

Identifizierung und Charakterisierung der selektiven Wirkung von (-)-Englerin A

Zur Erlangung eines akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

Dissertation

von
Diplom-Biologin
Yasemin Akbulut

Dortmund 2015

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund in der Zeit vom April 2011 bis Juni 2015 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Schulz

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
Kapitel 1.....	5
Einleitung.....	5
1.1 Das Nierenzellkarzinom.....	5
1.1.2 Von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressoren.....	6
1.1.3 Behandlung von Nierenkrebs.....	8
1.2 Naturstoffe als Quelle für neue Medikamente.....	11
1.2.1 Biologische Aktivität von (-)-Englerin A.....	13
1.2.2 PKC θ als Zielprotein von (-)-Englerin A.....	15
1.3 Chemische Genetik.....	16
1.4 Methoden zur Zielprotein-Identifizierung.....	19
1.4.1 Affinitäts-basierte Methoden.....	19
1.4.2 Affinitäts-freie Methoden.....	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	26
Kapitel 2.....	27
Material.....	27
2.1 Chemikalien.....	27
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.3 Laborgeräte.....	30
2.4 Puffer und Lösungen.....	30
2.5 Reagenzsysteme und Kits.....	35
2.6 Zelllinien.....	36
2.7 Nährmedien.....	37
2.7.1 Humane Zellen.....	37
2.7.2 Bakterien.....	37
2.8 Nukleinsäurestandards.....	38
2.9 Proteinstandards.....	38
2.10 Bakterienstämme.....	38
2.11 Plasmide.....	39
2.12 Oligonukleotide.....	39
2.13 Antikörper.....	40
2.13.1 Primärantikörper.....	40
2.13.2 Sekundärantikörper.....	40

Kapitel 3.....	41
Methoden.....	41
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	41
3.1.1 RNA-Isolierung.....	41
3.1.2 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration.....	41
3.1.3 cDNA-Herstellung (Reverse Transkription).....	41
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
3.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	42
3.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
3.1.7 Herstellung von Glycerol-Kulturen.....	44
3.1.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	44
3.2 Biochemische Methoden.....	44
3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	44
3.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry.....	45
3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.2.3 Colloidale-Coomassie Färbung von Proteinen.....	46
3.2.4 Immunoblot.....	46
3.2.5 Detektion immobilisierter Proteine.....	46
3.2.5.1 Detektion der Proteine mittels HRP-gekoppelter Antikörper.....	46
3.2.6 Affinitätschromatographie zur Zielprotein-Identifizierung.....	47
3.2.7 Tryptischer In-Gelverdau von Proteinen.....	47
3.2.8 Protein-Identifizierung mittels nano-HPLC/MS/MS.....	48
3.2.9 Bestimmung der Aktivität verschiedener Kinasen.....	49
3.2.9.1 Bestimmung der Aktivität mit der Z'-LYTE [®] -Technologie.....	49
3.2.9.2 Bestimmung der Aktivität mit dem Adapta [®] -Testsystem.....	50
3.2.9.3 Bestimmung der Bindung mit dem LanthaScreen [®]	51
3.2.10 Co-Immunopräzipitation.....	51
3.3 Zellbiologische Methoden.....	52
3.3.1 Auftauen von Zellen.....	52
3.3.2 Subkultivierung von Zellen.....	52
3.3.3 Zellzahlbestimmung.....	52
3.3.4 Kryokonservierung von Zellen.....	53
3.3.5 Transiente Transfektion von Zellen.....	53
3.3.6 Tetrazyklin-abhängige stabile TRPC4/5-Expression.....	54
3.3.7 Herstellung von Zelllysaten.....	54
3.3.7.1 Zelllysate für affinitätschromatographische Analysen und für den Nachweis von PKC θ	54

3.3.7.2 Zelllysate für den Nachweis von TRPC-Proteinen.....	54
3.3.7.3 Zelllysate für die Co-Immunopräzipitation von TRPC-Proteinen.....	55
3.3.8 Echtzeit Lebendzell-Mikroskopie.....	55
3.3.9 Bestimmung der Zellviabilität.....	55
3.3.10 Lebendzellanalyse mittels Echtzeit-Zell-Analysator (RTCA).....	56
3.3.11 Bestimmung der Zytotoxizität.....	56
3.3.12 Bestimmung von Nekrose und Apoptose mittels Durchflusszytometrie.....	57
3.3.13 Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität.....	58
3.3.14 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	58
3.3.15 Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration.....	59
3.3.15.1 Analyse der Ca ²⁺ -Konzentration durch die Firma Axxam.....	59
3.3.15.2 Analyse der Ca ²⁺ -Konzentration durch ein etabliertes Ca ²⁺ -Testsystem.....	59
3.3.15.3 Analyse der Ca ²⁺ -Konzentration an der Universität Leeds (UK).....	60
3.3.16 Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit von EGTA.....	60
3.3.17 Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit verschiedener Ca ²⁺ -Konzentrationen.....	60
3.3.18 Bestimmung der Glukoseaufnahme.....	61
3.3.19 Bestimmung der Laktatkonzentration.....	61
3.3.20 Immunozytochemie.....	62
3.3.20.1 Immunozytochemischer Nachweis von Proteinen.....	62
3.3.20.2 Immunozytochemischer Nachweis von Mitochondrien.....	62
3.3.21 GPCR-Profilierung.....	62
3.4 Elektrophysiologische Methoden.....	63
3.4.1 Ionenkanal-Profilierung.....	63
3.4.2 Patch-Clamp Versuche am MPI für experimentelle Medizin in Göttingen.....	63
3.4.3 Patch-Clamp Versuche an der Universität Leeds (UK).....	63
Kapitel 4.....	65
Ergebnisse.....	65
4.1 Analysen zur biologischen Aktivität von (-)-Englerin A.....	65
4.1.1 Effekte von (-)-Englerin A auf Nierenkrebszellen und die Brustkrebszelllinie HS578-T.....	65
4.1.1.2 Charakterisierung von (-)-Englerin A-Derivaten in A498-Zellen.....	67
4.1.2 Zeit- und konzentrationsabhängiger Einfluss in A498-Zellen.....	69
4.1.3 Morphologische Analysen in A498-Zellen.....	73
4.1.4 Untersuchungen zum Zelltod.....	75
4.2 Identifizierung der Zielproteine von (-)-Englerin A.....	79

4.2.1 Biochemische Analysen zur Zielprotein-Identifizierung.....	79
4.2.2 Untersuchung der Zielprotein-Kandidaten.....	81
4.2.3 Überprüfung von Kinasen als mögliche Zielproteine.....	83
4.2.4 Charakteristische Mutationen in Nierenkrebszelllinien.....	84
4.2.5 Untersuchungen zum Metabolismus in A498-Zellen.....	85
4.2.6 Wissenschaftliche Hypothesen zur Zielprotein-Identifizierung.....	88
4.2.7 Überprüfung von Ionenkanälen als putative Zielproteine.....	88
4.2.8 Identifizierung von TRPC5 als Zielprotein in CHO-Zellen.....	90
4.2.8.1 Untersuchungen zur intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration in A498-Zellen.....	92
4.2.9 TRPC4/5-Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien.....	93
4.2.10 Expressionsstudien zu TRPC4α/β in verschiedenen Zelllinien.....	94
4.3 Validierung der Zielproteine TRPC4/5.....	96
4.3.1 Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration in HEK293-TRPC4/5-Zellen.....	96
4.3.1.1 Untersuchungen zur Herkunft der Kalziumionen.....	97
4.3.2 Selektivität von (-)-Englerin A für TRP-Kanäle.....	98
4.3.2.1 Einfluss von (-)-Englerin A auf TRPC6, TRPM2 und TRPV4.....	100
4.3.2.2 Einfluss von (-)-Englerin A auf GPCRs.....	101
4.3.3 Biologische Aktivität von (-)-Englerin A in HEK293T-TRPC4/5-Zellen.....	103
4.3.4 Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration in A498-Zellen.....	107
4.3.5 Effekte von (-)-Englerin A auf Ionenkanäle in A498-Zellen.....	108
4.3.6 Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5.....	111
4.3.7 Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität in Abhängigkeit von Ca ²⁺	113
4.3.8 Einfluss von (-)-Englerin A auf die Mitochondrien.....	114
4.3.9 Untersuchungen zu PKCθ als Zielprotein von (-)-Englerin A.....	116
Kapitel 5.....	119
Diskussion.....	119
5.1 Biologische Aktivität von (-)-Englerin A.....	119
5.2 Identifizierung der Zielproteine von (-)-Englerin A.....	124
5.2.1 TRPC4/5- Regulatoren der intrazellulären Ca ²⁺ -Homöostase.....	130
5.3 Validierung der Zielproteine TRPC4/5.....	132
Kapitel 6.....	141
Ausblick.....	141
Kapitel 7.....	143
Literaturverzeichnis.....	143

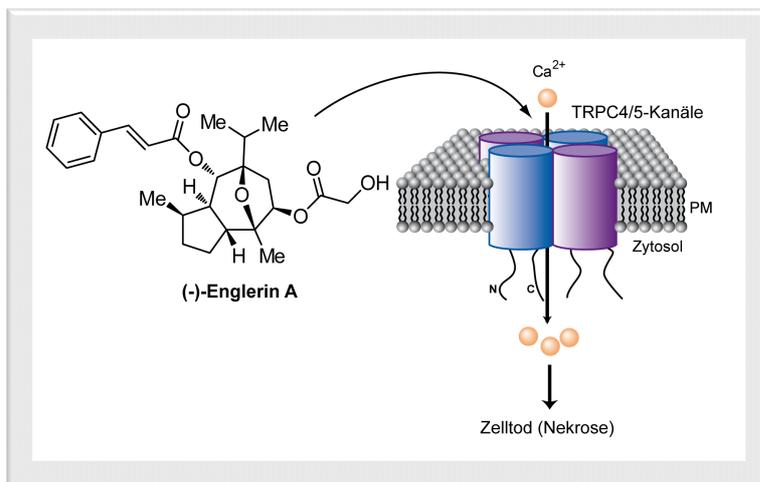
Abbildungsverzeichnis.....	151
Tabellenverzeichnis.....	154
Abkürzungsverzeichnis.....	155
Publikationen.....	157
Danksagung.....	158
Eidesstattliche Versicherung.....	159

Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom ist das am häufigsten auftretende Malignom der Niere. Dabei haben Patienten mit einer fortgeschrittenen lokalen Erkrankung eine 5-Jahres Überlebensrate von weniger als 2 %. Die gegenwärtigen Therapien sind oft nicht effektiv und unspezifisch und haben starke Nebenwirkungen. Dadurch besteht ein hoher Bedarf an neuen Therapien, die idealerweise eine selektive Wirkung ohne Nebenwirkungen erzielen.

Der Naturstoff (-)-Englerin A ist ein Guanin-Sesquiterpen aus dem Wolfsmilchgewächs *Phyllanthus engleri* und hemmt mit 1000facher Selektivität das Wachstum von Nierenkrebszelllinien im Vergleich zu anderen Krebszelllinien.

Die Etablierung der Totalsynthese und der absoluten Konfiguration des Naturstoffes schafften zum Einen die Voraussetzung für die Synthese von (-)-Englerin A-Derivaten mit einer höheren Potenz als (-)-Englerin A selbst und ermöglichten zum Anderen die Synthese des Naturstoffes in größeren Mengen, so dass weitere Untersuchungen zur biologischen Aktivität durchgeführt werden konnten.



Der Wirkmechanismus von (-)-Englerin A

(-)-Englerin A ist ein potenter und selektiver Aktivator für TRPC4/5-Kanäle in Nierenkrebszellen. Die Aktivierung Ca^{2+} -permeabler TRPC4/5-Kanäle erfolgt durch die direkte extrazelluläre Bindung an die Kanäle und führt zu einem starken Ca^{2+} -Influx. Die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration induziert schnell und selektiv den Zelltod in Nierenkrebszellen. **PM:** Plasmamembran

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass (-)-Englerin A innerhalb weniger Minuten Nekrose induziert, wobei der Wirkmechanismus unbekannt war. Für die Identifizierung möglicher Zielproteine wurde ein umfassendes Methodenspektrum eingesetzt. Hierzu wurden u. a. proteomische Analysen unter Verwendung von Affinitätsproben durchgeführt. Die dabei angereicherten Proteine konnten jedoch nicht als tatsächliche Zielproteine des (-)-Englerins bestätigt werden. Darüber hinaus wurden Signaltransduktionswege sowie der Einfluss auf den Zellmetabolismus untersucht, die ebenfalls nicht zur Identifizierung der Zielproteine führten. Weitere Versuche konzentrierten sich auf Membranproteine wie z.B.

Ionenkanäle und GPCRs. Diese konnten durch fehlende Solubilität in der Affinitätschromatographie nicht mit einbezogen werden. Weiterführende Untersuchungen berücksichtigten besonders Ionenkanäle, die in Zusammenhang mit Nierenkrebs stehen und identifizierten TRPC4/5-Kanäle als Zielproteine (*Transient receptor potential canonical ion channel 4/5*). Die Validierung der Zielproteine und des Wirkungsmechanismus von (-)-Englerin A erfolgte mit Hilfe von zellbasierten Ca^{2+} -Testsystemen, patch clamp Versuchen und genetischen Studien. Diese zeigten, dass (-)-Englerin A bereits bei nanomolaren Konzentrationen ein selektiver Aktivator von TRPC4/5-Kanälen ist. TRPC4/5-Kanäle werden durch eine direkte extrazelluläre Bindung von (-)-Englerin A aktiviert. Die mögliche indirekte Aktivierung der Kanäle über GPCRs konnte mit Hilfe eines GPCR Inhibitors in patch clamp Versuchen ausgeschlossen werden. Die durch (-)-Englerin A vermittelte Aktivierung von TRPC4/5-Kanälen führt zu einem starken Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen, wodurch die Zellen in kürzester Zeit der Nekrose erliegen. In patch clamp Versuchen wurden für Zellen, die mit (-)-Englerin A behandelt wurden Strom-Spannungs-Kurven gemessen, deren Verlauf für TRPC4 und nahe Verwandte Kanäle wie z.B. TRPC5 typisch ist. Die Verwendung des TRPC4/5 Antagonisten ML204 bestätigte TRPC4/5 als Zielproteine von (-)-Englerin A, da die Wirkung durch den Antagonisten inhibiert wurde. Für A498-Zellen wurden Strom-Spannungs-Kurven endogener TRPC-Kanäle gemessen, die auf eine TRPC4/1-Heterotetramerbildung hinweisen. Durch die Überexpression von TRPC4/5-Kanälen in HEK293T-Zellen gelang es eine nicht sensitive Zelllinie gegenüber (-)-Englerin A zu sensitivieren. Somit konnten TRPC4/5-Kanäle als Zielproteine bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration eine entscheidende Rolle für den schnellen Zelltod spielt. Die Reduzierung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen (-)-Englerin A behandelter Zellen führte im Vergleich zu höheren extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zu einem Anstieg der Zellviabilität.

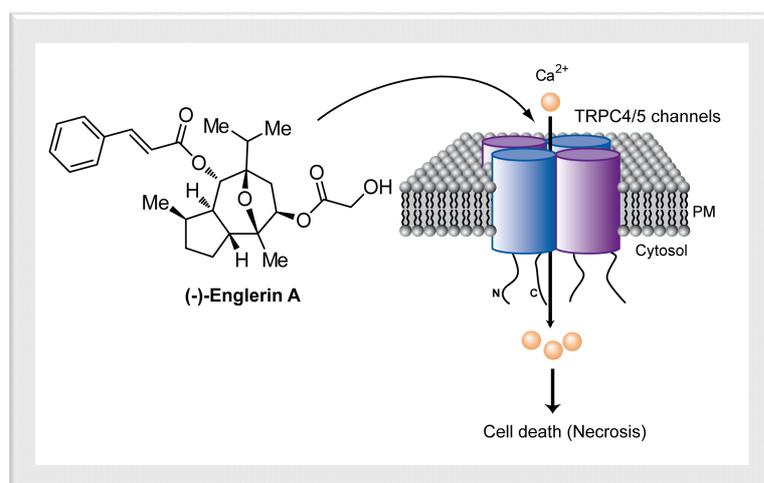
Die vorliegende Arbeit zeigt, dass (-)-Englerin A durch die direkte Aktivierung der Ca^{2+} -permeablen TRPC4/5-Kanäle eine schnelle und selektive zytotoxische Wirkung auf Nierenkrebszellen hat. Damit ist die Substanz nicht nur ein potentieller Wirkstoffkandidat für die Behandlung von Nierenkrebs, sondern eröffnet auch neue Möglichkeiten für die biologische Untersuchung dieser Kanäle. Ein solch potenter und selektiver Aktivator ist für TRPC4/5-Kanäle bisher nicht bekannt. Bislang wurden diese Kanäle durch die Verwendung relativ hoher Konzentrationen unspezifischer Substanzen aktiviert. Die Identifizierung von TRPC4/5 als Zielproteine von (-)-Englerin A verbessert darüber hinaus das Verständnis des bislang unbekanntes Wirkmechanismus dieses bemerkenswerten Naturstoffs. Der durch (-)-Englerin A induzierte selektive Zelltod von Nierenkrebszellen durch die Aktivierung von TRPC4/5-Kanälen ist für die zukünftige Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von Nierenkrebs von großer Bedeutung.

Summary

Renal cell carcinoma is the most frequently appearing malignant tumor of the kidney. Patients with an advanced stage of the disease have a five-year survival rate of less than 2 %. Current therapies are often ineffective and unspecific and have serious side effects. Thus, there is a high demand in finding novel therapies, which are ideally selective and without side effects.

The natural product (-)-englerin A is a guaianane sesquiterpene from the plant *Phyllanthus engleri* and inhibits the growth of renal cancer cells with a 1000-fold higher selectivity compared to other cancer cell lines.

The establishment of the total synthesis and the absolute configuration of the natural product enabled not only the synthesis of (-)-englerin A derivatives with higher activities than (-)-englerin A, but also facilitated the synthesis of sufficient quantities of the natural product allowing further studies on the biological activity.



Englerin A's mode of action

(-)-Englerin A is a potent and selective activator for TRPC4/5 channels in renal cancer cells. The activation of calcium-permeable TRPC4/5 channels through direct binding to the extracellular site of the channels leads to high calcium influx. The increased intracellular calcium concentration induces cell death and kills renal cancer cells rapidly and selectively. **PM**: plasma membrane

This thesis demonstrates that (-)-englerin A induces cell death already within minutes. For the identification of the target proteins a broad range of techniques was used. Affinity-based chemical proteomics was performed employing affinity labeled probes. Unfortunately, the enriched proteins could not be confirmed as target proteins. Moreover, signal transduction pathways and the influence on cell metabolism were analyzed, which did not lead to target identification as well. Further experiments concentrated on membrane proteins like ion channels and GPCRs. These protein classes usually cannot be identified in the affinity-based experiments before because of solubility issues. The analysis considered only ion channels

related to renal cell carcinoma and identified TRPC4/5 channels (Transient receptor potential canonical ion channel 4/5) as target proteins.

The validation of TRPC4/5 and (-)-englerin A's mode of action was carried out, amongst others, by means of calcium detection assays, patch clamp experiments and genetic studies. The results show that (-)-englerin A is a selective activator of TRPC4/5 channels in the nanomolar range. TRPC4/5 channels are activated by direct binding to the extracellular site of the channels. An indirect activation of the channels by GPCRs was excluded using a GPCR inhibitor by means of patch clamp experiments. The (-)-englerin A-mediated activation of TRPC4/5 channels induces a high calcium influx into cells leading to necrosis within few minutes.

Patch clamp experiments were performed with (-)-englerin A treated cells and determined current-voltage curves typical for TRPC4 and closely related channels like TRPC5. The evoked currents were inhibited by the TRPC4/5 inhibitor ML204 showing that TRPC4/5 are the cellular target proteins of (-)-englerin A. The current-voltage curves in A498 cells for endogenous TRPC channels indicate that TRPC4 is building heterotetramers with TRPC1. TRPC4/5 overexpression in the (-)-englerin A insensitive HEK293 cells rendered HEK293 cells sensitive for the natural product proving TRPC4/5 channels as target proteins. Moreover it was shown that increasing concentration of intracellular calcium concentrations play a key role in cell death. The reduction of the extracellular calcium concentration led to a higher cell viability in (-)-englerin A treated cells using low extracellular calcium concentrations compared to higher extracellular calcium concentrations.

(-)-englerin A kills renal cancer cells rapidly and selectively. This compound is not only a potential anticancer drug candidate but also enables the further biological analysis of TRPC4/5 channels. Such a potent and selective activator for TRPC4/5 channels has not been reported so far. For activation of these channels unspecific substances have been applied at high concentrations. The identification of TRPC4/5 channels as target proteins of (-)-englerin A leads to a better understanding of the mechanism of action of this remarkable natural product.

The (-)-englerin A-induced selective cell death in renal cell cancer through the activation of TRPC4/5 is of great significance for further investigation in drug development for treatment of renal cancer.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

In den letzten 20 Jahren gab es in Europa und weltweit einen jährlichen Anstieg von Neuerkrankungen um ca. 2 %. Innerhalb der Europäischen Union (EU) gab es in 2012 ungefähr 84.400 neue Nierenzellkarzinomfälle und ca. 34.700 Todesfälle, die durch Nierenzellkarzinom verursacht wurden.^[1]

Das Nierenzellkarzinom macht 2-3 % aller Krebsarten aus^[1] und wird aufgrund spezifischer histopathologischer und genetischer Charakteristika in verschiedene Subtypen aufgeteilt.^[2] Bei diesen Subtypen unterscheidet man zwischen dem klarzelligen Nierenzellkarzinom, welches mit 75 % am häufigsten auftritt, dem papillären Nierenzellkarzinom, das 10 % ausmacht, dem chromophoben Nierenzellkarzinom mit 5 %, dem Sammelgangkarzinom, welches mit 1 % am seltensten auftritt und dem nicht-klassifizierbaren Nierenzellkarzinom, das 3-5 % ausmacht.^[2]

Das Nierenzellkarzinom ist mit ca. 90 % das am häufigsten auftretende Malignom der Niere und tritt bei Patienten in einem Alter zwischen 60 und 70 Jahren auf. Dabei sind Männer in einem Verhältnis von 1,5:1 häufiger betroffen als Frauen. Neben Faktoren wie dem Lebensstil, Rauchen, Fettleibigkeit und Bluthochdruck^[3] tragen vererbte Prädispositionen zu dieser Erkrankung bei. Dazu gehören z.B. Mutationen im VHL-Gen, die für das von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) verantwortlich sind.^[4] Die meisten Patienten bleiben bis zur späten Phase der Erkrankung asymptomatisch.^[5] Symptome, die dann bei 6-10 % der Patienten auftreten sind neben den klassischen Flankenschmerzen beispielsweise auch eine Hämaturie.^{[6],[7]} Viel häufiger mit etwa 30 % treten Symptome wie z.B. Gewichtsreduktion, Fieber, eine abnormale Leber, Blutarmut und Bluthochdruck auf. Nur eine geringe Anzahl von Patienten zeigt Symptome wie beispielsweise Schmerzen in den Knochen und einen anhaltenden Husten, die direkt durch die metastatische Erkrankung verursacht werden.^[8] Dies hat zur Folge, dass 20-30 % der Betroffenen bei der Diagnose bereits Metastasen aufweisen.^[9] Auch eine körperliche Untersuchung der Patienten spielt bei der Diagnose vom Nierenkarzinom eine limitierende Rolle, kann aber dennoch bei manchen Betroffenen mit z.B. Ödemen in den unteren Extremitäten, hilfreich sein. Die Laborparameter, die üblicherweise bei Verdacht auf Nierenzellkarzinom herangezogen werden, sind die Hämoglobinwerte, die Erythrozyten-Sedimentationsrate, die alkalische Phosphatase und das Serum-Kalzium.^{[8],[10]}

1.1.2 von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsupressorgen

Das von Hippel-Lindau-Syndrom wurde im Jahre 1894 entdeckt^[11] und ist eine autosomal-dominante Erkrankung.^[12] Sie beruht auf einer heterozygoten Keimbahnmutation im VHL-Tumorsupressorgen auf dem Chromosomen 3p25, welches stark mit dem Nierenzellkarzinom assoziiert ist und in 80 % der Fälle auftritt.^{[12],[13],[14]} Das Auftreten von Tumoren in Zusammenhang mit dieser Erkrankung basiert entweder auf dem Verlust oder der Inaktivierung des verbliebenen Wildtyp-VHL-Allels, welches zur Abwesenheit eines funktionierenden VHL-Protein (pVHL) führt.^[13] Das VHL-Protein ist in verschiedene zelluläre Prozesse involviert. Hierzu zählen z.B. die Regulation der extrazellulären Matrix, die Stabilität des Zytoskeletts, die Kontrolle des Zellzyklus und die Zelldifferenzierung.^[4] Auch Mutationen des VHL-Gens in somatischen Zellen kommen häufig in vereinzelt klarzelligen Nierenzellkarzinomfällen vor.^[12] Ungefähr 20 % der VHL-Erkrankungen entstehen durch eine *de novo* Mutationen im VHL-Gen und sind nicht vererbt.^[15] Eine Tumorbildung in VHL-defizienten Nierenkarzinomzellen *in vivo* kann durch das Wiederherstellen der VHL-Funktion verhindert werden.^{[16],[17]}

Das VHL-Protein besteht aus einer α - und β -Form und ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert.^[4] Da es eine wichtige Rolle in der Regulation und Transkription von Wachstumsfaktoren hat,^[18] bewegt es sich zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus.^{[19],[20],[21],[22]} Die α -Domäne bildet einen stabilen Ubiquitin E3 Protein-Ligase-Komplex mit Elongin B, Elongin C,^{[23],[24],[25]} Cullin 2,^{[26],[27]} und dem Ring-box Protein Rbx1.^[28] Das VHL-Protein übernimmt innerhalb des Komplexes die Rolle des Substrat-Rezeptors, welches spezifische Proteine direkt bindet, die dann ubiquitinyliert und degradiert werden^[29] (**Abbildung 1.1**).

Solch ein spezifisches Protein kann das HIF-1-Protein (*hypoxia-inducible factor 1*) sein. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsaktivator, der eine wichtige Funktion bei der Vermittlung der zellulären Antwort in Abhängigkeit von Sauerstoff übernimmt. Das HIF-1-Protein besteht aus einer durch Hypoxie induzierbaren α -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit.^[30] Bei normaler Sauerstoffversorgung (Normoxie) wird HIF-1 α durch eine Sauerstoff-abhängige Prolylhydroxylase an seiner Prolinseitenkette hydroxyliert, die sich in der Sauerstoff-abhängigen Degradationsdomäne im Zytoplasma befindet.^{[31],[32]}

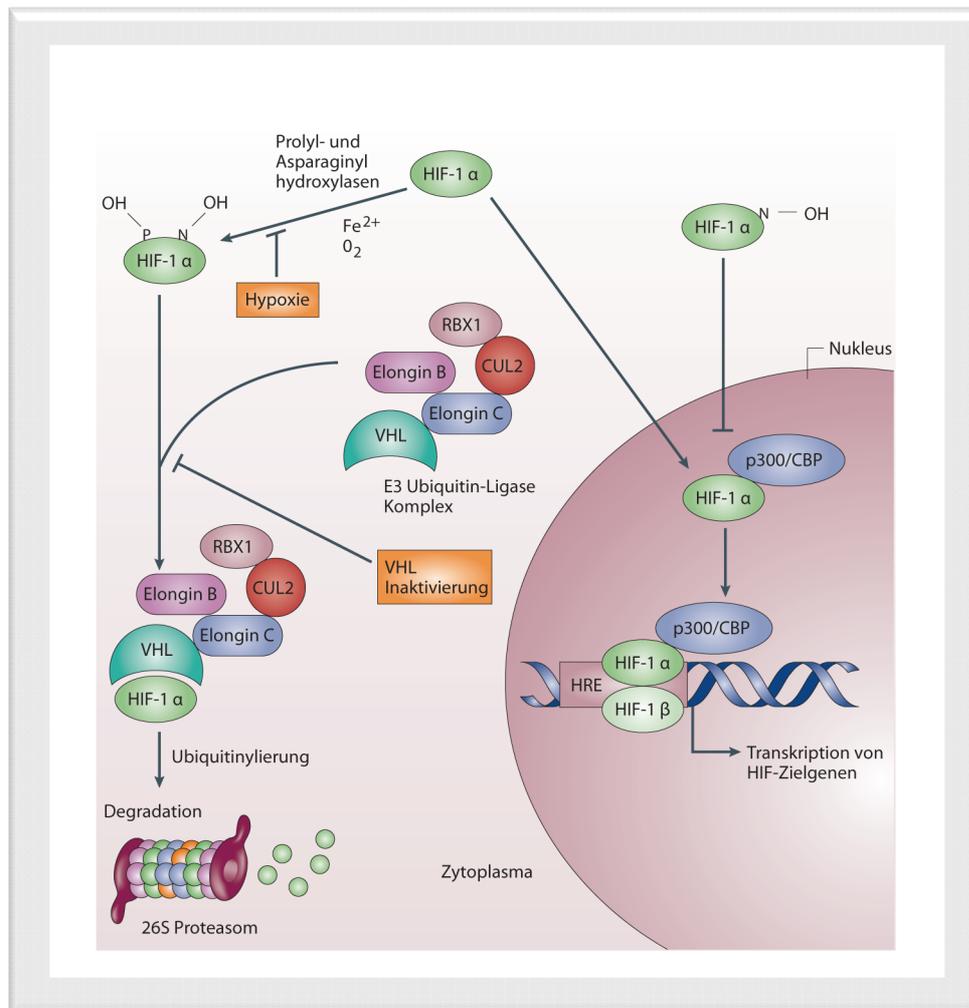


Abbildung 1.1: Dysregulierung von HIF-1 α durch die VHL-Inaktivierung (modifiziert nach Pavlovich und Schmidt, 2004)^[33]

Unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) wird HIF-1 α durch eine Familie von Prolylhydroxylasen an zwei konservierten Prolinseitenketten hydroxyliert. Die Hydroxylierung führt zur Erkennung und Bindung des Von-Hippel-Lindau (VHL) E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes, bestehend aus Elongin B, Elongin C, Cullin 2 (CUL2) und RBX1. Die Polyubiquitinierung von HIF-1 α durch den VHL-Komplex führt zum proteosomalen Abbau durch das 26S-Proteasom. HIF-1 α wird außerdem an einer Asparaginseitenkette durch eine Asparaginhydroxylase hydroxyliert, sodass eine Bindung an die transkriptionalen Co-Aktivatoren p300/CBP unterbunden wird und die Transkription von HIF-Zielgenen verhindert wird. Unter sauerstoffarmen Bedingungen (Hypoxie) werden beide Formen der Hydroxylierung unterbunden, sodass HIF-1 α akkumuliert und es somit zur Transkriptionsaktivierung Hypoxie-empfindlicher Gene kommt, wie es auch im Fall einer VHL-Inaktivierung auftritt. Die VHL-Inaktivierung führt zur Akkumulation von HIF-1 α im Zytoplasma und zur Translokation in den Nucleus. Dort dimerisiert HIF-1 α mit HIF-1 β und wird durch p300/CBP co-aktiviert. HIF α/β bindet an Hypoxie-empfindliche Elemente (HRE) und aktiviert die Transkription von Genen, die in klarzelligen Nierentumoren hochreguliert sind.

Dies erlaubt die Bindung von HIF-1 α an VHL und führt zur einer Ubiquitinierung und Abbau von HIF-1 α . Außerdem führt eine Hydroxylierung durch eine Asparaginhydroxylase im Zellkern zu einer Interaktion zwischen HIF1 α und den transkriptionalen Co-Aktivatoren *CREB-binding protein* (CBP) und p300, so dass die Transkription von HIF1-Zielgenen inhibiert wird.

Die VHL-Inaktivierung in Nierenzellen, wie bei Patienten mit dem VHL-Syndrom ahmt den Signalweg unter hypoxischen Bedingungen nach. Die Patienten besitzen ein in der Keimbahn mutiertes VHL-Allel und ein Wildtyp-VHL-Allel. Die Inaktivierung oder der Verlust

des VHL-Wildtyp-Allels führt dazu, dass HIF-1 α nicht mehr gebunden werden kann und der HIF-1 α -Abbau verhindert wird. Dies führt zu einer Akkumulation von HIF-1 α unter normalen Sauerstoffbedingungen. HIF-1 α wird dann aus dem Zytoplasma in den Nukleus translokalisiert. Dort heterodimerisiert es mit HIF-1 β und bindet dann an sogenannte Hypoxie-empfindliche Elemente.^[34] Durch die Bindung wird die Transkription von Zielgenen induziert, die unter anderem eine wichtige Rolle im Metabolismus und der Angiogenese spielen und u.a. zu der Produktion von GLUT-1-,^[35] VEGF^{[36],[37]} (*Vascular endothelial growth factor*), Erythropoetin- und PDGF-2 (*platelet-derived growth factor- β*) führen.^[33] Die Aktivierung der Zielgene trägt zu der Bildung von Nierenzellkarzinomen bei. Eine Dysregulation von HIF-1 α erklärt die Tumorbildung in VHL-defizienten Zellen nicht vollständig.^{[38],[39],[40]} Dies deutet daraufhin, dass das VHL-Protein eventuell auch eine HIF-unabhängige Tumorsuppressorfunktion besitzt.

1.1.3 Behandlung von Nierenkrebs

Wenn Nierenkrebs in einem frühen Stadium erkannt wird, kann dieser durch die chirurgische Entfernung der betroffenen Niere relativ erfolgreich behandelt werden. Dennoch entwickeln nicht weniger als 20-30 % der Patienten nach diesem Eingriff eine metastatische Erkrankung.^[41] Ungefähr 30-50 % der Patienten mit einer lokal fortgeschrittenen Erkrankung haben eine 5-Jahres Überlebensrate von weniger als 2 %.^{[41],[42]}

Die Behandlung von Nierenkrebs ist limitiert. Im Vergleich zu anderen Malignomen zeigt das Nierenzellkarzinom eine Resistenz sowohl gegenüber der Chemotherapie als auch der Hormontherapie.^[43] Eine systematische Therapie mit Zytokinen, wie beispielweise mit Interleukin-2, konnte nur geringe Erfolge von ca. 15 % erreichen, wobei die Erfolgsrate für eine vollständige Rückbildung des Tumors weitaus geringer ist. Im Vergleich dazu konnte gezeigt werden, dass eine systemische Behandlung mit traditionellen zytotoxischen Medikamenten (z.B. Vinblastin oder Paclitaxel), Bestrahlung oder eine Hormontherapie für Patienten mit Nierenkrebs nicht effektiv ist.^[44] Durch die Ineffizienz der genannten Behandlungsmethoden richtete sich der Fokus der Nierenzellkarzinombehandlung hauptsächlich auf die Entwicklung von Kinaseinhibitoren.^[45]

Für die Behandlung von metastatischem Nierenkrebs wurden insgesamt sieben Medikamente zugelassen und werden klinisch verwendet. Hierzu zählen unter anderem der Tyrosinkinaseinhibitor, Sunitinib, der Multikinaseinhibitor Sorafenib und der monoklonale anti-VEGF (*vascular endothelial growth factor*) Antikörper Bevacizumab.^[46]

Es gibt viele unterschiedliche Wege die Kinaseaktivität zu inhibieren. Dabei können Kinaseinhibitoren beispielsweise reversibel in die ATP-Bindetasche binden oder an einen angrenzenden Bereich um die enzymatische Aktivität zu inhibieren.^[47] Dadurch, dass die

Aminosäuresequenz der Kinasedomäne (ATP-Bindetasche) ähnlich zu vielen anderen Kinasen ist, besteht die Möglichkeit einer Kreuzreaktion bei Verwendung von ATP-kompetitiven Inhibitoren wie z.B. bei Sorafenib. Sorafenib ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor für VEGFR-2, inhibiert jedoch auch die enzymatische Aktivität anderer Kinasen, wie z.B. die von FLT3 (*Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3*). Auch Sunitinib ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor und inhibiert PDGF- (*Platelet-derived growth factor*) und VEGF-Rezeptoren. Ebenfalls wird auch hier unter anderem die Kinaseaktivität für FLT3 inhibiert.^[48] Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist mit der Mutation im VHL-Gen assoziiert, das für das VHL-Protein kodiert (siehe Abschnitt 1.1.2). Die VHL-Erkrankung kann aufgrund einer Keimbahnmutation oder einer somatischen Mutation entstehen, wobei letzteres häufiger auftritt. Dabei führt HIF-1 α zu einer erhöhten Freisetzung von VEGF und PDGF auch unter normalen Sauerstoffbedingungen.^[49] Dies führt zu einer starken Angiogenese und äußert sich in starken vaskulären primären Tumoren und Metastasen, die charakteristisch für das Nierenzellkarzinom sind.

Um bereits metastasierte Nierenzellkarzinome zu behandeln, wurden Angiogenese-Inhibitoren untersucht.^[50] Einer dieser Inhibitoren ist z.B. Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch an VEGF bindet.^[51] Eine Inhibierung intrazellulärer Signalwege des VEGF-Rezeptors kann durch die Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafenib gewährleistet werden. Diese Substanzen inhibieren VEGFR und andere Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie beispielsweise PDGF und die Serin/Threoninkinase RAF.^[52] Der Tyrosinkinase-Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Bindestelle, einer Transmembran-Region und einer Tyrosinkinasedomäne. Die Bindung des Rezeptors an einen Liganden führt zu seiner Stabilisierung und Dimerisierung, die die Kinaseaktivität steigert. Dadurch werden Signalwege katalysiert, die in der Zellproliferation resultieren.^[53]

Die Rezeptoraktivität kann durch die Substanzen Sunitinib und Sorafenib inhibiert werden. Der Wirkungsmechanismus der bisher genannten Angiogeneseinhibitoren in Patienten, wie z.B. mit dem Von Hippel-Lindau-Syndrom sind in **Abbildung 1.2** dargestellt. Beide Verbindungen besitzen einen ähnlichen Wirkungsmechanismus und Zytotoxizität. Sie verhindern die Angiogenese von Tumoren durch die Inhibierung von Tyrosinkinasen. Während Sorafenib nicht zu einem Schrumpfen des Tumors führt, konnte für Sunitinib der klare Nachweis erbracht werden, dass die Substanz den Tumor signifikant reduziert.^[54] Dennoch ist es wichtig zu erwähnen, dass die Medikamente Nebenwirkungen haben. Häufig handelt es sich dabei um Nebenwirkungen, die die Haut oder den Magen-Darm-Trakt betreffen.^[55]

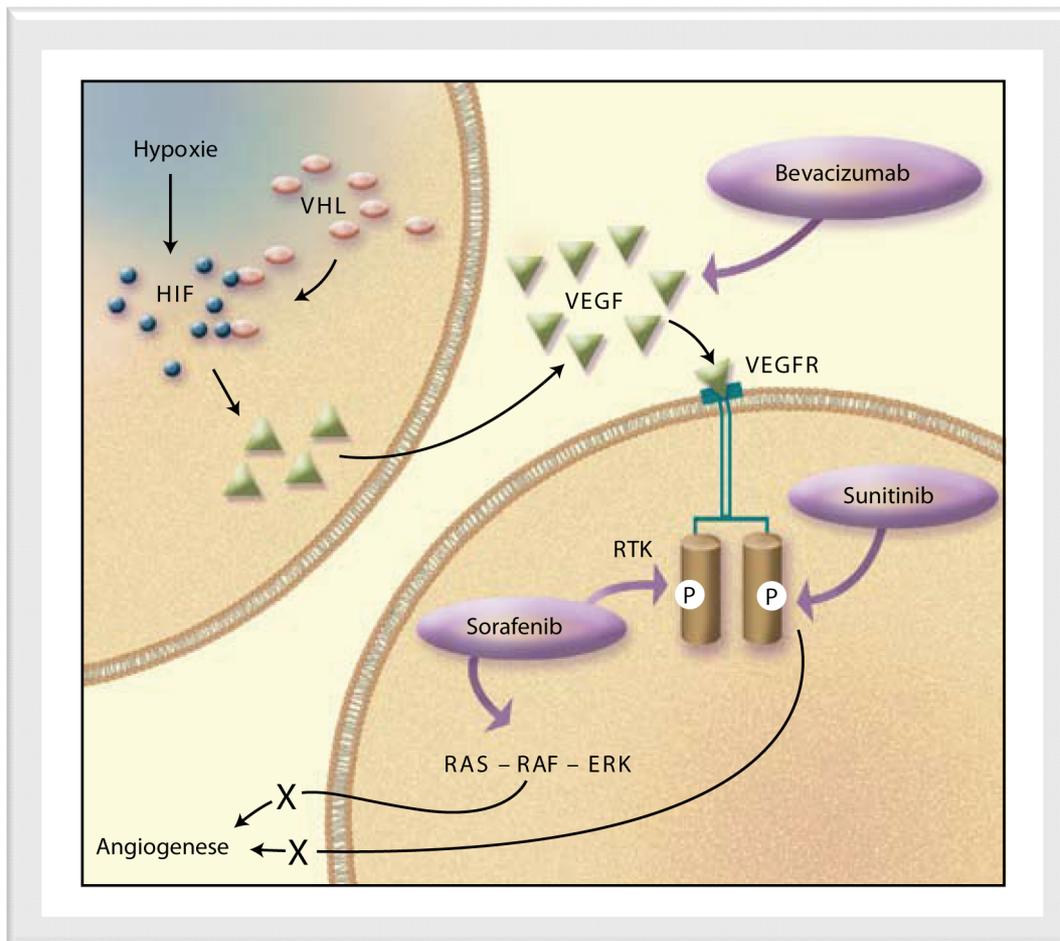


Abbildung 1.2: Wirkungsmechanismus von Angiogeneseinhibitoren bei VEGF-ausgelöster verstärkter Angiogenese (modifiziert nach Hiles und Kolesar, 2008).^[50]

Unter hypoxischen Bedingungen wird die Bildung von HIF-1 begünstigt und stimuliert die Freisetzung von VEGF (*vascular endothelial growth factor*). In normalen Zellen wird HIF-1 durch das VHL-Protein reguliert. In Patienten mit Nierenzellkarzinom wird das VHL-Protein in einer abnormalen Form exprimiert, sodass die Angiogenese auch unter normalen Sauerstoffbedingungen stark stimuliert wird. VEGF bindet an den VEGF-Rezeptor (VEGFR) und stabilisiert die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne. Dies führt zur Dimerisierung und Autophosphorylierung,^[53] sodass eine Reihe von Reaktionen katalysiert werden, in denen viele Signalwege wie z.B. auch RAS-RAF-ERK, involviert sind. Dies kann dann eventuell zur endothelialen Mitogenese und Zellmigration führen, welches dann in der Angiogenese resultiert.^[56] Bevacizumab inhibiert die extrazelluläre VEGF-Aktivität direkt. Sunitinib agiert an der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne des VEGF-Rezeptors, um die Angiogenese zu unterbinden.^[56] Sorafenib bindet an RAF und verhindert die Angiogenese sowohl an der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne des VEGF-Rezeptors als auch abwärts des Signalweges.^[9] RTK= Rezeptortyrosinkinase, P= Phosphorylierung. Abbildung von Taina Litwak, CMI.

Dies zeigt, dass die Entwicklung von Medikamenten für die Behandlung von Nierenkrebs eine sehr wichtige Rolle spielt. Für die Entwicklung neuer Medikamente sind häufig pflanzliche Naturstoffe eine gute Quelle. Sie können für die Synthese potenterer und weniger zytotoxischer Derivate von Nutzen sein, die für die Behandlung verschiedener Erkrankungen sehr hilfreich sein können.^{[57],[58],[59]}

1.2 Naturstoffe als Quelle für neue Medikamente

Naturstoffe sind sekundäre Metabolite^[60] und eine gute Quelle für die Entwicklung neuer Medikamente. Als Quelle von Naturstoffen dienen Pflanzen, Bakterien, Pilze und marine Organismen.^[61] Pflanzen werden bereits seit Tausenden von Jahren in der Medizin verwendet,^[62] z.B. in Form von Tinkturen oder Pudern.^{[62],[63]} Anfang des 19. Jahrhunderts erfolgte die Isolierung aktiver Substanzen aus Pflanzen wie z.B. von Morphin aus dem Milchsaft des Schlafmohns.^{[62],[64]} Die Isolierung und Charakterisierung pharmakologisch aktiver Substanzen aus Arzneipflanzen spielen heute immer noch eine wichtige Rolle und haben beispielweise eine entscheidende Bedeutung für die Behandlung von Krebs.^[61] Die aktuellen Untersuchungen für die Erforschung von Wirkstoffen aus Arzneipflanzen sind facettenreich und kombinieren botanische, phytochemische, biologische und molekulare Techniken. Dabei liefert die Untersuchung von Arzneipflanzen neue und wichtige Substanzen für die Behandlung verschiedener Erkrankungen wie beispielsweise Krebs, HIV, Alzheimer oder Malaria.^[61]

Naturstoffe sind nicht nur wegen ihrer strukturellen Diversität sondern insbesondere aufgrund ihrer oftmals selektiven und spezifischen biologischen Aktivität basierend auf ihrem Wirkungsmechanismus von großem Interesse.^[65] Darüber hinaus stellen Naturstoffe eine exzellente Quelle für die Synthese Naturstoff-inspirierter Substanzen dar. Naturstoffe haben sich im Laufe der Evolution gemeinsam mit den Proteinen entwickelt und sind demnach als biologisch validiert anzusehen. Dabei ist die Natur bei der Gestaltung und Synthese der Proteine und Metaboliten sparsam und nutzt nur einen geringen Teil der Gesamtheit aller chemischen Moleküle, welche im Laufe der Evolution selektiert wurden.^[66] Als Beispiel sei das menschliche Genom genannt. Dieses kodiert für ca. 25.000 Proteine von möglichen 10^{390} basierend auf 300 Aminosäuren.^[67] Die geringe Anzahl an kodierenden Proteinen ist damit zu begründen, dass diese unter physikalischen und chemischen Bedingungen aus der natürlichen Selektion hervorgegangen sind.^[68] Die Evolution übernimmt die Aufgabe, die Interaktion zwischen Proteinen und den entsprechenden Liganden präzise aufeinander abzustimmen. Ähnlich der konservierten Proteinstrukturen ist auch die Anzahl der Grundgerüste der Naturstoffe limitiert.^[66]

Bisher wurde allerdings nur ein Bruchteil der Naturstoffe erforscht. Trotz intensiver Untersuchungen der terrestrischen Flora z.B. wird geschätzt, dass nur 6 % von ungefähr 300.000 Arten höherer Pflanzen pharmakologisch erforscht sind.^{[69],[70],[71]}

Zu den bekanntesten Antikrebsmedikamenten, die in der klinischen Therapie eingesetzt werden, gehören die sogenannten Vincaalkaloide, wie Vinblastin und Vincristin, welche Naturstoffe aus der Pflanzengattung *Catharanthus roseus* darstellen.^[72] Vincaalkaloide und deren semi-synthetischen Derivate blockieren die Mitose. Dabei binden die Substanzen

spezifisch an Tubulin und führen zur Tubulindepolymerisation, welches in einem Arrest des Zellzyklus in der Metaphase resultiert.^[73]

Ein weiteres Beispiel ist Paclitaxel (auch Taxol genannt), welches aus der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* isoliert wurde. Es wurde Anfang der neunziger Jahre für die Behandlung von Eierstock- und Brustkrebs eingesetzt.^[65] Sowohl Paclitaxel als auch seine Derivate binden Tubulin und inhibieren dessen Depolymerisation.^{[74],[75]}

Für die Identifizierung von Naturstoffen mit pharmakologischer Wirkung wie die der oben genannten Antikrebsmedikamente sind entsprechende Screening-Methoden notwendig. Durch die Verwendung von Hochdurchsatz-Screens (HTS) seit Anfang der neunziger Jahre können heute mehr als 250.000 Substanzen pro Tag und Testsystem analysiert werden. Jedoch wird die Analyse der Naturstoffe im Vergleich zu reinen Substanzen im HTS-Format kaum angewendet. Gründe hierfür sind insbesondere der Zeitaufwand, welcher für die Aufreinigung und Identifizierung der aktiven Substanz aus einem Naturextrakt notwendig ist.^[65] Abhängig vom individuellen Design des verwendeten Testsystems ist eine Vorfraktionierung der Naturextrakte sinnvoll, bevor sie für einen zellbasierten HTS oder für einen HTS mit isolierten Proteinen verwendet werden. Diese Art der Vorfraktionierung wird sowohl in akademischen Einrichtungen als auch pharmazeutischen Firmen durchgeführt. Die Optimierung der Untersuchung von Naturstoffen liegt wohlmöglich in der Kombination verschiedener Techniken wie die z.B. Vorfraktionierung, HTS und der Verwendung entsprechend geeigneter Zelllinien, die einen Effekt auch bei Verwendung von Extrakten im Mikroliter-Bereich zeigen.^[65]

Oftmals gestaltet sich die Isolierung von Naturstoffen jedoch schwierig und führt zu einer geringen Ausbeute, sodass die Quantität der Substanz für eine langfristige Erforschung nicht ausreichend ist.^[65] Ein weiterer Nachteil der Naturstoffisolierung ist, dass Modifikationen an dem zu untersuchenden Naturstoff begrenzt möglich sind.^[76] Daher bietet die Etablierung einer Totalsynthese von Naturstoffen im Vergleich zur Naturstoffisolierung einen großen Vorteil. Mit Hilfe der Totalsynthese können nicht nur relativ große Mengen der Substanz bereitgestellt werden sondern es können auch Strukturen bzw. Teilstrukturen der Substanz identifiziert werden, welche für die Aktivität essentiell sind. Des Weiteren können mittels der Totalsynthese Derivate des Naturstoffs synthetisiert werden, welche eventuell eine stärkere Aktivität als der Naturstoff selbst aufweisen.^[65]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Naturstoffe als Medikamente in der Medizin hergestellt und verwendet werden. Trotz aller Schwierigkeiten und Herausforderungen, welche die Erforschung von Wirkstoffen mit sich bringt, werden Naturprodukte z.B. aus Arzneipflanzen eine essentielle Komponente in der Forschung neuer Medikamente bleiben.^[61]

1.2.1 Biologische Aktivität von (-)-Englerin A

Für die Bekämpfung von Nierenkrebs werden verschiedene Medikamente wie beispielsweise Sunitinib und Sorafenib eingesetzt. Die Verwendung solcher Medikamente bringen Patienten mit metastatischem Nierenkrebs Vorteile, aber zeigen keine vollständige Heilung und müssen über längere Zeiträume verabreicht werden. Außerdem haben diese Medikamente ernsthafte Nebenwirkungen.^[77] Aufgrund dieser Tatsachen ist es wichtig Substanzen zu finden bzw. zu entwickeln die spezifisch gegen Nierenkrebs aktiv sind.

In einer Studie wurden 60 Zelllinien in einem groß angelegten Screen am NIH (*National Institute of Health*) untersucht. Dieses führte zur Identifizierung verschiedener Naturstoffe, die eine spezifische Aktivität gegenüber Nierenkrebszellen im Vergleich zu Krebszellen aus anderen Geweben zeigten. Dabei wurden Nierenkrebszellen selektiv abgetötet. Die Analysen identifizierten zunächst 34 Naturstoffextrakte, welche selektiv auf Nierenkrebszellen wirkten. Einer der vielversprechenden Naturstoffkandidaten war die gegenüber Nierenkrebszellen hoch potente und selektive Substanz (-)-Englerin A (**Abbildung 1.3a**), während (-)-Englerin B eine niedrigere Aktivität und Selektivität aufweist. (-)-Englerin A ist ein Guanin-Sesquiterpen und wurde im Jahre 2009 von Ratnayake *et al.*^[78] i aus der Pflanze *Phyllanthus engleri*, einem Wolfsmilchgewächs, isoliert.

Für Englerin A konnte eine 1000-fach höhere selektive Wachstumsinhibierung gegenüber Nierenkrebszelllinien im Vergleich zu anderen Krebszelllinien gezeigt werden, was das hohe Potential dieser Verbindung für die Behandlung von Nierenkrebs unterstreicht.

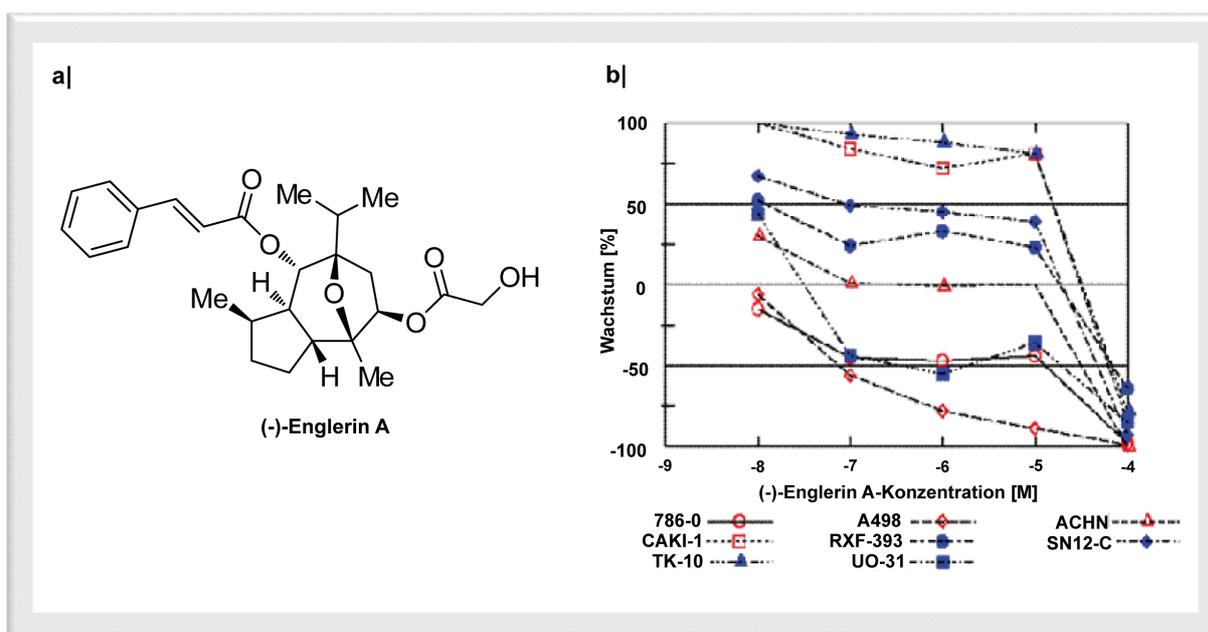


Abbildung 1.3: Wirkung von (-)-Englerin A auf das Wachstum von Nierenkrebszellen (modifiziert nach Ratnayake *et al.*, 2009)^[78]

a) Struktur von Englerin A. **b)** Dosis-Wirkungs-Kurve für die Wachstumsinhibierung von (-)-Englerin A gegenüber A498, 786-0, ACHN, UO-31, RXF-393, CAKI-1, TK-10 und SN12C aus dem 60-Zelllinien-Panel.

Sechs (A498, 786-0, ACHN, UO-31, RXF-393, SN12-C) von acht der getesteten Nierenkrebszelllinien zeigen eine Wachstumshemmungskonzentration 50 (engl. GI_{50} (growth inhibition concentration 50) im niedrigen nanomolaren Bereich (**Abbildung 1.3b**).

Der GI_{50} -Wert gibt die Konzentration einer Substanz an bei der 50 % des Wachstums inhibiert ist. Insbesondere die Zelllinien A498, 786-0, ACHN und UO31 sind gegenüber der Substanz sehr sensitiv und zeigen GI_{50} -Werte unter 10 nM.^[78] Damit ist (-)-Englerin A als eine potente Substanz für die Behandlung von Nierenkrebs sehr interessant. Die Substanz hat jedoch nicht ausschließlich eine Wirkung auf Nierenkrebszellen sondern zeigt auch vereinzelt eine zytotoxische Wirkung auf andere Krebszelllinien, wie z.B. die Brustkrebszelllinie HS578-T.^[78]

Die nicht bekannte absolute Konfiguration von (-)-Englerin A konnte im Jahre 2009 durch die Totalsynthese des (-)-Englerin A-Enantiomers ((+)-Englerin A) etabliert werden.^[79] Hierdurch gelang die Herstellung von (-)-Englerin A in Grammmaßstab, welches für weitere Struktur-Aktivitäts-Analysen genutzt wurde, um potentere Derivate herzustellen. Hierfür wurden Modifikationen am Zimtsäurerest, der Isopropylgruppe und der Glykolsäure von (-)-Englerin A durchgeführt. Um die Potenz auf Nierenkrebszellen zu testen wurden die synthetisierten Derivate, (-)-Englerin A und (+)-Englerin A auf A498-Zellen in einem Testsystem zur Zellviabilität getestet. Während sich Veränderungen an der Isopropylgruppe und des Glykolsäureesters negativ auf die Substanzaktivität auswirken, äußern sich Änderungen im Zimtsäurerest insgesamt positiv auf die Aktivität der Substanz.

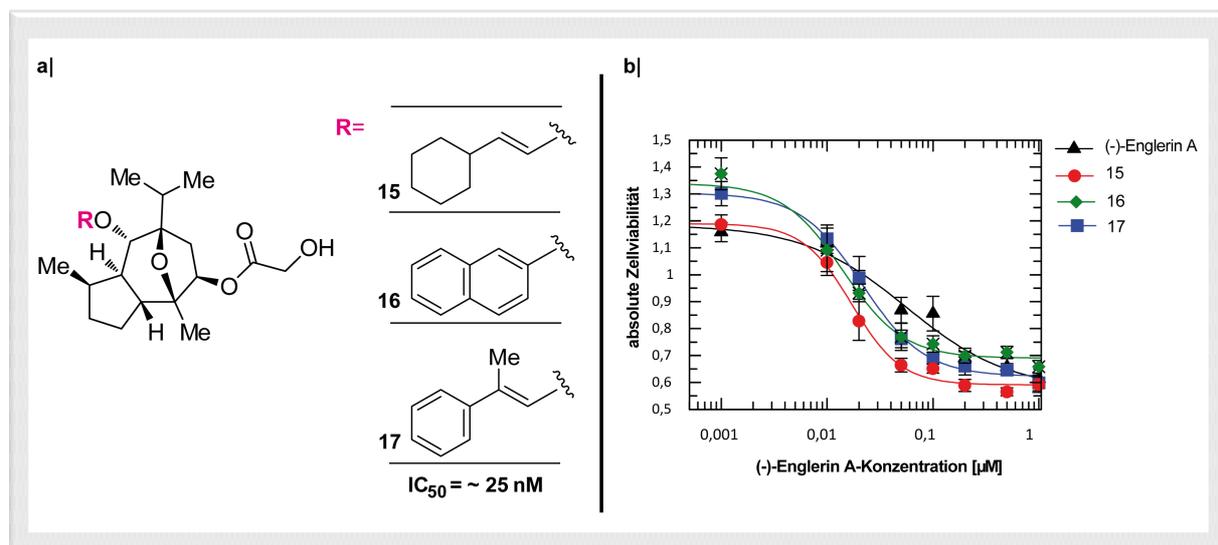


Abbildung 1.4: Wirkung von (-)-Englerin A-Derivaten auf die Viabilität von Nierenkrebszellen (modifiziert nach Radtke *et al.*, 2011)^[80]

a) Dargestellt sind die Strukturen der aktivsten (-)-Englerin A-Derivate mit Modifikationen im Zimtsäurerest und einem IC_{50} -Wert von ca. 25 nM. b) Dosis-Wirkungs-Kurven für die zytotoxische Aktivität der (-)-Englerin A-Derivate gegenüber A498-Zellen. Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen behandelt und die Zellviabilität mittels WST-1-Reagenz bestimmt. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Durch die Modifikationen am Zimtsäurerest gelang es drei (-)-Englerin A-Derivate mit IC_{50} -Werten von ca. 25 nM zu synthetisieren (**Abbildung 1.4a**), die deutlich potenter sind als der Naturstoff selbst, welcher einen IC_{50} -Wert von 45 nM aufweist^[80] (**Abbildung 1.4b**).

Für (+)-Englerin A konnte ein IC_{50} -Wert von 1 μ M ermittelt werden, welches die Erkenntnisse von Ratnayake *et al.*,^[78] bestätigt, die für das Enantiomer eine geringe Aktivität auf Nierenkrebszellen zeigen konnten.

Da alle drei Substanzen eine ähnliche Potenz besitzen wurden weitere Versuche zur Zellviabilität mit anderen Zelllinien durchgeführt, um selektivere Derivate zu identifizieren. Hierzu wurden vier weitere Zelllinien (CAKI-1, HEK293, HeLa, MDA-MB-468) ausgewählt und mit den Substanzen getestet.^[80] Keine der getesteten Zelllinien zeigten im Vergleich zu der Nierenkrebszelllinie A498 eine signifikante Wachstumsinhibierung.^[80] Um die Selektivität der Substanzen auf Nierenkrebszelllinien zu analysieren wurden diese auf normalen Nierenzelllinien (MDCK, BSC1, RC-124) untersucht und zeigten eine 100-fach niedrigere Aktivität im Vergleich zu A498-Zellen ($IC_{50} > 5 \mu$ M).^[80] Durch die Selektivität und der hohen Potenz von (-)-Englerin A gegenüber Nierenkrebszelllinien ist diese Substanz ein vielversprechender Kandidat für die spezifische Behandlung von Nierenkrebs.^[80]

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war noch kein Zielprotein für (-)-Englerin A publiziert. Es war lediglich bekannt, dass der Naturstoff eine starke Potenz und Selektivität hauptsächlich gegenüber Nierenkrebszellen besitzt.

1.2.2 PKC θ als Zielprotein von (-)-Englerin A

Das einzige bekannte Zielprotein von (-)-Englerin A ist die Proteinkinase C Typ Theta (PKC θ) und wurde von Sourbier *et al.* im Laufe dieser Arbeit im Jahre 2013 veröffentlicht.^[81] Die Aktivierung von PKC durch (-)-Englerin A wurde sowohl in 786-0-Zelllysaten mit Hilfe eines kommerziellen PKC-Kinase Testsystem als auch mit aufgereinigtem PKC θ -Protein belegt. Dass dabei nur die PKC θ -Isoform selektiv aktiviert wurde konnte durch den *Knock-Down* der einzelnen PKC-Isoformen bestätigt werden. Die Autoren konnten zeigen, dass (-)-Englerin A PKC θ in 786-0-Zellen aktiviert und dies zu einer inhibierenden Phosphorylierung von IRS (*insulin receptor substrate 1*). Dadurch wird die Glukoseaufnahme über den Glukosetransporter GLUT-1 inhibiert und führt zu einem Insulin-resistenten Phänotyp. Gleichzeitig führt (-)-Englerin A zu einer PKC θ -vermittelten Phosphorylierung und Aktivierung von HSF-1 (Heat shock factor 1), einem Transkriptionsfaktor, die die Glukoseabhängigkeit von Tumorzellen fördert (**Abbildung 1.5**). Diese Kombination aus der Glukoseabhängigkeit und gleichzeitigen Inhibierung der Glukoseaufnahme führt dazu, dass (-)-Englerin A letal auf Tumorzellen wirkt, die stark von Glukose abhängig sind.

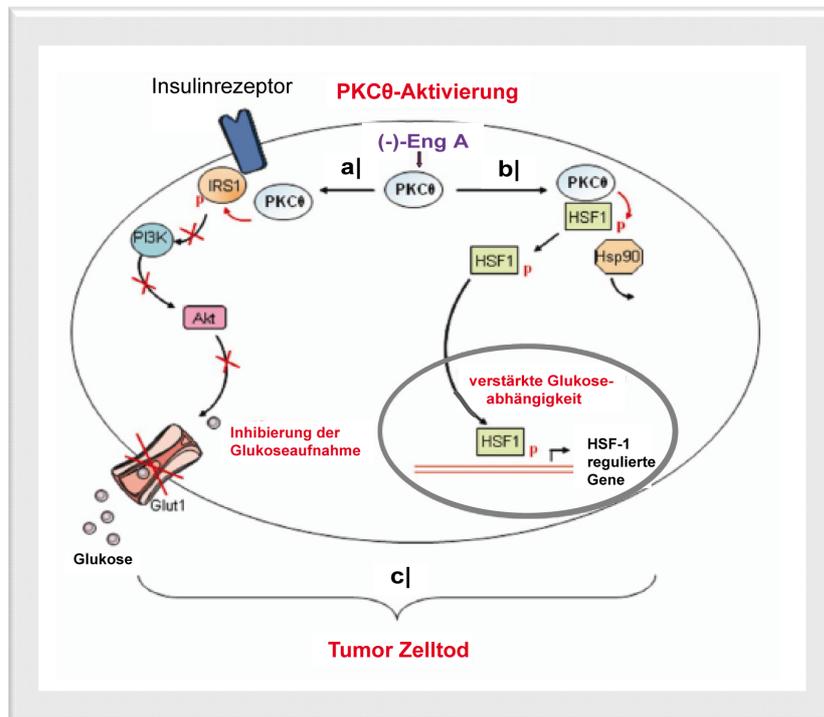


Abbildung 1.5: Der Wirkungsmechanismus von (-)-Englerin A (modifiziert nach Sourbier *et al.*, 2013)^[81]
 Die Aktivierung von PKCθ durch (-)-Englerin A induziert einen Insulin-resistenten Phänotyp. Die (-)-Englerin A-abhängige PKCθ-Aktivierung führt zu einer inhibierenden Phosphorylierung von IRS-1 und inhibiert den PI3K/AKT-Signalweg, sodass es zu einer verminderten Glukoseaufnahme kommt (a). Gleichzeitig führt die (-)-Englerin A-vermittelte PKCθ-Aktivierung zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors HSF-1, der durch die Transkription HSF-1 regulierter Gene die Glukoseabhängigkeit von Tumorzellen verstärkt (b). Die Kombination aus der Glukoseabhängigkeit und der gleichzeitigen Inhibition der Glukoseaufnahme führt dazu, dass (-)-Englerin A letal auf Tumorzellen wirkt, die stark von Glukose abhängig sind (c). **PKCθ**: Protein kinase C type theta, **IRS-1**: Insulin receptor substrate 1, **PI3K**: Phosphoinositide 3-kinase, **Akt**: Protein kinase B, **HSF-1**: Heat shock factor 1, **Hsp90**: Hsp90 chaperone protein kinase-targeting subunit, **P**: Phosphorylierung

Die Autoren beschreiben außerdem, dass die Expression von PKCθ und HSF-1 notwendig ist, um eine Sensitivität gegenüber (-)-Englerin A zu erzielen und demonstrieren dass HEK293-Zellen, die normalerweise gegenüber dem Naturstoff keine Sensitivität zeigen, nach Transfektion mit PKCθ und HSF-1 gegenüber der Substanz sensitiv sind.

1.3 Chemische Genetik

Die Chemische Genetik beschreibt die Untersuchung biologischer Systeme mit Hilfe niedermolekularer Substanzen. Die klassische Genetik dagegen gewährleistet die Untersuchung biologischer Systeme durch Genmanipulation mittels Mutagenesen wie z.B. *Knock-Outs*. Dabei wird die Einteilung in eine vorwärtsgerichtete- und in eine rückwärtsgerichtete Genetik vorgenommen.^[82] Bei der vorwärtsgerichteten Genetik erfolgt die Analyse vom Phänotyp zum Genotyp, sodass dies die Identifizierung von Genen zulässt, die für einen spezifischen Phänotyp verantwortlich sind. Dazu werden willkürliche Mutationen in Zellen oder Organismen eingebracht (z.B. durch DNA-modifizierende Substanzen oder Bestrahlung), die für einen bestimmten Phänotyp verantwortlich sind. Die

Untersuchung des mutierten Gens kann dann durch eine Genkartierung analysiert und identifiziert werden.^{[82],[83]} Bei der rückwärtsgerichteten Genetik dagegen erfolgt die Untersuchung von Genotyp zum Phänotyp. Dabei wird das Zielgen mutiert, das sich anschließend im Phänotyp äußert. Die phänotypischen Unterschiede in den mutierten Zellen oder Organismen werden analysiert, um die Funktion des mutierten Gens zu studieren.^[84]

In Analogie wird auch die Chemische Genetik in eine vorwärtsgerichtete- und rückwärtsgerichtete Chemische Genetik eingeteilt. Die vorwärtsgerichtete Chemische Genetik setzt chemische Substanzen ein, um die Funktion von Genprodukten zu modulieren. Die Substanzen die dadurch einen bestimmten Phänotyp induzieren, werden selektiert, um anschließend das Zielprotein zu identifizieren.^[84] Die Zielprotein-Identifizierung ist hilfreich, um die Funktion des betroffenen Zielgens bzw. Zielproteins zu untersuchen. Die rückwärtsgerichtete Chemische Genetik dagegen setzt niedermolekulare Substanzen ein, um ein gewünschtes Protein zu modulieren. Dazu werden Substanzbibliotheken verwendet, um Substanzen zu identifizieren, die mit dem gewünschten Zielprotein interagieren. Sobald eine Substanz identifiziert ist, werden Zellen oder Organismen mit dieser behandelt und die phänotypischen Effekte untersucht. Die Substanz kann dabei einen Effekt imitieren den man mit einer klassischen genetischen Mutation erreichen kann.^[85] Die klassische Genetik im Vergleich zur Chemischen Genetik ist in **Abbildung 1.6** veranschaulicht.

Die Chemische Genetik bietet im Vergleich zur klassischen Genetik einige Vorteile bei der Untersuchung von Systemen, bei der die klassische Genetik an ihre Grenzen stößt.^[86] Obwohl die klassische Genetik in der Aufklärung molekularer Prozessen und Signalwege insbesondere bei niedermolekularen Organismen sehr aufschlussreich ist, kann die Anwendung in höheren Organismen aufgrund des diploiden Chromosomensatzes schwierig sein.

Im Vergleich dazu kann die Chemische Genetik sowohl in Zellen auch als in Organismen angewendet werden. Außerdem können die Effekte von niedermolekularen Substanzen reversibel sein und z.B. über den Metabolismus abgebaut werden.^[83] Die chemischen Substanzen können zeit- und konzentrationsabhängig appliziert und wieder entfernt werden und zeigen normalerweise relativ schnelle Effekte, was eine kinetische *in vivo* Analyse erlaubt, die mit der klassischen Genetik nicht möglich ist.^[82] So eine temporäre Kontrolle der chemischen Substanz ermöglicht die zeit- und konzentrationsabhängige Charakterisierung von Proteinmodulationen. Proteine, die multifunktional sind, können durch die Bindung selektiver Substanzen individuell moduliert werden. Die klassische Genetik dagegen arbeitet mit *Knock-Outs*, wodurch das Protein aus dem Organismus entfernt wird und verhindert somit die Untersuchung verschiedener Effekte, zumal Proteine meist nicht nur eine Funktion besitzen und nur einen Bindungspartner haben. Zusätzlich sind *Knock-Outs* essentieller Gene letal, wobei die Applikation sub-letaler Konzentrationen einer chemischen Substanz

nur zu einem partialen *Knock-Out* Phänotyp führen können. Durch die Verabreichung unterschiedlicher Konzentrationen niedermolekularer Substanzen können Veränderungen im Phänotyp konzentrationsabhängig studiert werden.^[87]

Der größte Nachteil der Chemischen Genetik ist, dass es nicht universell einsetzbar ist. Mit Hilfe der klassischen Genetik kann im Prinzip jedes Gen manipuliert werden. Die Chemische Genetik dagegen braucht eine selektive Substanz, das spezifisch für das Zielprotein ist. Außerdem sind die Bindepartner nur für einen kleinen Teil von Proteinen bekannt, sodass es notwendig ist, weiterhin die Bindepartner von Proteinen zu erforschen. Dies kann durch Hochdurchsatz-Screens und der Synthese von strukturell unterschiedlichen Substanzsammlungen bewerkstelligt werden, um somit niedermolekulare Substanzen für jedes Genprodukt zu finden.^[88]

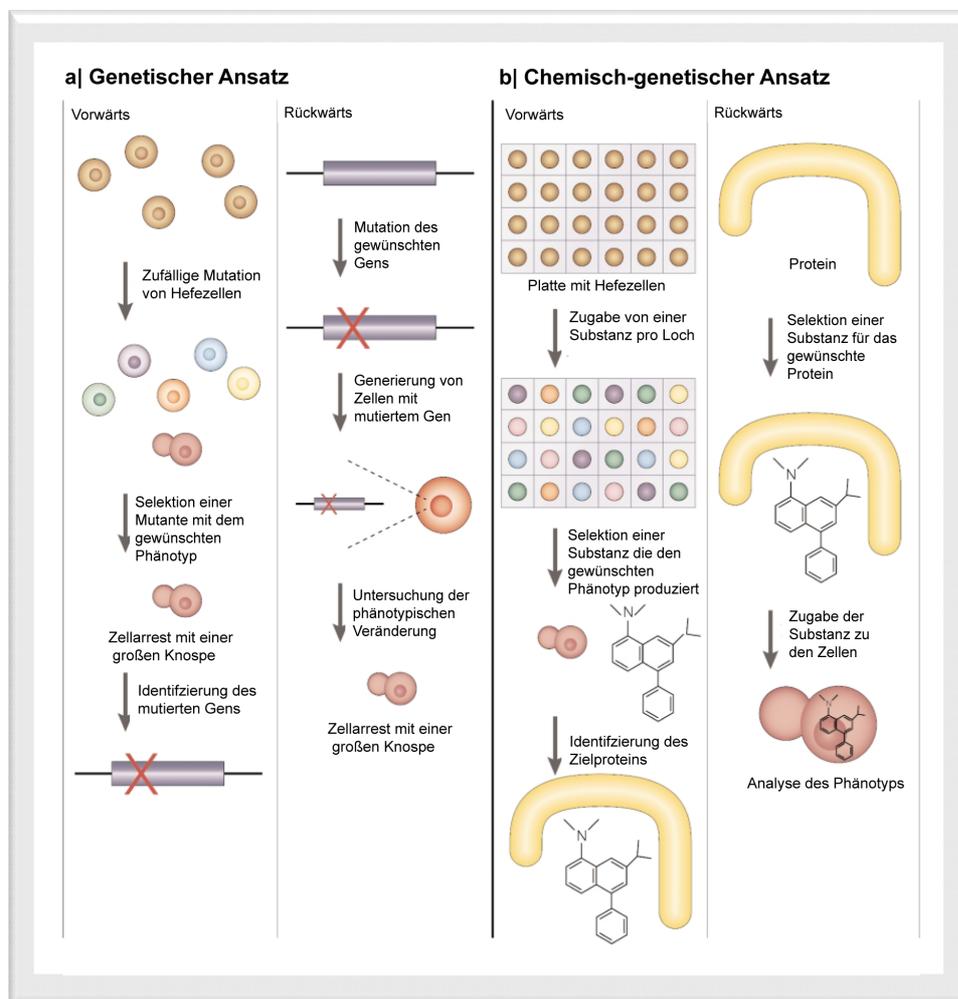


Abbildung 1.6: Vergleich zwischen genetischen- und chemisch-genetischen Ansätzen (modifiziert nach Stockwell, 2000)^[82]

a) Die vorwärtsgerichtete Genetik beinhaltet die zufällige Mutation von Genen, die Selektion des gewünschten Phänotyps und die Identifizierung der mutierten Gene in der entsprechenden Zelle. Im Vergleich dazu zeichnet sich die rückwärtsgerichtete Genetik durch die Mutation eines spezifischen Gens und der Identifizierung des daraus entstehenden Phänotyps aus. **b)** Bei der vorwärtsgerichteten chemischen Genetik erfolgt zunächst die Zugabe einer Substanz zu den Zellen. Die Substanz, die den gewünschten Phänotyp auslöst wird selektiert und anschließend das Zielprotein identifiziert. In der rückwärtsgerichteten chemischen Genetik wird das gewünschte Protein überexprimiert, um einen Bindungspartner aus mehreren Substanzen zu identifizieren. Danach wird die entsprechende Substanz selektiert und die Effekte auf den Phänotyp untersucht.

1.4 Methoden zur Zielprotein-Identifizierung

Die Identifizierung und Validierung von Zielproteinen niedermolekularer Substanzen ist für die biologische Charakterisierung und Bestimmung vorher nicht bekannter Zielproteine in der Arzneimittelforschung essentiell.^[89]

Bei der vorwärtsgerichteten Chemischen Genetik ist die Zielprotein-Identifizierung von wichtiger Bedeutung und ist normalerweise auch der zeitbestimmende Schritt. Die Zielprotein-Identifizierung dient dazu, den Wirkmechanismus der verwendeten Substanz zu erforschen, deren Effekt zuvor im Phänotyp bestimmt wurde. Für die Zielprotein-Identifizierung wurden bisher verschiedene Techniken entwickelt, dennoch gibt es keine universale Methode.^[85]

Im Folgenden werden einige der häufigsten und aktuellsten Methoden zur Zielprotein-Identifizierung behandelt, die nur einen kleinen Teil der verfügbaren Techniken darstellen.

1.4.1 Affinitäts-basierte Methoden

Die Affinitätschromatographie stellt eine direkte Methode dar, um die Zielproteine niedermolekularer Substanzen zu bestimmen.^[90] Die Idee dabei ist, dass ein Protein, das eine Substanz mit der stärksten Affinität bindet wahrscheinlich die biologische Aktivität der chemischen Substanz vermittelt.^[91] Diese Methode ist meistens erfolgreich, wenn die chemische Substanz potent ist und das Zielprotein stark *in vivo* exprimiert wird.^[92]

Bei der klassischen Affinitätschromatographie wird die Substanz über eine Affinitätsgruppe (z.B. Biotin) an einer stationären Phase (z.B. Streptavidin) immobilisiert. Durch die Interaktion mit dem Zielprotein kann dieses aus einer Proteinmischung isoliert werden, während unspezifische Binder durch Waschen entfernt werden. Die isolierten Zielproteine können durch massenspektrometrische Analyse identifiziert werden^{[91],[93]} (**Abbildung 1.7a**).

Mit Hilfe einer Kontroll-Substanz, welche im Vergleich zur aktiven Substanz deutlich weniger aktiv sein sollte können nicht spezifische Proteine identifiziert und als mögliche Zielproteine ausgeschlossen werden.

Mit dieser Technik konnten in der Vergangenheit wichtige Zielproteine niedermolekularer Verbindungen und Inhibitoren wie beispielsweise FK506 und Cyclosporin A identifiziert werden.^[94] Der Erfolg bei Anwendung dieser Methode ist allerdings von verschiedenen Faktoren abhängig wie z.B. vom Zelltyp, Lysispuffer und der Dauer der Inkubation mit dem Zelllysat. Außerdem ist es entscheidend, ob das gesuchte Protein stark genug exprimiert wird, damit es nachgewiesen werden kann.^[91]

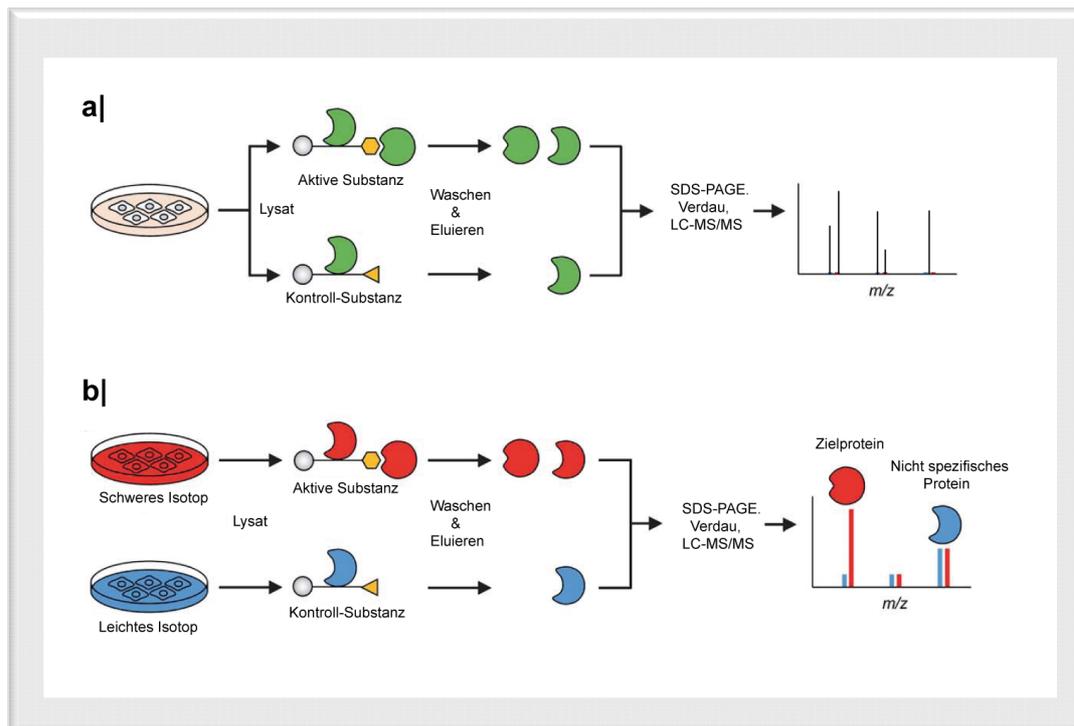


Abbildung 1.7: Affinitäts-basierte Methoden zur Zielprotein-Identifizierung (modifiziert nach Kawatani und Osada, 2014)^[95]

a) Affinitätschromatographie mit Affinitätssonden. Lysate werden zunächst mit der immobilisierten aktiven Substanz und der Kontroll-Substanz inkubiert, gewaschen und die gebundenen Proteine schließlich eluiert. Die Proteine werden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt, tryptisch verdaut, aufgereinigt und anschließend mit Hilfe von LC-MS/MS identifiziert. **b)** Quantitative Affinitätschromatographie mit SILAC. Zwei Zellpopulationen werden mit jeweils "leichten" Isotopen-markierten- und "schweren" Isotopen-markierten Aminosäuren kultiviert und so der Einbau der Proteine in die Zellen gewährleistet. Die isotopen-markierten Lysate werden mit der immobilisierten aktiven Substanz und der Kontroll-Substanz inkubiert, gewaschen und die gebundenen Proteine schließlich eluiert. Die eluierten Proteine werden anschließend vereint und mittels LC-MS/MS analysiert. Durch die Unterscheidung im Verhältnis von "leichten" zu "schweren" Peptidsignalen gelingt die Diskriminierung zwischen einer spezifischen Liganden-Proteinbindung und nicht spezifisch gebundener Proteine.

Auch die Synthese der zu verwendenden chemischen Substanz ist ein wichtiger Punkt, der zuvor gut durchleuchtet werden muss. Ein typische Affinitätssonde besteht aus dem Liganden, einem Abstandshalter (Linker) und einer Matrix, wobei letzteres zur Immobilisierung der Substanz dient.^[95] Die Anbringung einer funktionellen Gruppe oder einer affinen Gruppe an den Liganden darf dabei nicht die Bindung an das Zielprotein beeinträchtigen. Die Identifizierung der optimalen Position kann durch Struktur-Aktivitäts-Analysen gewährleistet werden und somit kann sichergestellt werden, dass die Substanz nach Ausstattung mit einem Linker immer noch aktiv ist.^[93]

Für die Zielprotein-Identifizierung konnten mit Hilfe der MS-Technik sensitivere und quantitative Methoden entwickelt werden, die im Hochdurchsatzformat verwendet werden können. Dabei werden insbesondere stabil isotopen-markierte MS-Techniken mit der Affinitätschromatographie kombiniert wie z.B. im SILAC-Verfahren (engl. *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*),^[96] welches eine Quantifizierung von Proteinen ermöglicht (siehe **Abbildung 1.7b**).

Dabei werden isotope-markierte essentielle Aminosäuren wie Methionin, Arginin, Leucin oder Lysin über den Metabolismus in die Proteine eingebaut. Das Prinzip dabei ist, dass zwei Zellpopulationen kultiviert werden, wobei eine unter normalen Bedingungen, d.h. mit den "leichten" Aminosäuren behandelt wird und die andere unter Verwendung schwerer Isotopen-markierter Aminosäuren wie z.B. ^{13}C -markiertes L-Arginin^[97] und ^{13}C , ^{15}N -markiertes L-Lysin.^[98] Der vollständige Einbau der Aminosäuren in das zelluläre Proteom erfolgt nach mindestens fünf Zellteilungen. Für die anschließende Affinitätschromatographie wird die aktive Sonde mit dem "schweren" Lysat und die inaktive Sonde mit dem "leichten" Lysat inkubiert. Die erfolgreich eluierten Proteine aus beiden Lysaten werden danach vereint und wie bereits beschrieben nach dem tryptischen Verdau mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert.^[93] Die Verwendung der Affinitätschromatographie in Kombination mit SILAC bietet viele Vorteile. Hierbei ist kein stringentes Waschen der Proben notwendig, sodass auch Proteine identifiziert werden können, die nur schwach binden und durch die Quantifizierung trotzdem als mögliche Zielproteine identifiziert werden können.^[98] Mit Hilfe der SILAC-Methode konnten u.a. Tubulin und CSE1 L (Exportin-2) als Zielproteine von Tetrathiodropyrin Tubulexin A^[99] identifiziert werden. Weitere Beispiele für eine erfolgreiche Zielprotein-Identifizierung mittels SILAC sind MT-ND1 (*NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1*) als Zielprotein von 5-Benzoylindol Derivaten^[100] und die Analyse der Zielproteine für Imatinib.^[101] Außerdem konnte gezeigt werden, dass die SILAC-Methode auch in embryonalen Stammzellen,^[102] aber auch in vollständigen Organismen wie beispielsweise in Maus,^[103] *C. elegans* und *D.melanogaster* eingesetzt werden kann.^[104] Der Nachteil dieser Methode ist, dass sie nicht in Zellen wie z.B. Blutplättchen angewandt werden kann, die nicht längerfristig kultiviert werden können, um den Einbau der Isotopen zu gewährleisten.^[93]

Für die Isolierung von Proteinen werden bei der klassischen Affinitätschromatographie niedermolekulare Substanzen mit Hilfe eines Linkers oder einer funktionellen Gruppe ausgestattet und sind damit eher für hoch abundante bzw. hochaffine Bindungen zwischen Ligand und Protein geeignet.^[105] Die Anbringung von z.B. funktioneller Gruppen kann in einem starken Aktivitätsverlust der chemischen Substanz resultieren.^[95] Eine alternative Methode dazu ist die Verwendung von kovalenten Affinitätssonden, die zusätzlich eine reaktive Gruppe beinhalten und eine direkte Proteinbindung- und Isolation ermöglichen^[105] und in lebenden Zellen *in vitro* durchgeführt werden kann (**Abbildung 1.8**). Dabei wird die verwendete Affinitätssonde auch als trifunktionale Gruppe bezeichnet,^[106] da sie aus dem Liganden, der photoreaktiven Gruppe und einer weiteren Affinitätsgruppe wie z.B. Biotin mit einem Fluorophor für die Immobilisierung und Visualisierung der Proteine besteht. Die meisten bioaktiven Substanzen binden nicht-kovalent an ihre Zielproteine, sodass diese während der Affinitätschromatographie ausgewaschen werden.

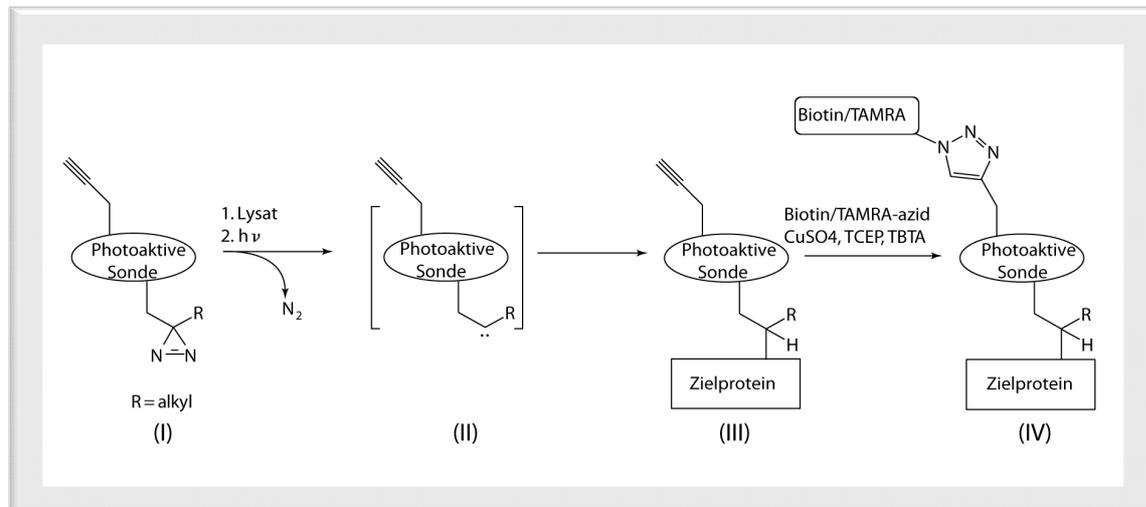


Abbildung 1.8: Affinitätschromatographie mit einer photoreaktiven Sonde (modifiziert nach MacKinnon und Taunton, 2009)^[107]

Photoaktivierung einer niedermolekularen Substanz mit einer Diazirin- und Alkin-Gruppe (**I**). Die UV-Bestrahlung der Diazirin-Gruppe generiert ein Carben-Intermediat (**II**), das zu einer kovalenten Bindung des Zielproteins führt (**III**). Das Addukt kann anschließend durch die Konjugation einer azidhaltigen Reportergruppe unter Anwendung der "Click Chemie" detektiert werden (**IV**).

Die Photoaktivierung dagegen ermöglicht eine kovalente Bindung zwischen Substanz und Zielprotein durch die Verwendung photoreaktiver Gruppen wie z.B. Benzophenon und Diazirin.^[95] Dabei führt die UV-Bestrahlung der Substanz zur Bildung hochreaktiver Carbene, die die Eigenschaft besitzen, Zielproteine kovalent durch die Ausbildung von C-C, C-H und O-H zu binden.^[108] Die gebundenen Zielproteine können anschließend durch eine Reporterguppe (z.B. Fluorophore und Biotin) visualisiert bzw. isoliert werden. Die kovalente Bindung zwischen Ligand und Zielprotein ermöglicht die Aufreinigung und Identifizierung des Zielproteins unter Verwendung verschiedener Techniken wie beispielsweise *Pull-Down*, SDS-PAGE und Massenspektrometrie.^[107] Mit dieser Methode konnten beispielsweise Zielproteine von Dasatinib, einem Tyrosinkinaseinhibitor identifiziert werden, die bis dahin noch unbekannt waren.^[109] Auch hier sind einige Faktoren bei der Synthese der photoreaktiven Substanz zu beachten. Dabei sollte die photoreaktive Substanz distal von der Bindestelle angebracht werden, um nicht die Bindung zwischen Ligand und Protein zu beeinträchtigen, sollte aber gleichzeitig nicht zu weit vom Zielprotein entfernt sein, um die kovalente Bindung zu ermöglichen. Ein großer Nachteil dieser Methode ist jedoch die Bindung von insbesondere abundanter und "klebriger" Proteine, die unspezifisch binden. Außerdem ist die Auswahl eines geeigneten bioorthogonalen Verfahrens für jedes Experiment individuell zu beurteilen. Eine Kupfer-katalysierte Reaktion beispielsweise um Zielproteine zu markieren, ist in lebenden Zellen nicht ideal, da dies toxisch für die Zellen sein kann.^[95] So eine Reaktion könnte dagegen in Zelllysaten durchgeführt werden, da die Zellen nicht mehr intakt sind.

1.4.2 Affinitäts-freie Methoden

Die Untersuchung des Wirkmechanismus der verwendeten Substanz kann durch Methoden analysiert werden, die sich in zwei Kategorien einteilen lassen. Die erste Kategorie umfasst Affinitäts-basierte Methoden für die Zielprotein-Identifizierung niedermolekularer Substanzen^{[96],[98]} und wurde bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die zweite Kategorie beinhaltet verschiedene Strategien, die auf genetisch manipulierbaren Modellorganismen beruht.^{[110],[111],[112]} Die Nachteile dabei sind, dass chemische Substanzen aufgrund von Multiresistenzen gegen Wirkstoffe oder wegen Divergenz der Zielproteine, in diesen Organismen inaktiv sein könnten.^[113] Um zu zeigen, dass es sich bei einem Protein, das durch eine chemische Substanz gebunden wird, um das physiologische Zielprotein handelt, basiert auf der Korrelation zwischen *in vitro* Testsystemen (z.B. Testsysteme zur Aktivitätsbestimmung oder Bindung) und dem Phänotyp, der aus einem *Knock-Out* des Proteins resultiert. Diese Korrelation kann jedoch irreführend sein, da die Effekte von Substanzen unterschiedlich sein können. Zum einen können z.B. Inhibierungen akut sein, d.h. einen starken Effekt haben und zum anderen kann der Phänotyp aufgrund des Protein *Knock-outs* indirekt sein oder auch auf einem kumulativen Effekt basieren.^[114] Gegenwärtig gibt es noch einen Mangel an Methoden, die diese Problematiken umgehen können und die Wirkungsmechanismen niedermolekularer Substanzen in humanen Zellen aufklären können.^[92] Für den "Gold-Standard" der Zielprotein-Identifizierung mit Hilfe einer Affinitäts-freien Methode sind zwei Kriterien zu erfüllen. Erstens sollte eine Substanzresistenz gegeben sein, die auf Mutationen im Zielprotein beruhen und zweitens sollten diese Mutationen die Effekte auf die Proteinaktivität durch die chemische Substanz supprimieren.^[92] Für einige chemische Substanzen wie z.B. Imatinib sind diese Kriterien erfüllt. Hierbei ergaben die Analysen der erwarteten Zielproteine solche Mutationen, welche zu einer Substanzresistenz führten.^{[115],[116]}

Die Erfüllung einer "Gold-Standard"-Validierung für diese Methode zeigt die Arbeit von Wacker *et al.*^[92] am Beispiel des zytotoxischen Krebsmedikamentes BI 2536 in relevanten humanen Krebszelllinien. Hierbei werden gegenüber der chemischen Verbindung multiresistente Klone isoliert und Mutationen durch die Transkriptomsequenzierung jedes einzelnen Klons identifiziert (**Abbildung 1.9**).

Bei BI 2536 handelt es sich um einen Inhibitor der Kinase PLK1 (*Polo-like kinase 1*), die eine wichtige regulatorische Funktion im Zellzyklus übernimmt.^[117] Für die Isolierung der resistenten Klone wurden humane HCT-116-Zellen (Kolonkarzinomzellen) verwendet. Das besondere an dieser Zelllinie ist, dass sie eine Defizienz für Fehlreparaturen besitzt und zugleich eine niedrige Expression von Multiresistenz-Pumpen aufweist.^[118]

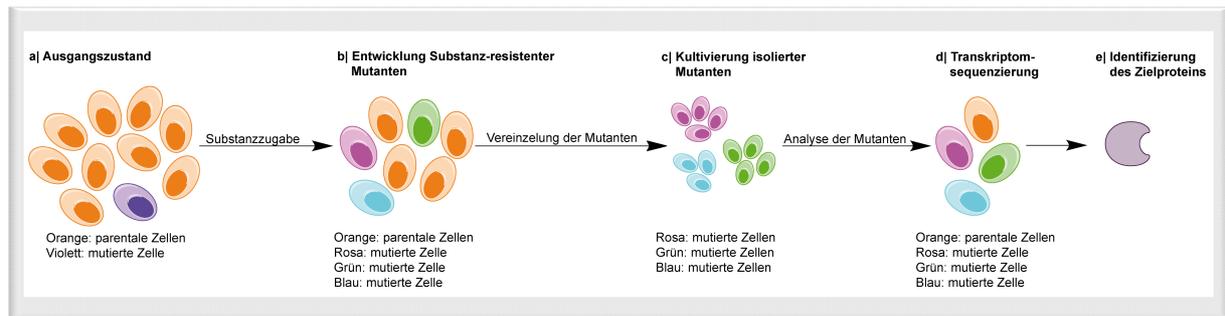


Abbildung 1.9: Zielprotein-Identifizierung durch Transkriptomanalyse (modifiziert nach Roemer und Boone, 2013)^[119]

In einem vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Ansatz wird zunächst die gewünschte Substanz zu den Zellen gegeben (a), um Substanz-resistente Mutanten zu generieren (b). Anschließend erfolgt die Vereinzelung und Kultivierung der isolierten Mutanten (c). Schließlich wird die Transkriptomsequenzierung sowohl für die Mutanten als auch für die parentalen Zellen durchgeführt (d). Durch den Sequenzvergleich können mögliche Zielproteine identifiziert werden.

Aufgrund dieser Eigenschaften erleichtert und fördert diese Zelllinie eine schnelle Identifikation von Mutationen, die gegenüber der chemischen Verbindung eine Resistenz verleihen.^{[120],[121]} Für den Versuch wurden HCT-116 Zellen mit 10 nM BI 2536 behandelt, wobei die mediane letale Dosis (LD₅₀) bei $3,9 \pm 2,8$ nM lag. Es konnten insgesamt 15 resistente Klone isoliert werden. Die Transkriptomsequenzierung erfolgte für sechs dieser Klone gemeinsam mit der parentalen Zelllinie. Für die ausgewählten Klone konnte im Vergleich zu der parentalen Zelllinie ein drei- bis neunfacher Anstieg in der LD₅₀ ermittelt werden. Bei genauerer Analyse der Sequenzierungsdaten konnte wieder im Vergleich mit der parentalen Zelllinie ein signifikanter Anstieg für 6-14 Variationen in einzelnen Nukleotiden für die mit BI 2536 behandelte Klone festgestellt werden. Die weiteren Analysen konzentrierten sich dabei auf Gene, die in mehr als einer BI 2536-resistenten Gruppe mutiert waren. Das einzige Gen, das in mehr als einer Gruppe eine Mutation aufwies, war das für PLK1.^[92] Es konnten zwei PLK1-Mutationen identifiziert werden, die anhand der Kristallstruktur von PLK1 mit der BI 2536 interagieren.^[122] Um zu untersuchen, ob beide identifizierten Mutationen für die BI 2536-Resistenz verantwortlich sind, wurden verschiedene stabile Zelllinien mit PLK1, die jeweils eine der beiden Mutationen beinhalten, generiert und mit BI 2536 untersucht. Die Ergebnisse ergaben, dass beide Mutationen in jeweils verschiedenen Zelllinien zu einer Supprimierung der BI 2536-Toxizität führen. Insgesamt konnte mit den generierten Daten ein "Gold-Standard" für den Nachweis von PLK1 als physiologisches Zielprotein von BI 2536 erbracht werden. Allerdings setzt diese Methode voraus, dass die Substanz ein direktes physiologisches Zielprotein hat. Dabei sollte die Substanzresistenz, welche durch Mutationen zustande kommt stark in den Substanz-resistenten Klonen vertreten sein. Für Substanzen, die mehrere Zielproteine besitzen ist die Methode weniger geeignet, da die Substanzresistenz in einem der Zielproteine weniger häufig vertreten ist. Dies hat zur Folge, dass eine große Anzahl an Klonen sequenziert werden müssten, um Mutationen zu identifizieren, welche häufiger in mehr als einem Klon

vorhanden ist. Außerdem ist die Methode nur für Substanzen geeignet, die zytotoxisch sind, da die Zellen abgetötet werden müssen, sodass nur Zellen weiter kultiviert werden, die Mutationen ausbilden.

Ein Nachteil in der vorwärtsgerichteten chemischen Genetik in humanen Zellen ist dennoch ein Mangel an molekularbiologischen Methoden, die eine Validierung der Substanz-resistenten Mutationen zulassen.^[89] Dieses Problem kann durch die Genom-Editierung beispielsweise durch die Verwendung der CRISPR-Cas9-Methode (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-Cas9*)^{[123],[124],[125],[126]} gelöst werden. Dabei erfolgt die Validierung durch den *Knock-Out* oder *Knock-In* eines Gens in die Substanz-resistenten Allele und die Wiederherstellung der Substanz-Sensitivität. Die CRISPR-Cas9-Methode ist hocheffizient und kann sowohl für dominante als auch für rezessive Substanz-resistente Allele angewandt werden.^[89]

Dass dieses Prinzip funktioniert zeigt die Publikation von Smurnyy *et al.*^[89] Dabei wurde die Genom-Editierung mit Hilfe von CRISPR-Cas9 in HCT116-Zellen durchgeführt, welches zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der verwendeten Substanz führte. Als niedermolekulare Substanz für diese Studien wurde u. a. 6-Thioguanin (6-TG) verwendet. 6-TG ist ein Antikrebsmedikament, das durch die Hypoxanthin phosphoribosyltransferase (HPRT1) in die toxische Form 6-Thioguanosin-monophosphat umgewandelt wird.^[127] Für die Studien wurden in einem vorwärtsgerichteten chemischen Ansatz KBM7-Zellen verwendet und Mutationen isoliert, die eine Resistenz gegenüber 6-TG aufwiesen. Bei den KBM7-Zellen handelt es sich um eine chronische myeloische Leukämie-Zelllinie, die haploid ist und somit nur eine Kopie aller Chromosomen mit Ausnahme von Chromosom 8 besitzt. Somit können in einem genetischen Screen sowohl dominante als auch rezessive Zunahmen bzw. Verluste von Funktionen identifiziert werden.^[128] Die isolierten 6-TG-resistenten Klone wurden sequenziert und so festgestellt, dass es sich dabei um *nonsense*-Mutationen in dem einzelnen HPRT1-Allel handelt. Die Validierung dieser Mutationen erfolgte durch die Inaktivierung des Gens unter Verwendung von CRISPR-Konstrukten, die HPRT1 an zwei verschiedenen Stellen schneiden.^[89] Die Cas9 Nuklease schneidet genomische DNA an einem spezifischen Genlocus, das durch die Sequenz der *small guide RNA*, die gemeinsam mit dem Enzym co-exprimiert wird, bestimmt wird.^{[123],[124],[125],[126]} Die Reparatur an den spezifisch geschnittenen Stellen erfolgt hauptsächlich durch den nicht-homologen Reparaturmechanismus NHEJ (*nonhomologous end-joining*). Diese Art der Reparatur ist fehlerhaft und führt zu einer Leserasterverschiebung, welches in einer Inaktivierung des Gens resultiert.^{[123],[124],[125],[126]} Die Transfektion von HCT-116-Zellen mit den CRISPR/Cas9-Konstrukten, die spezifisch für HPRT1 sind führte zu einem HPRT1-*Knock-Out* und resultierte in einer Resistenz gegenüber 6-TG. Eine anschließende erneute Sequenzierung des

HRPT1-Locus bestätigte die mit der Cas9 einhergehende Leserasterverschiebung und zeigte gleichzeitig eine Anreicherung dieser. Außerdem konnte nach der Substanzbehandlung nahezu kein Wildtyp-Allel gefunden werden, was deutlich zeigt, dass der Verlust der HPRT1-Funktion zu einer 6-TG Resistenz führt. Durch die Verwendung dieser Methode konnte die bereits bekannte, aber wichtige Funktion von HPRT1 für den durch 6-TG induzierten Zelltod^[128] unterstrichen werden und somit gezeigt werden, dass die Zielproteininvalidierung mit Hilfe der CRISPR-Cas9-Methode gewährleistet werden kann.^[89]

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bei dem Naturstoff (-)-Englerin A handelt es sich um eine hoch potente Substanz, welche gegenüber Nierenkrebszellen eine zytotoxische Wirkung aufweist und damit als ein mögliches Antikrebsmedikament in Frage kommt.

Im Rahmen eines Testsystems zur Zytotoxizität wurde demonstriert, dass es sich bei (-)-Englerin A um eine potente Verbindung handelt, die selektiv Nierenkrebszellen abtötet.^[78] Dabei wurden im 60-Zelllinien Screen Krebszelllinien aus anderen Geweben kaum beeinflusst. Auch normale Zelllinien zeigen gegenüber (-)-Englerin A keinen starken Effekt.

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit nichts über den biologischen Wirkungsmechanismus bekannt war, war das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit den Wirkmechanismus von (-)-Englerin A zu analysieren und aufzuklären. Dazu gehörten die Identifizierung und Validierung möglicher Zielproteine. Dies sollte hauptsächlich durch die Verwendung von Affinitätssonden, basierend auf Struktur-Aktivitäts-Analysen, gelingen. Außerdem sollte die biologische Aktivität der Substanz näher untersucht werden. Dabei sollte durch die Zuhilfenahme der Lebendzell-Mikroskopie und zellbasierter Testsysteme die genaue Form des Zelltodes untersucht werden.

Des Weiteren sollten weitere Struktur-Aktivitäts-Analysen der Substanz durchgeführt werden, um so eventuell Derivate zu identifizieren, die eine höhere Potenz als der Naturstoff selbst aufweisen. Die Analysen dafür sollten hauptsächlich mit einem Testsystem zur Zellviabilität erfolgen.

Kapitel 2

Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Firma/Herkunft
Acrylamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Acetonitril	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Agar	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Agarose	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammoniumpersulfat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ampicillin	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Aminosäuren, nicht essentiell (100x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Aqua/Polymount	Polysciences, Inc., PA, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
BSA (Rinderserumalbumin)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
2-Mercaptoethanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Coomassie Brilliant Blue G-250	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelb.
DMEM-Medium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelb.
DTE	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
DTT	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Emulsifier-Safe™	PerkinElmer, Inc., MA, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Formaldehyd	AppliChem GmbH, Darmstadt
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Inc., CA, USA

Glycerol	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Glycin	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe
[³ H] 2-Desoxy-D-Glukose	PerkinElmer, Inc., MA, USA
HEPES	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Hoechst 33342	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kanamycin	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Kälberserum (FBS)	Invitrogen, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
MEM-Medium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
ML204	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumdeoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Natriumpyruvat (100x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
NP-40	US Biological, MA, USA
ortho-Phosphorsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
PBS-Tabletten	Jena Biosciences GmbH, Jena
Penicillin-Streptomycin (100x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Phosphataseinhibitoren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PIPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelb.
Proteaseinhibitoren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads	Thermo Scientific, Schwerte
RPMI 1640-Medium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypanblau	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween 20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma/Herkunft
6-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
24-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
96-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
96-Loch-Zellkulturplatten (schwarz)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96-Loch-Zellkulturplatten, schwarz (Glasboden)	Zell-Kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg
384-Loch-Zellkulturplatten, schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
384-Loch-Zellkulturplatten, weiß	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
8-Kammer-Objektträger (Glasboden)	Thermo Scientific, Schwerte
Countess [®] Zählkammer	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Deckgläser Ø 12 mm	Thermo Fisher Scientific
E-16 Platte	Omni Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Gewebekulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Gewebekulturschalen Ø 10 cm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Gewebekulturschale Ø 50 mm (Glasboden)	MatTEK Corporation, MA USA
Kryoröhrchen	VWR International GmbH, Darmstadt
Küvetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Neubauer-Zählkammer	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Objektträger	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
PVDF-Transfermembran	Merck Chemicals Ltd, Beeston
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman 3MM Papier	Whatman GmbH, Dassel

2.3 Laborgeräte

Laborgeräte	Firma/Herkunft
Axiovert 200M mit Inkubator XL-3	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Axiovert Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Countess [®] Zellzähler	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Odyssey [®] FC Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Inkubator Nuaire DHD Autoflow NU 5510 E	IBS tecnomara, Fernwald
(Elektronenmikroskop) JEM 1200	JEOL GmbH, Eiching
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen
Pierce [™] G2 Fast Blotter	Thermo Scientific, Schwerte
Plattenlesegerät Infinite M200	Tecan, Crailsheim
Schüttler Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Sterilbank Microflow	NuncNalge, Rochester, USA
Sterilbank Nuaire	IBS tecnomara, Fernwald
Vakuumkonzentrator	Eppendorf AG, Hamburg
Szintillationszähler Wallac 1409	PerkinElmer, Inc., MA, USA
Wasserbad Memmert	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
xCELLigence RTCA DP	Omni Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Minispin	Eppendorf AG, Hamburg

2.4 Puffer und Lösungen

Zellbiologie	Zusammensetzung
Blocklösung	2 % (w/v) BSA in PBS-T
Fixierlösung	3,7 % (v/v) Formaldehyd in PBS

Zellbiologie	Zusammensetzung
Lysispuffer	50 mM PIPES 50 mM NaCl 5 mM EGTA 0,1 % (v/v) NP40 0,1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (v/v) Tween20 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol Proteaseinhibitor-Cocktail Phosphataseinhibitor-Cocktail pH 7,4
m-RIPA-Puffer	20 mM Tris, pH 8,0 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % (v/v) NP40 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat 0,1 % (w/v) SDS
Permeabilisierungslösung	0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
SBS-Puffer	10 mM HEPES 135 mM NaCl 5 mM KCl 1,2 mM MgCl ₂ 1,5 mM CaCl ₂ 8 mM Glukose pH 7,4

Zellbiologie	Zusammensetzung
TRPC-Lysispuffer	40 % (v/v) Glycerol 200 mM Tris, pH 6,8 280 mM SDS Proteaseinhibitor-Cocktail Phosphataseinhibitor-Cocktail nach Proteinbestimmung Zugabe von: 1 mM DTE 300 µM Bromphenolblau
Tyrode-Puffer	20 mM HEPES 130 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 5 mM NaHCO ₃ pH 7,4
Proteinbiochemie	Zusammensetzung
Blocklösung	5 % Magermilchpulver in PBS-T
PBS	Jena Bioscience GmbH, Jena 140 mM NaCl 10 mM Phosphatpuffer 3 mM KCl pH 7,45
PBS-T	0,1 % Tween20 in PBS
Pierce™ 1-Step Transfer Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
Sammelgelpuffer	1 M Tris, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8

Zellbiologie	Zusammensetzung
5 x SDS-Probenpuffer	40 % (v/v) Glycerol 200 mM Tris, pH 6,8 280 mM SDS 400 mM DTE 300 µM Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer	2,5 M Glycin 250 mM Tris 35 mM SDS
Färbelösungen	Zusammensetzung
Colloidale-Coomassie-Lösung	<u>Lösung A:</u> 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure 10 % (w/v) Ammoniumsulfat <u>Lösung B:</u> 5 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau G-250 <u>fertige Färbelösung:</u> 2 % (v/v) Lösung B 78 % (v/v) Lösung A 20 % (v/v) Methanol
Entfärberlösung	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Tryptischer Verdau/ HPLC	Zusammensetzung
Alkylierungslösung	55 mM Iodacetamid in 25 mM NH ₄ HCO ₃
Lösungsmittel A	0,1 % (v/v) Ameisensäure
Lösungsmittel B	100 % (v/v) Acetonitril 0,1 % (v/v) Ameisensäure
Reduktionslösung	50 mM DTT in 25 mM NH ₄ HCO ₃

Zellbiologie	Zusammensetzung
Verdau-Lösung	0,1 µg/ml Trypsin in 25 mM NH ₄ HCO ₃
Waschlösung 1	NH ₄ HCO ₃ /Acetonitril (3:1)
Waschlösung 2	NH ₄ HCO ₃ /Acetonitril (1:1)
Molekularbiologie	Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	200 mM Tris 50 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0 5,71 % (v/v) Eisessig
Elektrophysiologie	Zusammensetzung
Ringerlösung (extern)	10 mM HEPES 160 mM NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 2 mM CaCl ₂ 8 mM Gukose pH 7,4
Ringerlösung (intern)	10 mM HEPES 100 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 5 mM BAPTA 5 mM EGTA 45 mM N-Methyl-D-Glukamin (NMDG) pH 7,4
SBS-Puffer	10 mM HEPES 135 mM NaCl 5 mM KCl 1,2 mM MgCl ₂ 1,5 mM CaCl ₂ 8 mM Glukose pH 7,4

Zellbiologie	Zusammensetzung
Standard-Pipettenlösung	10 mM HEPES 145 mM CsCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 5 mM ATP 0,1 mM Na-GTP pH 7,2

2.5 Reagenzsysteme und Kits

Reagenzsystem/Kit	Firma/Herkunft
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, California, USA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Caspase-Glo [®] 3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim
Cell proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CellTiter-Glo [®] Luminiscent Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
CellTox [™] Green Cytotoxicity Assay	Promega GmbH, Mannheim
DC [™] Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Endofree Plasmid Maxi Kit	Quiagen GmbH, Hilden
Lactate Colorimetric/Fluometric Assay Kit	BioVision, California, USA
Lipofectamine [®] 2000 Transfektionsreagenz	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Mitotracker [®] Deep Red 633	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Scientific, Schwerte
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Quiagen GmbH, Hilden
Restore [™] Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
RNeasy mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden
Screen Quest [™] Fluo-8 Calcium Assay	Biomol, Hamburg
SuperSignal [®] West Pico	Thermo Scientific, Schwerte
SuperSignal [®] West Femto	Thermo Scientific, Schwerte
T-REX [™] System	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.6 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
A498	humane Nierenkarzinomzellen	DSMZ, Braunschweig
786-0	humane Nierenkarzinomzellen	DSMZ, Braunschweig
ACHN	humane Nierenkarzinomzellen	National [®] Cancer Institute, MD, USA
UO-31	humane Nierenkarzinomzellen	National [®] Cancer Institute, MD, USA
RXF-393	humane Nierenkarzinomzellen	National [®] Cancer Institute, MD, USA
CAKI-1	humane Nierenkarzinomzellen	National [®] Cancer Institute, MD, USA
SN-12C	humane Nierenkarzinomzellen	National [®] Cancer Institute, MD, USA
TK-10	humane Nierenkarzinomzellen	National [®] Cancer Institute, MD, USA
HS578-T	humane Brustkarzinomzellen	National [®] Cancer Institute, MD, USA
HEK293	humane embryonale Nierenzellen	ATCC [®] , Middlesex, England
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen transformiert mit dem SV-40 large T-Antigen	ATCC [®] , Middlesex, England
CHO	Ovarienzellen (chinesischer Hamster)	ATCC [®] , Middlesex, England

2.7 Nährmedien

2.7.1 Humane Zellen

Medium	Zusätze	Quelle
MEM mit Earle's Salzen mit L-Glutamin	10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep 1 % (v/v) Natriumpyruvat	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
RPMI 1640	10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep 1 % (v/v) Natriumpyruvat	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DMEM hoher Glukosegehalt (4,5 g/l)	10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep 1 % (v/v) Natriumpyruvat 1 % (v/v) MEM-NEAA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Ham's F12 mit L-Glutamin	10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep 1 % (v/v) Natriumpyruvat	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DMEM/F-12 GlutaMAX™	10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Opti-MEM® I	-----	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

2.7.2 Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium ^[129]	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl

Medium	Zusammensetzung
LB Agar	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar

2.8 Nukleinsäurestandards

Nukleinsäurestandard	Firma/Herkunft
Quick-Load [®] 100 bp DNA Ladder	New England BioLabs [®] GmbH, Frankfurt am Main
GeneRuler [™] 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St- Leon-Rot

2.9 Proteinstandards

Proteinstandard	Firma/Herkunft
PageRuler [™] Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St- Leon-Rot

2.10 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle
One Shot [®] OmniMAX [™] 2 T1	F' {proAB lacI ^q lacZΔM15 Tn10(Tet ^R) Δ(ccdAB) mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC) ϕ 80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA- argF)U 169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.11 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pcDNA™ 4/TO	Expressionsvektor	Prof. D. J. Beech, Leeds
<i>HsTRPC4</i> in pcDNA™ 4/TO	<i>HsTRPC4</i> in Expressionsvektor	Prof. D. J. Beech, Leeds
pcDNA™ 6/V5-His	Expressionsvektor mit His-Tag	Prof. D. J. Beech, Leeds
<i>HsTRPC5</i> in pcDNA™ 6/V5-His	<i>HsTRPC5</i> in Expressionsvektor mit His-Tag	Prof. D. J. Beech, Leeds

2.12 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
TRPC4 α/β fw	TTCAATGTCATCCCGAGCCC
TRPC4 α/β rev	GTAATCTTCGTGGGTGACTG
PKC θ fw	TGGGAGCATCCGTTTCTGAC
PCK θ rev	CAGCAGCATAAAACGTCGCT
HSF-1 fw	CCGCCCTCATTGACTCCATC
HSF-1 rev	TGAGCTCATTCTTGCCAGGC
GAPDH fw	TCAGCCGCATCTTCTTTTGCG
GAPDH rev	GGCGCCCAATACGACCAA

2.13 Antikörper

2.13.1 Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung WB IF	Stock	Quelle
Kaninchen anti-TRPC4	1:200 1:800	0,4 mg/ml	Alomone Labs, Jerusalem
Maus anti-TRPC1	1:200 1:500	1 mg/ml	NeuroMab, California, USA
Maus anti-TRPC5	1:200 1:500	1 mg/ml	NeuroMab, California, USA
Kaninchen anti-PKCθ	1:1000 -----	1 mg/ml	Abcam, Cambridge, England
Maus anti-HSF-1	1:1000 -----	1 mg/ml	Abcam, Cambridge, England
Kaninchen anti-α-Tubulin	1:2000 -----	0,5 mg/ml	Abcam, Cambridge, England
Kaninchen anti-SYEP	1:1000 -----	1 mg/ ml	Novus Biologicals, CO, USA

2.13.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Stock	Quelle
Esel anti-Kaninchen (Alexa Fluor® 488-Konjugat)	1:500	2 mg/ml	Life Technol. GmbH, Darmstadt
Esel anti-Maus (Alexa Fluor® 488-Konjugat)	1:500	2 mg/ml	Life Technol. GmbH, Darmstadt
Ziege anti-Kaninchen (HRP-Konjugat)	1:15000	0,8 mg/ml	Thermo Scientific, Schwerte
Ziege anti-Maus (HRP-Konjugat)	1: 15000	0,8 mg/ml	Thermo Scientific, Schwerte

Kapitel 3

Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden Zellen in eine 6-Lochplatte ausgesät. Dabei wurden pro Loch jeweils 2×10^5 Zellen ausplattiert und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy mini Kits von QIAGEN.

Hierzu wurden zunächst die Zellen lysiert und in QIA-shredder-Säulen für 2 min bei 16.100 rcf homogenisiert. Danach wurde 70 %iger Ethanol im Verhältnis 1:1 zu den Lysaten gegeben und diese in RNeasy-Säulen überführt. Hierdurch wurde eine selektive Bindung zwischen RNA und der Silica-basierten Membran gewährleistet um die RNA-Oligonukleotide zu binden. Durch mehrmaliges Waschen der Säulen wurden Kontaminationen entfernt. Nach Trocknen der Membran wurden die Säulen in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für die Elution der RNA wurde jeweils 30 µl RNA-freies Wasser direkt auf die Säule gegeben und die Proben für 1 min bei 9.300 rcf zentrifugiert.

3.1.2 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des NanoDrop 2000c Spektrophotometers. Zunächst wurde der Leerwert unter Verwendung von 1 µl DNA/RNA-freiem Wasser bestimmt. Anschließend wurden die DNA/RNA-Proben mit der gleichen Vorgehensweise gemessen und gleichzeitig die Reinheit der Proben aus dem Verhältnis von 260 nm zu 280 nm bestimmt. Die Messungen erfolgten alle in Doppelbestimmungen, sodass der Mittelwert der gemessenen Proben gebildet und mit diesen weitergearbeitet wurde.

3.1.3 cDNA-Herstellung (Reverse Transkription)

Die in 3.1.1 isolierte RNA sollte folgend für die PCR verwendet werden. Dafür wurde die isolierte RNA zunächst in cDNA mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits von QIAGEN umgeschrieben. Hierbei wird eine virale-, reverse Transkriptase verwendet, die eine RNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität besitzt und in der Lage ist, aus der vorliegenden

RNA cDNA zu synthetisieren. Die hierdurch synthetisierte DNA ist komplementär zur ursprünglichen RNA.

Für die Herstellung der cDNA war es zunächst wichtig, die eventuell noch vorhandene genomische DNA zu eliminieren. Hierzu wurde ein 14 µl Reaktionsansatz hergestellt. Dieser enthielt 1 µg der zuvor isolierten RNA, 2 µl des gDNA Wipeout Puffers und wurde mit DNA- und RNA-freiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Nach mehrmaligem Mischen wurde der Ansatz für 2 min bei 42 °C im PCR-Thermocycler inkubiert und anschließend sofort auf Eis platziert. Für die reverse Transkription wurden nun zu dem 14 µl Ansatz weitere 6 µl hinzugefügt, die neben der Quantiscript reversen Transkriptase (1 µl) auch den Quantiscript RT-Puffer (4 µl) und eine Oligonukleotid-Mischung (1 µl) enthielten. Der Reaktionsansatz von 20 µl wurde für weitere 15 min bei 42 °C inkubiert, um so die reverse Transkription durchzuführen. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte für 3 min bei 95 °C.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *Polymerasen chain reaction*) wird für die Amplifikation von DNA *in vitro* verwendet und wurde erstmals 1986 von Kary Mullis^[130] beschrieben. Sie beinhaltet neben der Denaturierung der DNA, auch die Oligonukleotid-Hybridisierung und die Elongation der Oligonukleotide.^[130] Die PCR wurde mit Hilfe des Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mixes durchgeführt, wobei die Bedingungen an die Schmelztemperaturen der jeweiligen Oligonukleotide und die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angepasst wurden. Hierzu wurden in einem 20 µl Ansatz 10 µl des Phusion Flash PCR Master Mixes, 100 ng der zu amplifizierenden DNA und 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit DNA-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die PCR beinhaltete einen initialen Denaturierungsschritt bei 98 °C für 10 s (1 Zyklus) gefolgt von 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung für jeweils 1 s, Anlagerung der Oligonukleotide bei entsprechender Schmelztemperatur für 5 s und die Elongation der Oligonukleotide bei 72 °C für 15 s. Die finale Elongation fand bei 72°C für 1 min statt.

3.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (One Shot® OmniMAX™ 2 T1) verwendet. Hierzu wurden 100 µl der Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und anschließend mit 100 ng der zu transformierenden DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Schließlich erfolgte ein Hitzeschock für 1 min bei 42 °C und die anschließende

Inkubation für 2 min auf Eis. Danach erfolgte die Zugabe von 900 µl LB-Medium zu den Bakterien und das Anziehen der Kultur für 1 h bei 37 °C im Schüttler. Die Zellen wurden in einem nächsten Schritt bei 9.300 rcf zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 100 µl LB-Medium aufgenommen, auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Verwendung des EndoFree Plasmid Maxi Kits. Dabei wird die Plasmid-DNA bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert an ein Ionenaustauscharz gebunden. Kontaminationen, wie beispielsweise RNA, Proteine oder niedermolekulare Substanzen, werden durch Waschschrte mit mittlerer Salzkonzentration entfernt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt unter Verwendung eines stark salzhaltigen Puffers. Die Entsalzung und Konzentrierung wird anschließend durch eine Isopropanol-Präzipitation gewährleistet.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden wie unter Punkt 3.1.5 beschrieben die Bakterienzellen nach der Transformation auf LB-Platten mit Selektionsdruck ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde von jeder Platte eine Zellkolonie gepickt und diese in jeweils 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) überführt. Das Anziehen der Bakterienkulturen erfolgte über Nacht bei 37 °C im Schüttler. Danach wurden die Zellen zunächst bei 16.100 rcf für 15 min bei 4 °C in 50 ml Reaktionsgefäße geerntet und anschließend resuspendiert. Nach Lysieren der Zellsuspension wurde diese neutralisiert, in ein QIAfilter Cartridge überführt und gefiltert. Endotoxine wurden aus dem Lysat entfernt, für 30 min auf Eis inkubiert und in ein QIAGEN-tip überführt. Nach Bindung der Plasmid-DNA an die Säule wurde diese gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend durch die Zugabe von 15 ml QN-Puffer in ein 50 ml Reaktionsgefäß eluiert. Für die Präzipitation der eluierten DNA wurden 10,5 ml 2-Propanol hinzugefügt, gemischt und bei 9.300 rcf für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Schließlich wurde die DNA mit 5 ml endotoxin-freiem 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut bei 9.300 rcf für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA für 10 min luftgetrocknet. Nach Resuspendierung der DNA in 30 µl endotoxin-freiem TE-Puffer erfolgte die Konzentrationsbestimmung bei 260 nm mit Hilfe des NanoDrop Spektrophotometers wie bereits in 3.1.2 beschrieben.

3.1.7 Herstellung von Glycerol-Kulturen

Um eine langfristige Konservierung von Bakterienkulturen mit der transformierten DNA zu gewährleisten, wurden Glycerol-Kulturen hergestellt. Hierzu wurden von der 200 ml Bakterienkultur in 3.1.6, die für die Plasmid-DNA Isolierung angezogen wurden, 500 µl entnommen und mit 500 µl sterilem Glycerol gemischt. Die Glycerol-Kulturen wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

3.1.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung der DNA erfolgte elektrophoretisch mit Hilfe von Agarosegelen. Hierzu wurde zunächst 2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst und aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen der Agarose wurde GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain hinzugegeben, um die Färbung der Nucleinsäuren zu gewährleisten. Nach Zugabe von 1/6 Ladepuffer zu der DNA erfolgte die Auftragung und Auftrennung im Agarosegel bei einer konstanten Spannung von 130 V. Als Kontrolle diente ein DNA-Standard, welcher ebenfalls aufgetragen wurde. Die DNA konnte anschließend mittels des DNA-Standards unter UV-Licht überprüft bzw. nachgewiesen werden.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten erfolgte nach Bradford^[131] mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays. Das Prinzip des Testsystems beruht darauf, dass der saure Farbstoff Coomassie Brilliant Blau primär basische und aromatische Aminosäure-Seitenketten bindet, was zu einer Verschiebung im Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm führt. Dabei ist die Absorption proportional zum Proteingehalt in der Probe. Um Auskunft über die absolute Proteinmenge in den Proben zu erhalten, wurde zunächst eine Eichgerade mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Lysate wurden diese zunächst in Wasser verdünnt. Dafür wurde 1 µl der Probe in 799 µl Wasser pipettiert und gemischt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz erfolgte die Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und anschließend die Absorptionsmessung der Proben bei 595 nm. Als Leerwert diente der verwendete Lysispuffer. Schließlich konnte mit Hilfe der BSA-Eichgerade unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet werden.

3.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von TRPC-Lysaten basiert auf dem Lowry-Testsystem^[132] und wurde mit Hilfe des DC™ Protein Assays durchgeführt. Dieses Testsystem toleriert im Vergleich zum Bradford-Reagenz hohe Anteile an Detergenzien wie beispielsweise 10 % SDS. Die kolorimetrische Messung erfolgt primär durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan und weniger durch Cysteine und Histidine. Bei dieser Messung reagieren Proteine mit einem alkalischen Kupfertartrat- und Folin-Reagenz. Dabei reagieren die Proteine zunächst mit Kupfer in einem alkalischen Medium welches zu einer Reduktion des Folin-Reagenzes durch Kupfertartrat behandelter Proteine führt.^[133] Bei der Reduktion des Folin-Reagenzes kommt es zu einer charakteristischen blauen Färbung mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm. Dabei ist die Absorption proportional zum Proteingehalt der Probe. Um Auskunft über die absolute Proteinmenge in den Proben zu erhalten wurde zunächst eine Eichgerade mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt.

Für die Absorptionsbestimmung der Proteine wurde zunächst Lösung A' hergestellt, die nachher für die Solubilisierung der Detergenzien wichtig ist, indem 1 ml Lösung A (alkalische Kupfertartrat-Lösung) mit 20 µl Lösung S versetzt wurde. Im nächsten Schritt wurden in eine 96-Lochplatte 5 µl der Lysate gegeben und anschließend mit 25 µl Lösung A' gemischt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung B in jedes Loch. Nachdem die Platte für 5 s geschüttelt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, konnte die Absorption bei 750 nm bestimmt werden. Schließlich konnte anhand der BSA-Eichgerade die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet werden.

3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierten Bedingungen nach Laemmli^[134] wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele verwendet. Dazu wurden die zu analysierenden Proben zunächst in 5x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend jeweils 60 µg Protein auf 8 %ige oder 10 %ige Trenngele aufgetragen. Von dem Proteinstandard wurden 8 µl aufgetragen. Als Kathoden- und Anodenpuffer diente 1x SDS-Laufpuffer. Für die Auftrennung der Proteine wurde für die ersten 10 min eine Spannung von 80 V angelegt und schließlich eine konstante Spannung von 120 V verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit einer Colloidalen-Coomassie-Lösung gefärbt oder auf einer PVDF-Membran immobilisiert.

3.2.3 Colloidale-Coomassie Färbung von Proteinen

Für die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde zunächst eine Colloidale-Coomassie-Lösung angesetzt. Der negativ geladene Farbstoff lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an. Für die Färbung wurden 400 ml Lösung A mit 10 ml Lösung B und 100 ml Methanol gemischt. Die Proteine wurden über Nacht in der Colloidalen-Coomassie-Lösung inkubiert. Um den Überschuss an Farbstoff zu entfernen, wurde entweder die Entfärberlösung oder Wasser verwendet. Der letzte Schritt wurde für proteomische Analysen mittels nano-HPLC/MS/MS durchgeführt.

3.2.4 Immunoblot

Der Immunoblot beschreibt den Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran und den anschließenden Nachweis von Proteinen unter Verwendung spezifischer Antikörper.

Um eine optimale Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgelen auf die PVDF-Membran zu gewährleisten, wurde das Gel für 10 min in Pierce™ 1-Step Transfer Buffer inkubiert. Parallel dazu wurde die PVDF-Membran mit Methanol für 30 s aktiviert und genauso wie auch das Filterpapier für 10 min in Pierce™ 1-Step Transfer Buffer belassen. Der Transfer erfolgte mit Hilfe des Pierce™ G2 Fast Blotter, der eine halbtrockene Transferkammer darstellt. Hierzu wurde die PVDF-Membran auf zwei Lagen Filterpapier gelegt und auf die Membran schließlich das Polyacrylamidgel. Abschließend wurden erneut zwei Lagen Filterpapier auf das Polyacrylamidgel gelegt und vorsichtig glatt gestrichen, um Luftblasen zu entfernen. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V für 7 min. Anschließend wurde die Membran kurz in Ponceau S geschwenkt und mit Wasser entfärbt, um so die Qualität des Proteintransfers zu begutachten. Ponceau S bindet reversibel an positiv geladene Aminogruppen und somit die Proteine sichtbar zu machen. Bei einem erfolgreichen Proteintransfer wurde die Membran für den immunologischen Nachweis immobilisierter Proteine verwendet.

3.2.5 Detektion immobilisierter Proteine

3.2.5.1 Detektion der Proteine mittels HRP-gekoppelter Antikörper

Für die Immundetektion der immobilisierten Proteine auf der PVDF-Membran war es zunächst wichtig, freie Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Hierzu wurde die Membran mit 10 ml Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der entsprechende Primärantikörper (Verdünnungen siehe Abschnitt 2.13.1) in 5 ml Blocklösung

verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen wurde die Membran insgesamt dreimal für jeweils 10 min mit PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Verdünnung des Sekundärantikörpers (Verdünnungen siehe Abschnitt 2.13.2) in 10 ml der Blocklösung und die Inkubation der Membran für 1 h bei Raumtemperatur. Folgend wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 min mit PBS-T gewaschen. Die hierbei verwendeten Sekundärantikörper waren an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, sodass die Detektion mittels Chemilumineszenz erfolgte. Als Entwicklerlösung wurden SuperSignal® West Pico oder SuperSignal® West Femto eingesetzt.

3.2.6 Affinitätschromatographie zur Zielprotein-Identifizierung

Die für die vergleichende Affinitätschromatographie verwendeten Affinitätssonden enthielten einen Triethylen-Biotin-Linker. Um die Sonden an Streptavidin zu immobilisieren, wurden je 500 µl Streptavidin-Kügelchen dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Affinitätssonden in PBS verdünnt, sodass sie eine finale Konzentration von 10 µM besaßen und wurden schließlich mit den Streptavidin-Kügelchen für 1 h bei 4 °C inkubiert. Um überschüssige, nicht gebundene Substanz zu entfernen, wurden die Streptavidin-Kügelchen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden sie mit 500 µl A498-Lysat (2 mg/ml) versetzt und erneut für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Streptavidin-Kügelchen zunächst zweimal mit 1 ml 25-75 mM MgCl₂-haltigem Lysispuffer gewaschen und zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Schließlich wurden die Streptavidin-Kügelchen mit 1x SDS-Probepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht, um die Proteine abzutrennen.

Für die Affinitätschromatographie-Versuche mit Verdrängung durch freie Substanz wurde gleichermaßen vorgegangen, nur dass zuvor die A498-Lysate mit 200-1000 µM freier Substanz für 1 h bei 4 °C vorinkubiert wurden.

3.2.7 Tryptischer In-Gelverdau von Proteinen

Für den tryptischen Verdau wurden die Proben aus 3.2.6 auf ein Polyacrylamidgel beladen und getrennt. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Colloidalen-Coomassie gefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt. Danach konnten alle Proteinbanden in fünf Abschnitte eingeteilt und anschließend mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten werden. Bevor diese in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden konnten, wurden die Gelstücke in 1-2 mm große Stücke zerkleinert. Danach erfolgte die Inkubation der Gelstücke in 200 µl Waschlösung 1 für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde

Waschlösung 1 durch Waschlösung 2 ersetzt und für weitere 15 min bei 37 °C gewaschen. Um eine Reduktion der Disulfidbrücken der Proteine zu gewährleisten, wurden diese in 100 µl Reduktionslösung für 45 min bei 37 °C reduziert. Die Inkubation der Gelstücke mit 100 µl Alkylierungslösung für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur stellte die Alkylierung der Proteine sicher. Nach zweimaligem Waschen der Proteine mit 200 µl Waschlösung 2 erfolgte die Zugabe von 50 µl Acetonitril für 10 min und die anschließende Trocknung der Proben für 10 min bei Raumtemperatur. Um die Proteine zu verdauen, wurde diesen zunächst 50 µl der Verdau-Lösung hinzugefügt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 50 µl 25 mM NH_4HCO_3 dazugegeben. Die Proteine wurden schließlich über Nacht bei 30 °C unter Schütteln verdaut. Die Freisetzung der Proteine aus den Gelstücken erfolgte mittels Ultraschallbad. Hierzu wurden die Gelstücke für 30 min bei 0 °C inkubiert und die Überstände in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Gelstücke wurden anschließend mit 50 µl Acetonitril für 15 min bei Raumtemperatur nachgewaschen und der Überstand mit dem vorherigen vereint. Als Vorbereitung für die nano-HPLC/MS/MS wurden die Proben schließlich im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die Lagerung der Proben bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80 °C.

3.2.8 Protein-Identifizierung mittels nano-HPLC/MS/MS

Die Identifizierung der tryptisch-verdauten Peptide wurde von Dr. Petra Janning und Dipl.-Ing. Andreas Brockmeyer unter Verwendung einer nano-HPLC/MS/MS, durchgeführt. Für die Analyse wurde eine Ultimate 3000 nano-HPLC (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) verwendet. Diese war mit einer Ladepumpe und einer Pumpe für den nano-Fluss-Bereich und einem Autosampler, der mit einem variablen zwei-Wellenlängen UV-Detektor verbunden war, ausgestattet. Die Messungen erfolgten an einem Orbitrap Massen-Spektrometer, welches mit einer LTQ XL linearen Ionenfalle (Thermo Electron Corporation, Dreieich) ausgerüstet war. Für die Injektion der Proben war die nano-HPLC mit dem Orbitrap Massenspektrometer mit einer standardbeschichteten Pico-Spitze (ID 20 µm, Tip-ID 10 µm, New Objective, Woburn, USA) verbunden.

Die getrockneten Peptide wurden zunächst in 30 µl 0,1 % TFA resuspendiert, und 10 µl der Mischung injiziert. Die Konzentrierung der Probe konnte mit Hilfe einer C18 PepMap 100 Vorsäule (3 µm, 100 Å, 300 µm ID * 5 mm, Dionex) und einer Flussrate von 30 µl/min für 5 min erreicht werden. Für die Trennung der Peptide wurde eine C18 PepMap 100 Säule (3 µm, 100 Å, 75 m ID * 25 mm) unter Verwendung eines linearen Gradienten genutzt. Dazu wurden zunächst 96 % Lösungsmittel A und 4 % Lösungsmittel B eingesetzt, das nach 145 Minuten auf 60 % Lösungsmittel A und 40 % Lösungsmittel B umgestellt wurde. Dabei betrug die Flussrate 300 nl/min. Die Vorläufer Messungen erfolgten in der Orbitrap mit der MS bei

einer Auflösung von 60000. Die fünf intensivsten Ionen, die mit Hilfe der MS/MS identifiziert wurden, konnten gleichzeitig in der linearen Falle aufgenommen werden. Die Identifizierung und Analyse der Proteine fand unter Anwendung der Protein-Datenbank SwissProt (SwissProt ID 2012 07, Taxonomie human) und des MOWSE Algorithmus,^[135] statt. Dabei wurden Ionen berücksichtigt, die zwei- bis dreifach geladen waren. Die Suche erfolgte für vollständige Spaltungen durch Trypsin, wobei auch fehlerhafte Spaltungen berücksichtigt wurden. Die Carbamidomethylierung wurde als feste Proteinmodifikation und die Methionin-oxidation als variable Modifikation gewählt. Die Massengenauigkeit betrug 10 ppm für Peptidmassen und 0,5 Da für MS/MS Daten. Die "False Discovery Rate" wurde auf 1 % gesetzt.

3.2.9 Bestimmung der Aktivität verschiedener Kinasen

Die Kinase-Profilierung wurde von der Firma Life Technologies durchgeführt. Hierzu wurden drei unterschiedliche fluoreszenzbasierte Testsysteme verwendet. Die Untersuchung der Kinasen erfolgte mit 1 μ M oder 5 μ M der Testsubstanz unter Verwendung unterschiedlicher Technologien, die im Folgenden beschrieben werden.

3.2.9.1 Bestimmung der Aktivität mit der Z'-LYTE[®]-Technologie

Die Z'-LYTE[®]-Technologie ist ein biochemisches Testsystem, das ein fluoreszenzbasiertes, enzym-gekoppeltes Format darstellt. Es basiert auf der unterschiedlichen Sensitivität phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Peptide gegenüber einer proteolytischen Spaltung. Das Peptidsubstrat ist mit zwei Fluorophoren markiert, die sich jeweils an beiden Enden des Peptides befinden und ein FRET-Paar (Förster-Resonanzenergietransfer) darstellen.

In einer primären Reaktion überträgt die Kinase das γ -Phosphat von ATP auf eine einzelne Tyrosin-, Serin-, oder Threonin-Seitenkette in den synthetischen FRET-Peptiden. In einer zweiten Reaktion erfolgt die Zugabe des Detektionsreagenzes. Dabei werden nicht phosphorylierte FRET-Peptide durch eine sequenz-spezifische Protease gespalten, sodass der Transfer zwischen Donor- und Akzeptor-Fluorophor unterbunden wird und somit das FRET-Signal erlischt. Phosphorylierte FRET-Peptide dagegen können nicht gespalten werden, da eine Phosphorylierung die Aktivität der im Detektions-Reagenz enthaltenen Protease inhibiert, sodass hier ein FRET-Signal bestehen bleibt, welches detektiert werden kann.

Für die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde die Testsubstanz in Kinasepuffer verdünnt und gemeinsam mit einer Peptid/Kinase-Mischung und einer ATP-Lösung in einer schwarzen

384-Lochplatte gemischt. Dabei betrug die finale Substanzkonzentration 1 μM oder 5 μM . Um eine homogene Lösung zu erhalten, wurde die Platte für 30 s geschüttelt und anschließend für die Kinasereaktion für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 μl des Detektions-Reagenz wurde die Platte erneut für 30 s geschüttelt und für weitere 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das FRET-Signal konnte durch das Verhältnis von Donor-Emission (445 nm) zu Akzeptor-Emission (520 nm) ermittelt werden. Während als Phosphorylierungskontrolle synthetisch phosphorylierte Peptide mit einer zum Peptid-Substrat identischen Sequenz verwendet wurden, diente eine Reaktion ohne ATP als Nicht-Phosphorylierungskontrolle, sodass keine Kinaseaktivität vorhanden war. Die Kinaseaktivität wurde schließlich auf die Kontrollen normalisiert.

3.2.9.2 Bestimmung der Aktivität mit dem Adapta[®]-Testsystem

Beim Adapta[®]-Testsystem handelt es sich um ein fluoreszenzbasiertes Format zur Detektion von ADP. Dieses Verfahren ist extrem ADP-sensitiv, sodass eine Verschiebung des Signals bereits sehr früh bei der Umsetzung von ATP zu ADP detektiert werden kann. Somit ist dieses Testsystem ideal für Kinasen mit geringer Aktivität geeignet. Das Verfahren wird in eine Kinasereaktionsphase und in eine ADP-Detektionsphase eingeteilt. In der Kinasereaktionsphase werden alle für die Kinasereaktion notwendigen Komponenten zusammengefügt und inkubiert. Danach wird eine Detektionslösung hinzugefügt, die aus einem Europium-markierten anti-ADP-Antikörper, einem Alexa Fluor[®] 647-markiertem ADP-Indikator (engl. *tracer*) und EDTA besteht. ADP, das in Anwesenheit eines Kinasesubstrats während der Kinasereaktion gebildet wird, verdrängt den Alexa Fluor[®] 647-markiertem ADP-Indikator vom Europium-markierten anti-ADP-Antikörper, was zu einem niedrigen TR-FRET-Signal (*Tracer*-FRET-Signal) führt. In Gegenwart eines Kinaseinhibitors ist die gebildete ADP-Menge reduziert, sodass die Interaktion zwischen Antikörper und ADP-Indikator intakt ist und dies in einem hohen TR-FRET-Signal resultiert. Das TR-FRET-Signal und damit die ADP-Bildung kann durch das Verhältnis von ADP-Indikator (665 nm) Emissionswellenlänge zu Europium (615 nm) Emissionswellenlänge ermittelt werden.

Für die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde Testsubstanz in HEPES-Puffer verdünnt und gemeinsam mit einer ATP-Lösung und einer Substrat/Kinase-Mischung in eine weiße 384-Lochplatte, gegeben und gemischt. Dabei betrug die finale Substanzkonzentration 1 μM . Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 μl einer 4-fach konzentrierten ATP-Lösung. Danach wurde die Platte für 30 s geschüttelt, 2 min bei 1000 x g zentrifugiert und schließlich für die Kinasereaktion für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 μl des Detektions-Reagenz wurde die Platte erneut für 30 s geschüttelt, 2 min bei 1000 x g zentrifugiert und für weitere 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde das TR-

FRET-Signal aus dem Verhältnis von Donor-Emission (665 nm) zu Akzeptor-Emission (615 nm) ermittelt. Als Positivkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit ADP anstelle von ATP. Für die Negativkontrolle wurde die geringste Emission aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von ADP-Indikator und Europium-markierten Antikörper in Gegenwart aktiver Kinasen verwendet. Diese Kontrolle wurde verwendet, um eine ATP-Umsetzung von < 40% zu produzieren. Die Kinaseaktivität wurde schließlich auf die Kontrollen normalisiert.

3.2.9.3 Bestimmung der Bindung mit dem LanthaScreen®

Das LanthaScreen®-Testsystem basiert auf einem Alexa Fluor®-Konjugat (*tracer*), das an die Kinase bindet und durch Zugabe eines Europium-markierten anti-Tag-Antikörper detektiert werden kann. Während die Bindung des Alexa Fluor®-Konjugates und des markierten anti-Tag-Antikörpers zu einem hohen TR-FRET Signal führt, kommt es in Anwesenheit eines Kinaseinhibitors zu einer Verdrängung des Alexa Fluor®-Konjugates durch den Inhibitor, was in einem Verlust des TR-FRET-Signals resultiert.

Für die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde die Testsubstanz in Kinasepuffer verdünnt und gemeinsam mit einer Kinase/Antikörper-Mischung und einer *Tracer*-Lösung in einer weißen 384-Lochplatte gemischt. Dabei betrug die finale Substanzkonzentration 5 µM. Die Platte wurde für 30 s geschüttelt und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das TR-FRET-Signal aus dem Verhältnis von *Tracer*-Emission (665 nm) zu Europium-markierten Antikörper Emission (615 nm) ermittelt. Als Positivkontrolle wurde die geringste Emission aus dem Verhältnis *Tracer* zu Europium eines bekannten Inhibitors verwendet. Für die Negativkontrolle wurde die höchste Emission aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von *Tracer* zu Europium-markierten Antikörper in Abwesenheit eines Inhibitors verwendet, sodass es zu keiner Verdrängung des *Tracers* kommen konnte. Die Kinaseaktivität wurde schließlich auf die Kontrollen normalisiert.

3.2.10 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation dient dazu mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers ein bestimmtes Antigen gemeinsam mit seinen Interaktionspartnern aus einer Lösung z.B. aus einem Proteingemisch zu präzipitieren.

Die Co-Immunopräzipitation gelang durch die Verwendung von Pierce™ Protein A/G magnetischen Kügelchen, die die IgG Bindungsdomänen sowohl von Protein A als auch Protein G kombinieren. Hierzu wurden zunächst Lysate wie in 3.3.7.3 beschrieben

hergestellt. Anschließend wurden jeweils 25 µl Protein A/G-Kügelchen mit 200 µl Waschpuffer nach Herstellerangaben gewaschen und erneut insgesamt dreimal mit 500 µl eiskaltem m-RIPA-Puffer inkubiert. Danach erfolgte die gemeinsame Zugabe von 500 µl Zelllysat (2mg/ml) und 10 µg des TRPC4-Antikörpers. Für die Kontrollen wurde kein Antikörper hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 4 °C. Schließlich wurden die Protein A/G-Kügelchen dreimal mit eiskaltem 500 µl m-RIPA-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Protein A/G-Kügelchen in 60 µl 2x SDS-Puffer aufgenommen und für 10 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überstände wurden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Auftauen von Zellen

Die zuvor in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 3 ml Medium aufgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen bei 200 rcf für 5 min zentrifugiert, um das im Kryomedium enthaltene DMSO zu entfernen. Nach dem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in eine mit 10 ml Kulturmedium befüllte T75cm² Gewebekulturflasche überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.3.2 Subkultivierung von Zellen

Für die Subkultivierung adhärenter Zellen, die eine Konfluenz von 90 % erreicht haben, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen durch die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung, sodass alle Zellen kurzzeitig bedeckt waren. Danach wurde die Trypsin/EDTA-Lösung abgenommen und die Zellen für 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um ein Ablösen der Zellen zu erleichtern. Folgend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Schließlich wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung in eine frische mit 10 ml Kulturmedium befüllte T75cm² Gewebekulturflasche überführt.

3.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte entweder mit dem automatischen Zellzähler Countess[®] oder manuell mit einer Neubauer-Zählkammer. Um eine Diskriminierung zwischen lebenden

und toten Zellen zu ermöglichen, wurden zunächst 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt. Anschließend wurden von diesem Gemisch 10 µl entnommen und zum automatischen Auszählen in eine Countess[®] Zählkammer überführt. Die Zellzahlbestimmung erfolgt hierbei in einem Volumen von 0,4 µl, was einem 1 mm x 1 mm Quadrat in einem herkömmlichen Hämocytometer entspricht. Die Zellzahl pro ml wird anhand der Trypanblaufärbung, welche tote Zellen färbt, aber auch anhand der Größe und Form der Zellen bestimmt. Für die Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde zunächst das Deckgläschen leicht befeuchtet und auf die Zählkammer geschoben, sodass die Bildung Newtonscher-Ringe deutlich sichtbar war. Danach wurden 20 µl der Zellsuspension in die Zählkammer gegeben und die lebenden Zellen unter dem Mikroskop manuell ausgezählt. Dabei wurden die Zellen in vier großen Quadraten bestehend aus 16 Quadraten, berücksichtigt. Hieraus wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor sowie 10^4 multipliziert, um so die Zellkonzentration pro ml zu erhalten.

3.3.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese zunächst in einer T75 cm² Gewebekulturflasche bis zu einer Konfluenz von 90 % angezogen. Danach wurden die Zellen wie in 3.3.2 beschrieben gewaschen und trypsinisiert. Nach Aufnehmen der Zellen in Medium und der Zellzahlbestimmung wurden diese für 5 min bei 200 rcf zentrifugiert. Das Zellsediment konnte danach im Medium mit 10 % (v/v) DMSO (Kryomedium) verdünnt werden. Die Verdünnung wurde so durchgeführt, dass 500 µl Zellsuspension eine Zellzahl von 10^6 aufwies, die schließlich in Kryoröhren überführt wurden. Die Kryoröhren wurden über Nacht bei -80 °C in einem Einfriercontainer gelagert und danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.3.5 Transiente Transfektion von Zellen

Für die transiente Transfektion von Zellen wurde das Lipofectamin[®] 2000-Reagenz verwendet. Hierfür wurden zunächst 5 µg DNA und 15 µl Lipofectamin 2000 in jeweils 250 µl Opti-MEM verdünnt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe der DNA-Lösung zu der Lipofectamin-Lösung und die Inkubation der DNA-Lipofectamin-Lösung für weitere 20 min bei Raumtemperatur. Parallel dazu wurden die zu transfizierenden Zellen wie in 3.3.2 mit PBS gewaschen, trypsinisiert und anschließend in 10 ml antibiotikafreiem Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe Abschnitt 3.3.3) wurden 3×10^6 Zellen (in 5 ml Medium) in eine T25 cm² Flasche überführt.

Danach wurde die DNA-Lipofectamin-Lösung zu den Zellen gegeben und diese für 8 h im Inkubator kultiviert und anschließend weiter verwendet.

3.3.6 Tetrazyklin-abhängige stabile TRPC4/5-Expression

Die Herstellung stabiler Zelllinien, die eine Tetrazyklin-abhängige Expression von Proteinen aufweisen, erfolgte mit Hilfe des T-REx™ Systems nach Herstellerangaben. Nach erfolgreicher Etablierung einer stabilen Zelllinie mit dem gewünschten Zielprotein wurde die Expression mittels Immunoblot überprüft. Die Kultivierung von HEK293-TRPC4/5-Zellen fand in DMEM/F-12 GlutaMAX™-Medium unter Selektionsdruck (5 µg/ml Blastocidin und 400 µg/ml Zeocin) statt. Die Expression der gewünschten Zielproteine wurde für 24 h durch die Zugabe von 1 µg/ml oder 10 µg/ml Tetrazyklin zu den Zellen induziert. Danach wurden die Zellen für verschiedene Versuchen verwendet.

3.3.7 Herstellung von Zelllysaten

3.3.7.1 Zelllysate für affinitätschromatographische Analysen und für den Nachweis von PKCθ

Für die Herstellung der Zelllysate wurden Zellen in T75 cm² Gewebekulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezogen und anschließend, wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, mit PBS gewaschen und trypsiniert. Die Zellen wurden schließlich in 10 ml eiskaltem PBS aufgenommen und insgesamt dreimal gewaschen, wobei die Zellen nach jedem Waschschritt für 5 min bei 1500 rcf zentrifugiert wurden. Danach wurden die Zellen in Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Um nicht lösliche Zellbestandteile von löslichen zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation des Lysates für 20 min bei 16.100 rcf und 4 °C. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (siehe Abschnitt 3.2.1) wurde die Proteinkonzentration der Lysate auf 2 mg/ml eingestellt. Diese wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Lysate bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80 °C.

3.3.7.2 Zelllysate für den Nachweis von TRPC-Proteinen

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden Zellen in eine 6-Lochplatte mit jeweils 2×10^5 - 6×10^5 Zellen pro Loch ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 2 ml eiskaltem PBS erfolgte die Zugabe von 200 µl TRPC-Lysispuffer und das Abschaben der Zellen. Die Zelllysate wurden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und

auf Eis sonifiziert (Stärke: 15 %, 3 Zyklen, für jeweils 15 s). Nach erfolgreicher Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (siehe Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben) wurden die Lysate mit 1 mM DTE und 300 μ M Bromphenolblau versetzt und bei 95 °C für 5 min gekocht. Die Lysate wurden bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.7.3 Zellysate für die Co-Immunopräzipitation von TRPC-Proteinen

Für die Herstellung der Zellysate wurden Zellen in 10 cm Gewebekulturschalen bis zu einer Konfluenz von 90 % angezogen und anschließend, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, das 0,9 mM CaCl_2 und 1 mM MgCl_2 enthielt. Nach Zugabe von 300 μ l m-RIPA-Puffer zu den Zellen, wurden diese abgeschabt und in frische 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Lyse der Zellen erfolgte für 30 min auf Eis unter leichtem Schütteln. Um einen effizienten Aufschluss der Zellen zu erzielen, wurden die Lysate zusätzlich zehnmal durch eine 20G-Kanüle und anschließend nochmals zehnmal durch eine 26G-Kanüle gepresst. Danach wurden die Lysate für 20 min bei 16.100 rcf und 4 °C zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde die Proteinkonzentration auf 2 mg/ml eingestellt und die Lysate schließlich in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Lysate bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -80 °C.

3.3.8 Echtzeit Lebendzell-Mikroskopie

Für die Echtzeitanalysen wurden Zellen in eine 24- oder 6-Lochplatte mit jeweils $2,5 \times 10^4$ (A498) oder $2,5 \times 10^5$ (HEK293T) Zellen pro Loch ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe der Testsubstanzen erfolgten die Echtzeitaufnahmen bei 37 °C und 5 % CO_2 für insgesamt 48 h. Die Bildaufnahmen erfolgten alle 10 min (A498) oder alle 2 min (HEK293T) mit Hilfe des Axiovert 200M Mikroskops unter Verwendung eines 20x Luftobjektives. Die Kombinierung der einzelnen Bilder zu einem Film gelang mit Hilfe der MetaMorph 7.7.8.0 Software.

3.3.9 Bestimmung der Zellviabilität

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe des WST-1-Reagenzes. Dabei wird das Tetrazoliumsalz WST-1 in Gegenwart von mitochondrialen Dehydrogenasen der Atmungskette zu löslichem Formazan reduziert, das direkt mit der Menge an metabolisch aktiven und somit lebenden Zellen korreliert. Die Menge an Formazan wird bei einer Absorption von 450 nm bestimmt. Des Weiteren wird die Absorption bei einer

Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt und diese Werte von den ermittelten Werten bei 450 nm subtrahiert.

Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden 4000 Zellen pro Loch in eine 96-Lochplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und 100 µl der Testsubstanz hinzugefügt, die bereits vorher in einer separaten 96-Lochplatte in Medium verdünnt wurde. Die Zellen wurden schließlich weitere 4 h oder 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl WST-1 Reagenz zu den Zellen und die Bestimmung der Absorption bei 450 und 620 nm bei 37 °C in einer kinetischen Messung mit einem Zeitintervall von 2 min. Die Messung wurde gestoppt als die Absorptionswerte für die Lösemittelkontrolle zwischen 0,8 und 1,2 lagen.

3.3.10 Lebendzellanalyse mittels Echtzeit-Zell-Analysator (RTCA)

Für die Beobachtung von A498-Zellen in Echtzeit mittels xCELLigence RTCA DP wurden zunächst 4000 Zellen in jeweils 180 µl Medium pro Loch in eine E-16-Platte ausgesät und deren Zellindex für 24 h mit einem Zeitintervall von 30 min aufgezeichnet. Nach erfolgter Substanzzugabe von 20 µl in gewünschter Konzentration wurde der Zellindex für einen Zeitraum von insgesamt 53 h aufgezeichnet. Dabei wurde für die erste Stunde nach Substanzzugabe ein Zeitintervall von 10 s und für die darauf folgenden 4 h ein Zeitintervall von 2 min gesetzt. Für die verbleibenden 48 h wurde ein Zeitintervall von 30 min gewählt.

3.3.11 Bestimmung der Zytotoxizität

Für die Bestimmung der Zytotoxizität wurde das CellTox™ Green Cytotoxicity Assay verwendet. Dabei werden Veränderungen in der Zellmembranintegrität gemessen. Der verwendete Cyaninfarbstoff wird von lebenden Zellen ausgeschlossen und färbt vorzugsweise die DNA toter Zellen an. Die Bindung des Farbstoffes an die DNA der Zellen resultiert in einem starken Fluoreszenzsignal, während dies bei lebenden Zellen nicht der Fall ist. Dabei ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Zytotoxizität.

Für den Versuch wurden 4000 Zellen pro Loch gemeinsam mit 2 µl/ml Green Dye in eine schwarze 96-Lochplatte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 3 h im Brutschrank inkubiert. Hiernach erfolgte die Zugabe von 50 µl pro Loch der Testsubstanzen zu den Zellen und die Messung der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm im Plattenleser.

3.3.12 Bestimmung von Nekrose und Apoptose mittels Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung apoptotischer und nekrotischer Zellen wurde das Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) verwendet. Die Färbung der Zellen beruht auf Veränderungen in der Zellmembranintegrität, die in der späten Phase des Zelltodes auftreten und durch apoptotische oder nekrotische Prozesse verursacht werden. Bei apoptotischen Zellen kommt es zu einer Translokation von Phosphatidylserin (PS) in der Phospholipidmembran von der Innenseite zur Außenseite der Plasmamembran. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, welches eine starke Affinität zu PS aufweist und somit an das PS apoptotischer Zellen bindet. Eine zusätzliche Konjugation an FITC (Fluorescein Isothiocyanat) ermöglicht eine akkurate Messung bzw. Visualisierung der Zellen. Zusätzlich wird Propidiumiodid (PI) verwendet, um auch früh apoptotische Zellen (PI negativ und FITC Annexin V positiv) zu identifizieren. Dabei schließen lebende Zellen mit einer intakten Membran den Farbstoff aus, während die Membranen toter und zerstörter Zellen für PI permeabel sind. Demnach weisen spät apoptotische oder bereits tote Zellen sowohl eine FITC-Annexin-V- als auch eine PI-Färbung auf. Das Testsystem kann nicht zwischen Zellen diskriminieren die aufgrund apoptotischer oder nekrotischer Prozesse tot sind. Dennoch kann eine FITC-Annexin-V-negative und eine PI-positive Färbung ein starker Hinweis auf Nekrose sein.

Für die Versuche wurden zunächst jeweils 2×10^5 A498-Zellen in eine 6-Lochplatte ausgesät und für 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Testsubstanzen für verschiedene Zeiten behandelt. Die Überstände wurden abgenommen und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und diese Waschfraktion mit den vorher abgenommenen Überständen vereint. Nach Trypsinierung der Zellen wurden diese in Medium aufgenommen und auch mit den vorherigen Überständen vereint. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 600 rcf zentrifugiert. Die Waschung der Zellsedimente erfolgte zweimal durch 5 ml eiskaltes PBS, wobei die Zellen nach jedem Waschriff erneut für 5 min bei 600 rcf zentrifugiert wurden. Nach Resuspendierung der Zellsedimente in 500 μl 1x Binding Buffer erfolgte die Zugabe von 5 μl Annexin V-FITC und 5 μl Propidiumiodid. Die Zellen wurden für 15 min im Dunkeln inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FlowJo 7.6.5 Software.

3.3.13 Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität

Die Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität erfolgte durch den Caspase-Glo[®] 3/7 Assay (Promega GmbH). Das Testsystem beinhaltet ein luminogenes Caspase-3/7-Substrat mit der Tetrapeptidsequenz DEVD, welches für die Caspase-Aktivität, die Luciferase-Aktivität und Zelllyse optimiert ist. In Gegenwart der Caspasen-3/7, die eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielen, werden durch die Zugabe des Reagenzes die Zellen zunächst lysiert und anschließend das Substrat durch die Caspasen gespalten. Diese Spaltung führt anschließend zur Freisetzung des Luciferase-Substrates Aminoluciferin. Aminoluciferin wird von der Luciferase oxidiert, wobei ein stabiles messbares Lumineszenzsignal entsteht. Dabei ist das gemessene Lumineszenzsignal proportional zur Caspase-3/7-Aktivität.

Für den Versuch wurden 4000 A498-Zellen pro Loch in eine weiße 384-Lochplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen für verschiedene Zeitpunkte und anschließend die Zugabe von 50 µl pro Loch des Caspase-Glo[®] 3/7-Reagenzes. Die Platte wurde anschließend für 30 s geschüttelt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich konnte die Lumineszenz mittels Plattenleser bestimmt werden.

3.3.14 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Präparation und Analyse der Proben für die Elektronenmikroskopie wurden von Dr. Markus Grabenbauer und Sabine Dongard durchgeführt. Dazu wurden zunächst jeweils $1,5 \times 10^5$ A498-Zellen in eine Gewebekulturschale mit Glasboden ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen für 3 h wurde das Medium verworfen und die Zellen für 30 min bei 37 °C in einer Fixier-Lösung bestehend aus 2 % Glutaraldehyd und 2 % Sucrose in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für jeweils 10 min mit Tris-HCl (pH 7,4) gewaschen. Die Osmierung der Zellen für 30 min erfolgte auf Eis durch die Zugabe der Osmierungslösung bestehend aus 1 % OsO₄ und 1,5 % K₄Fe(CN)₆. Danach wurden die Zellen dreimal für jeweils 10 min mit Wasser gewaschen. Für die Entwässerung der Zellen wurden stetig steigende Konzentrationen an Ethanol hinzugegeben. Dazu wurden die Zellen zunächst in 50 % Ethanol für 10 min inkubiert, dann zweimal für 15 min in 70 % Ethanol und anschließend für 10 min in 80 % Ethanol. Nachdem die Zellen zweimal für 10 min mit 90 % Ethanol und zweimal für 10 min in 95 % Ethanol inkubiert wurden, erfolgte dreimal eine jeweils 15-minütige Inkubation in absolutem Ethanol. Die Zellen wurden danach in Epon 812 eingebettet und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Polymerisierung der Proben erfolgte für 24-48 h bei 60 °C. Die Analyse der Proben wurde mit dem Elektronenmikroskop JEM 1200 durchgeführt.

3.3.15 Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

3.3.15.1 Analyse der Ca^{2+} -Konzentration durch die Firma Axxam

Bei dem verwendeten Testsystem handelt es sich um ein Testsystem, welches in der Lage ist intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen zu messen. Die hierzu verwendeten CHO-Zellen besitzen eine stabile Aequorin-Expression. Dabei wird als Kalzium-Sensor Coelenterazin verwendet, das ein Substrat verschiedener Luciferasen darstellt. Die Bindung von Kalzium-Ionen an Coelenterazin führt zu einer Konformationsänderung und resultiert in einem messbaren Lumineszenzsignal.

Für die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden zunächst jeweils 1×10^4 Zellen in einem Volumen von je 25 μl pro Loch in eine 384-Lochplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung des Mediums erfolgte die Beladung der Zellen mit 30 μl Coelenterazin (10 μM) als Kalzium-Sensor in Tyrode-Puffer. Danach wurde die Platte für 4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Volumen in jedem Loch auf 20 μl reduziert und 10 μl der Testsubstanzen hinzugefügt. Das Lumineszenzsignal wurde schließlich in einem FLIPR^{TETRA} Plattenleser für 3 min detektiert. In einem zweiten Schritt erfolgte die Zugabe von 15 μl Ca^{2+} (3,3 mM) und Detektion des Lumineszenzsignals für weitere 3 min.

3.3.15.2 Analyse der Ca^{2+} -Konzentration durch ein etabliertes Ca^{2+} -Testsystem

In Anlehnung an das Ca^{2+} -Testsystem der Firma Axxam wurde ein Ca^{2+} -Testsystem, mit Hilfe des Screen QuestTM Fluo-8 Calcium Assays (Biomol), etabliert. Hierbei handelt es sich um ein fluoreszenzbasiertes Testsystem, das die Detektion der intrazellulären Ca^{2+} -Immobilisierung ermöglicht. Dabei werden die Zellen mit dem Kalzium-Sensor Fluo-8 beladen und die lipophilen Gruppen durch Esterasen, in der Zelle gespalten, sodass ein negativ geladener Farbstoff entsteht, der in der Zelle verbleibt. Die Bindung des Farbstoffes an intrazelluläre Kalziumionen resultiert dann in einem messbaren Fluoreszenzsignal. Das Prinzip gilt auch für das Kalzium-Testsystem, welches in Abschnitt 3.3.15.3 beschrieben wird, mit dem Unterschied, dass hier andere Kalzium-Sensoren verwendet wurden.

Für den Versuch wurde 4×10^4 Zellen/ml (CHO) oder 1×10^4 Zellen/ml (A498) in eine 96-Lochplatte ausgesät und anschließend für 24 h inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und mit 50 μl Tyrode-Puffer ersetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 3,5 h im Brutschrank. Anschließend wurde Fluo-8 in Tyrode-Puffer verdünnt und 50 μl zu den Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für weitere 30 min im Brutschrank. Danach wurde der Fluoreszenzhintergrund für 5 min detektiert, wobei die Anregungswellenlänge bei 490 nm

und die Emission bei 525 nm lag. Anschließend erfolgte in einem ersten Schritt die Zugabe von 50 µl der Testsubstanzen zu den Zellen, die zuvor in Tyrode-Puffer verdünnt wurden und die erneute Messung des Fluoreszenzsignals für einen Zeitraum von 5 min. In einem zweiten Schritt wurde 50 µl CaCl₂ (3.3 mM) hinzugefügt und die Fluoreszenzintensität erneut für 5 min gemessen.

3.3.15.3 Analyse der Ca²⁺-Konzentration an der Universität Leeds (UK)

Die Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurden von M.Sc. H. J. Gaunt durchgeführt. Dazu wurden Zellen in eine schwarze 96-Lochplatte, entweder mit Poly-D-Lysin-Beschichtung (HEK293) oder ohne (für alle anderen Zellen) ausgesät, sodass die Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h eine Konfluenz von 80-90 % aufwiesen. Danach wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C in SBS-Puffer mit 2 µM Fura-2-AM und 0,01 % (v/v) Pluronic[®] F-127 (HEK293) oder mit Fluo-4-AM mit 2,5 mM Probenecid (alle anderen Zellen) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit SBS wurden diese für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Fluoreszenzsignal für Fura-2-AM detektiert, wobei die Anregungswellenlänge bei 340 nm und 380 nm und die der Emission bei 510 nm lag. Fluo-4-AM dagegen wurde bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Emission bei 525 nm detektiert.

3.3.16 Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit von EGTA

Für die Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit von Calcium-Chelator EGTA wurden 4000 A498-Zellen pro Loch in eine 96-Lochplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe verschiedener Konzentrationen von EGTA und 100 nM der Testsubstanz. Darauf folgte die unmittelbare Zugabe des WST-1-Reagenzes und die Bestimmung der Zellviabilität wie in Abschnitt 3.3.9 beschrieben.

3.3.17 Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit verschiedener Ca²⁺-Konzentrationen

Für die Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit verschiedener extrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen wurden zunächst zwei verschiedene Zellsuspensionen mit einer Konzentration von 4x10⁴ Zellen/ml angesetzt. Für eine der beiden Zellsuspensionen wurde MEM-Medium verwendet, das eine CaCl₂-Konzentration von 1,8 mM aufwies, während die

andere Zellsuspension in S-MEM-Medium mit nur 180 μM CaCl_2 angesetzt wurde. Von diesen beiden Zellsuspensionen wurden 4000 A498-Zellen pro Loch in eine 96-Lochplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe verschiedener Konzentrationen der Testsubstanz. Hiernach wurde unmittelbar das WST-1-Reagenz zugegeben und die Zellviabilität, wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben, bestimmt.

3.3.18 Bestimmung der Glukoseaufnahme

Für die Bestimmung der Glukoseaufnahme wurden zunächst 2×10^5 Zellen pro Loch in Glukose- und Serum-freiem Medium in eine 6-Lochplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit den Testsubstanzen für 1 h behandelt und zweimal mit 2 ml vorgewärmten PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Tritium-markierter 2-Desoxy-D-Glukose (^3H -2DG, 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) in Anwesenheit der Testsubstanzen erfolgte eine Inkubation für 5 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und mit 100 μl Lysispuffer für 3 min unter Schütteln lysiert. Danach wurden die Zellen gesammelt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Das gesamte Lysat konnte schließlich in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier-SafeTM) gegeben werden und mittels Szintillationszähler (Wallac 1409) analysiert werden.

3.3.19 Bestimmung der Laktatkonzentration

Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte mit Hilfe des Lactate Colorimetric/Fluometric Assay Kits (BioVision). Dabei reagiert das Laktat spezifisch mit einem Enzym-Mix und generiert ein Produkt. Die Fluoreszenz an umgesetzter Menge an Produkt wird bei einer Anregungswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 578 nm bestimmt.

Hierzu wurden 4000 A498-Zellen pro Loch in eine schwarze 96-Lochplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit der Substanz behandelt. Danach wurden 25 μl pro Loch Zellüberstand in eine neue schwarze 96-Lochplatte pipettiert und mit Assay-Puffer auf 50 μl pro Loch aufgefüllt. Schließlich wurden 50 μl pro Loch Reaktionsmix, bestehend aus 46 μl Assay-Puffer, 2 μl Enzym-Mix und 2 μl Probe, hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität ermittelt.

3.3.20 Immunozytochemie

3.3.20.1 Immunozytochemischer Nachweis von Proteinen

Für die Immunozytochemie wurden zunächst $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Loch in eine 24-Lochplatte mit Deckgläsern (\varnothing 12 mm) ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 1 ml PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit 1 ml Fixierlösung für 15 min unter Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Permeabilisierungslösung für 15 min unter Schütteln bei Raumtemperatur permeabilisiert. Freie Bindestellen wurden mit Hilfe von 1 ml Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Danach wurden die Primärantikörper in gewünschter Konzentration in der Blocklösung verdünnt und mit den Zellen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS-T gewaschen und mit Sekundärantikörpern und Hoechst 33342, welche zuvor auch in der Blocklösung verdünnt wurden, für 1 h bei Raumtemperatur behandelt. Nach erneutem dreimaligen Waschen in 1 ml PBS-T wurden die Zellen in Aqua/Polymount eingedeckelt und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

3.3.20.2 Immunozytochemischer Nachweis von Mitochondrien

Die Färbung von Mitochondrien wurde mit lebenden Zellen unter Verwendung des Mitotracker[®] Deep Red 633 durchgeführt. Hierzu wurden 4000 A498-Zellen pro Loch in eine schwarze 96-Lochplatte mit Glasboden pipettiert und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 200 nM Mitotracker, der zuvor in Medium ohne FBS verdünnt wurde, zu den Zellen gegeben und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 100 μ l Medium gewaschen und anschließend mit den Testsubstanzen für verschiedene Zeitintervalle inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 100 μ l PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit 100 μ l Fixierlösung für 15 min unter Schütteln bei Raumtemperatur. Danach wurde Hoechst 33342 in PBS verdünnt und mit den Zellen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und bis zur Analyse im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

3.3.21 GPCR-Profilierung

Die Aktivierung oder Inhibierung von G-protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) durch die Testsubstanzen wurde mit Hilfe des GPCR Profilers[®] der Firma Millipore durchgeführt. Zur Untersuchung der Testsubstanzen wurden diese zunächst in einem speziellen Assaypuffer verdünnt. Für die Überprüfung von (-)-Englerin A als Agonist erfolgte die Behandlung der

Zellen, welche die entsprechenden Rezeptoren überexprimieren, mit 1,25 μM (-)-Englerin A und die Bestimmung der GPCR-Aktivität mit Hilfe eines FLIPR^{TETRA} Plattenlesers für 180 s. Danach wurde die Platte für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich für den Test von (-)-Englerin A als Antagonist verwendet. Hierbei wurde ein bekannter Agonist zu den Zellen gegeben und anschließend 1 μM (-)-Englerin A hinzugefügt, um die Wirkung der Testsubstanz als Aktivator oder Inhibitor auf die GPCRs erneut für 180 s zu messen.

3.4 Elektrophysiologische Methoden

3.4.1 Ionenkanal-Profilierung

Der Einfluss der Testsubstanz auf ausgewählte Ionenkanäle wurde mit Hilfe des IonChannelProfiler[™] von der Firma Millipore durchgeführt. Für die Analyse inhibitorischer Effekte wurde (-)-Englerin A in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt und elektrophysiologisch mittels IonWorks Quattro und Ion Works HT untersucht.

3.4.2 Patch-Clamp Versuche am MPI für experimentelle Medizin in Göttingen

Die Untersuchung des EAG1-Ionenkanals mittels Patch-Clamp erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. W. Stühmer am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen. Hierzu wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit dem EAG1-Kanal transfiziert waren. Für die Messungen befanden sich die Zellen auf Deckgläschen und wurden in eine Zellkammer mit externer Ringerlösung gesetzt. Die Glaspipette hingegen wurde mit interner Ringerlösung befüllt und besaß einen Widerstand von ca. 2,5 M Ω . Das Patchen der Zellen erfolgte als *whole cell* (dabei wird die gesamte Zelle gepatcht) visuell mit Hilfe eines Monitors. Hatte die Zelle schließlich einen Widerstand von 1000 M Ω erreicht, konnte die Spannung auf -80 mV eingestellt und der vorhandene Strom in der Zelle vor Substanzzugabe gemessen werden. War der Strom stabil, erfolgte die Substanzzugabe für ca. 1-2 min und der fließende Strom wurde über diesen Zeitraum aufgezeichnet.

3.4.3 Patch-Clamp Versuche an der Universität Leeds (UK)

Die Untersuchungen von Ionenkanälen mittels patch clamp erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. D. J. Beech (Universität Leeds, Großbritannien). Die elektrophysiologischen Versuche wurden von M.Sc. H. J. Gaunt, Prof. Dr. D. J. Beech und Prof. Dr. Katsuhiko Muraki durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst Glaspipetten mittels *Puller* (Narishige, Japan) aus Borosilikatglas (Havard Apparatus, USA) mit einem Außendurchmesser von 1 mm und einem Innendurchmesser von 0,58 mm angefertigt. Nach dem die Pipetten in Feuer poliert und mit der Standardpipettenlösung befüllt waren, lag der Pipettenwiderstand bei 2-4 M Ω . Die Pipetten wurden anschließend an einem CV-4 Gestell (Molecular Devices, USA) befestigt und an einen 3-Wege-Grobmanipulator und Mikromanipulator angeschlossen. Bei der verwendeten Elektrode handelt es sich um eine Silberelektrode. Die Amplifizierung und Aufnahme der elektrischen Signale erfolgte am Axopatch 200B-Amplifikator mit der pCLAMP 10 Software (Molecular Devices) gewährleistet. Die Daten wurden bei 1 kHz gefiltert und digital bei 3 kHz mittels eines Digidata 1440A analog-zu-digital Umwandlers (Molecular Devices) aufgezeichnet. Die Analyse der Daten erfolgte durch die Software Clampfit 10.2 (Molecular Devices) und Origin 8.6 (originLab, Northampton, MA). Die Aufnahmen wurden mit SBS-Puffer als extrazelluläre Lösung bei Raumtemperatur durchgeführt. Für *outside-out patches* (hierbei wird nur ein Teil der Membran gepatcht) wurde zu der Standardpipettenlösung entweder 1 mM GDP- β -S hinzugefügt oder ATP und GTP durch die Zugabe von 100 nM (-)-Englerin A oder DMSO mit Pluronic[®] F-127 ersetzt.

Kapitel 4

Ergebnisse

Als Ausgangspunkt für die Identifizierung der Zielproteine von (-)-Englerin A dienten zunächst die bereits publizierten Erkenntnisse zu der biologischen Aktivität des Naturstoffs von Ratnayake et al., 2009.^[78] Hierbei ergab die biologische Evaluierung von (-)-Englerin A im 60-Zelllinien Screen am National Cancer Institute (Maryland, USA), dass (-)-Englerin A im Vergleich zu anderen Krebszelllinien eine 1000-fache höhere selektive Wachstumsinhibierung gegenüber Nierenkrebszelllinien zeigt.

Ausgehend davon wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte des Naturstoffes zunächst auf ausgewählte Nierenkrebszelllinien untersucht. Diese zeigten eine signifikante Inhibierung der Zellviabilität, welche auch in morphologischen Analysen, wie der Lebendzell-Mikroskopie, nachgewiesen werden konnte. Basierend auf diesen Erkenntnissen konnten weitere Analysen zur Ursache des Zelltods durchgeführt werden. Um Hinweise auf die Zielproteine zu erhalten, wurden Untersuchungen sowohl zu Signaltransduktionswegen als auch zum Metabolismus durchgeführt. Es wurde hauptsächlich mit der Nierenzellkarzinomzelllinie A498 gearbeitet, da diese Zelllinie nach Literaturangaben gegenüber (-)-Englerin A am sensitivsten ist.^[78]

Basierend auf den experimentellen Erkenntnissen, die im Laufe dieser Arbeit gewonnen wurden, und weiterer Literaturrecherche konnten Hinweise bezüglich der Zielproteine erarbeitet und näher untersucht werden.

Dabei erfolgte die Identifizierung der Zielproteine durch die Anwendung eines umfassenden Methodenspektrums.

Die Identität der Zielproteine konnte sowohl mit Hilfe von zellulären und biochemischen Testsystemen als auch elektrophysiologischen Versuchen verifiziert werden.

4.1 Analysen zur biologischen Aktivität von (-)-Englerin A

4.1.1 Effekte von (-)-Englerin A auf Nierenkrebszellen und die Brustkrebszelllinie HS578-T

Da (-)-Englerin A eine starke Selektivität und Potenz gegenüber Nierenkrebszellen zeigt,^[78] wurden die folgenden Versuche zunächst, wie in der Literatur beschrieben, mit den vier gegenüber (-)-Englerin A empfindlichsten Nierenkrebszelllinien^[78] durchgeführt, um die zellulären Effekte näher zu untersuchen. Außerdem wurde auch die Brustkrebszelllinie

HS578-T getestet, welche auch gegenüber der Substanz sensitiv ist.^[78] Bei den verwendeten Nierenkrebszelllinien handelte es sich um A498-, 786-0-, ACHN und UO-31-Zellen, die für 48 h mit (-)-Englerin A (**Abbildung 4.1a**) inkubiert wurden, um anschließend die Zellviabilität mit Hilfe des WST-1-Reagenzes (*water soluble tetrazolium*) zu analysieren (**Abbildung 4.1b**). Dabei wird das Tetrazoliumsalz in Gegenwart von mitochondrialen Dehydrogenasen der Atmungskette in lösliches Formazan reduziert, das direkt mit der Menge an metabolisch aktiven und somit lebenden Zellen korreliert. Bei dem gewählten Verfahren handelt es sich um eine Endpunktmessung.

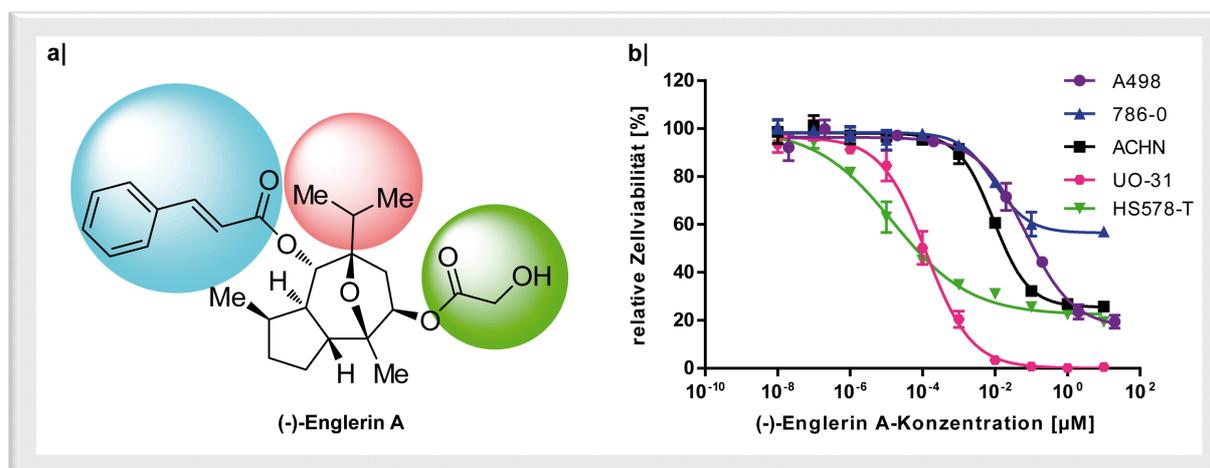


Abbildung 4.1: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität in Nierenkrebszellen und HS578-T-Zellen
a) Struktur von (-)-Englerin A. Blau dargestellt: Zimtsäurerest. Rot dargestellt: Isopropylgruppe. Grün dargestellt: Ester-Seitenkette. **b)** Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mittels des WST-1-Reagenzes. Hierzu wurden die verschiedenen Zelllinien zunächst für 48 h mit (-)-Englerin A behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des WST-1-Reagenzes zu den Zellen nach Herstellerangaben und die Bestimmung der Absorption bei 450 nm. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (100 %) dargestellt. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Die ermittelten Ergebnisse zeigten, dass mit steigender Substanzkonzentration die Viabilität aller getesteten Zelllinien abnimmt. Die zu Beginn vorhandene Zellviabilität von 100% (A498- und ACHN-Zellen) konnte konzentrationsabhängig auf bis zu 25 % reduziert werden. Des Weiteren konnte für alle Zelllinien ein IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich gemessen werden. Der IC_{50} -Wert gibt die Konzentration eines Inhibitors an, die nötig ist um 50 % der biologischen Aktivität zu inhibieren. Die IC_{50} -Werte für A498- und ACHN-Zellen lagen unter den gewählten Bedingungen bei unter 100 nM für A498-Zellen und unter 10 nM für ACHN-Zellen. Dies unterstreicht die hohe Potenz dieser Verbindung. Dass es sich bei der Substanz um eine hoch wirkungsvolle Verbindung handelt, wird insbesondere bei der Betrachtung der Dosis-Wirkungs-Kurve für behandelte UO-31-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von unter 5 nM deutlich. Hier wurde die anfängliche Zellviabilität von 100 % bis auf nahezu 0 % reduziert und dies bereits bei einer (-)-Englerin A Konzentration von nur ca. 50 nM. Lediglich die 786-0-Zellen waren gegenüber der Substanz nicht sehr sensitiv und wiesen einen IC_{50} -Wert von mehr als 10 μ M auf. Die Brustkrebszelllinie HS578-T ist gegenüber dem Naturstoff ebenfalls

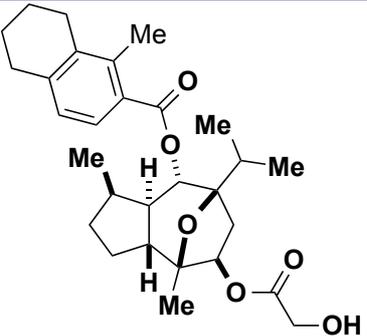
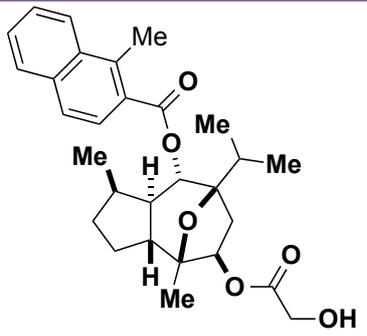
sensitiv^[78] und wurde auch auf die biologische Aktivität des Naturstoffes getestet. Hierbei zeigte sich, dass neben der UO-31-Zelllinie auch diese Brustkrebszelllinie gegenüber (-)-Englerin A sehr sensitiv ist und damit sensitiver als die anderen getesteten Nierenkrebszelllinien. Die ermittelten Ergebnisse decken sich zum größten Teil mit den bereits publizierten Daten von Ratnayake *et al.*^[78] Einzige Ausnahme stellen die 786-0-Zellen dar, die in der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit gegenüber (-)-Englerin A nicht sensitiv sind.

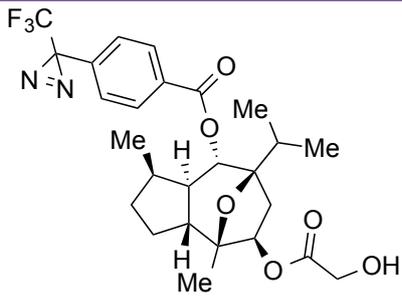
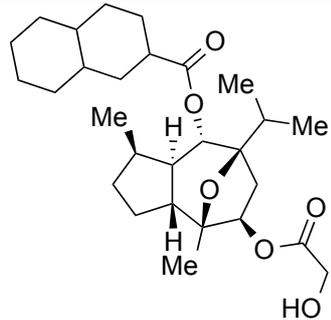
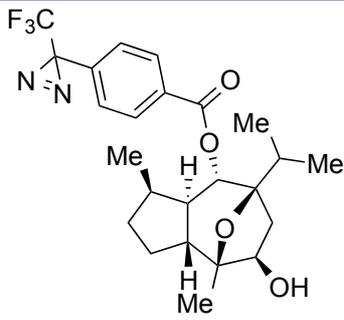
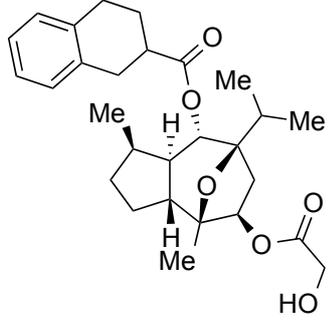
4.1.1.2 Charakterisierung von (-)-Englerin A-Derivaten in A498-Zellen

Die bereits publizierte Totalsynthese von (-)-Englerin A^[80] eröffnete die Möglichkeit zur Synthese von weiteren Derivaten mit dem Ziel potentere Verbindungen zu synthetisieren. Es wurden insgesamt sechs weitere Derivate zusätzlich zu den bereits veröffentlichten Derivaten von Dr. Lea Radtke und Dr. Matthieu Willot (TU Dortmund) hergestellt. Die Strukturen und die biologische Aktivität der Derivate sind in **Tabelle 4.1** dargestellt.

Tabelle 4.1: Einfluss der (-)-Englerin A-Derivate auf die Viabilität von A498-Zellen

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe des WST-1-Reagenz. Hierzu wurden A498-Zellen zunächst für 48 h mit den (-)-Englerin A-Derivaten behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des WST-1-Reagenzes zu den Zellen nach Herstellerangaben und die Bestimmung der Absorption bei 450 nm. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus drei biologischen Replikaten. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt.

Substanz	Struktur	IC ₅₀ \pm SD [nM]
1		8,9 \pm 6,8
2		14,8 \pm 6,5

Substanz	Struktur	IC ₅₀ ± SD [nM]
3		33,0 ± 6,6
4		52,3 ± 17,0
5		> 10000
6		> 10000

Hierzu wurden A498-Zellen für 48 h mit den verschiedenen Derivaten behandelt und schließlich die Zellviabilität mit Hilfe des WST-1-Reagenzes nach Herstellerangaben bestimmt. Im Vergleich zu allen anderen getesteten Derivaten wiesen die Verbindungen **1** und **2** eine besonders hohe Potenz mit IC₅₀-Werten von 8,9 und 14,8 nM auf und besitzen als einzige eine höhere Aktivität als der Naturstoff selbst. Diese hohe Aktivität wurde ausschließlich durch Modifikationen an dem Zimtsäurerest erreicht, wobei der Zimtsäurerest durch eine Methyltetrahydronaphthylgruppe (Substanz **1**) oder eine Methylnaphthylgruppe ersetzt wurde (Substanz **2**). Bis auf zwei der getesteten Derivate liegen alle IC₅₀-Werte unter 100 nM. Lediglich die Verbindungen **5** und **6** sind deutlich weniger aktiv (IC₅₀ > 10 µM) als

alle anderen getesteten Derivate. Bei Verbindung **5** wurde der Zimtsäurerest durch eine Diazirinegruppe und die Glykolsäure durch eine Hydroxylgruppe ersetzt, während Substanz **6** eine Tetrahydronaphtylgruppe aufweist. Aufgrund der niedrigen Aktivität für beide Substanzen war es nicht möglich einen IC_{50} -Wert zu ermitteln ($IC_{50} > 10 \mu M$). Dass die Ersetzung des Zimtsäurerestes ausschlaggebend für die Aktivität der Substanz ist, zeigte Derivat **4** im Vergleich zu **6**. Hier konnte festgestellt werden, dass die Decalgruppe in einer relativ aktiven Substanz (**4**) resultiert, während die Tetrahydronaphtylgruppe zu einer inaktiven Substanz führt (**6**). Der Austausch des Zimtsäurerestes durch eine Diazirine-Gruppe (**3**) dagegen demonstriert, dass die Substanz dadurch noch eine relativ starke Aktivität besitzt. Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich durch Veränderungen des Zimtsäurerestes aktivere Verbindungen synthetisiert werden konnten, während Modifikationen an der Glykolester-Seitenkette zu Substanzen mit deutlich niedrigerer Aktivität führen.

Die Modifikationen am Zimtsäurerest in der ersten Generation der Struktur-Aktivitäts-Analysen zeigten bereits eine gesteigerte Aktivität ($IC_{50} = ca. 25 nM$) im Vergleich zu (-)-Englerin A.^[80] In dem die Eigenschaften aller aktiven Derivate aus der ersten Generation kombiniert wurden konnte eine zweite Generation mit noch aktiveren Derivaten synthetisiert werden (vgl. hierzu Substanz **1** und **2**).

4.1.2 Zeit- und konzentrationsabhängiger Einfluss in A498-Zellen

Die Bestimmung der biologischen Aktivität von (-)-Englerin A und den Derivaten erfolgte als Endpunktmessung nach 48 h in Anlehnung an die Literatur^[78] in Abschnitt 4.1. Um den Einfluss verschiedener Konzentrationen des Naturstoffes in Echtzeit zu untersuchen, wurde in einem nächsten Schritt der Effekt von (-)-Englerin A auf A498-Zellen mit Hilfe eines Echtzeit-Zell-Analysators (*Real-Time Cell Analyzer* (RTCA)) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die kontinuierliche Beobachtung des Verhaltens adhärenter Zellen und wird mit Hilfe des Zellindex, basierend auf der gemessenen Impedanz, ausgedrückt. Hierfür werden Zellkulturplatten verwendet, die mit Gold-Mikroelektroden ausgestattet sind und die Veränderungen der Impedanz messen.^[136] Änderungen der Impedanz werden als Zellindex ausgedrückt und können durch verschiedene Parameter wie Zellzahl, Zellgröße, Zell-Zellkontakt, Zellwachstum und Zelltod^{[137],[138]} beeinflusst werden. Hierbei werden zelluläre Vorgänge während der gesamten Versuchsdauer abgebildet, sodass eine kinetische Messung ermöglicht wird. Nimmt die Zahl adhärenter Zellen zu, äußert sich dies in der Zunahme des Zellindex. Für die Analysen wurden A498-Zellen ausplattiert und der Zellindex für 24 h aufgezeichnet. Anschließend erfolgte die Substanzzugabe in Konzentrationen von 1 nM bis 10 μM .

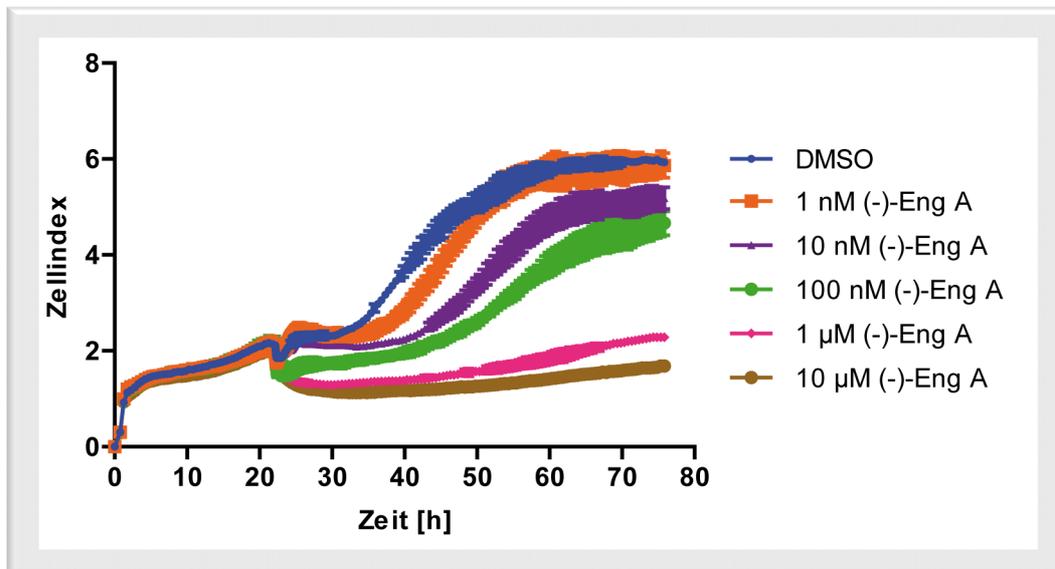


Abbildung 4.2: Echtzeitanalysen von (-)-Englerin A in A498-Zellen

Die Bestimmung des Zellindex erfolgte mittels eines Echtzeit-Zell-Analysators. Hierzu wurden A498-Zellen zunächst für 24 h vermessen. Danach erfolgte die (-)-Englerin A-Zugabe zu den Zellen in verschiedenen Konzentrationen. Der Zellindex der Zellen wurde für weitere 48 h aufgezeichnet. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen verwendet. Die Aufzeichnung des Zellindex fand nach Zugabe der Substanz für weitere 48 h statt (**Abbildung 4.2**).

Die dargestellten Ergebnisse der Echtzeitanalysen zeigten insgesamt sowohl eine konzentrationsabhängige- als auch zeitabhängige Wirkung der Testsubstanz. Bei der Verwendung von relativ hohen Konzentrationen (1 und 10 μ M) von (-)-Englerin A fiel der Zellindex innerhalb kürzester Zeit von 2 auf 1 und konnte im Laufe von weiteren 48 h den ursprüngliche Zellindex nicht wieder erreichen. Im Vergleich dazu wiesen die mit DMSO behandelten Zellen einen maximalen Zellindex von fast 6 auf. Auch niedrigere Konzentrationen der Verbindung zeigten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle noch starke Effekte auf den Zellindex. Bis zu 30 h nach Zugabe von 10 und 100 nM (-)-Englerin A wiesen die Zellen einen reduzierten Index von ca. 2 auf, während die Kontrollzellen einen wachsenden Anstieg im Zellindex zeigten. Anders als bei hohen Substanzkonzentrationen wird deutlich, dass sich die Zellen bei Behandlung mit niedrigen Substanzkonzentrationen nach einer gewissen Zeit von den Effekten erholen konnten und der Index wieder stieg wodurch er sich der Kontrolle annäherte. Auch die geringste Konzentration von noch 1 nM beeinflusste die Zellen und erreichte als einzige nach insgesamt 48 h denselben Zellindex wie die mit DMSO behandelten Zellen.

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus diesen Experimenten ist, dass (-)-Englerin A bereits nach kürzeren Behandlungszeiten als 48 h Effekte auslöst. Da nun aber mit Hilfe der Echtzeitanalysen keine genaue Aussage darüber getroffen werden konnte, um welche Effekte es sich genau handelte, wurden in einem nächsten Schritt sowohl die Zellviabilität

nach Zugabe der Substanz als auch die Zytotoxizität in A498-Zellen untersucht. Hierbei wurden die Inkubationszeiten mit dem Naturstoff reduziert, um den schnellen Einfluss von (-)-Englerin A aus den Echtzeitanalysen zu verifizieren. Für Untersuchungen zur Zellviabilität wurden die Zellen für 4 h mit (-)-Englerin A oder DMSO als Kontrolle behandelt. Zur Detektion wurde erneut das WST-1-Reagenz verwendet (**Abbildung 4.3a**).

Die zytotoxischen Effekte von (-)-Englerin A konnten unter Verwendung des CellTox Green Reagenzes in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden. Der Cyaninfarbstoff misst Veränderungen in der Zellmembran-Integrität, denn er wird von lebenden Zellen ausgeschlossen und färbt vorzugsweise die DNA toter Zellen. Die Bindung des Farbstoffes an die DNA der Zellen, resultiert in einem starken Fluoreszenzsignal, das gemessen werden kann und proportional zur Zytotoxizität ist.

Hierzu wurden A498-Zellen mit dem CellTox Green Reagenz versetzt und anschließend ausgesät. Nach drei Stunden erfolgte die Zugabe des Naturstoffes oder von DMSO als Kontrolle und die Detektion des Signals über einen Zeitraum von 5 min bis 4 h (**Abbildung 4.3b**).

Da es sich bei der Messung der Zellviabilität um eine Endpunktmessung handelte, wurden die Zellen für 4 h mit (-)-Englerin A inkubiert, wonach die Zellviabilität detektiert wurde. Die in **Abbildung 4.3a** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ein deutlicher Effekt auch schon bereits nach einer Behandlungszeit von 4 h erzielt werden konnte. Die zu anfangs vorhandene Zellviabilität von 100% wurde dabei konzentrationsabhängig auf bis zu 35 % reduziert. Dieser Wert konnte bereits bei einer Substanzkonzentration von 100 nM erreicht werden. Der IC_{50} -Wert lag unter diesen Bedingungen bei 17 nM und demonstriert nochmals die hohe Potenz der Verbindung. Um die Einflüsse über die Zeit zu beobachten, sollten die zytotoxischen Effekte der Substanz nach unterschiedlichen Zeiten detektiert werden. Bei dieser Messung handelte es sich, anders als bei der Messung der Zellviabilität, um eine kinetische Messung, welche eine kontinuierliche Beobachtung der Zytotoxizität der Substanz über die Zeit erlaubt.

Die ermittelte Zytotoxizität der Substanz zeigte, dass die Einflüsse bereits nach kurzen Behandlungszeiten von 15 und 30 min detektierbar waren. Bei einer Behandlungszeit von 30 min und einer Substanzkonzentration von 100 nM war eine Zytotoxizität zu verzeichnen, welche um mehr als das Doppelte im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen erhöht war. Längere Inkubationszeiten von 1 und 2 h führten zu einem 10-fach höheren Effekt. Hier lagen die ermittelten EC_{50} -Werte unterhalb von 10 nM. Bei einer Behandlungszeit von 4 h ließ sich ein linearer, konzentrationsabhängiger Anstieg des Effekts verzeichnen. Hierbei wurde jedoch die Sättigung der Kurve aufgrund der gewählten Substanzkonzentrationen nicht erreicht.

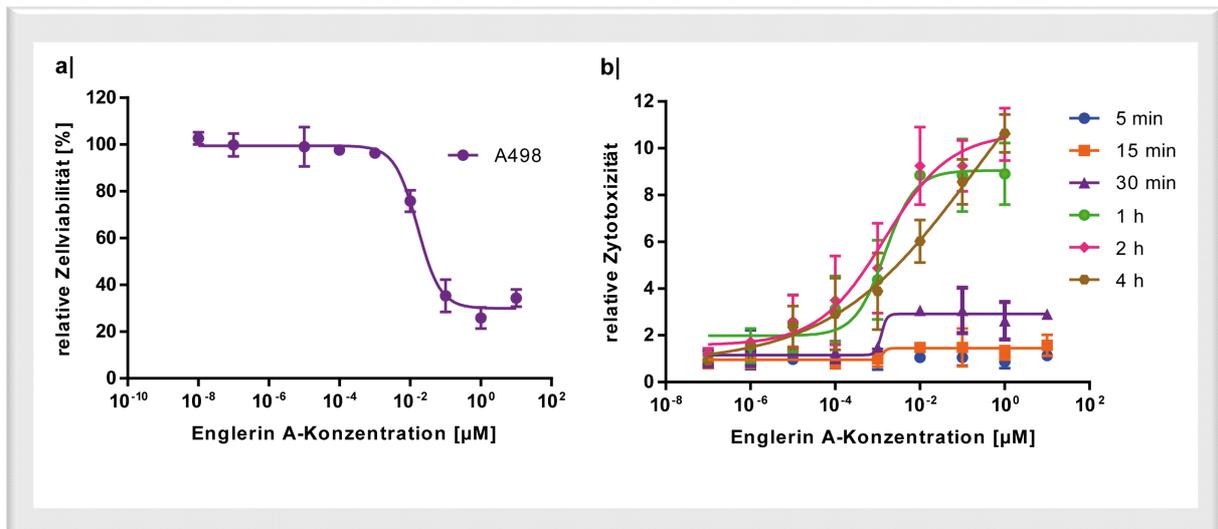


Abbildung 4.3: Einfluss von (-)-Englerin A in A498-Zellen nach kurzen Behandlungszeiten

a) Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte durch die Verwendung vom WST-1-Reagenz. Hierzu wurden A498-Zellen zunächst für 4 h mit (-)-Englerin A behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des WST-1 Reagenzes zu den Zellen nach Herstellerangaben und die Bestimmung der Absorption bei 450 nm. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (100 %) dargestellt. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

b) Zytotoxische Einflüsse von (-)-Englerin A. Die zytotoxischen Effekte von (-)-Englerin A wurden mit Hilfe des CellTox Green Reagenzes in einer kinetischen Messung detektiert. Hierzu wurden Zellen gemeinsam mit dem CellTox Green Reagenz ausgesät und für 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Substanzzugabe und die Behandlung der Zellen über einen Zeitraum von 4 h. Die Fluoreszenzmessung wurde bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm durchgeführt. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (1) dargestellt. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Dennoch konnte man daraus schlussfolgern, dass die Behandlung der Zellen für 4 h den stärksten zytotoxischen Einfluss auf die Zellen hatte. Dies stimmte mit dem ebenfalls starken Effekt, welchen (-)-Englerin A nach einer vierstündigen Inkubationszeit auf die Zellviabilität hatte, überein. Anhand dieser Versuche ließ sich festhalten, dass längere Behandlungszeiten, wie beispielweise 48 h, nicht nötig waren, da dieselben Effekte bereits nach 4 h zu beobachten waren. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit hauptsächlich kürzere Behandlungszeiten gewählt.

4.1.3 Morphologische Analysen in A498-Zellen

Im Weiteren wurde die Aktivität der Substanz auch auf morphologischer Ebene mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie und der Immunocytochemie analysiert bzw. bestätigt. Hierzu wurden A498-Zellen mit 100 nM (-)-Englerin A behandelt und die morphologischen Effekte mittels Lebendzell-Mikroskopie kontinuierlich über einen Zeitraum von 0 min bis 4 h aufgezeichnet (**Abbildung 4.4a**). Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelten Zellen. Der Einfluss des Naturstoffes ließ sich bereits 5 min nach Substanzzugabe beobachten. Hier war klar zu erkennen, dass sich die Zellen relativ schnell abrunden und in diesem Zustand über die gemessene Zeit verweilen bevor sie dem Zelltod erliegen. Des Weiteren konnte auch festgestellt werden, dass diese Zellen stark in ihrer Motilität eingeschränkt waren und sich in dem untersuchten Zeitraum nicht mehr teilten. Im Vergleich hierzu zeigten Zellen, die DMSO behandelten wurden keine Einschränkungen in Motilität und Zellteilung.

Diese Effekte der Substanz konnten auch mit Hilfe einer Immunfärbung festgestellt werden (**Abbildung 4.4b**). Dafür wurden A498-Zellen für 4 h mit 100 nM (-)-Englerin A behandelt und anschließend gefärbt.

Neben der Färbung der Zellkerne wurde auch ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet, um die Zellstruktur bzw. Zellform zu verdeutlichen. Während die mit DMSO behandelten Zellen eine relativ gestreckte Zellform und einen kleinen Nukleus aufwiesen, konnte in den mit (-)-Englerin A behandelten Zellen neben einer Abrundung der Zellen auch ein vergrößerter Nukleus, eine Veränderung der Tubulinstruktur und vakuolenförmige Strukturen beobachtet werden.

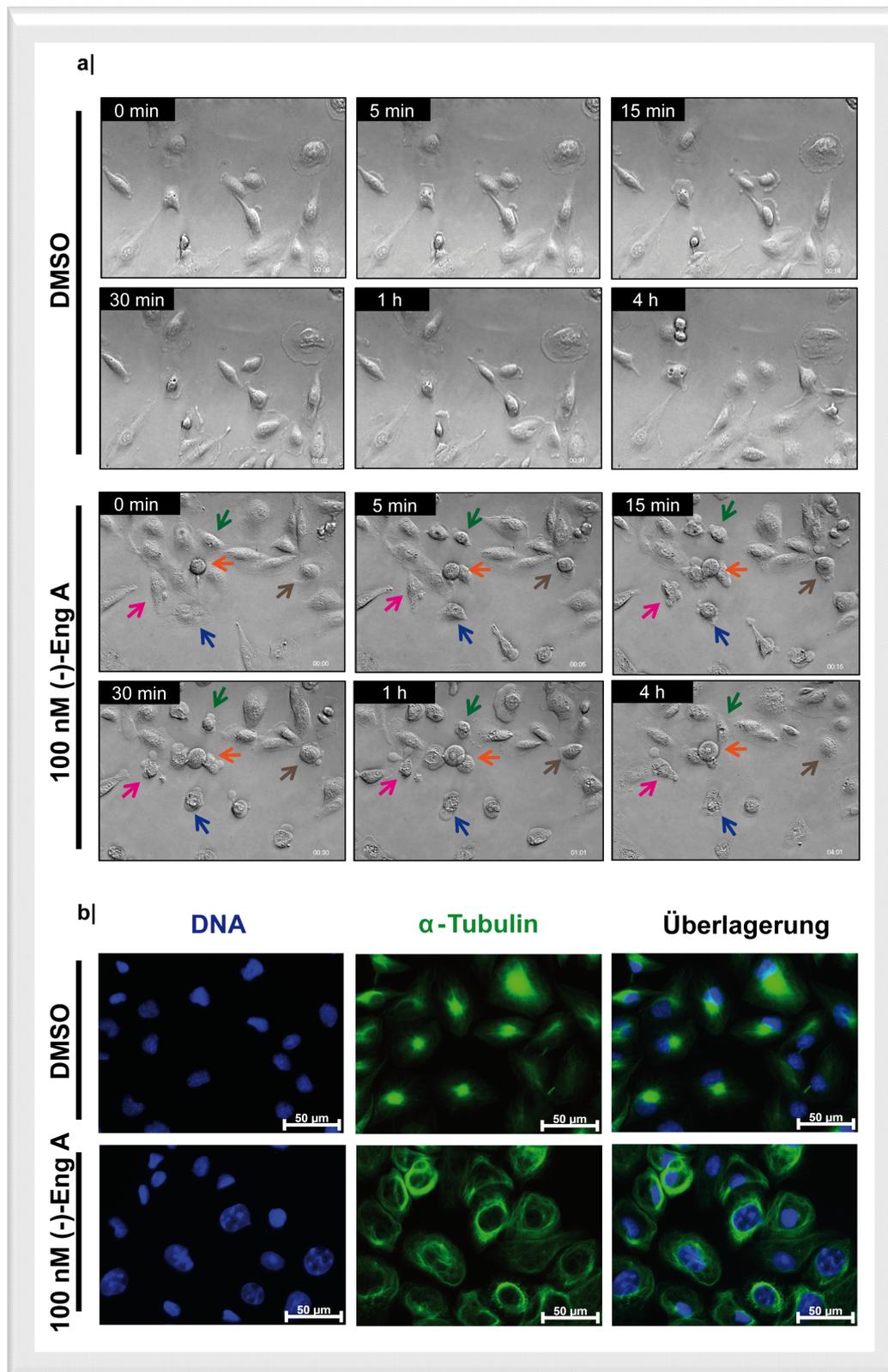


Abbildung 4.4: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Morphologie von A498-Zellen

a) Ausgewählte Sequenzen aus der Lebendzell-Mikroskopie. A498-Zellen wurden mit 100 nM (-)-Englerin A oder DMSO als Kontrolle behandelt und die morphologischen Veränderungen über einen Zeitraum von 4 h aufgezeichnet. Die farbigen Pfeile kennzeichnen die Veränderung der Zellmorphologie in (-)-Englerin A-behandelten Zellen. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Luft-Objektiv gemacht und sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

b) Immunfluoreszenz-Aufnahmen von A498-Zellen. A498-Zellen wurden für 4 h mit 100 nM (-)-Englerin A oder DMSO als Kontrolle behandelt. Nach erfolgter Fixierung und Permeabilisierung wurde die Zellkerne mit Hoechst 33342 und α -Tubulin mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem 40x Luft-Objektiv gemacht und sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

4.1.4 Untersuchungen zum Zelltod

A498-Zellen werden bei Behandlung mit (-)-Englerin A in kürzester Zeit abgetötet. Mehrere Aspekte ermöglichen Rückschlüsse auf die Form des Zelltodes. Neben der Zellmorphologie als Kriterium (z.B. in der Apoptose), spielen auch andere Aspekte, wie beispielsweise die Aktivität bestimmter Enzyme (z.B. Proteasen und Caspasen), aber auch funktionale Aspekte (z.B. programmierter Zelltod) eine wichtige Rolle.^[139] Aufgrund der durch (-)-Englerin A hervorgerufenen veränderten Zellmorphologie sollten nun verschiedene Formen des Zelltodes untersucht werden. Da sich bei der Behandlung ein relativ schnelles Abrunden der Zellen beobachten ließ, wurden die Zellen zunächst auf Apoptose untersucht. Charakteristisch für den Verlauf der Apoptose ist neben der Abrundung und des Schrumpfens der Zellen auch der Abbau der DNA durch Endonukleasen. Die Zelle wird schließlich in Vesikeln abgeschnürt und durch Phagozyten abgebaut.^[140] Zur Untersuchung der Apoptose wurde ein Caspase-3/7 Testsystem verwendet. Die Caspasen 3- und -7 gehören zu den Effektorcaspasen und führen durch die Aktivierung von zellulären Enzymen zum programmierten Zelltod, der Apoptose.^[141] So aktivieren sie durch Proteolyse unter anderem sekundäre Zielproteine wie beispielsweise DNasen. Durch die Aktivierung von DNasen wird die genomische DNA gespalten, sodass DNA-Fragmente entstehen, welche ein typisches Kennzeichen für Apoptose sind.^[142] Für die Analysen wurden A498-Zellen unter verschiedenen Bedingungen mit (-)-Englerin A behandelt. Anschließend wurde die Aktivität der Caspasen 3- und -7 gemessen (**Abbildung 4.5**).

Die in **Abbildung 4.5a** dargestellte Caspase-3/7-Aktivität berücksichtigt kurze Behandlungszeiten mit (-)-Englerin A von 15 min bis 2 h. Hier konnte bei keiner der getesteten Substanzkonzentrationen eine deutlich erhöhte Caspase-3/7-Aktivität im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen festgestellt werden. Auch Inkubationszeiten bis zu 48 h (**Abbildung 4.5b**) zeigten keinen Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität. Die gemessenen Aktivitäten lagen ähnlich wie die mit DMSO-behandelten Zellen um den Wert 1, sodass die Apoptose als mögliche Form des Zelltodes ausgeschlossen werden konnte.

Des Weiteren sollte die Autophagie überprüft werden, welche unter bestimmten Umständen zum Zelltod führen kann. Sie stellt einen Prozess dar, bei dem die Zelle zelleigene Bestandteile abbaut, um so das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von Zellbestandteilen zu gewährleisten.^[143]

Bei dieser Form des Zelltodes können vakuolenförmige Strukturen beobachtet werden,^[144] die auch bei A498-Zellen nach Behandlung mit (-)-Englerin A mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen (**siehe Abbildung 4.4a**) zu sehen waren.

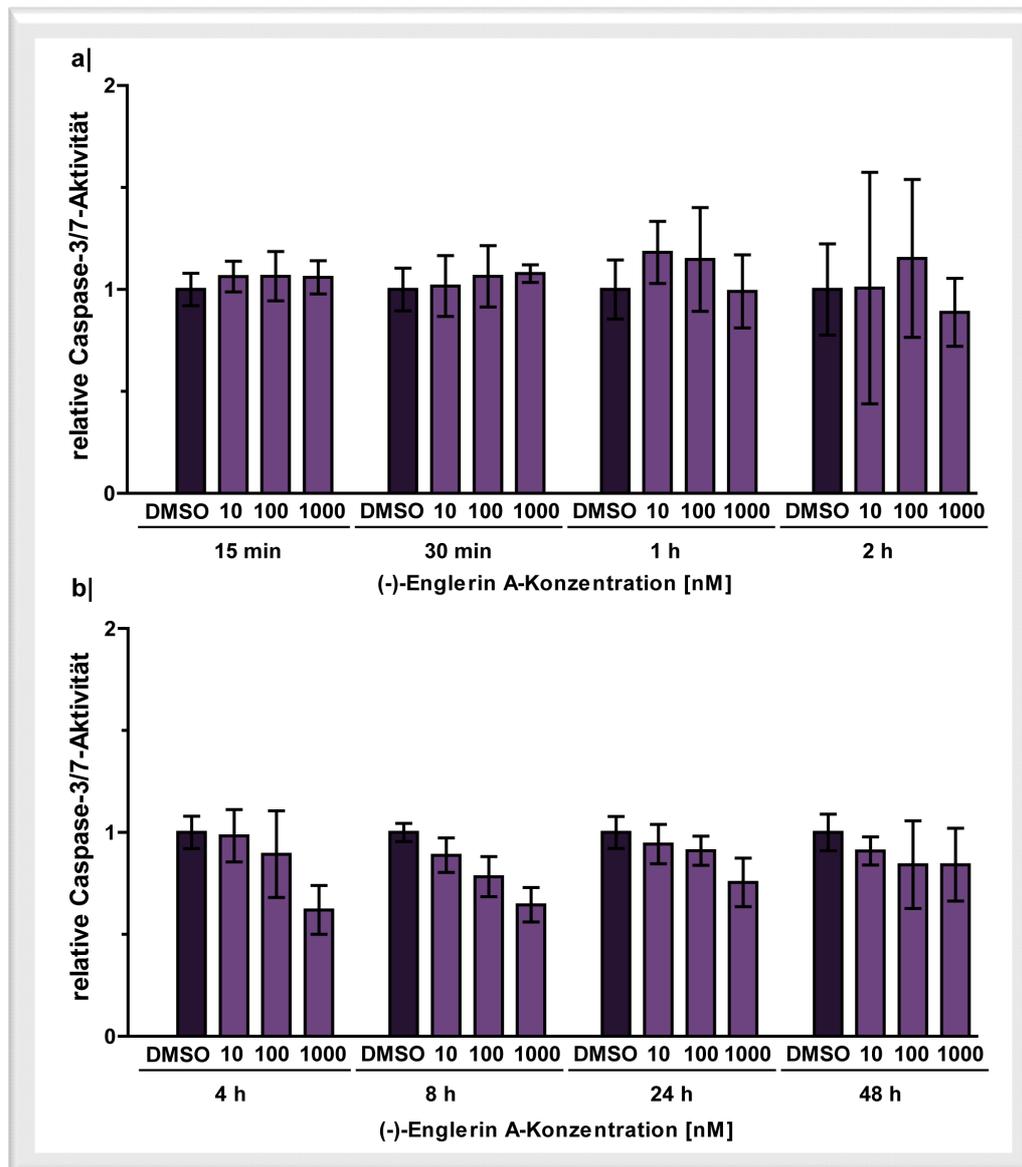


Abbildung 4.5: Untersuchungen zur Apoptose in A498-Zellen

Für die Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde der Caspase-Glo[®] 3/7-Assay verwendet. Hierzu wurden A498-Zellen mit verschiedenen (-)-Englerin A-Konzentrationen für kurze (a) und lange (b) Zeitintervalle behandelt und die Caspase-3/7-Aktivität nach Herstellerangaben detektiert. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (1) dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Autophagie kann als Antwort auf verschiedene Signale eingeleitet werden und führt zur Ausbildung von Doppelmembranen sogenannten Phagoophoren. Durch das Zusammenspiel verschiedener Proteine werden Autophagosomen gebildet, die in einem letzten Schritt mit Lysosomen fusionieren und zur Hydrolyse und zum Abbau des Inhalts führen.^[145] Um festzustellen, ob die Behandlung von Zellen mit (-)-Englerin A Autophagie induziert, wurden A498-Zellen mit der Substanz in einer Konzentration von 100 nM für 3 h behandelt und mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht. Als Positivkontrolle wurden 50 nM Rapamycin verwendet.

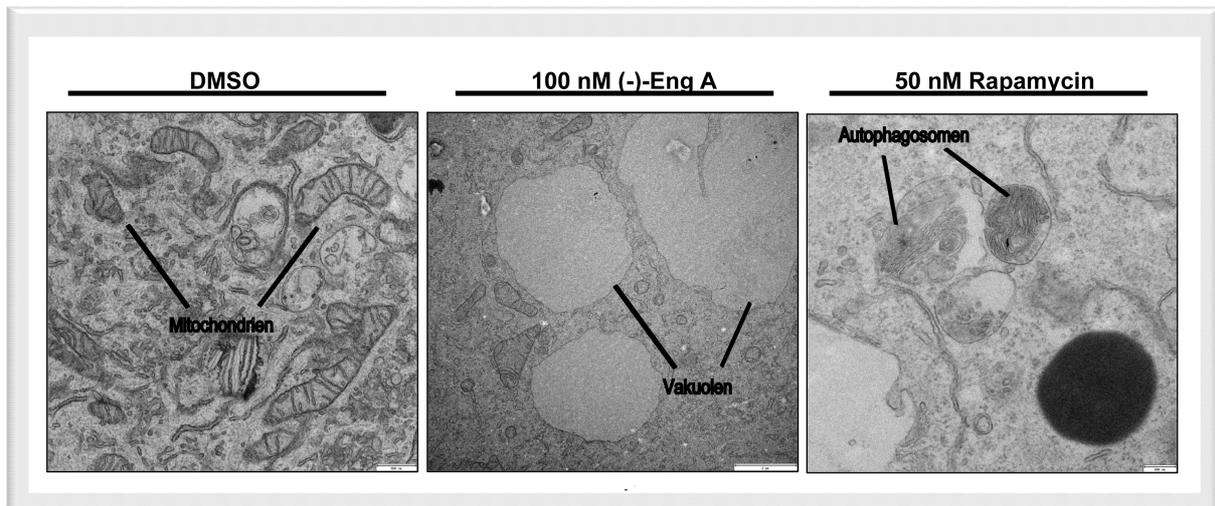


Abbildung 4.6: Untersuchungen zur Autophagie in A498-Zellen

Die Untersuchung von A498-Zellen auf Autophagie-assoziierte Strukturen erfolgte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie. Hierzu wurden A498-Zellen mit (-)-Englerin A oder Rapamycin für 3 h behandelt und anschließend mit Glutaraldehyd und Sucrose fixiert. Nach erfolgreicher Osmierung mit OsO_4 und $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ folgte die Entwässerung in Ethanol. Die Proben wurden schließlich in Epon 812 eingebettet und für 24-48 h bei 60°C polymerisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei technische Replikate.

Hierbei handelt es sich um eine Substanz, die nachweislich Autophagosomen induziert, welche ein typisches Merkmal der Autophagie sind und zelleigene Organellen beinhalten, die abgebaut werden. Die Anfertigung und Untersuchung der Präparate wurden von Dr. Markus Grabenbauer und Sabine Dongard (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Abteilung Systemische Zellbiologie) durchgeführt und sind in **Abbildung 4.6** dargestellt.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnten in den mit (-)-Englerin A-behandelten Zellen vakuolenförmige Strukturen identifiziert werden, die zuvor auch schon in der Lebendzell-Mikroskopie beobachtet wurden (**vgl. hierzu Abbildung 4.4a**). Während diese Vakuolen keine Strukturen beinhalteten, wiesen die mit Rapamycin behandelten Zellen typische Autophagosomen auf, deren Inhalt zelluläre Bestandteile wie z.B. Doppelmembranen waren. Da diese Strukturen in den mit (-)-Englerin A-behandelten Präparaten nicht nachweisbar waren, konnte die Autophagie als eine Form des Zelltodes ebenfalls ausgeschlossen werden. Die mit DMSO behandelten Zellen zeigten in den angefertigten Präparaten weder Autophagosomen noch Vakuolen auf. Hingegen konnten andere Strukturen wie die Mitochondrien identifiziert werden.

Die letzte Form des Zelltodes, die hinsichtlich des Einflusses von (-)-Englerin A auf die A498-Zellen analysiert wurde, ist die Nekrose. Diese wird im Allgemeinen durch chemische oder physikalische Beschädigungen der Zelle hervorgerufen.^[146] Im Gegenteil zur Apoptose schwillt die betroffene Zelle an und platzt schließlich, sodass die Plasmamembran zerstört wird und als Folge eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe ausgelöst wird. Dies hat zur Folge, dass auch andere Zellen Schaden nehmen.^{[147],[140],[148]}

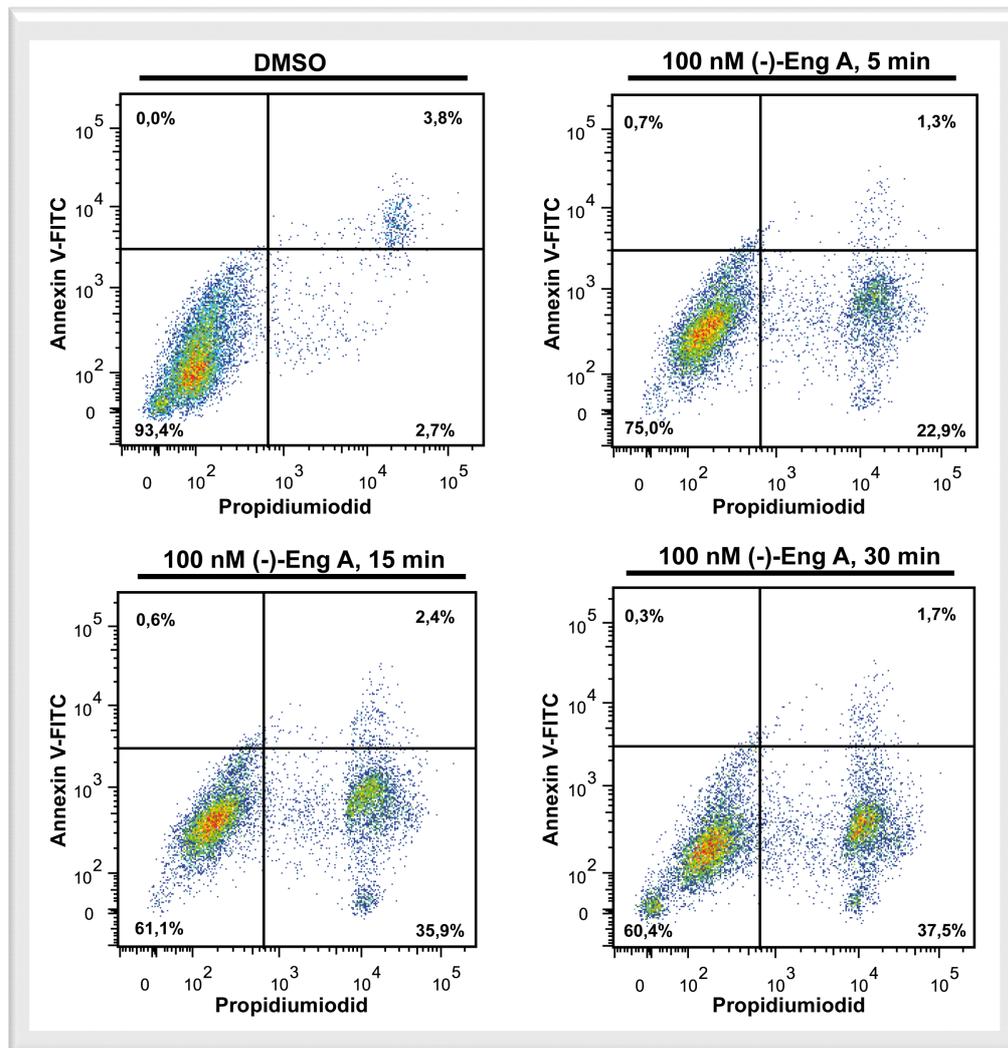


Abbildung 4.7: Untersuchungen zur Nekrose in A498-Zellen

Die Untersuchung von A498-Zellen auf Nekrose erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden Zellen mit 100 nM (-)-Englerin A für 5 bis 30 min oder mit DMSO als Kontrolle für 30 min behandelt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Annexin V-FITC für apoptotische Zellen und mit Propidiumiodid für spät apoptotische oder nekrotische Zellen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Für die Untersuchungen wurden A498-Zellen mit 100 nM (-)-Englerin A für 5 bis 30 min oder mit DMSO als Kontrolle für 30 min behandelt und anschließend mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid gefärbt wie in Abschnitt 3.3.12 beschrieben. Die Untersuchung der Proben erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie und ist in **Abbildung 4.7** dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass bis zu 22,9 % der Zellen bereits nach einer kurzen Behandlungszeit von 5 min bei einer Substanzkonzentration von 100 nM eine starke Propidiumiodid-Färbung und eine schwache Annexin V-FITC-Färbung aufwiesen, was dafür sprach, dass es sich dabei um nekrotische Zellen handelte. Nach 30 min Behandlungszeit lag der Anteil nekrotischer Zellen schon bei 37,5 %. Der Anteil nekrotischer Zellen in der DMSO-Kontrolle lag bei 2,7% und war somit, wie erwartet, gering. Sowohl der Anteil an früh-apoptotischen als auch spät-apoptotischen Zellen lag bei allen gemessenen Proben unter 4 %, sodass auch mit Hilfe dieses Versuches die Apoptose erneut ausgeschlossen werden konnte.

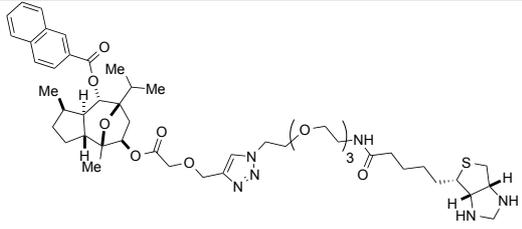
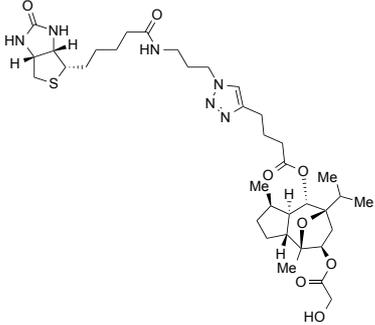
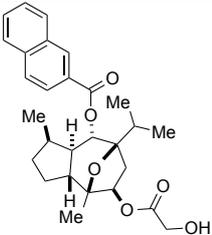
4.2 Identifizierung der Zielproteine von (-)-Englerin A

4.2.1 Biochemische Analysen zur Zielprotein-Identifizierung

Für die Identifizierung der Zielproteine sollten zunächst affinitätschromatographische Versuche mit Hilfe von Affinitätssonden durchgeführt werden. Die Auswahl der Substanzen hierfür basierte auf den Erkenntnissen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung des Naturstoffes und auf einem der aktiveren Derivate mit einer Naphtylgruppe (**9**).^[80] Die Synthese der Sonden **7** und **8** und die des aktiveren Derivates **9** erfolgte durch Dr. Lea Radtke (TU Dortmund). Die Strukturen und die zugehörigen Daten zur biologischen Aktivität sind in **Tabelle 4.2** dargestellt.

Tabelle 4.2: Affinitätssonden für affinitätschromatographische Versuche

Die IC_{50} -Werte wurden für die Beeinflussung der Zellviabilität ermittelt. Dies erfolgte mit Hilfe des WST-1-Reagenzes. Hierzu wurden A498-Zellen zunächst für 48 h mit den Affinitätssonden behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des WST-1 Reagenzes zu den Zellen nach Herstellerangaben und die Bestimmung der Absorption bei 450 nm. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt.

Substanz	Struktur	$IC_{50} \pm SD$ [nM]
7		$553,6 \pm 231,3$
8		$2759,3 \pm 1822,6$
9		$24,6 \pm 2,5$

Für die Affinitätschromatographie war es notwendig, die Sonden mit einem geeigneten Abstandshalter (Linker) auszustatten, um die Substanzen an einer stationären Phase zu immobilisieren. Hierzu wurden die Sonden mit einem Triethylenglykol-Biotin Linker ausgestattet, sodass als stationäre Phase magnetische Streptavidin-Kügelchen verwendet werden konnten. Die Streptavidin-Biotin Bindung stellt eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen in der Biologie dar und zeichnet sich u. a. neben einer starken Affinität im femtomolaren Bereich auch durch ihre hohe Spezifität aus.^{[149],[150],[151]} Häufig wird diese Bindung unter anderem für biochemische Verfahren eingesetzt.^[152] Hierbei war es wichtig, dass die Substanz **7** nach Anbringung des Linkers immer noch eine hohe Aktivität auf Nierenkrebszellen aufwies und der IC₅₀-Wert sich idealerweise nicht sehr von dem des ursprünglichen Derivates **9** unterschied. Die Substanz **8** sollte als Kontrolle dienen und daher möglichst inaktiv sein, d.h. im Idealfall einen IC₅₀-Wert von > 10 µM besitzen. Die Aktivität der Sonden wurde in einem Zellviabilitäts-Testsystem in A498-Zellen überprüft (**siehe Tabelle 4.2**). Hierbei stellte sich heraus, dass die aktive Sonde **7** einen IC₅₀-Wert von 0,55 µM aufwies und somit 12 mal weniger aktiv war als das ursprüngliche Derivat **9** und dennoch als aktiv eingeordnet werden musste. Bei der Substanz **8** zeigte sich, dass diese immer noch eine hohe Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von ca. 2,75 µM besaß und somit eine ähnlich hohe Potenz wie Substanz **7** hatte. Dennoch wurde mit beiden Substanzen eine vergleichende Affinitätschromatographie durchgeführt, da die Anbringung des Linkers an keiner anderen Position ohne starke Verluste in der Aktivität möglich war. Hierzu wurden 10 µM der aktiven Substanz **7** und 10 µM der weniger aktiven Substanz **8** verwendet. Die Durchführung der Affinitätschromatographie ist in Abschnitt 3.2.6 beschrieben. Die Analyse der Peptide wurde von Dr. Petra Janning und Dipl.-Ing. Andreas Brockmeyer (MPI für Molekulare Physiologie, Abteilung Chemische Biologie) unter Verwendung einer nano-HPLC/MS/MS, durchgeführt. Als Protein-Datenbank diente SwissProt. Die vergleichende Affinitätschromatographie wurde insgesamt dreimal wiederholt. Eine Übersicht der durchschnittlichen relativen Mengen identifizierter Proteine ist in **Abbildung 4.8a** dargestellt. Hierbei stellte sich heraus, dass die aktive Substanz **7** insgesamt 425 Proteine gebunden hatte und die weniger aktive Substanz **8** 241 Proteine. Um zwischen möglichen Zielproteinen und unspezifisch bindenden Proteinen zu unterscheiden, wurden solche Proteine selektiert, welche in allen drei Versuchen am häufigsten im Eluat mit der aktiven Substanz auftraten und seltener im Eluat der weniger aktiven Sonde. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt eine Quantifizierung nichtmarkierter Proteine nicht möglich war. Insgesamt konnten so 18 Proteine selektiert (**Abbildung 4.8b**). Da die Substanz **8** nicht inaktiv war, wurden auch Proteine berücksichtigt, die in ähnlicher oder gleicher Häufigkeit an diese Substanz gebunden hatten.

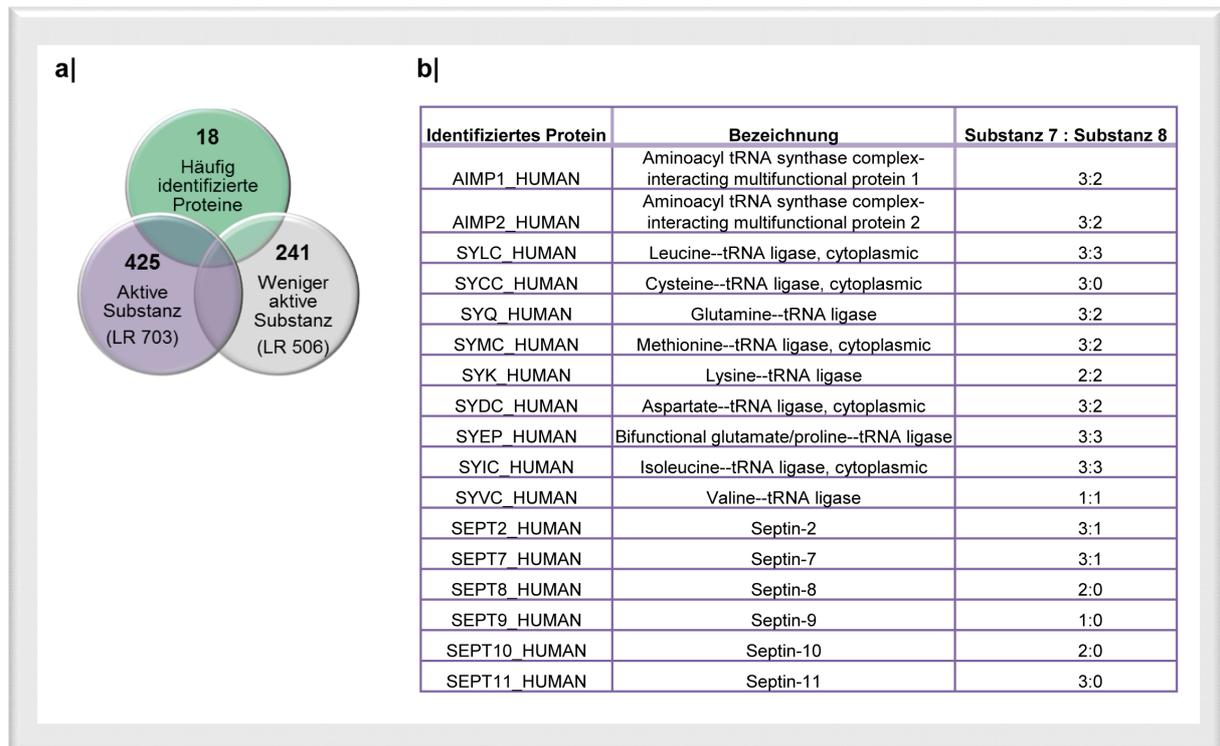


Abbildung 4.8: Identifizierte mögliche Zielproteine für die Substanzen 7 und 8

a) Übersicht der in der Affinitätschromatographie identifizierten Proteine für die Sonden **7** und **8**. Es wurden Daten aus drei Versuchen berücksichtigt.

b) Liste der häufig identifizierten Peptide nach tryptischem Verdau mittels nano-HPLC/MS/MS. Die dargestellten Werte sind Ergebnisse aus drei biologischen Replikaten. Die Häufigkeit der identifizierten Proteine aus drei Versuchen ist im Verhältnis von Substanz **7** zu Substanz **8** aufgelistet.

Hierbei war auffällig, dass es sich hauptsächlich um Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ARS) und Septine handelte. ARS gehören zu den Haushalts-Enzymen und sind hochkonserviert. Ihre Aufgabe besteht darin, sowohl eine effiziente als auch präzise Proteintranslation zu gewährleisten.^[153] Septine dagegen gehören zu der Familie der GTPasen und übernehmen verschiedene Aufgaben. Sie sind beispielsweise für die Organisation des Zytoskeletts verantwortlich und spielen eine Rolle in der Mitose.^[154]

4.2.2 Untersuchung der Zielprotein-Kandidaten

Einige der in der Affinitätschromatographie identifizierten Proteine (SYEP, SYIC, Septin 2, 7 und 9) sollten mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot nach der Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Als Beispiel werden hier die Ergebnisse für das Protein SYEP gezeigt. Für den spezifischen Nachweis wurde wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben eine Affinitätschromatographie mit den Substanzen **7** und **8** durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE-Verfahren wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem spezifischen Antikörper gegen SYEP markiert (**Abbildung 4.9a**).

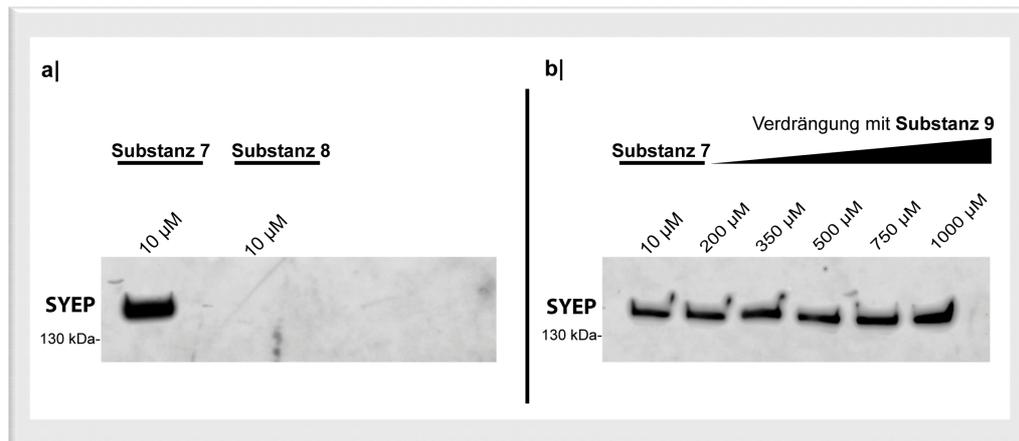


Abbildung 4.9: Validierung des Proteins SYEP als Zielprotein von Substanz 7 in A498-Zellen

a) Vergleichende Affinitätschromatographie mit den Substanzen **7** und **8**. Die Substanzen wurden auf Streptavidin-Kügelchen immobilisiert und für 1 h mit A498-Lysaten inkubiert. Nach Elution der Proteine durch Aufkochen der Streptavidin-Kügelchen in SDS-Probenpuffer erfolgte das Trennen der Proteine mittels SDS-PAGE. Für den Nachweis von SYEP mittels Immunoblot wurde ein spezifischer SYEP-Antikörper verwendet. Der sekundäre Antikörper war an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal® West Femto Reagenzes. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

b) Kompetitive Affinitätschromatographie mit den Substanzen **7** und **9**. A498-Lysate wurden zunächst mit steigenden Konzentrationen der Substanz **9** für 1 h vorinkubiert. Die Substanz **7** wurde auf Streptavidin-Kügelchen immobilisiert und für 1 h mit den bereits vorinkubierten A498-Lysaten behandelt. Die weitere Analyse der Proben und der Nachweis von SYEP erfolgte wie bereits für **a)** beschrieben. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Des Weiteren sollte das Protein mit einem Überschuss an unmodifizierter Substanz **9** konzentrationsabhängig von der aktiven Substanz **7** verdrängt werden, um so die spezifische Bindung zwischen der Affinitätssonde **7** und SYEP zu belegen (**Abbildung 4.9b**). Dies erfolgte ebenfalls mittels Affinitätschromatographie mit dem Unterschied, dass nun A498-Lysate bereits vor der Affinitätschromatographie für 1 h mit einem Überschuss an unterschiedlichen Konzentrationen von Substanz **9** inkubiert wurden. Somit sollte die Bindung der Affinitätssonde **7** an das mögliche Zielprotein SYEP unterbunden werden.

Als Kontrolle diente die Substanz **7**. Nach Aufkochen der Streptavidin-Kügelchen und Trennen der Proteine mittels SDS-PAGE wurde SYEP mit spezifischen Antikörpern gegen SYEP im Immunoblot-Verfahren untersucht.

Mit Hilfe der vergleichenden Affinitätschromatographie konnte gezeigt werden, dass das Protein SYEP erfolgreich an die aktive Sonde **7** gebunden hatte, wobei mit der weniger aktiven Substanz **8** kein Protein isoliert bzw. nachgewiesen werden konnte. Die Spezifität der Bindung zwischen Sonde und Protein sollte nun mit Hilfe einer kompetitiven Affinitätschromatographie bewiesen werden. Die hierzu verwendeten Konzentrationen von 200-1000 µM an unmodifizierter Substanz **9** konnten die in **Abbildung 4.9a** gezeigten Ergebnisse nicht bestätigen. Der Überschuss an **9** führte nicht zur Verdrängung des Proteins, sodass es nicht zu einer Abnahme der Intensität der SYEP-Proteinbande kam. Dies deutete darauf hin, dass die Sonde **7** nach wie vor in der Lage war SYEP zu binden und es sich damit um kein mögliches Zielprotein handelte. Insgesamt konnte mit diesem und anderen

ähnlichen Versuchen sowohl SYEP, als auch SYIC und die Septine 2, 7 und 9 als Zielproteine nicht bestätigt werden. Diese Zielprotein-Kandidaten wurden daher nicht weiter verfolgt.

4.2.3 Überprüfung von Kinasen als mögliche Zielproteine

Da die Ergebnisse der Affinitätschromatographie nicht aufschlussreich waren, sollten unabhängig von dieser Methode weitere Proteine untersucht werden, die eine wichtige Rolle bei Signaltransduktionswegen spielen. Hierzu zählen unter anderem Kinasen, welche bei vielen Krebsarten eine Schlüsselrolle spielen, und im Krebspatienten häufig mutiert sind.^[155] Kinasen sind Enzyme, die für die Phosphorylierung und somit Modulierung von Substraten verantwortlich sind.^[156]

Der Einfluss von (-)-Englerin A wurde auf die Aktivität verschiedener Proteinkinasen untersucht. Für die Kinase-Profilierung, durchgeführt von der Firma Life Technologies (siehe Abschnitt 3.2.9), wurde die Aktivität ausgewählter Kinasen in Anwesenheit von 5 μ M (-)-Englerin A untersucht (**Abbildung 4.10**). Die Auswahl der Kinasen basierte auf den vorangegangenen affinitätschromatographischen Versuchen, aber auch auf den Ergebnissen der Lebendzell-Mikroskopie, bei der Störungen der Zellmigration beobachtet werden konnten. Es wurden auch gleichzeitig Kinasen gewählt, die für den Metabolismus eine wichtige Rolle spielen, da in Krebszellen häufig ein veränderter Metabolismus vorzufinden ist.

Die Ergebnisse der Kinase-Profilierung zeigten, dass keine der getesteten 64 Kinasen durch 5 μ M (-)-Englerin A inhibiert werden. Für alle getesteten Kinasen lag die Inhibition durch die Testsubstanz bei unter 40 %, sodass nicht von einer deutlichen Inhibition gesprochen werden konnte und daher Kinasen als potentielle Zielproteine vorerst nicht weiter berücksichtigt wurden.

Kinase	% Inhibierung 5 µM (-)-Eng A	Technologie	Kinase	% Inhibierung 5 µM (-)-Eng A	Technologie
AKT1 (PKB alpha)	-9	Z'-Lyte®	CAMK1D (CaMKI delta)	-10	Z'-Lyte®
AKT2 (PKB beta)	8	Z'-Lyte®	CAMK2A (CaMKII alpha)	-8	Z'-Lyte®
AKT3 (PKB gamma)	2	Z'-Lyte®	CAMK2B (CaMKII beta)	-8	Z'-Lyte®
BMX	-14	Z'-Lyte®	CAMK2D (CaMKII delta)	-11	Z'-Lyte®
CDC42 BPA (MRCKA)	-16	Z'-Lyte®	CAMK4 (CaMKIV)	-15	Z'-Lyte®
CDC42 BPB (MRCKB)	-8	Z'-Lyte®	FLT1 (VEGFR1)	-6	Z'-Lyte®
CDK5/p25	-2	Z'-Lyte®	FLT4 (VEGFR3)	-10	Z'-Lyte®
CDK5/p35	0	Z'-Lyte®	FRAP1 (mTOR)	-7	Z'-Lyte®
CLK1	2	Z'-Lyte®	GSK3A (GSK3 alpha)	-6	Z'-Lyte®
CLK2	9	Z'-Lyte®	GSK3B (GSK3 beta)	3	Z'-Lyte®
CSNK2A1 (CK2 alpha 1)	9	Z'-Lyte®	KDR (VEGFR2)	0	Z'-Lyte®
CSNK2A2 (CK2 alpha 2)	8	Z'-Lyte®	PDK1	-10	Z'-Lyte®
DAPK3 (ZIPK)	-5	Z'-Lyte®	PDK1 Direct	-10	Z'-Lyte®
EPHA2	-5	Z'-Lyte®	RPS6KB1 (p70S6K)	-4	Z'-Lyte®
FER	-4	Z'-Lyte®	SGK (SGK1)	-7	Z'-Lyte®
FES (FPS)	-1	Z'-Lyte®	SGK2	12	Z'-Lyte®
MET (cMet)	11	Z'-Lyte®	SGKL (SGK3)	1	Z'-Lyte®
PAK1	8	Z'-Lyte®	CDK9/cyclin T1	5	Adapta®
PAK2 (PAK65)	3	Z'-Lyte®	PIK3C2A (PI3K-C2 alpha)	5	Adapta®
PAK3	-13	Z'-Lyte®	PIK3C3 (hVPS34)	-6	Adapta®
PAK4	-8	Z'-Lyte®	PIK3CA/PIK3R1 (p110 alp)	-5	Adapta®
PAK6	11	Z'-Lyte®	PIK3CD/PIK3R1 (p110 del)	9	Adapta®
PRKACA (PKA)	-5	Z'-Lyte®	PIK3CG (p110 gamma)	-5	Adapta®
PRKD1 (PKC mu)	-8	Z'-Lyte®	CAMK1 (CaMK1)	22	Adapta®
PTK2 (FAK)	2	Z'-Lyte®	CDK9/cyclin K	0	LanthaScreen®
PTK2B (FAK2)	-5	Z'-Lyte®	LIMK2	-6	LanthaScreen®
RET	5	Z'-Lyte®	MLCK (MLCK2)	11	LanthaScreen®
ROCK1	17	Z'-Lyte®	MYLK (MLCK)	-5	LanthaScreen®
ROCK2	-16	Z'-Lyte®	SLK	-2	LanthaScreen®
SRC	1	Z'-Lyte®	TNK2 (ACK)	-2	LanthaScreen®
AMPK A1/B1/G1	-13	Z'-Lyte®	CAMKK1 (CAMKKA)	-4	LanthaScreen®
AMPK A2/B1/G1	-14	Z'-Lyte®	CAMKK2 (CaMKK beta)	-3	LanthaScreen®

Abbildung 4.10: Kinase- Profilierung von (-)-Englerin A

Die Profilierung von (-)-Englerin A auf ausgewählte Kinasen erfolgte durch die Firma Life Technologies unter Verwendung verschiedener Technologien. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten.

4.2.4 Charakteristische Mutationen in Nierenkrebszelllinien

Um weitere Hinweise bezüglich der Zielproteine von (-)-Englerin A zu bekommen, war es wichtig, die charakteristischen Mutationen der sensitiven Nierenkrebszelllinien zu berücksichtigen. Eine vergleichende Sequenzanalyse verschiedener humaner Krebszelllinien ist bereits publiziert.^[157] Hierbei wurden insgesamt 24 bekannte Krebsgene in den 60 humanen Krebszelllinien des *NCI-60 panels* aus verschiedenen Geweben untersucht. Die Untersuchungen ergaben insgesamt 137 Mutationen, die in 14 der 24 untersuchten Gene identifiziert worden sind. Von diesen 14 mutierten Genen konnten für die

Nierenkrebszelllinien vier festgestellt werden, welche in **Tabelle 4.3** aufgeführt sind. Diese Ergebnisse stellen lediglich einen Bruchteil der Mutationen dar, da nur 24 Gene untersucht worden sind, die bereits als Krebsgene bekannt sind. Dennoch ließ sich für die Mutationen in Nierenkrebszelllinien sagen, dass die Gene für *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) und *TP53* (*Tumor protein p53*) am häufigsten mutiert sind.

Tabelle 4.3 Charakteristische Mutationen in verschiedenen Nierenkrebszelllinien^[157]

CDKN2A: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, **VHL**: Von Hippel-Lindau Tumor suppressor, **PTEN**: Phosphatase and tensin homologue, **TP53**: Tumor suppressor p53. x: mutiert, -: nicht mutiert.

Zelllinie	CDKN2A	VHL	PTEN	TP53
A498	x	x	-	-
786-0	x	x	x	x
ACHN	x	-	-	-
RXF-393	x	-	x	x
CAKI-1	x	-	-	-
SN12-C	-	-	-	x
UO-31	x	-	-	-
TK-10	-	-	-	x

Obwohl diese beiden Gene häufig mutiert sind, wurden die Mutationen für die A498- und 786-0-Zelllinie genauer untersucht, da diese beiden Zelllinien laut Literatur gegenüber (-)-Englerin A am sensitivsten sind.^[78] Eine Mutation im *VHL*-Gen konnte nur für diese beiden Zelllinien dokumentiert werden. Mutationen bzw. eine Fehlfunktionen von *VHL* in Zusammenhang mit Nierenkrebs zeigen, dass es auch unter aeroben Bedingungen zu einer Umprogrammierung des Glukose- und Energiehaushaltes führt. Dabei kommt es neben einer erhöhten Glukoseaufnahme auch zu einem starken Anstieg der Glykolyse und der Laktatproduktion auch unter aeroben Bedingungen durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (*hypoxia inducible factor*). Dieses Phänomen wird in der Literatur als Warburg-Effekt beschrieben.^[158] Diesem Hinweis folgend wurden im nächsten Abschnitt die Effekte von (-)-Englerin A auf den Glukosemetabolismus in Nierenkrebszellen untersucht.

4.2.5 Untersuchungen zum Metabolismus in A498-Zellen

Basierend auf den charakteristischen Mutationen von Nierenkrebszellen und weiterer Literaturrecherche konzentrierten sich die nächsten Untersuchungen auf die mit der *VHL*-Mutation in Zusammenhang stehenden metabolischen Signalwege. Eine Fehlfunktion oder Verlust des von Hippel-Lindau-Gens ist stark mit dem Nierenzellkarzinom assoziiert und tritt in 80 % der Fälle auf.^[14] Dabei werden beide *VHL*-Gene durch Mutationen oder

epigenetische Genstilllegung deaktiviert.^[158] Eine VHL-Fehlfunktion führt unter aeroben Bedingungen zu einer HIF-1-abhängigen Umprogrammierung des Glukose- und Energiemetabolismus, welches in einer erhöhten Glukoseaufnahme, Glykolyse und Laktatproduktion resultiert.^[158]

Das VHL-Protein funktioniert als Teil einer E3 Ubiquitin-Ligase, die eine Familie von Proteinen ubiquitinyliert, welche als *hypoxia inducible factors* (HIFs) bezeichnet werden und durch das Proteasom abgebaut werden.^[159] Funktionelle Beeinträchtigungen des VHL-Proteins führen zur Akkumulation und Translokation von HIF in den Nukleus, wo es als Transkriptionsfaktor fungiert. Hierbei werden Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF (*vascular endothelial growth factor*) transkribiert, welche die Angiogenese und damit das Tumorwachstum fördern.^[160] Durch weitere Literaturrecherche konnte ein eventuelle Hypothese zwischen (-)-Englerin A als niedermolekulare Substanz und der Inhibierung des Glukosemetabolismus festgestellt werden.^[14] Die Autoren konnten zeigen, das Nierenzellkarzinomzellen mit einer VHL-Fehlfunktion selektiv durch die Substanz STF-31 abgetötet werden. Das Zellwachstum konnte durch die direkte Bindung von STF-31 an GLUT1 (Glukosetransporter Typ 1) inhibiert werden und zeigt, das GLUT1 für die Glukoseaufnahme und das Überleben der Zellen essentiell ist. Eine Inhibierung der Glukoseaufnahme resultiert auch in einer Abnahme der Laktatkonzentration, da das Endprodukt der Glykolyse Pyruvat nicht mehr hergestellt werden kann und somit kein Laktat mehr gebildet wird.^[14]

Diesem Hinweis folgend wurde zunächst ein Testsystem zur Glukoseaufnahme in A498-Zellen etabliert und optimiert. Hierdurch sollte näher untersucht werden, ob der Naturstoff einen Einfluss auf die Glukoseaufnahme hat. Für diesen Versuch wurden Zellen zunächst für 1 h im Glukose- und Serum-freien Medium mit verschiedenen Konzentrationen an (-)-Englerin A versetzt und anschließend mit Tritium-markierter 2-Desoxy-D-Glukose (³H-2DG) inkubiert. ³H-2DG ist ein Glukose Analogon, welches von Glukosetransportern aufgenommen wird, jedoch nicht weiter metabolisiert werden kann. Die aufgenommene Menge ³H-2DG wurde mittels Szintillationszähler bestimmt (**Abbildung 4.11a**).

Die Messungen zeigten einen konzentrationsabhängigen Einfluss von (-)-Englerin A auf die ³H-2DG-Aufnahme. Steigende Konzentrationen an (-)-Englerin A führten zur Abnahme der ³H-2DG-Konzentration und somit sehr wahrscheinlich zu einer Inhibierung der ³H-2DG-Aufnahme. Die Verwendung von 500 nM (-)-Englerin A reduzierte die ³H-2DG-Aufnahme auf 50 %. Dadurch vermittelten die Daten in Abbildung 4.11a zunächst den Eindruck einer Inhibierung der Glukoseaufnahme. Bei genauerer Betrachtung der Zellen konnte jedoch

festgestellt werden, dass diese bereits nach kurzen Behandlungszeiten tot waren. Dass die Zellen bereits bei niedriger Substanzkonzentration der Nekrose erlagen ist in Abbildung 4.7 gezeigt. Die Nekrose, welche schnell bei Behandlung mit der Substanz auftritt, verfälschte die Messergebnisse und führte zu der Annahme, dass die Glukoseaufnahme inhibiert wird, was nicht der Fall war. Eine Inhibierung der Glukoseaufnahme würde eine messbare Abnahme der extrazellulären Laktatkonzentration zu Folge haben. Um dies zu überprüfen, wurden in einem weiteren Versuch A498-Zellen mit verschiedenen Substanzkonzentrationen für 1 h behandelt und anschließend die Laktatkonzentration mit Hilfe des Lactate Colorimetric/Fluometric Assay Kits (siehe Abschnitt 3.3.19), bestimmt (**Abbildung 4.11b**). Die Ergebnisse zeigten, dass die Laktatproduktion durch (-)-Englerin A, auch bei Verwendung höherer Konzentrationen von z.B. 1 μM , nicht beeinflusst wurde und bestätigen die Ergebnisse zur Glukoseaufnahme durch die Substanz. Durch diese Erkenntnisse und weitere biochemische Versuchen wurden Glukosetransporter als Zielproteine von (-)-Englerin A ausgeschlossen.

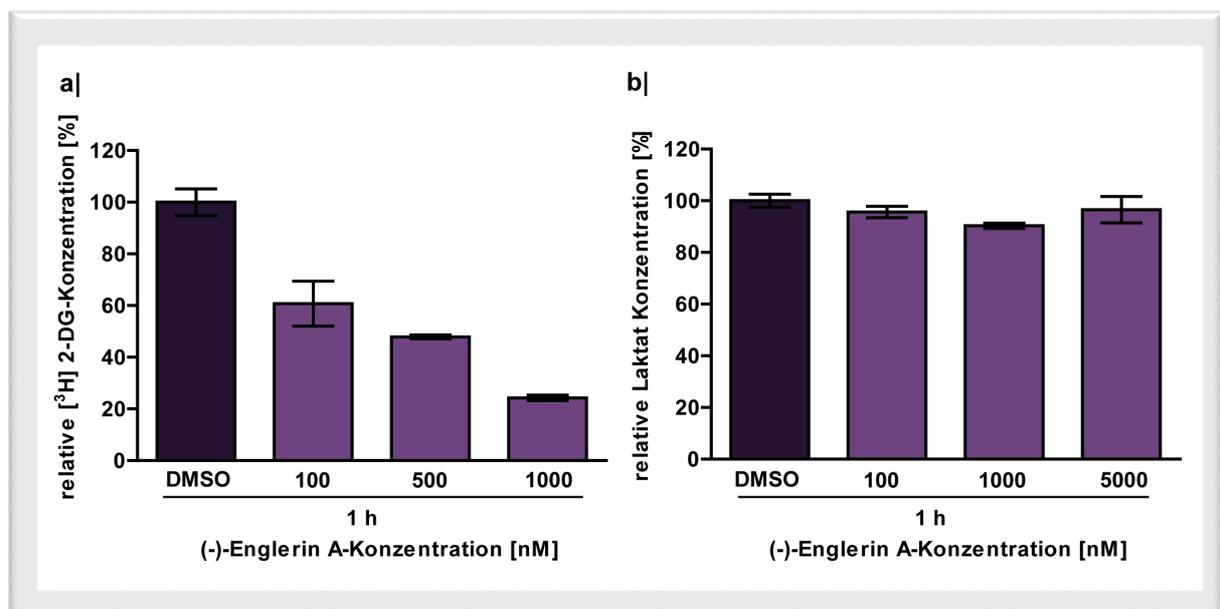


Abbildung 4.11: Einfluss von (-)-Englerin A auf den Glukosemetabolismus in A498-Zellen

a) Versuche zur Glukoseinhibierung. A498-Zellen wurden zunächst für 1 h mit (-)-Englerin A behandelt und anschließend für 5 min mit ^3H -2DG inkubiert. Der Anteil an aufgenommener ^3H -2DG wurde mittels Szintillationszähler bestimmt. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (100 %) dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

b) Bestimmung der Laktatkonzentration. Zur Bestimmung der Laktatkonzentration wurde das Lactate Colorimetric/Fluometric Assay Kit verwendet. Hierzu wurden Zellen für 1 h mit (-)-Englerin A behandelt und die Laktatkonzentration durch die Zugabe eines Laktat-Enzym-Mixes bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Anregungswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 587 nm bestimmt. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (100 %) dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

4.2.6 Wissenschaftliche Hypothesen zur Zielprotein-Identifizierung

Die vorstehend beschriebenen Untersuchungen führten zwar nicht zur Identifizierung eines Zielproteins von (-)-Englerin A, ließen aber dennoch einige wichtige Schlüsse bezüglich der Zielproteine zu. Die Affinitätschromatographie-Versuche ergaben keine signifikanten Zielproteine. Dies ließ zwei mögliche wissenschaftliche Hypothesen zu: Zum einen könnten die Zielproteine in sehr geringen Mengen exprimiert sein, sodass sie mittels Affinitätschromatographie nicht nachgewiesen werden können, da sie unter der Nachweisgrenze liegen oder zum anderen könnte es sich um Membranproteine wie beispielsweise Ionenkanäle oder GPCRs (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) handeln. Membranproteine sind fest in der Plasmamembran integriert und entfalten sich bei Solubilisierung unter experimentellen Bedingungen der Affinitätschromatographie. Bei der Literaturrecherche bezüglich Ionenkanälen in Zusammenhang mit Nierenkrebs fielen zwei Ionenkanäle auf. Hierbei handelte es sich zum einen um den Kaliumkanal Kv10.1 (EAG1; *Ether-a-go-go potassium channel 1*), welcher in Nierenkrebszellen überexprimiert wird und das Tumorstadium fördert^[161] und zum anderen um den TRPC4-Kanal (*Transient Receptor-Potential Cation Channel 4*), der im Nierenkrebs die Thrombospondin-1 (TSP1) Sekretion und die Angiogenese kontrolliert.^[162] Bei diesem Kanal handelt es sich um einen nicht-selektiven Kationenkanal, der unter anderem Kalzium-durchlässig ist. Die Effekte von (-)-Englerin A auf diese beiden Ionenkanäle sollten im Folgenden untersucht werden.

4.2.7 Überprüfung von Ionenkanälen als putative Zielproteine

Die Überprüfung des EAG1-Kanals als mögliches Zielprotein erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. W. Stühmer am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen. Für die Untersuchungen des Kanals waren elektrophysiologische Versuche notwendig, die mittels der patch clamp Methode durchgeführt wurden. Hierzu wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit dem humanen EAG1-Gen transfiziert waren. Für die Messungen befanden sich die Zellen auf Deckgläschen und wurden in eine Zellkammer mit externer Ringerlösung gesetzt. Die Glaspipette hingegen wurde mit interner Ringerlösung befüllt und besaß einen Widerstand von ca. 2,5 MΩ. Das Patchen der Zellen erfolgte als *Whole cell* visuell mit Hilfe eines Monitors. Hatte die Zelle schließlich einen Widerstand von 1000 MΩ erreicht, konnte die Spannung auf -80 mV eingestellt und der vorhandene Strom in der Zelle vor Substanzzugabe gemessen werden. War der Strom stabil erfolgte die Substanzzugabe für ca. 1-2 min. Neben der Ringerlösung und DMSO diente Astemizol als Positivkontrolle, da es ein bekannter EAG1-Inhibitor ist.^[163] Der fließende Strom wurde in Abhängigkeit von der Zeit gemessen (**Abbildung 4.12a**). Das Ergebnis zeigte deutlich, dass die Zugabe von 1 μM (-)-Englerin A keinen Effekt auf die EAG1-Kanäle zeigte und sich somit wie die Ringer- und

DMSO-Lösungen verhielt. Bei der Zugabe von 10 μM Astemizol hingegen, konnte eine sofortige Inhibierung der Kanäle festgestellt und dokumentiert werden. Auch bei Verwendung höherer Substanzkonzentrationen konnten keine Effekte beobachtet werden, sodass auch dieser Kanal als Zielprotein ausgeschlossen werden konnte. Um zu überprüfen, ob eventuell andere Ionenkanäle als mögliche Zielproteine in Frage kamen, wurde der Einfluss von (-)-Englerin A insbesondere auf Kanäle getestet, die im Herzen vertreten sind.

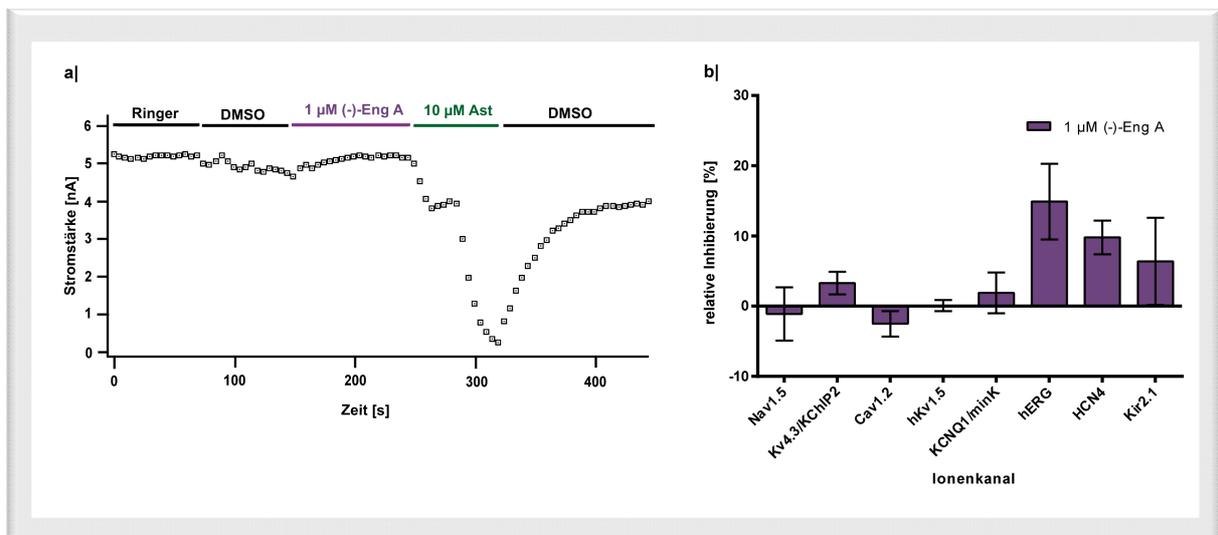


Abbildung 4.12: Untersuchungen von Ionenkanälen als mögliche Zielproteine von (-)-Englerin A

a) Effekte von (-)-Englerin A auf EAG1. Stabil mit EAG1 transfizierte HEK293-Zellen wurden als *whole cell* gepatcht und die Spannung auf -80 mV eingestellt. Anschließend erfolgte die Substanzzugabe und der Strom der EAG1-Kanäle wurde in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

b) Ionen-Kanal Profilierung am Beispiel des hERG-Kanals. Zellen wurden gepatcht und die Spannung von -80 mV auf +40 mV eingestellt. Hierdurch wurde das Schließen der Kanäle gewährleistet. Die Substanzzugabe erfolgte bei einer Spannung von -80 mV für 10 min. Die Werte wurden auf die jeweiligen Kontrollen normalisiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten.

Die Testung dieser Kanäle war sehr wichtig zumal (-)-Englerin A eventuell als Wirkstoffkandidat für die Behandlung von Nierenkrebspatienten in Frage kommen könnte. Daher sollte eine Inhibierung von Ionenkanälen im Herzen vermieden werden. Die elektrophysiologischen Versuche für die Analysen der Kanäle wurden von der Firma Millipore durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.1). Die Protokolle und Positivkontrollen für die einzelnen Kanäle waren unterschiedlich. Als Beispiel soll hier kurz die Vorgehensweise für den hERG-Kanal beschrieben werden. Nach dem Patchen der Zelle erfolgte die Substanzzugabe bei einer Spannung von -80 mV für 10 min. Als Positivkontrolle für die Inhibierung des hERG-Kanals wurde ein bekannter Inhibitor verwendet (**Abbildung 4.12b**). Keiner der getesteten Ionenkanäle zeigte eine nennenswerte Inhibierung bei Behandlung mit 1 μM (-)-Englerin A. Lediglich der hERG-Kanal wurde zu 15 % inhibiert. Da dieser Wert jedoch nicht hoch genug war und durch die Verwendung einer relativ hohen Substanzkonzentration zustande kam, wurde der Kanal als mögliches Zielprotein nicht weiter verfolgt.

4.2.8 Identifizierung von TRPC5 als Zielprotein in CHO-Zellen

Der zweite Ionenkanal der untersucht werden sollte, war der TRPC4-Kanal. Hier sollten die Modulationen des Naturstoffes mit Hilfe eines zellbasierten Testsystems untersucht werden, der in der Lage ist, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu detektieren. Dazu wurden die Effekte von (-)-Englerin A auf TRPC5 von der Firma Axxam untersucht. Da zum Zeitpunkt der Versuche keine Firma die Untersuchung des TRPC4-Kanals anbot, fiel die Auswahl auf TRPC5, da beide Ionenkanäle zu 65 % identisch sind^[164] und sowohl strukturell als auch funktionell sehr ähnlich sind.^[165] Für den Versuch wurden CHO-Zellen verwendet, die stabil mit dem TRPC5-Kanal und Aequorin, einem Photoprotein, transfiziert waren. Die Zellen wurden zunächst mit Coelenterazin als intramolekularer Kalziumsensor in Kalzium-freiem Tyrode-Puffer beladen und für 4 h inkubiert. Der Zeitraum von 4 h sollte dazu dienen, dass die internen Kalziumspeicher geleert werden, sodass nur Ca^{2+} extrazellulärer Herkunft gemessen wird. Anschließend erfolgte zuerst die Substanzzugabe zu den Zellen in Abwesenheit von Ca^{2+} und die Detektion des Lumineszenz-Signals in einer kinetischen Messung über 3 min (**Abbildung 4.13a**). Direkt danach wurde in einem zweiten Schritt 3,3 mM CaCl_2 zu den Zellen gegeben und das Signal nochmals für 3 min gemessen (**Abbildung 4.13b**). Bei Zugabe der Substanz in Abwesenheit von Ca^{2+} in verschiedenen Konzentrationen, kam es zu einem leichten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bis zu 20%. Allerdings erfolgte dies bei relativ hohen (-)-Englerin A-Konzentrationen von beispielsweise 1 und 10 μM . Konzentrationen unter 1 μM schienen keinen Effekt zu haben. Der leichte Anstieg in der Ca^{2+} -Konzentration ist damit zu begründen, dass das Ca^{2+} aus den internen Kalziumspeicher innerhalb der 4 h höchstwahrscheinlich nicht vollständig aufgebraucht bzw. umgesetzt wurde. Bei der Zugabe von CaCl_2 im zweiten Schritt konnte ein deutlicher Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen um das 5-fache gemessen werden. Bei einer Substanzkonzentration von 100 nM war die Kurve gesättigt und wies einen AC_{50} -Wert von 12 nM auf. Dies war ein Hinweis darauf, dass (-)-Englerin A TRPC5-Kanäle aktiviert und es zu einem starken Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle kommt.

Aufgrund dieser ersten positiven Ergebnisse wurde in Anlehnung an das Testsystem der Firma Axxam ein Testsystem zu Ca^{2+} -Detektion etabliert. Hierfür wurde der Screen Quest™ Fluo-8 Calcium Assay verwendet. Mit Hilfe dieses Testsystems konnte zunächst das entsprechende Kontrollexperiment zu dem oben genannten Versuch durchgeführt werden. Hierzu wurden nun CHO-Zellen verwendet, die den TRPC5-Kanal nicht überexprimierten. Die Zellen wurden zunächst mit dem Kalziumsensor Fluo-8® beladen und intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wie in Abschnitt 3.3.15.2 beschrieben, gemessen. Im ersten Schritt erfolgte die Zugabe der Substanz ohne Ca^{2+} (**Abbildung 4.13c**). Danach wurde wieder 3,3 mM CaCl_2 hinzugefügt und das Signal erneut gemessen (**Abbildung 4.13d**).

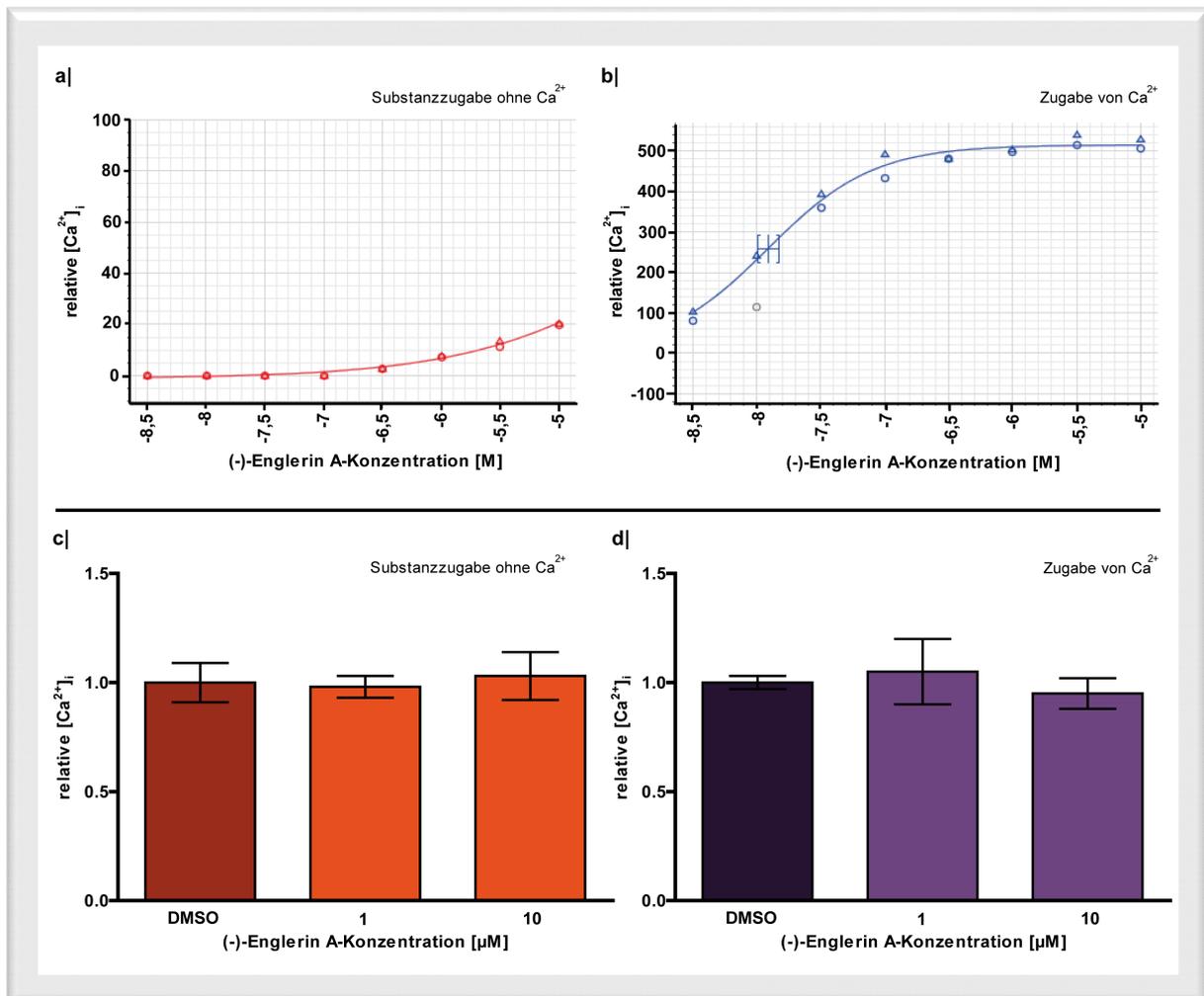


Abbildung 4.13: Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in CHO-Zellen

a) und b) (-)-Englerin A-Effekte auf CHO-TRPC5-Zellen. Stabil mit TRPC5 transfizierte Zellen wurden mit Coelenterazin in Kalzium-freiem Tyrode-Puffer beladen und für 4 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Kalzium-freie Substanzzugabe zu den Zellen und die Detektion des Lumineszenzsignals für 3 min (**a**). Direkt danach wurde 3,3 mM CaCl_2 zu den Zellen gegeben und das Lumineszenzsignal erneut für 3 min gemessen (**b**). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten.

c) und d) (-)-Englerin A-Effekte auf CHO-Zellen. Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mit Hilfe des Screen Quest™ Fluo-8 Calcium Assays. Zellen wurden zunächst in Kalzium-freiem Tyrode-Puffer für 4 h inkubiert und anschließend für weitere 30 min mit Fluo-8® ebenfalls in Kalzium-freiem Tyrode-Puffer beladen. Anschließend erfolgte die Kalzium-freie Substanzzugabe zu den Zellen und die Detektion der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm für 3 min (**c**). Direkt danach wurde 3,3 mM CaCl_2 zu den Zellen gegeben und die Fluoreszenzintensität erneut für 3 min gemessen (**d**). Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (1) dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Die Zugabe von 1 und 10 μM (-)-Englerin A ohne Ca^{2+} zeigte keinerlei Effekte auf die gemessene intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Hier entsprachen die Werte ungefähr 1 und der DMSO-Kontrolle.

Auch im zweiten Schritt bei der Zugabe von 3,3 mM CaCl_2 konnte kein signifikanter Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration festgestellt werden. Hier verhielten sich die Werte ähnlich zur Lösemittelkontrolle. Damit konnte gezeigt werden, dass die Effekte des Naturstoffes in CHO-TRPC5-Zellen auf die Überexpression des TRPC5-Kanals zurückzuführen waren.

4.2.8.1 Untersuchungen zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen

Da (-)-Englerin A im Vergleich zu anderen Krebszelllinien eine 1000-fach höhere selektive Wachstumsinhibierung von Nierenkrebszelllinien bewirkt^[78], wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach Behandlung mit dem Naturstoff auch in A498-Zellen ermittelt. Die Untersuchung erfolgte unter Verwendung des etablierten Kalzium-Testsystems (siehe Abschnitt 3.3.15.2) und ist in **Abbildung 4.14** dargestellt.

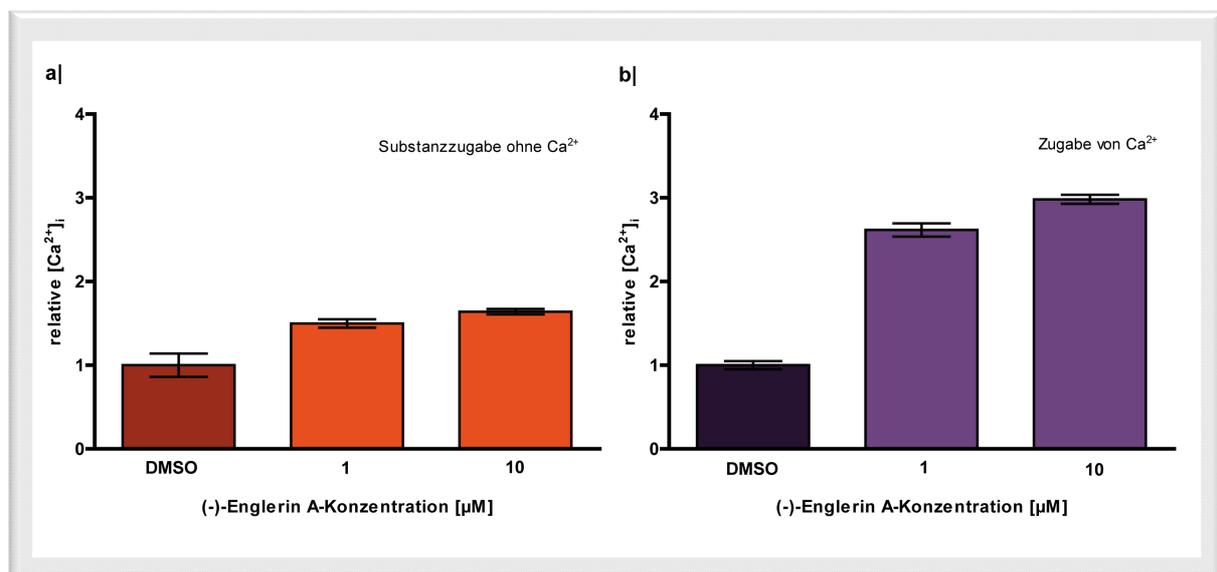


Abbildung 4.14: Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen

Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mit Hilfe des Screen Quest™ Fluo-8 Calcium Assays. Zellen wurden zunächst in Kalzium-freiem Tyrode-Puffer für 4 h inkubiert und anschließend für weitere 30 min mit Fluo-8® ebenfalls in Kalzium-freiem Tyrode-Puffer beladen. Anschließend erfolgte die Kalzium-freie Substanzzugabe zu den Zellen und die Detektion der Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm für 3 min (a). Direkt danach wurde 3,3 mM CaCl_2 zu den Zellen gegeben und die Fluoreszenzintensität erneut für 3 min gemessen (b). Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (1) dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Bei der Substanzzugabe in Abwesenheit von Ca^{2+} konnte nur ein leichter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle festgestellt werden (**Abbildung 4.14a**). Dies beruhte möglicherweise darauf, dass das Ca^{2+} aus den internen Kalziumspeichern innerhalb der 4 h höchstwahrscheinlich nicht vollständig aufgebraucht bzw. umgesetzt wurde. Insgesamt handelte es sich jedoch nicht um stark erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen. Bei der Zugabe von 3,3 mM CaCl_2 im zweiten Schritt konnte eine deutlich höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach der Behandlung der Substanz in Konzentrationen von 1 μM und 10 μM (-)-Englerin A gemessen werden (**Abbildung 4.14b**). Hierbei lagen die gemessenen Ca^{2+} -Konzentrationen bei ca. dem Dreifachen Wert der Lösemittelkontrolle, was darauf hindeutete, dass auch diese Zelllinie möglicherweise TRPC-Kanäle exprimiert.

4.2.9 TRPC4/5-Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien

Um zu bestimmen, ob eventuell TRPC4/5-Kanäle auch in diesen und anderen Nierenkrebszelllinien für diesen Phänotyp verantwortlich sind, wurden Expressionsstudien durchgeführt. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zelllinien zunächst im TRPC-Lysispuffer lysiert (siehe Abschnitt 2.4 und 3.3.7.2), die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und schließlich auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Nachweis von TRPC4 und TRPC5 wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern gegen TRPC4 und TRPC5 behandelt (**Abbildung 4.15**). Als Beladungskontrolle diente α -Tubulin.

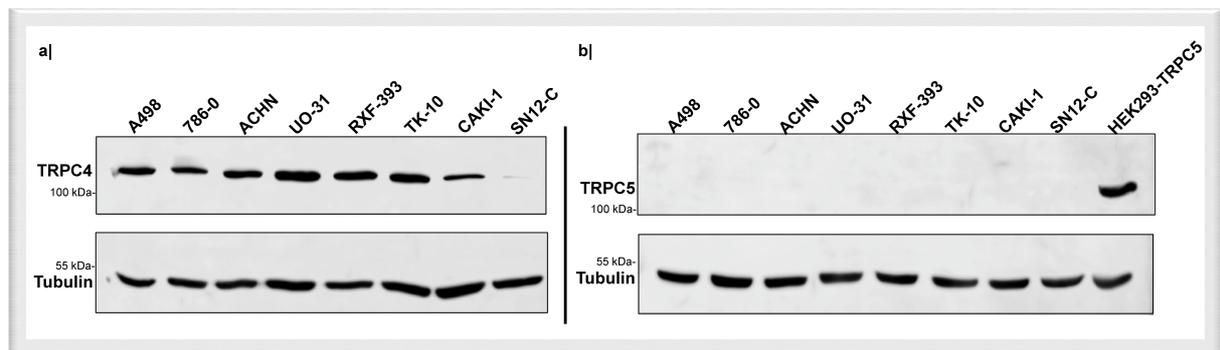


Abbildung 4.15: TRPC4/5-Proteinexpression in Nierenkrebszellen

Die Zellen wurden zunächst mit dem TRPC-Lysispuffer lysiert und anschließend sonifiziert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgten die Zugabe von DTE und Bromphenolblau und schließlich das Aufkochen der Lysate im SDS-Probenpuffer. Danach wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Nachweis von TRPC4 (**a**), TRPC5 (**b**) und α -Tubulin mittels Immunoblot wurden spezifische Antikörper verwendet. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal[®] West Femto Reagenzes. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

In allen acht untersuchten Nierenkrebszelllinien konnte TRPC4-Protein nachgewiesen werden (**Abbildung 4.15a**). Lediglich die SN12-C-Zellen zeigten eine sehr geringe Expression des Proteins. Dagegen konnte in keinem der Zelllysate das TRPC5-Protein detektiert werden (**Abbildung 4.15b**), während der TRPC5-Nachweis in dem Kontrollexperiment (HEK293-Zellen, die transient mit TRPC5 transfiziert waren) erfolgreich war. Dass kein TRPC5-Protein nachgewiesen werden konnte, bedeutete nicht, dass das Protein in den Zellen nicht exprimiert wurde.

Es zeigte lediglich, dass unter den getesteten Bedingungen kein TRPC5-Nachweis erbracht werden konnte und dies eventuell auch an der Nachweisgrenze der Immunoblot-Technik lag. Des Weiteren wurden auch die Zelllinien HS578-T und HEK293 hinsichtlich der Expression von TRPC4 (**Abbildung 4.16a**) und TRPC5 (**Abbildung 4.16b**) untersucht. Bei den HS578-T Zellen handelt es sich um eine Brustkrebszelllinie, die auch gegenüber (-)-Englerin A sehr sensitiv ist.^[78] Der Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität dieser Zelllinie wurde bereits in **Abbildung 4.1** gezeigt. Die HEK293-Zellen dagegen sind embryonale Nierenzellen, die gegenüber dem Naturstoff nicht sensitiv sind.^[80]

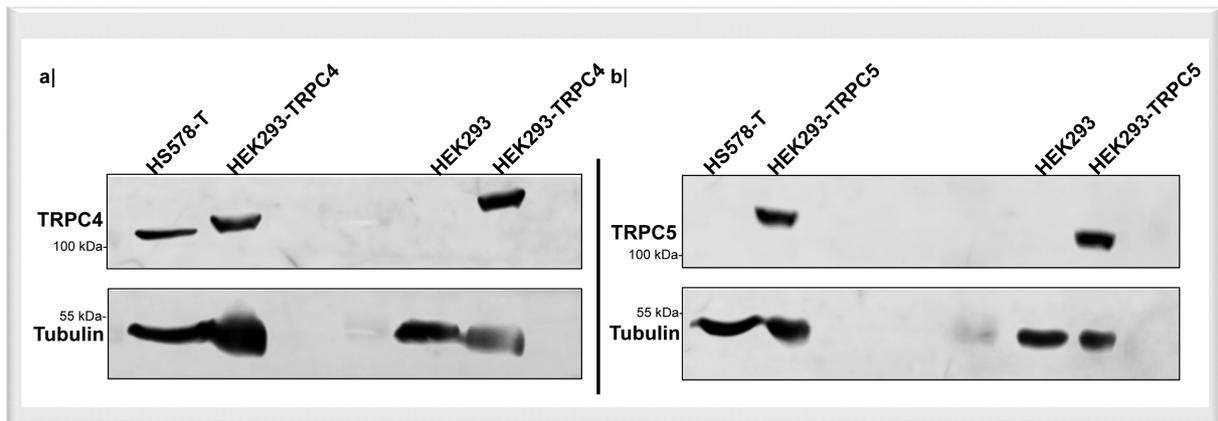


Abbildung 4.16: TRPC4/5-Proteinexpression in HS578-T- und HEK293-Zellen

Die Zellen wurden zunächst mit dem TRPC-Lysispuffer lysiert und anschließend sonifiziert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgten die Zugabe von DTE und Bromphenolblau und schließlich das Aufkochen der Lysate im SDS-Probenpuffer. Danach wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Nachweis von TRPC4 (a), TRPC5 (b) und α -Tubulin mittels Immunoblot wurden spezifische Antikörper verwendet. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal® West Femto Reagenzes. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Das TRPC4-Protein konnte in der HS578-T-Zelllinie nachgewiesen werden, während TRPC5 nicht detektierbar war. In den HEK293-Zellen konnte weder das TRPC4- noch das TRPC5-Protein nachgewiesen werden. Als Kontrollen wurden HEK293-Zellen verwendet, die mit TRPC4 oder TRPC5 transient transfiziert waren und die somit zu untersuchenden Proteine überexprimierten. Die Versuche zeigten, dass es keine direkte Korrelation zwischen der TRPC4/5-Proteinexpression und (-)-Englerin A-Sensitivität gab. D.h. dass die Sensitivität der Zelllinien nicht direkt auf die TRPC4/5-Proteinexpression zurückzuführen ist. TRPC4 konnte unter den getesteten Bedingungen in SN12-C-Zellen nicht detektiert werden, während TRPC5 in keines der Zelllinien nachgewiesen werden konnte.

4.2.10 Expressionsstudien zu TRPC4 α/β in verschiedenen Zelllinien

Mit Hilfe der beschriebenen Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass TRPC4 in allen getesteten Nierenkrebszelllinien und auch in der Brustkrebszelllinie HS578-T exprimiert wird. Daher sollte untersucht werden, welche Form von TRPC4 exprimiert wird.

Insgesamt sind in der Literatur ca. 10 Splicevarianten bekannt, von denen TRPC4 α und TRPC4 β am häufigsten exprimiert werden und funktionell charakterisiert sind.^{[166],[167],[168]} TRPC4 β ist 84 Aminosäuren kürzer als TRPC4 α .^[169] Um zu überprüfen, welche Variante von TRPC4 in den Nierenkrebszellen, der HS578-T- und der HEK293-Zelllinie exprimiert wird, wurden zunächst spezifische Oligonukleotide für die Unterscheidung der beiden Varianten entworfen. Als Kontrolle wurden ebenfalls spezifische Oligonukleotide für GAPDH konstruiert.

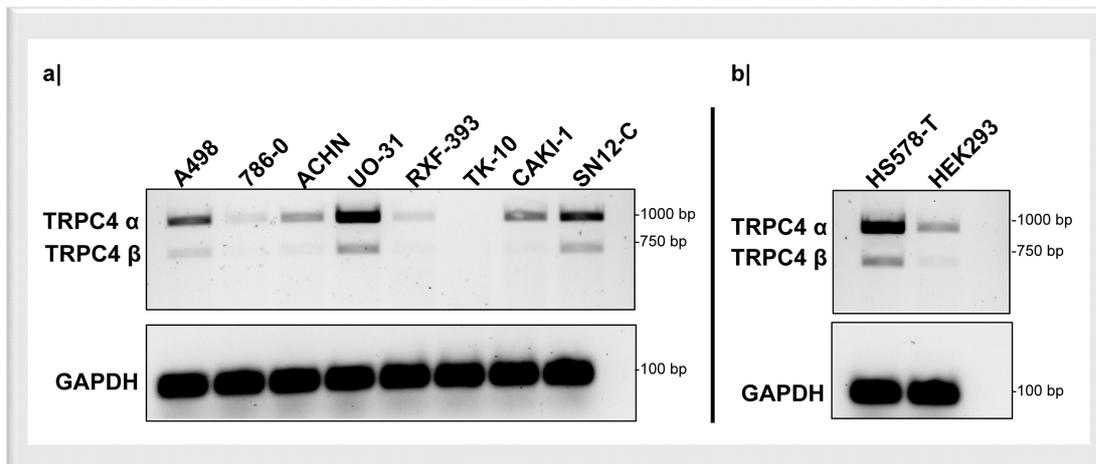


Abbildung 4.17: Expression von TRPC4 α / β in verschiedenen Zelllinien

a) TRPC4 α / β -Expression in Nierenkrebszellen. b) TRPC4 α / β -Expression in HS578-T- und HEK293-Zellen. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte die Herstellung der cDNA. Die Amplifikation der Gene erfolgte mittels PCR unter der Verwendung spezifischer Oligonukleotide für TRPC4 α / β und GAPDH. Die Auftrennung und Untersuchung der DNA erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Anschließend erfolgten die Isolation der Gesamt-RNA und die Herstellung der cDNA. Die Amplifikation der beiden TRPC4 Splicevarianten und von GAPDH fand mittels PCR statt, gefolgt von der Analyse der DNA-Produkte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (**Abbildung 4.17**). Die Ergebnisse zeigten, dass TRPC4 α in nahezu allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Lediglich für die TK-10-Zellen konnte diese Splicevariante unter den getesteten Bedingungen nicht detektiert werden. Insbesondere A498-, UO-31-, und SN12-C-Zellen und die Brustkrebszelllinie HS578-T zeigten eine relativ starke TRPC4 α -Expression. Auch HEK293-Zellen, die gegenüber (-)-Englerin A insensitiv sind, exprimierten TRPC4 α . Die Expression der TRPC4 β -Form war in den untersuchten Zelllinien überwiegend schwach, wobei für TK-10-Zellen keine Expression beobachtet werden konnte. Die drei Zelllinien UO-31, SN12-C und HS578-T zeigten eine relativ starke Expression für TRPC4 β . Da es sich hierbei um keine quantitative Analyse handelte war ein direkter Vergleich der Expressionsniveaus nicht möglich. Für alle anderen getesteten Zelllinien konnte eine geringe bis sehr schwache TRPC4 β -Expression festgestellt werden. Durch diese Untersuchungen konnte ein Überblick über die Expression von TRPC4 α / β in den Zelllinien geschaffen werden, die gegenüber dem Naturstoff sensitiv sind. Dabei konnte festgestellt werden, dass unter den getesteten Bedingungen überwiegend TRPC4 α detektiert werden konnte.

4.3 Validierung der Zielproteine TRPC4/5

4.3.1 Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-TRPC4/5-Zellen

Da TRPC4 und TRPC5 zu 65 % identisch^[164] und sowohl strukturell als auch funktionell sehr ähnlich sind^[165] wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit beide Ionenkanäle untersucht. Die genauere Untersuchungen dieser Ionenkanäle erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. D. J. Beech (Universität Leeds, Großbritannien). Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden von M.Sc. H. J. Gaunt und die elektrophysiologischen Versuche von M.Sc. H. J. Gaunt, Prof. Dr. D. J. Beech und Prof. Dr. Katsuhiko Muraki durchgeführt. Der Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde in genetisch modifizierten HEK293-Zellen untersucht, die stabil mit TRPC4 oder TRPC5 transfiziert waren. Für das Ca^{2+} -Testsystem wurde die Expression von TRPC4/5 (Tet⁺) für 24 h mit Tetrazyklin induziert (siehe Abschnitt 3.3.6). Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit Tetrazyklin induziert wurden und somit kein TRPC4/5 (Tet⁻) exprimierten. Die Zellen wurden zunächst mit dem Kalziumsensor Fura-2-AM in SBS-Puffer mit Pluronic[®] F-127 für 1 h beladen. Anschließend erfolgte die Zugabe von (-)-Englerin A und die kinetische Detektion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (**Abbildung 4.18a und b**). Des Weiteren konnten Dosis-Wirkungs-Kurven für beide Ionenkanäle erstellt werden (**Abbildung 4.18c und d**). Bei Zugabe von 100 nM (-)-Englerin A konnte ein starker Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowohl in HEK293-TRPC4-Zellen als auch für HEK293-TRPC5 (**Abbildung 4.18a und b**) beobachtet werden. Für TRPC4 betrug der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration das 3,5-fache und für TRPC5 das 4-fache der Kontrolle. Die Dosis-Wirkungs-Kurven für beide Ionenkanäle demonstrierten erneut, dass es sich hierbei um eine sehr potente Verbindung handelt. Während für den (-)-Englerin A-vermittelten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-TRPC4-Zellen ein EC_{50} -Wert von 11,2 nM ermittelt wurde (**Abbildung 4.18c**), zeigte sich, dass der Naturstoff mit einem EC_{50} -Wert von 7,6 nM den TRPC5-Ionenkanal sogar bei noch niedrigeren Konzentrationen aktiviert (**Abbildung 4.18d**). Insgesamt konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass (-)-Englerin A einen starken Einfluss auf die Kalziumhomöostase hat, die durch TRPC4/5-Kanäle vermittelt wird.

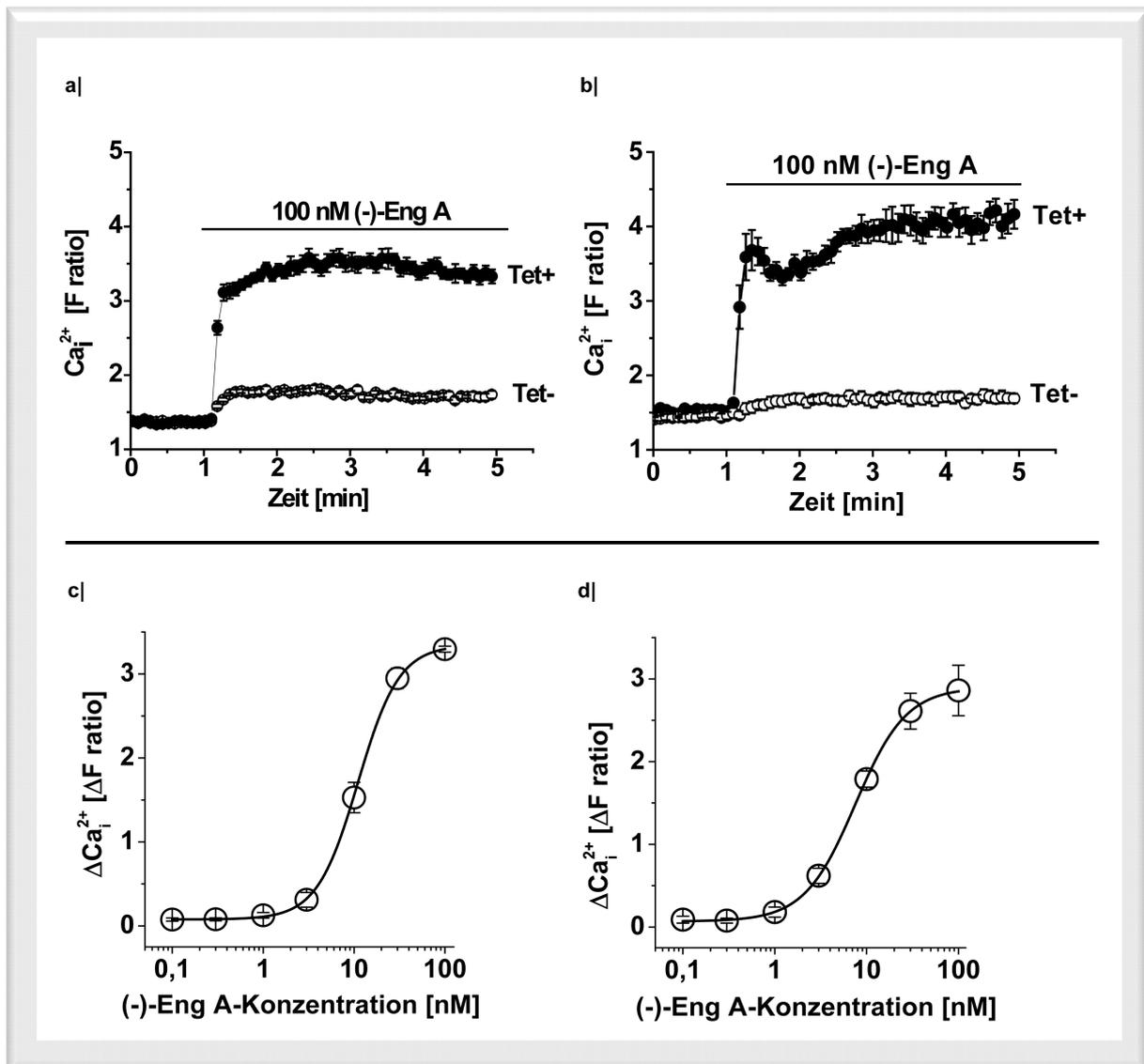


Abbildung 4.18: (-)-Englerin A-induzierter Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-TRPC4/5-Zellen

Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-TRPC4-Zellen (a) oder HEK293-TRPC5-Zellen (b). c) und d) Dosis-Wirkungs-Kurven für HEK293-TRPC4- und HEK293-TRPC5-Zellen. Die TRPC4/5 Expression (Tet+) wurde für 24 h durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert. Als Kontrolle dienten nicht-induzierte Zellen (Tet-). Anschließend wurden die Zellen mit Fura-2-AM in SBS-Puffer mit Pluronic® F-127 beladen und für 1 h inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von (-)-Englerin A. Zur Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm gemessen. Die Fluoreszenz ist als Verhältnis [F] aus 340 und 380 nm in a) und b) oder als Änderung dieses Verhältnisses $[\Delta F]$ in c) und d) dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

4.3.1.1 Untersuchungen zur Herkunft der Kalziumionen

Die vorstehend beschriebenen Versuche lieferten keine Auskunft über die Herkunft des Kalziums. Dabei kann das Ca^{2+} intrazellulärer (z.B. aus dem Endoplasmatisches Retikulum) oder extrazellulärer Herkunft sein. Für die Analyse wurde der Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} im Kulturmedium in HEK293-TRPC4 untersucht (Abbildung 4.19).

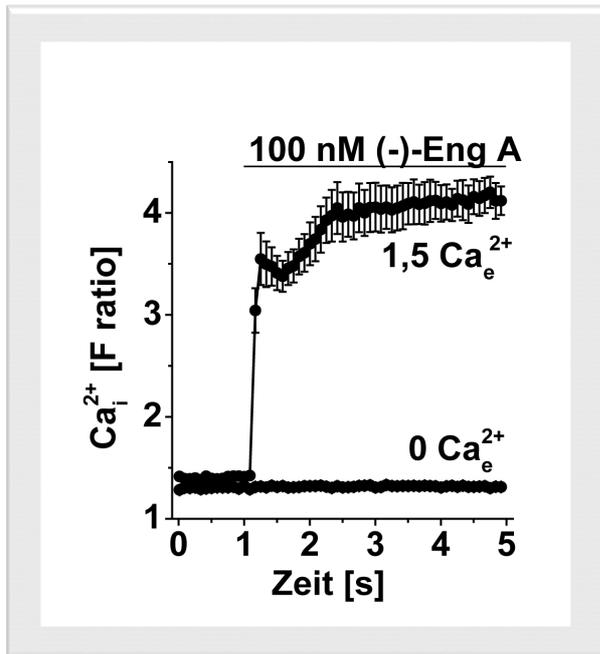


Abbildung 4.19: Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in An- und Abwesenheit von 1,5 mM Ca^{2+} im Kulturmedium
HEK293-TRPC4-Zellen wurden mit Fura-2-AM in SBS-Puffer mit Pluronic® F-127 in An- und Abwesenheit von 1,5 mM Ca^{2+} im Kulturmedium für 1 h beladen bevor 100 nM (-)-Englerin A zugegeben wurde. Zur Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 340 und 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm gemessen. Die Fluoreszenz ist als Verhältnis [F] aus 340 und 380 nm dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Demnach würde ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Abwesenheit von Ca^{2+} im Kulturmedium zeigen, dass das Ca^{2+} aus internen Kalziumspeichern stammt und nicht extrazellulärer Herkunft ist.

Bei Behandlung der Zellen mit 100 nM (-)-Englerin A in Ca^{2+} -freien Puffer konnte kein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass der (-)-Englerin A-Effekt durch die Abwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} aufgehoben werden kann. Dies zeigte deutlich, dass es sich hierbei nicht um Ca^{2+} aus den internen Kalziumspeichern der Zelle handelte, da kein Ca^{2+} -Anstieg gemessen werden konnte. Im Vergleich dazu führte die Substanzzugabe in Anwesenheit von 1,5 mM extrazellulärem Ca^{2+} zu einer starken Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dieses Ergebnis demonstrierte, dass die Kalziumionen, die für den starken Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich sind, aus dem extrazellulären Bereich stammen.

4.3.2 Selektivität von (-)-Englerin A für TRP-Kanäle

Um die Selektivität der Substanz für TRP-Kanäle zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Experimente durchgeführt. Hierzu diente die patch clamp-Technik, die typischerweise zur Messungen von Membranpotentialen eingesetzt wird. Die Messungen der TRPC4-vermittelten Ionenströme bei Zugabe von (-)-Englerin A erfolgte in HEK293-TRPC4-Zellen. Als Kontrolle wurde der TRC4/5-Antagonist ML204 verwendet.^[170] Für die Messungen der Ströme wurde die Pipette zunächst mit einer intrazellulären Lösung inklusive (-)-Englerin A gefüllt, um zu überprüfen ob die Substanz die Kanäle auf der intrazellulären Seite

der Plasmamembran aktiviert. Als extrazelluläre Lösung diente SBS-Puffer. Die zu untersuchenden Zellen wurden so gepatcht, dass beim Patchen ein Teil der Plasmamembran herausgelöst wurde und sich die intrazelluläre Seite der Plasmamembran in der Pipette befand. Diese spezielle Form des Patchens wird auch als *outside-out patch* bezeichnet. Für die Messungen wurden (-)-Englerin A oder ML204 in die extrazelluläre Lösung gegeben und die Ionenströme für ca. 2 min bei einer Spannung von jeweils -100 mV und +100 mV gemessen. Anschließend wurden die Substanzen nur extrazellulär in Lösung gegeben, um zu untersuchen ob die Kanäle auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran aktiviert werden (**Abbildung 4.20a**).

Des Weiteren wurde für HEK293-TRPC4-Zellen eine Strom-Spannungs-Kurve mit der *whole-cell patch clamp* Technik ermittelt (**Abbildung 4.20b**). Strom-Spannungs-Kurve sollte den Zusammenhang zwischen dem Membranpotential und dem Strom, welcher über die Zellmembran fließt, verdeutlichen. Hierbei wurde die gesamte Zelle gepatcht und die Substanzzugabe erfolgte extrazellulär. Die Ionenströme wurden anschließend bei unterschiedlichen Spannungen von -100 bis +100 mV aufgezeichnet.

Die Messungen zeigten einen signifikanten Fluss von Ionen durch die Membran und damit zum größten Teil durch TRPC4-Kanäle, da diese überexprimiert waren (**Abbildung 4.20a**). In den ersten 2-3 min nach Zugabe von (-)-Englerin A auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran konnte kein Anstieg im Ionenstrom gemessen werden. Dies zeigte, dass die Substanz TRPC4-Kanäle nicht intrazellulär aktiviert. Dagegen zeigte eine extrazelluläre Zugabe von 100 nM (-)-Englerin A ein Stromstärke von bis zu 0,3 nA (+100mV) und -0,3 (-100 mV). Ca. 2-3 min nach Zugabe der Substanz nahm der Strom ab, da die Substanz aus der extrazellulären Lösung herausgewaschen wurde. Bei erneuter Zugabe des Naturstoffes konnten erneut Ionenströme gemessen werden. Nach Zugabe von (-)-Englerin A wurde direkt ML204 appliziert, welches zu einer sofortigen Abnahme des Stroms führte.

Hierdurch konnte zum einen gezeigt werden, dass (-)-Englerin A selektiv TRPC4-Kanäle öffnet und zum anderen, dass der Naturstoff TRPC4-Kanäle selektiv aktiviert, da die Effekte durch ML204 aufgehoben werden konnten. Eine weitere Erkenntnis aus diesem Versuch war, dass (-)-Englerin A vermutlich reversibel an die Kanäle bindet, da die (-)-Englerin A-induzierten Ionenströme durch ML204 inhibiert wurden.

Außerdem konnte in dem *outside-out patch* gezeigt werden, dass der Naturstoff die Kanäle an der extrazellulären Seite der Plasmamembran aktiviert, da (-)-Englerin A an der extrazellulären Seite der Plasmamembran appliziert wurde.

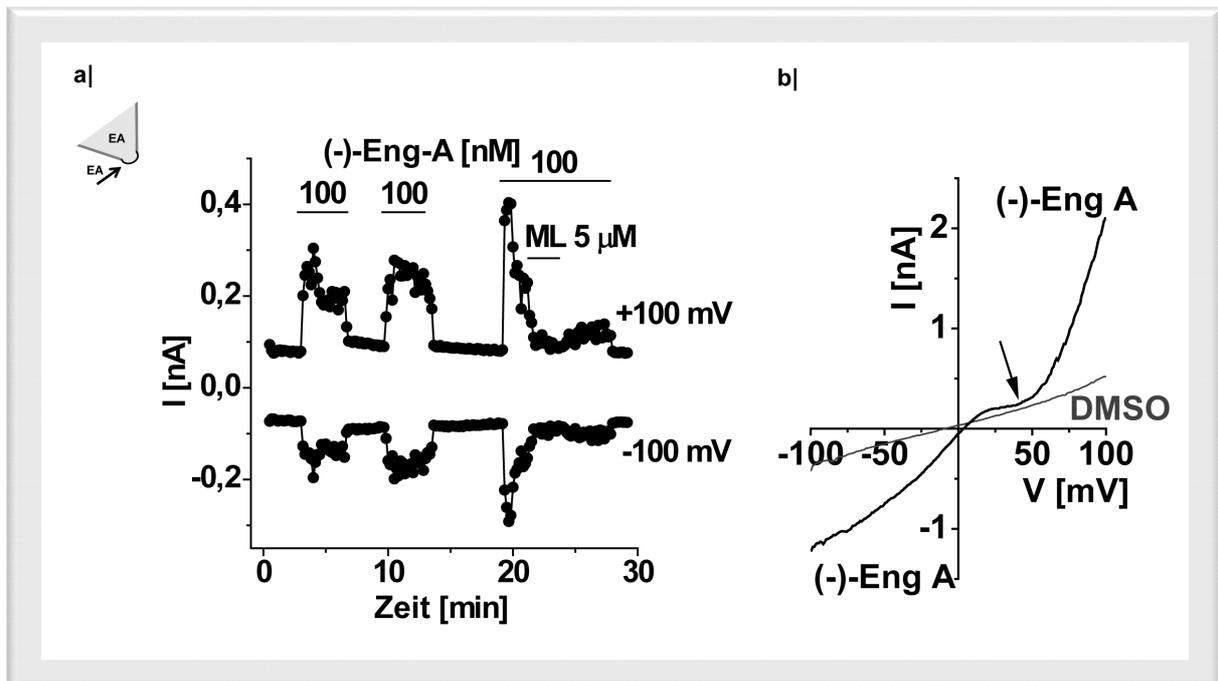


Abbildung 4.20: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Ionenströme in HEK293-TRPC4-Zellen

a) Ionenströme eines *outside-out patches*. Die Pipette wurde mit einer Standard-Pipetten-Lösung zusammen mit (-)-Englerin A befüllt. Als extrazelluläre Lösung diente SBS-Puffer. Die Zelle wurde gepatcht und ein Teil der Membran herausgelöst, sodass sich die intrazelluläre Seite der Plasmamembran innerhalb der Pipette befand. Die Zugabe von (-)-Englerin A zu der intrazellulären Seite der Plasmamembran erfolgte für 2-3 min und die Ionenströme wurden bei einer Spannung von -100 mV und + 100 mV aufgezeichnet. Anschließend wurden (-)-Englerin A oder ML204 extrazellulär in Lösung verabreicht und die Ionenströme weiter bei der gleichen Spannung gemessen. **b)** Strom-Spannungskurve eines *whole-cell patches*. Die Pipette wurde mit einer Standard-Pipetten-Lösung befüllt. Als extrazelluläre Lösung diente SBS-Puffer. Hierbei wurde die gesamte Zelle gepatcht. Die Zugabe von (-)-Englerin A oder DMSO erfolgte extrazellulär. Die Ionenströme wurden bei einer Spannung von -100 mV bis + 100 mV aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Dass es sich wirklich um die Aktivierung von TRPC4-Kanälen handelte konnte mit Hilfe einer Strom-Spannungskurve bestätigt werden. Dabei konnte anhand der gewählten Spannung und den Strömen, die bei Behandlung mit (-)-Englerin A entstanden, eine für TRPC4 typische "Sesselform" der Strom-Spannungskurve gemessen werden (**Abbildung 4.20b**). Die "Sesselform" stellt praktisch den "Fingerabdruck" für TRPC4 und nahe verwandte Kanäle dar.^{[171],[172],[173]}

4.3.2.1 Einfluss von (-)-Englerin A auf TRPC6, TRPM2 und TRPV4

Basierend auf der Phylogenie werden TRP-Proteine in drei große Gruppen eingeteilt. Hierbei handelt es sich neben der TRPC4-Familie mit sieben Mitgliedern (TRPC1-7) auch um die TRPV-Familie mit sechs Mitgliedern (TRPV1-6) und um die TRPM-Familie mit acht Mitgliedern (TRPM1-8).^[174] Um die Selektivität des Naturstoffes zu untersuchen wurden deshalb auch andere Ionenkanäle der TRP-Familien mit Hilfe des Testsystems zur Ca^{2+} -Detektion untersucht. Hierzu wurden genetisch modifizierte HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit murinem TRPC6^[175] oder aber humanem TRPM2 transfiziert waren. Darüber hinaus wurden auch genetisch modifizierte CHO-Zellen, die stabil TRPV4 exprimierten,

analysiert. Lediglich die Expression von TRPM2 wurde für 24 h mit Tetrazyklin induziert. Als Kalziumsensoren dienten Fura-2-AM (für TRPC6 und TRPM2) und Fluo-4 (für TRPV4). Die Kalzium-Detektion erfolgte wie bereits in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Für die Testung der TRPC6- und TRPM2-Kanäle wurden verschiedene Substanzkonzentrationen verwendet, während für TRPV4 eine Konzentration von 100 nM (-)-Englerin A eingesetzt wurde (**Abbildung 4.21**).

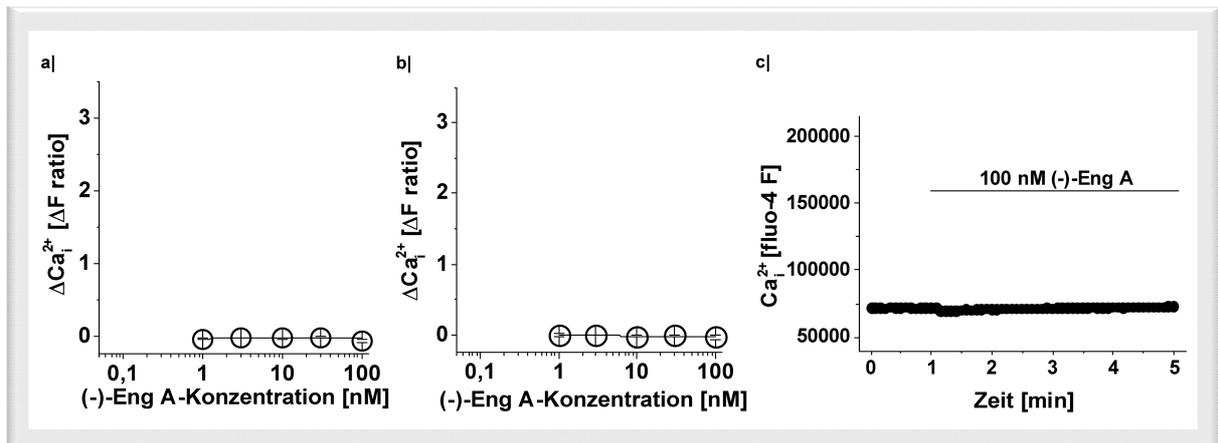


Abbildung 4.21: Die Effekte von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-TRPC6-, HEK293-TRPM2- und CHO-TRPV4-Zellen

Für die Untersuchungen wurden Zellen verwendet, die stabil murines TRPC6 (a), humanes TRPM2 (b) und humanes TRPV4 (c) exprimieren. Die Expression von TRPM2 wurde für 24 h mit Tetrazyklin induziert. Die Zellen wurden mit Fura-2-AM (a und b) oder Fluo-4 (c) in SBS-Puffer mit Pluronic® F-127 für 1 h beladen. Nach Zugabe von (-)-Englerin A wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration anhand der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und 380 nm (a und b) oder bei 485 nm (c) und einer Emissionswellenlänge von 510 nm (a und b) oder 525 nm (c) bestimmt. Die Fluoreszenz ist als Änderung des Verhältnisses [F] aus 340 nm und 380 nm (a und b) oder als absolute Fluoreszenz (c), dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Aus den erhaltenen Ergebnissen ging hervor, dass weder TRPC6, TRPM2 noch TRPV4 durch (-)-Englerin A aktiviert wurden. Bei allen getesteten TRP-Kanälen konnte kein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration detektiert werden. Hiermit wurde deutlich, dass (-)-Englerin A ein potenter und gleichzeitig selektiver Aktivator für TRPC4/5-Kanäle ist.

4.3.2.2 Einfluss von (-)-Englerin A auf GPCRs

Aus der Literatur ist bekannt, dass TRPC4/5-Kanäle auch durch Aktivierung von G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stimuliert werden können.^{[171],[176],[177]} Somit war es wichtig festzustellen, ob die Aktivierung von TRPC4/5 durch (-)-Englerin A über GPCRs erfolgt. Für diese Untersuchungen via *outside-out patch* wurden wieder genetisch modifizierte HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit TRPC4 transfiziert waren. Die TRPC4-Expression wurde für 24 h mit Tetrazyklin induziert. Um zu überprüfen, ob bei einer Inhibierung von GPCRs eine Aktivierung von TRPC4 immer noch möglich war, wurden alle GPCRs mit Hilfe von GDP- β -S inhibiert. Hierbei handelt es sich um ein stabiles GDP Analogon, das nicht hydrolysiert

werden kann. Nach Befüllen der Pipette mit GDP- β -S wurden die Zellen so gepatcht, dass die intrazelluläre Seite der Plasmamembran innerhalb der Pipette lag und die GPCRs somit durch GDP- β -S inhibiert werden konnten. Die Zugabe von (-)-Englerin A erfolgte auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran. Die TRPC-Ströme wurden alle 10 Sekunden bei einer Spannung von +100 mV und -100 mV gemessen (**Abbildung 4.22**). Als Kontrolle diente der TRPC4/5 Antagonist ML204.

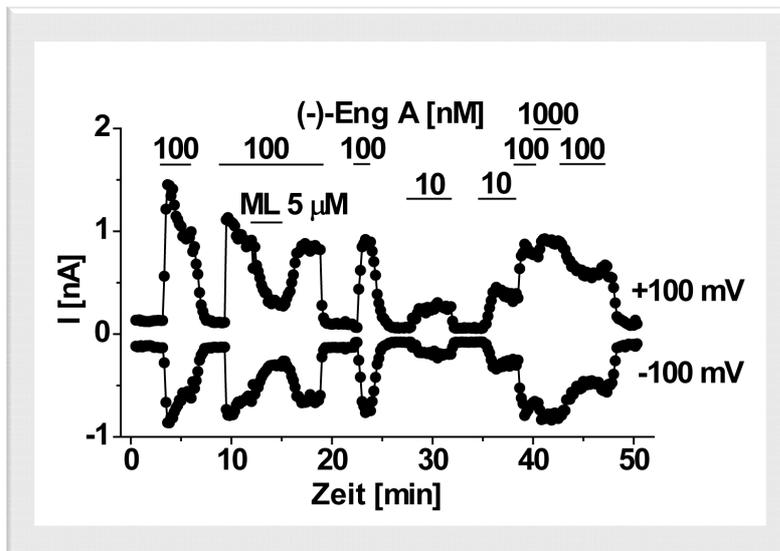


Abbildung 4.22: Einfluss von (-)-Englerin A auf GPCRs in HEK293-TRPC4-Zellen

Für die Untersuchungen wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit TRPC4 transfiziert wurden und die zur Induktion der TRPC4-Expression für 24 h mit Tetrazyklin behandelt wurden. Die Pipette wurde mit GDP- β -S befüllt. Die Zelle wurde gepatcht und ein Teil der Membran herausgelöst (*outside-out patch*), sodass sich die intrazelluläre Seite der Plasmamembran innerhalb der Pipette befand und die GPCRs inhibiert werden konnten. Die Zugabe von (-)-Englerin A oder ML204 erfolgte extrazellulär. Die Ionenströme wurden alle 10 Sekunden bei einer Spannung von -100 mV und + 100 mV aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Die Zugabe von (-)-Englerin A induzierte eindeutig starke Ströme für die TRPC4-Kanäle. Die Ionenströme waren so stark, wie Ströme, die normalerweise beim Patch einer ganzen Zelle (*whole cell*) auftreten. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass alleine in diesem relativ kleinen Teil der herausgelösten Membran hunderte von TRPC4-Kanälen aktiviert sein mussten. Nach jeder Applikation von (-)-Englerin A wurde die Substanz wieder herausgewaschen, sodass der Strom zurück zur Messbasis sank. Bei erneuter Zugabe von (-)-Englerin A konnten ähnlich starke Ströme reproduziert werden. Dass die Substanz in diesem Fall TRPC4-Kanäle selektiv aktiviert, konnte durch den Einsatz von ML204 gezeigt werden. Bei Applikation des TRPC4/5-Antagonisten konnte der (-)-Englerin A-Einfluss, wie bereits gezeigt, aufgehoben werden. Mit Hilfe dieser Versuche konnte demonstriert werden, dass der (-)-Englerin A-Effekt nicht über die Aktivierung von GPCRs vermittelt wird. Um diese Ergebnisse zu bekräftigen, wurde der Effekt des Naturstoffes als Agonist oder Antagonist auf GPCRs in einem zellbasierten Testsystem *in vitro getestet*. Die GPCR-Profilierung wurde von der Firma Millipore durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.21).

GPCR	% Aktivierung 1,25 µM (-)-Eng A	% Inhibierung 1 µM (-)-Eng A	GPCR	% Aktivierung 1,25 µM (-)-Eng A	% Inhibierung 1 µM (-)-Eng A
5-HT2B	0	6,6	GPR91	-0,2	6,4
A3	-1	-3,8	GPR99	1	-5,6
ADRB2	1	3,1	H1	-1	-5,8
APJ	0	10,9	IP1	-1	-4,4
AT1	0	0,4	M2	-1	-9,5
BB2	-1	-4,1	MC2	0	-9,8
BDKR2	0	-9	MCHR1	-1	22,5
C5aR	0	-2,2	mGlu2	-1	11,7
CaS	0	-1	Motilin	-1	-2,6
CB2	-1	0,6	MRGX2	1	1,1
CCK2	0	-4,6	NK1	-4	0,8
CCR2B	0	-0,2	NMU1	-1	-0,8
CGRP1	0	9,5	NPBW1	1	-23,8
ChemR23	-1	-4,4	NTR1	-1	-6,4
CRF1	1	12,6	OT	-1	4,6
CysLT1	0	-3,2	OX1	-1	-0,4
D5	3	-0,9	P2Y1	0	-3
ETB	0	-1,9	PAC1	0	0,1
FPR1	0	0	PAF	0	-9,7
GABAB1b	1	-1,5	PK1	-1	2,3
GAL1	1	24,9	PRP	0	-11,3
GLP-1	-1	31,8	PTH1	-1	-5,1
GnRH	-1	22,2	S1P3	-1	2,4
GPR103	0	-1,1	SST4	0	11,6
GPR109A	1	34,8	Thrombin-activated PARs	2	0,6
GPR14	0	-1,3	TRH	0	-0,1
GPR39	0	15,8	TSH	0	-2,5
GPR43	0	1,4	V1A	0	7,5
GPR54	0	0	Y2	-1	1,5
GPR68	-1	4,4			

Abbildung 4.23: Profilierung von (-)-Englerin A für die Modulation ausgewählter GPCRs

Für den Agonisten-Assay wurden sowohl (-)-Englerin A als auch die Kontrollsubstanzen zunächst verdünnt und ausplattiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen zu den Zellen, welche die ausgewählten GPCRs exprimierten. Die Messung des Fluoreszenz- oder Lumineszenzsignals erfolgte für 3 min. Anschließend wurde die Platte für den Test von (-)-Englerin A als Antagonist verwendet. Hierbei war die Vorgehensweise dieselbe wie für den Agonisten-Assay. Die Aktivierung und Inhibierung der GPCRs wurden auf die Kontrollen normalisiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten.

Dabei wurde die ausgewählten GPCRs auf eine durch (-)-Englerin A vermittelte Aktivierung und Inhibierung getestet (**Abbildung 4.23**).

Die GPCR-Profilierung zeigte, dass (-)-Englerin A weder eine deutliche Aktivierung noch eine Inhibierung auf die ausgewählten GPCRs bewirkte. Die höchste prozentuale Inhibierung konnte für GPR109A (*Hydroxycarboxylic acid receptor 2*) festgestellt werden. Allerdings wurde eine relativ hohe Substanzkonzentration von 1 µM verwendet. Die Inhibierung lag bei 34,8% und war dennoch nicht hoch genug, um weiter untersucht zu werden, sodass die untersuchten GPCRs als mögliche Zielproteine ausgeschlossen werden konnten.

4.3.3 Biologische Aktivität von (-)-Englerin A in HEK293T-TRPC4/5-Zellen

Alle untersuchten Nierenkrebszelllinien und auch die Brustkrebszelllinie HS578-T sind gegenüber (-)-Englerin A sensitiv (siehe Abschnitt 4.1.1) und enthalten TRPC4 (siehe

Abschnitt 4.2.9). Obwohl TRPC5 mittels Immunoblotting nicht nachgewiesen werden konnte, bedeutete dies nicht, dass es in diesen Zellen nicht exprimiert wird. Außerdem konnte mit Hilfe des Testsystems zur Kalzium-Detektion und patch clamp Versuchen gezeigt werden, dass TRPC5 auch gegenüber dem Naturstoff sensitiv ist. Dies führte zu der Hypothese, dass TRPC4 und auch TRPC5 aufgrund der hohen Homologie^[164] für die Sensitivität der Zellen verantwortlich sind.

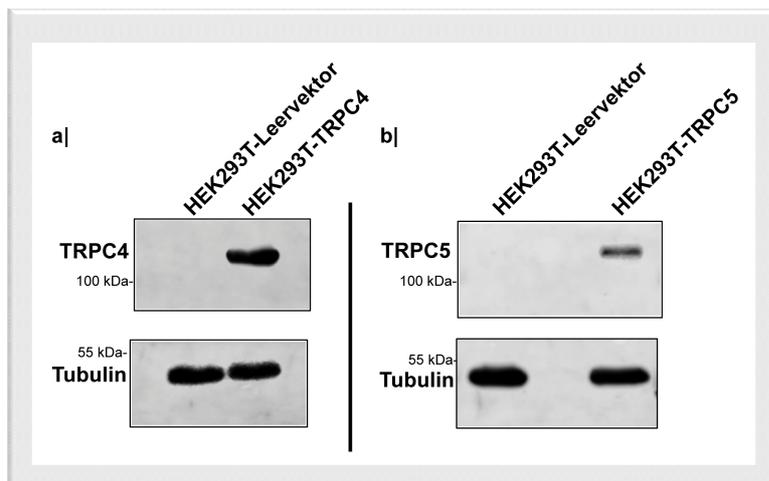


Abbildung 4.24: TRPC4/5-Expressionskontrollen in HEK293T-TRPC4/5-Zellen

HEK293T-Zellen wurden transient mit TRPC4-Konstrukten (a) und TRPC5-Konstrukten (b) transfiziert. 8 h nach der Transfektion wurden die Zellen replattiert und für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in TRPC-Lysispuffer lysiert und sonifiziert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgten die Zugabe von DTE und Bromphenolblau und schließlich das Aufkochen der Lysate im SDS-Probenpuffer. Danach wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Nachweis von TRPC4 (a), TRPC5 (b) und α -Tubulin mittels Immunoblot wurden spezifische Antikörper verwendet. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal[®] West Femto Reagenzes. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Überexpressionsstudien mit HEK293T-Zellen durchgeführt. HEK293T-Zellen sind gegenüber (-)-Englerin A mit einem IC_{50} -Wert von $24.8 \mu\text{M}$ insensitiv^[80] und zeigen keine TRPC4/5-Expression auf Proteinebene (siehe Abschnitt 4.2.9). Mit diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die Expression der TRPC4/5-Proteine für die Sensitivität gegenüber (-)-Englerin A verantwortlich ist. Dazu wurden HEK293T-Zellen transient mit TRPC4 und TRPC5 oder mit den jeweiligen Leervektoren als Kontrollen transfiziert (**Abbildung 4.24**). 48 h später erfolgte die Zugabe von (-)-Englerin A und die Messung der Zellviabilität mit Hilfe des WST-1-Reagenzes (**Abbildung 4.25**).

Durch die Transfektion mit TRPC4/5-Expressionskonstrukten war es möglich, HEK293T-Zellen gegenüber (-)-Englerin A zu sensitivieren. Aus den Ergebnissen des Zellviabilitäts-Testsystems geht deutlich hervor, dass Zellen, die TRPC4 bzw. TRPC5 überexprimieren, eine deutliche Sensitivität gegenüber (-)-Englerin A im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Während die Zellviabilität für die Kontrolle bei 100% lag, zeigten die mit TRPC4/5 transfizierten Zellen eine stetig abnehmende Viabilität bis hin zu einem Wert von ca. 50% bei Substanzkonzentrationen von 100 nM (**Abbildung 4.25a**) und 10 nM (**Abbildung 4.25b**).

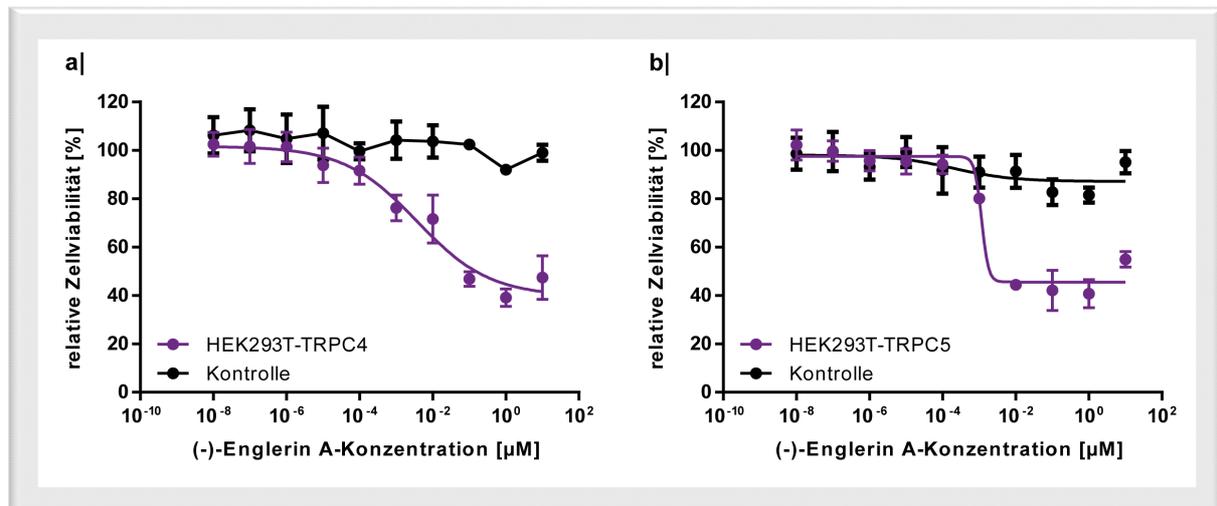


Abbildung 4.25: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität in HEK293T-TRPC4/5-Zellen

Für die Messung der Zellviabilität wurden zunächst HEK293T entweder mit einem TRPC4-Expressionskonstrukt (a) oder TRPC5-Expressionskonstrukt (b) und den entsprechenden Leervektoren als Kontrolle transient transfiziert und für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Substanzzugabe und die Messung der Zellviabilität mittels WST-1-Reagenz 4 h später nach Herstellerangaben. Die Bestimmung der Absorption erfolgte bei 450 nm. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (100 %) dargestellt. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologischen Replikaten \pm Standardabweichung.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass TRPC4/5 ausschlaggebend für die (-)-Englerin A-vermittelte Sensitivität ist.

Diese Erkenntnisse wurden zusätzlich in morphologischen Studien mit Hilfe von Lebendzellaufnahmen von HEK293T-TRPC4/5-Zellen untersucht.

Hierzu wurden HEK293T-Zellen zunächst transient mit TRPC4/5-Expressionskonstrukten oder den Leervektoren transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit 100 nM (-)-Englerin A und die Untersuchung der morphologischen Effekte mittels Lebendzell-Mikroskopie. Die Aufnahmen fanden kontinuierlich in Echtzeit über einen Zeitraum von 0 min bis 8 h statt. Die Ergebnisse sind in den **Abbildung 4.26** (TRPC4) und **Abbildung 4.27** (TRPC5) dargestellt. Der Einfluss des Naturstoffes ließ sich bereits 5-10 min nach Substanzzugabe beobachten. Hier war klar zu erkennen, dass sich die HEK293T-TRPC4 und HEK293T-TRPC5 schnell abrunden und in diesem Zustand über die gemessene Zeit verweilen bevor sie sterben.

Zum Zeitpunkt 0 min waren die HEK293T-TRPC4/5-Zellen, die mit (-)-Englerin A behandelt wurden, bereits abgerundet, was durch die schnellen Effekte der Substanz vom Zeitpunkt der Zugabe bis zum Beginn der Aufnahmen zu erklären ist. Zwischen der Substanzzugabe und dem Beginn der Aufzeichnungen lagen maximal 3 min. Innerhalb dieser Zeit hatte die Substanz aufgrund ihrer hohen Potenz bereits einen Einfluss auf die Zellen ausgeübt, sodass diese abgerundet waren.

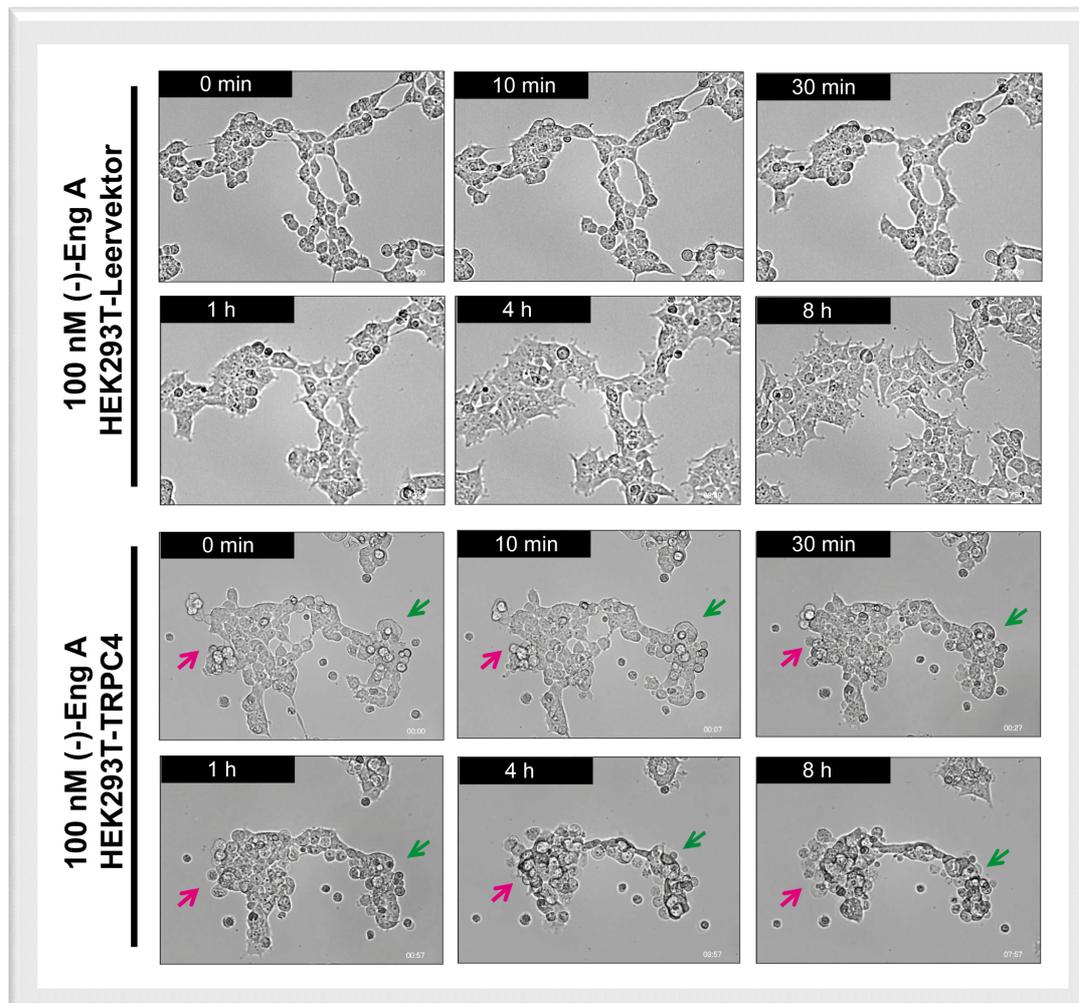


Abbildung 4.26: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Morphologie von HEK293T-TRPC4-Zellen

Ausgewählte Sequenzen aus der Lebendzell-Mikroskopie. HEK293T-Zellen wurden mit einem TRPC4-Expressionskonstrukt oder einem Leervektor (Kontrolle) transient transfiziert und für 48 h inkubiert. HEK293T-TRPC4 oder die Kontrollen wurden mit 100 nM (-)-Englerin A behandelt. Die farbigen Pfeile kennzeichnen die Veränderung der Zellmorphologie in (-)-Englerin A-behandelten Zellen. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Luft-Objektiv gemacht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Die Zellen konnten sich im weiteren Verlauf nicht mehr teilen und wurden durch die Substanz abgetötet. Diese Effekte auf die Zellmorphologie konnten bereits für A498-Zellen in Abschnitt 4.1.3 gezeigt werden. Die Kontrollzellen dagegen zeigten keine Beeinflussung durch (-)-Englerin A. Sie konnten sich über den gesamten Zeitraum weiterhin teilen und besaßen eine gestreckte Zellform und Filopodien.

Insgesamt konnten diese Ergebnisse die Untersuchungen zur Zellviabilität in HEK293T-TRPC4/5-Zellen bestätigen und dies auch auf morphologischer Ebene bekräftigen.

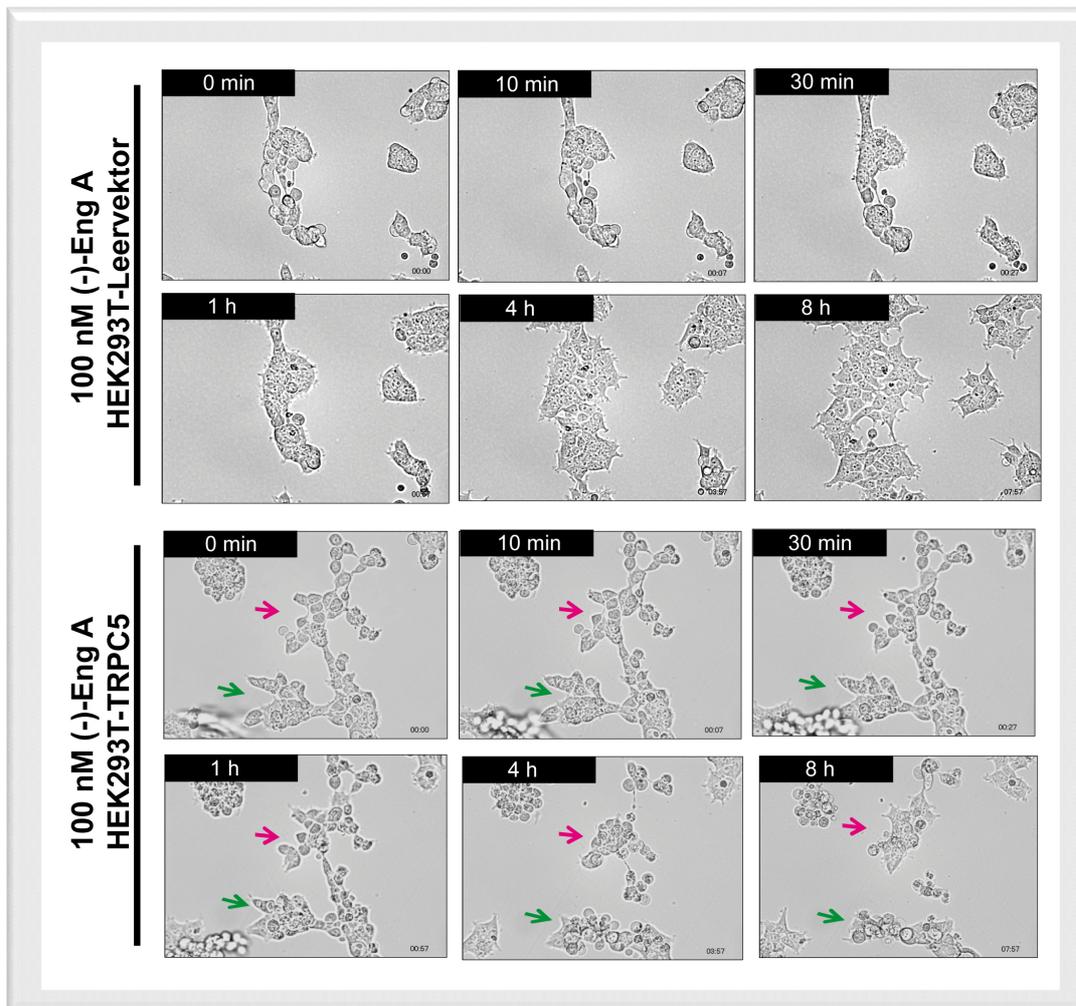


Abbildung 4.27: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Morphologie von HEK293T-TRPC5-Zellen
 Ausgewählte Sequenzen aus der Lebendzell-Mikroskopie. HEK293T-Zellen wurden mit einem TRPC5-Expressionskonstrukt oder einem Leervektor (Kontrolle) transient transfiziert und für 48 h inkubiert. HEK293T-TRPC5 oder die Kontrollen wurden mit 100 nM (-)-Englerin A behandelt. Die farbigen Pfeile kennzeichnen die Veränderung der Zellmorphologie in (-)-Englerin A-behandelten Zellen. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Luft-Objektiv gemacht. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

4.3.4 Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen

Da die Substanz eine 1000-fach höhere selektive Wachstumsinhibierung gegenüber Nierenkrebszelllinien zeigt als im Vergleich zu anderen Krebszelllinien war es wichtig die Untersuchungen weiter in Nierenkrebszellen fortzusetzen.

Hierfür wurden A498-Zellen ausgewählt und zunächst in weiteren Experimenten zur Analyse der (-)-Englerin A-Effekte auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration unterzogen. A498-Zellen wurden dafür mit Fluo-4 beladen und die Ca^{2+} -Detektion erfolgte wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Mit Hilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve konnte ein EC_{50} -Wert von 9,5 nM ermittelt werden (**Abbildung 4.28**).

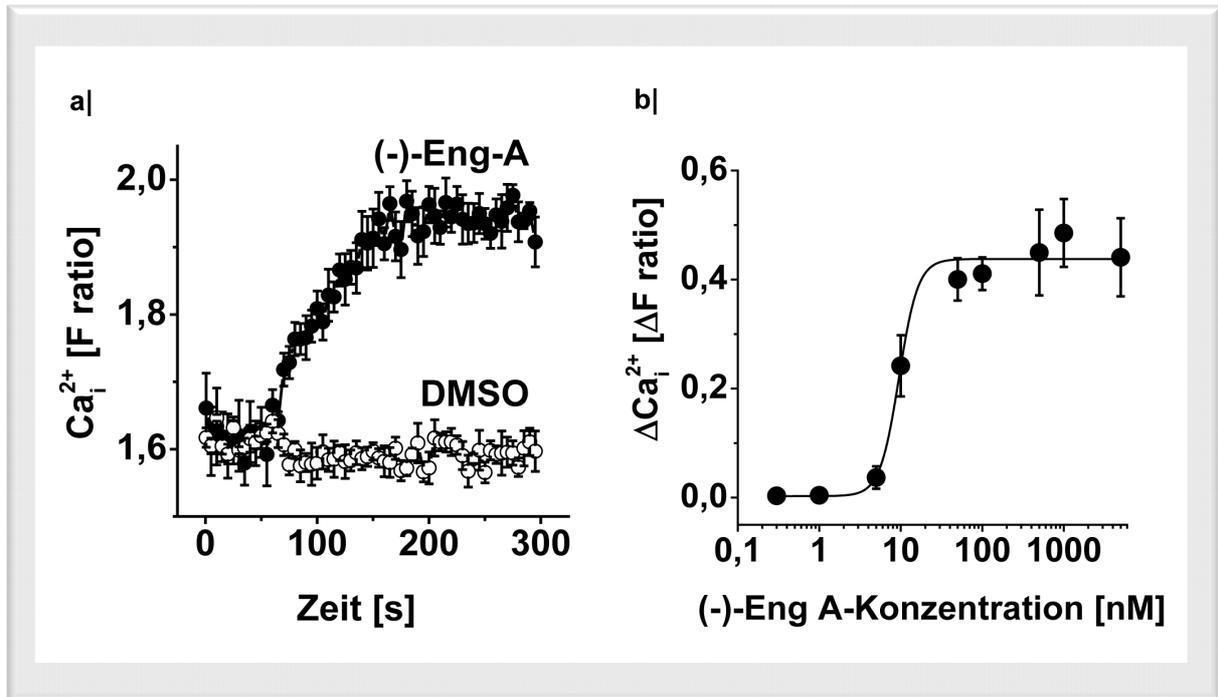


Abbildung 4.28: Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen
a) Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen. **b)** Dosis-Wirkungs-Kurve für A498-Zellen. Die Zellen wurden mit Fluo-4 in SBS-Puffer mit Probenecid für 1 h beladen. Anschließend erfolgte die Zugabe von (-)-Englerin A. Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen. Zur Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm gemessen. Die Fluoreszenz ist als absolute Fluoreszenz (a) oder als Änderung dieser Fluoreszenz [ΔF] dargestellt (b). Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate \pm Standardabweichung.

Bei der Zugabe von (-)-Englerin A konnte eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen demonstriert werden. Diese Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen, die für das initiale Testsystem zur Ca^{2+} -Detektion in A498-Zellen (Abschnitt 4.2.8.1) erhalten wurden. Im Vergleich zur Lösemittelkontrolle konnte für (-)-Englerin A ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration um das 1,25-fache festgestellt werden. Der ermittelte EC_{50} -Wert lag bei 9,5 nM und entspricht in etwa dem für die HEK293-TRPC4/5 Zellen ermittelten EC_{50} -Wert. Mit Hilfe dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass (-)-Englerin A auch in den A498-Zellen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt.

4.3.5 Effekte von (-)-Englerin A auf Ionenkanäle in A498-Zellen

Im nächsten Schritt wurden die Effekte des Naturstoffes auf die Ionenströme in A498-Zellen untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe eines *whole cell patches*. Hierbei wurde erneut die gesamte Zelle gepatcht, und die Zugabe von (-)-Englerin A, ML204 oder DMSO erfolgte extrazellulär. Die Messung der Ionenströme fand bei einer Spannung von jeweils -100 mV und +100 mV statt (**Abbildung 4.29a**). Des Weiteren wurde für die A498-Zellen eine Strom-Spannungs-Kurve erstellt (**Abbildung 4.29b**).

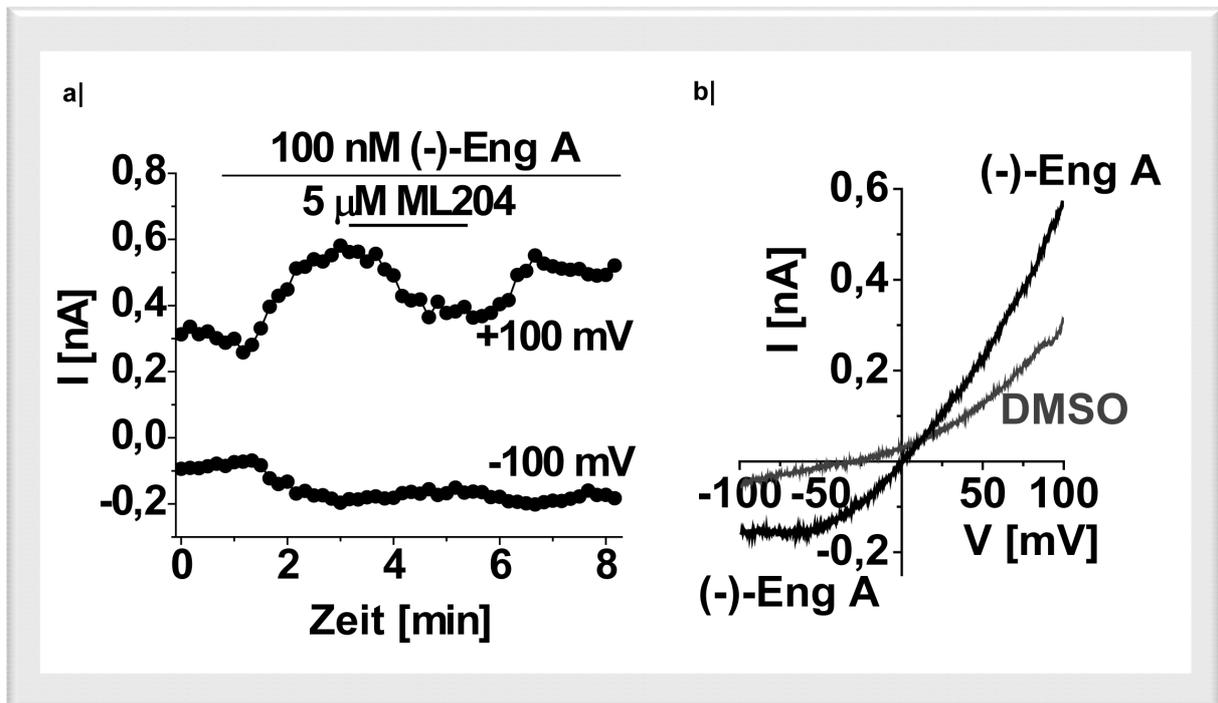


Abbildung 4.29: Effekte von (-)-Englerin A auf Ionenkanäle in A498-Zellen

a) Ionenströme eines *whole-cell patches*. b) Strom-Spannungs-Kurve eines *whole-cell patches*. Die Pipette wurde mit einer Standard-Pipetten-Lösung befüllt. Als extrazelluläre Lösung diente SBS-Puffer. Die Zugabe von (-)-Englerin A, ML204 oder DMSO erfolgte extrazellulär. Die Ionenströme wurden bei einer Spannung von -100 mV und + 100 mV (a) oder bei einer Spannung von -100 mV bis + 100 mV aufgezeichnet (b). Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Die Ergebnisse der Ionenströme in Abbildung 4.29a zeigten einen Stromfluss durch die Membran bei Behandlung mit (-)-Englerin A. Bei einer Substanzkonzentration von 100 nM konnte eine Stromstärke von bis zu 0,6 nA (+100 mV) und -0,2 (-100 mV) beobachtet werden. Nach Zugabe von (-)-Englerin A wurde direkt ML204 appliziert, welches zu einer sofortigen Abnahme des Stroms führte. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass (-)-Englerin A selektiv endogene TRPC4-Kanäle aktiviert. Die Strom-Spannungs-Kurve zeigte allerdings nicht die für TRPC4 typische "Sesselform", welche in Abschnitt 4.3.2 für HEK293-TRPC4 demonstriert werden konnte. Dies lag vermutlich daran, dass durch eine TRPC4-Überexpression in HEK293-Zellen überwiegend TRPC4-Homomere gebildet wurden und somit die für TRPC4 typische "Sesselform" zustande kam. Bei A498-Zellen dagegen, handelt es sich um endogene TRPC4-Kanäle, die vermutlich neben Homomeren auch Heteromere bilden.

Eine mögliche Erklärung für die Strom-Spannungs-Kurve ist, dass in A498-Zellen TRPC4-Proteine mit endogen exprimierten TRPC1-Kanälen, welche nicht in der Lage sind, selbständig funktionale Kanäle zu bilden, gemeinsam mit TRPC4 Heterotetramere bilden und dadurch der für TRPC4 typische "Fingerabdruck" d.h die "Sesselform" hier nicht detektiert werden konnte.^{[173],[178]} Um diese Hypothese im Weiteren zu untersuchen war es notwendig, TRPC4 zusammen mit TRPC1 in HEK293-Zellen zu exprimieren. Dazu wurden genetisch modifizierte HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit TRPC4 transfiziert waren. Zusätzlich konnte die TRPC1-Expression in diesen Zellen durch die transiente Transfektion von TRPC1

gewährleistet werden. Die TRPC4-Expression wurde für 24 h mit Tetrazyklin induziert. Die Messung der Ionenströme erfolgte auch hier mittels *whole-cell patch*. Die Zugabe von (-)-Englerin A, ML204 oder DMSO erfolgte extrazellulär. Die Ionenströme wurden bei einer Spannung von jeweils -100 mV und +100 mV gemessen (**Abbildung 4.30a**). Auch hier konnte für HEK293-TRPC4/1 eine Strom-Spannungs-Kurve ermittelt werden (**Abbildung 4.30b**).

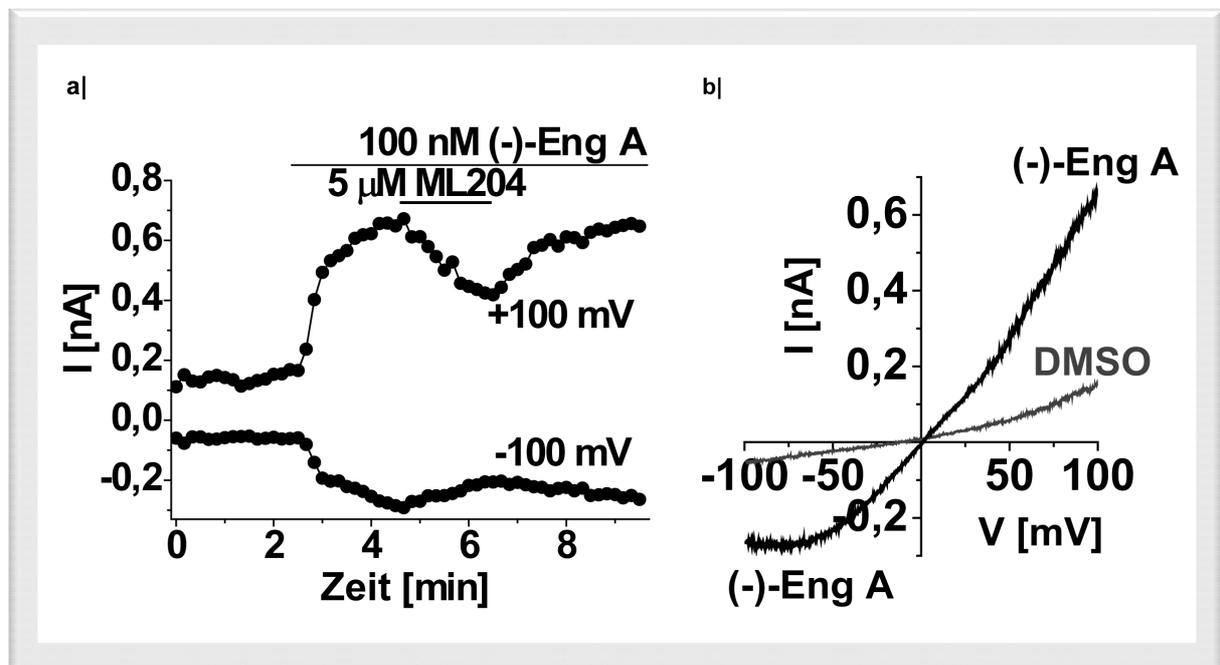


Abbildung 4.30: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Ionenströme in HEK293-TRPC4/1-Zellen

a) Ionenströme eines *whole-cell patches*. b) Strom-Spannungs-Kurve eines *whole-cell patches*. Für die Untersuchungen wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit TRPC4 transfiziert waren und für die TRPC4-Expression für 24 h mit Tetrazyklin induziert wurden. Zusätzlich wurden dieselben Zellen transient mit TRPC1 transfiziert, um so die Heterotetramerbildung zwischen TRPC4 und TRPC1 zu gewährleisten. Die Pipette wurde mit einer Standard-Pipetten-Lösung befüllt. Als extrazelluläre Lösung diente SBS-Puffer. Die Zugabe von (-)-Englerin A, ML204 oder DMSO erfolgte extrazellulär. Die Ionenströme wurden bei einer Spannung von -100 mV und + 100 mV (a) oder bei einer Spannung von -100 mV bis + 100 mV aufgezeichnet (b). Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Die Ergebnisse in Abbildung 4.30a zeigten nach Zugabe der Testsubstanz sehr ähnliche Ströme zu denen in A498-Zellen (Abbildung 4.29a). Auch hier konnte ein Stromfluss durch die Membran und damit durch TRPC4/1-Kanäle bei Behandlung mit (-)-Englerin A gemessen werden. Bei einer Substanzkonzentration von 100 nM konnte ein Stromstärke bis zu 0,6 nA (+100mV) und -0,2 (-100 mV) beobachtet werden. Nach Zugabe von (-)-Englerin A wurde direkt ML204 appliziert, welches zu einer sofortigen Abnahme des Ionenstroms führte und sich mit den Beobachtungen in A498-Zellen deckt. Die detektierte Strom-Spannungs-Kurve zeigte denselben Verlauf wie in A498-Zellen (Abbildung 4.29b). Auch hier konnte kein für TRPC4 typischer "Fingerabdruck" bzw. "Sesselform" identifiziert werden. Dadurch, dass die Strom-Spannungs-Kurve in HEK293-TRPC4/1-Zellen mit der für in A498-Zellen ermittelten

sehr ähnlich war lag die Vermutung sehr nahe, dass (-)-Englerin A in A498-Zellen auch TRPC4/1-Heterotetramere aktiviert.

4.3.6 Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5

Die Analyse endogener TRPC4-Kanäle in A498-Zellen weisen auf eine mögliche Heterotetramerbildung zwischen TRPC4 und TRPC1 hin (Abschnitt 4.3.5). Weitere Literaturrecherchen ergaben, dass auch eine Heterotetramerbildung zwischen TRPC4/1 und TRPC5 möglich ist.^{[171],[178]} Die Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen diesen drei Ionenkanälen erfolgte durch Co-Immunpräzipitation (Co-IP) sowohl in A498-Zellen als auch in HS578-T-Zellen. Die Untersuchung der HS578-T-Zellen war interessant, da diese Brustkrebszelllinie gegenüber (-)-Englerin A ebenfalls sehr sensitiv ist. Die Untersuchungen sollten sich auf A498-Zellen und HS578-T-Zellen konzentrieren um den gemeinsamen Faktor zu bestimmen, der beide Zelllinien gegenüber dem Naturstoff sensitiv macht.

Hierzu wurden zunächst Lysate hergestellt und die Co-Immunpräzipitation mit einem spezifischen TRPC4-Antikörper durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.7.3). Die Analysen erfolgten im Immunoblot-Verfahren mit spezifischen Antikörpern gegen TRPC4, TRPC1 und TRPC5. Als Kontrolle diente der spezifische TRPC4-Nachweis in den Lysaten sowohl vor der Co-Immunpräzipitation als auch danach (**Abbildungen 4.31 und 4.32**).

Die Ergebnisse für die TRPC4-Co-IP mit A498-Lysaten zeigten eine erfolgreiche Immunpräzipitation (IP) für TRPC4 (Abbildung 4.31a). Hier konnte eine deutliche Anreicherung des TRPC4-Proteins im Gegensatz zu dem A498-Lysat vor der IP nachgewiesen werden. In derselben Co-IP-Probe konnten auch TRPC1 und TRPC5 detektiert werden.

Auch wenn in den vorstehend beschriebenen das TRPC5-Protein in den A498-Zellen nicht detektiert werden konnte (Abschnitt 4.2.9), wurde der Nachweis durch die Anreicherung während der Co-IP erbracht. Sowohl der Nachweis von TRPC1 als auch TRPC5 waren starke Hinweise für die Interaktion von TRPC4 mit diesen beiden Kanälen in den A498-Zellen.

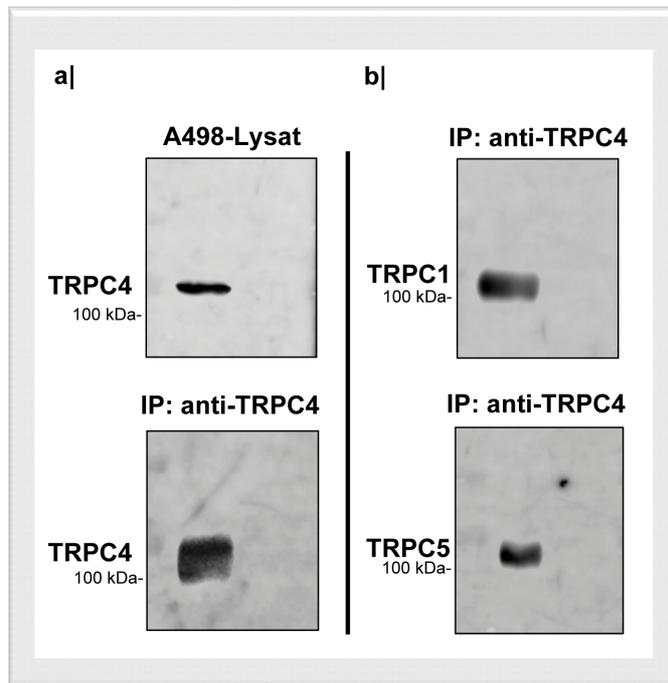


Abbildung 4.31: Untersuchungen zur Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5 in A498-Zellen

Die Zellen wurden zunächst mit m-RIPA-Puffer lysiert und anschließend gemeinsam mit einem spezifischen TRPC4-Antikörper und magnetischen Protein A/G-Kügelchen für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Protein A/G-Kügelchen wurden diese in SDS-Probenpuffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich erfolgte die Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis von TRPC4, TRPC1, TRPC5 und α -Tubulin erfolgte mittels Immunoblot mit spezifischen Antikörpern. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal® West Femto Reagenzes. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate. Als Kontrolle diente der TRPC4-Nachweis in Lysaten vor und nach der Co-IP (a). b) Co-IP mit TRPC4-spezifischem Antikörper.

Auch für die Brustkrebszelllinie HS578-T konnte eine Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5 nachgewiesen werden. Hierbei konnte nach erfolgreicher TRPC4-IP, eine Anreicherung für TRPC1 und TRPC5 detektiert werden. Wie bereits für die A498-Zelllinie (Abschnitt 4.2.9) konnte zuvor in der Brustkrebszelllinie kein TRPC5-Protein im Lysat nachgewiesen werden, da vermutlich das Protein in geringen Mengen exprimiert war. Obwohl keine Aussage über die Formatierung und die mögliche Heterotetramerbildung dieser drei Ionen-Kanäle gemacht werden konnte, wiesen diese Versuche dennoch eine Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5 in A498- und HS578-T-Zellen nach.

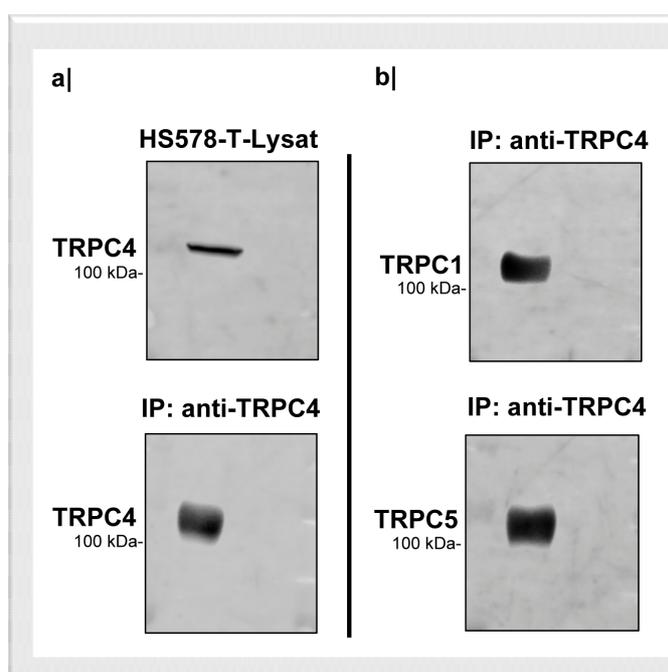


Abbildung 4.32: Untersuchungen zur Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5 in HS578-T-Zellen

Die Zellen wurden zunächst mit m-RIPA-Puffer lysiert und anschließend gemeinsam mit einem spezifischen TRPC4-Antikörper und magnetischen Protein A/G-Kügelchen für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Protein A/G-Kügelchen wurden diese in SDS-Probenpuffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich erfolgte die Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis von TRPC4, TRPC1, TRPC5 und α -Tubulin erfolgte mittels Immunoblot mit spezifischen Antikörpern. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal® West Femto Reagenzes. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate. Als Kontrolle diente der TRPC4-Nachweis in Lysaten vor und nach der Co-IP (a). b) Co-IP mit TRPC4-spezifischem Antikörper.

4.3.7 Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität in Abhängigkeit von Ca^{2+}

Die Aktivierung endogener TRPC4/1- oder überexprimierter TRPC4-Kanäle führt zu einem starken Ca^{2+} -Influx und resultiert in einer Ca^{2+} -Überladung. Dies könnte letzten Endes im Zelltod durch die Nekrose resultieren. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen zum Zelltod führen können.^[179] Um das zu überprüfen, wurden Versuche zur Zellviabilität in A498-Zellen unter Verwendung von EGTA als Kalzium-Chelator durchgeführt. Hierzu wurden zunächst verschiedene Konzentrationen an EGTA gemeinsam mit 100 nM (-)-Englerin A in MEM-Medium eingesetzt, das 1,8 mM CaCl_2 enthielt. Danach erfolgten sowohl die Substanzzugabe zu den Zellen als auch die anschließende, direkte Zugabe des WST-1-Reagenzes und die Messung der Zellviabilität (**Abbildung 4.33a**). Eine direkte Zugabe des Reagenzes war erforderlich, da die Effekte sehr schnell sind und diese unter Standardbedingungen nicht detektierbar waren. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit EGTA, jedoch nicht mit (-)-Englerin A, behandelt wurden. In einem weiteren Ansatz erfolgten die Versuche zur Zellviabilität mit verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen. Dazu erfolgte die Inkubation der Zellen zunächst für 24 h in Medium mit 1,8 mM CaCl_2 oder 180 μM CaCl_2 . Nach Zugabe von verschiedenen (-)-Englerin A-Konzentrationen fand auch hier eine anschließende direkte Zugabe des WST-1-Reagenzes und die Messung der Zellviabilität statt (**Abbildung 4.33b**).

Die Ergebnisse beider Versuche zeigten, dass die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration einen von (-)-Englerin A abhängigen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Bei Verwendung des Ca^{2+} -Chelators EGTA konnte ein konzentrationsabhängiger, abmildernder Effekt auf die Viabilität beobachtet werden. Die durch (-)-Englerin A verursachte Abnahme der Zellviabilität konnte durch steigende EGTA-Konzentrationen reduziert werden. Die zu Beginn relativ niedrige Zellviabilität von 30 % (180 μM EGTA) zeigte einen stetigen Anstieg bis zu einer Zellviabilität von 70 % (18 mM EGTA). Bei der Verwendung zweier verschiedener extrazellulärer Konzentrationen von CaCl_2 , die sich um den Faktor 10 unterschieden, konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Hier konnte eine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve für die Zellviabilität ermittelt werden. Die Reduktion der CaCl_2 -Konzentration im Zellkulturmedium von 1,8 mM auf 180 μM resultierte in einem 10-fach höheren IC_{50} -Wert für die Inhibierung der Zellviabilität als bei Verwendung von 180 μM CaCl_2 . Während der IC_{50} -Wert bei Verwendung von 180 μM CaCl_2 bei 77,7 nM lag, nahm dieser bei Verwendung von 1,8 mM CaCl_2 auf 7,5 nM ab. Die Ergebnisse beider Versuche zeigten, dass eine Reduktion der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Anwesenheit von (-)-Englerin A in einer höheren Viabilität von A498-Zellen resultieren.

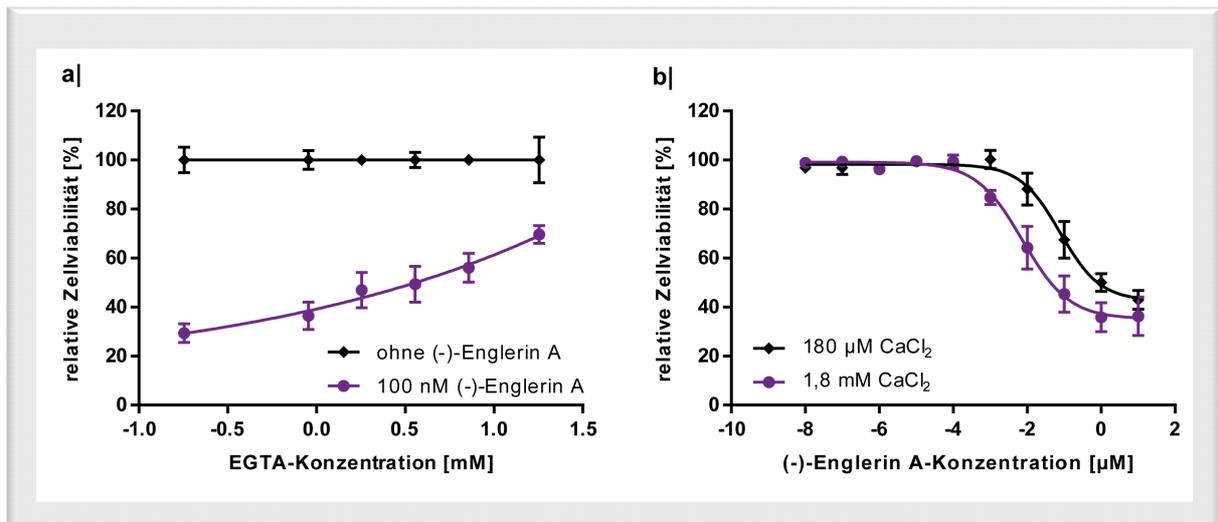


Abbildung 4.33: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität in A498-Zellen in Abhängigkeit von Ca²⁺

a) Effekte auf die Zellviabilität unter Verwendung von EGTA. Verschiedene EGTA-Konzentrationen wurden gemeinsam mit 100 nM (-)-Englerin A in MEM-Medium angesetzt und zu den Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die direkte Zugabe des WST-1-Reagenzes nach Herstellerangaben und die Bestimmung der Absorption bei 450 nm. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (100 %) dargestellt. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate ± Standardabweichung. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

b) Effekte auf die Zellviabilität unter Verwendung verschiedener CaCl₂-Konzentrationen. Zellen wurden 24 h zuvor in MEM-Medium mit 1,8 mM CaCl₂ oder in S-MEM-Medium mit 180 µM CaCl₂ inkubiert. Danach erfolgte die Substanzzugabe in verschiedenen Konzentrationen und die direkte Zugabe des WST-1-Reagenzes nach Herstellerangaben. Die Bestimmung der Absorption erfolgte bei 450 nm. Die Werte sind relativ zur DMSO-Kontrolle (100 %) dargestellt. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde mit Hilfe einer nicht-linearen Regression ermittelt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

4.3.8 Einfluss von (-)-Englerin A auf die Mitochondrien

Der (-)-Englerin A-abhängige starke Ca²⁺-Einstrom bzw. die Ca²⁺-Überladung der Zelle führt zum Zelltod. In diesem Zusammenhang war es interessant zu untersuchen, welcher Mechanismus zu dem Ca²⁺-abhängigen Zelltod führt. Hierbei sollte genauer analysiert werden, was die hohe intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration in der Zelle bewirkt. Die Literaturrecherche zu Ca²⁺-assoziiertem Zelltod ergab, dass hierbei höchstwahrscheinlich das mitochondriale Membranpotential beeinflusst wird.^[180] Dabei führt eine hohe intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration zur Depolarisation der mitochondrialen Membran und damit zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, wodurch der Zelltod ausgelöst wird.^{[181],[182]} Um den Einfluss von (-)-Englerin A auf die Mitochondrien zu untersuchen, wurden A498-Zellen mit dem Mitotracker Deep Red 633, welcher die Mitochondrien anfärbt, in Medium ohne FBS für 30 min beladen und anschließend für verschiedene Zeiten mit 10 nM (-)-Englerin A oder DMSO als Kontrolle behandelt und analysiert (**Abbildung 4.34**). Bei Behandlung der Zellen mit dem Naturstoff konnte bereits nach 5 min eine veränderte Morphologie der Mitochondrien im Vergleich zu Zellen festgestellt werden, die mit DMSO behandelt wurden. Während die Mitochondrien der

Kontrollzellen eine homogene Verteilung über die gesamte Zelle aufwiesen, zeigten Zellen, welche mit der Testsubstanz behandelt wurden, eine Art Präzipitation um den Zellkern. Diese Präzipitation konnten für alle Behandlungszeiten von 5 min bis 1 h deutlich nachgewiesen werden, wobei der Effekt bei 1 h weniger stark war als im Vergleich zu den anderen Behandlungszeiten. Diese Veränderungen in der Morphologie der Mitochondrien bei Behandlung mit (-)-Englerin A waren ein starker Hinweis darauf, dass die Mitochondrien beeinflusst werden, welches sich in einer Veränderung der Morphologie der Mitochondrien äußerte.

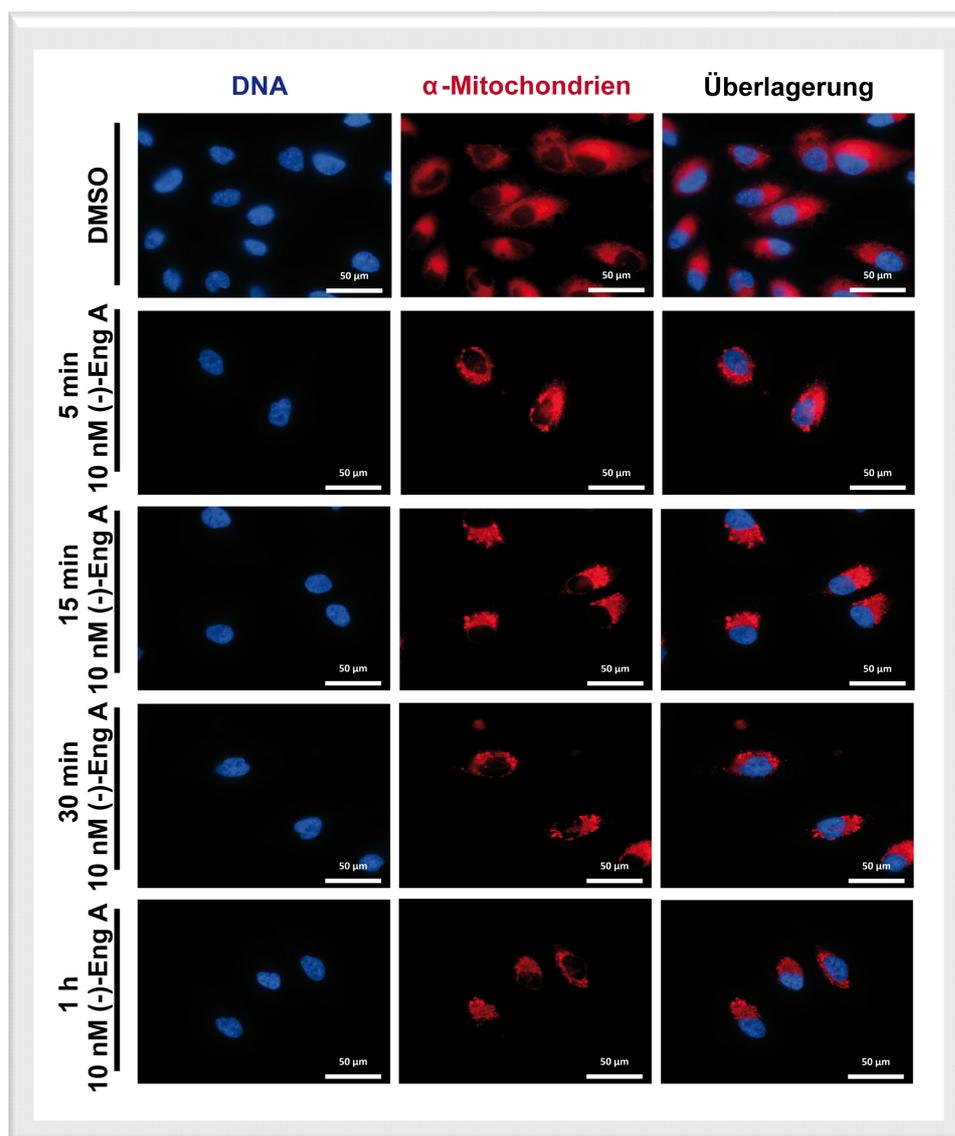


Abbildung 4.34: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Mitochondrien in A498-Zellen

Die Zellen wurden mit dem Mitotracker Deep Red 633 für 30 min inkubiert und anschließend für verschiedene Zeiten mit 10 nM (-)-Englerin A behandelt. Danach erfolgten die Fixierung der Zellen und die Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Die Zellen wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit einem 63x Öl-Objektiv analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

4.3.9 Untersuchungen zu PKC θ als Zielprotein von (-)-Englerin A

In der vorliegenden Arbeit wurden TRPC4/5-Kanäle als Zielproteine identifiziert und bereits publiziert.^[183] Das einzige bekannte Zielprotein von (-)-Englerin A ist die Proteinkinase C Typ Theta (PKC θ).^[81] Um eine Sensitivität gegenüber (-)-Englerin A zu erzielen ist neben der PKC θ -Expression die Expression von HSF-1 (Heat shock factor 1) notwendig. Da insgesamt acht Nierenkrebszelllinien und eine Brustkrebszelllinie gegenüber (-)-Englerin A sensitiv sind, war es wichtig, zunächst die Expression von PKC θ und HSF-1 in diesen Zelllinien zu überprüfen. Außerdem sollten auch HEK293-Zellen auf die endogene PKC θ - und HSF-1-Expression untersucht werden. Dafür wurde zunächst sowohl die PKC θ -Expression als auch die HSF-1-Expression auf mRNA-Ebene untersucht (**Abbildung 4.35**). Hierzu wurden spezifische PKC θ -, HSF-1- und GAPDH-Oligonukleotide als Kontrolle entworfen und die Expression auf mRNA-Ebene mittels Gelelektrophorese untersucht. Zusätzlich wurde die PKC θ - und HSF-Proteinexpression mittels Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen PKC θ , HSF-1 und α -Tubulin als Beladungskontrolle behandelt (**Abbildungen 4.36 und 4.37**).

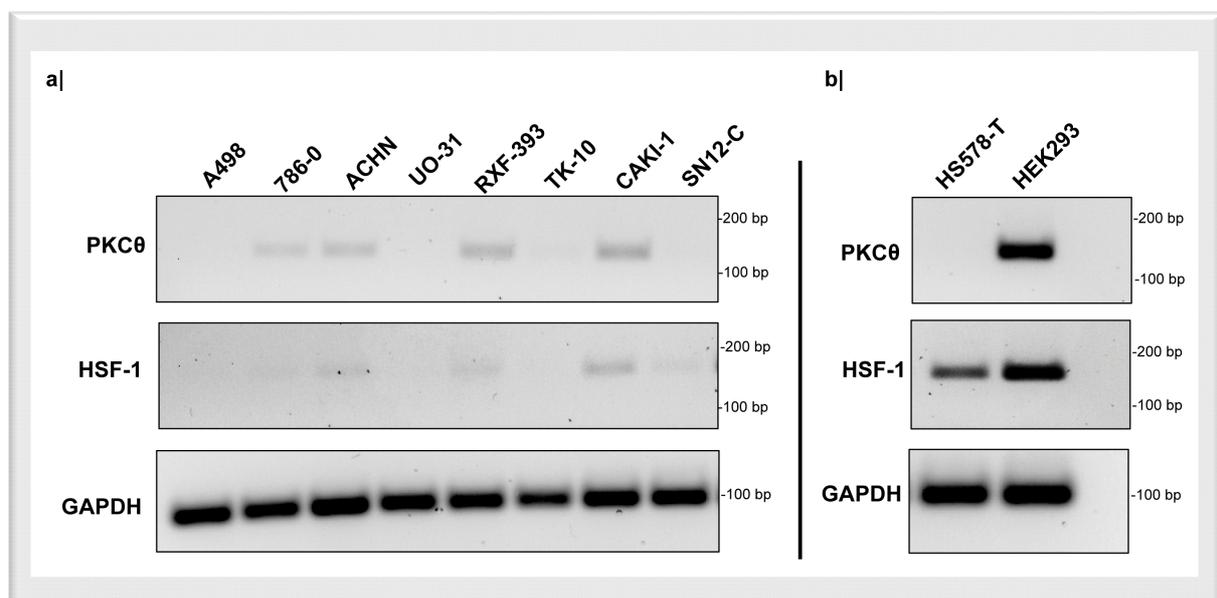


Abbildung 4.35: Nachweis von PKC θ - und HSF-1 auf mRNA-Ebene in verschiedenen Zelllinien

Zunächst wurde die Gesamt-RNA isoliert und die cDNA hergestellt. Die Amplifikation der Gene erfolgte mittels PCR unter der Verwendung spezifischer Oligonukleotide für PKC θ , HSF-1 und GAPDH (Kontrolle). Die Auftrennung und Untersuchung der DNA erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese für Nierenkrebszellen (a) und HS578-T- und HEK293-Zellen (b). Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Während für die Zelllinien A498, UO-31 und TK-10 kein PKC θ -Produkt detektiert werden konnte, war die Expression in den anderen Zelllinien sehr schwach. Eine schwache HSF-1-Expression konnte nur in CAKI-1-Zellen festgestellt werden, wobei alle anderen Zelllinien einer sehr schwachen bis keine Expression aufwiesen.

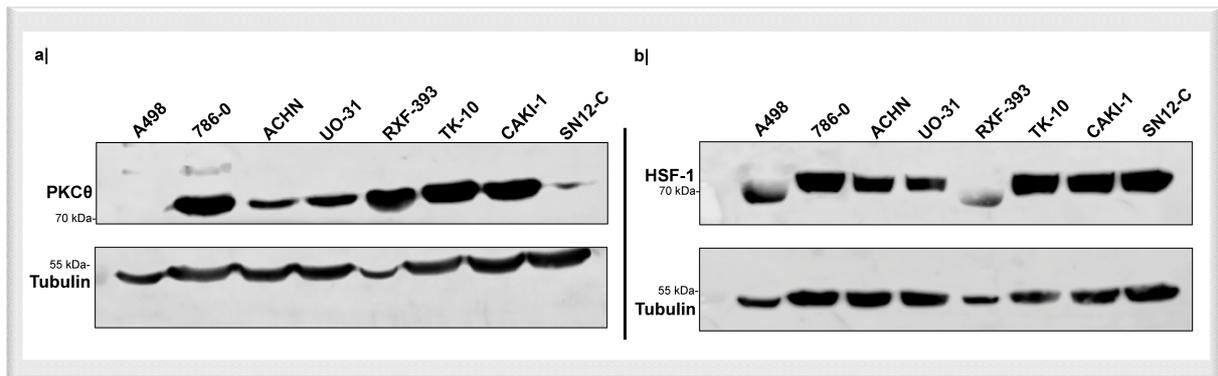


Abbildung 4.36: Nachweis von PKC θ und HSF-1 auf Proteinebene in verschiedenen Nierenkrebszelllinien
Die Zellen wurden zunächst mit dem m-RIPA-Puffer lysiert und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Danach wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Nachweis von PKC θ , HSF-1 und α -Tubulin mittels Immunoblot wurden spezifische Antikörper verwendet. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal[®] West Femto Reagenzes. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Lediglich im Fall der Brustkrebszelllinie HS578-T konnte eine deutliche Expression für HSF-1 beobachtet werden, während PKC θ -mRNA auch hier nicht nachgewiesen werden konnte. Ein sehr interessantes Ergebnis konnte für die HEK293-Zellen festgestellt werden. Hier konnte eine sehr starke Expression sowohl für PKC θ als auch für HSF-1 detektiert werden. Auf Proteinebene konnte für alle getesteten Zelllinien bis auf die A498-Zelllinie eine deutliche PKC θ -Expression nachgewiesen werden. Das HSF-1-Protein war dagegen in alle Zelllinien detektierbar. Diese Ergebnisse deckten sich nicht mit den mRNA-Mengen, da beide Methoden höchstwahrscheinlich eine unterschiedliche Nachweisgrenze besitzen und dementsprechend auch unterschiedlich sensitiv sind. Außerdem spielte vermutlich eine unterschiedliche Regulierung der Proteine in den untersuchten Zelllinien eine Rolle.

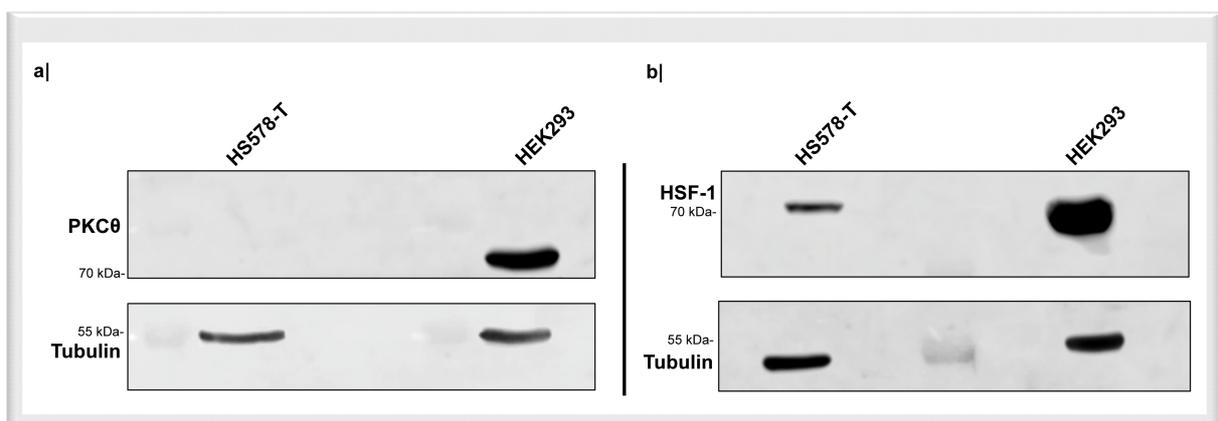


Abbildung 4.37: Nachweis von PKC θ und HSF-1 auf Proteinebene in HS578-T- und HEK293-Zellen
Die Zellen wurden zunächst mit dem m-RIPA-Puffer lysiert und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgeköcht. Danach wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Nachweis von PKC θ , HSF-1 und α -Tubulin mittels Immunoblot wurden spezifische Antikörper verwendet. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und die Detektion erfolgte mit Hilfe des SuperSignal[®] West Femto Reagenzes. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei biologische Replikate.

Die Expression der beiden untersuchten Proteine in HS578-T- und HEK293-Zellen dagegen deckten sich mit der Expression auf mRNA-Ebene. Hier konnte eine starke Expression von

HSF-1, jedoch keine für PKC θ nachgewiesen werden. Die Untersuchungen von HEK293-Zellen zeigten wie bereits auf mRNA-Ebene eine deutliche Expression sowohl des PKC θ -Proteins als auch des HSF-1-Proteins. Insgesamt konnte aus diesen Versuchen geschlossen werden, dass PKC θ nicht als Zielprotein in allen getesteten Zelllinien in Frage kommt, da A498-Zellen unter den getesteten Bedingungen kein PKC θ exprimierten oder nicht nachgewiesen werden konnte. Auch in der (-)-Englerin A-sensitiven Brustkrebszelllinie HS578-T scheint PKC θ nicht das Zielprotein zu sein, da hier kein HSF-1 exprimiert wurde, dieses jedoch laut Sourbier *et al.*^[81] für die Ausprägung des Phänotyps notwendig ist. Hinzu kommt, dass die HEK293-Zelllinie, die gegenüber dem Naturstoff nicht sensitiv ist, bereits eine starke endogene Expression sowohl von PKC θ als auch HSF-1 aufwies und diese somit nicht als Zielproteine in Frage kommen konnten. Sourbier *et al.* konnten eine Aktivierung für PKC θ mit Hilfe eines *in vitro* Testsystems demonstrieren. Um dies zu überprüfen wurde PKC θ in der vorliegenden Arbeit als mögliches Zielprotein in einer *in vitro* Kinase-Profilierung getestet. Die Profilierung erfolgte durch die Firma Life Technologies bei einer (-)-Englerin A-Konzentration von 1 μ M (siehe Abschnitt 3.2.9). Unter den getesteten Bedingungen konnte keine PKC θ -Aktivierung durch den Naturstoff nachgewiesen werden. Insgesamt konnte PKC θ als ein gemeinsames Zielprotein für alle getesteten (-)-Englerin A-sensitiven Zelllinien ausgeschlossen werden.

Kapitel 5

Diskussion

Der Naturstoff (-)-Englerin A ist ein Guanin-Sesquiterpen und wurde 2009 mit Hilfe eines Testsystems zur Zytotoxizität von Ratnayake *et al.*^[78] in einem systematischen Screen mit 60 verschiedenen Zelllinien identifiziert. Im Rahmen dieser Studien zeigte die Substanz eine 1000-fach höhere, selektive Wachstumsinhibierung im niedrigen nanomolaren Bereich für Nierenkrebszelllinien im Vergleich zu anderen Krebszelllinien. Durch diese Kombination stellt (-)-Englerin A einen potentiellen Kandidaten als Medikament für die Behandlung von Nierenkrebs dar.

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Wirkungsmechanismus von (-)-Englerin A zu entschlüsseln und dabei mögliche Zielproteine zu identifizieren und zu validieren.

5.1 Biologische Aktivität von (-)-Englerin A

Als Ausgangspunkt für die Arbeit wurde zunächst die biologische Aktivität von (-)-Englerin A in verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierzu wurden vier Nierenkrebszelllinien (A498, 786-0, ACHN und UO-31) und die Brustkrebszelllinie HS578-T ausgewählt, die gegenüber dem Naturstoff sensitiv sind.^[78] Der Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität wurde zunächst in einer Endpunktmessung nach 48 h analysiert. Für fast alle getesteten Zellen konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität im nanomolaren Bereich nachgewiesen werden. Die Zellviabilität von A498-, ACHN- und HS578-T-Zellen wurde bei einer Substanzkonzentrationen von 2 μM (A498- und ACHN-Zellen) und 200 nM (HS578-T-Zellen) bis auf ca. 25 % gesenkt, wohingegen die UO-31-Zellen sehr sensitiv auf die (-)-Englerin A-Behandlung reagierten ($\text{IC}_{50} < 5 \text{ nM}$). Dabei wurde die Zellviabilität bei einer Substanzkonzentration von 100 nM auf nahezu 0 % reduziert. Die UO-31-Zelllinie war in dieser Studie die sensitivste Zelllinie gegenüber (-)-Englerin A. Lediglich 786-0-Zellen zeigten eine relativ geringe Sensitivität ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$) gegenüber dem Naturstoff. Die für (-)-Englerin A ermittelten IC_{50} -Werte für die untersuchten Zelllinien stimmen im größten Teil mit den publizierten Daten von Ratnayake *et al.*^[78] überein. In der Publikation wurde eine starke Aktivität des Naturstoffes für die Zelllinien A498, ACHN und UO-31 ($\text{IC}_{50} < 10 \text{ nM}$) beschrieben. Allerdings zeigte (-)-Englerin A auch hier eine starke Aktivität in 786-0-Zellen ($\text{IC}_{50} < 10 \text{ nM}$), die in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Aktuellere Studien konnten die beschriebene nanomolare Aktivität von (-)-Englerin A in 786-0-Zellen nicht bestätigen und weisen eine geringere (-)-Englerin A-Aktivität für 786-0-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von 1,1 μM auf.^[184] Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das Nierenzellkarzinom

eine heterogene Gruppe von Tumoren darstellt,^[185] wobei subklonale Mutationen eine Substanzresistenz hervorrufen können.^[186]

Die Etablierung der Totalsynthese und die Bestimmung der absoluten Konfiguration für (-)-Englerin A.^[79] Dadurch können u. a. funktionelle Gruppen bestimmt werden, die für die biologische Aktivität notwendig sind. Der Einfluss der einzelnen Gruppen auf die biologische Aktivität wurde im Vorfeld anhand von 32 Derivaten untersucht und publiziert.^[80] Dabei wurden der Zimtsäurerest, die Isopropylgruppe und der Glykolsäureester modifiziert. Modifikationen des Zimtsäureesters sind hauptsächlich positiv für die Potenz der Substanz, während ein Austausch der Isopropylgruppe gegen eine Methyl- oder Ethylgruppe zu einer 100-fachen bzw. 20-fachen Aktivitätsabnahme im Vergleich zu (-)-Englerin A führt. Die Aktivität der Substanz ist gegenüber Modifikationen im Glykolsäureester sehr sensitiv. Dabei resultiert die Methylierung der Hydroxylgruppe in einer 14-fachen Abnahme der Substanzaktivität. Im Rahmen dieser Studien wurden drei Englerin A-Derivate synthetisiert, die gegenüber (-)-Englerin A in A498-Zellen eine stärkere zytotoxische Aktivität als der Naturstoff (IC_{50} von 45 nM) selbst zeigen (IC_{50} von ca. 25 nM).^[80]

In der vorliegenden Arbeit wurde eine zweite Generation von Struktur-Aktivitäts-Analysen durchgeführt, um eventuell potentere Derivate als die bis dato aktivsten (-)-Englerin A-Derivate zu synthetisieren. Die Synthese der (-)-Englerin A-Derivate erfolgte durch Dr. Lea Radtke und Dr. Matthieu Willot (TU Dortmund). Die hergestellten Substanzen wurden auf ihre zytotoxische Aktivität untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass weitere Modifikationen im Zimtsäurerest zu weitaus aktiveren Derivaten führen. Die im Rahmen dieser Studien getesteten Substanzen weisen bis auf zwei Derivate IC_{50} -Werte von weniger als 100 nM auf. Die aktivsten Substanzen erreichen eine bemerkenswerte Potenz (IC_{50} = 9 und 15 nM) durch den Austausch des Zimtsäurerestes gegen eine Methyltetrahydronaphthylgruppe oder eine Methylnaphthylgruppe. Sie stellen somit die bisher aktivsten (-)-Englerin A-Derivate dar und sind zugleich potenter als der Naturstoff selbst. Im Vergleich dazu führt der Austausch des Zimtsäurerests durch eine Decalgruppe zu einer Aktivitätsabnahme um den Faktor 3 (IC_{50} = 52 nM) im Vergleich zu der Methylnaphthylgruppe in dieser Position und führt beim Austausch gegen eine Tetrahydronaphthylgruppe zu einer inaktiven Verbindung (IC_{50} > 10 μ M). Auch die Ausstattung mit einer Diazirinegruppe anstelle des Zimtsäurerests resultiert in einer relativ starken Aktivität der Substanz (IC_{50} = 33 nM). Hingegen führt eine Kombination aus der Diazirinegruppe und einem zusätzlichen Austausch des Glykolsäureesters durch eine Hydroxylgruppe wiederum zu einer nicht aktiven Substanz (IC_{50} > 10 μ M). Anhand dieser Studien wurde gezeigt, dass sich Modifikationen im Zimtsäurerest hauptsächlich positiv auf die Substanzaktivität auswirken, während Veränderungen an der Glykolester-Seitenkette in

einer deutlichen Abnahme der Aktivität resultieren. Durch die Kombinationen der Eigenschaften aller aktiven Derivate wurde eine zweite Generation mit noch aktiveren Derivaten synthetisiert.

Neben der Überprüfung von (-)-Englerin A-Effekten auf die Zellviabilität verschiedener Zelllinien wurde auch der zeit- und konzentrationsabhängige Einfluss der Substanz in A498-Zellen untersucht und das Verhalten adhärenter Zellen in einer Echtzeitanalyse der Impedanzänderung über die Zeit vermessen. Dabei wurden Änderungen mit Hilfe des definierten Zellindex analysiert. (-)-Englerin A zeigte sowohl eine konzentrationsabhängige- als auch zeitabhängige Wirkung auf den Zellindex. Die Verwendung relativ hoher Substanzkonzentrationen von 1 und 10 μM führte innerhalb von zwei bis drei Stunden zu einer 50 %igen Reduktion des Zellindex, der sich im Laufe von weiteren 48 h nicht erholen konnte. Niedrigere Konzentrationen von (-)-Englerin A (10 und 100 nM) wiesen bis zu 30 h nach Substanzzugabe noch relativ starke Effekte auf und führten zu einer deutlichen Abnahme des Zellindex im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Gegensatz zu den verwendeten hohen Substanzkonzentrationen erholten sich die mit (-)-Englerin A behandelten Zellen in nanomolaren Bereich nach einer gewissen Zeit von den Effekten, sodass der Zellindex wieder stieg und sich der Kontrolle annäherte. Auch die geringste Konzentration von noch 1 nM beeinflusste die Zellen und erreichte als einzige nach insgesamt 48 h denselben Zellindex wie die mit DMSO behandelten Zellen.

Diese Ergebnisse verdeutlichten die hohe Potenz der Substanz und erlaubten folglich eine Verkürzung der Inkubationszeit auf 4 h anstelle der initial verwendeten 48h. Die verkürzte Behandlungszeit wurde in zellbiologischen Experimenten zur Zellviabilität und Zytotoxizität überprüft. Eine kurze Behandlungszeit der Zellen für 4 h resultierte in einem IC_{50} -Wert von 17 nM für die Zellviabilität, während der EC_{50} -Werte für die Zytotoxizität bei Behandlungszeiten von 1 und 2 h bei unter 10 nM lagen. Diese Ergebnisse bestätigten die beobachteten (-)-Englerin A-Effekte der Echtzeitanalysen, die innerhalb relativ kurzer Behandlungszeiten auftraten.

Zusätzlich wurden die Effekte von (-)-Englerin A auf morphologischer Ebene mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie in A498-Zellen analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass die Verwendung relativ niedriger Substanzkonzentration von 100 nM bereits nach 5 min eine Veränderung in Zellmorphologie hervorrufen. Es wurde beobachtet, dass sich die Zellen sehr schnell abrunden und in diesem Zustand über die Messdauer verweilen und in den Zelltod übergehen. Außerdem waren die Zellen in ihrer Motilität eingeschränkt und teilten sich nicht mehr über den gesamten Zeitraum. Diese Beobachtungen konnten zusätzlich auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigt werden, wobei die mit (-)-Englerin A behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle

abgerundet waren und einen vergrößerten Zellkern und eine Veränderung in der Zellstruktur aufwiesen. Anhand dieser Untersuchungen konnte festgehalten werden, dass die schnellen Effekte der Verbindung auf morphologischer Ebene bestätigt werden können.

Aus den morphologischen Versuchen, insbesondere der Lebendzell-Mikroskopie, wurden wichtige Erkenntnisse gewonnen, die einen starken Hinweis lieferten, dass die Zellen bei Behandlung mit der Substanz eine bestimmte Form des Zelltodes eingehen. Aufgrund der beobachteten sich ändernden Zellmorphologie wurden verschiedene Formen des Zelltodes wie die Apoptose, Autophagie und Nekrose untersucht. Stark abgerundete Zellen weisen zunächst auf Apoptose hin, für welche auch das Schrumpfen der betroffenen Zellen und der DNA-Abbau charakteristisch sind. Dabei wird das Zytoplasma in Vesikel abgeschnürt und anschließend durch Phagozyten abgebaut.^[140] Für die Untersuchung auf Apoptose wurden die Effektorcaspasen 3 und 7 ausgewählt, die die Aktivierung von zellulären Enzymen regulieren und dadurch zum programmierten Zelltod führen.^[141] Dabei führt die Aktivierung von sekundären Zielproteinen, wie z.B. DNAsen, zur Spaltung der genomischen DNA. Die entstehenden DNA-Fragmente sind typisch für die Apoptose und können als Referenz dienen.^[142] (-)-Englerin A-behandelte A498-Zellen zeigten sowohl bei hohen als auch niedrigen Substanzkonzentrationen für verschiedene Zeiten keine erhöhte Caspase-3/7-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Es ist jedoch zu beachten, dass die Induktion von Apoptose durch (-)-Englerin A in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Sulzmaier *et al.*^[187] zeigten, dass (-)-Englerin A eine Veränderung in der Zellmorphologie von A498- und UO-31-zellen hervorruft, die u.a. zu dem Verlust der Filopodien-Erweiterung und der Abrundung der Zellen führt. Eine Zunahme von apoptotischen Körperchen konnte hier nicht beobachtet werden. Außerdem konnte keine für apoptotische Zellen charakteristische Zunahme der Externalisierung des Phosphatidylserins beobachtet werden. Zusätzlich erfolgte in dieser Studie die Überprüfung der Caspase-3-Aktivität, die PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase) spaltet und aktiviert. PARP ist in den apoptotischen Signalweg involviert.^[188] Dadurch ist die Spaltung und Aktivierung von PARP ein Indikator für eine aktive apoptotische Signalkaskade. Im Rahmen dieser Publikation wurden die Zellen mit 1 µM der Substanz für 1 h und 4 h behandelt und führte in den Analysen zu keiner Spaltung bzw. Aktivierung von der Caspase-3 oder PARP. Um diese Daten zu verifizieren, wurden des Weiteren identische Bedingungen gewählt und A498-Zellen mit (-)-Englerin A behandelt und mit Hilfe eines enzymatischen Testsystem untersucht. Hier konnte die fehlende Caspase-3-Aktivität bestätigt werden.

Williams *et al.*^[189] dagegen zeigte, dass der Naturstoff eine Caspase-unabhängige Apoptose initiiert. Im Vergleich dazu konnten jedoch Histon-assoziierte DNA-Fragmente bei Behandlung mit (-)-Englerin A nach frühestens 24 h detektiert werden und durch die Zunahme von Phosphatidylserin an der äußeren Seite der Plasmamembran mit Hilfe der Durchflusszytometrie verifiziert werden. Da in der vorliegenden Arbeit die Apoptosestudien

Caspase-abhängig waren, kann eine Caspase-unabhängige Apoptose nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur sind Hinweise auf Caspase-unabhängige Proteasen wie z.B. Cathepsine und Calpaine zu finden,^[190] die eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit einem nekrotischen Zelltod stehen.^[191] Cathepsine sind lysosomale Proteasen. In Studien mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Cathepsinaktivität zum Tod des Kleinhirns führt, wenn kein Cystatin B vorhanden ist, welches ein Inhibitor für die Cathepsine B, H, L darstellt.^[192] Somit liegt die Vermutung nahe, dass Cathepsine für den Zelltod verantwortlich sein können. Bei Calpainen dagegen handelt es sich um eine Kalzium-abhängige Protease. Ein weiteres Beispiel sind Brustkrebszellen, bei denen der Zelltod durch Vitamin D-induziert wird und Caspase-unabhängig ist, aber durch Calpaine begünstigt wird.^[193]

Eine weitere Form des Zelltodes, die in der vorliegenden Arbeit untersucht worden ist, ist die Autophagie, bei dem die Zelle zelleigene Bestandteile abbaut, um das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von Zellbestandteilen zu gewährleisten.^[143] Charakteristisch für die Autophagie sind vakuolenförmige Strukturen,^[144] die zuvor auch bei A498-Zellen bei Behandlung mit dem Naturstoff in der Lebendzell-Mikroskopie beobachtet werden konnten. Die Autophagie führt zunächst zur Ausbildung von Phagophoren, aus denen anschließend Autophagosomen gebildet werden, welche schließlich mit Lysosomen fusionieren und zum Abbau des Inhalts führen.^[145]

Die Untersuchungen auf Autophagie wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie von Dr. Markus Grabenbauer und Sabine Dongard durchgeführt. Unter den getesteten Bedingungen konnten für (-)-Englerin A keine Autophagosomen und damit auch keine Autophagie nachgewiesen werden. Der bekannte Autophagieinduktor Rapamycin dagegen zeigte die charakteristische Ausbildung von Autophagosomen, die sich durch den Einschluss von zellulären Organellen auszeichnet. Dieses wurde für (-)-Englerin A-behandelte Zellen nicht beobachtet. Hier wurden leere vakuolenförmige Strukturen gebildet.

Die Publikationen im Zusammenhang von (-)-Englerin A und der Autophagie gelangen zu unterschiedlichen Erkenntnissen. Dabei zeigen Analysen zu Proteinen, die als Indikatoren für Autophagie gelten, keine Hochregulierung dieser Indikatoren bei Behandlung mit dem Naturstoff. Allerdings handelt es sich hier, wie auch in der vorliegenden Arbeit, um relative kurze Behandlungszeiten von 1 h mit 1 μ M Englerin A.^[187] Eine andere Publikation dagegen zeigt die Induktion von Autophagie u.a. auch auf Proteinebene. Hier können die bereits oben genannten Indikatorproteine wie z.B. LC3B-II nachgewiesen werden.^[189] Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass die Autoren die Zellen für insgesamt 45 h mit 200 nM (-)-Englerin A behandelt haben und der Zeitfaktor hier eine entscheidende Rolle spielen kann. Somit kann eine Induktion der Autophagie nach relativ langen Behandlungszeiten ein mögliches Szenario sein, was aber nach kurzen Zeiten eindeutig nicht nachgewiesen werden kann und

in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen wurde, da die Zellen nach langen Inkubationszeiten bereits tot waren.

Da die Apoptose und Autophagie als Form des Zelltodes ausgeschlossen werden konnten, wurde als letztes der Einfluss von (-)-Englerin A hinsichtlich der Nekrose untersucht. Diese Form des Zelltodes wird durch chemische oder physikalische Beschädigungen der Zelle hervorgerufen.^[146] Charakteristisch für die Nekrose sind das Anschwellen und Platzen der betroffenen Zelle. Dies führt zur Zerstörung der Plasmamembran und löst als Folge eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe aus, sodass auch andere Zellen einen Schaden davon tragen.^{[140],[147],[148]}

Die Untersuchungen auf Nekrose erfolgten mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dazu wurden A498-Zellen mit 100 nM (-)-Englerin A für relativ kurze Zeiten von 5 bis 30 min behandelt und anschließend mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid gefärbt und analysiert. Bereits eine fünfminütige Behandlung der Zellen mit 100 nM der Substanz resultierte in bis zu 22,9 % nekrotischer Zellen und führte bei einer etwas längeren Behandlungszeit von 15 min zu einem Anteil von 35,9 % nekrotischer Zellen. Dass die Substanz Nekrose induziert, wurde bereits von zwei Arbeitsgruppen publiziert.^{[187],[189]} In beiden Publikationen konnte jedoch nicht so ein starker Effekt auf die Nekrose nachgewiesen werden, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Sulzmaier *et al.*^[187] konnten einen Anteil von nur ca. 19 % nekrotischer A498-Zellen nachweisen, allerdings bei einer relativ hohen Substanzkonzentration von 1 µM und einer Behandlungszeit von 1 h. Die Studie von Williams *et al.*^[189] zeigt, dass nach sehr langen Behandlungszeiten von 24 und 46 h der nekrotische Anteil an A498-Zellen gerade mal bei 4 % liegt und im Vergleich zu den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit extrem niedrig ist. Obwohl der Anteil nekrotischer Zellen, die in den Veröffentlichungen nachgewiesen werden konnten, unterschiedliche hoch sind, kann geschlussfolgert werden, dass beide Publikationen und die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit miteinander korrelieren. Alle drei Studien kommen zu dem Schluss, dass es sich bei der Form des Zelltodes, die durch (-)-Englerin A verursacht wird um Nekrose handelt.

5.2 Identifizierung der Zielproteine von (-)-Englerin A

Für die Identifizierung möglicher Zielproteine wurde zunächst ein affinitätschromatographischer Ansatz auf Basis von (-)-Englerin A-Affinitätssonden gewählt. Die Affinitätssonden wurden von Dr. Lea Radtke synthetisiert. Die Auswahl der Sonden basierte auf den Analysen der Struktur-Wirkungs-Beziehung des Naturstoffes und auf einem der aktiveren Naphthylderivate.^[80] Die für die Affinitätschromatographie verwendeten Substanzen wurden mit einem Triethylenglykol-Biotin-Abstandshalter (Linker) ausgestattet,

um die Immobilisierung der Substanz an Streptavidin zu gewährleisten. Bevor die Sonden für die Affinitätschromatographischen Versuche genutzt werden konnten, wurde deren Aktivität in einem Testsystem zur Zellviabilität überprüft. Dabei wurde für die als aktiv definierte Substanz in A498-Zellen nach einer Behandlungszeit von 48 h ein IC_{50} -Wert von $0,55 \mu\text{M}$ ermittelt, während Kontrollsubstanz einen IC_{50} -Wert von $2,75 \mu\text{M}$ aufwies und damit noch relativ aktiv war. Ein Aktivitätsverlust durch Anbringung eines Linkers an aktive Substanzen wurde von verschiedenen Gruppen in der Literatur beschrieben.^{[95], [194]} Die Sonden wurden dennoch für die Affinitätschromatographischen Experimente verwendet, da in den vorangegangenen und den vorliegenden Studien ermittelt wurde, dass diese Position von den möglichen Modifikationspositionen, die optimalste war und zu einer geringen Aktivitätsabnahme führte. Mit diesem Versuchsaufbau wurden insgesamt 18 Proteine mit der vergleichenden Affinitätschromatographie identifiziert die statistisch signifikant waren. Dabei handelte es sich überwiegend um Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ARS) und Septine. Erste Validierungen der identifizierten Proteine SYEP, SYIC, Septin 2,7 und 9 mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot zeigten, dass diese Proteine sowohl an die aktive Substanz als auch an die Kontrollsubstanz binden und eine konzentrationsabhängige Verdrängung des Proteins durch das Naphthylderivat nicht möglich war. Damit konnten diese Zielproteinkandidaten ausgeschlossen werden. Abschließend ist in diesem Versuchsaufbau zu beachten, dass zum einen die verwendeten Sonden hinsichtlich ihrer Aktivität nicht optimal waren. Zum anderen berücksichtigt diese Methode hauptsächlich mögliche Zielproteine, die solubilisierbar sind. Membranproteine dagegen wurden in dem gewählten Versuchsaufbau selten identifiziert, da diese durch fehlende Solubilität zu einem frühen Zeitpunkt bei der Vorbereitung der Zellysate größtenteils entfernt wurden.

Kinasen sind Enzyme, die eine wichtige Rolle bei vielen Krebsarten spielen und in Patienten häufig mutiert sind.^[155] Aus diesem Grund wurden Kinasen als mögliche Zielproteine von (-)-Englerin A in Erwägung gezogen. Die Hauptaufgabe von Kinasen ist die Phosphorylierung und Modulierung von Substraten.^[156] Sie stellen somit wichtige Schalter für viele zelluläre Prozesse dar.

In einem kommerziellen Kinase-Screen (Life Technologies) wurde der Einfluss von (-)-Englerin A auf die Aktivität 64 ausgewählter Kinasen getestet. Dabei basierte die Auswahl sowohl auf den Erkenntnissen der Affinitätschromatographischen Versuchen als auch auf den Ergebnissen der Lebendzell-Mikroskopie. Die Kinase-Profilierung zeigte, dass (-)-Englerin A keine der getesteten Kinasen signifikant inhibiert. Anhand dieser Ergebnisse wurden die getesteten Kinasen als mögliche Zielproteine nicht weiter verfolgt.

Um weitere Hinweise hinsichtlich potentieller Zielproteine zu bekommen, wurden die Mutationen in den Nierenkrebszelllinien untersucht.^[157] Ein Augenmerk lag auf dem Vergleich

von Mutationen im VHL-Gen. Die Fehlfunktion des VHL-Proteins führt unter aeroben Bedingungen zur Umprogrammierung des Glukose- und Energiehaushaltes. Dies äußert sich in einer hohen Glukoseaufnahme, einer verstärkten Glykolyse und Laktatproduktion. Die Aktivierung von HIF-1 (*hypoxia inducible factor*) durch die VHL-Inaktivierung als Transkriptionsfaktor unter aeroben Bedingungen führt zu dieser Umprogrammierung. Mit Hilfe von Literaturrecherchen wurde ein Zusammenhang zwischen (-)-Englerin A als niedermolekularer Substanz und der Inhibierung des Glukosemetabolismus ermittelt.^[14] Um dies zu überprüfen wurde zunächst ein Testsystem zur Glukoseaufnahme etabliert und der Effekt von (-)-Englerin A in A498-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde die Laktatproduktion in diesen Zellen gemessen. Bei der Analyse wurde festgestellt, dass die Glukoseaufnahme durch (-)-Englerin A gehemmt war. Da aber die Zellen nach bereits kurzen Behandlungszeiten durch Nekrose starben verfälschte dies die Ergebnisse zur Glukoseaufnahme. Aufgrund der hohen Letalität wurde auch keine Abnahme in der Laktatkonzentration gemessen. Somit konnte der Glukosemetabolismus und die damit in Zusammenhang stehenden GLUT-Proteine als mögliche Zielproteine ausgeschlossen werden.

Die vorstehend ermittelten Erkenntnisse konnten noch keine möglichen Zielproteine identifizieren, trugen aber dennoch wichtige Erkenntnisse für die Zielprotein-Identifizierung bei. Dabei konnten zwei wesentliche Schlüsse gezogen werden. Erstens handelt es sich bei (-)-Englerin A um eine schnell wirkende Substanz, die binnen Minuten selektiv den Zelltod in Form der Nekrose in Nierenkrebszellen hervorruft. Zweitens konnten keinerlei signifikante Proteine in den Affinitätschromatographischen Versuchen identifiziert werden. Diese Erkenntnisse lassen zwei mögliche Hypothesen zu. Die gesuchten Zielproteine werden in so geringen Mengen exprimiert, dass sie unter der Nachweisgrenze der gewählten Experimente liegen. Alternativ könnte es sich um Membranproteine wie z.B. Ionenkanäle oder G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs) handeln, die fest in der Membran verankert sind und schwer zu solubilisieren sind. Im Zusammenhang mit Nierenkrebs werden in der Literatur zwei Ionenkanäle erwähnt. Der Kaliumkanal Kv10.1 (EAG1; *Ether-a-go-go potassium channel 1*)^[161] und der TRPC4-Kanal (*Transient Receptor-Potential Cation Channel 4*).^[162]

Die Untersuchung des EAG-1 Kanals als mögliches Zielprotein von (-)-Englerin A wurde am Max-Planck Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen in Kollaboration mit Prof. Dr. W. Stühmer durchgeführt. Elektrophysiologische Versuche in stabil mit Eag1 transfizierten HEK293-Zellen devalidierten jedoch die Hypothese. Hier zeigte sich, dass (-)-Englerin A im Gegensatz zu dem bekannten EAG1-Inhibitor Astemizol, keinen Effekt auf EAG1 hat. Somit kam dieser Kanal als mögliches Zielprotein nicht in Frage.

Da (-)-Englerin A aufgrund seiner hohen Potenz und Selektivität als Ausgangsstoff für die medikamentöse Behandlung von Nierenkrebs-Patienten interessant sein könnte, ist es wichtig, eine Modulation von Ionenkanälen als mögliche Nebenwirkung oder aber auch Ionenkanäle als mögliche Zielproteine im Herzen zu vermeiden. Ob (-)-Englerin A einen inhibierenden Einfluss auf Ionenkanäle im Herzen hat wurde durch elektrophysiologische Messungen (Millipore) untersucht. Dabei wurde keine signifikante Inhibierung von acht ausgewählten Ionenkanälen durch (-)-Englerin A festgestellt. Eine maximale Inhibierung von 15 % wurde für den hERG-Kanal gezeigt und wurde aufgrund der verwendeten hohen Substanzkonzentration von 1 μM vernachlässigt.

Der zweite Ionenkanal der untersucht wurde war der nicht-selektive Ca^{2+} -permeable Kanal TRPC4.^[195] TRPC4 kontrolliert im Nierenkrebs die Thrombospondin-1 (TSP1) Sekretion und die Angiogenese.^[162] Die Sekretion des Angiogenese-Inhibitors TSP1 ist im Vergleich zu normalen Nierenzellen deutlich niedriger und trägt zur Angiogenese bei. Außerdem konnte eine beeinträchtigte Ca^{2+} -Aufnahme in Nierenkrebszellen beobachtet werden, die im Zusammenhang mit einer geringen TRPC4-Expression steht. Eine geminderte TRPC4-Expression in Nierenkrebszellen resultiert demnach in einer TSP1-Retention und einer gestörten Sekretion des Antagonisten.^[162]

Da zu diesem Zeitpunkt die Untersuchung des TRPC4-Kanals nicht möglich war fiel die Auswahl auf TRPC5, welches zu 65 % mit TRPC4 identisch ist^[164] und sowohl strukturell als auch funktionell sehr ähnlich ist.^[165] Daher erfolgten die ersten Untersuchungen zu dem Effekt des Naturstoffes zunächst auf TRPC5-Kanäle. Der Einfluss von (-)-Englerin A wurde mit einem zellbasierten Testsystem analysiert, das mit Hilfe eines intramolekularen Kalziumsensors die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration detektieren kann. Hierzu wurden mit TRPC5 stabil transfizierte CHO-Zellen verwendet. Die Zugabe von (-)-Englerin A zu den stabil transfizierten CHO-Zellen zeigte eine fünffach erhöhte intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche konzentrationsabhängig war. Ein gesättigter Zustand der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde bereits bei einer Substanzkonzentration von 100 nM erreicht. Der ermittelte AC_{50} -Wert lag bei 12 nM. Dies deutete auf eine hohe Affinität zwischen(-)-Englerin A und TRPC5 hin. In Abwesenheit von Kalzium hatte (-)-Englerin A kaum einen Effekt auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Dass der gemessene Kalziumanstieg tatsächlich in Zusammenhang mit dem TRPC5-Kanal steht, wurde durch weitere Kontrollexperimente überprüft. Unter anderem wurde ein selbstetabliertes Testsystem zur intrazellulären Kalziummessung genutzt. Dabei zeigten CHO-Zellen, die nicht mit TRPC5 stabil transfiziert waren, keine deutliche Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von (-)-Englerin A. Damit konnte bestätigt werden, dass die Effekte der Substanz tatsächlich auf die Überexpression des TRPC5-Kanals zurückzuführen

sind. Anhand dieser Versuchsreihe gelang es zum ersten Mal (-)-Englerin A einen Effekt als Aktivator von TRPC5 nachzuweisen.

Da (-)-Englerin A eine 1000-fach höhere selektive Wachstumsinhibierung in Nierenkrebszelllinien als im Vergleich zu anderen Krebszelllinien zeigt,^[78] wurde der Einfluss der Substanz auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Nierenkrebszellen getestet. Für den Test wurden A498-Zellen untersucht, die bei Zugabe von (-)-Englerin A einen 2-3-fachen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Auch hier hatte die Substanzzugabe in Abwesenheit von Ca^{2+} keinen Effekt auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und belegt, dass (-)-Englerin A in Anwesenheit von Ca^{2+} für den beobachteten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich ist. Hier ist zu beachten, dass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration einen Anstieg von dem 2-3-fachen der Kontrolle zeigte (im Vergleich zur fünffachen in den CHO-TRPC5-Zellen). Bei den A498-Zellen handelt es sich um Zellen mit endogen exprimierten Kanälen und nicht wie im Fall der CHO-Zellen, um artifiziell modifizierte, die den TRPC5-Kanal überexprimierten, sodass nicht nur Homomere sondern auch heteromere Kanäle gebildet wurden und somit der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration geringer war. Außerdem konnte zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage getroffen werden, welche Ionenkanäle in A498-Zellen für den Kalziumanstieg verantwortlich waren. Dass (-)-Englerin A zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen führt, wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben.^[187]

Daher war es zunächst notwendig, die Expression von TRPC4/5 in den zu untersuchenden Zellen zu überprüfen. Die Überprüfung erfolgte in den Nierenkrebszelllinien und der Brustkrebszelllinie HS578-T, da das Testsystem zur Zellviabilität ganz deutlich zeigte, dass auch die Brustkrebszelllinie durch (-)-Englerin A beeinflusst wird. Dabei war es sehr wichtig den gemeinsamen Faktor zu bestimmen, der diese Zelllinien gegenüber der Substanz so sensitiv macht. Zusätzlich wurde die HEK393-Zelllinie untersucht und diente als Kontrolle, da (-)-Englerin A hier keinen Effekt zeigt.^[80]

Die Expressionsanalysen zeigten, dass TRPC4 in fast allen getesteten Nierenkrebszelllinien stark exprimiert wird. Lediglich die SN12-C-Zellen zeigten eine sehr schwache Expression des Kanals. TRPC4 konnte zusätzlich in der Brustkrebszelllinie nachgewiesen werden und lieferte damit den ersten Hinweis auf eine Gemeinsamkeit. Das für HEK293-Zellen unter den getesteten Bedingungen kein TRPC4 nachgewiesen werden konnte, korreliert damit, dass diese Zellen gegenüber dem Naturstoff nicht sensitiv sind, wenn man davon ausgehen kann, dass der TRPC4-Ionenkanal für die Sensitivität verantwortlich ist. Im Vergleich dazu kann zunächst für keines der untersuchten Zelllinien eine TRPC5-Expression nachgewiesen werden. Das bedeutete allerdings nicht, dass TRPC5 nicht exprimiert wurde, sondern nur,

dass es unter den getesteten Bedingungen nicht detektiert werden konnte und eventuell unter der Nachweisgrenze lag.

Da TRPC4 in allen getesteten Krebszelllinien nachgewiesen werden konnte, war es interessant zu überprüfen welche Form von TRPC4 exprimiert wird. Literaturrecherchen ergaben, dass ungefähr 10 Splicevarianten bekannt sind von denen TRPC4 α und TRPC4 β am stärksten exprimiert und funktionell charakterisiert sind.^{[166],[167],[168]} Dabei ist die β -Variante um 84 Aminosäuren kürzer als die α -Variante.^[169] Die Expressionsstudien zu TRPC4 α/β auf mRNA-Ebene erfolgten in den Nierenkrebszelllinien, der Brustkrebszelllinie HS578-T und HEK-293-Zellen mittels PCR. Dabei konnte TRPC4 α in fast allen Nierenkrebszelllinien nachgewiesen werden, wobei der Nachweis lediglich für TK-10-Zellen nicht erbracht wurde. Eine starke Expression der α -Form zeigten insbesondere die Zelllinien A498, UO-31 und HS578-T. Auch HEK-293-Zellen, die gegenüber (-)-Englerin A nicht sensitiv sind, wiesen eine relativ starke TRPC4 α -Expression auf. Die TRPC4 β -Expression gegenüber der α -Form war überwiegend schwach, wobei auch hier keine Expression für TK-10-Zellen nachgewiesen werden konnte. Die Zelllinien UO-31, SN12-C und HS578-T zeigten eine relativ starke Expression der β -Form. Dagegen zeigten alle anderen getesteten Zelllinien eine geringe bis sehr schwache Expression. Dabei konnte festgestellt werden, dass unter den getesteten Bedingungen überwiegend die TRPC4 α -Form detektiert wurde.

Dennoch ist es wichtig zu beachten, dass es sich hierbei um die Expression beider Varianten auf mRNA-Ebene handelt und diesen Erkenntnissen keine Quantifizierung der Expression zugrunde liegt. Eine Quantifizierung mit Hilfe der RT-PCR war nicht möglich, da sich die beiden Varianten um 84 Aminosäuren unterscheiden, bei denen es sich um eine Verkürzung handelt und es somit nicht möglich war ein zweites spezifisches Oligonukleotid-Paar für TRPC4 β herzustellen. Die Expression konnte nicht auf Proteinebene untersucht werden, da es zum Zeitpunkt der Analysen keine spezifischen Antikörper zu Unterscheidung der α - und β -Form gab. Aus der Literatur ist bekannt, dass die TRPC4-Splicevarianten trotz der großen Ähnlichkeit im Wirkmechanismus und der biophysikalischen Eigenschaften sich stark in ihrer Regulierung unterscheiden.^[196] Insbesondere für TRPC4 β konnte eine stärkere Aktivierung durch Phospholipase C-gekoppelte Rezeptoren im Vergleich zu TRPC4 α gezeigt werden. Außerdem konnten die Autoren belegen, dass die Co-Expression von TRPC4 α - und TRPC4 β -Untereinheiten zur Bildung von Homo- und Heteromultimeren mit vergleichbarer Effizienz führt. Um verschiedene Varianten von Heteromultimeren zu erhalten wurden TRPC4 α - und β in verschiedenen molaren Verhältnissen exprimiert. TRPC4 β wird in Gegenwart von TRPC4 α mit einer mehr als zweifach höheren Kooperativität inhibiert und deutet darauf hin, dass es sich hierbei um einen dominant-negativen Effekt von TRPC4 α -Untereinheiten in heteromultimeren TRPC4-Kanälen handelt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Verkürzung von TRPC4 α im C-Terminus die Kanalaktivität wieder

vollständig herstellt. Somit wurde demonstriert, dass TRPC4 β -Untereinheiten Rezeptor-abhängig regulierte homomultimere Kanäle bilden und TRPC4 α eine autoinhibitorische Domäne im C-Terminus besitzt, die eventuell weitere regulatorische Mechanismen benötigt.

5.2.1 TRPC4/5- Regulatoren der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase

TRPC-Proteine sind nicht-selektive Ca²⁺-permeable Kanäle, die für vielzählige zelluläre Funktionen verantwortlich sind.^[197] Die TRPC-Familie besteht aus 7 Unterfamilien (TRPC1-TRPC7),^[174] wobei alle Mitglieder dieselbe Topologie teilen.^[198] Sie bestehen aus sechs Transmembrandomänen (TM1-TM6) und besitzen eine Porenregion, die sich zwischen TM5 und TM6 befindet.^[174] TRPC4 wird in verschiedenen Organen und Zelltypen exprimiert wie beispielsweise in unterschiedlichen Neuronen, im kardiovaskulären System, in Mastzellen und Nierenzellen,^[169] während TRPC5 überwiegend im Gehirn exprimiert wird.^[199] Eine eher geringe TRPC5-Expression ist in peripheren Organen wie beispielsweise Leber, Herz und Niere vorzufinden.^[165] TRPC4 und TRPC5 sind zu 65 % identisch und sowohl strukturell als auch funktionell sehr ähnlich.^[165]

Unter den zahlreich identifizierten Splicevarianten von TRPC4 werden TRPC4 α - und β am stärksten exprimiert und sind am besten funktionell charakterisiert. Sowohl endogene als auch rekombinante TRPC4-Kanäle unterscheiden sich in ihrer Permeabilität und anderen biophysikalischen Eigenschaften sehr stark voneinander, die z.B. auf Unterschiede der Kanal-Komposition basieren können.^[169] Dabei stellen sie entweder Speicher-abhängige Kanäle (*store-operated channels*) mit einer starken Ca²⁺-Selektivität (**Abbildung 5.1**) oder Nichtspeicher-abhängige Kanäle (*non-store-operated channels*) dar, die hauptsächlich Na⁺ transportieren und durch G α_q -und/oder G α_i -gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden. Kanäle, die TRPC4 enthalten führen, zu einem durch einen Agonisten induzierten Kalziumioneninflux. Dies kann direkt oder auch indirekt durch Depolarisierung und Aktivierung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle geschehen.^[169] Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration spielen eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen. Zu diesen Prozessen gehören neben der Muskelkontraktion auch die Transmitterfreisetzung, die Zellproliferation, die Gentranskription und der Zelltod.^[200] TRP-Kanäle können durch verschiedene Stimuli aktiviert werden. Hierzu zählen intra- oder extrazelluläre Botenstoffe, chemischer, mechanischer oder osmotischer Stress und auch der Ca²⁺-Gehalt der internen Kalziumspeicher. Der Aktivierungsmechanismus kann über Rezeptoren, Liganden oder über eine direkte Aktivierung erfolgen.

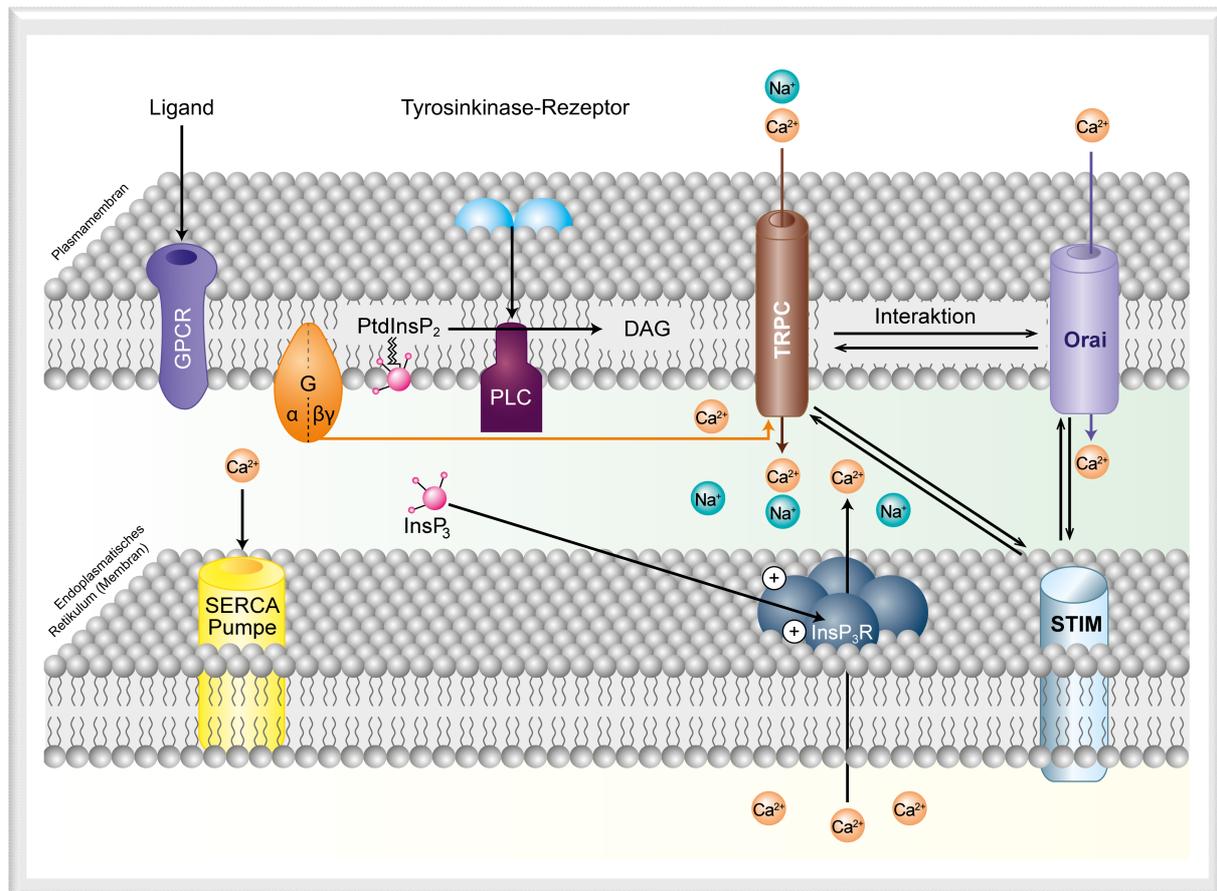


Abbildung 5.1: Aktivierung von Speicher-abhängigen TRPC-Kanälen (modifiziert nach Clapham, 2003)^[201]

Die Aktivierung von GPCRs oder Tyrosinkinase-Rezeptoren durch einen Liganden führt zur Aktivierung von PLC, die PtdinsP₂ in DAG und in InsP₃ hydrolysiert. Während DAG in der Membran verbleibt, aktiviert InsP₃ InsP₃R in der Membran des ERs. Dies resultiert in der Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER und führt zu einer Oligomerisierung von STIM1, welches dann TRPC- und Orai-Kanäle aktiviert und im Ca²⁺-Influx resultiert.

GPCRs: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, **PLC:** Phospholipase C, **PtdinsP₂:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, **DAG:** Diacylglycerol **InsP₃:** Inositol-1,4,5-trisphosphat, **InsP₃R:** Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor, **ER:** Endoplasmatisches Retikulum, **SERCA:** *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, **TRPC:** *Transient receptor potential canonical ion channel*, **STIM1:** *Stromal interaction molecule 1*

Bei der Signaltransduktion durch Rezeptoren aktivieren GPCRs oder Tyrosinkinasen Phospholipase C (PLC), welche wiederum TRP-Kanäle auf verschiedene weisen aktivieren kann. Bei Speicher-abhängigen Kanälen erfolgt eine Kommunikation zwischen dem ER und der in der Plasmamembran lokalisierten TRPC-Kanälen. Dabei werden TRPC- und Orai-Kanäle durch den Kalziumsensor STIM1 (*Stromal interaction molecule 1*) im endoplasmatischen Retikulum reguliert. Orai-Kanäle stellen eine wichtige Komponente bei der Aktivierung von Speicher-abhängigen Kanälen dar.^[202] Die Aktivierung durch Liganden kann entweder exogen durch niedermolekulare synthetische Substanzen (z.B. Capsaicin), aber auch durch Naturstoffe erfolgen. Endogene Liganden stellen Lipide oder Produkte aus dem Lipidmetabolismus (z.B. Diacylglycerole) dar. Weitere Liganden können Purin-Nukleotide und deren Metabolite sein (z.B. ADP-Ribose). Insbesondere anorganische Ionen wie Ca²⁺ und Mg²⁺ spielen eine wichtige Rolle bei der Kanalaktivierung. Eine direkte Aktivierung können mechanische Stimuli, Temperatur oder die Phosphorylierung des Kanals hervorrufen. Auch andere zelluläre Signalmechanismen, welche beispielsweise durch

Ca²⁺/Calmodulin reguliert werden, können die Kanalaktivität modulieren.^[203] TRPC4 kann durch verschiedene Agonisten und Antagonisten beeinflusst werden. Eine relativ neue Substanz, die als Antagonist agiert ist, ML204.^[204] ML204 inhibiert sowohl endogene als auch rekombinante TRPC4-Kanäle mit einem IC₅₀-Wert im niedrigen mikromolaren Bereich und hat keinen Einfluss auf die meisten Spannungs-gesteuerten Kanäle und andere TRP-Kanäle mit Ausnahme von TRPC5 und TRPC3. Kanäle die heterolog exprimierte TRPC4- und TRPC5-Kanäle beinhalten, können spezifisch durch Lanthanoide aktiviert werden, während Kanäle, die native TRPC4-Proteine enthalten, inhibiert werden können.

Studien in Knock-Out-Mäusen zeigen, dass TRPC4-Kanäle eine Schlüsselrolle im Ca²⁺-Einstrom spielen, welche z.B. für die Funktion von makro- und mikrovaskulären Endothelzellen^{[205],[206]} oder auch für die Neurotransmitterfreisetzung im Thalamus,^[207] notwendig sind.

Des Weiteren ist TRPC4 in verschiedene zelluläre Prozesse involviert. Hierzu zählen beispielsweise die Regulierung des Neuritenwachstums und der Neuritenexozytose.^[208] Studien zeigen, das TRPC4 eventuell im Kleinhirn von Ratten für die akkurate Entwicklung von Körnerzellen verantwortlich ist, wobei dies *in vivo* noch nicht vollständig untersucht ist.^[209] Außerdem spielt TRPC4 eine wichtige Rolle bei akuten neuronalen Verletzungen in der zerebralen Ischämie^[210] und wird als mögliches Zielprotein gesehen, dessen Inhibierung eine zerebrale Ischämie verhindern könnte.^[211]

5.3 Validierung der Zielproteine TRPC4/5

Da eine TRPC4-Expression in den Nierenkrebszelllinien und der Brustkrebszelllinie HS578-T nachgewiesen werden konnte und TRPC5 zu 65 % identisch mit TRPC4 ist,^[164] wurden zunächst die (-)-Englerin A-Effekte auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration untersucht. Die Untersuchung der Ionenkanäle erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. D.J. Beech (Universität Leeds, Großbritannien). Der im Folgenden hierzu verwendete Versuchsaufbau zur Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurde von M.Sc. H. J. Gaunt und die elektrophysiologischen Versuche von M.Sc. H. J. Gaunt, Prof. Dr. D.J. Beech und Prof. Dr. Katsuhiko Muraki durchgeführt.

Für Untersuchungen des (-)-Englerin A-Einflusses auf die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wurden genetisch modifizierte HEK293-Zellen untersucht, die stabil mit TRPC4 oder TRPC5 transfiziert waren. Die Expression des gewünschten Ionenkanals erfolgte durch Induktion mit Tetrazyklin. Zellen, die nicht mit Tetrazyklin induziert waren dienten als Kontrolle. Nach Beladung der Zellen mit dem Kalziumsensor wurde (-)-Englerin A hinzugefügt und die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration detektiert. Hier konnten die Effekte, die zuvor in CHO-TRPC5-Zellen beobachtet wurden, bestätigt werden. HEK293-Zellen die TRPC4 oder

TRPC5 überexprimierten (HEK293-TRPC4 und HEK293-TRPC5) zeigten einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei einer Substanzkonzentration von 100 nM. Damit wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass der Naturstoff diesen Effekt nicht nur auf TRPC5 sondern auch auf TRPC4 hat. Für beide Ionenkanäle konnte ein 3-4-facher Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zu Kontrolle gemessen werden. Um die Aktivität und Potenz der Verbindung in TRPC4/5 zu bestimmen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, die EC_{50} -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich (11,2 nM für TRPC4 und 7,6 nM für TRPC5) aufwiesen, welches die hohe Potenz der Verbindung bestätigt. Es wurde deutlich, dass (-)-Englerin A einen starken Einfluss auf die Kalziumhomöostase hat, der sich im Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration äußerte und offensichtlich durch TRPC4/5-Kanäle vermittelt wurde. Es wurden weitere TRP-Ionenkanäle auf die Modulation von (-)-Englerin A getestet. Hierzu wurden Zelllinien verwendet, die TRPC6-, TRPM2- und TRPV4-Kanäle überexprimierten, welche mit unterschiedlichen Substanzkonzentrationen inkubiert wurden. Die Behandlung mit (-)-Englerin A zeigte keine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und bestätigte dadurch die selektive Wirkung von (-)-Englerin A für TRPC4/5-Kanäle.

Auch für A498-Zellen wurde der gleiche Effekt wie für HEK293-TRPC4/5 beobachtet. Hier konnte eine Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden, wobei der EC_{50} -Wert bei 9,5 nM lag und ungefähr dem in den HEK293-TRPC4/5 ermittelten Wert entsprach. In Folgeexperimenten konnte die Herkunft der Kalziumionen ermittelt werden. Dabei kann das Kalzium aus internen Speichern der Zelle oder aus dem extrazellulären Bereich stammen. Bei Behandlung von Zellen in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} wurde kein intrazellulärer Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beobachtet. Dagegen konnte für die Kontrolle in Anwesenheit von extrazellulärem Kalzium eine starke Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass (-)-Englerin A keine Freisetzung von Kalzium aus den internen Kalziumspeichern wie z.B. aus dem ER (Endoplasmatisches Retikulum) bewirkt und die Kalziumionen aus dem extrazellulären Bereich stammen und es sich somit Kalziuminflux handelt.

Die bisherigen Erkenntnisse zeigten, dass (-)-Englerin A ein potenter Aktivator von TRPC4/5 ist und einen starken Einfluss auf den Kalziuminflux in HEK293-TRPC4/5 hat. Eine weitere wichtige Frage war, ob der Naturstoff selektiv für die beiden Ionenkanäle ist oder ob eventuell auch andere Ionenkanäle beeinflusst werden. Für die Klärung dieser Frage wurden elektrophysiologische Versuche mittels patch clamp-Technik durchgeführt. Die Messungen der Ionenströme bei Zugabe von (-)-Englerin A erfolgte an HEK293-TRPC4-Zellen. Als Kontrollsubstanz wurde ML204 verwendet, welches einen bekannten Antagonisten für TRPC4/5 darstellt.^[170] Für die Versuchsreihen wurde ein *outside-out-patch* verwendet, bei dem nur ein Teil der Plasmamembran herausgelöst wird und sich die intrazelluläre Seite der

Membran in der Pipette befindet. Dieses war notwendig um zu überprüfen, ob (-)-Englerin A einen Einfluss auf die Kanäle von der intrazellulären Seite der Plasmamembran hat. Die Substanzen wurden zunächst intrazellulär verabreicht und die Ionenströme für einige Minuten gemessen. Die intrazelluläre Zugabe von (-)-Englerin A führte zu keiner Aktivierung der TRPC4-Kanäle. Die extrazelluläre Zugabe von Englerin A in Lösung dagegen, zeigte bereits bei einer (-)-Englerin A-Konzentration von 100 nM einen starken Stromfluss durch die Membran, wobei der Effekt 2-3 Minuten anhielt bevor die Substanz aus der Lösung herausgewaschen wurde. Die erneute Zugabe des Naturstoffes führte zum selben Effekt und zeigte, dass diese reproduzierbar sind. Der Einfluss des Naturstoffes konnte durch den Antagonisten ML204 kompetitiert werden, welcher zu einer sofortigen Abnahme des Ionenstroms führte. Die zeigte, dass (-)-Englerin A TRPC4-Kanäle selektiv und spezifisch aktiviert, da die Effekte durch den TRPC4/5 Antagonisten aufgehoben wurden. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass der Naturstoff wahrscheinlich reversibel an die Kanäle bindet, da der Effekt durch das Auswaschen von (-)-Englerin A reduziert werden konnte und zum anderen durch ML204 aufgehoben wurde. Außerdem kann geschlussfolgert werden, dass (-)-Englerin A die Kanäle an der extrazellulären Seite der Plasmamembran aktiviert, da es sich hierbei um einen *outside-out-patch* handelte und die Substanz extrazellulär in Lösung verabreicht wurde. Für die exakte Bestimmung der Bindestelle von (-)-Englerin A an TRPC4 ist die Kristallstruktur von TRPC4 nötig, die bisher noch nicht publiziert ist. Dass es sich hier wirklich um die Aktivierung von TRPC4 handelt, konnte durch den Verlauf der Strom-Spannungs-Kurve verifiziert werden. Dabei wird der Zusammenhang zwischen dem Membranpotential und dem Strom, welcher durch den Ionenkanal fließt, untersucht. Hierzu wurden HEK293-TRPC4-Zellen gepatcht (*whole cell patch*) und mit (-)-Englerin A behandelt und anschließend der Stromfluss bei unterschiedlichen Spannungen gemessen. Die Messungen der Strom-Spannungs-Kurve für den Naturstoff zeigten eine für TRPC4 typische "Sesselform", die praktisch den "Fingerabdruck" für TRPC4- und nahe verwandte Kanäle darstellt.^{[171], [172], [173]}

Um auch die Selektivität der Substanz für TRPC4 in Nierenkrebszellen zu untersuchen, wurden A498-Zellen verwendet. Bei Behandlung der Zellen mit 100 nM der Substanz konnte eine deutliche Zunahme im Stromfluss durch die Membran detektiert werden, welcher auch hier durch die Zugabe des Antagonisten ML204 aufgehoben werden konnte. Da es sich um endogene TRPC4-Ionenkanäle handelt, waren die Ionenströme nicht so stark wie in den zuvor untersuchten HEK293-TRPC4-Zellen. Die für die A498-Zellen gemessene Strom-Spannungs-Kurve unterschied sich von der zuvor beobachteten TRPC4-Sesselform in HEK293-TRPC4-Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Literatur.^{[173], [178]} Es ist bekannt, dass TRPC1-Kanäle nicht in der Lage sind selbständig funktionale Ionenkanäle zu formen, sondern diese gemeinsam mit TRPC4 als Heterotetramere bilden, sodass ein

TRPC4-typischer "Fingerabdruck" hier nicht sichtbar wird. Dieses wurde durch die Verwendung von HEK293-TRPC4 Zellen überprüft, die durch eine transiente Transfektion TRPC1 exprimierten. So konnte eine Heterotetramerbildung von TRPC4 mit TRPC1 sichergestellt werden. Für die Messungen wurde die gesamte Zelle *gepatcht* (*whole-cell-patch*) und nach Substanzzugabe die Ionenströme gemessen und auch eine Strom-Spannungs-Kurve erstellt. Bei der Zugabe von (-)-Englerin A konnten ähnliche Ströme wie in den zuvor gemessenen A498-Zellen detektiert werden, die wieder durch die Zugabe von ML204 inhibiert wurde. Auch die für HEK293-TRPC4/1 ermittelte Strom-Spannungs-Kurve entspricht nicht der typischen TRPC4-Sesselform und stimmt mit der Strom-Spannungs-Kurve der A498-Zellen überein. Dies war ein Hinweis darauf, dass TRPC4 gemeinsam mit TRPC1 Heterotetramere in A498-Zellen bildet und (-)-Englerin A diese aktiviert.

Um festzustellen, ob es eine Interaktion zwischen TRPC4 und TRPC1 gibt, wurden Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) durchgeführt. Da weitere Literaturrecherchen einen Hinweis darauf gaben, dass es möglicherweise auch eine Heterotetramerbildung zwischen TRPC4/1 und TRPC5 gibt,^{[171],[178]} wurde auch diese Interaktion untersucht. Die Untersuchungen wurden an A498- und den ebenfalls (-)-Englerin A gegenüber sensitiven HS578-T-Zellen unter der Verwendung eines spezifischen TRPC4-Antikörpers durchgeführt. Es konnte eine Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5 für beide Zelllinien nachgewiesen werden. In den Proben der Co-IP mit TRPC4-Antikörper konnte eine deutliche Anreicherung sowohl von TRPC1 als auch für TRPC5 nachgewiesen werden. Das Vorhandensein für TRPC5 in beiden Lysaten wurde erst durch Anreicherung erbracht, da das Protein in Lysaten zuvor nicht nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von TRPC1 und TRPC5 deutet auf eine Interaktion mit TRPC4 hin und bestätigen die Ergebnisse der patch clamp Versuche für A498- und HEK293-TRPC4/1-Zellen, die wohlmöglich aufgrund dieser Interaktion eine für TRPC4-typische "Sesselform" nicht zeigen. Obwohl keine Aussage über die Zusammenstellung der Ionenkanäle für eine Heterotetramerbildung gemacht werden kann belegt diese Versuchsreihe die Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob (-)-Englerin A TRPC4/5-Kanäle direkt oder indirekt aktiviert. Aus der Literatur ist bekannt, dass TRPC4/5-Kanäle über GPCRs aktiviert werden können.^{[171],[176],[177]} Um zu überprüfen ob (-)-Englerin A TRPC4/5-Kanäle via GPCRs aktiviert, wurden HEK293-TRPC4-Zellen verwendet, die mittels eines *outside-out-patches* untersucht wurden. Dafür wurden Zellen mit GDP- β -S, einem nicht hydrolysierbaren GDP Analogon, behandelt, welches alle GPCRs inhibiert. Die Zugabe von (-)-Englerin A sowie ML204 erfolgte an der extrazellulären Seite der Plasmamembran. Trotz GPCR-Inhibierung wurden nach Zugabe von 100 nM (-)-Englerin A starke Ionenströme gemessen, die durch die wiederholte Zugabe der Substanz ausgelöst wurden. Auch hier wurde der Effekt durch den Antagonisten ML204 wieder aufgehoben. Die wichtige Erkenntnis aus diesem Versuch ist,

dass die Aktivierung des Ionenkanals durch (-)-Englerin A nicht GPCR-abhängig ist. Somit konnten GPCRs als direkte Zielproteine von (-)-Englerin A ausgeschlossen werden. Um diese Ergebnisse zu validieren, wurde zusätzlich eine Profilierung ausgewählter GPCRs *in vitro* durchgeführt. Dabei bewirkte (-)-Englerin A weder eine aktivierende noch inhibierenden Wirkung auf diese GPCRs. Der GPCR, der am stärksten durch (-)-Englerin A inhibiert wurde (34,8 %) war GPR109A (Hydroxycarboxylic acid receptor 2). Allerdings wurde GPR109A aufgrund der verwendeten hohen Substanzkonzentration von 1 μM nicht weiterverfolgt. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Versuche und die GPCR-Profilierung schließen GPCRs als mögliche direkte Zielproteine aus.

Die elektrophysiologischen Versuche und auch die zellbasierten Testsystem zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zeigten, dass TRPC4/5-Kanäle Zielproteine von (-)-Englerin A sind. Um zu überprüfen ob die bisher untersuchten Nierenkrebszelllinien und auch die Brustkrebszelllinie HS578-T aufgrund von TRPC4/5 eine Sensitivität gegenüber (-)-Englerin A zeigten, wurden Überexpressionsstudien an HEK293T-Zellen durchgeführt, die normalerweise gegenüber der Substanz keine Sensitivität zeigen und TRPC4/5 nicht exprimieren. Für den Versuch wurden HEK293T-Zellen transient mit TRPC4 oder TRPC5 transfiziert (HEK293T-TRPC4 und HEK293T-TRPC5) und anschließend der (-)-Englerin A-Effekt auf die Zellviabilität untersucht. Die Zellviabilität in HEK293T-TRPC4/5-Zellen nahm bei einer konzentrationsabhängigen Behandlung mit (-)-Englerin A bis zu 50 % ab. Dadurch gelang es eine nicht sensitive Zelllinie gegenüber dem Naturstoff sensitiv zu gestalten und bestätigte dass die TRPC4/5 Expression ausschlaggebend für die (-)-Englerin A Sensitivität ist. Die Effekte konnten auch in der Lebendzell-Mikroskopie bestätigt werden. Die Echtzeitaufnahmen zeigten, dass (-)-Englerin A bereits nach kurzer Zeit eine zytotoxische Wirkung auf die HEK293T-TRPC4/5-Zellen hat. Wie auch bereits für die A498-Zellen beobachtet, rundeten sich die Zellen schnell ab und verweilten über die gesamte Zeit in diesem Zustand bevor sie dem Zelltod erlagen. Dieser Einfluss konnte auch für A498-Zellen beobachtet werden und bestätigen die Messergebnisse zur Zellviabilität.

Es kann festgehalten werden, dass (-)-Englerin A in A498-Zellen endogene TRPC4/1 Kanäle aktiviert, somit einen starken Kalziuminflux fördert und in kürzester Zeit Nekrose induziert. Diese Fakten führten zu der Annahme, dass der durch (-)-Englerin A verursachte Kalziuminflux zu einer Kalziumüberladung der Zelle führt und dies im Zelltod durch Nekrose resultiert. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen zum Zelltod führen können.^[179] Ein direkter Zusammenhang zwischen TRPC4/5 und einer Ca^{2+} -Überladung, welche zum Zelltod führt ist in der Literatur beschrieben.^[164] Dabei wurde durch den Austausch von Glycin gegen Serin in einer konservierten Domäne von TRPC4/5, TRPC4- und TRPC5-Mutanten hergestellt, die bei Expression konstitutiv geöffnet sind. Die dauerhaft geöffnete Konformation der Mutanten führt zu einem nicht kontrollierten Ca^{2+} -

Einstrom, wodurch die Zellen dem Zelltod unterliegen. Bei der Kultivierung der Mutanten in Anwesenheit steigender Konzentrationen von EGTA konnte die Konzentration an freiem extrazellulären Ca^{2+} reduziert werden, sodass unter diesen Bedingungen die Zellen, die TRPC4/5-Mutanten exprimierten, überleben konnten. Damit wurde demonstriert, dass ein permanenter Ca^{2+} -Influx in einer Ca^{2+} -Überladung resultiert und letztlich zum Zelltod führt. Die Überprüfung dieser Hypothese im Hinblick auf den (-)-Englerin A-Wirkmechanismus erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen in A498-Zellen. In einem der Versuche wurde EGTA verwendet, welches ein Kalzium-Chelator darstellt und gemeinsam mit (-)-Englerin A appliziert wurde. Der andere Versuch basierte auf zwei verschiedenen extrazellulären CaCl_2 -Konzentrationen (1,8 mM und 180 μM), in denen die Zellen 24 h zuvor kultiviert wurden und anschließend die Substanzzugabe erfolgte.

Mit beiden Versuchen wurde gezeigt, dass die eingesetzten Ca^{2+} -Konzentrationen in Abhängigkeit von (-)-Englerin A einen Einfluss auf die Zellviabilität haben. Die Verwendung von EGTA zusammen mit 100 nM (-)-Englerin A zeigte einen konzentrationsabhängigen abmildernden Effekt, sodass eine Zunahme der Zellviabilität bis zu 70 % im Vergleich zu (-)-Englerin A alleine beobachtet wurde. Hier wurden die Ca^{2+} -Ionen durch EGTA gebunden und der Einstrom in die Zelle verhindert und somit eine Reduktion der Zellviabilität vorgebeugt. Der Einsatz verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen führte zu einem ähnlichen Effekt auf die Zellviabilität. Die Verwendung von 180 μM CaCl_2 statt 1,8 mM resultierte in einer Verschiebung der Kurve zur Zellviabilität in A498-Zellen. Der IC_{50} -Wert für (-)-Englerin A stieg von ursprünglichen 7,5 nM (bei 1,8 mM CaCl_2) auf 77,7 nM und zeigte ganz deutlich, dass sich eine hohe Ca^{2+} -Konzentration negativ auf die Zellviabilität auswirkte. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen den durch (-)-Englerin A hervorgerufenen Kalziuminflux und der Zellviabilität festgestellt werden. Die Hypothese, dass der starke Ca^{2+} -Einstrom bzw. eine Ca^{2+} -Überladung den Zelltod fördert wurde bestätigt. In diesem Zusammenhang war es wichtig zu untersuchen, welcher Mechanismus zu dem kalziumabhängigen Zelltod führt und was die hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle bewirkt. Durch Literaturrecherchen konnte ein Zusammenhang zwischen Kalzium-assoziiertem Zelltod und Änderungen im mitochondrialen Membranpotential hergestellt werden.^[180] Dabei führen hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer Depolarisation der Mitochondrien, sodass das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht, wodurch der Zelltod ausgelöst wird.^{[181],[182]}

Der Einfluss von (-)-Englerin A wurde in A498-Zellen untersucht. Dafür wurden die Mitochondrien angefärbt und für verschiedene Zeiten mit 10 nM (-)-Englerin A behandelt. Die Behandlung der Zellen mit dem Naturstoff zeigten bereits nach 5 min eine Veränderung der Morphologie der Mitochondrien im Vergleich zur Kontrolle. Die mit (-)-Englerin A behandelten Zellen wiesen Präzipitation von Mitochondrien um den Zellkern auf, während dies bei den

Kontrollzellen nicht der Fall war. Diese Änderung der Morphologie wurde für alle untersuchten Zeitpunkte (5 min-1 h) beobachtet, wobei der Effekt bei einer Stunde weniger stark war und nachließ. Dieser (-)-Englerin A-Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien waren ein starker Hinweis darauf, dass in Zusammenhang mit dem starken Kalziuminflux Mitochondrien in den (-)-Englerin A-abhängigen Zelltod involviert sind. Den ersten Hinweis darauf, dass (-)-Englerin A Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase in A498-Zellen hat, lieferte die Publikation von Sulzmaier *et al.*^[187] Hierbei wurde gezeigt, dass die Zugabe von 1 μM (-)-Englerin A für 1 h zu einer deutlichen Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt, wobei der Wirkungsmechanismus nicht weiter analysiert wurde. Weitere Literaturrecherchen ergaben einen möglichen Zusammenhang zwischen hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen und dem Zelltod, welche von der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration abhängig sind.^[212] Demnach führen moderate Ca^{2+} -Konzentrationen von 200-400 nM zur Apoptose, während Ca^{2+} -Konzentrationen von mehr als 1 μM Nekrose induzieren. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen hohen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen und einer Reduktion der Zellviabilität gezeigt werden.

Der Mechanismus der aufgrund einer Ca^{2+} -Überladung zum Zelltod führt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt. Eine mögliche Hypothese ist, dass der (-)-Englerin A-vermittelte starke Ca^{2+} -Influx zur Öffnung der sogenannten *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) führt. Die MPTP ist eine nicht-spezifische Pore, die sich in der inneren mitochondrialen Membran befindet und für alle Moleküle permeabel ist, welche kleiner als 1,5 kDa sind.^[213] Die Öffnung der Pore hat zur Folge, dass Protonen entlang der inneren mitochondrialen Membran einströmen und dadurch das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht. Durch den Zusammenbruch des Membranpotentials ist eine ATP-Generierung nicht mehr möglich und wirkt sich auf den Metabolismus aus. Durch die Aktivierung von Phospholipasen, Nukleasen und Proteasen erliegen die betroffenen Zellen letzten Endes der Nekrose.^{[214],[215],[216]} Um zu untersuchen, ob der (-)-Englerin A-vermittelte Ca^{2+} -Influx die MPTP öffnet, können MPTP-Inhibitoren wie z.B. Cyclosporin A oder Sanglifehrin A verwendet werden.^{[217],[218],[219],[220]} Die Inkubation von (-)-Englerin A-behandelten A498-Zellen mit den genannten MPTP-Inhibitoren sollte den Effekt von (-)-Englerin A inhibieren und kann dazu beitragen den Mechanismus, der zur Nekrose führt, weiter aufzuklären.

In der vorliegenden Arbeit wurden TRPC4/5-Kanäle als Zielproteine von (-)-Englerin A identifiziert. Diese Studie wurde in der Zeitschrift *Angewandte Chemie* publiziert.^[183] Vormaliges publiziertes Zielprotein von Englerin A ist PKC θ (*Protein kinase C type theta*) und wurde von der Arbeitsgruppe Sourbier *et al.*^[81] im Jahr 2013 veröffentlicht. Die Publikation zeigt, dass (-)-Englerin A zu einer Aktivierung von PKC θ in 786-O-Zellen führt. Die Aktivierung von PKC θ resultiert demnach in der Inhibierung von IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*) und

HSF-1 (*Heat shock factor 1*). Dies führt zu einer Limitierung der Glukoseaufnahme und gleichzeitig zur Glukoseabhängigkeit von Tumorzellen durch die Phosphorylierung von HSF-1, einem Transkriptionsfaktor. Dadurch wirkt (-)-Englerin A letal auf Tumorzellen, die stark von Glukose abhängig sind. Die Autoren beschreiben, dass für die (-)-Englerin A-Sensitivität die Expression von PKC θ und HSF-1 Voraussetzung ist. Außerdem zeigt die Publikation, dass die gegenüber (-)-Englerin A nicht sensitive Zelllinie HEK293 nach Transfektion mit PKC θ und HSF-1 gegenüber dem Naturstoff sensitiv werden.

In Expressionsstudien zu PKC θ und HSF-1 in den verwendeten Nierenkrebszellen wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine schwache Transkription beider Gene detektiert. In der Brustkrebszelllinie HS578-T wurde keine PKC θ -Expression nachgewiesen, während für HSF-1 eine relativ starke Expression detektiert werden konnte. Ein sehr interessanter Befund war, dass die untersuchten HEK293-Zellen sowohl PKC θ als auch HSF-1 bereits exprimierten. Auf Proteinebene konnte für fast alle getesteten Nierenkrebszelllinien eine starke Expression für PKC θ beobachtet werden. Für A498-Zellen konnte keine PKC θ -Expression nachgewiesen werden. Eine Expression von HSF-1 dagegen wurde in allen getesteten Zelllinien detektiert. In HS578-T konnte eine relativ starke Expression von HSF-1, aber keine für PKC θ gezeigt werden. In HEK293-Zellen wurde der Nachweis für beide Proteine erbracht. Die Ergebnisse auf mRNA-Ebene stimmten nicht mit denen auf Proteinebene vollständig überein. Dies lag vermutlich daran, dass beide Methoden unterschiedlich sensitiv sind und dadurch unterschiedliche Nachweisgrenzen besitzen. Außerdem ist die Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch Proteinebene für alle Zellen unterschiedlich reguliert. Sourbier *et al.*^[81] demonstrierten u.a. mit Hilfe eines *in vitro* Kinasetestsystems eine Aktivierung von PKC θ durch (-)-Englerin A. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mittels eines kommerziellen *in vitro* Kinase-Screens überprüft. Dabei wurde keine PKC θ -Inhibierung durch (-)-Englerin A nachgewiesen.

Insbesondere die Expressionsanalysen auf Proteinebene zeigen, dass der vorgeschlagene Wirkmechanismus von Sourbier *et al.*^[81] nicht auf alle sensitiven Nierenkrebszellen und HS578-T-Zellen zutrifft und nicht der gemeinsame Faktor sein kann, der die Zellen gegenüber (-)-Englerin A sensitiv macht, da PKC θ in A498-Zellen unter den getesteten Bedingungen nicht exprimiert wird. Des Weiteren konnte für HEK293-Zellen, die gegenüber dem Naturstoff nicht sensitiv sind eine PKC θ und HSF-1-Expression gezeigt werden. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit können die Erkenntnisse von Sourbier *et al.*^[81] nicht bestätigen und weisen darauf hin, dass PKC θ nicht das primäre Zielprotein von (-)-Englerin A in den untersuchten Zelllinien ist.

(-)-Englerin A wurde in der vorliegenden Arbeit als selektiver und potenter Aktivator von TRPC4/5-Kanälen identifiziert. Die Untersuchungen zum dem Wirkmechanismus erfolgten mit Hilfe von *in vitro* Versuchen. Um zu überprüfen, ob die Substanz als Wirkstoffkandidat für die Behandlung von Nierenkrebs in Frage kommt, muss die Wirkung von (-)-Englerin A im Weiteren in *in vivo* Studien fortgesetzt und die Pharmakokinetik bestimmt werden. Hierzu gehören Versuche mit A498-Tumor Xenotransplantationen in Mäusen und die Beobachtung des Tumorwachstums bei Verabreichung von (-)-Englerin A und einem Kontrollinhibitor wie z.B. ML204. In der Literatur wurden bereits 786-0-Tumor Xenotransplantationen in Mäusen durchgeführt^[81] und das Wachstum des Tumors durch (-)-Englerin A erfolgreich inhibiert. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt, dass (-)-Englerin A auf 786-0-Zellen im Vergleich zu A498-Zellen keinen starken Einfluss hat, sodass diese Versuche vorzugsweise mit A498-Tumoren durchgeführt werden sollten.

Des Weiteren kann mit Hilfe von *in vivo* Studien u.a. die Verträglichkeit und die Plasmastabilität der Substanz überprüft werden.

Kapitel 6

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde (-)-Englerin A als ein selektiver und potenter Aktivator von TRPC4/5-Ionenkanälen in A498-Zellen identifiziert und validiert. Die genauere Analyse ergab, dass der Naturstoff in kürzester Zeit durch einen hohen Ca^{2+} -Influx bzw. aufgrund einer Ca^{2+} -Überladung Nekrose induziert. Außerdem wurde gezeigt, dass (-)-Englerin A Einfluss auf die Mitochondrien hat. Der Einfluss durch den starken Ca^{2+} -Influx in den Mitochondrien kann durch genetisch kodierte und zugleich FRET basierte Ca^{2+} -Indikatoren untersucht werden. Zusätzlich kann analysiert werden, ob ein starker Ca^{2+} -Influx das mitochondriale Membranpotential beeinflusst. Dazu können fluoreszierende kationische Farbstoffe eingesetzt werden, welche in der mitochondrialen Matrix akkumulieren und die Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie ermöglichen.

In Überexpressionsstudien wurde gezeigt, dass transient transfizierte HEK293T-Zellen sensitiv gegenüber (-)-Englerin A waren. Diese Beobachtung fordert folglich die Untersuchung des TRPC4/5-*Knock-Outs* in A498-Zellen, die zu einer (-)-Englerin A-Resistenz führen sollten. Dies könnte beispielsweise durch eine Genom-Editierung durch die Verwendung der CRISPR-Cas9-Methode erfolgen und bei einer gegebenen Resistenz gegenüber (-)-Englerin A TRPC4/5 als Zielproteine zusätzlich bestätigen.

Ein weiterer Anhaltspunkt ist die Brustkrebszelllinie HS578-T. Bisher konnte hauptsächlich nur eine Expression von TRPC4/5 nachgewiesen werden. Um den gemeinsamen Faktor zu bestimmen, der auch diese Zelllinie gegenüber (-)-Englerin A sensitiv macht sind, weitere Versuche erforderlich. Um Hinweise zu erlangen, ob TRPC4/5 auch in dieser Zelllinie die gesuchten Zielproteine sind, könnte auch hier die Aktivität der Substanz hinsichtlich der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration untersucht werden. Hierzu könnten die zellbasierten Testsysteme und elektrophysiologischen Methoden aus der vorliegenden Arbeit verwendet werden.

Ein sehr wichtiger Punkt, der in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte, ist der Nachweis der direkten Bindung bzw. Interaktion zwischen TRPC4/5 und (-)-Englerin A. Da es sich bei diesen Ionenkanälen um Membranproteine handelt und diese nicht in physiologischen Konditionen in Lösung vorliegen, sind Standardanalysetechniken zur Untersuchung von Protein- und Substanzinteraktionen wie der Affinitätschromatographie ohne weiteres nicht anwendbar. Eine Möglichkeit der Analyse der Membranproteininteraktion kann mit Hilfe von FLIM (Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie) gewährleistet werden. Hierzu müsste sowohl (-)-Englerin A als auch TRPC4/5 mit einem entsprechenden Fluorophor versehen werden. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Fluorophore die Substanz und Proteine in ihrer Aktivität nicht beeinflussen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die genannten

zukünftigen Experimente zur Aufklärung der direkten Interaktion zwischen (-)-Englerin A und TRPC4/5 beitragen und den Wirkungsmechanismus der Substanz weiter aufklären können.

Kapitel 7

Literaturverzeichnis

- [1] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, F. Bray, *European journal of cancer* **2013**, *49*, 1374-1403.
- [2] G. Kovacs, M. Akhtar, B. J. Beckwith, P. Bugert, C. S. Cooper, B. Delahunt, J. N. Eble, S. Fleming, B. Ljungberg, L. J. Medeiros, H. Moch, V. E. Reuter, E. Ritz, G. Roos, D. Schmidt, J. R. Srigley, S. Storkel, E. van den Berg, B. Zbar, *The Journal of pathology* **1997**, *183*, 131-133.
- [3] T. Pischon, P. H. Lahmann, H. Boeing, A. Tjonneland, J. Halkjaer, K. Overvad, K. Klipstein-Grobusch, J. Linseisen, N. Becker, A. Trichopoulou, V. Benetou, D. Trichopoulos, S. Sieri, D. Palli, R. Tumino, P. Vineis, S. Panico, E. Monninkhof, P. H. Peeters, H. B. Bueno-de-Mesquita, F. L. Buchner, B. Ljungberg, G. Hallmans, G. Berglund, C. A. Gonzalez, M. Dorronsoro, A. B. Gurrea, C. Navarro, C. Martinez, J. R. Quiros, A. Roddam, N. Allen, S. Bingham, K. T. Khaw, R. Kaaks, T. Norat, N. Slimani, E. Riboli, *International journal of cancer. Journal international du cancer* **2006**, *118*, 728-738.
- [4] D. L. Lim, R. Ko, S. E. Pautler, *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada* **2007**, *1*, S13-20.
- [5] H. L. Kim, A. S. Beldegrun, D. G. Freitas, M. H. Bui, K. R. Han, F. J. Dorey, R. A. Figlin, *The Journal of urology* **2003**, *170*, 1742-1746.
- [6] C. T. Lee, J. Katz, P. A. Fearn, P. Russo, *Urologic oncology* **2002**, *7*, 135-140.
- [7] J. J. Patard, E. Leray, A. Rodriguez, N. Rioux-Leclercq, F. Guille, B. Lobel, *European urology* **2003**, *44*, 226-232.
- [8] A. C. Novick, S. C. Campbell, P.C. Walsh, A.B. Retik, E.D. Vaughan, A.J. Wein (Eds.), *Campbell's urology*, WB Saunders, Philadelphia **2002**, 2672-2731.
- [9] S. M. Wilhelm, C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag, P. A. Trail, *Cancer research* **2004**, *64*, 7099-7109.
- [10] G. Sufrin, S. Chasan, A. Golio, G. P. Murphy, *Seminars in urology* **1989**, *7*, 158-171.
- [11] E. Collins, *Trans Ophthalmol Soc UK* **1894**, *14*, 141-149
- [12] W. Y. Kim, W. G. Kaelin, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2004**, *22*, 4991-5004.
- [13] F. Latif, K. Tory, J. Gnarra, M. Yao, F. M. Duh, M. L. Orcutt, T. Stackhouse, I. Kuzmin, W. Modi, L. Geil, et al., *Science* **1993**, *260*, 1317-1320.
- [14] D. A. Chan, P. D. Sutphin, P. Nguyen, S. Turcotte, E. W. Lai, A. Banh, G. E. Reynolds, J. T. Chi, J. Wu, D. E. Solow-Cordero, M. Bonnet, J. U. Flanagan, D. M. Bouley, E. E. Graves, W. A. Denny, M. P. Hay, A. J. Giaccia, *Sci Transl Med* **2011**, *3*, 94ra70.
- [15] F. M. Richards, S. J. Payne, B. Zbar, N. A. Affara, M. A. Ferguson-Smith, E. R. Maher, *Human molecular genetics* **1995**, *4*, 2139-2143.
- [16] A. Schoenfeld, E. J. Davidowitz, R. D. Burk, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 8817-8822.
- [17] O. Iliopoulos, A. Kibel, S. Gray, W. G. Kaelin, Jr., *Nature medicine* **1995**, *1*, 822-826.
- [18] I. Groulx, S. Lee, *Molecular and cellular biology* **2002**, *22*, 5319-5336.
- [19] Y. Ye, S. Vasavada, I. Kuzmin, T. Stackhouse, B. Zbar, B. R. Williams, *International journal of cancer. Journal international du cancer* **1998**, *78*, 62-69.
- [20] S. Lee, D. Y. Chen, J. S. Humphrey, J. R. Gnarra, W. M. Linehan, R. D. Klausner, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 1770-1775.

- [21] S. Lee, M. Neumann, R. Stearman, R. Stauber, A. Pause, G. N. Pavlakis, R. D. Klausner, *Molecular and cellular biology* **1999**, *19*, 1486-1497.
- [22] D. R. Duan, J. S. Humphrey, D. Y. Chen, Y. Weng, J. Sukegawa, S. Lee, J. R. Gnarra, W. M. Linehan, R. D. Klausner, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 6459-6463.
- [23] D. R. Duan, A. Pause, W. H. Burgess, T. Aso, D. Y. Chen, K. P. Garrett, R. C. Conaway, J. W. Conaway, W. M. Linehan, R. D. Klausner, *Science* **1995**, *269*, 1402-1406.
- [24] A. Kibel, O. Iliopoulos, J. A. DeCaprio, W. G. Kaelin, Jr., *Science* **1995**, *269*, 1444-1446.
- [25] Y. Takagi, A. Pause, R. C. Conaway, J. W. Conaway, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 27444-27449.
- [26] A. Pause, S. Lee, R. A. Worrell, D. Y. Chen, W. H. Burgess, W. M. Linehan, R. D. Klausner, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 2156-2161.
- [27] K. M. Lonergan, O. Iliopoulos, M. Ohh, T. Kamura, R. C. Conaway, J. W. Conaway, W. G. Kaelin, Jr., *Molecular and cellular biology* **1998**, *18*, 732-741.
- [28] T. Kamura, D. M. Koepp, M. N. Conrad, D. Skowyra, R. J. Moreland, O. Iliopoulos, W. S. Lane, W. G. Kaelin, Jr., S. J. Elledge, R. C. Conaway, J. W. Harper, J. W. Conaway, *Science* **1999**, *284*, 657-661.
- [29] T. Kamura, S. Sato, K. Iwai, M. Czyzyk-Krzeska, R. C. Conaway, J. W. Conaway, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 10430-10435.
- [30] G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue, G. L. Semenza, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 5510-5514.
- [31] V. Srinivas, L. P. Zhang, X. H. Zhu, J. Caro, *Biochemical and biophysical research communications* **1999**, *260*, 557-561.
- [32] N. Masson, C. Willam, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe, *The EMBO journal* **2001**, *20*, 5197-5206.
- [33] C. P. Pavlovich, L. S. Schmidt, *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 381-393.
- [34] G. L. Semenza, M. K. Nejfelt, S. M. Chi, S. E. Antonarakis, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 5680-5684.
- [35] C. Chen, N. Pore, A. Behrooz, F. Ismail-Beigi, A. Maity, *J Biol Chem.* **2001**, *276*, 9519-9525.
- [36] D. Mukhopadhyay, B. Knebelmann, H. T. Cohen, S. Ananth, V. P. Sukhatme, *Molecular and cellular biology* **1997**, *17*, 5629-5639.
- [37] J. R. Gnarra, S. Zhou, M. J. Merrill, J. R. Wagner, A. Krumm, E. Papavassiliou, E. H. Oldfield, R. D. Klausner, W. M. Linehan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 10589-10594.
- [38] F. A. Mack, W. K. Rathmell, A. M. Arsham, J. Gnarra, B. Keith, M. C. Simon, *Cancer Cell* **2003**, *3*, 75-88.
- [39] a) J. K. Maranchie, J. R. Vasselli, J. Riss, J. S. Bonifacino, W. M. Linehan, R. D. Klausner, *Cancer Cell* **2002**, *1*, 247-255; b) Y. Jiang, W. Zhang, K. Kondo, J. M. Kico, T. B. St Martin, M. R. Dufault, S. L. Madden, W. G. Kaelin, Jr., M. Nacht, *Molecular cancer research : MCR* **2003**, *1*, 453-462.
- [40] C. C. Wykoff, C. W. Pugh, P. H. Maxwell, A. L. Harris, P. J. Ratcliffe, *Oncogene* **2000**, *19*, 6297-6305.
- [41] P. A. Godley, M. Taylor, *Current opinion in oncology* **2001**, *13*, 199-203.
- [42] I. Bleumer, E. Oosterwijk, P. De Mulder, P. F. Mulders, *European urology* **2003**, *44*, 65-75.
- [43] R. J. Motzer, M. Mazumdar, J. Bacik, P. Russo, W. J. Berg, E. M. Metz, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2000**, *18*, 1928-1935.
- [44] B. I. Rini, S. C. Campbell, B. Escudier, *Lancet* **2009**, *373*, 1119-1132.
- [45] K. A. Furge, J. P. MacKeigan, B. T. Teh, *The Lancet. Oncology* **2010**, *11*, 571-578.
- [46] B. Shuch, A. Amin, A. J. Armstrong, J. N. Eble, V. Ficarra, A. Lopez-Beltran, G. Martignoni, B. I. Rini, A. Kutikov, *European urology* **2015**, *67*, 85-97.
- [47] Y. Liu, N. S. Gray, *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 358-364.

- [48] S. Faivre, G. Demetri, W. Sargent, E. Raymond, *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6, 734-745.
- [49] H. T. Cohen, F. J. McGovern, *The New England journal of medicine* **2005**, 353, 2477-2490.
- [50] J. J. Hiles, J. M. Kolesar, *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* **2008**, 65, 123-131.
- [51] R. J. Motzer, G. B. Bolger, B. Boston, M. A. Carducci, M. Fishman, S. L. Hancock, R. J. Hauke, G. R. Hudes, E. Jonasch, P. Kantoff, T. M. Kuzel, P. H. Lange, E. G. Levine, C. Logothetis, K. A. Margolin, K. Pohar, B. G. Redman, C. N. Robertson, W. E. Samlowski, J. Sheinfeld, N. National Comprehensive Cancer, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* **2006**, 4, 1072-1081.
- [52] T. Ikezoe, C. Nishioka, T. Tasaka, Y. Yang, N. Komatsu, K. Togitani, H. P. Koeffler, H. Taguchi, *Molecular cancer therapeutics* **2006**, 5, 2522-2530.
- [53] E. Zwick, J. Bange, A. Ullrich, *Trends in molecular medicine* **2002**, 8, 17-23.
- [54] D. Strumberg, H. Richly, R. A. Hilger, N. Schleucher, S. Korfee, M. Tewes, M. Faghhi, E. Brendel, D. Voliotis, C. G. Haase, B. Schwartz, A. Awada, R. Voigtmann, M. E. Scheulen, S. Seeber, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2005**, 23, 965-972.
- [55] T. Eisen, C. N. Sternberg, C. Robert, P. Mulders, L. Pyle, S. Zbinden, H. Izzedine, B. Escudier, *Journal of the National Cancer Institute* **2012**, 104, 93-113.
- [56] J. Bellmunt, C. Montagut, S. Albiol, J. Carles, P. Maroto, A. Orsola, *BJU international* **2007**, 99, 274-280.
- [57] A. Baerheim Svendsen, J. J. Scheffer, *Pharmaceutisch weekblad. Scientific edition* **1982**, 4, 93-103.
- [58] M. F. Balandrin, J. A. Klocke, E. S. Wurtele, W. H. Bollinger, *Science* **1985**, 228, 1154-1160.
- [59] N. J. de Souza, B. N. Ganguli, J. Reden, *Ann. Rep. Med. Chem.* **1982**, 17.
- [60] D. A. Dias, S. Urban, U. Roessner, *Metabolites* **2012**, 2, 303-336.
- [61] M. J. Balunas, A. D. Kinghorn, *Life sciences* **2005**, 78, 431-441.
- [62] G. Samuelsson, *5th Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm* **2004**.
- [63] M. J. Balick, P. A. Cox, *Scientific American Library, New York, NY* **1997**.
- [64] A. Douglas Kinghorn, *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2001**, 53, 135-148.
- [65] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Biochim Biophys Acta* **2013**, 1830, 3670-3695.
- [66] H. van Hattum, H. Waldmann, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136, 11853-11859.
- [67] C. M. Dobson, *Nature* **2004**, 432, 824-828.
- [68] J. Skolnick, M. Gao, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, 110, 9344-9349.
- [69] D. S. Fabricant, N. R. Farnsworth, *Environmental health perspectives* **2001**, 109 Suppl 1, 69-75.
- [70] M. F. Balandrin, A. D. Kinghorn, N. R. Farnsworth, in: A. D. Kinghorn, M. F. Balandrin (Eds.) *Human medicinal agents from plants. Amer. Chem. Soc., Washington, DC* **1993**, 534, 2-12.
- [71] I. Raskin, D. M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D. A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakoby, J. M. O'Neal, T. Cornwell, I. Pastor, B. Fridlender, *Trends in biotechnology* **2002**, 20, 522-531.
- [72] R. van Der Heijden, D. I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard, R. Verpoorte, *Current medicinal chemistry* **2004**, 11, 607-628.
- [73] T. Okouneva, B. T. Hill, L. Wilson, M. A. Jordan, *Molecular cancer therapeutics* **2003**, 2, 427-436.
- [74] P. B. Schiff, J. Fant, S. B. Horwitz, *Nature* **1979**, 277, 665-667.
- [75] S. B. Horwitz, *Journal of natural products* **2004**, 67, 136-138.
- [76] G. M. Cragg, P. G. Grothaus, D. J. Newman, *Chemical reviews* **2009**, 109, 3012-3043.
- [77] M. B. Atkins, M. S. Ernstoff, R. A. Figlin, K. T. Flaherty, D. J. George, W. G. Kaelin, Jr., E. D. Kwon, T. A. Libermann, W. M. Linehan, D. F. McDermott, A. C. Ochoa, A. J.

- Pantuck, B. I. Rini, M. A. Rosen, J. A. Sosman, V. P. Sukhatme, J. W. Vieweg, C. G. Wood, L. King, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2007**, *13*, 667s-670s.
- [78] R. Ratnayake, D. Covell, T. T. Ransom, K. R. Gustafson, J. A. Beutler, *Org Lett* **2009**, *11*, 57-60.
- [79] M. Willot, L. Radtke, D. Konning, R. Frohlich, V. H. Gessner, C. Strohmann, M. Christmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, 9105-9108.
- [80] L. Radtke, M. Willot, H. Sun, S. Ziegler, S. Sauerland, C. Strohmann, R. Frohlich, P. Habenberger, H. Waldmann, M. Christmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 3998-4002.
- [81] C. Sourbier, B. T. Scroggins, R. Ratnayake, T. L. Prince, S. Lee, M. J. Lee, P. L. Nagy, Y. H. Lee, J. B. Trepel, J. A. Beutler, W. M. Linehan, L. Neckers, *Cancer Cell* **2013**, *23*, 228-237.
- [82] B. R. Stockwell, *Nature reviews. Genetics* **2000**, *1*, 116-125.
- [83] D. R. Spring, *Chemical Society reviews* **2005**, *34*, 472-482.
- [84] B. R. Stockwell, *Trends in biotechnology* **2000**, *18*, 449-455.
- [85] C. J. O'Connor, L. Laraia, D. R. Spring, *Chemical Society reviews* **2011**, *40*, 4332-4345.
- [86] J. R. Yeh, C. M. Crews, *Developmental cell* **2003**, *5*, 11-19.
- [87] D. P. Walsh, Y. T. Chang, *Chemical reviews* **2006**, *106*, 2476-2530.
- [88] S. L. Schreiber, *Bioorganic & medicinal chemistry* **1998**, *6*, 1127-1152.
- [89] Y. Smurnyy, M. Cai, H. Wu, E. McWhinnie, J. A. Tallarico, Y. Yang, Y. Feng, *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 623-625.
- [90] L. Burdine, T. Kodadek, *Chemistry & biology* **2004**, *11*, 593-597.
- [91] D. V. Titov, J. O. Liu, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20*, 1902-1909.
- [92] S. A. Wacker, B. R. Houghtaling, O. Elemento, T. M. Kapoor, *Nat Chem Biol* **2012**, *8*, 235-237.
- [93] S. Ziegler, V. Pries, C. Hedberg, H. Waldmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52*, 2744-2792.
- [94] J. Liu, J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807-815.
- [95] M. Kawatani, H. Osada, *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 277.
- [96] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 616-624.
- [97] S. E. Ong, I. Kratchmarova, M. Mann, *Journal of proteome research* **2003**, *2*, 173-181.
- [98] S. E. Ong, M. Schenone, A. A. Margolin, X. Li, K. Do, M. K. Doud, D. R. Mani, L. Kuai, X. Wang, J. L. Wood, N. J. Tolliday, A. N. Koehler, L. A. Marcaurette, T. R. Golub, R. J. Gould, S. L. Schreiber, S. A. Carr, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 4617-4622.
- [99] T. Voigt, C. Gerding-Reimers, T. T. Ngoc Tran, S. Bergmann, H. Lachance, B. Scholermann, A. Brockmeyer, P. Janning, S. Ziegler, H. Waldmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52*, 410-414.
- [100] J. S. Cisar, B. F. Cravatt, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 10385-10388.
- [101] S. B. Breitkopf, F. S. Oppermann, G. Keri, M. Grammel, H. Daub, *Journal of proteome research* **2010**, *9*, 6033-6043.
- [102] T. A. Prokhorova, K. T. Rigbolt, P. T. Johansen, J. Henningsen, I. Kratchmarova, M. Kassem, B. Blagoev, *Molecular & cellular proteomics : MCP* **2009**, *8*, 959-970.
- [103] M. Kruger, M. Moser, S. Ussar, I. Thievensen, C. A. Luber, F. Forner, S. Schmidt, S. Zanivan, R. Fassler, M. Mann, *Cell* **2008**, *134*, 353-364.
- [104] J. Krijgsveld, R. F. Ketting, T. Mahmoudi, J. Johansen, M. Artal-Sanz, C. P. Verrijzer, R. H. Plasterk, A. J. Heck, *Nature biotechnology* **2003**, *21*, 927-931.
- [105] G. Li, Y. Liu, Y. Liu, L. Chen, S. Wu, Y. Liu, X. Li, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52*, 9544-9549.
- [106] D. J. Lapinsky, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20*, 6237-6247.
- [107] A. L. Mackinnon, J. Taunton, *Current protocols in chemical biology* **2009**, *1*, 55-73.
- [108] L. Dubinsky, B. P. Krom, M. M. Meijler, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20*, 554-570.

- [109] H. Shi, C. J. Zhang, G. Y. Chen, S. Q. Yao, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 3001-3014.
- [110] J. N. Chan, C. Nislow, A. Emili, *Trends in pharmacological sciences* **2010**, *31*, 82-88.
- [111] G. Giaever, D. D. Shoemaker, T. W. Jones, H. Liang, E. A. Winzeler, A. Astromoff, R. W. Davis, *Nature genetics* **1999**, *21*, 278-283.
- [112] C. H. Ho, L. Magtanong, S. L. Barker, D. Gresham, S. Nishimura, P. Natarajan, J. L. Koh, J. Porter, C. A. Gray, R. J. Andersen, G. Giaever, C. Nislow, B. Andrews, D. Botstein, T. R. Graham, M. Yoshida, C. Boone, *Nature biotechnology* **2009**, *27*, 369-377.
- [113] G. M. Walker, *Journal of general microbiology* **1982**, *128*, 61-71.
- [114] W. A. Weiss, S. S. Taylor, K. M. Shokat, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 739-744.
- [115] M. E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P. N. Rao, C. L. Sawyers, *Science* **2001**, *293*, 876-880.
- [116] M. Azam, R. R. Latek, G. Q. Daley, *Cell* **2003**, *112*, 831-843.
- [117] P. Lenart, M. Petronczki, M. Steegmaier, B. Di Fiore, J. J. Lipp, M. Hoffmann, W. J. Rettig, N. Kraut, J. M. Peters, *Current biology : CB* **2007**, *17*, 304-315.
- [118] F. Teraishi, S. Wu, L. Zhang, W. Guo, J. J. Davis, F. Dong, B. Fang, *Cancer research* **2005**, *65*, 6380-6387.
- [119] T. Roemer, C. Boone, *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 222-231.
- [120] W. E. Glaab, K. R. Tindall, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1-8.
- [121] F. Girdler, F. Sessa, S. Patercoli, F. Villa, A. Musacchio, S. Taylor, *Chemistry & biology* **2008**, *15*, 552-562.
- [122] M. Kothe, D. Kohls, S. Low, R. Coli, G. R. Rennie, F. Feru, C. Kuhn, Y. H. Ding, *Chemical biology & drug design* **2007**, *70*, 540-546.
- [123] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* **2012**, *337*, 816-821.
- [124] P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, G. M. Church, *Science* **2013**, *339*, 823-826.
- [125] F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, F. Zhang, *Nature protocols* **2013**, *8*, 2281-2308.
- [126] Y. Fu, J. A. Foden, C. Khayter, M. L. Maeder, D. Reyon, J. K. Joung, J. D. Sander, *Nature biotechnology* **2013**, *31*, 822-826.
- [127] W. E. Glaab, J. I. Risinger, A. Umar, J. C. Barrett, T. A. Kunkel, K. R. Tindall, *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 1931-1937.
- [128] B. S. Andersson, V. P. Collins, R. Kurzrock, D. W. Larkin, C. Childs, A. Ost, A. Cork, J. M. Trujillo, E. J. Freireich, M. J. Siciliano, et al., *Leukemia* **1995**, *9*, 2100-2108.
- [129] G. Bertani, *Journal of bacteriology* **1951**, *62*, 293-300.
- [130] K. Mullis, F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **1986**, *51 Pt 1*, 263-273.
- [131] M. M. Bradford, *Analytical biochemistry* **1976**, *72*, 248-254.
- [132] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J Biol Chem* **1951**, *193*, 265-275.
- [133] G. L. Peterson, *Analytical biochemistry* **1979**, *100*, 201-220.
- [134] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [135] D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- [136] J. Martinez-Serra, A. Gutierrez, S. Munoz-Capo, M. Navarro-Palou, T. Ros, J. C. Amat, B. Lopez, T. F. Marcus, L. Fueyo, A. G. Suquia, J. Gines, F. Rubio, R. Ramos, J. Besalduch, *OncoTargets and therapy* **2014**, *7*, 985-994.
- [137] S. Kustermann, F. Boess, A. Bunes, M. Schmitz, M. Watzele, T. Weiser, T. Singer, L. Suter, A. Roth, *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2013**, *27*, 1589-1595.
- [138] R. Limame, A. Wouters, B. Pauwels, E. Fransen, M. Peeters, F. Lardon, O. De Wever, P. Pauwels, *PloS one* **2012**, *7*, e46536.
- [139] G. Melino, *Nature* **2001**, *412*, 23.
- [140] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, *British journal of cancer* **1972**, *26*, 239-257.

- [141] A. B. Parrish, C. D. Freel, S. Kornbluth, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2013**, 5.
- [142] S. Elmore, *Toxicologic pathology* **2007**, 35, 495-516.
- [143] G. Marino, M. Niso-Santano, E. H. Baehrecke, G. Kroemer, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, 15, 81-94.
- [144] N. Mizushima, *Genes & development* **2007**, 21, 2861-2873.
- [145] A. Fleming, T. Noda, T. Yoshimori, D. C. Rubinsztein, *Nat Chem Biol* **2011**, 7, 9-17.
- [146] P. Vandenabeele, W. Declercq, F. Van Herreweghe, T. Vanden Berghe, *Science signaling* **2010**, 3, re4.
- [147] S. M. Laster, J. G. Wood, L. R. Gooding, *Journal of immunology* **1988**, 141, 2629-2634.
- [148] A. H. Wyllie, J. F. Kerr, A. R. Currie, *International review of cytology* **1980**, 68, 251-306.
- [149] T. Sano, S. Vajda, C. R. Cantor, *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* **1998**, 715, 85-91.
- [150] P. S. Stayton, S. Freitag, L. A. Klumb, A. Chilkoti, V. Chu, J. E. Penzotti, R. To, D. Hyre, I. Le Trong, T. P. Lybrand, R. E. Stenkamp, *Biomolecular engineering* **1999**, 16, 39-44.
- [151] O. H. Laitinen, V. P. Hytonen, H. R. Nordlund, M. S. Kulomaa, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2006**, 63, 2992-3017.
- [152] C. E. Chivers, A. L. Koner, E. D. Lowe, M. Howarth, *The Biochemical journal* **2011**, 435, 55-63.
- [153] S. W. Lee, B. H. Cho, S. G. Park, S. Kim, *J Cell Sci* **2004**, 117, 3725-3734.
- [154] S. Mostowy, P. Cossart, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, 13, 183-194.
- [155] P. A. Futreal, L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman, M. R. Stratton, *Nat Rev Cancer* **2004**, 4, 177-183.
- [156] S. Blagden, J. de Bono, *Current drug targets* **2005**, 6, 325-335.
- [157] O. N. Ikediobi, 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, *Molecular cancer therapeutics* **2006**, 5, 2606-2612.
- [158] G. L. Semenza, *Journal of bioenergetics and biomembranes* **2007**, 39, 231-234.
- [159] P. H. Maxwell, M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher, P. J. Ratcliffe, *Nature* **1999**, 399, 271-275.
- [160] M. S. Wiesener, P. M. Munchenhagen, I. Berger, N. V. Morgan, J. Roigas, A. Schwiertz, J. S. Jurgensen, G. Gruber, P. H. Maxwell, S. A. Loning, U. Frei, E. R. Maher, H. J. Grone, K. U. Eckardt, *Cancer research* **2001**, 61, 5215-5222.
- [161] S. Wadhwa, P. Wadhwa, A. K. Dinda, N. P. Gupta, *Int Urol Nephrol* **2009**, 41, 251-257.
- [162] D. Veliceasa, M. Ivanovic, F. T. Hoepfner, P. Thumbikat, O. V. Volpert, N. D. Smith, *Febs J* **2007**, 274, 6365-6377.
- [163] J. Garcia-Quiroz, R. Garcia-Becerra, D. Barrera, N. Santos, E. Avila, D. Ordaz-Rosado, M. Rivas-Suarez, A. Halhali, P. Rodriguez, A. Gamboa-Dominguez, H. Medina-Franco, J. Camacho, F. Larrea, L. Diaz, *PloS one* **2012**, 7, e45063.
- [164] A. Beck, T. Speicher, C. Stoerger, T. Sell, V. Dettmer, S. A. Jusoh, A. Abdulmughni, A. Cavalie, S. E. Philipp, M. X. Zhu, V. Helms, U. Wissenbach, V. Flockerzi, *J Biol Chem* **2013**, 288, 19471-19483.
- [165] A. V. Zholos, *Handbook of experimental pharmacology* **2014**, 222, 129-156.
- [166] A. Cavalie, *Handbook of experimental pharmacology* **2007**, 93-108.
- [167] T. D. Plant, M. Schaefer, *Cell Calcium* **2003**, 33, 441-450.

- [168] T. D. Plant, M. Schaefer, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **2005**, 371, 266-276.
- [169] M. Freichel, V. Tsvilovskyy, J. E. Camacho-Londono, *Handbook of experimental pharmacology* **2014**, 222, 85-128.
- [170] M. Miller, J. Shi, Y. M. Zhu, M. Kustov, J. B. Tian, A. Stevens, M. Wu, J. Xu, S. Y. Long, P. Yang, A. V. Zholos, J. M. Salovich, C. D. Weaver, C. R. Hopkins, C. W. Lindsley, O. McManus, M. Li, M. X. Zhu, *Journal of Biological Chemistry* **2011**, 286, 33436-33446.
- [171] M. Schaefer, T. D. Plant, A. G. Obukhov, T. Hofmann, T. Gudermann, G. Schultz, *J Biol Chem* **2000**, 275, 17517-17526.
- [172] S. Z. Xu, P. Sukumar, F. Zeng, J. Li, A. Jairaman, A. English, J. Naylor, C. Ciurtin, Y. Majeed, C. J. Milligan, Y. M. Bahnasi, E. Al-Shawaf, K. E. Porter, L. H. Jiang, P. Emery, A. Sivaprasadarao, D. J. Beech, *Nature* **2008**, 451, 69-72.
- [173] J. Kim, M. Kwak, J. P. Jeon, J. Myeong, J. Wie, C. Hong, S. Y. Kim, J. H. Jeon, H. J. Kim, I. So, *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2014**, 466, 491-504.
- [174] G. Vazquez, B. J. Wedel, O. Aziz, M. Trebak, J. W. Putney, Jr., *Biochim Biophys Acta* **2004**, 1742, 21-36.
- [175] S. Z. Xu, F. Zeng, G. Boulay, C. Grimm, C. Harteneck, D. J. Beech, *British journal of pharmacology* **2005**, 145, 405-414.
- [176] J. Abramowitz, L. Birnbaumer, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2009**, 23, 297-328.
- [177] D. J. Beech, *Circ J* **2013**, 77, 570-579.
- [178] C. Strubing, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, D. E. Clapham, *Neuron* **2001**, 29, 645-655.
- [179] B. Zhivotovsky, S. Orrenius, *Cell Calcium* **2011**, 50, 211-221.
- [180] G. Kroemer, J. C. Reed, *Nature medicine* **2000**, 6, 513-519.
- [181] T. Nakagawa, S. Shimizu, T. Watanabe, O. Yamaguchi, K. Otsu, H. Yamagata, H. Inohara, T. Kubo, Y. Tsujimoto, *Nature* **2005**, 434, 652-658.
- [182] G. Kroemer, B. Dallaporta, M. Resche-Rigon, *Annu Rev Physiol* **1998**, 60, 619-642.
- [183] Y. Akbulut, H. J. Gaunt, K. Muraki, M. J. Ludlow, M. S. Amer, A. Bruns, N. S. Vasudev, L. Radtke, M. Willot, S. Hahn, T. Seitz, S. Ziegler, M. Christmann, D. J. Beech, H. Waldmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, 54, 3787-3791.
- [184] R. K. Akee, T. Ransom, R. Ratnayake, J. B. McMahon, J. A. Beutler, *Journal of natural products* **2012**, 75, 459-463.
- [185] S. Danilin, C. Sourbier, L. Thomas, V. Lindner, S. Rothhut, V. Dormoy, J. J. Helwig, D. Jacqmin, H. Lang, T. Massfelder, *Carcinogenesis* **2010**, 31, 1018-1026.
- [186] M. Gerlinger, S. Horswell, J. Larkin, A. J. Rowan, M. P. Salm, I. Varela, R. Fisher, N. McGranahan, N. Matthews, C. R. Santos, P. Martinez, B. Phillimore, S. Begum, A. Rabinowitz, B. Spencer-Dene, S. Gulati, P. A. Bates, G. Stamp, L. Pickering, M. Gore, D. L. Nicol, S. Hazell, P. A. Futreal, A. Stewart, C. Swanton, *Nature genetics* **2014**, 46, 225-233.
- [187] F. J. Sulzmaier, Z. Li, M. L. Nakashige, D. M. Fash, W. J. Chain, J. W. Ramos, *PloS one* **2012**, 7, e48032.
- [188] A. H. Boulares, A. G. Yakovlev, V. Ivanova, B. A. Stoica, G. Wang, S. Iyer, M. Smulson, *J Biol Chem* **1999**, 274, 22932-22940.
- [189] R. T. Williams, A. L. Yu, M. B. Diccianni, E. A. Theodorakis, A. Batova, *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **2013**, 32, 57.
- [190] C. Borner, L. Monney, *Cell death and differentiation* **1999**, 6, 497-507.
- [191] W. X. Zong, C. B. Thompson, *Genes & development* **2006**, 20, 1-15.
- [192] L. A. Pennacchio, D. M. Bouley, K. M. Higgins, M. P. Scott, J. L. Noebels, R. M. Myers, *Nature genetics* **1998**, 20, 251-258.
- [193] I. S. Mathiasen, I. N. Sergeev, L. Bastholm, F. Elling, A. W. Norman, M. Jaattela, *J Biol Chem* **2002**, 277, 30738-30745.
- [194] Y. Futamura, M. Muroi, H. Osada, *Molecular bioSystems* **2013**, 9, 897-914.
- [195] S. Antoniotti, A. Fiorio Pla, S. Barral, O. Scalabrino, L. Munaron, D. Lovisolo, *Journal of receptor and signal transduction research* **2006**, 26, 225-240.

- [196] M. Schaefer, T. D. Plant, N. Stresow, N. Albrecht, G. Schultz, *J Biol Chem* **2002**, 277, 3752-3759.
- [197] J. P. Jeon, C. Hong, E. J. Park, J. H. Jeon, N. H. Cho, I. G. Kim, H. Choe, S. Muallem, H. J. Kim, I. So, *J Biol Chem* **2012**, 287, 17029-17039.
- [198] B. Vannier, X. Zhu, D. Brown, L. Birnbaumer, *J Biol Chem* **1998**, 273, 8675-8679.
- [199] V. V. Tsvilovskyy, A. V. Zholos, T. Aberle, S. E. Philipp, A. Dietrich, M. X. Zhu, L. Birnbaumer, M. Freichel, V. Flockerzi, *Gastroenterology* **2009**, 137, 1415-1424.
- [200] S. F. Pedersen, G. Owsianik, B. Nilius, *Cell Calcium* **2005**, 38, 233-252.
- [201] D. E. Clapham, *Nature* **2003**, 426, 517-524.
- [202] B. Pani, S. Bollimuntha, B. B. Singh, *Frontiers in bioscience* **2012**, 17, 805-823.
- [203] I. S. Ramsey, M. Delling, D. E. Clapham, *Annu Rev Physiol* **2006**, 68, 619-647.
- [204] M. Miller, J. Shi, Y. Zhu, M. Kustov, J. B. Tian, A. Stevens, M. Wu, J. Xu, S. Long, P. Yang, A. V. Zholos, J. M. Salovich, C. D. Weaver, C. R. Hopkins, C. W. Lindsley, O. McManus, M. Li, M. X. Zhu, *J Biol Chem* **2011**, 286, 33436-33446.
- [205] M. Freichel, S. H. Suh, A. Pfeifer, U. Schweig, C. Trost, P. Weissgerber, M. Biel, S. Philipp, D. Freise, G. Droogmans, F. Hofmann, V. Flockerzi, B. Nilius, *Nature cell biology* **2001**, 3, 121-127.
- [206] C. Tiruppathi, M. Freichel, S. M. Vogel, B. C. Paria, D. Mehta, V. Flockerzi, A. B. Malik, *Circulation research* **2002**, 91, 70-76.
- [207] T. Munsch, M. Freichel, V. Flockerzi, H. C. Pape, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, 16065-16070.
- [208] A. G. Obukhov, M. C. Nowycky, *J Biol Chem* **2002**, 277, 16172-16178.
- [209] W. C. Huang, J. S. Young, M. D. Glitsch, *Cell Calcium* **2007**, 42, 1-10.
- [210] Y. Q. Gao, H. Gao, Z. Y. Zhou, S. D. Lu, F. Y. Sun, *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]* **2004**, 56, 153-157.
- [211] Y. Sun, P. Sukumaran, B. C. Bandyopadhyay, B. B. Singh, *Cells* **2014**, 3, 455-475.
- [212] D. J. McConkey, S. Orrenius, *Journal of leukocyte biology* **1996**, 59, 775-783.
- [213] A. W. Leung, A. P. Halestrap, *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1777, 946-952.
- [214] P. Bernardi, A. Krauskopf, E. Basso, V. Petronilli, E. Blachly-Dyson, F. Di Lisa, M. A. Forte, *Febs J* **2006**, 273, 2077-2099.
- [215] A. P. Halestrap, S. J. Clarke, S. A. Javadov, *Cardiovascular research* **2004**, 61, 372-385.
- [216] A. P. Halestrap, *Biochemical Society transactions* **2006**, 34, 232-237.
- [217] E. J. Griffiths, A. P. Halestrap, *Journal of molecular and cellular cardiology* **1993**, 25, 1461-1469.
- [218] T. Qian, A. L. Nieminen, B. Herman, J. J. Lemasters, *The American journal of physiology* **1997**, 273, C1783-1792.
- [219] N. Leducq, M. C. Delmas-Beauvieux, I. Bourdel-Marchasson, S. Dufour, J. L. Gallis, P. Canioni, P. Diolez, *Transplantation proceedings* **2000**, 32, 479-480.
- [220] S. J. Clarke, G. P. McStay, A. P. Halestrap, *J Biol Chem* **2002**, 277, 34793-34799.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Dysregulierung von HIF-1 α durch die VHL-Inaktivierung.....	7
Lizenznummer: 3633610289192	
Abbildung 1.2: Wirkungsmechanismus von Angiogeneseinhibitoren bei VEGF ausgelöster verstärkter Angiogenese.....	10
Abbildung 1.3: Wirkung von (-)-Englerin A auf das Wachstum von Nierenkrebszellen.....	13
Genehmigung wurde schriftlich bestätigt	
Abbildung 1.4: Wirkung von (-)-Englerin A-Derivaten auf die Viabilität von Nierenkrebszellen.....	14
Lizenznummer: 3635471184344	
Abbildung 1.5: PKC θ als Zielprotein von (-)-Englerin A.....	16
Abbildung 1.6: Vergleich zwischen genetischen- und chemisch-genetischen Ansätzen.....	18
Lizenznummer: 3635480814598	
Abbildung 1.7: Affinitäts-basierte Methoden zur Zielprotein-Identifizierung.....	20
Lizenznummer: 3635500738528	
Abbildung 1.8: Affinitätschromatographie mit einer photoreaktiven Sonde.....	22
Genehmigung wurde schriftlich bestätigt	
Abbildung 1.9: Zielprotein-Identifizierung durch Transkriptomanalyse.....	24
Lizenznummer: 3635521137208	
Abbildung 4.1: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität in Nierenkrebszellen und HS578-T-Zellen.....	66
Abbildung 4.2: Echtzeitanalysen von (-)-Englerin A in A498-Zellen.....	70
Abbildung 4.3: Einfluss von (-)-Englerin A in A498-Zellen nach kurzen Behandlungszeiten.....	72
Abbildung 4.4: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Morphologie von A498-Zellen.....	74
Abbildung 4.5: Untersuchungen zur Apoptose in A498-Zellen.....	76
Abbildung 4.6: Untersuchungen zur Autophagie in A498-Zellen.....	77
Abbildung 4.7: Untersuchungen zur Nekrose in A498-Zellen.....	78
Abbildung 4.8: Identifizierte mögliche Zielproteine für die Substanzen 7 und 8.....	81
Abbildung 4.9: Validierung des Proteins SYEP als Zielprotein von Substanz 7 in A498-Zellen.....	82
Abbildung 4.10: Kinase- Profilierung von (-)-Englerin A.....	84

Abbildung 4.11: Einfluss von (-)-Englerin A auf den Glukosemetabolismus in A498-Zellen.....	87
Abbildung 4.12: Untersuchungen von Ionenkanälen als mögliche Zielproteine von (-)-Englerin A.....	89
Abbildung 4.13: Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in CHO-Zellen.....	91
Abbildung 4.14: Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen.....	92
Abbildung 4.15: TRPC4/5-Proteinexpression in Nierenkrebszellen.....	93
Abbildung 4.16: TRPC4/5-Proteinexpression in HS578-T- und HEK293-Zellen.....	94
Abbildung 4.17: Expression von TRPC4 α/β in verschiedenen Zelllinien.....	95
Abbildung 4.18: (-)-Englerin A-induzierter Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-TRPC4/5-Zellen.....	97
Abbildung 4.19: Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in An- und Abwesenheit von 1,5 mM Ca^{2+} im Kulturmedium.....	98
Abbildung 4.20: Einfluss von (-)Englerin A auf die Ionenströme in HEK293-TRPC4-Zellen.....	100
Abbildung 4.21: Die Effekte von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in HEK293-TRPC6-, HEK293-TRPM2- und CHO-TRPV4-Zellen.....	101
Abbildung 4.22: Einfluss von (-)-Englerin A auf GPCRs in HEK293-TRPC4-Zellen.....	102
Abbildung 4.23: Profilierung von (-)-Englerin A für die Modulation ausgewählter GPCRs...	103
Abbildung 4.24: TRPC4/5-Expressionskontrollen in HEK293T-TRPC4/5-Zellen.....	104
Abbildung 4.25: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität in HEK293T-TRPC4/5-Zellen.....	105
Abbildung 4.26: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Morphologie von HEK293T-TRPC4-Zellen.....	106
Abbildung 4.27: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Morphologie von HEK293T-TRPC5-Zellen.....	107
Abbildung 4.28: Einfluss von (-)-Englerin A auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in A498-Zellen.....	108
Abbildung 4.29: Effekte von (-)-Englerin A auf Ionenkanäle in A498-Zellen.....	109
Abbildung 4.30: Einfluss von (-)Englerin A auf die Ionenströme in HEK293-TRPC4/1-Zellen.....	110
Abbildung 4.31: Untersuchungen zur Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5 in A498-Zellen.....	112

Abbildung 4.32: Untersuchungen zur Interaktion von TRPC4 mit TRPC1 und TRPC5 in HS578-T-Zellen.....	112
Abbildung 4.33: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Zellviabilität in A498-Zellen in Abhängigkeit von Ca ²⁺	114
Abbildung 4.34: Einfluss von (-)-Englerin A auf die Mitochondrien in A498-Zellen.....	115
Abbildung 4.35: Nachweis von PKC θ - und HSF-1 auf mRNA-Ebene in verschiedenen Zelllinien.....	116
Abbildung 4.36: Nachweis von PKC θ und HSF-1 auf Proteinebene in verschiedenen Nierenkrebszelllinien.....	117
Abbildung 4.37: Nachweis von PKC θ und HSF-1 auf Proteinebene in HS578-T- und HEK293-Zellen.....	117
Abbildung 5.1: Aktivierung von Speicher-abhängigen TRPC-Kanälen.....	131
Lizenznummer: 3635520684928	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Einfluss der (-)-Englerin A-Derivate auf die Viabilität von A498-Zellen.....	67
Tabelle 4.2: Affinitätssonden für affinitätschromatographische Versuche.....	79
Tabelle 4.3: Charakteristische Mutationen in verschiedenen Nierenkrebszelllinien.....	85

Abkürzungsverzeichnis

AC ₅₀	Aktivierende Konzentration 50
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Tissue Culture Collection
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalziumion
cDNA	komplementäre DNA
CRISPRCas9	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-Cas9</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Effektive Konzentration 50
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FBS	fetales Rinderserum
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GI ₅₀	Wachstumsinhibierende Konzentration 50
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
HTS	Hochdurchsatz-Screen
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
MΩ	Megaohm
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis eines Ionenfragments
min	Minute
mRNA	Boten-RNA

nA	Nanoampere
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-2	<i>Platelet-derived growth factor-β</i>
PKCθ	Proteinkinase C theta
RTK	Rezeptortyrosinkinase
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
TRPC	<i>Transient receptor potential cation channels</i>
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	Von Hippel-Lindau-Syndrom
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WST-1	wasserlösliches Tetrazolium
z.B.	zum Beispiel

Publikationen

1. Y. Akbulut, H. J. Gaunt, K. Muraki, M. J. Ludlow, M. S. Amer, A. Bruns, N. S. Vasudev, L. Radtke, M. Willot, S. Hahn, T. Seitz, S. Ziegler, M. Christmann, D. J. Beech, H. Waldmann, *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54*, 3787-3791.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann für die Auswahl des spannenden Promotionsthemas, die fortwährende Unterstützung während der gesamten Arbeit und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Schulz möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Frau Dr. Slava Ziegler danke ich für die kompetente Betreuung während der Arbeit und die Unterstützung bei Fragen und Diskussionen. Darüber hinaus möchte ich mich bei ihr für den Rückhalt während des Schreibprozesses und die Durchsicht der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Mathias Christmann, Frau Dr. Lea Radtke und Herrn Dr. Matthieu Willot danke ich für die Synthese der chemischen Verbindungen und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. D. J. Beech und Frau M.Sc. H. J. Gaunt danke ich für die erfolgreiche Kollaboration und die Durchführung der elektrophysiologischen Experimente.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Stühmer und Herrn Prof. Dr. Luis Pardo möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung der elektrophysiologischen Versuche am MPI in Göttingen bedanken.

Darüber hinaus danke ich insbesondere Frau M.Sc. Lea Kremer und Frau Dr. Kirsten Tschapalda sowohl für die Motivation und Unterstützung während des Schreibprozesses als auch für die Durchsicht der Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der ganzen Projektgruppe sowohl für die gute Teamarbeit als auch für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Akbulut, Yasemin
Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen.

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Identifizierung und Charakterisierung der selektiven Wirkung von (-)-Englerin A

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)