

**Identifizierung neuer PDE6D-Bindungspartner  
und  
Entwicklung eines phänotypischen Screens zur  
Identifizierung biologisch aktiver Indolochinolizine**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
der Technischen Universität Dortmund angenommene

**Dissertation**

von

**Diplom Biologe Philipp Robert Felix Küchler**

aus Hadamar

Dekan: Prof. Dr. Roland Winter  
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Herbert Waldmann  
2. Gutachter: PD Dr. Leif Dehmelt



Die vorliegende Dissertation entstand im Zeitraum von Juni 2011 bis April 2017 unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Herbert Waldmann an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund und dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund.

<b>1</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG NEUER PDE6D-INTERAKTIONSPARTNER .....</b>	<b>1</b>
1.1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.2	SUMMARY .....	2
1.3	EINLEITUNG.....	4
1.3.1	Lipidierung als posttranslationale Modifikation.....	4
1.3.2	Prenylierung von Proteinen .....	5
1.3.3	Biologische Rolle von Prenylierungen.....	8
1.3.4	Das molekulare Chaperon PDE6D .....	11
1.3.5	Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom .....	15
1.4	ZIELSETZUNG.....	19
1.5	ERGEBNISSE.....	21
1.5.1	Identifizierung von PDE6D-Interaktionspartnern mittels GST-Pulldown .....	21
1.5.2	Identifizierung von PDE6D-Interaktionspartnern mittels Koimmunpräzipitation.....	27
1.5.3	Validierung der identifizierten PDE6D-Interaktionspartner .....	31
1.5.4	Validierung und Charakterisierung neuer PDE6D-Interaktionspartner .....	33
1.5.5	Die PDE6D–Progerin-Interaktion.....	38
1.5.6	Auswirkungen der Inhibition der PDE6D–Progerin-Wechselwirkung.....	46
1.6	DISKUSSION.....	53
1.6.1	Identifikation von PDE6D-Interaktionspartnern mittels GST-Pulldown .....	53
1.6.2	Identifikation von PDE6D-Interaktionspartnern mittels Immunpräzipitation .....	57
1.6.3	Validierung identifizierter PDE6D-Interaktionspartnern .....	62
1.6.4	Untersuchungen zur Interaktion von PDE6D und CDC42, RAB23 und CNP .....	63
1.6.5	Untersuchungen zur PDE6D-Progerin Interaktion .....	66
1.6.6	Physiologische Auswirkungen der Inhibition der PDE6D-Progerin-Wechselwirkung ...	69
1.6.7	Betrachtungen zur Bindungsspezifität PDE6Ds .....	70
1.7	AUSBLICK.....	73
<b>2</b>	<b>ENTWICKLUNG EINES SCREENS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON BIOLOGISCH AKTIVEN INDOLOCHINOLIZINEN.....</b>	<b>77</b>
2.1	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
2.2	SUMMARY .....	78
2.3	EINLEITUNG.....	80
2.3.1	Der Zellzyklus .....	80
2.3.2	M-Phase und Spindelkontrollpunkt .....	82
2.3.3	Mitose-Inhibitoren in der Krebsforschung .....	85
2.3.4	NPM als Zielprotein in der Krebsforschung.....	90
2.3.5	Centrocountine: Biologisch aktive Indolochinolizine .....	97
2.4	ZIELSETZUNG.....	98

2.5	ERGEBNISSE.....	99
2.5.1	Entwicklung eines zellbasierten Screens auf Basis eines mitotischen Markerproteins....	99
2.5.2	Phänotypisches Screening von Centrocountin-Derivaten .....	105
2.5.3	Charakterisierung des potentesten Centrocountin-Derivats a528.....	106
2.5.4	Untersuchungen zum Wirkmechanismus biologisch aktiver Indolochinolizine.....	111
2.6	DISKUSSION.....	118
2.6.1	Entwicklung eines phänotypischen Screens zur Identifikation neuer Centrocountin-Derivate .....	118
2.6.2	Charakterisierung des potentesten Centrocountin-Derivats .....	120
2.6.3	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Centrocountin-1 .....	121
2.7	AUSBLICK.....	125
<b>3</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>127</b>
3.1	CHEMIKALIEN UND ZELLKULTURMEDIEN.....	127
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	128
3.3	ENZYME UND KITS .....	129
3.4	PROTEIN- UND DNA-STANDARDS .....	129
3.5	PRIMER.....	129
3.6	PLASMIDE.....	131
3.7	ANTIKÖRPER.....	132
<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>133</b>
4.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	133
4.1.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	133
4.1.2	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen .....	133
4.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA .....	133
4.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	133
4.1.5	Klonierung von humanem CDC42 .....	134
4.1.6	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	136
4.1.7	RNA-Isolation .....	137
4.1.8	cDNA-Synthese aus mRNA .....	137
4.1.9	Transformation von E.coli mittels Hitzeschock.....	137
4.1.10	Mutagenese mittels QuikChange-PCR .....	138
4.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	138
4.2.1	Expression und Reinigung von DecaHistidin-Nucleophosmin und Mutanten .....	138
4.2.2	Expression und Reinigung von 6xHis-CRM1 .....	139
4.2.3	Expression und Reinigung von GST-PDE6D.....	140
4.2.4	Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration .....	141
4.2.5	SDS-PAGE.....	141

4.2.6	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen .....	142
4.2.7	Oligomerisierung von DecaHistidin-NPM und Mutanten.....	142
4.2.8	Native Gelelektrophorese .....	142
4.2.9	Immunblot .....	143
4.2.10	GST-Pulldown.....	143
4.2.11	Immunpräzipitation.....	144
4.2.12	Tryptischer Verdau von Proteinkomplexen.....	145
4.2.13	StageTip Reinigung von Peptiden .....	145
4.2.14	Protein-Identifikation mittels nano-HPLC-MS/MS.....	145
4.2.15	MS/MS Datenanalyse .....	146
4.2.16	Proximity Ligation Assay (PLA).....	147
4.2.17	Fluoreszenzpolarisation (FP).....	148
4.2.18	DNA-Bindungsassay .....	149
4.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	149
4.3.1	Kultivierung von Zellen .....	149
4.3.2	Lipofektion von Humanzellen .....	150
4.3.3	Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293T Zellen .....	150
4.3.4	Zellviabilitätsbestimmung .....	150
4.3.5	Kryokonservierung von Zelllinien .....	150
4.3.6	Fixierung von Zellen.....	150
4.3.7	Immunzytochemie .....	151
4.3.8	Manuelle Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie.....	151
4.3.9	Automatische Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie.....	151
4.3.10	Lebendzellmikroskopie .....	151
4.3.11	Konfokale Mikroskopie .....	152
4.3.12	Screening von Mitoseinhibitoren.....	152
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>153</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>173</b>
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	173
6.2	DANKSAGUNG .....	175
6.3	LEBENS LAUF.....	176
6.4	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG (AFFIDAVIT) .....	177

# Teil 1





# 1 Identifizierung neuer PDE6D-Interaktionspartner

## 1.1 Zusammenfassung

Protein-Prenylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die die Affinität von Proteinen gegenüber biologischen Membranen erhöht und Protein-Protein-Interaktionen (PPI) vermitteln kann. Das molekulare Chaperon PDE6D (*Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta*) ist sowohl für die korrekte Membranlokalisierung prenylierter kleiner GTPasen als auch für deren Solubilisierung im wässrigen Milieu des Zytosols verantwortlich. Für das farnesylierte Protoonkogen KRAS konnte ein PDE6D-abhängiger Transport an die Plasmamembran gezeigt werden. Die spezifische Inhibition dieser Interaktion mittels niedermolekularer Verbindungen führt zur Relokalisation von KRAS an das Endomembransystem, einhergehend mit einer verringerten Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs und einer Wachstumsinhibition von KRAS-abhängigen Pankreastumorzellen. Aufgrund des Missverhältnisses zwischen der Größe des humanen Prenyloms (ca. 100 – 500 Proteine) und der Anzahl bekannter PDE6D-Bindungspartner wurde innerhalb dieser Arbeit eine Affinitätschromatographische Strategie mit anschließender massenspektrometrischer Analyse entwickelt, mit deren Hilfe neue, bisher unbekannte prenylabhängige Bindungspartner PDE6Ds identifiziert werden konnten. Als neue Interaktoren konnten die RHO-GTPase CDC42, die kleine GTPase RAB23 sowie die Phosphodiesterase CNP nachgewiesen werden. Die Wechselwirkung mit allen drei Proteinen konnte durch Verwendung der PDE6D-Inhibitoren Deltarasin und Deltazinone 1 gestört und die Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation der Proteine in Zellen untersucht werden. Weiterhin konnte als neuer Interaktor PDE6Ds die permanent farnesylierte Lamin A-Mutante Progerin identifiziert werden. Die seltene genetische Störung Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom (HGPS) wird in ca. 90% der Fälle durch eine heterozygote *de novo* Mutation hervorgerufen, die in der Folge zur Expression des dominant negativen Genprodukts Progerin führt. Ursächlich für den durch die Progerinexpression hervorgerufenen Phänotyp ist die im Unterschied zum Wildtyp-Protein permanente Farnesylierung, die Auswirkungen auf die Morphologie und Integrität des Zellkerns hat. Durch die Untersuchung von Prenylierungsmutanten konnte die prenylabhängige Interaktion zwischen Progerin und PDE6D sowohl in Zelllysat als auch – mittels PLA-Technologie (*proximity ligation assay*) – in Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die Progerin-PDE6D-Interaktion durch Deltarasin und Deltazinone 1 inhibiert werden. Neben den Auswirkungen einer Störung dieser

Interaktion mittels niedermolekularer Verbindungen wird in der vorliegenden Arbeit auch die Bindungsspezifität PDE6Ds gegenüber prenylierten Cargoproteinen unter Berücksichtigung der hier erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

## 1.2 Summary

Protein prenylation is a post-translational modification that increases the affinity of proteins for biological membranes and mediates protein-protein interactions. The molecular chaperone PDE6D (retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta) is responsible for the solubilization of prenylated small GTPases in the aqueous environment of the cytosol and their correct membrane localization. For the farnesylated proto-oncogen KRAS a PDE6D dependent transport to the plasma membrane was shown. The specific inhibition of this interaction by low molecular weight compounds leads to the relocation of KRAS to the endomembrane system, accompanied by a reduced activation of the MAPK/ERK signaling pathway and a growth inhibition of KRAS-dependent pancreatic tumor cells. There is a significant mismatch between the size of the human prenylome (approx. 100 - 500 proteins) and the number of known PDE6D binding partners. To identify novel binding partners of PDE6D an affinity chromatography based approach with subsequent mass spectrometric analysis was developed to identify new previously unknown prenyl-dependent binding partners of PDE6D. The RHO GTPase CDC42, the small GTPase RAB23, and the phosphodiesterase CNP were detected as new interactors. As proof of their binding the interaction with all three proteins could be disturbed with the known PDE6D inhibitors, Deltarasin and Deltazinone 1. The effects on the subcellular localization of the proteins upon treatment of cells with the inhibitors were investigated. Furthermore, the permanently farnesylated lamin A mutant, progerin was identified as a new interactor of PDE6D. In the rare genetic disorder Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS), a heterozygous *de novo* mutation leads to the expression of the dominant negative gene product progerin in approximately ninety percent of the cases. During maturation the wild type protein lamin A loses its farnesylated C-terminus, whereas the mutant progerin lacks the internal protease recognition site. The reason for the severe phenotype upon expression of progerin is due to its permanent farnesylation, which affects the morphology and integrity of the nucleus. In the present study prenylation mutants were employed to show the prenyl-dependent interaction between progerin and PDE6D in cell lysate and in cells by means of proximity ligation assay (PLA) technology. Subsequently, the progerin-PDE6D interaction could be inhibited by Deltarasin and Deltazinone 1. In addition to the effects of a small molecule disruption of this

interaction, the binding specificity of PDE6D towards prenylated cargoproteins is discussed in this study.

## 1.3 Einleitung

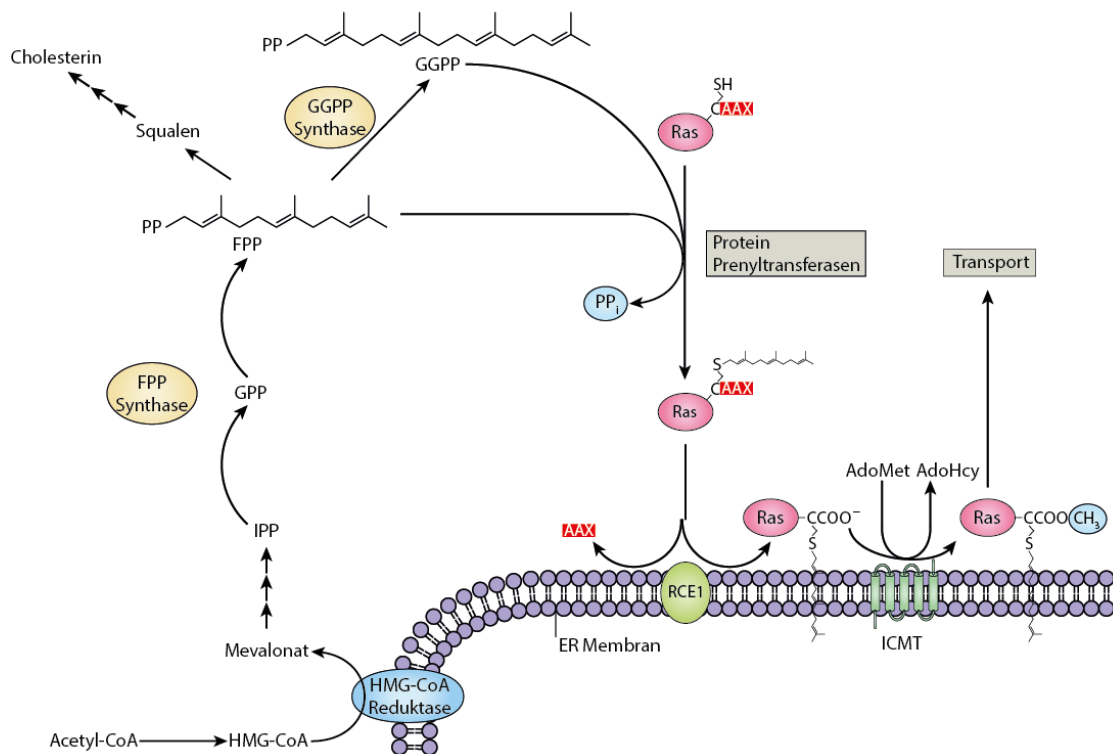
### 1.3.1 Lipidierung als posttranslationale Modifikation

Das humane Genom besteht aus ca. 22.500 codierenden Genen. Die Größe des humanen Proteoms wird auf über das 10 – 100-fache der Zahl der kodierenden Gene geschätzt (Walsh et al., 2005; Pertea and Salzberg, 2010). Zwei Hauptmechanismen sind für diese Erhöhung der Komplexität verantwortlich. Auf Transkriptionsebene kann alternatives Spleißen einer prä-mRNA zu unterschiedlichen mRNA-Produkten führen. Während beim normalen Spleißvorgang die Introns aus der prä-mRNA entfernt werden, können beim alternativen Spleißen Exons ausgeschnitten werden, was zu unterschiedlichen mRNA-Produkten in Länge und Exonkomposition führt. Der zweite Mechanismus zur Erhöhung der Komplexität findet auf Proteinebene statt und ist die kovalente Modifikation von Proteinen. Darunter fallen zum Einen die Enzym-katalysierte kovalente Addition von chemischen Gruppen oder Polypeptiden an Aminosäureseitenketten von Proteinen und zum Anderen die spezifische proteolytische Spaltung von Peptidbindungen (Prabakaran et al., 2012). Die bisher identifizierten über 200 posttranslationalen Modifikation (PTM) betreffen dabei von Transkriptionsfaktoren über Strukturproteine bis hin zu Membranrezeptoren alle Arten von Proteinen und modulieren deren physikochemischen Eigenschaften, was wiederum Auswirkungen auf die Aktivität, Lokalisation, den Abbau und die Fähigkeit hat, Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, DNA oder Substraten einzugehen (Jensen, 2006). Die Lipidierung von Proteinen ist eine weitverbreitete PTM, die ungefähr 1000 Proteine betrifft und unter anderem für die Vermittlung von PPI und für die Erhöhung der Membranaffinität des modifizierten Proteins verantwortlich ist (Resh, 2013). Hierbei können Fettsäuren, Sterine, Phospholipide, Glycosylphosphatidylinositole und Isoprenoide als Substrate dienen. Während die kovalente Verknüpfung von Proteinen mit Sterinen bisher nur für die Familie der Hedgehog-Proteine und die direkte Verknüpfung mit einem Phospholipid ausschließlich für das autophagosomale LC3-Protein bekannt ist, werden ungefähr 1% aller Proteine mit Glycosylphosphatidylinositol-Ankern (GPI-Anker) modifiziert. Über die Phosphatidylinositol-Reste werden Proteine, die mit einem GPI-Anker versehen wurden, an der extrazellulären Seite der Plasmamembran stabil fixiert und sind dort in diverse Signaltransduktionsprozesse eingebunden. Die kovalente Verknüpfung des Lipids an das Zielprotein erfolgt dabei für jedes Substrat durch ein spezifisches Enzym. Beispielsweise werden nach Abspaltung des initialen Methionins Proteine, die das N-terminale MGXXS/T-Motiv tragen, am Glycin mit der gesättigten Fettsäure Myristinsäure durch die N-Myristoyl-Transferase (NMT) modifiziert (N-Myristoylierung) (Resh, 2013). Während der komplexe

GPI-Anker ausreicht, um ein Protein an der Plasmamembran zu lokalisieren, benötigen myristoylierte Proteine für eine stabile Membranassoziation noch ein weiteres Signal. Dieses Signal kann eine zweite Lipidmodifikation in Form von einem oder mehreren Cysteinen sein, die einen Palmitinsäurerest tragen (zum Beispiel Kinasen der Src-Familie). Eine andere Möglichkeit die Affinität gegenüber Membranen zu erhöhen ist eine polybasische Domäne, die mit den negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran wechselwirken kann, wie im Falle des Proteins CDC42 (Resh, 2013). Die meisten Lipidmodifikationen sind irreversibel, die einzige bekannte Ausnahme ist die S-Palmitoylierung von Proteinen. Die Thioester-Bindung zwischen der Palmitoylgruppe und dem Cystein des Proteins kann durch Palmitoyl-Protein-Thioesterasen (PTE) gespalten werden, was zu Zyklen der Membranassoziation und -dissoziation von modifizierten Proteinen führen kann (Resh, 2013).

### **1.3.2 Prenylierung von Proteinen**

Die Prenylierung von Proteinen durch Modifikation mit Isoprenoiden wird für mehr als 200 Proteine vermutet (Berndt et al., 2011). Dabei wird zwischen zwei Arten von Prenylierungen unterschieden: zum einen die Farnesylierung mit der C15-Isopreneinheit Farnesyl durch die Farnesyltransferase (FTase), zum anderen die Geranylgeranylierung mit der C20-Isopreneinheit Geranylgeranyl durch die Geranylgeranyltransferase I (GGTase I). In beiden Fällen dient zumeist eine C-terminale CaaX-Box als Erkennungsmotiv für die Prenylierung des CaaX-Box-Cysteins (Zhang and Casey, 1996). Bekannte Proteinsubstrate für die FTase sind unter anderem HRAS, NRAS und KRAS sowie Proteine der Lamin-Familie und Proteine, die in Prozesse der Phototransduktion involviert sind. Geranylgeranyliert werden unter anderem Vertreter der Ras- und Rho-Rac-Familie. Prenylierung als PTM hat folglich tiefgreifende Effekte auf Signaltransduktionsprozesse sowie intrazelluläre Transportwege.



**Abbildung 1.1** Isoprenoid Metabolismus und CaaX-Box Prenylierung. Die an das endoplasmatische Retikulum (ER) assoziierte HMG-CoA-Reduktase stellt mit Mevalonat den ersten Vorläufer für die weitere Synthese von Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) her. Mevalonat wird in weiteren Folgeschritten enzymatisch zu Isopentenylpyrophosphat (IPP) umgewandelt. Die folgenden Kondensationsreaktionen der beiden C5-Einheiten IPP und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP, nicht gezeigt) zu Geranylpyrophosphat (GPP) sowie von GPP und IPP zu FPP werden in Säugern von der Farnesylpyrophosphatsynthase katalysiert (Kellogg and Poulter, 1997). FPP kann entweder Substrat für die Farnesyltransferase werden oder über die Geranylgeranylpyrophosphatsynthase mit einem weiteren IPP Molekül zu GGPP kondensiert werden. Weiterhin kann FPP über die Squalen Synthase Eingang in den Cholesterin-Biosyntheseweg finden. Die zytosolische Farnesyltransferase (FTase) und Geranylgeranyltransferase (GGTaseI) katalysieren die Übertragung der Prenylgruppen an das CaaX-Box-Cystein von Substratproteinen wie beispielsweise Ras. Anschließend erfolgt die Abspaltung der drei C-terminalen Aminosäuren durch die Protease RCE1 (Ras converting enzyme 1) an der zytosolischen Seite des ER. Letzter Schritt der Prozessierung ist die Carboxymethylierung des C-terminalen prenylierten Cysteins durch die Isoprenylcystein Carboxylmethyltransferase (ICMT). Im Anschluss erfolgt der Transport des Proteins an die Zielmembran. AdoHcy, S-Adenosyl-L-Homocystein; AdoMet, S-Adenosyl Methionin. Abbildung modifiziert nach Wang und Casey, 2016.

Die aus dem Mevalonatweg gewonnenen 5-Kohlenstoffeinheiten werden durch die Farnesylpyrophosphatsynthase und die Geranylgeranylpyrophosphatsynthase zu Farnesylpyrophosphat (FPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) weiterverarbeitet. Die im Zytosol lokalisierten Prenyltransferasen FTase und GGTase I binden die Isoprenoidpyrophosphate und binden anschließend in die Nähe der CaaX-Box von Zielproteinen, um im Folgeschritt die Thioester Bindung zwischen der Cysteinseitenkette und den Pyrophosphaten zu katalysieren. Damit ist die Prozessierung von CaaX-Box-tragenden Proteinen noch nicht abgeschlossen. An der zytosolischen Seite der ER-Membran werden die drei C-terminalen Aminosäuren (-aaX) proteolytisch durch RCE1 (*Ras converting enzyme 1*) abgespalten. Für die vollständige Prozessierung erfolgt im Anschluss ebenfalls an der

zytosolischen Seite der ER Membran die Methylierung des nun C-terminalen prenylierten Cysteins durch das Transmembranprotein ICMT (Isoprenyl-Carboxymethyltransferase). Hierbei wird die Methylgruppe des Ko-Substrats S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) auf das endständige Cystein übertragen (Abbildung 1.1). Die für die Membranassoziiierung benötigte Hydrophobizität durch die Prenylgruppe wird durch die Methylierung weiter erhöht, um den sogenannten hydrophoben Anker zu komplettieren (Parish and Rando, 1996). Insbesondere bei Proteinen, die mit der kürzeren Farnesylgruppe modifiziert werden, hat die Carboxymethylierung eine essentielle Funktion für den weiteren Transport sowie die stabile Assoziation mit Membranen (Baron and Casey, 2004). Die relative Hydrophobizität farnesylierter Proteine wird durch die Carboxymethylierung stark erhöht, während die ohnehin schon hydrophoberen geranylgeranylierten Proteine wesentlich weniger von der Methylierung profitieren (Parish and Rando, 1996). Dies steht in Einklang mit Studien, die die Assoziation von farnesylierten und geranylgeranylierten Peptiden mit synthetischen Liposomen untersucht haben. Farnesylierte, nicht methylierte Peptide zeigten nur geringe Membranbindung, während farnesyliert und methylierte Peptide Bindung zeigten. Für geranylgeranylierte Peptide hatte der Zusammenhang zwischen Carboxymethylierung und Membranassoziation wesentlich geringere Bedeutung (Silvius, JR and l'Heureux, 1994). Ähnlich wie myristoylierte Proteine benötigen auch farnesylierte Proteine aufgrund ihrer niedrigeren Hydrophobizität ein zweites Signal für die stabile Lokalisation an Membranen. Weitere Modifikationen mit Palmitinsäureresten oder eine polybasische Domäne können die nötige zusätzliche Affinität geben (Hancock et al., 1990).

Neben den genannten CaaX-Box-enthaltenden Proteinen, die Substrat für Isoprenylierungsreaktionen durch die FTase und GGTase I sind, gibt es eine dritte Prenyltransferase, Geranylgeranyltransferase II (GGTase II oder RabGGTase), die spezifisch Proteine der Rab-Familie (*ras genes from rat brain*) mit einem oder mehreren Geranylgeranylresten modifiziert. Die Familie der Rab-Proteine umfasst mehr als 60 Mitglieder und ist damit die größte Untergruppe der Ras-Familie von kleinen GTPasen. Sie sind evolutionär hochkonserviert und erfüllen eine wichtige Rolle im vesikulären Transport innerhalb der Zelle (Zerial and McBride, 2001). Der Mechanismus der Prenylierungsreaktion unterscheidet sich stark von dem Mechanismus bei CaaX-Box-enthaltenden Proteinen. Im Gegensatz zur FTase und GGTase I reicht das C-terminale Prenylierungsmotiv von Rab-Proteinen für die Erkennung durch die GGTase II nicht aus. Vielmehr binden neu synthetisierte Rab-Proteine an das *Rab escort protein* (REP), welches wiederum durch die GGTase II erkannt wird. Nach Bildung des ternären Komplexes

Rab-Protein–REP–GGTase II überträgt die GGTase II Geranylgeranylpyrophosphate auf C-terminale Cysteine. Dabei besitzen die meisten Rab-Proteine zwei Cysteine an ihrem C-Terminus, die geranylgeranyliert werden können (Leung et al., 2006). Rab-Proteine mit dem C-terminalen Motiv CXC werden am ER durch RCE1 und ICMT weiter prozessiert, wohingegen Rab-Proteine mit CC-Motiv nicht weiter prozessiert werden (Smeland et al., 1994). Obwohl die meisten Rab-Proteine mehrfach geranylgeranyliert werden, gibt es einige Ausnahmen, die kein Mehrfach-Prenylierungsmotiv CXC oder CC tragen. RAB8 besitzt beispielsweise eine CaaX-Box und kann neben der GGTase II auch durch die GGTase I geranylgeranyliert werden (Joberty et al., 1993). Ein Überblick über die verschiedenen C-terminalen Prenylierungsmotive und ihre Konsequenzen für die Modifikation mit Isoprenoiden ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

**Tabelle 1.1** C-terminale Isoprenylierungsmotive und zugehörige Modifikation. Proteine mit CaaL-Motiv sind zumeist Substrate der GGTase I, aber nicht alle Proteine deren CaaX-Box nicht auf Leucin endet, werden zwangsweise nur farnesyliert (Maurer-Stroh and Eisenhaber, 2005). Die Postprenylierungsprozessierung durch RCE1 und ICMT findet in Rab-Proteinen mit CC-Motiv nicht statt. f = farnesyl; gg = geranylgeranyl. Für CaaX: C = Cystein; a = aliphatische Aminosäure; X = beliebige Aminosäure.

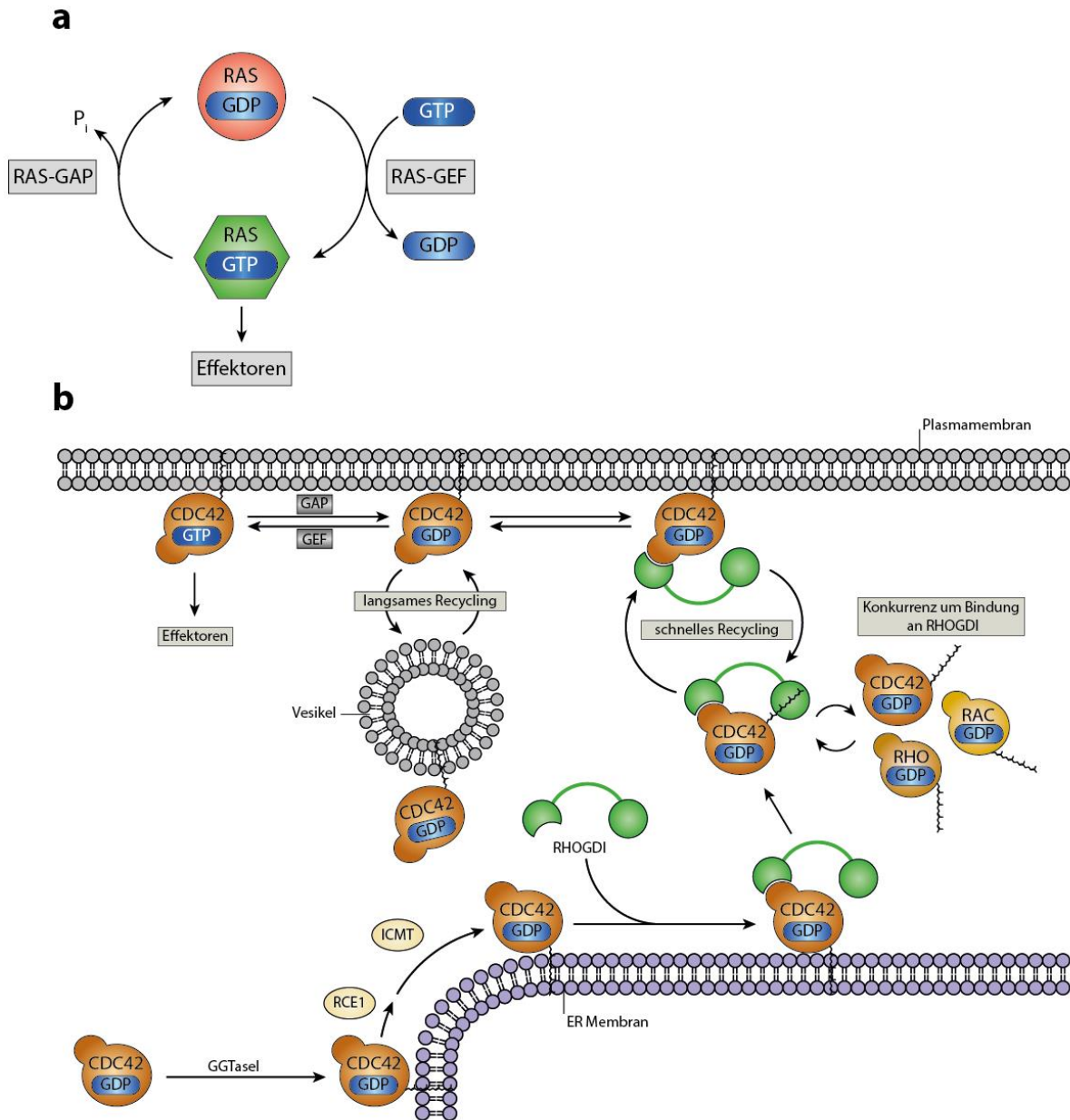
<b>Prenylierungsmotiv</b>	<b>Modifikation</b>	<b>Enzym (bevorzugt)</b>	<b>Postprenylierungs-Prozessierung</b>
CaaX	f/(gg)	FTase	ja
CaaL	gg	GGTase I	ja
CXC	gg	GGTase II	ja
CC	gg	GGTase II	nein

### 1.3.3 Biologische Rolle von Prenylierungen

Wie bereits erwähnt, hat die Prenylierung von Proteinen zwei Hauptaufgaben, zum einen die Erhöhung der Membranaffinität und somit indirekt die Lokalisierung des modifizierten Proteins und zum anderen die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI). Da die Prozessierung von CaaX-Box Proteinen an der ER-Membran abläuft, ergibt sich für den weiteren Transport der prenylierten Proteine ein Löslichkeitsproblem. Die neu erworbene Hydrophobizität durch den Prenylrest erfordert Transportproteine, die die hydrophobe Gruppe vor dem wässrigen Milieu des Zytosols abschirmen. Für die verschiedenen prenylierten Proteine gibt es diverse Transportproteine, die diese Aufgabe übernehmen. Als ein Beispiel für den Transport von geranylgeranylierten Proteinen seien die RhoGDIs (*Rho GDP-dissociation inhibitors*) genannt, die nicht nur für den Transport von Rho-Proteinen verantwortlich sind, sondern gleichzeitig deren Aktivität kontrollieren. Proteine der Rho-Familie sind, wie auch Ras- und Rab-Proteine, kleine GTPasen, die den zellulären



Energieträger GTP (Guanosintriphosphat) binden und hydrolysieren. Sie sind in diverse zelluläre Vorgänge wie Wachstum und Differenzierung, Vesikeltransport, Apoptose sowie Dynamiken des Zytoskeletts involviert. Die als molekulare Schalter bezeichneten kleinen GTPasen wechseln dabei zwischen einer aktiven GTP-gebundenen Form und einer inaktiven GDP gebundenen Form (Abbildung 1.2a). Der Wechsel zwischen den beiden Zuständen wird durch den zweistufigen Austausch von GDP zu GTP mittels eines GTP Austauschfaktors (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) katalysiert. Der GEF erhöht dabei die Geschwindigkeit der spontanen Dissoziation des GDP von der kleinen GTPase. Die GTPase selbst hat keine Präferenz gegenüber GDP oder GTP, aber aufgrund der wesentlich höheren GTP-Konzentration in der Zelle (ca. 10x mehr GTP als GDP) erfolgt die Beladung des Nukleotid-freien Proteins bevorzugt mit GTP (van Dyke et al., 1977; Colicelli, 2004). Die Bindung von GTP ruft eine Konformationsänderung im Protein hervor, die Bindestellen mit hohen Affinitäten für Effektorproteine freigibt. Die Inaktivierung der GTPase erfolgt durch die Hydrolyse von GTP. Da die intrinsische Hydrolyserate relativ gering ist (für HRas  $4,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ) und demnach die Reaktionszeit zur Regulation von Signaltransduktionsprozessen stark eingeschränkt wäre, wird die Hydrolyse von GTP durch Bindung eines GTPase-aktivierenden Proteins (GAP, *GTPase-activating protein*) beschleunigt (Neal et al., 1988; Colicelli, 2004).



**Abbildung 1.2** Rolle von RhoGDI im Transport und in der Regulation von Rho-GTPasen am Beispiel von CDC42. a) Zyklus der Aktivierung und Inaktivierung von kleinen GTPasen. Der molekulare Schalter RAS wechselt zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Form. Der Wechsel zwischen den beiden Zuständen wird durch GTP-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert. Konformationsänderungen im GTP-gebundenen Zustand ermöglichen die Interaktion mit Effektorproteinen. b) Neu synthetisiertes CDC42 wird durch die GGTase I geranylgeranyliert und anschließend von RCE1 und ICMT an der äußeren ER-Membran weiter modifiziert. Prozessiertes CDC42 wird durch Bindung von RhoGDI aus der Membran extrahiert. Freies prenyliertes CDC42 ist instabil und wird im Zytosol durch RhoGDI stabilisiert. Verschiedene Rho-GTPasen konkurrieren um die Bindung an RhoGDI. An der Zielmembran erfolgt die Dissoziation des RhoGDI–CDC42-Komplexes durch verschiedene Faktoren (Lipide, GEF, Phosphorylierung, etc.). Plasmamembran gebundenes CDC42 steht im Gleichgewicht mit zytosolischem RhoGDI-gebundenem CDC42. Die Rate mit der dieser Recyclingprozess abläuft wird durch posttranslationale Modifikationen bestimmt, die die Affinität der RhoGDI–CDC42-Bindung beeinflussen (schnelles Recycling). Ein weiterer langsamerer Recyclingprozess, der auf Vesikeltransport basiert, wurde ebenfalls für CDC42 postuliert. An der Membran kann CDC42 von GEFs aktiviert werden und an Effektoren binden. Nach Inaktivierung durch GAPs tritt das Protein wieder in den Recycling-Zyklus ein. Abbildung modifiziert nach (Garcia-Mata et al., 2011; Wang and Casey, 2016).

In ersten Studien wurden RhoGDIs als negative Regulatoren von RHO-Proteinen beschrieben, da sie die Fähigkeit besitzen GDP-gebundene RHO-Proteine zu binden, den

Nukleotidaustausch zu verhindern und somit die Rho-GTPase in inaktiviertem Zustand zu halten. Erst später wurde die Beobachtung gemacht, dass RhoGDIs auch als molekulare Chaperone dienen und die räumlich-zeitliche Lokalisation von Rho-Proteinen kontrollieren. Posttranslational werden Rho-Proteine, wie CDC42, von der GGTase I geranylgeranyliert und anschließend an der ER-Membran proteolytisch prozessiert und durch ICMT carboxymethyliert. Im wässrigen Milieu des Zytoplasmas verursacht der hydrophobe Prenylrest von freien Rho-GTPasen Fehlfaltungen im Protein, was sich in einer schnellen proteasomalen Degradation auswirkt. Dennoch sind in der Zelle ca. 90-95% der Rho-GTPasen im Zytoplasma lokalisiert, um der Zelle ein Reservoir zu schaffen, das bei Bedarf schnell abgerufen werden kann (Boulter et al., 2010; Garcia-Mata et al., 2011). Diese zytoplasmatische Fraktion wird durch die Bindung von RhoGDIs an Rho-GTPasen aufrechterhalten. Nach der proteolytischen Prozessierung interagiert RhoGDI über seinen N-Terminus mit der Switch I- und Switch II-Domäne der Rho-GTPase, was zur Positionierung der hydrophoben Prenylbindetasche des RhoGDIs an der Membran führt. Die Affinität von RhoGDI gegenüber GDP gebundener Rho-GTPase ( $K_{d, App} = 180 \text{ nM}$ ) ist in Anwesenheit von Membranen wesentlich höher als für CDC42 mit gebundenem GTP (für GMP-PNP  $K_{d, App} = 1400 \text{ nM}$ ) (Johnson et al., 2009). Durch Isomerisierungsvorgänge kann der Prenylrest der GTPase aus der Lipiddoppelschicht in die hydrophobe Tasche des RhoGDI wandern ohne in Kontakt mit dem wässrigen Milieu des Zytoplasmas zu treten (Hoffman et al., 2000). Nach Inaktivierung der Rho-GTPase durch die Hydrolyse des gebundenen GTP kann das Protein mit RhoGDI reassoziieren und so, in einem als „schnelles Recycling“ bezeichneten Vorgang, zurück in die zytoplasmatische Fraktion wandern. Gendelektionsstudien von CDC42 legen nahe, dass es neben dem schnellen Recycling noch einen weiteren Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Zirkulation von CDC42 zwischen dem ER, dem Zytoplasma und der Plasmamembran gibt. Durch Vesikeltransport können im „langsamen Recycling“ ebenfalls prenylierte Rho-GTPasen die Plasmamembran erreichen (Slaughter et al., 2009).

#### 1.3.4 Das molekulare Chaperon PDE6D

Das 17 kDa große Protein PDE6D (*Retinal rod rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit delta*) wurde zuerst als Untereinheit der cGMP Phosphodiesterase (PDE) identifiziert. Über Interaktion mit der PDE- $\alpha$ - und - $\beta$ -Untereinheit kann es den PDE-Komplex von der Membran lösen und somit die Phototransduktion in Photorezeptorzellen desensibilisieren (Florio et al., 1996). Ein Schlüsselschritt in der Phototransduktionskaskade ist die Umwandlung von cGMP zu 5'-GMP durch Retina-spezifische Phosphodiesterasen nach Aktivierung durch das G-Protein Transducin. PDEs sind Heterotetramere, deren  $\alpha$ - und

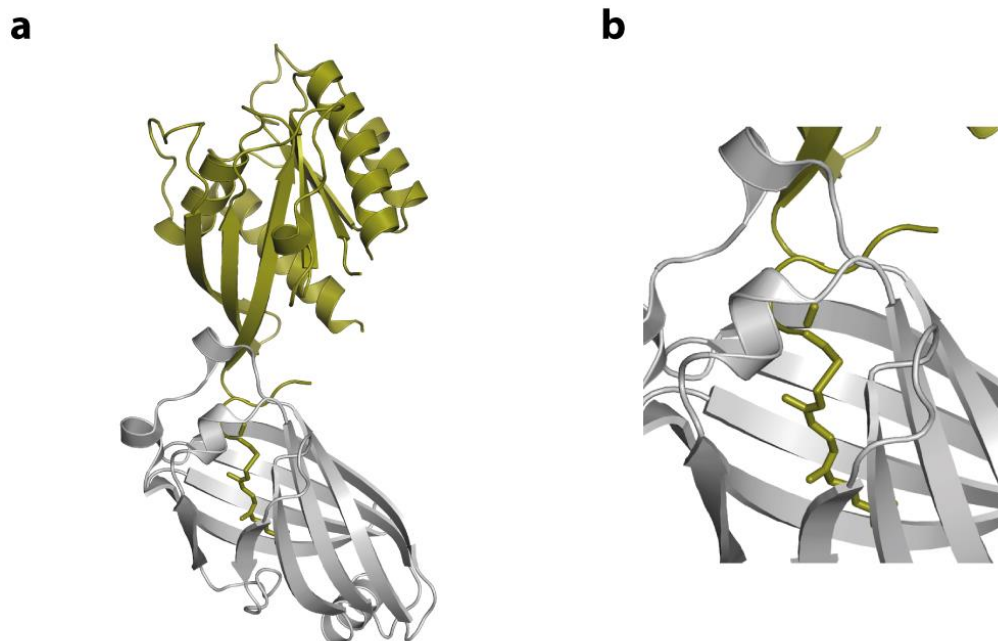
$\beta$ -Untereinheiten das katalytische Zentrum bilden. Die beiden kleineren  $\gamma$ -Untereinheiten haben eine inhibitorische Funktion (Pugh, JR and Lamb, 1993). PDE6D ist in der Lage über Bindung der prenylierten C-Termini der PDE- $\alpha$ - und - $\beta$ -Untereinheit den PDE-Komplex zu solubilisieren (Li et al., 1998). In Folgestudien konnte gezeigt werden, dass PDE6D ubiquitär exprimiert wird und Orthologe in fast allen Spezies besitzt. Dabei ist die Proteinsequenz hochkonserviert mit über 70% Sequenzidentität in Vertebraten und ca. 50% in Invertebraten. Als prominentes Strukturmotiv besitzt PDE6D eine Immunglobulin-ähnliche  $\beta$ -Faltblattstruktur, die eine hydrophobe Bindetasche mit hoher struktureller Ähnlichkeit zu den hydrophoben Bindetaschen von RhoGDI und UNC119 bildet (Hoffman et al., 2000; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2012). Während PDE6D und RhoGDI über ihre Bindetasche jedoch bevorzugt prenylierte Proteine binden, besitzt UNC119A eine Spezifität für lauroylierte und myristoylierte Proteine (Zhang et al., 2012). Die Tatsache, dass PDE6D in allen Gewebetypen exprimiert wird, nährt die Vermutung nach weiteren Funktionen neben der Solubilisierung der PDE. Initiale Hefe-zwei-Hybrid-System-Studien zeigten die Bindung von PDE6D an diverse kleine GTPasen der Ras- und Rho-Familien (Nancy et al., 2002).

**Tabelle 1.2** Bekannte PDE6D-Interaktionspartner. f = farnesyl; gg = geranylgeranyl. Tabelle modifiziert nach (Zhang et al., 2012).

Protein	Prenylierung	Protein	Prenylierung
PDE $\alpha$	f	RAB8	gg
PDE $\beta$	gg	RAB13	f
GRK1	f	RAB28	f
GRK7	gg	RHEB	f
cT $\gamma$	f	RHO6	f
T $\gamma$	f	RAP1a	gg
DmPDE5/6	gg	RAP1b	gg
HRAS	f	RAP2a	f
NRAS	f	RAP2b	gg
KRAS	f	RHOA	gg
RPGR	gg	RHOB	gg
ARL2-GTP	-	Prostacyclin-R	f
ARL3-GTP	-	INPP5E	f

In Ko-Kristallisationsstudien konnte die Struktur von PDE6D mit farnesyliertem RHEB (*Ras homolog enriched in brain*) aufgelöst werden. Die Struktur zeigt, dass die Interaktion fast ausschließlich über das C-terminale farnesylierte Cystein vermittelt wird und nur die letzten 5 – 10 Aminosäuren von RHEB-Hauptketteninteraktionen mit PDE6D eingehen. Trotz der

großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen RhoGDI und PDE6D zeigen sich in der Kristallstruktur starke Unterschiede im Bindungsmechanismus. Im Fall von RHEB und PDE6D, dringen die letzten 3 Aminosäuren von RHEB mit dem farnesylierten Cystein wesentlich tiefer in die Bindetasche von PDE6D ein als es für CDC42 und RhoGDI bekannt ist. Diese zusätzliche Interaktionsfläche kann vermutlich das Fehlen der Interaktion zwischen PDE6D und den Switch-Regionen von RHEB kompensieren und ist gleichzeitig auch die Bestätigung für die Nukleotid-unabhängige Bindung zwischen PDE6D und Interaktionspartnern, die über die hydrophobe Tasche binden (Ismail et al., 2011). Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor gemachte Beobachtung, dass es kaum Unterschiede in den Bindungsaffinitäten zwischen einem farnesylierten KRAS4B-Dodeca-Peptid an PDE6D und einem semisynthetischen farnesylierten KRAS4B-Protein an PDE6D gibt (Chen et al., 2010). Hieraus lässt sich auch die breite Spezifität und geringe Selektivität an PDE6D Bindungspartnern erklären (Nancy et al., 2002).

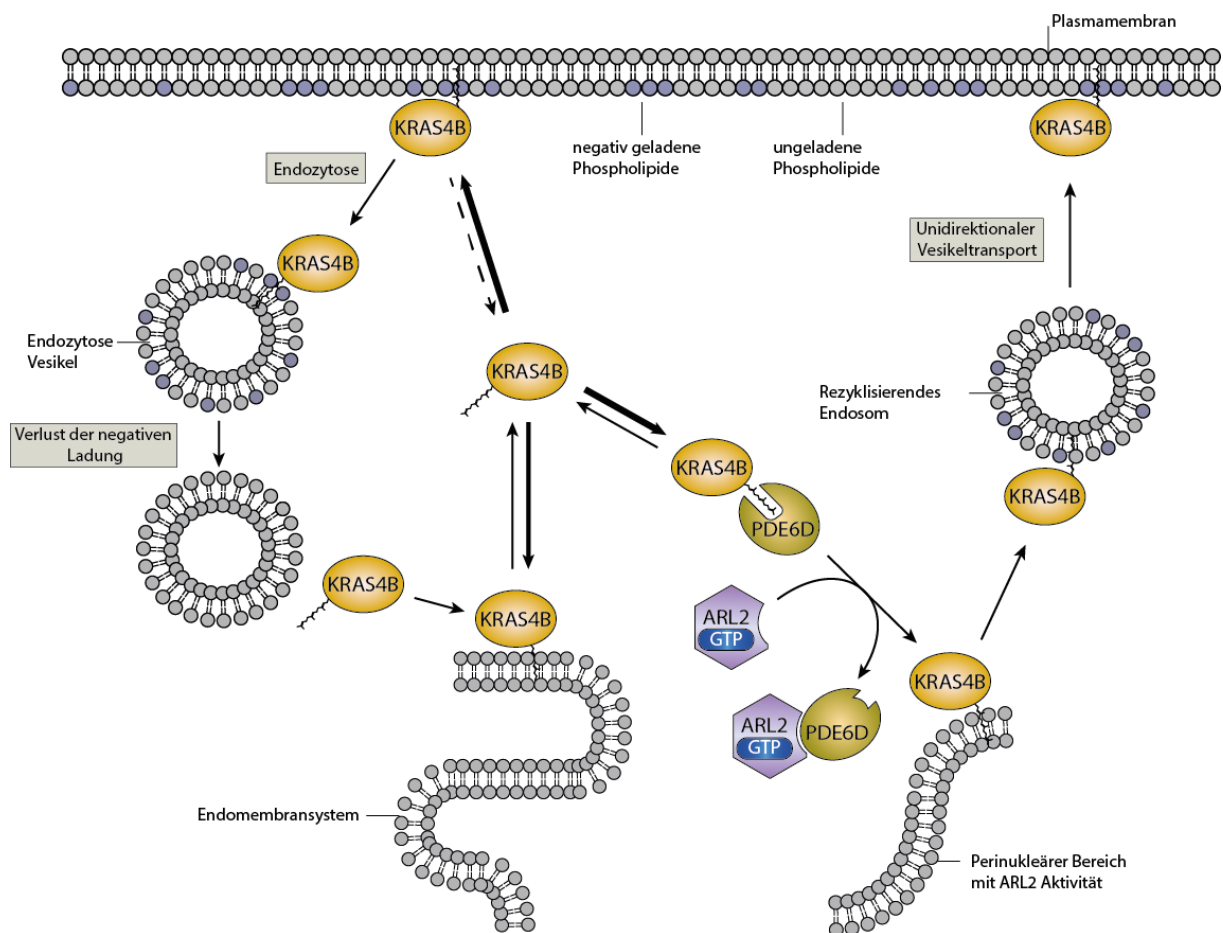


**Abbildung 1.3** Röntgenkristallstruktur des PDE6D–RHEB Komplexes. a) PDE6D (grau) bindet RHEB (ocker) über die C-terminale Farnesylgruppe. Es gibt keine weiteren Hauptketten-Interaktionen zwischen PDE6D und RHEB. b) Vergrößerter Ausschnitt der Bindetasche PDE6Ds und der Farnesylgruppe RHEBs. PDB: 3T5G.

Neben Interaktionen mit prenylierten Proteinen über die hydrophobe Bindetasche, kann PDE6D mit Proteinen der ARL Familie (ADP-ribosylation factor-like) wechselwirken. Die Bindung von ARL2 und ARL3 erfolgt dabei über  $\beta$ -Faltblätter von PDE6D an einer Bindestelle, die nicht mit der von prenylierten Bindungspartnern kollidiert. Des Weiteren interagiert PDE6D nur mit der GTP-gebundenen Form von ARL2/3. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung PDE6Ds von einer offenen Form, bei der die hydrophobe Tasche für Prenylreste zugänglich ist, zu einer geschlossenen Form, bei der sich die

hydrophobe Tasche stark verkleinert. In der geschlossenen Form kann keine Bindung von Proteinen über die hydrophobe Bindetasche PDE6Ds mehr stattfinden. Das System aus PDE6D, prenyliertem Protein und ARL2/3 kann so als Transportsystem fungieren, das durch ARL2/3-spezifisches Schließen der Bindetasche PDE6Ds transportierte Proteine gezielt entladen kann (Ismail et al., 2011).

Ein Modell für den Transport durch PDE6D gibt es für das Protoonkogen KRAS4B. Als Mitglied der Ras-Familie ist es für die Signaltransduktion innerhalb des MAPK/ERK-Signalwegs (*mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-related kinase*) verantwortlich. Der Signalweg kontrolliert diverse zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Zellproliferation, Apoptose, Motilität und Metabolismus (Kolch, 2005).



**Abbildung 1.4** KRAS4B-Lokalisierung durch Zyklen der Solubilisierung und des vesikulären Transports. KRAS4B delokalisiert von der Plasmamembran durch Endozytose und spontane Dissoziation ins Zytosol. Nach Verlust der negativen Ladung der Endozytosevesikel, dissoziiert KRAS4B ins Zytosol, wo es an Endomembranen und PDE6D binden kann. PDE6D-gebundenes KRAS4B kann in perinukleären Bereichen durch ARL2 entlassen werden, von wo aus KRAS4B an negativ geladene rezyklisierende Endosomen akkumuliert, die mittels unidirektionalem Vesikeltransport KRAS4B wieder an die Plasmamembran liefern. Abbildung modifiziert nach (Schmick et al., 2015).

KRAS4B wird zur Weiterleitung extrazellulärer Signale an der Plasmamembran aktiviert, um anschließend mit Effektoren zu interagieren. Die korrekte Lokalisation an der Plasmamembran ist für die Signaltransduktion folglich essentiell und wird durch PDE6D

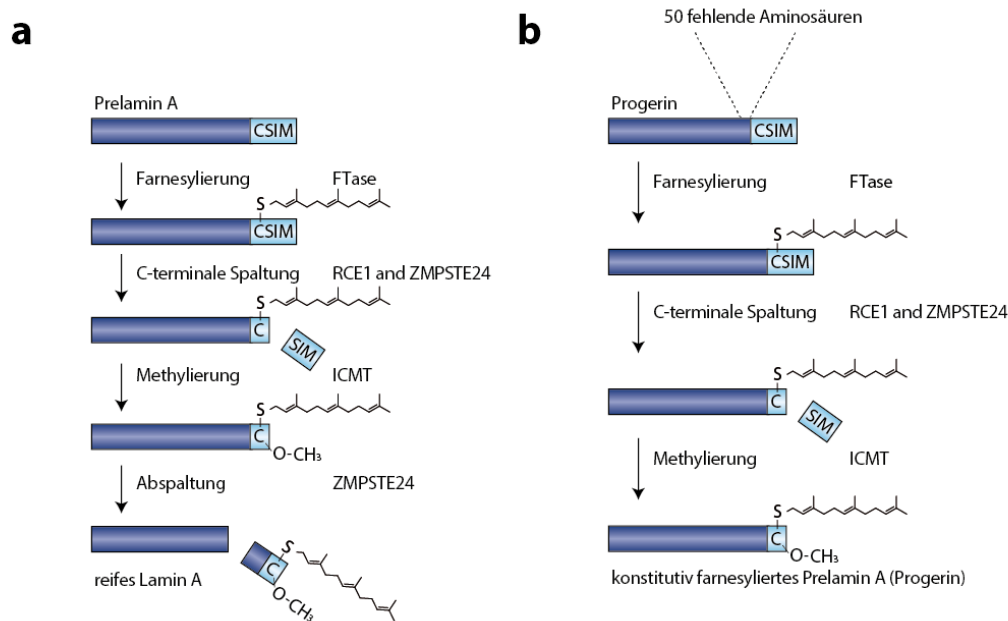
reguliert. KRAS4B besitzt neben einer Farnesylmodifikation eine Ansammlung von positiv geladenen Lysinen am C-Terminus; diese dienen als zweites Signal für die Lokalisation an Membranen, die negativ geladene Phospholipide besitzen (beispielsweise die Plasmamembran). Durch Endozytose verlässt KRAS4B die Plasmamembran und lokalisiert ins Zytoplasma, wo es sich auf das im Verhältnis zur Plasmamembran große Endomembransystem verteilt. Die nur geringen Wechselwirkungen mit den ungeladenen Phospholipiden der Endomembranen ermöglichen eine einfache Dissoziation ins Zytosol, wo KRAS4B an PDE6D binden kann. An perinukleären Membranen kann KRAS4B aus dem Komplex mit PDE6D durch hier lokalisiertes GTP-ARL2 entladen werden, was zu einer Erhöhung der lokalen KRAS4B-Konzentration führt. Von hier aus kann KRAS4B an rezyklisierende Endosomen (RE) binden und zurück an die Plasmamembran transportiert werden. Die Phospholipidkomposition der RE entspricht derjenigen der Plasmamembran, wodurch das Gleichgewicht in der KRAS4B-Assoziation von Endomembranen auf RE verschoben wird (Schmick et al., 2014).

Des Weiteren gibt es Hinweise auf einen Einfluss von PDE6D auf den Transport ciliärer Proteine in das primäre Cilium. Sowohl für INPP5E (*72 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase*) als auch für RPGR wurden in der Literatur kürzlich Mechanismen für den Transport beschrieben (Dutta and Seo, 2016; Fansa et al., 2016). Die Phosphatase INPP5E bindet mit hoher Affinität an PDE6D und kann im Gegensatz zu niedriger affinen Bindern wie KRAS4B oder RHEB nicht durch ARL2 aus der hydrophoben Bindetasche gedrängt werden. Diese hochaffinen Binder können jedoch durch GTP-ARL3 entladen werden, welches im Cilium angereichert ist (Thomas et al., 2013; Fansa et al., 2016).

### 1.3.5 Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom

Das Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom (HGPS) ist eine sehr seltene genetische Störung, die als klinisches Hauptmerkmal einen stark beschleunigten Alterungsprozess in jungem Alter zeigt. Kinder, die an HGPS erkrankt sind sterben im Durchschnitt zwischen dem 11. und 13. Lebensjahr. Das Aufkommen der genetischen Störung wird auf ca. 1:8.000.000 geschätzt mit nur etwa 40 bekannten Fällen weltweit im Jahr 2004 (Pollex and Hegele, 2004). Betroffene Kinder zeigen kurz nach der Geburt zunächst keine Symptome. Als erstes klinisches Anzeichen ist häufig während der ersten Lebensjahre ein vermindertes Wachstum zu beobachten. Bei Gewichtszunahmen von nur 0,440 kg/Jahr, erreichen HGPS-Kinder ein durchschnittliches Maximalgewicht von 14,5 kg bei einer Größe von 110 cm (Gordon et al., 2007). Im zweiten bis dritten Lebensjahr treten weitere Symptome auf, wie eine

charakteristische Fazies, Alopezie, Verlust von subkutanem Fett und Knochenfehlbildungen (Hennekam, 2006). Myokardinfarkte und Schlaganfälle durch fortschreitende Atherosklerose sind die häufigsten Todesursachen der Betroffenen (Sarkar and Shinton, 2001). Ursächlich für das Auftreten des klassischen HGPS ist in 90% der Fälle eine heterozygote *de novo* Punktmutation in Exon 11 des *LMNA*-Gens (Eriksson et al., 2003). Das *LMNA*-Gen kodiert für vier verschiedene Typ-A-Lamine (Lamin A, A $\Delta$ 10, C und C<sub>2</sub>). In differenzierten Zellen machen Lamin A und Lamin C den Hauptteil, der durch alternatives Spleißen generierten Typ-A-Lamine aus. Zusammen mit den Typ-B-Laminen (Lamin B1 und B2) bilden die zu den Intermediärfilamenten zugerechneten Lamine die nukleäre Lamina aus, ein komplexes Netzwerk, das dem Nukleus mechanische Stabilität gibt und zahlreiche weitere Funktionen übernimmt, etwa die Regulation der Transkription und die Positionierung der nukleären Poren (Gruenbaum et al., 2005). Proteine der Lamin-Familie werden posttranslational modifiziert. Die beiden B-Typ-Lamine sowie Lamin A, werden an ihren C-terminalen CaaX-Boxen farnesyliert. Das alternative Spleißprodukt des *LMNA*-Gens Lamin C besitzt hingegen keine CaaX-Box (Sinensky, 1994).

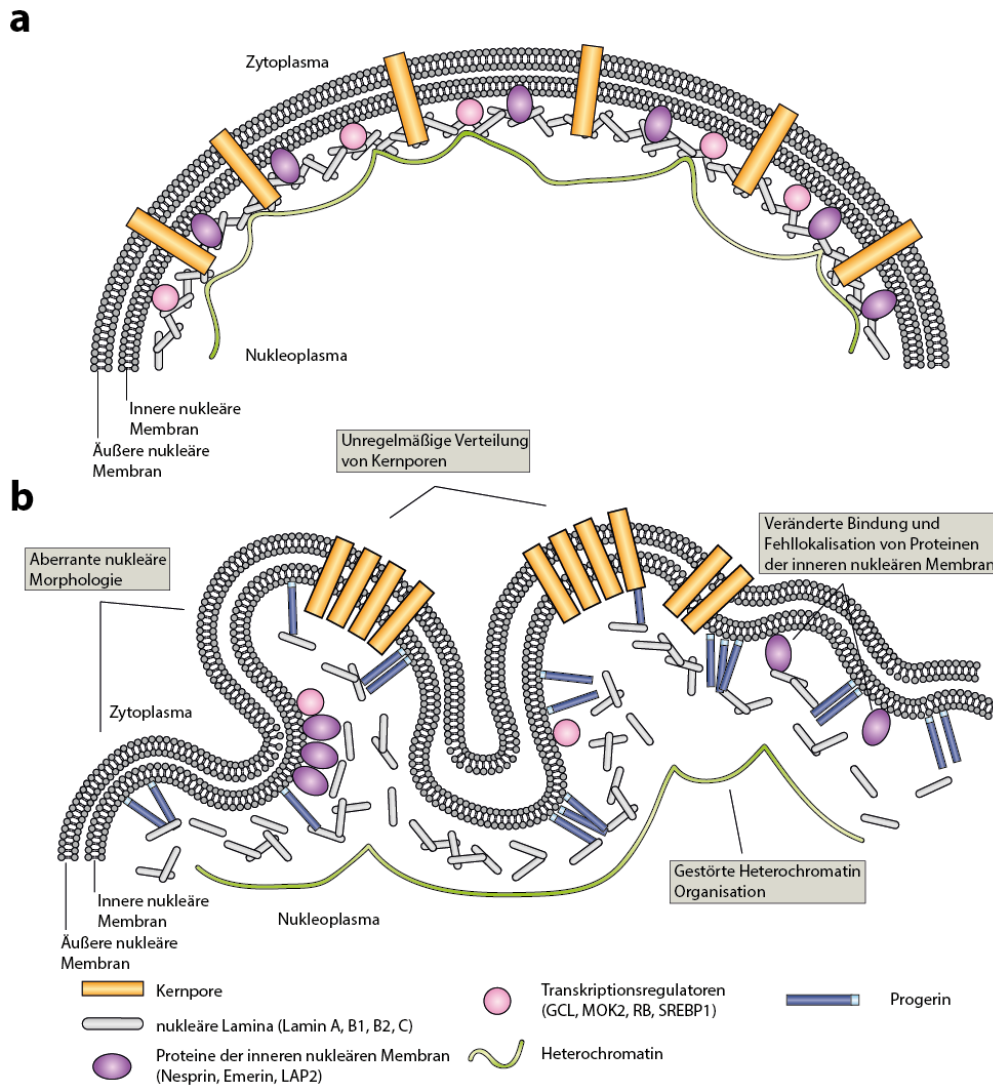


**Abbildung 1.5** Posttranslationale Modifikation von Lamin A. a) Nach der Farnesylierung von neu synthetisiertem Lamin A (Prelamin A) durch die FTase, erfolgt die Abspaltung der drei C-terminalen Aminosäuren durch RCE1 oder ZMPSTE24 (CaaX prenylprotease 1 homolog). Nach Carboxymethylierung des prenylierten Cysteins und Vervollständigung des hydrophoben Ankers, erfolgt im Unterschied zu Ras- oder Rho-Proteinen, die Erkennung eines C-terminalen Sequenzmotivs durch die Protease ZMPSTE24, die im Folgenden den modifizierten C-Terminus von Prelamin A abspaltet um so das reife Genprodukt zu erhalten. b) Die *de novo* Punktmutation im *LMNA*-Gen sorgt für die Expression der Lamin A-Mutante Progerin. Die fehlenden 50 Aminosäuren beinhalten die Erkennungssequenz für die Protease ZMPSTE24. Gereiftes Progerin ist im Gegensatz zu reifem Lamin A konstitutiv farnesyliert. Abbildung modifiziert nach (Young et al., 2013).

Im Gegensatz zur Prozessierung von Ras- und Rho-Proteinen, erfolgt im Fall von Lamin A ein weiterer Modifikationsschritt. Nach Farnesylierung und Carboxymethylierung wird der



modifizierte C-Terminus proteolytisch abgespalten, um reifes Lamin A zu erhalten (Abbildung 1.5). Die *de novo* Punktmutation bei klassischem HGPS (1824C>T, G608G) aktiviert eine kryptische Spleißstelle, die in der prä-mRNA zu einem Verlust von 150 Nukleotiden von Exon 11 führt. Die resultierende Lamin A-Isoform wird normal farnesyliert und carboxymethyliert, jedoch fehlt ihr durch die 50-Aminosäure-Deletion die Erkennungssequenz für die proteolytische Spaltung durch ZMPSTE24. Somit ist das finale Genprodukt des mutierten Gens konstitutiv farnesyliert, wohingegen Wildtyp-Lamin A im Reifungsprozess den farnesylierten C-Terminus wieder verliert (Pollex and Hegele, 2004; Coppede, 2012; Reddy and Comai, 2012). Aufgrund des ausgelösten Phänotyps, wird das Proteinprodukt der permanent farnesylierten Lamin A-Mutante Progerin genannt. Progerinexpression in normalen Fibroblasten kopiert den Phänotyp von HGPS-Patientenzellen und weist somit auf einen dominant-negativen Wirkmechanismus des mutierten Proteins hin, was in Einklang mit den gefundenen heterozygoten Mutationen in Patientenproben steht.



**Abbildung 1.6** Struktur der nukleären Lamina und Veränderungen durch Progerin Expression. a) Die nukleäre Lamina liegt an der Innenseite der inneren nukleären Membran. Sie ist dafür verantwortlich, die mechanische Stabilität des Nukleus aufrechtzuerhalten. Das komplexe Netzwerk der Kernlamina geht dabei Wechselwirkungen mit diversen Proteinen der inneren Kernmembran und Transkriptionsfaktoren ein. Des Weiteren organisiert sie die Lokalisation von Chromatin und den Kernporen. b) Die Expression von Progerin hat diverse Auswirkungen auf die Architektur des Nukleus. Die permanente Farnesylierung hält Progerin an der inneren nukleären Membran fest; dadurch wird die Aufrechterhaltung des Lamina-Netzwerks gestört, was zur Empfindlichkeit des Zellkerns gegenüber mechanischem Stress führt und die charakteristischen Ausbeulungen und Einkerbungen der Kernmembran hervorruft. Die veränderte Organisation der Kernlamina hat auch Auswirkungen auf Proteine, die normalerweise mit der Lamina interagieren. Interaktoren der Lamina sind in Progerin-exprimierenden Zellen nicht korrekt lokalisiert und Kernporenkomplexe sammeln sich in Clustern. Weiterhin verliert das Heterochromatin wichtige Interaktionen mit der Kernlamina und den mit ihr assoziierten Transkriptionsfaktoren, was zu einer veränderten Genexpression führt. Abbildung modifiziert nach (Capell and Collins, 2006).

Der Nukleus wird durch eine innere und äußere Membran vom Zytoplasma räumlich getrennt. Die äußere Membran geht in das raue ER über, die innere Membran ist zum Nukleoplasma mit dem Laminanetzwerk verbunden. Austausch zwischen Nukleus und Zytoplasma erfolgt durch Kernporenkomplexe, die mit der Kernmembran und der Lamina verknüpft sind (Abbildung 1.6) (Goldman et al., 2002). Die Kernlamina wird hauptsächlich durch Proteine der Lamin Familie aufgebaut. Die zur Gruppe der Typ-V-Intermediärfilamenten gehörenden

Lamine besitzen eine kurze N-terminale Kopfdomäne, eine lange  $\alpha$ -helikale coiled-coil-Domäne und einen globulären Rest. Im ersten Schritt des Aufbaus der Kernlamina bilden Lamine parallele Dimere über Interaktion der  $\alpha$ -helikalen Regionen ähnlich des Aufbaus von Myosin-Dimeren. Für die komplexe Architektur des Lamina-Netzwerks folgen weitere Interaktionen der Kopf- und Restgruppen der Lamine zu Fibrillen (Stuurman et al., 1998). Neben mechanischer Stabilität, die das Laminnetzwerk dem Zellkern gibt, ist die Interaktion der Lamina mit Kernporenkomplexen und weiteren Proteinen der inneren nukleären Membran essentiell für die Integrität des Zellkerns. Die Expression der Lamin A-Mutante Progerin in Zellen hat dramatische Auswirkungen auf die Funktionalität des Nukleus. Da Progerin im Gegensatz zu Wildtyp-Lamin A permanent farnesyliert ist, wird es an der inneren nukleären Membran gehalten und der korrekte Aufbau des Laminnetzwerks ist empfindlich gestört. Zellen, die Progerin exprimieren, zeigen eine veränderte Morphologie des Nukleus mit Ausbeulungen und Einkerbungen der Kernmembran sowie Empfindlichkeit gegenüber mechanischem Stress. Weiterhin ist die korrekte Lokalisation der Kernporenkomplexe gestört. In gesunden Zellen sind die Kernporen gleichmäßig über die Kernmembran verteilt, während sie sich in Progerin-exprimierenden Zellen in Clustern ansammeln. Die Veränderungen im Aufbau der Kernlamina haben weitere physiologische Konsequenzen, da auch Interaktionen der Kernlamina mit Interaktionspartnern gestört sind. In gesunden Zellen interagiert die Lamina unter anderem mit Komponenten der RNA-Polymerase II, mit weiteren Transkriptionsfaktoren und mit Heterochromatin. Diese Interaktionen können in Progerin-exprimierenden Zellen zum Teil nicht aufrecht erhalten werden, was Auswirkungen auf Genexpressionsmuster hat (Spann et al., 2002; Csoka et al., 2004). Weitere Studien zeigten in HGPS-Patientenzellen eine Anhäufung von DNA-Schäden, die zur Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten führen und die Proliferation der Zellen beeinflussen (Liu et al., 2006).

#### **1.4 Zielsetzung**

Protein-Prenylierung ist eine weitverbreitete PTM, die die Affinität von Proteinen gegenüber Membranen erhöht und PPI vermittelt. Das molekulare Chaperon PDE6D kann über seine hydrophobe Bindetasche prenylierte Proteine binden und im wässrigen Milieu des Zytosols solubilisieren. Die Interaktion zwischen prenyliertem Protein und PDE6D erfolgt dabei fast ausschließlich über den Lipidanteil mit nur geringem Anteil an Hauptketteninteraktionen zwischen PDE6D und gebundenem Protein. Im Gegensatz zu weiteren bekannten prenylbindenden Proteinen wird PDE6D daher eine geringe Spezifität gegenüber potentiellen Bindungspartnern zugesprochen. Dennoch gibt es eine Diskrepanz zwischen der Größe des

humanen Prenyloms und der Anzahl an bisher identifizierten Interaktionspartnern von PDE6D. Innerhalb dieser Arbeit sollte eine Methode zur affinitätschromatographischen Anreicherung und Identifizierung von neuen PDE6D-Interaktionspartnern entwickelt werden. Neue Interaktionspartner sollten anschließend mittels biochemischer Methoden validiert werden und die Bindungsspezifität von PDE6D gegenüber transportierten Proteinen analysiert werden. Unter Verwendung der PDE6D-adressierenden Substanzen Deltarasin und Deltazinone 1, die die hydrophobe Bindetasche von PDE6D blockieren, sollten die Auswirkungen einer Inhibition der Bindung zwischen PDE6D und neu identifizierten Interaktionspartnern untersucht werden.

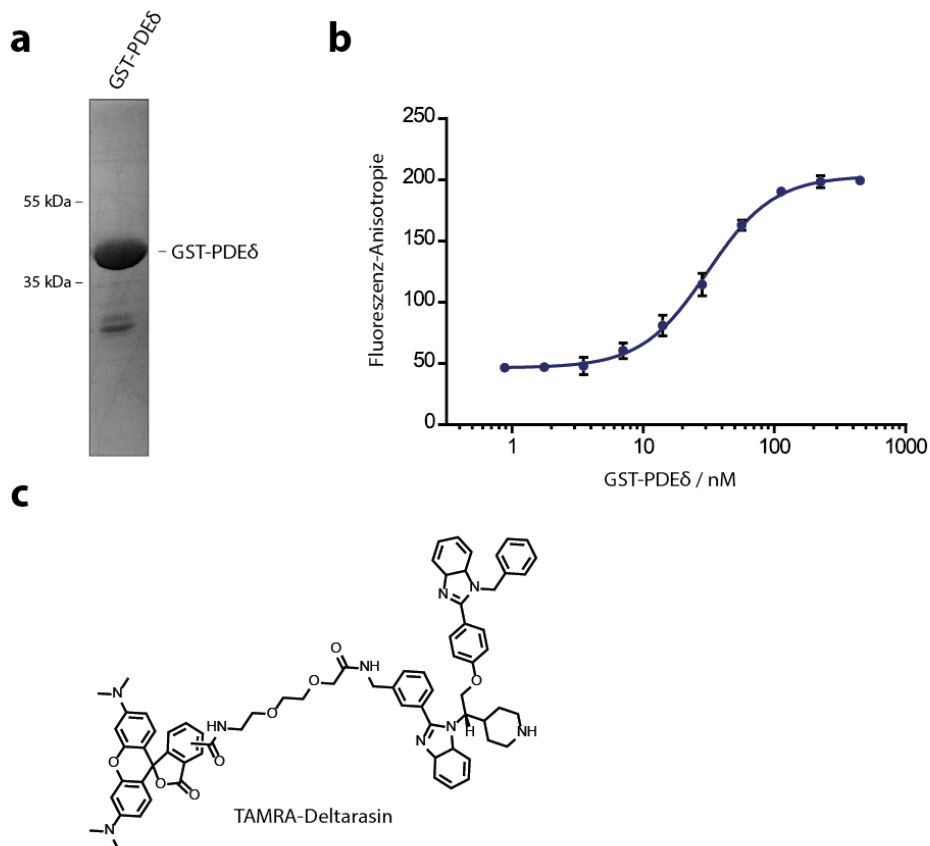
## 1.5 Ergebnisse

Zur Identifizierung neuer PDE6D Interaktionspartner wurden zwei verschiedene affinitätschromatographische Strategien verfolgt. Zum einen sollte Zelllysate mit heterolog exprimiertem GST-PDE6D inkubiert werden und nach Immobilisation an der festen Phase der gebildete Proteinkomplex massenspektrometrisch untersucht werden. Zum anderen wurde eine ähnliche Strategie wie in der Literatur für PDE6D bereits beschrieben verwendet (Humbert et al., 2012; Thomas et al., 2013). Hierfür sollten Zellen mit FLAG-PDE6D transient transfiziert werden und nach Immunpräzipitation über die FLAG-Markierung der Komplex aus FLAG-PDE6D und Interaktionspartnern massenspektrometrisch untersucht werden. Aufgrund der Annahme, dass bei einer herkömmlichen Anreicherung der Zielproteine an der festen Phase, Interaktionspartner mit geringen Affinitäten ( $K_D > 1 \mu\text{M}$ ) und transiente Wechselwirkungspartner eventuell nicht identifizierbar sind, wurden beide Strategien zusätzlich unter Zuhilfenahme eines kovalenten Crosslinkers durchgeführt (Pollard, 2010).

### 1.5.1 Identifizierung von PDE6D-Interaktionspartnern mittels GST-Pulldown

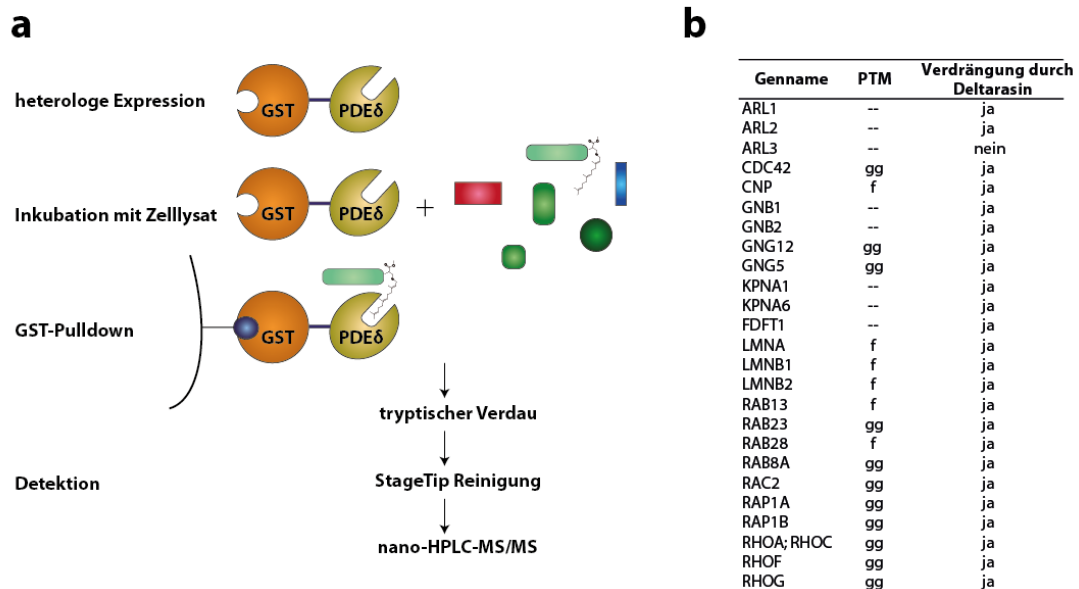
Für die affinitätschromatographische Reinigung von GST-PDE6D nach Inkubation mit Zelllysate musste zunächst das GST-markierte PDE6D heterolog exprimiert und gereinigt werden (Abbildung 1.7a). Zur Kontrolle der korrekten Faltung wurde im Anschluss TAMRA-

Deltarasin (Zimmermann et al., 2013a) (Abbildung 1.7c) mit gereinigtem GST-PDE6D titriert



**Abbildung 1.7** Reinigung von GST-PDE6D und Bindung an TAMRA-Deltarasin. a) Coomassie gefärbtes SDS-Gel der vereinigten GST-PDE6D enthaltenden Fraktionen nach Gelfiltration. b) Titration von 50 nM TAMRA-Deltarasin mit GST-PDE6D ( $K_{d\text{ App}} = 31$  nM) und Messung der Fluoreszenzanisotropie. c) Struktur von TAMRA-markiertem Deltarasin

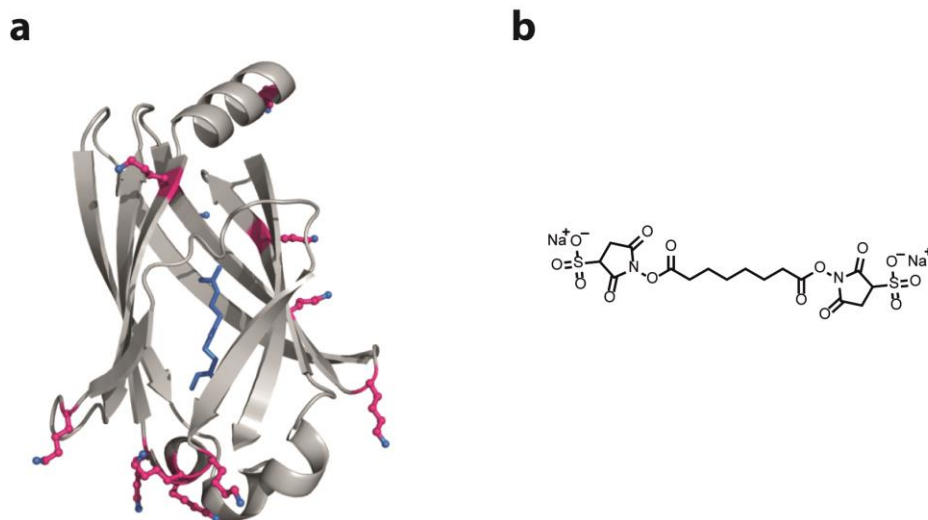
und mittels Fluoreszenzpolarisation (4.2.17) die Bindung verfolgt (Abbildung 1.7b). In Einklang mit den Literaturwerten (6xHis-PDE6D vs. TAMRA-Deltarasin  $K_d = 38 \pm 16$  nM) konnte eine  $K_{d\text{ App}} = 31$  nM bestimmt werden. 50  $\mu\text{g}$  des gereinigten Proteins wurden anschließend mit Zellysate der Pankreastumor-Zelllinie Panc-Tu-I inkubiert und durch Zugabe von Glutathion-gekoppelter Sepharose über die Glutathion (GSH)–Glutathion-S-Transferase-Wechselwirkung an der festen Phase immobilisiert, gewaschen (4.2.10) und enzymatisch verdaut (4.2.12). Nach Reinigung mithilfe der StageTip-Technologie (4.2.13) erfolgte die massenspektrometrische Messung (4.2.14) der Peptide durch Dr. Petra Janning und Dipl.-Ing. Andreas Brockmeyer im technischen Triplikate und die Auswertung der Daten mittels markierungsfreier massenspektrometrischer Quantifizierung (*label-free quantification*, LFQ, 4.2.15). Die schematische Übersicht der Pulldown Strategie ist in Abbildung 1.8a dargestellt.



**Abbildung 1.8** a) Schema des Pulldowns von GST-PDE6D zur Identifizierung neuer Interaktionspartner. Nach heterologer Expression und Reinigung von N-terminal GST-markiertem PDE6D erfolgte die Inkubation mit Zelllysat von Panc-Tu-1 Zellen. Anschließend werden die Proteinkomplexe über die GST-Markierung an GSH-Sepharose gebunden und an der festen Phase immobilisiert. Anschließendes Waschen vermindert die Bindung von unspezifisch gebundenen Proteinen. Die Peptide des tryptischen Verdau wurden mittels StageTip-Strategie gereinigt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. b) Zusammenfassung der PDE6D-bindenden Proteine, die mithilfe des Pulldowns identifiziert wurden.

Die identifizierten Proteine aus zwei biologischen Replikaten aus jeweils technischen Triplikaten wurden anschließend verglichen und Proteine, die in beiden biologischen Replikaten statistisch signifikant (t-Test) in der Pull-down-Probe mit GST-PDE6D im Vergleich zur Negativkontrolle GST angereichert waren, identifiziert (Abbildung 1.8b). Neben der hohen Übereinstimmung der biologischen Replikate stehen die gefundenen Proteine auch in Einklang mit den in der Literatur bekannten Wechselwirkungspartnern von PDE6D (Zhang et al., 2012). Neben den bekannten allosterischen Effektoren von PDE6D, ARL2 und ARL3, wurde ARL1 identifiziert, das hauptsächlich am Golgi-Apparat lokalisiert ist und dort für die korrekte Lokalisation von verschiedenen Proteinen verantwortlich ist (Christis and Munro, 2012). Weiterhin konnten diverse kleine GTPasen der Rab- und Rho-Familie identifiziert werden sowie die G-Protein- $\gamma$ -Untereinheiten GNG5 und GNG12. Insgesamt konnten 25 Proteine als Bindungspartner von PDE6D detektiert werden, von denen 11 geranylgeranyliert, 6 farnesyliert und 8 unprenyliert sind. Neue bisher unbekannte Interaktoren von PDE6D sind hierbei die GTPasen ARL1, RAB23 und CDC42 sowie die Phosphodiesterase CNP (2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase). Wurden während des Pull-downexperiments 50  $\mu$ M Deltarasin zum Zelllysat gegeben, konnten fast alle Interaktionen gestört werden (Abbildung 1.8b). Aufgrund der Annahme, dass die Interaktion zwischen PDE6D und Cargo-Proteinen hauptsächlich über die Prenylierung und

Carboxymethylierung des C-Terminus vermittelt wird und außer den 6 C-terminalen Aminosäuren keine weiteren Rückgrat-Interaktionen bei der Bindung eine Rolle spielen, erscheint die Zahl an identifizierten PDE6D-Interaktionspartnern im Vergleich zur Größe des bekannten Prenyloms weiterhin relativ gering. Um transiente Wechselwirkungen zwischen PDE6D und Cargoproteinen zu bestimmen, wurde deshalb der GST-Pulldown von GST-PDE6D zusätzlich unter Zuhilfenahme eines kovalenten Kreuzkupplers durchgeführt, der PPI in einem komplexen Gemisch (hier Zelllysate) durch kovalente Bindung fixiert und somit in folgenden Waschschrritten eine Dissoziation der Bindungspartner von PDE6D verhindert. Zur Wahl des Kreuzkupplungsreagenz wurde die Kristallstruktur von PDE6D zu Rate gezogen (Abbildung 1.9a). Aufgrund des Vorhandenseins von diversen Lysininen in der Nähe des Eingangs der hydrophoben Bindetasche, konnte das aminreaktive, gut wasserlösliche Kupplungsreagenz BS3 (Abbildung 1.9b) verwendet werden.

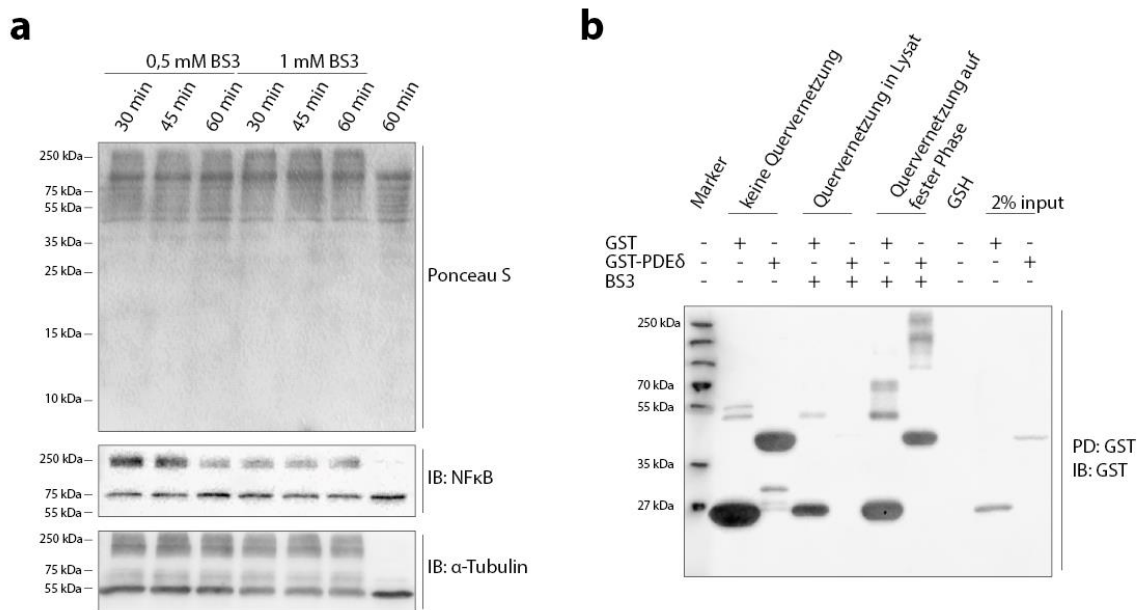


**Abbildung 1.9** a) Röntgenkristallstruktur von PDE6D (grau) und dem Farnesylrest (blau) von RHEB. Die Lysinseitenketten sind in magenta gekennzeichnet. PDB: 3T5G b) Struktur des homobifunktionalen, aminreaktiven NHS-Esters BS3 (Bis(sulfosuccinimidyl) suberat)

Der Pulldown Ansatz mit Kupplungsreagenz wurde nach gleichem Schema wie in Abbildung 1.8a durchgeführt, mit Zugabe von BS3 nach der Inkubation des Zelllysats mit GST-PDE6D und GSH-Sepharose. Um unbeabsichtigtes Kuppeln von Proteinen zu vermeiden und übermäßiges Kuppeln zu verhindern, welches zu großen unlöslichen Proteinkomplexen führen kann, wurden zunächst die optimalen Konzentration des Kupplungsreagenz sowie die optimale Inkubationsdauer bestimmt. Hierfür galt die niedrigste Konzentration und kürzeste



Zeit zu bestimmen, die ausreichend ist, um zelluläre Proteine kovalent zu vernetzen.



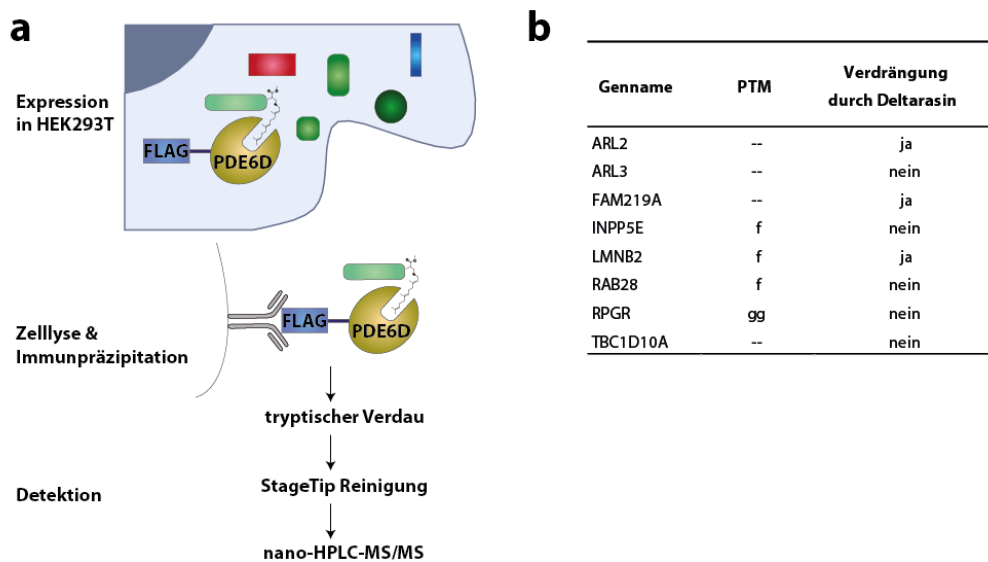
**Abbildung 1.10** Testreaktionen zur Verwendung des Quervernetzungs-Reagenz BS3. a) Panc-Tu-I-Zellysat wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen BS3 für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der erfolgreichen Quervernetzung nach Auftrennung des Lysats mittels SDS-PAGE und unspezifischer Proteinfärbung (Ponceau S) sowie Antikörperfärbung nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran gegen NFκB und α-Tubulin. b) Pulldown von GST/GST-PDE6D aus Panc-Tu-I-Lysat. Vergleich zwischen Pulldown ohne Quervernetzung, oder mit BS3 Zugabe zum Lysat nach Inkubation mit GST/GST-PDE6D sowie mit BS3-Behandlung nach Inkubation des Panc-Tu-I-Lysats mit GST/GST-PDE6D und GSH-Sepharose. Die Pulldown-Reaktion wurde mittels SDS-PAGE und Immunblotting gegen GST analysiert. IB = Immunblot; PD = Pulldown.

Hierfür wurde Panc-Tu-I-Zellysat mit unterschiedlichen Konzentrationen von BS3 für unterschiedliche Zeiten behandelt und anschließend mittels SDS-PAGE und Immunblotting analysiert. BS3-Konzentrationen von bereits 0,5 mM und 30 min Reaktionszeit waren ausreichend, um in der Ponceau S-Färbung Proteinbanden mit höherem Molekulargewicht zu beobachten als in der Kontrollreaktion (Abbildung 1.10a). Weiterhin konnten in den quervernetzten Proben höhermolekulare Spezies von NFκB, welches in aktiver Form Homo- und Heterodimere bildet, beobachtet werden. Gleiches gilt für die Detektion von α-Tubulin, welches in den quervernetzten Proben diverse höhermolekulare Banden im Vergleich zur Kontrolle ohne Kupplungsreagenz, zeigte. Da die zur affinitätschromatographischen Aufreinigung verwendete GST-Markierung in nativer Form Dimere bildet und PPI mit weiteren Proteinen eingeht (Fabrini et al., 2009), musste weiterhin der Zeitpunkt zur Zugabe des Kupplungsreagenz evaluiert werden, um zu vermeiden, dass die kovalente Verknüpfung eines gebildeten GST-Dimers oder einer GST PPI die Immobilisation an der festen Phase beeinflusst. Nach Inkubation des Zellysats mit GST/GST-PDE6D wurde, in einem Fall vor Zugabe, im anderen Fall nach Zugabe der GSH-Matrix, BS3 zugegeben und der Pulldown anschließend mittels SDS-PAGE und Immunblot analysiert. In den Proben, die vor Zugabe

der GSH-Matrix quervernetzt wurden, konnte eine geringere Fraktion GST immobilisiert werden, als in der Kontrolle ohne BS3. GST-PDE6D konnte unter diesen experimentellen Bedingungen nicht detektiert werden, was die Vermutung bestätigt, dass die Quervernetzung der Proteine die Bindestelle für GSH blockiert und somit kein Pulldown möglich ist. Im Fall der Quervernetzung nach Zugabe der GSH-Matrix konnte der Proteinkomplex erfolgreich isoliert werden und höher molekulare GST-PDE6D-Spezies nachgewiesen werden (Abbildung 1.10b). Die Durchführung des Pulldowns mit Quervernetzung und anschließender massenspektrometrischer Analyse des Proteinkomplexes zeigte jedoch schwache Reproduzierbarkeit und nur geringe Unterschiede zwischen der Proteinanreicherung mittels GST-PDE6D im Vergleich zu der Negativkontrolle GST. Vermutlich führte hier die kovalente Fixierung des Komplexes zu vielen unspezifischen Bindungen, was auch zur Reinigung und Detektion von indirekten Wechselwirkungspartnern führte.

## 1.5.2 Identifizierung von PDE6D-Interaktionspartnern mittels Koimmunpräzipitation

Neben der Methode des GST-Pulldowns wurde die Koimmunpräzipitation (Co-IP) für die Identifizierung weiterer PDE6D-Interaktionspartner verwendet. Hierfür wurde FLAG-PDE6D in HEK293T-Zellen überexprimiert (4.3.3). Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Antikörper-Antigen-Wechselwirkung an der festen Phase immobilisiert (4.2.11), gewaschen und enzymatisch verdaut (4.2.12). Die Analyse der gebundenen Proteine erfolgte wie im Falle des GST-Pulldowns massenspektrometrisch (4.2.14) im technischen Triplikate mit markierungsfreier Quantifizierung (4.2.15). Eine schematische Übersicht der Strategie ist in Abbildung 1.11 dargestellt.



**Abbildung 1.11** a) Schema der Koimmunpräzipitation von FLAG-PDE6D zur Identifizierung neuer Interaktionspartner. Nach ektopischer Expression von FLAG-PDE6D in HEK293T-Zellen wurde das Zelllysate mit einem an Agarose gekoppelten Antikörper gegen die FLAG-Markierung von PDE6D inkubiert. Vor der massenspektrometrischen Analyse erfolgte das mehrmalige Waschen der gebundenen Proteinkomplexe sowie der tryptische Verdau und die Aufreinigung mittels StageTips. b) Zusammenfassung der mittels Koimmunpräzipitation identifizierten PDE6D-Interaktionspartner.

Die identifizierten Proteine aus zwei biologischen Replikaten aus jeweils technischen Triplikaten wurden anschließend verglichen und Proteine, die in beiden biologischen Replikaten statistisch signifikant (t-Test) in der Probe mit den FLAG-PDE6D transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen angereichert waren, identifiziert (Abbildung 1.11b). Die mit dieser Strategie detektierten PDE6D-interagierenden Proteine, wiesen erneut eine hohe Übereinstimmung mit den in der Literatur bekannten Interaktionspartnern von PDE6D auf (Humbert et al., 2012; Thomas et al., 2013). Interessant ist, dass die erhaltene Liste an Proteinen wesentlich kürzer ist als die aus dem GST-Pulldown (Abbildung 1.8) und es nur wenige Überschneidungen in den identifizierten Proteinen zwischen den verschiedenen

verwendeten Strategien gibt. Neben den allosterischen Bindern ARL2 und ARL3 konnten nur die beiden prenylierten Proteine LMNB2 und RAB28 im GST-Pulldown und in der FLAG-Immunpräzipitation identifiziert werden. Die beiden gut charakterisierten PDE6D-Binder RPGR und das hochaffin bindende INPP5E konnten im GST-Pulldown nicht nachgewiesen werden. Neben dem methodischen Unterschied in der Probenvorbereitung kommen nur zwei weitere Faktoren für diesen Unterschied in Frage. Dies sind zum einen die verwendeten Zelllinien, für den Pulldown wurden Panc-Tu-I-Zellen und für die Immunpräzipitation HEK293T-Zellen verwendet, zum anderen das verwendete Puffersystem. Für die Immunpräzipitation wurde ein modifizierter RIPA-Puffer mit 1% NP40 verwendet, wohingegen für den GST-Pulldown ein Phosphat-basierter Puffer mit 0,5% CHAPS genutzt wurde. Der CHAPS-basierte Puffer wurde gewählt, da *in vitro* Bindungsstudien Hinweise lieferten, dass langkettige aliphatische Detergenzien mit der hydrophoben Bindetasche von PDE6D wechselwirken und daher potentiell zu identifizierende Binder verdrängen könnten (G. Zimmermann, MPI Dortmund). Dies könnte die wesentlich geringere Zahl an prenylierten Proteinen erklären, die in der Immunpräzipitation gefunden wurden. Gleichzeitig könnte die Kopräzipitation von INPP5E ( $K_d = 3,7 \pm 0,2$  nM) trotz Verwendung des langkettigen, aliphatischen Detergenz in der Immunpräzipitation anhand dessen hoher Affinität für PDE6D erklärt werden (Fansa et al., 2016). Neben der Geranylgeranylgruppe bindet RPGR auch über die N-terminale RCC1-ähnliche Domäne (*regulator of chromosome condensation*) mit hoher Affinität ( $K_d = 100$  nM) an PDE6D (Linari et al., 1999b).

**Tabelle 1.3** Identifizierte Proteine aus dem Kontrollpulldown von GST-PDE6D aus HEK293T-Lysat in CHAPS-Puffer. Nach heterologer Expression und Reinigung von N-terminal GST-markiertem PDE6D erfolgte die Inkubation mit Zelllysate von HEK293T Zellen. Anschließend wurden die Proteinkomplexe über die GST-Markierung an GSH-Sepharose gebunden und an der festen Phase immobilisiert. Anschließendes Waschen verminderte die Bindung von unspezifisch gebundenen Proteinen. Die Peptide des tryptischen Verdau wurden mittels StageTip-Strategie gereinigt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. f = farnesyl; gg = geranylgeranyl; -- = nicht prenyliert.

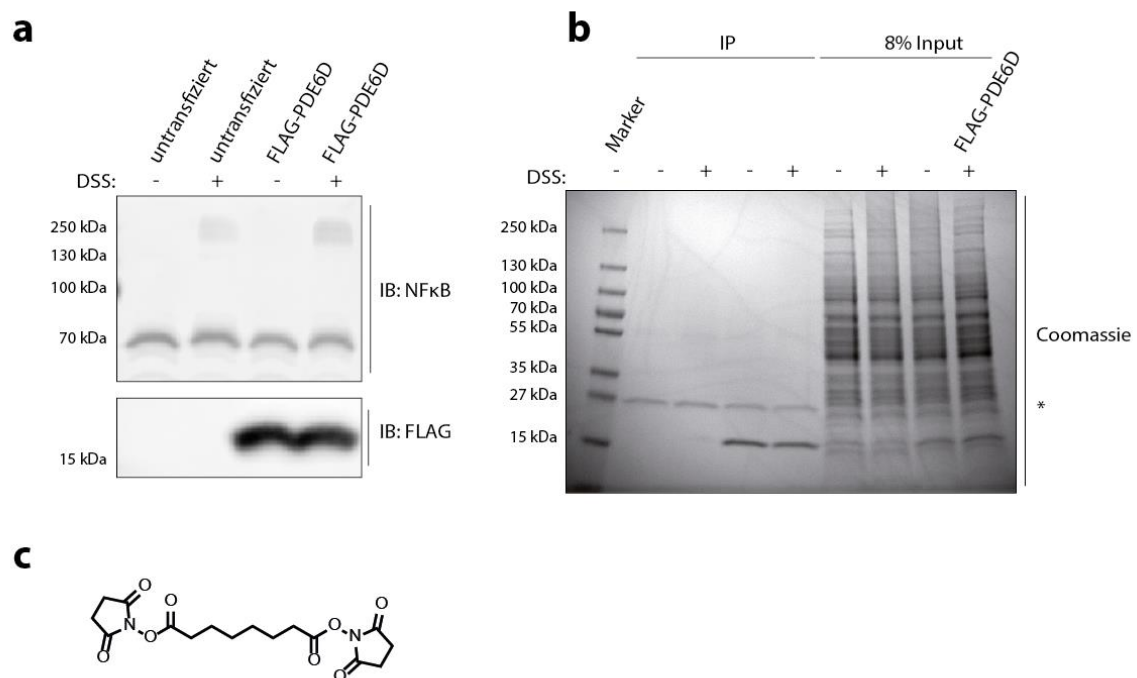
Proteinname	Genname	PTM
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADM	--
ADP-ribosylation factor-like protein 2	ARL2	--
ADP-ribosylation factor-like protein 3	ARL3	--
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	--
Dolichol-phosphate mannosyltransferase	DPM1	--
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	GMPS	--
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	GNB1	--
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	GNB2	--
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	--
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	GNG5	gg
Heat shock protein beta-1	HSPB1	--
Importin subunit beta-1	KPNB1	--
Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA	f

---

Lamin-B1	LMNB1	f
Lamin-B2	LMNB2	f
DNA replication licensing factor MCM3	MCM3	--
DNA replication licensing factor MCM4	MCM4	--
DNA replication licensing factor MCM7	MCM7	--
Cancer-related nucleoside-triphosphatase	NTPCR	--
6-phosphofructokinase, liver type	PFKL	--
6-phosphofructokinase, muscle type	PFKM	--
Ras-related protein Rab-13	RAB13	f
Ras-related protein Rab-28	RAB28	f
Ras-related protein Rap-1A	RAP1A	gg
Ras-related protein Rap-1b	RAP1B	gg
Rho-related GTP-binding protein RhoG	RHOG	gg
Serpin H1	SERPINH1	--
60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein	TROVE2	--
Elongation factor Ts, mitochondrial	TSFM	--
Exportin-1	XPO1	--

---

Als Kontrollelexperiment wurde der GST-Pulldown mit HEK293T-Lysat und CHAPS-Puffer durchgeführt, um eine Liste zu erhalten, die in weiten Teilen der des GST-Pulldowns aus Panc-Tu-I Zellen entspricht (Tabelle 1.3). Hieraus lässt sich als wahrscheinlichster Faktor für die Unterschiede in den Resultaten des Pulldowns und der Immunpräzipitation die Zusammensetzung des Lysepuffers ableiten. Das Fehlen von INPP5E und RPGR bei Verwendung des CHAPS-basierten Puffers kann auf die unterschiedliche Fähigkeit zur Solubilisierung von Proteinen durch unterschiedliche Detergenzien zurückgeführt werden. Wie im Falle des GST-Pulldowns wurde auch für die Immunpräzipitation von FLAG-PDE6D ein weiterer Ansatz mit Kupplungsreagenz durchgeführt. 24 h nach Transfektion mit FLAG-PDE6D wurden die HEK293T-Zellen trypsiniert, gewaschen und mit DSS (Disuccinimidyl suberat), dem zellpermeablen Äquivalent zu BS3, inkubiert (Abbildung 1.12c). Nach Abstoppen der Quervernetzungsreaktion wurden die Zellen lysiert und das Zelllysate mittels SDS-Gel und Immunblot auf die Anwesenheit höher molekularer Spezies von NFκB untersucht (Abbildung 1.12a). Weiterhin wurde die Immunpräzipitation von FLAG-PDE6D aus quervernetztem und nicht quervernetztem Lysat durchgeführt, um die Auswirkungen der DSS Behandlung auf das Epitop des FLAG-Markierung zu bestimmen (Abbildung 1.12b).

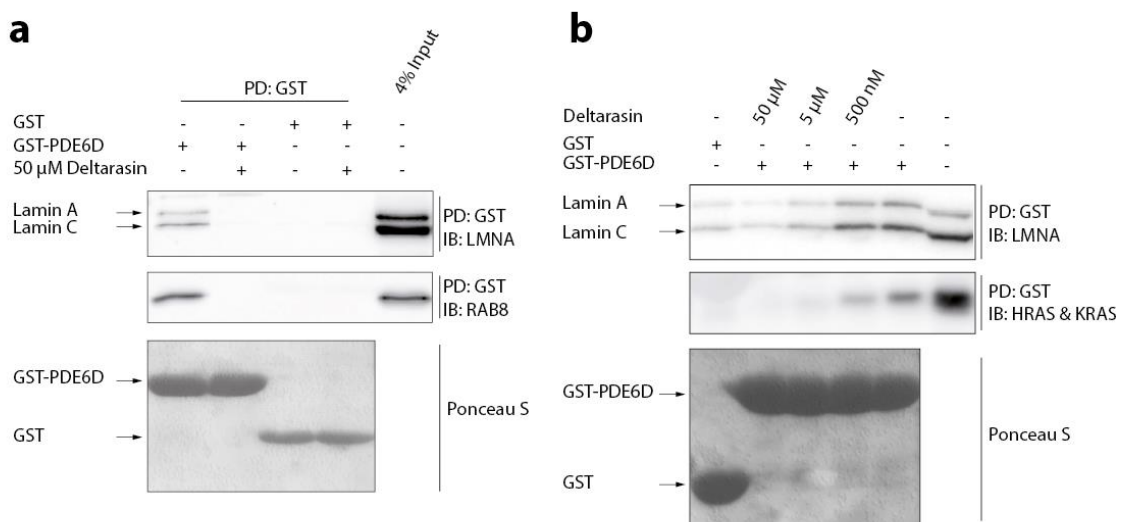


**Abbildung 1.12** Quervernetzung von FLAG-PDE6D und Interaktionspartnern in Zellen. a) HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit FLAG-PDE6D geerntet und zelluläre Proteine mit DSS quervernetzt. Die Zelllysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Immunblot analysiert. b) FLAG-PDE6D wurde aus HEK293T Zellen nach Quervernetzung mit DSS immunpräzipitiert und der erhaltene Komplex mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. c) Struktur des homobifunktionalen, aminreaktiven, zellpermeablen NHS-Esters DSS (Disuccinimidyl suberat). IB = Immunblot; IP = Immunpräzipitation.

Das Quervernetzen zellulärer Proteine in lebenden Zellen hat hierbei keine Auswirkung auf die Paratop–Epitop-Interaktion des in der Immunpräzipitation verwendeten Antikörpers gegen die FLAG-Markierung von FLAG-PDE6D. Sowohl im unbehandelten als auch im quervernetzten Ansatz konnte FLAG-PDE6D erfolgreich immunpräzipitiert werden. Die Immunpräzipitation in Anwesenheit des kovalenten Kreuzkupplers mit anschließender massenspektrometrischer Auswertung zeigte jedoch ähnlich, wie im Falle des GST-Pulldowns eine schlechte Reproduzierbarkeit. Am wahrscheinlichsten ist auch hier die Detektion vieler unspezifischer Wechselwirkungen, die durch das unselektive Quervernetzungsreagenz fixiert wurden.

### 1.5.3 Validierung der identifizierten PDE6D-Interaktionspartner

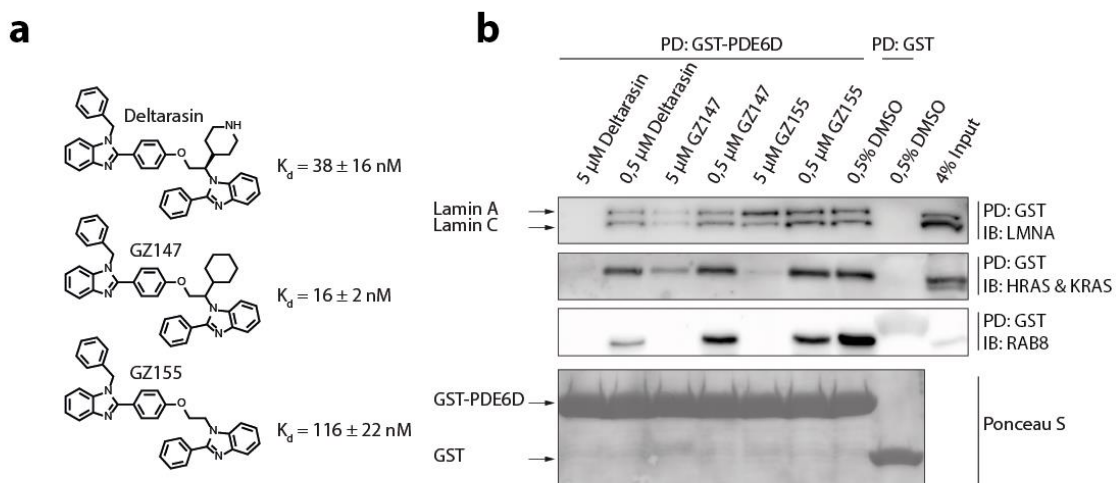
Im Anschluss an die Identifikation von PDE6D-Interaktionspartnern mittels Massenspektrometrie folgte die Validierung ausgewählter Proteine nach GST-Pulldown über SDS-PAGE und anschließendes Immunblotting (Abbildung 1.13).



**Abbildung 1.13** Validierung ausgewählter PDE6D Interaktoren und deren Verdrängung aus der hydrophoben Bindetasche von PDE6D durch Deltarasin. a) Pulldown von GST-PDE6D aus Panc-Tu-I Lysat unter Anwesenheit von 50 µM Deltarasin oder DMSO. Nach SDS-PAGE und Immunblotting erfolgte die Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen die LMNA-Genprodukte Lamin A und Lamin C sowie gegen RAB8. b) Pulldown von GST-PDE6D aus Panc-Tu-I-Lysat in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen Deltarasin im Lysat. Die Detektion erfolgte nach Immunblotting über spezifische Antikörper gegen Lamin A, Lamin C und Ras. GST und GST-PDE6D wurden über Ponceau S-Färbung der Membran gezeigt.

Nach Pulldown von GST-PDE6D aus Panc-Tu-I-Zelllysat konnte auch in der Analyse mittels Immunblot eine spezifische Bindung von Lamin A, Lamin C und RAB8 gezeigt werden. Während klare Proteinbanden für die getesteten PDE6D-Interaktoren in der mit GST-PDE6D-inkubierten Probe zu erkennen sind, kann kein Signal in der GST-Kontrolle detektiert werden. Weiterhin ist es möglich durch die Verwendung eines Überschusses von Deltarasin Lamin

A/C sowie RAB8 aus der hydrophoben Bindetasche PDE6Ds zu verdrängen (Abbildung 1.13a). Aufgrund der hohen Affinität Deltarasins gegenüber PDE6D ( $K_d = 38 \pm 16$  nM) sollten Proteine, die PDE6D über dessen hydrophobe Bindetasche binden auch bei geringeren Konzentrationen verdrängt werden können. Aus diesem Grund erfolgte die Durchführung des Pulldowns erneut mit verschiedenen Konzentrationen Deltarasins. Es zeigte sich, dass bereits 5  $\mu$ M Deltarasin ausreichend sind, um die Menge an Lamin A/C beinahe auf Hintergrundlevel zu reduzieren (Abbildung 1.13b). Ein weiterer bekannter Interaktionspartner von PDE6D ist die kleine GTPase Ras, für deren Lokalisation an der Zellmembran PDE6D mitverantwortlich ist. Für die Ras-Isoform KRAS4B ist bekannt, dass sie mit nanomolarer Affinität ( $K_d = 302$  nM) in PDE6Ds hydrophobe Tasche bindet (Chen et al., 2010). Überraschenderweise konnte jedoch kein Protein der Ras-Familie im GST-Pulldown mit anschließender massenspektrometrischer Analyse detektiert werden. Im Pulldown mit anschließender Analyse mittels Immunblot konnte die Bindung von Ras-Proteinen an PDE6D sowie die Verdrängung der Ras-Proteine durch Deltarasin jedoch gezeigt werden. Substanzkonzentrationen von bereits 500 nM waren ausreichend, um die Menge an koprizipitierten Ras-Proteinen deutlich zu verringern (Abbildung 1.14b). Um auszuschließen, dass die Verdrängung der getesteten Interaktionspartner von PDE6D ein experimentelles Artefakt ist und es sich hierbei tatsächlich um einen generellen Mechanismus handelt wurde der Pulldown von GST-PDE6D erneut in Anwesenheit von Deltarasin sowie zweier Derivate durchgeführt (Abbildung 1.14a) (Zimmermann et al., 2013a; Zimmermann et al., 2014).



**Abbildung 1.14** Verdrängung ausgewählter Proteine aus der hydrophoben Bindetasche PDE6Ds durch Deltarasin und zweier Derivate. a) Bis-benzimidazole Deltarasin, GZ147 und GZ155 sowie zugehöriger Affinitäten gegenüber PDE6D. b) Pulldown von GST-PDE6D aus Panc-Tu-I-Lysat in Anwesenheit von 0,5  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M Deltarasin, GZ147 oder GZ155. Anschließend Detektion gebundener Proteine nach Immunblotting und Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen Lamin A, Lamin C, HRAS, KRAS und RAB8.

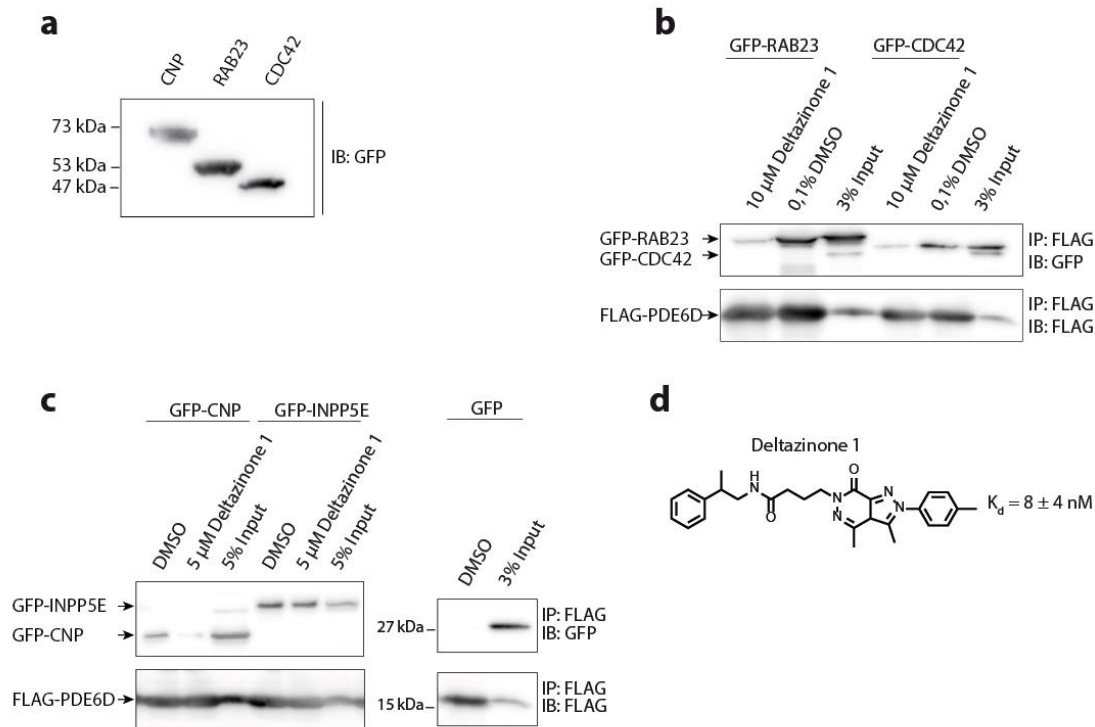


Deltarasin sowie die beiden getesteten Derivate waren in der Lage die drei untersuchten Proteine effektiv aus der hydrophoben Bindetasche von PDE6D zu verdrängen. Im Fall von Deltarasin sind 5  $\mu$ M Substanz ausreichend um die Bindung aller drei getesteten Proteine an PDE6D vollständig zu inhibieren und bereits bei 500 nM ist eine deutlich verringerte Bindung zu detektieren. Die kleine GTPase RAB8 lässt sich durch alle drei verwendeten Substanzen bei 5  $\mu$ M Konzentration vollständig verdrängen, wohingegen die Ras-Proteine noch geringe Restbindung bei 5  $\mu$ M GZ147 und GZ155 zeigt.

#### **1.5.4 Validierung und Charakterisierung neuer PDE6D-Interaktionspartner**

Zur Validierung und Charakterisierung der neu identifizierten PDE6D-Interaktionspartner CDC42, RAB23 und CNP wurden zunächst Expressionsplasmide der Proteine hergestellt. Das Maus-Ortholog von RAB23 wurde als bakterielles Expressionsplasmid von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Goody (MPI Dortmund) zu Verfügung gestellt und durch die DPF (Dortmund Protein Facility) in pOPIN-EGFP umklontiert. Die cDNA von CNP wurde kommerziell erworben (GE Dharmacon) und anschließend ebenfalls von der DPF in pOPIN-EGFP umklontiert. Für die Klonierung von CDC42 wurde RNA aus humanem Blut (zur Verfügung gestellt von M. Schwalfenberg, MPI Dortmund) isoliert. CDC42 wurde mit sequenzspezifischen Primern direkt aus der RNA amplifiziert und in pEGFP-C1 kloniert. Um den funktionalen prenylierten C-Terminus der Fusionsproteine zu erhalten, wurde die GFP-Markierung N-terminal platziert. Für die Validierung der physischen Interaktion zwischen PDE6D und den drei Proteinen wurden diese zunächst in HEK293T-Zellen mit FLAG-PDE6D kotransfiziert und anschließend die Interaktion mittels Koimmunpräzipitation

detektiert.

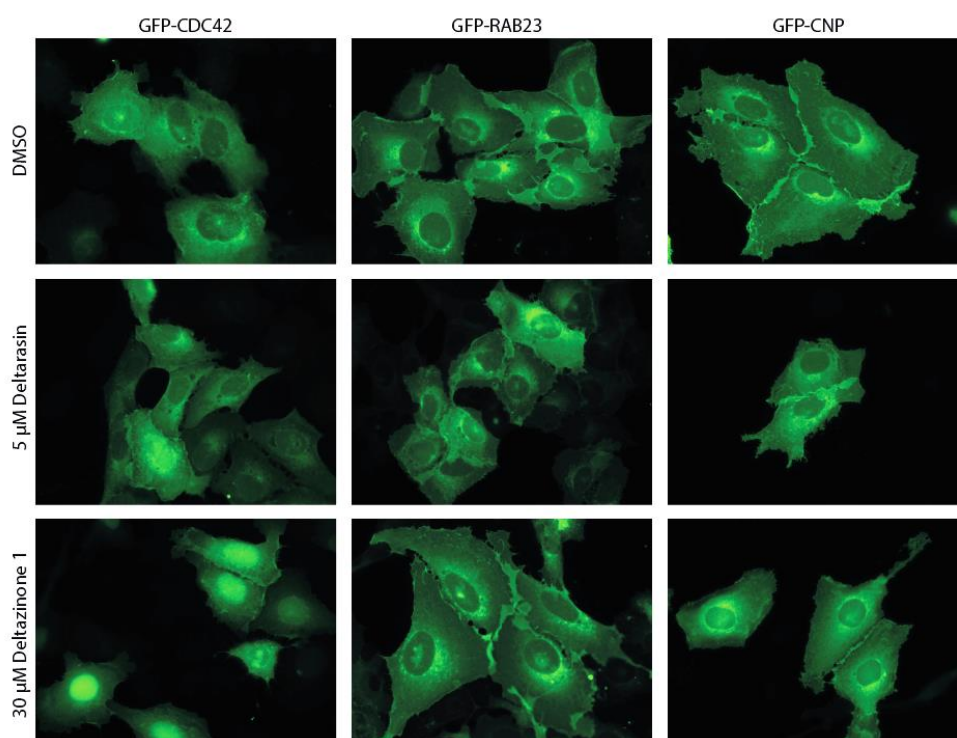


**Abbildung 1.15** Validierung der Interaktion von PDE6D mit CDC42, RAB23 und CNP. a) Testexpression von CDC42, RAB23 und CNP in HEK293T Zellen. b+c) Koimmunpräzipitation von GFP-RAB23, GFP-CDC42 und GFP-CNP aus HEK293T Zelllysaten in Anwesenheit von 5  $\mu$ M Deltazinone 1. Zur Detektion der GFP-markierten Interaktionspartner wurde nach SDS-PAGE und Immunblot die Membran mit einem spezifischen Antikörper gegen die GFP-Markierung behandelt. d) Struktur des hochaffinen Binders, der hydrophoben Tasche PDE6Ds, Deltazinone 1, mit Angabe der Dissoziationskonstanten für PDE6D.

Mittels Kalziumphosphat-Transfektion (4.3.3) wurde zunächst die korrekte Expression der Konstrukte in HEK293T-Zellen überprüft (Abbildung 1.15a). Im Anschluss erfolgte die Transfektion mit FLAG-PDE6D und den erwähnten GFP-markierten Konstrukten. Nach Immunpräzipitation von FLAG-PDE6D konnte im Immunblot die Interaktion mit allen drei neu identifizierten PDE6D-Interaktionspartnern validiert werden (Abbildung 1.15b+c). Zusätzlich wurde als Kontrolle die Kopräzipitation des bekannten PDE6D-Interaktionspartners INPP5E beobachtet (Abbildung 1.15c). Bei Transfektion der Zellen mit FLAG-PDE6D und GFP konnte keine unspezifische Kopräzipitation von GFP detektiert werden und es kann somit davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Interaktionen spezifisch sind. Die Zugabe des Pyrazolopyridazinons Deltazinone 1 (Abbildung 1.15d) führte zur Verdrängung der getesteten Proteine aus der hydrophoben Bindetasche von PDE6D. Im Fall von RAB23 und CDC42 sorgten 10  $\mu$ M Deltazinone 1 für eine nahezu komplette Verdrängung von PDE6D. Die Phosphodiesterase CNP zeigte schon bei einer Deltazinone 1-Konzentration von 5  $\mu$ M keine Bindung mehr an PDE6D. Wie in den

vorhergehenden Immunpräzipitationen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse, konnte auch hier INPP5E nicht durch Substanzzugabe von PDE6D verdrängt werden.

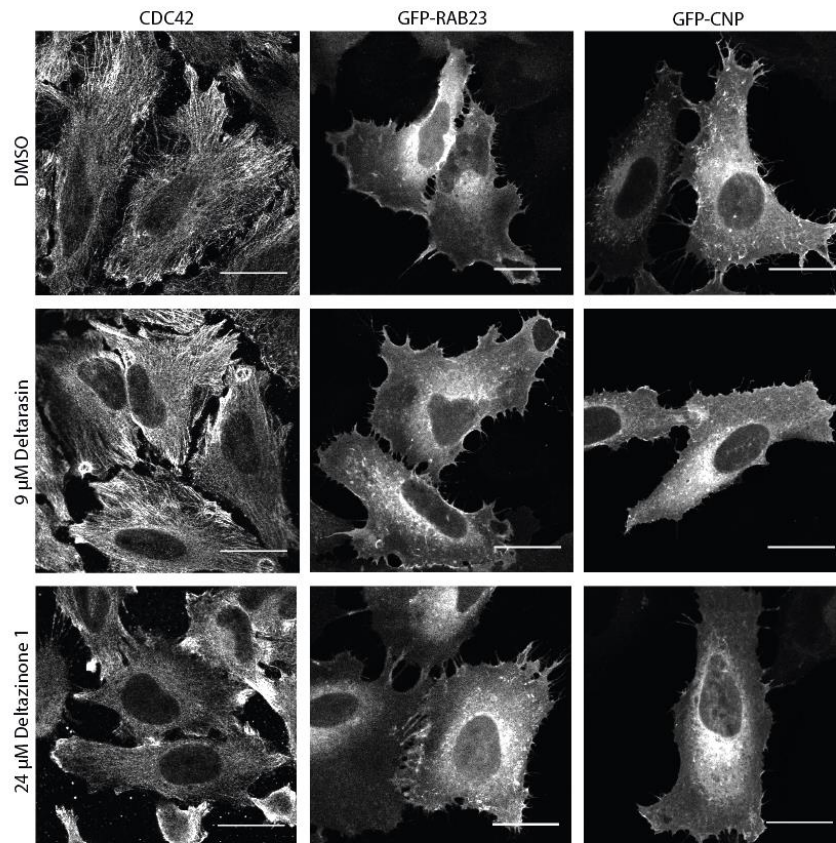
Im nächsten Schritt folgte die Charakterisierung der Interaktion zwischen PDE6D und den drei neuen Interaktionspartnern. Hierfür sollten zunächst etwaige Auswirkungen auf die Lokalisation der Proteine unter Substanzeinwirkung getestet werden. Sollte die Interaktion zwischen PDE6D und den drei neuen Wechselwirkungspartnern physiologisch relevant sein, könnte das Blockieren der hydrophoben Bindetasche von PDE6D die Interaktion mit den Proteinen verhindern und somit deren Lokalisation beeinflussen.



**Abbildung 1.16** Lokalisation von GFP-CDC42, GFP-RAB23 und GFP-CNP in U-2 OS-Zellen. U-2 OS-Zellen wurden mit GFP-CDC42, GFP-RAB23 und GFP-CNP transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit Deltarasin, Deltazinone 1 oder DMSO für weitere 24 h. Nach Fixieren der Zellen erfolgte die Analyse mittels Weitfeldmikroskopie. 63-fache Vergrößerung.

Alle drei Proteine lokalisieren in intrazellulären Vesikeln und an der Plasmamembran. Die Zugabe von Deltarasin und Deltazinone 1 konnte keinerlei Veränderung in der Lokalisation der untersuchten Proteine herbeiführen (Abbildung 1.16). Einzig für GFP-CDC42 konnte eine erhöhte Lokalisation im Zellkern bei Verwendung von Deltazinone 1 beobachtet werden, die vermutlich der Überexpression von GFP-CDC42 zu Grunde liegt und daher keine biologische Aktivität widerspiegelt (Garcia et al., 2006). Warum die Anreicherung von GFP-CDC42 im Nukleus von Deltazinone 1-behandelten Zellen ausgeprägter ist als in DMSO-behandelten Zellen, ist jedoch unklar. Aufgrund der höheren räumlichen Auflösung von

Konfokalmikroskopie im Vergleich zu Weitfeldmikroskopie wurde die Lokalisation der drei Proteine erneut mithilfe konfokaler Mikroskopie untersucht. Um einen Einfluss der GFP-Markierung auf die Lokalisation von GFP-CDC42 zu vermeiden wurden untransfizierte Zellen mit einem Primärantikörper gegen CDC42 behandelt und anschließend mittels Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper sichtbar gemacht.



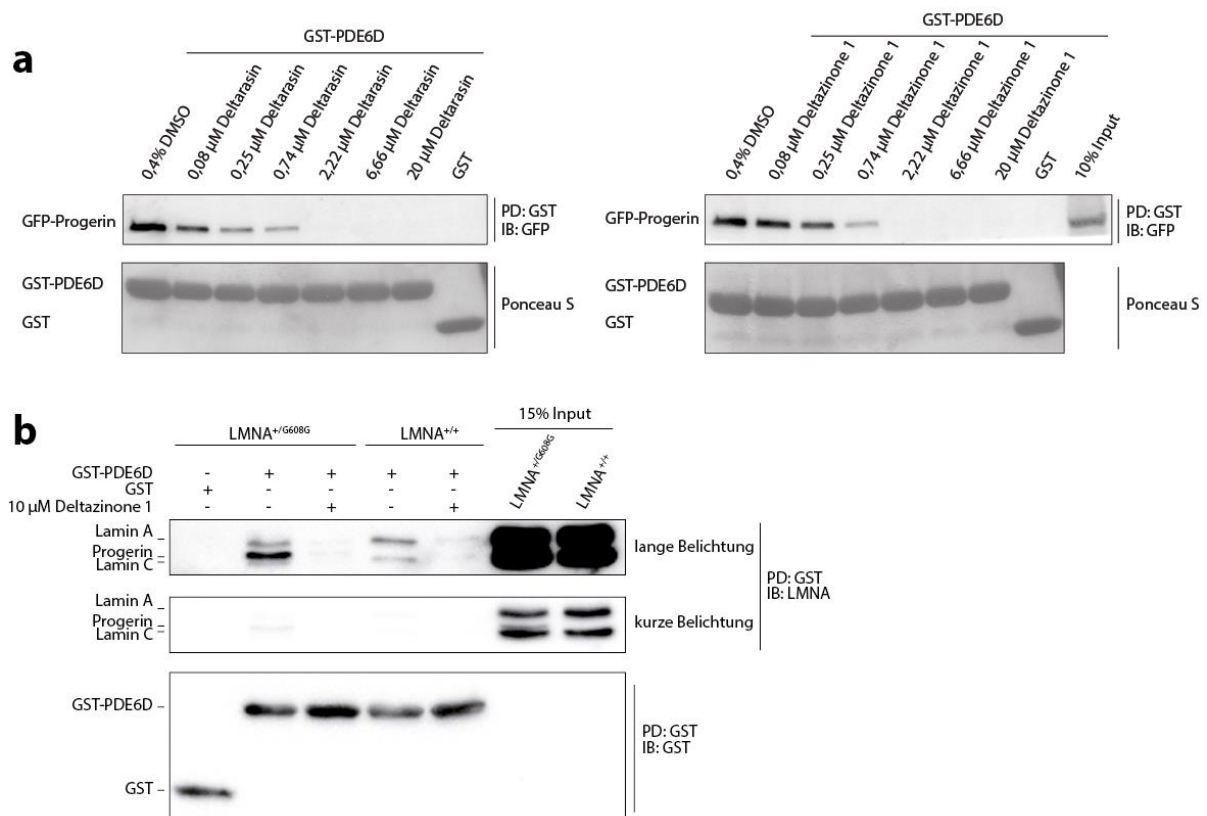
**Abbildung 1.17** Konfokale Mikroskopie zur Detektion der Lokalisation von GFP-RAB23, GFP-CNP und endogenem CDC42 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit GFP-RAB23 oder GFP-CNP transfiziert und anschließend für 1 h mit Deltarasin oder Deltazinone 1 behandelt. Nach Fixierung erfolgte die Analyse der Proben mittels konfokaler Mikroskopie. CDC42 wurde in untransfizierten HeLa-Zellen mithilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. 63-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 25 µm.

Um potentielle Nebeneffekte der Substanzen bei langen Inkubationszeiten zu vermeiden, wurden die Zellen für die konfokalen Aufnahmen für 1,5 h mit Substanz behandelt und anschließend an einem konfokalen Mikroskopiesystem analysiert. Wie in den Weitfeldmikroskopie-Aufnahmen, ließen auch die konfokalen Bilder keine klaren Rückschlüsse auf eine etwaige Beeinflussung der Lokalisation der getesteten Proteine durch die Inhibition von PDE6D zu. Gleichzeitig konnte durch Verwendung eines Antikörpers zur Visualisierung der Lokalisation von CDC42 davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Anhäufung von GFP-CDC42 im Zellkern in den vorangegangenen Mikroskopieaufnahmen tatsächlich um ein Messartefakt handelte, das vermutlich dem GFP-Konstrukt zuzuschreiben

ist. Obwohl die Lokalisation von CDC42 und CNP als prenylierungsabhängig beschrieben wurde konnte kein Zusammenhang zwischen der korrekten Lokalisation und dem Blockieren der hydrophoben Bindetasche von PDE6D gezeigt werden. Für Rho- und Rab-GTPasen gibt es in der Zelle spezielle Transportproteine, die für die korrekte Lokalisation verantwortlich sind. Zytoplasmatisches CDC42 wird durch RhoGDIs (*Rho-specific nucleotide dissociation inhibitors*) solubilisiert. Bei Ausschalten des RhoGDI-Gens wird der Anteil an CDC42 reduziert, der mit der Plasmamembran assoziiert ist (Boulter et al., 2010). Ähnliches gilt für Rab-Proteine, die bei Ausschalten des Gens für RAB-GDI eine unspezifische Lokalisation an Membranen zeigen (Araki et al., 1990). Demnach könnte eine Redundanz in der Aufgabe der Transportproteine das Blockieren von PDE6Ds hydrophober Bindetasche kompensieren und somit keine Beobachtung einer veränderten Lokalisation zulassen.

### 1.5.5 Die PDE6D–Progerin-Interaktion

Mithilfe der beiden affinitätschromatographischen Methoden zur Identifikation von Interaktionspartnern PDE6Ds, konnten Proteine der Lamin-Familie detektiert werden. Die identifizierten Lamin-Proteine umfassen Lamine des A-Typs, Lamin A und C, die von demselben Gen (*LMNA*) codiert werden und alternative Spleißingprodukte sind. Die B-Typ Lamine Lamin B1 und B2 werden von den Genen *LMNB1* und *LMNB2* codiert. Die Interaktion von PDE6D mit Proteinen der Lamin-Familie könnte ein Hinweis darauf sein, dass PDE6D eventuell auch mit der Lamin A-Mutante Progerin interagiert. Um die Wechselwirkung zu überprüfen wurde Progerin als GFP-markiertes Konstrukt in HEK293T-Zellen überexprimiert und anschließend zusammen mit GST-PDE6D aus dem Zelllysate gereinigt.

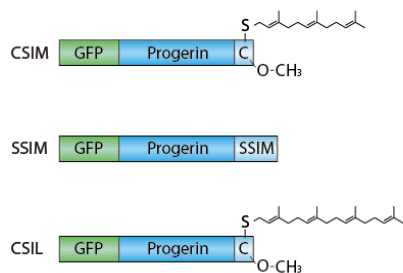


**Abbildung 1.18** PDE6D interagiert mit der Lamin A-Mutante Progerin. a) Pulldown von GST-PDE6D aus HEK293T-Zelllysaten. Die Zellen wurden 24 h vor der Lyse mit GFP-Progerin transfiziert. Mit PDE6D gereinigtes Progerin wurde mittels Immunblot durch spezifische Bindung eines Antikörpers gegen GFP nachgewiesen. Eingesetztes GST-PDE6D bzw. GST wurde mithilfe der Ponceau S-Färbung sichtbar gemacht. b) Pulldown von GST-PDE6D aus primären humanen Fibroblasten. Lysat aus Patientenzellen (*LMNA*<sup>G608G/+</sup>), die Progerin exprimieren sowie Zellen eines gesunden Verwandten (*LMNA*<sup>+/+</sup>) wurden mit 10  $\mu$ M Deltazinone 1 oder DMSO behandelt und anschließend für einen Pulldown Versuch mit GST/GST-PDE6D inkubiert. Endogenes Lamin A/C sowie Progerin wurden mittels spezifischer Antikörperfärbung im Immunblot nachgewiesen. Eingesetztes GST bzw. GST-PDE6D konnte mit einem Antikörper gegen die GST-Markierung detektiert werden.

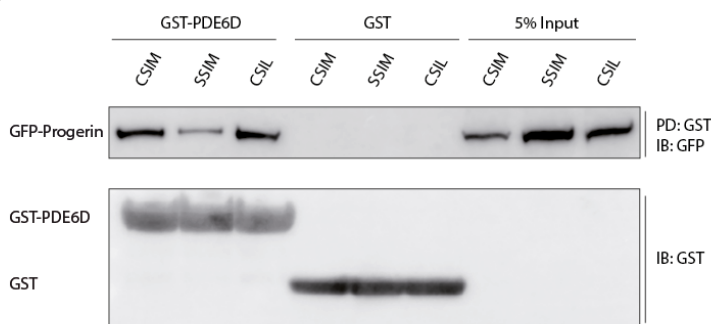
Der Pulldown-Versuch zeigt eine klare Bindung von GFP-Progerin an PDE6D (Abbildung 1.18a). Gleichzeitig kann GFP-Progerin durch Zugabe von Deltarasin oder Deltazinone 1

effektiv von PDE6D verdrängt werden. Bereits geringe Konzentrationen von 250 nM sind ausreichend, um die Menge an GFP-Progerin deutlich zu reduzieren und 2,22  $\mu$ M Substanz reichen aus, um die Interaktion im Lysat vollständig zu unterbinden. Weiterhin wurden primäre humane Fibroblasten von Patienten, die an der seltenen genetischen Störung HGPS leiden, untersucht. Die verwendeten Patientenzellen tragen eine heterozygote Mutation im *LMNA*-Gen (*LMNA*<sup>+/*G608G*</sup>) und exprimieren neben Lamin A und C auch Progerin. Um die Bindung von PDE6D an endogenes Progerin zu untersuchen, wurde ein Pulldown von GST-PDE6D aus Patientenzelllysate durchgeführt und die Kopräzipitation von Progerin untersucht (Abbildung 1.18b). Auch endogenes Progerin zeigt hier eine Bindung an PDE6D, die erfolgreich durch Blockieren der PDE6D-Prenylbindetasche gestört werden kann. Darüber hinaus kann bei Vergleich der Progerin-Mengen in der Inputkontrolle und dem Pulldown eine starke Anreicherung Progerins in der Pulldown-Probe beobachtet werden. Die Bindung von Progerin an PDE6D, sowie die Möglichkeit die Interaktion durch Blockieren der Prenylbindetasche von PDE6D zu stören, sind bereits erste Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Progerin und PDE6D über den Farnesylrest Progerins. Um die Interaktion weiter zu charakterisieren und nachzuweisen, dass die Interaktion prenylierungsabhängig ist, wurden im Folgenden zwei Mutanten des GFP-Progerin-Konstrukts erstellt.

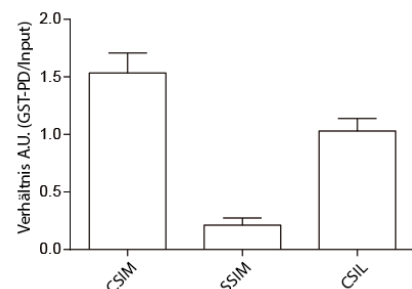
**a**



**b**



**c**

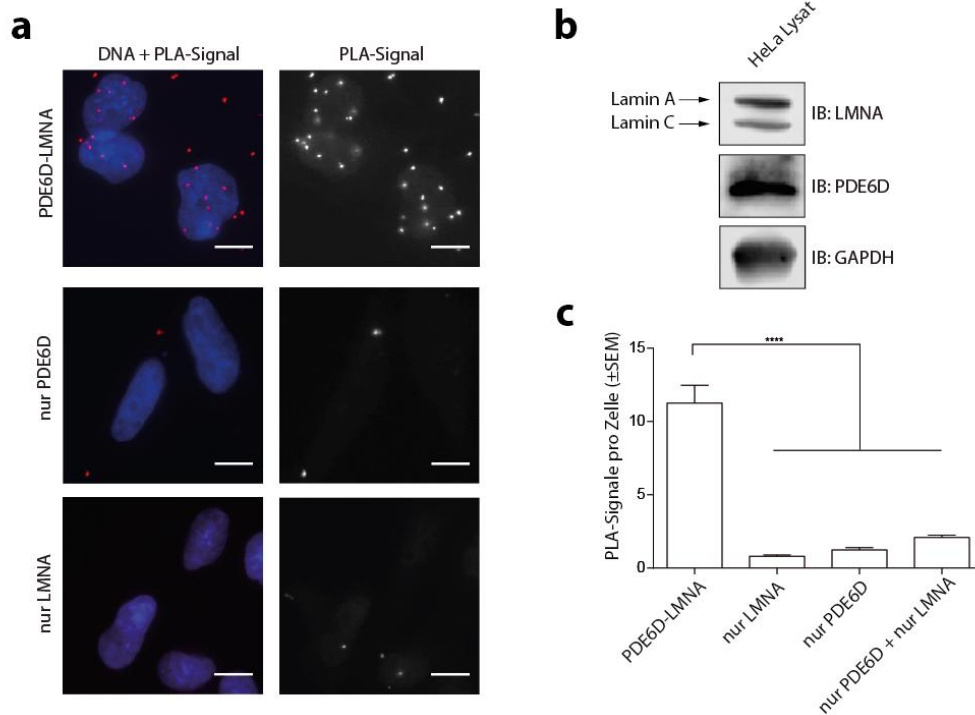


**Abbildung 1.19** Die PDE6D-Progerin Interaktion ist von der Prenylierung Progerins abhängig. a) Generierung von GFP-Progerin CaaX-Box Mutanten. Das Cystein der CaaX-Box von Progerin wird farnesyliert (CSIM), die SSIM Mutante wird nicht farnesyliert und die CSIL Mutante wird geranylgeranyliert. b) Pulldown von GST-PDE6D aus HEK293T-Zelllysate. Die Zellen wurden 24 h vor der Lyse mit den unterschiedlichen GFP-Progerin Mutanten transfiziert. Mit GST-PDE6D gereinigtes

GFP-Progerin wurde durch spezifische Bindung eines Antikörpers gegen GFP nachgewiesen. Eingesetztes GST/GST-PDE6D wurde mittels Antikörpern gegen GST nachgewiesen. c) Quantifizierung der Menge an gereinigtem GFP-Progerin. Die Intensität der GFP-Progerin Banden wurden in Verhältnis zur Menge in der Input-Kontrolle gesetzt.

Mittels Quikchange-PCR wurde durch einfachen Basenaustausch das CaaX-Box-Cystein von Wildtyp-Progerin (CSIM) durch Serin ersetzt (SSIM). Das erhaltene Protein kann somit nichtmehr prenyliert werden. Bei Austausch des C-terminalen Methionins gegen Leucin (CSIL), ändert sich das Prenylierungsmuster von Farnesylierung zu Geranylgeranylierung (Abbildung 1.19a). Im Anschluss wurde der Pulldown von GST-PDE6D aus Zellysat, das GFP-Progerin CSIM, GFP-Progerin SSIM oder GFP-Progerin CSIL enthält, durchgeführt. Bei Analyse der Mengen an kogereinigtem GFP-Progerin zeigt sich, dass GFP-Progerin SSIM, die nicht prenylierte Mutante, deutlich schwächer an PDE6D bindet als farnesyliertes (CSIM) und geranylgeranyliertes (CSIL) GFP-Progerin (Abbildung 1.19b). Das geranylgeranylierte Konstrukt (CSIL) zeigt ähnliche Bindungseigenschaften wie farnesyliertes GFP-Progerin (CSIM). Bei Quantifizierung der Menge an eluiertem GFP-Progerin und Normalisierung auf die Menge an GFP-Progerin im eingesetzten Zellysat, zeigt sich, dass GFP-Progerin CSIM am besten an PDE6D bindet. Die geranylgeranylierte Mutante bindet etwa um 40% schwächer an PDE6D und die nicht prenylierte Mutante zeigt eine Restbindung von ca. 10%. In der Literatur wird für PDE6D eine ungefähr 20x höhere Affinität von farnesylierten gegenüber geranylgeranylierten Proteinen angegeben (Zhang et al., 2004a; Chen et al., 2010). Die Ergebnisse des Pulldowns von GST-PDE6D mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (Abbildung 1.8) zeigten jedoch keine Bevorzugung von farnesylierten Proteinen, was im Einklang mit direkten biophysikalischen Messungen steht, die eine ungefähr zweifach höhere Affinität für ein farnesyliertes Peptid gegenüber dem gleichen Peptid mit Geranylgeranyl-Modifikation zeigten (G. Zimmermann, Dissertation, MPI Dortmund). Hierzu passen die Ergebnisse der Quantifizierung der GFP-Progerin Mutanten nach Pulldown mit GST-PDE6D (Abbildung 1.19c), die ebenfalls nur eine ungefähr doppelt so hohe Anreicherung von farnesyliertem Progerin gegenüber geranylgeranyliertem Progerin zeigten.



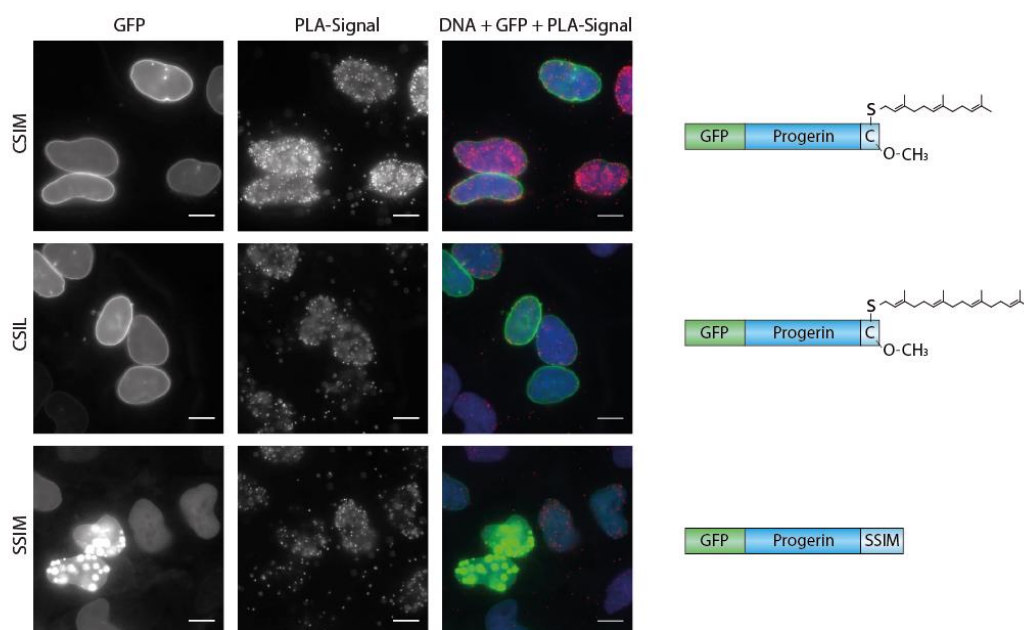


**Abbildung 1.20** PDE6D interagiert mit den *LMNA*-Genprodukten in HeLa-Zellen. a) Proximity Ligation Assay (PLA) zwischen PDE6D und Lamin A/C. Fixierte HeLa-Zellen wurden mit Antikörpern gegen PDE6D und gegen die Produkte des *LMNA* Gens oder mit beiden Antikörpern einzeln als Kontrolle behandelt. Anschließend erfolgte die Visualisierung von intrazellulären Interaktionen mittels PLA (rot) und Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie. Zelluläre DNA (blau) wurde mithilfe von Hoechst33342 sichtbar gemacht. Maßstabsbalken = 25 µm. b) Endogene Proteinlevel von Lamin A, Lamin C sowie PDE6D im Totallysat von HeLa-Zellen. Nach SDS-PAGE und Immunblot wurde die Expression der genannten Proteine in HeLa-Zellen mittels spezifischer Antikörperfärbung gezeigt. c) Quantifizierung der PLA Signale für die PDE6D-LMNA Interaktion und der Vergleich mit den Kontrollen, bei denen nur ein Primärantikörper verwendet wurde und der Addition der PLA-Signale beider Negativkontrollen. Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest durchgeführt ( $p \leq 0,001$ ).

Um auszuschließen, dass die Interaktion von PDE6D und den Produkten des *LMNA*-Gens ein Artefakt des Pulldowns ist und es nur zu einer Interaktion in Zelllysat kommt, wurde die Interaktion mittels Proximity Ligation Assay (PLA, 4.2.16) in HeLa-Zellen untersucht. Für den Versuch wurden HeLa-Zellen fixiert und permeabilisiert und anschließend mit Primärantikörpern gegen PDE6D und die *LMNA*-Genprodukte behandelt. Als Sekundärantikörper wurden zwei PLA-Antikörper eingesetzt, die an ihrer Fc-Region komplementäre Oligonukleotide tragen. Das Paratop der PLA-Antikörper erkennt dabei jeweils die Fc-Region des Primärantikörpers abhängig von dessen Ursprungsspezies. Bei räumlicher Nähe (maximale Distanz von 40 nm) der beiden Primärantikörper können die Oligonukleotide der PLA-Antikörper hybridisieren. Nach Ligation und Amplifikation (*rolling circle amplification*, RCA) der DNA, werden fluorophorgekoppelte Oligonukleotide zur *in situ* Hybridisierung zugegeben. Hierdurch entsteht ein Fluoreszenzsignal am Ort räumlicher Nähe der beiden Proteine, das im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden kann. Zunächst wurde HeLa-Zelllysat auf die Anwesenheit der zu testenden Proteine PDE6D und Lamin A/C untersucht (Abbildung 1.20b). In dem anschließenden Assay konnten

PLA-Signale zwischen PDE6D und Lamin A/C hauptsächlich im Zellkern und der nahen Umgebung des Zellkerns detektiert werden (Abbildung 1.20a). In den beiden Negativkontrollen, bei denen nur jeweils einer der beiden Primärantikörper benutzt wurde, konnten nur vereinzelte PLA-Signale detektiert werden. Mit Hilfe der Software ImageJ konnten die PLA-Signale gezählt und auf die gesamte Zellzahl normalisiert werden. Insgesamt wurden pro Bedingung mindestens 250 Zellen ausgewertet. Nach statistischer Analyse zeigt sich eine signifikant höhere Anzahl an PLA-Punkten pro Zelle in den Proben mit Primärantikörpern gegen PDE6D und LMNA im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen mit nur einem Primärantikörper sowie auch bei Addition der PLA-Signale beider Negativkontrollen (Abbildung 1.20c). Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor gemachten Beobachtungen der Pulldown-Experimente und zeigen eine Interaktion von PDE6D und Lamin A/C auch in zellulärer Umgebung.

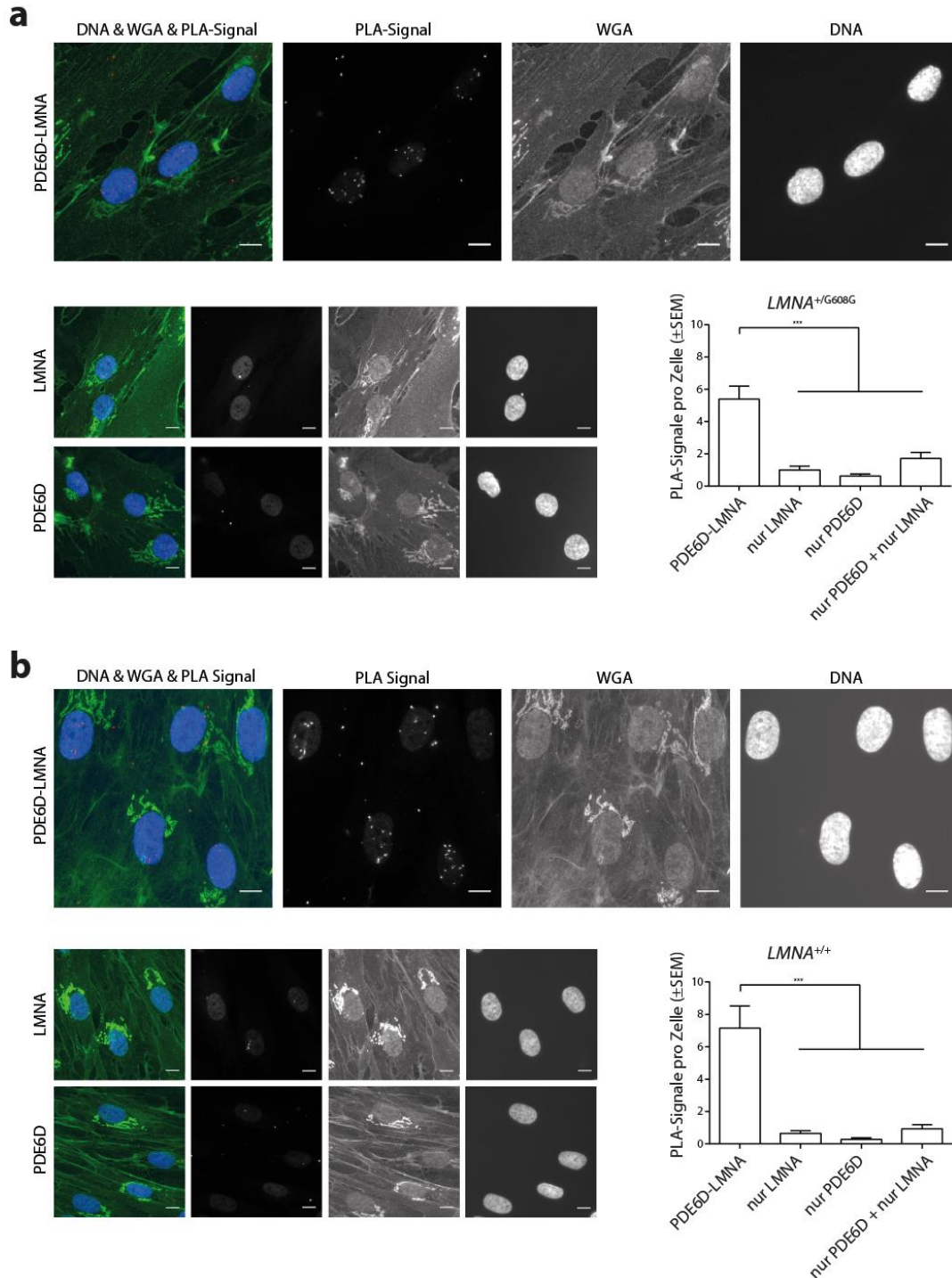
Nach Detektion der Interaktion von PDE6D und Lamin A/C in Zellen, sollte auch die Interaktion zwischen PDE6D und der Lamin A-Mutante Progerin in Zellen untersucht werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit GFP-Progerin, der geranylgeranylierten GFP-Progerin Mutante (CSIL) und der nicht farnesylierten GFP-Progerin Mutante (SSIM) transfiziert. Anschließend erfolgte der PLA mit Primärantikörpern gegen PDE6D und die *LMNA*-Genprodukte.



**Abbildung 1.21** PDE6D interagiert bevorzugt mit farnesyliertem Progerin in Zellen. HeLa-Zellen wurden mit GFP-Progerin bzw. den CaaX-Box Mutanten GFP-Progerin SSIM (nicht farnesyliert) und GFP-Progerin CSIL (geranylgeranyliert) transfiziert. Im Anschluss erfolgte der PLA mit Antikörpern gegen PDE6D und die *LMNA* Genprodukte. Die Detektion der

PLA-Signale (rot) und der GFP-Progerin Mutanten (grün) erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei 63-fache Vergrößerung. Die DNA (blau) wurde mithilfe von Hoechst33342 sichtbar gemacht. Maßstabsbalken = 10 µm.

Wie im Falle des PLA mit endogenem Lamin A/C, kann auch bei Überexpression von GFP-markiertem Progerin die Interaktion mit PDE6D im Kern beobachtet werden. In Zellen, die mit farnesyliertem GFP-Progerin (CSIM) transfiziert wurden, sind deutlich mehr Interaktionen zu detektieren als in Zellen, die mit nicht farnesyliertem (SSIM) oder geranylgeranyliertem GFP-Progerin (CSIL) transfiziert wurden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Pulldown der GFP-Progerin Mutanten mit GST-PDE6D, kann jedoch kein Unterschied zwischen GFP-Progerin SSIM und GFP-Progerin CSIL beobachtet werden. Beide Mutanten zeigen deutlich weniger Interaktionen mit PDE6D als GFP-Progerin CSIM. Obwohl im Pulldown Versuch die Bindung von geranylgeranyliertem GFP-Progerin nur ungefähr zweimal schwächer ist als die Bindung von farnesyliertem GFP-Progerin an PDE6D, können die Unterschiede in den Interaktionen in der Zelle durch die höhere Membranaffinität des längeren Geranylgeranylrests erklärt werden. Während RhoGDIs Rho Proteine aus Membranen über Bindung ihres N-Terminus an die switch I und switch II Region der GTPasen aktiv aus Membranen extrahieren können, ist für PDE6D bislang kein solcher Mechanismus bekannt (Garcia-Mata et al., 2011). Wahrscheinlicher ist für PDE6D eine Rolle in der Solubilisierung der zytosolischen Fraktion von prenylierten Proteinen. Im Fall von GFP-Progerin CSIL, könnte die höhere Affinität zu Membranen, für eine niedrigere Fraktion an zytosolischem Protein führen und somit zu weniger Wechselwirkungen mit PDE6D.



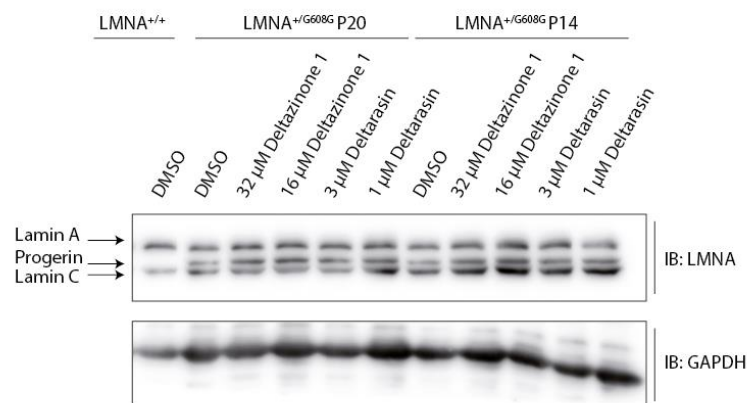
**Abbildung 1.22** PDE6D interagiert mit den *LMNA*-Genprodukten in primären Fibroblasten von HGPS-Patienten. Proximity Ligation Assay (PLA) zwischen PDE6D und Lamin A/C bzw. Progerin. a) Fixierte primäre Fibroblasten eines HGPS-Patienten (*LMNA*<sup>+G608G</sup>) oder b) fixierte primäre Fibroblasten eines gesunden Elternteils (*LMNA*<sup>+/+</sup>) wurden mit Antikörpern gegen PDE6D und LMNA oder beiden Antikörpern einzeln als Kontrolle behandelt. Anschließend erfolgte die Visualisierung von intrazellulären Interaktionen mittels PLA (rot) und Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie. DNA (blau) wurde mittels Hoechst33342 und zelluläre Membranen (grün) mit einem Weizenkeim-Agglutinin Alexa-Fluor488-Konjugat gefärbt. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m. Die Quantifizierung der PLA Signale pro Zelle erfolgte über vier biologische Replikate mit mindestens 250 analysierten Zellen je Replikat. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfachem ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ( $p < 0,01$ ).

Die Interaktion zwischen PDE6D und den *LMNA*-Genprodukten Lamin A/C bzw. Progerin in Zellen, konnte auch in primären humanen Fibroblasten mithilfe des PLA gezeigt werden.

Sowohl in Zellen von HGPS-Patienten als auch in gesunden Zellen waren Interaktionen zwischen PDE6D und Lamin A/C bzw. Progerin zu detektieren (Abbildung 1.22). Entsprechend den Resultaten in HeLa-Zellen (Abbildung 1.20) konnte die Interaktion zwischen PDE6D und den *LMNA*-Genprodukten auch hier hauptsächlich im Nukleus detektiert werden. Entgegen vorangegangener Ergebnisse zur erhöhten Anreicherung von Progerin mit GST-PDE6D (Abbildung 1.18) konnte in Progerin exprimierenden HGPS-Patientenzellen (*LMNA*<sup>+G608G</sup>) keine erhöhte Interaktion zwischen PDE6D und Lamin A/C bzw. Progerin im Vergleich zu gesunden Zellen (*LMNA*<sup>+/+</sup>) beobachtet werden.

### 1.5.6 Auswirkungen der Inhibition der PDE6D–Progerin-Wechselwirkung

Nach dem Nachweis einer Interaktion von PDE6D und den *LMNA*-Genprodukten in Zelllysaten sowie in Zellen, sollten die physiologischen Auswirkungen der Inhibition der Interaktion durch die niedermolekularen Verbindungen Deltarasin und Deltazinone 1 untersucht werden. PDE6D ist in Retinazellen der Maus für die korrekte Lokalisation des farnesylierten Proteins GRK1 verantwortlich. In Abwesenheit von PDE6D kann GRK1 nicht in die äußeren Segmente der Retinazellen transportiert werden. Fehllokalisiertes GRK1 wird abgebaut und die Gesamtmenge an Protein sinkt. Dementsprechend konnten in PDE6D-Knockout-Mausmodellen geringere Proteinlevel von GRK1 beobachtet werden (Zhang et al., 2007). Unter der Annahme, dass PDE6D auch für die Lokalisation von Lamin A bzw. Progerin mitverantwortlich ist, könnte die Inhibition der PDE6D-LMNA Interaktion über Blockieren der Prenylbindetasche zur Fehllokalisierung von Lamin A/Progerin führen und somit ebenfalls zur Degradation der transportierten Proteine. Um die Auswirkungen auf die Proteinlevel von LMNA/Progerin nach Inhibition der PDE6D-LMNA Interaktion zu untersuchen, wurden primäre Fibroblasten von HGPS-Patienten nach unterschiedlich langer Kultivierung (Passage 20 und Passage 14) mit verschiedenen Konzentrationen von Deltarasin und Deltazinone 1 für 48 h behandelt und anschließend die Proteinlevel von Lamin A/C und Progerin analysiert.

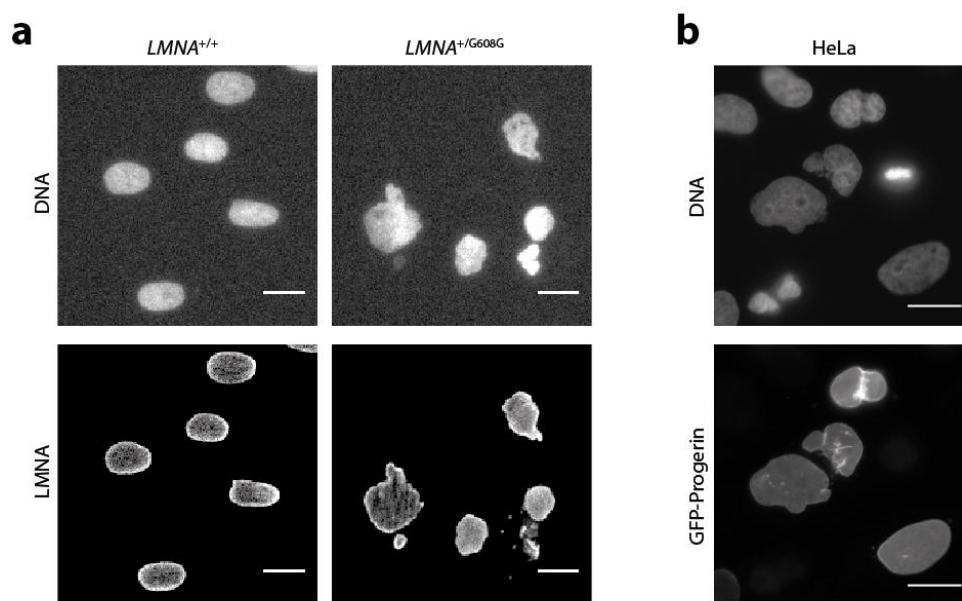


**Abbildung 1.23** Blockieren der Prenylbindetasche von PDE6D hat keine Auswirkung auf die Proteinlevel von Lamin A/C und Progerin. HGPS-Patientenzellen (*LMNA*<sup>+G608G</sup>) in Passage 20 (P20) und Passage 14 (P14) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Deltarasin und Deltazinone 1 für 48 h behandelt und anschließend in 1xLämmli-puffer lysiert. Die Detektion erfolgte mittels Immunblot und spezifischem Antikörper gegen die *LMNA*-Genprodukte. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen GAPDH verwendet.

Die Analyse der Proteinlevel mittels Immunblot (Abbildung 1.23) zeigte jedoch keinen Einfluss der Substanzbehandlung auf die Proteinmengen von Lamin A/C und Progerin.

Eines der Hauptmerkmale Progerin-exprimierender Zellen ist der nukleäre Phänotyp. Während Zellen, die ein gesundes *LMNA*-Gen tragen einen normalen runden Nukleus

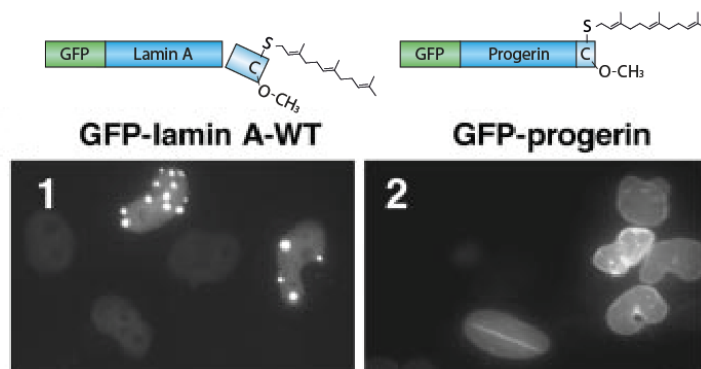
besitzen, zeigen Progerin exprimierende Zellen einen Nukleus mit Einkerbungen, Ausbuchtungen und Faltungen der nukleären Lamina. Der farnesylierte C-Terminus von Wildtyp Prelamin A wird nach Lokalisation an der inneren nukleären Membran abgespalten und prozessiertes Lamin A löst sich von der Membran um die nukleäre Lamina zu bilden. Im Unterschied dazu verbleibt Progerin mit dem konstitutiv farnesylierten C-Terminus an der inneren Membran des Nukleus. Durch die periphere Assoziation an der Kernmembran über die Farnesylgruppe am C-Terminus und die Ausbildung der nukleären Lamina über das restliche Protein kann die komplexe Architektur der Lamina nicht aufrecht erhalten werden, was zu dem erwähnten veränderten nukleären Phänotyp führt (Capell and Collins, 2006).



**Abbildung 1.24** Nukleärer Phänotyp von Progerin-exprimierenden Zellen. a) HGPS-Patientenzellen ( $LMNA^{+/G608G}$ ) sowie Zellen eines gesunden Elternteils wurden fixiert und mittels spezifischer Antikörper die  $LMNA$ -Genprodukte sichtbar gemacht. b) HeLa-Zellen wurden 48 h vor Fixierung mit GFP-Progerin transfiziert. Die DNA wurde durch Färbung mit DAPI sichtbar gemacht. Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m.

In Abbildung 1.24a sind als Beispiel für die Veränderungen des Nukleus humane Fibroblasten eines HGPS-Patienten ( $LMNA^{+/G608G}$ ) im Vergleich zu gesunden Zellen eines nicht erkrankten Elternteils ( $LMNA^{+/+}$ ) dargestellt. Der ausgebuchtete und überlappende nukleäre Phänotyp von Progerin-exprimierenden Zellen, lässt sich durch Überexpression der Lamin A-Mutante Progerin ebenfalls in HeLa-Zellen hervorrufen, die homozygot für Wildtyp  $LMNA^{+/+}$  sind. HeLa-Zellen, die GFP-markiertes Progerin exprimieren, zeigen ebenfalls den gewölbten und teils überlappenden Phänotyp der Kernlamina (Abbildung 1.24b). Die morphologischen Auswirkungen auf die Kernstruktur bei Expression von Progerin stehen in direktem Zusammenhang mit weiteren phänotypischen Merkmalen, die auch zum Krankheitsbild des HGPS führen. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die morphologische Veränderungen des Nukleus in direktem Zusammenhang mit der permanenten Farnesylierung

von Progerin steht. Durch Behandlung von Progerin-exprimierenden Zellen mit Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI) konnte der abweichende nukleäre Phänotyp umgekehrt werden (Mallampalli et al., 2005). Im Falle einer Beteiligung von PDE6D am Transport von Prelamin A bzw. Progerin zur inneren Kernmembran könnte das Blockieren der Prenylbindetasche zu einem ähnlich positiven Effekt führen. Während die Überexpression von GFP-Progerin zu den charakteristischen Ausbeulungen der Kernlamina führt, ist bei Überexpression von GFP-Lamin A, das während der Prozessierung seinen farnesylierten C-Terminus verliert, ein normaler nukleärer Phänotyp zu beobachten, bei dem sich das Protein in nukleären Foki ansammelt (Abbildung 1.25).

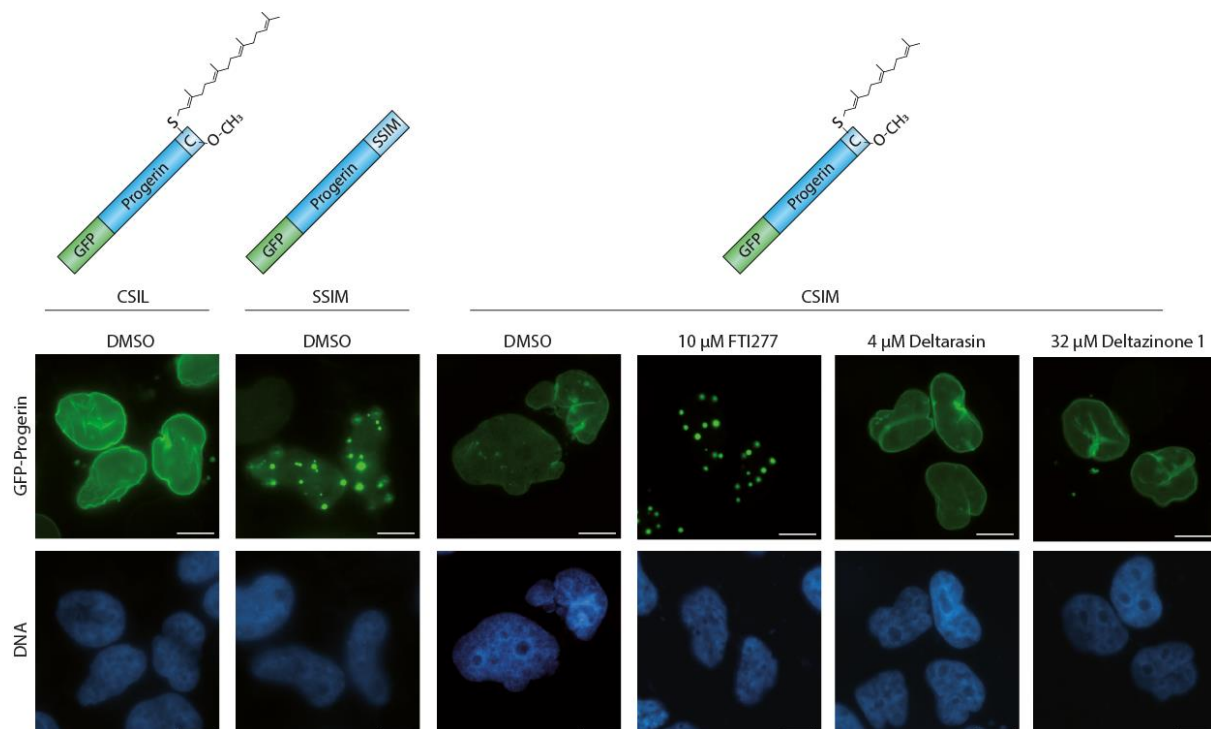


**Abbildung 1.25** Überexpression von GFP-Progerin, aber nicht GFP-Lamin A führt zu einem aberranten nukleären Phänotyp. HeLa-Zellen wurden transient mit GFP-Lamin A (1) oder GFP-Progerin (2) transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Fixierung der Zellen und die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie. Abbildung modifiziert aus (Mallampalli et al., 2005).

Bei Behandlung von GFP-Progerin exprimierenden Zellen mit einem Farnesyltransferaseinhibitor kann der mit positiver Wirkung assoziierte Phänotyp von GFP-Lamin A transfizierten Zellen imitiert werden. Unter FTI-Bedingungen sammelt sich GFP-Progerin in nukleären Foki und die Anzahl an Zellen mit aberranten Nuklei ist signifikant reduziert (Capell et al., 2005). Um den Einfluss des Blockierens der Prenylbindetasche von PDE6D durch Deltarasin und Deltazinone 1 auf die Lokalisation von GFP-Progerin zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit GFP-Progerin (CSIM) sowie der geranylgeranylierten (CSIL) und nicht farnesylierten (SSIM) Progerin-Mutante transfiziert und mit Deltarasin oder Deltazinone 1 behandelt (Abbildung 1.26). Die Zugabe des FTIs führte, wie erwartet, zu einer Ansammlung von GFP-Progerin CSIM in nukleären Foki und kopierte damit die Lokalisation von GFP-Lamin A und der nicht farnesylierten Mutante SSIM. In allen drei Fällen wird durch das Fehlen der C-terminalen Prenylgruppe ein Binden an die innere Kernmembran verhindert. Die Lokalisation der geranylgeranylierten Mutante CSIL entsprach der Lokalisation von farnesyliertem GFP-Progerin CSIM, was durch die Bindung des prenylierten C-Terminus an die innere Kernmembran erklärt werden kann.



Hierbei scheint es keine Rolle zu spielen welches Prenylierungsmotiv die Membranassoziation vermittelt.



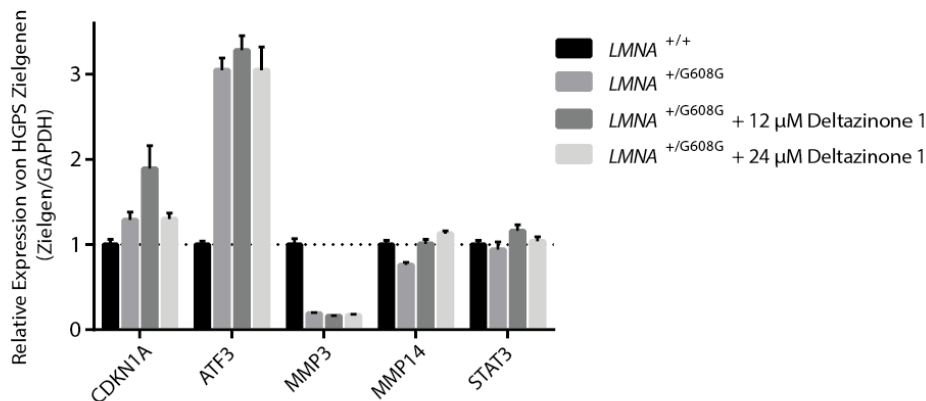
**Abbildung 1.26** Das Blockieren von PDE6Ds Prenylbindetasche führt nicht zu einer veränderten Lokalisation von GFP-Progerin. HeLa-Zellen wurden mit farnesyliertem GFP-Progerin (CSIM), geranylgeranyliertem GFP-Progerin (CSIL) oder nicht farnesyliertem GFP-Progerin (SSIM) transfiziert und für 48 h mit einem Farnesyltransferaseinhibitor (FTI277), Deltarasin oder Deltazinone 1 behandelt. Anschließend erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen. Maßstabsbalken = 10 µm.

Die Behandlung der GFP-Progerin CSIM exprimierenden Zellen mit Deltarasin und Deltazinone 1 zeigte jedoch keinen Unterschied in der Lokalisation des GFP-markierten Proteins.

Die veränderte Kernlamina Architektur, hervorgerufen durch Expression von Progerin, hat neben morphologischen Auswirkungen weitere Konsequenzen für die Zellhomöostase. Während Proteine der Kernlamina in gesunden Zellen diverse Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren eingehen und für die Organisation des Chromatins und der Kernporen verantwortlich sind, kann diese Aufgabe in Progerin-exprimierenden Zellen nicht ausgeführt werden. Kernlamina-assoziierte Proteine wie Nesprin, Emerin und LAP2 (lamin associated protein 2) sind fehllokalisiert und die Kernporenkomplexe finden sich delokalisiert in Ansammlungen an der Kernmembran wieder. Peripheres Heterochromatin, das in gesunden Zellen mit der Kernmembran assoziiert ist, löst sich in Progerin-exprimierenden Zellen von der Kernmembran und wichtige Interaktionen mit der RNA-Polymerase II, RNA-Spleißfaktoren und Transkriptionsfaktoren sind gestört. Dies führt zu Fehlregulierungen in der

Expression von diversen Genen (McCord et al., 2013). Insgesamt konnten 361 Gene in HGPS-Zellen identifiziert werden, die signifikante Unterschiede in ihrer Expression im Vergleich zu gesunden Zellen zeigten. Unter anderem sind dies Gene, die für Transkriptionsfaktoren und Proteine der extrazellulären Matrix kodieren (Csoka et al., 2004). In HGPS-Zellen konnte durch Verwendung von Morpholinos, die komplementär zu der aberranten Spleißstelle auf Exon 11 des mutierten LMNA-Gens erstellt wurden, der Spleißvorgang der mutierten LMNA-prä-mRNA verhindert werden, um somit die Expression von Progerin zu unterbinden. Das Morpholino-Oligonukleotid bindet dabei an die LMNA-prä-mRNA an der Stelle, an der sich die mutierte Spleißstelle befindet und schirmt diese sterisch vor dem Spleißosom ab. Die anschließende Analyse der Expression ausgewählter veränderter Gene in HGPS-Zellen zeigte eine Rückkehr zu den Expressionsmustern von gesunden Zellen (Scaffidi and Misteli, 2005).

Um die Auswirkungen von Deltazinone 1 auf die Expressionslevel von bestimmten Genen zu untersuchen, die in HGPS-Zellen dereguliert sind, wurden HGPS-Patientenzellen mit verschiedenen Substanzkonzentrationen für 96 h behandelt und anschließend fünf Zielgene mittels qPCR untersucht (Abbildung 1.27).



**Abbildung 1.27** Deltazinone 1 hat keinen Einfluss auf die Expression von ausgewählten Progerin-abhängigen Genen. HGPS-Patientenzellen (*LMNA*<sup>+/G608G</sup>) und Zellen eines gesunden Elternteils (*LMNA*<sup>+/+</sup>) wurden für 96 h mit Deltazinone 1 behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der Expressionslevel mittels qPCR. Die erhaltenen Werte wurden auf die Expressionslevel des gesunden Elternteils (*LMNA*<sup>+/+</sup>) normalisiert. Der Versuch wurde mit sechs biologischen Replikaten jeweils im technischen Triplikat durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse mit Standardabweichung.

Bei Vergleich der Expressionslevel zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen gesunden Zellen und HGPS-Patientenzellen. Die Expression von CDKN1A ist in HGPS-Zellen um ca. 30% erhöht und für den Transkriptionsfaktor ATF3 sogar um ca. 300%. Die Matrix Metalloproteinase 3 (MMP3) zeigt im Vergleich zu gesunden Zellen nur noch eine Expression von ungefähr 20%. Die Level für die Matrix-Metalloproteinase 14 (MMP14)

liegen bei ungefähr 75% der von gesunden Zellen. Der Transkriptionsfaktor STAT3 wurde als Kontrolle mituntersucht und zeigt, wie erwartet, nur geringe Veränderungen zwischen HGPS-Zellen und gesunden Zellen. Die Behandlung der Patientenzellen mit Deltazinone 1 zeigt für CDKN1A, ATF3 und MMP3 keinen Einfluss auf die Expressionslevel. Einzig für MMP14 kann ein geringer positiver Effekt durch Behandlung der Zellen mit Deltazinone 1 beobachtet werden. Hier sorgt die Substanzbehandlung für einen Anstieg der Expressionslevel der Protease von ca. 75% in  $LMNA^{+/G608G}$ -Zellen auf die MMP14-Proteinlevel von gesunden Zellen ( $LMNA^{+/+}$ ).



## 1.6 Diskussion

### 1.6.1 Identifikation von PDE6D-Interaktionspartnern mittels GST-Pulldown

Ursprünglich wurde PDE6D als vierte Untereinheit der cGMP-Phosphodiesterase (PDE) in Retinazellen beschrieben. Durch Solubilisierung der PDE kann PDE6D die Phototransduktion desensibilisieren (Florio et al., 1996). In Folgestudien wurde PDE6D aufgrund der Fähigkeit prenylierte Proteine zu solubilisieren und der strukturellen Ähnlichkeit zu RhoGDI als GSF (*GDI like solubilising factor*) beschrieben. PDE6D besitzt eine hydrophobe Bindetasche, über die farnesylierte und geranylgeranylierte Proteine gebunden werden können. Über die hydrophobe Bindetasche interagiert PDE6D prenylabhängig mit diversen kleinen GTPasen der Ras-, Rho- und Rab-Familie sowie mit Proteinen, die in Phototransduktionsprozesse involviert sind. Im Unterschied zu RhoGDI und RabGDI bindet PDE6D prenylierte Proteine unabhängig von deren Nukleotidladungsstatus. Die Interaktion zwischen PDE6D und den zugehörigen GDFs (*GDI displacement factors*), ARL2 und ARL3, erfolgt über eine separate Bindestelle, die räumlich unabhängig von der Bindestelle für prenylierte Proteine ist. Die Bindung der GTP-beladenen GDFs an PDE6D sorgt für eine Konformationsänderung, die eine Schließung der hydrophoben Bindetasche PDE6Ds verursacht und somit für die Dissoziation von gebundenem prenyliertem Protein sorgt (Linari et al., 1999a; Ismail et al., 2011). Innerhalb der Zelle wurde PDE6Ds Einfluss auf die Lokalisation von KRAS und INPP5E beschrieben. KRAS wird durch Zyklen der Solubilisierung durch PDE6D, die anschließende Entladung durch GTP-ARL2 an perinukleären Membranen und durch unidirektionalen Vesikeltransport an der Plasmamembran gehalten. Dabei hilft PDE6D der entropischen Tendenz entgegenzuwirken, lipidisiertes Ras-Protein über alle Membranen hinweg zu verteilen (Schmick et al., 2014). Die ciliäre Lokalisation von INPP5E erfolgt ebenfalls unter Einwirkung von PDE6D. Die hochaffine Interaktion zwischen PDE6D und farnesyliertem INPP5E kann durch im Cilium lokalisiertes GTP-ARL3 gelöst werden, was zur Entladung von INPP5E führt (Humbert et al., 2012; Miertzschke et al., 2014; Fansa et al., 2016). Die Bindung der prenylierten Proteine an PDE6D erfolgt dabei fast ausschließlich über die Lipidmodifikation ohne weitere Hauptketteninteraktionen, wie sie von Rho-Protein–RhoGDI-Interaktionen bekannt sind. Daraus folgt eine breite Spezifität PDE6Ds gegenüber potentiellen Bindungspartnern, deren Affinität zumeist nur von der Komposition der letzten 10 Aminosäuren abhängig ist (Fansa et al., 2015; Lee and Seo, 2015). Aufgrund des Ungleichgewichts zwischen prenylierten Proteinen (> 200 Proteine) und bisher identifizierten PDE6D-Interaktionspartnern (ca. 26), sollte innerhalb dieser Arbeit ein affinitätschromatographischer Ansatz zur Identifikation neuer PDE6D-Interaktionspartner

entwickelt werden. Weiterhin sollten die Auswirkungen einer Inhibition der PPI zwischen PDE6D und identifizierten Bindern durch Verwendung von niedermolekularen Verbindungen untersucht werden, die PDE6Ds hydrophobe Bindetasche mit hoher Affinität adressieren (Zimmermann et al., 2013a; Zimmermann et al., 2014).

Mithilfe des (innerhalb dieser Arbeit) entwickelten GST-Pulldowns und anschließender massenspektrometrischer Analyse konnten insgesamt 25 Proteine identifiziert werden, von denen 6 farnesyliert, 11 geranylgeranyliert und 8 nicht prenyliert sind. Die Liste enthält diverse kleine GTPasen, Komponenten von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Proteine der Lamin-Familie sowie die beiden GDFs ARL2 und ARL3. Einige der gefundenen Proteine wurden bereits mit PDE6D in Zusammenhang gebracht. RAB13 kann beispielsweise durch PDE6D von zellulären Membranen gelöst werden (Marzesco et al., 1998). Auffallend ist, dass nur einfach prenylierte Proteine Bindung an PDE6D zeigen. Proteine der Rab-Familie, die häufig an mehreren C-terminalen Cysteinen geranylgeranyliert werden, zeigen keine Bindung an PDE6D, während monoprenylierte Vertreter der Rab-Familie Bindung zeigten. Gleiches gilt für die nicht an PDE6D bindenden Ral-Proteine RALA (*Ras-related protein Ral-A*) und RALB (*Ras-related protein Ral-B*), die ein C-terminales CCaX Motiv tragen, welches über einen zum klassischen Prenylierungsweg alternativen Mechanismus prenyliert und palmitoyliert wird (Nishimura and Linder, 2013). Dies steht in Einklang mit den aus der Literatur bekannten PDE6D-Bindungspartnern, die alle nur eine einfache Prenylmodifikation besitzen (Zhang et al., 2012). Alle der insgesamt 14 identifizierten prenylierten Proteine besitzen nur eine Prenylmodifikation, was ein Hinweis darauf sein kann, dass PDE6D generell bevorzugt an einfach prenylierte Proteine bindet. Weiterhin fällt auf, dass trotz eines eigenen Chaperonsystems diverse Vertreter der Rab- und Rho-Familie identifiziert werden konnten. Neben ARL2 und ARL3 konnten weitere Proteine identifiziert werden, die nicht prenyliert sind und demnach mit PDE6D vermutlich über eine andere Bindungsstelle wechselwirken könnten. Interessant ist hierbei die Identifikation der Arf-ähnlichen GTPase ARL1, die sich strukturell nur gering von ARL2/3 unterscheidet. Die switch II Region von ARL1 besitzt im Gegensatz zu ARL2/3 eine kleine hydrophobe Tasche, die an der Bindung von GRIP (*golgin-97*, *RanBP2alpha*, *Imh1p* and *p230/golgin-245*) Domänen beteiligt ist. ARL1 bindet GTP-abhängig an Proteine mit der ca. 50 Aminosäure langen GRIP-Domäne und ist für deren korrekte Lokalisation an den Golgi-Apparat verantwortlich (Panic et al., 2003). Im Gegensatz zu ARL2/3 besitzt ARL1 eine funktionsfähige N-terminale Konsensussequenz für die N-Myristoylierung. Bei Mutation des Myristoylierungssignals kann

ARL1 nicht mehr korrekt an den Golgi-Apparat lokalisieren (Lee et al., 1997; Lu and Hong, 2003). Aufgrund der ähnlichen Struktur von ARL1/2/3 ist die Identifikation von ARL1 als Wechselwirkungspartner von PDE6D nicht überraschend. Hinzu kommt, dass bereits vorangegangene Hefe-2-Hybrid-Studien die Bindung von GTP-beladenem ARL1 an PDE6D und UNC119 gezeigt haben (van Valkenburgh et al., 2001). In diesem Zusammenhang wären Versuche zur Fähigkeit der Verdrängung von prenylierten Proteinen aus PDE6Ds hydrophober Bindetasche durch GTP-ARL1 interessant.

Eines der neu identifizierten, prenylierten Proteine, die PDE6D binden, ist die kleine GTPase CDC42 (*Cell division control protein 42 homolog*). CDC42 ist involviert in die Generierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität in eukaryotischen Zellen. Der Austausch von GDP zu GTP durch einen GEF ermöglicht die Interaktion von CDC42 mit diversen Effektoren, was wiederum verschiedene Folgeeffekte nach sich zieht, wie beispielsweise die Neuordnung des Aktin-Netzwerks oder eine Induktion der Transkription durch Aktivierung von Proteinkinasen (Johnson, 1999). Wie bereits beschrieben, wird die Aktivität CDC42s dabei durch Nukleotidbindung sowie durch Bindung von RhoGDI beeinflusst (siehe 1.3.3). CDC42 besitzt neben der Geranylgeranylgruppe eine Polylysin-Domäne in der Nähe des C-Terminus, die ähnlich wie im Falle von KRAS4B, die Assoziation mit Membranen, die negativ geladene Phospholipide enthalten, erhöhen. Ob die hier gemessene Interaktion zwischen PDE6D und CDC42 physiologisch relevant ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Untersuchungen zur Lokalisation in fixierten Zellen nach Substanzbehandlung zeigten keine klaren Unterschiede in der Lokalisation des Proteins. Dies könnte durch eine etwaige Redundanz der Transportsysteme erklärt werden. CDC42 besitzt mit RhoGDI ein eigenes Transportsystem, welches zudem dessen Aktivität kontrolliert.

Als weiterer neuer Interaktionspartner von PDE6D wurde die Phosphodiesterase CNP (*2,3-cyclic-nucleotide 3-phosphodiesterase*) identifiziert. CNP wird hauptsächlich im Gehirn und im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert, wo es für die Myelinisierung von Oligodendrozyten verantwortlich ist (Raasakka and Kursula, 2014). CNP bindet an Tubulin Heterodimere, kopolymerisiert mit ihnen und fördert somit das Wachstum zellulärer Fortsätze, die die Myelinschicht bilden (Lee et al., 2005b). Neben der C-terminalen CaaX-Box, deren Cystein farnesyliert wird und für die Membranassoziation von CNP verantwortlich ist, besitzt CNP C-terminal eine katalytische Domäne mit Phosphodiesterase Aktivität, die bevorzugt in Oligodendrozyten 2',3'-cAMP zu 2'-AMP umsetzt (Verrier et al., 2013). Eine mögliche Funktion für CNP ausserhalb des ZNS könnte die Befähigung zur

schnellen morphologischen Veränderung von Membranen in bestimmten Zelltypen sein (Vogel and Thompson, 1988). Neben erhöhter CNP-Aktivität in myelinhaltigen Retinageweben, konnte eine fünffach erhöhte Aktivität in den äußeren Segmenten von Stäbchenzellen gemessen werden (Giulian and Moore, 1980). Die genaue Funktion CNPs in Photorezeptorzellen ist nicht endgültig geklärt; es wird vermutet, dass CNP auch in Retinazellen an der Reorganisation von Membranen oder aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität an der Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten durch die Photorezeptoren beteiligt sein könnte (Vogel and Thompson, 1988).

Auch die Identifikation von CNP als neuem Interaktionspartner von PDE6D scheint wenig zu überraschen. PDE6D besitzt die höchste Expressionsrate in der Retina und ist dort für die korrekte Lokalisation der PDE6 (*cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase*) verantwortlich, die ebenfalls eine Phosphodiesterase ist, jedoch statt 2',3'-cAMP als Substrat 3',5'-cGMP verwendet. In Mausmodellen konnte durch Knockout von PDE6D unter anderem eine gestörte Lokalisation der PDE6 und eine Degeneration der Retina gezeigt werden (Zhang et al., 2007). Hier könnten Untersuchungen zur Lokalisation und Aktivität CNPs in PDE6D defizienten Retinazellen Aufschluss über einen eventuellen Zusammenhang zwischen Retinadegradation und gestörter CNP-PDE6D Interaktion geben.

Der dritte neu identifizierte Wechselwirkungspartner von PDE6D ist die kleine GTPase RAB23 (*Ras-related protein Rab-23*). Zur Familie der Rab-GTPasen gehörend, ist auch RAB23 in den Vesikeltransport zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten involviert. Anders als die meisten Rab-GTPasen besitzt RAB23 eine klassische CaaX-Box (für RAB23: CSIP), die sowohl durch die GGTase I als auch durch die GGTase II am Cystein mit einer Geranylgeranylgruppe modifiziert werden kann, bevor die weitere Prozessierung durch RCE1 und ICMT folgt. Im Falle von monoprenylierten Rab-Proteinen, wie sie hier als Binder von PDE6D identifiziert wurden, ist noch kein Mechanismus bekannt, der ihre Lokalisation an Zielmembranen steuert (Seabra and Wasmeier, 2004). RAB23 ist in der Literatur als negativer Regulator des Sonic-Hedgehog-Signalwegs (Shh) beschrieben, der stromabwärts des Shh-Liganden agiert (Eggenchwiler et al., 2001). RAB23-defiziente Mäuse zeigen während der Embryonalentwicklung Defekte im dorsalen Schließen des Neuralrohrs (*open brain mouse, opb*), ein Prozess der hauptsächlich durch den Shh-Signalweg gesteuert wird. Die Rolle von RAB23 wird in der Regulation des Vesikel-assoziierten Transports von Hedgehog-Signalweg-Komponenten vermutet (Eggenchwiler et al., 2006). In Säugern lokalisieren die Komponenten des Hh-Signalwegs in das primäre Cilium und Mutationen, die



die Integrität des Ciliums stören, haben Auswirkungen auf den Hh-Signalweg (Jiang and Hui, 2008).

RAB23 zusammen mit dem ebenfalls als PDE6D-Interaktor identifizierten RAB8 sind als essentiell für die Ciliogenese beschrieben (Yoshimura et al., 2007). Die Identifikation von Proteinen, die eine Funktion im Hedgehog-Signalweg beziehungsweise der Ciliogenese haben, könnte ein Hinweis auf eine Funktion von PDE6D im Transport von Hedgehog-Signalwegkomponenten sein. Dieser Verdacht wird zum einen durch bereits publizierte Ergebnisse über den Transport der Phosphatase INPP5E durch PDE6D verstärkt (Thomas et al., 2013). INPP5E reguliert über ihre Phosphataseaktivität die Level an Phosphoinositolphosphaten innerhalb des primären Ciliums und somit indirekt die Aktivität des Hedgehog-Signalwegs (Chávez et al., 2015). Zum anderen zeigen die hier untersuchten Inhibitoren der prenylabhängigen Wechselwirkungen von PDE6D eine Inhibition des Hedgehog-Signalwegs (Zimmermann, 2015). Dies macht eine Funktion PDE6Ds im Transport der hier beschriebenen Proteine in das primäre Cilium denkbar.

### 1.6.2 Identifikation von PDE6D-Interaktionspartnern mittels

#### Immunpräzipitation

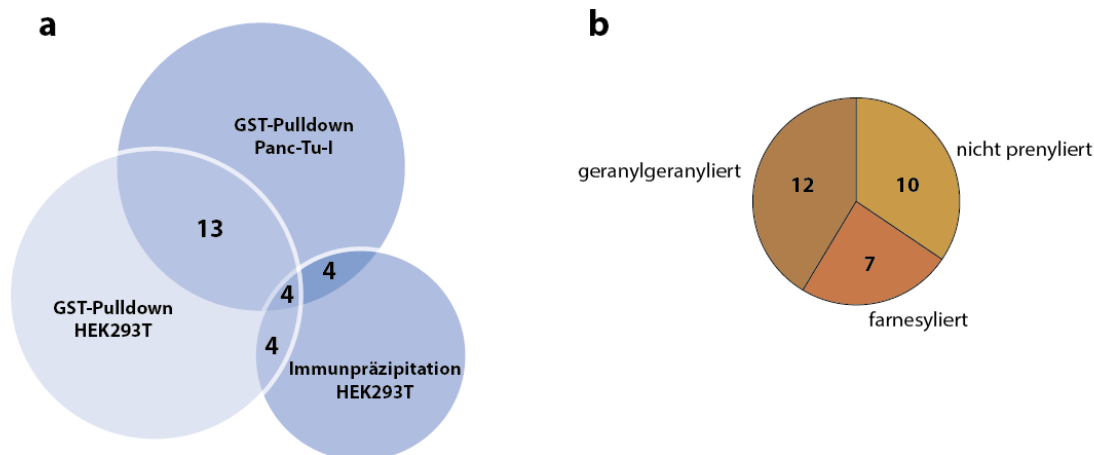
Als zweite Methode zur Identifikation von PDE6D-Interaktionspartnern wurde die Immunpräzipitation von FLAG-PDE6D aus HEK293T-Lysat gewählt. Hierfür wurden die Zellen mit FLAG-PDE6D transfiziert, anschließend lysiert und mittels Antikörpern gegen die FLAG-Markierung, die auf Agarosebeads immobilisiert wurden, immunpräzipitiert. Dieser Ansatz entsprach in weiten Teilen zwei zuvor veröffentlichten Studien, die ebenfalls HEK293T-Zellen verwendeten, statt der FLAG-Markierung jedoch eine TAP-Strategie (*Tandem Affinity Purification*) zur affinitätschromatographischen Reinigung gebundener Proteine wählten (Humbert et al., 2012; Thomas et al., 2013).

Insgesamt konnten die Peptide von 8 Proteinen identifiziert werden, die in der mit FLAG-PDE6D transfizierten Probe signifikant höher angereichert waren, als in den Proben aus untransfizierten Zellen. Von den 8 identifizierten Proteinen sind 3 farnesyliert (INPP5E, LMNB2, RAB28), 4 nicht prenyliert (ARL2, ARL3, FAM219A, TBC1D10A) und ein Protein geranylgeranyliert (RPGR). Auch in der Immunpräzipitation konnten die beiden GDFs ARL2 und ARL3 identifiziert werden sowie das nukleäre Lamin LMNB2. Zusätzlich konnte der bereits beschriebene Interaktor RPGR, der PDE6D sowohl über die C-terminale Farnesylgruppe als auch über seinen N-Terminus bindet, identifiziert werden. Ebenfalls als Interaktor nachweisbar war die hoch affin an PDE6D bindende Phosphatase INPP5E ( $K_d = 3,7 \text{ nM}$ ).

Die insgesamt relativ kurze Liste mit gefundenen PDE6D-interagierenden Proteinen ist dabei fast identisch mit den bereits publizierten Daten anderer Gruppen mit ähnlichem massenspektrometrischem Ansatz (Humbert et al., 2012; Thomas et al., 2013). Auffallend ist der große Unterschied in den identifizierten PDE6D-Interaktionspartnern zwischen den beiden unterschiedlichen verwendeten Methoden. Zum einen wurden im GST-Pulldown Ansatz ca. dreimal so viele Proteine wie im Vergleich mit der Immunpräzipitation detektiert und zum anderen gibt es beinahe keine Übereinstimmungen in den identifizierten Proteinen. Lediglich vier Proteine (ARL2, ARL3, LMNB2, RAB28) konnten in beiden Ansätzen nachgewiesen werden. Die wahrscheinlichsten Ursachen hierfür könnten die unterschiedlichen verwendeten Zelllinien für den GST-Pulldown Panc-Tu-I und für die Immunpräzipitation HEK293T sein. Ein anderer möglicher Faktor ist die Verwendung unterschiedlicher Pufferbedingungen für die Zellyse und die anschließende affinitätschromatographische Aufreinigung. Um eine etwaige Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien auf die unterschiedlichen Resultate der gefundenen Proteine auszuschließen, wurde als Kontrollversuch der GST-Pulldown mit HEK293T-Zellysat und dem auf CHAPS-basierenden Puffer des Pulldowns wiederholt. Die nach massenspektrometrischer Analyse erhaltene Liste gereinigter Proteine gleicht dabei zu großen Teilen der mit Panc-Tu-I-Zellen erhaltenen Liste. Immunpräzipitation und GST-Pulldown aus HEK293T-Zellen zeigen Übereinstimmung in den gleichen vier Proteinen (ARL2, ARL3, LMNB2, RAB28) die auch im GST-Pulldown aus Panc-Tu-I-Zellen und in der Immunpräzipitation aus HEK293T-Zellen nachweisbar waren. Der GST-Pulldown aus Panc-Tu-I- und HEK293T-Zellen zeigt dagegen eine Übereinstimmung in 13 Proteinen (Abbildung 1.28a). Diese Ergebnisse schließen die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien als Ursache für die sich stark unterscheidenden Proteinlisten der beiden Interaktionsstudien nicht aus, machen aber eine größere Auswirkung der Pufferbedingungen wahrscheinlicher. Für den GST-Pulldown wurde ein auf dem Detergenz-CHAPS basierender Puffer gewählt, da in vorangegangenen biophysikalischen Studien ein Einfluss von Polyether-basierenden Detergenzien (Triton X-100, Tween 20) auf die Interaktion zwischen einem KRAS4B-Peptid und PDE6D beobachtet werden konnte. Die Verwendung der langkettigen aliphatischen Detergenzien zeigte eine verringerte Bindungsaffinität für PDE6D, vermutlich durch Bindung in die hydrophobe Bindetasche PDE6Ds (Zimmermann, 2015). Weitere Faktoren spielen bei der wesentlich höheren Anzahl an identifizierten Bindungspartnern im GST-Pulldown eine Rolle, wie beispielsweise der hohe Überschuss an GST-PDE6D im Zellysat. Im Versuch wurden 50 µg des rekombinanten Proteins eingesetzt; im Gegensatz dazu steht die Überexpression von FLAG-PDE6D in

HEK293T-Zellen, die selbst unter Kontrolle des starken CMV-Promotors nicht annähernd die Konzentrationen des heterolog in Bakterien exprimierten GST-PDE6Ds im Zelllysate erreicht (Xia et al., 2006). Die Solubilisierung von Proteinen in wässrigen Puffersystemen ist stark abhängig vom eingesetzten Detergenz. In dem durchgeführten GST-Pulldown wurde zwitterionisches CHAPS und in der Immunpräzipitation nicht-ionisches NP-40 als Detergenz verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Solubilisierungseigenschaften befinden sich folglich unterschiedliche Proteine in Lösung, die an PDE6D binden können.

Um die Fähigkeit der Verdrängung der identifizierten PDE6D-Binder durch Blockierung PDE6Ds hydrophober Bindetasche zu untersuchen, wurden in initialen Experimenten sowohl der GST-Pulldown als auch die Immunpräzipitation in Anwesenheit des kleinen Moleküls Deltarasin durchgeführt. Für Deltarasin konnte sowohl die Bindung in die Prenylbindetasche PDE6Ds mit hoher Affinität ( $K_{d \text{ App}} = 38 \pm 16 \text{ nM}$ ) gezeigt werden als auch die Fähigkeit die niedrig affinen PDE6D-Binder RHEB und RAS aus PDE6Ds hydrophober Bindetasche zu verdrängen (Zimmermann et al., 2013a; Zimmermann et al., 2014). Die Zugabe eines hohen Überschusses an Deltarasin (50  $\mu\text{M}$ ) in das Zelllysate während der Inkubation mit GST-PDE6D zeigte nach der anschließenden massenspektrometrischen Auswertung, dass alle interagierenden Proteine bis auf ARL3 verdrängt werden konnten. In der Immunpräzipitation konnten lediglich 3 der 8 identifizierten Proteine durch Deltarasin verdrängt werden. Eines der nicht verdrängbaren Proteine ist auch hier ARL3, was die Beobachtungen aus dem GST-Pulldown bestätigt.



**c**

Proteinname	Genname	Modifikation	Panc-Tu-I		HEK293T	
			GST-PDE6D	FLAG-PDE6D	GST-PDE6D	
ADP-ribosylation factor-like protein 1	ARL1	--	■			
ADP-ribosylation factor-like protein 2	ARL2	--	■			
ADP-ribosylation factor-like protein 3	ARL3	--	■			
Cell division control protein 42 homolog	CDC42	gg	■			
2,3-cyclic-nucleotide 3-phosphodiesterase	CNP	f	■			
Protein FAM219A	FAM219A	--		■		
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	GNB1	--	■			
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	GNB2	--				■
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	GNG12	gg	■			
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	GNG5	gg	■			■
72 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase	INPP5E	f		■		
Importin subunit alpha-1	KPNA1	--	■			
Importin subunit alpha-7;Importin subunit alpha	KPNA6	--	■			
Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA	f				■
Lamin-B1	LMNB1	f				■
Lamin-B2	LMNB2	f		■		
Ras-related protein Rab-13	RAB13	f				■
Ras-related protein Rab-23	RAB23	gg	■			
Ras-related protein Rab-28	RAB28	f	■			
Ras-related protein Rab-8A	RAB8A	gg	■			
Ras-related C3 botulinum to+in substrate 2	RAC2	gg	■			
Ras-related protein Rap-1A	RAP1A	gg				■
Ras-related protein Rap-1b;Ras-related protein Rap-1b-like protein	RAP1B	gg				■
Transforming protein RhoA	RHOA;RHOC	gg	■			
Rho-related GTP-binding protein RhoF	RHOF	gg	■			
Rho-related GTP-binding protein RhoG	RHOG	gg				■
X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator	RPGR	gg		■		
TBC1 domain family member 10A	TBC1D10A	--				■

**Abbildung 1.28** Kombinierte Liste der identifizierten PDE6D-Interaktionspartner. a) Überschneidungen in der Proteinidentifikation mit unterschiedlichen Ansätzen. Die beiden Hauptstrategien GST-Pulldown aus Panc-Tu-I-Lysat und Immunpräzipitation aus HEK293T-Lysat sind dunkelblau dargestellt, die Kontrollreaktion zur Abhängigkeit der identifizierten Proteine von der verwendeten Zelllinie hellblau. b) Insgesamt konnten durch Kombination beider affinitätschromatographischer Strategien 29 Proteine, die an PDE6D binden, identifiziert werden, von denen 12 geranylgeranyliert, 7 farnesyliert und 10 nicht prenyliert sind. c) Tabelle mit den Ergebnissen beider affinitätschromatographischer Ansätze zur Identifikation von PDE6D-Interaktionspartnern und dem Kontrollexperiment, bei dem GST-PDE6D mit HEK293T-Lysat inkubiert wurde. Die Spalten GST-PDE6D und FLAG-PDE6D zeigen, ob das jeweilige Protein mithilfe des Pulldowns oder der Immunpräzipitation nachgewiesen werden konnte (grüne Markierung). Die drei neuen Binder, deren Interaktion mit PDE6D innerhalb dieser Arbeit weiter untersucht wurde, sind orange hervorgehoben.

Zur Entladung prenylierter Proteine von PDE6D bildet sich ein kurzlebiger ternärer Komplex, aus PDE6D-ARL-Cargoprotein, der schnell zu PDE6D-ARL und Cargoprotein zerfällt. ARL2

ist aufgrund seiner geringeren Affinität gegenüber PDE6D in der Lage, niedrig affine Binder (z.B. Ras-Proteine) aus PDE6Ds hydrophober Tasche zu verdrängen; ARL3, das eine wesentlich höhere Affinität für PDE6D besitzt, kann auch hoch affine Binder, wie INPP5E verdrängen (Thomas et al., 2013; Zimmermann, 2015). Aufgrund des Prinzips der mikroskopischen Reversibilität besteht die Annahme, dass die Bindung hoch affiner Cargoproteine in PDE6Ds Prenylbindetasche, die allosterischen GDFs ARL2/3 von PDE6D verdrängen können. Für Fluorophor-markiertes Deltarasin konnte bereits die Verdrängung von PDE6D durch ARL2 und ARL3 gezeigt werden. Weitere höher affine Derivate Deltarasins konnten jedoch nur durch die Bindung von ARL3 an PDE6D verdrängt werden (Zimmermann, 2015). Dementsprechend könnte in den hier durchgeführten Versuchen, trotz eines hohen Überschusses an Deltarasin, die Dissoziation des PDE6D–ARL3-Komplexes aufgrund dessen hoher Affinität nicht erreicht worden sein. Die beiden Proteine INPP5E und RPGR ließen sich durch Zugabe von Deltarasin ebenfalls nicht verdrängen, was sich im Falle von INPP5E durch dessen sehr hohe Affinität gegenüber PDE6D erklären lässt. RPGR bindet PDE6D über eine C-terminale Geranylgeranylgruppe und zusätzlich über die RCC-ähnliche Domäne. Bei Inhibition der Interaktion der C-terminalen Geranylgeranylgruppe und PDE6Ds hydrophober Bindetasche besteht die Möglichkeit der Bindung über Hauptketteninteraktionen mit einer  $K_d = 500$  nM (Watzlich et al., 2013). Interessanterweise hat die Zugabe von Deltarasin unterschiedliche Auswirkungen auf die Bindung von RAB28 durch PDE6D. Im Pulldown-Ansatz kann RAB28 durch Deltarasin-Zugabe verdrängt werden, in der Immunpräzipitation hingegen nicht.

Diverse bekannte PDE6D-Interaktoren, wie beispielsweise Proteine der Ras-Familie (KRAS, NRAS, RHEB), konnten nicht mit statistisch ausreichender Signifikanz identifiziert werden. Auch hierfür kann es verschiedene Gründe geben, von der Löslichkeit in den verwendeten Puffern bis hin zu Verdrängungseffekten durch die im Zelllysats enthaltenen GDFs ARL2/3, die die Fraktion an prenylierten PDE6D-Bindern niedrig halten. Um Verdrängungseffekte durch GDFs und die Dissoziation von transienten Interaktionen zwischen PDE6D und Cargoproteinen während der affinitätschromatographischen Reinigung zu minimieren, wurden beide experimentellen Ansätze erneut unter Zugabe eines kovalenten Kreuzkupplers durchgeführt. Dieser sollte im Pulldown-Ansatz nach Inkubation des Zelllysats mit GST-PDE6D die ausgebildeten Proteinkomplexe kovalent fixieren und somit die Dissoziation unterbinden. Im Immunpräzipitationsansatz sollte die Inkubation der transfizierten lebenden Zellen mit einem membrangängigen Kreuzkuppler PDE6D-Liganden-Komplexe innerhalb der Zelle fixieren, um somit neben transienten Interaktionen auch Rückschlüsse auf endogene

zelluläre Interaktionen zu ziehen. In beiden Fällen führte die massenspektrometrische Auswertung der an PDE6D gebundenen Proteine allerdings zu langen Proteinlisten, die eine sehr geringe Reproduzierbarkeit zeigten. Die nicht vorhandene Spezifität der verwendeten Kreuzkupplungsreagenzien führte hier zu vielen unspezifischen kovalenten Verknüpfungen, die eine statistisch korrekte Auswertung der Daten nicht zuließen.

Insgesamt konnte innerhalb dieser Arbeit die Bindung von 29 Proteinen mit zwei unterschiedlichen affinitätschromatographischen Ansätzen an PDE6D detektiert werden (Abbildung 1.28b). Die komplette Liste der identifizierten Proteine ist in Abbildung 1.28c aufgeführt.

### 1.6.3 Validierung identifizierter PDE6D-Interaktionspartnern

Im Anschluss an die affinitätschromatographische Reinigung und massenspektrometrische Analyse der präzipitierten PDE6D-Proteinkomplexe wurde die Bindung von ausgewählten Proteinen an PDE6D erneut untersucht und mittels Immunblot nachgewiesen. Neben dem immunologischen Nachweis der Bindung an PDE6D sollte auch die konzentrationsabhängige Verdrängung von Cargoproteinen durch Deltarasin sowie ähnlich affinen Derivaten untersucht werden.

RAB8, Lamin A, Lamin C, HRAS und KRAS konnten nach GST-Pulldown mittels spezifischer Antikörperbindung im Immunblot als Bindungspartner von PDE6D validiert werden. Der verwendete Antikörper gegen die Produkte des *LMNA*-Gens erkennt beide Produkte des alternativen Spleißvorgangs, das ca. 74 kDa große Lamin A und das 65 kDa große Lamin C. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen konnte keine weitere Bande für das unprozessierte Prelamin A beobachtet werden. Da Lamin C und vollständig prozessiertes Lamin A keine Prenylgruppe besitzen, scheint eine indirekte Interaktion mit PDE6D durch Kopräzipitation von Lamin A/C mit farnesyliertem Lamin B1/B2 am wahrscheinlichsten. In Anwesenheit von Deltarasin oder Derivaten zeigen Lamin A/C eine konzentrationsabhängig verringerte Bindung an PDE6D, was zumindest eine Hauptketteninteraktion zwischen den beiden Proteinen an einer anderen Bindestelle als der allosterischen ARL2/3 Bindestelle unwahrscheinlich macht. Vermutlicher ist, wie bereits erwähnt, die Beeinträchtigung der PDE6D–Lamin B1/B2-Interaktion durch Zugabe der niedermolekularen Verbindungen. Die Lamine (A, C, B1 und B2) bauen zusammen die Kernlamina auf. Dabei bilden sich Fibrillen-artige Netzwerke bestehend aus den vier verschiedenen Laminen aus, deren starke Interaktion ursächlich für die Kopräzipitation von Lamin A/C durch Lamin B1/B2 ist. Bei Adressierung der hydrophoben Bindetasche von PDE6D mittels niedermolekularer Verbindungen, wird vermutlich die Interaktion zwischen

Lamin B1/B2 und PDE6D gestört und somit auch die indirekte Interaktion mit Lamin A/C. Sowohl für die Lamin-Proteine als auch für RAB8 und die untersuchten Ras-Proteine konnte die Verdrängung von PDE6D konzentrationsabhängig mit Deltarasin und Derivaten gezeigt werden.

#### 1.6.4 Untersuchungen zur Interaktion von PDE6D und CDC42, RAB23 und CNP

Die drei Proteine CDC42, RAB23 und CNP wurden aus den neu identifizierten Interaktionspartnern von PDE6D für eine detailliertere Charakterisierung ausgewählt. Die entsprechenden N-terminal GFP-markierten Proteine, wurden für Interaktionsstudien in HEK293T-Zellen zusammen mit FLAG-markiertem PDE6D ko-transfiziert. Dieser, vom ursprünglichen Pulldown abweichende Ansatz, sollte als orthogonale Methode die Ergebnisse der massenspektrometrischen Auswertung bestätigen. Darüber hinaus bietet die Expression der Fusionsproteine Vorteile in der Verfügbarkeit hochsensitiver Antikörper gegen die GFP-Markierung sowie die bessere Solubilisierung der Proteine in wässrigem Puffer und eine generell erhöhte Expression im Vergleich zu endogenen Proteinleveln. Die spezifische Bindung von RAB23, CDC42 und CNP an PDE6D konnte mit dieser Methodik bestätigt werden. Als Kontrollreaktion konnte keine Bindung von FLAG-PDE6D an GFP gezeigt werden. Für den Nachweis einer prenylabhängigen Bindung an PDE6D wurden die Immunpräzipitationen in Anwesenheit von Deltazinone 1 durchgeführt, einem Nachfolgemolekül Deltarasis mit anderer Grundstruktur, höherer Affinität für die hydrophobe Bindetasche von PDE6D und geringerer Toxizität in Zellkulturstudien (Papke et al., 2016). Im Gegensatz zu den neu identifizierten Bindern konnte die Phosphatase INPP5E nicht durch Deltazinone 1 verdrängt werden. Zum einen bestätigt dies die Ergebnisse aus den massenspektrometrischen Untersuchungen in Anwesenheit von Deltarasin, andererseits zeigt es, dass selbst das hochaffine Deltazinone 1 ( $K_d = 8 \pm 4$  nM; zum Vergleich Deltarasin  $K_d = 38 \pm 16$  nM) nicht in der Lage ist, INPP5E ( $K_d = 3,7 \pm 0,2$  nM) unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen effizient zu verdrängen. Dies sollte jedoch zunächst nur als initialer Hinweis zur Natur der PDE6D–INPP5E-Interaktion dienen. Aufgrund des Versuchsansatzes in Zelllysat mit nicht definierten Mengen an PDE6D und INPP5E ist die Ableitung einer generellen Aussage schwierig. Zudem ist die bekannte Bindungsaffinität zwischen PDE6D und INPP5E lediglich mit einem farnesylierten C-terminalen Octapeptid von INPP5E gemessen worden, was der tatsächlichen Affinität wahrscheinlich nahe kommt, aber durchaus eventuelle Hauptketteninteraktionen zwischen den beiden Proteinen vernachlässigt. Vorläufige Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit zum Einfluss von Deltarasin/Deltazinone 1 auf den PDE6D–INPP5E<sub>Octapeptid</sub>-Komplex in einem biochemischen

Ansatz mittels Fluoreszenzpolarisation zeigten die Verdrängung des Peptids durch beide Substanzen (Daten nicht gezeigt).

Nach Bestätigung einer prenylabhängigen Interaktion zwischen CDC42, RAB23 und CNP mit PDE6D erfolgte die Untersuchung einer physiologischen Auswirkung bei Störung der Interaktion in Zellen mittels Deltarasin/Deltazinone 1. In Mausmodellen mit deletiertem *PDE6D* konnte zuvor eine Beeinträchtigung des Transports der katalytischen PDE-Untereinheiten PDE $\alpha/\beta$  und der Rhodopsin-Kinase GRK1 in Stäbchenzellen der Retina beobachtet werden, was zu einer langsamen Zapfen-Stäbchen-Dystrophie führte. Fehllokalisiertes GRK1 wird dabei degradiert, was zu niedrigeren GRK1-Proteinmengen in der Retina von *PDE6D*<sup>-/-</sup> Mäusen führte (Zhang et al., 2007). Weitere Daten aus *in vitro* Systemen zeigten, dass PDE6D die Lokalisation verschiedener Ras-GTPasen beeinflusst. So konnten durch Überexpression von PDE6D in Humanzellen Ras-Proteine, die normalerweise an zelluläre Membranen (Endomembransystem, Plasmamembran) lokalisieren, in einem zytosolischen Pool detektiert werden (Nancy et al., 2002). Weiterhin konnte in HepG2-Zellen, die kein PDE6D exprimieren, eine Delokalisation von Ras-Proteinen beobachtet werden, die durch ektopische Expression von PDE6D aufgehoben werden konnte und eine Relokalisation der Ras-Proteine an die Plasmamembran verursachte. Passend hierzu zeigte der Knockdown PDE6Ds in MDCK-Zellen eine Delokalisation von HRAS von der Plasmamembran hin zu Endomembranen (Chandra et al., 2012). Auswirkungen auf die Lokalisation von PDE6D-Cargoproteinen konnte auch die Blockierung von PDE6Ds Prenylbindetasche zeigen. Die Behandlung von Zellen mit Deltarasin führte zur Relokalisation von mCitrine-KRAS von der Plasmamembran hin zu Endomembranen (Zimmermann et al., 2013a).

Innerhalb dieser Arbeit konnten in fixierten Zellen keine Auswirkungen auf die Lokalisation der neu identifizierten PDE6D-Interaktionspartner CDC42, RAB23 und CNP bei Behandlung mit Deltarasin/Deltazinone 1 ermittelt werden. Wie in Kapitel 1.5.4 und 1.3.3 beschrieben, besitzen Rho-Proteine ein eigenes Chaperonsystem, welches CDC42 durch Bindung an RhoGDI nicht nur an der Plasmamembran lokalisiert und eine solubilisierete zytosolische Fraktion aufrecht erhält, sondern gleichzeitig durch spezifische Bindung von GDP-beladenem CDC42 dessen Aktivität reguliert (Garcia-Mata et al., 2011). Die chemische Inhibition der Bindung von CDC42 an PDE6D könnte somit durch Funktion von RhoGDI keine unmittelbaren phänotypischen Auswirkungen auf die Lokalisation von CDC42 zeigen. Auch Rab-Proteine besitzen ihr eigenes Chaperonsystem, welches den Effekt einer Inhibition von PDE6D auf die Lokalisation von RAB23 abfangen könnte.



Die innerhalb dieser Arbeit identifizierten Rab-Proteine (RAB8, RAB13, RAB23, RAB28), die an PDE6D binden, sind im Unterschied zum Großteil der Rab-Proteine alle monoprenyliert. Monoprenylierte Rab-Proteine besitzen eine CaaX-Box und können von allen drei bekannten Prenyltransferasen (FTase, GGTaseI, GGTaseII) modifiziert werden, um anschließend im Gegensatz zu mehrfach prenylierten Rab-Proteinen von RCE1 und ICMT weiter prozessiert zu werden. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass es zwei verschiedene Wege für neu synthetisierte Rab-Proteine gibt an ihre Zielmembran zu gelangen. Während mehrfach prenylierte Rab-Proteine durch REP (*rab escort protein*) und RabGDI transportiert werden, wird für monoprenylierte Rab-Proteine ein indirekter Weg über die Assoziation mit dem ER vorgeschlagen. Die Prozessierung durch RCE1 und ICMT erfolgt am ER. Im Anschluss werden Rab-Proteine durch RabGDI aus der ER-Membran extrahiert und unabhängig vom sekretorischen Weg an ihre Zielmembran transportiert (Leung et al., 2007). Dieser alternative Transportweg für CaaX-Box Rab-Proteine konnte allerdings noch nicht experimentell bestätigt werden. Ebenso sind in der Literatur keine Transportmechanismen der hier identifizierten PDE6D-bindenden Rab-Proteine bekannt. Aufgrund der Fähigkeit monoprenylierte, carboxymethylierte Proteine zu binden, könnte PDE6D in den Transport monoprenylierter Rab-Proteine involviert sein.

Interessant ist, dass die hier identifizierten Rab-Proteine RAB8, RAB23 und RAB28 ins primäre Cilium lokalisieren oder in den Transport von ciliären Komponenten involviert sind. RAB8 ist essentiell für die Ciliogenese und den Ausbau der ciliären Membran (Nachury et al., 2007). RAB23 ist in den vesikulären Transport von Komponenten des Hedgehog-Signalwegs in das primäre Cilium eingebunden und RAB28 lokalisiert an den Basalkörper des primären Ciliums, wo es vermutlich ebenfalls für den Transport ciliärer Proteine verantwortlich ist. Zusätzlich wurden Mutationen in RAB28 als Ursache für eine Zapfen-Stäbchen-Dystrophie identifiziert, die ebenfalls in PDE6D<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden konnte (Roosing et al., 2013; Roosing et al., 2014). Die äußeren Segmente der Stäbchenzellen in der Retina stellen dabei lediglich eine spezialisierte Form des primären Ciliums dar (PSC, photoreceptor sensory cilium) (Liu et al., 2007). Obwohl die hier durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation von RAB23 keinen Einfluss durch Blockierung der Prenylbindetasche PDE6Ds zeigten, stellt das molekulare Chaperon, für das der Transport von Proteinen ins primäre Cilium bereits beschrieben wurde (INPP5E, RPGR), einen möglichen Kandidaten für den Transport von monoprenylierten Rab-Proteinen in oder an das primäre Cilium dar. Gleiches gilt auch für das dritte untersuchte Protein CNP. Außerhalb seiner prominenten Funktion im ZNS ist nur die Funktion als Regulator der Mikrotubuli-Polymerisation bekannt (Bifulco et al., 2002; Lappe-

Siefke et al., 2003; Lee et al., 2005b). In der Retina könnte CNP durch Interaktion mit Mikrotubuli an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt sein. Auch hier kann ein etwaiger Transport durch PDE6D nicht ausgeschlossen werden. Um den Einfluss PDE6Ds auf die Lokalisation und Aktivität der hier getesteten Proteine weiter zu untersuchen, könnten Lokalisationsstudien in cilierten Zellen bzw. Retinazellen (z.B. RPE1) durchgeführt werden.

### 1.6.5 Untersuchungen zur PDE6D-Progerin Interaktion

Nach Identifikation von Lamin A/C, Lamin B1 und Lamin B2 als Interaktionspartner von PDE6D stellte sich die Frage, ob PDE6D auch mit Progerin interagiert und wenn ja, ob eine Inhibition der Interaktion die Lokalisation von Progerin beeinflusst. Der durchgeführte Pulldown zeigte die Bindung von Progerin an PDE6D. Zusätzlich lässt sich die Interaktion durch Zugabe von Deltarasin und Deltazinone 1 stören. Diese Beobachtung ließ sich in einem halb endogenen Ansatz mit Zellysate von HGPS-Patientenzellen validieren. Die Fibroblasten stammen von Patienten mit der beschriebenen heterozygoten Punktmutation ( $LMNA^{+G608G}$ ), die als Folge neben funktionellem Lamin A/C auch Progerin exprimieren. Auch hier konnte eine Bindung von Progerin an PDE6D gezeigt werden, die sich mit Deltarasin/Deltazinone 1 kompetieren lässt. Der Einfluss der beiden getesteten Substanzen, die in die Prenylbindetasche von PDE6D binden, ist ein erster Hinweis auf eine prenylabhängige Interaktion zwischen PDE6D und Progerin, der durch die Kopräzipitation der Progerin-Prenylierungsmutanten bestätigt werden konnte. Wie erwartet zeigte die nicht farnesylierte Progerin-Mutante die geringste Interaktion mit PDE6D. Nach Quantifizierung ergibt sich eine Restbindung von ca. 10% im Vergleich mit farnesyliertem Progerin (100%). Dies bestätigt die Vermutung einer prenylabhängigen Interaktion PDE6Ds mit Progerin und spricht ebenfalls mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für eine direkte Interaktion der beiden Proteine. Die geringe Menge an gebundenem nicht farnesyliertem Progerin lässt sich durch die starke Interaktion der Lamina-Komponenten untereinander erklären. Ähnlich, wie im Pulldown aus Panc-Tu-I Zellen, wo eine Bindung von Lamin A/C, die beide nicht prenyliert sind, an PDE6D detektiert werden konnte und auf die Kopräzipitation mit den PDE6D-Interaktoren Lamin B1 und Lamin B2, zurückzuführen ist. Die geranylgeranylierte Mutante von Progerin, zeigte eine lediglich um ca. 40% verringerte Bindung an PDE6D im Vergleich zu farnesyliertem Progerin.

Um eine unspezifische Interaktion von PDE6D mit den Produkten des *LMNA*-Gens auszuschließen wurde die Interaktion zwischen endogenem PDE6D und Lamin A/C in HeLa-Zellen untersucht. Aufgrund der bisher vermuteten breiten Bindungsspezifität PDE6Ds

gegenüber Cargoproteinen sollte ausgeschlossen werden, dass die im Pulldown und der Immunpräzipitation detektierten Interaktionen nur im Zelllysate stattfinden, die Proteine in der Zelle jedoch nie in räumliche Nähe gelangen. Für diese Aufgabe wurde der PLA (*proximity ligation assay*) eingesetzt, eine immunzytochemische Methode, die PPI in fixierten Zellen nachweisen kann. Mithilfe dieser Methode konnten in HeLa-Zellen Interaktionen der untersuchten Proteine im Zellkern detektiert werden. Ähnlich wie im Pulldown ist auch in diesem Ansatz davon auszugehen, dass die Interaktion zwischen PDE6D und den beiden nicht prenylierten Laminen Lamin A/C über die Interaktion von PDE6D und Lamin B1/B2 vermittelt wird. Die Interaktion zwischen PDE6D und Progerin konnte anschließend ebenfalls in HeLa-Zellen mittels Überexpression bestätigt werden. Bei Überexpression von farnesyliertem Progerin (CSIM) zeigt sich eine hohe Anzahl an Interaktionen zwischen PDE6D und den *LMNA*-Genprodukten im Vergleich zu Zellen, die mit geranylgeranyliertem (CSIL) oder nicht farnesyliertem (SSIM) Progerin transfiziert wurden. In den Proben der beiden Prenylierungsmutanten CSIL und SSIM konnten insgesamt wesentlich weniger Interaktionen detektiert werden als in Zellen, die mit farnesyliertem Progerin CSIM transfiziert wurden. Dies bestätigt zum einen die Untersuchungen aus dem GST-Pulldown mit PDE6D und der Kopräzipitation der Progerin-Mutanten, zum anderen konnte in Zellen keine erhöhte Interaktion der geranylgeranylierten (CSIL) gegenüber der nicht farnesylierten Mutante (SSIM) detektiert werden, obwohl der Pulldown hier eine ca. 6-fache Bevorzugung des geranylgeranylierten Proteins gegenüber Progerin SSIM zeigte. Dies könnte durch die erhöhte Hydrophobizität der Geranylgeranylgruppe gegenüber der Farnesylgruppe erklärt werden. Wie eingangs erwähnt benötigen farnesylierte Proteine zur stabilen Membranassoziation ein zweites Signal in Form einer polybasischen Domäne (spezifische Plasmamembranassoziation) oder einer zweiten Lipidmodifikation. Prozessiertes Lamin A verliert seine Assoziation an die Kernmembran aufgrund der proteolytischen Abspaltung seines C-Terminus und ist als funktionelles Protein Bestandteil der Kernlamina. Die Farnesylgruppe ist in diesem Fall vermutlich nur für eine anfängliche Membranlokalisierung verantwortlich, die Lamin A in Kontakt mit der membrangebundenen Prozessierungsmaschinerie aus RCE1/ZMPSTE24 und ICMT bringt. Gleichzeitig wird das Protein somit in die Nähe weiterer Proteine der Kernlamina gebracht, an die es während seiner Reifung bindet. Aus diesen Gründen entfällt die Notwendigkeit einer stabilen Membranassoziation und eines zweiten Lokalisationssignals neben der Prenylgruppe. Die Lamin A-Mutante Progerin besitzt folglich ebenfalls kein zweites Membranlokalisierungssignal, was zu einer relativ losen Assoziation mit der Kernmembran

führt. Studien zur Membranassoziation von Prenylgruppen an künstliche Membranen berechneten apparente Dissoziationskonstanten für farnesylierte Peptide im Bereich von 100  $\mu\text{M}$ , während für geranylgeranylierte Peptide ein ca. 45-fach niedrigerer Wert erreicht wurde. Für geranylgeranylierte Proteine würde dies ohne aktiven Extraktionsmechanismus einen sehr geringen spontanen Austausch zwischen Membran und Zytosol bedeuten (Silvius, JR and l'Heureux, 1994). Im Fall der hier untersuchten Interaktion zwischen PDE6D und geranylgeranyliertem Progerin (CSIL) könnte allein die erhöhte Membranassoziation durch die längere Prenyleinheit für eine geringere zytosolische Fraktion an Progerin sorgen, welches an PDE6D binden kann.

Neben der Untersuchung einer zellulären Interaktion in Überexpressionsmodellen war auch die Analyse der PDE6D–Progerin/Lamin A/C-Interaktion in Patientenzellen von Interesse. In der Theorie sollten in  $LMNA^{+G608G}$ -Zellen nach den Ergebnissen des Pulldowns aus Patientenzellen mehr Interaktionen detektiert werden als in  $LMNA^{+/+}$ -Zellen. Der durchgeführte PLA konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigen. Sowohl in den Zellen erkrankter Kinder als auch in Zellen gesunder Verwandter konnten Interaktionen zwischen PDE6D und den  $LMNA$ -Genprodukten im Nukleus beobachtet werden, die Anzahl an Interaktionen war jedoch in beiden Fällen ungefähr gleich. Dies stellt die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Versuch zur Interaktion PDE6Ds und ektopischem Progerin in Frage und könnte auf einen Einfluss der Überexpression hindeuten, bei der eine weitaus größere Menge an Protein exprimiert wird als unter physiologischen Bedingungen. Höhere Konzentrationen an Progerin könnten für eine höhere Fraktion an freiem Progerin im Nukleoplasma sorgen, welches durch PDE6D gebunden werden kann. Zusätzlich könnte auch die GFP-Markierung einen Einfluss auf die Lokalisation und die Bindungseigenschaften Progerins haben. Das relativ große GFP (26 kDa) könnte die Solubilisierungseigenschaften Progerins in der Zelle positiv beeinflussen und somit ebenfalls eine höhere für PDE6D verfügbare Fraktion schaffen. Andererseits ist die Expression von Progerin in HGPS-Patientenzellen im Vergleich zu Lamin A/C wesentlich geringer (Vgl. Ladekontrollen in Abbildung 1.18c). Die Menge an Progerin könnte in Patientenzellen zu gering sein, um einen Unterschied zu Wildtyp-Zellen zu detektieren, die zwei funktionale  $LMNA$ -Allele besitzen. Hier könnte eine Wiederholung der Versuche mit spezifischen Antikörpern gegen PDE6D und Progerin Aufschluss geben.

### 1.6.6 Physiologische Auswirkungen der Inhibition der PDE6D-Progerin-Wechselwirkung

Die Inhibition der prenylabhängigen PDE6D–KRAS-Wechselwirkung mithilfe von Deltarasin/ Deltazinone 1 konnte in Pankreastumorzellen eine Inhibition des Wachstums der Zellen zeigen (Zimmermann et al., 2013a; Papke et al., 2016). Sollte die Interaktion zwischen PDE6D und Progerin physiologisch relevant sein, könnte mit Konsequenzen auf den HGPS-Phänotyp gerechnet werden. Zu diesem Zweck wurden innerhalb dieser Arbeit zunächst die Auswirkungen auf die Gesamtproteinmenge an Progerin in HGPS-Patientenzellen untersucht, die mit Deltarasin und Deltazinone 1 behandelt wurden. In *PDE6D*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte zuvor eine geringere Proteinmenge an der Rhodopsin-Kinase (GRK1) detektiert werden, die normalerweise durch PDE6D an die äußeren Segmente der Retinazellen transportiert wird. Das Fehlen PDE6Ds führt in diesem Fall nicht nur zur Delokalisation von GRK1 sondern gleichzeitig zu dessen Degradation, da es nicht an seinen korrekten Wirkungsort transportiert werden kann (Zhang et al., 2007). In den hier durchgeführten Untersuchungen in HGPS-Patientenzellen konnte kein Einfluss der beiden getesteten Substanzen auf die Gesamtproteinmenge an Progerin beobachtet werden.

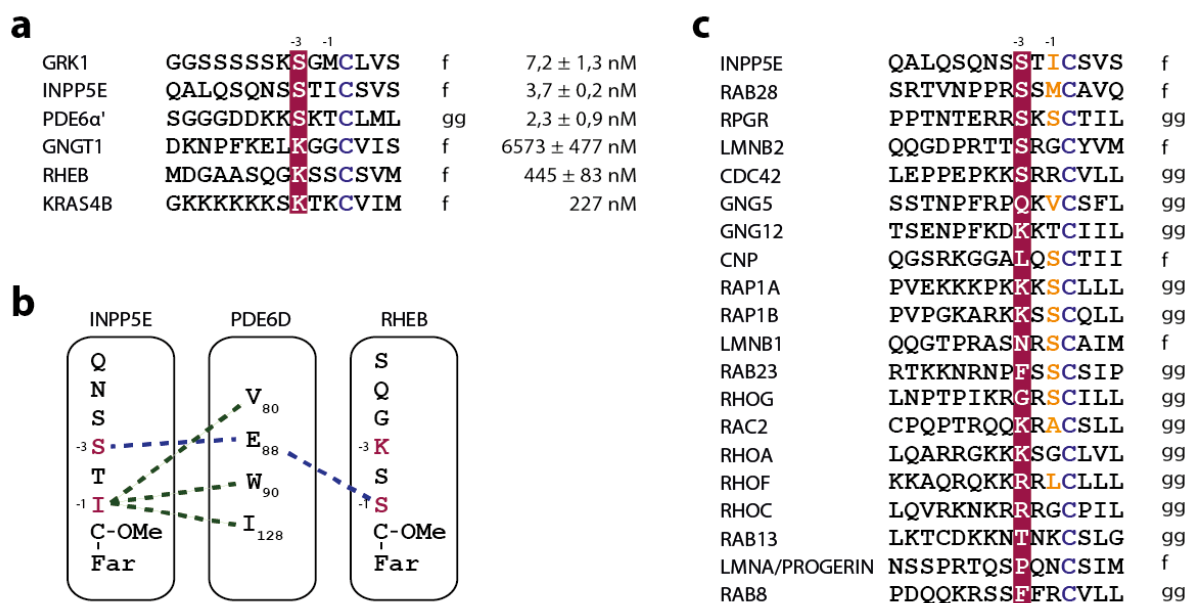
Weiterhin konnte in HeLa-Zellen, die mit GFP-Progerin transfiziert wurden kein Einfluss der Substanzen auf die Lokalisation Progerins detektiert werden. Während FTI, wie bereits in der Literatur beschrieben, für eine Relokalisation Progerins von der Kernlamina ins Nukleoplasma sorgen, konnte für Deltarasin/ Deltazinone 1 behandelte Zellen weder eine erhöhte nukleoplasmatische Fraktion, mit charakteristischer Foki-Bildung beobachtet werden, noch hatte die Substanzbehandlung Auswirkungen auf die durch Progerin induzierten morphologischen Veränderungen des Kerns. Diese Resultate machen einen Einfluss PDE6Ds auf die Lokalisation von neu synthetisiertem Progerin/Prelamin A unwahrscheinlich. Für die Biosynthese von Prelamin A wurde in der Literatur bereits ein Mechanismus beschrieben, der sich von dem bekannten Weg für andere CaaX-Box-Proteine unterscheidet. Während beispielsweise Ras-Proteine nach der Synthese im Zytosol durch die FTase prenyliert werden, erfolgt die weitere Prozessierung mittels RCE1 und ICMT am ER. Erst danach erfolgt der Transport des Proteins zur Plasmamembran oder zum Golgi-Apparat. Im Fall von Lamin A wird das neu synthetisierte Protein aufgrund seiner starken Kernimportsequenz (NLS, *nuclear localisation signal*) direkt in den Nukleus transportiert, wo es im Nukleoplasma farnesyliert wird und anschließend an der inneren Kernmembran durch RCE1, ICMT und ZMPSTE24 weiter modifiziert wird. Nach abgeschlossener Prozessierung befindet sich Lamin A bereits an seinem Wirkungsort und der farnesylierte C-Terminus wurde bereits abgespalten.



Fluoreszenzpolarisations-Messungen Dansyl-markierter prenylierter Peptide einen großen Unterschied in den Affinitäten zu PDE6D zwischen farnesylierten ( $K_d = 102 - 616$  nM) und geranylgeranylierten ( $K_d > 10$   $\mu$ M) Peptiden (Chen et al., 2010). Des Weiteren wiesen FLIM-Experimente (*Fluorescence-lifetime imaging microscopy*) mit einer geranylgeranylierten mCitrine-markierten NRAS-Mutante und mCherry-PDE6D im Gegensatz zu Wildtyp farnesyliertem mCitrine-NRAS auf keine Interaktion hin und geranylgeranyliertes NRAS konnte in Pulldownexperimenten nicht mit PDE6D kogereinigert werden (Chandra et al., 2012). Andere Studien wiederum zeigen die hochaffine Bindung eines C-terminal geranylgeranylierten Peptids an PDE6D ( $K_d = 2,3$  nM). Die Ko-Kristallstruktur des Peptids und PDE6D zeigt die Neuordnung der Aminosäuren F133 und L17 innerhalb der hydrophoben Bindetasche von PDE6D, die der 5 Kohlenstoff längeren Isopreneinheit eine tiefere Bindung in die Tasche erlaubt (Fansa et al., 2015).

Die hier erhaltenen Ergebnisse spiegeln eine etwaige geringere Affinität PDE6Ds gegenüber geranylgeranylierten Proteinen im Vergleich mit farnesylierten Proteinen nicht wider. Im Pulldown mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der Bindungspartner PDE6Ds konnte keine Präferenz für farnesylierte Proteine gegenüber geranylgeranylierten Proteinen beobachtet werden. In den Pulldown-Versuchen mit Prenylierungsmutanten Progerins konnte ebenfalls entgegen der Literatur nur eine ungefähr zweifache Präferenz für farnesyliertes Progerin gefunden werden. Gestützt werden die Ergebnisse dieser Arbeit durch biophysikalische Messungen, bei denen von  $G\alpha$  abgeleitete Dodecapeptide mit identischer Sequenz mit Farnesyl- oder Geranylgeranylrest mit PDE6D titriert wurden und nur eine ungefähr 2,5-fache Präferenz von Farnesyl gegenüber Geranylgeranyl zeigten (G. Zimmermann, MPI Dortmund, Dissertation). Die unterschiedlichen Ergebnisse in Hinblick auf die Bindungsspezifität PDE6Ds könnten im experimentellen Aufbau liegen. Bisherige direkte Messungen zur Spezifität PDE6Ds wurden entweder nur mit dem modifizierten Cysteinmethylester durchgeführt, bei dem Interaktionen der C-terminalen Aminosäuren und PDE6D vernachlässigt wurden, oder mit gänzlich verschiedenen Peptiden. Die zellulären FLIM-Experimente lassen außer Acht, dass palmitoyliertes und geranylgeranyliertes NRAS durch die erhöhte Hydrophobizität der Geranylgeranylgruppe gegenüber der Farnesylgruppe auch eine höhere Affinität für Membranen hat und somit möglicherweise ein geringerer zytosolischer Pool zur Bindung durch PDE6D zur Verfügung steht. Gleiches wurde innerhalb dieser Arbeit in den PLA-Messungen zur Interaktion von PDE6D mit geranylgeranyliertem Progerin beobachtet.

Ein weiterer zu klärender Punkt in der Funktionsweise des Transports von prenylierten Proteinen durch PDE6D ist die Affinität der jeweiligen Interaktion. Aufgrund der geringen Interaktionsfläche kann nur die Sequenz des C-Terminus ausschlaggebend für eine sogenannte hoch affine gegenüber einer niedrig affinen Bindung sein. Für den hoch affinen PDE6D-Binder INPP5E konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Serins in -3 Position vom farnesylierten Cystein zu einem Alanin die Interaktion mit PDE6D unterbindet (Lee and Seo, 2015). Die Analyse von Ko-Kristallstrukturen von PDE6D und einem C-terminalen INPP5E-Peptid sowie die Messung von Bindungsaffinitäten zwischen PDE6D und C-terminalen Peptiden von GRK1 bzw. GNGT1 zeigten neben dem Einfluss des Serins in -3 Position auch einen Einfluss der Aminosäure in -1 Position (Abbildung 1.29a). Während das -1 Serin von RHEB (niedrig affiner Binder) eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glu88 von PDE6D eingeht, ist das -1 Isoleucin von INPP5E (hoch affiner Binder) in einer hydrophoben Furche von PDE6D gebunden (Abbildung 1.29b). GRK1 ist wie INPP5E ein hoch affiner Binder ( $K_d = 7,2$  nM) und besitzt ebenfalls in -3 Position ein Serin, in -1 Position jedoch ein Methionin. Die PDE6-Untereinheit PDE6 $\alpha'$  ( $K_d = 2,3$  nM) ist geranylgeranyliert und besitzt in -3 Position ein Serin und in -1 Position ein Threonin. Demnach scheint die Art der Aminosäure in -1 Position nicht ganz eindeutig zu sein und reicht vom hydrophoben Isoleucin bis zum polaren Threonin. Festzuhalten bleibt, dass eine Möglichkeit zur hoch affinen Bindung durch ein Serin in -3 Position aufgrund der Wasserstoffbrückenbindung zusammen mit einer hydrophoben Aminosäure in -1 Position vermittelt werden kann (Fansa et al., 2015; Fansa et al., 2016).



**Abbildung 1.29** Abhängigkeit der Bindungsaffinitäten von PDE6D-Interaktionspartnern von ihrer C-terminalen Peptidsequenz. a) Vergleich der Bindungsaffinitäten bekannter PDE6D-Interaktionspartner. Die Affinitäten wurden mithilfe



von kurzen prenylierten Peptiden und PDE6D biochemisch ermittelt. Für die Interaktion wichtige Aminosäuren in -3 Position wurden rot hinterlegt. Das farnesylierte Cystein ist violett eingefärbt (Chen et al., 2010; Fansa et al., 2015; Fansa et al., 2016). b) Interaktionen, die für die unterschiedlichen Affinitäten zwischen INPP5E und RHEB mit PDE6D verantwortlich sind. Verglichen werden die Interaktionen der Aminosäuren in -1 Position und -3 Position (rot) von INPP5E und RHEB mit PDE6D. Polare Interaktionen sind mit blauen gestrichelten Linien und hydrophobe Interaktionen mit grünen gestrichelten Linien gezeigt. Abbildung modifiziert nach (Ismail, 2016). c) C-terminale Sequenzen von in dieser Arbeit identifizierten PDE6D-Interaktionspartnern. Zusätzlich zur Markierung der Aminosäure in -3 Position (rot hinterlegt) und dem farnesylierten Cystein (violett) wurden für die Bindung an PDE6D wichtige Serine und hydrophobe Aminosäuren orange markiert. Weiterhin ist die Art der Prenylmodifikation angegeben: f = Farnesyl; gg = Geranylgeranyl.

Bei einem Vergleich der C-terminalen Sequenzen der innerhalb dieser Arbeit identifizierten PDE6D-Bindungspartner mit den Sequenzen bekannter Binder fällt auf, dass fünf der identifizierten Proteine (INPP5E, RAB28, RPGR, LMNB2, CDC42) ein Serin in -3 Position besitzen. Die GTPase RAB28 zeigt mit einem Serin in -3 und einem Methionin in -1 Position das gleiche Sequenzmotiv, das auch der hoch affine Binder GRK1 zeigt. Ebenfalls ein Serin in -3 Position besitzt das neu identifizierte interagierende Protein CDC42, welches allerdings von zwei sterisch anspruchsvollen Argininen in der -1 und -2 Position begleitet wird (Abbildung 1.29c).

## 1.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels eines affinitätschromatographischen Ansatzes neue, bisher unbekannte prenylabhängige Bindungspartner des molekularen Chaperons PDE6D identifiziert werden. Die Auswertung der identifizierten Proteine zeigte keine Bindungspräferenz PDE6Ds gegenüber farnesylierten oder geranylgeranylierten Proteinen. Folgende Mutationsstudien mit der Lamin A-Mutante Progerin zeigten nur eine geringe Bevorzugung der Bindung an farnesyliertes Progerin im Vergleich zu geranylgeranyliertem Progerin. Die Auswirkungen einer Inhibition der Bindung zwischen PDE6D und prenylierten Proteinen bedarf noch weiterer Studien. Mittels FLIM-Messungen könnten neben den Interaktionen zwischen PDE6D und den neu identifizierten Bindungspartnern CDC42, RAB23, CNP und Progerin auch die Störung der Interaktion in Zellen mittels kleiner Moleküle untersucht werden. Die Untersuchung der Lokalisation von CDC42, RAB23 und CNP in Deltazinone-1 behandelten Zellen zeigte keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen. Hierfür könnte zum Teil die Interaktion von PDE6D und ARL2 verantwortlich sein, deren Bindung die Substanz aktiv aus der hydrophoben Bindetasche von PDE6D verdrängt. Die Verwendung höher affiner Deltarasin-Derivate oder neu entwickelter PDE6D-Inhibitoren, die nichtmehr durch ARL2 verdrängt werden, könnten hier Aufschluss geben (Martin-Gago et al., 2017). Weiterhin könnte zusätzlich zur Konfokalmikroskopie mit fixierten Zellen die zelluläre Dynamik der Proteine mittels FRAP-Messungen (*fluorescence recovery after photobleaching*) untersucht werden. Da im Falle von Rho-GTPasen neben dem Transport via RhoGDI ein zweiter Transportweg über rezyklisierende Vesikel bekannt ist, könnte für den PDE6D-

abhängigen Transport ein ähnlicher Mechanismus denkbar sein und der Phänotyp bei Inhibition von PDE6D lediglich geringe dynamische Unterschiede in der Lokalisation von transportierten Proteinen an der Zielmembran zeigen. Neben den Auswirkungen einer Inhibition von PDE6D ist auch die Frage der Bindungsspezifität nicht endgültig geklärt. Trotz der zahlreichen identifizierten Bindungspartner innerhalb dieser Arbeit besteht die Möglichkeit, dass durch die PDE6D–ARL2/3-Interaktion transiente Wechselwirkungen zwischen PDE6D und Interaktoren in dem hier verwendeten Ansatz nicht detektiert werden können. Neben Studien, die PDE6D und interagierende Proteine kovalent verknüpfen, könnte die hier entwickelte affinitätschromatographische Methode mit der PDE6D-Doppelmutante PDE6D<sup>F94A,I98A</sup> durchgeführt werden. Die Bindung von GTP-ARL2 an PDE6D<sup>F94A,I98A</sup> führt zu einer wesentlich geringeren Freisetzung gebundener Cargoproteine im Vergleich zu Wildtyp PDE6D, wodurch die Fraktion an identifizierbaren, prenylabhängigen PDE6D Bindern erhöht werden könnte. In Zusammenhang mit der Bindungsspezifität wären auch biophysikalische Messungen der Affinitäten zwischen PDE6D und identifizierten Bindungspartnern interessant. Unter der Annahme, dass das Überschreiten einer Affinitätsschwelle zwischen PDE6D und bindenden Proteinen in einer physiologisch relevanten Interaktion endet, könnte so der Mechanismus des PDE6D-abhängigen Transports weiter aufgeklärt werden. Neue Methoden zur heterologen Expression und Reinigung von prenylierten und vollständig prozessierten Proteinen, wie durch Gillette *et al.* beschrieben, könnten die bisher komplizierten semi-synthetischen Methoden ersetzen (Gillette et al., 2015). Da die Interaktion zwischen PDE6D und prenylierten Proteinen bis auf wenige Ausnahmen hauptsächlich über die Prenylgruppe und die letzten 5 -10 Aminosäuren erfolgt, wäre auch die Messung der Bindungsaffinitäten einer kleinen Bibliothek an kurzen prenylierten Peptiden, die von den C-Termini bekannter PDE6D-Binder abstammen, denkbar. Hier könnten mittels eines Alaninscans die für die Bindung essentiellen Sequenzmotive identifiziert werden.

## Teil 2



## 2 Entwicklung eines Screens zur Identifizierung von biologisch aktiven Indolochinolizinen

### 2.1 Zusammenfassung

Der Kontrollverlust über den Zellzyklus ist ein Hauptmerkmal humaner Tumorzellen. Die Akkumulation von Mutationen in Krebszellen führt zu unplanmäßigen Teilungsvorgängen und genomischer Instabilität. Diverse therapeutische Strategien zur Adressierung des Zellzyklus in Krebszellen wurden bereits untersucht. Viele dieser Strategien konnten jedoch nicht den gewünschten therapeutischen Erfolg einhergehend mit geringen zytotoxischen Effekten auf gesunde Zellen erreichen (Dominguez-Brauer et al., 2015). Die Wirkungsweise der meisten Zellzyklus-adressierenden Substanzen beruht dabei auf der Aktivierung des Spindelkontrollpunkts (SAC, *spindle assembly checkpoint*). Die chronische Aktivierung des Kontrollpunkts und die damit einhergehende Arretierung der Zelle in der Metaphase durch chemische Agenzien bestimmt dabei zwei mögliche Schicksale für die Zelle; Entweder die Zelle teilt sich trotz aktiviertem Kontrollpunkt in Tochterzellen in einem Vorgang, der als „mitotic slippage“ bezeichnet wird und eventuelle Aneuploidien zur Folge haben kann, oder die Zelle stirbt einen apoptotischen Zelltod während der Mitose. Dabei wird davon ausgegangen, dass intrinsisch genomisch instabile Krebszellen mit höherer Wahrscheinlichkeit den Weg des Zelltods einschlagen als gesunde Zellen. Innerhalb der Abteilung „Chemische Biologie“ (MPI Dortmund) wurde mithilfe eines vorwärts gerichteten chemisch-genetischen Ansatzes das biologisch aktive Indolochinolizin Centrocountin-1 entwickelt, das über Interaktion mit den Zielproteinen Nucleophosmin (NPM) und Exportin-1 (CRM1) zu einer Aktivierung des Spindelkontrollpunkts und einem vermehrten apoptotischen Zelltod führt (Duckert et al., 2012). In dieser Arbeit konnte ein zellbasierter phänotypischer Screen entwickelt werden, der zur Identifizierung neuer aktiver Centrocountin—1-Derivate verwendet wurde. Mittels automatischer Mikroskopie und anschließender Quantifizierung der gewonnenen Bilddaten wurde der mitotische Index von behandelten Zellen mithilfe des mitotischen Markerproteins Phospho-Histon H3 bestimmt. Das Screening einer kleinen Bibliothek an Centrocountin-Derivaten identifizierte das Pyridoisochinolizin a528 als potenteste Substanz. Folgeversuche zeigten eine zweifache Erhöhung des mitotischen Index im Vergleich zu Centrocountin-1 und stärkere Auswirkungen auf die Proliferation von HeLa-Zellen als die Ursprungssubstanz. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit der Wirkmechanismus der Centrocountine weiter erörtert. Aufgrund der diversen Funktionen von NPM hinsichtlich Chaperonaktivität, DNA-Reparatur, Ribosomenbiogenese und

Zentrosomen-Integrität ergeben sich verschiedene Möglichkeiten eines Einflusses von Centrocountin-1. Die Oligomerisierung NPMs ist für die Chaperonaktivität und RNA-Bindung während der Ribosomenbiogenese essentiell und die Störung selbiger führt zu einem Anstieg von DNA-Schäden sowie zum P53-abhängigen Zelltod. In diesem Zusammenhang konnte neben einem Einfluss von Centrocountin-1 auf die Oligomerisierung von NPM auch die aus RNAi-Studien bekannte Häufung von DNA-Schäden in NPM-defizienten Zellen ausgeschlossen werden. Störungen des CRM1-abhängigen Transports von FOXO3 bestätigen vorherige Ergebnisse zu einem Einfluss von Centrocountin-1 auf den Kernexportfaktor CRM1. In dieser Arbeit werden die gewonnenen Ergebnisse in Hinblick auf den potentiellen Wirkmechanismus der Centrocountine diskutiert.

## **2.2 Summary**

A major feature of human cancer is the loss of control over the cell cycle of tumor cells. The accumulation of mutations leads to unplanned division processes and genomic instability. Various therapeutic strategies to address the cell cycle in cancer cells have already been investigated. However, many of these strategies failed to achieve the desired therapeutic outcome combined with low cytotoxic effects on healthy cells (Dominguez-Brauer et al., 2015). The mode of action of most cell cycle addressing substances is based on the activation of the spindle assembly checkpoint (SAC). The chronic activation of the SAC by chemical agents and the following arrest of cells in the metaphase determines two possible fates for the cells. Despite the activated control point the cell divides into two daughter cells, in a process called "mitotic slippage", which is likely to cause aneuploidia or the cell dies an apoptotic cell death during mitosis. It is assumed that intrinsically genomically unstable cancer cells are more likely to take the path of cell death than healthy cells. We employed a forward chemical genetic screen to identify the biologically active indoloquinolizine Centrocountin-1, which leads to an activation of the SAC and increases apoptotic cell death via interaction with the target proteins nucleophosmin (NPM) and exportin 1 (CRM1) (Duckert et al., 2012). In this work, a cell-based phenotypic screen was developed to identify new Centrocountin-1 derivatives. By means of automatic microscopy and subsequent image quantification, the mitotic index of treated cells was determined using the mitotic marker phospho-histone H3. The screening of a small library of Centrocountin-1 derivatives identified the pyridoisoquinolizine a528 as the most potent substance. Subsequent tests showed a twofold increase in the mitotic index and stronger effects on the proliferation of HeLa cells compared to the parent compound Centrocountin-1. In addition, the mechanism of action of Centrocountin-1 was further investigated. Due to the diverse functions of NPM with respect

to chaperone activity, DNA repair, ribosome biogenesis, and centrosome integrity, various possibilities for an influence of Centrocountin-1 arise. The oligomerization of NPM is essential for the chaperone activity and the RNA binding during ribosome biogenesis. Interference with the oligomerization of NPM leads to an increase of DNA damage and P53-dependent cell death. Centrocountin-1 shows no effect on the oligomerization of NPM and no accumulation of DNA damage in treated cells, which are both known observations from studies in NPM deficient cells. Moreover, the impaired CRM1-dependent transport of FOXO3 confirms previous results on the influence of Centrocountin-1 on the nuclear export factor CRM1. With regard to the obtained results the potential mechanism of action of Centrocountin-1 is discussed in this work.

## 2.3 Einleitung

### 2.3.1 Der Zellzyklus

Zellen durchlaufen einen komplexen Zyklus, der einerseits ihr Wachstum und ihre Proliferation steuert und andererseits in die zelluläre Antwort auf Schäden und Krankheiten involviert ist. Der Zellzyklus wird dabei durch diverse regulatorische Proteine gesteuert, die der Zelle das Fortschreiten im Zyklus erlauben und im finalen Schritt die Teilung einer Mutterzelle in zwei Tochterzellen zulassen (Schafer, 1998). Der Zellzyklus lässt sich in 5 unterschiedliche funktionelle Phasen einteilen: die  $G_0$ -Phase, in der sich Zellen in einem Ruhezustand befinden, was den Hauptteil der Zellen im menschlichen Körper betrifft, die  $G_1$ - und  $G_2$ -Phase, in der die Zellen RNA und Proteine synthetisieren und die die beiden Orientierungspunkte DNA-Synthese und Mitose voneinander trennen. Während der S-Phase erfolgt die Replikation der DNA und die M-Phase umfasst Mitose und Zytokinese (Harper and Brooks, 2005). Morphologisch lässt sich der Zellzyklus zusätzlich in die Interphase ( $G_{1/0}$ ,  $G_2$ , S) und die Phasen der Mitose (M-Phase) unterteilen. Das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus wird durch die Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und deren regulatorische Partner, den Cyclinen, kontrolliert (Bloom and Cross, 2007). Die Aktivität der CDKs benötigt die Bindung der regulatorischen Cycline. Die Verfügbarkeit der Cycline wird wiederum Zellzyklus-abhängig über deren Synthese und Degradation kontrolliert; daraus folgt eine zeitabhängige Regulation der CDKs (Malumbres and Barbacid, 2009). Humane Zellen besitzen ca. 13 Genloci für CDKs und 25 für Cycline, von denen jedoch nur ein geringer Teil unmittelbar in das Vorantreiben des Zellzyklus involviert ist. Unter ihnen befinden sich die drei Interphase CDKs (CDK2, CDK4 und CDK6), die mitotische CDK1, sowie 10 Cycline, die in 4 verschiedene Klassen (A-, B-, D- und E-Cycline) eingeteilt werden können. Das Fortschreiten durch den Zellzyklus und der Übergang von einer Phase in die nächste wird dabei durch Kontrollpunkte überwacht, die den korrekten Ablauf überprüfen. Im Falle eines Fehlers im Ablauf, wie beispielsweise der Ansammlung von DNA-Schäden, wird ein Kontrollpunkt aktiviert. Um eine potentielle Übertragung des Fehlers an Tochterzellen zu verhindern, veranlasst der Kontrollpunkt eine Arretierung des Zellzyklus bis zur Bereinigung des Fehlers. Dies erfolgt unter anderem über die Inhibition der CDKs durch CDK-Inhibitoren (CKIs), die den Zellzyklus reversibel arretieren können (Nigg, 2001; Bartek et al., 2004; Musacchio and Salmon, 2007). Einer der frühesten Kontrollpunkte im Zellzyklus ist der Restriktionspunkt (R-Punkt). Im Gegensatz zu den übrigen Phasen des Zellzyklus, ist die Zelle während der frühen und mittleren  $G_1$ -Phase empfänglich für extrazelluläre Signale. Die

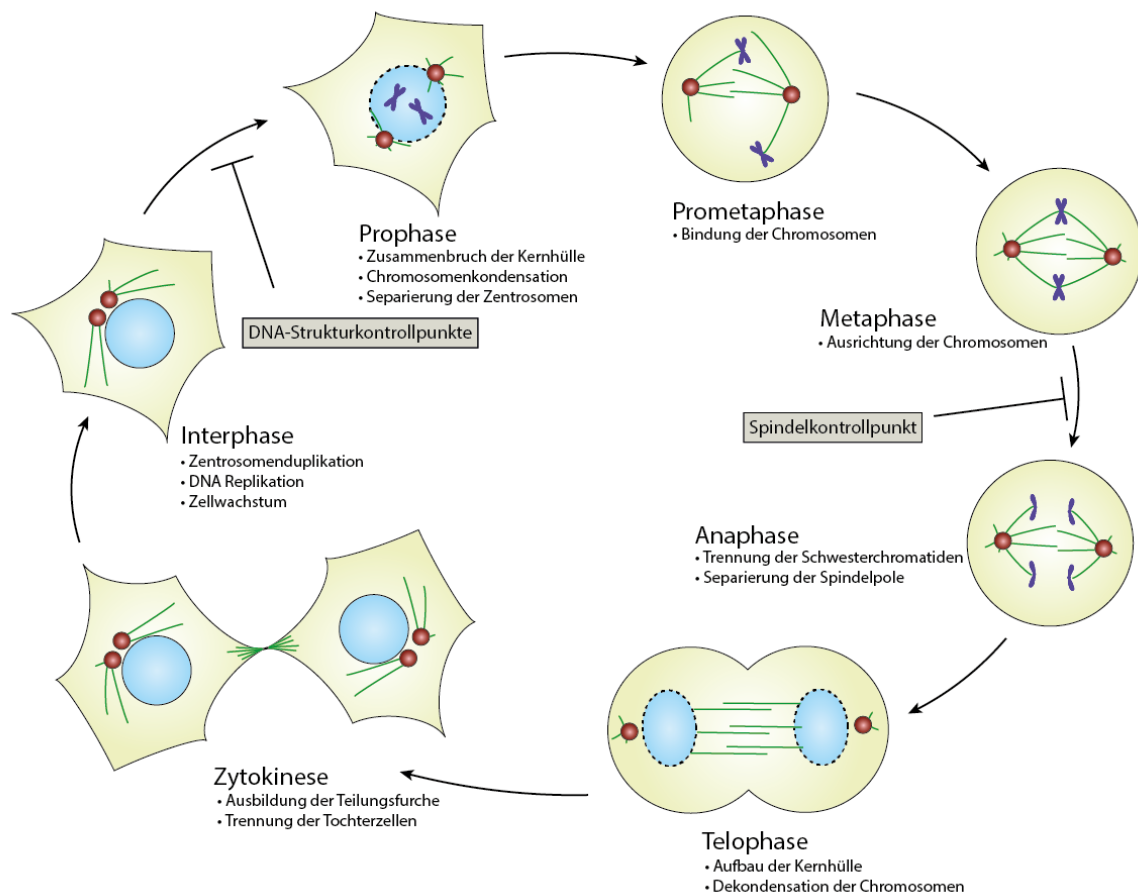


Akkumulation von ausreichend mitogenen Signalen, um das Zellwachstum zu gewährleisten, entscheidet zu diesem Zeitpunkt über das Fortschreiten im Zyklus oder das Verlassen des Zyklus in die G<sub>0</sub>-Phase (Planas-Silva and Weinberg, 1997). Während der S-Phase existieren weitere Kontrollpunkte, die die Integrität des Genoms während der Replikation überwachen. Der Replikationskontrollpunkt wird aktiviert, wenn die enzymatische Aktivität der DNA-Polymerase während der Replikation zum Erliegen kommt (Bartek et al., 2004). Der S-M Kontrollpunkt erkennt die unvollständige Replikation der DNA und verhindert den Übergang in die M-Phase, um eine Zellteilung so lange zu verhindern, bis das Genom vollständig repliziert wurde (Bartek et al., 2004). Der dritte bekannte Kontrollpunkt der S-Phase (Intra-S-Phase Kontrollpunkt) wird durch DNA Doppelstrangbrüche (DSBs) aktiviert und verzögert das Fortschreiten im Zellzyklus, um der DNA-Reparaturmaschinerie Zeit für die Behebung der Probleme zu geben (Bartek et al., 2004). Wie bereits erwähnt, beruht der Übergang von einer Zellzyklusphase zur nächsten auf Proteinkomplexen aus Cyclinen und CDKs. Das Durchlaufen der G<sub>1</sub>-S-Phase wird durch drei CDKs und ihre zugehörigen Cycline gesteuert. Zu Beginn der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase induzieren mitogene Signale die Expression der D-Typ-Cycline (D1, D2, D3) und die Translokation von CDK4 und CDK6 in den Nukleus. Im Nukleus inhibieren Proteine der Retinoblastom-Familie (Rb) die Transkription durch Bindung und Modulierung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Die Komplexe aus Cyclin D-CDK4 und Cyclin D-CDK6 zusammen mit Cyclin E-CDK2 phosphorylieren und inaktivieren Rb-Proteine und überschreiten somit den Restriktionspunkt, was die Zelle unabhängig von mitogenen Signalen macht und ihr ein Fortschreiten in die S-Phase ermöglicht. Für das Durchlaufen der S-Phase sind hauptsächlich CDK1 und CDK2 sowie die A-Typ-Cycline verantwortlich, die während der G<sub>2</sub>-Phase ubiquitiniert und proteasomal degradiert werden, während B-Typ Cycline aktiv synthetisiert werden. Die Bindung von Cyclin B an CDK1 ist im Folgenden hauptsächlich für den G<sub>2</sub>-M Übergang sowie das Durchschreiten der Mitose verantwortlich (Malumbres and Barbacid, 2005). Im Detail sind die Vorgänge dabei wesentlich komplizierter. Beispielsweise kann die Aktivität von CDKs durch aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen an verschiedenen Positionen moduliert werden (Borgne and Meijer, 1996). Weitere Ebenen der Komplexität kommen durch positive und negative Rückkopplungs-Schleifen hinzu (Hoffmann et al., 1993). Neben PTM als Regulatoren der CDKs spielen CKIs, die in zwei Familien unterteilt werden können, eine entscheidende Rolle. Vertreter der INK4-Familie (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>) binden und inhibieren spezifisch monomeres CDK4 und CDK6, während Vertreter der

CIP/KIP-Familie (p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>) an Cyclin-CDK-Komplexe binden und diese inhibieren (Denicourt and Dowdy, 2004).

### **2.3.2 M-Phase und Spindelkontrollpunkt**

Die M-Phase besteht aus den beiden Hauptteilen Mitose und Zytokinese, deren Hauptaufgabe die gleichmäßige Aufteilung des in der S-Phase replizierten Genoms sowie die anschließende Gleichverteilung von Organellen während der Zytokinese auf die beiden Tochterzellen ist. Die M-Phase ist in 5 Phasen unterteilt: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase (Abbildung 2.1). Als Beginn der Mitose wird traditionell die Prophase angesehen, der Zeitpunkt, an dem die Kondensation des Chromatins zu Chromosomen im Lichtmikroskop detektiert werden kann und die zuvor duplizierten Zentrosomen auseinander migrieren, um die zukünftigen Spindelpole auszubilden. Gleichzeitig beginnen die Zentrosomen mit der Ausbildung dynamischer Mikrotubuli, die bis in die Peripherie der Zelle vordringen. Weiterhin löst sich durch direkte Phosphorylierung von Kernlamina-Proteinen durch CDK1 die Kernhülle auf (Nigg, 1993). In der folgenden Prometaphase binden die von den Zentrosomen ausgehenden Mikrotubulipolymere an die Kinetochore der Chromosomen. Die beidseitige Bindung der Chromosomen durch Mikrotubuli von beiden Spindelpolen aus, führt zu einem zweierichteten Zug auf die Chromosomen. In der Metaphase wird der Zug auf die Chromosomen aufrechterhalten und sorgt nach hohen dynamischen Bewegungen der Chromosomen für die finale Ausrichtung in der Metaphaseebene (auch Äquatorialebene). Die korrekte Bindung aller Kinetochore mit Mikrotubuli gegenüberliegender Spindelpole, initiiert das Separieren der Schwesterchromatiden und markiert damit den Start der Anaphase. In der weiteren Anaphase werden die Schwesterchromatiden zu ihren jeweiligen Spindelpolen gezogen und die Spindelpole selbst wandern weiter auseinander in Richtung der Zellmembran. Im finalen Schritt der Mitose, der Telophase, beginnt die Neubildung der Kernlamina um das bereits dekodensierende Chromatin sowie die anschließende Bildung eines kontraktiven Actomyosin-Rings, der die Zytokinese komplettiert (Nigg, 2001).



**Abbildung 2.1** Die M-Phase. Bereits vor Eintritt in die M-Phase kontrolliert die Zelle über die DNA-Strukturkontrollpunkte die Integrität des Genoms und lässt nur bei inaktiviertem Kontrollpunkt das Fortschreiten im Zellzyklus zu. Während der Prophase kondensiert das zelluläre Chromatin und die Zentrosomen beginnen sich voneinander zu trennen. Gleichzeitig beginnt die Auflösung der nukleären Lamina und die Ausbildung der hoch dynamischen mitotischen Mikrotubuli. In der Prometaphase werden die Kinetochore der Chromosomen durch die mitotischen Mikrotubuli gebunden. Die fehlerfreie bipolare Bindung der Schwesterchromatiden sorgt für ihre korrekte Anordnung in der Äquatorialebene während der Metaphase und ist gleichzeitig das Signal für die Inaktivierung des Spindelkontrollpunktes und den Übergang in die Anaphase. Die folgende Trennung der Schwesterchromatiden erlaubt den Zug selbiger zu den entgegengerichteten Spindelpolen (Anaphase). Nach Erreichen der Spindelpole beginnt die Chromosomenkondensation sowie die Neubildung der nukleären Lamina in der Telophase. Im letzten Schritt wird ein kontraktile Actomyosin-Ring ausgebildet, der für die folgende Zellteilung verantwortlich ist. Abbildung modifiziert nach (Nigg, 2001; Gadde and Heald, 2004).

Die Mitose ist ein hochkomplexer Prozess und bedarf der intensiven Überwachung, um beispielsweise Aneuploidien in Tochterzellen zu vermeiden. Die erste Kontrolle, um eine korrekte Mitose und Zellteilung zu gewährleisten, findet bereits auf DNA Ebene über die bereits erwähnten DNA-Strukturkontrollpunkte statt. So wird beispielsweise bei Aktivierung des Intra-S-Phase Kontrollpunkts durch UV Strahlung und folgende Bildung von DSBs die Phosphatase CDC25 über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert. Beim Übergang von der G<sub>2</sub>- zur M-Phase kann der Cyclin B-CDK1 Komplex nicht durch CDC25 dephosphoryliert werden, womit CDK1 im inaktiven Zustand bleibt und die Zelle am Eintritt in die M-Phase gehindert wird (Donzelli and Draetta, 2003). Ein weiterer wichtiger Kontrollpunkt befindet sich am Übergang von der Metaphase zur Anaphase. Der

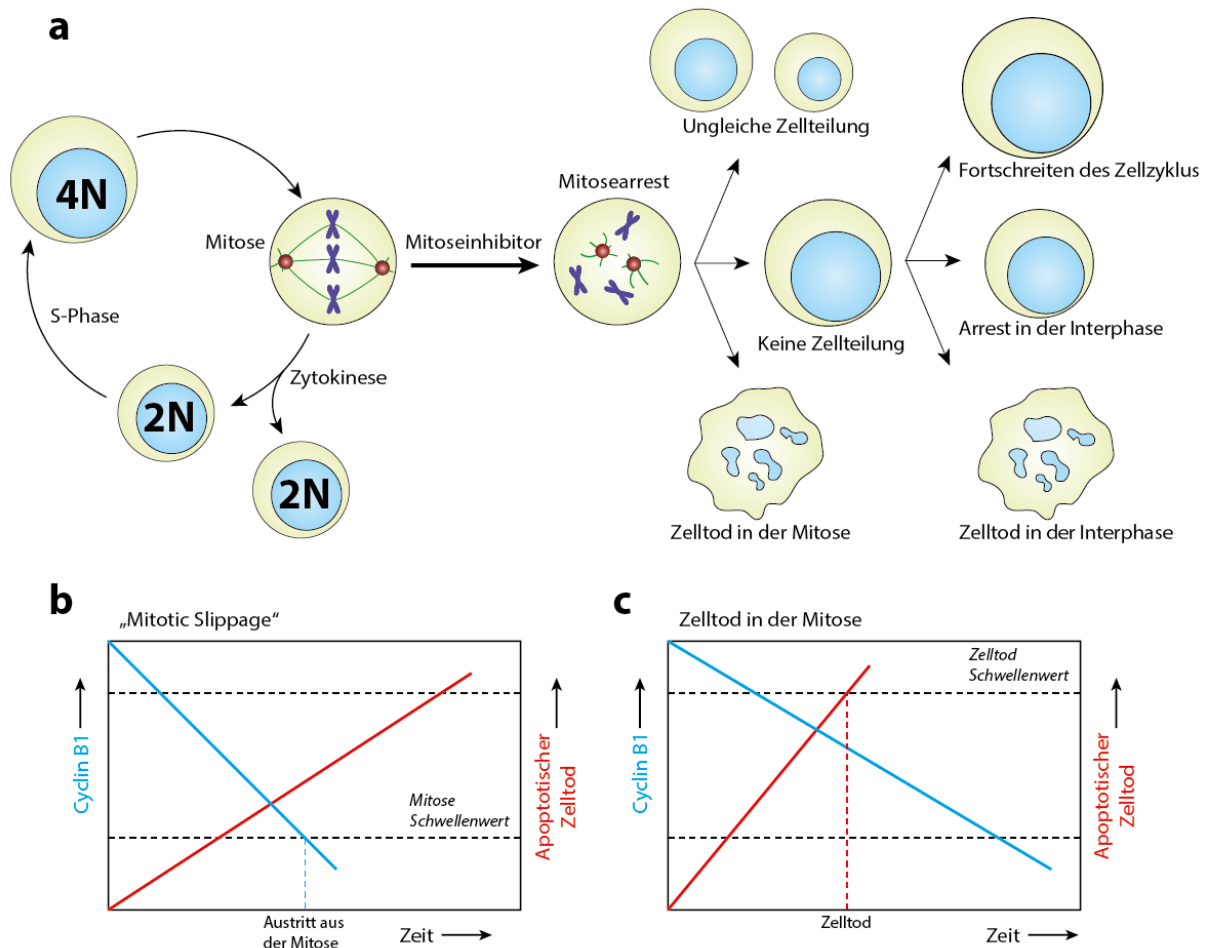
Spindel-Kontrollpunkt (*spindle assembly checkpoint*, SAC) verhindert ein Fortschreiten der Mitose, sofern nicht alle Kinetochore eine korrekte bipolare Verbindung zu den beiden Spindelpolen aufweisen, um somit Fehlverteilungen der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen zu vermeiden. Der Eintritt in die Anaphase wird hauptsächlich durch die zwei Proteine Cyclin B und Securin kontrolliert. Während der Cyclin B–CDK1-Komplex den Beginn der M-Phase ermöglicht, wird durch Abbau von Cyclin B am Ende der Metaphase CDK1 inaktiviert, was für die Zelle das Signal für den Start der Anaphase ist. Securin ist ein Inhibitor der Protease Separase. Nach erfolgreicher Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphaseebene, wird Securin ebenfalls abgebaut, wodurch die aktive Separase die Trennung der Schwesterchromatiden verursacht und den Zug der Chromatiden zu den Spindelpolen erlaubt. Sowohl Cyclin B als auch Securin sind Substrate für den APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*), einen Multienzymkomplex, der während der Mitose mit Komponenten des Spindelapparates assoziiert ist und über seine E3-Ligase-Aktivität unter anderem für die proteasomale Degradation von Cyclin B und Securin verantwortlich ist. Neben E1- und E2-Enzymen benötigt der APC/C einen dritten Kofaktor, der die Substratspezifität der E3-Ligase-Aktivität bestimmt (Peters, 2006). Für die Degradation von Cyclinen des Typ-B und Securins ist der APC/C<sup>Cdc20</sup>- sowie der APC/C<sup>Cdh1</sup>-Komplex verantwortlich, wobei ersterer zwischen Prophase und Metaphase aktiv ist und CDC20 ein SAC-Zielprotein ist. Die Inhibition von CDC20 durch Aktivierung des Spindel-Kontrollpunktes inhibiert folglich die Funktion des APC/C<sup>Cdc20</sup> und damit die proteasomale Degradation von Cyclin B und Securin, wodurch die Zelle weiterhin in der Metaphase gehalten wird. Eine Reihe von Proteinen sind für die Detektion nicht bipolar verbundener Kinetochore und die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes verantwortlich. Die SAC-Proteine MAD2, BUBR1, BUB3, sowie der APC/C Ko-Aktivator CDC20 gehören dem MCC (*mitotic checkpoint complex*) an, der den APC/C bindet und die K48 Polyubiquitinierung von Securin und Cyclin B verhindert (Fang et al., 1998; Sudakin et al., 2001). Weitere Kernkomponenten, die für die Signalamplifizierung des SAC-Signals verantwortlich sind, sind MAD1 und die Kinasen MPS1 und Aurora B (Musacchio and Salmon, 2007). Während der Prometaphase sammeln sich alle Komponenten des SAC an den Kinetochoren. Die korrekte bipolare Bindung der Kinetochore durch die +-Enden der Mikrotubuli vermittelt die Inaktivierung des SAC. Dadurch dissoziiert CDC20 von den Kinetochoren und aktiviert den APC/C. Eine weitere Möglichkeit zur Inaktivierung des SAC ist die Detektion der Zugspannung am Kinetochor durch die gebundenen Mikrotubuli. Bei der syntelischen (Schwesterkinetochore werden von Mikrotubuli desselben Spindelpols

gebunden) und merotelischen (Verknüpfung eines Kinetochors mit Mikrotubuli von zwei verschiedenen Spindelpolen) Verknüpfung von Mikrotubuli und Kinetochor bleibt der SAC aktiviert, obwohl die Kinetochore durch Mikrotubuli gebunden sind. Um Fehlverteilungen der Chromatiden zu verhindern, wird die Spannung zwischen den Schwesterchromatiden der Chromosomen gemessen. Niedrige Spannung spricht dabei für eine der erwähnten syntelischen oder merotelischen Assoziationen. Durch erhöhte Aktivität der Kinase Aurora B (AURKB) werden vorhandene Tubulin-Kinetochor-Interaktionen destabilisiert, um eine Neuorientierung der Mikrotubuli zu ermöglichen und damit die korrekte amphitelische Kinetochor-Verknüpfung, die zur Inaktivierung des SAC führt (Cimini and Degrossi, 2005).

### 2.3.3 Mitose-Inhibitoren in der Krebsforschung

Der Verlust der normalen Kontrolle über den Zellzyklus ist ein Kennzeichen von humanen Krebserkrankungen. Tumorzellen häufen genetische Abweichungen an, die in unkontrollierter Proliferation und genomischer Instabilität enden (Dominguez-Brauer et al., 2015). Aufgrund der Tatsache, dass Tumoren eine wesentlich höhere Anzahl an mitotisch aktiven Zellen im Vergleich zu gesundem Gewebe enthalten und die Mitose als fragilste Phase des Zellzyklus hoch anfällig für den Zelltod durch Eingriffe in den korrekten Ablauf ist, stellt das Adressieren der Mitose ein valides Ziel in der Krebstherapie dar (Chan et al., 2012). Die Störung der Mitose kann dabei zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgen. Erster Angriffspunkt kann der Eintritt in die Mitose sowie die Duplikation der Zentrosomen und damit der Aufbau des Spindelapparates sein. Weiterhin sind der bereits beschriebene Spindel-Kontrollpunkt und die Chromosomen-Segregation während der Anaphase, sowie der Austritt aus der Mitose in der Telophase, Ziele in der Entwicklung von Anti-Krebs-Wirkstoffen (Manchado et al., 2012). Die hoch-dynamischen Mikrotubuli der mitotischen Spindel gehören zu den erfolgreichsten Angriffspunkten in der Krebstherapie. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle während der Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphaseebene, der anschließenden Separierung der Schwesterchromatiden und der folgenden Segregation zu den Spindelpolen hat die Beeinflussung ihrer Dynamik die Blockierung der Mitose und eventuell den anschließenden apoptotischen Zelltod zur Folge (Jordan and Wilson, 2004). Zusätzlich ist die Mikrotubulidynamik in mitotischen Zellen ca. 10x – 100x höher als in Interphase-Zellen, was eine zusätzliche Selektivität in der Adressierung von Krebszellen gibt (Zhai et al., 1996). Dabei basiert der hervorgerufene mitotische Arrest auf der Aktivierung des SAC. Zellen, die durch Modulierung der Mikrotubulidynamiken und folgende Aktivierung des SAC in der Mitose angehalten werden, können verschiedene Schicksale ereilen. Die Aktivierung des Kontrollpunktes verhindert zunächst die Degradation von Cyclin B durch den APC/C<sup>Cdc20</sup>,

dennoch erfolgt weiterhin ein langsamer Abbau von Cyclin B, der bei Erreichen eines bestimmten Schwellenwerts den Zellen ein Verlassen der Mitose trotz permanent aktivem SAC erlaubt (Brito and Rieder, 2006).



**Abbildung 2.2** Zellschicksal nach Behandlung mit Mitoseinhibitoren. a) Mitoseinhibitoren, wie beispielsweise Taxol, arretieren Zellen in der Metaphase aufgrund der permanenten Aktivierung des Spindelkontrollpunkts. Im Anschluss ergeben sich verschiedene mögliche Schicksale für die Zellen. Entweder sie sterben in der Mitose oder teilen sich ungleichmäßig in zwei aneuploide Tochterzellen. Alternativ können die Zellen die Mitose ohne Zellteilung verlassen, um in der anschließenden Interphase zu sterben, unbegrenzt in der Interphase zu verweilen oder im Zellzyklus fortzuschreiten, jedoch ohne folgende Zellteilung. b+c) Konkurrenz-Modell, das über das Schicksal von in der Mitose arretierten Zellen entscheidet. Zwei konkurrierende Signalwege, zum einen der Abbau von Cyclin B1 und zum anderen die Ansammlung von Signalen, die zum Zelltod führen, bestimmen über das Überleben oder Sterben der arretierten Zellen. Während eines mitotischen Arrests steigt das Signal für einen apoptotischen Zelltod an, wohingegen die Cyclin B1-Proteinmenge sinkt. Beide Signalwege besitzen Schwellenwerte und das Schicksal der Zelle richtet sich danach, welcher Signalweg diesen Wert zuerst erreicht. Demnach erfolgt das „mitotic slippage“, wenn die Cyclin B1-Menge den Mitose-Schwellenwert unterschreitet (b). Sollten die Signale, die zum apoptotischen Zelltod führen zuerst den Zelltod-Schwellenwert überschreiten, stirbt die Zelle in der Mitose (c). Abbildung modifiziert nach (Gascoigne and Taylor, 2008; Gascoigne and Taylor, 2009).

Dieser Vorgang wird als „mitotic slippage“ bezeichnet und kann zu einer ungleichen Aufteilung der Chromosomen in den entsprechenden Tochterzellen, sowie zum Ende der Mitose ohne Zellteilung, führen. Eine weitere Möglichkeit besteht im Caspase-abhängigen Tod der Zelle während der Mitose (Jordan et al., 1996; Gascoigne and Taylor, 2008). Obwohl die Vorgänge, die zur Entscheidung des Schicksals einer arretierten Zelle führen noch nicht restlos aufgeklärt sind, wird vermutet, dass zwei konkurrierende Signalwege verantwortlich

sind. Während des mitotischen Arrests steigt das Signal, das zum apoptotischen Zelltod führt, gleichzeitig wird Cyclin B abgebaut. Beide Signale besitzen spezifische Schwellenwerte und welches Signal als erstes seinen Wert überschreitet/unterschreitet determiniert das Schicksal der Zelle (Gascoigne and Taylor, 2009). Viele der heute bekannten Tubulin-adressierenden Substanzen wurden in großangelegten Screening-Studien von Naturstoffbibliotheken identifiziert. Dabei wird zwischen zwei Subkategorien von Substanzen unterschieden. Zum einen Mikrotubuli-destabilisierende Substanzen, die die Tubulin-Polymerisation inhibieren, wie beispielsweise die bereits vor über 50 Jahren entwickelten Vincaalkaloide (Jordan and Wilson, 2004). Zum anderen Mikrotubuli-stabilisierende Substanzen, die die Tubulin-Polymerisation stimulieren, wie beispielsweise Taxane und Epothilone (Chan et al., 2012). Stabilisierende Substanzen, wie das ursprünglich aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isolierte Taxol (Paclitaxel), binden  $\beta$ -Tubulin mit hoher Affinität an der Innenseite der Mikrotubulifilamente (Morris and Fournier, 2008). Die durch die Bindung hervorgerufene Konformationsänderung stabilisiert und erhöht die Interaktion mit benachbarten Tubulin-Molekülen. Obwohl die stabilisierten Mikrotubuli an die Kinetochore von mitotischen Chromosomen binden können, sind sie nicht in der Lage die nötige Zugspannung zwischen den Schwesterchromatiden aufzubauen, um den SAC zu inaktivieren (Jordan and Wilson, 2004; Chan et al., 2012). Als Mikrotubuli-destabilisierende Substanz bindet das Vincaalkaloid Vinblastine an eine Bindestelle in räumlicher Nähe zur GTP-Bindestelle von  $\beta$ -Tubulin-Dimeren und Mikrotubulifilamenten. In hohen Substanzkonzentrationen ( $> 100$  nM in HeLa-Zellen) sorgt es für die Depolymerisation von Mikrotubuli, zerstört damit den Spindelapparat und blockiert die Zellen in der Mitose. Sowohl für Mikrotubuli-stabilisierende als auch für -destabilisierende Substanzen gilt jedoch, dass ihre Wirkung bei Verwendung von wesentlich geringeren, klinisch relevanten Dosen auf einer Modulation der Mikrotubulidynamiken beruht und nicht auf einer Erhöhung/Reduktion der Mikrotubuli-Polymermasse. Der Einfluss auf die empfindlichen Mikrotubulidynamiken stört den normalen Aufbau des Spindelapparates und führt aufgrund der verringerten Zugspannung zur Aktivierung des SAC und zum Arrest der Zelle in der Mitose (Jordan and Wilson, 2004). Mikrotubuli-adressierende Substanzen sind in der klinischen Anwendung weitverbreitet. Diverse Derivate von Vincaalkaloiden und Taxanen werden alleine oder in Kombinationstherapien zur Behandlung solider Tumoren und hämatologisch malignen Erkrankungen eingesetzt (Dumontet and Jordan, 2010). Probleme in der Verabreichung von Mikrotubuli-adressierenden Substanzen bestehen in schwerwiegenden Nebenwirkungen für die Patienten. Da die Substanzen nicht zwischen gesunden Zellen und Krebszellen

unterscheiden können sowie der Tatsache, dass sie auch Auswirkungen auf nicht-mitotische Mikrotubuli haben, finden diese Nebenwirkungen hauptsächlich in Zellen und Geweben statt, die mitotisch sehr aktiv sind oder eine hohe Menge an Mikrotubulifilamenten besitzen (Dominguez-Brauer et al., 2015). Besonders periphere Neuropathien sind fatale Nebeneffekte, die vermutlich durch Bindung der Substanzen an neuronale Mikrotubulifilamente der Axone, Störungen im axonalen Transport verursachen. Eine weitere Nebenwirkung ist die Knochenmarksuppression aufgrund der Inhibition von mitotisch aktiven Zellen im Knochenmark (Sahenk et al., 1994; Jordan and Wilson, 2004). Weiterhin sind Resistenzen von Tumorzellen gegenüber Mikrotubuli-adressierenden Substanzen ein großes Problem, insbesondere die Expression von P-Glycoprotein, einem ABC-Transporter, der als Efflux-Pumpe Taxane und Vincaalkaloide aktiv aus der Zelle transportiert. Auch die vermehrte Expression der  $\beta$ III-Isoform von Tubulin, die verringerte Bindungsaffinitäten zu Taxanen zeigt, kann zur Resistenz der Zelle beitragen (Morris and Fornier, 2008).

Aufgrund der genannten Nachteile der Adressierung von Mikrotubulifilamenten ist die Suche nach neuen Wirkstoffen, deren Zielproteine spezifisch in der Mitose aktiv sind, Gegenstand derzeitiger Forschungsbemühen (Jackson et al., 2007). Einer dieser Ansätze ist die Inhibition der CDKs, die im Komplex mit ihren jeweiligen regulatorischen Cyclinen das Fortschreiten im Zellzyklus bewirken. Hierzu wurden mehr als 30 Substanzen entwickelt, von denen bereits ein Drittel in klinischen Studien getestet wurde. Der Großteil adressiert dabei die ATP-Bindetasche der CDKs und blockiert verschiedene CDKs, was zu Zellzyklusarresten am G<sub>1</sub>/S und G<sub>2</sub>/M Übergang führt. Als weiteres Ziel in der Krebstherapie sind die Aurorakinasen A, B und C (AURKA, AURKB, AURKC) zu nennen. AURKA ist in verschiedene Prozesse eingebunden, die zum Aufbau des Spindelapparates führen, darunter die Separierung der Zentrosomen während der Prophase (Barr and Gergely, 2007). AURKB ist u.a. in die Detektion der Kinetochor-Bindung der Mikrotubuli während der Metaphase involviert und trägt damit zur Integrität des SAC bei. Weiterhin übernimmt sie Funktionen in der folgenden Zytokinese (Malumbres, 2011). Die bisher entwickelten Aurorakinase-Inhibitoren zeigten in verschiedenen Krebszelllinien und Xenograft-Modellen vielversprechende Ergebnisse, konnten jedoch in klinischen Studien nur geringe Effekte auf hämatologische maligne Erkrankungen und solide Tumoren zeigen. Die Nebenwirkungen entsprachen denen von klassischen Therapien mit Mikrotubuli adressierenden Substanzen (Dominguez-Brauer et al., 2015). Eine weitere Familie an mitotischen Kinasen, die als Zielproteine in der Krebsforschung untersucht werden, sind die Polo-like Serin/Threonin Kinasen. Es sind fünf verschiedene Polo-like Kinasen (PLK1-5) bekannt, von denen die PLK1 sowohl die best

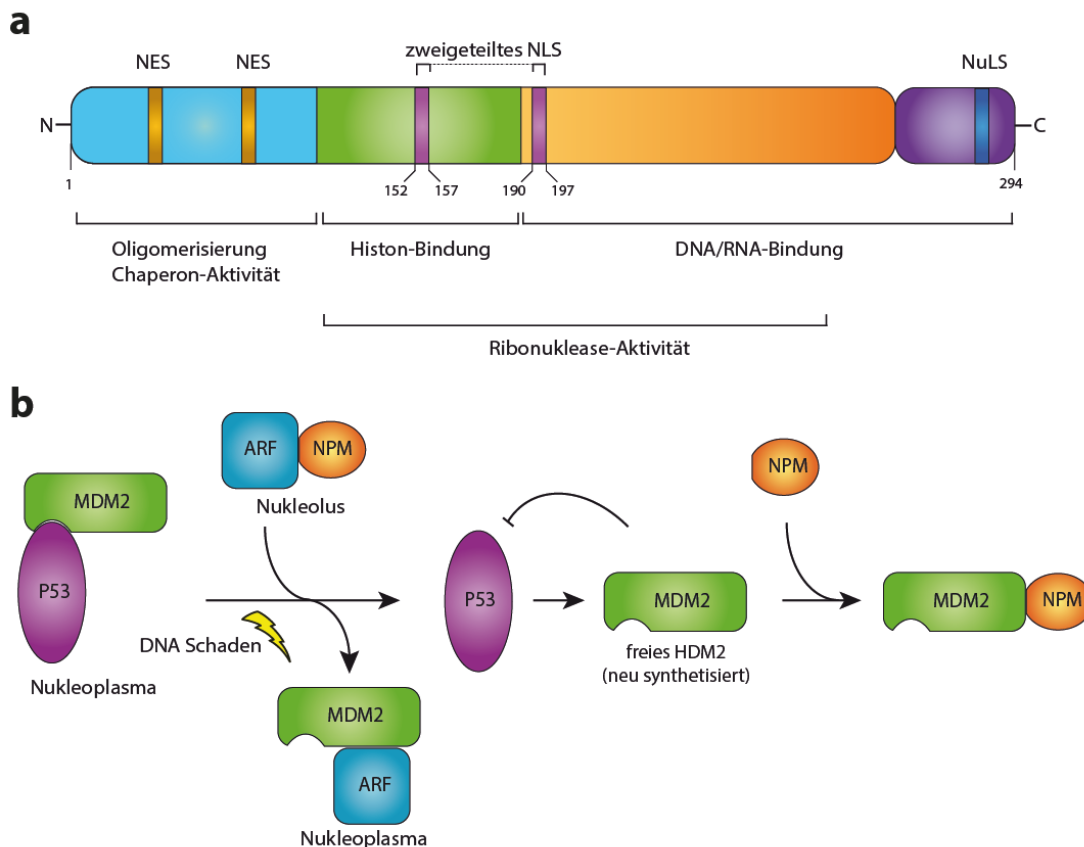


untersuchte ist, als auch das vielversprechendste Zielprotein (Strebhardt, 2010). PLK1 wird nur in mitotisch aktiven Zellen exprimiert und die höchste Proteinmenge kann während der späten G<sub>2</sub>- und M-Phase detektiert werden. Durch Aktivierung von Cyclin B und CDC25 ist sie für den G<sub>2</sub>/M-Übergang verantwortlich. Weiterhin spielt die PLK1 eine Rolle in der Reifung des Zentromers, dem Aufbau des bipolaren Spindelapparates, dem Spindelkontrollpunkt sowie dem Austritt aus der Mitose und der Zytokinese. Eine weitere Gruppe potentieller Zielproteine stellt die Familie der mitotischen Kinesine dar. Kinesine sind Motorproteine, die aus einem langen coiled-coil Teil mit einer Cargoprotein-Bindedomäne und einer globulären Kopf-Domäne bestehen. Die aus der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie nutzen Kinesine zur mechanischen Fortbewegung an Mikrotubulifilamenten. Neben dem Transport von Vesikeln und Organellen sorgen Mitose-spezifische Kinesine für die Separation der Zentrosomen, den Aufbau des Spindelapparats und die Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseebene (Sarli and Giannis, 2008). Bis heute sind mindestens 12 Kinesine bekannt, die in die Mitose involviert sind. Die Inhibition des Kinesins Eg5 (KIF11) mit dem allosterisch bindenden Molekül Monastrol zeigt die Ausbildung von monopolen Spindeln und einen Arrest der Zellen in der Mitose, wohingegen in Interphase-Zellen kein Einfluss auf das Zytoskelett beobachtet werden (Mayer et al., 1999). Weitere Kinesine bleiben jedoch Gegenstand intensiver Forschungsbemühen wie beispielsweise CENP-E und HSET (Myers and Collins, 2016). Weitere Zielproteine, deren Adressierung die genomische Instabilität von Krebszellen ausnutzen könnte, sind Kinasen der NEK-Familie (*never-in-mitosis Aspergillus (NIMA)-related kinases*) sowie die Kinasen MASTL (*Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase-like*) und HASPIN (*Haploid germ cell-specific nuclear protein kinase*). Dabei hat die Funktion aller genannten Kinasen Auswirkungen auf den korrekten Aufbau und die Funktion des Spindelapparats. Das Zentrosom ist verantwortlich für die Organisation der Mikrotubuli und besteht aus zwei Zentriolen, die von perizentriolarem Material umgeben sind. Während Durchlaufens des Zellzyklus besitzt das Zentrosom einen eigenen Zyklus. Parallel zur Replikation der DNA in der S-Phase beginnt der Zentrosomenzyklus. Zwischen der späten S-Phase und der frühen G<sub>2</sub>-Phase wird das Zentrosom dupliziert, bevor es separiert wird um die beiden Spindelpole zu bilden, die Ausgangspunkt für die Bildung der mitotischen Mikrotubuli sind. Die korrekte Ausführung dieser Vorgänge ist dabei von großer Bedeutung, da hiervon die ordnungsgemäße Separierung der Schwesterchromatiden während der Anaphase und demnach die genomische Stabilität der Zelle abhängt. Die Deregulation der genannten mitotischen Kinasen kann Spindeldefekte und die fehlerhafte Aufteilung der Chromosomen verursachen und damit für

die Tumorenbildung verantwortlich sein. Die bereits beschriebene Erhöhung der genomischen Instabilität durch Adressierung der mitotischen Kinasen könnte den Zelltod in Krebszellen forcieren (Vitale et al., 2011; Dominguez-Brauer et al., 2015).

### 2.3.4 NPM als Zielprotein in der Krebsforschung

Nucleophosmin (NPM, B23, Numatrin, NO38) ist ein ubiquitär exprimiertes Phosphoprotein, das zur Familie der Nucleoplasmine gezählt wird. NPM ist hauptsächlich in den Nucleoli lokalisiert, kann aber zwischen Nucleus und Zytoplasma pendeln. NPM ist in diverse zelluläre Prozesse eingebunden, wie die Ribosomen-Biogenese, die DNA-Reparatur und Stressantwort sowie die Zentrosomenduplikation. Weiterhin ist NPM sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor beschrieben, abhängig von Zelltyp und Expressionsleveln. So konnte eine erhöhte NPM-Expression mit verschiedenen soliden Tumoren in Verbindung gebracht werden, während ein Funktionsverlust NPMs in hämatologischen Krankheiten beobachtet werden konnte. Als nukleäres Chaperon besitzt NPM eine saure Domäne, die für die Chaperon-Funktion und Oligomerisierung von NPM verantwortlich ist.



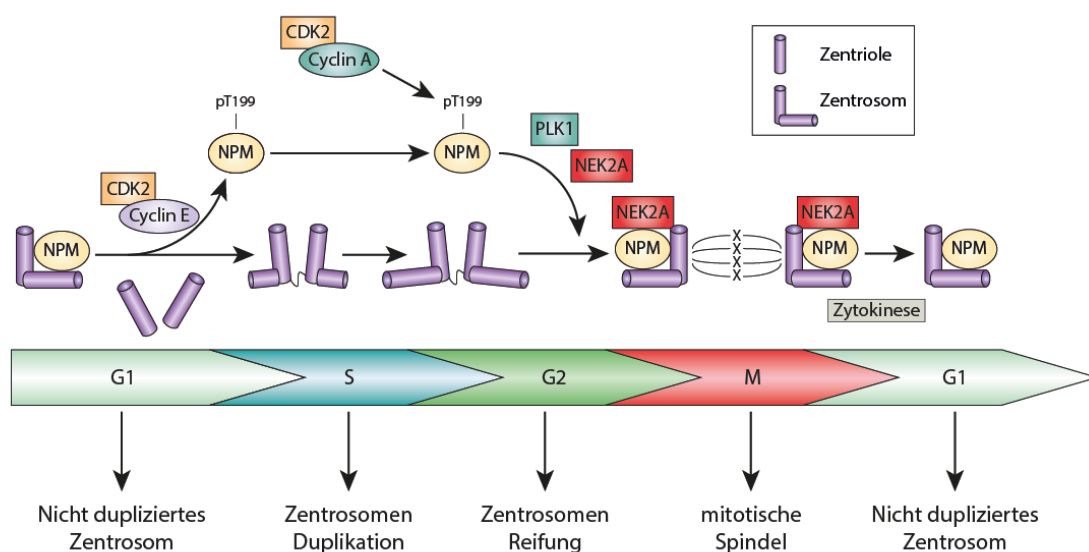
**Abbildung 2.3** Domänenstruktur von NPM und Funktion von NPM in der Reparatur von DNA-Schäden. a) NPM besitzt ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (NLS), zwei Kernexportsignale (NES) und ein nukleoläres Lokalisationssignal (NuLS). N-terminal befinden sich die Funktionalitäten für die Oligomerisierung und die Chaperon-Aktivität in einer unpolaren Domäne (blau). Die Histon-Bindedomäne befindet sich in einer sauren Domäne (grün) und die DNA-Bindedomäne in einem basischen Cluster (orange). Der C-Terminus beherbergt das NuLS in einer aromatischen Region (violett). Abbildung modifiziert nach (Grisendi et al., 2006). b) Model für den Einfluss von NPM auf die Reparatur von DNA-Schäden.

DNA-Schäden stören die ARF–NPM-Interaktion im Nukleolus, was zur Relokalisation von ARF in das Nukleoplasma führt, wo es an MDM2 bindet und damit die durch MDM2 vermittelte K48-Polyubiquitinierung von P53 unterbindet. Das Signal für einen Zellzyklusarrest (oder apoptotischen Zelltod), hervorgerufen durch stabilisiertes P53, wird durch die Bindung von NPM an freigesetztes oder neu synthetisiertes MDM2 aufrechterhalten. Abbildung modifiziert nach (Lee et al., 2005a).

Histon-Chaperone werden für den korrekten Zusammenbau der Nukleosomen benötigt, wo sie den Transfer von DNA auf die Histone vermitteln, um Chromatin aufzubauen. NPM bindet bevorzugt an Histon-Tetramere (H3-H4) und ist durch den Aufbau der Nukleosomen indirekt an DNA-abhängigen Prozessen, wie Replikation, DNA-Reparatur und Transkription beteiligt (Okuwaki et al., 2001). Neben der Funktion als Histon-Chaperon, besitzt NPM eine breite Chaperon-Spezifität gegenüber Proteinen, die thermisch denaturiert wurden. Die Bindung wird dabei vermutlich über exponierte hydrophobe Bereiche in denaturierten Zielproteinen und hydrophoben Bereichen innerhalb NPMs N-Terminus vermittelt. Ähnlich wie bei anderen bekannten Chaperonen ist die Assoziation/Dissoziation von NPM und Bindungspartnern ATP-unabhängig (Szebeni and Olson, 1999). In Zellen liegt NPM hauptsächlich in Pentameren vor, die sich wiederum zu Decameren mit einem Molekulargewicht von ca. 355 kDa zusammenlagern. Die Oligomerisierung wird dabei über die Oligomerisierungsdomäne im N-Terminus von NPM vermittelt (Hingorani et al., 2000). Der NPM-Decamer dient zunächst als Bindungsplattform für den H3/H4-Tetramer, bevor durch Anlagerung der beiden H2A–H2B-Heterodimere das fertige Nukleosom entsteht (Dutta et al., 2001). NPM besitzt weiterhin sowohl ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal (NLS), als auch zwei Kernexportsignale (NES), die das Pendeln zwischen Nukleus und Zytoplasma ermöglichen. Die NPM-Fraktion in den Nukleoli ist in die Transkription von rRNA-Genen involviert, die zum Aufbau der ribosomalen Untereinheiten dienen. Dies konnte durch Knockdown von NPM in Humanzellen und eine anschließende verringerte Transkription von rRNA-Genen gezeigt werden (Murano et al., 2008). Für NPM sind weitere Funktionen in der Kontrolle des Zellzyklus und dem Zellüberleben bekannt. Hauptsächlich beruhen diese Beobachtungen auf den Interaktionen NPMs mit den beiden Tumorsuppressoren P53 und ARF (*alternative reading frame*). Bei Überexpression von NPM in Fibroblasten konnte eine Stabilisierung von P53 beobachtet werden einhergehend mit der Einleitung der zellulären Seneszenz. Die Herunterregulierung von NPM führte zur Destabilisierung von P53 und einer höheren Anfälligkeit der Zellen für einen P53-abhängigen Zellzyklusarrest in Folge von verschiedenen Stresstimuli (Colombo et al., 2002). Weitere Studien weisen bei NPM-Überexpression auf eine höhere Resistenz von Zellen gegenüber UV- und ionisierender Strahlung sowie Hypoxie hin. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf eine erhöhte DNA-Reparatur in NPM-überexprimierenden Zellen zurückzuführen ist (Wu et al., 2002). In diesem Zusammenhang konnte die physiologische Funktion NPMs auf genotoxischen Stress

aufgeklärt werden. P53 wird im Nukleoplasma durch die E3-Ligase MDM2 ubiquitiniert und in der Folge proteasomal degradiert. Unter UV-Stress löst sich der NPM-ARF-Komplex in den Nukleoli und ARF kann im Nukleoplasma an MDM2 binden (Abbildung 2.3b). Als Folge wird P53 stabilisiert, was zu einem Zellzyklusarrest oder dem apoptotischen Zelltod führen kann. Durch Bindung von NPM an freigesetztes oder neu synthetisiertes MDM2 im Nukleoplasma wird die Reassoziaton von P53 und MDM2 weiter unterbunden, wodurch dieser Effekt noch verstärkt wird (Lee et al., 2005a). Generell wird vermutet, dass NPM als Hauptinteraktor von ARF wesentlich zu dessen Lokalisation im Nukleolus und dessen Stabilität in der Zelle beiträgt (Colombo et al., 2011). In *NPM<sup>-/-</sup>*-Zellen konnten dementsprechend neben sehr geringen ARF-Proteinleveln auch kein nukleoläres ARF nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in Zellen, die mit ARF-Mutanten transfiziert wurden, die nicht mehr an NPM binden können, eine schnelle Degradation von ARF und eine verringerte Proliferation beobachtet werden (Colombo et al., 2011). Interessant ist auch NPMs Funktion innerhalb der Zentrosomen-Reifung (Abbildung 2.4). Vor dem Eintritt in die Mitose dupliziert sich das Zentrosom genau einmal, um die beiden Pole der mitotischen Spindel formen zu können. In tierischen Zellen wird die Duplikation durch die Phosphorylierung von NPM an T199 durch den CDK2-Cyclin E-Komplex vermittelt (Okuda et al., 2000). Die Phosphorylierung in der späten G<sub>1</sub>-Phase ist für die Dissoziation NPMs vom Zentrosom verantwortlich und erlaubt im Folgenden die Duplikation des Zentrosoms. Es wird vermutet, dass zentrosomales NPM die Zelle vor einer Überduplikation der Zentrosomen schützt und somit den G<sub>2</sub>-M-Übergang ermöglicht (Zatsepina et al., 1999). In Übereinstimmung damit, konnten in Zellen, die die nicht-phosphorylierbare NPMT199A Mutante exprimieren, Defekte in der Duplikation der Zentrosomen beobachtet werden, die zu einer fehlerhaften Mitose führten (Tokuyama et al., 2001). Während Duplikation und Reifung der Zentrosomen wird die Reassoziaton von NPM mit dem Zentrosom über die Phosphorylierung an T199 durch CDK2-Cyclin A aufrechterhalten. Wenn sich zu Beginn der Mitose die Kernmembran auflöst, lokalisiert NPM wieder an die Zentrosomen, wo es erneut eine ungewollte Überduplikation der Zentrosomen verhindert. Es wrd vermutet, dass für diese Relokalisation an die Zentrosomen die beiden Kinasen PLK1 und NEK2A verantwortlich sind. Für NPM wurde bereits die PLK1-abhängige Phosphorylierung an Serin 4 gezeigt, deren Bedeutung für die Zentrosomenduplikation und -Segregation in Mutationsstudien bestätigt werden konnte (Zhang et al., 2004b). Nach erfolgreicher Zytokinese und Eintritt in die G<sub>1</sub>-Phase beginnt der Zentrosomenzyklus von Neuem (Lim and Wang, 2006). Die Assoziaton NPMs an die Zentrosomen zu Beginn der Mitose ist von der Interaktion mit dem RAN-CRM1-Komplex

abhängig. Der Exportrezeptor CRM1 bindet das Kernexportsignal (NES) von NPM und vermittelt so mithilfe des Regulators RAN den Transport an die mitotischen Zentrosomen. In Einklang mit diesem Modell für den Kernexport von NPM konnte bei Inhibition des CRM1-abhängigen Transports in Zellen mittels Leptomycin B (LMB) eine Überduplikation der Zentrosomen beobachtet werden, einhergehend mit dem Fehlen von NPM an den Zentrosomen innerhalb der Mitose. Gleichzeitig konnten in NPM-defizienten Zellen überzählige Zentrosomen detektiert werden, deren Zahl sich durch ektope Expression von Wildtyp-NPM, jedoch nicht durch eine NPM-Mutante mit mutiertem NES, wieder auf Normalniveau zurück regulieren ließ (Wang et al., 2005).

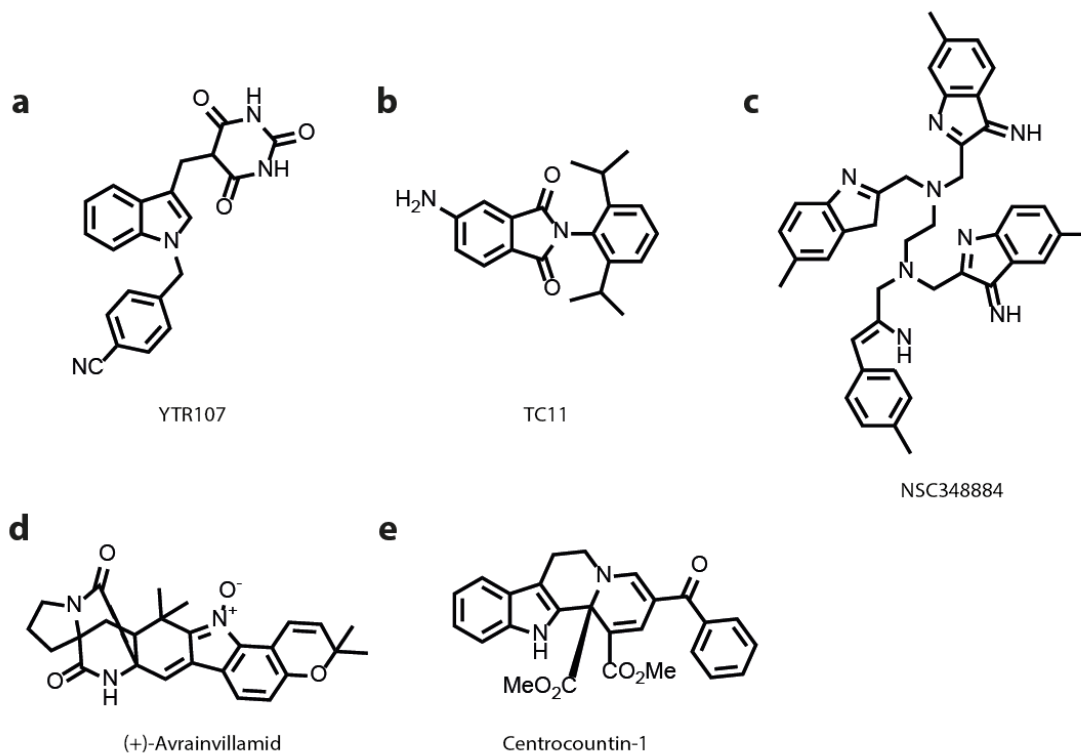


**Abbildung 2.4** Schema des Einflusses von NPM auf die Zentrosomenduplikation und die Mitose. In der frühen G<sub>1</sub>-Phase dissoziiert NPM vom Zentrosom nach Phosphorylierung durch CDK2-Cyclin E. Ohne gebundenes NPM können sich die Zentriolen voneinander trennen, um sich anschließend zu duplizieren. Während der Zentrosomenduplikation und Zentrosomenreifung in der S- und G<sub>2</sub>-Phase wird die Reassoziierung von NPM an die Zentrosomen durch die Phosphorylierungsaktivität von CDK2-Cyclin A verhindert. Nach Auflösung der Kernmembran zu Beginn der M-Phase kann NPM abhängig von der Phosphorylierungsaktivität von PLK1 und NEK2A an die Zentrosomen der mitotischen Spindel binden, um eine erneute Duplikation der Zentrosomen zu verhindern. Nach erfolgreicher Zytokinese beginnt der Zentrosomenzyklus in der folgenden G<sub>1</sub>-Phase von Neuem. Abbildung modifiziert nach (Grisendi et al., 2006).

Die Rolle NPMs in der Tumorentstehung ist nicht eindeutig. Wie zu Beginn erwähnt, wird NPM eine Rolle als Protoonkogen und als Tumorsuppressor zugeschrieben. Generell kann ein erhöhtes Zellwachstum und eine erhöhte Proliferationsrate sowie Inhibition der Differenzierung und Apoptose in Tumorzellen mit einer NPM-Überexpression in Verbindung gebracht werden. Die Antwort auf proliferative Signale kann dabei über den Transkriptionsfaktor und das Protoonkogen MYC1 vermittelt werden, für das das *NPM*-Gen ein direktes transkriptionelles Ziel ist. NPM selbst kann in der Folge die DNA-Synthese über die DNA Polymerase  $\alpha$  aktivieren, somit den Zellzyklus-Ablauf beschleunigen und über die durch NPM gesteigerte Ribosomen-Biogenese zum Zellwachstum beitragen (Colombo et al.,

2011). Neben der Steigerung des zellulären Metabolismus hat NPM diverse positive Auswirkungen auf das Zellüberleben durch die Inhibition verschiedener pro-apoptotischer Signalwege. Bei Überexpression von NPM in Zellen konnte eine Resistenz gegenüber UV-induzierter Apoptose gezeigt werden, die zur anhaltenden Proliferation der Zellen und einer erhöhten DNA-Reparatur durch Hochregulierung des Reparaturfaktors PCNA (*proliferating cellular component of the DNA*) führte. Weiterhin kann NPM durch direkte Bindung die Aktivität des Tumorsuppressors IRF1 (*interferon regulatory factor 1*) inhibieren, der in gesunden Zellen in den apoptotischen Zelltod und Zellzyklusarrest nach DNA-Schäden involviert ist (Kondo et al., 1997). Weitere Mechanismen durch die NPM bei Überexpression die Apoptose inhibiert sind physische Interaktionen mit den Tumorsuppressoren PKR (*Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase*) und CAD (*caspase-activated DNase*) (Pang et al., 2003)(Ahn et al., 2005). Als letzter Mechanismus bleibt die direkte Interaktion zwischen NPM und P53 zu nennen. Die Aktivität von P53 wird, wie bereits beschrieben, durch Bindung von MDM2 intensiv kontrolliert. Als Antwort auf DNA-Schäden, kann P53 durch die ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM-related kinase*) an Serin 15 phosphoryliert werden, was zur Aktivierung von Effektoren wie p21<sup>WAF1/CIP1</sup> führt und dem pro-apoptotischen Gen *BAX*, das in Zellzyklusarrest und Apoptose-Mechanismen eingebunden ist. Die Überexpression NPMs verhindert die Phosphorylierung von P53 und somit auch den folgenden Zellzyklusarrest bzw. den apoptotischen Zelltod (Li et al., 2005).

Aufgrund der Überexpression von NPM in diversen Tumoren, den damit verbundenen Auswirkungen auf die Stabilität von P53 und der folgenden Unterdrückung von apoptotischen Signalen sowie der Korrelation zwischen NPM-Expression und dem Überleben von Krebszellen, wird NPM als potentielles Ziel in der Krebstherapie angesehen. Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von NPM in Tumorzellen zu einem massiven Sterben der Zellen führte (Zhang, 2004). Neben der Überexpression von NPM in verschiedenen Tumorarten, sind auch Krebszellen bekannt, die aufgrund einer Gen-Translokation NPM-Fusionsproteine exprimieren, die potente Onkogene sind (z.B. NPM-ALK, NPM-MLF1) (Drexler et al., 2000). Weiterhin können auch Mutationen im NPM-Gen selbst onkogene Auswirkungen haben (z.B. NPMc+ Mutante) (Box et al., 2016).



**Abbildung 2.5** Strukturen bekannter kleiner Moleküle, die an NPM binden. a) Struktur von YTR107; identifiziert in einem phänotypischen Screen für kleine Moleküle, die Zellen gegenüber Bestrahlung sensibilisieren (Sekhar et al., 2011). b) Struktur des Phthalimids TC11; identifiziert in einem Screen von Thalidomid-Derivaten auf die Zellproliferation von multiplen Myelom-Zelllinien (Shiheido et al., 2012). c) Struktur von NSC348884; identifiziert in einem *in silico* Screen als Binder des NPM-Pentamers. d) Struktur von (+)-Avrainvillamid; identifiziert durch einen Pulldown-Assay mit biotinyliertem (+)-Avrainvillamid und T-47D-Zelllysats (Wulff et al., 2007b). e) Struktur von Centrocountin-1; identifiziert innerhalb eines phänotypischen Screens zur Modulation der Mitose und anschließendem Pulldown-Assay (Dückert et al., 2012).

In der Literatur sind einige NPM bindende Substanzen beschrieben, von denen das früheste Beschriebene ein Peptid des HIV-1-Rev-Proteins ist (ARRNRRRRWREYC), welches die Sequenz zur nukleolären Lokalisierung des Proteins enthält. Die Behandlung von HRasV12A transformierten Maus-Fibroblasten (Ras-3T3) mit dem Peptid in Zellkultur konnte eine Verringerung der Zellproliferation zeigen. *In vivo* konnten ebenfalls positive Effekte der Peptidbehandlung auf die Tumorgröße von Ras-abhängigen Tumoren in einem Maus-Xenograft-Modell beobachtet werden. In Zusammenhang mit den bereits beschriebenen Auswirkungen auf die DNA-Schadensantwort von Zellen bei genotoxischem Stress, konnte in Blasenkrebszellen durch Kombination mit niedrigen Dosen des HIV-1-Rev-Peptids der Effekt des Topoisomerase-Inhibitors Doxorubicin exponentiell verstärkt werden. Als Ursache für den Effekt des Peptids wird ein Einfluss auf die Aktivität und Funktion von P53 vermutet. Die erhöhte Expression P53s könnte somit für die Anti-Tumor-Aktivität des HIV-1-Rev-Peptids verantwortlich sein. (Chan et al., 2005).

Der Naturstoff (+)-Avrainvillamid konnte ebenfalls als Binder von NPM identifiziert werden. In der Zellkultur konnte die Proliferation von Tumorzellen durch die Substanz inhibiert

werden und die P53-Proteinlevel stiegen abhängig zur (+)-Avrainvillamid Konzentration. Es konnte gezeigt werden, dass (+)-Avrainvillamid eine kovalente Bindung mit Cystein 275 am C-Terminus von NPM eingeht (Wulff et al., 2007b; Wulff et al., 2007a). Eine weitere Gruppe bekannter NPM-Inhibitoren beeinflusst die Fähigkeit NPMs Oligomere zu bilden. Hierzu gehören die niedermolekularen Verbindungen YTR107 und NSC348884 (Abbildung 2.5a und c) sowie das RNA-Aptamer 1A1 (Qi et al., 2008; Jian et al., 2009; Sekhar et al., 2011). YTR107 und Derivate wurden innerhalb eines phänotypischen Screens identifiziert, der zur Suche nach Substanzen entwickelt wurde, die die Sensitivität von Zellen gegenüber genotoxischem Stress erhöhen (Reddy et al., 2010). NPM konnte mithilfe eines affinitätschromatographischen Ansatzes als Zielprotein identifiziert werden und biochemische Untersuchungen zeigten einen Einfluss der Substanz auf die Oligomerisierung NPMs (Sekhar et al., 2014). Die initial identifizierte Substanz YTR107 konnte eine NPM-vermittelte Reparatur von DNA-Schäden in Zellen verhindern. Weiterhin führte die Behandlung von Zellen mit YTR107 ohne weiteren genotoxischen Stress zur Ansammlung von DNA-Schäden, die vermutlich ebenfalls auf eine Inhibition der NPM-vermittelten DNA-Reparatur zurückzuführen sind. In Maus-Xenograft-Modellen konnte weiterhin ein positiver Einfluss von YTR107 auf das Tumorwachstum in Kombination mit Bestrahlungstherapie erfasst werden (Sekhar et al., 2011). Das innerhalb eines *in silico* Screening-Ansatzes identifizierte NSC348884 zeigt ebenfalls einen Einfluss auf die Oligomerisierung NPMs. Ähnlich wie bei dem bereits beschriebenen HIV-1-Rev-Peptid konnte auch NSC348884 einen synergistischen Effekt auf die Proliferation von Lymphomzellen bei Kombination mit Doxorubicin hervorrufen. NSC348884 zeigt weiterhin einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation und die Apoptose von Prostatakarzinomzellen (LNCaP). Die Behandlung mit Substanz war einhergehend mit erhöhten P53-Proteinleveln und der vermehrten Anwesenheit von phosphoryliertem P53 (pS15), was die Rolle NPMs als natürlichem Repressor von P53 bestätigt. NPM könnte somit die Funktion von P53 während des Zellwachstums und in Anwesenheit geringer DNA-Schäden abdämpfen (Qi et al., 2008). Auch das 2009 entwickelte RNA-Aptamer 1A1 zeigte in Zellen eine erhöhte Menge an P53, apoptotisches Zellsterben und eine gesteigerte Sensibilität der Zellen gegenüber genotoxischem Stress (Jian et al., 2009). Das Phthalimid TC11 bindet zwar an die Oligomerisierungsdomäne von monomerem NPM, die Bindung führt im Gegensatz zu den drei vorherigen Substanzen jedoch nicht zu einer Inhibition der Oligomer-Bildung von NPM (Abbildung 2.5b). Mit TC11 behandelte Zellen zeigten einen apoptotischen Zelltod und *in vivo* Tumormodelle zeigten eine signifikante Verringerung der Tumorengröße. Die



verwendeten multiplen Myelom-Zelllinien waren negativ für P53 und der Einsatz von TC11 in HeLa-Zellen zeigte keinen Anstieg der P53-Proteinlevel. Stattdessen wird angenommen, dass der apoptotische Zelltod die Folge des Einflusses von NPM auf die Zentrosomen-Integrität ist. In TC11-behandelten Zellen konnten überzählige Zentrosomen einhergehend mit einer Anreicherung von mitotischen Zellen beobachtet werden. Der Mechanismus, der zum apoptotischen Zelltod führt, könnte somit während des mitotischen Arrests anzusiedeln sein oder später aufgrund ungleichmäßiger Zellteilungen in Tochtergenerationen ausgelöst werden (Shiheido et al., 2012; Matsushita et al., 2015).

### **2.3.5 Centrocountine: Biologisch aktive Indolochinolizine**

Innerhalb der Arbeitsgruppe Chemische Biologie (MPI Dortmund) wurde abgeleitet von biologisch aktiven Naturstoffen mit Indol-Grundgerüst eine kleine Bibliothek an Indolochinolizinen synthetisiert, deren biologische Aktivität später in zellulären Versuchen festgestellt werden konnte. Aktive Indolochinolizine zeigten überzählige Spindelpole in mitotischen Zellen sowie einen Arrest in der Mitose und die Aktivierung des apoptotischen Zelltods. Mittels affinitätschromatographischen Reinigungsverfahren, konnte NPM als Zielprotein identifiziert werden. Aufgrund der Interaktion von NPM und dem Kernexportrezeptor CRM1 in der Kontrolle der Zentrosomenreifung wurde CRM1 als weiteres potentiell Zielprotein in Betracht gezogen. Beide Proteine, NPM und CRM1, konnten anschließend mittels mikroskopischer und biochemischer Verfahren validiert werden. Die Charakterisierung der aktivsten Substanz Centrocountin-1 zeigte eine etwa 5-fach längere Mitosedauer, die von multipolaren Spindeln und fehlorientierten Chromosomen in der Metaphaseebene begleitet wurde. Der apoptotische Zelltod, der bei Behandlung von Zellen mit Centrocountin-1 herbeigeführt werden konnte, scheint dabei ähnlich wie im Falle von TC11 nicht P53-abhängig zu sein, da auch Zellen von Mitosearrest und Apoptose betroffen sind, die P53-defizient sind (Pries, 2011). Vielmehr scheint die Aktivierung des Spindelkontrollpunkts und der anschließende mitotische Arrest, bei dem wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben der Zelltod-Signalweg und die Cyclin B-Degradation um ein Sterben oder Überleben der Zelle konkurrieren, für das Schicksal der Zelle verantwortlich zu sein. Die Frage welche Faktoren die Suszeptibilität der spezifischen Zelle oder Zelllinie gegenüber einem Tod durch permanente SAC-Aktivierung ausmachen, ist jedoch noch nicht geklärt (Gascoigne and Taylor, 2008). Der Mechanismus, wie eine Inhibition von NPM und CRM1 den beschriebenen zellulären Phänotyp verursacht, ist ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt. Da beide Proteine über Bindung an das Zentrosom an dessen Duplikation am Ende der

G<sub>1</sub>-Phase eingebunden sind, besteht die Möglichkeit, dass sich die unabhängige Inhibition beider Proteine akkumuliert und eine zentrosomale Überduplikation oder Fragmentierung verursacht wird. Bei hohen Konzentrationen von Centrocountin-1 konnte in diesem Zusammenhang eine Inhibition des nukleären Exports durch CRM1 beobachtet werden (Pries, 2011; Duckert et al., 2012).

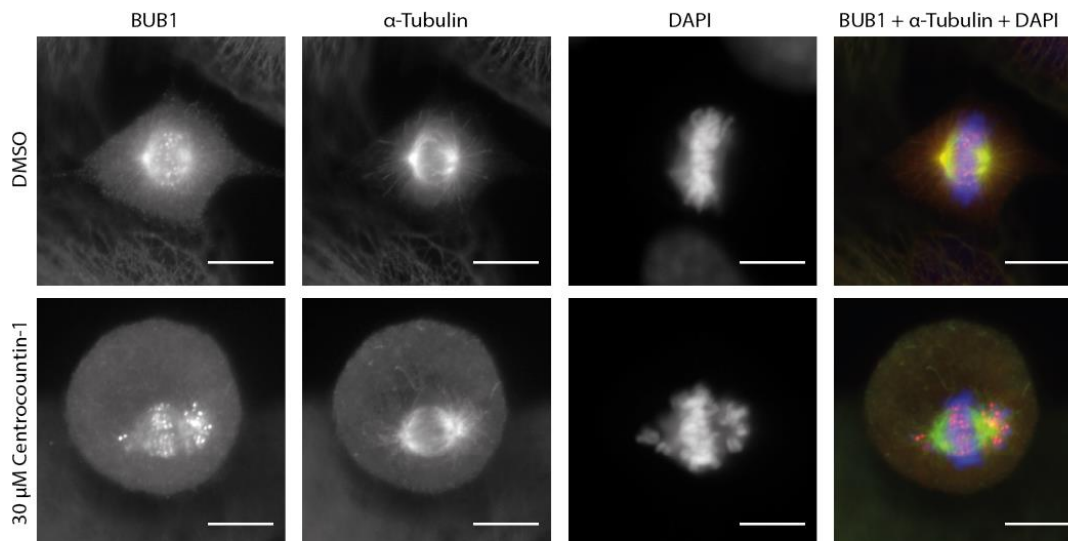
## **2.4 Zielsetzung**

Innerhalb dieser Arbeit sollte ein zellbasierter phänotypischer Screen entwickelt werden, der zur Identifizierung weiterer aktiver Centrocountin-1-Derivate verwendet werden kann. Anschließend sollte der Einfluss dieser Substanzen auf die Zellteilung untersucht werden. In weiteren Untersuchungen galt es, den Wirkmechanismus der biologisch aktiven Indolochinolizine anhand der Ursprungssubstanz Centrocountin-1 insbesondere im Hinblick auf die beiden Zielproteine NPM und CRM1 weiter zu erörtern.

## 2.5 Ergebnisse

### 2.5.1 Entwicklung eines zellbasierten Screens auf Basis eines mitotischen Markerproteins

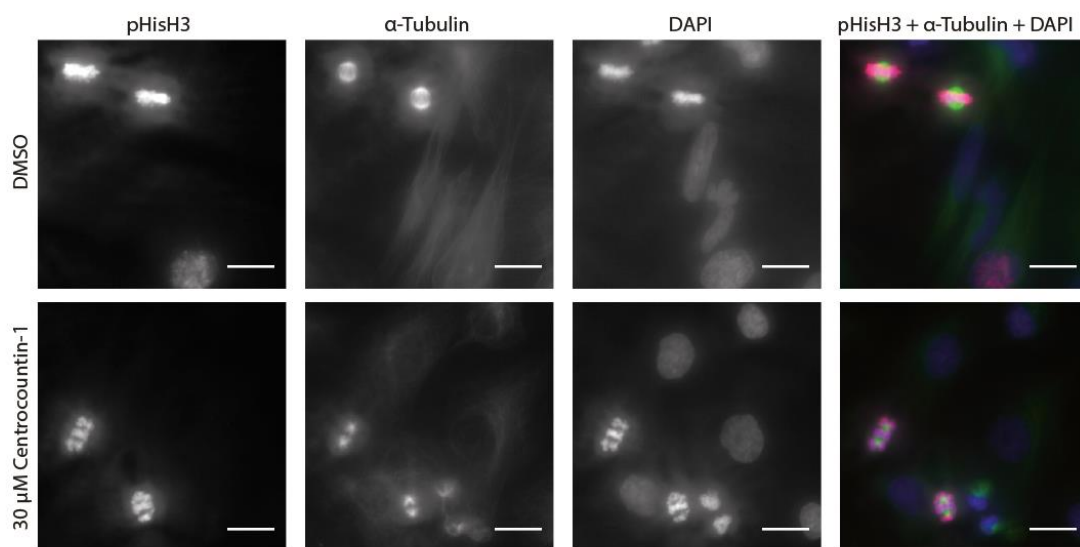
Für die Entwicklung eines Screens zur Identifizierung weiterer biologisch aktiver Centrocountin-Derivate wurde zunächst versucht das Merkmal der fehlangeordneten Chromosomen innerhalb der Metaphase von HeLa-Zellen zu nutzen. Nach Auflösung der Kernhülle während der Prometaphase sind die Chromosomen zugänglich für Mikrotubuli. In einem als *search and capture* beschriebenen Mechanismus verlängern und verkürzen sich die Mikrotubuli, die ihren Ursprung in den beiden Spindelpolen haben, um die Kinetochore der Chromosomen zu binden. Kinetochore, die nicht mit Plus-Enden der Mikrotubuli verbunden sind, werden von BUB- und MAD-Proteinen gebunden und aktivieren den SAC.



**Abbildung 2.6** Centrocountin-1 induziert die Fehllokalisierung von Chromosomen und die Bildung freier Kinetochore in der Metaphase. HeLa-Zellen wurden für 16 h mit 30  $\mu\text{M}$  Centrocountin-1 behandelt. Anschließend erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen BUB1 (rot) und  $\alpha$ -Tubulin (grün) sowie die Visualisierung zellulärer DNA mittels DAPI (blau). 63x-Vergrößerung. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ .

Bei Behandlung von Zellen mit Centrocountin-1 können fehlerhaft ausgerichtete Chromosomen während der Metaphase beobachtet werden, einhergehend mit einem Anstieg an Signalen für BUB1. Während in DMSO-behandelten Zellen die Chromosomen in der Äquatorialebene ausgerichtet sind und die Signale für BUB1 entlang selbiger liegen, zeigen sich in Substanz-behandelten Zellen BUB1-Signale in der Nähe beider Spindelpole (Abbildung 2.6). In der Theorie sollte sich die unterschiedliche Lokalisation der Chromosomen als auch der punktförmigen BUB1-Signale mittels automatischer Bildanalyse erfassen lassen, um die Zahl an Zellen mit fehllokalisierten Chromosomen innerhalb der

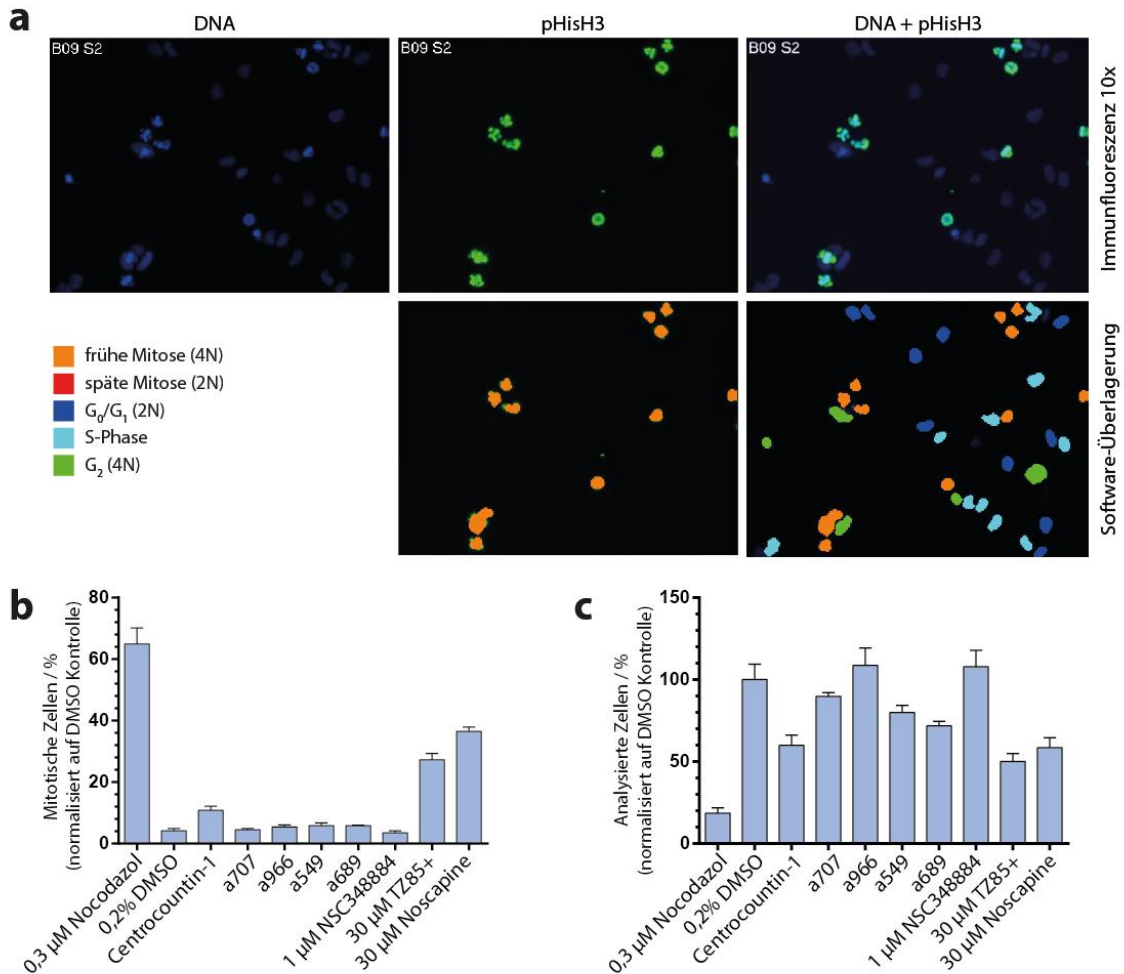
Metaphase zu quantifizieren. Aufgrund der Komplexität dieses Vorhabens in der praktischen Umsetzung wurde dieser Ansatz als Grundlage für einen Screen jedoch verworfen. Zum einen wäre die bioinformatische Analyse der Lokalisation der Chromosomen sehr aufwendig, zum anderen ergibt auch die Analyse des BUB1 Signals kein klares Ja-Nein-Ergebnis, da auch unbehandelte Zellen ein BUB1 Signal zeigen und erneut nur ein Ergebnis über die räumliche Lokalisation des Signals erreicht werden könnte. Als weiterer wesentlich praktikablerer Marker wurde die Phosphorylierung von Histon 3 an Serin 10 (pHisH3) untersucht. Zwischen Prophase und Metaphase erfolgt diese Phosphorylierung, die für die Initiation der Chromosomen-Kondensation notwendig ist, durch die Kinasen AURKA und AURKB (Crosio et al., 2002; Nowak and Corces, 2004). Am Ende der Anaphase erfolgt die Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 1 (PP1) (Prigent and Dimitrov, 2003). Der Anstieg in phosphoryliertem pHisH3 innerhalb der Mitose macht es als mitotischen Marker ideal für die Verwendung als Signalgeber innerhalb eines phänotypischen Screens, da es ein klares Ja-Nein-Signal gibt, ob sich Zellen in der Mitose befinden oder nicht.



**Abbildung 2.7** Detektion des mitotischen Markers pHisH3 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 16 h mit 30  $\mu$ M Centrocourtin-1 behandelt. Anschließend erfolgte die Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen an Serin 10 phosphoryliertes Histon H3 (rot) und  $\alpha$ -Tubulin (grün) sowie die Visualisierung von DNA (blau) mittels DAPI. 63x-Vergrößerung. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Der mitotische Marker pHisH3 ist im Gegensatz zur Detektion fehllokalisierter Chromosomen jedoch kein eindeutiges Merkmal einer gestörten Mitose. Alle mitotischen Zellen, die sich zwischen Prometaphase und Anaphase befinden sind positiv für pHisH3, somit auch Zellen, die die Mitose normal durchlaufen ohne Fehllokalisierung der Chromosomen oder einer Überduplikation der Spindelpole. Dennoch kann es durch die verlängerte Zeit, die Zellen in Anwesenheit von Centrocourtin-1 in der Mitose verbringen

(60 min unbehandelt gegenüber ca. 300 min mit Centrocountin-1) zu einer Anreicherung von mitotischen Zellen kommen. Bei Annahme einer statistischen Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus zum Zeitpunkt der Behandlung mit Centrocountin-1 und einer ungefähren Duplikationsdauer von 24 h für HeLa-Zellen, sollte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl pHisH3 positiver Zellen nach 24 h Behandlung beobachtet werden. Mithilfe eines automatisierten Mikroskop-Aufbaus und anschließender Software-basierter Quantifizierung sollte im Folgenden eine Auswahl an Testsubstanzen zur Evaluation des Assay-Setups untersucht werden.

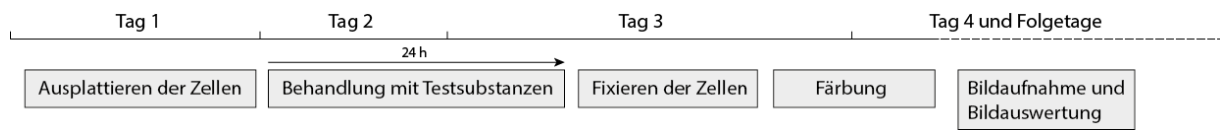


**Abbildung 2.8** Automatische Bildaufnahme und Quantifizierung mitotischer Zellen. a) HeLa-Zellen wurden in 96-Lochplatten ausgesät und am Folgetag mit 20 µM Centrocourtin-1 für weitere 24 h behandelt. Nach Färbung mitotischer Zellen mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen phosphoryliertes Histon 3 (S10) (grün) und der DNA (blau) mittels DAPI, erfolgte die automatische Bildaufnahme. Es folgte die Software-basierte (MetaMorph) Erkennung mitotischer Zellen anhand eines positiven Signals im pHisH3-Kanal und die Erkennung aller Zellen anhand des DAPI-Signals. Die Softwareüberlagerung zeigt die Erkennung mitotischer Zellen in orange und anhand des DAPI-Signals pro Fläche die Unterscheidung aller Zellen in die unterschiedlichen Zellzyklusphasen. 10x-Vergrößerung. b) Prozentualer Anteil an mitotischen Zellen in Anwesenheit verschiedener Testsubstanzen (mit Standardabweichung über drei technische Replikate; normalisiert auf DMSO-Kontrolle). Falls nicht anders angegeben wurden die Zellen mit 20 µM Substanz für 24 h behandelt. c) Die Anzahl analysierter Zellen nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen (mit Standardabweichung über drei technische Replikate; normalisiert auf DMSO-Kontrolle).

Hierfür wurden HeLa-Zellen in 96-Lochplatten mit Centrocourtin-1, sowie verschiedenen Derivaten (a707, a966, a549, a689), für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden der Tubulin-Polymerisationsinhibitor Nocodazol, der Zellen am Übergang zwischen G<sub>2</sub>- und M-Phase arretiert, sowie Noscaphine, das ebenfalls an Tubulin bindet, Mikrotubulidynamiken stört und Zellen im G<sub>2</sub>/M Übergang arretiert, verwendet (Anderson et al., 2005). Zusätzlich wurde das Noscaphine-Derivat TZ85+ eingesetzt (Zimmermann et al., 2013b) und der bekannte Nucleophosmin-Oligomerisierungsinhibitor NSC348884 (Qi et al., 2008) (Abbildung 2.5). Mithilfe eines automatischen Mikroskops wurden bei 10-facher Vergrößerung je Loch der 96-Lochplatte 9 Bilder aufgenommen, was bei 3 Löchern je

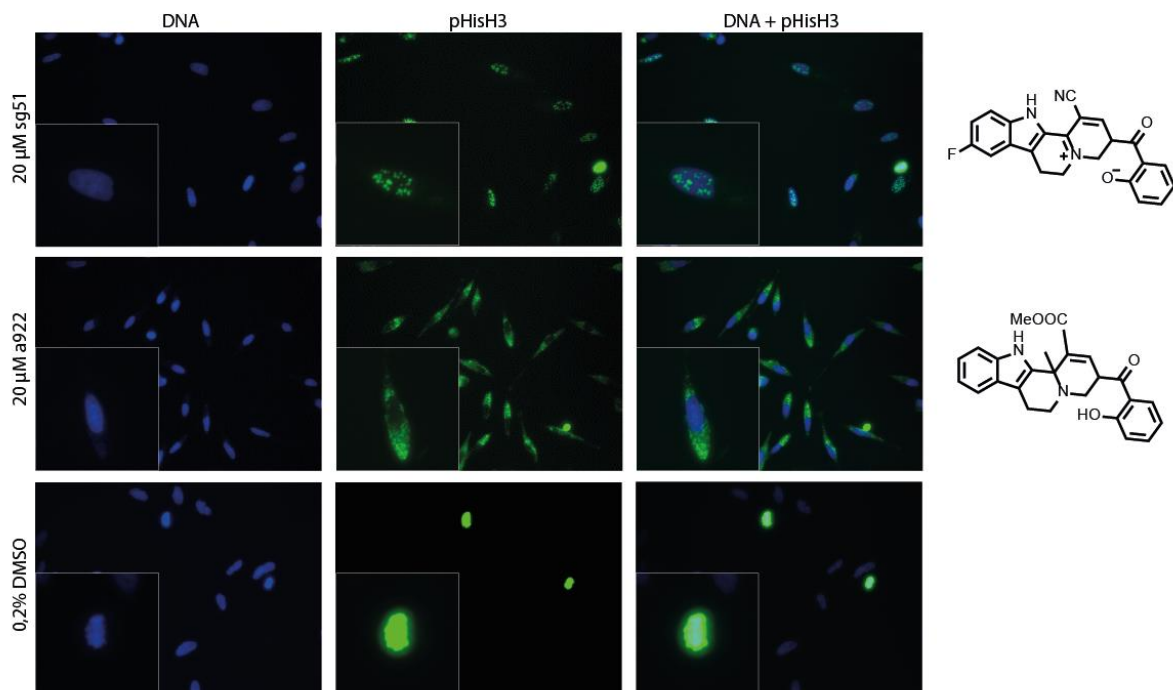
Bedingung zu insgesamt 27 Bildern pro Substanz führte und einer Analyse von ca. 1200 Zellen. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Bilder mit der Software MetaMorph (Visitron), dabei wurden alle Zellen pro Bild über ihr Signal im DAPI-Kanal erfasst. Analyse Artefakte wie Punkte und überlagerte Zellen wurden durch Definition der minimalen und maximalen Größe eines Zellkerns aus der automatischen Analyse ausgeschlossen. Weiterhin ist MetaMorph in der Lage, anhand des DAPI-Signals Zellen einer Zellzyklusphase zuzuordnen. Dabei berechnet es die Intensität des DAPI-Signals im Verhältnis zur Fläche und kann so die Menge der DNA pro Zelle berechnen und anschließend die entsprechende Zellzyklusphase schätzen. Da innerhalb dieses Versuchsaufbaus jedoch lediglich zwischen mitotischen Zellen und Interphase-Zellen unterschieden werden musste, wurde die genaue Einteilung der Zellzyklusphasen vernachlässigt. Durch Analyse der Bilder im pHisH3-Kanal konnten die entsprechenden mitotischen Zellen gezählt werden. MetaMorph kann zwischen zwei Phasen der Mitose unterscheiden. Auch hier ist die Intensität des Signals pro Fläche ausschlaggebend für die Einteilung in frühe oder späte Mitose. Vor Separierung der Schwesterchromatiden und dem Zug der Chromatiden zu den Spindelpolen werden die Zellen anhand ihres Signals im pHisH3-Kanal als früh-mitotisch klassifiziert, während Zellen in der späten Metaphase und Anaphase, bei denen sich die Schwesterchromatiden bereits getrennt haben, als spät-mitotisch klassifiziert werden. Da die Trennung mitotischer Zellen in frühe oder späte Mitose für diesen Screen nicht relevant war, wurden auch hier alle mitotischen Zellen ohne weitere Unterteilung analysiert. In Abbildung 2.8b ist die Auswertung einer 96-Lochplatte mit Testsubstanzen, die die Fraktion an mitotischen Zellen relativ zu allen analysierten Zellen prozentual angibt, dargestellt. Zellen die mit DMSO behandelt wurden zeigten einen Anteil an mitotischen Zellen von ca. 5%, während Zellen, die mit 0,3  $\mu\text{M}$  Nocodazol behandelt wurden über 60% Zellen in der Mitose zeigten. Das biologisch aktive Indolochinolizin Centrocountin-1 zeigte ca. 13% mitotische Zellen. Die inaktiven Indolochinolizine (a707, a966, a549, a689) zeigten Werte vergleichbar mit denen von DMSO-behandelten Zellen (Abbildung 2.8b). Gleichzeitig mit der Berechnung der mitotischen Zellen konnte durch Auswertung aller analysierten Zellen nach 24 h Substanzbehandlung die Gesamtmenge an Zellen untersucht werden. Während in den Proben in Anwesenheit von DMSO und den inaktiven Indolochinolizinen ca. 1000 - 1500 Zellen analysiert wurden, konnten in den Proben mit aktiven Substanzen und den Positivkontrollen deutlich weniger Zellen anhand ihres DAPI-Signals detektiert werden. Dies ist auf eine Kombination der Auswirkungen des Mitosearrests und einer eventuellen Toxizität der verwendeten Substanzen zurückzuführen. Für die finalen Screening-Bedingungen wurde die Konzentration der zu testenden Substanzen auf 20  $\mu\text{M}$  festgelegt, zusätzlich wurden als

Kontrollen neben DMSO die Ausgangssubstanz Centrocountin-1 sowie 0,3  $\mu\text{M}$  Nocodazol eingesetzt. In Abbildung 2.9 ist der Ablauf des Screenings schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.9** Schema für die Durchführung des phänotypischen Screens zur Identifizierung aktiver Centrocountin-Derivate. An Tag 1 erfolgte die Ausplattierung der Zellen. Nach einer ca. 24-stündigen Adaptionphase erfolgte die Behandlung mit den zu testenden Substanzen für weitere 24 h. Nach Fixierung der Zellen an Tag 3 wurden die Zellen mit spezifischem Antikörper gegen phospho-Histon 3 (S10) für mindestens 1 h oder über Nacht behandelt. Am Folgetag erfolgte die Inkubation mit einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper und DAPI. Ab diesem Zeitpunkt konnten die 96-Lochplatten bei 4°C bis zur Aufnahme mit dem automatischen Mikroskop bei 4° bis zu einer Woche gelagert werden. Die Bildauswertung erfolgte ebenfalls automatisch im Anschluss an die Bildaufnahme, mit geringen manuellen Feinjustierungen für jede 96-Lochplatte.

Im Anschluss an die Quantifizierung der Bilddaten erfolgte die manuelle Filterung von falsch positiv getesteten Substanzen, die eine hohe Anzahl an mitotischen Zellen zeigten, die jedoch auf Auffälligkeiten in den analysierten Bildern zurückzuführen waren. In Abbildung 2.10 sind zwei Beispielsubstanzen aufgeführt, die in der automatischen Quantifizierung eine hohe Anzahl an mitotischen Zellen zeigten, die jedoch auf ein unspezifisches Signal des pHisH3-Antikörpers zurückzuführen sind.



**Abbildung 2.10** Zwei Beispiele für falsch positiv identifizierte Substanzen. Dem Screening-Setup entsprechend wurden HeLa-Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  sg51 oder a922 für 24 h behandelt. Nach Färbung der DNA (blau) und des phosphorylierten Histons H3 (S10) (grün) erfolgte die automatische Bildaufnahme und die Quantifizierung der gewonnenen Bilddaten. 10x-Vergrößerung.

Im Fall der getesteten Substanz sg51 zeigt jeder Nukleus der behandelten Zellen ein fragmentiertes pHisH3 Signal, das sich zu dem Signal in mitotischen Zellen unterscheidet und



bei Vergleich mit dem DAPI-Signal auch in Interphase-Zellen detektiert wird (vergleiche Abbildung 2.7 und DMSO-Kontrolle). Die Substanz a922 zeigte ebenfalls ein pHisH3-Signal in fast allen untersuchten Zellen unabhängig von deren Zellzyklusphase. Hier ist das pHisH3-Signal jedoch im gesamten Zytosol verteilt. In beiden Fällen führte die automatische Quantifizierung zu einer fehlerhaften Zählung von Interphase-Zellen (Abbildung 2.10).

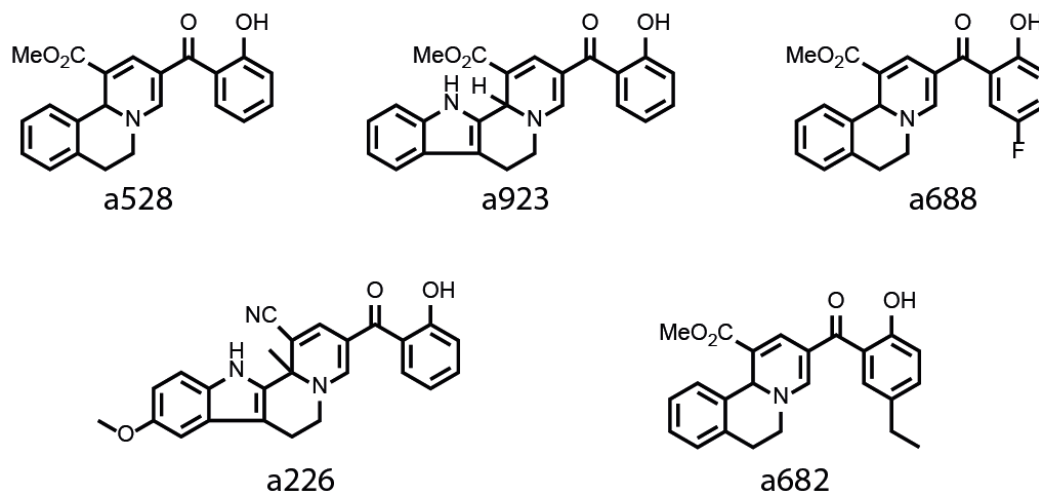
## 2.5.2 Phänotypisches Screening von Centrocountin-Derivaten

Der entwickelte phänotypische Screen wurde anschließend zum Screening einer kleinen spezialisierten Bibliothek von Centrocountin Derivaten genutzt, die von V. Eschenbrenner-Lux (MPI Dortmund) innerhalb der Abteilung synthetisiert wurde. Insgesamt wurden ca. 150 Substanzen untersucht, von denen Substanzen als aktiv berücksichtigt wurden, die eine doppelt so hohe Anzahl an mitotischen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigten (entspricht 8% - 10% mitotische Zellen). 12 der getesteten Substanzen überschritten den festgelegten Schwellenwert, wobei die potenteste Substanz a528 bei einer Substanzkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  eine 7,8-fache Erhöhung in der Anzahl mitotischer Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und eine ca. zweifache Erhöhung zu Centrocountin-1-behandelten Zellen bei gleicher Konzentration zeigte (Tabelle 2.1 und Abbildung 2.11)

**Tabelle 2.1** Untersuchte Substanzen, die den Schwellenwert (normalisierter mitotischer Index) für die Anzahl an mitotischen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mindestens um den Faktor 2 überschreiten. Zum Vergleich wurde Centrocountin-1 mit aufgeführt. Substanzen, die mit einem Stern (\*) gekennzeichnet sind wurden mit einer Substanzkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  getestet.

Substanz	normalisierter mitotischer Index
a528	7,8
a923	5,7
a688*	4,4
a226	3,9
a682*	3,6
Centrocountin-1	3,3
a703	3,0
mv31	2,8
sg37	2,6
a813	2,6
a530/m429*	2,5
a710	2,4
a501f1*	2,0

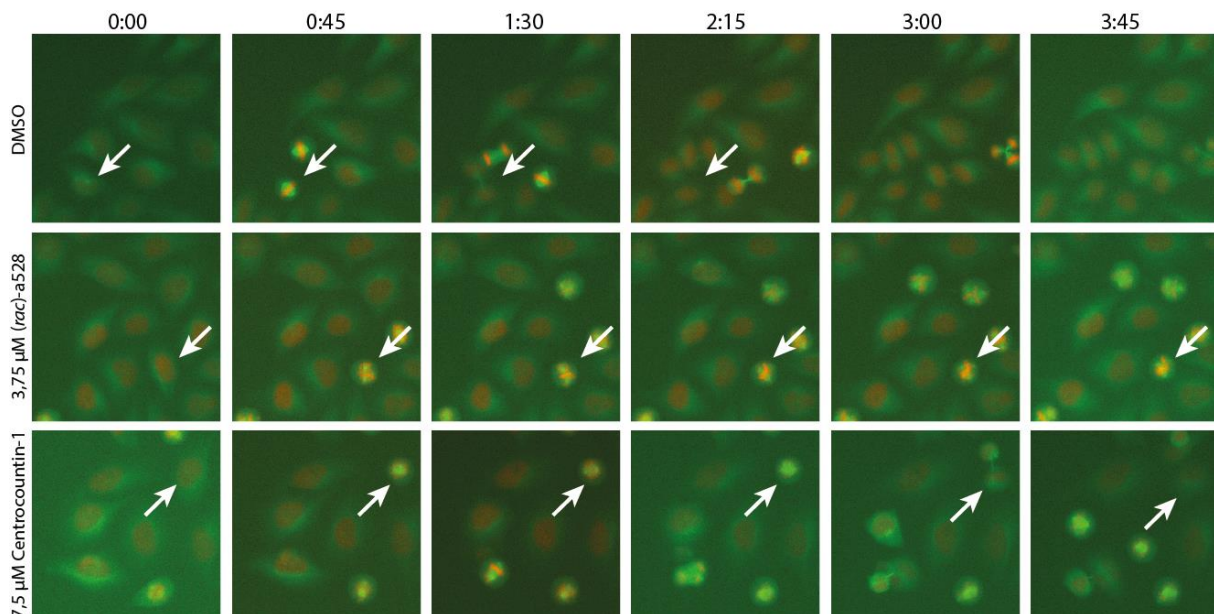
Parallel zum Screening der Substanzbibliothek wurde das Screening-Setup an das Lead Discovery Center (Dortmund) der Max-Planck-Gesellschaft transferiert, wo weitere Centrocountin-Derivate synthetisiert und getestet wurden.



**Abbildung 2.11** Strukturen der 5 aktivsten Centrocountin-Derivate.

### 2.5.3 Charakterisierung des potentesten Centrocountin-Derivats a528

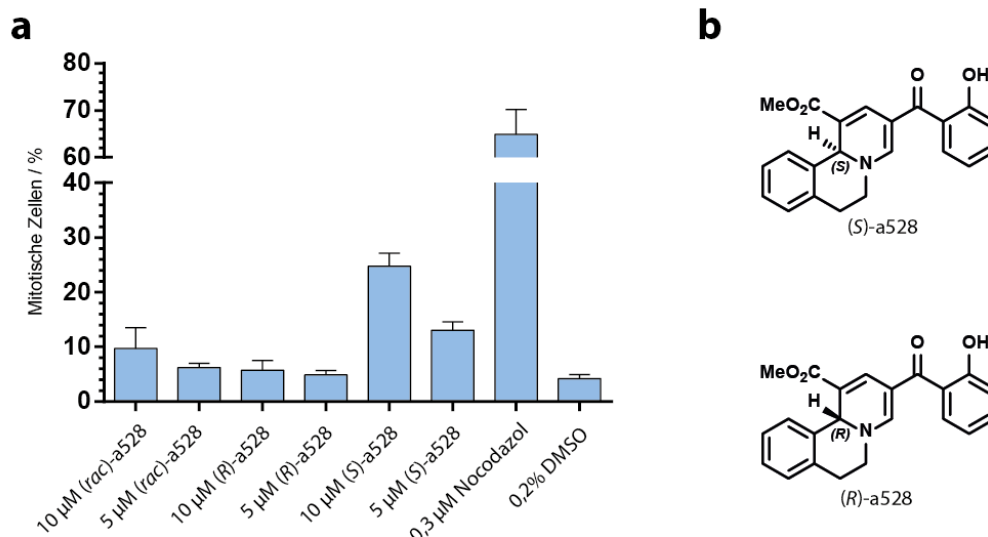
Für die weitere Charakterisierung der potentesten Substanz, a528, aus dem Screening wurde der Einfluss der Substanz auf die Mitosedauer mithilfe von Lebendzellmikroskopie untersucht. Hierfür wurden HeLa-H2B-mCherry-GFP- $\beta$ -Tubulin-Zellen (Neumann et al., 2010), die stabil mCherry-markiertes Histon H2B und GFP-markiertes  $\alpha$ -Tubulin exprimieren, genutzt. Unter Verwendung von 3,75  $\mu$ M a528 wurden alle 45 min fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht.



**Abbildung 2.12** Lebendzellmikroskopie von HeLa-H2B-mCherry-GFP- $\beta$ -Tubulin-Zellen, die mit 3,75  $\mu\text{M}$  a528, 7,5  $\mu\text{M}$  Centrocountin-1 oder DMSO behandelt wurden. Die Pfeile zeigen mitotische Zellen. Die Aufnahme von Bildern erfolgte automatisch alle 45 min bei 10-facher Vergrößerung. Histon H2B = rot,  $\alpha$ -Tubulin = grün. Zeitformat: h:mm.

Während DMSO-behandelte Zellen ca. 60 min zum Durchlaufen von Mitose und Zytokinese benötigten ist bei mit a528 behandelten Zellen die Mitose selbst nach 3 h noch nicht abgeschlossen. Als Kontrollsubstanz wurde Centrocountin-1 mitgeführt, das in der eingesetzten Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  ebenfalls eine deutlich verlängerte Zellteilungsdauer zeigte.

Sowohl für das Screening als auch die Lebendzelleexperimente wurde ein racemisches Gemisch von a528 verwendet. Da im Fall der Centrocountine nur für das (*R*)-Enantiomer (Centrocountin-1) eine biologische Aktivität gemessen werden konnte (Dückert et al., 2012), sollte für a528 ebenfalls eine etwaige Enantiomerenspezifität ermittelt werden. Hierfür wurden die beiden Enantiomere innerhalb des Screening-Setups miteinander verglichen und ihre Auswirkungen auf die Anzahl mitotischer Zellen untersucht (Abbildung 2.13).



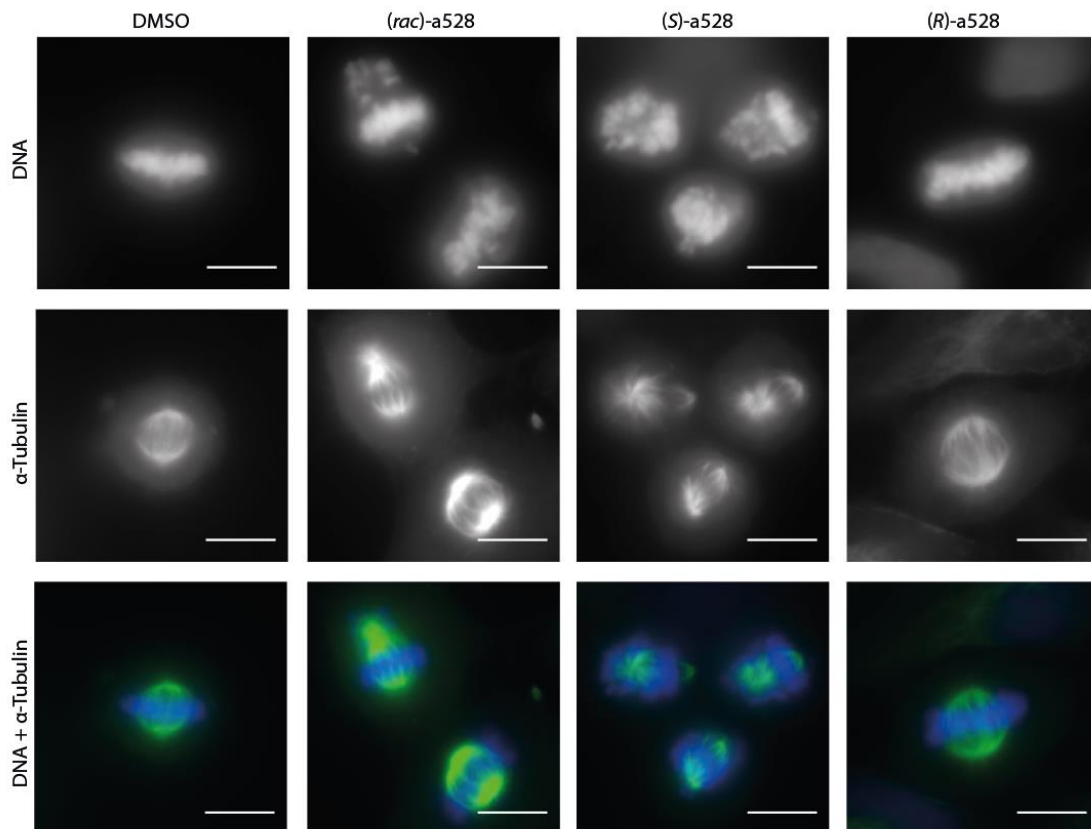
**Abbildung 2.13** Enantiomerenspezifität von a528. a) HeLa-Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Substanzen behandelt. Anschließend erfolgte die Berechnung des Anteils der mitotischen Zellen anhand der Auszählung von pHisH3 positiven Zellen. b) Strukturen der beiden untersuchten a528-Enantiomere.

Hier zeigte sich, dass auch das potentere Centrocountin-Derivat a528 eine Enantiomerenspezifität zeigte. Bei Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  des (S)-Enantiomers konnten knapp 25% der untersuchten Zellen in der Mitose detektiert werden, während die gleiche Substanzkonzentration des (R)-Enantiomers keinerlei Auswirkungen hatte und Mengen an mitotischen Zellen zeigte, die vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle waren. Passend dazu zeigte das racemische Gemisch ca. 10% an mitotischen Zellen, was ungefähr der Hälfte an mitotischen Zellen des aktiven (S)-Enantiomers bei gleicher Substanzkonzentration entspricht. Gleichzeitig konnte auch die Konzentrationsabhängigkeit der Substanz auf den Mitosearrest gezeigt werden. Bei Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  des (S)-Enantiomers reduzierte sich die Anzahl an mitotischen Zellen um ungefähr die Hälfte im Vergleich zum Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  Substanz (Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2** Enantiomerenspezifität von a528. Prozentualer Anteil an mitotischen Zellen nach Behandlung von HeLa-Zellen mit den angegebenen Substanzen. Berechnung der Standardabweichung (SD) über drei technische Replikate

Substanz	Mitotische Zellen / %	SD / %
10 $\mu\text{M}$ (rac)-a528	9,7	3,8
5 $\mu\text{M}$ (rac)-a528	6,2	0,8
10 $\mu\text{M}$ (R)-a528	5,7	1,8
5 $\mu\text{M}$ (R)-a528	4,9	0,8
10 $\mu\text{M}$ (S)-a528	24,7	2,4
5 $\mu\text{M}$ (S)-a528	13,1	1,6
0,3 $\mu\text{M}$ Nocodazol	64,9	5,3
0,2% DMSO	4,2	0,7

Eine weitere Auswirkung der Behandlung von Zellen mit Centrocountin-1 ist die fehlerhafte Anordnung von Chromosomen während der Metaphase. Anstatt sich in der Äquatorialebene auszurichten, zeigen Centrocountin-1-behandelte Zellen auch Chromosomen in der Nähe der Spindelpole (siehe Abbildung 2.6). Um einen ähnlichen Effekt von a528 zu untersuchen wurden HeLa-Zellen mit dem racemischem Gemisch von a528 sowie dem (*S*)- und (*R*)-Enantiomer behandelt und nach 24 h Inkubation fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

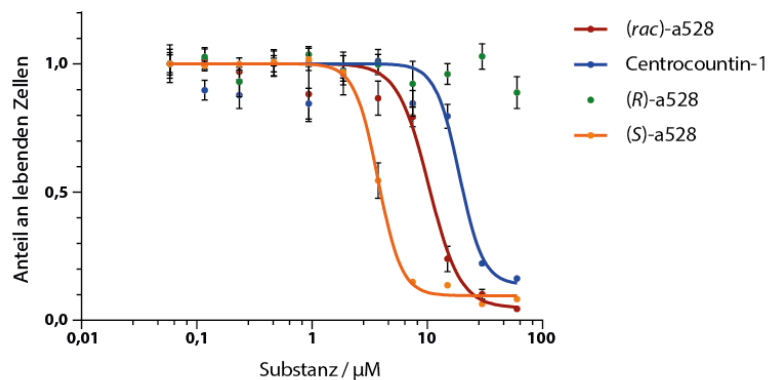


**Abbildung 2.14** Die Substanz a528 verursacht die fehlerhafte Anordnung von Chromosomen in der Metaphase. HeLa-Zellen wurden mit 10  $\mu\text{M}$  der angegebenen Substanzen für 24 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Färbung von  $\alpha$ -Tubulin (grün) mittels spezifischem Antikörper und der DNA (blau) mittels DAPI. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ .

Zellen, die mit DMSO oder (*R*)-a528 behandelt wurden, zeigten normale Metaphase Zellen, bei denen die Chromosomen korrekt in der Äquatorialebene angeordnet waren. Bei Inkubation mit (*rac*)-a528 oder (*S*)-a528 konnten neben einer erhöhten Anzahl an mitotischen Zellen auch fehlorientierte Chromosomen in der Metaphase detektiert werden. Das aktive Enantiomer (*S*)-a528 zeigte dabei eine stärkere Auswirkung auf die Fehllokalisierung der Chromosomen als das racemische Gemisch (Abbildung 2.14).

Ein Teil der Zellen, die mit Centrocountin-1 behandelt wurden, zeigten in Folge des Mitosearrests einen apoptotischen Zelltod. Für das neu identifizierte aktive Derivat a528

sollten ebenfalls die Auswirkungen auf die Zellviabilität bestimmt werden. Hierfür wurde der WST-1 Assay eingesetzt, der spektrophotometrisch die Zellproliferation, Zellviabilität sowie die Empfindlichkeit gegenüber Substanzen messen kann. Das eingesetzte Tetrazoliumsalz WST-1 wird unter anderem durch die zellulären Reduktionsmittel NADH und NADPH sowie durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System zu Formazan gespalten (Berridge et al., 2006). Während das Edukt WST-1 farblos ist, absorbiert Formazan Licht bei einer Wellenlänge zwischen 420 nm und 480 nm. In einer Zellpopulation lässt sich somit am Farbumschlag die Fraktion an lebenden Zellen messen. Für diese Analysen wurden HeLa-Zellen im 96-Lochplattenformat kultiviert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von (*rac*)-a528 und den getrennten Enantiomeren für 48 h behandelt, um anschließend die Fraktion an lebenden Zellen mittels WST-1 Reagenz zu bestimmen.



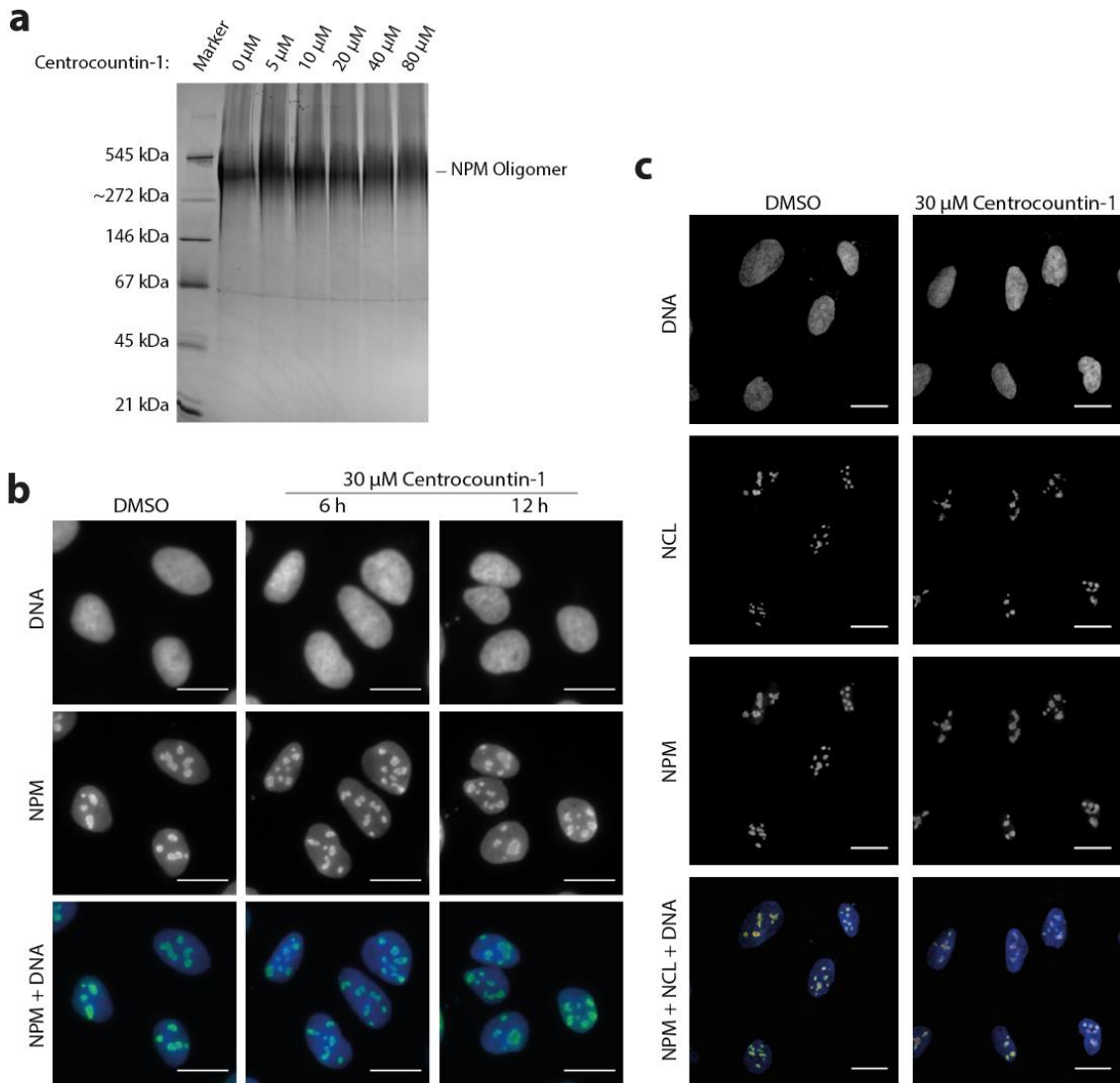
**Abbildung 2.15** Einfluss von (*rac*)-a528, (*R*)-a528 und (*S*)-a528 auf die Viabilität von HeLa-Zellen. Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Substanz behandelt. Anschließend erfolgte die Detektion der Zellviabilität mittels WST-1 Reagenz.

Wie auch bei der Induktion des Mitosearrests zeigt das inaktive (*R*)-Enantiomer von a528 keinen Einfluss auf die Viabilität von HeLa-Zellen, während das aktive (*S*)-Enantiomer eine halb-maximale inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) von  $4,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$  zeigt. Sowohl das racemische Gemisch von a528 ( $\text{IC}_{50} = 9,7 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ), als auch die Ausgangssubstanz Centrocountin-1 ( $\text{IC}_{50} = 17,2 \pm 2,4 \mu\text{M}$ ) zeigten wesentlich höhere  $\text{IC}_{50}$ -Werte und somit eine geringere Befähigung zur Inhibition der Proliferation von HeLa-Zellen (Abbildung 2.15).

## 2.5.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus biologisch aktiver Indolochinolizine

### 2.5.4.1 Einfluss von Centrocountin-1 auf die Oligomerisierung von NPM

Neben der Identifizierung weiterer biologisch aktiver Centrocountin-Derivate, sollte innerhalb dieser Arbeit der Wirkmechanismus von Centrocountin-1, insbesondere im Hinblick auf die beiden Zielproteine NPM und CRM1, weiter aufgeklärt werden. NPM existiert in der Zelle in einem Gleichgewicht zwischen einer monomeren und einer oligomeren Form (Herrera et al., 1996). Dabei befindet sich der Hauptteil NPMs (ca. 95%) in Zellen als Pentamer (Chan and Chan, 1995). Zwei NPM-Pentamere lagern sich wiederum in einer Kopf-zu-Kopf-Anordnung zu einem Decamer zusammen. Es wird davon ausgegangen, dass der Decamer als Histon-Chaperon fungiert und den Aufbau der Nucleosomen erleichtert (Dutta et al., 2001; Okuwaki et al., 2001; Lee et al., 2007). In der Literatur sind zwei Ansätze bekannt, mit dem Ziel die NPM-Oligomerisierung zu unterbinden. In einem Ansatz wurde mittels der SELEX-Methode (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) ein RNA-Aptamer designt, der die Oligomerisierung von NPM in Zellen inhibiert. NPM lokalisiert in Zellen fast ausschließlich in die Nucleoli und die Inhibierung der Oligomerisierung sorgt für eine Delokalisation in das Nucleoplasma, einhergehend mit einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber DNA-Schäden-induzierenden Agenzien (Jian et al., 2009). In einem zweiten Ansatz wurde in einem *in silico* Screen NSC348884 identifiziert, der die Dimerisierung von NPM inhibiert und ähnlich wie das zuvor erwähnte RNA-Aptamer P53 hochreguliert, was zum apoptotischen Zelltod führt (Qi et al., 2008). Um die Auswirkungen von Centrocountin-1 auf die Oligomerisierung von NPM zu untersuchen, wurde 10xHis-NPM heterolog exprimiert und mit verschiedenen Konzentrationen von Centrocountin-1 inkubiert, um danach mittels nativer Gelelektrophorese untersucht zu werden (Abbildung 2.16a).



**Abbildung 2.16** Untersuchungen zum Einfluss von Centrocountin-1 auf die Oligomerisierung von NPM. a) Heterolog exprimiertes 10xHis-NPM wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Centrocountin-1 inkubiert und anschließend mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. b und c) Centrocountin-1 zeigt keinen Einfluss auf die Lokalisation von NPM im Zellkern. U-2 OS-Zellen wurden für 6 h oder 12 h mit 30  $\mu$ M Centrocountin-1 behandelt und anschließend mittels spezifischem Antikörper gegen NPM und Nucleolin (NCL) gefärbt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Inkubation mit DAPI. Die Bildaufnahme erfolgte entweder mittels Weitfeldmikroskopie (DNA = blau, NPM = grün) (b) oder Konfokalmikroskopie (DNA = blau, NPM = grün, NCL = rot) (c). Maßstabsbalken = 20  $\mu$ m.

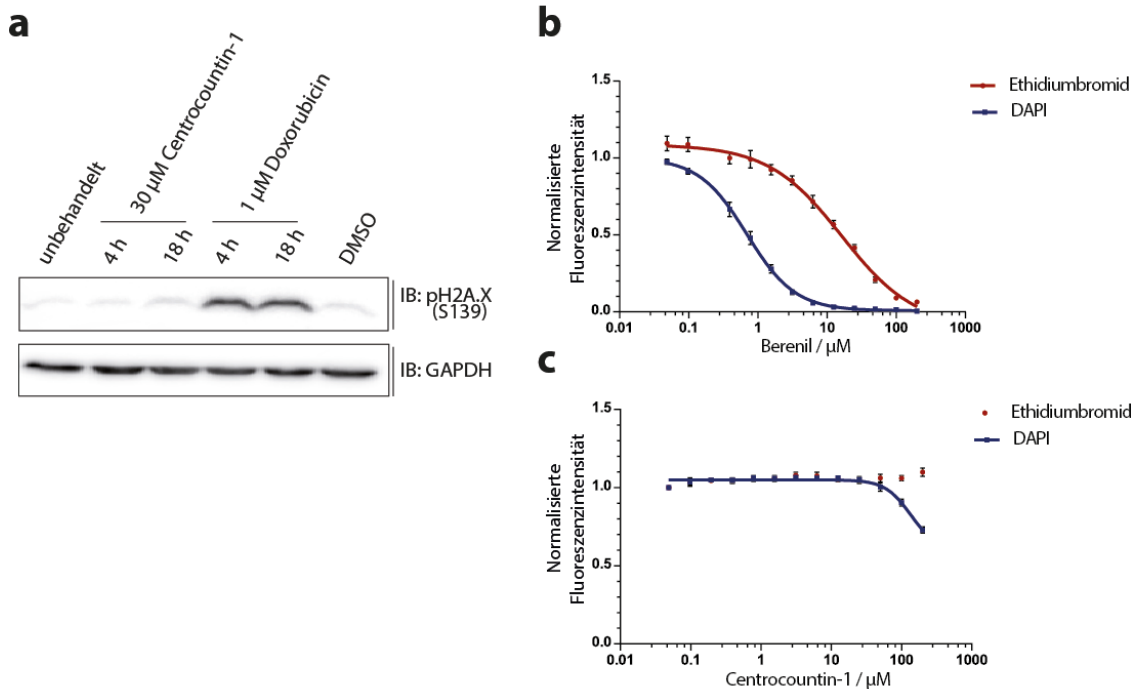
Centrocountin-1-Konzentrationen bis zu 80  $\mu$ M hatten keine detektierbaren Auswirkungen auf die Oligomerisierung von NPM. In der nativen Gelelektrophorese konnte hauptsächlich eine Oligomer-Bande, die vermutlich dem NPM-Decamer (ca. 355 kDa) entspricht und eine dünnere Bande knapp unter der 67 kDa Markerbande, die vermutlich dem NPM-Dimer (ca. 65 kDa) entspricht, identifiziert werden. Das entwickelte RNA-Aptamer zeigte als Folge der Inhibition der Oligomerisierung eine Delokalisation NPMs von den Nucleoli in das Nukleoplasma. Centrocountin-1 zeigte bei Konzentrationen von 30  $\mu$ M in U-2 OS-Zellen keinen Hinweis auf eine veränderte nukleoläre Lokalisation im Vergleich mit DMSO-behandelten Zellen (Abbildung 2.16b). Zusätzlich zur Analyse mithilfe der



Weitfeldmikroskopie wurden konfokale Bilder von U-2 OS Zellen aufgenommen unter Zuhilfenahme des Nukleolimarkern Nucleolin (NCL). Auch hier zeigte NPM in Anwesenheit von Centrocountin-1 eine Lokalisation in den Nukleoli und keine Delokalisation ins Nukleoplasma, was zusätzlich über Kolokalisation mit NCL validiert werden konnte (Abbildung 2.16c).

#### **2.5.4.2 Untersuchungen zur DNA-Bindung und zur Aktivierung der DNA-Reparaturmaschinerie**

NPM ist in die zelluläre Antwort auf genotoxischen Stress involviert. Bei Schädigung der DNA durch chemische Agenzien oder UV-Strahlung steigt die Expression von NPM an. In *NPM1*<sup>-/-</sup>-Zellen konnte die konstitutive Aktivierung der DNA-Reparaturmaschinerie gezeigt werden, was vermutlich auf eine Kontrollpunkt-Funktion von NPM in Bezug auf die DNA-Integrität zurückzuführen ist (Colombo et al., 2005; Grisendi et al., 2006). Die Bindung von NPM durch Centrocountin-1 könnte dessen Aufgabe in der DNA-Schadensantwort beeinflussen. Um eventuelle Effekte von Centrocountin-1 zu untersuchen wurden HeLa-Zellen mit 30 µM Centrocountin-1 behandelt und anschließend die Auswirkungen auf einen Marker für DNA-Schäden, phosphoryliertes Histon H2A.X (S139), untersucht. Als Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche wird das Histon H2A.X von verschiedenen Kinasen (ATM, ATR, DNA-PK) phosphoryliert, um im Anschluss die Rekrutierung der komplexen DNA-Reparaturmaschinerie zu vermitteln (Bonner et al., 2008). In den oben erwähnten *NPM1*<sup>-/-</sup> Zellen konnte eine permanente Phosphorylierung von H2A.X detektiert werden (Colombo et al., 2005).



**Abbildung 2.17** Centrocountin-1 zeigt keine relevante Bindung an DNA und hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der DNA-Reparaturmaschinerie. a) HeLa-Zellen wurden für 4 h oder 18 h mit 30  $\mu\text{M}$  Centrocountin-1 oder 1  $\mu\text{M}$  Doxorubicin behandelt. Die Phosphorylierung von Histon H2A.X (pH2A.X) an Serin 139 wurde mittels Immunblotting und einem spezifischem Antikörper detektiert. b und c) Die Fähigkeit der Bindung von Centrocountin-1 in die kleine Furche der DNA sowie die Fähigkeit zur DNA-Interkalation wurden mittels eines Fluoreszenz-basierten Assays untersucht. Die Verdrängung von DAPI, das in die kleine Furche der DNA bindet und des DNA-Interkalators Ethidiumbromid von Kalbsthymus-DNA in Abhängigkeit von der eingesetzten Substanzkonzentration eines Kompetitors wurden anhand der Fluoreszenzintensität verfolgt. b) Als Positivkontrolle wurde Berenil verwendet, das mit nanomolarer Affinität ( $\text{IC}_{50} = 700 \text{ nM}$ ) in die kleine Furche der DNA bindet und mit niedriger Affinität ( $\text{IC}_{50} = 16 \mu\text{M}$ ) in DNA interkaliert. c) Centrocountin-1 zeigt keine Interkalation in DNA und nur eine sehr geringe Bindung in die kleine Furche der DNA (Centrocountin gegenüber kleiner Furche  $\text{IC}_{50} \geq 100 \mu\text{M}$ ).  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden mit einem Standard 4-Punkte Fit berechnet.

Als Positivkontrolle wurde Doxorubicin (1  $\mu\text{M}$ ) verwendet, das in DNA interkaliert und die Topoisomerase II (TOPII) hemmt. Die Bildung des ternären Komplexes TOPII-Doxorubicin-DNA verhindert nach Öffnen der DNA zur Strangrelaxation die erneute Ligation. Hierdurch wird die Replikation gestoppt, freie DNA Stränge werden von der DNA-Reparaturmaschinerie erkannt und H2A.X wird phosphoryliert. Während in Doxorubicin behandelten HeLa-Zellen ein Signal für pH2AX detektiert werden konnte, zeigt Centrocountin-1 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des Markerproteins (Abbildung 2.17a).

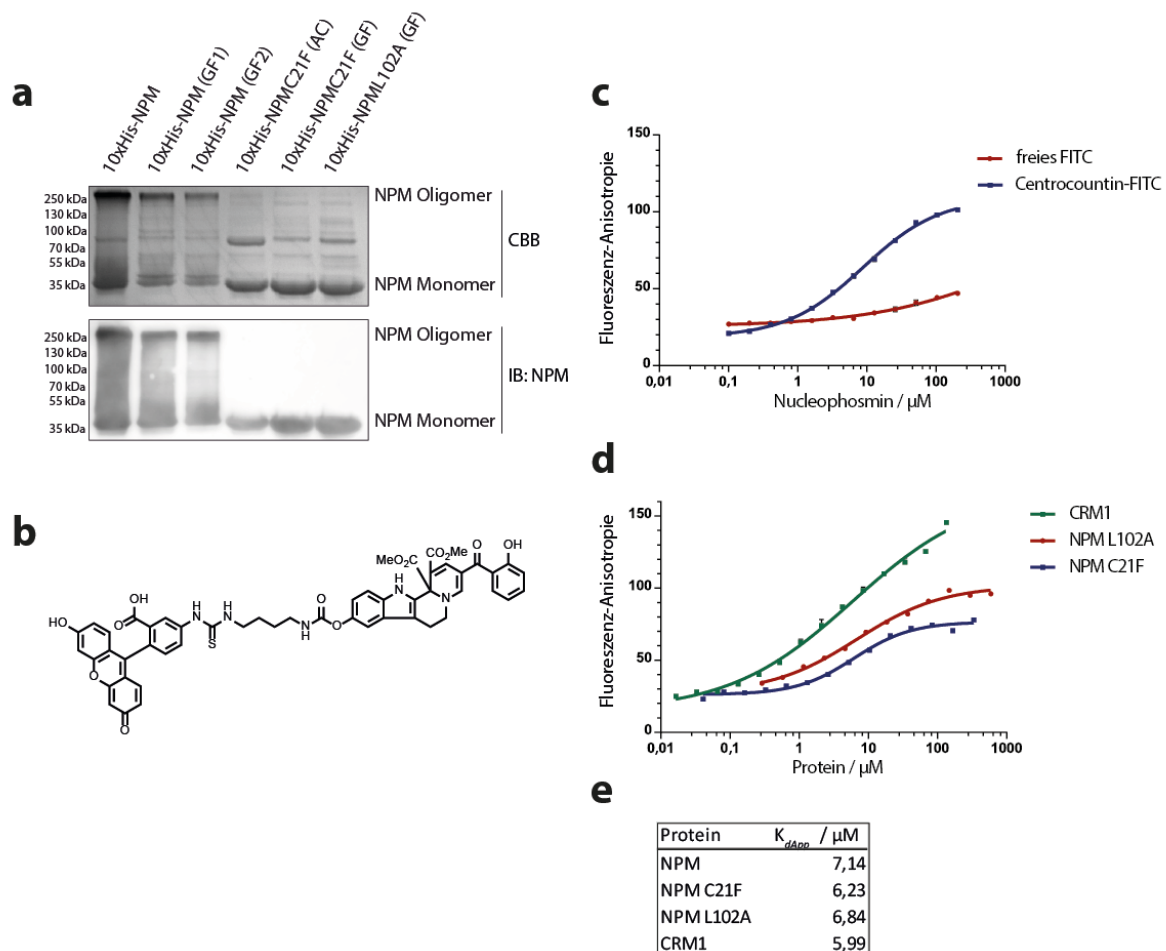
Weiterhin sollte die Fähigkeit von Centrocountin-1 zur Bindung an DNA untersucht werden. Zum einen sollte damit die DNA als etwaiges Sekundärziel der Substanz ausgeschlossen werden und zum anderen sollte ein simpler im niedrigen Durchsatz durchführbarer Assay entwickelt werden, mit dem sich neue flachere Centrocountin-1-Derivate im Hinblick auf ihre DNA-Bindungseigenschaften untersuchen lassen. Als Grundlage wurde ein Fluoreszenz-

basierter Verdrängungsassay gewählt, der bereits von Williams *et al.* beschrieben wurde, bei dem zwei bekannte fluoreszente DNA-Binder mit Kalbsthymus-DNA vorinkubiert werden und durch die Testsubstanzen verdrängt werden müssen (Williams et al., 2012). Als Liganden wurden DAPI und Ethidiumbromid gewählt, wobei DAPI in die kleine Furche der DNA bindet und Ethidiumbromid zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert. Als Positivkontrolle wurde Berenil (Diminazen) verwendet, das mit nanomolarer Affinität in die kleine Furche der DNA bindet und mit wesentlich niedrigerer Affinität in DNA interkaliert. Berenil war dementsprechend in der Lage, sowohl DAPI von Kalbsthymus-DNA zu verdrängen ( $IC_{50} = 700 \text{ nM}$ ), als auch mit geringerer Effizienz Ethidiumbromid ( $IC_{50} = 16 \text{ }\mu\text{M}$ ) (Abbildung 2.17b). Centrocountin-1 zeigte selbst bei Konzentrationen von  $200 \text{ }\mu\text{M}$  keine Verdrängung von Ethidiumbromid und nur eine geringe Verdrängung von DAPI mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $\geq 100 \text{ }\mu\text{M}$  (Abbildung 2.17c).

#### 2.5.4.3 Spezifität von Centrocountin-1 für monomeres und oligomeres NPM

Als Zielproteine von Centrocountin-1 wurden in früheren Arbeiten die beiden Proteine NPM und CRM1 identifiziert (Dückert et al., 2012). Der Nachweis einer direkten Bindung von Centrocountin-1 an die beiden Proteine erfolgte mittels Fluoreszenzpolarisation, bei der ein Cy3-gekoppeltes Centrocountin-1-Derivat mit den heterolog exprimierten Proteinen titriert wurde. Aufgrund der Oligomerisierung von NPM konnte jedoch nicht zwischen einer Bindung von Centrocountin an oligomeres oder monomeres NPM unterschieden werden. Weiterhin zeigte auch der verwendete Fluorophor Bindung an die beiden Proteine (Pries, 2011). In der Literatur sind zwei NPM-Punktmutationen bekannt, die die Oligomerisierung von NPM unterbinden. Der Austausch von Cystein 21 zu Phenylalanin (NPM C21F) sowie der Austausch von Leucin 102 zu Alanin (NPM L102A) führt zu monomerem NPM (Enomoto, 2006; Prinos et al., 2011). Um die Bindung von Centrocountin-1 an monomeres NPM zu überprüfen, wurden die zwei NPM-Mutanten (C21F und L102A) mittels Quikchange-PCR generiert, heterolog exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Während Wildtyp-NPM in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese Banden für den NPM-Oligomer und den NPM-Monomer zeigt, kann für beide Mutanten ausschließlich monomeres NPM detektiert werden (Abbildung 2.18a). Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenzpolarisation wurde ein Fluorescein-markiertes Centrocountin-Derivat (Centrocountin-FITC) verwendet, das von V. Eschenbrenner-Lux (MPI Dortmund) innerhalb der Arbeitsgruppe synthetisiert wurde (Abbildung 2.18b). Zunächst erfolgte die Titration von Centrocountin-FITC mit Wildtyp 10xHis-NPM, was eine

wesentlich niedrigere Dissoziationskonstante ( $K_{dApp} = 7,14 \mu\text{M}$ ) als die Titration von freiem FITC mit NPM ( $K_{dApp} \geq 1000 \mu\text{M}$ ) zeigte (Abbildung 2.18c). Im Anschluss wurden die beiden NPM Mutanten sowie CRM1 getestet. Alle drei Proteine zeigten hierbei ähnliche apparente Dissoziationskonstanten zwischen 6 und 7  $\mu\text{M}$  (Abbildung 2.18d und e).

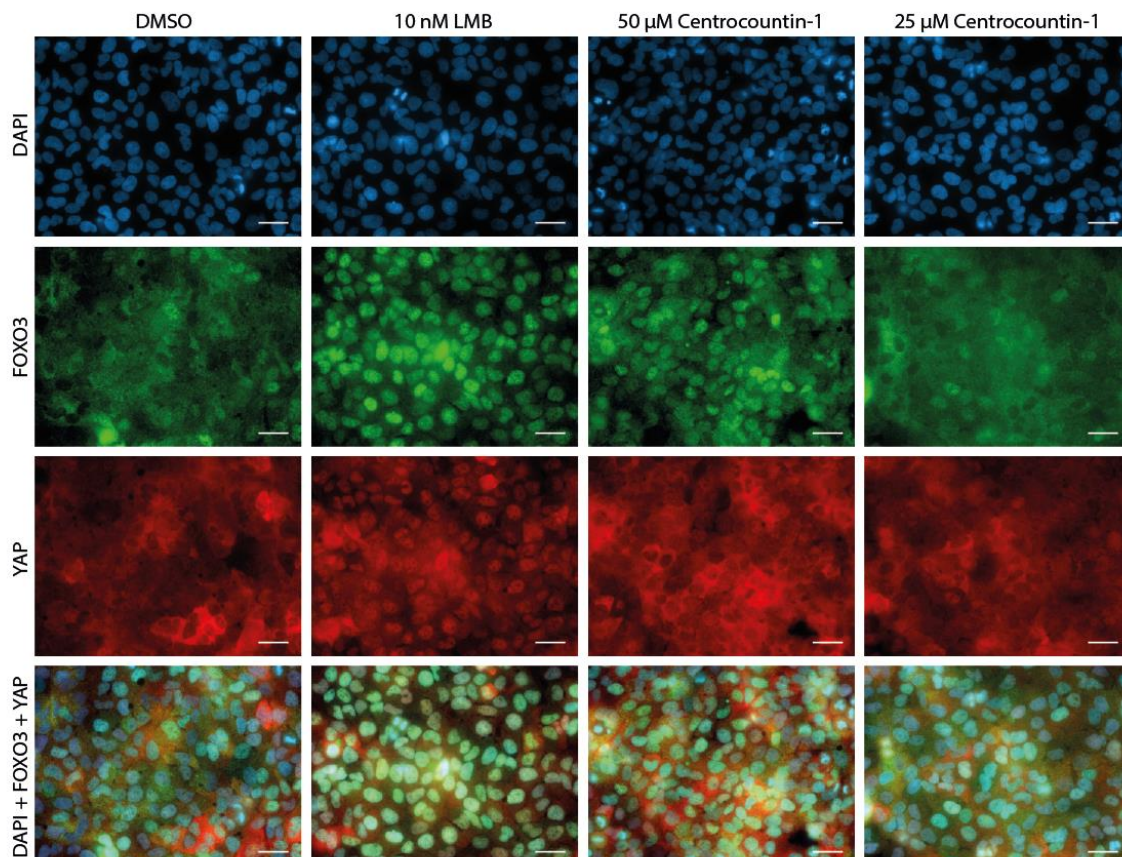


**Abbildung 2.18** Interaktion von Centrocountin-FITC mit monomerem NPM. a) Expression der monomeren NPM-Mutanten 10xHis-NPMC21F (GF) und 10xHis-NPML102A (GF). Vergleich der beiden Mutanten mit Wildtyp 10xHis-NPM mittels SDS-PAGE (ohne Erhitzen der Proben) und Coomassie Brilliant Blue-Färbung (CBB, oben) oder spezifischer Antikörperfärbung (unten). Die Proben 10xHis-NPM (GF1) bzw. (GF2) zeigen unterschiedliche Fraktionen von Wildtyp 10xHis-NPM nach dem Versuch der Trennung mittels Größenausschlusschromatographie. Probe (AC) zeigt die proteinhaltige Fraktion nach Affinitätsaufreinigung und Proben (GF) nach der folgenden Gelfiltration. b) Struktur von Centrocountin-FITC. c) Titration von Centrocountin-FITC/ freiem FITC mit 10xHis-NPM. d) Titration von Centrocountin-FITC mit 6xHis-CRM1, 10xHis-NPMC21F oder 10xHis-NPML102A. e) Die Tabelle zeigt die ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten.

#### 2.5.4.4 Einfluss von Centrocountin-1 auf den CRM1-abhängigen nukleären Export

Mit Centrocountin-1 behandelte Zellen zeigen neben einer Anhäufung von mitotischen Zellen auch eine vermehrte Anzahl von Zellen mit multipolaren Spindeln. Dies könnte auf eine Inhibition des Transports von NPM durch CRM1 an die Zentrosomen zu Beginn der Mitose hindeuten, wo NPM normalerweise eine Überduplikation der Zentrosomen verhindert (Lim

and Wang, 2006). In vorangegangenen Studien konnte ein Einfluss hoher Konzentrationen von Centrocountin-1 auf den CRM1-abhängigen Export von RANBP1 detektiert werden (Pries, 2011). Innerhalb dieser Arbeit sollte der Einfluss von Centrocountin-1 auf zwei weitere CRM1-Cargoproteine untersucht werden. Der transkriptionelle Koaktivator YAP1 sowie der Transkriptionsaktivator FOXO3. Beide Proteine zirkulieren zwischen Zytoplasma und Nukleus. Bei Inhibition des CRM1-abhängigen nukleären Exports, akkumulieren beide Proteine im Nukleus.



**Abbildung 2.19** Einfluss von Centrocountin-1 auf die Lokalisation von CRM1-Cargoproteinen. HeLa-Zellen wurden für 6 h mit Centrocountin-1 oder der Positivkontrolle LMB (Leptomycin B) behandelt. Nach Fixierung und Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen YAP (rot) und FOXO3 (grün) erfolgte die Färbung der DNA mittels DAPI. Maßstabsbalken = 40 µm.

In DMSO-behandelten Zellen kann sowohl FOXO3 als auch YAP hauptsächlich im Zytoplasma detektiert werden. Durch Zugabe des kovalenten CRM1-Inhibitors Leptomycin B (LMB) verbleiben beide Proteine im Nukleus behandelter Zellen. Centrocountin-1 zeigt bei einer Substanzkonzentration von 50 µM eine Akkumulation von FOXO3 im Nukleus, während keine Auswirkungen auf die Lokalisation von YAP detektiert werden können. Niedrigere Konzentrationen von Centrocountin-1 zeigen keinen Einfluss auf den Kernexport der beiden untersuchten Proteine (Abbildung 2.19).

## 2.6 Diskussion

### 2.6.1 Entwicklung eines phänotypischen Screens zur Identifikation neuer Centrocountin-Derivate

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zur Identifikation neuer potenter Centrocountin-Derivate ein phänotypischer automatisierter Screeningansatz entworfen und validiert werden, der im Anschluss für das Screening einer kleinen Bibliothek an Centrocountin Derivaten genutzt werden sollte. Darüberhinaus sollte die Wirkungsweise der Centrocountine weiter erörtert werden, insbesondere im Hinblick auf die bereits erwähnten Zielproteine NPM und CRM1.

Für das phänotypische Screening wurden zunächst verschiedene Auslesemarker in Betracht gezogen. Als offensichtlichstes Merkmal verursacht die Behandlung von Zellen mit Centrocountin eine überzählige Verdoppelung oder Fragmentierung der Zentrosomen, was zu einer gestörten Chromosomenausrichtung während der Metaphase führt. Diese Fehlansrichtung ist in Zellen durch Färbung der DNA einfach zu detektieren. Allerdings würde zum einen die automatische computergestützte Unterscheidung zwischen fehlorientierten Chromosomen innerhalb der Metaphaseebene und korrekt ausgerichteten Chromosomen sehr hohe Anforderungen an den Mustererkennungsalgorithmus der Auswertungssoftware stellen. Zum anderen befinden sich die Chromosomen zwischen Prometa- und Metaphase in hoher dynamischer Bewegung. Die korrekte Ausrichtung der Chromosomen in der Metaphaseebene ist das Resultat eines langen Ausrichtungsprozesses, bei dem sich die Chromosomen durch Verbindung mit den mitotischen Mikrotubuli in der Zelle bewegen bis diese zum Übergang in die Anaphase bereit ist. Somit könnte ebenfalls in unbehandelten Zellen eine Fehlorientierung von Chromosomen zu Beginn der Metaphase detektiert werden. Eine weitere Methode, um die Fehlorientierung der Chromosomen zu quantifizieren ist die Verwendung eines Markerproteins. Wie bereits in vorangegangenen Abschnitten beschrieben, wird die Aktivierung des Spindelkontrollpunkts sowohl durch fehlende Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore der Schwesterchromatiden ausgelöst als auch durch eine Detektion von zu geringer Zugspannung zwischen den Kinetochoren der Schwesterchromatiden. Die Detektion der Bindung zwischen Mikrotubuli und Kinetochoren erfolgt dabei unter anderem über das Protein BUB1. BUB1 bindet an freie Kinetochore und verhindert so den Übergang zur nächsten Phase der Mitose. Centrocountin-behandelte Zellen zeigen in der Metaphase punktförmige Signale für BUB1 verteilt durch die gesamte Zelle. Diese Signale kolokalisieren mit den angefärbten Chromosomen. Auch wenn hier theoretisch

die Möglichkeit einer Quantifizierung der Signale bestünde, wird bei Betrachtung der Verteilung von BUB1 in unbehandelten Zellen ein weiteres Problem von BUB1 als Marker für fehlorientierte Chromosomen deutlich: Aufgrund der Dynamik der Chromosomen während der Metaphase zeigen auch unbehandelte Zellen Signale für BUB1. Die Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore der Chromosomen ist ein Zyklus immer wieder erneuter Assoziation und Dissoziation, dadurch wird auch in unbehandelten Zellen BUB1 an die Kinetochore rekrutiert und kann anschließend, wenn auch mit spezifischerer Lokalisation in der Metaphaseebene, in der Zelle detektiert werden. Auch in diesem Fall müsste ein Algorithmus zwischen verteilten BUB1-Signalen und BUB1-Signalen in der Metaphaseebene unterscheiden können, was prinzipiell möglich, jedoch sehr aufwendig umzusetzen ist. Als dritte Möglichkeit wurde die längere Verweildauer von Centrocountin-behandelten Zellen in der Mitose in Betracht gezogen. Da Centrocountin-behandelte Zellen im Vergleich mit unbehandelten Zellen, eine ca. 5-fach längere Verweildauer in der Mitose zeigen, sollte in einer gemischten Zellpopulation nach Substanzbehandlung eine höhere Anzahl an mitotischen Zellen detektiert werden können (Pries, 2011). Als Marker für die Detektion von mitotischen Zellen wurde die Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 (pHisH3) gewählt. Die Phosphorylierung durch die Kinasen AURKA und AURKB zu Beginn der M-Phase leitet die Kondensation der Chromosomen ein. In der späten Anaphase erfolgt die Dephosphorylierung einhergehend mit der Dekondensation der Chromosomen durch die PP1. Zellen, die ein positives Signal für den Marker pHisH3 zeigen befinden sich demnach in der Mitose. Für die Entwicklung des Screening-Ansatzes wurde zunächst in Voruntersuchungen ein Einfluss von Centrocountin-1 auf die Phosphorylierung von Histon 3 ausgeschlossen und anschließend die Möglichkeit zur automatischen Quantifikation des pHisH3-Signals mithilfe der Software MetaMorph (Visitron) untersucht. Die Behandlung der verwendeten HeLa-Zellen mit Centrocountin-1 zeigte mitotische Zellen mit positivem Signal für die Phosphorylierung von Histon H3, was einen Einfluss der Substanz auf die Phosphorylierungsreaktion ausschließt. Trotz der chromosomalen Fehlansrichtungen in den arretierten Metaphase Zellen konnte das pHisH3-Signal korrekt Software-basiert quantifiziert werden. Für das automatisierte Testen neuer Substanzen, wurde das Screening-Setup für den Einsatz im 96-Lochplattenformat optimiert und mittels automatischer Mikroskopie und anschließender Software-basierter Auswertung eine Testplatte vermessen. Die Quantifizierung der Testplatte zeigte ca. 5% mitotische Zellen in der DMSO-Kontrolle und ca. 63% mitotische Zellen nach 24 h Behandlung mit 0,3  $\mu$ M Nocodazol. Die beiden Tubulinbinder Noscadin und TZ85+, die als Mikrotubuli-adressierende Substanzen ebenfalls über eine Aktivierung des

Spindelkontrollpunkts zur Arretierung behandelter Zellen in der Metaphase führen, zeigten ebenfalls erhöhte Werte für die Anzahl an mitotischen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Zur Analyse der Qualität des verwendeten Assaysystems in Hinblick auf das dynamische Fenster zwischen der Negativkontrolle DMSO und der Positivkontrolle Nocodazol, wurde ein  $Z'$ -Faktor von  $\geq 0,5$  berechnet. Ein  $Z'$ -Faktor von  $\geq 0,5$  zeigt dabei an, dass der Unterschied zwischen den Signalen der beiden eingesetzten Kontrollen groß genug ist, um weitere unbekannte Substanzen unter den verwendeten Testbedingungen zu untersuchen (Zhang et al., 1999; Walters and Namchuk, 2003). Das Assaysetup konnte im Folgenden erfolgreich für die Untersuchung von ca. 150 Substanzen verwendet werden. Dabei konnten 5 Substanzen identifiziert werden, die eine höhere Anzahl an mitotischen Zellen zeigten als die Ursprungssubstanz Centrocountin-1. Die aktivste Substanz, a528, führte zu einer 7,8-fachen Erhöhung der mitotischen Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und zu einer ca. doppelt so hohen Anzahl an mitotischen Zellen im Vergleich mit Centrocountin-1 behandelten Zellen.

### **2.6.2 Charakterisierung des potentesten Centrocountin-Derivats**

Die Substanz a528 zeigte in Zellen, ähnlich wie auch die Ursprungssubstanz Centrocountin-1, eine längere Verweildauer der Zellen innerhalb der Mitose. Auch die charakteristische Fehlorientierung der Chromosomen in der Metaphaseebene konnte in a528-behandelten Zellen beobachtet werden. Ebenso konnte bei längerer Behandlung von Zellen mit der Substanz, analog zur Behandlung mit Centrocountin-1, ein Einfluss auf das Zellwachstum gemessen werden. Mittels WST-1 Assay konnte für a528 ( $IC_{50} = 9,7 \pm 1,1$ ) hierbei ein stärkerer Einfluss auf die Zellproliferation als für Centrocountin-1 ( $IC_{50} = 17,2 \pm 2,4$ ) gezeigt werden. Desweiteren konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass nur das (*S*)-Enantiomer von a528 biologische Aktivität zeigt. Unter Screening-Bedingungen konnte für das (*R*)-Enantiomer keinerlei Aktivität detektiert werden. Während das (*S*)-Enantiomer bei 10  $\mu$ M Substanzkonzentration ca. 25% mitotische Zellen zeigt, kann für das (*R*)-Enantiomer ein Wert von ca. 6% ermittelt werden, was sich nur geringfügig vom Wert der DMSO-behandelten Kontrollzellen (ca. 5%) unterscheidet. Das racemische Gemisch zeigt bei gleicher Substanzkonzentration ungefähr die Hälfte an mitotischen Zellen im Vergleich mit dem aktiven (*S*)-Enantiomer, was zu den erfolgten Beobachtungen eines aktiven (*S*)- und eines inaktiven (*R*)-Enantiomers passt. Weiterhin zeigt das inaktive Enantiomer keinen Einfluss auf die Orientierung der Chromosomen in der Metaphaseebene und die Mitose verläuft normal. Auch die Untersuchungen zur Zellproliferation zeigten keine Aktivität von (*R*)-a528 und bei gleicher Substanzkonzentration ist die  $IC_{50}$  für die Zellproliferation von HeLa-Zellen für das



racemische Gemisch etwa doppelt so hoch wie für das aktive Enantiomer (*S*)-a528. Zusammenfassend zeigt sich, dass mithilfe des entwickelten Screening-Setups und dem anschließenden Screening einer kleinen Bibliothek an Centrocountin-Derivaten mit der Substanz a528 ein Pyridoisochinolizin identifiziert wurde, für das eine höhere Aktivität in Bezug auf den mitotischen Arrest, der Fehllokalisierung von Chromosomen in der Metaphaseebene und der Inhibition der Zellproliferation detektiert werden konnte, als die Ursprungssubstanz Centrocountin-1. Allerdings deutet die Betrachtung der Struktur-Wirkungs-Beziehung darauf hin, dass bereits geringe Veränderungen der Substituenten der Chinolizine eine substantielle Veränderung der Aktivität zur Folge haben. Hinzu kommt, dass die Substanz a528 Stabilitätsprobleme zeigte, was zur Bildung des entsprechenden zwitterionischen Salzes führte (Eschenbrenner-Lux, 2014; Eschenbrenner-Lux et al., 2014).

### 2.6.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Centrocountin-1

Ein bereits beschriebener Ansatz zur Adressierung von NPM mittels kleiner Moleküle besteht in der Inhibition der Oligomerisierung von NPM. Es wird angenommen, dass zelluläres NPM zum Großteil als Oligomer vorliegt und die Oligomerisierung insbesondere für Aufgaben im Nukleus/Nukleolus von Bedeutung ist. Hierzu gehört unter anderem die Funktion als Histon-Chaperon, die sowohl bei der Nukleosomen-Neubildung als auch bei der Reparatur von DNA-Schäden zum Tragen kommt. Der entwickelte NPM-Oligomerisierungsinhibitor NSC348884 verursachte in verschiedenen Zelllinien einen P53-abhängigen Zelltod. In gesunden Zellen führen unter anderem DNA-Schäden zur Phosphorylierung von P53 an Serin 15. Die N-terminale Phosphorylierung unterbindet die Interaktion von P53 mit der E3-Ligase MDM2 und führt somit zur Stabilisierung von P53 und der anschließenden Arretierung des Zellzyklus zur Behebung der Schäden oder zur Aktivierung des apoptotischen Zelltods (Cheng and Chen, 2010). In Tumorzellen, die eine erhöhte Menge an NPM exprimieren, verhindert NPM durch direkte Bindung an den N-Terminus von P53 die Phosphorylierung an Serin 15 und schwächt somit die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden ab (Qi et al., 2008). Dementsprechend konnte die Behandlung verschiedener Krebszelllinien mit dem Oligomerisierungsinhibitor NSC348884 einen Anstieg von zellulärem P53 (pS15) sowie den folgenden apoptotischen Zelltod zeigen. Ein weiterer Oligomerisierungsinhibitor von NPM, das kleine Molekül YTR107, verhindert die Lokalisation von NPM an Orte von DNA-Schäden und unterbindet somit die DNA-Reparatur. Innerhalb dieser Arbeit konnte für Centrocountin-1 kein Einfluss auf die Oligomerisierung von heterolog exprimiertem NPM beobachtet werden. Weder die Inhibierung der Oligomerisierung von heterolog exprimiertem NPM, noch die Relokalisation von nukleolärem NPM in das Nukleoplasma konnte für die

Substanz Centrocountin-1 gezeigt werden, was eine Beeinträchtigung der Oligomerisierung NPMs durch Centrocountin-1 unwahrscheinlich macht. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen zu Substanzen, die in der Literatur als NPM-Binder ohne Einfluss auf die Oligomerisierung beschrieben wurden. Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten, die durch die bereits erwähnten Oligomerisierungsinhibitoren NSC348884, YTR107 und dem RNA-Aptamer 1A1 verursacht werden – wie beispielsweise der P53-abhängige Zelltod und die Sensibilisierung der Zellen gegenüber genotoxischem Stress – zeigt die Substanz TC11 zwar auch einen apoptotischen Zelltod, dieser ist jedoch P53-unabhängig. Weiterhin konnte, ähnlich wie für Centrocountin-1 auch für TC11-behandelte Zellen eine Überduplikation der Zentrosomen sowie eine Anreicherung mitotischer Zellen beobachtet werden. Ein weiterer Punkt ist die Detektion multinukleärer Zellen sowohl in Centrocountin-1- als auch in TC11-behandelten Zellen. Diese Zellen könnten das Ergebnis von aktivierten Spindelkontrollpunkten und folgendem „mitotic slippage“ sein. Die hier erhaltenen Ergebnisse, die einen Einfluss von Centrocountin-1 auf die Oligomerisierung unwahrscheinlich machen, und die Ähnlichkeiten im Phänotyp zu TC11-behandelten Zellen, könnten ein Hinweis auf einen Unterschied im Wirkmechanismus zwischen Substanzen darstellen, die an NPM binden und dessen Oligomerisierung inhibieren, und Substanzen, die die Oligomerisierung nicht inhibieren. Die Bindung von Centrocountin-1 an NPM könnte somit durch Inhibierung des Transports von NPM zu den Zentrosomen die fehlerhafte Reduplikation bzw. Fragmentierung selbiger initiieren. Die überzähligen Spindelpole aktivieren durch fehlende Zugspannung zwischen den Kinetochoren der Schwesterchromatiden den Spindelkontrollpunkt. Im Folgenden entscheidet der bereits beschriebene, jedoch nicht vollständig aufgeklärte, Signalweg das Schicksal der arretierten Zelle. Entweder die Zelle leitet den apoptotischen Zelltod während der arretierten Metaphase ein oder die Zelle teilt sich. Die folgende Teilung kann zu Aneuploidien in Tochterzellen führen, deren Auswirkungen auf das weitere Überleben der Zellen nicht umfassend aufgeklärt sind (Santaguida and Amon, 2015).

Die Möglichkeit eines anderen Wirkmechanismus von Centrocountin-1 gegenüber NPM Oligomerisierungsinhibitoren wird zusätzlich durch die Tatsache bestätigt, dass die Behandlung von Zellen mit Centrocountin-1 nicht zur Anhäufung von DNA-Schäden führt. Zellen, die mit NPM Oligomerisierungsinhibitoren behandelt wurden, zeigten zum einen anhand des phosphorylierten Markerproteins pH2A.X eine Ansammlung von DNA-Schäden, zum anderen eine höhere Sensitivität der Zellen gegenüber genotoxischem Stress (Qi et al.,

2008; Sekhar et al., 2014). Gleiches konnte in RNAi-Studien für Zellen mit herunterregulierten NPM-Leveln gezeigt werden (Box et al., 2016). Wie genau NPM an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt ist, konnte noch nicht umfassend aufgeklärt werden. Zwei Hypothesen scheinen wahrscheinlich, einerseits NPMs Anwesenheit in einem Multiproteinkomplex, der DNA-Rekombinationsaktivität besitzt und somit an der Verknüpfung der DNA nach UV-Schäden durch Rekombination beteiligt sein könnte. Andererseits könnte NPMs Funktion als Histon-Chaperon beim Aufbau der Nukleosomen nach DNA-Schäden helfen (Borggreffe et al., 1998; Okuwaki et al., 2001). Zusätzlich zur Detektion des Markers pH2A.X in Centrocountin-1-behandelten Zellen wurde innerhalb dieser Arbeit die Fähigkeit von Centrocountin-1 zur Bindung an DNA untersucht. Neben den DNA-Bindungseigenschaften von Centrocountin-1 sollte der entwickelte biochemische Verdrängungsassay eine Plattform für die Untersuchung neuer Centrocountin-Derivate mit flacheren Strukturen bieten, die mögliche Bindungen mit zellulärer DNA eingehen könnten. Eine Bindung der Ursprungssubstanz Centrocountin-1 an DNA konnte mithilfe des Versuchssystems ausgeschlossen werden. Lediglich bei hohen micromolaren Konzentrationen ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ) konnte eine geringe Bindung von Centrocountin-1 in die kleine Furche der DNA detektiert werden. Aufgrund der sehr geringen Affinität von Centrocountin-1 für DNA kann davon ausgegangen werden, dass diese Interaktion keinen Einfluss auf den bekannten Phänotyp der Centrocountine hat und die DNA-Bindungseigenschaften von Centrocountin-1 in zellulären Versuchen vernachlässigt werden können.

In Voruntersuchungen zum Wirkmechanismus der Centrocountine konnte die Bindung an NPM und CRM1 bereits biochemisch unter Zuhilfenahme eines Cy3-gekoppelten Centrocountin-Derivats validiert werden (Pries, 2011). Innerhalb dieser Arbeit wurde die Bindung mit einem Fluorescein-markierten Centrocountin-Derivat untersucht, da die zuvor verwendete Cy3-Markierung selbst eine geringe Bindung an NPM zeigte. Weiterhin sollte die Verwendung zweier NPM-Mutanten Aufschluss über etwaige Unterschiede in den Bindungsaffinitäten Centrocountins gegenüber monomerem und oligomerem NPM geben. Die biochemischen Untersuchungen zur Bindung von Fluorescein-markiertem Centrocountin an die Zielproteine NPM und CRM1 mittels Fluoreszenzpolarisation zeigten vergleichbare Bindungsaffinitäten gegenüber dem NPM-Oligomer ( $K_{d, App} = 7,14 \mu M$ ) und den mittels Punktmutagenese hergestellten monomeren NPM-Mutanten (NPM C21F  $K_{d, App} = 6,23 \mu M$ ; NPM L102A  $K_{d, App} = 6,84 \mu M$ ). Somit ist von keiner Spezifität Centrocountins gegenüber monomerem oder oligomerem NPM auszugehen. Die Bindung an das zweite Zielprotein

CRM1 konnte mit ähnlichen Affinitäten bestätigt werden ( $K_{d\text{App}} = 5,99 \mu\text{M}$ ). Die Bindung von Centrocountin-FITC an die beiden Zielproteine NPM und CRM1 bestätigt überdies die bereits durchgeführten Messungen zur Bindung von Centrocountin-Cy3 an NPM und CRM1 (Pries, 2011). Auch die funktionellen Auswirkungen der Bindung an den nukleären Exportfaktor CRM1, die bereits zuvor in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Centrocountin-1 zu einer Inhibition des CRM1-abhängigen Transports von RANBP1 führten, konnten innerhalb dieser Arbeit validiert werden. Der Transkriptionsfaktor FOXO3 reguliert diverse zelluläre Prozesse, wie beispielsweise Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Metabolismus (van der Vos and Coffey, 2011). FOXO3 zirkuliert CRM1-abhängig zwischen Nukleus und Zytoplasma. Die Inhibition des CRM1-abhängigen Kernexports durch den kovalenten Inhibitor Leptomycin B führt zur Akkumulation von FOXO3 im Zellkern. Hohe Konzentrationen von Centrocountin-1 ( $50 \mu\text{M}$ ) zeigten ebenfalls eine Retention von FOXO3 im Nukleus. Aufgrund der Tatsachen, dass CRM1 auch für den Transport von NPM am Ende der G<sub>2</sub>-Phase an die Zentrosomen verantwortlich ist und dass die Inhibition von CRM1 den Transport von NPM an die Zentrosomen stört, was zu einer unkontrollierten Trennung der Zentriolen und einer Amplifikation der Zentrosomen führt, ist ein Wirkmechanismus der Centrocountine über die Bindung an NPM und CRM1 auch mechanistisch denkbar (Forgues et al., 2003; Shinmura et al., 2005). Da Centrocountin-1 jedoch keine Auswirkungen auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors YAP zeigte, der ebenfalls durch CRM1 ins Zytoplasma transportiert wird, scheint die Bindung an CRM1 nicht den gesamten CRM1-abhängigen Transport zu inhibieren. Dies könnte zum einen an unterschiedlichen Affinitäten zwischen CRM1 und den NES von CRM1-Cargoproteinen liegen, deren Bindung durch Centrocountin-1 gestört wird. Zum anderen könnte im Falle von FOXO3 die Akkumulierung im Nukleus nach Centrocountin-1-Behandlung auch ein sekundärer Effekt sein. Die stressinduzierte Phosphorylierung von FOXO3 an Serin 7 durch MAPK14 führt ebenfalls zur Lokalisation in den Nukleus. Die Behandlung von Brustkrebszellen mit Doxorubicin zeigte ohne Einfluss auf CRM1 eine nukleäre Lokalisation von FOXO3. Es wird davon ausgegangen, dass der durch Doxorubicin in diesen Zellen hervorgerufene Zellzyklusarrest und Zelltod direkt auf die Aktivität von MAPK14 und der folgenden Relokalisation von FOXO3 in den Nukleus zurückzuführen ist (Ho et al., 2012). Generell sind Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie in die Antwort auf oxidativen Stress involviert, der ihre nukleäre Lokalisation induziert und dort unter anderem für die Transkription von Zellzyklus-inhibierenden und proapoptotischen Genen verantwortlich ist (Salih and Brunet, 2008). Dementsprechend könnte die Retention von FOXO3 im Nukleus von Centrocountin-1-

behandelten Zellen auch ein Effekt des zellulären Stresses sein, der durch die Substanz hervorgerufen wird, oder der bereits beobachtete Anstieg an apoptotischem Zelltod durch einen Effekt von FOXO3 hervorgerufen werden.

## 2.7 Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit konnte erfolgreich die Entwicklung eines phänotypischen Screeningansatzes zur Identifizierung von Substanzen, die Zellen in der Mitose arretieren, entwickelt werden. Die im Folgenden aus einer kleinen Bibliothek von Centrocountin-Derivaten identifizierte aktivste Substanz zeigte die gleichen phänotypischen Merkmale wie die Ursprungssubstanz Centrocountin-1. Für die weitere Evaluation der Substanz a528 könnte die Dissoziationskonstante gegenüber den beiden Zielproteinen NPM und CRM1 in einem biophysikalischen Ansatz gemessen werden. Dies könnte mithilfe eines Fluorophor-gekoppelten Derivats geschehen, welches zur Messung der Fluoreszenzpolarisation mit heterolog exprimiertem NPM bzw. CRM1 verwendet werden könnte. Für den Wirkmechanismus der biologisch aktiven Indolochinolizine konnte innerhalb dieser Arbeit durch Untersuchungen von Centrocountin-1 bereits gezeigt werden, dass die Oligomerisierung von NPM nicht beeinflusst ist. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich der Wirkmechanismus von Centrocountin-1 zu dem von in der Literatur bekannten Oligomerisierungsinhibitoren NPMs unterscheidet. Während die Oligomerisierungsinhibitoren einen P53-abhängigen Zelltod verursachen, ist für Centrocountin-1 eher ein Einfluss auf die Integrität der Zentrosomen wahrscheinlich. Für die bekannten Oligomerisierungsinhibitoren NPMs ist eine Sensibilisierung behandelter Zellen gegenüber genotoxischem Stress beschrieben, die vermutlich über die NPM-P53-Interaktion vermittelt wird. Die Messung der Zellproliferation von Zellen, die mit Centrocountin-1 und dem Topoisomerase-Inhibitor Doxorubicin behandelt wurden, könnten Hinweise auf etwaige synergistische Effekte liefern und damit eine Abhängigkeit des durch Centrocountin-1 hervorgerufenen Phänotyp von P53 nahelegen. In diesem Zusammenhang wäre auch die Untersuchung eines Einflusses von Centrocountin-1 auf die Relokalisation von NPM nach Induktion von DNA-Schäden durch UV-Strahlung in die Nukleoli von Interesse. Centrocountin-1-behandelte Zellen zeigen unter anderem tripolare Zellen, was ein Hinweis auf eine Zentrosomen-Überduplikation bzw. Zentrosomen-Fragmentierung sein kann. NPM kontrolliert die Integrität der Zentrosomen durch direkte Bindung zwischen der G<sub>2</sub>-Phase und der folgenden G<sub>1</sub>-Phase. Die Assoziation an die Zentrosomen bzw. die nukleoläre Lokalisation wird über die Phosphorylierung NPMs an Threonin 199 kontrolliert. Der

Einfluss von Centrocountin-1 auf die Phosphorylierung von NPM ließe sich mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes NPM (pT199) untersuchen.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien und Zellkulturmedien

**Tabelle 3.1** Verwendete Chemikalien und Zellkulturmedien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Aminosäuren, nicht essentiell (100x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Aqua Polymount	Polysciences, Inc., PA, USA
Bradford Reagenz	BioRad, München
BSA	SERVA GmbH, Heidelberg
2-Mercaptoethanol	SERVA GmbH, Heidelberg
cOmplete protease inhibitor, EDTA free	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	SERVA GmbH, Heidelberg
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe
DMEM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO	SERVA GmbH, Heidelberg
DNA Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
DTE	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
DTT	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
EDTA	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
FBS	Invitrogen, Darmstadt
FLAG M2 magnetic beads	Sigma-Aldrich GmbH, München
GelRed Dye	Biotium, Inc., CA, USA
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare GmbH, Freiburg
Hoechst33342	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Kalbhymus DNA	Sigma-Aldrich GmbH, München
Kanamycin	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Leptomycin B	Sigma-Aldrich GmbH, München
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumpyruvat (100x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
NiNTA Agarose	Qiagen, Hilden
NP-40 Alternative	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
PBS-Tabletten	Jena Biosciences GmbH, Jena
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
PFA	Sigma-Aldrich GmbH, München
Ponceau S Solution 0,2%	Sigma-Aldrich GmbH, München
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA
TEMED	SERVA GmbH, Heidelberg
TFA	Sigma-Aldrich GmbH, München

Triton X-100	SERVA GmbH, Heidelberg
TRIzol	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA (1x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Tween-20	Fisher BioReagents, NJ, USA

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden in ultrapure oder p.A. Qualität von Applichem, Invitrogen, Fluka, Roth oder Sigma-Aldrich bezogen.

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.2** Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
12-Loch-Zellkulturplatte (clear)	Sarstedt AG, Nümbrecht
24-Loch-Zellkulturplatte (clear)	Sarstedt AG, Nümbrecht
96-Loch-Zellkulturplatte (clear)	Sarstedt AG, Nümbrecht
96-Loch-Zellkulturplatte (screening)	Corning Inc., New York, USA
96-Loch-Zellkulturplatte Glasboden	ZellKontakt, Nörten
Carl Zeiss Immersol	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Countess Zählkammer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Deckgläser Ø 12 mm	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Gewebekulturflaschen (versch. Größen)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Gewebekulturschalen (versch. Größen)	Sarstedt AG, Nümbrecht
iCycler iQ PCR 96-Lochplatten	BioRad, München
Küvetten	Sarstedt AG, Nümbrecht
Mini-PROTEAN TGX Gels (4-20%, 4-15%)	BioRad, München
Nitrocellulose-Membran	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Objektträger	Diagonal GmbH, Münster
PVDF-Membran Immobilon FL	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Whatman 3MM Papier	Whatman GmbH, Dassel

Alle weiteren verwendeten Verbrauchsmaterialien entsprachen den üblichen Laborstandards.



### 3.3 Enzyme und Kits

Tabelle 3.3 Verwendete Enzyme und Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Deoxyribonuclease I	Fermentas, St. Leon-Roth
Duolink In Situ Detection Reagent Orange	Sigma-Aldrich GmbH, München
Endofree Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lipofectamine 3000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PfuUltra HF DNA Polymerase	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Phusion Flash High Fidelity Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Q5 High Fidelity Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
SsoAdvanced Universal SYBR Green	BioRad, München
SuperSignal West Pico	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SuperSignal West Femto	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Zellproliferationsreagenz WST-1	Roche, Mannheim

### 3.4 Protein- und DNA-Standards

Tabelle 3.4 Verwendete Protein- und DNA-Standards.

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
GeneRuler 100 bp DNA Ladder plus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

### 3.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen in sterilem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

**Tabelle 3.5** Verwendete Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese mittels PCR.

<b>Primer</b>		<b>Sequenz</b>
NPM-C21F	FWD	CCAGAACTATCTTTTCGGTTTTGAACTAAAGGCCGACAAAG
	REV	CTTTGTCTGGCCTTTAGTTCAAACCGAAAAGATAGTTCTGG
NPM-L102A	FWD	GAAATAACACCACCAGTGGTTCGCAAGGTTGAAGTGTGGTTCAG
	REV	CTGAACCACACTTCAACCTTGCAGCCACTGGTGGTGTATTTC
PROGERIN-C661S	FWD	CAGAGCCCCCAGAACTCCAGCATCATGTAATC
	REV	GATTACATGATGCTGGAGTTCTGGGGGCTCTG
PROGERIN-M664L	FWD	CCAGAACTGCAGCATCTTGTAACTCTGGGACCTG
	REV	CAGGTCCCAGATTACAAGATGCTGCAGTTCTGG

**Tabelle 3.6** Verwendete Klonierungsprimer

<b>Primer</b>		<b>Sequenz</b>
CDC42	FWD	CGTCAAGCTTCCATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTGTGG
	REV	GTACGGATCCTCATAGCAGCACACACCTGCG

**Tabelle 3.7** Verwendete Primer für die quantitative real-time PCR

<b>Zielgen</b>		<b>Sequenz</b>	<b>Amplikon (bp)</b>
ATF3	FWD	CCTCTGCGCTGGAATCAGTC	111
	REV	TTCTTTCTCGTCGCCTCTTTT	
β-Aktin	FWD	ATCGTCCACCGCAAATGCTTCTA	105
	REV	AGCCATGCCAATCTCATCTTGTT	
CDKN1A	FWD	TGCTCAGAGAAGTCGGAAGAA	196
	REV	TGGCACAAAGTTCATAGGGCA	
GAPDH	FWD	TCAGCCGCATCTTCTTTTGCG	100
	REV	GGCGCCCAATACGACCAA	
MMP3	FWD	AGTCTTCCAATCCTACTGTTGCT	226
	REV	TCCCGTCCACTCCAATCC	
MMP14	FWD	CATCTGTGACGGAACTTTGA	163
	REV	GGCAGTGTGATGGACGCA	
STAT3	FWD	ATCACGCCTTCTACAGACTGC	176
	REV	CATCCTGGAGATTCTCTACCACT	

---

### 3.6 Plasmide

---

Name	Herkunft
pET19b-NPM	Prof. Martin, Molecular Cell Biology Laboratory, Dublin, Ireland
pET3a-CRM1	Prof. Wittinghofer, MPI Dortmund
pEGFP-D50 lamin A	Tom Misteli, Addgene plasmid #17653
pGEX4T5-PDE6D	Prof. Wittinghofer, MPI Dortmund
pgLAP3-GFP-INPP5E	Prof. Wittinghofer, MPI Dortmund
pcDNA3-FLAG-PDE6D	M. Pechivanis, MPI Dortmund
pOPINM-RAB23	Prof. Goody, MPI Dortmund
pQE60-CRM1	Iain Mattaj, EMBL Heidelberg

---

### 3.7 Antikörper

**Tabelle 3.8** Verwendete Primär- und Sekundärantikörper. IB = Immunblot; IF = Immunfluoreszenz; BSA = 5% (w/v) Rinderserumalbumin in TBS-T für Immunblots bzw. 2% (w/v) Rinderserumalbumin in PBS 0,1% (v/v) Triton-X100 für Immunfluoreszenz; Milch = 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T.

Antikörperbezeichnung	Verdünnung	Herkunftsorganismus; Klonalität	Puffer	Hersteller; Katalognummer
<b><u>Primärantikörper</u></b>				
Anti-GFP-Tag	IB: 1:5000	Kaninchen Polyklonal	BSA	AnaSpec, Inc., Fremont, USA; 29779-500
Anti-FLAG M2	IB: 1:2000	Maus; Monoklonal	BSA	Sigma-Aldrich GmbH, München; F3165
PDE6D	IB: 1:500	Kaninchen, Polyklonal	BSA	Thermo Fisher Scientific, Schwerte; PA5-22008
Cdc42 (B-8)	IF: 1:200	Maus, Monoklonal	BSA	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA; sc-8401
GAPDH	IB: 1:10000	Maus, Monoklonal	Milch	Sigma-Aldrich GmbH, München; G8795
Anti-Lamin A/C clone JoL2	IB: 1:500	Maus, Monoklonal	BSA	Millipore, Temecula, CA, USA; MAB3211
	IF: 1:200		BSA	
GST	IB: 1:5000	Kaninchen, Polyklonal	BSA	Novus Biologicals, Abingdon, UK; NB600-326
Anti-HRas + KRas	IB: 1:1000	Kaninchen, Polyklonal	BSA	Abcam, Cambridge, UK; ab53160
Rab8 (D22D8) XP	IB: 1:1000	Kaninchen, Monoklonal	BSA	Cell Signaling, Danvers, USA; 6975
NFκB p65	IB: 1:500	Kaninchen, Polyklonal	Milch	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA; sc-372
Anti-Histone H3 (phosphoS10)	IB: 1:1000	Kaninchen, Polyklonal	BSA	Abcam, Cambridge, UK; ab5176
	IF: 1:1000		BSA	
BUB1	IF: 1:500	Maus, Monoklonal	BSA	AbD Serotec; MCA2679
Anti-alpha Tubulin	IF: 1:1000	Kaninchen, Polyklonal	BSA	Abcam, Cambridge, UK; ab18251
Phospho-Histone H2A.X	IB: 1:1000	Kaninchen, Monoklonal	BSA	Cell Signaling, Danvers, USA, 9178
FOXO3A(75D8)	IF: 1:500	Kaninchen, Monoklonal	BSA	Cell Signaling, Danvers, USA, 2497
YAP (63.7)	IF: 1:200	Maus, Monoklonal	BSA	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA; sc-101199
	IB: 1:1000		BSA	
NPM	IF: 1:200	Kaninchen, Polyklonal	BSA	Cell Signaling, Danvers, USA, 3542
	IF: 1:200		BSA	
Anti-α-Tubulin FITC conjugate	IF: 1:500	Maus, Monoklonal	BSA	Sigma-Aldrich GmbH, München; F2168
<b><u>Sekundärantikörper</u></b>				
Anti-Rabbit HRP	IB: 1:20000	Ziege, Polyklonal	Milch	Thermo Fisher Scientific, Schwerte; 31460
Anti-Mouse HRP	IB: 1:20000	Ziege, Polyklonal	Milch	Thermo Fisher Scientific, Schwerte; 31430
Anti-Rabbit Alexa 488	IF: 1:500	Esel, Polyklonal	BSA	Thermo Fisher Scientific, Schwerte; R37118
Anti-Mouse Alexa 488	IF: 1:500	Esel, Polyklonal	BSA	Thermo Fisher Scientific, Schwerte; R37114
Anti-Mouse Alexa 555	IF: 1:500	Esel, Polyklonal	BSA	Thermo Fisher Scientific, Schwerte; R31570
Anti-Mouse Alexa 595	IF: 1:500	Esel, Polyklonal	BSA	Thermo Fisher Scientific, Schwerte; R37115
Anti-Rabbit Alexa 595	IF: 1:500	Esel, Polyklonal	BSA	Thermo Fisher Scientific, Schwerte; R37119

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mithilfe eines 1%igen Agarosegels (1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, 1:100000 GelRed Dye, pH 8,0) bei konstant 110 mV elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Als Größenmarker wurden 3 µl Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Die Auswertung des Gels erfolgte am Gelanalysegerät Gellogis 200 Imaging System (Kodak).

#### 4.1.2 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Elution von PCR-Amplifikaten aus einem Agarosegel wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben extrahiert.

#### 4.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus E.coli unter Verwendung des QIAquick Plasmid Mini Kits und des QIAquick Plasmid Maxi Kits (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben, extrahiert.

#### 4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA mittels spezifischer Primer wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Hierfür wurde die Templat-DNA mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern sowie Desoxyribonukleotiden, in dem für die Polymerase benötigten Puffer versetzt. Als Polymerase diente, je nach Einsatzgebiet eine Q5-, Pfu-, Phusion- oder Taq-Polymerase. Die Reaktionen wurden wie im Beispielansatz (Tabelle 4.1) in einem Mastercycler EP Gradient S (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Im Anschluss wurde das Amplifikat mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.1.1) analysiert oder mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt.

**Tabelle 4.1:** Beispiellansatz für eine Standard-PCR und zugehörige PCR-Bedingungen

PCR Ansatz (25 µl)		PCR Bedingungen	
5x Polymerase Puffer	5 µl	98°C	30 s
dNTPs (2 mM each)	0,625 µl	98°C	10 s
Primer 1 (10 µM)	1 µl	66°C	20 s
Primer 2 (10 µM)	1 µl	72°C	30 s/kb Templat Länge
Templat DNA	100 ng	72°C	2 min
Q5 HF Polymerase (2 U/µl)	0,25 µl	4°C	∞
ddH <sub>2</sub> O	auf 25 µl		

#### 4.1.5 Klonierung von humanem CDC42

Für die Klonierung von humanem CDC42 in einen Expressionsvektor mit N-terminaler GFP-Markierung wurde zunächst RNA aus humanem Blut isoliert (4.1.7) und bei -80°C gelagert. Die Erstrangsynthese der CDC42 cDNA erfolgte mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden). Statt der Verwendung des mitgelieferten Primermixes (Oligo dT- und *random* Hexamer-Oligonukleotide) wurden spezifische Oligonukleotide für die CDC42-Sequenz, mit Schnittstellen für *Hind*III und *Bam*HI für die anschließende Generierung von überhängenden Enden während der Klonierungsreaktion, verwendet. Zunächst erfolgte der Verdau von genomischer DNA in den RNA-Proben für 10 min bei 42°C (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2** Ansatz für den Verdau genomischer DNA aus Proben

Verdau genomischer DNA (14 µl)	
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl
Templat RNA	1 µg
RNase freies Wasser	auf 14 µl

Anschließend wurde der Verdau sofort auf Eis gekühlt und zu den Komponenten für die Erstrangsynthese gegeben (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3** Ansatz für die Erstrangsynthese von CDC42 cDNA aus isolierter RNA

Erststrangsynthese-Ansatz (20 µl)	
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl
CDC42_fwd	0,5 µl (= 250 nM)
CDC42_rev	0,5 µl (= 250 nM)
Verdau Reaktion aus vorherigem Schritt	14 µl

Die Erststrangsynthese wurde für 30 min bei 42°C durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase durch Inkubation bei 95°C für 3 min. Die

gewonnene CDC42 cDNA konnte anschließend bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Um ausreichende Mengen an cDNA für die anschließende Klonierungsreaktion zu gewinnen wurde die cDNA aus der Erststrangsynthese zunächst als Templat für eine PCR mit den Klonierungsprimern (CDC42\_fwd und CDC42\_rev) verwendet (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4** PCR-Ansatz für die Amplifikation des CDC42-Fragments für die anschließende Klonierungsreaktion

PCR-Ansatz (20 $\mu\text{l}$ )		PCR Bedingungen	
5x Phusion HF buffer	4 $\mu\text{l}$	98°C	30 s
dNTPs (2 mM each)	2 $\mu\text{l}$	98°C	10 s
CDC42_fwd	1 (= 500 nM)	72°C	30 s
CDC42_rev	1 (= 500 nM)	72°C	10 min
Erststrangsynthese-Produkt	250 ng	4°C	$\infty$
Phusion DNA-Polymerase	0,2 $\mu\text{l}$		
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 $\mu\text{l}$		

15  $\mu\text{l}$  des Reaktionsmixes wurden im Anschluss an die PCR auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (4.1.1), die entsprechende Bande für CDC42 (ca. 600 bp) ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt (4.1.2).

Für die Klonierung des CDC42-Fragments in den Zielvektor pEGFP-C1 wurde sowohl das CDC42-Fragment als auch der Zielvektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen *Hind*III und *Bam*HI für 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschnitten und die Enzyme anschließend für 10 min bei  $80^{\circ}\text{C}$  inaktiviert (Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5** Restriktionsverdau des CDC42-Fragments und des Zielvektors pEGFP-C1

CDC42-Fragment (20 $\mu\text{l}$ )	DNA-Fragment	Zielvektor
10x FastDigest buffer	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
Templat DNA	ca. 160 ng	ca. 750 ng
<i>Hind</i> III FD	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
<i>Bam</i> HI	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$

Im Anschluss erfolgte die Reinigung der geschnittenen DNA über ein Agarosegel und die Extraktion der DNA aus dem Gel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die folgende Ligation des CDC42-Fragments und des Zielvektors erfolgte bei  $22^{\circ}\text{C}$  für 1 h (Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6** Ligationsansatz für die Klonierung von CDC42 in pEGFP-C1

<b>Ligationsansatz (20 µl)</b>	
10x Ligationspuffer	2 µl
DNA-Fragment	ca. 60 ng
Zielvektor	ca. 30 ng
T4 Ligase (5 U/µl)	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µl

Zur Inaktivierung der T4-DNA-Ligase wurde der Reaktionsmix im Anschluss für 5 min auf 70°C erhitzt. 15 µl des Reaktionsmixes wurden im Folgenden für die Transformation von E.coli Omnimax Zellen verwendet (4.1.9). Transformanten, die nach positiver Selektionierung auf LB-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) Wachstum zeigten wurden in Flüssigkulturen (5 ml) weiter kultiviert und zunächst mittels eines Testverdaus auf die Anwesenheit des Plasmids überprüft. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der isolierten Plasmide durch die Firma StarSEQ (Mainz).

#### **4.1.6 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Zur Analyse der Expressionslevel von HGPS-Zielgenen wurde die qPCR eingesetzt. Wie bei der Standard-PCR-Reaktion wird auch in der qPCR ein spezifisches DNA Molekül amplifiziert. Zusätzlich wird nach jeder Amplifikationsrunde die Menge an DNA in der Probe gemessen. Die Quantifizierung erfolgt durch Zugabe eines Fluoreszenzmarkers (SYBRGreen), der direkt an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Der gebildete Komplex aus DNA und Fluorophor emittiert Fluoreszenz bei 520 nm nach Anregung bei 497 nm. Die Fluoreszenz wird von der optischen Einheit des verwendeten PCR-Cyclers (Biorad iCycler IQ5) am Ende jeder Elongationsphase detektiert. Die lineare Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und des PCR Produkts wird dazu verwendet die Menge an Matrizen DNA im Ausgangsmaterial zu berechnen. Dabei wurde die relative Quantifizierung benutzt, bei der das Verhältnis zwischen dem Zielgen und einem unveränderlichen Referenzgen gemessen wird. Als interner Standard wurde ein 105 bp langes Amplikon aus β-Aktin cDNA oder ein 100 bp Amplikon aus GAPDH cDNA verwendet. Da der verwendete Fluorophor (SYBRGreen) unspezifisch an dsDNA bindet, wurde im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, mit deren Hilfe sich verifizieren lässt, dass nur das gewünschte DNA-Fragment amplifiziert wurde und die Fluoreszenz-Emission somit spezifisch mit der Menge des Zielgens korreliert. Tabelle 4.7 zeigt einen Beispiel-Reaktionsansatz.



**Tabelle 4.7:** Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die QPCR. Die emittierte Fluoreszenz wurde am Ende der Elongationsphase jedes Amplifikationszyklus gemessen.

Reaktionsansatz QPCR (25 µl)		Reaktionsbedingungen	
2x SsoAdvanced SYBRGreen Mix	12,5 µl	98°C	30 s
Primer 1 (10 µM)	0,25 µl	98°C	10 s
Primer 2 (10 µM)	0,25 µl	60°C	60 s
Templat DNA	100 ng	98°C	60 s
ddH <sub>2</sub> O	auf 25 µl	60°C	60s
		60 – 95°C	je 10 s (Erhöhung um 0,5°C pro Zyklus)

x40

#### 4.1.7 RNA-Isolation

HeLa-Zellen wurden in 6 cm Schalen nach Erreichen von ca. 90% Konfluenz durch Zugabe von 1 ml TRIzol (Invitrogen, Darmstadt) lysiert. Für die RNA Isolation aus humanem Blut wurden 500 µl Blut mit 1 ml TRIzol versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur, erfolgte im Fall des humanen Blutes die Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (12.000g, 15 min, 4°C). Die Zugabe von 200 µl Chloroform (15 s schütteln, 3 min Inkubation bei RT) und anschließende Zentrifugation führte zur Auftrennung der Gewebebestandteile im Reaktionsgefäß unter Bildung von 3 Phasen. Die Fällung der RNA in der oberen wässrigen Phase erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Mittels Zentrifugation wurde die RNA präzipitiert und nach zweimaligem Waschen mit 75%igem Ethanol in DEPC Wasser bei Raumtemperatur überkopf getrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet konnte in 50 µl DEPC Wasser resuspendiert werden und die Konzentration spektroskopisch bestimmt werden (NanoDrop® ND-2000c, PEQLAB). Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### 4.1.8 cDNA-Synthese aus mRNA

Die Herstellung von cDNA aus mRNA erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

#### 4.1.9 Transformation von E.coli mittels Hitzeschock

Chemisch kompetente E.coli OmniMAX oder BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurden mittels Hitzeschock transformiert. Hierzu wurden 100 µl kompetente Zellen mit 50 – 200 ng Plasmid DNA versetzt und für 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 42°C im Wasserbad erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmtem SOB Medium erfolgte das Anziehen der Bakterien unter Schütteln für 1 h bei 37°C. Die Zellsuspension wurde auf LB Agarplatten ausgestrichen und unter Selektionsdruck

durch Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml), Chloramphenicol (25 µg/ml) oder Tetracyclin (10 µg/ml) über Nacht bei 37°C wachsen gelassen.

#### 4.1.10 Mutagenese mittels QuikChange-PCR

Für die gezielte Mutagenese von Zielproteinen wurde die Primer-Extensions-Methode gewählt und nach den Herstellerangaben des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits (Agilent) durchgeführt. Hierzu wurde die Templat Plasmid-DNA mit Oligonukleotid-Primern, die die gewünschte Sequenzänderung tragen hybridisiert und das gesamte Plasmid mittels einer DNA Polymerase repliziert (Tabelle 4.8).

**Tabelle 4.8:** Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen für die Quikchange Mutagenese

QuikChange PCR Ansatz (50 µl)		QuikChange PCR Bedingungen	
10x Reaktionspuffer	5 µl	95°C	30 s
Templat DNA	10 – 50 ng	95°C	30 s
Oligonukleotid-Primer 1 (10 µM)	0,5 µl	55°C	1 min
Oligonukleotid-Primer 2 (10 µM)	0,5 µl	68°C	2 min/kb der Plasmidgröße
dNTP Mix	1 µl		
PfuUltra HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl		
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl		

x18

Der Verdau der methylierten Ursprungs DNA erfolgte durch Zugabe von 1 µl *DpnI* (10 U/µl) und Inkubation bei 37°C für 1 h. Anschließend erfolgte die Transformation in E.coli Omnimax Zellen (Transformation von E.coli mittels Hitzeschock 4.1.9).

## 4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.1 Expression und Reinigung von DecaHistidin-Nucleophosmin und Mutanten

Zur Expression der rekombinanten Proteine wurden bereits mit 10xHis-NPM (in pET19b) transformierte Bakterien (BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) aus Glycerolkulturen ausplattiert (LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin). Die Proteinexpression in 5 L TB Medium (Vorkultur in LB Medium, 100 µg/ml Ampicillin 1:50 mit TB Medium verdünnt) wurde bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 1,1 mit 1 mM IPTG induziert und bei 18°C über Nacht inkubiert. Nach Sedimentation der Bakterien bei 2600g und 4°C für 20 min, erfolgte die Lagerung des Bakterienpellets bei -20°C. Zur Aufreinigung von 10xHis-NPM (Wildtyp, C21F, L102A) wurden die gefrorenen Bakterienpellets in Lysepuffer (50 mM TRIS pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 0,1% NP-40, 5 mM Imidazol) resuspendiert. Nach Einstellen der Suspension auf 1 mM PMSF und Zugabe von DNaseI (10 µg/ml) wurden die Zellen fünfmal für je 1 min auf Eis sonifiziert. Zelldebris konnte durch Zentrifugation bei 10000g und 4°C

für 60 min entfernt werden. Die selektive Trennung von 10xHis-NPM und Mutanten aus dem Zelllysate erfolgte affinitätschromatographisch mittels FPLC. Hierfür wurde das von Zelltrümmern bereinigte Zelllysate mithilfe einer Peristaltikpumpe langsam auf eine Ni-NTA-Säule (die Säule wurde vorher mit 3 Säulenvolumen (CV) Lysepuffer äquilibriert) aufgetragen und mit ca. 4 CV Säulenwaschpuffer (50 mM TRIS pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 5 mM Imidazol) gewaschen bis die Absorption bei 280 nm konstant ist (UV280 = konstant). Unspezifisch gebundene Proteine wurden bei niedrigen Imidazol Konzentrationen mit ca. 4 CV Waschpuffer (50 mM TRIS pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 60 mM Imidazol) entfernt. Die Elution von 10xHis-NPM (und Mutanten) erfolgte bei hoher Imidazol Konzentration (50 mM TRIS pH7,9, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 500 mM Imidazol). Die vereinigten Eluatfraktionen wurden über Nacht in einem Dialyseschlauch umgepuffert (50 mM TRIS pH7,9, 500 mM NaCl, 1 mM DTE, 2 mM EDTA). Im Anschluss erfolgte die Konzentration des Eluats mittels Ultrafiltration und die Beladung der Gelfiltrationssäule (HiLoad Superdex 26/60 Superdex 75 prep grade, GE Healthcare, vorher mit 1 CV entgastem Dialysepuffer äquilibriert) über ein Superloop. Nach Elution der Proteine mit 1 CV Dialysepuffer und Analyse der erhaltenen Proteinfractionen mit SDS-PAGE (4.2.5) wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt, ihr Proteingehalt bestimmt (4.2.4) und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

#### **4.2.2 Expression und Reinigung von 6xHis-CRM1**

Für die Expression von 6xHis-CRM1 wurden bereits mit pQE60-Crm1 transformierte E.coli (BL21-CodonPlus(DE3)-RIL) aus Glycerolkulturen über Nacht auf LB-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Proteinexpression wurde durch Animpfen von 4,5 L TB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 500 ml einer Vorkultur nach Erreichen einer OD600 = 0,9 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 16-stündiger Expression unter Schütteln bei 18°C erfolgte die Abtrennung der Bakterien mittels Zentrifugation (6000 g, 20 min, 4°C) und die anschließende Lagerung der Bakterien-Pellets bei -20°C. Zur Aufreinigung von 6xHis-CRM1 wurden die gefrorenen Bakterien in insgesamt ca. 70 ml Lysepuffer (100 mM HEPES-KOH, 300 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,9) gelöst. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von PMSF (1 mM Endkonzentration), DNase (10 µg/ml), RNase A (0,1 mg/ml) und Lysozym (0,2 mg/ml). Nach 30-minütigem Rühren auf Eis erfolgte die Zellyse durch fünfmaliges Sonifizieren für 1 min. Die Abtrennung von Zelldebris erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 10000 g und 4°C. Die Trennung von 6xHis-CRM1 von bakteriellen Proteinen erfolgte affinitätschromatographisch mit Hilfe eines ÄKTA FPLC-Systems. Hierfür wurde das Rohlysate mit einer Peristaltikpumpe langsam auf eine zuvor

dreimal mit Auftragspuffer (100 mM HEPES-KOH, 300 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 15 mM Imidazol, pH 7,9) äquilibrierten NiNTA-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 8 Säulenvolumen (CV) Waschpuffer (100 mM HEPES-KOH, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM Imidazol, 10% Glycerin, pH 7,9) erfolgte die Elution des gebundenen 6xHis-CRM1 unter hoher Imidazol-Konzentration (Waschpuffer mit 250 mM Imidazol). Anschließend erfolgte die Vereinigung der proteinhaltigen Fraktionen und die Dialyse gegen Dialysepuffer (20 mM HEPES-KOH, 140 mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, 250 mM Saccharose, pH 7,5) in einem Dialyseschlauch über Nacht bei 4°C. Am Folgetag erfolgte die Konzentration der Proteine mittels Ultrafiltration, die Proteinbestimmung mittels Bradford-Test und die Lagerung nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C.

#### **4.2.3 Expression und Reinigung von GST-PDE6D**

Zur Expression von GST-PDE6D wurden bereits mit PDE6D (in pGex4T5) transformierte E.coli RosettaTM2 aus Glycerolstocks ausplattiert (LB-Agarplatte, 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg Chloramphenicol) und über Nacht bei 37°C gelagert. Nach Verdünnung einer Vorkultur in LB Medium (100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol) 1:100 mit TB Medium (100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Chloramphenicol) auf ein Gesamtvolumen von 10 L erfolgte die Induktion mit 0,2 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> = 1,33. Die Expression von GST-PDE6D wurde über Nacht bei 18°C unter Schütteln durchgeführt. Anschließend erfolgte die Sedimentierung der Bakterien durch Zentrifugation bei 4000g für 20 min bei 4°C und die Lagerung bei -20°C. Zur Reinigung der Proteine wurden die Bakterien zunächst in Lyspuffer (30 mM TRIS-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol) resuspendiert und auf 1 mM PMSF eingestellt. Nach Zugabe von DNaseI (10 µg/ml) konnte die Zellsuspension dreimal für 1 min auf Eis sonifiziert und dreimal mittels Microfluidizer aufgeschlossen werden. Zur Abtrennung von Zelldebris wurde das Lysat für 35 min bei 20000g zentrifugiert. Die Trennung von GST-PDE6D von sonstigen Proteinen aus dem Zelllysat erfolgte affinitätschromatographisch über Bindung an GSH-Sepharose mittels FPLC. Hierzu wurde das von Zelltrümmern bereinigte Lysat mittels Peristaltikpumpe langsam auf eine GSH-Säule (die Säule wurde vorher mit 3 Säulenvolumen (CV) Lysispuffer gewaschen) aufgetragen und mit 5 CV Lysispuffer gewaschen (bis Absorption bei 280 nm konstant). Die Elution erfolgte mit 4 CV Elutionspuffer (30 mM TRIS-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 200 mM Glutathion). Die GST-PDE6D enthaltenen Eluatfraktionen wurden mittels Ultrafiltration konzentriert und anschließend langsam mithilfe eines 5 ml Superloops auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad Superdex 26/60 Superdex 75 prep grade, GE Healthcare)

aufgetragen, die zuvor mit 1 CV (320 ml) Gelfiltrationspuffer (20 mM TRIS-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol) äquilibriert wurde. Nach der Elution erfolgte die erneute Konzentration, die Proteinbestimmung mittels Bradford-Test (4.2.4) und das Schockfrieren in flüssigem Stickstoff, bevor die Proteine bei -80°C gelagert wurden.

#### **4.2.4 Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration**

Um die Proteinkonzentration von Proben zu bestimmen wurde der Bradford-Test verwendet. Hierfür wurde Bradford-Reagenz (Bio-Rad) 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und je 1 ml davon in Messküvetten gegeben. Nach Zugabe der proteinhaltigen Probe und 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. Mithilfe der zuvor erstellten Eichgeraden kann die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden. Die Eichgerade wurde zuvor mit verschiedenen Verdünnungen einer BSA-Lösung mit bekannter Konzentration erstellt.

#### **4.2.5 SDS-PAGE**

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte über eine SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Die Proteinproben wurden zunächst nach Zugabe von Lämmli-Puffer (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, 1% SDS (w/v), 5% 2-Mercaptoethanol (v/v), 10% Glycerin (v/v), 0,05% Bromphenolblau (w/v), pH 8,0) bei 95°C für 5 min denaturiert. Je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Zielproteins wurde die Auftrennung über 8- oder 10%ige Trenngele (Tabelle 4.9) in 1xLämmli-Laufpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei konstant 80 V für 30 min und anschließend konstant 150 V für 60 min durchgeführt. Als Elektrophorese-Apparatur wurde die Mini-PROTEAN® 3 Cell von Bio-Rad und als Stromversorgung das PowerPac 3000 (Bio-Rad) verwendet.

**Tabelle 4.9:** Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele. Die Angaben beziehen sich für Trenngele auf ein Endvolumen von 20 ml und für das Sammelgel auf 10 ml.

	Sammelgel 4% [ml]	Trenngel 8% [ml]	Trenngel 10% [ml]	Trenngel 12% [ml]	Trenngel 15% [ml]
ddH <sub>2</sub> O	6,8	9,3	7,9	6,6	4,6
30% Acrylamid Mischung	1,7	5,3	6,7	8	10
TRIS-HCl (1,5 M, pH 8,8)	-	5	5	5	5
TRIS-HCl (1,0 M, pH 6,8)	1,25	-	-	-	-
10% SDS- Lösung	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
10% APS- Lösung	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02

#### 4.2.6 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Um Proteine aus elektrophoretisch aufgetrennten Proteingemischen auf dem Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurden die Gele mit heißer Coomassie-Färbelösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, 39,75% ddH<sub>2</sub>O, 0,25% (w/v) Coomassie Blue R-250) für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Entfärbung mit heißer 10% (w/v) Essigsäure bis zur gewünschten Farbintensität der Proteinbanden.

#### 4.2.7 Oligomerisierung von DecaHistidin-NPM und Mutanten

Nach Expression und Reinigung von 10xHis-NPM, 10xHis-NPMC21F und 10xHis-NPML102A wurde die Oligomerisierung der Proteine mittels SDS-PAGE und Immunblot überprüft. 10 µg der gereinigten Proteine wurden in Lämmli-Puffer (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, 1% SDS (w/v), 5% 2-Mercaptoethanol (v/v), 10% Glycerin (v/v), 0,05% Bromphenolblau (w/v), pH 8,0) gelöst und anschließend ohne vorheriges Aufkochen mittels eines 12%igen SDS-Gels aufgetrennt. Mit Hilfe der Coomassie-Färbung wurden die Proteine im Gel sichtbar gemacht. Parallel erfolgte das Immunblotting eines identisch behandelten SDS-Gels auf eine PVDF-Membran und die folgende Antikörperfärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen NPM.

#### 4.2.8 Native Gelelektrophorese

Zur Bestimmung des Einflusses von Centrocountin-1 auf die Oligomerisierung von NPM wurde gereinigtes 10xHis-NPM mit unterschiedlichen Konzentrationen von Centrocountin-1 oder DMSO für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben in CN-Probenpuffer (50 mM Imidazol, 50 mM NaCl, 2 mM 6-Aminocapronsäure, 1 mM EDTA, 0,01% Ponceau S, 10% Glycerin) verdünnt. Die elektrophoretische Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine erfolgte auf einem nativen ServaGel (3 – 12%) in einer

Gelelektrophorese-Apparatur mit nativem Anodenpuffer (500 mM BisTris-HCl, pH 7,0) und nativem Kathodenpuffer (500 mM Tricine, 150 mM BisTris) für 10 min bei einer konstanten Spannung von 50 V und 100 min bei konstanten 200 V. Im Anschluss erfolgte die Färbung des nativen Gels mittels Coomassie-Färbung.

#### 4.2.9 Immunblot

Nach elektrophoretischer Auftrennung des Proteingemischs über SDS-PAGE wurden die Proteine, unter Verwendung des Wet-Blot-Systems auf eine Nitrocellulose- (PROTRAN® (0,2 µm Porengröße), Whatman) oder PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Immobilon-FL PVDF, 0,45 µm, Merck Millipore) übertragen. Hierfür wurden Gel und Nitrocellulosemembran zwischen zuvor in Nitrocellulose-Transferpuffer (25 mM TRIS-HCl pH 8,3, 190 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) getränkte Filterpapiere gelegt. Bei Verwendung von PVDF-Membran wurde diese vor Äquilibriumierung in PVDF-Transferpuffer (25 mM TRIS-HCl pH 8,3, 190 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol) in 100% Methanol für 1 min geschüttelt. Der Transfer erfolgte in der Blottingkammer (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) bei konstant 100 V (Power Pac 3000, Biorad) für 60 min. Im Anschluss wurde der korrekte Transfer der Proteine auf die Membran durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau S-Lösung (0,2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure, Serva) überprüft. Um unspezifische Antikörperbindestellen auf der Membran zu blockieren wurde die Membran für 60 min in Blocking-Puffer (je nach Primärantikörper 5% (w/v) Milchpulver oder 5% (w/v) BSA in TBS-T (20 mM TRIS-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20) geschüttelt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C (Tabelle 3.8) unter Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für 5 Minuten wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten (horseradish peroxidase, Peroxidase aus dem Meerettich) Sekundärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen wurde die Membran erneut dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran für 1 min mit Chemilumineszenz Substrat (SuperSignal West Pico/Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) behandelt. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte in einem Odyssey FC (LI-COR) oder ChemiDoc (Biorad) System.

#### 4.2.10 GST-Pulldown

Zum Nachweis von Proteininteraktionen und zur Identifizierung neuer Bindungspartner von PDE6D wurde die Methode des GST-Pulldowns gewählt. Hierfür wurden humane Pankreastumorzellen (Panc-Tu-I), humane Nierenzellen HEK293T oder humane Fibroblasten

(HGDAFN127 und HGFDFN168) in PBS-C (140 mM NaCl, 10 mM Phosphate Buffer, 3 mM KCl, pH 7.45, 0,5% CHAPS, EDTA-free Protease Inhibitoren) von 10 cm Kulturschalen mit einem Zellschaber gekratzt. Mittels milder Sonifizierung und anschließender mechanischer Lyse (Pressen des Lysats durch 28G Nadel) wurden die Zellen homogenisiert. Nach Sedimentation unlöslicher Zellbestandteile (15 min, 12000g, 4°C) wurde die Proteinkonzentration des Überstands mittels Bradford-Test (4.2.4) bestimmt und mit PBS-C auf gleiche Proteinkonzentrationen eingestellt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von GST-PDE6D (1,3 – 2 µM), von Deltarasin/Deltazinone 1 oder DMSO sowie von 16 µl (50/50) GSH-Sepharose 4B (GE Healthcare). Nach 2 h Inkubation wurde der immobilisierte Proteinkomplex mittels Zentrifugation (5 min, 500g, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Zur Abtrennung von unspezifisch gebundenen Proteinen erfolgte das Waschen des Komplexes bei anschließender elektrophoretischer Auftrennung fünfmal mit PBS-C. Nach dem letzten Waschen wurden die GSH-Kügelchen unter Zuhilfenahme einer Insulinspritze trocken gezogen und in 16 µl 2xLämmli-Puffer (125 mM TRIS-HCl pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerol, 50 mM DTT, 0,01% Bromphenolblau) für 5 min auf 95°C erhitzt. Im Falle der folgenden Analyse des Proteinkomplexes mithilfe von HPLC-MS/MS wurde dreimal mit PBS-C und zweimal mit PBS (140 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 3 mM KCl, pH 7.45) gewaschen, um die Detergenz-Konzentration für die folgenden Arbeitsschritte (4.2.12) gering zu halten.

#### **4.2.11 Immunpräzipitation**

Neben der Methode des GST-Pulldowns wurde zum Nachweis von Proteininteraktionen und zur Identifikation neuer Interaktionspartner von PDE6D die Immunpräzipitation verwendet. Hierfür wurden mit FLAG-PDE6D (in pcDNA3.1(+)) transfizierte HEK293T-Zellen in RIPAm Puffer (50 mM TRIS-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,25% Na-Deoxycholat, 1% NP40, EDTA-free Protease Inhibitoren) aus 10 cm Zellkulturschalen gekratzt und anschließend für 30 min unter Schütteln bei 4°C lysiert. Für den Nachweis von Proteininteraktionen wurden mit FLAG-PDE6D (in pcDNA3.1(+)) und GFP-markiertem Interaktionspartner transfizierte HEK293T-Zellen in PBS-C (siehe 4.2.10) aus 10 cm Zellkulturschalen gekratzt, anschließend sonifiziert und mechanisch lysiert (siehe 4.2.10). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (4.2.4) und Angleichen der Proteinkonzentration zwischen den verschiedenen Proben mit PBS-C, erfolgte die Zugabe von 10 µl Antikörper gegen die FLAG-Markierung gekoppelt an magnetisierte Agarose (Anti-FLAG M2 Magnetic Beads, Sigma). Im Anschluss an die Inkubation für 2 h oder über Nacht wurde der Komplex aus Agarose, Antikörper und präzipitierten Proteinen in einem magnetischen Ständer vom



Zelllysat getrennt und für die Analyse mittels Immunblot (4.2.9) viermal mit PBS-C gewaschen. Das Abtrennen des Proteinkomplexes konnte durch Zugabe von 20 µl 2xLämmli-puffer (4.2.10) erreicht werden. Für die massenspektrometrische Analyse wurde der Proteinkomplex dreimal mit RIPAm und zweimal mit TBS (20 mM TRIS-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) gewaschen.

#### **4.2.12 Tryptischer Verdau von Proteinkomplexen**

Für die Identifikation neuer Interaktionspartner von PDE6D wurde nach der affinitätschromatographischen Reinigung (4.2.10 und 4.2.11) ein tryptischer Verdau des angereicherten Proteinkomplexes durchgeführt und die erhaltenen Peptide anschließend massenspektrometrisch analysiert. Hierfür wurden die immobilisierten Proteinkomplexe für 1 h bei Raumtemperatur in 100 µl E1 Puffer (50 mM Ammoniumbicarbonat, 1 mM DTT, 5 µg/ml Trypsin) geschüttelt, anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl E2 Puffer (50 mM TRIS-HCl pH 7,5, 1,85 M Urea, 50 mM Chloracetamid) und die Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben mit 2 µl konzentrierter Trifluoressigsäure versetzt.

#### **4.2.13 StageTip Reinigung von Peptiden**

Die erhaltenen Peptide (4.2.12) wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mittels Umkehrphasenchromatographie gereinigt. Die verwendeten StageTips (Stop and Go Extraction Tips) wurden dabei aus Polypropylen Pipettenspitzen und C18 Säulenmaterial (3M High Performance Extraction Disks C18 (Octadecyl)) selbst hergestellt. Die Aktivierung des StageTips erfolgte durch Zugabe von 100 µl Methanol auf das Säulenmaterial und anschließender Zentrifugation in der StageTip Zentrifuge. Nach zweimaligem Waschen mit 100 µl Lösung A (0,1% Ameisensäure in ddH<sub>2</sub>O) wurden die StageTips mit den Proben beladen. Nach Waschen mit Lösung A erfolgte die Elution der Peptide durch 1 min Inkubation der StageTips mit 20 µl Lösung B (80% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure in ddH<sub>2</sub>O) und anschließender Zentrifugation in ein frisches Reaktionsgefäß. Die Elution wurde ein zweites Mal wiederholt und die Eluate vereinigt. Zur Lagerung vor der Analyse mittels HPLC-MS/MS wurden die Eluate mithilfe von Vakuumkonzentration (Concentrator plus, Eppendorf) getrocknet.

#### **4.2.14 Protein-Identifikation mittels nano-HPLC-MS/MS**

Die getrockneten Peptide aus dem tryptischen Verdau (4.2.13) wurden mittels nano-HPLC getrennt und anschließend mittels MS und MS/MS identifiziert. Hierfür wurde eine Ultimate 3000 nano-HPLC gekoppelt an ein Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap

Massenspektrometer (Thermo Scientific) verwendet. Die Messung der Peptide und die folgende Auswertung der Daten sowie die markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung (LFQ, *label free quantification*) wurde von Dr. Petra Janning (MPI Dortmund) und Andreas Brockmeyer (MPI Dortmund) durchgeführt. Zunächst wurden die getrockneten Peptide in 20 µl TFA resuspendiert und anschließend unter Sonifizierung (15 min bei maximaler Intensität) gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15000g, 1 min) sedimentiert und anschließend verworfen. Im Anschluss wurden 3 µl Fraktionen in einem nano-(U)HPLC System mit Flussraten von 300 nl/min unter Verwendung eines UltiMate™ 3000 RSLCnano Systems (Dionex) ausgestattet mit einer nano-HPLC Acclaim PepMap RSLC C18 Säule (2 µm, 10 nm, 75 µm ID x 25 cm, nanoViper, Dionex), einer Vorsäule (Acclaim PepMap100 C18, 5 µm, 10 nm, 300 µm ID x 5 mm, Dionex) entsalzt und konzentriert und mittels Nanoelektronenspray ionisiert (Standard Coated SilicaTip™ Emitter, 360 µm OD, 20 µm ID, 10 µm Tip ID, 10,5 cm, New Objective, USA). Die Auftrennung erfolgte mit einem linearen Gradienten über 90 min von 5% - 40% Acetonitril (0,1% Ameisensäure) in Wasser (0,1% Ameisensäure) bei konstanter Flussrate bei einer Säulentemperatur von 40°C. Hoch auflösende MS und MS/MS Messungen wurden auf einem Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Scientific) mit Nanoelektronensprayionisierung durchgeführt (Nanospray Flex Ion Source, Thermo Scientific). Ionisiert wurde mit 1,8 – 2,5 kV um einen Massenbereich von m/z 300 – 1650 mit einer Auflösung von 70000 Einheiten zu messen („one-micro-scan mode“ mit „automated gain control“ (AGC)). Bis zu zehn Hochenergie-Dissoziations MS/MS Scans (HCD) mit einer Auflösung von 17500 Einheiten wurden von den 10 Peptiden mit der höchsten Intensität und mindestens doppelter Ladung gemessen (AGC:  $1 \times 10^5$ , IT: 120 ms, isolation window: 3 m/z, normalized collision energy (NCE): 25, Verhältnis von 0,1%, Intensitätsschwelle:  $8,3 \times 10^2$ , dynamic exclusion: 20s). Es wurden jeweils Komplet- und Fragmentierungsspektren aufgenommen.

#### **4.2.15 MS/MS Datenanalyse**

Die Auswertung von Massenspektrometrie Daten wurde mithilfe der Software MaxQuant (Cox and Mann, 2008) (v.1.3.0.3 oder 1.4.1.2) mit dem Andromeda Suchalgorithmus und dem humanen Referenz Proteom der Uniprot-Datenbank durchgeführt. Die Suche wurde für den Kompletverdau mit Trypsin und zwei Fehlschnitten ausgeführt. Carbamidomethylierung wurde als feste Proteinmodifikation und die Oxidation von Methionine und Acetylierung des N-Terminus als variable Modifikation eingestellt. Die Genauigkeit für gesamte Massenspektren wurde auf 5 ppm und für MS/MS Spektren auf 20 ppm gesetzt. Die false

discovery rate (FDR) für Peptide und Proteine wurde auf 1% gesetzt und es wurden ausschließlich Proteine für die weitere Analyse ausgewählt, von denen mindestens 2 Peptide quantifiziert werden konnten. Als Methode zur relativen Quantifizierung wurde der Algorithmus zur label free quantification (LFQ, markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung) mit der MaxQuant Software verwendet. Die drei technischen Replikate der Proben des GST-Pulldowns mit GST-PDE6D (4.2.10) sowie der Immunpräzipitation mit FLAG-PDE6D (4.2.11) bzw. deren Kontrollexperimente (Pulldown mit GST und Immunpräzipitation mit untransfizierten Zellen) wurden gruppiert. Nach Logarithmieren ( $\log_2$ ) der LFQ Intensitäten wurden Proteine, die nicht mindestens zweimal in einer Gruppe quantifiziert werden konnten, herausgefiltert. Fehlende Werte wurden durch normalverteilte Werte berechnet. Proteine die nach t-Test signifikant von der Normalverteilung abwichen, wurden als Treffer berücksichtigt.

#### 4.2.16 Proximity Ligation Assay (PLA)

Für den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen in Zellen wurde die *in situ* PLA Technik nach Herstellerangaben verwendet (Duolink PLA Technology, Sigma Aldrich). Diese Methode ermöglicht die Visualisierung von Protein-Protein-Interaktionen in fixierten Zellen. Hierfür wurden 50000 HeLa-Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch Platte auf Deckgläsern ausgesät. Am nächsten Tag folgte die Transfektion (4.3.2) mit GFP-Progerin und Mutanten (in pEGFP-C1). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 250  $\mu$ l 4% Paraformaldehyd in PBS (siehe 4.2.10) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 500  $\mu$ l PBS erfolgte das Blockieren und Permeabilisieren der Zellen durch Inkubation mit 250  $\mu$ l Blockier-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM Phosphate Buffer, 3 mM KCl, 0,1% Triton-X100, 3% (w/v) Rinderserumalbumin, pH 7,45) für 30 min. Die Deckgläser wurden über Nacht auf einem Tropfen (30  $\mu$ l) Primärantikörper in Blockier-Puffer bei 4°C unter gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am Folgetag erfolgte das dreimalige Waschen mit 500  $\mu$ l PBS-Tx (140 mM NaCl, 10 mM Phosphate Buffer, 3 mM KCl, 0,1% Triton-X100, pH 7,45) und die Inkubation mit PLA+ und PLA- Proben (1:100) in 30  $\mu$ l Blockier-Puffer je Deckglas für 1 h bei 37°C. Unspezifisch gebundene PLA-Proben wurden durch zweimaliges Waschen mit 500  $\mu$ l TBS-Tw (20 mM TRIS-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) entfernt. Zur Ligation der DNA Sequenzen der beiden PLA-Proben wurden die Deckgläser für 30 min bei 37°C mit Ligationslösung (Ligase Puffer 1:5 in ddH<sub>2</sub>O, Ligase 1:40) überschichtet. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit TBS-Tw erfolgte die Amplifikation der DNA und die anschließende Hybridisierung mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden durch Inkubation mit Amplifikationslösung (Amplifikations Puffer 1:5 in

ddH<sub>2</sub>O, Polymerase 1:80) für 100 min bei 37°C. Vor Fixierung der Deckgläser auf Objektträgern (Aqua Polymount, Polysciences Inc.) wurde die DNA mit DAPI (1:1000 in TBS (20 mM TRIS-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl)) gefärbt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (4.3.8) bei 63x Vergrößerung und Aufnahme von Bildern im DAPI (DNA) und DsRed (PLA Signal) Kanal. Die Quantifizierung der PLA Signale pro Zelle erfolgte automatisiert mithilfe von ImageJ und folgendem Makro:

```
dir=getDirectory("input");
name=getDirectory("Save results");
setBatchMode(true);
files=getFileList(dir);
for(f=0; f<files.length; f++){
    run("Bio-Formats Importer", "open="+dir+files[f]+" + color_mode=Default
    split_channels view=Hyperstack stack_order=XYZCT series_1");
    // *.czi Datei öffnet 3 Kanäle in gleicher Reihenfolge. Image 1 ist channel595 (PLA
    signal) Image 3 ist DAPI.
    selectImage(1);
    setAutoThreshold("Default dark");
    //run("Threshold...");
    setThreshold(439, 4095);
    // Threshold muss manuell für jedes Experiment (Belichtungsdauer etc.) vorher
    definiert werden
    run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity show=Outlines display exclude clear
    include");
    // speichern im gewählten output Verzeichnis, mit Dateinamen
    Bilddatei_results_PLA.txt
    saveAs("Results", name+files[f]+"_results_PLA.txt");
    selectImage(3);
    setAutoThreshold("Default dark");
    //run("Threshold...");
    run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity show=Outlines display clear include");
    // speichern im gewählten output Verzeichnis, mit Dateinamen
    Bilddatei_results_DNA.txt
    saveAs("Results", name+files[f]+"_results_DNA.txt");
    close("**");
};
setBatchMode(false);
```

#### 4.2.17 Fluoreszenzpolarisation (FP)

Zur Charakterisierung der Wechselwirkungen von niedermolekularen Verbindungen und Proteinen wurde die Methode der Fluoreszenzpolarisation verwendet. Hierfür wurde in 96- oder 384-Lochplatten der zu untersuchende Rezeptor (GST-PDE6D, 10xHis-NPM, 10xHis-NPMC21F, 10xHis-NPML102A, 6xHis-CRM1) in PBS-T (140 mM NaCl, 10 mM Phosphatpuffer, 3 mM KCl, 0,05% Tween-20, pH 7.45) vorgelegt und seriell verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Liganden TAMRA-Deltarasin/Centrocountin-FITC zu einer Endkonzentration von 50/300 nM. Die Analyse der Platten erfolgte mit einem Multiplattenleser (Safire2, Tecan). Apparente Dissoziationskonstanten wurden mithilfe eines Standard 4-Parameter Fits berechnet.

#### 4.2.18 DNA-Bindungsassay

Die Bindung von kleinen Molekülen an DNA wurde mithilfe eines Verdrängungsexperiments nach Williams *et al.* bestimmt (Williams et al., 2012). In einer 96-Lochplatte wurden 20  $\mu\text{M}$  sonifizierte Kalbsthymus DNA in PBS mit 2  $\mu\text{M}$  DAPI oder 2  $\mu\text{M}$  Ethidiumbromid vorgelegt und anschließend mit dem zu testenden kleinen Molekül titriert. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz für DAPI mit Anregung bei 358 nm und 461 nm Emission und für Ethidiumbromid bei einer Anregungswellenlänge von 546 nm und einer Emission von 595 nm (Tecan M1). Bei Bindung eines kleinen Moleküls an DNA wird je nach Bindestelle DAPI und/oder Ethidiumbromid verdrängt und das jeweilige Fluoreszenzsignal sinkt. Mittels eines Standard 4-Punkte Fits kann die IC<sub>50</sub> der Testsubstanz bestimmt werden.

### 4.3 Zellbiologische Methoden

#### 4.3.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 10 cm Zellkulturschalen in entsprechendem Medium (Tabelle 4.10) kultiviert.

**Tabelle 4.10:** Verwendete Zelllinien und zugehörige Medien

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze
HeLa, HEK293T, Panc-Tu-1, U-2 OS	DMEM (4,5 g/L Glukose, 4 mM Glutamin)	10% (v/v) FBS, Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml) nicht essentielle Aminosäuren 10 mM Natriumpyruvat
Primäre Humanfibroblasten (HGADFN167/127, HGFDFN168, HGFDMN90)	DMEM (4,5 g/L Glukose, ohne Glutamin)	10% (v/v) FBS, Penicillin (1000 U/ml) Streptomycin (1 mg/ml) 2 mM Glutamin

Bei Erreichen einer ca. 90%igen Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS (10 mM Phosphatpuffer, 140 mM NaCl, pH 7,45) gewaschen und anschließend für 5 – 10 min mit 2 ml 1xTrypsin/EDTA Lösung unter Kulturatmosphäre inkubiert. Die Trypsinierungsreaktion wurde mit frischem Kulturmedium gestoppt und die Zellen nach Resuspendierung verdünnt in neue Zellkulturschalen ausgesät. HEK293T Zellen wurden zur Passage mit frischem Medium abgelöst, vereinzelt und in neue Zellkulturschalen verdünnt.

### **4.3.2 Lipofektion von Humanzellen**

Die Transfektion von HeLa-Zellen erfolgte mit Lipofectamine 2000 oder Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben.

### **4.3.3 Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293T Zellen**

HEK293T Zellen wurden bei ca. 40%iger Konfluenz in 10 cm Zellkulturschalen transfiziert. Hierfür wurden 10 µg Plasmid-DNA in 500 µl 244 µM Kalziumchlorid Lösung gelöst und langsam zu 500 µl 2xHBS (50 mM HEPES, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,0) gegeben. Im Anschluss erfolgte das langsame Zutropfen des Transfektionsmixes zu den Zellen. Die Zellen wurden 24 h oder 48 h nach Transfektion lysiert. Bei Lyse nach 48 h erfolgte 24 h nach Transfektion der Austausch des Transfektionsmediums gegen frisches Kulturmedium.

### **4.3.4 Zellviabilitätsbestimmung**

Zur Bestimmung von Zellviabilität und Zellproliferation wurde der WST-1 (water soluble tetrazolium) Test genutzt. Hierbei wird das stabile Tetrazolium Salz durch zelluläres NAD(P)H+H<sup>+</sup> zu Formazan gespalten, welches Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm absorbiert. Die gemessene Absorption bei 450 nm korreliert dabei mit den metabolisch aktiven Zellen in Kultur. HeLa-Zellen wurden in 96-Lochplatten ausgesät und am Folgetag mit den entsprechenden Substanzen im Quadruplikat für 48 h behandelt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des WST-1 Reagenzes (Roche) zu 10% (v/v) Endkonzentration. Nach Messung der Absorption bei 450 nm (DTX-880 plate reader, Beckman Coulter) konnte der EC<sub>50</sub> der getesteten Substanzen über einen Standard Vier-Punkte Fit berechnet werden (Graphpad Prism 6.0).

### **4.3.5 Kryokonservierung von Zelllinien**

Zur Lagerung wurden Zellen nach Waschen mit PBS und Trypsinierung (4.3.1) in Kryokonservierungs-Medium (Zellkulturmedium, 10% (v/v) DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Lagerung der Zellen in einer Einfrierhilfe (Mr. Frosty, Thermo Fisher) bei -80°C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte der Transfer der Kryoröhrchen in die Dampfphase eines Flüssigstickstofftanks.

### **4.3.6 Fixierung von Zellen**

Für die immunzytochemische Analyse von zellulären Proteinen wurden Zellen in 24-Lochplatten auf Deckgläsern oder in 96-Lochplatten (Corning, #3340 oder Zellkontakt, #5241) kultiviert und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei

Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS überschüssige Fixierlösung entfernt.

#### **4.3.7 Immunzytochemie**

Zellen auf Deckgläsern in 24-Lochplatten oder in 96-Lochplatten wurden nach Fixierung (4.3.6) dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Blockier-Puffer (4.2.16) für 1 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper (Tabelle 3.8) in Blockier-Puffer für Zellen auf Deckgläsern auf einem Tropfen (30 µl) Antikörperlösung und in der 96-Lochplatte in 40 µl Antikörperlösung für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Am Folgetag wurden die Proben mit PBS oder PBS-Tx (4.2.16) dreimal gewaschen. Die Inkubation mit Sekundärantikörper (Tabelle 3.8) folgte in Blockier-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Nach Abnahme des Sekundärantikörpers wurde einmal mit DNA-Färbelösung (DAPI oder Hoechst33342 1 µg/ml in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zellen in 96-Lochplatten konnten so bis zur Analyse bei 4°C gelagert werden, während Zellen auf Deckgläsern mit einem Tropfen Eindeckmedium (Aqua Polymount Polysciences Inc.) auf Objektträgern fixiert und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet wurden.

#### **4.3.8 Manuelle Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie**

Für die nicht-automatische Fluoreszenzmikroskopie wurden Proben auf Deckgläsern und 96-Lochplatten mit Glasboden (Zellkontakt) in einem inversen Zeiss Observer Z.1 System mit einem Zeiss LD Plan NEOFLUAR (40x/0,6 Korr) und einem Zeiss Plan APOCHROMAT (63x/1,4 Öl) Objektiv analysiert. Bilder wurden mittels einer AxioCam MRM Kamera aufgenommen und mit der Software Zeiss ZEN blue edition 2011 bearbeitet und exportiert.

#### **4.3.9 Automatische Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie**

Die automatische Aufnahme von 96-Lochplatten bei 20x Vergrößerung erfolgte unter Verwendung eines Zeiss Axiovert 200M Systems mit automatischem Mikroskoptisch und automatischem optischem Autofokus (Visitron). Bilder wurden mit einer CoolSNAP ES Kamera (Visitron) aufgenommen und mit der Software MetaMorph (7.7.8.0, Visitron) ausgewertet.

#### **4.3.10 Lebendzellmikroskopie**

Für die Lebendzellmikroskopie wurden Zellen in 24-Lochplatten (Greiner) ausgesät und in einer Inkubationskammer unter dem automatischen Mikroskop Zeiss Axiovert 200M

kultiviert. Die Aufnahme von Bildern erfolgte alle 10 min mit einem 20x oder 40x Objektiv. Für Fluoreszenz-Lebendzellmikroskopie wurde voll supplementiertes phenolrot-freies DMEM Medium verwendet.

#### **4.3.11 Konfokale Mikroskopie**

Konfokale Bilder von Proben auf Deckgläsern wurden mithilfe eines Leica TCS SP5 Systems, unter Verwendung eines Weißlicht-Lasers und eines Argon-Lasers mit einem 63x Öl-Objektiv (HCX PL APO lambda blue 63x 1.40 oil), aufgenommen. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software Leica Application Suite Advanced Fluorescence Lite 2.6.3 build 8173 und ImageJ1.51a.

#### **4.3.12 Screening von Mitoseinhibitoren**

Für das Screening von Centrocourtin-Derivaten wurde ein High Content Screen mit niedrigem Durchsatz gewählt. Hierfür wurden 2500 HeLa-Zellen in 100 µl Zellkulturmedium in 96-Lochplatten (Corning, #3340) ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen und durch 100 µl frisches Medium mit 20 µM Testsubstanz ausgetauscht. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 100 µl Perm-Fix Lösung (100 mM K-PIPES, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 4% (v/v) Formaldehyd) bei Raumtemperatur für 30 min fixiert und permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Proben zweimal für 3 min mit 100 µl TBS-T (4.2.9) gewaschen und für 1 h mit 2% Rinderserumalbumin in TBS-T blockiert. Zur Färbung des Mitosemarkers phospho-Histon H3 wurde je Loch der 96-Loch Platte 40 µl des Primärantikörpers (Abcam, ab5176 1:1000 in Blockier-Puffer) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit TBS-T für 3 min erfolgte die Inkubation mit Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper und DNA Marker (donkey anti-goat Alexa488, 1:500; DAPI 1µg/ml) in 40 µl Blockier-Puffer für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T und einem finalen Waschschrift mit TBS konnten die Platten bei 4°C bis zur Vermessung am automatischen Mikroskop (4.3.9) gelagert werden. Pro Loch der 96-Lochplatte wurden 9 Bilder mit einem 20x Objektiv im DAPI und Azami-Kanal aufgenommen. Mithilfe der Software MetaMorph 7.7.8.0 und der Applikation Cell Cycle Analysis wurde die Anzahl an allen Zellen und die Anzahl an mitotischen Zellen pro Bild bestimmt. Die Berechnung des mitotischen Index erfolgte je Loch der 96-Lochplatte und lies die Berechnung einer Standardabweichung über drei technische Replikate zu.



## 5 Literaturverzeichnis

- Ahn, J.Y., Liu, X., Cheng, D., Peng, J., Chan, P.K., Wade, P.A., and Ye, K. (2005). Nucleophosmin/B23, a nuclear PI(3,4,5)P(3) receptor, mediates the antiapoptotic actions of NGF by inhibiting CAD. *Molecular cell* 18, 435-445.
- Anderson, J.T., Ting, A.E., Boozer, S., Brunden, K.R., Crumrine, C., Danzig, J., Dent, T., Faga, L., Harrington, J.J., and Hodnick, W.F., et al. (2005). Identification of novel and improved antimitotic agents derived from noscapine. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 7096-7098.
- Araki, S., Kikuchi, A., Hata, Y., Isomura, M., and Takai, Y. (1990). Regulation of reversible binding of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, to synaptic plasma membranes and vesicles by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 265, 13007-13015.
- Baron, R.A., and Casey, P.J. (2004). Analysis of the kinetic mechanism of recombinant human isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase (Icmt). *BMC Biochemistry* 5, 1.
- Barr, A.R., and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *Journal of Cell Science* 120, 2987-2996.
- Barrowman, J., Hamblet, C., George, C.M., and Michaelis, S. (2008). Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment. *Molecular biology of the cell* 19, 5398-5408.
- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 792-804.
- Berndt, N., Hamilton, A.D., and Sebt, S.M. (2011). Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 11, 775-791.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., and Tan, A.S. (2006). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In *Biotechnology annual review*, M.R. El-Gewely, ed. (Amsterdam: Elsevier), pp. 127–152.
- Bifulco, M., Laezza, C., Stingo, S., and Wolff, J. (2002). 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1807-1812.

- Bloom, J., and Cross, F.R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 149-160.
- Bonner, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., and Pommier, Y. (2008). GammaH2AX and cancer. *Nature reviews. Cancer* 8, 957-967.
- Borggreffe, T., Wabl, M., Akhmedov, A.T., and Jessberger, R. (1998). A B-cell-specific DNA recombination complex. *The Journal of biological chemistry* 273, 17025-17035.
- Borgne, A., and Meijer, L. (1996). Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *The Journal of biological chemistry* 271, 27847-27854.
- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J., and Burridge, K. (2010). Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nature Cell Biology* 12, 477-483.
- Box, J.K., Paquet, N., Adams, M.N., Boucher, D., Bolderson, E., O'Byrne, K.J., and Richard, D.J. (2016). Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC molecular biology* 17, 19.
- Brito, D.A., and Rieder, C.L. (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Current biology : CB* 16, 1194-1200.
- Capell, B.C., and Collins, F.S. (2006). Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nature reviews. Genetics* 7, 940-952.
- Capell, B.C., Erdos, M.R., Madigan, J.P., Fiordalisi, J.J., Varga, R., Conneely, K.N., Gordon, L.B., Der, C.J., Cox, A.D., and Collins, F.S. (2005). Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12879-12884.
- Chan, H.J., Weng, J.J., and Yung, B.Y. (2005). Nucleophosmin/B23-binding peptide inhibits tumor growth and up-regulates transcriptional activity of p53. *Biochemical and biophysical research communications* 333, 396-403.
- Chan, K.S., Koh, C.G., and Li, H.Y. (2012). Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell Death & Disease* 3, e411-.
- Chan, P.K., and Chan, F.Y. (1995). Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. *Biochimica et biophysica acta* 1262, 37-42.

- Chandra, A., Grecco, H.E., Pisupati, V., Perera, D., Cassidy, L., Skoulidis, F., Ismail, S.A., Hedberg, C., Hanzal-Bayer, M., and Venkitaraman, A.R., et al. (2012). The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nature cell biology* *14*, 148-158.
- Chávez, M., Ena, S., van Sande, J., Kerchoue d'Exaerde, A. de, Schurmans, S., and Schiffmann, S.N. (2015). Modulation of Ciliary Phosphoinositide Content Regulates Trafficking and Sonic Hedgehog Signaling Output. *Developmental cell* *34*, 338-350.
- Chen, Y.-X., Koch, S., Uhlenbrock, K., Weise, K., Das, D., Gremer, L., Brunsveld, L., Wittinghofer, A., Winter, R., and Triola, G., et al. (2010). Synthesis of the Rheb and K-Ras4B GTPases. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* *49*, 6090-6095.
- Cheng, Q., and Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* *9*, 472-478.
- Christis, C., and Munro, S. (2012). The small G protein Arl1 directs the trans-Golgi-specific targeting of the Arf1 exchange factors BIG1 and BIG2. *The Journal of cell biology* *196*, 327-335.
- Cimini, D., and Degrossi, F. (2005). Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends in cell biology* *15*, 442-451.
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* *2004*, RE13.
- Colombo, E., Alcalay, M., and Pelicci, P.G. (2011). Nucleophosmin and its complex network. a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene*.
- Colombo, E., Bonetti, P., Lazzerini, D.E., Martinelli, P., Zamponi, R., Marine, J.C., Helin, K., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2005). Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 8874-8886.
- Colombo, E., Marine, J.-C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nature Cell Biology* *4*, 529-533.
- Coppede, F. (2012). Premature aging syndrome. *Advances in experimental medicine and biology* *724*, 317-331.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* *26*, 1367-1372.

Crosio, C., Fimia, G.M., Loury, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H., Sen, S., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2002). Mitotic phosphorylation of histone H3. spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Molecular and cellular biology* 22, 874-885.

Csoka, A.B., English, S.B., Simkevich, C.P., Ginzinger, D.G., Butte, A.J., Schatten, G.P., Rothman, F.G., and Sedivy, J.M. (2004). Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging cell* 3, 235-243.

Denicourt, C., and Dowdy, S.F. (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes & Development* 18, 851-855.

Dominguez-Brauer, C., Thu, K.L., Mason, J.M., Blaser, H., Bray, and Mak, T.W. (2015). Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Molecular cell* 60, 524-536.

Donzelli, M., and Draetta, G.F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports* 4, 671-677.

Drexler, H.G., Gignac, S.M., Wasielewski, R. von, Werner, M., and Dirks, W.G. (2000). Pathobiology of NPM-ALK and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia* 14, 1533-1559.

Duckert, H., Pries, V., Khedkar, V., Menninger, S., Bruss, H., Bird, A.W., Maliga, Z., Brockmeyer, A., Janning, P., and Hyman, A., et al. (2012). Natural product-inspired cascade synthesis yields modulators of centrosome integrity. *Nature chemical biology* 8, 179-184.

Dückert, H., Pries, V., Khedkar, V., Menninger, S., Bruss, H., Bird, A.W., Maliga, Z., Brockmeyer, A., Janning, P., and Hyman, A., et al. (2012). Natural product-inspired cascade synthesis yields modulators of centrosome integrity. *Nature chemical biology* 8, 179-184.

Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery* 9, 790-803.

Dutta, N., and Seo, S. (2016). RPGR, a prenylated retinal ciliopathy protein, is targeted to cilia in a prenylation- and PDE6D-dependent manner. *Biology open*.

Dutta, S., Akey, IV, Dingwall, C., Hartman, K.L., Laue, T., Nolte, R.T., Head, J.F., and Akey, C.W. (2001). The crystal structure of nucleoplasmin-core: implications for histone binding and nucleosome assembly. *Molecular cell* 8, 841-853.

- Eggenschwiler, J.T., Bulgakov, O.V., Qin, J., Li, T., and Anderson, K.V. (2006). Mouse Rab23 regulates hedgehog signaling from smoothed to Gli proteins. *Developmental biology* 290, 1-12.
- Eggenschwiler, J.T., Espinoza, E., and Anderson, K.V. (2001). Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* 412, 194-198.
- Enomoto, T. (2006). Essential Role of the B23/NPM Core Domain in Regulating ARF Binding and B23 Stability. *Journal of Biological Chemistry* 281, 18463-18472.
- Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., and Berglund, P., et al. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-298.
- Eschenbrenner-Lux, V. (2014). Development of Cascade Reactions to Ring-Fused Quinolizines for the Synthesis of a Natural Product-Inspired Compound Collection.
- Eschenbrenner-Lux, V., Kuchler, P., Ziegler, S., Kumar, K., and Waldmann, H. (2014). An enantioselective inverse-electron-demand imino Diels-Alder reaction. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 53, 2134-2137.
- Fabrini, R., Luca, A. de, Stella, L., Mei, G., Orioni, B., Ciccone, S., Federici, G., Lo Bello, M., and Ricci, G. (2009). Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination. *Biochemistry* 48, 10473-10482.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & Development* 12, 1871-1883.
- Fansa, E.K., Kösling, S.K., Zent, E., Wittinghofer, A., and Ismail, S. (2016). PDE6 $\delta$ -mediated sorting of INPP5E into the cilium is determined by cargo-carrier affinity. *Nat Comms* 7, 11366.
- Fansa, E.K., O'Reilly, N.J., Ismail, S., and Wittinghofer, A. (2015). The N- and C-terminal ends of RPGR can bind to PDE6 $\delta$ . *EMBO reports*.
- Florio, S.K., Prusti, R.K., and Beavo, J.A. (1996). Solubilization of Membrane-bound Rod Phosphodiesterase by the Rod Phosphodiesterase Recombinant  $\delta$  Subunit. *J. Biol. Chem.* 271, 24036-24047.
- Forgues, M., Difilippantonio, M.J., Linke, S.P., Ried, T., Nagashima, K., Feden, J., Valerie, K., Fukasawa, K., and Wang, X.W. (2003). Involvement of Crml in Hepatitis B Virus X

Protein-Induced Aberrant Centriole Replication and Abnormal Mitotic Spindles. *Mol. Cell Biol.* 23, 5282-5292.

Gadde, S., and Heald, R. (2004). Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Current biology : CB* 14, R797-805.

Garcia, Z., Silio, V., Marques, M., Cortes, I., Kumar, A., Hernandez, C., Checa, A.I., Serrano, A., and Carrera, A.C. (2006). A PI3K activity-independent function of p85 regulatory subunit in control of mammalian cytokinesis. *The EMBO journal* 25, 4740-4751.

Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 493-504.

Gascoigne, K.E., and Taylor, S.S. (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer cell* 14, 111-122.

Gascoigne, K.E., and Taylor, S.S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science* 122, 2579-2585.

Gillette, W.K., Esposito, D., Blanco, M.A., Alexander, P., Bindu, L., Bittner, C., Chertov, O., Frank, P.H., Grose, C., and Jones, J.E., et al. (2015). Farnesylated and methylated KRAS4b: high yield production of protein suitable for biophysical studies of prenylated protein-lipid interactions. *Scientific Reports* 5, 15916.

Giulian, D., and Moore, S. (1980). Identification of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the vertebrate retina. *Journal of Biological Chemistry* 255, 5993-5995.

Goldman, A.E., Moir, R.D., Montag-Lowy, M., Stewart, M., and Goldman, R.D. (1992). Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *The Journal of cell biology* 119, 725-735.

Goldman, R.D., Gruenbaum, Y., Moir, R.D., Shumaker, D.K., and Spann, T.P. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & Development* 16, 533-547.

Gordon, L.B., McCarten, K.M., Giobbie-Hurder, A., Machan, J.T., Campbell, S.E., Berns, S.D., and Kieran, M.W. (2007). Disease Progression in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: Impact on Growth and Development. *Pediatrics* 120, 824-833.

Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., and Pandolfi, P.P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 493-505.

Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K., and Wilson, K.L. (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 21-31.

- Hancock, J.F., Paterson, H., and Marshall, C.J. (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63, 133-139.
- Harper, J.V., and Brooks, G. (2005). The mammalian cell cycle: an overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 296, 113-153.
- Hennekam, R.C. (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *American journal of medical genetics. Part A* 140, 2603-2624.
- Herrera, J.E., Correia, J.J., Jones, A.E., and Olson, M.O. (1996). Sedimentation analyses of the salt- and divalent metal ion-induced oligomerization of nucleolar protein B23. *Biochemistry* 35, 2668-2673.
- Hingorani, K., Szebeni, A., and Olson, M.O. (2000). Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *The Journal of biological chemistry* 275, 24451-24457.
- Ho, K.-K., McGuire, V.A., Koo, C.-Y., Muir, K.W., Olano, N.d., Maifoshie, E., Kelly, D.J., McGovern, U.B., Monteiro, L.J., and Gomes, A.R., et al. (2012). Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 Promotes Its Nuclear Localization in Response to Doxorubicin. *J. Biol. Chem.* 287, 1545-1555.
- Hoffman, G.R., Nassar, N., and Cerione, R.A. (2000). Structure of the Rho Family GTP-Binding Protein Cdc42 in Complex with the Multifunctional Regulator RhoGDI. *Cell* 100, 345-356.
- Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *The EMBO journal* 12, 53-63.
- Humbert, M.C., Weihbrecht, K., Searby, C.C., Li, Y., Pope, R.M., Sheffield, V.C., and Seo, S. (2012). ARL13B, PDE6D, and CEP164 form a functional network for INPP5E ciliary targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 19691-19696.
- Ismail, S. (2016). A GDI/GDF like system for sorting and shuttling ciliary proteins. *Small GTPases*, 0.
- Ismail, S.A., Chen, Y.X., Rusinova, A., Chandra, A., Bierbaum, M., Gremer, L., Triola, G., Waldmann, H., Bastiaens, P.I., and Wittinghofer, A. (2011). Arl2-GTP and Arl3-GTP

regulate a GDI-like transport system for farnesylated cargo. *Nature chemical biology* 7, 942-949.

Jackson, J.R., Patrick, D.R., Dar, M.M., and Huang, P.S. (2007). Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nature reviews. Cancer* 7, 107-117.

Jensen, O.N. (2006). Interpreting the protein language using proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 391-403.

Jian, Y., Gao, Z., Sun, J., Shen, Q., Feng, F., Jing, Y., and Yang, C. (2009). RNA aptamers interfering with nucleophosmin oligomerization induce apoptosis of cancer cells. *Oncogene* 28, 4201-4211.

Jiang, J., and Hui, C.C. (2008). Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental cell* 15, 801-812.

Joberty, G., Tavitian, A., and Zahraoui, A. (1993). Isoprenylation of Rab proteins possessing a C-terminal CaaX motif. *FEBS letters* 330, 323-328.

Johnson, D.I. (1999). Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63, 54-105.

Johnson, J.L., Erickson, J.W., and Cerione, R.A. (2009). New insights into how the Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor regulates the interaction of Cdc42 with membranes. *The Journal of biological chemistry* 284, 23860-23871.

Jordan, M.A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W.B., Copp, H., and Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research* 56, 816-825.

Jordan, M.A., and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4, 253-265.

Kellogg, B.A., and Poulter, C.D. (1997). Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Current opinion in chemical biology* 1, 570-578.

Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 827-837.

Kondo, T., Minamino, N., Nagamura-Inoue, T., Matsumoto, M., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (1997). Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* 15, 1275-1281.



- Lappe-Siefke, C., Goebels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P.E., Griffiths, I.R., and Nave, K.A. (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nature genetics* 33, 366-374.
- Lee, C., Smith, B.A., Bandyopadhyay, K., and Gjerset, R.A. (2005a). DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF. *Cancer research* 65, 9834-9842.
- Lee, F.-J.S., Huang, C.-F., Yu, W.-L., Buu, L.-M., Lin, C.-Y., Huang, M.-C., Moss, J., and Vaughan, M. (1997). Characterization of an ADP-ribosylation Factor-like 1 Protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 30998-31005.
- Lee, H.H., Kim, H.S., Kang, J.Y., Lee, B.I., Ha, J.Y., Yoon, H.J., Lim, S.O., Jung, G., and Suh, S.W. (2007). Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer-pentamer interface. *Proteins* 69, 672-678.
- Lee, J., Gravel, M., Zhang, R., Thibault, P., and Braun, P.E. (2005b). Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *The Journal of Cell Biology* 170, 661-673.
- Lee, J.-J., and Seo, S. (2015). PDE6D binds to the C-terminus of RPGR in a prenylation-dependent manner. *EMBO reports*.
- Lehner, C.F., Furstenberger, G., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1986). Biogenesis of the nuclear lamina: in vivo synthesis and processing of nuclear protein precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 2096-2099.
- Leung, K.F., Baron, R., Ali, B.R., Magee, A.I., and Seabra, M.C. (2007). Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation. *The Journal of biological chemistry* 282, 1487-1497.
- Leung, K.F., Baron, R., and Seabra, M.C. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases. *Journal of lipid research* 47, 467-475.
- Li, J., Zhang, X., Sejas, D.P., and Pang, Q. (2005). Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia research* 29, 1415-1423.

- Li, N., Florio, S.K., Pettenati, M.J., Rao, P.N., Beavo, J.A., and Baehr, W. (1998). Characterization of Human and Mouse Rod cGMP Phosphodiesterase  $\delta$  Subunit (PDE6D) and Chromosomal Localization of the Human Gene. *Genomics* 49, 76-82.
- Lim, M.J., and Wang, X.W. (2006). Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prev* 30, 481-490.
- Linari, M., Hanzal-Bayer, M., and Becker, J. (1999a). The delta subunit of rod specific cyclic GMP phosphodiesterase, PDE delta, interacts with the Arf-like protein Arl3 in a GTP specific manner. *FEBS Letters* 458, 55-59.
- Linari, M., Ueffing, M., Manson, F., Wright, A., Meitinger, T., and Becker, J. (1999b). The retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1315-1320.
- Liu, Q., Tan, G., Levenkova, N., Li, T., Pugh, E. N., Jr., Rux, J.J., Speicher, D.W., and Pierce, E.A. (2007). The proteome of the mouse photoreceptor sensory cilium complex. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6, 1299-1317.
- Liu, Y., Rusinol, A., Sinensky, M., Wang, Y., and Zou, Y. (2006). DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *Journal of Cell Science* 119, 4644-4649.
- Lu, L., and Hong, W. (2003). Interaction of Arl1-GTP with GRIP domains recruits autoantigens Golgin-97 and Golgin-245/p230 onto the Golgi. *Molecular Biology of the Cell* 14, 3767-3781.
- Mallampalli, M.P., Huyer, G., Bendale, P., Gelb, M.H., and Michaelis, S. (2005). Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in a HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14416-14421.
- Malumbres, M. (2011). Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases. *Physiological Reviews* 91, 973-1007.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* 30, 630-641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 9, 153-166.

- Manchado, E., Guillaumot, M., and Malumbres, M. (2012). Killing cells by targeting mitosis. *Cell death and differentiation* 19, 369-377.
- Martin-Gago, P., Fansa, E.K., Klein, C.H., Murarka, S., Janning, P., Schurmann, M., Metz, M., Ismail, S., Schultz-Fademrecht, C., and Baumann, M., et al. (2017). A PDE6delta-KRas Inhibitor Chemotype with up to Seven H-Bonds and Picomolar Affinity that Prevents Efficient Inhibitor Release by Arl2. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*.
- Marzesco, A.M., Galli, T., Louvard, D., and Zahraoui, A. (1998). The rod cGMP phosphodiesterase delta subunit dissociates the small GTPase Rab13 from membranes. *The Journal of biological chemistry* 273, 22340-22345.
- Matsushita, M., Ozaki, Y., Hasegawa, Y., Terada, F., Tabata, N., Shiheido, H., Yanagawa, H., Oikawa, T., Matsuo, K., and Du W, et al. (2015). A Novel Phthalimide Derivative, TC11, Has Preclinical Effects on High-Risk Myeloma Cells and Osteoclasts. *PLoS One* 10.
- Maurer-Stroh, S., and Eisenhaber, F. (2005). Refinement and prediction of protein prenylation motifs. *Genome Biology* 6, R55.
- Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., and Mitchison, T.J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science (New York, N.Y.)* 286, 971-974.
- McCord, R.P., Nazario-Toole, A., Zhang, H., Chines, P.S., Zhan, Y., Erdos, M.R., Collins, F.S., Dekker, J., and Cao, K. (2013). Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome research* 23, 260-269.
- Miertzschke, M., Koerner, C., Spoerner, M., and Wittinghofer, A. (2014). Structural insights into the small G-protein Arl13B and implications for Joubert syndrome. *The Biochemical journal* 457, 301-311.
- Morris, P.G., and Fournier, M.N. (2008). Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 7167-7172.
- Murano, K., Okuwaki, M., Hisaoka, M., and Nagata, K. (2008). Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Mol Cell Biol* 28, 3114-3126.

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 379-393.

Myers, S.M., and Collins, I. (2016). Recent findings and future directions for interpolar mitotic kinesin inhibitors in cancer therapy. *Future medicinal chemistry* 8, 463-489.

Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peranen, J., Merdes, A., Slusarski, D.C., Scheller, R.H., Bazan, J.F., and Sheffield, V.C., et al. (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129, 1201-1213.

Nancy, V., Callebaut, I., El Marjou, A., and Gunzburg, J. de (2002). The delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *The Journal of biological chemistry* 277, 15076-15084.

Neal, S.E., Eccleston, J.F., Hall, A., and Webb (1988). Kinetic analysis of the hydrolysis of GTP by p21N-ras. The basal GTPase mechanism. *The Journal of biological chemistry* 263, 19718-19722.

Neumann, B., Walter, T., Hériché, J.-K., Bulkescher, J., Erfle, H., Conrad, C., Rogers, P., Poser, I., Held, M., and Liebel, U., et al. (2010). Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature* 464, 721-727.

Nigg, E.A. (1993). Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Current opinion in cell biology* 5, 187-193.

Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.

Nishimura, A., and Linder, M.E. (2013). Identification of a Novel Prenyl and Palmitoyl Modification at the CaaX Motif of Cdc42 That Regulates RhoGDI Binding. *Molecular and Cellular Biology* 33, 1417-1429.

Nowak, S.J., and Corces, V.G. (2004). Phosphorylation of histone H3. a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in genetics : TIG* 20, 214-220.

Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., and Bove, K.E., et al. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127-140.

- Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Letters* 506, 272-276.
- Pang, Q., Christianson, T.A., Koretsky, T., Carlson, H., David, L., Keeble, W., Faulkner, G.R., Speckhart, A., and Bagby, G.C. (2003). Nucleophosmin interacts with and inhibits the catalytic function of eukaryotic initiation factor 2 kinase PKR. *The Journal of biological chemistry* 278, 41709-41717.
- Panic, B., Perisic, O., Veprintsev, D.B., Williams, R.L., and Munro, S. (2003). Structural basis for Arl1-dependent targeting of homodimeric GRIP domains to the Golgi apparatus. *Molecular cell* 12, 863-874.
- Papke, B., Murarka, S., Vogel, H.A., Martin-Gago, P., Kovacevic, M., Truxius, D.C., Fansa, E.K., Ismail, S., Zimmermann, G., and Heinelt, K., et al. (2016). Identification of pyrazolopyridazinones as PDEdelta inhibitors. *Nature communications* 7, 11360.
- Parish, C.A., and Rando, R.R. (1996). Isoprenylation/methylation of proteins enhances membrane association by a hydrophobic mechanism. *Biochemistry* 35, 8473-8477.
- Pertea, M., and Salzberg, S.L. (2010). Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biology* 11, 206.
- Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7, 644-656.
- Planas-Silva, M.D., and Weinberg, R.A. (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *Current opinion in cell biology* 9, 768-772.
- Pollard, T.D. (2010). A guide to simple and informative binding assays. *Molecular Biology of the Cell* 21, 4061-4067.
- Pollex, R.L., and Hegele, R.A. (2004). Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clinical genetics* 66, 375-381.
- Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H., and Gunawardena, J. (2012). Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 4, 565-583.
- Pries, V. (2011). Biologische Charakterisierung von Indolochinolizinen. Dissertation am MPI Dortmund.

- Prigent, C., and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* *116*, 3677-3685.
- Prinos, P., Lacoste, M.C., Wong, J., Am Bonneau, and Georges, E. (2011). Mutation of cysteine 21 inhibits nucleophosmin/B23 oligomerization and chaperone activity. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* *2*, 24-30.
- Pugh, E.N., JR, and Lamb, T.D. (1993). Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochimica et biophysica acta* *1141*, 111-149.
- Qi, W., Shakalya, K., Stejskal, A., Goldman, A., Beeck, S., Cooke, L., and Mahadevan, D. (2008). NSC348884, a nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* *27*, 4210-4220.
- Raasakka, A., and Kursula, P. (2014). The myelin membrane-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: on a highway to structure and function. *Neurosci Bull* *30*, 956-966.
- Reddy, S., and Comai, L. (2012). Lamin A, farnesylation and aging. *Experimental cell research* *318*, 1-7.
- Reddy, Y.T., Sekhar, K.R., Sasi, N., Reddy, P.N., Freeman, M.L., and Crooks, P.A. (2010). Novel substituted (Z)-5-((N-benzyl-1H-indol-3-yl)methylene)imidazolidine-2,4-diones and 5-((N-benzyl-1H-indol-3-yl)methylene)pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-triones as potent radiosensitizing agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* *20*, 600-602.
- Resh, M.D. (2013). Covalent lipid modifications of proteins. *Current biology : CB* *23*, 5.
- Roosing, S., Collin, R.W., den Hollander, A.I., Cremers, F.P., and Siemiatkowska, A.M. (2014). Prenylation defects in inherited retinal diseases. *Journal of medical genetics* *51*, 143-151.
- Roosing, S., Rohrschneider, K., Beryozkin, A., Sharon, D., Weisschuh, N., Staller, J., Kohl, S., Zelinger, L., Peters, T.A., and Neveling, K., et al. (2013). Mutations in RAB28, Encoding a Farnesylated Small GTPase, Are Associated with Autosomal-Recessive Cone-Rod Dystrophy. *The American Journal of Human Genetics* *93*, 110-117.
- Sahenk, Z., Barohn, R., New, P., and Mendell, JR (1994). Taxol neuropathy. Electrodiagnostic and sural nerve biopsy findings. *Archives of neurology* *51*, 726-729.
- Salih, D.A., and Brunet, A. (2008). FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current opinion in cell biology* *20*, 126-136.

- Santaguida, S., and Amon, A. (2015). Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy. *Nature reviews. Molecular cell biology* *16*, 473-485.
- Sarkar, P., and Shinton, R. (2001). Hutchinson-Guilford progeria syndrome. *Postgraduate Medical Journal* *77*, 312-317.
- Sarli, V., and Giannis, A. (2008). Targeting the kinesin spindle protein. basic principles and clinical implications. *Clin Cancer Res* *14*, 7583-7587.
- Scaffidi, P., and Misteli, T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature medicine* *11*, 440-445.
- Schafer, K.A. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary pathology* *35*, 461-478.
- Schmick, M., Kraemer, A., and Bastiaens, P.I. (2015). Ras moves to stay in place. *Trends in cell biology* *25*, 190-197.
- Schmick, M., Vartak, N., Papke, B., Kovacevic, M., Truxius, D.C., Rossmannek, L., and Bastiaens, P.I. (2014). KRas Localizes to the Plasma Membrane by Spatial Cycles of Solubilization, Trapping and Vesicular Transport. *Cell* *157*, 459-471.
- Seabra, M.C., and Wasmeier, C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Current opinion in cell biology* *16*, 451-457.
- Sekhar, K.R., Benamar, M., Venkateswaran, A., Sasi, S., Penthala, N.R., Crooks, P.A., Hann, S.R., Geng, L., Balusu, R., and Abbas, T., et al. (2014). Targeting Nucleophosmin 1 Represents a Rational Strategy for Radiation Sensitization. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* *89*, 1106-1114.
- Sekhar, K.R., Reddy, Y.T., Reddy, P.N., Crooks, P.A., Venkateswaran, A., McDonald, W.H., Geng, L., Sasi, S., Waal, Robert P. Van Der, and Roti, J.L.R., et al. (2011). The Novel Chemical Entity YTR107 Inhibits Recruitment of Nucleophosmin to Sites of DNA Damage, Suppressing Repair of DNA Double-Strand Breaks and Enhancing Radiosensitization. *Clin Cancer Res* *17*, 6490-6499.
- Shiheido, H., Terada, F., Tabata, N., Hayakawa, I., Matsumura, N., Takashima, H., Ogawa, Y., Du W, Yamada, T., and Shoji, M., et al. (2012). A phthalimide derivative that inhibits centrosomal clustering is effective on multiple myeloma. *PLoS One* *7*, e38878.
- Shinmura, K., Tarapore, P., Tokuyama, Y., George, K.R., and Fukasawa, K. (2005). Characterization of centrosomal association of nucleophosmin/B23 linked to Crm1 activity. *FEBS Letters* *579*, 6621-6634.

- Silvius, JR, and l'Heureux, F. (1994). Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. *Biochemistry* 33, 3014-3022.
- Sinensky, M. (1994). The processing pathway of prelamin A.
- Slaughter, B.D., Das, A., Schwartz, J.W., Rubinstein, B., and Li, R. (2009). Dual modes of cdc42 recycling fine-tune polarized morphogenesis. *Developmental cell* 17, 823-835.
- Smeland, T.E., Seabra, M.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1994). Geranylgeranylated Rab proteins terminating in Cys-Ala-Cys, but not Cys-Cys, are carboxyl-methylated by bovine brain membranes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10712-10716.
- Spann, T.P., Goldman, A.E., Wang, C., Huang, S., and Goldman, R.D. (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *The Journal of Cell Biology* 156, 603-608.
- Strebhardt, K. (2010). Multifaceted polo-like kinases. drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 9, 643-660.
- Stuurman, N., Heins, S., and Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *Journal of structural biology* 122, 42-66.
- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of Cell Biology* 154, 925-936.
- Szebeni, A., and Olson, M.O. (1999). Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein science : a publication of the Protein Society* 8, 905-912.
- Thomas, S., Wright, K.J., Le Corre, S., Micalizzi, A., Romani, M., Abhyankar, A., Saada, J., Perrault, I., Amiel, J., and Litzler, J., et al. (2013). A homozygous PDE6D mutation in Joubert syndrome impairs targeting of farnesylated INPP5E protein to the primary cilium. *Human mutation*.
- Tokuyama, Y., Horn, H.F., Kawamura, K., Tarapore, P., and Fukasawa, K. (2001). Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* 276, 21529-21537.
- van der Vos, K.E., and Coffey, P.J. (2011). The extending network of FOXO transcriptional target genes. *Antioxidants & redox signaling* 14, 579-592.



- van Dyke, K., Robinson, R., Urquilla, P., Smith, D., Taylor, M., Trush, M., and Wilson, M. (1977). An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology* *15*, 377-391.
- van Valkenburgh, H., Shern, J.F., Sharer, J.D., Zhu, X., and Kahn, R.A. (2001). ADP-ribosylation factors (ARFs) and ARF-like 1 (ARL1) have both specific and shared effectors: characterizing ARL1-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* *276*, 22826-22837.
- Verrier, J.D., Jackson, T.C., Gillespie, D.G., Janesko-Feldman, K., Bansal, R., Goebbels, S., Nave, K.A., Kochanek, P.M., and Jackson, E.K. (2013). Role of CNPase in the oligodendrocytic extracellular 2',3'-cAMP-adenosine pathway. *Glia* *61*, 1595-1606.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *12*, 385-392.
- Vogel, U.S., and Thompson, R.J. (1988). Molecular structure, localization, and possible functions of the myelin-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. *Journal of neurochemistry* *50*, 1667-1677.
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., and Gatto, G.J., JR (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* *44*, 7342-7372.
- Walters, W.P., and Namchuk, M. (2003). Designing screens: how to make your hits a hit. *Nature Reviews Drug Discovery* *2*, 259-266.
- Wang, M., and Casey, P.J. (2016). Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *17*, 110-122.
- Wang, W., Budhu, A., Forges, M., and Wang, X.W. (2005). Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol* *7*, 823-830.
- Watzlich, D., Vetter, I., Gotthardt, K., Miertzschke, M., Chen, Y.-X., Wittinghofer, A., and Ismail, S. (2013). The interplay between RPGR, PDE[delta] and Arl2/3 regulate the ciliary targeting of farnesylated cargo. *EMBO reports* *14*, 465-472.

- Williams, A.K., Dasilva, S.C., Bhatta, A., Rawal, B., Liu, M., and Korobkova, E.A. (2012). Determination of the drug-DNA binding modes using fluorescence-based assays. *Analytical biochemistry* 422, 66-73.
- Wu, M.H., Chang, J.H., Chou, C.C., and Yung, B.Y. (2002). Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation. *Int J Cancer* 97, 297-305.
- Wulff, J.E., Herzon, S.B., Siegrist, R., and Myers, A.G. (2007a). Evidence for the rapid conversion of stephacidin B into the electrophilic monomer avrainvillamide in cell culture. *Journal of the American Chemical Society* 129, 4898-4899.
- Wulff, J.E., Siegrist, R., and Myers, A.G. (2007b). The natural product avrainvillamide binds to the oncoprotein nucleophosmin. *Journal of the American Chemical Society* 129, 14444-14451.
- Xia, W., Bringmann, P., McClary, J., Jones, P.P., Manzana, W., Zhu, Y., Wang, S., Liu, Y., Harvey, S., and Madlansacay, et al. (2006). High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein expression and purification* 45, 115-124.
- Yoshimura, S., Egerer, J., Fuchs, E., Haas, A.K., and Barr, F.A. (2007). Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation. *The Journal of cell biology* 178, 363-369.
- Young, S.G., Yang, S.H., Davies, B.S., Jung, H.J., and Fong, L.G. (2013). Targeting protein prenylation in progeria. *Science translational medicine* 5, 171.
- Zatsepina, O.V., Rousselet, A., Chan, P.K., Olson, M.O., Jordan, E.G., and Bornens, M. (1999). The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *Journal of cell science* 112 ( Pt 4), 455-466.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 107-117.
- Zhai, Y., Kronebusch, P.J., Simon, P.M., and Borisy, G.G. (1996). Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 135, 201-214.
- Zhang, F.L., and Casey, P.J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annual review of biochemistry* 65, 241-269.

- Zhang, H., Constantine, R., Frederick, J.M., and Baehr, W. (2012). The prenyl-binding protein PrBP/delta. a chaperone participating in intracellular trafficking. *Vision research* 75, 19-25.
- Zhang, H., Constantine, R., Vorobiev, S., Chen, Y., Seetharaman, J., Huang, Y.J., Xiao, R., Montelione, G.T., Gerstner, C.D., and Davis, M.W., et al. (2011). UNC119 is required for G protein trafficking in sensory neurons. *Nature neuroscience* 14, 874-880.
- Zhang, H., Li, S., Doan, T., Rieke, F., Detwiler, P.B., Frederick, J.M., and Baehr, W. (2007). Deletion of PrBP/delta impedes transport of GRK1 and PDE6 catalytic subunits to photoreceptor outer segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8857-8862.
- Zhang, H., Liu, X.H., Zhang, K., Chen, C.K., Frederick, J.M., Prestwich, G.D., and Baehr, W. (2004a). Photoreceptor cGMP phosphodiesterase delta subunit (PDEdelta) functions as a prenyl-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 279, 407-413.
- Zhang, H., Shi, X., Paddon, H., Hampong, M., Dai, W., and Pelech, S. (2004b). B23/Nucleophosmin Serine 4 Phosphorylation Mediates Mitotic Functions of Polo-like Kinase 1. *J. Biol. Chem.* 279, 35726-35734.
- Zhang, J.H., Chung, T.D., and Oldenburg, K.R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* 4, 67-73.
- Zhang, Y. (2004). The ARF-B23 connection: implications for growth control and cancer treatment. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 3, 259-262.
- Zimmermann, G. (2015). Design, synthesis and biophysical evaluation of small molecules targeting the K-Ras-PDE $\delta$  interaction. Dissertation am MPI Dortmund.
- Zimmermann, G., Papke, B., Ismail, S., Vartak, N., Chandra, A., Hoffmann, M., Hahn, S.A., Triola, G., Wittinghofer, A., and Bastiaens, P.I.H., et al. (2013a). Small molecule inhibition of the KRAS-PDE[dgr] interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* 497, 638-642.
- Zimmermann, G., Schultz-Fademrecht, C., Kuchler, P., Murarka, S., Ismail, S., Triola, G., Nussbaumer, P., Wittinghofer, A., and Waldmann, H. (2014). Structure Guided Design and Kinetic Analysis of Highly Potent Benzimidazole Inhibitors Targeting the PDE $\delta$  Prenyl Binding Site. *J. Med. Chem.* 57, 5435-5448.

Zimmermann, T.J., Roy, S., Martinez, N.E., Ziegler, S., Hedberg, C., and Waldmann, H. (2013b). Biology-Oriented Synthesis of a Tetrahydroisoquinoline-Based Compound Collection Targeting Microtubule Polymerization. *ChemBioChem* 14, 295-300.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	Transporter mit ATP-bindender Kasette ( <i>ATP binding cassette</i> )
AMP	Adenosinmonophosphat
BS3	<i>Bissulfosuccinimidyl suberate</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat ( <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	<i>disuccinimidyl suberate</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fc Region	konstanter Bereich eines Antikörpers ( <i>fragment crystallizable</i> )
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLAG-tag	Proteinmarkierung (DYKDDDDK)
FLIM	Fluoreszenz Lebensdauer Mikroskopie ( <i>fluorescence lifetime imaging</i> )
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FTase	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
GDF	<i>GDI dissociation factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GMP-PNP	<i>guanosine 5'-[<math>\beta,\gamma</math>-imido]triphosphate</i>
GSF	<i>GDI-like solubilization factor</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase

GTP	Guanosintriphosphat
HGPS	<i>Hutchinson-Gilford progeria syndrome</i>
HVR	<i>hypervariable region</i>
$K_{d \text{ App}}$	apparente Dissoziationskonstante
NES	Kernexportsignal ( <i>nuclear export signal</i> )
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PTM	Posttranslationale Modifikation
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung ( <i>TRIS buffered saline</i> )
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 6.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Herbert Waldmann für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Chemische Biologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie sowie für die Überlassung der Forschungsthemen und die Begutachtung der Dissertation bedanken.

PD Dr. Leif Dehmelt danke ich herzlich für die Bereitschaft der Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Dr. Slava Ziegler möchte ich für die Aufnahme in die Biogruppe und das Korrekturlesen der Dissertation danken.

Dr. Vincent Eschenbrenner-Lux, Dr. Gunther Zimmermann und Dr. Sandip Murarka danke ich für die Zusammenarbeit und die Synthese der chemischen Verbindungen.

Für die Hilfe bei den alltäglichen Arbeiten im Labor und das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich insbesondere bei Christine Nowak bedanken. Dr. Petra Janning und Andreas Brockmeyer danke ich für die massenspektrometrische Analyse diverser Proben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gunther Zimmermann, Melanie Schwalfenberg und Dr. Jochen Spiegel für die vielen anregenden Diskussionen, die Hilfestellungen bei wissenschaftlichen Fragestellungen und das exzellente Arbeitsklima sowie die vielen Aktivitäten ausserhalb des Instituts.

Ferner möchte ich mich auch bei Bernd Rathmer, Dr. Peter Schröder, Michael Winzker, Nancy Martinez und Lucas Robke bedanken, die nicht nur den gemeinsamen Arbeitsalltag angenehmer sondern meine Zeit in Dortmund durch gemeinsame Freizeitaktivitäten auch unterhaltsamer gemacht haben.

## 6.3 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Philipp Robert Felix Kuchler  
Geburtsdatum: 05.10.1984  
Geburtsort: Hadamar

### Ausbildung:

6/2011 – Heute: **Dissertation**, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie (MPI)/  
TU Dortmund

Thema: Identifizierung neuer PDE6D-Bindungspartner und Entwicklung eines  
phänotypischen Screens zur Identifizierung biologisch aktiver  
Indolochinolizine

Betreuer: Prof. Dr. Dr. H. Waldmann, Abteilung für Chemische Biologie,  
MPI Dortmund

12/2009 – 12/2010: **Diplomarbeit**, Goethe-Universität Frankfurt am Main

Thema: Charakterisierung von Protein-Phosphatasen als neue  
Interaktionspartner von NOSIP

Betreuer: Prof. Dr. I. Dikic, Institut für Biochemie II, Goethe-Universität Frankfurt  
am Main

10/2005 – 12/2010: **Studium der Biologie**, Goethe-Universität Frankfurt am Main

06/1995 – 06/2004: **Abitur**, Leibniz-Gymnasium/ Friedrich-Dessauer-Gymnasium,  
Frankfurt am Main



## 6.4 Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Küchler, Philipp Robert Felix

147212

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 neuer PDE6D-Bindungspartner und Entwicklung eines phänotypischen

Screens zur Identifikation biologisch aktiver Indolochinolizine

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)