

Biologische Charakterisierung von Indolochinolizinen

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

DISSERTATION

von

Master of Science

Verena Pries

aus Essen

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Schulz

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Zeit von Mai 2007 bis Juni 2011 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Chemische Genetik.....	1
1.2.	Methoden zur Zielprotein-Identifizierung	6
1.3.	Der Zellzyklus.....	12
1.4.	Der Centrosomen-Zyklus.....	15
1.5.	Die M-Phase: Mitose und Cytokinese	18
1.6.	Der Zellzyklus als Ansatzpunkt für Krebstherapien.....	23
1.7.	Zielsetzung.....	29
2.	Material.....	31
2.1.	Laborgeräte	31
2.2.	Verbrauchsmaterialien.....	32
2.3.	Chemikalien.....	33
2.4.	Puffer und Lösungen	35
2.5.	Nucleinsäure-Standards	38
2.6.	Protein-Standard	38
2.7.	Vektoren.....	38
2.8.	Enzyme	38
2.9.	Oligodesoxyribonukleotide	39
2.9.1.	Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung.....	39
2.9.2.	Oligodesoxyribonukleotide zur Sequenzierung.....	39
2.10.	Antikörper.....	39
2.10.1.	Primäre Antikörper	39
2.10.2.	Sekundäre Antikörper.....	40
2.11.	Reagenziensets „Kits“	41
2.12.	Nährmedien.....	41
2.12.1.	Bakterien.....	41
2.12.2.	Zellen	42
2.13.	Organismen	43
2.13.1.	Bakterienstämme	43

Inhaltsverzeichnis

2.13.2.	Zelllinien.....	43
3.	Methoden	45
3.1.	Molekularbiologische Methoden	45
3.1.1.	Anzucht und Lagerung von Bakterien	45
3.1.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
3.1.3.	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	45
3.1.4.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	45
3.1.5.	Klonierung von DNA-Fragmenten	46
3.1.5.1.	Herauslösen von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	46
3.1.5.2.	DNA-Hydrolyse mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	46
3.1.5.3.	Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden	46
3.1.5.4.	Ligation von DNA Fragmenten.....	47
3.1.5.5.	DNA-Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock	47
3.1.5.6.	Kolonie-PCR.....	47
3.1.5.7.	Herstellung von Glycerol-Kulturen	47
3.1.5.8.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	48
3.1.6.	Heterologe Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	48
3.1.6.1.	Heterologe Expression von Nucleophosmin.....	48
3.1.6.2.	Heterologe Expression von CRM1	48
3.2.	Zellbiologische Methoden.....	49
3.2.1.	Kultivierung von Zellen	49
3.2.1.1.	Auftauen von Zellen	49
3.2.1.2.	Subkultivierung/Passagieren von Zellen.....	49
3.2.1.3.	Zellzahlbestimmung	49
3.2.1.4.	Kryokonservierung.....	49
3.2.2.	Transfektion von DNA.....	50
3.2.3.	Herstellung von Zelllysaten	50
3.2.4.	Synchronisation von Zellen.....	50
3.2.5.	Immunzytochemie.....	51
3.2.5.1.	Fixieren von Zellen	51

Inhaltsverzeichnis

3.2.5.2.	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen	51
3.2.6.	Durchflusszytometrie	51
3.2.7.	Mikroskopie	52
3.2.7.1.	Lebendzell-Mikroskopie am MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden.....	52
3.2.7.2.	Lebendzell-Mikroskopie an der Universität Konstanz	53
3.2.7.3.	Fluoreszenzmikroskopie	53
3.2.7.4.	Konfokale Mikroskopie	53
3.2.7.5.	Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM).....	53
3.2.8.	Test zur Bestimmung der Zellproliferation.....	54
3.2.9.	Apoptose Test.....	54
3.3.	Proteinchemische Methoden.....	55
3.3.1.	Reinigung von Proteinen	55
3.3.1.1.	Reinigung von (His) ₁₀ -markiertem NPM	55
3.3.1.2.	Reinigung von CRM1	55
3.3.2.	Proteinquantifizierung.....	56
3.3.3.	Konzentrieren von Proteinen	56
3.3.4.	Affinitätsreinigung zur Zielprotein-Identifizierung.....	56
3.3.5.	Tryptischer in-Gel Verdau von Proteinen	57
3.3.6.	Protein-Identifikation mittels nano-HPLC/MS/MS.....	57
3.3.7.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.3.8.	Coomassie-Färbung von Proteinen	58
3.3.9.	Zink-Imidazol Färbung von Proteinen	59
3.3.10.	Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran	59
3.3.11.	Immundetektion von auf Membranen immobilisierten Proteinen	59
3.3.12.	Detektion mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper.....	59
3.3.13.	Detektion mittels HRP-gekoppelten Antikörpern	60
3.3.14.	Aktivitätsanalyse der Phosphatase CDC25a	60
3.3.15.	Aktivitätsanalyse verschiedener Kinasen	60

Inhaltsverzeichnis

3.3.16.	Fluoreszenz-Polarisation.....	61
3.3.17.	Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	61
4.	Ergebnisse.....	62
4.1.	Phänotypische Analysen.....	62
4.1.1.	Erstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung.....	62
4.1.2.	Primäre Analysen mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie.....	66
4.1.3.	Analyse der Konzentrationsabhängigkeit des Phänotyps.....	68
4.1.4.	Analyse der Spindelpol-Zusammensetzung in multipolaren Zellen.....	69
4.1.5.	Zellzyklus-Analysen.....	72
4.1.6.	Untersuchungen des Spindel-Kontrollpunktes.....	73
4.1.7.	Untersuchungen zur Zellproliferation und Apoptose.....	77
4.1.8.	Phänotypische Analysen in weiteren Zelllinien.....	78
4.2.	Identifizierung der Zielproteine der Centrocountine.....	87
4.2.1.	Analysen basierend auf wissenschaftlichen Hypothesen.....	87
4.2.1.1.	Untersuchungen zur Tubulin-Polymerisation.....	87
4.2.1.2.	Aktivitäts-Analyse der Phosphatase CDC25a.....	89
4.2.1.3.	Aktivitäts-Analyse verschiedener Zellzyklus-relevanter Kinasen.....	90
4.2.2.	Proteinbiochemische Untersuchungen verschiedener Zellzyklus-relevanter Proteine.....	94
4.2.3.	Zielprotein-Identifizierung mittels Affinitätsreinigung.....	97
4.3.	Validierung von Nucleophosmin.....	99
4.3.1.	Immundetektion identifizierter Zielproteine.....	99
4.3.2.	Fluoreszenz-gekoppelte in vivo Bindungsstudien.....	101
4.3.3.	Fluoreszenz-gekoppelte in vitro Bindungsstudien.....	103
4.3.4.	Einfluss von Centrocountin 1 auf die Sekundärstruktur von NPM bzw. CRM1.....	104
4.3.5.	Funktionelle Untersuchungen von NPM und CRM1.....	106
5.	Diskussion.....	110
5.1.	Phänotypische Analysen.....	110

Inhaltsverzeichnis

5.2.	Zielprotein-Identifizierung	114
5.3.	NPM – ein multifunktionales Protein ermöglicht verschiedene Wirkungsmechanismen von Centriolen	116
5.4.	NPM – bekannte Inhibitoren.....	119
5.5.	NPM – Rolle während der Centriolen-Duplikation	121
6.	Ausblick.....	128
7.	Zusammenfassung	129
8.	Literatur	132
9.	Anhang	149
9.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	149
9.2.	Danksagung	151
9.3.	Lebenslauf	153
9.4.	Eidesstattliche Erklärung.....	154

*„Ob eine Sache gelingt, erfährst du nicht wenn du darüber nachdenkst,
sondern wenn du es ausprobierst.“*

Für Thorsten und meine Familie

1. Einleitung

1.1. Chemische Genetik

Einen Meilenstein bei der Analyse der menschlichen Biologie definierte 2001 die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter et al., 2001). Zu wissen welche Gene vorliegen und abgelesen werden können oder die Proteine zu erfassen, welche zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle exprimiert werden, ist jedoch nicht ausreichend, um das Phänomen Leben vollständig zu verstehen. Viel mehr entscheidet sich das Schicksal einer Zelle durch die Interaktion von Proteinen sowohl untereinander, als auch mit anderen Makromolekülen, mit Strukturen, wie der Zellmembran und dem Zytoskelett, sowie mit niedermolekularen Verbindungen, welche durch Bindung an Genprodukte deren Aktivität verändern können. Dementsprechend bleibt eine der größten Herausforderungen der Naturwissenschaft die einzelnen Buchstaben der Genomsequenz, zu Wörtern, Sätzen, Absätzen und Kapiteln anzuordnen, um letztendlich das Buch des Lebens zusammenzufügen (Waldmann, 2003). Um dieses Ziel zu erreichen, folgt die Molekulargenetik seit ihren Anfängen im 20. Jahrhundert dem Grundsatz: Um ein System zu verstehen, muss man es stören (Brenner, 1974; Stockwell, 2004). Dies gelingt zum einen durch gezieltes Ausschalten von Genen („Knock out“), was die Expression der entsprechenden Proteine verhindert. Zum anderen resultiert eine erhöhte Anzahl von Genkopien beziehungsweise Verwendung von aktiveren Promotoren in einer gesteigerten Proteinkonzentration. Des Weiteren kann eine Proteinfunktion durch Mutation des entsprechenden Gens modifiziert werden (Hartwell, 1991). Aufgrund des zu beobachtenden Phänotyps, kann abschließend auf die Genfunktion geschlossen werden. Mit Hilfe dieser Methodik konnten grundlegende biologische Prozesse erfolgreich erforscht werden (Stockwell, 2000). So wurde etwa der Zellzyklus an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Hartwell, 1974), der programmierte Zelltod am Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Driscoll, 1992) sowie die frühembryonale Entwicklung an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980) aufgeklärt. Allerdings bringen genetische Ansätze auch einige Einschränkungen mit sich. Zum Beispiel gestaltet sich die Analyse eines Phänotyps als sehr schwierig, wenn die Ausschaltung eines Gens zur Letalität führt. Ebenso sind genetische Mutationen in den meisten Fällen nicht konditional, sie können nicht gezielt an- oder ausgeschaltet werden. Mutationen von nicht-essentiellen Genen können außerdem häufig funktionell durch verwandte Gene kompensiert werden,

so dass der „Knock out“ Phänotyp verdeckt bleibt (Alaimo et al., 2001). Ein komplementärer Ansatz zur Molekulargenetik ist die Chemische Genetik, welche anstelle von Genmutationen niedermolekulare Verbindungen nutzt, um Proteinfunktionen zu verändern (Schreiber, 1998). Obwohl der Begriff Chemische Genetik erst in den 90er Jahren geprägt wurde, reichen seine Anfänge weit zurück. So dienten bereits vor Jahrhunderten Naturstoffe, welche meist zufällig durch Menschen oder Tiere aufgenommen wurden und zu einem positiven Effekt führten, als Arzneimittel. Im späten 18. Jahrhundert festigte sich, durch die routinemäßige Reinigung der Wirkstoffe Opium und Digitalis aus dem Schlafmohn bzw. dem Fingerhut, die Idee, dass der Effekt von Pflanzenextrakten durch die einzelnen Bestandteile herbeigeführt wird (Florian et al., 2007). Die Beobachtung von Paul Ehrlich, Nervenzellen mit Methylenblau selektiv anfärben zu können und die daraus resultierende Folgerung, dass die Wirkung von niedermolekularen Substanzen durch „Rezeptoren“ herbeigeführt wird, war ein weiterer Fortschritt (Travis, 1989). Die Basis für chemisch-genetische Analysen wurde im 19. Jahrhundert geschaffen, als es Chemikern erstmals gelang Verbindungen zu synthetisieren, welche zuvor aus Pflanzenextrakten isoliert worden waren. Eines der wahrscheinlich bekanntesten Beispiele hierfür ist die Acetylsalizylsäure (Vane & Botting, 2003). Bereits in der Antike wurde die fiebersenkende und schmerzstillende Wirkung von Weidenrindenextrakt beschrieben. Die Isolierung von Salizylsäure aus der Weidenrinde erfolgte um 1830 und bis zur ersten erfolgreichen Herstellung von Acetylsalizylsäure vergingen weitere 23 Jahre. Schließlich wurde 1899 Aspirin® als erster synthetischer Wirkstoff kommerziell durch Bayer & Co vermarktet. Dies war sowohl der Auftakt für die wachsende Anzahl an Pharmaunternehmen, als auch für die Medizinische Chemie. Fortschritte im Rahmen der Proteinexpression und -reinigung, trugen zum Durchbruch der chemisch-genetischen Methoden bei (Florian et al., 2007).

Alternativ zur klassischen Genetik hat die Chemische Genetik einige Vorteile aufzuweisen: Ein chemisch-genetischer Ansatz kann parallel an verschiedenen Arten (Zelllinien oder Organismen) durchgeführt werden. Des Weiteren kann die Chemische Genetik Systeme analysieren, für die klassische genetische Ansätze nur teilweise, bzw. gar nicht oder nur sehr schwer durchzuführen sind. Weitere Vorteile sind die Funktion von essentiellen und rezessiven Genen untersuchen zu können, sowie schnell ablaufende Prozesse zeitaufgelöst zu analysieren. Außerdem kann nach Entfernen der niedermolekularen Substanz eine mögliche biologische Antwort beobachtet werden und es besteht die Möglichkeit konzentrationsabhängige Phänotypen zu erforschen. Niedermolekulare Verbindungen können in verschiedenen Kombinationen eingesetzt werden und zudem als Hilfsmittel in der Protein-

Kristallographie dienen. Ferner kann mit Hilfe der Chemischen Genetik spezifisch eine Proteinfunktion ausgeschaltet werden, während beim Ausschalten eines Gens alle Funktionen des Proteins verloren gehen. Letztendlich ist auch die Tatsache, dass eine niedermolekulare Substanz möglicherweise zu einem Arzneimittel weiterentwickelt wird, eine Motivation diese Moleküle als Werkzeuge zur Erforschung von biologischen Prozessen einzusetzen (Stockwell, 2004; Westwood, 2004). Eine Gemeinsamkeit der Molekulargenetik und der Chemischen Genetik besteht in der Unterteilung in einen vorwärts- und einen rückwärtsgerichteten Ansatz, wie in Abbildung 1 dargestellt ist.

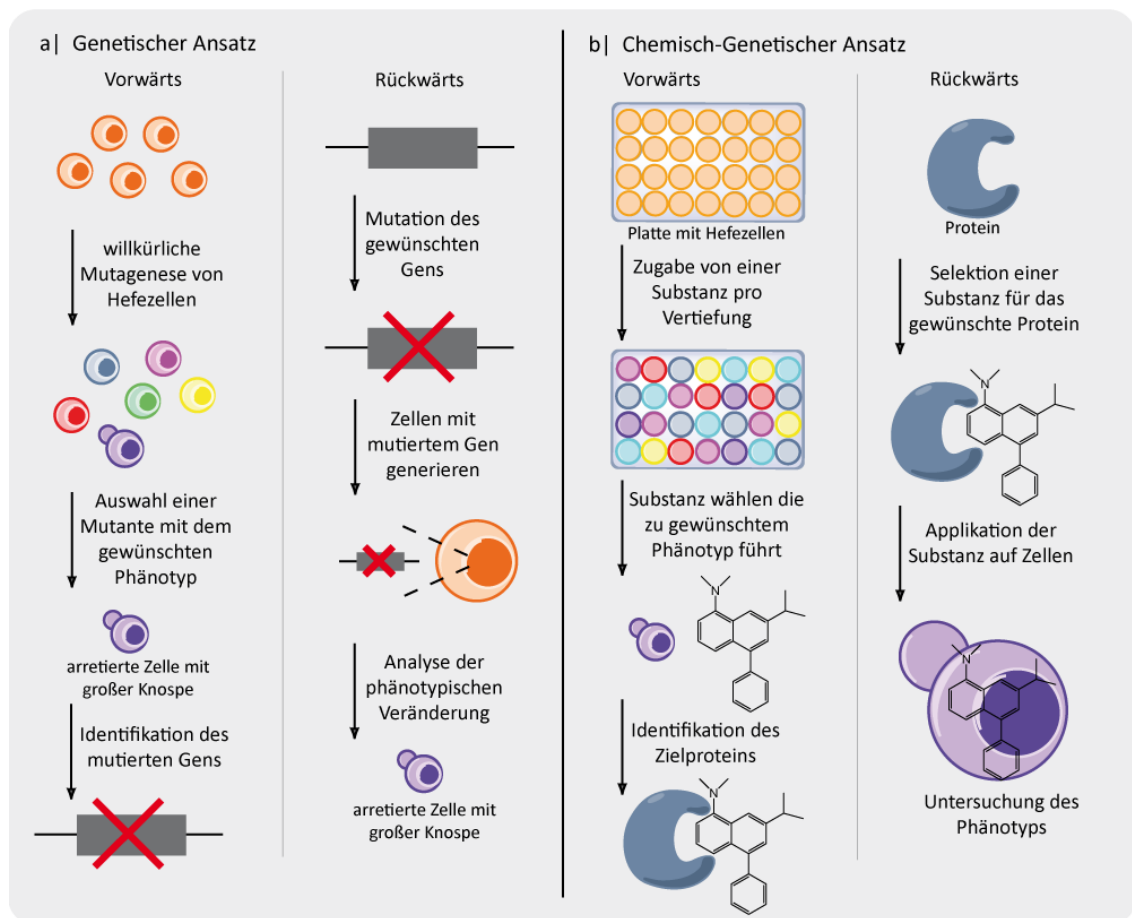


Abbildung 1: Vergleich von genetischen und chemisch-genetischen Ansätzen (modifiziert nach Stockwell, 2000)

a) Ein vorwärts-gerichteter genetischer Ansatz beinhaltet die willkürliche Mutagenese von Zellen, ein Testverfahren zur Detektion gewünschter Phänotypen und die Identifizierung der mutierten Gene in den betroffenen Zellen. Im Gegensatz hierzu wird bei dem rückwärts-gerichteten Ansatz ein Gen spezifisch mutiert und der daraus resultierende Phänotyp untersucht. **b)** Bei einem vorwärts-gerichteten chemisch-genetischen Ansatz werden in einem Testverfahren Substanzen auf Zellen appliziert. Eine Substanz, welche den gewünschten Phänotyp auslöst wird ausgewählt und das Zielprotein identifiziert. Im rückwärts-gerichteten Ansatz wird ein Protein von Interesse genutzt, um unter mehreren Substanzen einen spezifischen Bindungspartner zu finden. Anschließend wird der Effekt der ausgewählten Substanz auf den Phänotyp untersucht.

Der rückwärts-gerichtete chemisch-genetische Ansatz beginnt bei einem Protein von Interesse und führt zur Analyse des Phänotyps. Genauer gesagt werden in einem biochemischen *in vitro*-Testsystem niedermolekulare Substanzen untersucht, welche möglicherweise das Zielprotein modifizieren können. Die phänotypische Antwort identifizierter Inhi-

bitoren oder Aktivatoren wird anschließend in einem zellulären System untersucht. Im Gegensatz zum rückwärts-gerichteten Ansatz bewegt sich der vorwärts-gerichtete Ansatz vom Phänotyp zum Zielprotein. In diesem Testsystem werden niedermolekulare Verbindungen gesucht, die in dem untersuchten biologischen System einen gewünschten Phänotyp auslösen. Weist ein Molekül Aktivität auf, muss anschließend das von der Substanz modifizierte Protein identifiziert werden (Hübel et al., 2008). Das zu untersuchende biologische System kann in diesem Fall ein einzelliger Eu- oder Prokaryot sein, physiologische oder pathologische Zellen komplexer mehrzelliger Vertebraten oder Säuger sowie komplette höhere Organismen wie Fliegen, Würmer, Zebrafische oder Mäuse (Bredel & Jacoby, 2004).

Ein Fallbeispiel für einen rückwärts-gerichteten chemisch-genetischen Ansatz ist die Aufklärung der Funktion der Kinase MEK1 (Sebolt-Leopold et al., 1999). Diese wurde in einem im Hochdurchsatz durchgeführten *in vitro* Kinase-Testsystem, spezifisch durch die niedermolekulare Verbindung PD184352 (Abbildung 2) inhibiert. Um die Bedeutung von MEK1 für das Zellwachstum und die Morphologie sowie den Verlauf des Zellzyklus zu definieren, wurde der Effekt von PD184352 auf diese Prozesse in Dickdarmkrebszellen untersucht. Diese Analysen zeigten, dass die Aktivität von MEK1 für den Übergang des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase, für das anhaftungsunabhängige Wachstum, die Zellverteilung und die Überführung von einer runden Morphologie der Darmkrebszellen zu einer abgeflachten Morphologie benötigt wird (Abbildung 2). Bei Mäusen mit einem Dickdarmtumor, die mit PD184352 behandelt wurden, war ein Schrumpfen des Tumors zu verzeichnen, was ebenfalls auf eine Beteiligung von MEK1 am Wachstum von Dickdarmkrebszellen *in vivo* hindeutete. Zusammenfassend konnte durch diesen Ansatz ein niedermolekularer MEK1 Inhibitor entdeckt werden, der im weiteren Verlauf zur Aufklärung der Rolle von MEK1 in Tumorzellen diente. Des Weiteren zeigt diese Studie beispielhaft die Vorzüge von chemisch-genetischen alternativ zu den traditionell genetischen Ansätzen, da in einem analogen rückwärts-gerichteten genetischen Ansatz *Mek1*-defiziente Mausembryonen bereits früh in der embryonalen Entwicklung starben (Giroux et al., 1999).

Exemplarisch für einen vorwärts-gerichteten chemisch-genetischen Ansatz ist die Entdeckung von Monastrol (Mayer et al., 1999). Im Hochdurchsatz wurden 16320 Substanzen auf Lungenkrebszellen gegeben und mit Hilfe eines Cytoblots Substanzen identifiziert, welche den Gehalt an phosphoryliertem Nucleolin erhöhten; Phosphonucleolin diente als Marker zum Nachweis eines mitotischen Arrests. Da viele der bereits bekannten Mitoseinhibitoren Tubulin modulierten, wurde in einem weiteren Schritt der Einfluss der zuvor

identifizierten Moleküle auf die Tubulin-Polymerisation *in vitro* getestet. Moleküle, welche keine Auswirkung auf die Polymerisation hatten, wurden mit Zellen aus der Grünen Meerkatze inkubiert und die fixierten Zellen mittels Immunfluoreszenz hinsichtlich ihrer Tubulin-, Aktin- und Chromatin-Struktur untersucht. Unter den gefundenen 86 Substanzen wurde Monastrol, welches Zellen in der Mitose arretierte und monopolare mitotische Spindeln induzierte (Abbildung 2), als neuer Mitoseinhibitor identifiziert. Zum einen konnte dieser Phänotyp mit einem bekannten Phänotyp korreliert werden. Zum anderen konnte später *in vitro* gezeigt werden, dass es sich bei dem Zielprotein um das Kinesin EG5 handelt. In anschließenden Experimenten wurde Monastrol genutzt, um mitotische Prozesse, die Detektion und Korrektur von falsch orientierten Chromosomen und die Aufgaben von EG5 für den Spindelaufbau und die Spindelaufrechterhaltung zu studieren (Kapoor et al., 2000).

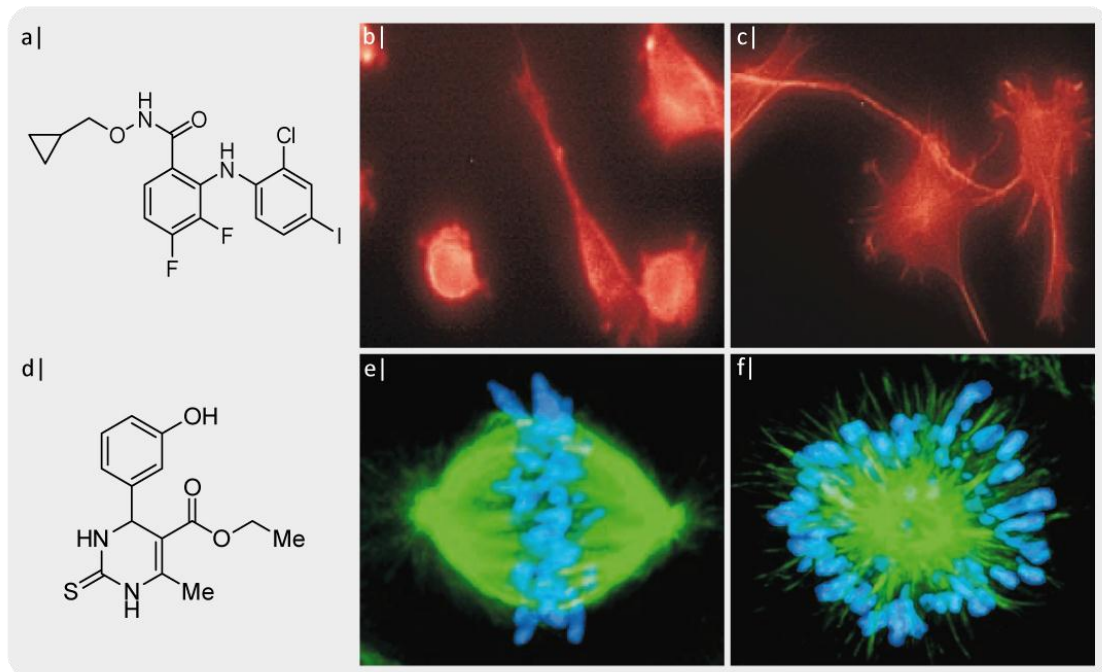


Abbildung 2: Fallbeispiele für chemisch-genetische Ansätze (Mayer et al., 1999; Sebolt-Leopold et al., 1999)

a) Chemische Struktur von PD184352. b) Darmkrebszellen nach 24 h Inkubation mit DMSO und anschließender Aktin-Färbung. c) Darmkrebszellen nach 24 h Inkubation mit PD184352 und anschließender Aktin-Färbung. d) Chemische Struktur von Monastrol. e) Nierenzelle aus der Grünen Meerkatze nach DMSO-Behandlung. Tubulin (grün) und DNA (blau) wurden angefärbt. f) Nierenzelle aus der Grünen Meerkatze nach Inkubation mit Monastrol. Tubulin (grün) und DNA (blau) wurden angefärbt.

Für Phänotypen, für die eine einfache Korrelation mit einer bereits bekannten Mutation nicht möglich ist, werden andere Methoden verwendet, um das Zielprotein zu identifizieren. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

1.2. *Methoden zur Zielprotein-Identifizierung*

Der zumeist geschwindigkeitslimitierende Schritt eines vorwärts-gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes ist die Identifizierung des Zielproteins der zuvor ausgewählten Substanz. Die einfachste Herangehensweise, um ein Zielprotein zu identifizieren, ist eine fundierte wissenschaftliche Hypothese. Diese Hypothese kann zum einen auf dem beobachteten biologischen Effekt oder zum anderen auf einem eventuellen Effekt in einem anderen Testsystem beruhen. Eine strukturbasierte Literaturrecherche, bei der nach möglichen pharmakologischen Wirkungen der ausgewählten Substanz und strukturverwandten Derivaten in anderen Systemen gesucht wird, kann eine weitere Basis für eine Hypothese sein (Ward et al., 2002). Ein erfolgreiches Beispiel für die Aufklärung eines Zielproteins mit Hilfe dieser Methode ist das bereits beschriebene Monastrol. Jedoch ist die Identifizierung meist nicht so simpel und es wird auf andere Möglichkeiten, wie Microarrays, Expressionsklonierungen und affinitätschromatographie-basierte Methoden, zurückgegriffen.

Von den möglichen Microarray-Techniken ist zunächst der DNA-Microarray (Abbildung 3) zu nennen, welcher die Erstellung von Genom-Expressionsprofilen wesentlich vereinfacht. Diese Methode ermöglicht die Messung der transkriptionellen Antwort jedes Gens auf eine zelluläre Veränderung, sei es eine Erkrankung, ein Prozess wie die Zellteilung oder eine Antwort auf eine chemische sowie genetische Störung (Hughes et al., 2000). Durch einen Vergleich des Expressionsprofils von behandelten Zellen mit dem Profil von Zellen mit bekannten Mutationen kann auf ein mögliches Zielprotein zurückgeschlossen werden (Hughes et al., 2000; Marton et al., 1998). Eine weitere vielversprechende Form des Microarrays ist der Protein-Microarray oder Protein-Chip (Abbildung 3). Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Proteine gereinigt und auf einer derivatisierten Oberfläche immobilisiert (Zhu & Snyder, 2003). Dieser Chip wird mit einer fluoreszenz- oder radioaktivmarkierten Variante der niedermolekularen Verbindung inkubiert und nach stringentem Waschen können die markierten Proteine identifiziert werden. Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit in kurzer Zeit das Bindungsprofil eines Moleküls mit einem kompletten Proteom zu analysieren. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass auch niedrig exprimierte Proteine identifiziert werden können. Ein Nachteil liegt in einer eventuellen sterischen Hinderung der Proteine, welche durch deren Anordnung auf dem Chip entstehen kann. Ebenso können fehlende posttranslationale Modifikationen der Proteine die Wechselwirkung mit der niedermolekularen Verbindung verhindern oder verfälschen (Terstappen et al., 2007).

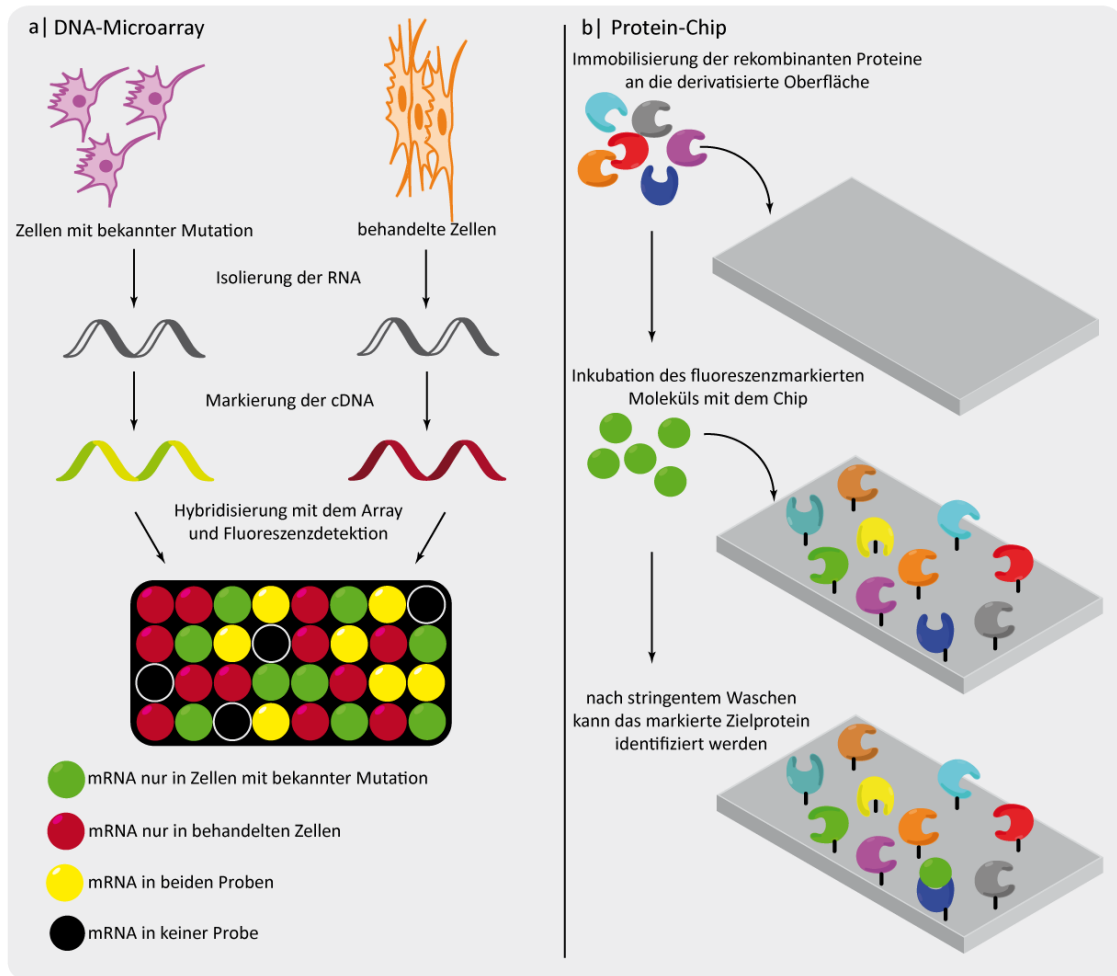


Abbildung 3: Zielprotein-Identifizierung mit Hilfe von Microarrays

a) Für einen DNA-Microarray wird die RNA aus behandelten Zellen und Zellen mit einer bekannten Mutation isoliert. Während der reversen Transkription wird die cDNA der beiden Proben mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Die cDNA wird mit dem Microarray hybridisiert und die Fluoreszenzsignale werden detektiert. (modifiziert nach Bilitewski, 2009) **b)** Bei einem Protein-Chip werden die gereinigten Proteine an der derivatisierten Oberfläche immobilisiert und der Chip wird mit der zu untersuchenden fluoreszenzmarkierten niedermolekularen Verbindung inkubiert. Nach stringentem Waschen kann das markierte Zielprotein identifiziert werden. (modifiziert nach Zheng & Chan, 2002)

Weitere Möglichkeiten Zielproteine zu identifizieren, sind auf der Expressionsklonierung basierende Techniken, zu denen unter anderem das Phagen-Display (Abbildung 4a) und das Hefe-Drei-Hybrid-System (Abbildung 4b) zählen. Diese Ansätze erlauben durch die Expression einer cDNA-Bibliothek den direkten Zugriff auf die Gene, welche die Zielproteine kodieren. Beim Phagen-Display werden cDNA-Bibliotheken so in das Genom integriert, dass sie Fusionskonstrukte mit den Genen bilden, welche für Hüllproteine kodieren und somit potenzielle Zielproteine auf der Phagen-Oberfläche exprimiert werden. Die Phagen werden mit der immobilisierten Substanz inkubiert, so dass Phagen mit der richtigen Affinität gebunden werden. Durch stringentes Waschen werden unspezifische Bindungen entfernt, die gebundenen Phagen werden eluiert und zur Amplifizierung in Bakterienzellen eingebracht. Diese vervielfältigte Population enthält einen größeren Teil der Phagen, die

das Zielprotein exprimieren. Nach mehreren aufeinanderfolgenden Runden der Affinitätsanreicherung, kann eine monoklonale Phagen-Population gewonnen werden. Durch anschließende DNA-Isolierung und -Sequenzierung kann auf das Zielprotein zurückgeschlossen werden (Smith & Petrenko, 1997; Terstappen et al., 2007). Ein erfolgreiches Beispiel ist die identifizierte Interaktion zwischen Ca^{2+} /Calmodulin und dem Curcumin Derivat HBC (Tabelle 1) (Shim et al., 2004). Nachteile dieses Ansatzes sind, ähnlich zu denen des Protein-Chips, fehlende posttranslationale Modifikationen der Proteine. Weiterhin können nicht erhaltene Multiproteinkomplexe eine Interaktion mit der niedermolekularen Substanz verhindern.

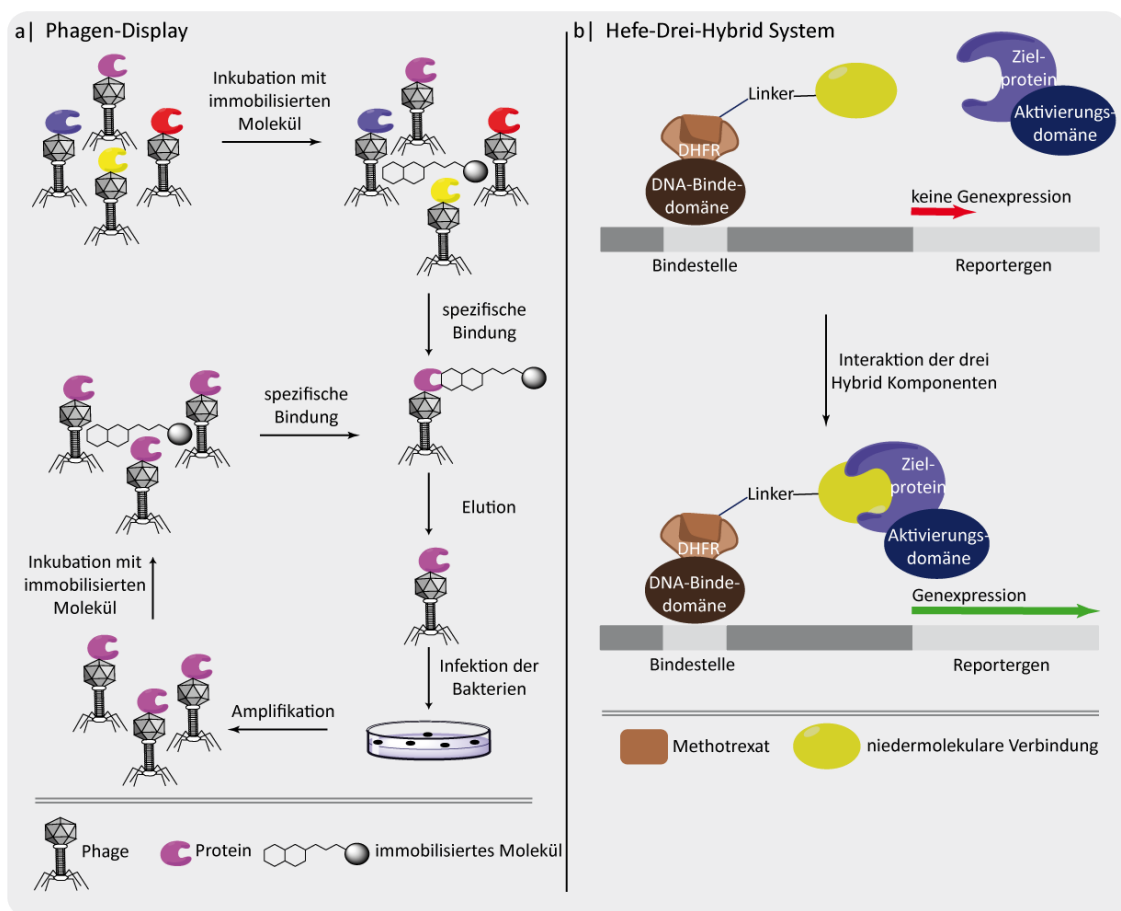


Abbildung 4: Auf Expressionsklonierung basierende Methoden (modifiziert nach Terstappen et al., 2007)

a) Eine Phagen-Population mit verschiedenen Proteinen wird mit dem immobilisierten Molekül inkubiert. Unspezifisch bindende Phagen werden durch stringentes Waschen entfernt, spezifisch bindende Phagen werden eluiert und durch Infektion in Bakterien eingebracht. Die amplifizierten Phagen werden erneut mit dem Molekül inkubiert. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt bis eine monoklonale Phagen-Population entsteht. **b)** Das Hefe-Drei-Hybrid System besteht aus einem Hybriden aus DNA-bindender Domäne und Ligand-bindender Domäne, einem aus Aktivierungsdomäne und cDNA und einem dritten aus dem Liganden und der zu untersuchenden molekularen Verbindung. Interagieren die drei Hybrid Komponenten miteinander wird ein Reporter gen exprimiert und das entstehende Signal zur Selektion benutzt.

Eine weitere Expressionsklonierungs-Methode ist das Hefe-Drei-Hybrid System (Licitra & Liu, 1996), bei dem es sich um eine Erweiterung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems handelt. Der erste Teil dieses Systems ist ein Hybridprotein bestehend aus einer DNA-bindenden

Domäne und einer Ligand-bindenden Domäne, z.B. die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR). Der zweite Teil ist eine Transkriptionsaktivierungsdomäne, die mit einer cDNA-Bibliothek fusioniert ist. Der dritte Teil dieses Systems ist die zu untersuchende niedermolekulare Verbindung, die an einen Liganden, z.B. Methotrexat, gekoppelt ist und die Verbindung zwischen dem ersten Hybriden und dem zweiten ermöglicht. Kommt eine Interaktion der drei Komponenten zu Stande, wird die Expression eines Reportergens aktiviert und das Signal kann ausgelesen werden. Es folgt eine Selektion der Zellen, welche das Reportergen exprimieren sowie die anschließende DNA-Isolierung und -Sequenzierung. Dieses System hat zum einen den Vorteil, dass die Interaktion *in vivo* untersucht werden kann, zum anderen den Nachteil, dass in Hefezellen andere intrazelluläre Bedingungen vorherrschen, als in Säugetierzellen (Terstappen et al., 2007).

Unter den zahlreichen Methoden zur Zielprotein-Identifizierung, ist die biochemische Isolierung von zellulären Proteinen mit Hilfe der Affinitätschromatographie die klassische Methode (Sato et al., 2010). Mehrere erfolgreiche Identifikationen basieren auf dieser Technik (Bach et al., 2005; Oda et al., 2003; Snyder et al., 2005b). Hierbei wird das Molekül mit einer angemessenen funktionellen Gruppe, dem „Linker“, modifiziert, welche eine Immobilisierung an einer festen Phase ermöglicht. Nach der Inkubation des immobilisierten Moleküls mit Proteinextrakten werden zunächst unspezifische Bindungen durch stringentes Waschen entfernt, bevor die Interaktion mit spezifisch gebundenen Proteinen durch Änderung der Pufferbedingungen gelöst wird (Festphasen-Elution). Die Identifikation des Zielproteins erfolgt anschließend mittels Immundetektion und Massenspektrometrie. Im Gegensatz zu den bislang beschriebenen Methoden besitzt die Affinitätschromatographie den Vorteil, dass die Zielproteine in ihrer dreidimensionalen Struktur erhalten bleiben und somit auch alle posttranslationalen Modifikationen aufweisen. Jedoch bringt auch diese Technik einige Schwierigkeiten mit sich. So muss zunächst sichergestellt werden, dass eine Modifikation des Moleküls nicht zu dessen Inaktivierung führt. Weitere Probleme liegen in einer möglichen sterischen Hinderung oder unspezifischen Bindungen, welche durch die Entstehung einer zu hydrophoben Umgebung bedingt sein können. Auch die Bindungsaffinität spielt eine große Rolle. So werden hohe Affinitäten gegenüber niedrigen bevorzugt, da schlechter bindende Interaktionspartner im Laufe der Chromatographie verloren gehen können. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Menge des Zielproteins im Extrakt. Je höher die Proteinkonzentration desto wahrscheinlicher ist eine Interaktion zwischen Molekül und Protein und desto höher die Ausbeute der Affinitätschromatographie. Liegen mehrere Zielproteine vor, ist eine hohe Proteinkonzentration eher kritisch, da

eine Bindung von Proteinen, welche in niedrigeren Mengen vorliegen, verhindert werden kann (Terstappen et al., 2007). Zur Minimierung von unspezifischen Bindungen, gibt es verschiedene Optimierungen der Affinitätschromatographie (Abbildung 5).

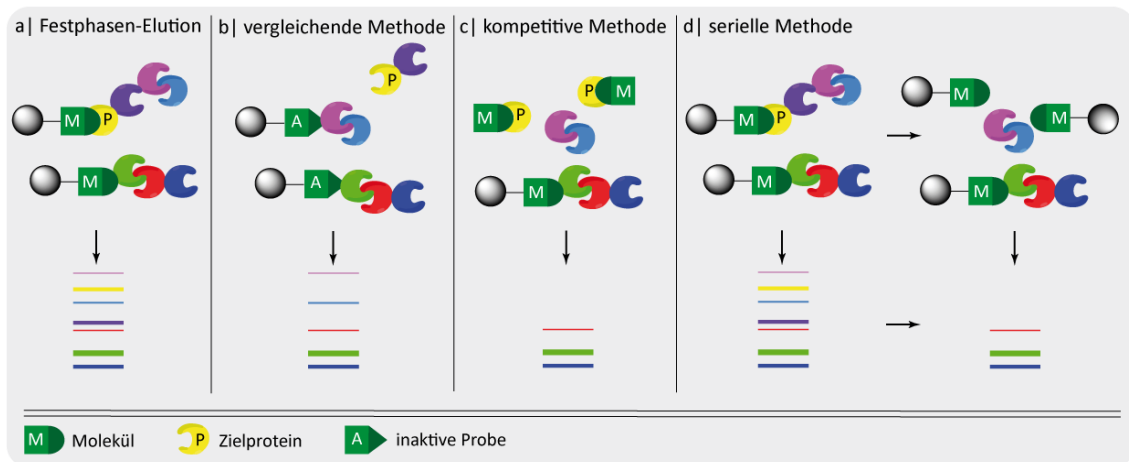


Abbildung 5: Zielprotein-Identifizierung mittels Affinitätschromatographie (modifiziert nach Terstappen et al., 2007).

Das Prinzip einer Affinitätschromatographie besteht in der Bindung des Moleküls (M) an eine Matrix und die anschließende Inkubation mit einem Proteinextrakt, welcher das Zielprotein (P) enthält. Nach wiederholtem Waschen können die selektiv gebundenen Proteine mit verschiedenen Methoden eluiert werden. **a** | Festphasen-Elution. Bei dieser Methode erfolgt die Auswaschung der spezifisch gebundenen Proteine durch eine Änderung der Pufferbedingungen. **b** | Vergleichende Methode. Parallel zur Affinitätschromatographie mit einer aktiven Probe, wird ein Versuch mit einer inaktiven Probe (A) durchgeführt und die entsprechenden Eluate miteinander verglichen. Nur Proteine, welche nicht in der inaktiven Probe identifiziert werden, werden als Zielproteine in Betracht gezogen. **c** | Kompetitive Methode. Hierbei erfolgt die Elution der spezifisch gebundenen Proteine mit einem Überschuss an nicht modifiziertem Molekül. **d** | Serielle Methode. Bei dieser Variante wird der restliche Proteinextrakt einer ersten Chromatographie mit neuem immobilisiertem Molekül inkubiert. Zielproteine sollten nur in der ersten Reinigung identifiziert werden, während in der zweiten Chromatographie unspezifische Bindungen zu detektieren sind. **a-d** | Die farbigen Banden präsentieren die ausgewaschenen Proteine nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE.

Die einfachste Variante ist hier die „vergleichende Methode“, bei der zur Affinitätschromatographie auch ein inaktives Molekül mit analoger Struktur genutzt wird. Als potenzielle Zielproteine in Betracht gezogen werden Proteine, welche lediglich mit dem aktiven Molekül identifiziert werden können (Snyder et al., 2005b). Bei einer weiteren Variante, der „kompetitiven Methode“, werden die spezifisch gebundenen Proteine mit einem Überschuss an freiem bioaktivem Molekül von der festen Phase eluiert (Emami et al., 2004). Außerdem ist es möglich eine „serielle Methode“ anzuwenden, bei der zunächst die Standard-Affinitätschromatographie durchgeführt wird. In einem nächsten Schritt wird der restliche Proteinextrakt mit neuem immobilisiertem Molekül inkubiert. Die Zielproteine sollten in der ersten Chromatographie identifiziert werden, da sie eine hohe Affinität für das Molekül haben, während unspezifische Bindungen in beiden Proben in gleichen Mengen nachweisbar sind (Yamamoto et al., 2006). Weitere Variationen der Affinitätschromatographie können durch die Wahl des Abstandhalters („Linker“) erzielt werden. So können Polymethylen- und Polyethylenglykol (PEG)-Einheiten verwendet werden. Jüngste Studien

zeigen, dass Polyethylenglykol zu bevorzugen ist, da es bessere physikalische Eigenschaften aufweist und meist zur Reduzierung von nichtspezifischen Bindungen beiträgt. Einige mit Hilfe der Affinitätschromatographie identifizierte Proteine sind in Tabelle 1 abgebildet.

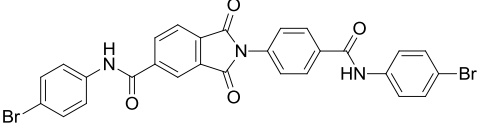
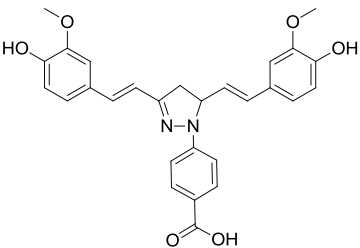
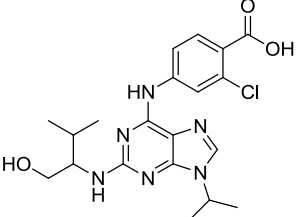
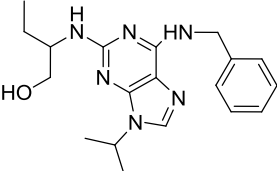
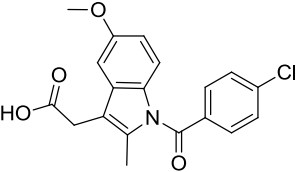
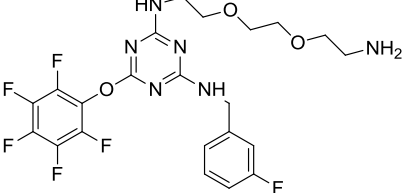
Methode	Substanz	Zielprotein(e)
Protein-Chip	<p>SMIR4</p> 	Nir1p (Huang et al., 2004)
Phage-Display	<p>HBC</p> 	Ca ²⁺ -Calmodulin (Shim et al., 2004)
Hefe-Drei-Hybrid System	<p>Purvanalol B</p> 	CDK1, CDK5, CDK6, CLK3, EPHB2, FLT4, FYN, PAK4, PCTK1, PCTK2, RSK3, YES (Becker et al., 2004)
Affinitätschromatographie	<p>Roscovitin</p> 	CDK5, ERK1, ERK2, Pyridoxalkinase (Bach et al., 2005)
Affinitätschromatographie (Kompetitive Methode)	<p>Indomethacin</p> 	Glyoxalase 1 (Sato et al., 2007)
Affinitätschromatographie (Vergleichende Methode)	<p>Melanogenin</p> 	Prohibitin (Snyder et al., 2005a)

Tabelle 1: Erfolgreiche Beispiele der Zielprotein-Identifizierung (modifiziert nach Terstappen et al., 2007)

CDK: „cyclin dependent kinase“; CLK3: „CDC-like kinase 3“; EPHB2: „ephrin receptor B2“; ERK: „extracellular signal-regulated kinase“; FLT4: „fms-related tyrosine kinase 4“; PAK4: „p21(CDKN1A)-activated kinase 4“; PCTK: PCTAIRE Proteinkinase; RSK3: „ribosomal protein S6 kinase 3“; SMIR4: „small molecule inhibitor of rapamycin 4“; YES: „Yamaguchi sarcoma oncogene“

Auch die Länge des „Linkers“ spielt eine wichtige Rolle. Ein längerer „Linker“ führt zu einer wesentlich höheren Ausbeute des Zielproteins aus dem Zelllysate. Überdies wird durch eine zusätzliche Verlängerung mit einer rigiden Polyprolin-Helix die Kapazität der Affinitätsreinigung gefördert (Sato et al., 2007). Weitere Unterschiede im Rahmen der Affinitätschromatographie betreffen die Anheftung des Moleküls an die feste Phase. Die Kopplung kann entweder kovalent, durch einen Abstandhalter mit einem freiem Amin und einer NHS-aktivierten Sepharose (Snyder et al., 2005b), oder durch einen Biotin-„Linker“ und eine Bindung an eine Avidin-Sepharose (Sato et al., 2007) erfolgen. Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es möglich im Rahmen eines vorwärts-gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes potenzielle Zielproteine zu identifizieren. Allerdings müssen diese zunächst in weiteren Analysen validiert werden, um falsch-positive Proteine ausschließen zu können (Terstappen et al., 2007). Um zwischen positiven und falsch-positiven Proteinen unterscheiden zu können, ist es zunächst hilfreich eine bioinformatische Analyse durchzuführen. Mit Hilfe dieser Analyse kann überprüft werden, ob das Zielprotein in dem Signalweg, welcher im anfänglichen phänotypischen Testsystem gestört wurde, zu finden ist (Ekins et al., 2007). Ist eine dreidimensionale Proteinstruktur verfügbar, kann eine Strukturanalyse der Molekül-Protein Interaktion zur Bewertung einer möglichen Bindung beitragen (Macchiarulo et al., 2004). Da diese *in silico* Methoden lediglich eine Vorhersage liefern, ist es weiterhin notwendig, die Molekül-Protein Interaktion und deren funktionelle Auswirkungen zu beweisen. Eine Möglichkeit die Interaktion nachzuweisen ist die Oberflächenplasmonresonanz (Knoth et al., 2009). Der veränderte Phänotyp kann mit Hilfe von RNA-Interferenz Experimenten überprüft werden, welche den durch das Molekül ausgelösten, Effekt nachahmen sollten (Terstappen et al., 2007).

1.3. Der Zellzyklus

Zellen, welche durch natürliche Alterung oder programmierten Zelltod (Apoptose) verloren gehen, müssen kontinuierlich erneuert werden, um das Überleben von mehrzelligen Organismen zu gewährleisten. Dies wird durch den Zellzyklus gewährleistet, ein semikonservativer Prozess, in dem eine existierende Zelle ihre Inhalte dupliziert und sich in zwei Tochterzellen teilt (Blagden & de Bono, 2005). Der Zellzyklus wird in vier verschiedene Phasen unterteilt: die G1-Phase, welche die Pause vor der DNA-Replikation darstellt, die S-Phase in der die DNA synthetisiert wird, die G2-Phase, die Pause nach der DNA-Replikation und schließlich die M-Phase, welche die Mitose und abschließende Cytokinese beinhaltet

(Hartwell & Weinert, 1989). Zusätzlich kann eine Phase definiert werden, in der die Zellen in einem Ruhezustand verharren, die G₀-Phase. In dieser Phase können die Zellen durch externe Faktoren, wie Mitogene, stimuliert werden und wieder in den Zellzyklus einsteigen. Die G₀-, G₁-, S- und G₂-Phase werden auch kollektiv als Interphase bezeichnet (Harper & Brooks, 2005). Diese vereinfachte Darstellung beschreibt die prinzipiellen Vorgänge, jedoch ist der Zellzyklus wesentlich komplexer (Abbildung 6). Jede Phase des Zellzyklus wird durch spezifische Proteine angetrieben, welche nach Vollendung ihrer Aufgabe rechtzeitig abgebaut oder inaktiviert werden. Diese zahlreichen Kontrollpunkte ermöglichen einen normalen Ablauf des Zellzyklus (Blagden & de Bono, 2005). Der erste dieser Kontrollpunkte kommt in der späten G₁-Phase zum Einsatz und wird als Restriktionspunkt bezeichnet. Haben Zellen diesen Punkt passiert, sind sie irreversibel auf die Beendigung des begonnenen Zellzyklus festgelegt und durchlaufen die Mitose (Hennig, 2002). Weitere Kontrollpunkte existieren in der S-Phase, um wenn nötig DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren, sowie am G₂/M-Übergang, um eine komplette und fehlerfreie DNA-Replikation sicher zu stellen (Harper & Brooks, 2005). Das System von Regulatoren, welche den Übergang zwischen den einzelnen Phasen antreiben, konzentriert sich auf die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs). Diese Enzyme werden aktiviert, wenn regulierende Proteine, die Cycline, an sie binden. Das CDK Netzwerk organisiert direkt oder indirekt die koordinierte Kontrolle von Proteinen und Genen in nahezu allen essentiellen Zellfunktionen (Santos & Ferrell, 2008). In Säugerzellen bilden mehr als zehn verschiedene CDKs und Cycline Komplexe, welche hohe Substratspezifitäten aufweisen und für den reibungslosen Übergang der einzelnen Zellzyklus-Phasen verantwortlich sind. So wird das Durchlaufen der G₁-Phase von Cyclin D Isoformen (D1, D2, D3) komplexiert mit CDK4 und CDK6 koordiniert, während der G₁/S-Übergang und der Ablauf der S-Phase von CDK2-Cyclin E und CDK2-Cyclin A gewährleistet werden. CDK2 und CDK1 zusammen mit Cyclin A und Cyclin B sind am G₂/M-Übergang beteiligt (Kurzawa & Morris, 2010). Die Regulation von Cyclin-abhängigen Kinasen veranschaulicht die Komplexität der regulatorischen Mechanismen, welche dem Zellzyklus zu Grunde liegen. Die fortlaufende Aktivierung von CDK-Cyclin-Komplexen ist ein komplizierter vielschichtiger Prozess, gesteuert sowohl durch Protein-Protein-Interaktionen, als auch posttranslationale Modifikationen und Konformationsänderungen. In der Tat unterliegen CDK-Cyclin-Komplexe aktivierender und hemmender Regulation, insbesondere der inhibitorischen Phosphorylierung durch die WEE1 und MYT1 Kinase, der entgegenwirkenden Dephosphorylierung durch die Phosphatase CDC25a und der aktivierenden Phosphorylierung durch die CDK-aktivierende Kinase (CAK). Zusätzlich

spielen aktivierende Kinasen, wie z.B. die Polo-like Kinasen (PLK), durch eine aufeinander abgestimmte Phosphorylierung der Cyclin-Untereinheit und der CDC25-Phosphatase eine kritische Rolle bei der CDK-Cyclin-Aktivierung.

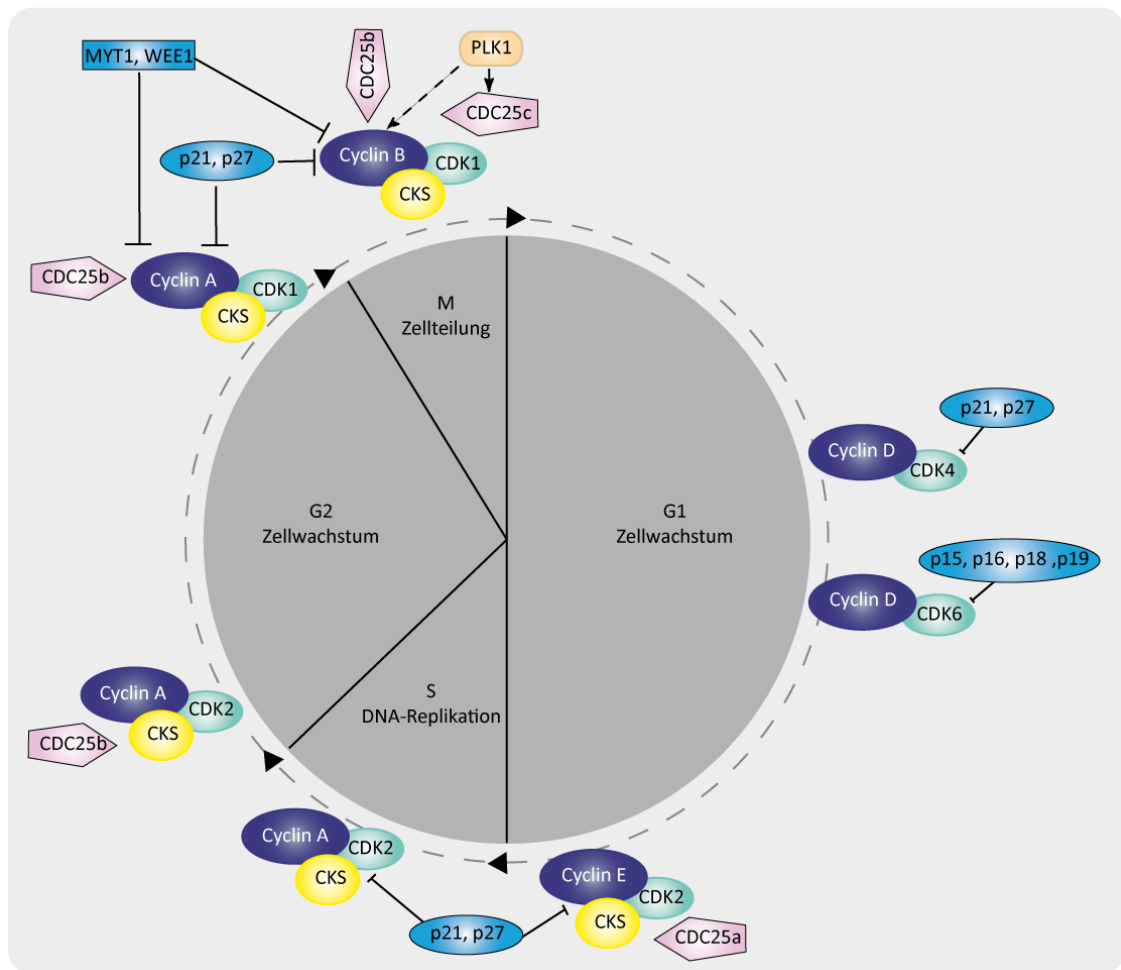


Abbildung 6: Der Zellzyklus und die generellen regulatorischen Mechanismen (modifiziert nach Kurzawa & Morris, 2010).

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen. Die G1-Phase wird für das Zellwachstum benötigt. Während der S-Phase findet die DNA-Synthese und Replikation statt. Die G2-Phase ist eine weitere Phase des Zellwachstums und der Synthese von Faktoren, welche für die Mitose (M) benötigt werden. Der Ablauf des Zellzyklus beruht auf Cyclin-abhängigen Kinasen. Diese heterodimeren Komplexe bestehen aus einer katalytischen CDK-Untereinheit verbunden mit einer regulatorischen Cyclin-Untereinheit. Ein schrittweiser Aufbau und eine Aktivierung der CDK-Cyclin-Komplexe wird durch ein komplexes Netzwerk aus Aktivatoren, u. a. CDC25-Phosphatasen und PLK-Kinasen, und Inhibitoren, im besonderen WEE1- und MYT1-Kinasen, sowie strukturelle Inhibitoren, p21, p27 CIP/KIP und Mitglieder der INK4 Familie p15, p16, p18, p19, reguliert.

Weiterhin wird die Komplexität der CDK-Cyclin-Regulation durch die kontrollierenden Rückkopplungsmechanismen hervorgehoben. Im Besonderen ist der Schlüsselregulator für den Verlauf der Mitose, CDK1-Cyclin B, zum einen in eine negative Rückkopplungsschleife involviert, welche WEE1 und MYT1 inaktiviert und zum anderen in eine positive, welche eine weitere Aktivierung der CDC25-Phosphatasen zur Folge hat. Dies führt zur Amplifizierung der CDK1-Cyclin B-Aktivität bis zu einem Schwellenwert, der wiederum den bedingungslosen und irreversiblen Eintritt in die Mitose auslöst. Auf eine nichtkatalytische Art

und Weise sind die CKS (CDK Untereinheit)-Proteine und die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs) in die Regulierung der CDK-Cyclin-Aktivität involviert. CKS Proteine stabilisieren die CDK-Cyclin-Komplexe und sind an der Rekrutierung von Phosphoprotein-Regulatoren, wie CDC25, WEE1 und MYT1, beteiligt. Die CKIs schließen Mitglieder der p21, p27 CIP/KIP- und der INK4-Familie ein und stellen strukturelle Inhibitoren dar. Sie erhalten die Cyclin-abhängigen Kinasen sowohl während des normal fortschreitenden Zellzyklus, als auch als Antwort auf Stress, Wachstumsfaktorenmangel, Zellkontaktinhibition oder Kontrollpunkt-Aktivierung in ihrer inaktiven Konformation. Nicht zuletzt unterliegen die unterschiedlichen Akteure dieses komplexen Netzwerks den kontrollierten Mechanismen des Proteinabbaus durch das Ubiquitin/Proteasom-System (Kurzawa & Morris, 2010).

1.4. Der Centrosomen-Zyklus

Parallel zur DNA-Replikation beginnt der Centrosomen-Zyklus (Lapenna & Giordano, 2009), welcher auch einiger Regulation bedarf (Abbildung 7). Die Duplikation der Centrosomen fängt mit der physikalischen Trennung der gepaarten Centriolen an. Dies wird durch den CDK2-Cyclin E-Komplex ausgelöst, welcher auch für das Einsetzen der Chromosomen-Replikation verantwortlich ist (Fukasawa, 2005). Verschiedene Zielproteine des CDK2-Cyclin E-Komplexes konnten identifiziert werden, unter anderem das nukleolare Protein Nucleophosmin (Okuda et al., 2000). Innerhalb des noch nicht kopierten Centrosoms lokalisiert Nucleophosmin (NPM) zwischen die gepaarten Centriolen und trägt möglicherweise zur Centriolen-Paarung bei (Shinmura et al., 2005). Die Phosphorylierung von NPM durch CDK2-Cyclin E führt zur Dissoziation des Proteins von den Centrosomen, gefolgt von der Teilung der gepaarten Centriolen. In diesem Fall wirkt NPM als negativer Regulator der Centrosomen-Verdoppelung und der CDK2-Cyclin E-Komplex wirkt dieser negativen Regulation durch Phosphorylierung entgegen (Grisendi et al., 2005). In Zusammenarbeit mit ROCK2, einem Mitglied der Rho-assoziierten, das „coiled-coil“ Strukturelement enthaltenden Protein-Kinase-Familie, übt NPM auch eine positive Regulation aus. Nach erfolgter Phosphorylierung durch CDK2-Cyclin E erlangt NPM eine höhere Bindungsaffinität für ROCK2 und kann ROCK2 an den Centrosomen aktivieren. Dies resultiert in einer schnellen Centrosomen-Verdoppelung (Ma et al., 2006). Ein weiteres Zielprotein des CDK2-Cyclin E-Komplexes ist MPS1 („monopolar spindle 1“), eine Spindel-Kontrollpunkt-Kinase, welche an das Centrosom lokalisiert. MPS1 wird durch die Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert und trägt zur Initiation der Centrosomen-Verdoppelung bei (Fisk et al., 2003). CDK2

bildet nicht nur mit Cyclin E einen Komplex sondern auch mit Cyclin A. Beide Komplexe teilen viele Substrate, so dass auch CDK2-Cyclin A an der Regulation der Centrosomen-Duplikation beteiligt ist (Meraldi et al., 1999). Vor der Centrosomen-Verdoppelung erfolgt die Aktivierung von CDK4/CDK6-Cyclin D (Reed, 1997). Ein Zielprotein dieses Komplexes ist das Retinoblastoma (RB) Tumorsuppressorprotein (Giacinti & Giordano, 2006). In nicht phosphoryliertem Zustand bindet RB an die E2F-Transkriptionsfaktoren und unterdrückt die Transkription der für den G1/S-Übergang benötigten Gene. Die Phosphorylierung von RB führt zu dessen Inaktivierung und ermöglicht den Beginn der Centrosomen-Duplikation (Giacinti & Giordano, 2006; Meraldi et al., 1999). Aufgrund der regulierenden Funktion der CDK-Cyclin-Komplexe sind auch einige Proteine, die zur Kontrolle der CDK-Cyclin-Aktivität beitragen, am Beginn der Centrosomen-Verdoppelung beteiligt (Fukasawa, 2007). Die CDK2 wird zum einen von den CDC25-Phosphatasen aktiviert. Zum anderen erfolgt eine negative Regulierung durch den CDK-Inhibitor p21^{CIP1/WAF1}, welcher seinerseits durch das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert wird (Sherr, 2006). Weitere regulatorische Proteine sind die Polo-like Kinasen (PLK) 2 und 4 sowie Aurora A (Fukasawa, 2007). Nach erfolgter Einleitung der Centrosomen-Duplikation und der Trennung der gepaarten Centriolen, entstehen Procentriolen in der Nähe des proximalen Endes orthogonal zu den bereits existierenden Centriolen (D'Assoro et al., 2002). Während der Centrosomen-Reifung in der S- und G2-Phase dehnen sich die Procentriolen weiter aus. Ferner rekrutieren die beiden Centrosomen schrittweise pericentriolares Material, wie PLK1 (Golsteyn et al., 1995) und NuMA (Merdes et al., 1996), wohingegen die Proteine der Interphase-Centrosomen entfernt werden. Für die Centrosomen-Reifung ist unter anderem Aurora A zuständig, indem es verschiedene Proteine wie TACC („transforming acidic coiled-coil protein“) (Raff, 2002) und LATS2 („larger tumour suppressor 2“) (Toji et al., 2004) phosphoryliert und zum Centrosom leitet. Andere Regulatoren sind die p21-aktivierte Kinase (PAK1), welche die Assoziation von Aurora A mit den Centrosomen kontrolliert (Kumar et al., 2006) und PLK1, welche unter anderem in die Rekrutierung von γ -Tubulin zu den Centrosomen involviert ist (Casenghi et al., 2003). In der späten G2-Phase erlangen die Tochter-Centriolen des parentalen Paares subdistale Anhänge und werden somit zu voll ausgereiften Centrosomen. Kurz vor Beginn der Mitose teilen sich die Centrosomen auf, was auf die Aktivierung von NEK2A („NIMA-related kinase 2A“) zurückzuführen ist. NEK2A sorgt für die Dissoziation der Proteine C-NAP1 und Rootletin von den Centrosomen und somit für den Abbau der Verbindung zwischen den beiden Centrosomen. Die negative Regulation von NEK2A wird von der Protein-Phosphatase 1 (PP1) bewirkt.

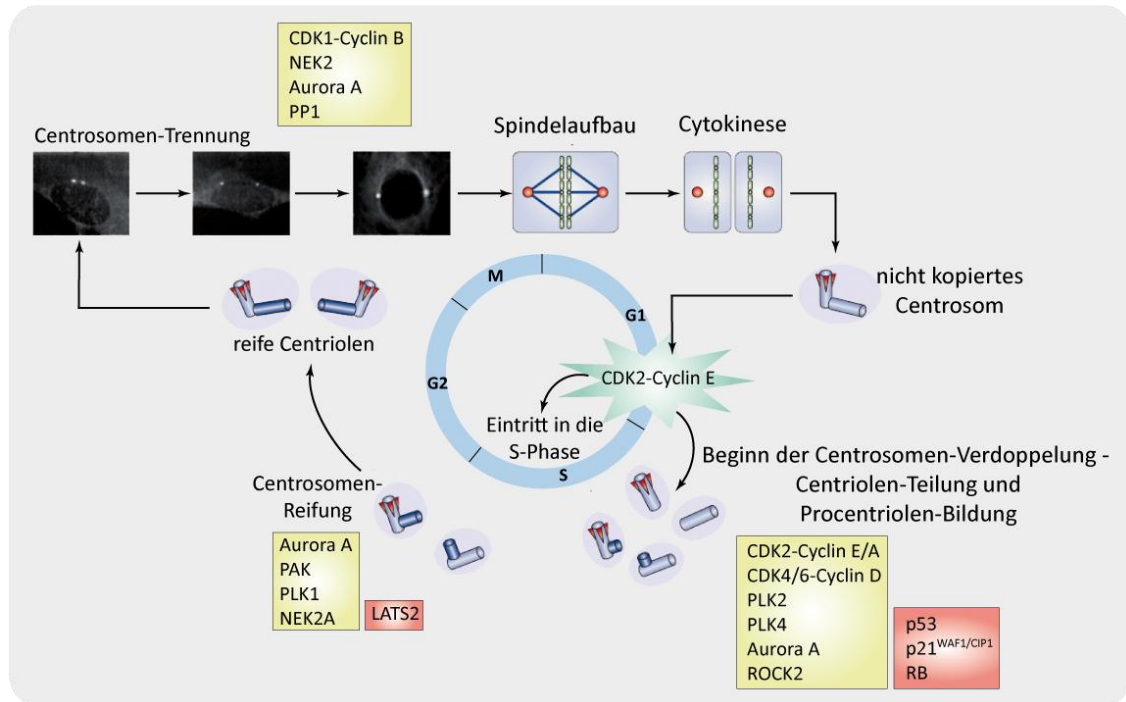


Abbildung 7: Der Centrosomen-Zyklus (modifiziert nach Fukasawa, 2005)

Die Centrosomen Duplikation beginnt mit der physikalischen Trennung der gepaarten Centriolen, ausgelöst durch den CDK2-Cyclin E-Komplex, gefolgt von der Bildung der Procentriolen am proximalen Ende der bereits existierenden Centriolen. Während der Centrosomen-Reifung in der S- und G2-Phase verlängern sich die Procentriolen und rekrutieren schrittweise pericentriolares Material. Während der späten G2-Phase erhält die neue Tochtercentriole subdistale Anhänge und die Reifung der Centrosomen ist abgeschlossen. Kurz vor der Mitose teilen sich die verdoppelten Centrosomen und wandern zu den entgegengesetzten Enden der Zelle (Centrosomen-Trennung). Während der Mitose fungieren die Centrosomen als Spindelpole und sind für den Aufbau einer bipolaren Spindel verantwortlich. Im Laufe der Cytokinese erhält jede Tochterzelle ein Centrosom. Einige der Kinasen und Phosphatasen (grüne Kästen) sowie Tumorsuppressorproteine (rote Kästen), welche Schlüsselfunktionen in der Centrosomen-Duplikation einnehmen, sind dargestellt.

Der CDK1-Cyclin B-Komplex phosphoryliert und inaktiviert PP1 und sorgt damit für die Aktivierung von NEK2A (Mi et al., 2007). Nach ihrer Teilung wandern die Centrosomen zu entgegengesetzten Enden der Zelle (Centrosomen-Teilung), ein Prozess an dem das Kinesin EG5 maßgeblich beteiligt ist (Kashina et al., 1997). In der Mitose bilden die Centrosomen die Spindelpole und lenken die Ausbildung einer bipolaren mitotischen Spindel, was unter anderem durch eine vermehrte Anreicherung von γ -Tubulin und des γ -Tubulin-Ring-Komplexes (γ -TuRC) gewährleistet wird (Khodjakov & Rieder, 1999). Die Organisation und Stabilisierung der Spindelpole von der frühen Mitose bis zur Anaphase wird durch NuMa, welches die Vernetzung der Spindel-Mikrotubuli erleichtert, unterstützt (Gehmlich et al., 2004). Während der Cytokinese erhält jede Tochterzelle zusammen mit einer Hälfte der duplizierten DNA ein Centrosom (Fukasawa, 2007).

1.5. *Die M-Phase: Mitose und Cytokinese*

Die Hauptaufgabe der Mitose ist die Segregation der Schwesterchromatiden auf zwei neu entstehende Zellen, so dass jede Tochterzelle einen kompletten Chromosomensatz erbt (Nigg, 2001). Zusätzlich muss jede Tochterzelle ein Centrosom und die entsprechenden Bestandteile des Zytoplasmas und der Organellen erhalten. Die Mitose wird gewöhnlich in fünf unterschiedliche Phasen geteilt: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase (Abbildung 8). Während der Prophase kondensiert das Interphase-Chromatin zu Chromosomen und die zuvor duplizierten Centrosomen wandern auseinander, wodurch die Pole des zukünftigen Spindelapparates definiert werden. Gleichzeitig beginnen die Centrosomen hochdynamische Mikrotubuli zu bilden, welche den Raum in alle Richtungen sondieren. Ebenso löst sich die Kernhülle auf. Während der Prometaphase werden die Mikrotubuli an proteinreiche Strukturen auf den Centromeren der mitotischen Chromosomen, den Kinetochoren, gebunden. Die Interaktion von gepaarten Schwesterchromatiden mit Mikrotubuli entgegengesetzter Pole führt zu einer stabilen bipolaren Anheftung. Die Chromosomen kommen in einer äquatorialen Ebene, der Metaphaseplatte, zusammen, wo sie sich während der gesamten Metaphase hin und her bewegen. Weisen alle Chromosomen eine einwandfreie bipolare Anheftung auf, wird der Beginn der Anaphase durch einen plötzlichen Verlust der Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden eingeleitet. Danach werden die Schwesterchromatiden zu den entgegengesetzten Polen gezogen und die Pole selber wandern in Richtung des Zellkortex. Sind die Chromosomen an den Polen angekommen, werden neue Kernmembranen um die Tochterchromosomen herum gebildet und die Chromatin-Dekondensation beginnt (Telophase). Letztendlich entsteht ein auf Aktomyosin basierender kontraktiler Ring, welcher die Zellteilungsfurche bildet und zur Abschnürung der beiden Tochterzellen führt. Damit ist die Cytokinese, der Prozess der eigentlichen Zellteilung, abgeschlossen (Nigg, 2001). Um schwerwiegende Fehler, wie die ungleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen, zu verhindern, unterliegt die Mitose ebenfalls einer strengen Regulation, welche hauptsächlich auf zwei Mechanismen beruht: der Proteinphosphorylierung und der Proteolyse. Diese beiden Mechanismen greifen eng ineinander. Die proteolytische Maschinerie wird durch Phosphorylierung kontrolliert, wohingegen diverse mitotische Kinasen durch Abbau herunterreguliert werden. Die bedeutendste mitotische Kinase ist die CDK1, wobei auch andere Kinasen aus der Polo, Aurora und NIMA („never in mitosis A“) Familie sowie Kinasen, welche in die mitotischen Kontrollpunkte, den Austritt aus der Mitose und der Cytokinese involviert sind,

eine wichtige Rolle spielen (Nigg, 2001). Der erste Kontrollpunkt der eine Bedeutung für den geregelten Ablauf der Mitose hat, ist der „DNA-Struktur-Kontrollpunkt“, welcher den Übergang von der G2- zur M-Phase in Anwesenheit von nicht replizierter oder beschädigter DNA verhindert. Auf die regulatorischen Mechanismen dieses Kontrollpunktes wurde in Kap. 1.3 bereits ausführlich eingegangen. Eines der ersten Ereignisse innerhalb der Mitose ist der Abbau der Kernhülle, welcher durch eine Hyperphosphorylierung der Lamine durch CDK1-Cyclin B eingeleitet wird (Nigg, 1995). Ein Enzymkomplex, welcher eine wichtige Rolle in der Regulation der kompletten Mitose spielt, ist der „Chromosomal passenger complex“ (CPC). Der CPC besteht aus der Aurora B-Kinase, dem inneren Centromer Protein (INCENP), Borealin und Survivin (Vader et al., 2008), wobei Aurora B der enzymatische Kern ist und durch INCENP, Borealin und Survivin aktiviert und spezifisch lokalisiert wird (Vader et al., 2006). Während der Prophase befindet sich der CPC auf den Chromosomenarmen, wo er die Struktur und Organisation der mitotischen Chromosomen kontrolliert. In der nachfolgenden Prometaphase kann eine erhöhte Konzentration des Komplexes an den Kinetochoren nachgewiesen werden. Dies reflektiert die essentielle Funktion des CPC zwischen den gepaarten Kinetochoren, wo er die einwandfreien Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktionen kontrolliert und reguliert. Die Lokalisierung des CPC zur zentralen Spindel und zum äquatorialen Zellkortex während der Anaphase und zum Flemming-Körper („mid-body“) während der Telophase ist unabdingbar für die Funktion des kontraktilen Ringes und für die abschließende Abschnürung, also die sichere zytoplasmatische Teilung (Vagnarelli & Earnshaw, 2004). Ein sehr wichtiger Kontrollpunkt im Rahmen der Mitose ist der „Spindel-Kontrollpunkt“ (Abbildung 9), welcher den Beginn der Anaphase verhindert bis alle Kinetochore eine korrekte bipolare Anheftung aufweisen (Nicklas, 1997). Die wichtigsten Proteine des Spindel-Kontrollpunktes sind MAD1 („mitotic-arrest deficient“), MAD2, BUBR1, BUB1 („budding uninhibited by benzimidazole“), BUB3 und MPS1 (May & Hardwick, 2006). In der frühen Mitose, bevor ordnungsgemäße Anheftungen gebildet werden, lokalisieren die MAD- und BUB-Proteine an die äußeren Kinetochore und reichern sich an nicht von Mikrotubuli gebundenen Kinetochoren an. Wenn die Spindel-Mikrotubuli an die äußeren Kinetochore binden, finden komplexe molekulare Interaktionen statt, welche die Mikrotubuli-Anheftung und -Dynamik regulieren, so dass die Kontrollpunkt-Proteine ideal platziert sind, um diese Interaktionen zu detektieren (Maiato et al., 2004). Der Kontrollpunkt wird sowohl bei fehlender Spannung zwischen den Kinetochoren und den Mikrotubuli, als auch bei fehlender Anheftung durch die Mikrotubuli aktiviert, wobei jeweils unterschiedliche Proteine rekrutiert werden.

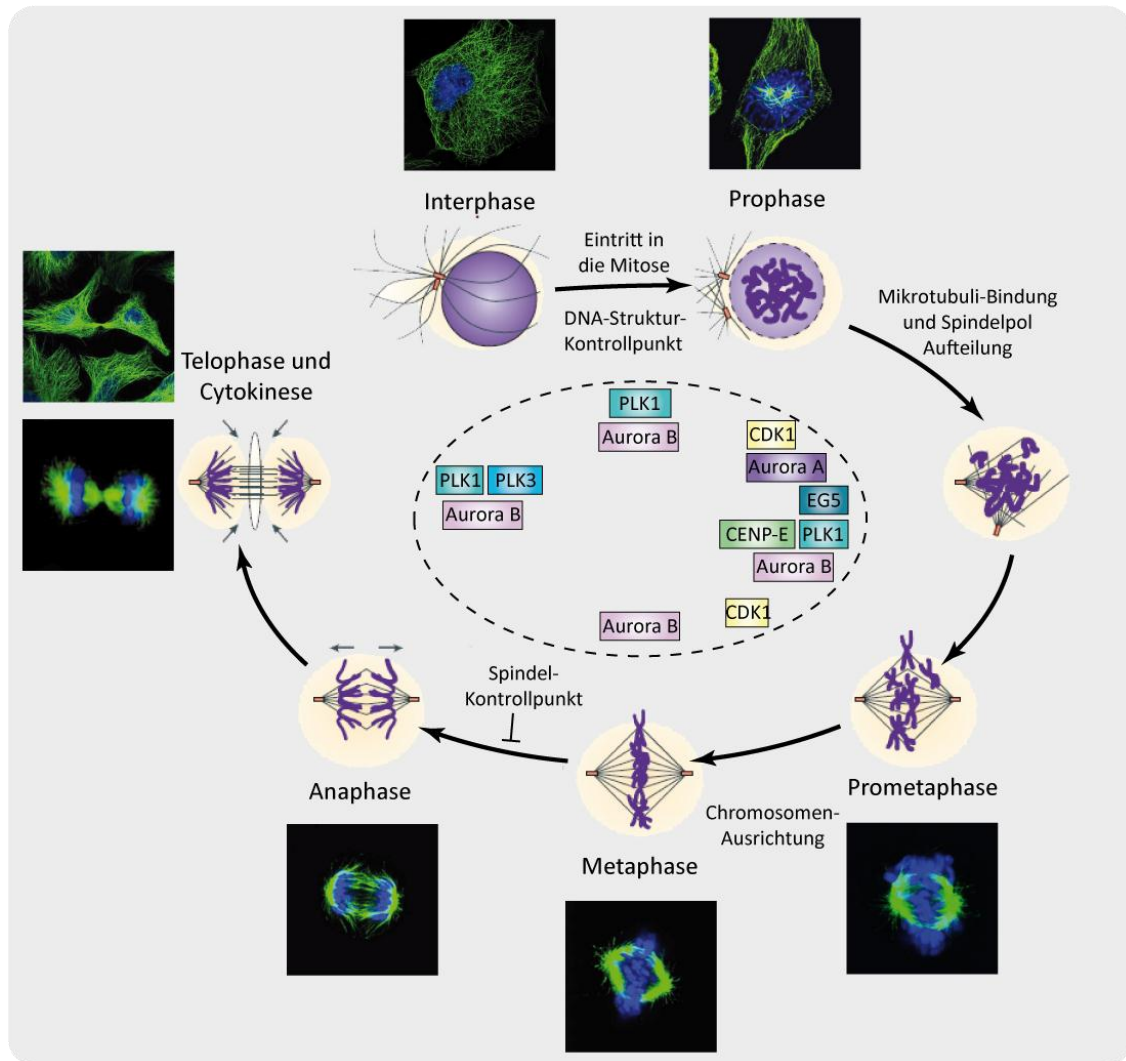


Abbildung 8: Die Phasen der Mitose (modifiziert nach Jackson et al., 2007; Nigg, 2001)

Während der Prophase beginnt zum einen die Kondensation der Chromosomen und zum anderen wandern die Centrosomen auseinander und bilden hochdynamische Mikrotubuli. Die Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore der Chromosomen erfolgt in der Prometaphase. In der anschließenden Metaphase ordnen sich die Chromosomen in der Äquatorialebene an. Die beginnende Trennung der Chromatiden zu entgegengesetzten Polen kennzeichnet die Anaphase. In der Telophase wird der Spindelapparat aufgelöst und die Chromatiden beginnen zu decondensieren. Eine neue Kernmembran wird um die Zellen herum ausgebildet. Durch einen auf Aktomyosin basierten kontraktile Ring schließt sich die Zellmembran zwischen den beiden neu entstehenden Kernen (Cytokinese). Neben der schematischen Darstellung der Mitose werden auch einige wichtige Regulatoren hervorgehoben. Gekennzeichnet sind außerdem die wichtigen Kontrollpunkte während der Mitose. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen von HeLa-Zellen präsentieren ebenfalls die schematisch dargestellten mitotischen Phasen. Die DNA ist in blau gezeigt, die Mikrotubuli in grün.

Die MAD1- und MAD2-Proteine lagern sich an ungebundene Kinetochore aber nicht an Kinetochore mit fehlender Zugspannung an (Waters et al., 1998), während BUB1 und BUBR1 an Kinetochoren mit fehlender Zugspannung und fehlender Mikrotubuli Anheftung lokalisieren (Skoufias et al., 2001). Das nachgeschaltete Ziel des Spindel-Kontrollpunktes ist der Anaphase fördernde Komplex/Cyclosom (APC/C: „anaphase promoting complex/ cyclosome“), eine Multiprotein E3-Ubiquitin-Ligase, welche aktiviert durch den Cofaktor CDC20, eine Reihe von Zellzyklus-Regulatoren mit Ubiquitinresten markiert, und sie somit für den Abbau durch das 26S-Proteasom vorbereitet (Castro et al., 2005).

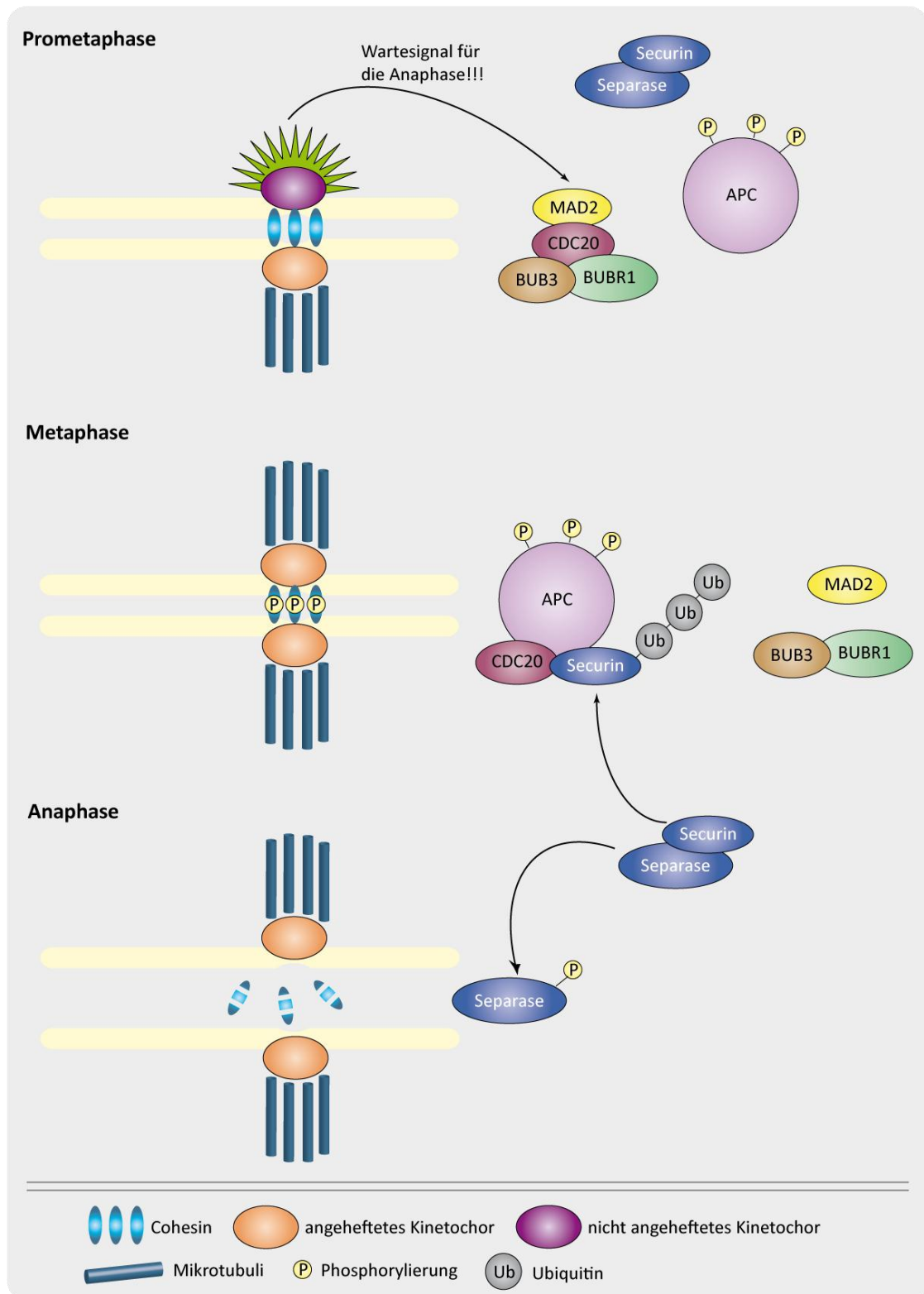


Abbildung 9: Der Spindel-Kontrollpunkt (modifiziert nach Musacchio & Hardwick, 2002)

Nach der DNA-Replikation werden die Schwester-Chromatiden durch Cohesine zusammengehalten. Während der Prometaphase senden nicht angeheftete Kinetochore wahrscheinlich ein Wartesignal für die Anaphase, welches zur Bildung eines Komplexes aus CDC20, MAD2, BUBR1 und BUB3 führt. Dieser Komplex hemmt die Ubiquitinierung von Securin durch den Anaphase-fördernden Komplex (APC) und verhindert so die Aktivierung von Separase und den daraus folgenden Abbau von Cohesin. Nach einer bipolaren Anheftung werden Ubiquitin-Reste an Securin angebracht, was die Aktivierung von Separase auslöst, zum proteolytischen Abbau von Cohesin führt und die Anaphase einleitet.

Sowohl Cyclin B als auch Securin sind Substrate des APC/C (Vader et al., 2008), wobei Securin gleichzeitig einer der Schlüssel-Regulatoren für den Beginn der Anaphase ist. Der Abbau von Securin, ermöglicht der Protease Separase den für den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden verantwortlichen Proteinkomplex Cohesin aufzulösen. Dies lässt ein Ziehen der Chromatiden zu entgegengesetzten Polen zu (Musacchio & Salmon, 2007). Auch die abschließende Zellteilung, die Cytokinese, wird durch verschiedene regulatorische Mechanismen kontrolliert. Die am besten untersuchten Mechanismen können in fünf Kategorien eingeteilt werden: die Komponenten der zentralen Spindel, RhoA und ihre Regulatoren und direkten Effektoren, nicht-muskuläres Myosin II, Aktin und seine direkten Regulatoren sowie Faktoren, welche für die Bewegung und die Fusion von Membranvesikeln verantwortlich sind (Glotzer, 2005). Durch den proteolytischen Abbau der Cycline während der Anaphase und die daraus folgende Inaktivierung der Kinasen wird die Dephosphorylierung und Aktivierung von Proteinen ermöglicht, welche für den Aufbau der zentralen Spindel benötigt werden. Die zentrale Spindel besteht aus einem Satz von antiparallelen Mikrotubuli, welche sich während der Anaphase zwischen den sich teilenden Chromosomen bündeln und zur Anreicherung von Schlüssel-Regulatoren der Cytokinese dienen. Einer dieser Regulatoren ist PRC1, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP), welches für die Organisation der zentralen Spindel und die Cytokinese in den meisten tierischen Zellen benötigt wird (Mollinari et al., 2002). Weitere Proteine, wie NuSAP (nukleolares Spindel-assoziiertes Protein), Orbit oder der Tumorsuppressor BRCA2 („breast cancer 2“) häufen sich während der Anaphase und Telophase auf der zentralen Spindel an und beeinflussen den Ablauf der Cytokinese (Daniels et al., 2004; Inoue et al., 2000; Raemaekers et al., 2003). Ein zentraler Regulator für die Bildung des kontraktilen Ringes ist die RhoA-GTPase. Wie die meisten Ras-verwandten GTPasen wird auch RhoA durch Faktoren wie GEFs („guanine nucleotide exchange factor“) und GAPs („GTPase activating protein“) reguliert, welche den Nukleotid-Austausch und die Nukleotid-Hydrolyse vorantreiben. Der wichtige GEF für RhoA während der Cytokinese scheint ECT2 zu sein, der für die Ausbildung der Teilungsfurche verantwortlich ist (Tatsumoto et al., 1999). Ein mögliches GAP, welches zur Inaktivierung von RhoA und somit zu den abschließenden Schritten der Cytokinese beiträgt, könnte CYK-4 sein (Jantsch-Plunger et al., 2000). RhoA-GTP aktiviert nachgeschaltete Signalwege, die zur Aktin-Polymerisation und Myosin II-Aktivierung führen. Aufgrund seiner Notwendigkeit für den Aufbau der Teilungsfurche wird das nicht-muskuläre Myosin II auch als Motor der Cytokinese bezeichnet (Straight et al., 2003). Die mechano-chemische Aktivität des Myosins ruht allerdings bis es mit Aktin-Filamenten, der

zweiten wichtigen Komponente des kontraktilen Ringes, interagiert. Die häufig parallele Anordnung der Aktin-Filamente wird hauptsächlich durch Profilin und Formine organisiert (Glotzer, 2005). Das Aktomyosin-System ist jedoch nicht ausreichend, um die Cytokinese zum Abschluss zu bringen, da letztendlich beide Tochterzellen von einer eigenen Plasmamembran umschlossen werden müssen. Die Maschinerie, welche in der Lage ist, während der Cytokinese Membranen einzufügen, besteht aus Syntaxinen, Syntaxin-assoziierten Proteinen, Mitgliedern des Coatomer-Komplexes, GTPasen der RAB-Familie und Untereinheiten des Exocyst-Komplexes (Low et al., 2003; Skop et al., 2004). Weitere Kinasen sind wahrscheinlich dabei behilflich Membranen zum „Midbody“ zu liefern (Fan & Beck, 2004).

1.6. Der Zellzyklus als Ansatzpunkt für Krebstherapien

Bereits vor über 100 Jahren zeigte Theodor Boveri die synchrone Separation der Chromosomen in den ersten mitotischen Teilungen von befruchteten Seeigelleiern. Des Weiteren beschrieb er den nachteiligen Effekt von ungleichmäßigen Aufteilungen der Chromosomen in diesen Zellen und ihren Nachkommen (Boveri, 1902). Nach der Beobachtung von atypischen Mitosen in diversen Karzinomen, war es erneut Boveri, der die These formulierte, dass eine Fehlverteilung der Chromosomen der Grund für die Entstehung von Tumoren und Geburtendefekten sei (Boveri, 1914). Tatsächlich sind die meisten soliden Tumore aneuploid, weisen also numerische Aberrationen ihres Chromosomensatzes auf. Weiterhin zeigen verschiedene Krebszelllinien eine chromosomale Instabilität (CIN), was bedeutet, dass Zellen während ihrer Teilung regelmäßig ganze Chromosomen verlieren oder hinzu gewinnen (Lengauer et al., 1997). Die Ursachen für CIN sind bislang nicht bekannt, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass Defekte in den Prozessen, welche die Chromosomen-Aufteilung in der Mitose kontrollieren, daran beteiligt sind (Kops et al., 2005). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass bei einer Krebserkrankung etwa 300 Gene im menschlichen Genom mutiert sind und weitere Gene eine veränderte Expression aufweisen. Solche Veränderungen tragen zur gestörten Regulation von Zellzyklus-Kinasen bei (Abbildung 10), was häufig mit anomalen Teilungen und unkontrollierter Proliferation von Krebszellen in Verbindung steht (Lapenna & Giordano, 2009).

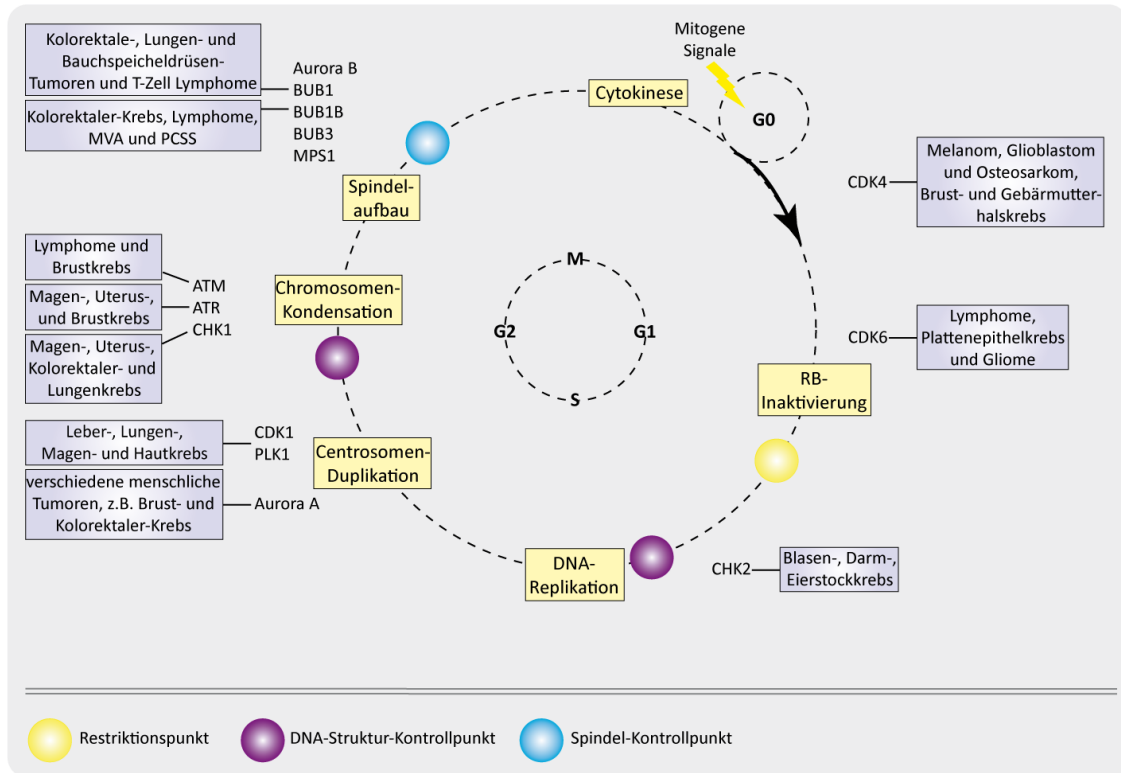


Abbildung 10: Zellzyklus Regulation im Hinblick auf Protein-Kinasen mit potenzieller Bedeutung für die Krebstherapie (modifiziert nach Lapenna & Giordano, 2009)

Cyclin-abhängige Kinasen in der Interphase leiten die Zelle aus dem Ruhezustand und hinter den Restriktionspunkt, was die Zellen unwiderruflich auf die DNA Synthese, den Übergang zur S-Phase (S), festlegt. Die DNA-Struktur-Kontrollpunkt Kinasen (CHKs) fungieren als Sensorproteine, welche als Antwort auf fehlerhafte DNA den Stillstand des Zellzyklus in der G1- und G1-/S-Phase einleiten. CDK1, CDK2, PLK1 und Aurora A sind in die Regulation des Centrosomen Zyklus involviert, während die Kinasen, die in den Spindel-Kontrollpunkt eingebunden sind die einwandfreie DNA Aufteilung während der Mitose (M) garantieren. Verschiedene Kinasen können an unterschiedlichen Stellen des Zellzyklus wirken und die Aktivität von anderen Zellzyklus-verbundenen Kinasen modulieren. Krebserkrankungen, welche mit genetischen Veränderungen von spezifischen Kinasen in Verbindung stehen, sind durch die blauen Kästen gekennzeichnet. ATM: Ataxia telangiectasia mutiert, ATR: Ataxia telangiectasia und RAD3-verbundenes Protein, BUB1: „budding uninhibited by benzimidazoles 1“, BUB1B: BUB1 Homolog beta (auch BUBR1), MPS: Monopolare Spindel 1, MVA: „mosaic variegated aneuploidy“, PCSS: „premature chromatid separation syndrome“, RB: Retinoblastoma Protein Familienmitglieder.

Aufgrund des Potentials die Tumorgenese auszulösen, ist die Mitose ein beliebter Ansatzpunkt für die Entwicklung von Anti-Krebs-Wirkstoffen (Weaver & Cleveland, 2005). Die meisten in der Klinik angewendeten Chemotherapeutika wirken auf den Zellzyklus, um die Hyperproliferation in Tumorzellen zu inhibieren und das gewünschte Resultat der Chemotherapie, die anschließende Apoptose, auszulösen (Lee & Schmitt, 2003). Basierend auf ihrer Wirkungsweise werden diese Chemotherapeutika in klare Untergruppen aufgeteilt: Wirkstoffe, welche die DNA-Synthese hemmen, Wirkstoffe, welche die DNA schädigen und Wirkstoffe, welche eine funktionale Störung der mitotischen Spindel hervorrufen (Schmidt & Bastians, 2007). Zahlreiche Naturstoffe inhibieren die Mikrotubuli-Dynamik und bringen ihre primäre Wirkungsweise in proliferierenden Tumorzellen zur Geltung, wo sie die Mitose blockieren und anschließend den Zelltod einleiten (Zhou & Giannakakou, 2005). Mikrotubuli-bindende Wirkstoffe können in zwei Kategorien klassifiziert werden: Wirkstoffe,

welche zur Stabilität der Mikrotubuli beitragen, wie die Taxane und Epothilone, und Stoffe, die destabilisierend wirken, wie die Vincaalkaloide und Colchicine (Schmidt & Bastians, 2007). Alle diese Verbindungen unterdrücken in klinisch relevanten Konzentrationen die Dynamik des Spindelapparates und inhibieren so die Kinetochor-Anhaftung an die Mikrotubuli und die Chromosomen-Ausrichtung. Die Anwesenheit von teilweise orientierten Chromosomen mit fehlender Mikrotubuli-Bindung oder Kinetochor-Spannung aktiviert den Spindel-Kontrollpunkt und führt zum mitotischen Arrest in einem Prometaphase-ähnlichen Zustand. Obwohl die primäre Wirkungsweise dieser Arzneimittel geklärt ist, bleibt es unklar wie sie den Tumorzelltod einleiten. So gibt es auch keine Erklärung dafür, warum Taxane erfolgreich bei Brust-, Eierstock- und Lungen-Karzinomen, aber nicht bei Dickdarm-Karzinomen eingesetzt werden können (Schmidt & Bastians, 2007). Ein schwerwiegendes Problem dieser Wirkstoffe ist, dass es zu Nebenwirkungen, z. B. Knochenmarksuppression, peripheren Nervenleiden und Haarausfall, kommt. Zwar sollte das primäre Ziel der Mikrotubuli-modulierenden Verbindungen die mitotische Spindel sein, jedoch sind auch Interphase-, ruhende und differenzierte Zellen zur Aufrechterhaltung der Zytoskelett-Funktionen auf dynamische Mikrotubuli angewiesen (Zhou & Giannakakou, 2005). Aus diesem Grund ist es reizvoll Wirkstoffe zu finden, welche nur während der Zellteilung exprimierte Proteine modifizieren, um so einen verbesserten therapeutischen Index zu ermöglichen (Jackson et al., 2007). Eine vielversprechende Zielgruppe stellen die mitotischen Kinesine dar, eine Untergruppe der Kinesin-Motorproteine, welche ausschließlich in der Mitose agiert (Wood et al., 2001). Verschiedene mitotische Kinesine haben ausschlaggebende Aufgaben in einzelnen Aspekten des Spindelaufbaus und der Spindelfunktion, einbegriffen Spindelpol-Organisation, Chromosomen-Anordnung und -Aufteilung und Mikrotubuli-Dynamik (Jackson et al., 2007). Eines der für die Mitose spezifischen Kinesine ist KSP/EG5, welches für die Bildung einer bipolaren Spindel sowie die ordnungsgemäße Aufteilung der Schwesterchromatiden verantwortlich ist (Blangy et al., 1995). Eine Hemmung von KSP/EG5 führt zur Ausbildung einer monopolaren Spindel (Kapoor et al., 2000), was die Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes und den anschließenden mitotischen Arrest mit sich bringt. Der erste Inhibitor von KSP/EG5, Monastrol (Abbildung 2), wurde in einem chemischen-genetischen Ansatz identifiziert (Mayer et al., 1999). Die relativ geringe zelluläre Aktivität behinderte jedoch die weitere Wirkstoff-Entwicklung (Schmidt & Bastians, 2007). In der Zwischenzeit ist das Feld der KSP/EG5-Inhibitoren-Entdeckung und -Entwicklung regelrecht explodiert und einige Inhibitoren, wie SB-743921 (Cytokinetics und GlaxoSmithKline), Mk-0731 (Merck) und ARRY-520 (Array Biopharma) (Abbildung 11),

wurden in klinischen Studien untersucht (Holen et al., 2011; Matsuno et al., 2008; Schmidt & Bastians, 2007). Ein weiteres Kinesin von besonderem Interesse ist CENP-E, welches zugleich Effektor und Sensor von mitotischen Prozessen ist. CENP-E bindet und reguliert die Spindel-Kontrollpunkt-Kinase BUBR1 an den Kinetochoren (Mao et al., 2003). Die zeitgleiche Anheftung dieses Kinesins an Mikrotubuli und Kinetochore ist essentiell, um den mitotischen Kontrollpunkt zu passieren und ermöglicht den Ablauf der Anaphase (Yao et al., 2000). Zellen in denen CENP-E inhibiert wird, zeigen Spindelpol-Fragmentierung, Verlust der Chromosomen-Anordnung während des Zusammenkommens in der Metaphase und reduzierte Spindelspannung, was zu einer Verzögerung der Mitose führt (Putkey et al., 2002). Daher führt eine verminderte CENP-E-Funktion, ähnlich wie Spindel-störende Wirkstoffe, zu schwerwiegenden mitotischen Fehlern, was darauf hindeutet, dass die Hemmung von CENP-E eine attraktive Strategie für die Krebstherapie ist. Tatsächlich haben Cytokinetics und GlaxoSmithKline Daten für den CENP-E Inhibitor GSK923295A (Abbildung 11) bekannt gegeben, welcher *in vitro* und *in vivo* eine starke Anti-Tumor-Aktivität aufweist (Sutton, 2007).

Einen weiteren Ansatzpunkt für Krebstherapien bieten die mitotischen Kinasen. Unter den verschiedenen Kinasen, welche für den Spindelaufbau benötigt werden, sind die Polo-like-Kinasen und Aurora-Kinasen von besonderem Interesse. Zahlreiche Inhibitoren befinden sich in der klinischen Entwicklung. Die Familie der Polo-like-Kinasen umfasst vier Mitglieder PLK1, PLK2 (SNK), PLK3 (FNK) und PLK4 (SAK) (Barr et al., 2004). Das meist studierte Familienmitglied ist PLK1, welche eine essentielle Rolle in der Centrosomen-Reifung, dem Spindelaufbau, der Chromosomen-Aufteilung, der Aktivierung des APC/C, der Cytokinese, der Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes sowie der Aktivierung von CDK1 am G2/M-Übergang einnimmt (Strebhardt & Ullrich, 2006). Der Reiz PLK1 als Zielprotein für eine gerichtete Tumorthherapie zu nutzen, wird durch zwei Beobachtungen bekräftigt: zum einen kann eine Überexpression von PLK1 in zahlreichen Krebserkrankungen mit unterschiedlichem pathologischen Ursprung, wie Brust, Eierstock, Dickdarm, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Endometrium, Gehirn, Haut, Kopf-Hals, Speiseröhre, Magen-Darm-Trakt und Prostata nachgewiesen werden (Takai et al., 2005). Zum anderen führt die gezielte Störung der PLK1-Funktion zum Anhalten der Mitose und dem anschließenden Zelltod (Schmidt et al., 2006). Ein vielversprechender PLK1-Inhibitor ist der nicht-ATP kompetitive Inhibitor ON01910 (Abbildung 11). Er hemmt das Zellwachstum in verschiedenen Tumor-Zelllinien durch Einleitung des mitotischen Arrests und der Apoptose, führt *in vivo* jedoch nicht zu

Nebenwirkungen wie Hämatoxizität, Leberschäden und Neurotoxizität (Gumireddy et al., 2005).

Die Aurora-Kinasen gewährleisten die einwandfreie Centrosomen-Funktion, Chromosomen-Anordnung und -Aufteilung (Bolanos-Garcia, 2005; Vader et al., 2006). Aurora A konnten verschiedene essentielle Funktionen während der Mitose zugeordnet werden. So bildet die Kinase einen Komplex mit dem Protein Ajuba und scheint eine wichtige Rolle beim Übergang von der G2- zur M-Phase zu spielen (Hirota et al., 2003). Während der Mitose bindet Aurora A an das regulatorische Protein TPX2 und lokalisiert an die Centrosomen (Kufer et al., 2002). Dort ist es in die Regulation von centrosomalen Proteinen, welche für die Bildung der Mikrotubuli und des Spindelaufbaus benötigt werden, involviert (Kinoshita et al., 2005). Die Hemmung von Aurora A führt zu Defekten in der Centrosomen-Reifung, was mit schwerwiegenden Spindel-Fehlern und der Ausbildung von monopolaren Spindeln in Verbindung steht und eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Spindel-Bipolarität vermuten lässt (Manfredi et al., 2007). Des Weiteren konnte für Aurora A gezeigt werden, dass es in verschiedenen Tumoren vervielfältigt ist und als Onkogen agieren kann (Bischoff et al., 1998). Aurora B ist eine Komponente des „Chromosomal passenger complex“, welcher INCENP, Borealin und Survivin einschließt (Vader et al., 2006). Aurora B kann an verschiedenen Positionen in der Zelle, abhängig von den verschiedenen Phasen der Mitose, nachgewiesen werden. In den frühen Phasen der Mitose lokalisiert die Kinase an die Chromosomen-Arme und die inneren Kinetochore, in der Anaphase in die Mittelzone der Spindel und in der Telophase zur Zellteilungsfurche (Schmidt & Bastians, 2007). Darüber hinaus wird Aurora B benötigt um syntele Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftungen zu lösen und so monoorientierte Anheftungen zu korrigieren und eine bipolare Chromosomen-Ausrichtung zu gewährleisten (Hauf et al., 2003). Ferner ist Aurora B essentiell für die Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes als Antwort auf eine gestörte Spannung zwischen den Schwester-Chromatiden (Ditchfield et al., 2003). In der späten Telophase, lokalisiert Aurora B zum kontraktilen Ring und zur Zellteilungsfurche und ist für die Cytokinese erforderlich. Eine Hemmung der Aurora B-Aktivität interferiert mit der Chromosomen Anordnung und blockiert die Zellteilung, jedoch nicht den Zellzyklusablauf, was in polyploiden Zellen resultiert (Ditchfield et al., 2003; Hauf et al., 2003). Aurora C ist nicht so gut untersucht wie Aurora A oder B und scheint redundante Funktionen zu Aurora B zu haben, da es möglicherweise auch ein Teil des CPC ist und teilweise den Funktionsausfall von Aurora B komplementieren kann (Sasai et al., 2004). Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen stellen die Aurora-Kinasen attraktive Zielproteine im Rahmen der Krebstherapie dar (Keen &

Taylor, 2004). Einige Aurora-Kinase-Inhibitoren, wie VX-680, Hesperadin, ZM447439 (Abbildung 11), AT-9283, MLN-8054, R-763, SU6668 und PHA-739358, konnten identifiziert werden und durchlaufen Phase I/II klinische Studien (Agnese et al., 2007; Fiskus et al., 2008; Gontarewicz et al., 2008; Soncini et al., 2006; Tao et al., 2007). Der erste Inhibitor in den klinischen Studien, VX-680, hemmt nicht nur die Zellproliferation, sondern fördert auch die Apoptose in einem weiten Spektrum an Tumortypen. Die Beobachtung, dass VX-680 keinen Effekt auf ruhende Zellen hat, macht ihn zu einem vielversprechenden Krebstherapeutikum (Harrington et al., 2004). Erst kürzlich wurden von GlaxoSmithKline neue Aurora-Inhibitoren identifiziert, welche Verkürzungen des klinischen Kandidaten GSK-1070916 darstellen, jedoch ein niedrigeres Molekulargewicht und eine höhere Bindungs-Effizienz aufweisen (Medina et al., 2010).

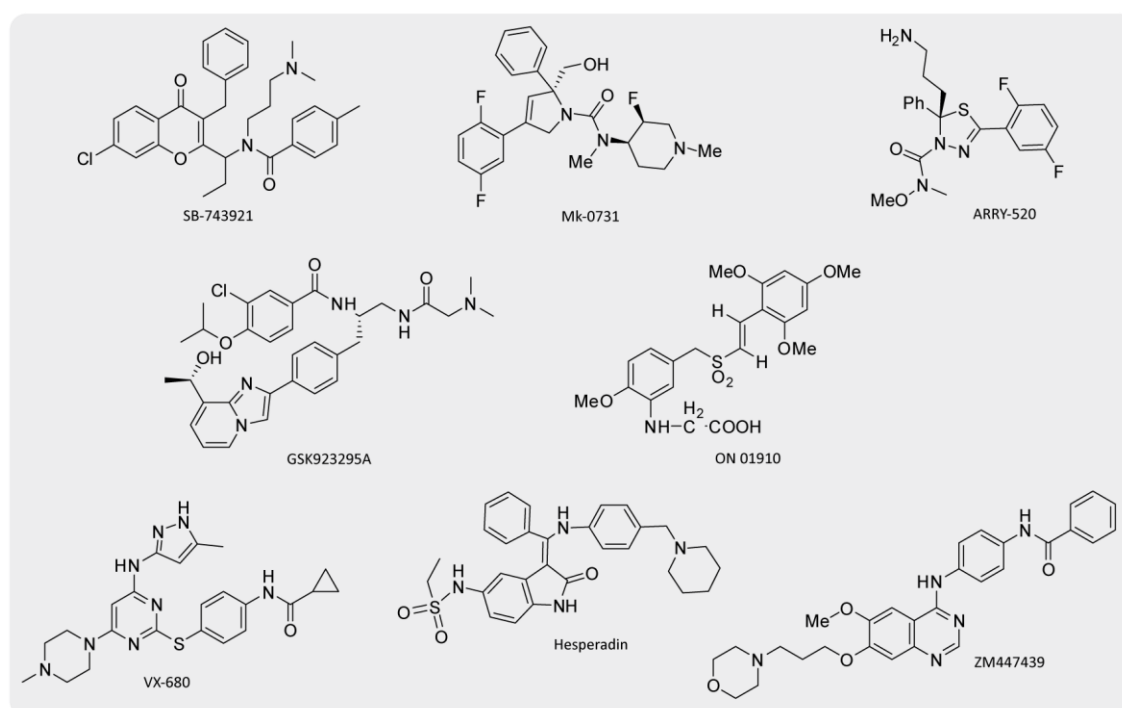


Abbildung 11: Strukturen verschiedener Zellzyklus Inhibitoren

Strukturen der EG5 Inhibitoren SB-743921, Mk-0731 und ARRY-520, des CENP-E Inhibitors GSK923295A, des PLK Inhibitors ON01910 sowie der Aurora Inhibitoren VX-680, Hesperadin und ZM447439.

Weitere Inhibitoren wurden für die Cyclin-abhängigen Kinasen, sowie für die am DNA-Struktur-Kontrollpunkt beteiligten Kinasen, ATM und CHK2, beschrieben (Lapenna & Giordano, 2009). Reizvolle Zielproteine sind auch die in den Spindel-Kontrollpunkt involvierten Kinasen BUB1, BUBR1 und MPS1, sowie das Kinetochor Protein CENP-F (Schmidt & Bastians, 2007). Jedoch ist die Liste der potentiellen Proteine, welche innerhalb der Mitose als Ansatzpunkt für Krebstherapien dienen können, bei Weitem noch nicht komplett. Da die Mitose ein streng regulierter Prozess ist und Krebszellen nur limitierte Möglichkeiten

haben einem gerichteten pharmakologischen Eingriff zu entgehen, ist damit zu rechnen, dass die Suche nach einem essentiellen mitotischen Zielprotein weiterhin herausfordernd sein wird (Schmidt & Bastians, 2007).

1.7. Zielsetzung

Im Rahmen eines vorwärts-gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes konnten innerhalb der abteilungseigenen Substanzbibliothek potenzielle Zellzyklus-Inhibitoren mit einem Indolochinolizin-Grundgerüst, identifiziert werden. Diese Verbindungen führten nach der Inkubation mit Nierenzellen der Grünen Meerkatze zu einer Ansammlung von mitotischen Zellen. In anschließenden Lebendzell-Mikroskopie-Analysen in der Gruppe von Prof. Thomas Mayer konnte in TC21-Zellen (HeLa-Zellen mit einem GFP-Tubulin und einem GFP-CENP-A Konstrukt) zum einen eine verlängerte Mitose, zum anderen eine ausschließliche Dreiteilung der Zellen beobachtet werden. Eine nahe liegende Inhibierung der Tubulin-Polymerisation konnte ausgeschlossen werden (Menninger, 2009).

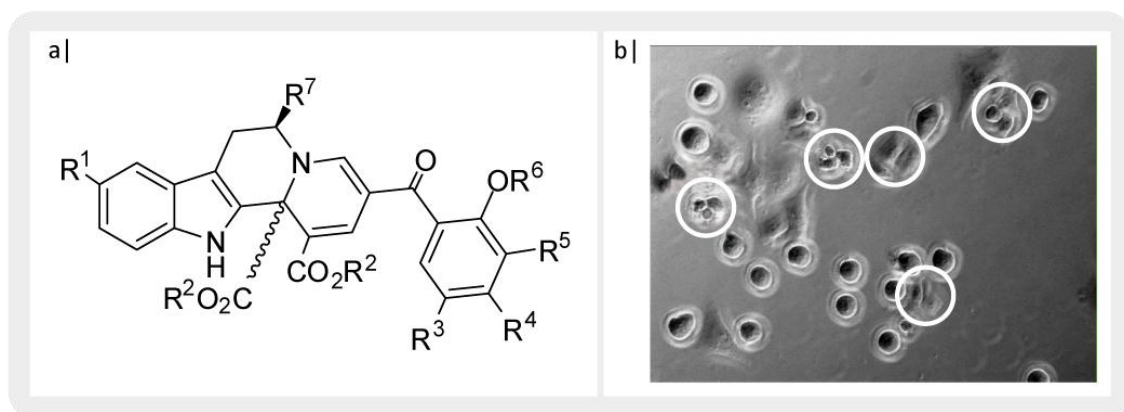


Abbildung 12: Indolochinolizine und deren Einfluss auf TC21-Zellen

a) Grundgerüst der getesteten Indolochinolizine. b) Ausschnitt aus Lebendzell-Aufnahmen von TC21-Zellen nach der Behandlung mit einem aktiven Indolochinolizin (Menninger, 2009). Die Kreise kennzeichnen Zellen, welche eine Dreiteilung durchlaufen.

Ein Ziel dieser Arbeit sollte es nun sein, den von den Indolochinolizinen ausgelösten Phänotyp näher zu charakterisieren. Hierzu sollten zunächst weitere Lebendzell-Mikroskopie-Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Prof. Anthony Hyman am Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden durchgeführt werden. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Aufnahmen sollten außerdem die DNA, die Mikrotubuli sowie die Spindelpole der mit den Indolochinolizinen behandelten Zellen detailliert untersucht werden. Zur quantitativen Analyse des beobachteten Zellzyklus-Arrests sollte die Durchflusszytometrie genutzt werden. Neben der Charakterisierung des Phänotyps sollten die primären zellbiologischen Untersuchungen zur Erstellung einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung der fokussier-

ten Indolochinolizin-Bibliothek beitragen. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in Zusammenarbeit mit Dr. Heiko Dücker eine Affinitätssonde synthetisiert werden. Anschließend sollte mit Hilfe dieser Sonde eine vergleichende und kompetitive Variante der Affinitätschromatographie erfolgen, um die Identifizierung der Zielproteine der Indolochinolizine zu ermöglichen. Alternativ hierzu sollte eine Zielprotein-Identifizierung basierend auf wissenschaftlichen Hypothesen durchgeführt werden. Sowohl für diese Untersuchungen als auch für eine abschließende Validierung identifizierter Zielproteine sollten zellbiologische (Immunzytochemie), proteinbiochemische (Immunblots), molekularbiologische (Klonierung benötigter Proteine) und biophysikalische (Fluoreszenzpolarisation) Methoden eingesetzt werden.

2. Material

2.1. Laborgeräte

CD-Spektrometer J-815	Jasco® GmbH, Gross-Umstadt
Fluoromax4-Spektrofluorometer	HORIBA Jobin Yvon GmbH,
Inkubator Nuaire DHD Autoflow NU 5510 E	Nuaire, Fernwald
Miniprotean 3 Gelelektrophorese System	BioRad, München
Odyssey® Fc Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen
Plattenlesegerät Infinite M200	Tecan, Crailsheim
Rührer IKAMAG RCT	IKA® Werke, Staufen
Schüttler Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Spektrometer Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Microflow	NuncNalge, Rochester, USA
Sterilbank Nuaire	Nuaire, Fernwald
Trans-Blot Transferkammer	BioRad, München
Vakuumkonzentrator	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Wasserbad Memmert	Hettich AG, Bäch, CH
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Eppendorf Minispin	Eppendorf, Hamburg

Alle weiteren Geräte entsprachen dem üblichen Laborstandard.

2.2. Verbrauchsmaterialien

6-Loch Zellkulturplatten (Falcon)	Becton Dickinson, Heidelberg
12-Loch Zellkulturplatten (Falcon)	Becton Dickinson, Heidelberg
24-Loch Zellkulturplatten (Falcon)	Becton Dickinson, Heidelberg
96-Loch Zellkulturplatten, weiß	Corning, New York, USA
384-Loch Zellkulturplatten, schwarz	Corning, New York, USA
8-Kammer Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Aqua Poly/Mount	Polysciences, Warrington, USA
Deckgläser Ø 12 mm	Thermo Scientific, Schwerte
Serologische Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturflaschen (Falcon)	Becton Dickinson, Heidelberg
Halbmikroküvette UVette	Eppendorf, Hamburg
Incidur®	Ecolab, Wien, AT
Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester, USA
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger (Super Frost Color)	Menzel, Braunschweig
PVDF-Transfermembran	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Whatmann 3MM Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.3. Chemikalien

Acrylamid / N,N-Methylenbisacrylamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Ampicillin	Gerbu, Gaiberg
Aminosäuren, nicht-essentiell, 100x	GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe
Apo-ONE [®] Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva, Heidelberg
DMEM Medium	PAA, Pasching, AT
DTT	Gerbu, Gaiberg
ER-Tracker™ Green (BODIPY [®] FL glibenclamide)	Invitrogen, Darmstadt
FuGENE [®] 6 Transfektions Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Geneticidinsulfat (G418)	Carl Roth, Karlsruhe
GelRed™ Nucleic Acid Stain	Biotrend, Köln
Hoechst33342	Invitrogen, Darmstadt
Iodacetamid	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Kälberserum (FBS)	GIBCO-Invitrogen, Darmstadt
Kanamycin	Gerbu, Gaiberg
McCoy's 5a Medium	PAA, Pasching, AT
NHS-aktivierte Sepharose	GE Healthcare, München
Nocodazol	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
RPMI 1640 Medium	PAA, Pasching, AT
Natriumpyruvat, 100x	GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin Magnetic Beads	New England Biolabs, Frankfurt

Material

SuperSignal® West Pico	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SuperSignal® West Femto	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Thymidin	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Trypsin	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin-EDTA 0,05 %	PAA, Pasching, AT
WST-1 Reagenz	Roche, Mannheim

Alle weiteren Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) oder Serva (Heidelberg).

2.4. Puffer und Lösungen

Molekularbiologie	
TAE-Puffer	40 mM Tris/Essigsäure, pH 7.5 20 mM Na-Acetat 1 mM EDTA
Zellbiologie	
Lysispuffer	50 mM Pipes 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 0.1% (v/v) NP40 0.1% (v/v) Triton X-100 0.1% (v/v) Tween20 0.1% (v/v) β-Mercaptoethanol Protease Inhibitor Cocktail pH 7.4
Lysispuffer für Cytoplasmaextrakte	300 mM Saccharose 0.6% (v/v) NP-40 10 mM Tris, pH 7.5 1 mM EDTA, pH 8.0 1.5 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 1 mM DTT Protease Inhibitoren
Lysispuffer für Kernextrakte	25% (v/v) Glycerol 10 mM Tris, pH 7.5 0.1 mM EDTA, pH 8.0 1.5 mM MgCl ₂ 500 mM NaCl 10 mM DTT Protease Inhibitoren

Material

Zellbiologie	
4x Perm-Puffer	400 mM Pipes/KOH pH 6.8 40 mM EGTA 4 mM MgCl ₂ 0.4% (v/v) Triton X-100
Perm-Fix Lösung	3.7% (v/v) Formaldehyd 1x Perm-Puffer
PI-Lösung	0.05 mg/ml Propidiumiodid 0.1 mg/ml RNase A 0.05% (v/v) Triton X-100
Proteinbiochemie	
100 mM Natrium-Phosphat-Puffer (NaP _i)	200 mM NaH ₂ PO ₄ 200 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.0
Sammelgel-Puffer	1 M Tris, pH 6.8
5 x SDS-Probenpuffer	50% (v/v) Glycerol 250 mM Tris, pH 6.8 350 mM SDS 500 mM DTE 360 µM Bromphenolblau
10 x SDS-Laufpuffer	2.5M Glycin 250 mM Tris 35 mM SDS
1 x TBS	10 mM Tris/HCl pH 7.4 150 mM NaCl
1 x TBST	1x TBS 0.1% Triton X-100
Trenngel-Puffer	1.5 M Tris, pH 8.8

Material

Proteinbiochemie-Färbelösungen	
Coomassie-Lösung	0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250 45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Colloidal-Coomassie	<i>Lösung A:</i> 2% (v/v) ortho-Phosphorsäure 10% (w/v) Ammoniumsulfat <i>Lösung B:</i> 5% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G-250 <i>fertige Lösung:</i> 2% (v/v) Lösung B 78% (v/v) Lösung A 20% (v/v) Methanol
Entfärber-Lösung	30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Fixierlösung für Zink-Imidazol Färbung	50% (v/v) Methanol 5% (v/v) Essigsäure
Imidazol-SDS Lösung	0.2M Imidazol 0.1% SDS
Zinksulfat Lösung	0.2M Zinksulfat
Tryptischer Verdau	
Alkylierungslösung	55 mM Iodacetamid in 25 mM NH_4HCO_3
Reduktionslösung	50 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3
Verdaulösung	0.01 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin in 25 mM NH_4HCO_3
Waschlösung 1	25 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril (3:1)
Waschlösung 2	25 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril (1:1)

2.5. *Nucleinsäure-Standards*

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus	Fermentas, St. Leon-Rot

2.6. *Protein-Standard*

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
---	-------------------------

2.7. *Vektoren*

pECFP-C1	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F
pEYFP-N1	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, F
pOTB7-NPM	Open Biosystems, Huntsville, USA
pET3a-CRM1	Prof. Wittinghofer (Paraskeva et al., 1999)
pET19b-NPM	Prof. Martin (Cullen et al., 2009)
pOPINE	Dortmund Protein Facility

2.8. *Enzyme*

<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow-Fragment	Fermentas, St. Leon-Rot

2.9. Oligodesoxyribonukleotide

2.9.1. Oligodesoxyribonukleotide zur Klonierung

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Schnittstelle
pECFP-C1-NPM1 fw	CCG GAATTC GATGGAAGATT CGATGG ACATG	EcoRI
pECFP-C1-NPM1 rev	CCCA AGCTT TTAAAGAGACTT CCTCC ACTGCC	HindIII
pECFP-N1 NPM1 fw	CTTA AGCTT ACCATGGAAGATT CGATGG ACATG	HindIII
pECFP-N1 NPM1 rev	CTT GGATCC CAAAGAGACTT CCTCC ACTGC	BamHI

Die Schnittstellen innerhalb der Sequenzen wurden in fett dargestellt.

2.9.2. Oligodesoxyribonukleotide zur Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
pECFP-C1 Fw	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGT
pECFP-C1 Rev	GTTTCAGGTT CAGGGG GAGGTG
pECFP-N1 Fw	GTCGTAACA ACTCCG CCC
pECFP-N1 Rev	GTCCAGCTCG ACCAGG ATG

2.10. Antikörper

2.10.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Bezogen von
BUB1 (MCA2679)	Maus	AbD Serotec
CEP135	Kaninchen	Prof. Hyman (Bird & Hyman, 2008)
CREST (CS1058)	Mensch	Europa Bioproducts Ltd
CRM1 (sc-74454)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
GAPDH (G8795)	Maus	Sigma-Aldrich®
GAPDH (G9545)	Kaninchen	Sigma-Aldrich®
Histon H3 (H9289)	Kaninchen	Sigma-Aldrich®

Antikörper	Organismus	Bezogen von
NPM (3542)	Kaninchen	Cell Signaling Technology®
p14 ^{ARF} (MS850-P0)	Maus	Thermo Scientific
p21 ^{WAF1/CIP1} (sc-397)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc
p53 (sc-126)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc
pHiston H3 (ab14955, ab5176)	Maus, Kaninchen	Abcam®
RANBP1 (ab97659)	Kaninchen	Abcam®
RB (554316)	Maus	BD Pharmingen™
α-Tubulin (MCA77G)	Ratte	AbD Serotec
α-Tubulin (ab18251)	Kaninchen	Abcam®
β-Tubulin (ab21057)	Ziege	Abcam®
γ-Tubulin (T6567)	Maus	Sigma-Aldrich®

2.10.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Organismus	Bezogen von
Anti-Kaninchen IgG (H+L) HRP-Konjugat	Ziege	Thermo Scientific
Anti-Kaninchen (IRDye® 680 Konjugat)	Esel	LI-COR® Biosciences
Anti-Kaninchen (IRDye® 800 CW Konjugat)	Esel	LI-COR® Biosciences
Anti-Kaninchen (Alexa Fluor® 488 Konjugat)	Esel	Invitrogen™
Anti-Kaninchen (Alexa Fluor® 555 Konjugat)	Esel	Invitrogen™
Anti-Maus IgG (H+L) HRP-Konjugat	Ziege	Thermo Scientific
Anti-Maus (Alexa Fluor® 488 Konjugat)	Esel	Invitrogen™
Anti-Maus (Alexa Fluor® 555 Konjugat)	Esel	Invitrogen™
Anti-Maus (Alexa Fluor® 633 Konjugat)	Esel	Invitrogen™
Anti-Maus (IRDye® 680 Konjugat)	Esel	LI-COR® Biosciences

Antikörper	Organismus	Bezogen von
Anti-Maus (IRDye800CW Konjugat)	Esel	LI-COR® Biosciences
Anti-Ratte (Alexa Fluor® 488 Konjugat)	Esel	Invitrogen™
Anti-Ziege (DyLight® 549 Konjugat)	Esel	Abcam®
Anti-Ziege (DyLight® 649 Konjugat)	Esel	Abcam®

2.11. Reagenziensets „Kits“

Qiagen® Plasmid Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

2.12. Nährmedien

2.12.1. Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB (Bertani, 1951)	0.5% Hefeextrakt 1% Trypton 0.5% NaCl
LB Agar	0.5% Hefeextrakt 1% Trypton 0.5% NaCl 1.5% Agar
SB (Hanahan, 1983)	3.2% Pepton 2% Hefeextrakt 0.5% NaCl

2.12.2. Zellen

Zelllinie	Medium	Zusätze
BSC-1	DMEM, 4.5 g/l Glukose, Glutamin	10% (v/v) FBS Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml) nicht essentielle Aminosäuren 10 mM Natriumpyruvat
HCT-116	DMEM, 4.5 g/l Glukose, Glutamin	10% (v/v) FBS Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml) nicht essentielle Aminosäuren 10 mM Natriumpyruvat
HeLa	DMEM, 4.5 g/l Glukose, Glutamin	10% (v/v) FBS Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml) nicht essentielle Aminosäuren 10 mM Natriumpyruvat
HT-29	McCoy's 5a Medium	10% (v/v) FBS Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml)
MCF7	DMEM, 4.5 g/l Glukose, Glutamin	10% (v/v) FBS Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml) nicht essentielle Aminosäuren 10 mM Natriumpyruvat
PC-3	RPMI 1640	10% (v/v) FBS Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml)

Material

Zelllinie	Medium	Zusätze
Saos-2	DMEM, 4.5 g/l Glukose, Glutamin	10% (v/v) FBS Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml) nicht essentielle Aminosäuren 10 mM Natriumpyruvat
SW480	DMEM, 4.5 g/l Glukose, Glutamin	10% (v/v) FBS Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml) nicht essentielle Aminosäuren 10 mM Natriumpyruvat

2.13. Organismen

2.13.1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
BL21-DE3	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI</i> <i>ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>
BL21-DE3-RIL-Codon Plus	<i>E. coli B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+Tetrgal λ(DE3) endA Hte</i> <i>[argU ileY leuW Camr]</i>
OmniMAX™ 2 T1	<i>F' {proAB lacI^q lacZΔM15 Tn10(Tet^R) Δ(ccdAB)}</i> <i>mcrA Δ(mrr</i> <i>hsdRMS-mcrBC) Φ 80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 endA1</i> <i>recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD</i>

2.13.2. Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
BSC-1	Epithelzellen aus der Niere von <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze); ATCC CCL-26
HCT-116	Humane Epithelzellen aus einem kolorektalen Karzinom; ATCC CCL-247

Material

Zelllinie	Herkunft
HCT-116 p53 ^{-/-}	Humane Epithelzellen aus einem kolorektalen Karzinom, p53-defizient (Bunz et al., 1998)
HeLa	Humane Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom; ATCC CCL-2
HT-29	Humane Epithelzellen aus einem kolorektalen Karzinom; ATCC HTB-38
MCF7	Humane Epithelzellen aus einem Brustkarzinom, ATCC HTB-22
PC-3	Humane Epithelzellen aus einem Prostatakarzinom; ATCC CRL-1435
Saos-2	Humane Zellen aus einem Osteosarkom; ATCC HTB-85
SW480	Humane Epithelzellen aus einem kolorektalen Karzinom; ATCC CCL-228

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht aller in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* Stämme erfolgte in LB-Flüssigmedium (Ausubel, 1995) bei 37 °C und 220 rpm in einem Inkubationsschüttler. Die verwendeten Medien wurden zuvor für 25 min bei 120 °C autoklaviert. Erforderliche Antibiotika wurden steril-filtriert und den Medien nach dem Autoklavieren zugegeben. Die Endkonzentration von Ampicillin, Kanamycin oder Chloramphenicol betrug 0.1 mg/ml.

3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid DNA wurde mit Hilfe des „QIAprep® Spin Miniprep Kits“ nach Herstellerangaben isoliert. Um möglichst saubere DNA für nachfolgende Transfektionen (Kap 3.2.2) zu erhalten wurde das „QIAfilter® Plasmid Midi Kit“ genutzt.

3.1.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA mit destilliertem Wasser verdünnt und die Absorption der Lösung bei 260 nm im Biophotometer bestimmt. Mit Hilfe der Faustformel, dass eine DNA-Lösung von 50 µg/ml eine Absorption von 1 aufweist, konnte die Konzentration berechnet werden.

3.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode welche genutzt wird, um DNA *in vitro* zu vervielfältigen und wurde 1985 von Kary Mullis beschrieben (Saiki et al., 1988). Der PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus thermostabilen Polymerasen wie *Pfu* oder *Taq*, der zu amplifizierenden DNA, 10 nmol des entsprechenden Vor- bzw. Rückwärts-Oligodesoxyribonukleotids („Primer“), 10 nmol Desoxyribonukleotiden sowie dem für die jeweilige Polymerase benötigten Puffer. Das PCR-Programm bestand aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 2 min, 25-35 Zyklen aus Denaturierung (95 °C, 30s), Oligodesoxyribonukleotid

Anlagerung (Schmelztemperatur der „Primer“ - 5 °C, 30s) und der Verlängerung (72 °C, 2 min), sowie einem abschließenden Elongationsschritt bei 72 °C für 10 min.

Bei einer PCR, bei der die amplifizierte DNA zur anschließenden Klonierung verwendet werden sollte, enthielten die Oligodesoxyribonukleotide etwa 10 bp lange Überhänge mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen. Das Programm wurde insofern verändert, als dass die ersten 10 Zyklen der PCR basierend auf der Schmelztemperatur des für die Matrizen-DNA spezifischen „Primers“ durchgeführt wurden und die folgenden Zyklen basierend auf der Schmelztemperatur des kompletten Oligonukleotids inklusive der Restriktionsschnittstellen.

3.1.5. Klonierung von DNA-Fragmenten

3.1.5.1. Herauslösen von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten der gewünschten Größe aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick® Gel Extraktion Kits“ nach Herstellerangaben.

3.1.5.2. DNA-Hydrolyse mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktion von Plasmiden bzw. DNA-Fragmenten wurde eine entsprechende Menge DNA, mit den ausgewählten Restriktionsenzymen und dem mitgelieferten 10x Puffer in einem Gesamtvolumen von 20-50 µl inkubiert. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C über 60-90 min.

3.1.5.3. Dephosphorylierung von DNA-5'-Enden

Um die Ligation eines geschnittenen Plasmids zu verhindern, wurde direkt nach der Restriktion, dem linearisierten Plasmid Shrimp Alkaline Phosphatase hinzugegeben (Sambrook, 2001). Die Menge des einzusetzenden Enzyms richtete sich nach der Menge der DNA 5'-Enden. Es wurden jeweils 1U Enzym pro pmol 5'-Ende benötigt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C. Ein abschließendes Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C für 15 min führte zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase.

3.1.5.4. Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation restringierter DNA-Fragmente in Plasmide erfolgte mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (Sambrook, 2001). Das Enzym wurde laut Herstellerangaben im mitgelieferten Puffer eingesetzt und der Ansatz 1 h bei 22 °C inkubiert.

3.1.5.5. DNA-Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Zur Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock (Hanahan, 1983) wurden 10 µl des Ligations-Ansatzes mit 200 µl chemisch-kompetenten Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42 °C wurden die Zellen erneut 2 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Bakterien mit 700 µl vorgekühltem LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C angezogen. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, 700 µl des Überstandes verworfen und das Sediment resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agarplatten (Ausubel, 1995) ausplattiert und unter Selektionsdruck durch Ampicillin (0,1 mg/ml) bzw. durch Kanamycin (0,05 mg/ml) über Nacht bei 37 °C angezogen.

3.1.5.6. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente zum Nachweis von erfolgreich klonierten DNA-Fragmenten in Plasmide nach erfolgter Ligation (Kap. 3.1.5.4). Hierzu wurden zunächst Einzelkolonien des über Nacht gewachsenen Transformationsansatzes mit einer sterilen Pipettenspitze in einem entsprechenden PCR-Ansatz resuspendiert. Nach Übertragung einer Kolonie in den PCR-Ansatz wurde diese mit der gleichen Pipettenspitze in ein Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Medium unter dem entsprechenden Selektionsdruck über Nacht bei 37 °C angezogen. Die PCR wurde wie unter Kap. 3.1.4 beschrieben durchgeführt, mit der einzigen Veränderung, dass die anfängliche Denaturierung für 10 min erfolgte, um die Bakterien aufzubrechen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (Kap. 3.1.5.8) der PCR-Produkte wurde Plasmid-DNA der Klone, welche das DNA-Fragment gewünschter Größe enthielten, durch die Firma StarSEQ (Mainz) sequenziert.

3.1.5.7. Herstellung von Glycerol-Kulturen

Zur Herstellung von Glycerol-Kulturen wurde der Transformationsansatz (Kap. 3.1.5.5) auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Nach der Inkubation

über Nacht bei 37 °C wurden die Bakterienzellen in 1 ml LB-Medium resuspendiert und 500 µl der Suspension mit 500 µl sterilem Glycerol vermischt. Alternativ wurden 500 µl einer Übernacht-Kultur direkt mit 500 µl sterilem Glycerol vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.5.8. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden 0.8-2%ige (w/v) Agarosegele mit GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain in 1xTAE-Puffer verwendet. Nach Aufnahme der DNA-Fragmente in 1/6 Volumen Ladebuffer (6x Orange Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot) erfolgte die Trennung der DNA durch eine Horizontal-Elektrophorese bei konstanter Stromstärke von 100 V. Die Nukleinsäuren wurden unter UV-Licht nachgewiesen. Als Größenstandard diente der „Gene Ruler 1 kb DNA ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot).

3.1.6. Heterologe Expression von Proteinen in *E. coli*

3.1.6.1. Heterologe Expression von Nucleophosmin

Das Plasmid pET19b-NPM (Cullen et al., 2009) wurde mittels Hitzeschock (Kap. 3.1.5.5) in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert und in TB-Medium bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 30 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und bis zur weiteren Reinigung bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.6.2. Heterologe Expression von CRM1

Das CRM1-pET3a Plasmid (Paraskeva et al., 1999) wurde in *E. coli* BL21(DE3 RIL(K+)) transformiert. Die Bakterien wurden in SB-Medium mit 2% Ethanol bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Die Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.5 mit 200 µM IPTG induziert. Die weitere Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 25 °C über Nacht. Abschließend wurden die Zellen sedimentiert und bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Kultivierung von Zellen

3.2.1.1. Auftauen von Zellen

Die zuvor in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen, wurden unter leichtem Schütteln bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden dann unter sterilen Bedingungen in, mit 10 ml Medium befüllte, 75 cm² Gewebekulturflaschen gegeben. Die weitere Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂-Gehalt. Zur Entfernung des im Kryomedium enthaltenen DMSO war es notwendig nach etwa 24 h das Kulturmedium zu erneuern.

3.2.1.2. Subkultivierung/Passagieren von Zellen

Bei einer Konfluenz der adhärennten Zellen von 90-100% wurden die Zellen vom Boden der Gewebekulturflaschen abgelöst und in einer geringeren Zellzahl in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Hierzu wurde zunächst das alte Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden sie mit Trypsin/EDTA bedeckt und für einige Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in neues Medium aufgenommen und durch auf- und abpipettieren vereinzelt.

3.2.1.3. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zunächst wurde das Deckglas befeuchtet und auf die Stege der Zählkammer gelegt. Die Zellsuspension wurde in die von den Stegen gebildete Vertiefung pipettiert bis durch Kapillarkräfte ein luftblasenfreies Einfüllen des Zwischenraumes zwischen Deckglas und Zählkammer erfolgte. Unter dem Mikroskop wurden alle Zellen in den vier äußeren Quadraten, welche wiederum aus 16 kleineren Quadraten bestehen, ausgezählt. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und die Zellzahl durch Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ bestimmt. Die berechnete Zahl entsprach der Zellzahl in Zellen/ml Medium.

3.2.1.4. Kryokonservierung

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % in 75 cm² Kulturschalen angezogen. Anschließend wurden die Zellen wie unter Kap. 3.2.1.2 beschrieben abgelöst. Nach dem

Bestimmen der Zellzahl (Kap. 3.2.1.3) wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1000 g sedimentiert. Die Zellen wurden in Medium inklusive 10% (v/v) DMSO verdünnt, so dass je 300 µl mit einer Zellzahl von 10^6 in Kryoröhrchen überführt werden konnten. Diese wurden in einer speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe (Nalgene, Rochester, USA) für 24 h bei -80°C gelagert. Hierdurch konnte eine langsame Reduktion der Temperatur von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gewährleistet werden. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2.2. Transfektion von DNA

Die Transfektion von Plasmiden in Zellen erfolgte mit Hilfe des FuGENE® Transfektions Reagenz. Für eine Transfektion in einer 24 Loch Platte wurden zunächst $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. Nach 24h wurde der Transfektions-Ansatz vorbereitet. Hierzu wurden 1.8 µl Reagenz in einem Gesamtvolumen von 20 µl serumfreien Medium verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 300 ng DNA wurde der Ansatz gut durchmischt und es folgte eine weitere Inkubation bei RT für 15 min. Abschließend wurde der Transfektions-Ansatz tropfenweise auf die ausgesäten Zellen gegeben.

3.2.3. Herstellung von Zelllysaten

Die Herstellung von Zelllysaten erfolgte aus Zellkulturflaschen welche eine 90-100%ige Konfluenz aufwiesen. Zunächst wurden dieselben Schritte durchgeführt wie unter Kap. 3.2.1.2 beschrieben. Die nach der Trypsin-Behandlung erhaltene Zellsuspension wurde für 5 min bei 1500 g zentrifugiert und das erhaltene Sediment mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in Lysispuffer resuspendiert, gut durchmischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zelltrümmer 20 min bei 12000 g und 4°C von den löslichen Zellbestandteilen abgetrennt. Das erhaltene Lysat wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

3.2.4. Synchronisation von Zellen

Zur Synchronisation der Zellen am Beginn der S-Phase wurde dem Medium direkt nach dem Aussäen 2 mM Thymidin zugegeben (Heintz et al., 1983). Nach erfolgter Inkubation von 18 h wurde der Thymidin-Block durch zweimaliges Waschen mit PBS und abschließen-

dem Waschen mit Medium aufgehoben, so dass die Zellen synchron die S- und G2-Phase durchlaufen konnten.

3.2.5. Immunzytochemie

3.2.5.1. Fixieren von Zellen

Für eine immunzytochemische Analyse von Proteinen wurden Zellen in 24-Loch Platten auf Deckgläsern kultiviert. Zum Nachweis von centrosomalen Strukturen wurde eine Fixierung mit Methanol gewählt, während zum Nachweis von anderen zellulären Strukturen die Fixierung mit Formaldehyd erfolgte.

Zur Fixierung der Zellen mit Methanol wurde zunächst das Kultur-Medium abgenommen, und anschließend die mit Zellen bewachsenen Deckgläser für 15 min bei -20 °C in 100% Methanol inkubiert. Zum Schluss erfolgte eine Zugabe von PBS-T für 10 min zur Rehydrierung der Zellen.

Die Fixierung von Zellen mit Formaldehyd erfolgte nach Abnahme des Mediums für 20 min in Perifix-Lösung bei Raumtemperatur (RT).

3.2.5.2. Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

Die zuvor fixierten Zellen (Kap. 3.2.5.1) wurden für eine Stunde in PBS-T zuzüglich 2% BSA blockiert. Der erste Antikörper wurde entsprechend den Herstellerangaben in PBS-T/2% BSA verdünnt und für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit PBS-T wurde der zweite Antikörper 1:500 ebenfalls in PBS-T/2% BSA verdünnt und für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Gleichzeitig erfolgte die Färbung der DNA mit Hoechst33342. Bevor die Zellen mit Aqua-Poly/Mount eingedeckelt wurden, war erneutes Waschen (3 x 10 min) mit PBS-T notwendig. Bis zur Analyse der fixierten Zellen unter dem Mikroskop, wurden die Deckgläser im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.6. Durchflusszytometrie

Zur Analyse des DNA Gehaltes mittels der Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst in 6-Loch Platten ausgesät. Nach etwa 24 h wurden die Zellen mit den zu testenden Substanzen behandelt und für weitere 19 h mit diesen inkubiert. Danach wurde das Medi-

um abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin behandelt. Das abgenommene Medium, PBS sowie das Trypsin wurden in 15 ml Röhrrchen überführt. Die abgelösten Zellen wurden in 2 ml frisches Medium aufgenommen und mit den zuvor gesammelten Überständen vereinigt. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei 1500 g für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 1 ml PBS aufgenommen und unter ständigem Schütteln wurden der Suspension 2.5 ml kaltes Ethanol hinzugegeben. Die Fixierung der Zellen erfolgte bei -20 °C über Nacht. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 1500 g wurden die Zellsedimente in 500 µl PI-Lösung resuspendiert und für 40 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 3 ml PBS wurden die Zellen gewaschen. Nach abschließender Sedimentation für 5 min bei 1500 g wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und mit Hilfe des FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, USA) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo 7.5.

3.2.7. Mikroskopie

3.2.7.1. Lebendzell-Mikroskopie am MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden

Bei der Untersuchung von GFP-H2B-HeLa-Zellen in 384-Loch-Platten, wurden 24 h vor der Substanzapplikation je 10^3 Zellen pro Vertiefung in 50 µl Medium ausgesät. Die Aufnahme der Bilddaten erfolgte 2 h nach Substanzzugabe mit Hilfe eines automatischen Olympus IX81 Mikroskops unter Verwendung der integrierten Software-Funktionen „CellR“ und „ScanR“.

Für die hochauflösenden Lebendzell-Aufnahmen wurden $4 \cdot 10^3$ Zellen pro Vertiefung in 8-Loch Zellkammern (μ -slide 8-well; 80826; Ibidi GmbH, Martinsried) ausgesät und für 24 h inkubiert. Zwei Stunden nach der Substanzzugabe wurde die Lebendzell-Mikroskopie begonnen. Hierfür wurde ein DeltaVision® RT System (Applied Precision, LLC, Issaquah, USA; IX70/71 [Olympus]), welches mit einer CCD Kamera (CoolSnap HQ; Roper Scientific Photometrics, Tucson, USA) ausgestattet war, verwendet. Für diese Aufnahmen wurde ein 60x 1.42 NA PlanApo N Objektiv bei 37 °C benutzt. Die einzelnen Bilder wurden in Z-Ebenen mit 2.5 µm Abständen aufgenommen und alle 3 min wiederholt. Die Bilddaten wurden mit der SoftWoRx Software (Applied Precision, LLC, Issaquah, USA) berechnet. Die einzelnen Bilder der Z-Ebenen wurden so zusammengeführt, dass ein komplett scharfes Abbild der jeweils betrachteten Zelle entstand. Hierdurch konnten hochaufgelöste Filme betrachtet werden.

3.2.7.2. Lebendzell-Mikroskopie an der Universität Konstanz

Für die Lebendzell-Mikroskopie Aufnahmen wurden HeLa-Zellen mit einem GFP-Histon H2B Konstrukt (HeLa GFP-H2B) in einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung in einer 12-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen wurden gleich bei der Aussaat nach der in Abschnitt Kap. 3.2.4 beschriebenen Methode synchronisiert. Nach dem Aufheben des Thymidin-Blocks wurden die Zellen mit den jeweiligen Substanzen in CO_2 unabhängigen Medium inkubiert. Die Platte wurde sofort nach Applikation der Substanzen in einem beheizten Plattenhalter (37°C) auf dem Mikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss) positioniert. Durch Verwendung der Software MetaMorph® (Molecular Devices®, Downingtown, USA) wurde die Aufnahme der Bilddaten so eingestellt, dass in jeder Vertiefung drei Positionen aufgenommen wurden. Hierbei wurde jede Position alle 5 min bei der Anregungswellenlänge für GFP und im Durchlicht für eine Dauer von 16 h aufgenommen. Die erhaltenen Bilddaten konnten mit Hilfe derselben Software als Film betrachtet werden.

3.2.7.3. Fluoreszenzmikroskopie

Für nicht konfokale Fluoreszenzaufnahmen wurde das Axiovert Observer Mikroskop Z1 (Carl Zeiss, Deutschland) mit einem EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Öl Objektiv oder einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Öl Objektiv verwendet.

3.2.7.4. Konfokale Mikroskopie

Für konfokale Aufnahmen wurde ein Leica TCS SP5 mit einem HCX PL APO lambda blue 63x1.40 Öl UV Objektiv genutzt.

3.2.7.5. Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM)

Die FLIM Experimente wurden 24 h nach der Transfektion von HeLa-Zellen (Kap. 3.2.2) mit ECFP-NPM, NPM-ECFP, EYFP-NPM und NPM-Citrine bzw. EYFP-CRM1 in einer Inkubationskammer bei 37°C und 5% CO_2 durchgeführt. Die Messungen erfolgten direkt oder 1 h nach Zugabe des Cy3-modifizierten Moleküls im „time domain mode“ an einem Olympus Fluoview 1000 Mikroskop, welches mit einem „compact lifetime“ und „FCS upgrade kit“ für Laser Scanning Mikroskope (PicoQuant GmbH) ausgestattet ist. Für die Aufnahmen wurde ein 60x/1.35 NA Öl Objektiv (Olympus) verwendet. Die Fluorophore EYFP und Citrine wurden alle 25 ns mit einem gepulsten Dioden Laser bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt, und die Fluoreszenz wurde mit einem 525/15 Bandpass Filter detektiert. Der gepulste

Laser und die Photodioden (SPADs = Single Photon-Counting Diodes) wurden mit der Sepia II software (PicoQuant GmbH) kontrolliert. Die Integrationszeit pro Aufnahme betrug etwa 3 min (durchschnittliche absolute Photonenzahl = 1.000.000 pro Aufnahme). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der SymPhoTime v5.12 Software (PicoQuant GmbH, Berlin).

3.2.8. Test zur Bestimmung der Zellproliferation

Der zur Bestimmung der Zellproliferation genutzte WST-1 (water soluble tetrazolium) Test basiert auf mitochondrialen Dehydrogenasen, die das Tetrazoliumsalz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) in dunkelrotes Formazan umsetzen. Dieses ist wasserlöslich und absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm. Zur Durchführung wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte die zu testenden Zelllinien in 100 µl Medium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 19 h mit den Indolochinolizinen behandelt. Anschließend wurde zu den Zellen WST-1 Reagenz gemäß Herstellerangaben hinzugegeben und die optische Dichte bei 450 nm detektiert. Die gemittelten Werte (n=4) aus den Vertiefungen ohne Zellen wurden von den gemittelten Messwerten (n=4) subtrahiert. Die prozentuale Zellproliferation wurde basierend auf den DMSO behandelten Zellen berechnet. Der Z'-Faktor wurde wie von Zhang et al. (Zhang et al., 1999) beschrieben ermittelt.

3.2.9. Apoptose Test

Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurden die zu untersuchenden Zellen in schwarze 384-Loch Platten mit durchsichtigem Boden ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 42 h mit den zu testenden Indolochinolizinen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gemäß den Herstellerangaben lysiert und bis zur Messung bei Raumtemperatur inkubiert. Die resultierende Fluoreszenz wurde mit dem Infinite® M200 Plattenleser (Tecan) bei folgenden Wellenlängen detektiert: Anregung 485 nm/ Emission 520 nm. Die gemittelten Leerwerte (n=4) wurden von den gemittelten Messwerten (n=4) subtrahiert und die relative Caspase-3/7-Aktivität im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen ermittelt. Der Z'-Faktor wurde wie zuvor beschrieben (Zhang et al., 1999) berechnet.

3.3. *Proteinchemische Methoden*

3.3.1. *Reinigung von Proteinen*

3.3.1.1. **Reinigung von (His)₁₀-markiertem NPM**

Die Zellsedimente (Kap. 3.1.6.1) wurden in 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 0.1% NP40 und 1 mM PMSF (3 ml/ g Sediment) resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (5 x 1 min). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 75000 g für 30 min bei 4 °C abgetrennt und der Überstand auf eine Ni-NTA Säule aufgetragen. Unspezifische Proteine wurden mit 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 60 mM Imidazol von der Säule gewaschen während die Elution von spezifisch gebundenen Proteinen mit 20 mM Tris/HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol erfolgte. Die gesammelten Fraktionen wurden vereint und durch Dialyse in PBS pH 7.9 über Nacht bei 4 °C entsalzt. Das Eluat wurde in Amicon Ultra Centrifugal Filter Units mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Millipore) konzentriert und mittels Gelfiltration mit einer 26/60 G 75 Säule weiter gereinigt. Abschließend erfolgte eine erneute Konzentrierung des Eluats.

3.3.1.2. **Reinigung von CRM1**

Die sedimentierten Zellen (Kap. 3.1.6.2) wurden in 50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 % Glycerol, 2 mM DTE, 1 mM PMSF (3 ml/g Sediment) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte wie unter Kap. 3.3.1.1 beschrieben. Die Zelltrümmer wurden für 30 min bei 75000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde mit 1.5 M Ammoniumsulfat gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden bei 16000 g für 30 min bei 4 °C sedimentiert und anschließend in 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM Kaliumacetat, 5% Glycerol, 2 mM DTE aufgenommen. Die Reinigung erfolgte mittels Gelfiltration auf einer 16/60 G200 Säule. Den erhaltenen Fraktionen wurde je 1 ml 500 mM Saccharose hinzugegeben. Fraktionen welche Crm1 enthielten wurden vereint und durch einen Anionen-Austausch mit einer Q-Sepharose noch weiter gereinigt. Eine graduelle Elution wurde mit 1 M NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1% Glycerol, 2 mM DTE durchgeführt. Abschließend wurden die CRM1 enthaltenden Fraktionen vereint, entsalzt und in Amicon Ultra Centrifugal Filter Units mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Millipore) konzentriert.

3.3.2. Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch unter der Verwendung von Bradford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Der Proteingehalt wurde anhand des linearen Bereichs einer mit BSA erstellten Eichgerade ermittelt (Bradford, 1976).

3.3.3. Konzentrieren von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen erfolgte nach Wessel und Flügge (Wessel & Flugge, 1984). Zur Fällung wurden die Protein-Lösung zunächst in vierfaches Probenvolumen Methanol aufgenommen. Die Proben wurden durchmischt für 10 s bei 9000 g zentrifugiert und anschließend wurde ein Probenvolumen Chloroform hinzugegeben. Vor der Zugabe von drei Volumen H₂O wurden die Proben erneut gemischt und sedimentiert. Anschließend wurde die obere Phase abgenommen und verworfen. Der Protein-Lösung wurden drei Volumen Methanol beigemischt. Danach erfolgte eine abschließende Zentrifugation für 2 min bei 9000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Protein-Sediment an der Luft getrocknet.

3.3.4. Affinitätsreinigung zur Zielprotein-Identifizierung

Um die Affinitätssonde an NHS-aktivierte Sepharose zu kuppeln, wurde diese zunächst 10 x mit kaltem HCl gewaschen. Die Kupplung der Affinitätssonde (200 µM) an die Sepharose (25 µl) erfolgte über Nacht bei 4 °C und 550 rpm in 0.2 M NaHCO₃ und 0.5 M NaCl pH 8.3. Um überschüssiges Molekül zu entfernen wurden die Sepharose 3 x mit 500 µl DMSO gewaschen, bevor die freien Bindestellen für 3 h bei 4 °C und 550 rpm in 0.1 M Tris (pH 8.5) blockiert wurden. Anschließend erfolgten drei Waschzyklen à 3 x 0.1 M Tris (pH 8.5) und 3 x 0.1 M Acetat (pH 4.5). Nach dem Äquilibrieren der Sepharose mit Lysispuffer wurde das HeLa-Zelllysat für 1h bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss an drei Waschschrte mit Lysispuffer mit 75 mM MgCl₂ wurden die gebundenen Proteine durch Inkubation mit fünffachem Überschuss an freiem Molekül für 2 h bei 4 °C eluiert. Die Konzentrierung des Eluats erfolgte wie in Kap. 3.3.3 bzw. durch Zentrifugation in Millipore Centricons mit einer Ausschlussgröße von 3 kDa.

3.3.5. Tryptischer in-Gel Verdau von Proteinen

Als Vorbereitung für die Nano-LC-MS/MS wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (Kap. 3.3.7) aufgetrennt und durch Colloidal-Coomassie (Kap. 3.3.8) oder Zink-Imidazol (Kap. 3.3.9) angefärbt. Anschließend wurden die Gelbanden in 5 gleich große Stücke geschnitten. Jedes Gelstück wurde weiter in 1-2 mm große Stücke zerkleinert. Die Gelstücke wurden für 30 min in 200 µl Waschlösung 1 bei 37 °C geschüttelt. Diese wurde anschließend durch Waschlösung 2 ersetzt, und die Stücke wurden für weitere 15 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Disulfid-Brücken der Proteine mit 100 µl Reduktionslösung bei 37 °C für 45 min reduziert und durch Inkubation mit 100 µl Alkylierungslösung für 1 h im Dunkeln bei RT alkyliert. Nach zweimaligem Waschen für je 15 min mit 200 µl Waschlösung 2 wurden 50 µl Acetonitril zugegeben und die Proben für 10 min dehydriert. Danach wurden die Gelstücke im Abzug für 5–10 min getrocknet und mit 50 µl Verdaulösung für 15 min bei RT rehydriert. Der tryptische Verdau erfolgte über Nacht bei 30 °C unter Schütteln. Anschließend wurden die Gelstücke bei 0 °C in einem Ultraschallbad für 30 min inkubiert und der Überstand in saubere Gefäße überführt. Zum Dehydrieren wurden die Proben für 15 min mit 30 µl Acetonitril inkubiert und der neue Überstand mit dem vorherigen vereinigt.

3.3.6. Protein-Identifikation mittels nano-HPLC/MS/MS

Für die Protein-Identifikation wurden die tryptischen Peptide aufgetrennt und mittels nano-HPLC/MS/MS identifiziert. Die Trennung erfolgte an einer Ultimate 3000 nano-HPLC (Dionex, Idstein) ausgerüstet mit einer analytischen Pumpe, welche mit einem Flussverteiler, einem Fluss-Manager, einem Autosampler und einem variablen zwei-Wellenlängen UV-Detektor verbunden war. Die MS und MS/MS Experimente wurden an einem Orbitrap Massen-Spektrometer durchgeführt, ausgestattet mit einer LTQ XL linearen Ionen-Falle (Thermo Electron Corporation, Dreieich). Alle genutzten Lösungsmittel wiesen eine LC-MS Reinheit auf.

Die gefriergetrockneten tryptischen Peptide wurden in 30 µl TFA (Trifluoressigsäure) gelöst. 10 µl dieser Proben wurden injiziert und auf einer C18 PepMap 100 Säule (3 µm, 100 Å, 300 µm ID * 5 mm, Dionex) unter Nutzung von 0.1% TFA und bei einer Fluss-Rate von 30 µl/min für 5 min angereichert. Die Trennung erfolgte auf einer C18 PepMap 100 Säule (3 µm, 100 Å, 75 µm ID * 15 mm) unter Verwendung eines linearen Gradienten startend mit 96.8% Lösungsmittel A, 3.2% Lösungsmittel B und einer Steigerung bei min 145

auf 62% Lösungsmittel A, 38% Lösungsmittel B mit einer Fluss-Rate von 300 nl/min (Lösungsmittel A: wässrige 0.1% Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure). Die nano-HPLC war mit dem Orbitrap Massen Spektrometer unter Verwendung einer Standard beschichteten Pico Spitze (ID 75 μ m, Tip-ID 30 μ M, New Objective, Woburn, USA) verbunden. Vorläufer Scans wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 60000 durchgeführt. MS/MS Daten der fünf intensivsten Ionen wurden simultan in der linearen Falle aufgenommen. Zur Protein Identifikation wurden die Daten mit der SwissProt Datenbank (Version 56.7) unter Verwendung des MOWSE Algorithmus (Perkins et al., 1999) analysiert. Die MS/MS Ionen-Suche wurde für zwei- bis dreifach geladene Ionen durchgeführt. Die Suchen erfolgten für vollständige enzymatische Trypsin-Spaltungen, wobei eine fehlerhafte Spaltung zugelassen wurde. Die Taxonomie wurde auf Homo sapiens (human) gesetzt. Als Proteinmodifikationen wurde die Carbamidomethylierung als feste Modifikation und die Oxidation von Methionin als variable Modifikation gewählt. Die Massengenauigkeit wurde auf 5 ppm für Peptid-Massen und auf 0.5 Da für MS/MS Daten gesetzt. Als Signifikanz-Grenzwert wurde $p < 0.001$ bestimmt.

3.3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der zu analysierenden Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt, wobei die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert wurden und die eigentliche Trennung, welche vom Molekulargewicht und der Ladung der Proteine abhängt, in einem 10-15%igen Trenngel stattfand. Die Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 30 mA. Das Molekulargewicht der Proteine konnte mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas) ermittelt werden. Die getrennten Proteine wurden dann in Coomassie-Lösung (Kap. 3.3.8) oder Zink-Imidazol-Lösung (Kap. 3.3.9) gefärbt oder auf PVDF-Membran immobilisiert (Kap. 3.3.11).

3.3.8. Coomassie-Färbung von Proteinen

Zur Färbung der Proteine im Gel wurden diese in Coomassie-Lösung inkubiert. Zur Entfernung von nicht an Proteine gebundenem Farbstoff, wurden die Gele in Entfärber-Lösung inkubiert. Zur Detektion von geringen Proteinmengen (ca. 30 ng pro Bande) erfolgte alternativ eine Färbung mit Colloidal-Coomassie (Neuhoff et al., 1988). Hierzu wurden 400 ml

Lösung A mit 10 ml Lösung B gemischt und 100 ml Methanol hinzugegeben. Das Gel wurde bis zur Färbung der Proteinbanden in der Lösung belassen. Eine Entfärbung war nicht nötig.

3.3.9. Zink-Imidazol Färbung von Proteinen

Für diese inverse Färbemethode wurde das Polyacrylamidgel zunächst unter ständigem Schütteln für 20 min in Fixierlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in destilliertem Wasser für jeweils 15 min, wurde das Gel für weitere 20 min in Imidazol-SDS Lösung geschüttelt. Um die Färbung sichtbar zu machen, wurde das Gel 60-90 s in Zinksulfat Lösung inkubiert, abschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zur weiteren Analyse darin gelagert (Carlos et al., 1998).

3.3.10. Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Das „Western Blotting“ bezeichnet ein Verfahren mit dem elektrophoretisch getrennte Proteine (Kap. 3.3.7) aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes transferiert und immobilisiert werden können (Towbin et al., 1979). Für den Elektrotransfer wurde eine Halbtrockenzelle genutzt, bei der das Blot-Sandwich aus in Transferpuffer getränkten Filterpapieren, Gel und Membran horizontal zwischen zwei Plattenelektroden eingebaut wird. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 5.5 mA pro cm² Membran unter Verwendung einer konstanten Spannung von 25 V für eine halbe Stunde.

3.3.11. Immundetektion von auf Membranen immobilisierten Proteinen

3.3.12. Detektion mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper

Zur Immundetektion wurden freie Bindungsstellen auf der Membran (Kap. 3.3.10) durch Inkubation in Blockierpuffer (LI-COR® Biosciences, Deutschland) abgesättigt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Der spezifisch bindende primäre Antikörper wurde in Blockierpuffer mit 0.1% Tween-20 verdünnt und die Membran für 1 Stunde oder über Nacht darin inkubiert. Nach gründlichem Waschen, 3 x 10 min mit PBST, wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, welcher ebenfalls in Blockierpuffer mit 0.1% Tween-20 verdünnt wurde, für eine Stunde inkubiert. Vor dem Scannen der Membran mit Hilfe eines Odyssey®

Fc Imagers (LI-COR® Biosciences, Deutschland) war erneutes Waschen mit PBST (2 x 10 min) und PBS (10 min) notwendig.

3.3.13. Detektion mittels HRP-gekoppelten Antikörpern

Zur Immundetektion wurden freie Bindungsstellen auf der Membran (Kap. 3.3.10) durch Inkubation in TBST/2% Slimfast Schoko abgesättigt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Der spezifisch bindende primäre Antikörper wurde in TBST/1% BSA verdünnt und die Membran für 1 Stunde oder über Nacht bei 4 °C darin inkubiert. Nach gründlichem Waschen, 3 x 10 min mit TBST, wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, welcher ebenfalls in TBS-T/1% BSA verdünnt wurde, für eine Stunde inkubiert. Vor dem Entwickeln der Membran war erneutes Waschen mit TBST (2 x 10 min) und TBS (10 min) notwendig. Die Entwicklung erfolgte mit der Entwicklungslösung SuperSignal® West Pico oder SuperSignal® West Femto (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) nach Herstellerangaben.

3.3.14. Aktivitätsanalyse der Phosphatase CDC25a

Für die Überprüfung der Phosphatase CDC25a Aktivität wurde ein fluoreszenzbasiertes Testsystem genutzt. Die Analyse wurde in schwarzen 96-Loch Platten in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Die zu testenden Substanzen wurden in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 100 mM EDTA, 100 mM DTE, 1% NP40, pH 8.0 verdünnt und die Reaktion durch Zugabe von 1 µM Enzym und 100 µM Substrat gestartet. Als Substrat diente 6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat (DiFUMP) (Gee et al., 1999; Walther, 2009). Die Messung erfolgte in einem Infinite® M200 Plattenleser (Tecan, Crailsheim) bei 37 °C. Die Phosphataseaktivität wurde bei einer Anregung von 358 nm und einer Emission von 455 nm über 50 min in Intervallen von 2 min aufgezeichnet.

3.3.15. Aktivitätsanalyse verschiedener Kinasen

Das Kinase Profiling wurde von der ProKinase GmbH (Freiburg) durchgeführt. Die Aktivität der 24 Protein-Kinasen wurde mittels eines radiometrischen Protein-Kinase-Testsystems (³³PanKinase® Activity Assay) ermittelt. Alle Analysen wurden in 96-Loch Flash Plates™ (Perkin Elmer, Boston, USA) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde in vier Schritten in folgender Reihenfolge pipettiert: 15 µl ATP Lösung

(in H₂O), 20 µl Puffer (60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 µM Na-orthovanadat, 1.2 mM DTT, 50 µg/ml PEG20000, 1 µM [γ-³³P]-ATP (ca. 6 x 10⁵ cpm pro Vertiefung)), 5 µl der zu testenden Substanz in 10% DMSO und abschließend 10 µl von einer Enzym/Substrat Mischung (in H₂O). Für die Analyse von CAMK2A wurden außerdem 50 ng/Vertiefung Calmodulin und 0.5 mM CaCl₂ verwendet.

Die Reaktionsansätze wurden für 80 min bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 2% (v/v) H₃PO₄ wurde die Reaktion gestoppt. Die Lösung wurde abgenommen und die Ansätze zweimal mit 200 µl 0.9% (w/v) NaCl gewaschen. Alle Analysen wurden mit einem BeckmanCoulter Biomek 2000/SL Roboter System durchgeführt. Der Einbau von ³³P_i (in cpm) wurde mit einem Mikroplatten Szintillationszähler (Microbeta, Wallac) bestimmt.

Alle verwendeten Protein-Kinasen wurden in Sf9 Insektenzellen als rekombinante GST-Fusionsproteine oder His-markierte Proteine mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems exprimiert. Alle Kinasen wurden von humanen cDNAs hergestellt. Die Reinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie mit GSH-Agarose (Sigma-Aldrich®, Steinheim) oder Ni-NTH-Agarose (Qiagen, Hilden). Die Reinheit wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert und die Identität der Protein Kinasen durch Immundetektion mit spezifischen Antikörpern oder durch Massenspektroskopie verifiziert.

3.3.16. Fluoreszenz-Polarisation

Fluoreszenz-Polarisations-Messungen wurden mit einem FluoroMax4 Spectrofluorometer (Horiba Scientific, USA) bei 20 °C durchgeführt. Die Messungen erfolgten in PBS pH 7.9 für NPM und 50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 1% Glycerol, 2 mM DTE für CRM1. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregung von 553 nm und einer Emission von 565 nm gemessen. Die Dissoziationskonstanten (K_D-Werte) wurden entsprechend Gleichung 12.14 (Kenakin, 1993) mit Hilfe der GraFit 5 Software berechnet.

3.3.17. Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Für die Messungen im Spektropolarimeter J-815 der Firma Jasco wurden die Proteine in 10 mM Natrium-Phosphat (NaP_i)-Puffer pH 7.0 verdünnt. Die Spektren wurden bei RT, mit einer spektralen Bandbreite von 1 nm über einen Wellenlängenbereich von 260-175 nm aufgenommen. Die Anzahl der Akkumulationen betrug 10. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit DichroWeb (Whitmore & Wallace, 2008).

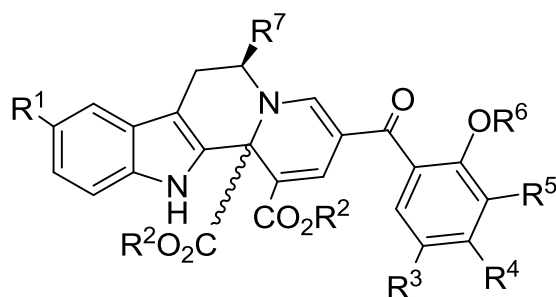
4. Ergebnisse

Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse veranschaulichen die typische Vorgehensweise im Rahmen einer Zielprotein-Identifizierung. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurden durch einen vorwärts-gerichteten chemisch-genetischen Ansatz aktive Substanzen in einer Indolochinolizin-Substanzbibliothek identifiziert. Diese führten zu einer veränderten Tubulin-Struktur und einem Zellzyklus-Arrest. Zunächst werden gewonnene Erkenntnisse aus der Lebendzell-Mikroskopie sowie aus Immunfluoreszenz-Aufnahmen, welche zur Erstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung genutzt werden konnten, beschrieben. Die anfänglichen Lebendzell-Experimente konnten außerdem Ansatzpunkte für weitergehende phänotypische Analysen, wie die Untersuchung einer möglichen Konzentrationsabhängigkeit des Phänotyps, Analysen zur Zusammensetzung der Spindelpole und Zellzyklus-Untersuchungen liefern. Anschließend an die Darstellung der Ergebnisse zur phänotypischen Charakterisierung der Substanzen in HeLa-Zellen sowie in weiteren Zelllinien werden erzielte Resultate im Rahmen der Zielprotein-Identifizierung präsentiert. Schließlich erfolgt die Beschreibung der im Validierungsprozess gewonnenen Erkenntnisse.

4.1. Phänotypische Analysen

4.1.1. Erstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung

Basierend auf den Ergebnissen vorhergegangener Lebendzell-Mikroskopie Analysen, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Anthony Hyman am MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden weitere Studien durchgeführt (Menninger, 2009). Diese sollten zunächst zur Erstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung beitragen. Im Rahmen der im Hochdurchsatz durchgeführten Lebendzell-Mikroskopie wurden zehn von Dr. Vivek Khedkar synthetisierte Indolochinolizine getestet (Tabelle 2). Außerdem wurden die reinen Enantiomere von Substanz **2**, welche von Dr. Heiko Dückert zur Verfügung gestellt wurden (Dücker, 2011), untersucht. Alle Verbindungen wurden in verschiedenen Konzentrationen für 24 h mit HeLa-Zellen, welche mit GFP markiertes Histon H2B exprimierten (Neumann et al., 2010), inkubiert. Dementsprechend konnte mit Hilfe dieser Zelllinie das Verhalten der DNA im Verlauf des Zellzyklus beobachtet werden. Dies ermöglichte den Anteil von atypischen Mitosen die von den verschiedenen Substanzen verursacht wurden, zu bestimmen. Unter dem Begriff „atypische Mitosen“ wurden Zellen mit



Substanz	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	Aktivität
1	H	Me	H	H	H	H	H	+++
2	OMe	Me	H	H	H	H	H	+++
3	H	Me	Me	H	H	H	H	-
4	H	Et	Me	H	H	H	H	-
5	H	Me	iPr	H	H	H	H	-
6	H	Et	H	H	H	H	H	-
7	H	Et	iPr	H	H	H	H	-
8	Br	Me	H	H	H	H	H	++
9	Cl	Me	H	H	H	H	H	++
10	Me	Me	H	H	H	H	H	++
11	H	Me	H	OBn	Me	H	H	-
12	OMe	Et	H	H	H	H	H	-
13	OH	Me	H	H	H	H	H	++
14	H	Me	H	H	H	H	CO ₂ Me	+
15	H	Me	Cl	H	H	H	H	-
16	H	Et	Br	H	H	H	H	-
17	H	Et	Cl	H	Cl	H	H	-
18	OMe	Et	Me	H	H	H	H	-
19	OMe	Et	iPr	H	H	H	H	-
20	H	Et	Cl	Me	H	H	H	-
21	H	Et	Cl	H	H	H	H	-
22	OMe	Et	Cl	H	H	H	H	-
23	OMe	Et	Br	H	H	H	H	-
24	H	Me	H	Phenyl		H	H	-
25	H	Me	H	H	H	Me	H	+
26	OMe	Me	Br	H	H	H	H	-
27	H	Me	Br	H	H	H	H	-
28	H	Me	Cl	H	Cl	H	H	-
29	H	Me	Br	H	Br	H	H	-
30	H	Me	Cl	Me	H	H	H	-
31	H	Me	Phenyl	H	H	H	H	-

Tabelle 2: Verwendete Indolochinolin-Bibliothek und SAR

Die Struktur zeigt das Grundgerüst der verwendeten Indolochinoline mit den entsprechenden Substituenten R¹-R⁷. Die Tabelle listet die einzelnen Substituenten der 31 Substanzen auf. In der letzten Spalte ist die Aktivität vermerkt, so wie sie mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie (Lila hinterlegte Substanzen) und Immunfluoreszenz-Aufnahmen (alle Substanzen) in HeLa-Zellen ermittelt werden konnte. Die Lebendzell-Mikroskopie wurde für Substanzkonzentrationen von 12 µM bis 100 µM durchgeführt, während die Immunfluoreszenz-Aufnahmen bei einer Konzentration von 25 µM durchgeführt wurden.

fehlorientierten bzw. falsch angeordneten Chromosomen während der Metaphase, Zellen mit einer deutlich verlängerten Mitose und Zellen welche eine multipolare Spindel aufwie-

sen, zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13a dargestellt. Im weiteren Verlauf des Projektes wurde die anfängliche Substanzbibliothek durch Dr. Heiko Dücker und Dipl.-Chem. Hanna Bruss auf 31 Substanzen (Tabelle 2) erweitert.

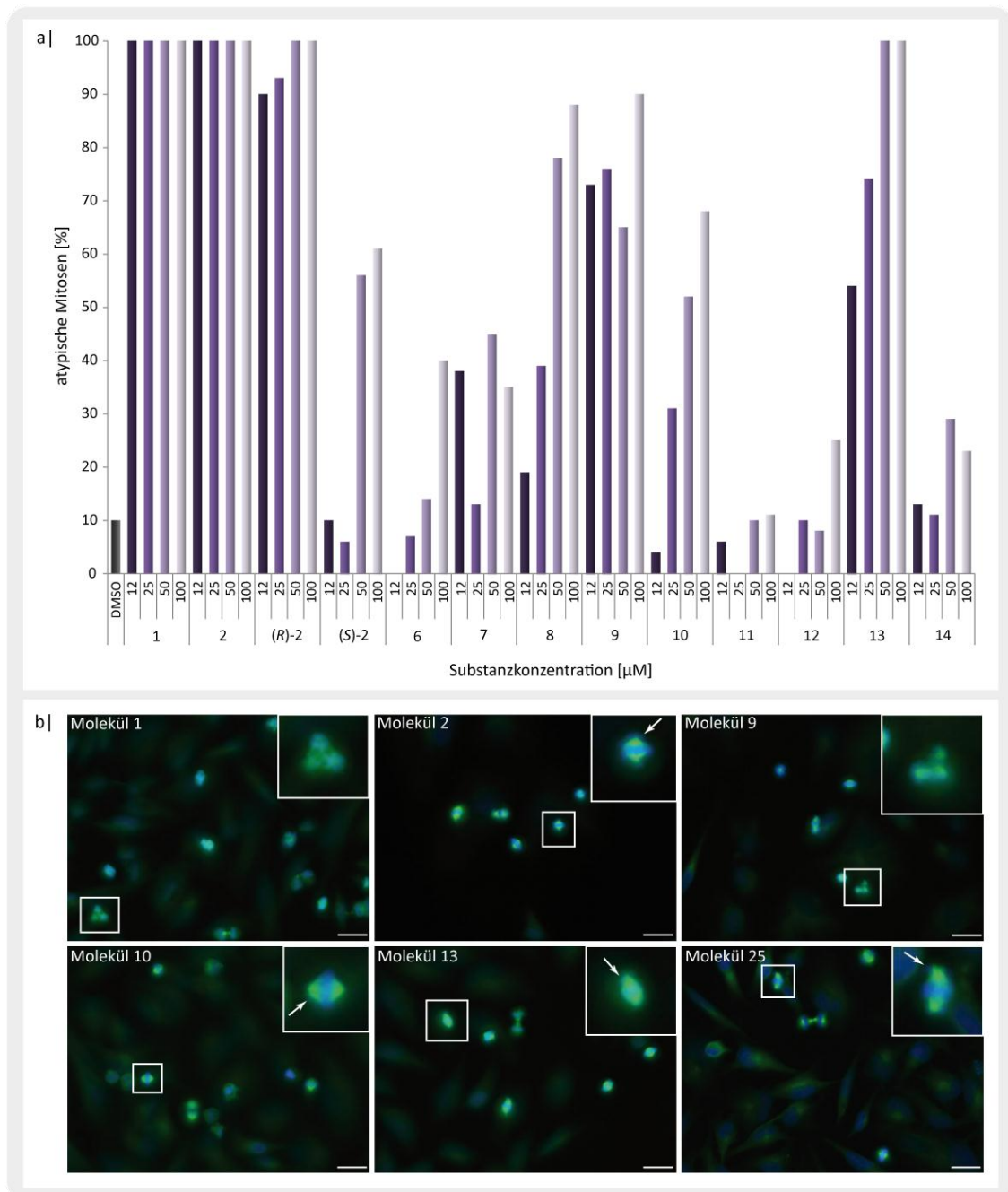


Abbildung 13: Struktur-Wirkungs-Beziehung

a) HeLa-Zellen, die stabil Histon H2B-GFP exprimieren, wurden mit elf verschiedenen Substanzen der Indolochinolin-Bibliothek bei einer Konzentration von 12, 25, 50 und 100 µM inkubiert. Über 24 h wurden in regelmäßigen Abständen von 5 min Bilder aufgenommen und diese zu einem Film zusammengefügt. Alle atypischen Mitosen (Fehlausrichtung der Chromosomen, Multipolarität, verlängerte Mitose) wurden ausgezählt und ihr prozentualer Anteil von allen mitotischen Zellen berechnet. **b)** HeLa-Zellen wurden für 19 h mit allen 31 Substanzen der Bibliothek bei einer Konzentration von 25 µM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Permfix fixiert und die DNA (blau) mit Hoechst 33342 sowie α-Tubulin (grün) mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Gezeigt sind Aufnahmen für die aktiven Moleküle **1, 2, 9, 10, 13** und **25**. Die Pfeile in den Vergrößerungen zeigen fehlorientierte Chromosomen an den Spindelpolen. Maßstabsbalken: 20 µm.

Dementsprechend wurden für die neu synthetisierten Substanzen die benötigten Informationen für die Struktur-Wirkungs-Beziehung mittels Immunfluoreszenz-Aufnahmen gesammelt (Abbildung 13b). Hierzu wurden HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät, für 19 h mit 25 μM der Substanzen behandelt und anschließend mit Perifix fixiert. Die DNA sowie das Mikrotubuli-Zytoskelett wurden angefärbt und analysiert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Modifikationen an Position R^1 möglich sind, während der Tausch einer Methyl- zu einer Ethylgruppe an R^2 zu einem Aktivitätsverlust führt. Zwar konnte in den anfänglichen Lebendzell-Mikroskopie-Experimenten (Abbildung 13a) eine Aktivität bei hohen Konzentrationen für die Substanzen **6**, **7** und **12** beobachtet werden, dieses Ergebnis ließ sich in weiteren Experimenten jedoch nicht bestätigen. Auch Substituenten an den Positionen R^{3-5} bewirkten einen Aktivitätsverlust des Moleküls. Das Einbringen einer Methylgruppe an R^6 sowie eines Methylesters an R^7 hatten eine verminderte Aktivität zur Folge. Ferner wurde deutlich, dass die Substanzen **1** und **2** die höchste Aktivität aufwiesen, da im Rahmen der Lebendzell-Mikroskopie für diese Substanzen auch bei Konzentrationen von 12 μM keine typische Zellteilung zu beobachten war. Eine weitere interessante Entdeckung war, dass die Aktivität der Verbindungen für die möglichen Enantiomere unterschiedlich war. Dementsprechend zeigte das (*R*)-Enantiomer der Substanzen **1** und **2** eine höhere Aktivität, als das (*S*)-Enantiomer. Bei Substanzkonzentrationen des (*R*)-Enantiomers von 12 und 25 μM war die Anzahl der atypischen Mitosen neunmal so hoch, wie bei der Inkubation mit dem (*S*)-Enantiomer. Lediglich bei höheren Konzentrationen (50 und 100 μM) war auch für das (*S*)-Enantiomer eine fünf- bis sechsfache Erhöhung der fehlerhaften Zellteilungen zu verzeichnen. Basierend auf diesen Beobachtungen konnte zum einen von Dr. Heiko Dückert eine Affinitätssonde synthetisiert werden, welche zur Zielprotein-Identifizierung eingesetzt werden sollte. Zum anderen wurden die folgenden Analysen ausschließlich mit einer der beiden aktivsten Substanzen durchgeführt. Aufgrund des beobachteten Phänotyps wurde davon ausgegangen, dass die Zellen nicht mehr in der Lage sind ihre Centrosomen zu „zählen“, so dass den aktiven Substanzen der Name Centrocountin gegeben wurde. Daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit (*R*)-**1** als Centrocountin 1 und (*R*)-**2** als Centrocountin 2 bezeichnet. Ergebnisse, welche mit dem (*S*)-Enantiomer gewonnen wurden, werden aufgrund der durchgehend niedrigeren Aktivität nicht dargestellt.

4.1.2. Primäre Analysen mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie

Mit Hilfe von hochaufgelösten Lebendzell-Aufnahmen, ebenfalls in Kooperation mit Dr. Alexander W. Bird und Prof. Anthony Hyman vom MPI für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden, war es möglich die Geschehnisse während der Mitose genauer zu bewerten. Zunächst wurden HeLa H2B-GFP Zellen (Neumann et al., 2010) mit 30 μ M Centrocountin 1 inkubiert und in Abständen von 5 min Aufnahmen der Zellen gemacht. Der Vergleich mit Zellen, welche mit DMSO behandelt wurden, konnte deutlich zeigen, wie einzelne fehlorientierte Chromosomen zu einer verzögerten Mitose führten (Abbildung 14a und e).

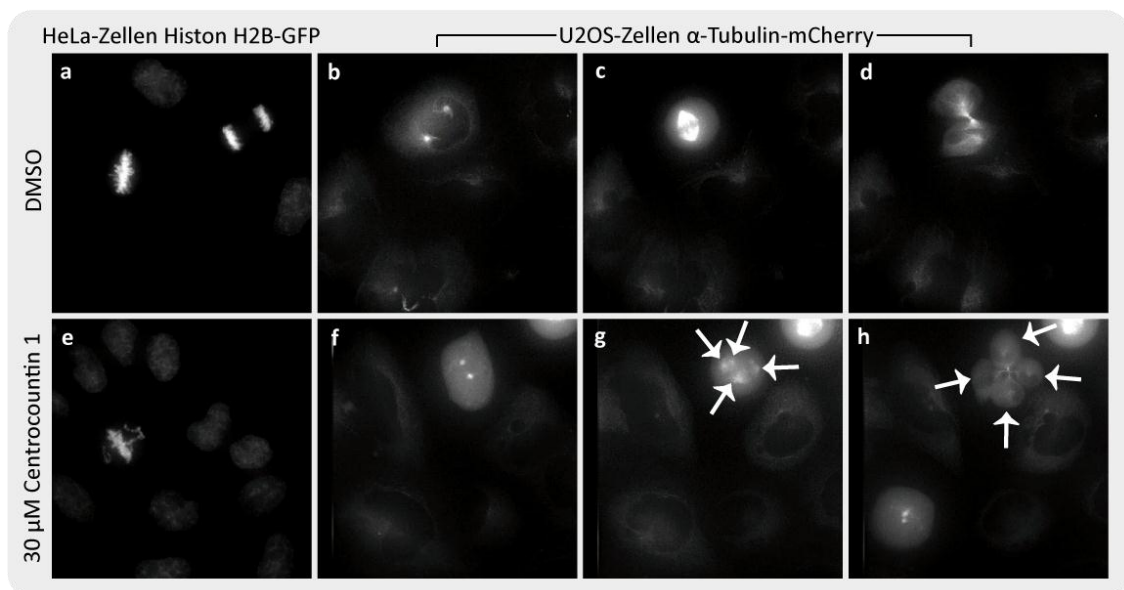


Abbildung 14: Hochaufgelöste Aufnahmen der DNA und des Mikrotubuli-Zytoskellerts

a) Gezeigt ist eine mitotische Zelle in der Metaphase nach der Behandlung mit DMSO. b-d) Die Filmausschnitte zeigen eine typische Zellteilung, angefangen von der Entstehung der Centrosomen, über den Aufbau einer bipolaren Spindel bis zur abschließenden Abschnürung der beiden Zellen. e) Eine HeLa H2B-GFP Zelle, welche mit 30 μ M Centrocountin 1 behandelt wurde, in der Metaphase. f-h) Filmausschnitte welche den Ablauf einer durch Centrocountin 1 ausgelösten multipolaren Teilung in U2OS α -Tubulin-mCherry Zellen veranschaulichen. Zunächst bilden sich zwei Spindelpole. Im Laufe der Mitose entstehen weitere Pole, die im Folgenden zu einer Mehrfachteilung der Zelle führen.

Auf diese Weise sollte auch der Einfluss der Centrocountine auf den Aufbau der Mitose-Spindel detailliert untersucht werden. So zeigten Aufnahmen der Osteosarkom-Zellen U2OS, die stabil α -Tubulin-mCherry (Bird & Hyman, 2008) exprimierten, nach der Behandlung mit DMSO das Auftreten von zwei Spindelpolen (Abbildung 14b), den Aufbau einer bipolaren Spindel (Abbildung 14c) und die Abschnürung der beiden Tochterzellen (Abbildung 14d). Nach der Inkubation mit 30 μ M Centrocountin 1 konnte zunächst auch die Ausbildung von zwei Spindelpolen/Centrosomen beobachtet werden (Abbildung 14f). Jedoch tauchten im Laufe der Zellteilung zusätzliche Spindelpole auf (Abbildung 14g), welche abschließend zu einer Mehrfachteilung der Zelle führten (Abbildung 14h). Die in den

vorangegangenen Analysen beobachtete verzögerte Mitose, sollte durch weitere Lebendzell-Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Prof. Thomas U. Mayer (Universität Konstanz) genau quantifiziert werden (Abbildung 15).

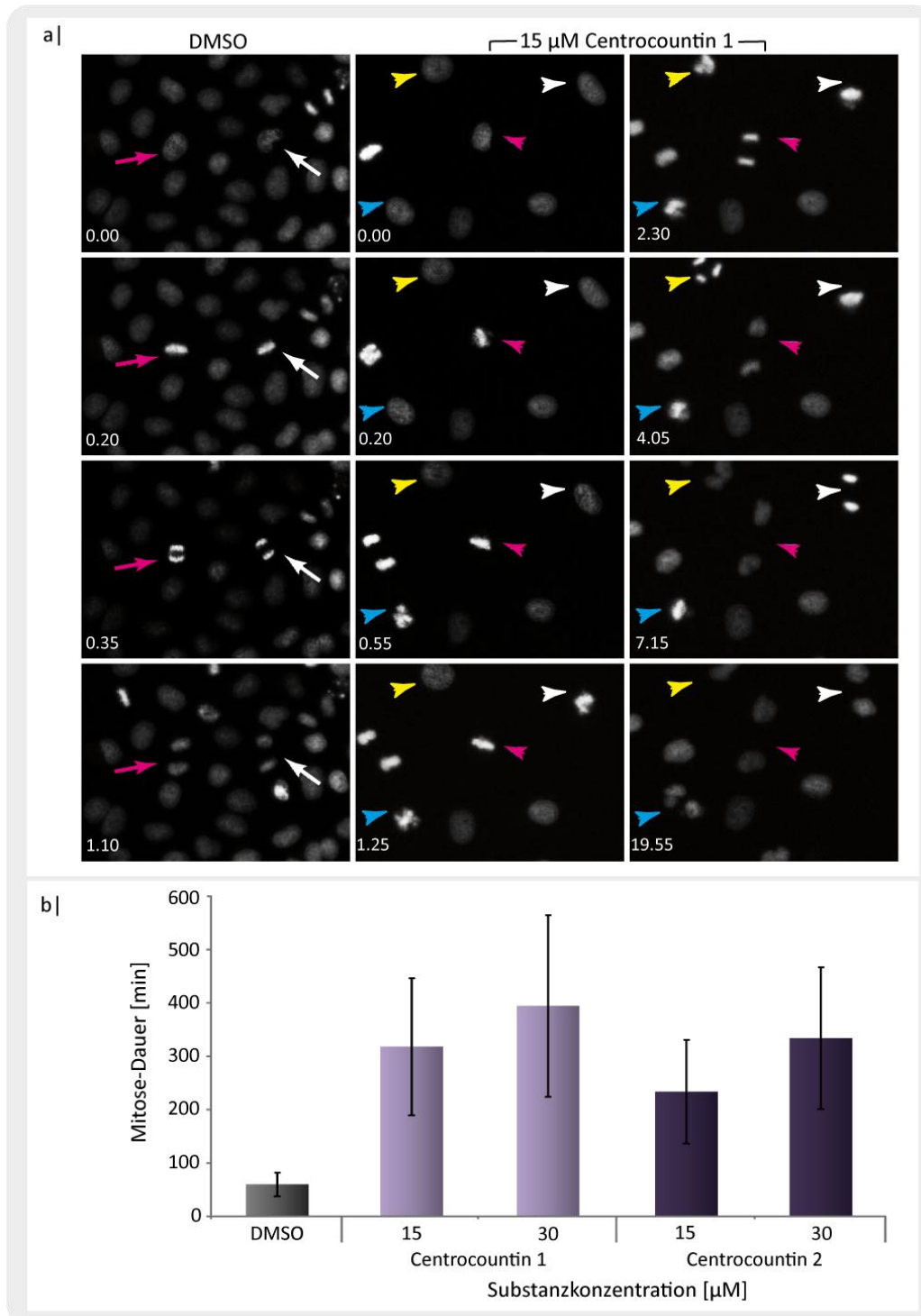


Abbildung 15: Analyse der Mitose-Dauer in HeLa H2B-GFP Zellen

a) Ausschnitte aus der Lebendzell-Mikroskopie mit HeLa H2B-GFP Zellen nach der Behandlung mit DMSO (links) oder 15 μM Centrocountin 1 (rechts). Die farbigen Pfeile (DMSO) bzw. Pfeilspitzen (15 μM Centrocountin 1) erleichtern die Identifizierung einzelner Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die bereits vergangene Zeit ist in h.min angegeben. b) Auswertung der Lebendzell-Aufnahmen. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Mitose-Dauer von 109 Zellen, behandelt mit DMSO, Centrocountin 1 oder Centrocountin 2 wurde bestimmt und gegen die Substanzkonzentration aufgetragen.

Hierzu wurden erneut HeLa H2B-GFP Zellen genutzt. Die Zellen wurden mit Centrocountin 1 behandelt und Bilder für einen Zeitraum von 20 h in Intervallen von 5 min aufgenommen. Die Dauer der Mitose wurde vom Beginn der Kondensation der Chromosomen bis zur vollendeten Abschnürung der Zellen bestimmt. Sowohl für die Kontrolle, als auch für Centrocountin 1 und 2 wurden 109 Zellen analysiert (Abbildung 15b). Mit DMSO behandelte Zellen benötigten etwa 60 min zum Durchlaufen einer Zellteilung. Durch die Zugabe von Centrocountin 1 war die Mitose durchschnittlich fünfmal länger. Die Erhöhung der Substanzkonzentration von 15 auf 30 μM , hatte einen weiteren Anstieg der Mitose-Dauer auf etwa 400 min zur Folge. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist dieser Unterschied jedoch eher als gering zu betrachten. Auch Zellen, welche mit Centrocountin 2 behandelt wurden, zeigten eine deutlich verlängerte Zellteilung. Jedoch war die gemessene Dauer, mit Werten von 250 min bei 15 μM und 350 min bei 30 μM , hier etwas geringer als bei einer Behandlung mit Centrocountin 1.

4.1.3. Analyse der Konzentrationsabhängigkeit des Phänotyps

Aufgrund der unterschiedlichen Phänotypen, Fehlausrichtung der Chromosomen sowie multipolare Spindeln bzw. Mehrfachteilungen, welche in den anfänglichen Untersuchungen beobachtet wurden, stellte sich die Frage, ob diese einer Konzentrationsabhängigkeit unterliegen. Um dies herauszufinden, wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, welche eine Fehlorientierung ihrer Chromosomen, multipolare Spindeln oder keinen auffälligen Phänotyp bei verschiedenen Centrocountin-Konzentrationen zeigten. Hierzu wurden HeLa-Zellen genutzt, welche sowohl H2B-mCherry, als auch β -Tubulin-GFP exprimierten, so dass keine indirekte Färbung nötig war. Die Zellen wurden für 19 h mit Centrocountin 2 behandelt und mit Permfix fixiert. Anschließend erfolgte die Analyse aller auf einem Deckglas befindlichen mitotischen Zellen, was bei jeder Konzentration mehr als 150 Zellen entsprach. Die ermittelten Werte sind in Abbildung 16 zusammengefasst. Wie erwartet sank der Anteil der typischen Mitosen bei steigender Konzentration von Centrocountin 2. Bei einer Konzentration von 1.5 μM wiesen nur noch 47% der analysierten Zellen eine typische Mitose auf und bei 25 μM waren keine fehlerfreien Teilungen mehr zu beobachten. Analog hierzu stieg der Anteil der Zellen mit fehlorientierten Chromosomen bis zu einer Konzentration von 25 μM stetig bis auf 83% an. Wurden die Zellen mit 50 μM Centrocountin 2 behandelt, sank die Zahl der Mitosen mit fehlorientierten Chromosomen auf 50% ab, was in direktem

Zusammenhang mit dem Anstieg der multipolaren Zellen auf 50% stand. Im Gegensatz zu den Zellen mit einer fehlerhaften Bildung der Metaphaseplatte zeigten die Zellen mit der Ausbildung einer multipolaren Spindel keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit. Für diesen Phänotyp schwankte der prozentuale Anteil der mitotischen Zellen bei Substanzkonzentrationen von 1.5 bis 25 μM zwischen 15 und 20%. Diese Werte waren nur etwa doppelt so hoch wie der für die DMSO-Kontrolle ermittelte Anteil der multipolaren Zellen von 9%.

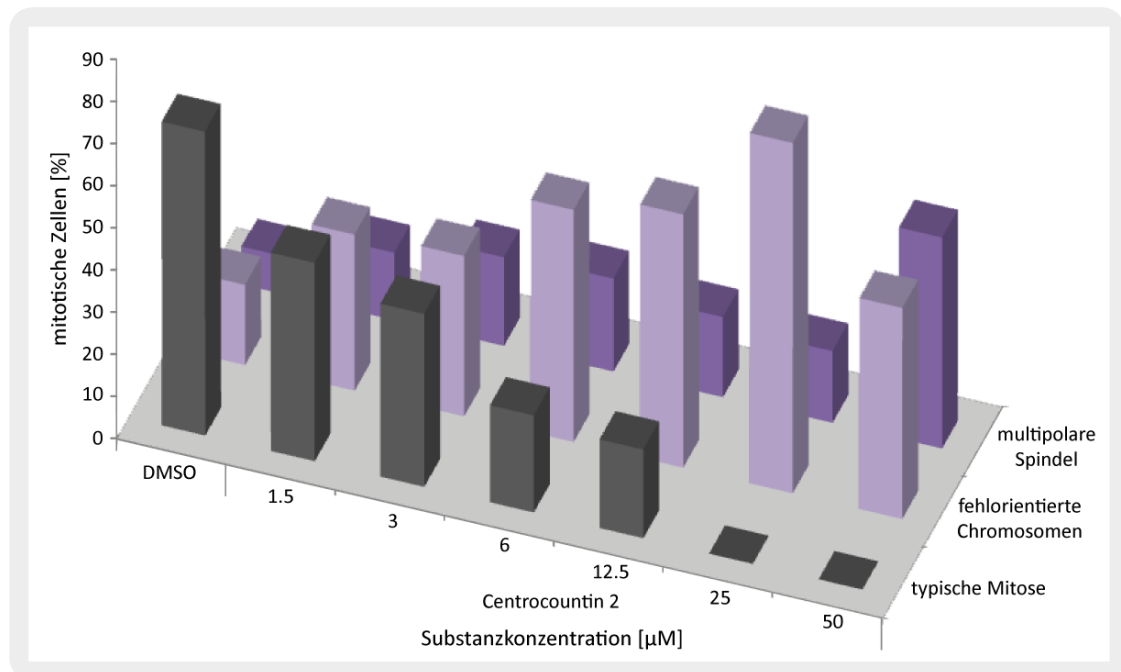


Abbildung 16: Untersuchung des Phänotyps bei unterschiedlichen Substanzkonzentrationen in HeLa-Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen Konzentrationsabhängigkeit der Phänotypen wurden HeLa-Zellen mit einem Histon2B-mCherry-Konstrukt und einem β -Tubulin-GFP-Konstrukt für 19 h mit steigenden Konzentrationen Centrocourtin 2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Permfix fixiert und die Anzahl der Zellen mit typischen Mitosen, die Anzahl der Zellen mit fehlorientierten Chromosomen in der Metaphase und die Anzahl der Zellen mit einer multipolaren Spindel bestimmt. Ausgezählt wurden jeweils alle mitotischen Zellen auf einem Deckglas, was bei jeder Konzentration mehr als 150 Zellen entsprach.

4.1.4. Analyse der Spindelpol-Zusammensetzung in multipolaren Zellen

Wie unter Kap. 4.1.2 beschrieben, konnte in den hochaufgelösten Lebendzell-Aufnahmen der U2OS α -Tubulin-mCherry Zellen das Entstehen von zusätzlichen Spindelpolen beobachtet werden. Der Ursprung dieser Pole konnte im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch nicht geklärt werden. So war es möglich, dass es entweder zu einer Centrosomen-Überduplikation kam oder dass sich pericentriolares Material (PCM) von den bereits bestehenden Polen ablöste, was zu einer Centrosomen-Fragmentierung führte. Um die Herkunft dieser Spindelpole zu klären, sollte die Centrosomen-Zusammensetzung von multi-

polaren Spindeln näher analysiert werden. Um möglichst viele mitotische Zellen untersuchen zu können, wurden HeLa-Zellen zunächst für 19 h mit Thymidin behandelt und so in der S-Phase arretiert. Anschließend wurde das Thymidin aus den Zellen herausgewaschen und Centrocountin 1 hinzugegeben. Die Zellen konnten so synchron die G2-Phase durchlaufen und in die M-Phase eintreten. Das Erreichen der Mitose nach etwa 9 h wurde durch das Auftreten vermehrter abgerundeter Zellen festgestellt. In diesem Stadium erfolgte auch die abschließende Fixierung in eiskaltem Methanol. Um die Komponenten der Spindelpole zu analysieren, wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern für β -Tubulin, γ -Tubulin, als spezifischer Marker für Centrosomen, und CEP135 als Marker für Centriolen, angefärbt. Parallel erfolgte außerdem die Markierung der DNA mit Hoechst 33342. Da die Spindelpole in unterschiedlichen Ebenen der Zelle liegen können, wurden mit einem konfokalen Mikroskop Z-Projektionen in einem Abstand von etwa 0.8 μm aufgenommen. Mit Hilfe der ImageJ Software und dem Einsatz zusätzlicher Programme der Biomedical Imaging Group – EPFL wurden die einzelnen Aufnahmen zusammengefügt (Forster et al., 2004) und die Unschärfe in dem rekonstruierten Bild reduziert (Vonesch & Unser, 2008). In Abbildung 17a sind Aufnahmen für die bipolare Spindel einer mit DMSO behandelten Zelle sowie für multipolare Spindeln der mit Centrocountin 1 behandelten Zellen gezeigt. Bei der Analyse wurde deutlich, dass bei Auftauchen von mehreren Polen auch unterschiedliche Spindelpol-Zusammensetzungen möglich waren. So konnten zum einen multipolare Zellen beobachtet werden, bei denen alle Pole eine Färbung für β -Tubulin, γ -Tubulin und CEP135 aufwiesen. Dies könnte auf eine Centrosomen-Überduplikation hinweisen. Des Weiteren zeigten einige Zellen eine fehlende CEP135-Färbung in einem oder mehreren Polen, was eine Centrosomen-Fragmentierung implizieren könnte, oder das Auftreten von acentriolaren Polen, welche weder positiv für γ -Tubulin noch für CEP135 waren. Eine Quantifizierung der Beobachtungen deutete außerdem darauf hin, dass sich die Zusammensetzung der Spindelpole bei steigender Centrocountin 1-Konzentration verändert (Abbildung 17b). Dementsprechend wiesen circa drei Viertel der mit 25 μM Centrocountin 1 behandelten Zellen mindestens einen Pol ohne CEP135 auf und 23% besaßen ausschließlich Pole mit γ -Tubulin und CEP135 Färbung. Für 6% der multipolaren Zellen konnten acentrosomale Pole nachgewiesen werden. Erhöhte man die Substanzkonzentration auf 50 μM verringerte sich die Anzahl der Zellen, welche in allen Polen eine β -Tubulin, γ -Tubulin und CEP135 Färbung aufwiesen auf 6%. Dafür war der Anteil der Zellen mit mindestens einem acentrosomalen Pol mit 44% etwa siebenmal so hoch wie bei einer Substanzkonzentration von 25 μM . Bei der Hälfte der analysierten Zellen konnte nach der Behandlung

mit 50 μM Centrocountin 1 zumindest ein Pol beobachtet werden, welcher keine CEP135-Färbung besaß.

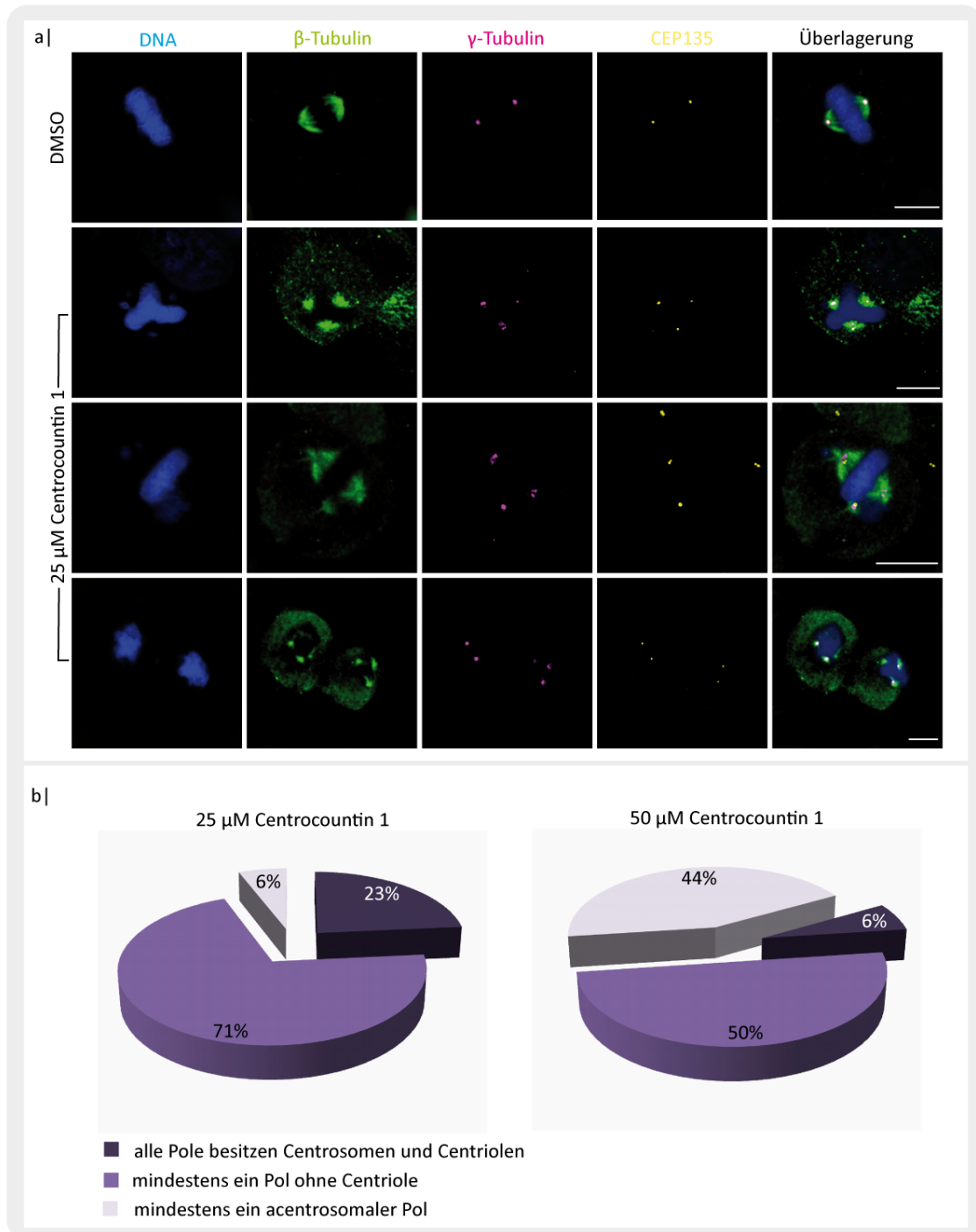


Abbildung 17: Spindelpol-Zusammensetzung der multipolaren Spindeln in HeLa-Zellen nach Centrocountin 1 Behandlung

a) HeLa-Zellen wurden durch Zugabe von Thymidin in der S-Phase blockiert, für weitere 9 h bis zum Beginn der Mitose, mit 25 μM bzw. 50 μM Centrocountin 1 behandelt und mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung von β -Tubulin, γ -Tubulin und CEP135 mit spezifischen Antikörpern sowie der DNA mit Hoechst 33342. Maßstabsbalken: 10 μm . b) Zusammensetzung der multipolaren Spindeln dargestellt in zwei Kreisdiagrammen für 25 μM Centrocountin 1 bzw. 50 μM Centrocountin 1.

4.1.5. Zellzyklus-Analysen

Bereits mit Hilfe der Lebendzell-Analysen konnte eine verlängerte Mitose der mit Centrocountin 1 und 2 behandelten Zellen nachgewiesen werden. Anhand der Aufnahmen konnte ein mitotischer Arrest als Ursache für die wesentlich höhere Mitose-Dauer festgestellt werden. Dieser Arrest sollte mittels Durchflusszytometrie-Untersuchungen zum einen bestätigt und zum anderen quantifiziert werden. Für diese Analysen wurden HeLa-Zellen ausgesät und für 19 h mit 25 bzw. 50 μM Centrocountin 1 behandelt. Nach der Fixierung der Zellen wurde ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Die Analyse des DNA-Gehaltes der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Repräsentative Histogramme für die Resultate der Behandlung mit DMSO und 25 μM Centrocountin 1 sowie die quantitative Analyse finden sich in Abbildung 18a und b.

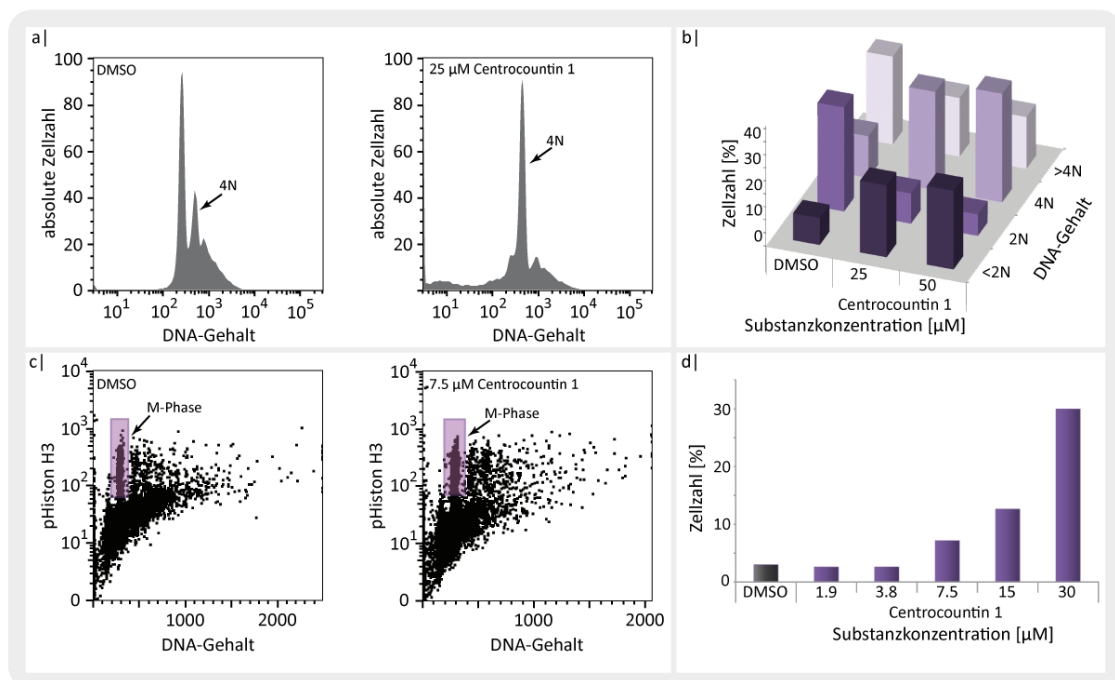


Abbildung 18: Ergebnisse der Zellzyklus-Analysen von HeLa-Zellen nach Behandlung mit Centrocountin 1

a) Repräsentative Histogramme für mit DMSO und Centrocountin 1 behandelte HeLa-Zellen. Für die Durchflusszytometrie-Analyse wurden die Zellen 19 h mit Centrocountin 1 behandelt, mit 70% Ethanol fixiert und ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt. **b)** Auswertung der Zellzyklusphasen von behandelten HeLa-Zellen. **c)** Repräsentative Punkt-Diagramme für mit DMSO und Centrocountin 1 behandelte HeLa-Zellen. Für die Durchflusszytometrie-Analyse wurden HeLa-Zellen für 19 h mit Centrocountin 1 behandelt, mit 70% Ethanol fixiert und phosphoryliertes Histon H3 mit einem spezifischen Antikörper markiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit Alexa-Fluor®488 durch einen sekundären Antikörper sowie die Färbung der DNA mit Propidiumiodid. **d)** Quantitative Auswertung der mitotischen HeLa-Zellen bei verschiedenen Substanzkonzentrationen.

Bereits die Histogramme lassen erkennen, dass nach einer Behandlung mit 25 μM Centrocountin der Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N deutlich ansteigt. Dies wird in der quantitativen Auswertung weiter verdeutlicht. 2N (G1-Phase) ist hier gleich zu setzen mit dem normalen DNA-Gehalt von HeLa-Zellen (82 Chromosomen). Zellen in der

G2/M-Phase weisen einen doppelten DNA-Gehalt (4N) auf. Gleichzeitig besteht auch die Möglichkeit, dass Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N, Zellen in der G1-Phase darstellen, welche keine erfolgreiche Cytokinese durchlaufen haben. Bei einem höheren DNA-Gehalt als 4N ist davon auszugehen, dass die Zellen während der Aufarbeitung nicht gut vereinzelt werden konnten, oder die Zellen zwar in die Zellteilung eintreten, diese aber nicht abschließen und somit mehrkernig werden. Ein kleinerer DNA-Gehalt als 2N deutet auf Zellfragmente, also abgestorbene Zellen hin. Nach Inkubation der HeLa-Zellen mit 25 μ M Centrocoun- tin 1 war der Anteil der Zellen in der G1-Phase, im Vergleich zu den Kontrollzellen, um etwa das Dreifache reduziert. Während der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase im Gegensatz zur DMSO-Kontrolle auf das Doppelte anstieg. Auch die Anzahl der Zellen mit einem DNA-Gehalt $<2N$ erhöhte sich nach der Substanzbehandlung von 10 auf etwa 30%. Die Unterschiede, welche zwischen einer Konzentration von 25 μ M und 50 μ M ermittelt werden konnten, waren eher gering. Um zu zeigen, dass ein mitotischer Arrest und nicht ein Anhalten in der G2-Phase vorliegt, wurde zusätzlich der genaue Anteil an mitotischen Zellen bestimmt. Hierzu wurde eine Doppelfärbung der Zellen angewendet, bei der sowohl der DNA-Gehalt mit Propidiumiodid bestimmt wurde, als auch die mitotischen Zellen durch die Markierung von phosphoryliertem Histon H3 nachgewiesen wurden (Taylor, 2004). In Abbildung 18c und d sind die Ergebnisse dieser Messungen zusammengefasst. Laut Literaturangaben befinden sich nur etwa 4% einer HeLa-Zellpopulation in der Mitose, was sich mit dem ermittelten Wert von etwa 3% deckt. Nach Behandlung mit Centrocoun- tin 1 stieg dieser Wert konzentrationsabhängig bis zu einer Konzentration von 30 μ M um das 10-fache an.

4.1.6. Untersuchungen des Spindel-Kontrollpunktes

Gründe für einen mitotischen Arrest liegen oftmals in der Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes. Die Kernkomponenten dieses Kontrollpunktes sind die MAD- und BUB-Proteine, welche gemeinsam bei auftretenden Problemen während der Chromosomen-Teilung den Übergang in die Anaphase verhindern. Solche Probleme beruhen meistens auf der fehlenden bipolaren Anhaftung der Chromosomen an die Spindel-Mikrotubuli über die Kinetochore. Daher sind Zellen in der Lage sowohl die Anhaftung der Mikrotubuli an die Kinetochore, als auch die Spannung welche durch bipolare Bindung an den Kinetochoren ausgeübt wird, zu kontrollieren. Vermutet wird, dass die MAD-Proteine eine fehlende Anhaftung detektieren, während die BUB-Proteine sowohl fehlende Anhaftung, als auch feh-

lende Spannung wahrnehmen können (Musacchio & Hardwick, 2002). Die vermutete Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes nach Behandlung mit den Centrocountinen sollte durch eine Immunfärbung für BUB1 nachgewiesen werden (Abbildung 19).

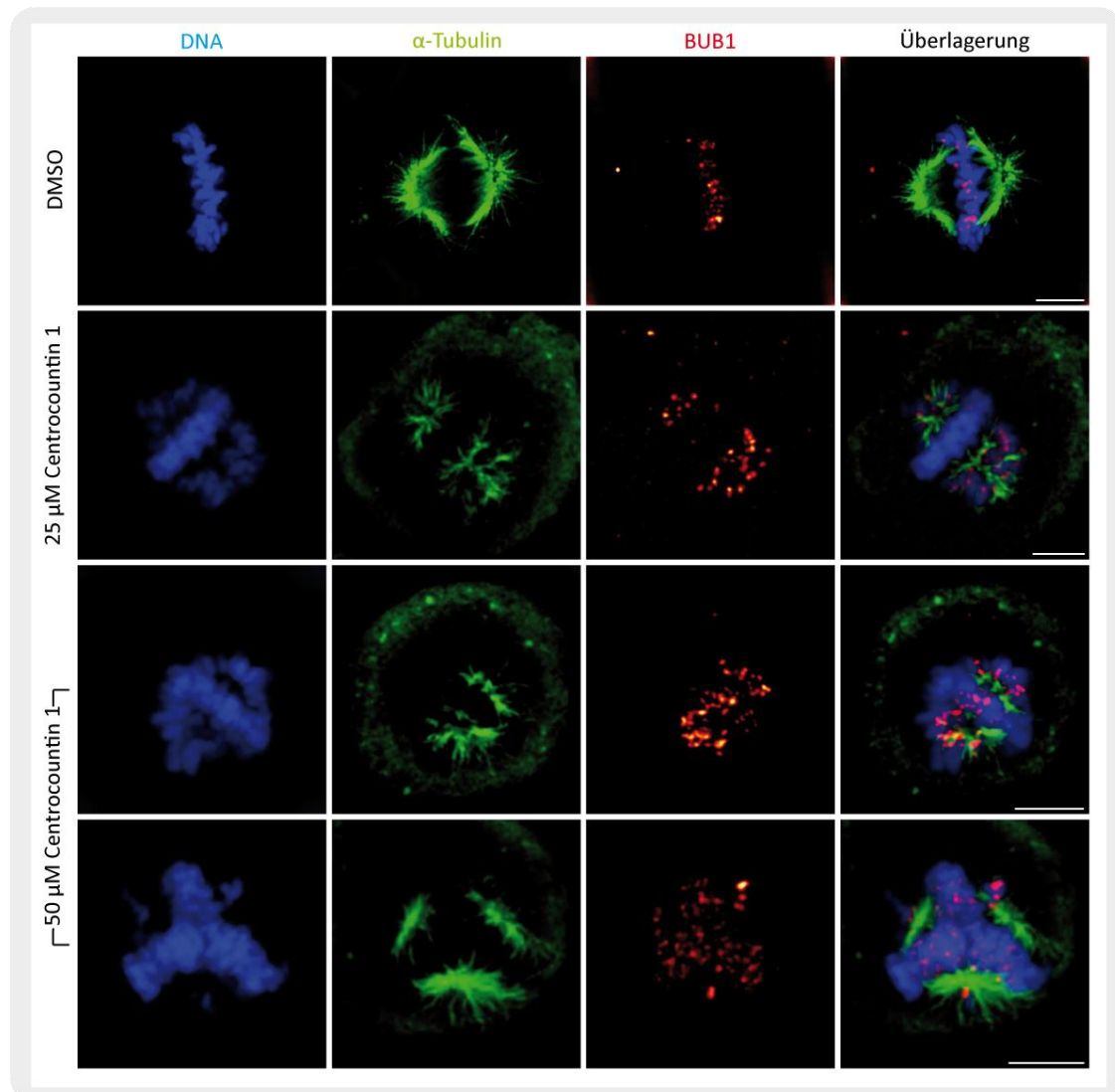


Abbildung 19: Untersuchung zur Spindel-Kontrollpunkt Aktivierung durch Centrocountin 1 in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden zunächst durch Zugabe von Thymidin in der S-Phase blockiert. Der Thymidin-Block wurde nach 19 h durch Wechsel des Mediums aufgehoben und die Zellen mit 25 bzw. 50 µM Centrocountin 1 behandelt. Nach etwa 9 h setzte die Mitose ein und die Zellen wurden mit Permfix fixiert. Abschließend wurden ihre DNA, α-Tubulin und BUB1 angefärbt. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 bzw. mit spezifischen primären Antikörpern und sekundären Antikörpern welche an AlexaFluor®-gekoppelt waren. Für die BUB1-Färbung wurde eine Darstellung gewählt, bei der die Intensität der Färbung durch verschiedene Farben kodiert wird. So werden Kinetochore mit einem niedrigeren Gehalt an BUB1 in dunkelrot gezeigt. Ein Anstieg der BUB1 Konzentration führt zu einer hellroten, orangen bzw. gelben Färbung. Maßstabsbalken: 5 µm.

Eine Aktivierung des Kontrollpunktes spiegelt sich in einer höheren BUB1-Konzentration an den Kinetochoren wider. Dementsprechend wurde für die BUB1-Färbung eine Darstellungsweise gewählt, bei der eine höhere BUB1-Intensität durch hellere Farben wiedergegeben wird. Dies bedeutet, dass Kinetochore mit erfolgter Anhaftung dunkelrot dargestellt sind und Kinetochore mit fehlender Bindung oder fehlender Spannung in hellerem rot bis

gelb erscheinen. Die Auswertung der BUB1-Färbung ergab, dass auch in den mit DMSO behandelten Zellen einige vereinzelt Kinetochose eine erhöhte BUB1-Konzentration aufwiesen. Bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 25 μM konnte deutlich in allen fehlorientierten Chromosomen ein erhöhter BUB1-Gehalt an den Kinetochose nachgewiesen werden, während die bereits in der Metaphaseplatte angeordneten Chromosomen keine BUB1-Färbung zeigten. Wurden die Zellen mit 50 μM Centrocountin 1 behandelt, konnten sowohl für die Kinetochose der fehlorientierten Chromosomen, als auch für die der bereits angeordneten Chromosomen eine teilweise starke Erhöhung des BUB1-Proteins detektiert werden. Interessanterweise zeigte die analysierte multipolare Zelle einen geringeren Anstieg der BUB1-Konzentration. Da eine positive BUB1-Färbung entweder eine fehlende Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochose oder eine fehlende Spannung zwischen Kinetochose und Mikrotubuli signalisieren kann, sollte dies genauer untersucht werden. Für diese Analyse, wurde die Tatsache genutzt, dass bei einer gespannten mitotischen Spindel die Kinetochose der Schwesterchromatiden einen größeren Abstand aufweisen, als bei fehlender Spannung (Andreassen et al., 2004). Daher wurden HeLa-Zellen nach einem Thymidin-Block mit Centrocountin 1 behandelt, in der Mitose fixiert und abschließend mit Hoechst 33342 sowie spezifischen Antikörpern gegen α -Tubulin und die Centromere angefärbt. Um die Abstände von in einer Ebene lokalisierten Kinetochose vermessen zu können, wurde unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops die Zelle in verschiedenen Z-Ebenen aufgenommen (Abbildung 20a). Die Auswertung von etwa 100 Kinetochose-Paaren erfolgte mit der ImageJ Software. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigten, dass der Kinetochose-Abstand in der Kontrollzelle wesentlich größer ist, als nach einer Behandlung mit 25 μM oder 50 μM Centrocountin 1. In Kontrollzellen wiesen 75% der Kinetochose-Paare einen Abstand zwischen 0.8 und 1.0 μm auf. Im Gegensatz hierzu konnte für den Großteil der mit Centrocountin behandelten Zellen ein Abstand von 0.4 bis 0.6 μm gemessen werden. Während dieser Anteil der Kinetochose-Paare bei einer Substanzkonzentration von 25 μM 47% betrug erhöhte er sich bei einer Konzentration von 50 μM auf 63%. Die Anzahl der Zellen mit einem Kinetochose-Abstand >1 μm betrug nach der Behandlung mit Centrocountin 1 nur noch 1 bis 3%, wohingegen dieser Anteil bei den Kontrollzellen bei 30% lag.

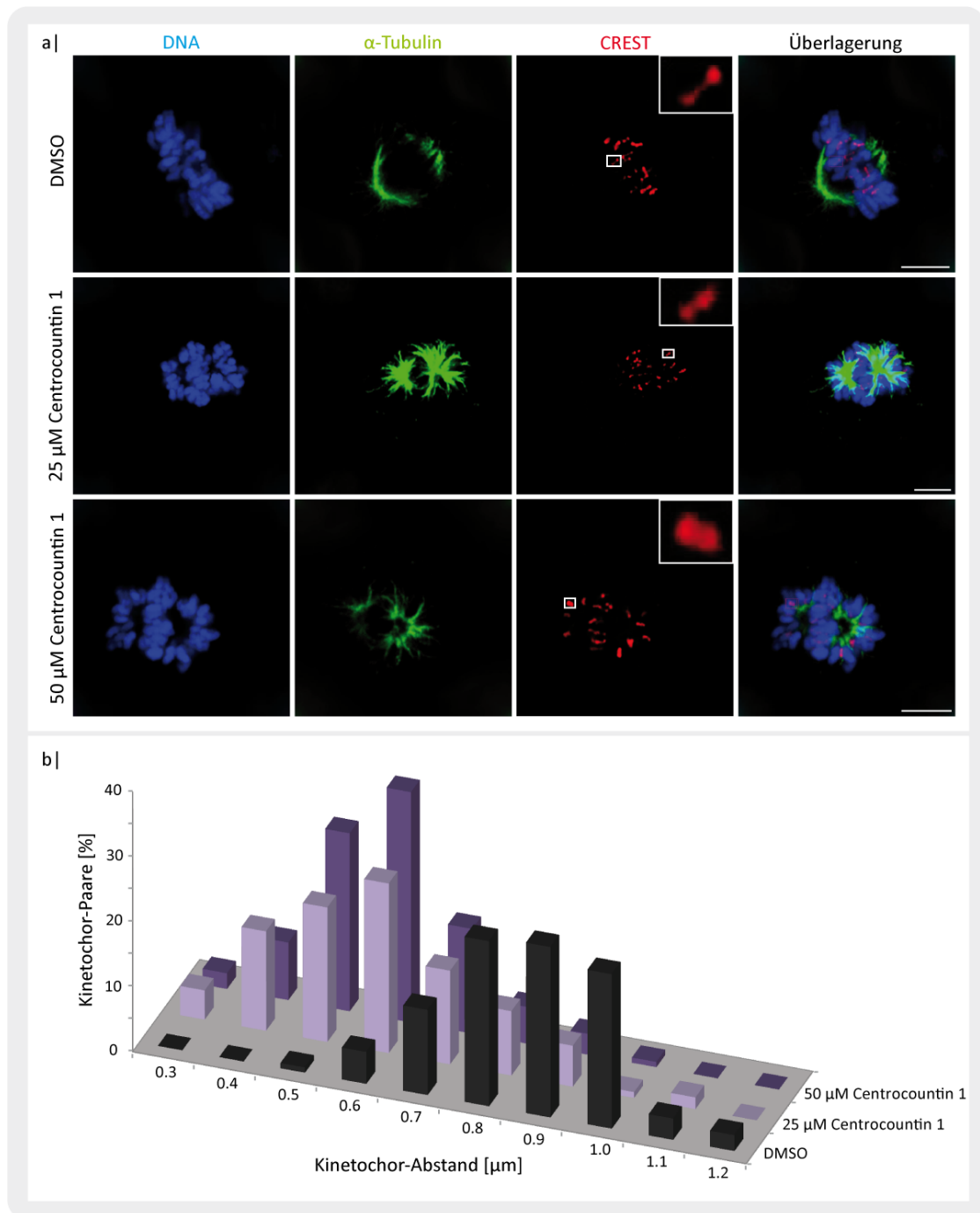


Abbildung 20: Analyse der Spannung zwischen Spindel-Mikrotubuli und Kinetochoren in HeLa-Zellen nach Centrocountin 1 Behandlung

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen behandelter HeLa-Zellen. Die Zellen wurden zunächst mittels Thymidin-Zugabe in der S-Phase synchronisiert. Nach erfolgter Behandlung mit Centrocountin 1 für 9 h wurden die Zellen in der Mitose mit Permfix fixiert und die DNA, Mikrotubuli und Kinetochore spezifisch mit Hoechst 33342, einem α -Tubulin und einem CREST Antikörper und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern angefärbt. Um die in einer Ebene liegenden Kinetochore auswerten zu können, wurden die Zellen in Z-Ebenen mit einem Abstand von 2 μ m aufgenommen. Maßstabsbalken: 5 μ m. b) Quantitative Auswertung des Kinetochor-Abstands. Mit Hilfe der Aufnahmen konnten für jede Konzentration etwa 100 Kinetochor-Paare ausgewertet werden. Der Abstand zwischen den Schwester-Kinetochoren wurde mit Hilfe von ImageJ ermittelt.

4.1.7. Untersuchungen zur Zellproliferation und Apoptose

Sowohl die Lebendzell-Mikroskopie als auch die Durchflusszytometrie-Analysen gaben erste Hinweise darauf, dass einige Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1 starben. So war es im Weiteren notwendig zu überprüfen, inwiefern die Substanzen eine zytotoxische Wirkung entfalten und ob es sich bei dem beobachteten Zelltod um einen programmierten Zelltod, also Apoptose, handelte. Die Untersuchungen zur Zellproliferation und Apoptose in HeLa-Zellen und in den im Folgenden beschriebenen Zelllinien wurden unter Mithilfe von Dr. Slava Ziegler sowie Bernd Rathmer (Bachelor-Arbeit, 2009) durchgeführt. Die für die HeLa-Zellen gemessenen Werte sind in Abbildung 21 dargestellt.

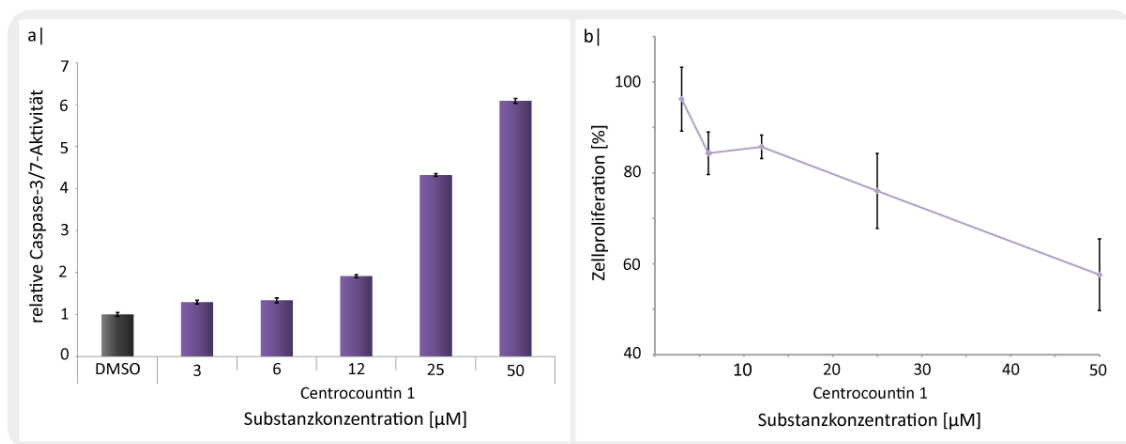


Abbildung 21: Untersuchungen zur Apoptose und Zellproliferation in HeLa-Zellen

a) Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One® Homogenous Caspase-3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden HeLa-Zellen für 42 h mit Centrocountin 1 inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität gemäß den Herstellerangaben detektiert. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. b) Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde WST-1 Reagenz genutzt. HeLa-Zellen wurden für 19 h mit Centrocountin 1 behandelt. Anschließend wurde das WST-1 Reagenz gemäß Herstellerangaben zu den Zellen hinzugegeben und die optische Dichte bei 450 nm detektiert. Die gezeigten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Die prozentuale Zellproliferation wurde basierend auf den DMSO behandelten Zellen berechnet.

Das Liniendiagramm zeigt den kontinuierlichen Rückgang der Zellproliferation von anfänglichen 100% zu etwa 55% bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 50 µM. Das Balkendiagramm stellt die relative Caspase-3/7-Aktivität dar, welche stetig zunimmt. Bei einer Konzentration von 25 µM ist eine bereits 4.5-fache Erhöhung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu verzeichnen, bei 50 µM eine 6.5-fache Erhöhung.

4.1.8. Phänotypische Analysen in weiteren Zelllinien

Der von Centrocountin 1 und 2 induzierte Phänotyp konnte eingehend in HeLa-Zellen untersucht werden. Von großem Interesse war jedoch, ob der Phänotyp auch in anderen Zelllinien beobachtet werden kann oder ob der Effekt der Substanz zelltypspezifisch ist. Außerdem wurde die nicht-transformierte Zelllinie BSC-1 untersucht, um festzustellen, ob die Wirkung der Centrocountine lediglich auf Krebszellen beschränkt ist. Charakteristische Mutationen der verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3 dargestellt.

Zelllinie	Chromosomensatz	APC	CTNNB1	KRAS	BRAF	PIK3CA	PTEN	p14 ^{ARF}	p53	RB
HeLa	4N								HPV	HPV
MCF7	3N-4N					+		++		
SW480	3N	++		++					++	
HT-29	3N	+			+	+			++	
PC-3	3N						++		++	
Saos-2	3N								--	++
HCT-116	2N		+	+		+		++		
HCT-116 p53 ^{-/-}	2N		+	+		+		++	--	

Tabelle 3: Charakteristische Mutationen der verwendeten Zelllinien

N: einfacher Chromosomensatz von 23 Chromosomen. APC: „adenomatous-polyposis-coli-Protein“, CTNNB1: β -Catenin, PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase katalytische Untereinheit α -Isoform, PTEN: Phosphatase und Tensin Homolog, RB: Retinoblastoma. ++: homozygote Mutation, +: heterozygote Mutation, --: „Null“-Mutation. (Cottrell et al., 1992; Ikediobi et al., 2006; King et al., 2006; Kobunai et al., 2010; Rochette et al., 2005; Sjødahl et al., 2011; van Haften et al., 2009)

Für alle ausgewählten Zelllinien sollte zunächst der Zustand der Zellen mittels Immunfluoreszenz-Aufnahmen untersucht werden. Außerdem erfolgten Analysen zur Zellproliferation und Apoptose sowie Experimente zum Zellzyklus. Bei den Ergebnissen der Zellzyklus-Analyse wird der normale DNA-Gehalt der jeweiligen Zelllinie mit 2N bezeichnet, so dass Zellen in der G2/M-Phase einen DNA-Gehalt von 4N aufweisen. Eine der ersten getesteten Zelllinien war die Brustkrebslinie MCF7 (Abbildung 22), bei der die Chromosomenzahl zwischen 66 und 87 schwankt (Soule et al., 1973).

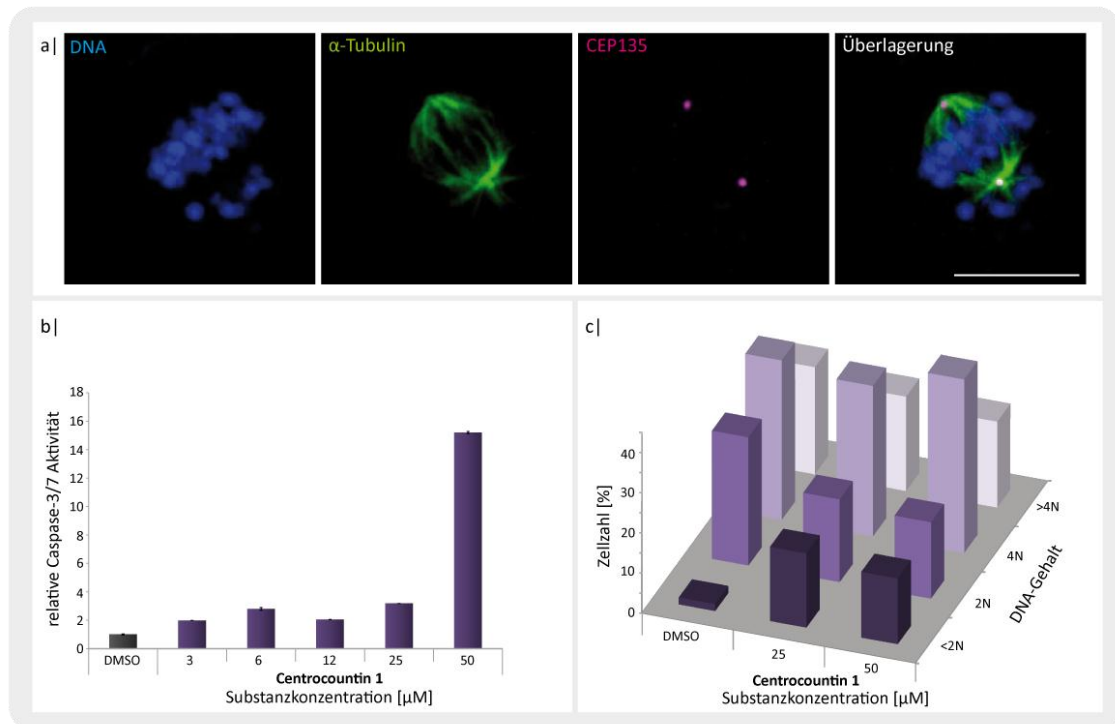


Abbildung 22: Phänotypische Analysen in MCF7-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von MCF7-Zellen mit spezifischer Färbung der DNA, des α -Tubulins und der Centriolen. Die Zellen wurden zuvor für 19 h mit 25 μ M Centrocountin 1 behandelt. Maßstabsbalken: 10 μ m. **b)** Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One® Homogenous Caspase-3/7 Assay verwendet. Hierzu wurden die MCF7-Zellen für 42 h mit Centrocountin 1 inkubiert und anschließend gemäß den Herstellerangaben die Caspase-3/7-Aktivität ermittelt. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängige voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. **c)** Repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Zellzyklus-Analysen. Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurden die behandelten Zellen fixiert, ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.5 Software.

Der Einfluss von Centrocountin 1 auf die Zellproliferation in allen getesteten Zelllinien ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigten, dass auch in MCF7-Zellen nach Behandlung mit 25 μ M Centrocountin 1 fehlorientierte Chromosomen während der Metaphase zu finden sind. Ebenso wurde die Zellproliferation bei der recht hohen Substanzkonzentration von 50 μ M auf 60% reduziert und die Apoptose stieg auf das 16-fache der DMSO-Kontrolle an. Im Rahmen der Zellzyklus-Analysen konnte jedoch im Gegensatz zu den zuvor untersuchten HeLa-Zellen kein Arrest in der G2/M-Phase festgestellt werden. Zwar war eine Reduktion der Zellzahl in der G1-Phase (2N) zu verzeichnen, aber kein Anstieg der Zellzahl mit einem DNA-Gehalt von 4N sondern mit einem DNA-Gehalt von <2N, was auf apoptotische Zellen hindeutete.

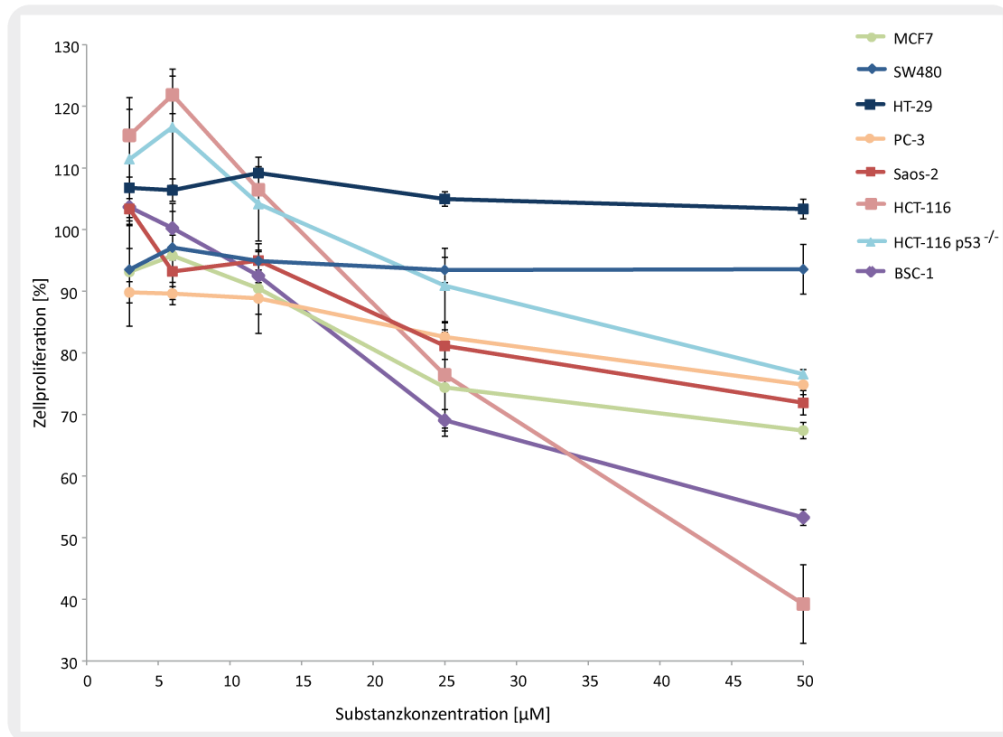


Abbildung 23: Einfluss von Centrocountin 1 auf die Zellproliferation verschiedener Zelllinien

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde das WST-1 Reagenz genutzt. Die zu untersuchenden Zellen wurden für 19 h mit Centrocountin 1 behandelt. Anschließend wurde das WST-1 Reagenz gemäß Herstellerangaben zu den Zellen hinzugegeben. Die gezeigten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Die prozentuale Zellproliferation wurde basierend auf den DMSO behandelten Zellen berechnet.

Die nächste untersuchte Zelllinie war die Darmkrebszelllinie SW480 (Abbildung 24), welche einen triploiden Chromosomensatz aufweist (Leibovitz et al., 1976). Die Immunfärbung dieser Zellen nach einer Behandlung mit Centrocountin 1 konnte neben der fehlerhaften Ausbildung der Metaphaseplatte auch multipolare Zellen nachweisen. Die Zellproliferation war nach der Behandlung mit Centrocountin weitestgehend unbeeinflusst und auch die Apoptose wies nur eine geringfügige Erhöhung bei einer Konzentration von 50 μ M auf. Bei der Analyse des Zellzyklus konnte bei beiden getesteten Substanzkonzentrationen eine Abnahme der Anzahl der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2N beobachtet werden. Des Weiteren war ein leichter konzentrationsabhängiger Anstieg der Zellzahl mit einem DNA-Gehalt von 4N und der mit einem DNA-Gehalt von <2N zu verzeichnen. Dies implizierte eine vermehrte Anzahl von abgestorbenen Zellen, was jedoch im Widerspruch zur Analyse der Zellproliferation bzw. der Caspase-3/7-Aktivität stand, welche nicht auf ein Sterben der Zellen hindeuteten.

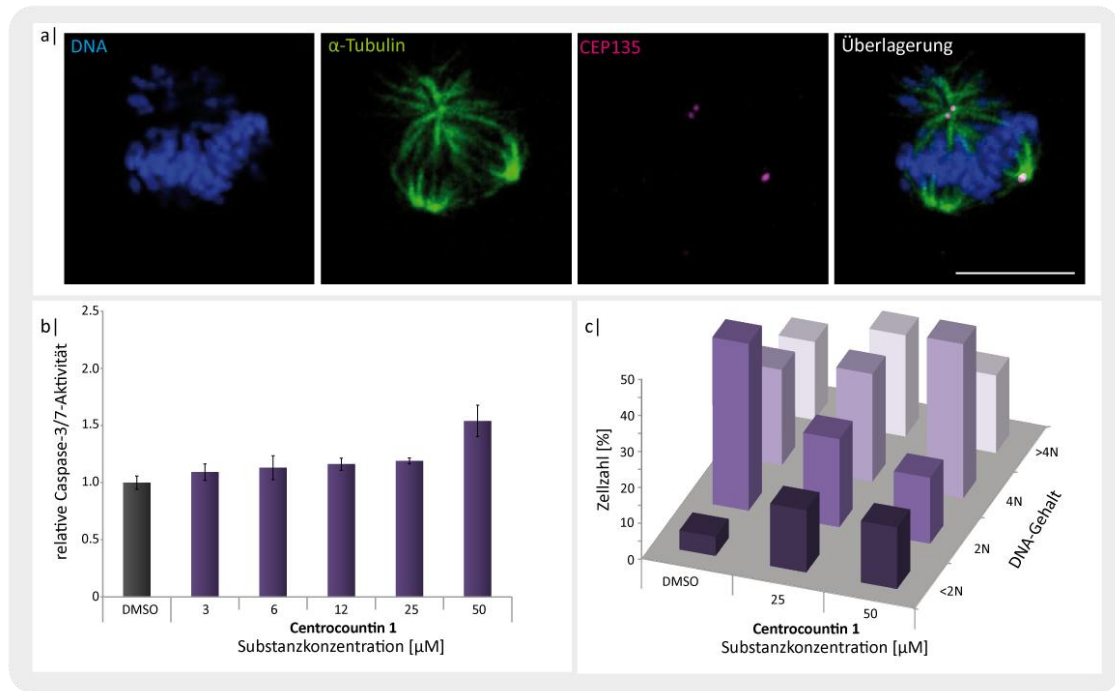


Abbildung 24: Phänotypische Analysen in SW480-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von SW480-Zellen mit spezifischer Färbung der DNA, des α -Tubulins und der Centriolen. Die Zellen wurden zuvor für 19 h mit 25 μ M Centrocountin 1 behandelt. Maßstabsbalken: 10 μ m. b) Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One® Homogenous Caspase-3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden die SW480-Zellen für 42 h mit Centrocountin 1 inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität gemäß den Herstellerangaben detektiert. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. c) Repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Zellzyklus-Analysen. Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurden die behandelten Zellen fixiert, ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.5 Software.

Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Darmkrebszelllinie HT-29 (Abbildung 25). Diese Zelllinie weist einen triploiden Chromosomensatz, mit einer Chromosomenzahl von 68-72 auf. Wie zuvor bei der Analyse der SW480-Zellen konnten auch hier sowohl eine Fehlorientierung der Chromosomen, als auch multipolare Spindeln beobachtet werden. Die ermittelten Werte zur Zellproliferation waren bei den verschiedenen Substanzkonzentrationen unverändert und bei der Messung der Caspase-3/7-Aktivität konnte nur ein leichter Anstieg bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 50 μ M gezeigt werden. Die Zellzyklus-Analysen ergaben einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Zellzahl in der G1-Phase (2N) und bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 50 μ M einen Anstieg des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase (4N). Auffällig war hier, dass bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 25 μ M die Zellzahl mit einem DNA-Gehalt von 2N abnahm, jedoch nicht die Zellzahl mit einem DNA-Gehalt von 4N zunahm sondern der Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt >4N. Dies könnte auf die vermehrte Bildung von mehrkernigen Zellen hinweisen.

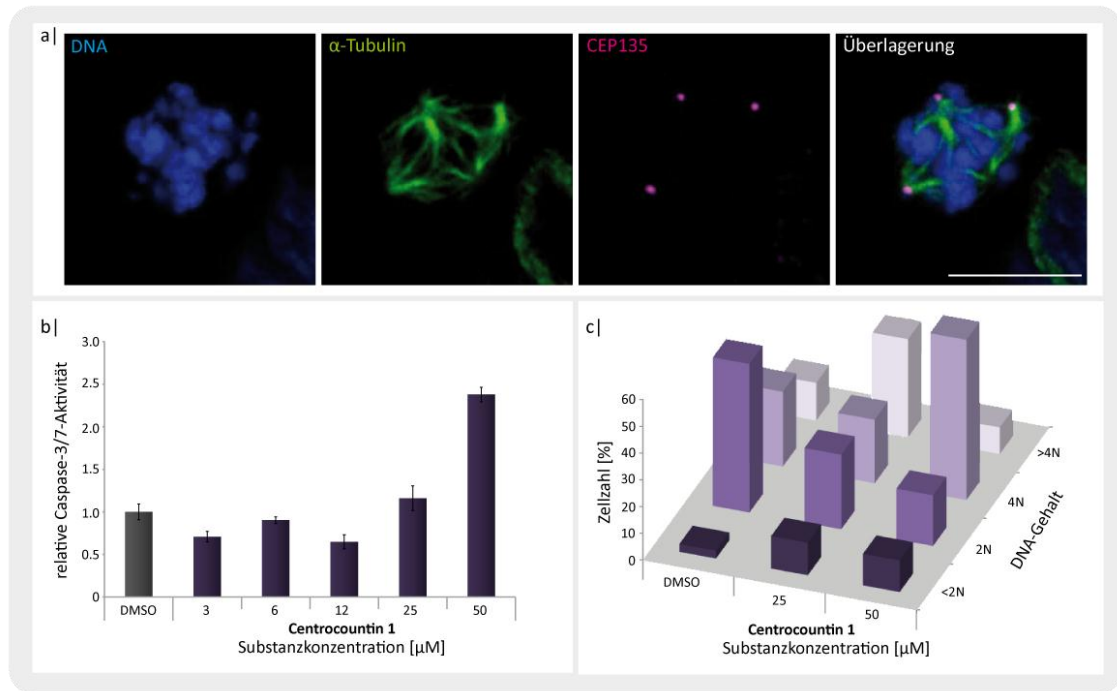


Abbildung 25: Phänotypische Analysen in HT-29-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von HT-29-Zellen mit spezifischer Färbung der DNA, des α -Tubulins und der Centriolen. Die Zellen wurden zuvor für 19 h mit 25 μ M Centrocountin 1 behandelt. Maßstabsbalken: 10 μ m. b) Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One® Homogenous Caspase-3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden die HT-29-Zellen für 42 h mit Centrocountin 1 inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität gemäß den Herstellerangaben detektiert. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. c) Repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Zellzyklus-Analysen. Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurden die behandelten Zellen fixiert, ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.5 Software.

Interessanterweise besitzen beide getesteten Darmkrebslinien, SW480 und HT-29, Mutationen im p53 Protein und weisen zusätzlich dessen Überexpression auf (Rodrigues et al., 1990). Dies ließ einen Zusammenhang zwischen der p53-Proteinmenge und dem fehlenden Einfluss von Centrocountin 1 auf deren Zellproliferation und Apoptose vermuten. Daher wurden im Folgenden Zelllinien mit unterschiedlichen p53-Mengen getestet. So wurde zunächst der Phänotyp der Prostatakrebszelllinie PC-3 (Kaighn et al., 1979) untersucht (Abbildung 26). Diese Zelllinie ist nahezu triploid mit einer Chromosomenzahl von 62 und exprimiert kein p53 (Rubin et al., 1991). Auch hier konnte durch eine Färbung der DNA eine Fehlorientierung der Chromosomen in der Metaphase nachgewiesen werden. Die Zellproliferation blieb auch bei steigenden Substanzkonzentrationen unverändert. Für die Apoptose konnten leicht erhöhte konzentrationsabhängige Werte ermittelt werden, welche bei der höchsten Konzentration in einem 3,5-fachen Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität gipfelten. Im Rahmen der Zellzyklus-Analyse konnte kein Arrest in der G2/M-Phase detektiert werden. Ganz im Gegensatz dazu sank sowohl der Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N als auch der Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2N. Die Anzahl der

Zellen mit einem DNA-Gehalt $>4N$ stiegen an. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen keine Cytokinese durchlaufen und somit vermehrt mehrkernig werden.

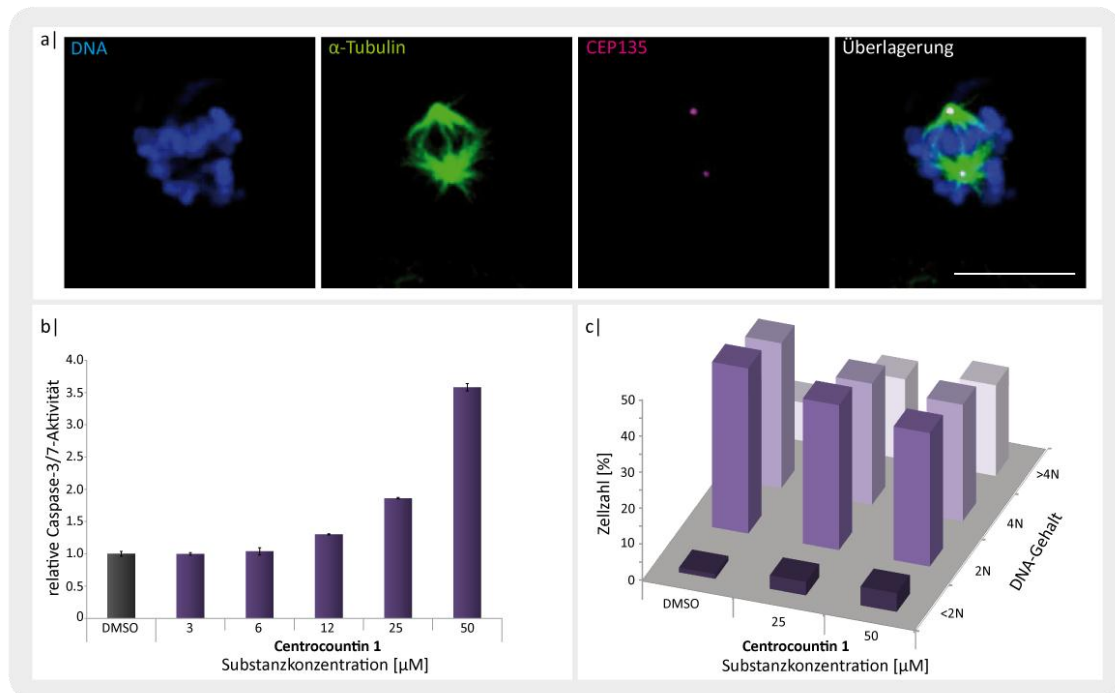


Abbildung 26: Phänotypische Analysen in PC-3-Zellen nach der Behandlung mit Centrocoutin 1

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von PC-3-Zellen mit spezifischer Färbung der DNA, des α -Tubulins und der Centriolen. Die Zellen wurden zuvor für 19 h mit 25 μM Centrocoutin 1 behandelt. Maßstabsbalken: 10 μm . **b)** Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One® Homogenous Caspase-3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden die PC-3-Zellen für 42 h mit Centrocoutin 1 inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität gemäß den Herstellerangaben detektiert. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. **c)** Repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Zellzyklus-Analysen. Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurden die behandelten Zellen fixiert, ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.5 Software.

Die Osteosarkomlinie Saos-2 (Abbildung 27) weist eine Chromosomenzahl von 56 auf und exprimiert ebenfalls kein p53 (Diller et al., 1990). Bei der phänotypischen Analyse der Saos-2-Zellen konnten ebenfalls Probleme bei der Bildung der Metaphaseplatte gezeigt werden. Ferner war ein stetiger Rückgang der Zellproliferation und parallel ein Anstieg der Apoptose bis auf das 16-fache der Kontrolle zu beobachten. Auch ein Arrest in der G2/M-Phase konnte ermittelt werden.

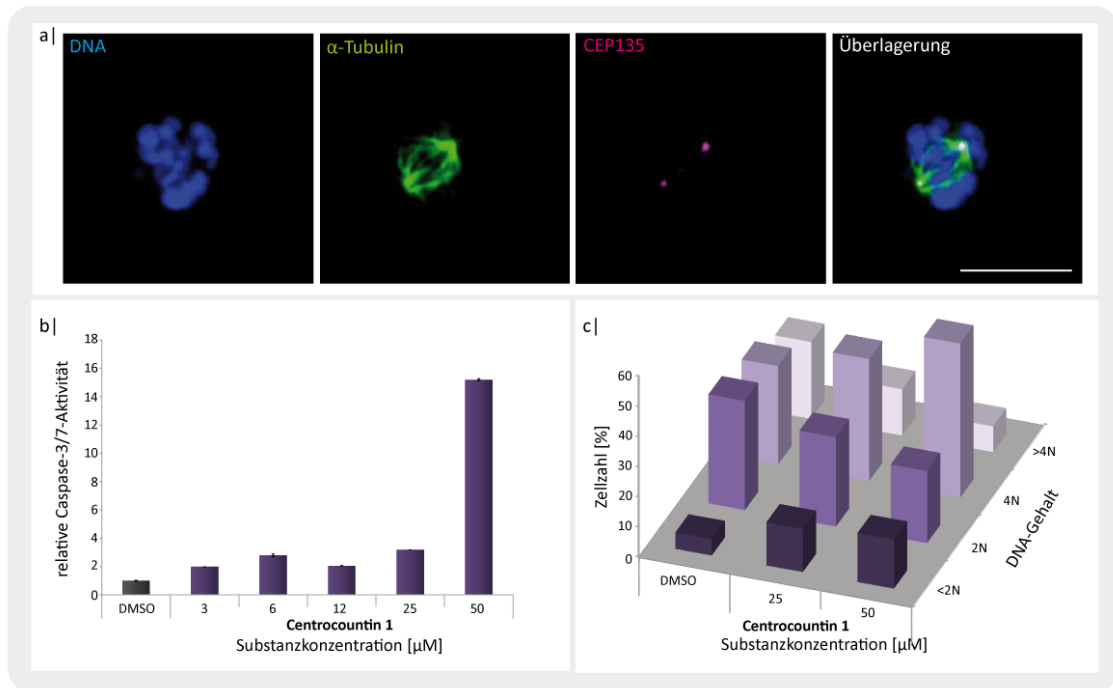


Abbildung 27: Phänotypische Analysen in Saos-2-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Saos-2-Zellen mit spezifischer Färbung der DNA, des α -Tubulins und der Centriolen. Die Zellen wurden zuvor für 19 h mit 25 μM Centrocountin 1 behandelt. Maßstabsbalken: 10 μm . b) Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One® Homogenous Caspase-3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden die Saos-2-Zellen für 42 h mit Centrocountin 1 inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität gemäß den Herstellerangaben detektiert. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. c) Repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Zellzyklus-Analysen. Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurden die behandelten Zellen fixiert, ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.5 Software.

Die HCT-116-Zellen wurden ursprünglich aus einem kolorektalen Karzinom isoliert und sind mit einer Chromosomenzahl von 45 nahezu diploid (Brattain et al., 1981). Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen dieser Zellen nach Substanzbehandlung zeigten sowohl Probleme im Aufbau der Metaphaseplatte als auch multipolare Zellen. Die Messungen der Zellproliferation und der Apoptose zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit. Die Zellproliferation ging bei einer Konzentration von 50 μM auf einen Wert von 30% zurück und die Apoptose zeigte einen fünfmal höheren Wert als bei der DMSO-Kontrolle. Die Zellzyklus-Analyse zeigte lediglich einen Anstieg der Zellen mit einem DNA-Gehalt <2N.

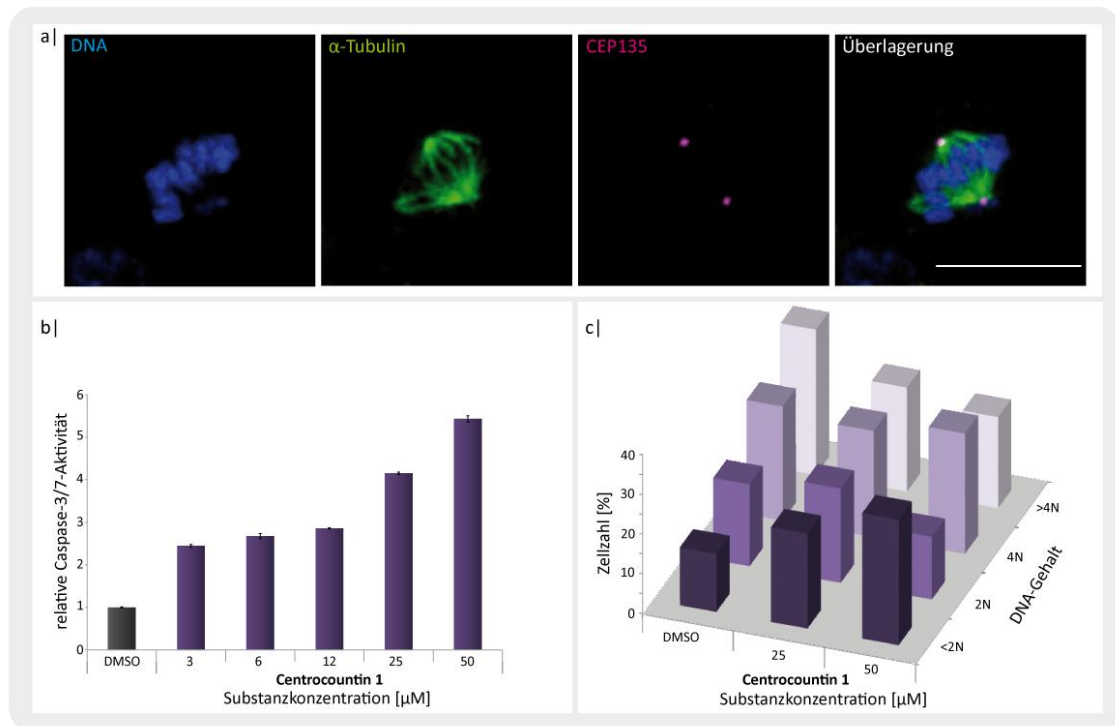


Abbildung 28: Phänotypische Analysen in HCT-116-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von HCT-116-Zellen mit spezifischer Färbung der DNA, des α -Tubulins und der Centriolen. Die Zellen wurden zuvor für 19 h mit 25 μ M Centrocountin 1 behandelt. Maßstabsbalken: 10 μ m. **b)** Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One® Homogenous Caspase-3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden die HCT-116-Zellen für 42 h mit Centrocountin 1 inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität gemäß den Herstellerangaben detektiert. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. **c)** Repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Zellzyklus-Analysen. Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurden die behandelten Zellen fixiert, ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.5 Software.

Des Weiteren wurde eine HCT-116-Zelllinie getestet, welche zwei gestörte p53-Allele aufweist (p53^{-/-}) (Bunz et al., 1998). Auch diese Zelllinie wies eine Fehlorientierung der Chromosomen auf. Außerdem waren bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 50 μ M ein Anstieg der Apoptose auf das 6-fache und ein Rückgang der Zellproliferation auf 70% zu beobachten. Beide Messungen waren konzentrationsabhängig. Die Untersuchung der Zellzyklusphasen ergab einen leichten Anstieg der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N von 36 auf 54%. Ferner war der Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt von <2N erhöht, was die Ergebnisse der Apoptose-Messungen widerspiegelte.

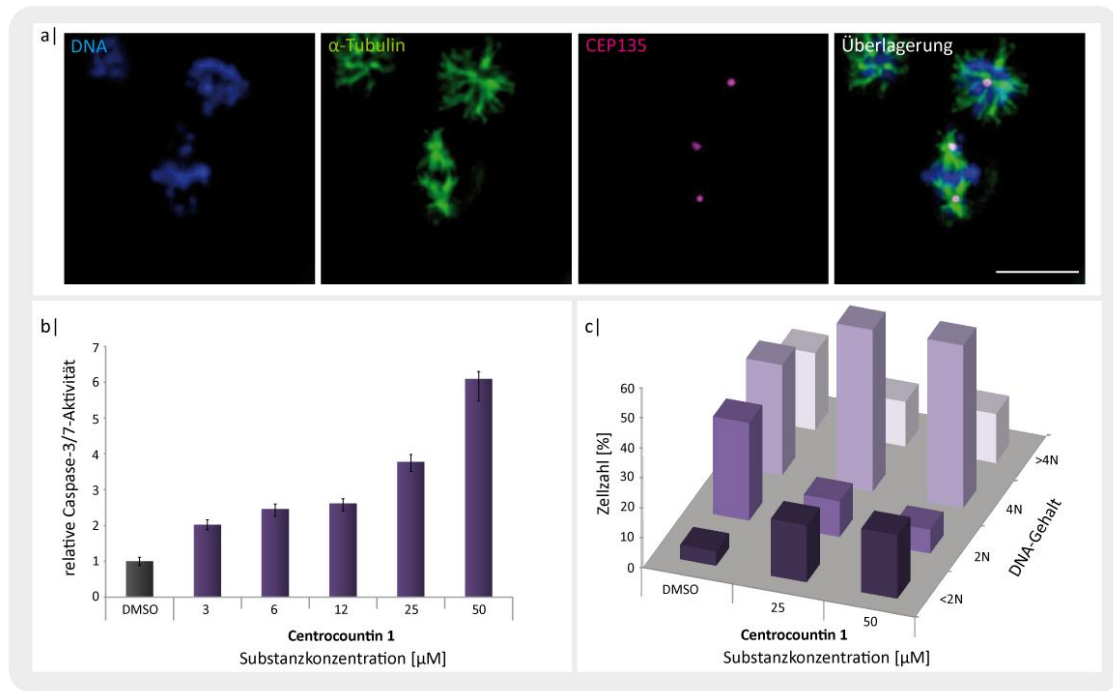


Abbildung 29: Phänotypische Analysen in HCT-116 p53^{-/-}-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von HCT-116 p53^{-/-}-Zellen mit spezifischer Färbung der DNA, des α-Tubulins und der Centriolen. Die Zellen wurden zuvor für 19 h mit 25 µM Centrocountin 1 behandelt. Maßstabsbalken: 10 µm. **b)** Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One® Homogenous Caspase-3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden die HCT-116 p53^{-/-}-Zellen für 42 h mit Centrocountin 1 inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität gemäß den Herstellerangaben detektiert. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung ± Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. **c)** Repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Zellzyklus-Analysen. Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurden die behandelten Zellen fixiert, ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.5 Software.

Abschließend wurde die nicht-transformierte Zelllinie BSC-1 (Hopps et al., 1963) untersucht. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze. Hier konnte mittels der Immunfluoreszenz neben der Fehlorientierung der Chromosomen auch eine auftretende Multipolarität der Spindel detektiert werden. Die Zellproliferation sank bei steigender Substanzkonzentration kontinuierlich bis zu einem Wert von 50% während die Caspase-3/7-Aktivität auf das 150-fache des Kontrollwertes anstieg. Anzumerken ist hier, dass bereits bei geringen Centrocountin 1-Konzentrationen eine etwa 20-fache Erhöhung der Apoptose zu verzeichnen war. Die Zellzyklus-Analyse konnte keinen eindeutigen Arrest in der G2/M-Phase identifizieren, sondern einen Anstieg der Zellen mit fragmentierter DNA, was die Ergebnisse der Untersuchungen zur Zellproliferation und Apoptose unterstützte.

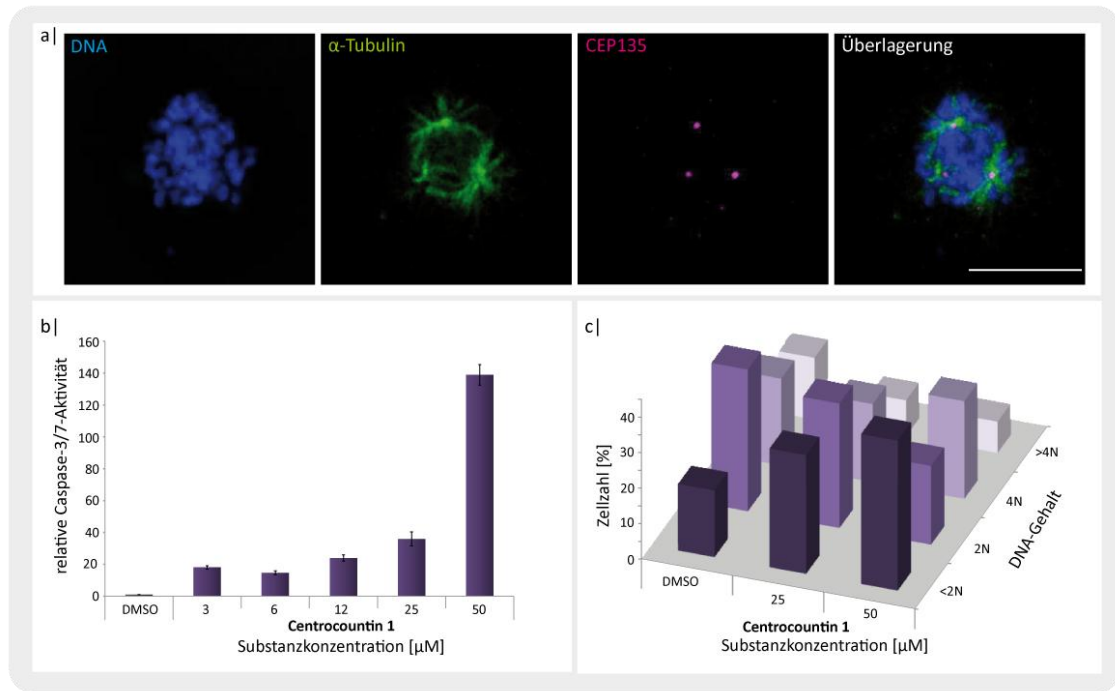


Abbildung 30: Phänotypische Analysen in BSC-1-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

a) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von BSC-1-Zellen mit spezifischer Färbung der DNA, des α -Tubulins und der Centriolen. Die Zellen wurden zuvor für 19 h mit 25 μM Centrocountin 1 behandelt. Maßstabsbalken: 10 μm . **b)** Zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Apo-One[®] Homogenous Caspase-3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden die BSC-1-Zellen für 42 h mit Centrocountin 1 inkubiert und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität gemäß den Herstellerangaben detektiert. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Messungen. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus einer vierfachen Bestimmung \pm Standardabweichung. Alle Ergebnisse wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. **c)** Repräsentative Ergebnisse drei unabhängiger Zellzyklus-Analysen. Zur Bestimmung der Zellzyklus-Phasen wurden die behandelten Zellen fixiert, ihre DNA mit Propidiumiodid angefärbt und die Zellen entsprechend ihres DNA-Gehaltes sortiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo 7.5 Software.

4.2. Identifizierung der Zielproteine der Centrocountine

4.2.1. Analysen basierend auf wissenschaftlichen Hypothesen

Nach der detaillierten Untersuchung des von Centrocountin 1 induzierten Phänotyps, sollten zunächst Versuche unternommen werden, das Zielprotein basierend auf wissenschaftlichen Hypothesen zu identifizieren. Die Ergebnisse dieser Ansätze sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.2.1.1. Untersuchungen zur Tubulin-Polymerisation

Nach der anfänglichen Identifikation der Substanzen im vorwärts-gerichteten chemisch-genetischen Ansatz war die erste naheliegende Hypothese, dass die Substanzen einen Einfluss auf die Tubulin-Polymerisation haben könnten. In einem *in vitro* Testsystem konnte eine solche direkte Interaktion bereits ausgeschlossen werden (Menninger, 2009). Dem-

entsprechend sollte eine mögliche Inhibition der Tubulin-Polymerisation *in cellulo* untersucht werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und über Nacht mit Centrocountin 1 behandelt. Zur Depolymerisation der Mikrotubuli wurden die Deckgläser für eine Stunde auf Eis gegeben. Die Repolymerisation erfolgte durch Inkubation der Zellen in 37 °C warmem Medium für eine Dauer von 0 bis 15 min. Das Fortschreiten der Polymerisation in Interphase- und mitotischen Zellen wurde durch eine Immunfärbung von α -Tubulin verfolgt (Abbildung 31).

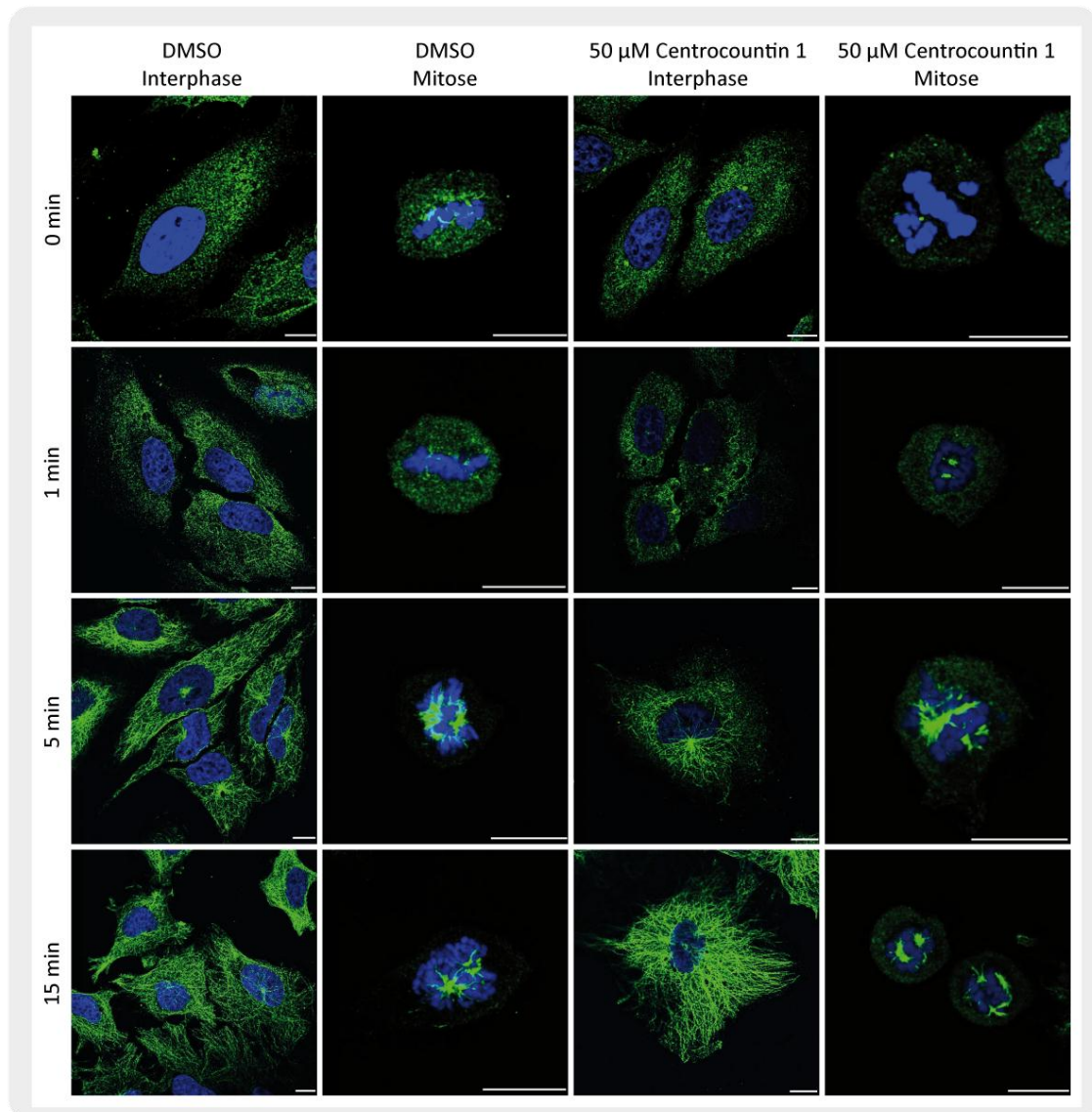


Abbildung 31: Analyse der Tubulin-Polymerisation in HeLa-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

HeLa-Zellen wurden für 19 h mit DMSO und 50 μ M Centrocountin behandelt. Anschließend wurde das Tubulin-Gerüst der Zellen 1 h auf Eis depolymerisiert. Zur Repolymerisation wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläser für die angegebenen Zeiten in 37 °C warmes Medium getaucht und direkt in Permfix fixiert. DNA (blau) und α -Tubulin (grün) wurden spezifisch mit Hoechst 33342 bzw. einem spezifischen primären und fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper angefärbt. Maßstabsbalken: 10 μ m

Die Aufnahmen der Zellen direkt nach der Inkubation auf Eis (0 min) zeigen eine komplette Rückbildung der Tubulin-Strukturen in den Interphase und mitotischen Zellen. Sowohl in

den Kontrollzellen, als auch in den mit Centrocountin 1 behandelten Zellen, tritt zwischen 1 und 5 min nach der Erwärmung auf 37 °C die Repolymerisation des Tubulins ein. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37 °C ist dieser Prozess in den Interphase-Zellen abgeschlossen. Auch bei den mitotischen Zellen ist eine vollständig ausgebildete Spindel zu beobachten. Somit haben die Centrocountine keinen Einfluss auf die Tubulin-Polymerisation.

4.2.1.2. Aktivitäts-Analyse der Phosphatase CDC25a

Ein weiteres potentiell Zielprotein stellte die Phosphatase CDC25a dar. Dieses Enzym dephosphoryliert spezifisch Tyrosin- und Threonin-Reste der CDK-Untereinheiten der CDK-Cyclin-Komplexe und führt somit zu deren Aktivierung. In Säugern konnten drei CDC25-Isoformen CDC25a, CDC25b und CDC25c identifiziert werden. Alle Isoformen sind an der Kontrolle der frühen und späten Zellzyklus-Übergänge beteiligt und haben alle verschiedenen Kombinationen der CDK-Cyclin-Komplexe zum Ziel (Boutros et al., 2007). Durch die Dephosphorylierung von CDK2 spielen die CDC25-Phosphatasen eine wichtige Rolle in der Centrosomen-Duplikation (Fukasawa, 2007). Die Hemmung der CDC25-Phosphatasen führt zu einer Abnahme der Zellproliferation (Brezak et al., 2004) und zu einem Anstieg der fehlorientierten Chromosomen in der Metaphase (Cazales et al., 2007). Die Hemmung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenz-Testsystems ermittelt (Abbildung 32). Hierbei diente DiFUMP, 6,8-Difluor-4-methylumbelliferylphosphat (Gee et al., 1999; Walther, 2009), als Substrat. Unter denen im Testsystem herrschenden Bedingungen spaltet CDC25a ein Phosphat vom Substrat ab und es entsteht ein stark fluoreszierendes Hydroxycoumarinanion. Dieses kann nach Anregung bei 355 nm bei einer Wellenlänge von 455 nm detektiert werden. Die relative Enzymaktivität wurde nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Centrocountin 1, Centrocountin 2 und dem Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor bis-(4-Trifluormethylsulfonamidophenyl)-1,4-diisopropylbenzol ermittelt und mit Hilfe von GraFit 5 ausgewertet. Während für den Phosphatase-Inhibitor ein IC_{50} -Wert von $48.7 \mu\text{M} \pm 3.0$ berechnet werden konnte, war weder für Centrocountin 1 noch für Centrocountin 2 eine konzentrationsabhängige Hemmung von CDC25a zu verzeichnen.

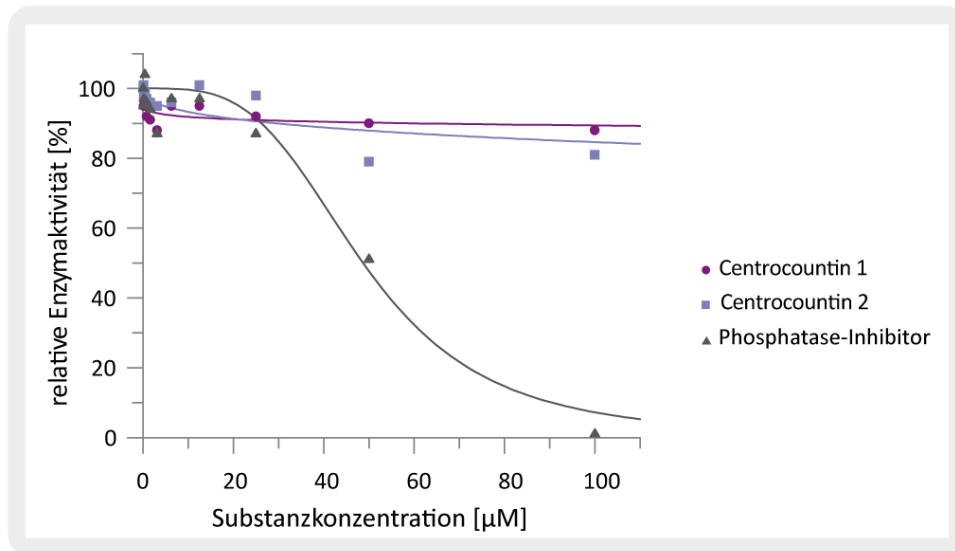


Abbildung 32: Einfluss der Centrocountine auf die Aktivität der Phosphatase CDC25a

Die Hemmung der Phosphatase wurde mit einem Fluoreszenz-basierten Testsystem ermittelt. Hierbei führt die Abspaltung eines Phosphats vom Substrat zur Entstehung eines stark fluoreszierenden Hydroxycoumarinians, welches bei einer Emissions-Wellenlänge von 455 nm detektiert werden kann. Die relative Enzymaktivität nach Inkubation mit Centrocountin 1, Centrocountin 2 und dem Phosphatase-Inhibitor bis-(4-Trifluormethylsulfonamidophenyl)-1,4-diisopropylbenzol wurde ermittelt und gegen die Substanzkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte mit der GraFit 5 Software.

4.2.1.3. Aktivitäts-Analyse verschiedener Zellzyklus-relevanter Kinasen

Im Rahmen der Literaturrecherche konnten außerdem zahlreiche Kinasen als mögliche Zielproteine ausgemacht werden. So regulieren die Aurora-Kinasen (Aurora A, Aurora B, Aurora C) die Centrosomen- und Spindelfunktion. Aurora A bindet während der späten S-Phase und von der frühen G2- bis zur M-Phase an Spindelpole und Centrosomen (Kimura et al., 1997). Aurora B ist ein Teil des CPC („Chromosomal passenger complex“), welcher sich während der Mitose von den Centromeren zur Mittelzone der Spindel bewegt (Terada et al., 1998). Außerdem wird angenommen, dass Aurora B die Chromosomenkondensation, den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden, die bipolare Chromosomen-Anhaftung, den Spindel-Kontrollpunkt und die Chromosomen-Teilung reguliert (Giet et al., 2002). Über die Aufgaben von Aurora C ist weniger bekannt, klar ist jedoch, dass es einige Funktionen von Aurora B ergänzen kann (Sasai et al., 2004). Eine Inhibition dieser Kinasen führt zu abnormalen mitotischen Spindeln, nicht separierten Centrosomen, Fehlorientierung der Chromosomen während Meta- und Anaphase, Chromatin-Brücken in der Telophase und einer verzögerten Mitose (Andersen et al., 2008; Hoar et al., 2007). Eine weitere interessante Kinase war die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase 2 (CAMK2). Eine wichtige Rolle der CAMK2 innerhalb der Centrosomen-Teilung konnte zumindest in *Xenopus*-Embryo-Extrakten nachgewiesen werden. Zu diesen Untersuchungen führten Berichte, dass Calci-

um und Calmodulin für den Übergang von G1- zu S-Phase notwendig sind, dass periodische Calcium-Schwankungen im Zellzyklus von *Xenopus*-Eiern mit diesem Übergang übereinstimmen und dass an den Centrosomen lokalisiertes CAMK2 centrosomale Proteine *in vitro* phosphorylieren kann (Matsumoto & Maller, 2002). Eine allgemein sehr wichtige Aufgabe für das Fortschreiten des Zellzyklus haben die CDK-Cyclin-Komplexe. Von besonderem Interesse waren hier die Interaktionen von CDK1-Cyclin B1, CDK2-Cyclin A, CDK2-Cyclin E, CDK4-Cyclin D1, CDK4-Cyclin D3 und CDK6-Cyclin D1. Dabei ist CDK1-Cyclin B1 das Schlüsselement, welches den Eintritt in die Mitose auslöst (Nurse, 1990). In tierischen Zellen werden der Beginn der DNA-Synthese und der Centrosomen-Teilung zumindest teilweise durch Aktivierung des CDK2-Cyclin E-Komplexes miteinander verbunden (Hinchcliffe & Sluder, 2002). Sowohl der CDK2-Cyclin A-Komplex, als auch CDK4/6-Cyclin D sind in die Regulierung der Centrosomen-Verdoppelung involviert (Meraldi et al., 1999). Wobei eines der wichtigsten Zielproteine des CDK4/6-Cyclin D-Komplexes das Tumorsuppressorprotein RB („Retinoblastoma“) ist (Giacinti & Giordano, 2006). Die CHK1- und CHK2-Kinase werden durch ATM („Ataxia Telangiectasia Mutated“) und ATR („ATM- and RAD3-related“) aktiviert und erfüllen zahlreiche regulatorische Funktionen im Zellzyklus. So sind sie in der Lage, p53 durch Phosphorylierung zu stabilisieren, was zu einer Hochregulation von p21^{WAF1/CIP1} führt. Dies wiederum verhindert die Aktivierung des CDK1-Cyclin B-Komplexes und führt zu einem Anhalten des Zellzyklus in der späten G2-Phase (Charrier-Savournin et al., 2004). In einem p53-unabhängigen Mechanismus blockieren CHK1 oder CHK2 die Aktivierung von CDK1-Cyclin B indem sie die CDC25-Isoformen phosphorylieren und somit inhibieren (Rudolph, 2007). Die Kinase MARK1 („MAP/microtubule affinity-regulating kinase“) phosphoryliert die Mikrotubuli-assoziierten Proteine Tau, MAP2 und MAP4 und führt somit zu deren Dissoziation von den Mikrotubuli und erhöht die Mikrotubuli-Dynamik (Drewes et al., 1997). Eine Schlüsselfunktion für die Initiierung der Centrosomen-Teilung hat auch die Kinase NEK2A („never in mitosis gene A related kinase“). Die Expression einer NEK2A Variante ohne Kinase-Funktion resultiert in einer gescheiterten Centrosomen-Teilung und führt zur Ausbildung einer monopolaren Spindel, während die Überexpression von NEK2A eine verfrühte Centrosomen-Teilung einleitet (Fry et al., 1998). Der p21-aktivierten Kinase 1 (PAK1) kommt nur eine indirekte Rolle im Rahmen des Centrosomen-Zyklus zu, indem sie mit Aurora A interagiert und dieselbe an den Centrosomen aktiviert. Wird PAK1 gehemmt kommt es dementsprechend zu einer verzögerten Rekrutierung von Aurora A an die Centrosomen (Zhao et al., 2005). Eine Verbindung von PKA (Proteinkinase A „cAMP dependent protein kinase“) zum Spindelaufbau wird durch die Tatsache gestützt,

dass Pericentrin als AKAP (A-Kinase anchoring protein) die Bindung der PKA an die Centrosomen ermöglicht. So ist es möglich, dass Pericentrin die Kinase zu centrosomalen Substraten führt, welche bislang unbekannt sind (Diviani et al., 2000). Des Weiteren führt eine gesteigerte Kinase-Aktivität der PKA zur Phosphorylierung von Centrin an Serin 170 und somit zur Teilung der Centriolen (Lutz et al., 2001). Eine weitere bedeutende Kinase für die Kontrolle der Centrosomen-Reifung kommt der Polo-like Kinase 1 (PLK1) zu. Eine reduzierte PLK1-Aktivität resultiert in funktionellen Defekten der Centrosomen und verhindert die Ausbildung einer bipolaren Spindel (Barr et al., 2004). PLK2 (SNK) und PLK4 (SAK) regulieren die Centriolen-Duplikation und lokalisieren zu den Centrosomen (Habedanck et al., 2005; Warnke et al., 2004). Die PLK3 spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Mikrotubuli-Dynamik und der Centrosomenfunktion. Eine gestörte Expression führt zu einem Zellzyklus-Arrest und zur Apoptose. ROCK1 („p160-Rho associated coiled-coil containing protein kinase“) ist eine centrosomale Komponente und wird für die Centrosomen-Positionierung und den Centrosomen-abhängigen Austritt aus der Mitose benötigt (Chevrier et al., 2002). ROCK2 bindet ebenfalls an die Centrosomen und fördert die Centrosomen-Duplikation, während eine Herunterregulation der Kinase eine Unterdrückung der Centrosomen-Verdoppelung zur Folge hat (Ma et al., 2006). Eine weitere Kinase von Interesse war die Spindel-Kontrollpunkt-Kinase „monopolar spindle 1“ (MPS1/TTK). Diese bindet an die Centrosomen und wird durch CDK2-Cyclin E-Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert. In ihrer aktivierten Form führt die MPS1 zur Centrosomen-Verdoppelung (Fisk et al., 2003). Die Kinase WEE1 wird durch CHK1 hochreguliert und katalysiert ihrerseits die hemmende Phosphorylierung von CDK1 (Lee et al., 2001). Sie trägt somit zur Blockierung des CDK1-Cyclin B-Komplexes bei und führt zum G2-Arrest.

Alle diese Kinasen führen bei einem „Knock Out“ oder einer Inhibition zu einem Phänotyp, der dem durch die Centrocountine verursachten ähnlich ist oder nehmen generell Schlüsselfunktionen im Zellzyklus/Centrosomen-Zyklus ein. Aufgrund dieser Tatsache, sollten alle Enzyme in einem *in vitro* Testsystem untersucht werden. Die Durchführung erfolgte durch die ProQinase GmbH (Freiburg). Die Aktivität wurde bei einer Substanzkonzentration von 10 μ M in einem radiometrischen Proteinkinase-Testsystem bestimmt (Tabelle 4). Ab einer Restaktivität von < 50% kann von einer Hemmung der Kinase gesprochen werden. Wie Tabelle 4 zeigt, war bei keiner der getesteten Kinasen ein Aktivitätsverlust in dieser Größenordnung zu verzeichnen.

Ergebnisse

Kinase	Centrocountin 1	Centrocountin 2
Aurora A	91	89
Aurora B	93	86
Aurora C	92	90
CAMK2A	85	86
CDK1-Cyclin B1	108	89
CDK2-Cyclin A	94	78
CDK2-Cyclin E	98	79
CDK4-Cyclin D1	105	97
CDK4-Cyclin D3	106	88
CDK6-Cyclin D1	98	103
CHK1	108	97
CHK2	89	100
MARK1	99	99
NEK2	96	102
PAK1	100	80
PKA	80	92
PLK1	109	110
PLK3	100	100
ROCK1	80	86
ROCK2	94	108
SAK (PLK4)	113	97
SNK (PLK2)	96	101
TTK (MPS1)	97	89
WEE1	100	94

Tabelle 4: Einfluss der Centrocountine auf die Aktivität verschiedener Kinasen

Die Aktivitätsanalyse wurde von der ProQinase GmbH (Freiburg) durchgeführt. Die Ermittlung der Aktivität erfolgte mittels eines radiometrischen Proteinkinase Testsystems („³³PanQinase® Activity Assay). Aufgelistet sind die 24 getesteten Kinasen und deren Restaktivität [%] nach Behandlung mit 10 µM Centrocountin 1 bzw. Centrocountin 2. Eine Restaktivität von <50% deutet auf eine Hemmung der Kinase hin.

Nach den Ergebnissen der *in vitro* Analyse sollte zusätzlich noch die Aktivität der Aurora B-Kinase *in cellulo* überprüft werden. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Funktionen der Aurora-Kinasen können Aurora A und Aurora B Histon H3 an Serin10 phosphorylieren, jedoch scheint nur Aurora B für diese Phosphorylierung *in vivo* notwendig zu sein (Giet et al., 2002). Dementsprechend ist es möglich die Inhibition der Aurora B-Kinase durch eine Zellfärbung für phosphoryliertes Histon H3 (pHiston H3) zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen spiegelten jedoch die Resultate des *in vitro* Testsystems wieder. So zeigten mit Centrocountin 1 behandelte HeLa-Zellen eine ebenso intensive Färbung für pHiston H3 wie die Kontrollzellen. Auch eine Erhöhung der Substanzkonzentration von 25 auf 50 µM führte nicht zu einem Ausbleiben der pHiston H3-Färbung.

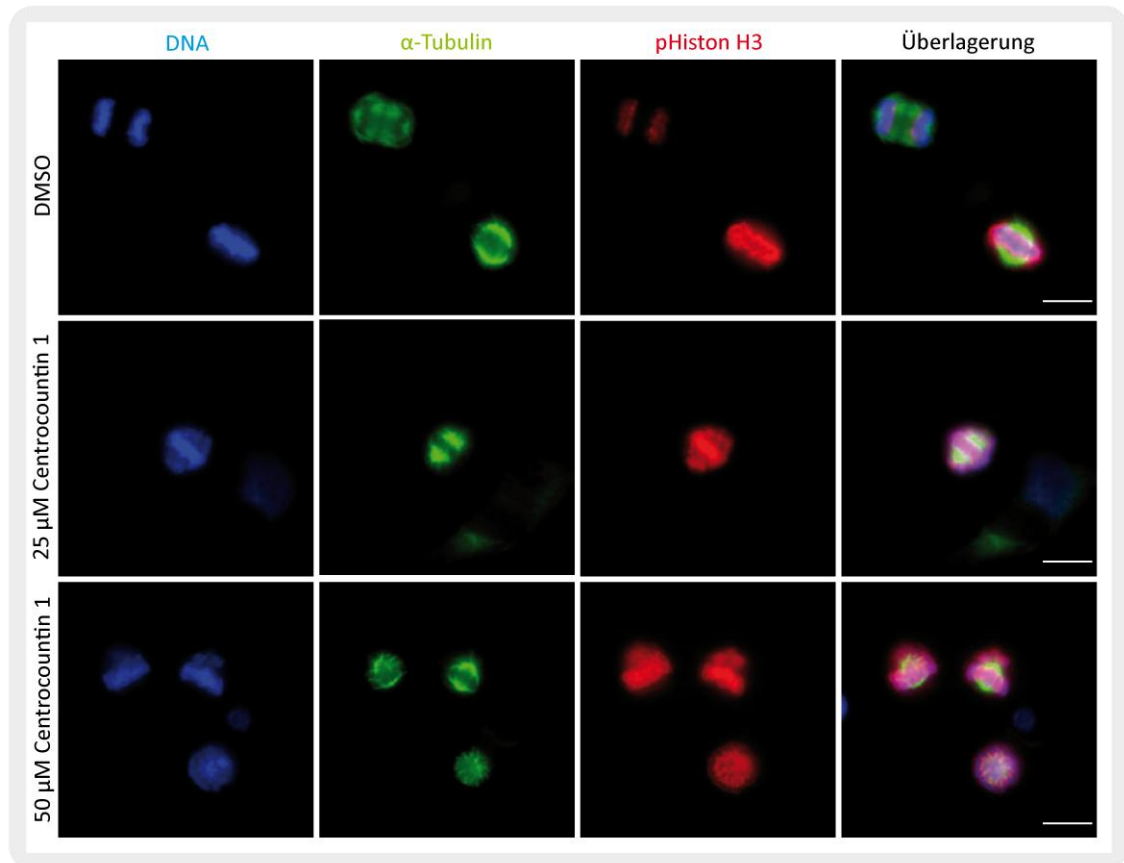


Abbildung 33: Analyse der Aurora B-Aktivität in HeLa-Zellen nach der Behandlung mit Centrocountin 1

HeLa-Zellen wurden für 19 h mit Centrocountin 1 behandelt, anschließend mit Perifix fixiert und für DNA, α -Tubulin und phosphoryliertes Histon H3 angefärbt. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Im Fall der Polo-like-Kinasen war außerdem bekannt, dass sie zusätzlich zur N-terminalen katalytischen Protein-Kinase-Domäne eine Phosphopeptid-bindende Domäne, die Polo-Box-Domäne (PBD), aufweisen. Eine Inhibition dieser Domäne führte zu einer Fehlorientierung der Chromosomen in der Metaphase und zur Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes (Watanabe et al., 2009). Aufgrund dieser Tatsache wurde eine mögliche Hemmung der PBD durch die Centrocountine in Zusammenarbeit mit Dr. N. Watanabe und Prof. H. Osada (ASI, RIKEN, Japan) untersucht. Die Analysen bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 20 μ M zeigten jedoch keinen Effekt auf die PBD von PLK1.

4.2.2. Proteinbiochemische Untersuchungen verschiedener Zellzyklus-relevanter Proteine

Des Weiteren war von Interesse, ob durch die Behandlung mit Centrocountin 1 die Expression verschiedener Zellzyklus-relevanter Proteine beeinflusst wird. Das Wissen darüber könnte zur Eingrenzung eines möglichen Zielproteins beitragen. Eines dieser Proteine war der Tumorsuppressor p53. Dieser unterdrückt die Krebsentstehung durch das Einleiten

eines Zellzyklus-Arrests oder der Apoptose als Antwort auf diverse zelluläre Stresssignale (Brady & Attardi, 2010). Die Funktion, den Zellzyklus anhalten zu können, korreliert mit dem Vermögen als Transkriptionsfaktor zu agieren (Crook et al., 1994). Unter den bislang identifizierten p53 Zielgenen spielt p21^{WAF1/CIP1} eine wichtige Rolle für den Zellzyklus-Arrest (el-Deiry et al., 1993). p21^{WAF1/CIP1} ist ein Cyclin-Kinase-Inhibitor, welcher die Aktivierung des CDK1-Cyclin B-Komplexes verhindert und so zu einem Anhalten des Zellzyklus in der späten G2-Phase führt (Charrier-Savournin et al., 2004). Der Tumorsuppressor p14^{ARF} ist das alternative Produkt des Leserahmens auf dem INK4A Locus. Er stabilisiert und aktiviert p53, indem er an MDM2 bindet, dessen Ubiquitin-Ligase-Aktivität inhibiert und somit den Abbau von p53 verhindert (Balint & Vousden, 2001). Ferner sorgt p14^{ARF} in p53- und p21^{WAF1/CIP1}-defizienten Zellen für einen Arrest in der späten G2-Phase und schützt diese Zellen vor einer uneingeschränkten Vermehrung (Normand et al., 2005). Diese Feststellung könnte besonders im Hinblick auf die genutzten HeLa-Zellen interessant sein, da HeLa-Zellen mit humanen Papillomaviren (HPV) infiziert sind. Das virale Onkoprotein E6 führt zur Inaktivierung von p53 durch Bindung an dessen DNA-Binde-Domäne und fördert zusätzlich den Abbau von p53 durch das 26S-Proteasom (McCloskey et al., 2010). Außerdem exprimieren HeLa-Zellen nur ein geringes basales Niveau an p21^{WAF1/CIP1} (Kralj et al., 2003). Ein weiterer Tumorsuppressor, welcher eine ausschlaggebende Rolle in der negativen Regulation des Zellzyklus spielt, ist RB (Retinoblastoma Protein) (Giacinti & Giordano, 2006). Das Tumorsuppressorprotein unterdrückt die Transkription von Genen, welche für den Übergang von der G1- zur S-Phase benötigt werden, durch die Bindung an den E2F-Transkriptionsfaktor. Es ist somit ein essentieller Bestandteil des Restriktionspunktes. Die Hemmung von RB erfolgt durch die CDK4/6-Cyclin D vermittelte Phosphorylierung (Giacinti & Giordano, 2006). Genau wie p53 wird auch RB in HeLa-Zellen durch das humane Papillomavirus inaktiviert, wobei dies durch Bindung des Onkoproteins E7 ausgelöst wird (Münger et al., 2001). Die Immundetektion von p53 und p21^{WAF1/CIP1} in MCF7 und HCT-116 Zellen (Abbildung 34a-f) konnte zeigen, dass ein erhöhtes Niveau beider Proteine zu verzeichnen ist. Die Signalintensität von p53 in MCF7-Zellen stieg nach der Behandlung mit 12 µM Centrocountin 1 um etwa das 13-fache an und sank bei Konzentrationen von 25 und 50 µM wieder leicht ab. Die p21^{WAF1/CIP1}-Menge stieg bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 12 µM auf das Doppelte an, während höhere Konzentrationen keinen weiteren Effekt hatten. In HCT-116-Zellen war eine konzentrationsabhängige Zunahme von p53 bis zu einer Konzentration von 25 µM zu beobachten. Genau wie bei den MCF7-Zellen war bei 50 µM ein leichter Rückgang zu verzeichnen. Analog zur p53-Proteinmenge ver-

hielt sich die Menge von p21^{WAF1/CIP1} in HCT-116-Zellen. Auch für die untersuchten Proteine RB und p14^{ARF} konnte in HeLa-Zellen eine Hochregulierung festgestellt werden (Abbildung 34g-i). Für RB war diese konzentrationsabhängig. Im Fall von p14^{ARF} war ein drastischer Anstieg der Signalintensität bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 12 µM zu verzeichnen, welche bei höheren Konzentrationen wieder leicht abnahm.

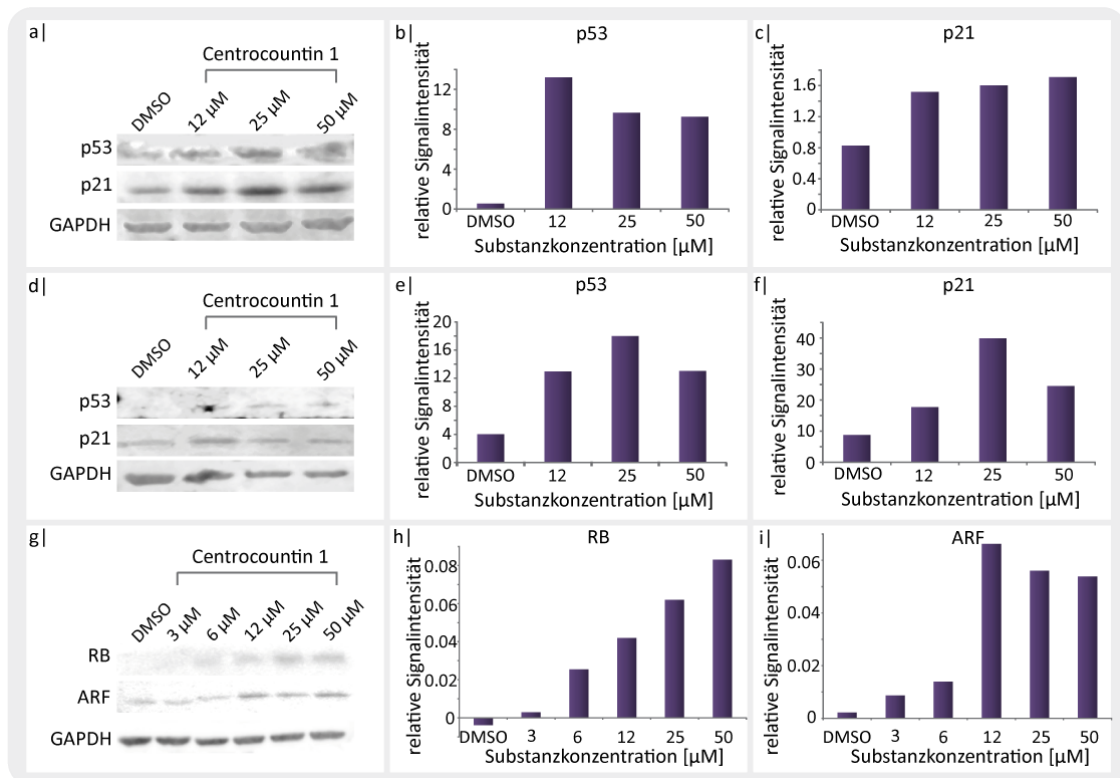


Abbildung 34: Immunodetektion Zellzyklus-relevanter Proteine nach der Behandlung mit Centrocountin 1

a) MCF7-Zellen wurden für 19 h mit Centrocountin 1 behandelt und anschließend lysiert. Die Lysate wurden auf den gleichen Proteingehalt angepasst und mittels SDS-PAGE (4-20%) getrennt. Danach wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Als spezifische Antikörper wurden anti-p53, anti-p21^{WAF1/CIP1} und anti-GAPDH als Ladekontrolle verwendet. Die sekundären Antikörper waren an IRDye® 680 oder IRDye® 800CW gekoppelt. b) Die Intensitäten von p53 wurden auf die Signalintensität von GAPDH normiert und gegen die Substanzkonzentration aufgetragen. c) Die Auswertung der Signalintensitäten von p21^{WAF1/CIP1} in MCF7-Zellen. d) HCT-116-Zellen wurden für 19h mit Centrocountin 1 behandelt und anschließend lysiert. Die Lysate wurden auf den gleichen Proteingehalt angepasst und in einem SDS-PAGE (4-20%) getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Als spezifische Antikörper wurden anti-p53, anti-p21^{WAF1/CIP1} und anti-GAPDH als Ladekontrolle verwendet. Die sekundären Antikörper waren mit IRDye680 oder IRDye 800 markiert. e) Die Auswertung der Signalintensität von p53 in HCT-116-Zellen. f) Die Auswertung der Signalintensität von p21^{WAF1/CIP1} in HCT-116-Zellen. g) HeLa-Zellen wurden für 19 h mit steigenden Konzentrationen Centrocountin 1 behandelt und lysiert. Der Proteingehalt der Lysate wurde angeglichen und die Proteine mittels SDS-PAGE (4-20%) getrennt. Danach folgte die Immobilisierung auf einer PVDF-Membran. Als primäre Antikörper dienen ein anti-RB, anti-p14^{ARF} und ein anti-GAPDH Antikörper. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. h) Die Auswertung der Signalintensität von RB in HeLa-Zellen. i) Auswertung der Signalintensität von p14^{ARF} in HeLa-Zellen. Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgte mit Hilfe der Image Studio 1.1 Software.

4.2.3. Zielprotein-Identifizierung mittels Affinitätsreinigung

Nachdem mit Hilfe der wissenschaftlichen Hypothesen lediglich Zielproteine ausgeschlossen werden konnten, sollte eine Affinitätsreinigung durchgeführt werden. Basierend auf den Ergebnissen der Struktur-Wirkungs-Beziehung (Kap. 4.1.1) wurden von Dr. Heiko Dückert verschiedene Affinitätssonden synthetisiert. So wurden als Befestigungspunkt für den Abstandshalter sowohl R¹ als auch R⁶ gewählt und die Länge des „Linkers“ variierte von einer einfachen Alkyl-Einheit zu einer Polyethylenglykol-Einheit (Tabelle 5). Für alle Moleküle erfolgte zunächst eine Überprüfung hinsichtlich ihrer Aktivität in HeLa-Zellen. Außerdem wurde durch das Lead-Discovery Center die Membranpermeabilität der Sonden mit dem „Parallel artificial membrane permeability assay“ (PAMPA) untersucht (Tabelle 5).

Substanz	(R)-Enantiomer	(S)-Enantiomer	PAMPA [% Flux]
32a/b			9.9/8.9
33a/b			0.6/1.1
34a/b			1.6/4.7

Tabelle 5: Verschiedene synthetisierte Affinitätssonden

Gezeigt sind die Strukturen der verschiedenen synthetisierten Affinitätssonden sowie die Ergebnisse des PAMPA („Parallel artificial membrane permeability assay“) für die Moleküle. Die Ergebnisse der Zellpermeabilität sind in % Flux angegeben. <5 = geringe Permeabilität, 5-25 = mittlere Permeabilität, >25 = hohe Permeabilität.

Für keines der synthetisierten Moleküle konnte eine Aktivität in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Der Test hinsichtlich der Membranpermeabilität ergab, dass die Moleküle **32a** und **32b** eine mittlere Durchlässigkeit aufwiesen, während **33a/b** und **34a/b** als impermeabel identifiziert wurden. Dementsprechend führte das Anbringen eines Abstandhalters an R₆ zu einer Inaktivität des Moleküls. Daraus resultierend wurden für die nachfolgende Affi-

nitätschromatographie die Substanzen **33** und **34** verwendet. Zur Identifizierung des Zielproteins wurde eine Kombination aus vergleichender und kompetitiver Methode gewählt (Abbildung 5). So wurden zunächst die vermeintlich aktive Substanz **33a** bzw. **34a** sowie das inaktive Analogon **33b** bzw. **34b** über die freie Aminogruppe an eine NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt. Nach Sättigung der freien Bindestellen durch Zugabe eines Tris-Puffers, wurde die immobilisierte Substanz für 1 h mit einem HeLa-Lysat inkubiert. Durch stringentes Waschen wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Spezifisch gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 1 mM Centrocountin 1 bzw. dem weniger aktiven (S)-Enantiomer eluiert. Durch eine Methanol/Chloroform-Fällung (Wessel & Flugge, 1984) konnten die eluierten Proteine konzentriert werden. Anschließend erfolgte die Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Zur anschließenden Massenanalyse wurden die Proteinbanden aus dem Gel herausgeschnitten und über Nacht mit Trypsin verdaut. Zur Proteinidentifikation wurden die tryptischen Peptide durch Dr. Petra Janning und Dipl.-Ing. Andreas Brockmeyer mittels nano-HPLC/MS/MS aufgetrennt und analysiert (Abbildung 35).

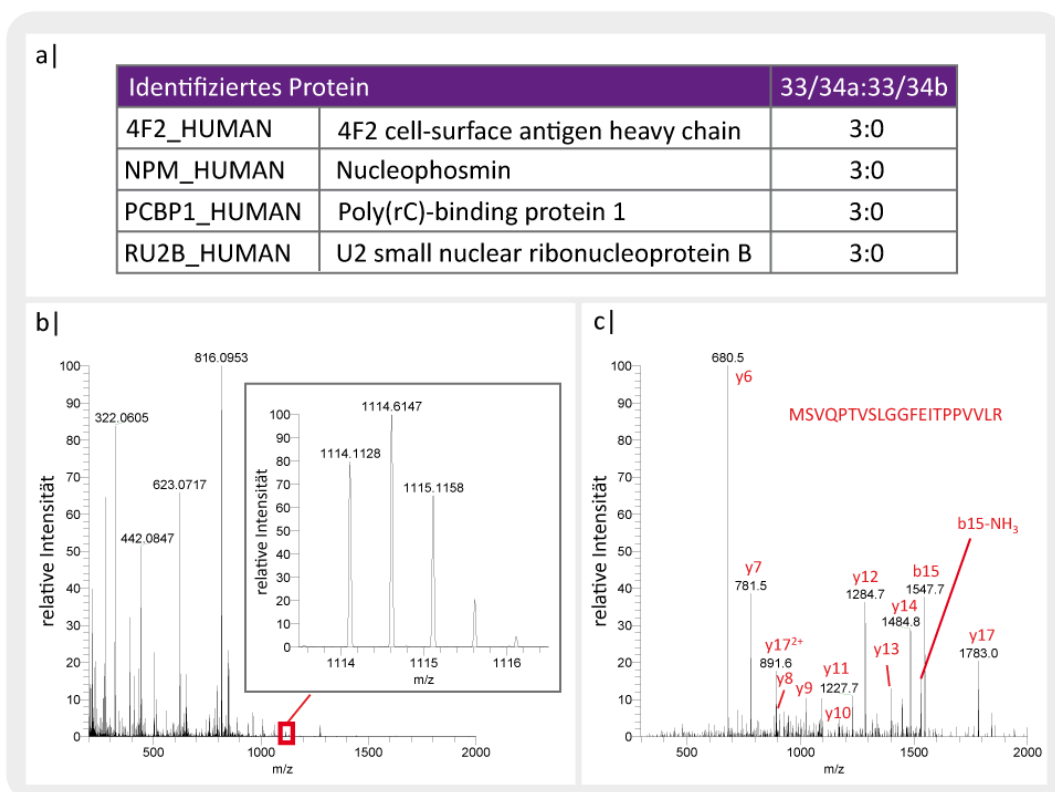


Abbildung 35: Ergebnisse der Affinitätschromatographie für die Moleküle 33a und 34a

a) Liste der identifizierten Proteine, welche in drei Affinitätschromatographien mit dem (R)-Enantiomer des Moleküls **33** bzw. **34** jedoch nicht mit dem (S)-Enantiomer gefunden wurden. b) Identifikation von tryptischen Peptiden mit Hilfe von HPLC-MS/MS. Gezeigt ist ein repräsentatives Massenspektrum mit einer Retentionszeit von 110.36-113.57 min. Das rote Rechteck markiert den vergrößerten Teil des Spektrums, welcher für die MS/MS-Fragmentierung genutzt wurde. c) MS/MS Fragmentierung als Beispiel für die Identifikation des Peptid-Fragments MSVQPTVSLGGFEITPPVVLRL, welches charakteristisch für das humane Nucleophosmin ist. Die γ -Serie (geladene Peptid-Fragmente am C-Terminus (Roepstorff Nomenklatur)) und zwei in hohem Maße vorhandene Peptid-Fragmente der b-Serie (geladen am N-Terminus) sind rot markiert.

Die Datenanalyse erfolgte mit der SwissProt Datenbank (Version 56.7) unter Verwendung des MOWSE Algorithmus (Perkins et al., 1999). Als Signifikanz-Grenzwert wurde $p < 0.001$ gewählt. Abbildung 35a zeigt die identifizierten Zielproteine aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Ein repräsentatives Massenspektrum, sowie die MS/MS-Fragmentierung, welche beispielhaft für das Peptid MSVQPTVSLGGFEITPPVLR aus humanem Nucleophosmin ist, sind in Abbildung 35b und c dargestellt. Die Auswertung der einzelnen Experimente ergab, dass in allen drei unabhängigen Experimenten lediglich vier Proteine identifiziert werden konnten, welche an das (*R*)-Enantiomer (**33a/34a**) jedoch nicht an das (*S*)-Enantiomer (**33b/34b**) gebunden hatten. Hierbei handelte es sich um 4F2 („4F2 cell-surface antigen heavy chain“), NPM (Nucleophosmin), PCBP1 („Poly(rC)-binding protein 1“) und RU2B („U2 small nuclear ribonucleoprotein B“).

4.3. Validierung von Nucleophosmin

Nach der erfolgten Zielprotein-Identifizierung wurde zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt, um eine mögliche Verbindung der detektierten Proteine mit dem beobachteten Phänotyp zu finden. Dabei ergab sich, dass eine Störung des nukleolaren Phosphoproteins Nucleophosmin (NPM) durch RNA-Interferenz (RNAi) zu einem mitotischen Arrest führt. Des Weiteren sind Defekte bei der Chromosomen-Anordnung, dem Aufbau der Mitose-Spindel und der Centrosomen sowie der Kinetochor-Mikrotubuli-Anhaftung zu beobachten (Amin et al., 2008). Ein weiterer interessanter Aspekt war die Verbindung von Nucleophosmin zu dem nuklearen Export-Rezeptor CRM1. Wird dieser durch Leptomycin B gehemmt, entstehen überzählige Centrosomen und multipolare Spindeln (Kudo et al., 1999). Da die anderen identifizierten Proteine zum einen keinen Zusammenhang zu dem durch Centrocuntin induzierten Phänotyp aufwiesen, zum anderen durch statistische Auswertungen aller in der Abteilung durchgeführten Affinitätsreinigungen als unspezifische Binder ausgemacht wurden, sollte im weiteren Verlauf NPM als mögliches Zielprotein bestätigt werden. Des Weiteren war von Interesse, ob Centrocuntin möglicherweise den Komplex aus NPM und CRM1 beeinflusst.

4.3.1. Immundetektion identifizierter Zielproteine

Zur Validierung von NPM als Zielprotein sollte dieses zunächst nach erfolgter Affinitätschromatographie mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Mit der gleichen

Methode sollte ebenfalls herausgefunden werden, ob auch CRM1 bzw. der NPM-CRM1-Komplex im Rahmen der Affinitätsreinigung gebunden wird. Ebenso sollte eine konzentrationsabhängige Kompetition der beiden Proteine gezeigt werden. Hierzu wurde eine modifizierte Affinitätsreinigung durchgeführt, bei der die verwendeten Zelllysate mit unterschiedlichen Konzentrationen von Centrocountin 1 vorinkubiert wurden. Dieser Überschuss an Centrocountin 1 sollte dazu führen, dass die Zielproteine bereits im Lysat gebunden werden, bevor sie die Möglichkeit haben, an die Affinitätssonde zu binden. Nach erfolgter Affinitätsreinigung wurden die gebundenen Proteine durch Aufkochen der Sepharose in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die Proteine von Interesse mittels spezifischer Antikörper gegen NPM und CRM1 detektiert (Abbildung 36). Genau wie bei der Affinitätsreinigung zur Massenanalyse wurde auch dieser Versuch mit der vermeintlich aktiven Substanz **34a** (Abbildung 36a) und als Kontrolle mit dem vermeintlich inaktiven Enantiomer **34b** (Abbildung 36b) durchgeführt. Dementsprechend wurde zur Verdrängung der Proteine in der „Negativ-Kontrolle“ das (S)-Enantiomer von Centrocountin 1 eingesetzt.

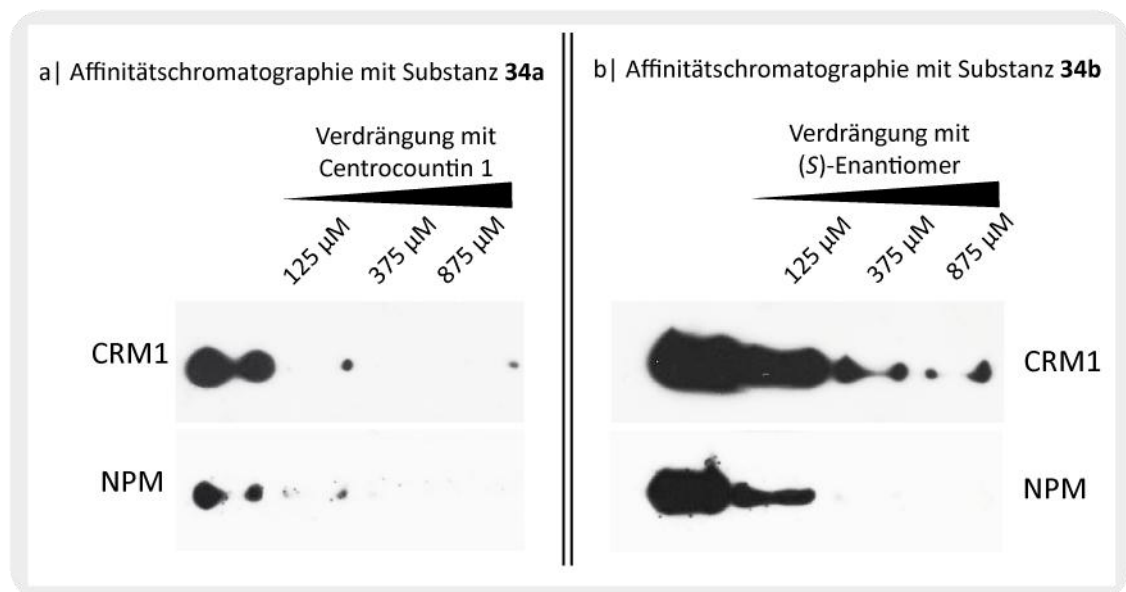


Abbildung 36: Validierung der Proteine NPM und CRM1 mittels Immundetektion

a| Das Molekül **34a** wurde an einer NHS-Sepharose immobilisiert und mit einem HeLa-Lysat inkubiert. Alternativ wurden die Lysate mit steigender Konzentration an Centrocountin 1 vorinkubiert, um so eine Kompetition des gebundenen Proteins zu bewirken. **b|** Das Molekül **34b** wurde an einer NHS-Sepharose immobilisiert und mit einem HeLa-Lysat inkubiert. Alternativ wurden die Lysate mit steigender Konzentration des (S)-Enantiomers von Centrocountin 1 vorinkubiert, um so eine Kompetition des gebundenen Proteins zu bewirken. Die gebundenen Proteine wurden bei **a|** und **b|** durch Aufkochen der Sepharose eluiert und mittels SDS-PAGE getrennt. Nach erfolgter Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden CRM1 und NPM mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal[®] West Femto Reagenz auf einem Röntgenfilm.

Die Konkurrenz von CRM1 und NPM durch einen Überschuss von Centrocountin 1 im Zelllysate konnte erfolgreich nachgewiesen werden. So führte eine steigende Konzentration von Centrocountin 1 im Zelllysate zu einer geringeren Intensität der nachgewiesenen Proteine. Sowohl bei CRM1, als auch bei NPM reichte eine Substanzkonzentration von 125 μM aus, um die Bindung des Proteins an das immobilisierte Molekül zu verhindern. Allerdings konnten NPM und CRM1 auch in der Affinitätschromatographie mit der „Negativkontrolle“ nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte eine Verdrängung mit dem (*S*)-Enantiomer ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Effekt. Allerdings war eine Verdrängung von NPM hier erst bei einer Konzentration des (*S*)-Enantiomers von 375 μM erfolgreich und im Fall von CRM1 konnte keine vollständige Verdrängung nachgewiesen werden. Eine Überprüfung der Substanzen in einem HPLC-Experiment ergab, dass eine partielle Racemisierung der Moleküle stattgefunden hatte (Dückert, 2011), so dass die beobachteten Bindungen an das (*S*)-Enantiomer durch eine Verunreinigung mit dem aktiven (*R*)-Enantiomer erklärt werden konnten.

4.3.2. Fluoreszenz-gekoppelte *in vivo* Bindungsstudien

Eine Möglichkeit, eine Bindung zwischen Centrocountin und den identifizierten Proteinen *in vivo* nachzuweisen, bestand in der Durchführung der Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM). Hierzu wurde zunächst von Dr. Heiko Dücker eine mit Cy3 modifizierte Substanz synthetisiert (Abbildung 37a). Genau wie bei den Affinitätssonden konnte auch hier eine partielle Racemisierung der enantiomerenreinen Substanzen beobachtet werden (Dücker, 2011), so dass im Folgenden nicht mit einem reinen Enantiomer gearbeitet werden konnte. Analog zur Affinitätsreinigung musste auch hier untersucht werden, inwiefern diese Substanz zellpermeabel ist. Dies wurde durch Inkubation der Substanz **35** mit HeLa-Zellen getestet (Abbildung 37b). Da die Aufnahmen von Substanz **35** die Lokalisierung an das endoplasmatische Retikulum (ER) vermuten ließen, wurde dies durch die Verwendung eines ER-Markers überprüft. Die Überlagerung der beiden Bilder konnte die anfängliche Vermutung bestätigen. Des Weiteren wurden verschiedene fluoreszierende Fusionskonstrukte von Nucleophosmin hergestellt. So wurde die NPM-Sequenz mittels PCR aus dem pOTB7-Plasmid amplifiziert und gleichzeitig Schnittstellen für *HindIII* und *BamHI* bzw. *XhoI* und *BamHI* eingefügt. Die NPM-cDNA wurde dann in pECFP-N1 bzw. pECFP-C1 und pEYFP-N1 ligiert. Ein NPM-Konstrukt mit einem C-terminalen mCitrine wurde im Rahmen dieser Arbeit von der Dortmund Protein Facility (DPF) hergestellt. Zur Konstruktion eines EYFP-

CRM1 wurden die Plasmide pET3a/CRM1 und pEYFP-C1 mit den Restriktionsenzymen *NdeI* bzw. *BspEI* geschnitten. Die 5'-Enden wurden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes aufgefüllt, um glatte Enden zu erzeugen. Anschließend wurden beide Plasmide mit *BamHI* geschnitten und die CRM1-cDNA in den pEYFP-C1 Vektor ligiert. Die verschiedenen DNA-Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert.

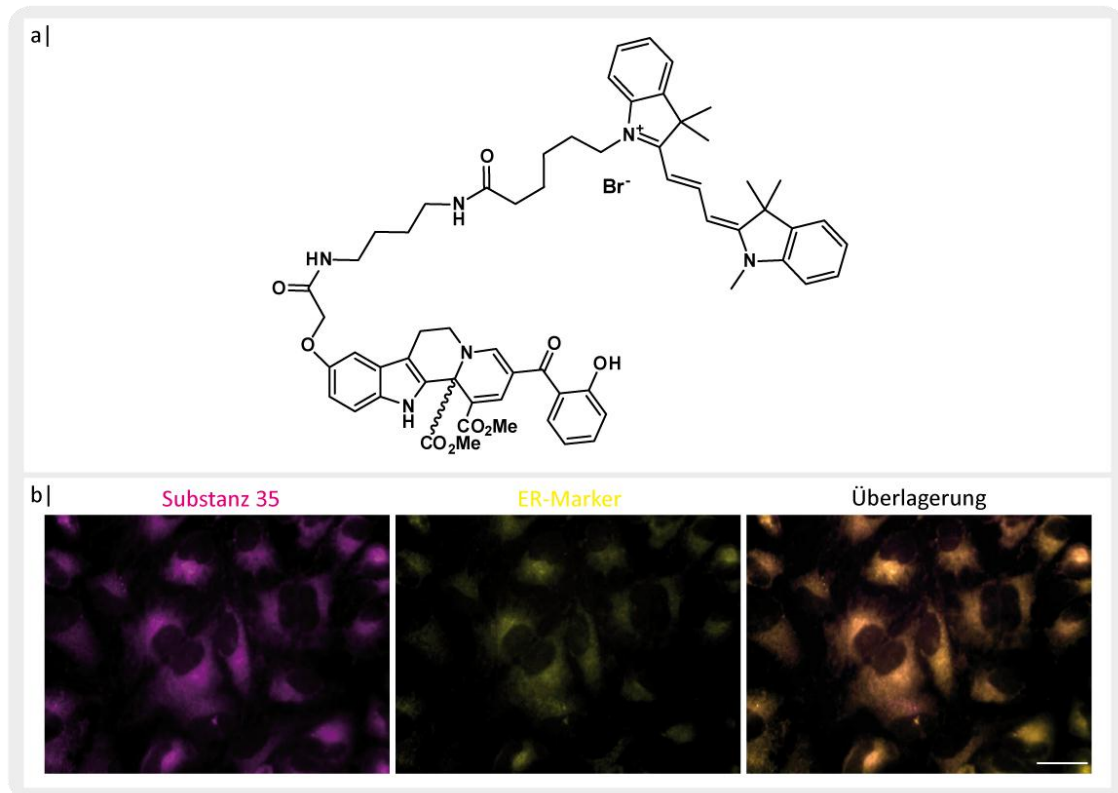


Abbildung 37: Analyse der zellulären Lokalisation des Cy3-modifizierten Centrocountins 35

a) Struktur des Cy3-modifizierten Centrocountins **35**. b) HeLa-Zellen wurden über Nacht mit 1 μM Substanz **35** inkubiert. Vor dem Fixieren wurden die Zellen für eine halbe Stunde bei 37 °C mit einem ER-Marker behandelt. Maßstabsbalken: 20 μm

Die Fluoreszenz-Lebensdauer der markierten Proteine von Kontrollzellen und Zellen, die 1 h lang mit 1 μM Substanz **35** behandelt wurden, wurde mit Hilfe eines Olympus Fluoview 1000 Mikroskops, ausgestattet mit einem „compact lifetime“ und „FCS upgrade kit“ für Laser Scanning Mikroskope, bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der SymPhoTime v5.12 Software (Abbildung 38). Die Ergebnisse der FLIM-Messungen zeigten für alle verwendeten Fusionsproteine einen Rückgang der Fluoreszenz-Lebensdauer nach der Inkubation mit Substanz **35**. Diese Abnahme ist auf einen Förster-Energie-Resonanz-Transfer (FRET) zwischen dem Donor ECFP, EYFP bzw. Citrine und dem Akzeptor Cy3, zurückzuführen. Obwohl der Unterschied zwischen den Kontrollen und den behandelten Zellen jeweils nur etwa 0.1 ns betrug, konnten diese Ergebnisse durch einen Zweistichproben-t-Test als statistisch signifikant bestätigt werden.

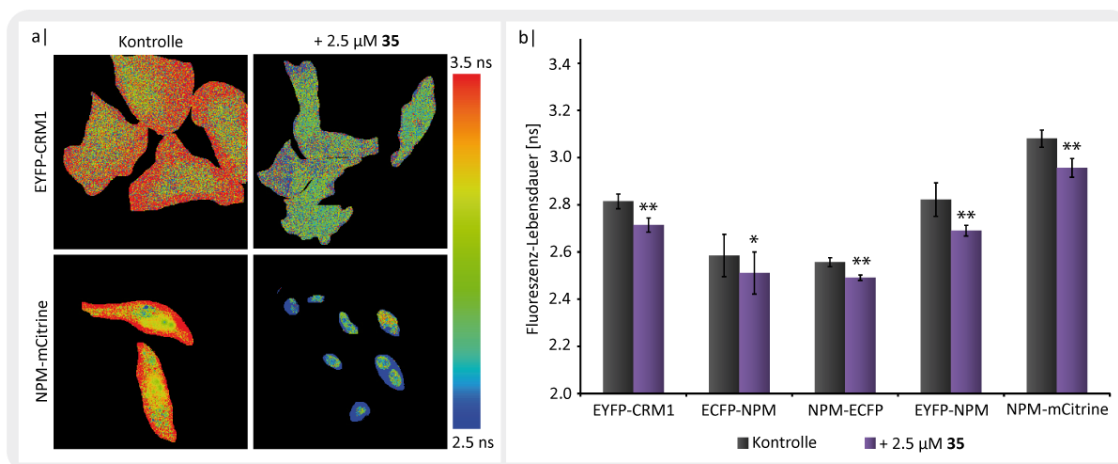


Abbildung 38: *In vivo* Bindungsstudien von Centrocountin 35 und NPM bzw. CRM1 mittels FLIM

a) Beispielhafte Aufnahmen der Lebensdauer von EYFP-CRM1 und NPM-mCitrine in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit EYFP-CRM1 und NPM-mCitrine transfiziert. 24 h später wurde die Lebensdauer der Fluorophore bestimmt, bzw. die Zellen mit 2.5 µM Molekül **35** behandelt und anschließend die Lebensdauer bestimmt. b) Repräsentative Auswertung drei unabhängig voneinander durchgeführter Experimente. Das Balkendiagramm zeigt die gemittelte Fluoreszenz-Lebensdauer der jeweiligen Fluorophore aus 10 verschiedenen Zellen ± Standardabweichung. Die Signifikanz der gemessenen Werte wurde mit Hilfe eines Zweistichproben-t-Tests bestimmt. * = $p < 0.005$, ** = $p < 0.001$.

4.3.3. Fluoreszenz-gekoppelte *in vitro* Bindungsstudien

Eine Möglichkeit die Bindung von Centrocountin **35** an NPM bzw. CRM1 *in vitro* zu analysieren und die Dissoziationskonstante (K_D) für die Bindung an die Proteine zu bestimmen, bot die Methode der Fluoreszenz-Polarisation (FP). Fluoreszenz-Polarisation nutzt linear polarisiertes Anregungslicht und misst den Grad der Polarisation des emittierten Lichts. Die Polarisation steigt mit abnehmender molekularer Rotation. Diese korreliert bei einer niedermolekularen Verbindung mit deren Bindung an ein Makromolekül (Jameson & Mocz, 2005). Um diese Bindungsanalyse durchzuführen, mussten zunächst His-NPM und CRM1 exprimiert und gereinigt werden, welche dann gegen die fluoreszierende Komponente, Substanz **35**, titriert wurden (Abbildung 39). Mit Hilfe der FP konnte eine Bindung sowohl von His-NPM als auch von CRM1 an Substanz **35** gezeigt werden (Abbildung 39a). Mittels folgender Formel (Kenakin, 1993)

$$F = F_{min} - (F_{min} - F_{max}) * \frac{(L + R + K_D) - \sqrt{[(L + R + K_D)^2 - 4 * L * R]}}{2 * L}$$

konnten K_D -Werte von $8.5 \mu\text{M} \pm 1.5$ für CRM1 und $17.4 \mu\text{M} \pm 1.6$ für His-NPM ermittelt werden. Da Aufgrund der zellulären Aktivität von Centrocountin **1** im niedrigen µM Bereich ein geringerer K_D -Wert erwartet wurde, lag die Vermutung nahe, dass eventuell eine zusätzliche unspezifische Bindung der Proteine allein an den Cy3-Farbstoff stattfand (Abbildung 39b).

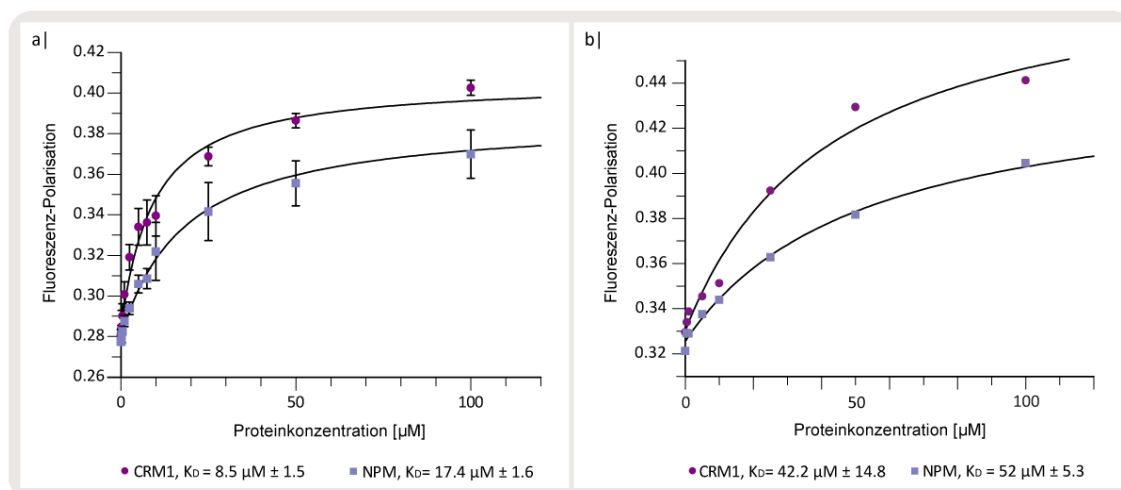


Abbildung 39: In vitro Bindungsstudien von Substanz 35 und NPM bzw. CRM1 mittels FP

a) Bindung von His-NPM und CRM1 an Substanz 35. Zur Ermittlung der Bindungskurven wurde 1 µM Substanz 35 vorgelegt und His-NPM bzw. CRM1 hinzu titriert. Die Polarisation wurde bei einer Anregung von 553 nm und einer Emission von 565 nm gemessen. Für jeden Datenpunkt wurden 15 Messungen durchgeführt und gemittelt. Die gemessenen Werte aus drei unabhängigen Versuchen wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Eine K_D-Berechnung mit Hilfe der GraFit 5 Software ergab 8.5 µM ± 1.5 für CRM1 und 17.4 µM ± 1.6 für NPM. **b)** Bindung von His-NPM und CRM1 an Cy3. Zur Ermittlung der Bindungskurven wurde 1 µM Cy3 vorgelegt und His-NPM bzw. CRM1 hinzu titriert. Die Polarisation wurde bei einer Anregung von 553 nm und einer Emission von 565 nm gemessen. Für jeden Datenpunkt wurden 15 Messungen durchgeführt und gemittelt. Für CRM1 konnte ein K_D-Wert von 42.2 µM ± 14.8 und für NPM ein Wert von 52 µM ± 5.3 berechnet werden.

Daher wurde dies anschließend überprüft. Die Messungen zeigten, dass auch eine schwächere Bindung der Proteine an Cy3 vorlag. Eine Berechnung der K_D-Werte ergab 42.2 µM ± 14.8 im Fall von CRM1 und 52 µM ± 5.3 für His-NPM.

4.3.4. Einfluss von Centrocountin 1 auf die Sekundärstruktur von NPM bzw. CRM1

Um festzustellen, ob die Bindung von Centrocountin 1 an die Proteine NPM und CRM1 möglicherweise eine Veränderung derer Sekundärstruktur hervorruft, wurde diese mit Hilfe der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) analysiert (Kap. 3.3.17). Hierzu wurden zunächst das pET3a-CRM1 Plasmid und das pET19b-NPM Plasmid in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt. Die Messung der CD-Spektren erfolgte in 10 mM NaP_i-Puffer pH 7.0 über einen Wellenlängenbereich von 175-260 nm. Jede Messung stellt 10 Akkumulationen dar (Abbildung 40). Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe von DichroWeb (Whitmore & Wallace, 2008) analysiert. Zur Berechnung der Sekundär-Struktur wurde die CDSSTR Methode (Compton & Johnson, 1986) angewandt. Die ermittelten Werte finden sich in Tabelle 6. Die berechneten Werte für NPM zeigen einen erhöhten Anteil von α-Helices nach der Bindung an Centrocountin. So ist der Anteil hier etwa zweimal so hoch wie bei His-NPM allein bzw. nach Zugabe des Lösungsmittels Trifluorethanol (TFE) allein.

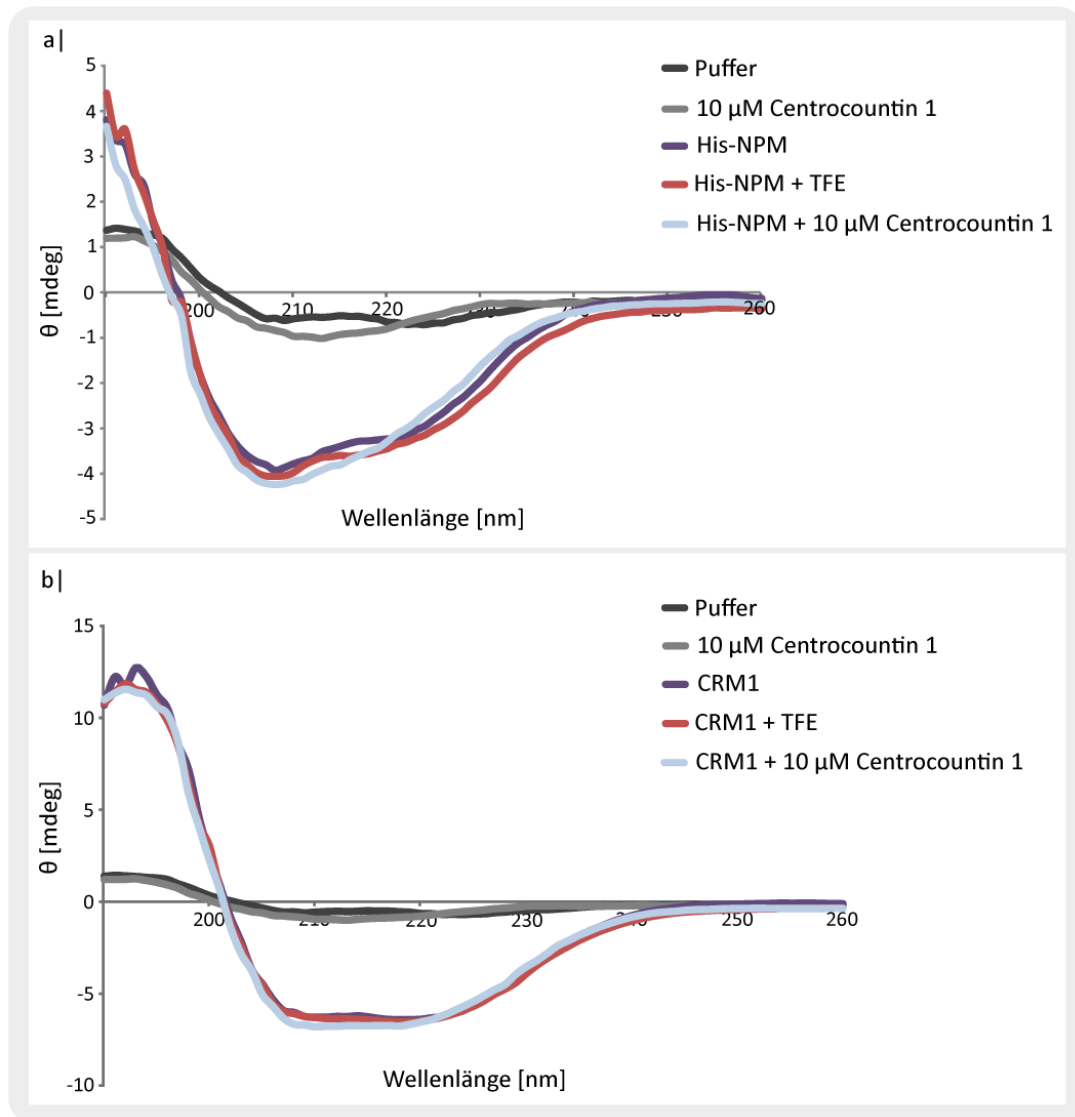


Abbildung 40: Einfluss von Centrocountin 1 auf die Sekundärstruktur von NPM bzw. CRM1

Zur Messung der CD-Spektren wurden 2 μM der Proteine NPM bzw. CRM1 in 10 mM NaP_i -Puffer pH 7.0 verwendet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte über einen Wellenlängenbereich von 175-260 nm. **a)** CD-Spektren des Puffers, von Centrocountin 1, His-NPM allein, His-NPM + TFE und His-NPM + Centrocountin 1. Die Daten sind das Ergebnis einer zehnfachen Akkumulation. **b)** CD-Spektren des Puffers, von Centrocountin 1, CRM1 allein, CRM1 + TFE und CRM1 + Centrocountin 1. Die Daten sind das Ergebnis einer zehnfachen Akkumulation.

Gleichzeitig ist ein Rückgang der β -Faltblatt Strukturen zu messen und der Anteil der β -Schleifen steigt um 10% an. Im Fall von CRM1 sind keine größeren Schwankungen der verschiedenen Bestandteile zu verzeichnen. Allgemein zeigen alle Messungen einen recht hohen Anteil an ungeordneten Elementen. Zusammenfassend deuten die Messungen darauf hin, dass die Bindung von Centrocountin 1 an NPM eine strukturelle Veränderung des Proteins zur Folge hat.

	α - Helix ₁	α - Helix ₂	β - Faltblatt ₁	β - Faltblatt ₂	β - Schleife	ungeordnet
NPM	7	1	24	11	15	42
NPM + TFE	4	4	26	11	19	35
NPM + 10 μ M Centrocountin	11	6	12	7	25	39
CRM1	6	0	18	12	19	41
CRM1 + TFE	4	6	20	12	24	33
CRM1 + 10 μ M Centrocountin	4	8	23	12	23	31

Tabelle 6: Berechnung der Sekundärstruktur-Anteile von NPM bzw. CRM1 mittels DichroWeb (Whitmore & Wallace, 2008)

Zur Berechnung der Sekundär-Struktur wurde die CDSSTR Methode (Compton & Johnson, 1986) angewandt. Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil der verschiedenen Bestandteile der Sekundärstruktur. α -Helix₁: reguläre α -Helix, α -Helix₂: verdrehte α -Helix, β -Faltblatt₁: reguläres β -Faltblatt, β -Faltblatt₂: verdrehtes β -Faltblatt.

4.3.5. Funktionelle Untersuchungen von NPM und CRM1

Zur Überprüfung des Einflusses der Centrocountine auf die Funktion von NPM sollte getestet werden, ob die Behandlung mit Centrocountin 1 eventuell zu einer veränderten Lokalisation des Proteins führt. Hierzu wurde zum einen ein spezifischer Antikörper gegen NPM genutzt, um behandelte, fixierte HeLa-Zellen anzufärben. Zum anderen wurde das hergestellte ECFP-NPM Konstrukt verwendet. Dieses wurde in HeLa-Zellen transfiziert, und die Zellen wurden anschließend mit Centrocountin 1 behandelt und mit Perifix fixiert. Sowohl die Färbung von NPM mittels eines spezifischen Antikörpers (Abbildung 41a), als auch der Einsatz des ECFP-NPM-Konstrukts (Abbildung 41b), zeigten eine hauptsächliche Lokalisation von NPM in den Nukleoli. Ein Unterschied zwischen der DMSO-Kontrolle und den mit Centrocountin 1 behandelten Zellen war nicht zu beobachten. Mit Hilfe des spezifischen Antikörpers konnte NPM außerdem an der mitotischen Spindel nachgewiesen werden, wenn auch nur mit geringer Intensität. Doch auch diese Färbung war weiterhin in behandelten Zellen zu verzeichnen.

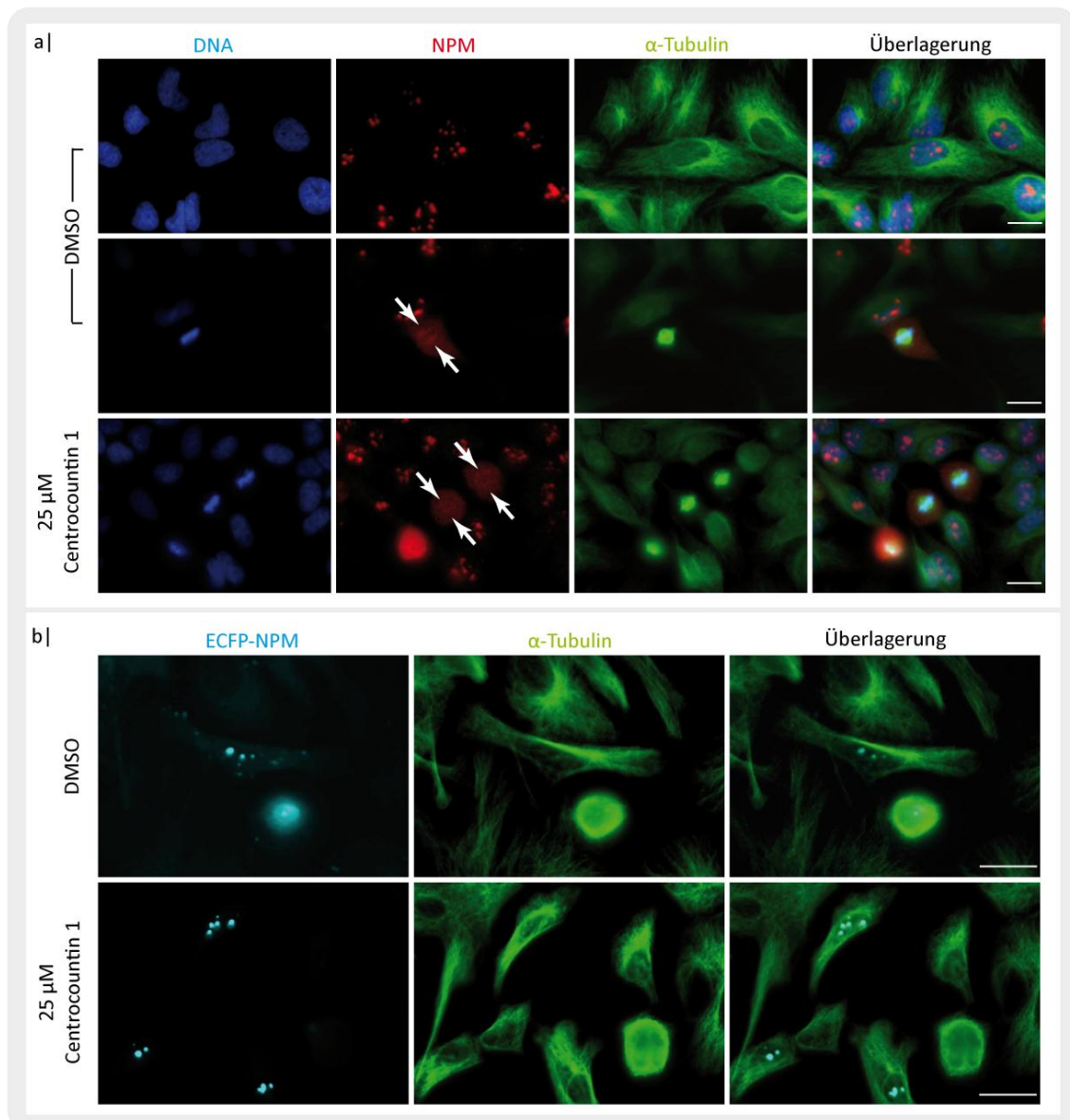


Abbildung 41: Einfluss von Centrocountin 1 auf die Lokalisierung von NPM in HeLa-Zellen

a) HeLa-Zellen wurden für 19 h mit 25 μ M Centrocountin 1 behandelt. Anschließend folgten die Fixierung mit Permfix sowie die Anfärbung von DNA, NPM und α -Tubulin mit Hoechst 33342 bzw. spezifischen Antikörpern. Maßstabsbalken: 20 μ m. b) HeLa-Zellen wurden mit dem ECFP-NPM Konstrukt transfiziert und anschließend mit Centrocountin 1 behandelt. Nach der Fixierung der Zellen mit Permfix wurden diese mit einem spezifischen Antikörper für α -Tubulin angefärbt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Um den Einfluss von Centrocountin 1 auf die Export-Funktion von CRM1 zu untersuchen, wurde der CRM1-abhängige Export des Ran-bindenden Proteins (RANBP1) analysiert. Hierzu wurden HeLa-Zellen für 19 h mit Centrocountin 1 behandelt, anschließend fixiert und die DNA mit Hoechst 33342 sowie RANBP1 mit einem spezifischen primären und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper angefärbt. Als Kontrolle wurden die Zellen außerdem für 1 h mit 10 nM Leptomycin B, einem bekannten Inhibitor von CRM1, behandelt (Abbildung 42).

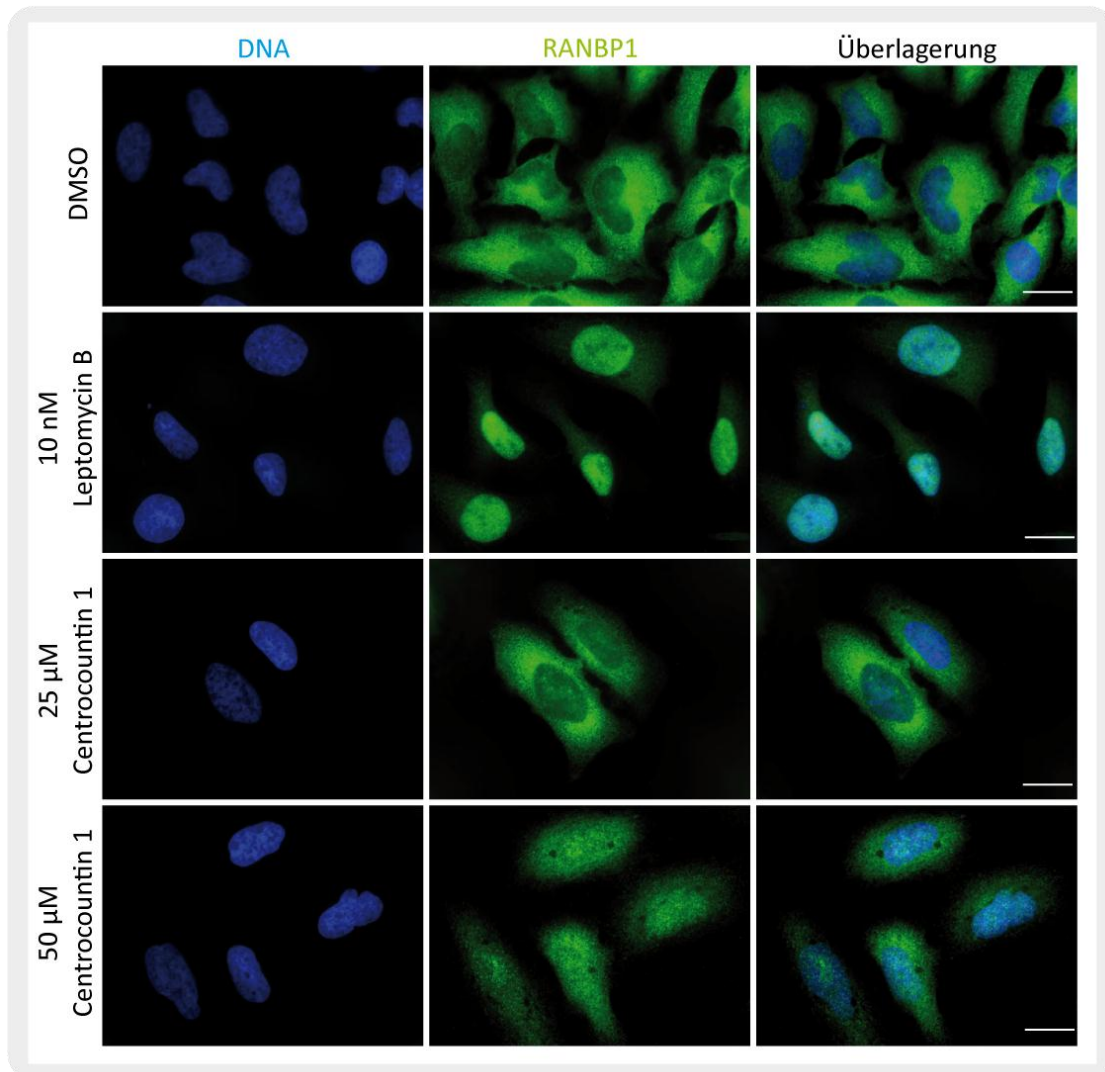


Abbildung 42: Einfluss von Centrocountin 1 auf den nuklearen Export von RANBP1 durch CRM1 in HeLa-Zellen
 HeLa-Zellen wurden für 1h mit 10 nM Leptomycin B bzw. für 19 h mit 25 μ M und 50 μ M Centrocountin 1 behandelt. Die DNA der fixierten Zellen wurde mit Hoechst 33342 angefärbt, RANBP1 mit einem spezifischen Antikörper aus Kaninchen. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Die Zellfärbung konnte zeigen, dass bei einer Substanzkonzentration von 25 μ M kein Effekt auf die nukleare Export-Funktion von CRM1 ausgeübt wird, da RANBP1 hauptsächlich ins Zytoplasma lokalisiert. Bei einer Konzentration von 50 μ M war eine Hemmung des nuklearen Exports von RANBP1 zu erkennen, welche zu einer Anhäufung von RANBP1 im Kern und einer Abnahme von RANBP1 im Zytoplasma führte. Ein Vergleich mit der Leptomycin B-Kontrolle verdeutlichte jedoch, dass noch keine vollständige Inhibition vorlag. Zusätzlich zu den immunzytochemischen Untersuchungen wurde die Proteinmenge der beiden Proteine überprüft. HeLa-Zellen wurden für 19 h mit ansteigender Konzentration an Centrocountin 1 behandelt und anschließend lysiert. Im Falle von NPM wurden die Lysate in eine Kern- und eine Zytoplasma-Fraktion getrennt, um so möglicherweise auf eine veränderte Lokalisation oder eine veränderte Zellkompartiment-spezifische Proteinmenge

schließen zu können. Die Proteine wurden in 4-20%igen Gradientengelen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Ladekontrolle für Zytoplasma bzw. Kernextrakte wurden GAPDH und Histon H3 verwendet. Außerdem wurde der Gehalt an phosphoryliertem Histon H3 (pHiston H3) nachgewiesen, um einen erhöhten Anteil von mitotischen Zellen nachzuweisen (Abbildung 43).

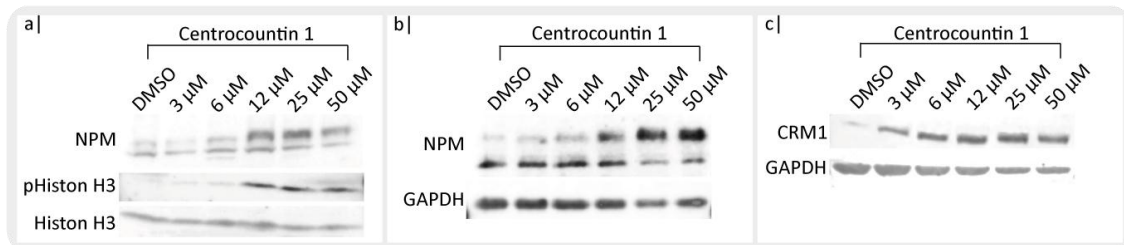


Abbildung 43: Analyse des Protein-Niveaus von NPM und CRM1 nach der Behandlung mit Centrocountin 1

HeLa-Zellen wurden für 19 h mit steigenden Konzentrationen an Centrocountin 1 behandelt und anschließend lysiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in 4-20%igen Gradientengelen. Nach der Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der verschiedenen Proteine mit spezifischen primären Antikörpern. Als sekundäre Antikörper dienten Antikörper, welche mit einem IRDye® gekoppelt waren. a) Immundetektion von NPM, pHiston H3 und Histon H3 in Kernextrakten von HeLa-Zellen. b) Immundetektion von NPM und GAPDH in Zytoplasma-Extrakten von HeLa-Zellen. c) Immundetektion von CRM1 und GAPDH in HeLa Lysaten.

Auch im Rahmen der Westernblot-Analyse konnte keine veränderte Lokalisation von NPM gezeigt werden. Auffallend war jedoch das Auftauchen bzw. die höhere Intensität einer zweiten Bande, welche etwas höher als die NPM-Bande lief. Durch die simultane Färbung von pHiston H3 konnte festgestellt werden, dass die erhöhte Intensität dieser Bande mit dem vermehrten Auftreten von mitotischen Zellen in Verbindung stand. Da NPM verschiedenen posttranslationalen Modifikationen unterläuft, könnte es sich bei dieser zusätzlichen Bande um eine Phosphorylierung, Sumoylierung oder Ubiquitinierung handeln. Für CRM1 konnte ein leichter Anstieg der Proteinmenge detektiert werden.

5. Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein vorwärts-gerichteter chemisch-genetischer Ansatz bei dem das Zytoskelett und die DNA von BSC-1-Zellen angefärbt wurden. Hierbei wurden Moleküle aus einer Indolochinolizin-Substanzbibliothek als mögliche Zellzyklus-Inhibitoren identifiziert (Menninger, 2009). Diese, Centrocountin genannten Substanzen, führten zu multipolaren mitotischen Spindeln und einer verlängerten Zellteilung. In ersten Analysen konnte eine Hemmung der Tubulin-Polymerisation *in vitro* ausgeschlossen werden. Dies war von besonderem Interesse, da zahlreiche bislang in der Klinik genutzte anti-mitotische Wirkstoffe Tubulin zum Ziel haben. Daher handelte es sich bei Centrocountin 1 um einen neuen Inhibitor der Zellteilung und eine Identifizierung des Zielproteins bzw. der Zielproteine war von großem Interesse.

5.1. Phänotypische Analysen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnten zunächst zur detaillierten Charakterisierung des von Centrocountin 1 induzierten Phänotyps beitragen. So konnte in HeLa-Zellen mit Histon H2B-mCherry und β -Tubulin-GFP bereits bei einer Substanzkonzentration von 1.5 μ M ein Anstieg der Zellen mit fehlorientierten Chromosomen in der Metaphase detektiert werden. Eine Steigerung der Konzentration führte auch zu einem erhöhten Anteil an Zellen mit einem Defekt in der Ausbildung der Metaphaseplatte. Erst bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 50 μ M war eine Anreicherung von mitotischen Zellen mit multipolaren Spindeln zu beobachten. Hochaufgelöste Lebendzell-Mikroskopie-Aufnahmen von U2OS- α -Tubulin-mCherry Zellen konnten zeigen, dass die Zellen nach Substanzbehandlung zunächst eine bipolare Spindel ausbildeten und erst im Verlauf der Mitose zusätzliche Spindelpole auftauchten, die abschließend zu multipolaren Teilungen führten. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass es möglicherweise zu einer Centrosomen-Überduplikation kommt. Eine andere Möglichkeit wäre eine Centrosomen-Fragmentierung in der Mitose. Hierzu würde auch die festgestellte unterschiedliche Zusammensetzung der multipolaren Spindelpole passen. So wiesen einige Pole eine Färbung für β -Tubulin, γ -Tubulin und CEP135 auf, während bei anderen eine centriolare Färbung fehlte und zusätzlich auch acentrosomale Pole detektiert werden konnten. Die Auflösung der Immunfluoreszenz-Aufnahmen lieferte keinen Aufschluss darüber, ob die Pole jeweils nur eine oder zwei Centriolen beinhalteten. Die Defekte in der Chromosomen-Anordnung und beim Auf-

bau der bipolaren Spindel führten zur Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes. Dies wurde durch einen höheren BUB1-Gehalt der mit Centrocountin 1 behandelten HeLa-Zellen nachgewiesen. Eine Untersuchung des Interkinetochor-Abstandes zeigte, dass der Anstieg der BUB1-Konzentration auf eine fehlende Spannung zwischen Kinetochoren und Mikrotubuli zurückzuführen war, was wiederum einen mitotischen Arrest zur Folge hatte. Dieser konnte mittels Durchflusszytometrie von mit Propidiumiodid und pHiston H3 gefärbten HeLa-Zellen belegt werden. Auch die Lebendzell-Mikroskopie von HeLa Histon H2B-GFP Zellen zeigte eine verlängerte Mitose. Nach einer Behandlung mit Centrocountin 1 war die Dauer der Zellteilung im Gegensatz zu Kontrollzellen etwa sechsmal so lang. Ein interessanter Mechanismus, welcher eine Verbindung zwischen den einzelnen Beobachtungen herstellen könnte, wurde in CHO („Chinese Hamster Ovary“)-Zellen beschrieben (Hut et al., 2003). So konnte gezeigt werden, dass Zellen mit unvollständig replizierter oder beschädigter DNA bei gleichzeitigem Vorhandensein eines defekten G2/M-Kontrollpunktes, während der Mitose zusätzliche Centrosomen-ähnliche Strukturen ausbildeten. Des Weiteren wurde festgestellt, dass es sich bei diesen Strukturen, um eine Fragmentierung der bestehenden Centrosomen handelte und jeder dieser Pole nur eine Centriole enthielt. Diese zusätzlichen Centrosomen-Strukturen führten zur Ausbildung von multipolaren Spindeln. Zwar kam es zu einer verzögerten Mitose, der Fortgang des Zellzyklus war jedoch nicht blockiert, so dass die Tochterzellen entweder nach der Cytokinese starben, mehrkernige Zellen gebildet wurden oder mehrere Tochterzellen entstanden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die zusätzlichen Centrosomen nicht durch die verlängerte Mitose gebildet wurden, sondern direkt auf die beschädigte DNA zurückzuführen waren. So wäre es denkbar, dass Centrocountin 1 durch Bindung an NPM DNA-Schäden hervorruft. Ein gleichzeitig geschwächter G2/M-Kontrollpunkt, würde den Eintritt in die Mitose zulassen. Die geschädigte DNA könnte dann wie oben beschrieben zu zusätzlichen Centrosomen und multipolaren Teilungen führen (Abbildung 46).

Ein Rückgang der Zellproliferation von mit Centrocountin 1 behandelten HeLa-Zellen nach 19 h war auf das Anhalten des Zellzyklus sowie die einsetzende Apoptose zurückzuführen. Ein wichtiger Punkt in der Entwicklung eines Wirkstoffes ist, ob die induzierten Effekte zelltypspezifisch oder zumindest nur in Krebszellen zu beobachten sind. Aus diesem Grund wurden weitere Krebszelllinien sowie eine nicht-transformierte Linie auf den beschriebenen Phänotyp hin untersucht. Die fehlorientierten Chromosomen und die zusätzlichen Spindelpole waren nicht nur in HeLa-Zellen zu beobachten, sondern auch in den acht weiteren getesteten Zelllinien. Dies zeigte, dass es sich nicht um einen zelltypspezifischen Ef-

fehlern konnte. Da auch die nicht transformierte Zelllinie BSC-1 diesen Phänotyp aufwies, konnte zusätzlich ausgeschlossen werden, dass lediglich Krebszellen auf die Behandlung mit Centrocountin 1 reagierten. Interessanterweise war zwar bei allen getesteten Zelllinien ein Defekt bei der Ausbildung der Metaphaseplatte und der Spindel zu beobachten, die Reaktion auf diese Defekte war jedoch innerhalb der Zelllinien unterschiedlich. So zeigten die Brustkrebszellen MCF7 einen Anstieg der Apoptose und eine verringerte Zellproliferation, jedoch keinen Arrest in der G2/M-Phase. Bei der Darmkrebslinie SW480 war kein Einfluss auf Apoptose und Zellproliferation zu verzeichnen. Allerdings konnten ein mitotischer Arrest und ein Anstieg des Anteils der Zellen mit einem geringeren DNA-Gehalt als 2N beobachtet werden. Die Darmkrebslinie HT29 hingegen zeigte bei einer Centrocountin 1-Konzentration von 50 μM eine deutlich erhöhte Caspase-3/7-Aktivität sowie einen Arrest in der G2/M-Phase. Bei 25 μM Centrocountin 1 war kein Arrest zu beobachten, jedoch ein Anstieg der Zellen mit einem DNA-Gehalt von $>4\text{N}$. Die Zellproliferation war bei jeder getesteten Konzentration unverändert. In den Prostatakrebszellen PC3 waren eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Apoptose sowie ein leichter Rückgang der Zellproliferation zu verzeichnen. Die Analyse der Zellzyklus-Phasen ergab einen höheren Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt $>4\text{N}$. Die aus einem Osteosarkom isolierten Saos-2-Zellen reagierten bei 50 μM Centrocountin mit einer gesteigerten Caspase-3/7-Aktivität und mit einer Verringerung der Zellproliferation, welche bereits bei niedrigen Substanzkonzentrationen beobachtet werden konnte. Des Weiteren konnte eine geringe Ansammlung der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4N festgestellt werden. Bei der nicht-transformierten BSC-1-Zelllinie konnten eine konzentrationsabhängige gesteigerte Caspase-3/7-Aktivität sowie eine verminderte Zellproliferation festgestellt werden. Ein durch Centrocountin 1 verursachter Einfluss auf den Zellzyklus war nicht zu beobachten. Die untersuchten Darmkrebszellen HCT-116 zeigten eine Erhöhung der Apoptose und einen extremen Rückgang der Zellproliferation bis auf 40%. Der Zellzyklus blieb auch hier unbeeinflusst. Die gleiche Zelllinie jedoch als p53-defiziente Variante zeigte in Abhängigkeit von der steigenden Substanzkonzentration einen Anstieg der Apoptose sowie eine verringerte Zellproliferation. Ebenso bewirkte Centrocountin 1 hier einen geringen Arrest in der G2/M-Phase. Eine Möglichkeit für die fehlende Detektion eines Zellzyklus-Arrests in den meisten Zelllinien könnte in deren unterschiedlichen Verdoppelungs-Zeiten liegen. Bei der Behandlung von HeLa-Zellen war ein deutlicher G2/M-Arrest bereits nach 19 h zu verzeichnen, so dass dieser Fixierungszeitpunkt auch für alle weiteren getesteten Zellen gewählt wurde. HeLa-Zellen benötigen für das Durchlaufen eines Zellzyklus etwa 24 h, während PC3- und

Saos-2-Zellen über 35 h benötigen. So könnte es sein, dass ein Anhalten des Zellzyklus hier besser zu einem späteren Zeitpunkt festgestellt werden könnte. Die BSC-1- und HCT-116-Zelllinie haben einen Generationszyklus von 16-18 h, was dazu beitragen könnte, dass ein mitotischer Arrest hier bereits einige Zeit vor der Fixierung eingesetzt hatte und die Zellen nach 19 h bereits apoptotisch reagierten. Auch Gascoigne & Taylor beschrieben dieses Problem bei der Untersuchung von anti-mitotischen Wirkstoffen (Gascoigne & Taylor, 2009). Viele Studien benutzen Durchflusszytometrie, Immunoblots oder Immunfluoreszenz zur Analyse von anti-mitotischen Substanzen. All diese Methoden sind jedoch nur Momentaufnahmen und geben keine Information über die Geschichte jeder beliebigen Zelle oder deren kinetische Antwort auf eine Substanzbehandlung. Daher ist es auch nicht möglich einen Zusammenhang zwischen der Mitose und einem eventuell beobachteten Zelltod herzustellen. So zeigten MCF7-Zellen zwar eine Induktion der Apoptose jedoch keinen Arrest. Dies könnte bedeuten, dass die fehlorientierten Chromosomen in dieser Zelllinie nicht zu einer Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes führten. Die Zellen also entweder direkt in der Mitose starben oder die Mitose weiter durchliefen jedoch ohne abschließende Cytokinese und erst in der nächsten Interphase apoptotisch wurden. Bei HT29-Zellen war bei 25 μM Centrocourtin 1 eine erhöhte Anzahl von Zellen mit einem DNA-Gehalt von $>4\text{N}$ zu verzeichnen, während bei 50 μM ein mitotischer Arrest sowie ein Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität festgestellt wurde. Dies deutet darauf hin, dass bei einer Konzentration von 25 μM ebenfalls keine Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes vorlag und die Zellen den Zellzyklus ohne eine Teilung beendeten, was zu mehrkernigen Zellen führte. Bei einer höheren Substanzkonzentration wurde ein Arrest in der G2/M-Phase eingeleitet, jedoch war es auch hier möglich, dass die Zellen entweder direkt in der Mitose oder erst im darauf folgenden Zellzyklus in die Apoptose übergingen. Bei den getesteten SW480-Zellen war interessant zu beobachten, dass es zwar einen mitotischen Arrest gab, die Zellen jedoch keine Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität oder eine Verringerung der Zellproliferation aufwiesen. So war anzunehmen, dass die Zellen sich trotz der Behandlung mit Centrocourtin 1 weiterhin teilten. Ein möglicher Grund für die Varianzen unter den verschiedenen Zelllinien wurde zunächst in den unterschiedlichen p53-Proteinmengen der Zellen vermutet. So ist bekannt, dass bei einem Scheitern der Cytokinese ein p53-abhängiger Kontrollpunkt aktiviert wird, welcher in Anwesenheit von p53 die Zellen arretiert, so dass diese schließlich sterben (Fukasawa, 2007). Im Gegensatz dazu führt eine Abwesenheit von p53 zu einer Vollendung des Zellzyklus. Viele dieser Zellen werden mehrkernig und sterben während der Zellalterung. Manche Zellen können diesem Mechanismus

jedoch entkommen und bleiben polyploid. Da das Vorkommen von mehr als zwei homologen Chromosomen-Sets (Polyploidie) allerdings Chromosomen destabilisiert, verlieren oder gewinnen die polyploiden Zellen Chromosomen, was zur Aneuploidie führt. Da die getesteten HeLa-, Saos-2- und HCT-116 p53^{-/-}-Zellen eine Inaktivierung von p53 bzw. kein p53 aufweisen und trotzdem zu einem Arrest in der Lage sind, ist der beschriebene p53-abhängige Kontrollpunkt keine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der getesteten Zelllinien. Auch die Möglichkeit, dass Zellen welche durch eine Chromosomen-Instabilität (CIN) charakterisiert sind, einen defekten oder geschwächten Spindel-Kontrollpunkt aufweisen und somit nicht in der Lage sind auf Störungen, wie eine Schädigung der DNA, mit einem Arrest zu reagieren (Weaver & Cleveland, 2005) konnte nicht bestätigt werden. Die getesteten HT29- und SW480-Zellen gehören zu diesen CIN-Zelllinien und trotzdem konnte ein Anhalten in der G2/M-Phase festgestellt werden. Diese Beobachtungen stimmten jedoch mit Ergebnissen von Gascoigne & Taylor überein, welche die Reaktion von 15 verschiedenen Zelllinien auf eine Behandlung mit anti-mitotischen Wirkstoffen untersucht hatten (Gascoigne & Taylor, 2008). Eben diese Analysen konnten zur Aufstellung einer Hypothese beitragen warum Zellen verschiedener Zelllinien oder sogar einer Zelllinie ein unterschiedliches Schicksal nach einem mitotischen Arrest durchlaufen. So wird angenommen, dass das Schicksal einer Zelle von zwei konkurrierenden unabhängigen Signalwegen beeinflusst wird: zum einen die Aktivierung des Zelltod-Signalweges, zum anderen der Schutz vor einem Cyclin B-Abbau. Beide Signalwege verfügen möglicherweise über einen Schwellenwert und das Schicksal einer Zelle entscheidet sich durch den Schwellenwert, der als erstes überschritten wird. Dies bedeutet, fällt das Cyclin B-Level unter den Grenzwert für einen Austritt aus der Mitose, kommt es zu einem „Herausschlüpfen“ aus der Mitose. Wird der Grenzwert für den Zelltod-Signalweg zuerst überschritten, stirbt die Zelle in der Mitose. Diese Hypothese könnte auch eine Erklärung dafür bieten, warum zwar bei allen getesteten Zelllinien Defekte in der Chromosomen-Anordnung und dem Spindel Aufbau detektiert werden konnten, jedoch einige mit einem mitotischen Arrest darauf reagieren, während andere einen Anstieg der Apoptose aufweisen.

5.2. Zielprotein-Identifizierung

Da der Zellzyklus durch zahlreiche unterschiedliche Mechanismen reguliert wird, gibt es eine Vielzahl von Proteinen, deren Ausschalten oder Störung zu dem beschriebenen Phänotyp führt. Basierend auf wissenschaftlichen Hypothesen wurden so zunächst Tubulin, 24

Zellzyklus-relevante Kinasen sowie die CDC25-Phosphatase näher untersucht. Eine Überprüfung der *in cellulo* Tubulin-Polymerisation konnte die Ergebnisse des *in vitro* Testsystems (Menninger, 2009), dass keine Hemmung der Polymerisation vorliegt, bestätigen. Auch die Aktivitäts-Analysen der Kinasen und der CDC25a-Phosphatase brachten keinen Nachweis für einen Einfluss von Centrocountin 1. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass *in vitro* zwar keine Hemmung gezeigt werden konnte, dies aber nicht bedeutet, dass Centrocountin 1 auch *in vivo* keinen Einfluss ausübt. Lediglich für die Kinase Aurora B konnte dies durch eine Färbung von phosphoryliertem Histon H3 bestätigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass mit Hilfe dieser Untersuchungen nur mögliche Proteine ausgeschlossen werden konnten, wurde das Zielprotein im weiteren Verlauf mit Hilfe der Affinitätschromatographie identifiziert. Im Rahmen dieses Versuchsansatzes konnten 4F2 („4F2 cell-surface antigen heavy chain“), NPM (Nucleophosmin), PCBP1 (Poly(rC)-bindendes Protein 1) und RU2B („U2 small nuclear ribonucleoprotein B) als mögliche Zielproteine der Centrocountine identifiziert werden. 4F2 und PCBP1 wurden basierend auf statistischen Auswertungen aller in der Abteilung durchgeführten Affinitätsreinigungen als Verunreinigung bzw. unspezifische Bindung bewertet. Während für RU2B kein offensichtlicher Zusammenhang mit der Mitose bzw. dem Zellzyklus geschlossen werden konnte, stellte NPM ein vielversprechendes Zielprotein dar. Dieser erste Hinweis konnte durch die Immundetektion von NPM nach erfolgter Affinitätschromatographie sowie durch dessen konzentrationsabhängige Verdrängung weiter bestätigt werden. Ebenso konnte ein bekannter Bindungspartner von NPM, der nukleare Export-Rezeptor CRM1, in diesen Analysen identifiziert werden. Allerdings konnte im Rahmen dieser Untersuchungen auch eine Bindung von NPM und CRM1 an das (S)-Enantiomer der Affinitätssonde bzw. von Centrocountin 1 gezeigt werden. Für diese Beobachtung könnte es verschiedene Gründe geben. Zum einen zeigten die Affinitätssonden eine partielle Racemisierung, was dazu führte, dass das (S)-Enantiomer mit dem aktiven (R)-Enantiomer „verunreinigt“ wurde. Zum anderen ist es durchaus möglich, dass das (S)-Enantiomer auf zellulärer Ebene zwar keine Aktivität zeigt, aber durch seine lediglich andere räumliche Struktur, trotzdem eine Bindung mit dem Zielprotein eingehen kann. Ebenso ist anzumerken, dass bei dem (S)-Enantiomer kein kompletter Aktivitätsverlust, sondern eine wesentlich geringere Aktivität zu verzeichnen war, so dass die Bindung an das Zielprotein immer noch möglich ist.

5.3. *NPM – ein multifunktionales Protein ermöglicht verschiedene Wirkungsmechanismen von Centrocountinen*

Die Literaturrecherche ergab, dass NPM ein weit verbreitetes, hoch konserviertes, multifunktionales Phosphoprotein ist, welches sich in den Nukleoli befindet, sich jedoch schnell zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her bewegt (Yun et al., 2003). NPM wurde sowohl mit einer proliferativen als auch mit einer wachstumshemmenden Wirkung in Verbindung gebracht. Während es sich zwischen zellulären Kompartimenten hin und her bewegt, agiert es in verschiedenen zellulären Prozessen. Diese umfassen den Transport von prä-ribosomalen Partikeln und die Ribosomenbiogenese, die Antwort auf Stresssignale wie UV-Bestrahlung und Hypoxie, die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität durch Kontrolle der zellulären Ploidie und der Beteiligung in DNA-Reparatur-Prozessen sowie die Regulierung der DNA-Transkription durch Anpassung der Chromatinkondensations- und dekondensations-Ereignisse. Außerdem reguliert NPM die Aktivität und Stabilität von wichtigen Tumorsuppressoren, wie p53 und p14^{ARF} (Grisendi et al., 2006). Auch die Auswirkungen einer Störung von NPM durch RNA-Interferenz (RNAi) wurden bereits eingehend untersucht (Amin et al., 2008). So konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einem durch RNAi induzierten geringeren NPM Niveaus, morphologische Veränderungen ihrer Kernstruktur aufwiesen und keine Zellteilungen mehr durchliefen. Eine verminderte DNA-Synthese wurde eher als sekundärer Effekt der Einstellung der Zellteilung beurteilt, als ein direkter Eingriff in die DNA-Synthese. Eine Überprüfung des p53-Signalweges zeigte eine Aktivierung von p53 sowie dem nachgeschalteten p21^{WAF1/CIP1}. Außerdem wurde eine Unterdrückung von HPV18 E6 festgestellt, welches normalerweise zum Abbau von p53 führt. Ferner führte das Ausschalten von NPM zu einer Anhäufung von Zellen in der Prometa- und Metaphase, was von einer sechs- bis siebenfachen Erhöhung des mitotischen Index begleitet wurde. Ein erhöhter Anteil von BUBR1- und BUB1-positiven Zellen wies darauf hin, dass der mitotische Arrest durch eine Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes ausgelöst wurde. Arretierte mitotische Zellen wiesen hauptsächlich zwei verschiedene Defekte auf: nicht angeordnete Chromosomen (mehr als zehn Chromosomen waren nicht in der Metaphaseplatte angeordnet) und fehlorientierte Chromosomen (ein bis zehn Chromosomen waren nicht in der Metaphaseplatte angeordnet). Die Analyse der mitotischen Spindeln ergab entweder desorganisierte Spindeln (26 %) oder multipolare Spindeln (9 %), mit fragmentierten Centrosomen. Eine Kälte-Behandlung der Zellen führte zu instabilen mitotischen Spindeln. Des Weiteren konnten monotele (nur ein Schwester-Kinetochor wird von

den Mikrotubuli gebunden) und syntele (beide Kinetochore binden an Mikrotubuli, welche vom gleichen Pol ausgehen) Anhaftungen der Kinetochore beobachtet werden. Lebendzell-Mikroskopie-Aufnahmen konnten zeigen, dass die Mitose mit durchschnittlich 3 h etwa dreimal so lange dauerte, wie die Mitose von Kontrollzellen. Diese Analysen führten zu der Annahme, dass NPM nicht nur eine wichtige Rolle in der Zellproliferation einnimmt, sondern auch für die ordnungsgemäße Anordnung der Chromosomen während der Metaphase, für die Ausbildung einer funktionalen und stabilen Spindel mit intakten Centrosomen und für korrekte Kinetochor-Mikrotubuli Anhaftungen zuständig ist. Da diese Beschreibung des Phänotyps von NPM-gestörten Zellen in fast allen Punkten mit dem Centrocountin-Phänotyp übereinstimmt, wurde NPM als plausibles Zielprotein näher betrachtet. Deshalb werden im Folgenden die verschiedenen Funktionen von NPM näher betrachtet und mögliche Effekte von Centrocountin mit diesen in einen möglichen Zusammenhang gebracht.

Eine direkte Interaktion von p53 mit NPM reguliert dessen Stabilisierung und Aktivierung. Der genaue Mechanismus dieser Regulierung konnte jedoch nicht beschrieben werden. So ist es möglich, dass NPM als Chaperon eine Aggregation von p53 verhindert. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass NPM die korrekte zelluläre Lokalisation von p53 gewährleistet (Colombo et al., 2002). Ein weiterer indirekter Zusammenhang zwischen NPM und p53 konnte in NPM^{-/-} Maus Embryonen gezeigt werden (Colombo et al., 2005). In diesen Embryonen war eine gesteigerte Caspase-3-Aktivität sowie eine erhöhte Expression von p53 zu verzeichnen. Auch eine Stabilisierung von p53-Zielproteinen, wie p21^{WAF1/CIP1}, MDM2 und BAX, konnte nachgewiesen werden. Dies wies auf eine konstitutive Aktivierung von p53 in NPM^{-/-} embryonalen Zellen hin. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Aktivierung von p53 nicht von einer p14^{ARF}-Aktivierung abhängig war, sondern Teil des DNA-Struktur-Kontrollpunktes. Dieser involviert die Aktivierung von ATM/ATR Kinasen, Phosphorylierung von nachgeschalteten Zielproteinen, wie Histon H2AX und deren Ansammlung an DNA-Doppelstrang-Brüchen oder zerstörten Replikations-Gabeln. Somit scheint es, als wäre die p53-Aktivierung nur eine sekundäre Antwort auf den Verlust eines Kontrollpunktes für die DNA-Integrität in NPM^{-/-}-Zellen. Daher scheint es möglich, dass Centrocountin eine mögliche DNA-Reparatur-Funktion von NPM stört und dies zu einer Aktivierung von p53 und p21^{WAF1/CIP1} führt, was einen Zellzyklus-Arrest unterstützt (Abbildung 46).

Tatsächlich konnte eine Funktion von NPM im Rahmen der DNA-Reparatur nach UV-Bestrahlung gefunden werden (Wu et al., 2002). So konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden,

dass nach UV-Bestrahlung eine Erhöhung der NPM mRNA nachzuweisen ist. NPM RNAi-Experimente führten zu einem Anstieg von UV-induziertem Zellsterben. Des Weiteren konnte eine Hemmung der DNA-Reparatur und ein geringeres Expressionsniveau von PCNA („proliferating cell nuclear antigen“) beobachtet werden. Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation und in der DNA-Reparatur Maschinerie. Fraglich ist, ob NPM auch bei anderen zellulären Stress-Situationen eine Interaktion mit PCNA eingeht und so eine wichtige Funktion im allgemeinen Reparaturmechanismus der DNA einnimmt.

NPM ist unentbehrlich für die nukleolare Lokalisation des Tumorsuppressors p14^{ARF} (Colombo et al., 2005). Durch die ordnungsgemäße Lokalisation schützt NPM p14^{ARF} sowohl vor einem Proteasom-abhängigen als auch –unabhängigen Abbau. Möglicherweise bindet NPM neu synthetisiertes p14^{ARF} und unterstützt als Chaperon die Ausbildung einer stabilen tertiären Struktur. Ferner konnte gezeigt werden, dass durch die nukleolare Lokalisation die Interaktion mit der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 unterbunden wird (Korgaonkar et al., 2005). Erst bei einer Relokalisation ins Nukleoplasma kann p14^{ARF} seiner Funktion als MDM2-Antagonist erfüllen und somit zur Aktivierung von p53 führen. Diese Entdeckung komplementiert Veröffentlichungen, welche eine Herunterregulation von NPM durch p14^{ARF} beschreiben (Bertwistle et al., 2004). So wird vorgeschlagen, dass NPM und p14^{ARF} in einer autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleife die Zellteilung kontrollieren. Bei einem geringen Expressionslevel wird p14^{ARF} in die Nukleoli geführt und dort durch NPM inhibiert, so dass es zu einem ordnungsgemäßen Zellwachstum kommt. Zellalterung und unbeschränkte onkogene Signale haben eine erhöhte p14^{ARF}-Expression zur Folge, welche zu einem effizienteren Abbau von NPM führt, indem dessen Ubiquitylierung ausgelöst wird (Itahana et al., 2003). Diese Studien stehen auch im Einklang mit einem sich entwickelnden Konzept, dass eine Störung des Nukleolus zur Aktivierung des p53-abhängigen Signalwegs und anschließend unterdrücktem Zellwachstum beiträgt (Rubbi & Milner, 2003). Dieser Annahme liegt die Idee zugrunde, dass eine geschädigte DNA oder ein anderer zellulärer Stressauslöser den Nukleolus stören und somit nukleolare Proteine, wie p14^{ARF} ins Nukleoplasma freigesetzt werden. Dort sind sie in der Lage MDM2 zu binden und p53 zu aktivieren. Auch dieser Ansatz wäre ein denkbarer Wirkungsmechanismus für die Centrocountine (Abbildung 46).

Ebenfalls konnte eine direkte Interaktion von p21^{WAF1/CIP1} mit NPM nachgewiesen werden (Xiao et al., 2009). NPM verhindert die Ubiquitylierung von p21^{WAF1/CIP1} und erhöht so dessen Halbwertszeit. Es wird angenommen, dass NPM auch hier eine Funktion als Chaperon ausübt und so p21^{WAF1/CIP1} vor Aggregation schützt und die Bildung von Protein-Komplexen

unterstützt. Aufgrund der Tatsache, dass die Interaktion von Chaperonen mit ihren Substraten hoch dynamisch ist und typischerweise eine niedrige Stöchiometrie aufweist, könnte dies die nur teilweise Co-Lokalisation der beiden Proteine erklären. Da nach Behandlung mit Centrocountin 1 ein Anstieg der Menge des p21^{WAF1/CIP1}-Niveaus und kein Rückgang detektiert werden konnte, ist nicht anzunehmen, dass eine Hemmung dieser Protein-Protein-Interaktion vorliegt. So ist es wahrscheinlicher, dass eine Hochregulierung ein sekundärer Effekt ist, welcher über den bereits beschriebenen p53-abhängigen Signalweg vermittelt wird.

Ebenso konnte eine direkte Interaktion von NPM mit phosphoryliertem Retinoblastoma Protein (RB) gezeigt werden (Takemura et al., 1999). Auch wurde festgestellt, dass RB und NPM zumindest teilweise als Komplex mit der DNA-Polymerase α (Pol α) vorliegen und diese synergistisch stimulieren. Pol α katalysiert die anfänglichen Schritte der DNA-Elongation, welche aus der Synthese von kurzen RNA-„Primern“ und aus der folgenden Synthese von kurzen DNA-Ketten bestehen. Möglicherweise erzeugt die Interaktion aus NPM, RB und Pol α die optimale Konformation für die Polymerase. Es wird vermutet, dass NPM in diesem Prozess als doppelte-Hexamer Struktur vorliegt. Solche Strukturen finden sich häufig bei Proteinen, welche am DNA-Metabolismus beteiligt sind. Ferner konnte die nukleolare Translokation von hyperphosphoryliertem RB am Ende der S-Phase durch die Bindung an NPM gezeigt werden (Takemura et al., 2002). Eine Erklärung für diese Translokation konnte jedoch nicht gefunden werden. Aufgrund der Tatsache, dass die beiden Proteine für eine Stimulierung von Pol α sorgen, ist es jedoch möglich, dass sie eine Rolle in der Replikation von nukleolarer DNA am Ende der S-Phase spielen. Ausgehend von diesem Mechanismus, ist es möglich, dass Centrocountin die Interaktion von NPM und RB stört, was zu einer unvollständigen DNA-Replikation führen könnte. Dies wäre ein Grund für Schäden an der DNA und könnte einen der bereits oben beschriebenen Signalwege auslösen, welcher den beobachteten Phänotyp zur Folge hätte (Abbildung 46).

5.4. NPM – bekannte Inhibitoren

Da NPM möglicherweise als natürlicher Repressor von p53 fungiert und so dessen Funktion während des Zellwachstums und bei DNA-Schädigung dämpft, wirkt es als Proto-Onkoprotein und stellt ein potentiell Zielprotein in der Krebstherapie dar. Im Hinblick darauf wäre die Entdeckung eines neuen NPM-Inhibitors von besonderem Interesse. Bis lang existieren lediglich vier Veröffentlichungen, die von einer Hemmung von NPM berich-

ten. Die erste Beschreibung betrifft die Bindung eines Peptids (ARRNRRRRWREYC) an NPM, welches die Sequenz zur nukleolaren Lokalisation des HIV-1 Rev Proteins beinhaltet (Chan et al., 2005). So führte zunächst die Inkubation des Rev-Peptids (Abbildung 44a) mit Ras-transformierten NIH-3T3 Zellen zu einer hohen Zytotoxizität. Des Weiteren wurden mit Ras-3T3 Zellen (onkogenes Ras exprimierende Zellen) geimpfte Mäuse mit dem Peptid behandelt und es konnte ein verringertes Tumorwachstum verzeichnet werden. Diese Anti-Tumor-Aktivität des NPM-bindenden Peptids war auf eine Erhöhung des intrazellulären Gehalts an p53 zurückzuführen. Ferner wurde NPM als Zielprotein des natürlich vorkommenden Alkaloids (+)-Avrainvillamide (Abbildung 44b) beschrieben (Wulff et al., 2007). Auch in diesem Fall konnte eine erhöhte zelluläre Konzentration von p53 nachgewiesen werden, was den anti-proliferativen Effekt des Naturstoffes in kultivierten Zellen erklärte. Der erste gezielt synthetisierte Inhibitor NSC348884 (Abbildung 44c) wurde in einem struktur-basierten Ansatz entworfen, um die Dimerisierung/Oligomerisierung von NPM zu verhindern (Qi et al., 2008). Auch NSC348884 induzierte die Apoptose und führte zu einer Hochregulierung von p53. Ein weiterer Inhibitor der NPM Oligomerisierung ist ein RNA-Aptamer (Jian et al., 2009). Dieses wurde *in vitro* mit Hilfe der SELEX („systematic evolution of ligands by exponential enrichment“) Methode selektioniert und zeigte eine Bindung an die zentrale säurereiche Region von NPM. Das Aptamer 1A1 (Abbildung 44d) inhibierte die Oligomerisierung *in vitro* sowie in verschiedenen Krebs-Zelllinien und führte zur Fehllokalisierung von NPM ins Nukleoplasma. Dies ging damit einher, dass p14^{ARF} ebenfalls ins Nukleoplasma lokalisierte anstatt in die Nukleoli. Nukleoplasmatisches p14^{ARF} ist ein Antagonist von MDM2 und stabilisiert p53. Daher konnte ebenfalls ein erhöhtes Niveau an p53 sowie dem nachgeschaltetem p21^{WAF1/CIP1} nachgewiesen werden.

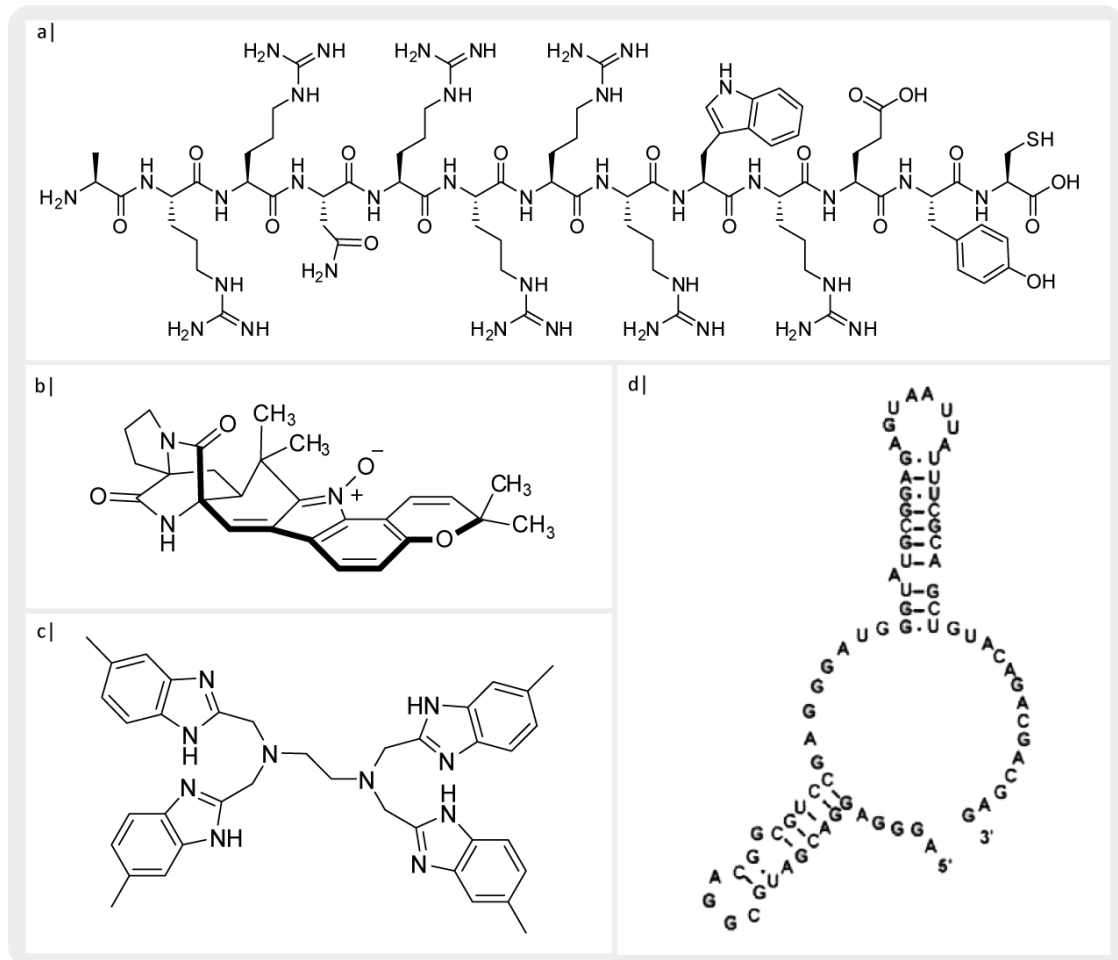


Abbildung 44: Strukturen bekannter NPM-Inhibitoren

a) Struktur des NPM-bindenden Rev-Peptids. b) Struktur des Naturstoffes (+)-Avrainvillamide. c) Struktur des NPM-Inhibitors NSC348884. d) Das NPM-bindende Aptamer 1A1.

5.5. NPM – Rolle während der Centrosomen-Duplikation

Besonders interessant im Rahmen der Literaturrecherche war die Verbindung von NPM zur Centrosomen-Duplikation. Bis zur späten G1-Phase ist NPM an die Centrosomen gebunden und wird erst durch die CDK2-Cyclin E-vermittelte Phosphorylierung von diesen gelöst. Daher scheint NPM eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Centrosomen-Duplikation zu spielen. Erst am Beginn der Mitose relokalisiert NPM zu den verdoppelten Centrosomen, so dass während der Cytokinese jede Tochterzelle ein NPM-gebundenes Centrosom erhält (Okuda, 2002). Dieser Zusammenhang konnte zum einen durch Mikroinjektion eines monoklonalen NPM-Antikörpers gezeigt werden, da dieser sterisch eine Phosphorylierung durch CDK2-Cyclin E verhindert und somit eine starke Inhibition der Centrosomen-Duplikation induziert (Okuda et al., 2000). Zum anderen unterdrückte die Deletion der Phosphorylierungsstelle (NPM Δ 186-239) und die Einführung eines nicht phosphorylierba-

ren Restes (NPM/S199A) ebenfalls die Centrosomen-Verdoppelung (Tokuyama et al., 2001). Da auch CDK2-Cyclin A in der Lage ist, NPM *in vitro* an Threonin 199 zu phosphorylieren und dieser Komplex während der S- und G2-Phase eine hohe Aktivität aufweist, wird angenommen, dass CDK2-Cyclin A eine frühzeitige Re-Assoziation von NPM mit den Centrosomen verhindert (Tokuyama et al., 2001). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers waren Fukasawa und Mitarbeiter in der Lage die centrosomale Lokalisation von NPM während des Zellzyklus zu beobachten (Shinmura et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass NPM sich während der frühen G1-Phase zwischen den beiden gepaarten Centriolen befindet. Während der G1-Phase verändert sich die Lokalisierung zu einer der beiden Centriolen hin. Sehr wahrscheinlich geht diese Veränderung dem Einsetzen der Centrosomen-Duplikation voraus. Zwar dissoziiert der größte Teil von NPM von den Centrosomen, ein geringer Anteil jedoch behält seine Assoziation zur Mutter-Centriole auch in bereits verdoppelten Centrosomen. Des Weiteren konnte eine Verbindung mit dem nuklearen Export-Rezeptor 1 (CRM1), welcher an die nukleare Export-Sequenz (NES) von Zielproteinen bindet, gezeigt werden. Eine Hemmung dieses Proteins durch den kovalenten Inhibitor Leptomycin B (LMB) (Kudo et al., 1999) oder das Hepatitis B Virus (HBV) HBx Protein (Forgues et al., 2003) führten zu einer Fragmentierung der Centriolen und einer verfrühten Centrosomen-Duplikation. Dementsprechend resultierte eine Inhibition von CRM1 in der schnellen Dissoziation von NPM von den Centrosomen und einer Anhäufung von Cyclin E an den Centrosomen (Abbildung 45). Zur gleichen Zeit wie Shinmura und Kollegen untersuchten auch Wang et al. die Verbindung von NPM zur Centrosomen-Duplikation und dem RAN-CRM1 Netzwerk (Wang et al., 2005). Der nukleo-zytoplasmatische Transport von NPM beruht nicht allein auf der Aktivität von CRM1. Vielmehr benötigt der nukleolare Export-Rezeptor die kleine GTPase RAN, welche dessen Interaktion mit den Substraten kontrolliert. Der Guanin Nukleotid-Austausch Faktor RCC1 erleichtert eine Bindung von RAN an CRM1, während RANBP1 (Ran bindendes Protein 1) eine Dissoziation von CRM1 und RAN begünstigt. Die Tatsache, dass eine Verbindung von RAN zum Spindelaufbau gezeigt werden konnte (Dasso, 2001) und RAN-Mutationen sowie die Überexpression von RANBP1 zu multipolaren Spindeln führten (Di Fiore et al., 2004), ließen vermuten, dass der RAN-CRM1 Komplex eine wichtige Rolle in der Centrosomen-Duplikation einnimmt. Auch die von Wang et al. durchgeführten Analysen unterstützten die Hypothese, dass der RAN-CRM1 Komplex an den Centrosomen Zielproteine mit einer NES reguliert. Gleichzeitig könnte dieser Prozess durch Phosphorylierung kontrolliert werden.

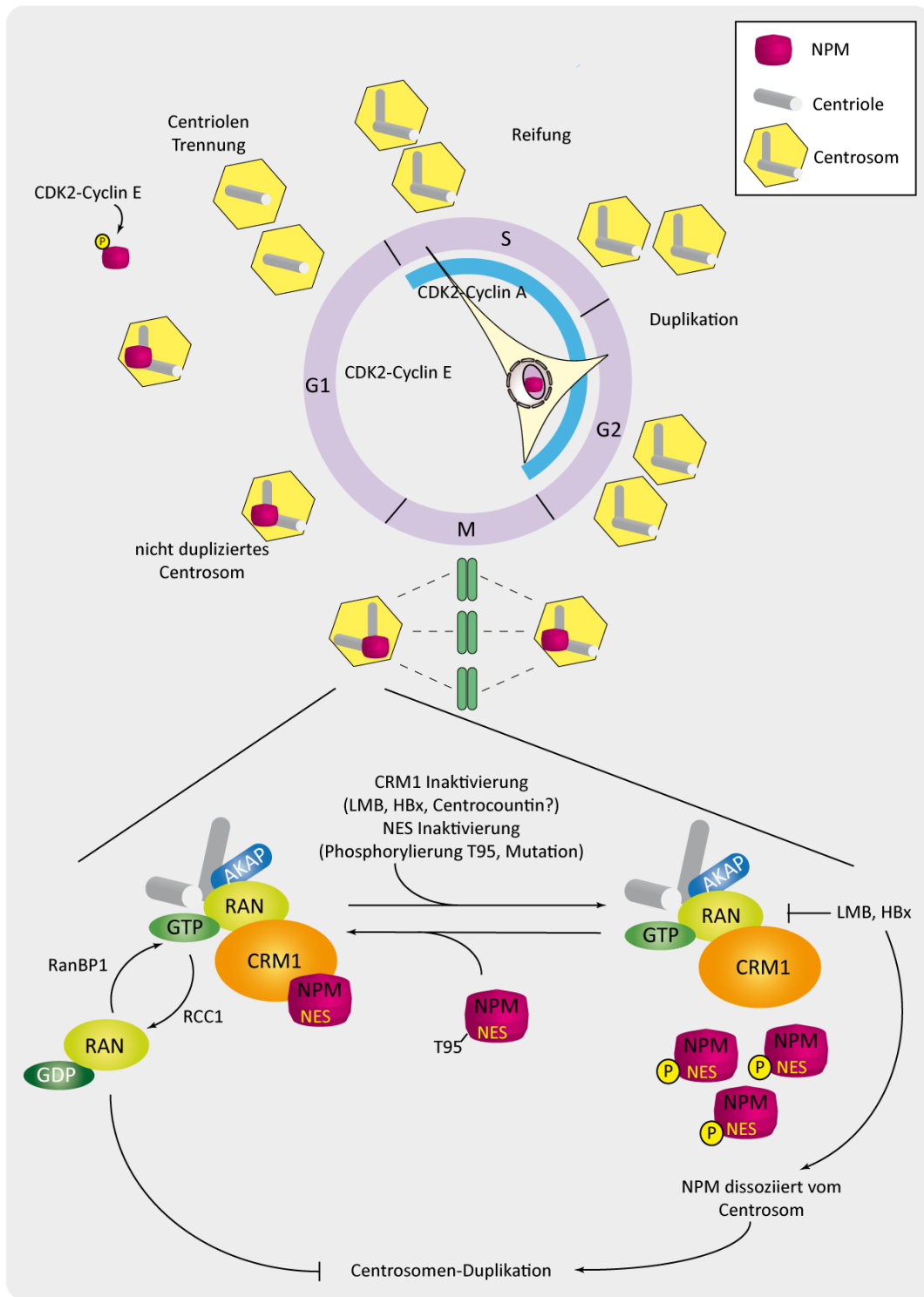


Abbildung 45: NPM und CRM1 in der Centrosomen-Duplikation (modifiziert nach Lim & Wang, 2006)

Der Transport von NPM zum Centrosom wird durch den RAN-CRM1 Komplex reguliert. NPM bindet spezifisch an noch nicht duplizierte Centrosomen und dissoziiert nach erfolgter Phosphorylierung durch CDK2-Cyclin E in der späten G1-Phase. Dadurch wird die Centrosomen-Duplikation eingeleitet. Während der S- bis zur G2-Phase ist NPM hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert. Wenn die Kernmembran am Beginn der Mitose zusammenbricht, relokalisiert NPM an die Centrosomen und verhindert so eine erneute Duplikation. Neu entstandene Zellen beinhalten ein NPM-gebundenes Centrosom. Die Relokalisation zu den Centrosomen während der Mitose erfolgt durch Interaktion mit RAN-CRM1 über die NES von NPM. Die kleine GTPase RAN wechselt ständig zwischen einem inaktiven GDP- und aktiven GTP-gebundenen Zustand durch RANBP1 und RCC1. GTP-gebundenes RAN bindet mit AKAP und CRM1 an die Centrosomen. Die Inhibition von CRM1 durch LMB oder HBx sowie die NES-Inaktivierung durch Phosphorylierung oder Mutation führt zur Dissoziation von NPM von den Centrosomen und ermöglicht die Centrosomen-Vervielfältigung. An dieser Stelle des Mechanismus könnte eventuell auch Centrocountin 1 eingreifen.

Obwohl nicht ausgeschlossen werden konnte, dass auch andere NES-beihaltende Proteine an der Centrosomen-Duplikation beteiligt sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass NPM ein wichtiges Substrat des RAN-CRM1 Komplexes darstellt.

Dieser Mechanismus lässt auch Spielraum für eine Störung durch die Centrocountine. So ist es denkbar, dass die Centrocountine die Bindung von NPM an CRM1 verhindern und die Centrosomen sich so unkontrolliert duplizieren. Da *in vivo* und *in vitro* sowohl eine Bindung von Centrocountin an NPM als auch an CRM1 gezeigt werden konnte, ist allerdings fraglich, ob die Störung einer solchen Interaktion durch die simultane Bindung an NPM und CRM1 eingeleitet wird. Daher ist es auch möglich, dass die beiden Proteine unabhängige Zielproteine darstellen. Eine Hypothese wäre, dass NPM das primäre Zielprotein darstellt und bereits bei niedrigen Substanzkonzentrationen die Interaktion mit einem der oben aufgeführten Proteine stört und so eine Fehlorientierung der Chromosomen ausgelöst wird. Bei höheren Substanzkonzentrationen (50 μM) könnte ein sekundäres Ziel CRM1 sein. Möglicherweise stört Centrocountin bei dieser Konzentration zusätzlich die nukleare Exportfunktion von CRM1, was durch die immunzytochemischen Analysen von RANBP1 gestützt wird. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, dass ein vermehrter Anteil multipolarer Zellen erst bei einer Konzentration von 50 μM detektiert werden kann. Auffallend ist jedoch, dass im Rahmen der Fluoreszenzpolarisations-Experimente für CRM1 ein geringerer K_D -Wert berechnet werden konnte als für NPM, so dass anzunehmen wäre, dass CRM1 aufgrund der leicht höheren Affinität das primäre Zielprotein ist. Hierzu ist zunächst zu bemerken, dass die berechneten K_D -Werte nur als relative Werte gesehen werden können, da aufgrund einer partiellen Racemisierung von Substanz **35** zum einen kein reines Enantiomer des Moleküls verwendet werden konnte. Zum anderen konnte eine unspezifische Bindung der Proteine an Cy3 festgestellt werden, was zu einer Verfälschung des K_D -wertes beiträgt. Ein weiterer Faktor, der ebenfalls zu einer Relativierung der K_D -Werte führt, ist die Tatsache, dass NPM in Zellen wesentlich höher exprimiert ist als CRM1.

Des Weiteren konnte bei der Untersuchung der Centrosomen-Duplikation ein Zusammenhang zwischen der ROCK2 („Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2“) Kinase, einem Effektor der kleinen GTPase Rho, und NPM gezeigt werden (Ma et al., 2006). ROCK2 fördert die Centrosomen-Duplikation abhängig von seiner Kinase-Funktion und auch abhängig von seiner Centrosomen-Lokalisation. Die Kinase scheint nicht per se für die Verdoppelung verantwortlich zu sein, sondern eher für die zeitige Centrosomen-Duplikation. Das an Threonin199 phosphorylierte NPM bindet mit einer hohen Affinität an ROCK2 und sorgt für dessen gesteigerte Aktivität. ROCK2 ist daraufhin in der Lage schnell

und effizient die für den Beginn der Centrosomen-Duplikation nötigen Proteine zu phosphorylieren. In Bezug auf diesen Mechanismus wäre eine Hemmung sowie einer Stabilisierung dieser Interaktion denkbar. Da ROCK2 jedoch nicht unbedingt für die Centrosomen-Verdoppelung nötig ist, scheint es auch eher unwahrscheinlich, dass die Störung dieser Interaktion zu einer Centrosomen-Vermehrung beitragen könnte.

Ganz aktuell konnte auch eine Interaktion von BRCA2 („breast cancer 2“) mit NPM und ROCK2 identifiziert werden (Wang et al., 2011). Obwohl solch ein Zusammenhang vorher nicht gefunden wurde, bestehen einige parallele Funktionen von NPM und ROCK2 an den Centrosomen und BRCA2. So ist BRCA2 auch ein Substrat von CRM1 und lokalisiert während der G1-Phase bis zur frühen Mitose an die Centrosomen (Han et al., 2008). Eine Störung von BRCA2 führt zu einer abnormalen Zellteilung und resultiert in multicentrosomalen und mehrkernigen Zellen (Nakanishi et al., 2007). Daher ist es möglich, dass BRCA2, ROCK2 und NPM einen Komplex bilden und so gemeinsam die Integrität der Centrosomen-Duplikation und der genomischen Stabilität sichern. Interessanterweise bindet NPM zwischen Aminosäure 639 und 1000 an BRCA2. Dieser Region konnten bislang keine weiteren molekularen Funktionen nachgewiesen werden, sie weist jedoch häufig Punktmutationen in vererbbaarem Brust- oder Eierstock-Krebs auf. Dies deutet darauf hin, dass die Mutationen möglicherweise die Interaktion zwischen NPM und BRCA2 unterdrücken. Genauso wäre es denkbar, dass Centrocotin diese Interaktion stört. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass eine gestörte Interaktion von NPM und BRCA2 vermehrt zu fragmentierten Centrosomen führt und zu einem geringeren Anteil von überduplizierten Centrosomen. Dies entspricht den Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden. Alle diese Hypothesen (Abbildung 46) weisen darauf hin, dass Centrocotin in der Lage ist, eine oder womöglich mehrere Protein-Protein-Interaktionen von NPM zu verhindern. Die Störung von Protein-Protein-Interaktionen stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung von Anti-Krebs-Wirkstoffen dar und ist seit einiger Zeit Realität (Arkin & Wells, 2004). Bislang konnten verschiedene spezifische niedermolekulare Verbindungen identifiziert werden, welche anti-apoptotische Proteine wie BCL-2-BAX (Oltersdorf et al., 2005), MDM2-p53 (Vassilev et al., 2004) und XIAP-SMAC (Oost et al., 2004) zum Ziel haben. Daher wäre es im Fall von Centrocotin von besonderem Interesse, wenn die Hemmung einer Protein-Protein-Interaktion vorläge. Dies würde bedeuten, dass gezielt spezifische Funktionen von NPM inhibiert werden könnten. Dementsprechend könnte Centrocotin als biologisches Werkzeug eingesetzt werden, um die komplexen Funktionen von NPM weiter zu untersuchen.

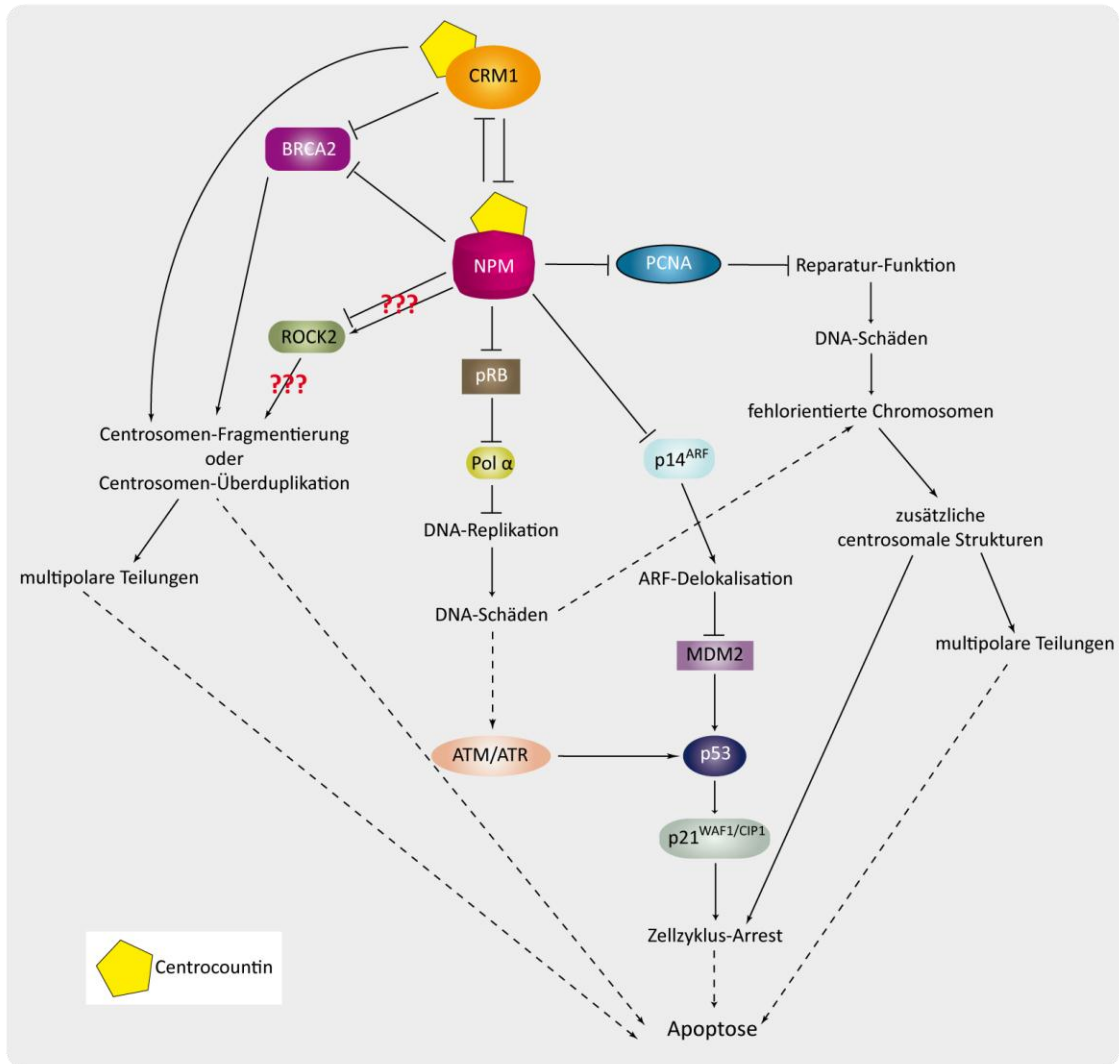


Abbildung 46: Hypothetische Wirkungsmechanismen der Centrocountine

BRCA2: breast cancer 2; NPM: Nucleophosmin; ROCK2: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2; RB: Retinoblastoma Protein; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; Pol α : DNA-Polymerase α ; ATM: Ataxia telangiectasia mutiert; ATR: Ataxia telangiectasia und RAD3-verwandtes Protein; MDM2: murine double minute 2.

Außerdem stellt Centrocountin einen Ausgangspunkt für die Entwicklung eines möglichen Anti-Krebs-Wirkstoffes dar. NPM wird in verschiedenen Tumoren überexprimiert und ist deshalb ein Marker für Magen-, Dickdarm-, Eierstock- und Prostata-Karzinome (Grisendi et al., 2006). Ferner ist *NPM1* das häufigste Ziel von genetischen Veränderungen in hämatopoetischen Tumoren. Zwei gut charakterisierte genomische Ereignisse, welche *NPM1* betreffen, sind chromosomale Translokationen in lymphoiden sowie myeloiden Funktionsstörungen (Morris et al., 1995; Raimondi et al., 1989; Redner et al., 1996) und Mutationen in AML („acute myeloid lymphoma“) (Falini et al., 2005). Veränderungen von *NPM1* führen entweder zu onkogenen Fusionsproteinen oder mutierten NPM-Proteinen begleitet von dem Verlust eines funktionellen Allels des Gens (Berger et al., 2006). Die Rolle des NPM-Restes in den verschiedenen chimären Produkten, NPM-ALK („anaplastic lymphoma kinase“), NPM-RAR α („retinoic acid receptor α) und NPM-MLF1 („myelodysplasia/myeloid

leukaemia factor 1“) konnte noch nicht vollständig geklärt werden, jedoch ist denkbar, dass NPM als Schnittstelle für eine Homo- oder Heterodimerisation dient (Bischof et al., 1997). Neben seiner Rolle in der Onkogenese wird NPM auch eine Bedeutung für die Tumorsuppression zugeschrieben. Diese Funktion als Tumorsuppressor ist zum einen darauf zurückzuführen, dass NPM in die Kontrolle der genomischen Stabilität involviert ist (Di Fiore, 2008; Grisendi et al., 2006). Dementsprechend weisen *NPM1*^{+/-}-Zellen einen signifikanten Anteil an genomischer Instabilität auf, welcher die Anfälligkeit für onkogene Transformationen erhöht (Grisendi et al., 2005). Zum anderen ist NPM in Signalwege eingebunden, welche die Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 begünstigen. Hier ist zunächst die Interaktion von NPM mit dem Tumorsuppressor p14^{ARF} zu nennen. Diese Interaktion schützt p14^{ARF} sowohl vor einem Proteasom-abhängigen als auch Proteasom-unabhängigen Abbau (Kuo et al., 2008) und sorgt somit für die Hemmung von MDM2, dem negativen Regulator von p53. Ebenso kann NPM bei zellulärem Stress direkt an MDM2 binden und auf diesem Weg p53 stabilisieren (Kurki et al., 2004). Die Tumorsuppressor-Funktionen von NPM, seine proto-onkogenen Eigenschaften sowie die NPM-Mutationen in hämatopoetischen Tumoren zeigen dessen Bedeutung für die Krebs-Forschung. Die Entdeckung von Centrocotin als NPM-Modulator ist somit von großem Interesse und stellt die Basis für weitergehende Analysen dar.

6. Ausblick

Diese Arbeit konnte einen guten Überblick des von Centrocountin ausgelösten Phänotyps liefern. Des Weiteren wurde mit Nucleophosmin ein Zielprotein identifiziert, welches komplexe Aufgaben in der Zelle übernimmt. Aufgrund dieser Tatsache war es abschließend nicht möglich, den genauen Wirkungsmechanismus von Centrocountin zu entschlüsseln, sondern nur verschiedene Varianten vorzuschlagen. Daher können die hier geschilderten Ergebnisse als Ansatzpunkt für weitergehende Studien genutzt werden. So wäre es zunächst interessant, die Bildung der Centrosomen/Centriolen am besten gemeinsam mit der DNA mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie zu verfolgen. So könnten die Zusammenhänge zwischen fehlorientierten Chromosomen und zusätzlichen Spindelpolen besser analysiert werden. Außerdem könnte dies eine Antwort auf die Frage geben, ob die zusätzlichen Centrosomen jeweils nur eine oder zwei Centriolen beinhalten. Außerdem könnte geklärt werden, ob es sich um eine Centrosomen-Fragmentierung oder eine Überduplikation handelt.

Ferner wäre von Interesse, die Bindungsstelle von Centrocountin sowohl an NPM als auch an CRM1 herauszufinden. Hierzu könnten Deletionskonstrukte beider Proteine genutzt werden. Zum einen wäre es möglich, die Deletionskonstrukte in Zellen zu transfizieren und diese für eine Affinitätsreinigung zu verwenden, zum anderen könnten mit gereinigten Proteinfragmenten im Rahmen der Fluoreszenz-Polarisation K_D -Werte bestimmt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Bindungsstelle zu charakterisieren, läge in einer Co-Kristallisation von NPM bzw. CRM1 mit Centrocountin. Dies könnte auch die Hinweise der CD-Spektroskopie auf eine Strukturänderung von NPM bestätigen oder widerlegen. Weiterhin könnte eine Beeinflussung von Centrocountin auf die Interaktion von NPM und CRM1 mit Hilfe eines ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) untersucht werden.

Ein weiterer Ansatz wäre, einen möglichen Einfluss auf die oben beschriebenen Interaktionspartner von NPM zu überprüfen. So könnten zum Beispiel Immunpräzipitationen in An- und Abwesenheit von Centrocountin durchgeführt werden, um herauszufinden welche der vorstellbaren Protein-Protein-Interaktionen gestört wird. Ebenso wäre auch hier der Einsatz der ELISA-Technik denkbar.

7. Zusammenfassung

Laut einer Schätzung werden im Jahr 2020, durch Faktoren wie die Überalterung der Weltbevölkerung, die Verwestlichung der Ernährungsgewohnheiten und die zunehmende Umweltverschmutzung, 15 Millionen neue Krebsfälle diagnostiziert und 12 Millionen Menschen werden auf Grund einer Krebserkrankung sterben (Bray & Moller, 2006). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit, neue Wirkstoffe zu entwickeln, die in der Lage sind Krebserkrankungen aufzuhalten oder besser noch zu heilen. Ein beliebter Ansatzpunkt für Therapeutika ist der Zellzyklus, um die Hyperproliferation von Tumorzellen zu stoppen und die Zellen nachfolgend in die Apoptose zu leiten. Viele in der Klinik erfolgreich eingesetzte Chemotherapeutika verändern die Tubulin-Dynamik und inhibieren somit den mitotischen Spindelapparat, was zu einer Arretierung der Mitose und dem anschließenden Absterben der Tumorzellen führt. Aufgrund der Tatsache, dass dynamische Mikrotubuli auch wichtige Funktionen in nicht proliferierenden Zellen erfüllen, führt der Einsatz von Tubulinbindenden Wirkstoffen zu zahlreichen Nebenwirkungen. Deshalb ist es von großer Bedeutung niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, welche geeignet sind, andere wesentliche Proteine des Zellzyklus zu modifizieren und dadurch den Tod der Tumorzellen herbeizuführen.

Bereits im Vorfeld wurden in einem zellulären Testsystem Substanzen aus einer abteilungseigenen Indolochinolizin-Bibliothek identifiziert, welche in der Lage waren den Zellzyklus zu inhibieren. Der durch diese Substanzen induzierte Phänotyp konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen, wie Lebendzell-Mikroskopie, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie, näher beschrieben werden. So führte die Inkubation von HeLa-Zellen mit den Indolochinolizinen zu fehlorientierten Chromosomen während der Metaphase und dem Auftreten von zusätzlichen Spindelpolen, was zu multipolaren Spindeln führte. Dieser Phänotyp ließ vermuten, dass die Zellen nicht mehr in der Lage sind ihre Centrosomen zu „zählen“, weshalb die aktiven Substanzen als Centrocountine bezeichnet wurden. Außerdem konnten Immunfluoreszenz-Aufnahmen einer BUB1-Färbung eine Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes zeigen. Die Analyse des Interkinetochor-Abstandes wies darauf hin, dass die Aktivierung des Kontrollpunktes durch eine fehlende Spannung zwischen den Kinetochoren und den Mikrotubuli ausgelöst wurde. Die Spindel-Kontrollpunkt-Aktivierung resultierte in einem mitotischen Arrest, welcher durch die etwa fünfmal so lange Mitose-Dauer von mit Centrocountin 1 behandelten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen gezeigt werden konnte. Auch die Zellzyklus-Analyse zeigte

einen konzentrationsabhängigen Anstieg der mitotischen Zellen. Ferner war ein Rückgang der HeLa-Zellproliferation auf etwa 60% zu verzeichnen. Dieser war zum einen durch das Anhalten des Zellzyklus in der M-Phase, zum anderen durch das Einsetzen der Apoptose zu erklären. Durch Immunfluoreszenz-Aufnahmen in acht weiteren Zelllinien konnte gezeigt werden, dass das Auftreten der fehlorientierten Chromosomen sowie der zusätzlichen Spindelpole zelltypübergreifend ist.

Aufgrund des interessanten Phänotyps war es im weiteren Verlauf von besonderer Bedeutung die Zielproteine der Centrocountine zu identifizieren. So wurde zunächst versucht eine Zielprotein-Identifizierung mittels wissenschaftlicher Hypothesen durchzuführen. Zu den potentiellen Zielproteinen zählten Tubulin, zahlreiche Zellzyklus-spezifische Kinasen und die Phosphatase CDC25a, welche jedoch alle mit Hilfe entsprechender *in vitro* oder *in vivo* Testsysteme ausgeschlossen werden konnten. Basierend auf den oben beschriebenen phänotypischen Analysen konnte eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufgestellt werden, welche die Synthese einer Sonde für die Affinitätschromatographie ermöglichte. Die hergestellte Sonde wurde über ein freies Amin an eine NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt, so dass eine Affinitätsreinigung mit HeLa-Zelllysaten durchgeführt werden konnte. Mit Hilfe einer Kombination aus der vergleichenden und kompetitiven Variante der Affinitätschromatographie konnte das nukleolare Protein Nucleophosmin (NPM) als Zielprotein identifiziert werden. Die anschließende Literaturrecherche ergab, dass das Ausschalten von NPM durch RNAi ähnliche Effekte, wie die durch Centrocountin ausgelöst, verursachte. Auch eine Störung der Bindung des nuklearen Export-Rezeptors CRM1 an NPM führte zu dem beobachteten Phänotyp. So wurden für folgende Validierungs-Experimente sowohl NPM als auch der NPM-CRM1-Komplex als mögliche Bindungspartner in Betracht gezogen. Sowohl NPM als auch CRM1 konnten mittels Immundetektion nach erfolgter Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Ebenso war eine konzentrationsabhängige Verdrängung mit einem Überschuss an Centrocountin 1 zu verzeichnen. Ferner konnte durch Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie und Fluoreszenz-Polarisation *in vivo* und *in vitro* eine Bindung beider Proteine an ein mit Cy3 modifiziertes Centrocountin gezeigt werden. Aufgrund der diversen Aufgaben von NPM in der Zelle könnten neben der NPM-CRM1 Interaktion, auch weitere Protein-Protein-Interaktionen gestört werden, welche die beschriebenen Phänotypveränderungen hervorrufen würden. Dementsprechend könnten eine gehinderte Interaktion von NPM und PCNA während der DNA-Reparatur, von NPM und p14^{ARF} sowie von NPM und RB zu einer Aktivierung von p53 und dem nachgeschalteten p21^{WAF1/CIP1} führen. Dies würde einen Zellzyklus-Arrest auslösen, welcher oftmals in

Verbindung mit der Apoptose steht. Einen Hinweis auf diesen möglichen Wirkmechanismus gaben die erhöhten Protein-Niveaus von p53 und p21^{WAF1/CIP1}, welche in mit Centrocourtin behandelten MCF7- und HCT-116-Zellen nachgewiesen werden konnten. Gehemmte Interaktionen zwischen NPM und ROCK2, NPM und BRCA2 und natürlich NPM und CRM1 könnten außerdem zu einer Centrosomen-Fragmentierung bzw. Überduplikation führen, welches ebenfalls ein Anhalten des Zellzyklus oder die Apoptose zur Folge hätte. Aufgrund der Tatsache, dass NPM proto-onkogene Funktionen ausübt und das am häufigsten mutierte Gen in hämatopoetischen Tumoren ist, ist die Entdeckung von Centrocourtin, einem neuen NPM-Inhibitor, von besonderer Bedeutung. Auch Centrocourtin als biologisches Werkzeug nutzen zu können, um die zahlreichen zellulären Funktionen von NPM besser zu untersuchen und zu verstehen, kann nicht außer Acht gelassen werden.

8. Literatur

- Agnese, V., V. Bazan, F.P. Fiorentino, D. Fanale, G. Badalamenti, G. Colucci, V. Adamo, D. Santini, & A. Russo. 2007. The role of Aurora-A inhibitors in cancer therapy. *Ann Oncol.* 18 Suppl 6:vi47-52.
- Alaimo, P.J., M.A. Shogren-Knaak, & K.M. Shokat. 2001. Chemical genetic approaches for the elucidation of signaling pathways. *Current Opinion in Chemical Biology.* 5:360-367.
- Amin, M.A., S. Matsunaga, S. Uchiyama, & K. Fukui. 2008. Nucleophosmin is required for chromosome congression, proper mitotic spindle formation, and kinetochore-microtubule attachment in HeLa cells. *FEBS Lett.* 582:3839-3844.
- Andersen, C.B., Y. Wan, J.W. Chang, B. Riggs, C. Lee, Y. Liu, F. Sessa, F. Villa, N. Kwiatkowski, M. Suzuki, L. Nallan, R. Heald, A. Musacchio, & N.S. Gray. 2008. Discovery of Selective Aminothiazole Aurora Kinase Inhibitors. *ACS Chemical Biology.* 3:180-192.
- Andreassen, P.R., D.A. Skoufias, & R.L. Margolis. 2004. Analysis of the spindle-assembly checkpoint in HeLa cells. *Methods Mol Biol.* 281:213-225.
- Arkin, M.R., & J.A. Wells. 2004. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov.* 3:301-317.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moored, D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. & EDS 1995. Current protocols in molecular biology, New York.
- Bach, S., M. Knockaert, J. Reinhardt, O. Lozach, S. Schmitt, B. Baratte, M. Koken, S.P. Coburn, L. Tang, T. Jiang, D.C. Liang, H. Galons, J.F. Dierick, L.A. Pinna, F. Meggio, F. Totzke, C. Schachtele, A.S. Lerman, A. Carnero, Y. Wan, N. Gray, & L. Meijer. 2005. Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem.* 280:31208-31219.
- Balint, E.E., & K.H. Vousden. 2001. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer.* 85:1813-1823.
- Barr, F.A., H.H. Sillje, & E.A. Nigg. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:429-440.
- Becker, F., K. Murthi, C. Smith, J. Come, N. Costa-Roldán, C. Kaufmann, U. Hanke, C. Degenhart, S. Baumann, W. Wallner, A. Huber, S. Dedier, S. Dill, D. Kinsman, M. Hediger, N. Bockovich, S. Meier-Ewert, A.F. Kluge, & N. Kley. 2004. A Three-Hybrid Approach to Scanning the Proteome for Targets of Small Molecule Kinase Inhibitors. *Chemistry & Biology.* 11:211-223.
- Berger, R., M. Busson, L. Baranger, C. Helias, M. Lessard, N. Dastugue, & F. Speleman. 2006. Loss of the NPM1 gene in myeloid disorders with chromosome 5 rearrangements. *Leukemia.* 20:319-321.
- Bertani, G. 1951. STUDIES ON LYSOGENESIS I.: The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 62:293-300.
- Bertwistle, D., M. Sugimoto, & C.J. Sherr. 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol.* 24:985-996.
- Bilitewski, U. 2009. DNA microarrays: an introduction to the technology. *Methods Mol Biol.* 509:1-14.

- Bird, A.W., & A.A. Hyman. 2008. Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *J Cell Biol.* 182:289-300.
- Bischof, D., K. Pulford, D.Y. Mason, & S.W. Morris. 1997. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol.* 17:2312-2325.
- Bischoff, J.R., L. Anderson, Y. Zhu, K. Mossie, L. Ng, B. Souza, B. Schryver, P. Flanagan, F. Clairvoyant, C. Ginther, C.S. Chan, M. Novotny, D.J. Slamon, & G.D. Plowman. 1998. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* 17:3052-3065.
- Blagden, S., & J. de Bono. 2005. Drugging cell cycle kinases in cancer therapy. *Curr Drug Targets.* 6:325-335.
- Blangy, A., H.A. Lane, P. d'Herin, M. Harper, M. Kress, & E.A. Nigg. 1995. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell.* 83:1159-1169.
- Bolanos-Garcia, V.M. 2005. Aurora kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:1572-1577.
- Boutros, R., V. Lobjois, & B. Ducommun. 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer.* 7:495-507.
- Boveri, T. 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verhandlungen der Physikalisch-medicinischen Gesellschaft zu Würzburg N. F.* 35:67-90.
- Boveri, T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72:248-254.
- Brady, C.A., & L.D. Attardi. 2010. p53 at a glance. *Journal of Cell Science.* 123:2527-2532.
- Brattain, M.G., W.D. Fine, F.M. Khaled, J. Thompson, & D.E. Brattain. 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 41:1751-1756.
- Bray, F., & B. Moller. 2006. Predicting the future burden of cancer. *Nat Rev Cancer.* 6:63-74.
- Bredel, M., & E. Jacoby. 2004. Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. *Nat Rev Genet.* 5:262-275.
- Brenner, S. 1974. The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics.* 77:71-94.
- Brezak, M.C., M. Quaranta, O. Mondesert, M.O. Galcera, O. Lavergne, F. Alby, M. Cazales, V. Baldin, C. Thuriéau, J. Harnett, C. Lanco, P.G. Kasprzyk, G.P. Prevost, & B. Ducommun. 2004. A novel synthetic inhibitor of CDC25 phosphatases: BN82002. *Cancer Res.* 64:3320-3325.
- Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J.P. Brown, J.M. Sedivy, K.W. Kinzler, & B. Vogelstein. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 282:1497-1501.
- Carlos, F.-P., C.-S. Lila, H. Eugenio, G. Maribel, E. Eric, M. Ehrenfried, & W.F. Rainer. 1998. Understanding the mechanism of the zinc-ion stains of biomacromolecules in electrophoresis gels: Generalization of the reverse-staining technique. *Electrophoresis.* 19:2398-2406.

- Casenghi, M., P. Meraldi, U. Weinhart, P.I. Duncan, R. Korner, & E.A. Nigg. 2003. Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell*. 5:113-125.
- Castro, A., C. Bernis, S. Vigneron, J.C. Labbe, & T. Lorca. 2005. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene*. 24:314-325.
- Cazales, M., R. Boutros, M.C. Brezak, S. Chaumeron, G. Prevost, & B. Ducommun. 2007. Pharmacologic inhibition of CDC25 phosphatases impairs interphase microtubule dynamics and mitotic spindle assembly. *Mol Cancer Ther*. 6:318-325.
- Chan, H.J., J.J. Weng, & B.Y. Yung. 2005. Nucleophosmin/B23-binding peptide inhibits tumor growth and up-regulates transcriptional activity of p53. *Biochem Biophys Res Commun*. 333:396-403.
- Charrier-Savournin, F.B., M.T. Chateau, V. Gire, J. Sedivy, J. Piette, & V. Dulic. 2004. p21-Mediated nuclear retention of cyclin B1-Cdk1 in response to genotoxic stress. *Mol Biol Cell*. 15:3965-3976.
- Chevrier, V., M. Piel, N. Collomb, Y. Saoudi, R. Frank, M. Paintrand, S. Narumiya, M. Bornens, & D. Job. 2002. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. *The Journal of Cell Biology*. 157:807-817.
- Colombo, E., P. Bonetti, E. Lazzerini Denchi, P. Martinelli, R. Zamponi, J.C. Marine, K. Helin, B. Falini, & P.G. Pelicci. 2005. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol*. 25:8874-8886.
- Colombo, E., J.C. Marine, D. Danovi, B. Falini, & P.G. Pelicci. 2002. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*. 4:529-533.
- Compton, L.A., & W.C. Johnson. 1986. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Analytical Biochemistry*. 155:155-167.
- Cottrell, S., D. Bicknell, L. Kaklamanis, & W.F. Bodmer. 1992. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet*. 340:626-630.
- Crook, T., N.J. Marston, E.A. Sara, & K.H. Vousden. 1994. Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation. *Cell*. 79:817-827.
- Cullen, S.P., I.S. Afonina, R. Donadini, A.U. Lüthi, J.P. Medema, P.I. Bird, & S.J. Martin. 2009. Nucleophosmin Is Cleaved and Inactivated by the Cytotoxic Granule Protease Granzyme M during Natural Killer Cell-mediated Killing. *Journal of Biological Chemistry*. 284:5137-5147.
- D'Assoro, A.B., W.L. Lingle, & J.L. Salisbury. 2002. Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene*. 21:6146-6153.
- Daniels, M.J., Y. Wang, M. Lee, & A.R. Venkitaraman. 2004. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science*. 306:876-879.
- Dasso, M. 2001. Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell*. 104:321-324.
- Di Fiore, B., M. Ciciarello, & P. Lavia. 2004. Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle*. 3:305-313.
- Di Fiore, P.P. 2008. Playing both sides: nucleophosmin between tumor suppression and oncogenesis. *J Cell Biol*. 182:7-9.

- Diller, L., J. Kassel, C.E. Nelson, M.A. Gryka, G. Litwak, M. Gebhardt, B. Bressac, M. Ozturk, S.J. Baker, B. Vogelstein, & et al. 1990. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol.* 10:5772-5781.
- Ditchfield, C., V.L. Johnson, A. Tighe, R. Ellston, C. Haworth, T. Johnson, A. Mortlock, N. Keen, & S.S. Taylor. 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol.* 161:267-280.
- Diviani, D., L.K. Langeberg, S.J. Doxsey, & J.D. Scott. 2000. Pericentrin anchors protein kinase A at the centrosome through a newly identified RII-binding domain. *Curr Biol.* 10:417-420.
- Drewes, G., A. Ebneith, U. Preuss, E.M. Mandelkow, & E. Mandelkow. 1997. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 89:297-308.
- Driscoll, M. 1992. Molecular genetics of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurobiology.* 23:1327-1351.
- Dückert, H. 2011. Entwicklung organokatalysierter Annelierungs- und Dominoreaktionen zur Synthese naturstoffinspirierter Substanzsammlungen. TU Dortmund.
- Ekins, S., Y. Nikolsky, A. Bugrim, E. Kirillov, & T. Nikolskaya. 2007. Pathway mapping tools for analysis of high content data. *Methods Mol Biol.* 356:319-350.
- el-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, & B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75:817-825.
- Emami, K.H., C. Nguyen, H. Ma, D.H. Kim, K.W. Jeong, M. Eguchi, R.T. Moon, J.-L. Teo, S.W. Oh, H.Y. Kim, S.H. Moon, J.R. Ha, & M. Kahn. 2004. A small molecule inhibitor of β -catenin/cyclic AMP response element-binding protein transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:12682-12687.
- Falini, B., C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L. Pasqualucci, R. La Starza, D. Diverio, E. Colombo, A. Santucci, B. Bigerna, R. Pacini, A. Pucciarini, A. Liso, M. Vignetti, P. Fazi, N. Meani, V. Pettrossi, G. Saglio, F. Mandelli, F. Lo-Coco, P.-G. Pelicci, M.F. Martelli, & G.A.L.W.P. the. 2005. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med.* 352:254-266.
- Fan, J., & K.A. Beck. 2004. A role for the spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis. *J Cell Sci.* 117:619-629.
- Fisk, H.A., C.P. Mattison, & M. Winey. 2003. Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:14875-14880.
- Fiskus, W., Y. Wang, R. Joshi, R. Rao, Y. Yang, J. Chen, R. Kolhe, R. Balusu, K. Eaton, P. Lee, C. Ustun, A. Jillella, C.A. Buser, S. Peiper, & K. Bhalla. 2008. Cotreatment with Vorinostat Enhances Activity of MK-0457 (VX-680) against Acute and Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Clinical Cancer Research.* 14:6106-6115.
- Florian, S., S. Hummer, M. Catarinella, & T.U. Mayer. 2007. Chemical genetics: reshaping biology through chemistry. *HFSP J.* 1:104-114.
- Forgues, M., M.J. Difilippantonio, S.P. Linke, T. Ried, K. Nagashima, J. Feden, K. Valerie, K. Fukasawa, & X.W. Wang. 2003. Involvement of Crm1 in Hepatitis B Virus X Protein-

- Induced Aberrant Centriole Replication and Abnormal Mitotic Spindles. *Mol. Cell. Biol.* 23:5282-5292.
- Forster, B., D. Van De Ville, J. Berent, D. Sage, & M. Unser. 2004. Complex wavelets for extended depth-of-field: a new method for the fusion of multichannel microscopy images. *Microsc Res Tech.* 65:33-42.
- Fry, A.M., T. Mayor, P. Meraldi, Y.D. Stierhof, K. Tanaka, & E.A. Nigg. 1998. C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J Cell Biol.* 141:1563-1574.
- Fukasawa, K. 2005. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett.* 230:6-19.
- Fukasawa, K. 2007. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer.* 7:911-924.
- Gascoigne, K.E., & S.S. Taylor. 2008. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell.* 14:111-122.
- Gascoigne, K.E., & S.S. Taylor. 2009. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science.* 122:2579-2585.
- Gee, K.R., W.C. Sun, M.K. Bhalgat, R.H. Upson, D.H. Klaubert, K.A. Latham, & R.P. Haugland. 1999. Fluorogenic substrates based on fluorinated umbelliferones for continuous assays of phosphatases and beta-galactosidases. *Anal Biochem.* 273:41-48.
- Gehrmlich, K., L. Haren, & A. Merdes. 2004. Cyclin B degradation leads to NuMA release from dynein/dynactin and from spindle poles. *EMBO Rep.* 5:97-103.
- Giacinti, C., & A. Giordano. 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene.* 25:5220-5227.
- Giet, R., D. McLean, S. Descamps, M.J. Lee, J.W. Raff, C. Prigent, & D.M. Glover. 2002. Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *The Journal of Cell Biology.* 156:437-451.
- Giroux, S., M. Tremblay, D. Bernard, J.F. Cardin-Girard, S. Aubry, L. Larouche, S. Rousseau, J. Huot, J. Landry, L. Jeannotte, & J. Charron. 1999. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol.* 9:369-372.
- Glotzer, M. 2005. The Molecular Requirements for Cytokinesis. *Science.* 307:1735-1739.
- Golsteyn, R.M., K.E. Mundt, A.M. Fry, & E.A. Nigg. 1995. Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *The Journal of Cell Biology.* 129:1617-1628.
- Gontarewicz, A., S. Balabanov, G. Keller, R. Colombo, A. Graziano, E. Pesenti, D. Benten, C. Bokemeyer, W. Fiedler, J. Moll, & T.H. Brummendorf. 2008. Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood.* 111:4355-4364.
- Grisendi, S., R. Bernardi, M. Rossi, K. Cheng, L. Khandker, K. Manova, & P.P. Pandolfi. 2005. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature.* 437:147-153.
- Grisendi, S., C. Mecucci, B. Falini, & P.P. Pandolfi. 2006. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer.* 6:493-505.

- Gumireddy, K., M.V.R. Reddy, S.C. Cosenza, R.B. Nathan, S.J. Baker, N. Papathi, J. Jiang, J. Holland, & E.P. Reddy. 2005. ON01910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent. *Cancer Cell*. 7:275-286.
- Habedanck, R., Y.-D. Stierhof, C.J. Wilkinson, & E.A. Nigg. 2005. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol*. 7:1140-1146.
- Han, X., H. Saito, Y. Miki, & A. Nakanishi. 2008. A CRM1-mediated nuclear export signal governs cytoplasmic localization of BRCA2 and is essential for centrosomal localization of BRCA2. *Oncogene*. 27:2969-2977.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166:557-580.
- Harper, J.V., & G. Brooks. 2005. The mammalian cell cycle: an overview. *Methods Mol Biol*. 296:113-153.
- Harrington, E.A., D. Bebbington, J. Moore, R.K. Rasmussen, A.O. Ajose-Adeogun, T. Nakayama, J.A. Graham, C. Demur, T. Hercend, A. Diu-Hercend, M. Su, J.M.C. Golec, & K.M. Miller. 2004. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med*. 10:262-267.
- Hartwell, L.H. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 38:164-198.
- Hartwell, L.H. 1991. Twenty-Five Years of Cell Cycle Genetics. *Genetics*. 129:975-980.
- Hartwell, L.H., & T.A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246:629-634.
- Hauf, S., R.W. Cole, S. LaTerra, C. Zimmer, G. Schnapp, R. Walter, A. Heckel, J. van Meel, C.L. Rieder, & J.-M. Peters. 2003. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore–microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *The Journal of Cell Biology*. 161:281-294.
- Heintz, N., H.L. Sive, & R.G. Roeder. 1983. Regulation of human histone gene expression: kinetics of accumulation and changes in the rate of synthesis and in the half-lives of individual histone mRNAs during the HeLa cell cycle. *Mol Cell Biol*. 3:539-550.
- Hennig, W. 2002. Genetik. Springer-Verlag.
- Hinchcliffe, E.H., & G. Sluder. 2002. Two for two: Cdk2 and its role in centrosome doubling. *Oncogene*. 21:6154-6160.
- Hirota, T., N. Kunitoku, T. Sasayama, T. Marumoto, D. Zhang, M. Nitta, K. Hatakeyama, & H. Saya. 2003. Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells. *Cell*. 114:585-598.
- Hoar, K., A. Chakravarty, C. Rabino, D. Wysong, D. Bowman, N. Roy, & J.A. Ecsedy. 2007. MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Mol Cell Biol*. 27:4513-4525.
- Holen, K., R. DiPaola, G. Liu, A. Tan, G. Wilding, K. Hsu, N. Agrawal, C. Chen, L. Xue, E. Rosenberg, & M. Stein. 2011. A phase I trial of MK-0731, a Kinesin Spindle Protein (KSP) inhibitor, in patients with solid tumors. *Investigational New Drugs*:1-8.
- Hopps, H.E., B.C. Bernheim, A. Nisalak, J.H. Tjio, & J.E. Smadel. 1963. Biologic Characteristics of a Continuous Kidney Cell Line Derived from the African Green Monkey. *J Immunol*. 91:416-424.

- Huang, J., H. Zhu, S.J. Haggarty, D.R. Spring, H. Hwang, F. Jin, M. Snyder, & S.L. Schreiber. 2004. Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:16594-16599.
- Hübel, K., T. Lessmann, & H. Waldmann. 2008. Chemical biology--identification of small molecule modulators of cellular activity by natural product inspired synthesis. *Chem Soc Rev*. 37:1361-1374.
- Hughes, T.R., M.J. Marton, A.R. Jones, C.J. Roberts, R. Stoughton, C.D. Armour, H.A. Bennett, E. Coffey, H. Dai, Y.D. He, M.J. Kidd, A.M. King, M.R. Meyer, D. Slade, P.Y. Lum, S.B. Stepaniants, D.D. Shoemaker, D. Gachotte, K. Chakraborty, J. Simon, M. Bard, & S.H. Friend. 2000. Functional Discovery via a Compendium of Expression Profiles. *Cell*. 102:109-126.
- Hut, H.M., W. Lemstra, E.H. Blaauw, G.W. Van Cappellen, H.H. Kampinga, & O.C. Sibon. 2003. Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol Biol Cell*. 14:1993-2004.
- Ikediodi, O.N., H. Davies, G. Bignell, S. Edkins, C. Stevens, S. O'Meara, T. Santarius, T. Avis, S. Barthorpe, L. Brackenbury, G. Buck, A. Butler, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, C. Hunter, A. Jenkinson, D. Jones, V. Kosmidou, R. Lugg, A. Menzies, T. Mironenko, A. Parker, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, R. Smith, H. Solomon, P. Stephens, J. Teague, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, W. Reinhold, J.N. Weinstein, M.R. Stratton, P.A. Futreal, & R. Wooster. 2006. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther*. 5:2606-2612.
- Inoue, Y.H., M. do Carmo Avides, M. Shiraki, P. Deak, M. Yamaguchi, Y. Nishimoto, A. Matsukage, & D.M. Glover. 2000. Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*. 149:153-166.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.
- Itahana, K., K.P. Bhat, A. Jin, Y. Itahana, D. Hawke, R. Kobayashi, & Y. Zhang. 2003. Tumor Suppressor ARF Degrades B23, a Nucleolar Protein Involved in Ribosome Biogenesis and Cell Proliferation. *Molecular cell*. 12:1151-1164.
- Jackson, J.R., D.R. Patrick, M.M. Dar, & P.S. Huang. 2007. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer*. 7:107-117.
- Jameson, D.M., & G. Mocz. 2005. Fluorescence polarization/anisotropy approaches to study protein-ligand interactions: effects of errors and uncertainties. *Methods Mol Biol*. 305:301-322.
- Jantsch-Plunger, V., P. Goczy, A. Romano, H. Schnabel, D. Hamill, R. Schnabel, A.A. Hyman, & M. Glotzer. 2000. CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis. *J Cell Biol*. 149:1391-1404.
- Jian, Y., Z. Gao, J. Sun, Q. Shen, F. Feng, Y. Jing, & C. Yang. 2009. RNA aptamers interfering with nucleophosmin oligomerization induce apoptosis of cancer cells. *Oncogene*. 28:4201-4211.
- Kaighn, M.E., K.S. Narayan, Y. Ohnuki, J.F. Lechner, & L.W. Jones. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*. 17:16-23.

- Kapoor, T.M., T.U. Mayer, M.L. Coughlin, & T.J. Mitchison. 2000. Probing Spindle Assembly Mechanisms with Monastrol, a Small Molecule Inhibitor of the Mitotic Kinesin, Eg5. *The Journal of Cell Biology*. 150:975-988.
- Kashina, A.S., G.C. Rogers, & J.M. Scholey. 1997. The bimC family of kinesins: essential bipolar mitotic motors driving centrosome separation. *Biochim Biophys Acta*. 1357:257-271.
- Keen, N., & S. Taylor. 2004. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 4:927-936.
- Kenakin, T.P. 1993. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. Raven, New York. 385-410 pp.
- Khodjakov, A., & C.L. Rieder. 1999. The Sudden Recruitment of γ -Tubulin to the Centrosome at the Onset of Mitosis and Its Dynamic Exchange Throughout the Cell Cycle, Do Not Require Microtubules. *The Journal of Cell Biology*. 146:585-596.
- Kimura, M., S. Kotani, T. Hattori, N. Sumi, T. Yoshioka, K. Todokoro, & Y. Okano. 1997. Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1. *J Biol Chem*. 272:13766-13771.
- King, A.J., D.R. Patrick, R.S. Batorsky, M.L. Ho, H.T. Do, S.Y. Zhang, R. Kumar, D.W. Rusnak, A.K. Takle, D.M. Wilson, E. Hugger, L. Wang, F. Karreth, J.C. Lougheed, J. Lee, D. Chau, T.J. Stout, E.W. May, C.M. Rominger, M.D. Schaber, L. Luo, A.S. Lakdawala, J.L. Adams, R.G. Contractor, K.S. Smalley, M. Herlyn, M.M. Morrissey, D.A. Tuveson, & P.S. Huang. 2006. Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. *Cancer Res*. 66:11100-11105.
- Kinoshita, K., T.L. Noetzel, L. Pelletier, K. Mechtler, D.N. Drechsel, A. Schwager, M. Lee, J.W. Raff, & A.A. Hyman. 2005. Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *The Journal of Cell Biology*. 170:1047-1055.
- Knoth, T., K. Warburg, C. Katzka, A. Rai, A. Wolf, A. Brockmeyer, P. Janning, T.F. Reubold, S. Eschenburg, D.J. Manstein, K. Hübel, M. Kaiser, & H. Waldmann. 2009. The Ras Pathway Modulator Melophlin A Targets Dynamins. *Angewandte Chemie*. 121:7376-7381.
- Kobunai, T., T. Watanabe, Y. Yamamoto, & K. Eshima. 2010. The frequency of KRAS mutation detection in human colon carcinoma is influenced by the sensitivity of assay methodology: a comparison between direct sequencing and real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 395:158-162.
- Kops, G.J., B.A. Weaver, & D.W. Cleveland. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*. 5:773-785.
- Korgaonkar, C., J. Hagen, V. Tompkins, A.A. Frazier, C. Allamargot, F.W. Quelle, & D.E. Quelle. 2005. Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol*. 25:1258-1271.
- Kralj, M., K. Husnjak, T. Korbler, & J. Pavelic. 2003. Endogenous p21WAF1//CIP1 status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21WAF1//CIP1 overexpression. *Cancer Gene Ther*. 10:457-467.

- Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E.P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, & S. Horinouchi. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:9112-9117.
- Kufer, T.A., H.H.W. Silljé, R. Körner, O.J. Gruss, P. Meraldi, & E.A. Nigg. 2002. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *The Journal of Cell Biology*. 158:617-623.
- Kumar, R., A.E. Gururaj, & C.J. Barnes. 2006. p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer*. 6:459-471.
- Kuo, M.L., W. den Besten, M.C. Thomas, & C.J. Sherr. 2008. Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3. *Cell Cycle*. 7:3378-3387.
- Kurki, S., K. Peltonen, & M. Laiho. 2004. Nucleophosmin, HDM2 and p53: players in UV damage incited nucleolar stress response. *Cell Cycle*. 3:976-979.
- Kurzawa, L., & M.C. Morris. 2010. Cell-Cycle Markers and Biosensors. *Chembiochem*. 11:1037-1047.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lapenna, S., & A. Giordano. 2009. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 8:547-566.
- Lee, J., A. Kumagai, & W.G. Dunphy. 2001. Positive Regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 Proteins. *Mol. Biol. Cell*. 12:551-563.
- Lee, S., & C.A. Schmitt. 2003. Chemotherapy response and resistance. *Curr Opin Genet Dev*. 13:90-96.
- Leibovitz, A., J.C. Stinson, W.B. McCombs, 3rd, C.E. McCoy, K.C. Mazur, & N.D. Mabry. 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res*. 36:4562-4569.
- Lengauer, C., K.W. Kinzler, & B. Vogelstein. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 386:623-627.
- Licitra, E.J., & J.O. Liu. 1996. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:12817-12821.
- Lim, M.J., & X.W. Wang. 2006. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prev*. 30:481-490.
- Low, S.H., X. Li, M. Miura, N. Kudo, B. Quiñones, & T. Weimbs. 2003. Syntaxin 2 and Endobrevin Are Required for the Terminal Step of Cytokinesis in Mammalian Cells. *Developmental Cell*. 4:753-759.
- Lutz, W., W.L. Lingle, D. McCormick, T.M. Greenwood, & J.L. Salisbury. 2001. Phosphorylation of Centrin during the Cell Cycle and Its Role in Centriole Separation Preceding Centrosome Duplication. *Journal of Biological Chemistry*. 276:20774-20780.
- Ma, Z., M. Kanai, K. Kawamura, K. Kaibuchi, K. Ye, & K. Fukasawa. 2006. Interaction between ROCK II and Nucleophosmin/B23 in the Regulation of Centrosome Duplication. *Mol. Cell. Biol*. 26:9016-9034.

- Macchiarulo, A., I. Nobeli, & J.M. Thornton. 2004. Ligand selectivity and competition between enzymes in silico. *Nat Biotech.* 22:1039-1045.
- Maiato, H., J. DeLuca, E.D. Salmon, & W.C. Earnshaw. 2004. The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci.* 117:5461-5477.
- Manfredi, M.G., J.A. Ecsedy, K.A. Meetze, S.K. Balani, O. Burenkova, W. Chen, K.M. Galvin, K.M. Hoar, J.J. Huck, P.J. LeRoy, E.T. Ray, T.B. Sells, B. Stringer, S.G. Stroud, T.J. Vos, G.S. Weatherhead, D.R. Wysong, M. Zhang, J.B. Bolen, & C.F. Claiborne. 2007. Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:4106-4111.
- Mao, Y., A. Abrieu, & D.W. Cleveland. 2003. Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell.* 114:87-98.
- Marton, M.J., J.L. DeRisi, H.A. Bennett, V.R. Iyer, M.R. Meyer, C.J. Roberts, R. Stoughton, J. Burchard, D. Slade, H. Dai, D.E. Bassett, Jr., L.H. Hartwell, P.O. Brown, & S.H. Friend. 1998. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med.* 4:1293-1301.
- Matsumoto, Y., & J.L. Maller. 2002. Calcium, Calmodulin, and CaMKII Requirement for Initiation of Centrosome Duplication in Xenopus Egg Extracts. *Science.* 295:499-502.
- Matsuno, K., J.-i. Sawada, & A. Asai. 2008. Therapeutic potential of mitotic kinesin inhibitors in cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 18:253-274.
- May, K.M., & K.G. Hardwick. 2006. The spindle checkpoint. *J Cell Sci.* 119:4139-4142.
- Mayer, T.U., T.M. Kapoor, S.J. Haggarty, R.W. King, S.L. Schreiber, & T.J. Mitchison. 1999. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science.* 286:971-974.
- McCloskey, R., C. Menges, A. Friedman, D. Patel, & D.J. McCance. 2010. Human papillomavirus type 16 E6/E7 upregulation of nucleophosmin is important for proliferation and inhibition of differentiation. *J Virol.* 84:5131-5139.
- Medina, J.R., S.W. Grant, J.M. Axten, W.H. Miller, C.A. Donatelli, M.A. Hardwicke, C.A. Oleykowski, Q. Liao, R. Plant, & H. Xiang. 2010. Discovery of a new series of Aurora inhibitors through truncation of GSK1070916. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 20:2552-2555.
- Menninger, S. 2009. Etablierung zellulärer Testsysteme zur Identifikation von Molekülsonden für chemisch-genetische Untersuchungen. TU Dortmund.
- Meraldi, P., J. Lukas, A.M. Fry, J. Bartek, & E.A. Nigg. 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol.* 1:88-93.
- Merdes, A., K. Ramyar, J.D. Vechio, & D.W. Cleveland. 1996. A Complex of NuMA and Cytoplasmic Dynein Is Essential for Mitotic Spindle Assembly. *Cell.* 87:447-458.
- Mi, J., C. Guo, D.L. Brautigan, & J.M. Larner. 2007. Protein phosphatase-1alpha regulates centrosome splitting through Nek2. *Cancer Res.* 67:1082-1089.
- Mollinari, C., J.P. Kleman, W. Jiang, G. Schoehn, T. Hunter, & R.L. Margolis. 2002. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol.* 157:1175-1186.

- Morris, S.W., M.N. Kirstein, M.B. Valentine, K. Dittmer, D.N. Shapiro, A.T. Look, & D.L. Saltman. 1995. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 267:316-317.
- Münger, K., J.R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S.L. Gonzalez, M. Grace, & V.L. Zacny. 2001. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*. 20:7888-7898.
- Musacchio, A., & K.G. Hardwick. 2002. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:731-741.
- Musacchio, A., & E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:379-393.
- Nakanishi, A., X. Han, H. Saito, K. Taguchi, Y. Ohta, S. Imajoh-Ohmi, & Y. Miki. 2007. Interference with BRCA2, which localizes to the centrosome during S and early M phase, leads to abnormal nuclear division. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 355:34-40.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, & W. Ehrhardt. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 9:255-262.
- Neumann, B., T. Walter, J.-K. Hériché, J. Bulkescher, H. Erfle, C. Conrad, P. Rogers, I. Poser, M. Held, U. Liebel, C. Cetin, F. Sieckmann, G. Pau, R. Kabbe, A. Wünsche, V. Satagopam, M.H.A. Schmitz, C. Chapuis, D.W. Gerlich, R. Schneider, R. Eils, W. Huber, J.-M. Peters, A.A. Hyman, R. Durbin, R. Pepperkok, & J. Ellenberg. 2010. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*. 464:721-727.
- Nicklas, R.B. 1997. How Cells Get the Right Chromosomes. *Science*. 275:632-637.
- Nigg, E.A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*. 17:471-480.
- Nigg, E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:21-32.
- Normand, G., P.G. Hemmati, B. Verdoodt, C. von Haefen, J. Wendt, D. Güner, E. May, B. Dörken, & P.T. Daniel. 2005. p14ARF Induces G2 Cell Cycle Arrest in p53- and p21-deficient Cells by Down-regulating p34cdc2 Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry*. 280:7118-7130.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 344:503-508.
- Nusslein-Volhard, C., & E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 287:795-801.
- Oda, Y., T. Owa, T. Sato, B. Boucher, S. Daniels, H. Yamanaka, Y. Shinohara, A. Yokoi, J. Kuromitsu, & T. Nagasu. 2003. Quantitative Chemical Proteomics for Identifying Candidate Drug Targets. *Analytical Chemistry*. 75:2159-2165.
- Okuda, M. 2002. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene*. 21:6170-6174.

- Okuda, M., H.F. Horn, P. Tarapore, Y. Tokuyama, A.G. Smulian, P.K. Chan, E.S. Knudsen, I.A. Hofmann, J.D. Snyder, K.E. Bove, & K. Fukasawa. 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*. 103:127-140.
- Oltersdorf, T., S.W. Elmore, A.R. Shoemaker, R.C. Armstrong, D.J. Augeri, B.A. Belli, M. Bruncko, T.L. Deckwerth, J. Dinges, P.J. Hajduk, M.K. Joseph, S. Kitada, S.J. Korsmeyer, A.R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M.J. Mitten, D.G. Nettesheim, S. Ng, P.M. Nimmer, J.M. O'Connor, A. Oleksijew, A.M. Petros, J.C. Reed, W. Shen, S.K. Tahir, C.B. Thompson, K.J. Tomaselli, B. Wang, M.D. Wendt, H. Zhang, S.W. Fesik, & S.H. Rosenberg. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*. 435:677-681.
- Oost, T.K., C. Sun, R.C. Armstrong, A.S. Al-Assaad, S.F. Betz, T.L. Deckwerth, H. Ding, S.W. Elmore, R.P. Meadows, E.T. Olejniczak, A. Oleksijew, T. Oltersdorf, S.H. Rosenberg, A.R. Shoemaker, K.J. Tomaselli, H. Zou, & S.W. Fesik. 2004. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. *J Med Chem*. 47:4417-4426.
- Paraskeva, E., E. Izaurralde, F.R. Bischoff, J. Huber, U. Kutay, E. Hartmann, R. Luhrmann, & D. Gorlich. 1999. CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol*. 145:255-264.
- Perkins, D.N., D.J.C. Pappin, D.M. Creasy, & J.S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20:3551-3567.
- Putkey, F.R., T. Cramer, M.K. Morphew, A.D. Silk, R.S. Johnson, J.R. McIntosh, & D.W. Cleveland. 2002. Unstable Kinetochore-Microtubule Capture and Chromosomal Instability Following Deletion of CENP-E. *Developmental Cell*. 3:351-365.
- Qi, W., K. Shakalya, A. Stejskal, A. Goldman, S. Beeck, L. Cooke, & D. Mahadevan. 2008. NSC348884, a nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene*. 27:4210-4220.
- Raemaekers, T., K. Ribbeck, J. Beaudouin, W. Annaert, M. Van Camp, I. Stockmans, N. Smets, R. Bouillon, J. Ellenberg, & G. Carmeliet. 2003. NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J Cell Biol*. 162:1017-1029.
- Raff, J.W. 2002. Centrosomes and cancer: lessons from a TACC. *Trends Cell Biol*. 12:222-225.
- Raimondi, S.C., I.D. Dube, M.B. Valentine, J. Mirro, Jr., H.J. Watt, R.A. Larson, M.A. Bitter, M.M. Le Beau, & J.D. Rowley. 1989. Clinicopathologic manifestations and breakpoints of the t(3;5) in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Leukemia*. 3:42-47.
- Redner, R.L., E.A. Rush, S. Faas, W.A. Rudert, & S.J. Corey. 1996. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*. 87:882-886.
- Reed, S.I. 1997. Control of the G1/S transition. *Cancer Surv*. 29:7-23.
- Rochette, P.J., N. Bastien, J. Lavoie, S.L. Guerin, & R. Drouin. 2005. SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions. *J Mol Biol*. 352:44-57.
- Rodrigues, N.R., A. Rowan, M.E. Smith, I.B. Kerr, W.F. Bodmer, J.V. Gannon, & D.P. Lane. 1990. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:7555-7559.

- Rubbi, C.P., & J. Milner. 2003. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* 22:6068-6077.
- Rubin, S.J., D.E. Hallahan, C.R. Ashman, D.G. Brachman, M.A. Beckett, S. Virudachalam, D.W. Yandell, & R.R. Weichselbaum. 1991. Two prostate carcinoma cell lines demonstrate abnormalities in tumor suppressor genes. *J Surg Oncol.* 46:31-36.
- Rudolph, J. 2007. Inhibiting transient protein-protein interactions: lessons from the Cdc25 protein tyrosine phosphatases. *Nat Rev Cancer.* 7:202-211.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, & H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-491.
- Sambrook, J., Russell, D.W.,. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Santos, S.D., & J.E. Ferrell. 2008. Systems biology: On the cell cycle and its switches. *Nature.* 454:288-289.
- Sasai, K., H. Katayama, D.L. Stenoien, S. Fujii, R. Honda, M. Kimura, Y. Okano, M. Tatsuka, F. Suzuki, E.A. Nigg, W.C. Earnshaw, W.R. Brinkley, & S. Sen. 2004. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 59:249-263.
- Sato, S.-i., Y. Kwon, S. Kamisuki, N. Srivastava, Q. Mao, Y. Kawazoe, & M. Uesugi. 2007. Polyproline-Rod Approach to Isolating Protein Targets of Bioactive Small Molecules: Isolation of a New Target of Indomethacin. *Journal of the American Chemical Society.* 129:873-880.
- Sato, S.-i., A. Murata, T. Shirakawa, & M. Uesugi. 2010. Biochemical Target Isolation for Novices: Affinity-Based Strategies. *Chemistry & Biology.* 17:616-623.
- Schmidt, M., & H. Bastians. 2007. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resist Updat.* 10:162-181.
- Schmidt, M., H.P. Hofmann, K. Sanders, G. Sczakiel, T.L. Beckers, & V. Gekeler. 2006. Molecular alterations after Polo-like kinase 1 mRNA suppression versus pharmacologic inhibition in cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 5:809-817.
- Schreiber, S.L. 1998. Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 6:1127-1152.
- Sebolt-Leopold, J.S., D.T. Dudley, R. Herrera, K. Van Becelaere, A. Wiland, R.C. Gowan, H. Teclé, S.D. Barrett, A. Bridges, S. Przybranowski, W.R. Leopold, & A.R. Saltiel. 1999. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med.* 5:810-816.
- Sherr, C.J. 2006. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer.* 6:663-673.
- Shim, J.S., J. Lee, H.J. Park, S.J. Park, & H.J. Kwon. 2004. A new curcumin derivative, HBC, interferes with the cell cycle progression of colon cancer cells via antagonization of the Ca²⁺/calmodulin function. *Chem Biol.* 11:1455-1463.
- Shinmura, K., P. Tarapore, Y. Tokuyama, K.R. George, & K. Fukasawa. 2005. Characterization of centrosomal association of nucleophosmin/B23 linked to Crm1 activity. *FEBS Lett.* 579:6621-6634.

- Sjödahl, G., M. Lauss, S. Gudjonsson, F. Liedberg, C. Hallden, G. Chebil, W. Mansson, M. Hoglund, & D. Lindgren. 2011. A Systematic Study of Gene Mutations in Urothelial Carcinoma; Inactivating Mutations in TSC2 and PIK3R1. *PLoS One*. 6:e18583.
- Skop, A.R., H. Liu, J. Yates, 3rd, B.J. Meyer, & R. Heald. 2004. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science*. 305:61-66.
- Skoufias, D.A., P.R. Andreassen, F.B. Lacroix, L. Wilson, & R.L. Margolis. 2001. Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:4492-4497.
- Smith, G.P., & V.A. Petrenko. 1997. Phage Display. *Chem Rev*. 97:391-410.
- Snyder, J.R., A. Hall, L. Ni-Komatsu, S.M. Khersonsky, Y.-T. Chang, & S.J. Orlow. 2005a. Dissection of Melanogenesis with Small Molecules Identifies Prohibitin as a Regulator. *Chemistry & Biology*. 12:477-484.
- Snyder, J.R., A. Hall, L. Ni-Komatsu, S.M. Khersonsky, Y.T. Chang, & S.J. Orlow. 2005b. Dissection of melanogenesis with small molecules identifies prohibitin as a regulator. *Chem Biol*. 12:477-484.
- Soncini, C., P. Carpinelli, L. Gianellini, D. Fancelli, P. Vianello, L. Rusconi, P. Storici, P. Zugnioni, E. Pesenti, V. Croci, R. Ceruti, M.L. Giorgini, P. Cappella, D. Ballinari, F. Sola, M. Varasi, R. Bravo, & J. Moll. 2006. PHA-680632, a Novel Aurora Kinase Inhibitor with Potent Antitumoral Activity. *Clinical Cancer Research*. 12:4080-4089.
- Soule, H.D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert, & M. Brennan. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 51:1409-1416.
- Stockwell, B.R. 2000. Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function. *Nat Rev Genet*. 1:116-125.
- Stockwell, B.R. 2004. Exploring biology with small organic molecules. *Nature*. 432:846-854.
- Straight, A.F., A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N.J. Westwood, J.R. Sellers, & T.J. Mitchison. 2003. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science*. 299:1743-1747.
- Strebhardt, K., & A. Ullrich. 2006. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 6:321-330.
- Sutton, D., Diamond, M., Faucette, L., Giardiniere, M., Zhang, S., Vidal, J., Dhanak, D., Knight, S., Bergnes, G., Qian, X., Wood, K., Huang, P., Jackson, J. 2007. GSK923295A, a potent and selective CENP-E inhibitor, has broad spectrum activity against human tumor xenografts in nude mice. *Proc. Am. Ass. Cancer Res*. Abstr. # 1522 (Abstract).
- Takai, N., R. Hamanaka, J. Yoshimatsu, & I. Miyakawa. 2005. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene*. 24:287-291.
- Takemura, M., F. Ohoka, M. Perpelescu, M. Ogawa, H. Matsushita, T. Takaba, T. Akiyama, H. Umekawa, Y. Furuichi, P.R. Cook, & S. Yoshida. 2002. Phosphorylation-dependent migration of retinoblastoma protein into the nucleolus triggered by binding to nucleophosmin/B23. *Exp Cell Res*. 276:233-241.
- Takemura, M., K. Sato, M. Nishio, T. Akiyama, H. Umekawa, & S. Yoshida. 1999. Nucleolar Protein B23.1 Binds to Retinoblastoma Protein and Synergistically Stimulates DNA Polymerase α Activity. *Journal of Biochemistry*. 125:904-909.

- Tao, Y., P. Zhang, V. Frascogna, Y. Lecluse, A. Auperin, J. Bourhis, & E. Deutsch. 2007. Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells. *Br J Cancer*. 97:1664-1672.
- Tatsumoto, T., X. Xie, R. Blumenthal, I. Okamoto, & T. Miki. 1999. Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol*. 147:921-928.
- Taylor, W.R. 2004. FACS-based detection of phosphorylated histone H3 for the quantitation of mitotic cells. *Methods Mol Biol*. 281:293-299.
- Terada, Y., M. Tatsuka, F. Suzuki, Y. Yasuda, S. Fujita, & M. Otsu. 1998. AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J*. 17:667-676.
- Terstappen, G.C., C. Schlupen, R. Raggiaschi, & G. Gaviraghi. 2007. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 6:891-903.
- Toji, S., N. Yabuta, T. Hosomi, S. Nishihara, T. Kobayashi, S. Suzuki, K. Tamai, & H. Nojima. 2004. The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells*. 9:383-397.
- Tokuyama, Y., H.F. Horn, K. Kawamura, P. Tarapore, & K. Fukasawa. 2001. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem*. 276:21529-21537.
- Towbin, H., T. Staehelin, & J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4350-4354.
- Travis, A.S. 1989. Science as receptor of technology: Paul Ehrlich and the synthetic dyestuffs industry. *Sci Context*. 3:383-408.
- Vader, G., A.F. Maia, & S.M. Lens. 2008. The chromosomal passenger complex and the spindle assembly checkpoint: kinetochore-microtubule error correction and beyond. *Cell Div*. 3:10.
- Vader, G., R.H. Medema, & S.M. Lens. 2006. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol*. 173:833-837.
- Vagnarelli, P., & W.C. Earnshaw. 2004. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*. 113:211-222.
- van Haften, G., G.L. Dalgliesh, H. Davies, L. Chen, G. Bignell, C. Greenman, S. Edkins, C. Hardy, S. O'Meara, J. Teague, A. Butler, J. Hinton, C. Latimer, J. Andrews, S. Barthorpe, D. Beare, G. Buck, P.J. Campbell, J. Cole, S. Forbes, M. Jia, D. Jones, C.Y. Kok, C. Leroy, M.L. Lin, D.J. McBride, M. Maddison, S. Maquire, K. McLay, A. Menzies, T. Mironenko, L. Mulderrig, L. Mudie, E. Pleasance, R. Shepherd, R. Smith, L. Stebbings, P. Stephens, G. Tang, P.S. Tarpey, R. Turner, K. Turrell, J. Varian, S. West, S. Widaa, P. Wray, V.P. Collins, K. Ichimura, S. Law, J. Wong, S.T. Yuen, S.Y. Leung, G. Tonon, R.A. DePinho, Y.T. Tai, K.C. Anderson, R.J. Kahnoski, A. Massie, S.K. Khoo, B.T. Teh, M.R. Stratton, & P.A. Futreal. 2009. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet*. 41:521-523.
- Vane, J.R., & R.M. Botting. 2003. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*. 110:255-258.

- Vassilev, L.T., B.T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, & E.A. Liu. 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 303:844-848.
- Venter, J.C.M.D. Adams E.W. Myers P.W. Li R.J. Mural G.G. Sutton H.O. Smith M. Yandell C.A. Evans R.A. Holt J.D. Gocayne P. Amanatides R.M. Ballew D.H. Huson J.R. Wortman Q. Zhang C.D. Kodira X.H. Zheng L. Chen M. Skupski G. Subramanian P.D. Thomas J. Zhang G.L. Gabor Miklos C. Nelson S. Broder A.G. Clark J. Nadeau V.A. McKusick N. Zinder A.J. Levine R.J. Roberts M. Simon C. Slayman M. Hunkapiller R. Bolanos A. Delcher I. Dew D. Fasulo M. Flanigan L. Florea A. Halpern S. Hannenhalli S. Kravitz S. Levy C. Mobarry K. Reinert K. Remington J. Abu-Threideh E. Beasley K. Biddick V. Bonazzi R. Brandon M. Cargill I. Chandramouliswaran R. Charlab K. Chaturvedi Z. Deng V.D. Francesco P. Dunn K. Eilbeck C. Evangelista A.E. Gabrielian W. Gan W. Ge F. Gong Z. Gu P. Guan T.J. Heiman M.E. Higgins R.-R. Ji Z. Ke K.A. Ketchum Z. Lai Y. Lei Z. Li J. Li Y. Liang X. Lin F. Lu G.V. Merkulov N. Milshina H.M. Moore A.K. Naik V.A. Narayan B. Neelam D. Nusskern D.B. Rusch S. Salzberg W. Shao B. Shue J. Sun Z.Y. Wang A. Wang X. Wang J. Wang M.-H. Wei R. Wides C. Xiao C. Yan, et al. 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science*. 291:1304-1351.
- Vonesch, C., & M. Unser. 2008. A fast thresholded landweber algorithm for wavelet-regularized multidimensional deconvolution. *IEEE Trans Image Process*. 17:539-549.
- Waldmann, H. 2003. At the crossroads of chemistry and biology. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 11:3045-3051.
- Walther, T. 2009. Synthese und Struktur-Wirkungs-Beziehung von Brunsvicamid-Analoga. TU Dortmund.
- Wang, H.F., K. Takenaka, A. Nakanishi, & Y. Miki. 2011. BRCA2 and Nucleophosmin Coregulate Centrosome Amplification and Form a Complex with the Rho Effector Kinase ROCK2. *Cancer Res*. 71:68-77.
- Wang, W., A. Budhu, M. Forgues, & X.W. Wang. 2005. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol*. 7:823-830.
- Ward, G.E., K.L. Carey, & N.J. Westwood. 2002. Using small molecules to study big questions in cellular microbiology. *Cell Microbiol*. 4:471-482.
- Warnke, S., S. Kemmler, R.S. Hames, H.-L. Tsai, U. Hoffmann-Rohrer, A.M. Fry, & I. Hoffmann. 2004. Polo-like Kinase-2 Is Required for Centriole Duplication in Mammalian Cells. *Current Biology*. 14:1200-1207.
- Watanabe, N., T. Sekine, M. Takagi, J. Iwasaki, N. Imamoto, H. Kawasaki, & H. Osada. 2009. Deficiency in chromosome congression by the inhibition of Plk1 polo box domain-dependent recognition. *J Biol Chem*. 284:2344-2353.
- Waters, J.C., R.H. Chen, A.W. Murray, & E.D. Salmon. 1998. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J Cell Biol*. 141:1181-1191.
- Weaver, B.A.A., & D.W. Cleveland. 2005. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. 8:7-12.
- Wessel, D., & U.I. Flugge. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 138:141-143.

- Westwood, N.J. 2004. Chemical genetics: how does it function? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 362:2761-2774.
- Whitmore, L., & B.A. Wallace. 2008. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*. 89:392-400.
- Wood, K.W., W.D. Cornwell, & J.R. Jackson. 2001. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol*. 1:370-377.
- Wu, M.H., J.H. Chang, C.C. Chou, & B.Y. Yung. 2002. Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation. *Int J Cancer*. 97:297-305.
- Wulff, J.E., R. Siegrist, & A.G. Myers. 2007. The natural product avrainvillamide binds to the oncoprotein nucleophosmin. *J Am Chem Soc*. 129:14444-14451.
- Xiao, J., Z. Zhang, G.G. Chen, M. Zhang, Y. Ding, J. Fu, M. Li, & J.P. Yun. 2009. Nucleophosmin/B23 interacts with p21WAF1/CIP1 and contributes to its stability. *Cell Cycle*. 8:889-895.
- Yamamoto, K., A. Yamazaki, M. Takeuchi, & A. Tanaka. 2006. A versatile method of identifying specific binding proteins on affinity resins. *Analytical Biochemistry*. 352:15-23.
- Yao, X., A. Abrieu, Y. Zheng, K.F. Sullivan, & D.W. Cleveland. 2000. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol*. 2:484-491.
- Yun, J.P., E.C. Chew, C.T. Liew, J.Y. Chan, M.L. Jin, M.X. Ding, Y.H. Fai, H.K. Li, X.M. Liang, & Q.L. Wu. 2003. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem*. 90:1140-1148.
- Zhang, J.-H., T.D.Y. Chung, & K.R. Oldenburg. 1999. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening*. 4:67-73.
- Zhao, Z.S., J.P. Lim, Y.W. Ng, L. Lim, & E. Manser. 2005. The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Mol Cell*. 20:237-249.
- Zheng, X.F., & T.F. Chan. 2002. Chemical genomics: a systematic approach in biological research and drug discovery. *Curr Issues Mol Biol*. 4:33-43.
- Zhou, J., & P. Giannakakou. 2005. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 5:65-71.
- Zhu, H., & M. Snyder. 2003. Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol*. 7:55-63.

9. Anhang

9.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius; $T(^{\circ}\text{C}) = T(\text{K}) + 273,16 \text{ K}$
A	Ampère
Amp	Ampicillin
ATCC	American Tissue Culture Collection
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
bzw.	beziehungsweise
CAM	Chloramphenicol
CD	Zirkulardichroismus („circular dichroism“)
CDK	Cyclin abhängige Kinase („cyclin dependant kinase“)
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales Rinderserum
FLIM	Fluoreszenz-Lebensdauer Mikroskopie („fluorescence lifetime imaging“)
FP	Fluoreszenz-Polarisation
h	Stunde
His	Histidin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel

M	Molar (mol/l)
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis eines Ionenfragments
min	Minute
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NPM	Nucleophosmin
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration in mol/l
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolts per minute“)
RT	Zimmertemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
s	Sekunde
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein („yellow fluorescent protein“)

9.2. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich für die Überlassung des spannenden Projektes, sein immerwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Bereitstellung idealer Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Frank Schulz danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Dr. Leif Dehmelt danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat die Rolle des Prüfungsbeisitzers zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Slava Ziegler die mir selbstständiges Arbeiten ermöglichte und mir durch ihre hervorragende fachliche Kompetenz bei Fragen und Problemen stets zur Seite stand. Ebenso danke ich ihr für die Durchsicht dieser Arbeit.

Bei Dr. Katja Hübel möchte ich mich für die Aufnahme in die Biogruppe, die anfängliche Betreuung und natürlich die schönen Festival-Tage bedanken.

Prof. Dr. Anthony Hyman und Prof. Dr. Thomas Mayer danke ich für die Möglichkeit in ihren Arbeitsgruppen am MPI in Dresden und an der Universität Konstanz, die Lebendzell-Experimente durchzuführen, welche einen wichtigen Beitrag zum Fortgang dieser Arbeit geleistet haben.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Sven Müller sowie Gabi Beetz aus der Abteilung für Systemische Zellbiologie bedanken, die mir bei Fragen bezüglich der Mikroskopie sowie den FACS-Messungen immer zur Seite gestanden haben. Thies Klüßendorf bin ich dankbar für die Einführung in die FLIM-Experimente, sowie für seine Hilfe bei deren Auswertung.

Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Petra Janning und Dipl.-Ing. Andreas Brockmeyer, welche auch am Wochenende dafür gesorgt haben, dass Proben zur Zielprotein-Identifizierung reibungslos analysiert werden konnten.

Dr. Sascha Menninger gebührt besonderer Dank für die Einführung in das Projekt, die netten Tage in Dresden und das Korrektur-Lesen dieser Arbeit. Dr. Heiko Dückert danke ich für die gute Teamarbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei unserer technischen Assistentin Christine Nowak, besonders für ihren unermüdlichen Einsatz bei der CRM1-Klonierung und -Reinigung. Ferner danke ich der restlichen Biotruppe: Dr. Bernhard Ellinger, Dr. Silke Erdmann, Dr. Claas Gerding-Reimers, Nancy Martinez, Beate Schölermann, Tuyen Tran und Dr. Karin Warburg. Ein spezieller Dank gilt meiner Schreibtischnachbarin Kristina Görmer, die mir zu

einer guten Freundin geworden ist. Ohne sie wären so manche Tage noch unerträglicher gewesen. Danke natürlich auch für die „chemische Beratung“ und die Hilfestellungen bei ChemDraw.

Dank gilt auch meinem Bachelor-Studenten Bernd Rathmer und Jennifer Dietrich, die erfolgreich an diesem Projekt mitgewirkt haben.

Abschließend danke ich meinen Eltern, meiner Schwester Sandra und meinem Patenkind Laura, die mich in diesen Jahren immer unterstützt und wieder motiviert haben. An dieser Stelle möchte ich auch Marlies und Walter danken, die mir in einer schwierigen Situation geholfen und somit dazu beigetragen haben, dass ich mich auf die Fertigstellung meiner Arbeit konzentrieren konnte. Thorsten, danke für deine unendliche Liebe!

9.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Verena Pries, geborene Effenberger
Geburtsdatum und -ort	20. Mai 1982, Essen
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

08/1989 – 07/1993	Grundschule „Am Krausen Bäumchen“, Essen
08/1993 – 06/2002	Maria-Wächtler-Gymnasium, Essen
06/2002	allgemeine Hochschulreife

Universitätsausbildung

10/2002 – 06/2005	Studiengang Biologie, Ruhr-Universität Bochum
06/2005	Bachelor of Science
07/2005 – 03/2007	Studiengang Biologie, Ruhr-Universität Bochum
09/2002 – 08/2003	Anfertigung der Masterarbeit an der Ruhr-Universität Bochum am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie (Prof. Weiler) „Molekulare Untersuchungen zum katalytischen Mechanismus der Allenoxid-Cyclase 2 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) HEYNH“
03/2007	Master of Science
05/2007 – 06/2011	Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und der Technischen Universität Dortmund in der Abteilung für Chemische Biologie (Prof. Waldmann)

Dortmund, 26.06.2011

9.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln erstellt habe.

Dortmund, den 26.06.2011

Verena Pries