern sortiert, wobei jeweils die für diese Gruppe repräsentative Verbindung in eine neue Auswahl aufgenommen wurde. Die auf die Weise erzeugte Auswahl beinhaltete 479 Verbindungen, die nach chemischer Diversität und biologischer Relevanz ausgewählt worden waren. Neben dem Einsatz in Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte die erstellte Substanzauswahl auch bereits von mehreren Mitarbeitern der Abteilung sowie von externen Kooperationspartnern in zellbasierten Tests eingesetzt werden. Der für die Substanzauswahl entwickelte Algorithmus kann außerdem jederzeit neue, für zelluläre Tests geeignete Substanzbibliotheken generieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem zwei zelluläre Tests entwickelt, um neue biologisch aktive Substanzen in Anwendungsgebieten zu identifizieren, welche bisher nicht in der Arbeitsgruppe untersucht wurden.

Einer der in dieser Arbeit etablierten zellulären Tests sollte sich mit der Identifizierung neuer antibiotischer Verbindungen beschäftigen. Zum einen müssen dringend neue potente Antibiotika entwickelt werden, um ältere und mittlerweile weniger effektive Medikamente zu ersetzen, und zum anderen verspricht die Untersuchung naturstoffinspirierter Substanzbibliotheken einen hohen Anteil aktiver Verbindungen. Das Ziel, eine zuverlässige Methode zur Identifizierung neuer antibiotischer Verbindungen zu etablieren, konnte durch die Anwendung der DIN 58940, die durch Verwendung der System-Duetz-Abdeckungen weiter optimiert wurde, erreicht werden. Der Einsatz von vier klinisch erprobten Bakterienstämmen erlaubte es, die erhaltenen Daten in ihrer Relevanz einzuordnen. Mit den substituierten  $\beta$ -Carbolin-Hydantoin-Verbindungen wurde eine Substanzklasse identifiziert, deren Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich liegt. Für die untersuchten Tetramsäurederivate ist es zudem gelungen, ihre Wirkungsweise, die Entkopplung des bakteriellen Protonengradienten, nachzuweisen.

Ein wesentliches Ziel der Arbeit war die Untersuchung des kanonischen Wnt-Signalwegs. Dieser Signalweg ist ein maßgeblicher Regulator von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. Seine fehlerhafte Regulierung ist ein Auslöser der Tumorentwicklung; daher ist die Identifizierung von Inhibitoren des Signalwegs von großem klinischen Interesse. Aktivatoren des Wnt-Signalwegs werden andererseits bereits in der Stammzellforschung eingesetzt und sind deshalb ebenso von großer

klinischer Relevanz. Durch Etablierung und Einsatz eines Luziferase-basierten Reporter-Gen-Tests wurden insgesamt mehr als 800 chemische Substanzen auf ihre Eigenschaft, den kanonischen Wnt-Signalweg zu modulieren, untersucht.

Einer der aus dieser Analyse hervorgegangenen stärksten Inhibitoren, ein substituiertes Dekalin, wurde weitergehend untersucht. Nachdem die Dosis-Wirkungsuntersuchungen der Substanz in der Reporter-Gen-Zelllinie und auch in untransformierten HEK293-Zellen die niedrig mikromolare Aktivität bestätigten, wurde genauer eingegrenzt, welcher Teil des Wnt-Signalwegs von der Substanz gestört wird. Dazu wurde der Proteinkomplex, welcher  $\beta$ -Catenin phosphoryliert, entweder durch niedermolekulare Verbindungen gehemmt oder es wurden für diesen Komplex defiziente Krebszelllinien für die Analyse genutzt. Da die Substanz auch in diesen Fällen ihre volle Wirksamkeit zeigte, wurde vermutet, dass das zelluläre Ziel in der Transkriptionskontrolle lag. Ein weiterer Hinweis wurde durch Inkubation der Substanz mit verschiedenen Zellfraktionen erhalten, die anschließend auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, den Wnt-Signalweg zu inhibieren. Es zeigte sich, dass die Verbindung nicht wirksam war, nachdem sie mit Proteinen des Zellkerns inkubiert wurde, wahrscheinlich weil ein Protein des Kerns die Substanz band und dadurch eine weitere Wirkung verhinderte. Eine Resynthese der Substanz gelang nicht, da die chemische Struktur der Verbindung nicht aufgeklärt werden konnte. Im Zuge dieser Struktursuche wurde, basierend auf 320 weiteren Dekalinen, eine Struktur-Wirkungsbeziehung aufgestellt, die zeigte, dass diese Substanzklasse durchaus noch weitere sehr aktive Verbindungen enthält.

Es wurde ebenso der Mechanismus der stärksten Aktivatoren untersucht, welche zur Klasse der Oxepane gehörten. Bei dieser Substanzklasse handelte es sich um synergistisch wirkende Substanzen, da sie ohne Aktivierung des Wnt-Signalwegs mit Wnt3a-Protein keine Wirkung zeigen. Studien mit niedermolekularen Verbindungen oder Krebszelllinien zeigten, dass das molekulare Ziel der Aktivatoren auf der Ebene des Rezeptorkomplexes liegt. Deshalb wurde in Kooperation mit organischen Chemikern der Abteilung eine Affinitätssonde synthetisiert. Hierzu wurde im Vorfeld durch Untersuchung von 116 Oxepanen eine Struktur-Wirkungsbeziehung aufgestellt. Die durch eine Kooperation dargestellte Sonde wurde in einer Affinitätsaufreinigung eingesetzt, wodurch es gelang, neben anderen Proteinen die Vang-Gogh-Like-Proteine 1 und 2 als Bindepartner zu identifizieren. Diese Proteine sind Rezeptoren des nicht-kanonischen Wnt/PCP-Signalwegs und können direkt den kanonischen Wnt-Signalweg beeinflussen. Die Proteine Cdc2 und Pesc1 konnten als spezifische Bindepartner

ausgeschlossen werden. Vang1 hingegen konnte in anschließenden Immunodetektionen als reversibler Bindepartner identifiziert werden.

Die Charakterisierung von Proteinen der Van-Gogh-Like-Proteinfamilie als Bindepartner verschiedener Oxepanderivate bildet einen interessanten Einstieg in weiterführende Untersuchungen des kanonischen und des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs.