

Identifizierung und Charakterisierung neurotropher Naturstoffderivate und kovalenter Kinesininhibitoren

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Tim Förster

aus Bochum

Dekan: Prof. Dr. Roland Winter

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann

2. Gutachter: PD Dr. Leif Dehmelt

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund in der Zeit von Februar 2012 bis Mai 2017 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Zusammenfassung..... | 1 |
| 2 | Summary..... | 3 |
| 3 | Einleitung | 5 |
| 3.1 | Chemische Genetik..... | 5 |
| 3.2 | Neuronale Morphogenese..... | 7 |
| 3.2.1 | Neurodegenerative Erkrankungen..... | 9 |
| 3.2.2 | Neuromodulatorische Naturstoffe | 11 |
| 3.3 | Der Zellzyklus | 16 |
| 3.3.1 | Zentrosomen und die mitotische Spindel..... | 18 |
| 3.3.1.1 | Zentrosomale Defekte und Mechanismen zur Befähigung bipolarer Mitose ... | 19 |
| 3.3.2 | Kinesine | 22 |
| 3.3.2.1 | HSET | 24 |
| 3.3.3 | Antimitotische Substanzen | 26 |
| 3.3.4 | Kinesinmodulatoren..... | 28 |
| 3.4 | Zielsetzung der Arbeit | 30 |
| 4 | Material | 33 |
| 4.1 | Eukaryotische Zelllinien..... | 33 |
| 4.2 | Antikörper und Färbereagenzien | 33 |
| 4.3 | Chemikalien und Reagenzien..... | 34 |
| 4.4 | Verbrauchsmaterialien | 36 |
| 4.5 | Puffer und Lösungen..... | 37 |
| 4.6 | Allgemeine Laborgeräte | 40 |
| 4.7 | Zellkulturmedien..... | 41 |
| 4.8 | Kits..... | 41 |
| 5 | Methoden | 43 |
| 5.1 | Zellbiologische Methoden..... | 43 |
| 5.1.1 | Auftauen von Zellen | 43 |
| 5.1.2 | Subkultivierung von Zellen | 43 |
| 5.1.3 | Bestimmung der Zellzahl und Aussaat von Zellen | 43 |
| 5.1.4 | Kryokonservierung von Zellen | 44 |
| 5.1.5 | Zellsynchronisation..... | 44 |
| 5.1.6 | Immunzytochemische Färbung von Zellen | 45 |
| 5.1.7 | Herstellung von Zelllysaten | 45 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 5.1.7.1 | Herstellung von Gesamtproteinlysaten für Desthiobiotin-ADP Pull Down-Experimente | 45 |
| 5.1.7.2 | Herstellung von Gesamtproteinlysaten für den <i>Cellular Thermal Shift Assay</i> (CETSA) | 46 |
| 5.1.8 | Zellbasierter Assay zum Nachweis von phänotypischen Veränderungen und mitotischem Arrest..... | 46 |
| 5.1.9 | Zellbasiertes Screening zur Identifizierung neuromodulatorischer Substanzen | 46 |
| 5.1.10 | Zellbasiertes Testsystem zur Identifizierung neuroprotektiver Substanzen..... | 47 |
| 5.2 | Molekularbiologische Methoden | 48 |
| 5.2.1 | Klonierung, Expression und Reinigung von MAP4K4 | 48 |
| 5.2.2 | Kristallisation von MAP4K4 | 48 |
| 5.2.3 | Klonierung, Expression und Reinigung der HSET-Motordomäne | 49 |
| 5.2.4 | Klonierung, Expression und Reinigung der Eg5-Motordomäne..... | 49 |
| 5.3 | Proteinbiochemische Methoden | 50 |
| 5.3.1 | Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 50 |
| 5.3.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 51 |
| 5.3.3 | Immunoblot | 51 |
| 5.3.3.1 | Proteintransfer (Western Blotting)..... | 51 |
| 5.3.3.2 | Nachweis immobilisierter Proteine | 52 |
| 5.3.3.2.1 | Nachweis immobilisierter Proteine durch HRP-gekoppelte Antikörper | 52 |
| 5.3.3.2.2 | Nachweis immobilisierter Proteine durch Infrarot-Farbstoffe..... | 53 |
| 5.3.4 | Untersuchung der Beeinflussung von Testsubstanzen auf die Polymerisation von Tubulin..... | 53 |
| 5.3.5 | Tryptischer Verdau von Proteinen und Aufreinigung über <i>Stage Tips</i> | 54 |
| 5.4 | Fluoreszenzmikroskopie in Mikrotiterplatten..... | 54 |
| 5.5 | Testsysteme zur Aktivitätsmessung von Enzymen | 58 |
| 5.5.1 | Bestimmung der Kinaseaktivität | 58 |
| 5.5.1.1 | Bestimmung der Kinaseaktivität mit dem Z'-LYTE™ Kinase Assay..... | 59 |
| 5.5.1.2 | Bestimmung der Kinaseaktivität mit dem Adapta™ Universal Kinase Assay.. | 60 |
| 5.5.1.3 | Bestimmung der Kinaseaktivität mit dem LanthaScreen™ Eu Kinase Binding Assay..... | 60 |
| 5.5.2 | Bestimmung der Kinesinaktivität mit dem ADP-Glo™ Kinase Assay | 61 |
| 5.5.3 | Messung der Enzymaktivität mit einem Malachitgrün-Testsystem | 62 |
| 5.5.4 | Aktivitätsmessung von Enzymen mit einem enzymgekoppelten Testsystem .. | 63 |
| 5.5.5 | Polymerisation von Mikrotubuli zur Durchführung von ATPase-Testsystemen | 64 |
| 5.6 | Validierung von Zielproteinen von Testsubstanzen | 64 |
| 5.6.1 | Zielprotein-Validierung mit Desthiobiotin-ATP | 64 |
| 5.6.2 | Zielprotein-Validierung mit dem <i>Cellular thermal shift assay</i> (CETSA)..... | 65 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.7 | Massenspektrometrische Methoden..... | 66 |
| 5.7.1 | Nachweis der kovalenten Bindung von Testsubstanzen durch die <i>in vitro</i> Peptid-Fangmethode..... | 66 |
| 5.7.2 | Bindungsstudien von Testsubstanzen an Peptide mit Fließinjektions-Massenspektrometrie | 67 |
| 5.7.3 | Bindungsstudien von Testsubstanzen an tryptisch verdaute Peptide mittels nano-HPLC/MS/MS..... | 67 |
| 5.7.4 | Stabilitätsanalyse von Testsubstanzen unter Einfluss von Glutathion..... | 68 |
| 6 | Ergebnisse | 69 |
| 6.1 | Etablierung eines Testsystems zur Identifizierung neuritogener Substanzen | 70 |
| 6.1.1 | Testung der Inkubationszeit zur ATRA-induzierten Ausdifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen | 70 |
| 6.1.2 | Testung von Kontrollverbindungen zur Analyse neuritogener Testsubstanzen..... | 76 |
| 6.2 | Identifizierung neuritogener Effekte von MILI A-Derivaten..... | 78 |
| 6.2.1 | Einfluss von neuritogenen MILI A-Derivaten auf das Neuritenwachstum | 79 |
| 6.2.2 | Einfluss von Pyridin- und Fluorderivaten auf das Neuritenwachstum..... | 81 |
| 6.2.3 | Einfluss neuritogener MILI A-Derivate auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen..... | 85 |
| 6.2.4 | Einfluss der Behandlungsdauer auf die neuritogenen Effekte von MILI A-inspirierten Verbindungen..... | 86 |
| 6.2.5 | Profilierung von Kinasen als potenzielle Zielproteine von neuritogenen MILI A-Derivaten..... | 91 |
| 6.2.6 | Identifizierung und Validierung von MAP4K4 als Zielprotein von neuritogenen MILI A-Derivaten | 96 |
| 6.2.7 | Zielprotein-Validierung durch Proteinanreicherung mit Desthiobiotin-ATP | 105 |
| 6.2.8 | Ermittlung des Bindungsmechanismus durch Co-Kristallisation von MAP4K4 und PS201S | 106 |
| 6.2.9 | Neuroprotektive Effekte von MILI A-inspirierten Substanzen | 107 |
| 6.3 | Identifizierung von antimittotischen MILI A-Derivaten | 110 |
| 6.3.1 | Phänotypische Effekte von MILI A-Derivaten..... | 110 |
| 6.3.2 | Beeinflussung der Tubulin-Polymerisation durch MILI A-Derivate | 115 |
| 6.4 | Identifizierung von Secoyohimbanen mit neuritogenen Effekten..... | 116 |
| 6.4.1 | Effekte von Secoyohimbanen auf das Neuritenwachstum | 116 |
| 6.4.2 | Einfluss neuritogener Secoyohimbane auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl | 123 |
| 6.4.3 | Konzentrationsabhängigkeit der neuritogenen Effekte von Secoyohimbanen..... | 125 |
| 6.5 | Identifizierung von aktiven Substanzen aus einer Iridoid-inspirierten Substanzbibliothek | 129 |
| 6.5.1 | Phänotypische Effekte von Iridoid-inspirierten Substanzen | 129 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 6.5.2 | Beeinflussung der Tubulin-Polymerisation durch Iridoid-inspirierte Substanzen . | 133 |
| 6.5.3 | Neuromodulatorische Effekte von Iridoid-inspirierten Substanzen..... | 133 |
| 6.6 | Identifizierung von Sulfonylpyrimidinen als kovalente HSET-Inhibitoren..... | 134 |
| 6.6.1 | Identifizierung und Bestätigung von 236038 als HSET-Inhibitor durch zellbasierte Untersuchungen | 134 |
| 6.6.2 | Validierung der HSET-Bindung durch die <i>in vitro</i> Peptid-Fangmethode..... | 137 |
| 6.6.3 | Validierung der HSET-Inhibition durch den bekannten Inhibitor AZ82 | 141 |
| 6.6.4 | Problemlösungsansätze zu biochemischen Untersuchungen von HSET-Inhibitoren | 144 |
| 6.6.5 | Thiol-abhängige Aktivität von Sulfonylpyrimidinen | 145 |
| 6.6.6 | Validierung der intrazellulären kovalenten HSET-Bindung mit dem <i>Cellular thermal shift assay</i> (CETSA) | 147 |
| 6.6.7 | Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Inhibition von HSET durch Sulfonylpyrimidine | 148 |
| 7 | Diskussion..... | 151 |
| 7.1 | Etablierung eines zellbasierten Testsystems zur Identifizierung neuromodulatorischer Substanzen in SH-SY5Y-Zellen | 151 |
| 7.2 | Identifizierung und Charakterisierung neurotropher Substanzen aus einer MILI A-inspirierten Substanzbibliothek..... | 153 |
| 7.3 | Identifizierung und Charakterisierung antimitotischer Substanzen aus MILI A- und Iridoid-inspirierten Substanzbibliotheken | 163 |
| 7.4 | Identifizierung und Charakterisierung neurotropher Substanzen aus einer Secoyohimban-inspirierten Substanzbibliothek | 167 |
| 7.5 | Charakterisierung von Sulfonylpyrimidinen als kovalente HSET-Inhibitoren | 170 |
| 8 | Ausblick..... | 179 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 181 |
| 10 | Abbildungsverzeichnis..... | 191 |
| 11 | Tabellenverzeichnis..... | 195 |
| 12 | Abkürzungsverzeichnis..... | 197 |
| 13 | Anhang..... | 199 |
| 14 | Danksagung | 221 |
| 15 | Eidesstattliche Versicherung | 223 |

1 Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen sind durch den fortschreitenden Verlust von Neuronen infolge verschiedener pathologischer Mechanismen, wie Exzitotoxizität, Proteinaggregationen oder oxidativen Stress, gekennzeichnet. Trotz zahlreicher Behandlungsstrategien gibt es bislang keine erfolgreichen Ansätze zur Regeneration geschädigter Neuronen. Die Neugestaltung des neuronalen Netzwerkes ist essentiell für die Wiederherstellung der physiologischen Funktionen, weshalb die Erforschung neuartiger Therapeutika mit neurotrophen Eigenschaften von großer Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang werden auch neurotrophe Naturstoffe aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums untersucht. In dieser Arbeit wurde ein Testsystem zur Identifizierung neuromodulatorischer Substanzen in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y entwickelt. Die optimalen Testbedingungen beinhalteten eine Differenzierungsperiode von 72 h, gefolgt von einer Substanzbehandlung über 96 h. Es wurde der Einfluss von Substanzbibliotheken, welche durch biologisch-orientierte Synthese auf Basis neuroaktiver Naturstoffe synthetisiert worden waren, auf das Neuritenwachstum der Zellen untersucht. Die Neuritenlänge wurde durch halbautomatische Analyse fluoreszenzmikroskopischer Bilddaten quantifiziert.

Durch Testung von Pyridonalkaloid-Analoga auf Basis des Naturstoffes Militarion A (MILI A) wurden vier neurotrophe Verbindungen identifiziert. Die potenteste Substanz, ein 4-Hydroxy-2-pyridon, verstärkte das Neuritenwachstum bei einer Konzentration von 10 μM signifikant um 72 %. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zu dem Kinaseinhibitor Pyridovericin wurde der Einfluss des 4-Hydroxy-2-pyridons auf Kinasen, die als relevant für das Neuritenwachstum bekannt sind, untersucht. Dies führte zur Identifizierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Kinase 4 (MAP4K4) als Zielprotein. Des Weiteren konnte die Verbindung als selektiver und ATP-kompetitiver Inhibitor von MAP4K4 ermittelt werden. Der detaillierte Bindungsmechanismus wurde anhand einer Co-Kristallisation der Wildtyp-Kinase mit dem Inhibitor untersucht. Die Kristallstruktur ergab eine Typ I-Bindung des Pyridon-Grundgerüsts über Wasserstoffbrückenbindungen an Glu106 und Cys108 der ATP-Bindestelle sowie des 4-Hydroxyphenyl-Substituenten an Lys54.

Innerhalb der 2,4-Dimethoxypyridine dieser Substanzbibliothek wurden zwei Verbindungen identifiziert, die mitotischen Arrest in HeLa-Zellen auslösen und destabilisierend auf die Tubulin-Polymerisation wirken. Den gleichen Effekt zeigten zwei Vertreter einer Iridoid-inspirierten Substanzbibliothek.

Weiterhin wurden zwei neurotrophe Enantiomerenpaare aus einer Substanzbibliothek, die von den neuroprotektiven Indolalkaloiden Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin inspiriert war, identifiziert. Ein auf dem Secoyohimban-Grundgerüst basierendes Indolalkaloid

steigerte das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen bei einer Konzentration von 10 μM um 42 % und stellte damit die stärkste Verbindung dar.

Zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten für Krebserkrankungen werden häufig Elemente der Mitose als Zielproteine gewählt, da die Proliferation in Tumorzellen schnell und uneingeschränkt abläuft. Die Verabreichung vieler Wirkstoffe hat jedoch starke Nebenwirkungen. Daher besteht ein großer Bedarf an Substanzen, die spezifisch Tumorzellen attackieren, während gesundes Gewebe nicht geschädigt wird. Das Kinesin HSET gilt daher als vielversprechendes Zielprotein in der Wirkstoffforschung. HSET besitzt eine essentielle Funktion bei der zentrosomalen Gruppierung in Tumorzellen mit amplifizierten Zentrosomen, während in gesunden Zellen funktionell dominante Zentrosomen vorhanden sind.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein Screening zur Testung niedermolekularer Substanzen auf Inhibition der ATPase-Aktivität von HSET durchgeführt. Hierbei wurde ein Sulfonylpyrimidin-basierter Inhibitor des Kinesins identifiziert, welcher die Anzahl mitotischer Zellen mit multipolaren Spindeln erhöhte. Die Verbindung erwies sich als kovalenter HSET-Inhibitor, da *in vitro* die Übertragung des Pyrimidin-Grundgerüsts auf zwei Cysteine in HSET beobachtet wurde. In Anwesenheit von Thiolen wurde eine Reaktivität der Substanz beobachtet, was zu abgeschwächter inhibitorischer Aktivität führte. Dennoch bleibt ein Großteil der Verbindung nach Inkubation mit Glutathion intakt, wodurch die Möglichkeit der intrazellulären HSET-Modifikation und –Inhibition gegeben ist. Eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung mit Derivaten des Inhibitors ergab durch Einführung *meta*-substituierter aromatischer Ringe, eines *n*-Hexylamids sowie eines $(\text{CH}_2)_3$ -Linkers eine bis zu fünffach erhöhte Aktivität.

Diese Arbeit stellt einen geeigneten Startpunkt zur Erforschung neuartiger Ansätze gegen neurodegenerative Krankheiten sowie Krebserkrankungen dar. Es konnten neurotrophe Verbindungen auf Basis der Naturstoffe MILI A und (Iso-)Rhynchophyllin ermittelt werden. Da über die Wirkmechanismen neuroaktiver Pyridonalkaloide bislang wenig bekannt ist, geben die vorgelegten Ergebnisse neue Einblicke in die modulierten Prozesse von biologisch aktiven Vertretern dieser Substanzklasse. Ebenso konnten durch die neurotrophen Indolalkaloide weitere Erkenntnisse in Hinblick auf die neuropharmakologischen Eigenschaften dieser Moleküle gewonnen werden. Ein Sulfonylpyrimidin wurde als erster kovalenter HSET-Inhibitor identifiziert, der weitere Möglichkeiten zur Entwicklung von Therapeutika gegen Tumorzellen mit amplifizierten Zentrosomen eröffnet.

2 Summary

Neurodegenerative diseases are characterized by progressive loss of functional neurons as a result of pathological mechanisms, e.g. excitotoxicity, protein aggregation or oxidative stress. Despite numerous efforts to identify novel therapeutic strategies, successful approaches for the regeneration of neuronal networks are still missing. Neuronal regeneration is essential for the restoration of physiological function. Therefore, identifying appropriate therapeutics is of high demand for neuropharmacological research. Natural products with neurotrophic properties are commonly used in this context. Therefore, a cell-based assay to identify neuromodulatory substances was established using the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. As screening conditions neuronal differentiation for 72 h and compound treatment for 96 h were chosen. Compound libraries, which were synthesized by biology-oriented synthesis based on neuroactive natural products, were analyzed for their influence on neurite outgrowth in SH-SY5Y. Neurite length was visualized by fluorescence microscopy followed by semi-automatic quantification.

Screening of a library of pyridone alkaloid analogues, based on the neurotrophic natural product militarinone A (MILI A), identified four substances significantly enhancing neurite outgrowth in SH-SY5Y cells. The most potent compound contained the 4-hydroxy-2-pyridone scaffold and promoted the total neurite length by 72 % at a concentration of 10 μ M. According to the structural relation to the kinase inhibitor pyridovericin, the inhibition of kinases, which are relevant for neurite outgrowth, was analyzed. The mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 (MAP4K4) was identified as the target protein of the 4-hydroxy-2-pyridone, which was characterized as selective and ATP-competitive inhibitor. Co-crystallization with wild type-MAP4K4 revealed binding in a type I fashion. The pyridone core forms hydrogen bonds to Glu106 and Cys108 as well as the 4-hydroxyphenyl group to Lys54.

In addition, two 2,4-dimethoxypyridines of the MILI A-inspired compound collection provoked mitotic arrest in HeLa cells and were identified as tubulin destabilizing compounds. The same effect was observed for two iridoid-inspired substances.

Furthermore, two neurotrophic pairs of enantiomers were identified, which were inspired by the neuroprotective indole alkaloids rhynchophylline and isorhynchophylline. The most active compound of this library represented the secoyohimbane scaffold and enhanced the neurite outgrowth in SH-SY5Y cells by 42 % at a concentration of 1 μ M.

Mitotic proteins are commonly targeted for cancer therapy due to the rapid and uncontrolled mitosis of cancer cells. However, treatments with various therapeutics lead to side effects.

Therefore, cancer cell-specific substances are of high demand due to their potential to spare healthy tissues. Therefore, the mitotic kinesin HSET is considered to be a promising candidate for drug discovery: HSET is essential for centrosomal clustering in cancer cells with amplified centrosomes to ensure pseudo-bipolar cell division. In normal cells, HSET is not required when functionally dominant centrosomes are present.

Prior to the presented work, a screen for inhibition of HSET's ATPase activity by small molecules was performed. A sulfonyl-pyrimidine compound was identified as one of the most potent HSET inhibitors in the screen and caused mitotic arrest with an increased amount of multipolar spindles. Covalent modification by transfer of the pyrimidine core to two cysteine residues in HSET was shown *in vitro*. The compound is partially trapped by thiols, which results in attenuated activity. A substantial amount of the intact compound was retained upon exposure to glutathione, which is in line with the capability to modify HSET in living cells. A structure-activity relationship analysis was performed leading to a five-fold increase of activity by introduction of meta-substituted aromatic rings or *n*-hexyl amide as well as extending the carbon linker to (CH₂)₃.

This work represents an appropriate starting point to explore novel programs, aiming at the treatment of neurodegenerative diseases and cancer. Neurotrophic compounds, inspired by the natural products MILI A, rhynchophylline and isorhynchophylline, were identified. Since not a lot is known about the mechanism of action of neuroactive pyridone alkaloids, the thesis provides an insight into the pathway modulation by this compound class. Furthermore, additional information about the neuromodulatory properties of indole alkaloids was gathered by identifying novel neurotrophic secoyohimbanes. In addition, the first covalent HSET inhibitor was characterized which offers novel possibilities for cancer cell selective approaches.

3 Einleitung

3.1 Chemische Genetik

Genetische Testverfahren haben zur Aufschlüsselung weitreichender biologischer Prozesse durch niedermolekulare Substanzen beigetragen. Sie gelten als wirksame Methoden zur Identifizierung von Genen bei der Regulierung von biologischen Prozessen und werden grundsätzlich in drei Schritten durchgeführt: Zunächst werden zufällige Mutationen in Zellen oder Modellorganismen eingebracht und die so entstandenen Mutanten auf einen Defekt im gewünschten Prozess untersucht. Schließlich werden die Mutanten identifiziert, die den entsprechenden Phänotyp ausgelöst haben. Ein erheblicher Nachteil dieses Ansatzes ist die schwierige Übertragbarkeit auf humane Zellen, was der langsamen Reproduktionsrate und dem komplexen Genom geschuldet ist. Aufgrund dessen können die Zellen durch Regulierung verwandter Gene unter Umständen den eigentlichen Effekt der Mutation ausgleichen und so das Ergebnis verfälschen.^[1]

Daher werden verstärkt chemisch-genetische Ansätze verfolgt (Abbildung 3.1): Derartige Verfahren basieren auf exogenen Substanzen, die in das biologische System eingebracht und auf eine mögliche Einflussnahme auf biologische Prozesse untersucht werden. Dazu wird eine Vielzahl an Substanzen zur Identifizierung aktiver Verbindungen in einem Hochdurchsatzverfahren (engl. *high-throughput screening*, HTS) getestet. Anschließend können in tiefergehenden Experimenten die Zielproteine der aktiven Substanzen ermittelt werden, um so die Modulation der zellulären oder physiologischen Prozesse untersuchen zu können.^[1]

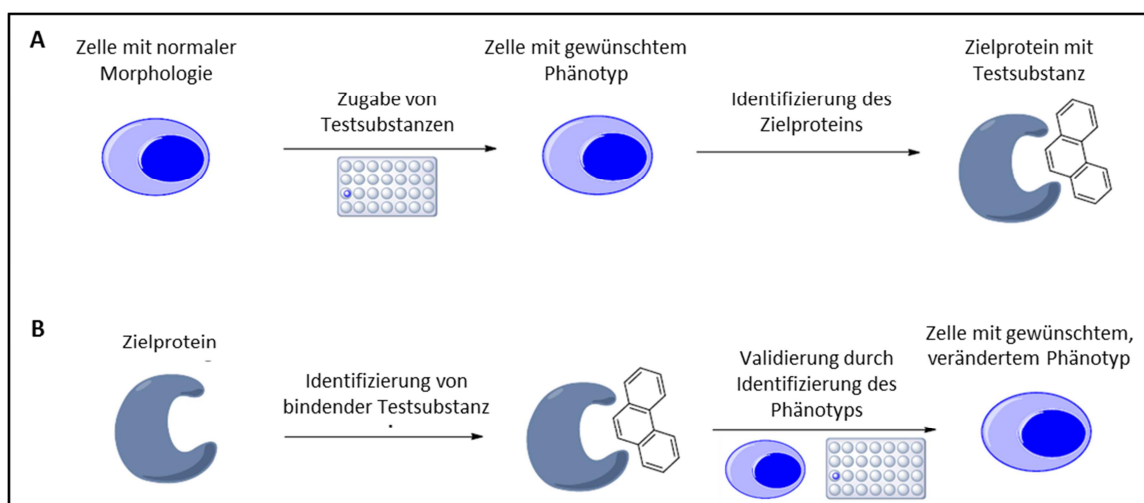


Abbildung 3.1: Vergleichende Darstellung der [A] vorwärts- und [B] rückwärtsgerichteten chemischen Genetik (modifiziert nach ^[2])

Zur Durchführung chemisch-genetischer Verfahren sind chemische Substanzbibliotheken notwendig, um eine möglichst große Anzahl an Verbindungen auf Beeinflussung des gewünschten Prozesses untersuchen zu können. Bestandteile dieser Bibliotheken können niedermolekulare Substanzen oder Peptide sein, die äquivalent zu genetischen Mutationen verwendet werden, um die Funktion eines Genproduktes zu modifizieren. Solche Kollektionen bestehen aus synthetisierten Derivaten von bekannten Wirkstoffen oder Wirkstoffkandidaten, jedoch zu einem Teil auch aus natürlich vorkommenden Verbindungen, die Pilzen, Bakterien oder Pflanzen entstammen. Entsprechende Naturstoffe sind über die Jahre zu einer wichtigen Quelle für die Erforschung neuer Wirkstoffe geworden. Organische niedermolekulare Verbindungen besitzen in vielen Fällen die Fähigkeit, die Membran der Zielzelle durchdringen zu können. Daher haben sich chemische Substanzbibliotheken in zahlreichen Fällen als erfolgreich bei der Erforschung neuartiger Therapeutika erwiesen.^[1]

Die Nutzung und Optimierung von Naturstoffen mit biologischer Relevanz bildet die Basis für die Biologie-orientierte Synthese (engl. *biology-oriented synthesis*, BIOS). Bei diesem Prinzip dienen ausgewählte Verbindungen als prävalidierte Startpunkte zur Synthese entsprechender Substanzbibliotheken für die Wirkstoffforschung.^[3] BIOS wurde ursprünglich auf Basis von Naturstoffen entwickelt, weitet sich aber auch auf die Chemie von nicht natürlichen Verbindungen aus.^[4] Naturstoffbibliotheken weisen mit 0,2 – 1,5 % deutlich höhere Trefferraten im Vergleich zu synthetischen Verbindungen und kombinatorischen Bibliotheken auf, was auch für BIOS-Kollektionen erwartet werden kann.^[4] Daher sind naturstoffbasierte Bibliotheken in vielen Fällen auch nicht sehr umfangreich und besitzen durchschnittlich 200 – 500 Verbindungen.^[4] Hierbei werden einzelne Substituenten variiert, um Derivate des Naturstoffes mit spezifischen Interaktionsmustern mit dem Zielprotein zu generieren.^[3b]

In chemisch-genetischen Ansätzen kommen häufig HTS-Verfahren zum Einsatz: Deren Vorteile liegen insbesondere in der kurzen Zeit und dem geringen Aufwand, die für ein Experiment aufgewendet werden müssen, was mit einer deutlich erhöhten Anzahl an getesteten Substanzen pro Zeiteinheit einhergeht.^[5] In diesem Zusammenhang können durch HTS auch die Kosten reduziert werden. Des Weiteren stehen heutzutage in vielen Fällen Screening-Einrichtungen zur Verfügung, in denen die Experimente schnell und automatisiert durchgeführt werden können.^[1]

Zielprotein-basierte Screenings werden im Falle von rückwärts gerichteter chemischer Genetik zur Identifizierung von Liganden eines gewünschten Proteins angewandt. Hierbei werden gereinigte Proteine zur Etablierung und Anwendung eines enzymatischen Testsystems eingesetzt, in dem die Bindung oder Inhibition des Proteins durch eine Testsubstanz überprüft wird.^[1, 6] Des Weiteren können auch mehrere Proteine zur Analyse

der Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt werden.^[7] Für klassische vorwärtsgerichtete chemisch-genetische Verfahren werden phänotypische Testsysteme angewandt: Diese können in einzelligen Organismen oder Zellkulturen durchgeführt werden. Die Detektion des gewünschten Proteins oder Organells kann über spezifische Marker mit anschließender mikroskopischer Visualisierung zur Identifizierung morphologischer Veränderungen erfolgen. Funktionelle Testsysteme detektieren bestimmte Prozesse, wie Mitose, Apoptose oder Metabolismus. Niedermolekulare Substanzen können in diesen Verfahren zur Identifizierung von Proteinen führen, die einen bestimmten Prozess regulieren.^[1]

Am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie sind zahlreiche chemisch-genetische Ansätze auf Basis von biologisch-orientierter Synthese erfolgreich eingesetzt worden, um neuartige Wirkstoffkandidaten anhand von Ausgangssubstanzen mit biologischer Aktivität zu entdecken.^[8] Die neuartigen Wirkstoffkandidaten, die in diesem Zusammenhang für verschiedene medizinische Fragestellungen ermittelt wurden, unterstreichen die Bedeutsamkeit des BIOS-Prinzips für die Wirkstoffforschung.

3.2 Neuronale Morphogenese

Die neuronale Morphogenese ist insbesondere anhand von hippokampalen Mausneuronen detailliert untersucht worden.^[9] Während dieses Entwicklungsprozesses bilden Neuronen ausgehend vom Zellkörper Axone und Dendriten, die der Polarisierung und Signalweiterleitung der Zelle dienen.^[10] Die Polarisierung kann hierbei durch Etablierung von *in vitro*-Kulturen studiert werden, da die Zellen nach Extraktion depolarisieren und die Nervenfortsätze zurückgebildet werden. Die Zellen erscheinen kugelförmig und bilden unmittelbar nach Ausplattierung kurze Fortsätze, die so genannten Filopodien, aus denen nach 12 – 36 h kurze Neuriten entstehen.^[10] In diesem Stadium wachsen und schrumpfen die initialen Neuriten zufällig und halten die Gesamtlänge der Neuriten aufrecht.

Das Wachstum der Neuriten wird durch verschiedene Prozesse gesteuert: Durch Verlängerung von Aktinfilamenten entsteht zunächst eine Vorwölbung des Zellkörpers, wobei gebündelte Aktinfilamente die Filopodienbildung steuern, während Mikrotubuli entlang des Aktins wachsen.^[11] Das Aktinnetzwerk wird bei der Neuritenbildung durch ein großes Netzwerk an Proteinen reguliert, das für Keimbildung, Polymerisation und Organisation zuständig ist. Hierbei ist insbesondere der Arp2/3-Komplex entscheidend, der als Keimbildungszentrum fungiert und an bereits bestehende Filamente bindet und die Bildung neuer Filamente bewirkt, was in einem verzweigten Aktinnetzwerk resultiert.^[12] Ebenso

spielen Anticapping-Proteine wie Ena/VASP eine wichtige Rolle, die die Enden der Aktinfilamente zugänglich für weiteres G-Aktin machen und dadurch die Verlängerung der Filamente ermöglichen.^[13] Insgesamt ist die Neuritogenese ein dynamischer Prozess, der sowohl durch wachstumsfördernde als auch wachstumshemmende Proteine beeinflusst wird.^[11a] Wachstumshemmende Signale kommen u.a. vom Zytoskelettprotein Profilin oder Myosin, das abhängig von der Abundanz von Regulatorproteinen positiv oder inhibitorisch auf den Bildungsprozess der Neuriten wirken kann.^[14] Die Mikrotubuli werden vorrangig durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine mittels eines Zusammenspiels fördernder und inhibitorischer Faktoren reguliert.^[15] Extrazelluläre Reize, u.a. durch die Neurotrophine NGF (engl. *nerve growth factor*) und BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), regulieren Bildung und Wachstum von Filopodien und Neuriten über einen gemeinsamen intrazellulären Signalweg. Neurotrophine binden an die Neurotrophin-spezifischen p75NTR-Rezeptoren oder an Tropomyosin-Rezeptor-Kinasen A, B und C (TrkA, TrkB, TrkC).^[16] Autokrin oder parakrin erhöhte BDNF-Konzentrationen erhöhen die Axonspezifizierung in neuronalen Zellkulturen.^[10] Durch Bindung der Wachstumsfaktoren an Trk-Rezeptoren, die durch Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zur Aktivierung der GTPasen Rac1 und Cdc42 führt, wird die Neuritenbildung und –entwicklung gefördert.^[11a]

Die neuronale Polarität startet mit dem starken Wachstum eines der Neuriten, der sich zum Axon weiterentwickelt (36 – 72 h nach Ausplattierung).^[10] Dies geschieht durch Aktivierung von Rezeptoren sowie Adhäsions- und Signalmolekülen, indem das Gleichgewicht der extrazellulären Signale aufgehoben wird. Die schrittweise Verlängerung des Axons wird durch Aufrechterhaltung der Aktivierung über einen positiven Rückkopplungsmechanismus gewährleistet.^[11b] In den folgenden Tagen wird die morphologische Entwicklung der weiteren Neuriten zu Dendriten fortgesetzt^[10] und schließlich durch die Synapsenbildung abgeschlossen. Insgesamt dauert die gesamte Entwicklung *in vitro* ausgehend von der ausplattierten, kugelförmigen Zelle etwa 7 - 28 Tage (Abbildung 3.2).^[17] *In vivo* scheint der Prozess analog abzulaufen, hängt jedoch auch von der entsprechenden Region des Nervensystems und dem Zelltyp ab.^[10]

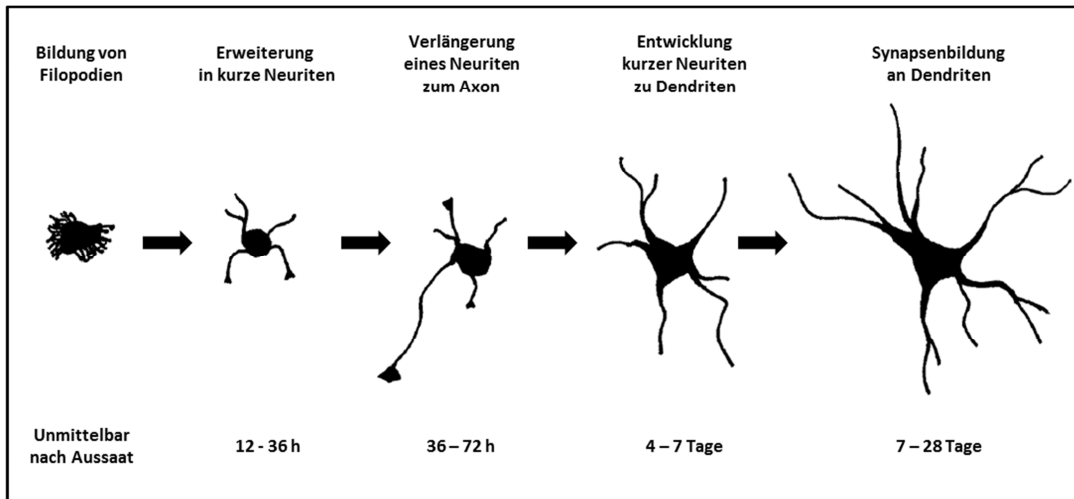


Abbildung 3.2: Neuronale Morphogenese anhand von hippocampalen Mausneuronen (modifiziert nach ^[9, 18])

Zahlreiche intra- und extrazelluläre Signale beeinflussen die neuronale Polarisierung. Ein entscheidendes Protein ist hierbei die Kinase PI3K, die an der Signalweiterleitung nach Bindung von Neurotrophinen an Tyrosin-Rezeptorkinasen (Trk) beteiligt ist und in der späteren Entwicklung die Spezifizierung des Axons beeinflusst.^[19] Über eine Signalkaskade ausgehend von Neurotrophinen und Trk wird zudem GSK-3 β phosphoryliert und inaktiviert, was entscheidend zur Verlängerung des Axons beiträgt.^[11b] Zur GSK-3 β -Inaktivierung führt auch die Aktivierung Wnt-Signalweges, der an verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt ist.^[11b, 20] Des Weiteren sind auch GTPasen der Ras- und Rho-Familien an der Polarität und am Axonwachstum beteiligt.^[11b]

3.2.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Krankheiten stellen eine enorme Herausforderung für Medizin, Wissenschaft und Ökonomie dar. Allein in den Jahren 2010 und 2011 belief sich der ökonomische Schaden durch Morbus Alzheimer in den USA auf 215 Milliarden US-Dollar. Aktuell wird für das Jahr 2017 die Einnahme durch Alzheimer-Medikamente auf 8,3 Milliarden US-Dollar geschätzt.^[21] Neurodegenerative Erkrankungen sind durch fortschreitenden Verlust von Neuronen und eine Vielzahl molekularer Attribute gekennzeichnet. Der wissenschaftliche Fortschritt auf molekularer Ebene hat zu einer Reihe von Behandlungsmöglichkeiten geführt, die in den pathologischen Fortgang der Krankheiten eingreifen können.^[22]

Ein wichtiger Mechanismus im Krankheitsbild von neurodegenerativen Krankheiten ist der neuronale Zelltod durch Glutamat-abhängige Exzitotoxizität. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem und wirkt als Agonist des *N*-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptors. Stimulierung des NMDA-Rezeptors führt zu Depolarisierung der synaptischen Membran und löst starken Calciumionen-Einstrom aus, was eine biochemische Signalkaskade auslöst und schließlich zu apoptotischem Zelltod führt.^[23] Exzitotoxizität stellt einen erheblichen Bestandteil von neurodegenerativen Krankheiten Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Huntington und amyotropher Lateralsklerose (ALS) dar.^[24] Neurodegeneration wird auch durch eine Vielzahl weiterer Faktoren ausgelöst und beeinflusst: Dazu zählen oxidativer Stress oder Mangel an Wachstumsfaktoren und Zytokinen.^[25]

Charakteristisch für zahlreiche neurodegenerative Krankheiten sind zudem anormale Proteinaggregationen. So sind intrazelluläre neurofibrilläre Aggregate, bestehend aus dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau, und extrazelluläre Plaques aus β -Amyloidpeptiden charakteristisch für Morbus Alzheimer.^[26] Das Gleichgewicht zwischen dephosphoryliertem, Mikrotubuli-gebundenem Tau und phosphoryliertem, freiem Tau ermöglicht axonalen Transport in Neuronen.^[27] Störungen dieses Gleichgewichts sowie Mutationen des Tau-Gens oder kovalente Modifikationen des Proteins können zu einem erhöhten Gehalt an freiem Tau führen, was in der Bildung von fibrillären Tau-Aggregaten resultiert.^[27] Der damit einhergehende Verlust der Mikrotubuli-Stabilisierung führt zu strukturellen und regulatorischen Fehlfunktionen, die zu synaptischer Dysfunktion und Degeneration von Neuronen führen können.^[28] β -Amyloidpeptide entstehen durch proteolytische Spaltung des Amyloidvorläuferproteins APP und können toxische Oligomere und im späteren Stadium auch extrazelluläre, plaqueartige Aggregate bilden.^[21] Ähnlich verhält es sich bei Morbus Parkinson, das sich durch abnorme Aggregationen des synaptischen Proteins α -Synuklein auszeichnet, das den Hauptbestandteil der Lewy-Körper, dem Kennzeichen von Morbus Parkinson, darstellt.^[29]

Strategien zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen setzen hauptsächlich auf die Abschwächung und Kontrolle der Krankheitssymptome. Der optimale Fall würde die Regenerierung der geschädigten und zerstörten Axone, Dendriten und Synapsen im zentralen Nervensystem mit einschließen. Entsprechende Ansätze waren bislang jedoch nicht erfolgreich.^[30] Im Falle von Morbus Alzheimer wird heutzutage hauptsächlich auf Inhibitoren der Cholinesterase, Secretase und der Tau-Aggregate gesetzt.^[31] Morbus Parkinson-Behandlungen fokussieren sich auf Agonisten von Dopamin-Rezeptoren, da in frühen Stadien der Krankheit Dopamin-sezernierende Neuronen absterben.^[30, 32] Ebenso sind im Falle von ALS verschiedene Ansätze zur Herstellung geeigneter Wirkstoffe verfolgt

worden. Jedoch wurde nur ein Medikament, Riluzol, durch die *Food and Drug Administration* (engl. Behörde für Lebens- und Arzneimittel, FDA) zugelassen. Behandlung mit Riluzol reduziert die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität, bekämpft damit jedoch nicht die Symptome der Erkrankung, sondern hat lediglich einen lebensverlängernden Effekt.^[33] Behandlung mit den erwähnten Wirkstoffen zeigen insgesamt zwar Verbesserungen der Symptome, sind jedoch nicht in der Lage die Krankheiten vollständig zu heilen.^[30]

Ebenfalls wurden neurotrophe Faktoren, z.B. BDNF, als Behandlungsmöglichkeit für neurodegenerative Erkrankungen untersucht. BDNF-Mangel ist pathophysiologisch in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer, ALS, Morbus Huntington und Morbus Parkinson entdeckt worden.^[34] BDNF ist für seine Funktion zur Regenerierung von Neuronen in Form des Wiederaufbaus synaptischer Strukturen durch dendritische Verästelung bekannt. Daher eignet sich exogene BDNF-Zugabe grundsätzlich zur Behandlung neurodegenerativer Symptome.^[35] In diesem Zusammenhang sind auch neurotrophe Naturstoffe, vornehmlich aus Pflanzen und Mikroorganismen isoliert, aufgrund ihres breiten neuropharmakologischen Wirkungsspektrums im Fokus der Wissenschaft gerückt.^[22, 30] Niedermolekulare Verbindungen mit neurotropher oder neuroprotektiver Wirkung besitzen die Fähigkeit des Schutzes vor neuronaler Schädigung sowie zur Unterstützung der Wiederherstellung geschädigter Neuronen und können daher von großer Bedeutung in der Neuropharmakologie sein. Es besteht ein großer Bedarf an neuartigen Wirkstoffen und Therapieansätzen, für die protektive und wachstumsfördernde Substanzen ermittelt werden müssen.^[8a, 8b]

Ein weiterer therapeutischer Ansatz für zahlreiche neurodegenerative Symptome ist die Modulation der c-Jun-N-terminalen Kinasen 1 - 3 (JNK 1-3). Diese wirken als multifunktionale Signalmoleküle in vielen zellulären Prozessen, u.a. in der Regenerierung von Neuronen nach Schädigung. Entscheidend für die Wahl als Zielprotein ist jedoch die Regulierung von proapoptotischen Proteinen durch JNK.^[36] Eine Abschwächung des apoptotischen Zelltods konnte in neuronalen Zellen von JNK-defizitären Mäusen beobachtet werden.^[37] Zahlreiche niedermolekulare Substanzen sowie peptidbasierte Inhibitoren von JNK sind bereits in klinischen Studien getestet worden.^[36, 38]

3.2.2 Neuromodulatorische Naturstoffe

Naturstoffe sind komplexe chemische Verbindungen, die verschiedenste Zielproteine binden und modulieren können. Dabei sind zahlreiche Effekte auf Signaltransduktionswege nachgewiesen worden, die auf direkte Modulation von Proteinen, wie Kinasen oder

Rezeptoren, zurückgehen. Die Eigenschaften reichen weiterhin von antioxidativen Effekten über Chromatinmodulation bis hin zu epigenetischen Einflüssen.^[22] Zahlreiche natürlich vorkommende neurotrophe Verbindungen sind ebenfalls bereits beschrieben worden.^[39] Der erste Naturstoff, für den neurotrophe Effekte beschrieben wurden, war Lactacystin, das bei niedrigmikromolaren Konzentrationen eine signifikante Steigerung des Neuritenwachstums zeigte. Einige neurotrophe Sesquiterpene sind aus Arten der Pflanzengattung *Illicium* isoliert und charakterisiert worden. Hierzu zählen unter anderem Merrilacton A und Jiadifenin.^[30] Weitere Substanzklassen, aus denen neurotrophe Naturstoffe identifiziert werden konnten, sind beispielsweise Alkaloide, Iridoide, Steroide und Diterpenoide.^[30, 39] Darüber hinaus weisen Naturstoffe vielfach auch neuroprotektive Eigenschaften auf.^[40] Niedermolekulare Substanzen mit neurotrophen oder neuroprotektiven Eigenschaften sind für die neuropharmakologische Forschung von großem Interesse, da neuritogene Verbindungen zur Regenerierung geschädigter Neuronen beitragen können.^[8a] Einige vielversprechende Substanzklassen und ihre biologischen Effekte werden im Folgenden näher beschrieben.

Pyridonalkaloide mit dem 4-Hydroxy-2-pyridon-Grundgerüst weisen vielfältige biologische Wirkungen von antibakteriellen über insektiziden bis hin zu neurotrophen Effekten auf.^[41] 4-Hydroxy-2-pyridone werden aufgrund ihrer Struktur in mehrere Gruppen unterteilt, wobei die Gruppe der 4-Hydroxy-3-Acyl-modifizierten Pyridone die neurotrophen Vertreter beinhaltet. Dazu zählt auch das Pyridonalkaloid Militarion A (MILI A, Abbildung 3.3),^[41] das aus dem marinen Pilz *Paecilomyces militaris* isoliert und als neuritogen beschrieben wurde.^[42] MILI A zeigte eine Verstärkung des Neuritenwachstums von 80 % bzw. 70 % bei Konzentrationen von 33 bzw. 10 μM in der Phäochromozytom-Zelllinie PC-12. Dabei wies MILI A keinerlei zytotoxische Effekte bis zu einer Konzentration von 100 μM auf.^[42]

Die weiteren Militarione Militarion B und C weisen lediglich geringe Effekte auf das Neuritenwachstum in PC-12-Zellen auf, während Militarion D inaktiv ist (Abbildung 3.3). Militarion B wirkt zusätzlich bei einer Konzentration von 100 μM leicht zytotoxisch.^[42] Nach der Identifizierung und Charakterisierung der Militarione wurden weitere Vertreter der Pilzgattung *Paecilomyces* auf bioaktive Metabolite untersucht: Aus *P. farinosus* wurden die Pyridonalkaloide Farinoson A, B und C (Abbildung 3.3) isoliert und ebenfalls auf neurotrophe Effekte getestet. Farinoson A und C zeigten einen förderlichen Einfluss auf das Neuritenwachstum in PC-12-Zellen bei Applikation von 20 – 50 μM , wohingegen Farinoson B in dieser Hinsicht keine Aktivität aufwies.^[43] Da Farinoson C strukturell deutlich einfacher als MILI A aufgebaut ist, ist trotz eingehender Struktur-Aktivitäts-Analyse unklar, ob ein identischer Wirkmechanismus vorliegt.^[43-44] Aus *P. farinosus* wurde zusätzlich (+)-*N*-Deoxymilitarion A (Abbildung 3.3) isoliert, das Neuritenwachstum bei Konzentrationen von 33 – 100 μM induziert.^[45]

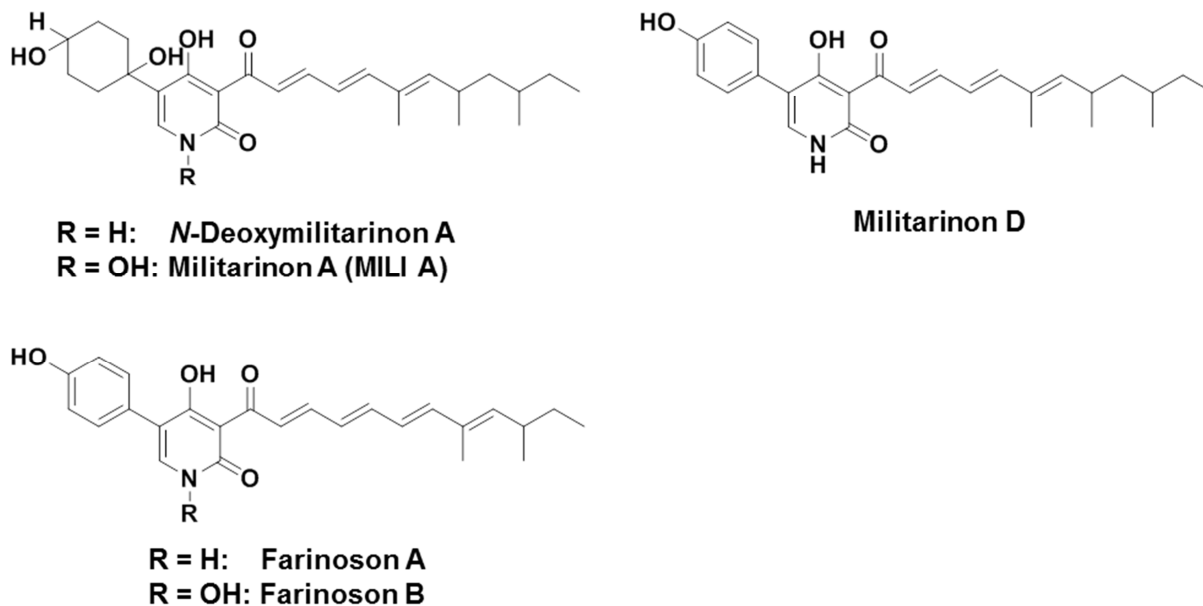


Abbildung 3.3: Neurotrophe Pyridonalkaloide aus *Paecilomyces*-Arten

Für MILI A wurde zudem der Wirkmechanismus detailliert aufgeklärt.^[46] Aufgrund seiner amphiphilen Struktur akkumuliert die Substanz zunächst in der Zellmembran und wird langsam ins Zytoplasma entlassen. Hier aktiviert MILI A spezifische Signaltransduktionswege, die in die NGF-induzierte neuronale Differenzierung involviert sind. Dabei wird die Phosphorylierung der Kinase SAPK/JNK, welche ebenfalls von NGF induziert wird, verstärkt. Der Effekt ist jedoch leicht abweichend vom Wirkmechanismus von NGF, da zwar ebenfalls die Kinasen MAPK und Akt/PI3K aktiviert werden, die zeitliche Koordinierung jedoch abweicht. Da MILI A vermutlich nicht durch Bindung an den Neurotrophin-Rezeptor TrkA wirkt, wird ein indirekter Effekt von MILI A auf TrkA vermutet. Dieser kann auf die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts als Folge der TrkA-Phosphorylierung zurückgeführt werden.^[46]

Iridoide basieren auf dem Cyclopenta[c]pyran-Grundgerüst und stellen eine große Substanzklasse aus verschiedenen pflanzlichen Quellen dar,^[25] die in der Natur hauptsächlich als Glykoside vorkommen.^[47] Da diese Pflanzen bereits in traditionellen Behandlungsmethoden eingesetzt wurden, wurde die Bioaktivität dieser Iridoide detailliert analysiert: Iridoide weisen beispielsweise neuroprotektive, antioxidative, kardiovaskuläre, antivirale, antimikrobielle oder immunmodulatorische Effekte auf. Iridoidglykoside mit nachgewiesener biologischer Aktivität können dadurch als Grundlage für die biologisch-orientierte Synthese von Substanzkollektionen dienen.^[8b]

Unter den neuroprotektiven Vertretern der Iridoide ist insbesondere Catalpol (Abbildung 3.4) zu nennen. Catalpol schützt vor neuronaler Schädigung durch Protektion vor oxidativem

Stress und dadurch resultierendem Zelltod. Hierbei wird teilweise die Stickoxid-Synthese und die Produktion von Tumornekrosefaktor- α , Stickoxid und reaktiven Sauerstoffspezies inhibiert. Zusätzlich schwächt es durch Erhöhung des Verhältnisses vom antiapoptotischen Protein Bcl-2 zum proapoptotischen Bax-Protein die intrazellulären Signalwege, die zu apoptotischem Zelltod führen.^[48] Ein weiteres neuroprotektives Iridoid ist Geniposid (Abbildung 3.4), das in primären Neuronen vor oxidativem Stress und Schädigung durch Glukose-Mangel schützt.^[49] In PC-12-Zellen konnte zusätzlich die konzentrationsabhängige Induzierung von Neuritenwachstum durch agonistische Wirkung auf den Glukagon-ähnlichen Rezeptor 1 (GLP-1)-Rezeptor nachgewiesen werden.^[50] Bei Applikation von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ wurde dieser Effekt auch für Catalpol gezeigt.^[25] Geniposid und Catalpol werden daher auch als Behandlungsmöglichkeiten für Morbus Alzheimer diskutiert.^[51] Für verschiedene Iridoide wurde die Induzierung oder Verstärkung von neuronalem Wachstum durch Aktivierung von Komponenten intrazellulärer Signalwege nachgewiesen, die in die neuronale Differenzierung involviert sind. So zeigen Picrosid I und II (Abbildung 3.4) eine Verstärkung des Neuritenwachstums, das durch NGF-Zugabe induziert wurde.^[52] Harpagid (Abbildung 3.4) und zahlreiche abgeleitete Verbindungen aus *Scrophularia buergeriana* schützen primäre Rattenneuronen vor Glutamat-induzierter Exzitotoxizität, was unter anderem durch Verstärkung des antioxidativen Abwehrsystems geschieht.^[53]

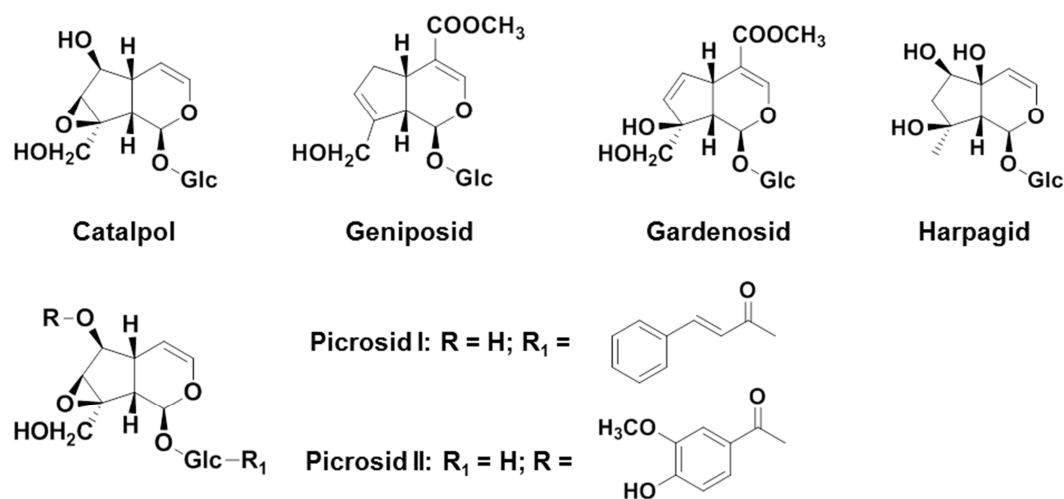
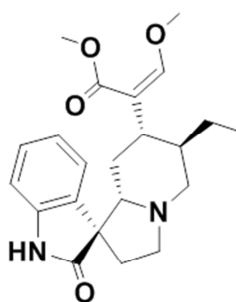


Abbildung 3.4: Natürlich vorkommende neuromodulatorische Iridoide

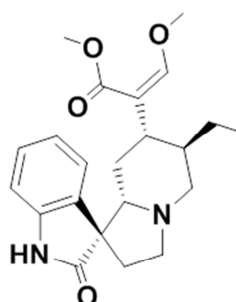
Substanzkolektionen auf Basis von neuroaktiven Iridoidglykosiden sind mit Hilfe von biologisch-orientierter Synthese bereits synthetisiert worden und erfolgreich in Testsystemen anhand von primären Neuronen auf neurotrophe Effekte untersucht worden.^[8b]

Pflanzen der Gattung *Uncaria* sind bereits in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung von Krankheiten des kardiovaskulären Systems und des zentralen Nervensystems eingesetzt worden. Die pharmakologischen Aktivitäten von *Uncaria*-Arten sind vielfältig und beinhalten unter anderem neuroprotektive, krampflösende und sedative Wirkungen.^[54] Speziell die neuromodulatorische Aktivität spielt eine wichtige Rolle für neuropathologische Krankheitsbilder.

Im Falle von *Uncaria rhynchophylla* geht die neuropharmakologische Wirkung vorrangig auf die Indolalkaloide Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin (Abbildung 3.5) zurück, die die Hauptbestandteile von Extrakten dieser Pflanze darstellen.^[54] Beide Substanzen beinhalten das Secoyohimban-Grundgerüst^[55] und sind für die Wirkstoffforschung aufgrund eines breiten Spektrums an pharmakologischen Eigenschaften von Interesse. Beide Verbindungen wirken antagonistisch auf NMDA-Rezeptoren, was zur Behandlung oder Vorbeugung von neuronalen Erkrankungen mit überschüssiger NMDA-Rezeptoraktivität von Interesse ist.^[56] Rhynchophyllin inhibiert die JNK-Phosphorylierung und Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B (engl. *nuclear factor- κ B*) nach Induzierung von Exzitotoxizität.^[57] Des Weiteren ist ein antiepileptischer Effekt von Rhynchophyllin bei Exzitotoxizität beschrieben worden, der mit verminderter Freisetzung von Sauerstoffradikalen assoziiert ist.^[57] Außerdem weist die Substanz entzündungshemmende Eigenschaften durch reduzierte Freisetzung von Stickoxid, Tumornekrosefaktor- α oder Interleukin-1 β nach Lipopolysaccharid-induzierter Immunreaktion auf.^[58] Isorhynchophyllin wirkt durch einen kompetitiven Mechanismus antagonistisch auf den 5-Hydroxytryptaminrezeptor (5-HT_{2A}).^[59] Zahlreiche pharmakologische Effekte sind auch von weiteren Indolalkaloiden und Phenolverbindungen aus *U. rhynchophylla* bekannt.^[60]



Rhynchophyllin



Isorhynchophyllin

Abbildung 3.5: Neuroprotektive Indolalkaloide aus *Uncaria rhynchophylla*

Darüber hinaus sind weitere natürlich vorkommende Naturstoffe mit dem Secoyohimban-Grundgerüst erfolgreich auf ihre Bioaktivität untersucht worden: Strychnofolin weist beispielsweise antimittotische Effekte auf Leberkrebszellen auf.^[61] Pteropodin steigert die Aktivität von muskarinischen Rattenrezeptoren, während Alstonisin antiplasmodiale und vasorelaxierende Aktivitäten zeigt.^[62] Spirotryprostatin A wurde in Mauszellen als Inhibitor des Übergangs von G₂- zur M-Phase identifiziert.^[63]

Das breite Spektrum an pharmakologischen Eigenschaften von Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin, speziell in Bezug auf die Neuroprotektion, macht auf der Secoyohimban-Kernstruktur basierende Indolalkaloide zu prävalidierten Startpunkten für die biologisch-orientierte Synthese von Substanzkollektionen mit neurobiologischer Aktivität. Eine kleinere Substanzbibliothek basierend auf Secoyohimbanen wurde bereits auf primäre Hippokampus-Neuronen der Ratte sowie Motoneuronen, die aus embryonalen Stammzellen gewonnen wurden, getestet und führte zur Ermittlung erster neurotropher Verbindungen.^[8a]

3.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus lässt sich in drei Phasen unterteilen: Die Interphase, die Mitose und die Zytokinese. Die Mitose wiederum gliedert sich weiterhin in Pro-, Meta-, Ana- und Telophase (Abbildung 3.6). Nach der Verdopplung der Zentrosomen und Replikation der DNA während der Interphase startet zu Beginn der Mitose die Bildung der mitotischen Spindel.^[64] Die mitotische Spindel ist ein bipolares Konstrukt, welches die korrekte Verteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen sicherstellt. Sein Hauptbestandteil sind Mikrotubuli, polymere Strukturen aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren.^[65] Die Minus-Enden sind dabei an den Spindelpolen verankert, während die positiven Enden zur Mitte der Spindel orientiert sind. Dort überlappen Mikrotubuli von beiden Polen, wodurch eine antiparallele Anordnung entsteht.^[65b]

In der Mitose werden zunächst die Zentrosomen separiert, welche dadurch zu Mikrotubuli-organisierenden Zentren (engl. *microtubule-organizing centers*, MTOC) werden.^[66] In der Pro- bzw. Metaphase beginnen sich die kondensierten Chromosomen an die Mikrotubuli der Spindel anzuhängen und zum Spindelzentrum zu orientieren.^[64] Im Spindelzentrum sind die Chromosomen durch Multiproteinkomplexe, die so genannten Kinetochore, an den Mikrotubuli verankert.^[65b] In der Anaphase werden die einzelnen Chromatiden in Richtung der entsprechenden Spindelpole auseinandergezogen. In der Telophase verlängert sich die mitotische Spindel und es bilden sich die Kernmembranen um die Chromatidensätze, bevor

der Zellzyklus durch das endgültige Aufteilen in zwei Tochterzellen abgeschlossen wird (Abbildung 3.6).^[64]

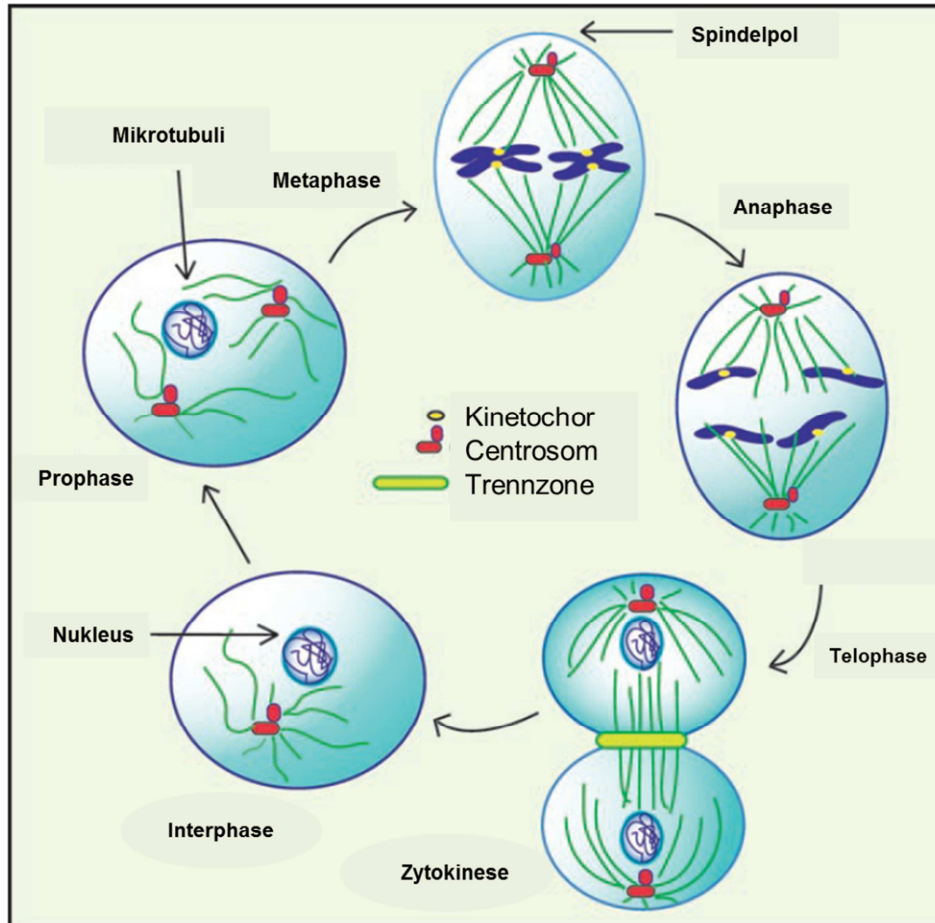


Abbildung 3.6: Phasen der Zellteilung (modifiziert nach ^[64])

Essentiell für eine einwandfreie Zellteilung ist die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen: Hierbei ist entscheidend, dass die Teilung so lange blockiert wird, bis die gleichmäßige Verteilung der DNA garantiert werden kann. Der konservierte Signalweg *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) erhält Signale von den Kinetochoren, die unvollständig an die Mikrotubuli angeheftet sind.^[67] Kinetochore vermitteln das Anheften der Chromosomen an die Mikrotubuli, was sowohl durch Interaktionen mit Chromatin und Mikrotubuli als auch über Kontrolle des SAC bewerkstelligt wird.^[68] Durch die Signale der Kinetochore verhindert der SAC, dass ein Übertritt in die Anaphase erfolgen kann, solange einzelne Kinetochore nicht korrekt an die Mikrotubuli der mitotischen Spindel angeheftet sind.^[67] Bei fehlerhafter Orientierung der Chromosomen oder anderen Defekten der mitotischen Spindel kann chromosomale Instabilität, wie abweichende Chromosomenzahlen

(Aneuploidien), auftreten, die durch fehlerhafte Aufteilung der Chromatiden während der Mitose entstehen und bei Überleben der polyploiden Zelle zu malignem Zellwachstum führen können. Chromosomale Instabilität kann in den meisten Krebstumoren beobachtet werden und ist ein wichtiger Grund für die Entstehung von Tumoren. Die essentielle Aufgabe der SAC bei der Verhinderung von fehlerhafter Mitose hat verschiedene Ansätze in der Wirkstoffforschung inspiriert, die auf die Aktivität des SAC Einfluss nehmen. Hierbei sind insbesondere Inhibitoren der Kinase Aurora B zu nennen, die eine entscheidende Rolle bei der Orientierung der Chromosomen während der Mitose spielt.^[67, 69] Der zweite essentielle Kontrollpunkt ist der *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C). Der Komplex besteht aus 15 Einzelproteinen, die entsprechende Zielproteine erkennen und ubiquitinieren.^[70] Zielproteine des APC/C sind Regulatoren des Zellzyklus, die für den Übertritt von der Meta- zur Anaphase abgebaut werden, um den Fortgang der Mitose zu ermöglichen.^[71] Bei unvollständigem oder fehlerhaftem Anheften der Kinetochore an die Schwesterchromatiden wird der APC/C blockiert, bis alle Schwesterchromatiden korrekt an die Kinetochore gebunden sind.^[70, 72]

Die korrekte Verteilung der Chromosomen ist essentiell für die Lebensfähigkeit eines Organismus. Fehler während der Mitose, wie abweichende Zentrosomenzahlen, fehlerhafte Zytokinese oder Defekte des SAC führen zu Aneuploidien, was in der Entstehung von Tumoren resultieren kann.^[67]

3.3.1 Zentrosomen und die mitotische Spindel

Zentrosomen kontrollieren als Mikrotubuli-organisierende Zentren die Anzahl, Polarität und Verteilung von Mikrotubuli und koordinieren deren Funktionen. Dazu zählen Form, Polarität, Adhäsion und Beweglichkeit der Zelle, ebenso wie Transport und Lokalisierung von Organellen. Des Weiteren sind Zentrosomen für die Chromosomenaufteilung und Zytokinese von entscheidender Bedeutung^[73] und dienen als Verankerungspunkt für Mikrotubuli in der mitotischen Spindel.^[66] Zentrosomen setzen sich aus einem Zentriolenpaar und umgebendem perizentriolarem Material (engl. *pericentriolar material*, PCM) zusammen. Das PCM besteht insbesondere aus γ -Tubulin-Komplexen, die als Befestigungspunkte für Mikrotubuli dienen.^[74] Zusätzlich sind zahlreiche Kinasen, Phosphatasen oder Motorproteine Bestandteil des PCM oder sind an dessen Aufbau beteiligt.^[75]

Abhängig von der mitotischen Phase besitzen Zellen ein ungeteiltes Zentrosom oder ein Zentrosomenpaar.^[76] Die Duplikation der Zentrosomen wird parallel mit der DNA-Replikation kurz vor Beginn der S-Phase (späte G₁-Phase) initiiert. Dabei werden die Zentriolen

zunächst getrennt, bevor am proximalen Ende eine Procentriole gebildet wird. Im Folgenden werden die Procentriolen verlängert und PCM rekrutiert, so dass zwei Zentrosomen entstehen und die Ausbildung der Spindelpole während der Mitose gewährleistet ist.^[66]

Duplizierte Zentrosomen sind essentiell für die korrekte Verteilung der Chromosomen auf beide Tochterzellen während der Mitose.^[73] Tumorzellen weisen häufig zentrosomale Vervielfältigungen auf, die aus verschiedenen Abweichungen vom korrekten Ablauf der Mitose resultieren, und können verschiedene Strategien durchlaufen, um dennoch die so genannte pseudo-bipolare Mitose durchführen zu können.^[77] Behandlungsstrategien zur Unterdrückung von pseudo-bipolarer Teilung sind für die Krebstherapie von besonderer Bedeutung: Niedermolekulare Substanzen, die spezifisch in diesen Vorgang eingreifen, könnten ausschließlich Tumorzellen attackieren, während gesunde Zellen nicht beeinträchtigt wären.^[77b]

3.3.1.1 Zentrosomale Defekte und Mechanismen zur Befähigung bipolarer Mitose

Zentrosomale Defekte lassen sich in strukturelle und numerische Defekte unterteilen.^[73] Strukturelle Defekte beinhalten vergrößerte Zentrosomen, Ansammlungen zentrosomaler Proteine außerhalb der Zentrosomen, Abweichungen in der Phosphorylierung der PCM-Bestandteile oder Fragmentierung der Zentriolen.^[73, 78] Unter numerischen Gesichtspunkten sind häufig erhöhte Zentrosomenzahlen zu beobachten. Diese Defekte ergeben sich als Folge verschiedener fehlgeschlagener Mechanismen (Abbildung 3.7): Beispielsweise können Zentrosomen mehrfach während eines Zellzyklus dupliziert werden. Häufiger sind jedoch abgebrochene Zellteilungen der Grund für multiple Zentrosomen. Diese können wiederum mehrere Gründe haben, wie z.B. nicht behobene DNA-Schädigungen oder deregulierte Signalwege. Eine Fehlfunktion des SAC oder langfristiger mitotischer Arrest führen zum Austritt aus der Mitose. Weitere Möglichkeiten sind Zellfusionen oder *de novo*-Synthese von Zentriolen.^[66, 73]

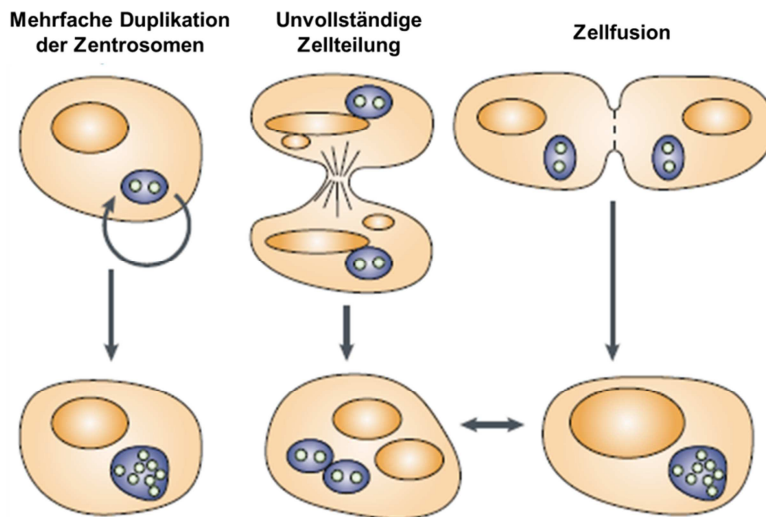


Abbildung 3.7: Beispielmehanismen für die Entstehung abweichender Zentrosomenzahlen (modifiziert nach ^[73])

Zellen mit amplifizierten Zentrosomen sind zu verschiedenen Mechanismen befähigt, um trotz einer erhöhten Zentrosomenzahl eine bipolare Mitose zu bewerkstelligen (Abbildung 3.8). Zentrosomen können verdrängt werden, indem Zytoplasten mit enthaltenen Zentrosomen gebildet werden. Des Weiteren können überschüssige Zentrosomen durch Ausschalten ihrer MTOC-Aktivität inaktiviert werden, während bei einer asymmetrischen Aufteilung die Zentrosomen auf zwei Tochterzellen verteilt werden. Eine dieser Tochterzellen beinhaltet nur ein Zentrosom, was sich zur folgenden Mitose innerhalb des Zentrosomzyklus erneut teilen und so eine bipolare Zellteilung bewirken kann. Die am häufigsten auftretende Strategie ist jedoch die Gruppierung von Zentrosomen, bei der zwei Gruppen gebildet werden, die dadurch die bipolare Spindel bilden können.^[77a]

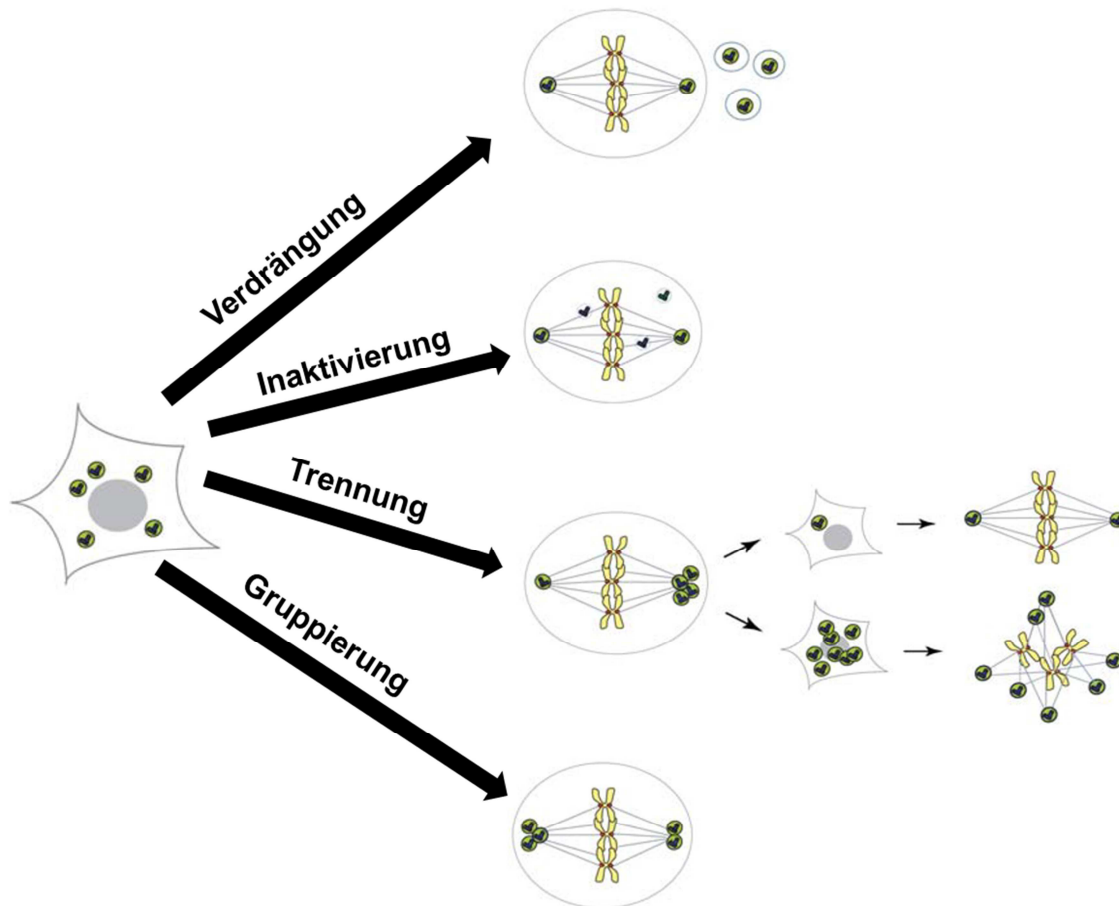


Abbildung 3.8: Mechanismen zur Bewerkstelligung von pseudo-bipolarer Mitose (modifiziert nach ^[77a])

Zentrosomale Gruppierung wurde erstmals 1982 in murinen Tumorzellen beobachtet.^[79] Erhöhte Aufmerksamkeit erlangte der Prozess jedoch erst zur Jahrtausendwende, als in Brustkarzinomen der Zusammenhang zwischen erhöhter Zentrosomenzahl und abweichender Mitose aufgezeigt wurde.^[80] In den folgenden Jahren war die Aufschlüsselung der molekularen Mechanismen der Gruppierung von Zentrosomen im Fokus der Wissenschaftler: In zahlreichen Studien wurde ermittelt, dass das Gruppieren von Zentrosomen durch die Kombination von Spindel-spezifischen Mikrotubuli- und Aktin-assoziierten Kräften an der Peripherie der Zelle reguliert wird.^[77b] Hierzu zählen die Motorproteine Dynein, Eg5, CENP-E und HSET, der RanGTPase-Effektor HURP, das Mikrotubuli-assoziierte Protein NuMa und der Aktin-Regulator Form3/INF2.^[77b, 78, 81] Dabei stehen insbesondere das Kinesin HSET und das Effektorprotein HURP im Fokus: Beide Proteine haben keine essentielle Aufgabe in gesunden somatischen Zellen, wohingegen sie unabdingbar für die Bildung bipolarer Spindeln in Zellen mit erhöhter Zentrosomenzahl sind.^[77b, 78]

Die Gruppierung von Zentrosomen zur Bildung der pseudo-bipolaren Spindel wird durch verschiedene Strukturen und Mechanismen, u.a. den SAC, beeinflusst. Da durch den SAC das Signal für die Fortsetzung der Mitose bei fehlerhafter Bindung von Spindel-Mikrotubuli und Kinetochoren gegeben wird, wird eine Beeinflussung des SAC bei der Bildung der pseudo-bipolaren Spindel und der damit einhergehenden Verzögerung des Übertritts in die Anaphase angenommen.^[77a] Erhöhte Chromosomen- oder Zentrosomenzahlen sind mit verlängerter Mitosedauer assoziiert.^[82]

Der SAC stellt die notwendige Zeitspanne zur Gruppierung der Zentrosomen vor dem Eintritt in die Anaphase sicher. Eine Beteiligung des SAC lässt sich dadurch bestätigen, dass die SAC-Komponenten Mad2, Bub1 und CENP-E in *Drosophila*-Zellen notwendig für das korrekte Gruppieren der Zentrosomen sind. Durch die Regulierung von Eg5 und der dadurch aufrechterhaltenen Kräfte innerhalb der mitotischen Spindel ist auch der APC/C entscheidend an der erfolgreichen Gruppierung der Zentrosomen beteiligt.^[81a]

Weitere Faktoren, die ebenfalls die Gruppierung von Zentrosomen in Krebszellen beeinflussen, sind Mikrotubuli-assoziierte Proteine, wie z.B. MAPs oder Dynein. Dynein übt eine notwendige Kraft zur korrekten Positionierung der Spindelpole aus. Überdies ist beispielsweise auch die Zelladhäsion ein wichtiger Faktor bei der Spindelbildung: Bei schwacher Verbindung zur extrazellulären Matrix exprimieren Zellen mehr HSET, da die Zelle die von außen einwirkenden Kräfte ausgleichen muss. Dies wurde für die Neuroblastom-Zelllinie N1E-115 mit schwacher Integrin β 1-Expression gezeigt.^[77a]

Des Weiteren spielen diverse Motorproteine und Spindel-assoziierte Proteine eine gewichtige Rolle bei der Gruppierung von Zentrosomen. Hierbei sind insbesondere Mikrotubuli-assoziierte Proteine, wie z.B. Kinesine, zu nennen.^[77a]

3.3.2 Kinesine

Kinesine bestehen u.a. aus einer konservierten Motordomäne, die etwa 340 Aminosäuren umfasst und ATP- sowie Mikrotubuli-Bindestellen aufweist.^[83] Die Motordomäne wandelt ATP unter Hydrolyse in mechanische Energie und Kraft um, um die Fortbewegung der Kinesine an den Mikrotubuli zu gewährleisten.^[83a, 84] Neben der Motordomäne, die auch als Kopf des Proteins bezeichnet wird, besitzen Kinesine weitere Domänen, die als Stiel- und Schwanzdomänen bezeichnet werden (Abbildung 3.9).^[83a, 85] Die Stiel- und Schwanzdomänen werden zur Dimerisierung oder Oligomerisierung benötigt und binden die transportierte Ladung, die u.a. aus Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren besteht.^[85-86] Die

meisten Kinesine liegen in Form von Homodimeren vor, Ausnahmen bilden Kinesin-1 (Heterotetramere), Kinesin-2 (Heterotrimere) oder Kinesin-5 (Homotetramere).^[84]

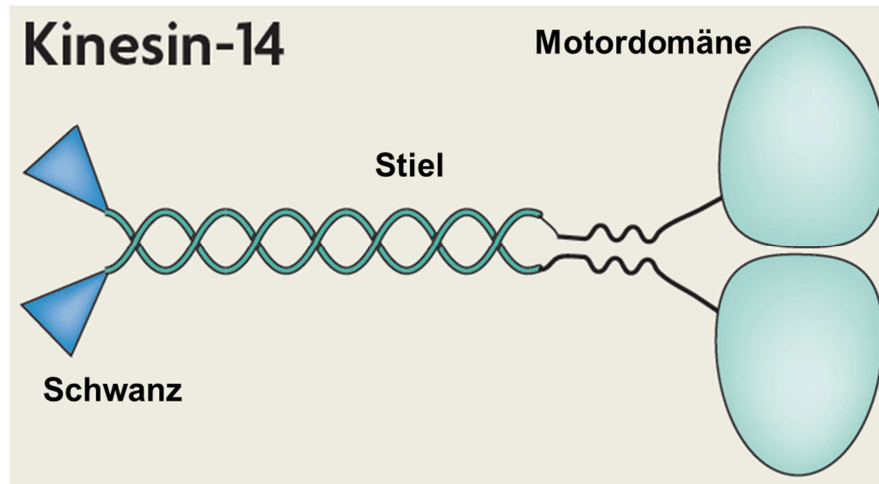


Abbildung 3.9: Aufbau von Motorproteinen der Kinesin-Superfamilie am Beispiel der Homodimere der Kinesin-14-Familie (modifiziert nach ^[84])

Die Kinesin-Superfamilie weist 45 Vertreter auf, die anhand von Strukturhomologien und Funktionsweisen in 14 Unterfamilien eingeordnet werden.^[83b] Aufgrund der konservierten Motordomäne wird die Aufteilung der Kinesin-Superfamilie durch die hochdivergenten Stiel- und Schwanzdomänen ermöglicht.^[86] Bislang sind 16 Kinesine mit mitotischen Funktionen beschrieben worden, die an der Spindelbildung und –aufrechterhaltung sowie Positionierung der Chromosomen in der Metaphasenplatte, Aufteilung der Schwesterchromatiden in der Anaphase und der Zytokinese beteiligt sind.^[72, 87] Kinesine mit Amino-terminal gebundener Motordomäne sind zum positiven Ende der Mikrotubuli orientiert, während bei Carboxy-terminaler Motordomäne eine Orientierung zum negativen Mikrotubuli-Ende vorliegt.^[84] Kinesine mit zentraler Motordomäne besitzen keine direkte Bewegungsfähigkeit und sind zur Regulation und Depolymerisation von Mikrotubuli befähigt.^[88] Die Funktionen der mitotischen Motorproteine sind entsprechend ihrer Bewegungsrichtung angepasst, indem zum Plus-Ende orientierte Kinesine häufig mit Chromosomentransport assoziiert sind, während bei Orientierung zum Minus-Ende hauptsächlich strukturelle Aufgaben wie Aufrechterhaltung der Spindelpositionierung vorliegen.^[83b] Weitere Kinesine sind an synaptischem Vesikeltransport in Neuronen oder an der Zellmigration beteiligt.^[86, 89]

Mitotische Kinesine sind bezüglich ihrer Synthese, Funktion und Abbau stark reguliert, so dass ein Kinesin nur während des entsprechenden Prozesses in seiner aktiven Form vorhanden ist und während der Inaktivierung von den Mikrotubuli und der zu

transportierenden Ladung abgeschottet wird.^[84, 90] Regulationsmechanismen sind hierbei räumliche Kontrolle durch Signalmoleküle, Protein-Protein-Interaktionen oder Phosphorylierung.^[90] So werden Proteine der Kinesin-14-Familie während der Interphase ständig im Nukleus gehalten, da sie durch Bindung an Importin- α und - β inaktiviert werden.^[91] Das Kinesin-7 CENP-E befindet sich außerhalb der Mitose im Zytoplasma und gelangt erst durch die Auflösung der Kernhülle an seinen Funktionsort.^[92]

3.3.2.1 HSET

HSET (*engl. human spleen, embryo, testes*, humane Milz, Embryo, Hoden), auch KIFC1 oder KNSL2, ist ein humaner Vertreter der Kinesin-14-Familie und ist an der Vernetzung der Mikrotubuli der mitotischen Spindel sowie an der Organisation und Aufrechterhaltung der Spindel beteiligt.^[83a, 93] Als Kinesin-14 besitzt HSET eine Motordomäne am C-Terminus, wodurch es zum negativen Ende der Spindelmikrotubuli orientiert ist und sich durch Entlanggleiten an den Mikrotubuli zu den Spindelpolen bewegt.^[84, 91b, 94] In gesunden Zellen wird HSET für die Zusammensetzung der bipolaren Spindel unter nicht-zentrosomalen Bedingungen, etwa bei der Meiose, benötigt. Im Gegensatz dazu ist es für die Ausbildung der mitotischen Spindel nicht essentiell, wenn funktionell dominante Zentrosomen vorhanden sind.^[94] In Tumorzellen mit korrekter Zentrosomenzahl werden nicht-zentrosomale Pole durch Polymerisation der Mikrotubuli unabhängig von den Zentrosomen gebildet. In diesem Fall ist HSET für das Gruppieren dieser nicht-zentrosomalen Strukturen erforderlich.^[95] In Krebszellen mit abweichender Zentrosomenzahl ist HSET dagegen für die Gruppierung amplifizierter Zentrosomen erforderlich, um die Bildung der pseudo-bipolaren Spindel und somit die Mitose sicherzustellen.^[77b] Herabregulierung von HSET in Zellen mit multiplen Zentrosomen führt zur Entstehung multipolarer Spindeln und zu fehlerhafter Chromosomensortierung (Abbildung 3.10).^[83a] In Zellen mit mehrheitlich zwei Zentrosomen pro Zelle sind keine Fragmentierungen der Spindel und keine multipolaren Spindeln zu beobachten.^[95] Multipolare Spindeln nach HSET-Depletion konnten auch in *Drosophila*-Zellen beobachtet werden, wo das Kinesin-14 Ncd (*nonclaret disjunctional*) eine analoge Funktion erfüllt.^[96]

Aufgrund seiner Orientierung zum Minus-Ende der Mikrotubuli agiert HSET antagonistisch zu dem Kinesin-5-Vertreter Eg5, welches zu den Plus-Polen orientiert ist.^[94] Eg5 liegt als bipolares Homotetramer mit zwei zum Plus-Ende orientierten, anti-parallelen Motordomänen an jedem Ende vor. Eg5 gleitet an parallel verlaufenden Mikrotubuli entlang und kann diese quervernetzen, was entscheidend zur Separierung der Spindelpole beiträgt.^[83b, 90] Die Funktion von Eg5 ist essentiell für die korrekte Durchführung der Mitose, was durch

Inhibitionsstudien gezeigt wurde. Behandlung mit spezifischen, allosterischen Eg5-Inhibitoren bewirkt die Verhinderung der Zentrosomenteilung, was in einer monoastralen Spindel mit umgebenden Chromosomen resultiert (Abbildung 3.10).^[85, 97] Selektive Eg5-Inhibition kann wiederum durch parallele HSET-Inhibition kompensiert werden, was zur Bildung so genannter pseudo-bipolarer Spindeln führt.^[93]

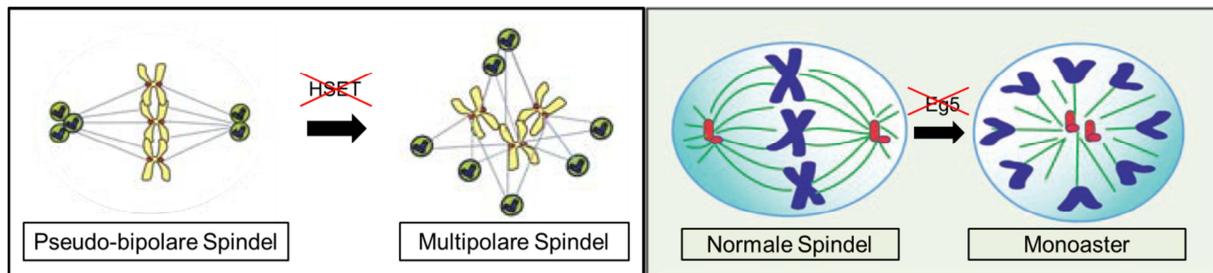


Abbildung 3.10: Multipolare Spindel nach HSET-Inhibition oder –Herabregulierung und monoastrale Spindel nach Inhibition oder Herabregulierung von Eg5 (modifiziert nach ^[64, 77a])

Dieser Effekt kann in Zellkulturen mit einem hohen Anteil an Zellen mit abweichender Zentrosomenzahl, z.B. in den Brustkarzinomzellen BT-549 oder der Maus-Neuroblastomzelllinie N1E-115, beobachtet werden.^[95, 98] In Populationen mit geringem Anteil an Zellen mit multiplen Zentrosomen, z.B. in der Osteosarkomzelllinie U2OS, treten pseudo-bipolare Spindeln nur in geringem Maße auf.^[99] Die Abhängigkeit von HSET zur Bildung der pseudo-bipolaren Spindel scheint somit ausschließlich in Krebszellen mit amplifizierten Zentrosomen der Fall zu sein. Multipolare Strukturen werden durch RNAi-bedingte Herabregulierung des HSET-Proteingehalts nur in Zellen mit zusätzlichen Zentrosomen induziert. Aufgrund der Dominanz der Zentrosomen ist die Funktion von HSET in gesunden Zellen vernachlässigbar. Im Gegensatz dazu stellt HSET bei der nicht-zentrosomalen Meiose einen entscheidenden Faktor dar. Daher scheinen die Faktoren, die für die nicht-zentrosomale Spindel in der Meiose verantwortlich sind, dieselben wie bei der pseudo-bipolaren Spindel in Tumorzellen zu sein.^[77a] Interessanterweise konnten in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa dennoch multipolare Spindeln nach siRNA-induzierter Herabregulierung von HSET detektiert werden.^[83a] Diese Zelllinie weist lediglich ca. 10 % Zellen mit amplifizierten Zentrosomen auf.^[77b]

Durch den unterschiedlichen Bedarf in gesunden Zellen und Tumorzellen stellt HSET ein vielversprechendes Zielprotein für Behandlungsstrategien von Krebserkrankungen dar.^[77b] HSET wird bei einem beträchtlichen Teil von Krebserkrankungen überexprimiert, darunter Brust-, Lungen-, Darm- und Gebärmutterhalstumoren.^[100] Diese Tumoren weisen in hohem

Maße amplifizierte Zentrosomen auf.^[73] HSET wird des Weiteren als Markerprotein für Brustkrebserkrankungen diskutiert, da eine Überexpression des Kinesins mit späteren Tumorstadien und aggressivem Krankheitsverlauf durch beschleunigte Proliferation assoziiert wird.^[100] Ähnliche Effekte wurden in Ovarialkarzinomen beobachtet, wo eine HSET-Überexpression mit schlechten Überlebensprognosen und besonderer Schwere der Erkrankung einhergeht.^[101] Zusätzlich konnte eine Verbindung zwischen abweichender HSET-Expression und verminderter Zeugungsfähigkeit demonstriert werden.^[102]

3.3.3 Antimitotische Substanzen

Krebszellen weisen zahlreiche Charakteristika auf, die sie von gesunden somatischen Zellen unterscheiden. Dazu zählt unter anderem die unkontrollierte Proliferation trotz eingeschränkter Nährstoffversorgung und fehlendem Platz.^[72, 103] Außerdem sind sie in der Lage, dem Zelltod in Form von Apoptose zu entgehen, indem der Tumorsuppressor p53 inhibiert wird.^[103-104] Krebszellen können verschiedene Liganden und Signalmoleküle exprimieren und so Wachstum und Metastasierung vorantreiben.^[105] Aufgrund dieser vielfältigen charakteristischen Merkmale und Unterschiede zu gesundem Gewebe sind verschiedene Ansätze unternommen worden, um speziell entartete Zellen zu attackieren.^[72] Heutige Behandlungsmethoden von Tumoren beinhalten meist Chemotherapie, Bestrahlung und operative Entfernung des Tumors. In seltenen Fällen werden auch Immuntherapeutika eingesetzt, damit Tumorzellen effektiver vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden.^[72, 106] Des Weiteren werden monoklonale Antikörper oder Antikörper-Wirkstoff-Konjugate eingesetzt.^[107] Mikrotubuli werden aufgrund der schnellen und uneingeschränkten Proliferation von Tumorzellen häufig als Zielstruktur gewählt. Die antimitotischen Therapeutika Paclitaxel und Vinblastin greifen durch die Aktivierung des SAC in die Polymerisation der Mikrotubuli ein und verhindern damit den Übertritt in die Anaphase. Die Zellen arretieren in der Mitose und durchlaufen schließlich die Apoptose, da der Aufbau der mitotischen Spindel und die Orientierung der Chromosomen aufgehoben werden.^[72] Paclitaxel (Taxol, Abbildung 3.11) ist der bekannteste Vertreter der Taxane und als Therapeutikum von Tumoren der Brust, Eierstöcke und Lunge weit verbreitet.^[72, 108] Es inhibiert die Depolymerisation der Mikrotubuli durch Bindung an β -Tubulin, was in mitotischem Arrest und apoptotischem Zelltod resultiert.^[109] Ein weiteres Mikrotubuli-stabilisierendes Taxan ist Cabazitaxel, das ebenfalls gegen Brust- und Prostatakrebs eingesetzt wird. Ebenfalls an β III-Tubulin bindet Epothilone B, dessen Analogon Ixabepilon (Abbildung 3.11) gegen Brustkrebs bei Resistenzen gegen Taxane verwendet wird.^[110] Eine weitere β -Tubulinbindestelle, die von vielen Therapeutika gebunden wird, ist die Vinca-Bindestelle. Hier binden die so genannten Vinca-Alkaloide, wie Vincristin und Vinblastin

(Abbildung 3.11), die seit 40 Jahren zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden. Vinca-Alkaloide depolymerisieren Mikrotubuli, was zur Zerstörung der mitotischen Spindel und mitotischem Arrest führt.^[72, 108] Ein vielversprechender, neuerer Wirkstoff aus dieser Gruppe ist Vintafolid, das mit Folsäure konjugiert ist und bereits in Phase II-Studien erfolgreich gegen Eierstock- und Lungenkarzinome eingesetzt wurde.^[111] Der entsprechende Folatrezeptor ist in vielen Tumorzellen überexprimiert und macht dieses Konjugat zu einem hoffnungsvollen Wirkstoff.^[112] Die Bindung von Therapeutika, unter anderem Nocodazol oder 2-Methoxyestradiol (Abbildung 3.11), an die Colchicin-Bindestelle führt ebenfalls zur Destabilisierung der Mikrotubuli.^[113]

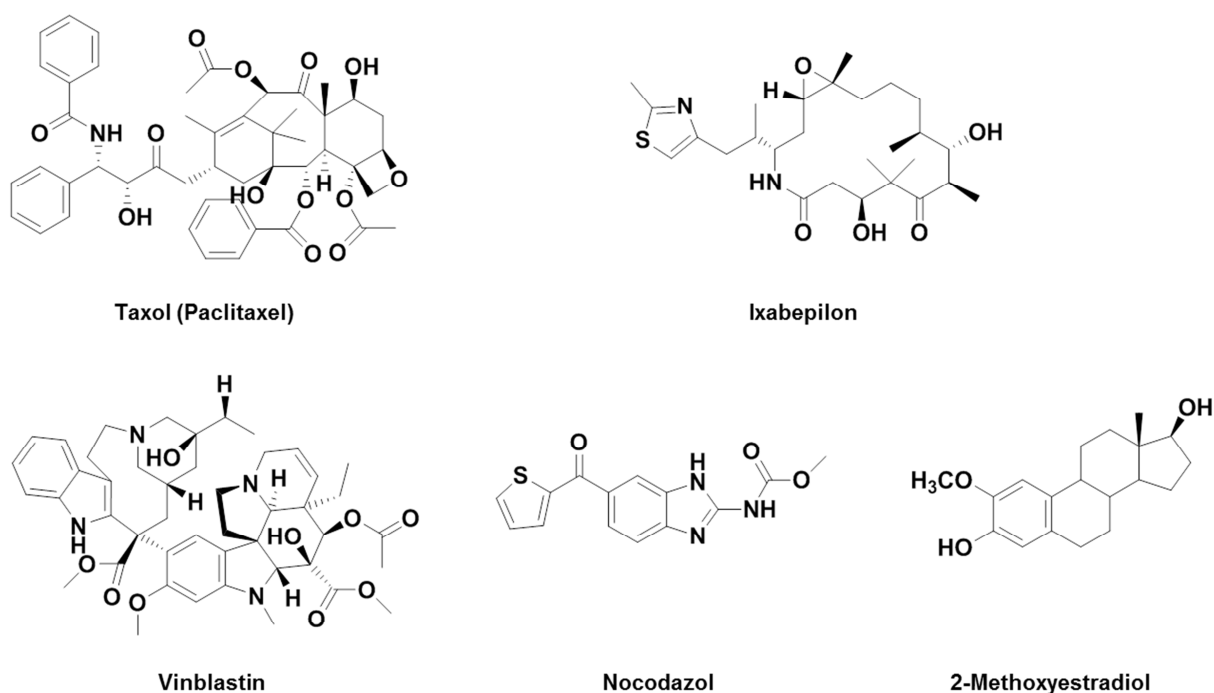


Abbildung 3.11: Ausgewählte Tubulin-bindende Therapeutika

Mikrotubuli-bindende Giftstoffe wie Taxane und Vinca-Alkaloide stellen effektive Wirkstoffe gegen verschiedene Krebsstypen dar, weisen jedoch auch Nebenwirkungen auf, da aufgrund fehlender Spezifität für Krebszellen auch gesundes Gewebe geschädigt wird. Dies kann zu Erkrankungen des Blutkreislaufs, Nervensystems oder Verdauungstraktes führen.^[72, 77a, 114] Zudem können Resistenzen gegen den entsprechenden Wirkstoff auftreten.^[72]

Neben zahlreichen Mikrotubuli-bindenden Wirkstoffen sind zusätzliche Strategien verfolgt worden, um den mitotischen Apparat zu attackieren und zu beeinflussen. Hierbei sind vor allem Inhibitoren von mitotischen Kinasen, wie Polo-like Kinase 1 (PLK1), Aurora A und Aurora B, sowie der mitotischen Kinesine Eg5, CENP-E und HSET zu nennen. Inhibition

dieser Proteine führt zu mitotischem Arrest,^[67] was verschiedene Folgen haben kann. Die Zellen können absterben, steigen aus der Mitose aus oder es entstehen aneuploide Tochterzellen durch ungleiche Zellteilung.^[115]

Eine besondere Rolle in der Wirkstoffforschung haben Inhibitoren mitotischer Kinesine eingenommen: Hierbei sind die Kinesine Eg5, CENP-E und HSET zu nennen, die aufgrund ihrer essentiellen Funktion im Rahmen der Mitose unter besonderem Augenmerk der Wissenschaftler stehen.

3.3.4 Kinesinmodulatoren

Die Verwendung antimitotischer Wirkstoffe ist aufgrund von zum Teil schädlichen Nebenwirkungen durch simultane Wirkung auf nicht betroffenes Gewebe limitiert. Auch trotz der Existenz von Therapeutika, die wie Taxol multipolare Strukturen fördern, kann keiner dieser Wirkstoffe spezifisch Zellen mit amplifizierten Zentrosomen attackieren.^[77b]

In den letzten Jahrzehnten sind mitotische Kinesine vornehmlich in den Fokus der Wirkstoffforschung gerückt, seitdem der selektive Eg5-Inhibitor Monastrol (Abbildung 3.12) beschrieben wurde.^[97a] Monastrol wurde in einem phänotypischen Screeningverfahren, das spezifisch für antimitotische Verbindungen ohne Bindungsaktivität an Mikrotubuli entwickelt wurde, entdeckt. Behandlung mit Monastrol verhindert die Zentrosomenteilung, was in einer monoastralen Spindel mit zentralen Zentrosomen und umgebenden Chromosomen resultiert.^[85, 97a] Monastrol bindet an eine allosterische Bindestelle in Eg5 und ist daher nicht-kompetitiv mit ATP und Mikrotubuli. Eg5-Inhibitoren induzieren die Aktivierung des SAC und lösen mitotischen Arrest und Apoptose aus.^[85] Als weiterer allosterischer Inhibitor mit identischem Wirkmechanismus wurde S-Trityl-L-Cystein (STLC, Abbildung 3.12) beschrieben.^[116] Einige Eg5-Inhibitoren wurden bereits in klinischen Studien untersucht, wobei sich Ispinesib und das Analogon SB-743921 inzwischen in Phase II-Studien befinden. Insgesamt befinden sich neun Verbindungen derzeit in klinischen Untersuchungen, die alle den gleichen Bindungsmechanismus wie Monastrol und STLC aufweisen.^[117] Als ATP-kompetitive Eg5-Inhibitoren wurden Biphenylverbindungen beschrieben, die jedoch über einen allosterischen Mechanismus wirken.^[118] Sie weisen Selektivität gegenüber anderen Kinesinen und teilweise starke Inhibitionen im hohen nanomolaren Bereich auf. Zahlreiche weitere Inhibitoren für Eg5 wurden beschrieben, die jedoch nicht selektiv für das Protein sind.^[97b]

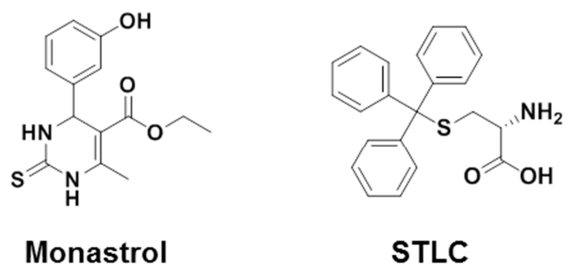


Abbildung 3.12: Inhibitoren des mitotischen Kinesins Eg5

Vielversprechende Inhibitoren wurden auch für das Kinesin-7 CENP-E (engl. *centromere protein E*) beschrieben. GSK923295 (Abbildung 3.13) ist der am detailliertesten charakterisierte CENP-E-Inhibitor und bindet allosterisch mit einem K_i von 3,2 nM. Ebenso wurde Selektivität gegenüber anderen Kinesinen aufgezeigt und in zellbasierten Studien mit unvollständiger Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte der gewünschte Phänotyp dargestellt.^[119] GSK923295 wird in klinischen Phase I-Studien auf Möglichkeiten zur Verwendung als Krebsmedikament getestet.^[120] Als potenter und selektiver Inhibitor wurde ebenfalls Syntelin (Abbildung 3.13) beschrieben, das einen IC_{50} von 160 nM gegen CENP-E aufweist.^[121] Der erste beschriebene CENP-E-Inhibitor UA62784^[122] (Abbildung 3.13) wurde kürzlich als Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation beschrieben und war zuvor bereits als unselektiver Hemmstoff bekannt, der zusätzlich zahlreiche Kinasen inhibiert.^[97b, 123] Trotz zahlreicher klinischer Untersuchungen von Inhibitoren der Kinesine Eg5 und CENP-E weist bislang nur der Eg5-Inhibitor ARRY-520 klinische Aktivität in Testpatienten auf.^[117]

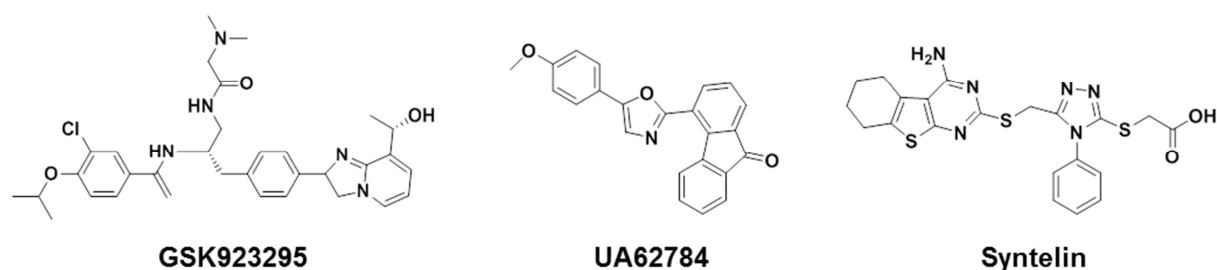


Abbildung 3.13: Inhibitoren des mitotischen Kinesins CENP-E

Bis zum heutigen Tage sind nur wenige niedermolekulare HSET-Inhibitoren beschrieben worden. Wu et al. entdeckten mittels eines Hochdurchsatzverfahrens eine inhibitorische Substanz mit einem Phenylalanin-Grundgerüst. Durch Synthese einer entsprechenden Substanzbibliothek wurde der erste potente HSET-Inhibitor **AZ82** identifiziert.^[93, 124] **AZ82** (Abbildung 3.14) inhibiert die Mikrotubuli-stimulierte ATPase-Aktivität des Kinesins mit einem

IC₅₀ von 0,3 µM und zeigte starke Selektivität gegenüber weiteren Kinesinen.^[93] **AZ82** bindet selektiv an den HSET-Mikrotubuli-Komplex und führt phänotypisch in BT-549-Zellen zu einem hohen Zellanteil, der multipolare Spindeln aufweist. Des Weiteren ergab Inhibition von Eg5 mit gleichzeitiger **AZ82**-Behandlung pseudo-bipolare Spindeln.^[93] Weitere HSET-Inhibitoren wurden in den letzten Jahren beschrieben, wobei diese Substanzen an HSET ohne Interaktion mit Mikrotubuli binden. Insgesamt wiesen diese Verbindungen ein schwächeres Inhibitions Potenzial als **AZ82** auf.^[98, 125] In klinischen Studien sind HSET-Inhibitoren bislang noch nicht getestet worden.

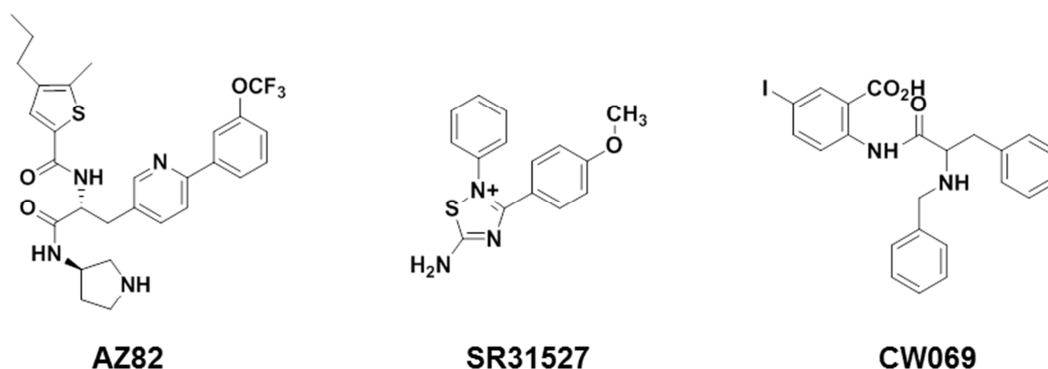


Abbildung 3.14: Inhibitoren des mitotischen Kinesins HSET

Weitere Inhibitoren sind für Vertreter der Kinesin-1-, Kinesin-6-, Kinesin-8-, Kinesin-12- und Kinesin-13-Familien beschrieben worden.^[97b]

3.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten vorwärts- bzw. rückwärtsgerichtete Ansätze der chemischen Genetik^[1] verwendet werden, um auf Basis von Naturstoffen neuartige niedermolekulare neuromodulatorische und antimittotische Substanzen zu identifizieren.

Für die Identifizierung neurotropher Verbindungen sollte ein vorwärtsgerichteter Ansatz verwendet werden: Hierbei war das primäre Ziel die Etablierung eines zellbasierten Testsystems, mit dem naturstoffbasierte Substanzbibliotheken auf neurotrophe Effekte untersucht werden sollten. Als relevanter Parameter sollte das Wachstum von Neuriten in einer neuronalen Zelllinie dienen, wofür ein publiziertes Protokoll unter Verwendung der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y verwendet wurde.^[126] SH-SY5Y-Zellen sind bereits für zahlreiche Untersuchungen zur Modulierung des Neuritenwachstums durch

Behandlung mit niedermolekularen Substanzen zum Einsatz gekommen.^[127] Das vorhandene Protokoll beinhaltete Informationen zur Kultivierung und Ausdifferenzierung in Neuronen-ähnliche Zellen, so dass die Bedingungen zur Behandlung mit den Testsubstanzen evaluiert wurden. Als Testsubstanzen dienten Substanzbibliotheken auf Basis mehrerer neuromodulatorischer Naturstoffe, die am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie hergestellt wurden: Eine Bibliothek basierend auf dem Pyridonalkaloid MILI A wurde von Dr. Peter Schröder synthetisiert. Die neurotrophe Wirkung von MILI A sowie verwandter Pyridonalkaloide wurde in PC-12-Zellen nachgewiesen.^[41] Iridoid-basierte Substanzbibliotheken wurden von Dr. Peter Schröder und Dr. Pierre-Yves Dakas synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Iridoid-basierte Substanzen mit neuromodulatorischen Einflüssen sind ebenfalls in vielen Fällen beschrieben worden.^[25] Die Synthese einer Substanzbibliothek, basierend auf den Indolalkaloiden Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin, erfolgte durch Dr. Sara López-Tosco und Dr. Andrey Antonchick. Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin zeichnen sich durch vielfältige neuropharmakologische Effekte aus.^[54] Die Substanzbibliotheken sollten mit Hilfe des zuvor etablierten Testsystems auf Modulierung des Neuritenwachstums untersucht werden. Im Falle aktiver Substanzen sollten über Struktur-Aktivitäts-Analysen sowie die Bestimmung des Zielproteins nähere Informationen über den Wirkmechanismus gewonnen werden.

Für die Ermittlung antimittotischer Substanzen wurde ein rückwärtsgerichteter chemisch-genetischer Ansatz verwendet. Das Ziel dieses Projektes war die Identifizierung neuartiger Inhibitoren des mitotischen Kinesins HSET. HSET ist essentiell für die Gruppierung amplifizierter Zentrosomen, was Tumorzellen zur Durchführung der pseudo-bipolaren Mitose befähigt.^[77b] Inhibition oder RNAi-bedingte Herabregulierung des Kinesins führt in Zellen mit multiplen Zentrosomen zu multipolaren Spindeln, was in mitotischem Arrest und schließlich apoptotischem Zelltod resultiert. Da HSET in gesunden Zellen aufgrund der funktionell dominanten Zentrosomen keine essentielle Funktion zu erfüllen scheint, wird dieses Kinesin als vielversprechendes Zielprotein neuartiger Wirkstoffe diskutiert.^[77b] Daher wurde ein Screening zur Testung der *in vitro*-Inhibition der ATPase-Aktivität von HSET mit ca. 150000 Verbindungen aus der Substanzbibliothek des *Compound Management and Screening Centers* (COMAS) der Max-Planck-Gesellschaft durchgeführt. Im Anschluss wurden die aktiven Verbindungen von M.Sc. Mylene Hübecker und Beate Schölermann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie auf zellulärer Basis initial analysiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die tiefergehende Charakterisierung des Sulfonylpyrimidins **236038**, das HSET kovalent bindet und in zellbasierten Experimenten mitotischen Arrest und multipolare Spindeln hervorrief. Hierzu sollte das inhibitorische Potenzial der Verbindung aus dem Screening bestätigt und im Vergleich mit dem publizierten Inhibitor **AZ82** eingeordnet werden. Des Weiteren sollten verwandte Sulfonylpyrimidine, die ebenfalls Aktivität gegen

HSET gezeigt hatten, näher charakterisiert werden. Von Dr. Erchang Shang (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) und Kenshirou Shimizu (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) wurden Substanzbibliotheken auf Basis des aktiven Derivats **236035** synthetisiert, mit denen eine Struktur-Aktivitäts-Analyse angefertigt wurde. Die Charakterisierung sollte zusätzlich zu den enzymatischen Testungen auch in zellbasierten Testsystemen, welche die mitotische Arretierung sowie die fehlerhafte zentrosomale Gruppierung nach Substanzbehandlung visualisieren, durchgeführt werden. Abschließend sollte die intrazelluläre Bindung an HSET in Zellen mit amplifizierten Zentrosomen analysiert werden.

4 Material

4.1 Eukaryotische Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung | Quelle |
|------------|------------------------------|-------------------------|
| BT-549 | Brustkarzinomzellen (human) | ATCC, Manassas, VA, USA |
| HeLa | Zervixkarzinomzellen (human) | DSMZ, Braunschweig |
| MDA-MB-231 | Brustkarzinomzellen (human) | DSMZ, Braunschweig |
| SH-SY5Y | Neuroblastomzellen (human) | DSMZ, Braunschweig |

4.2 Antikörper und Färbereagenzien

| Antikörper/Färbereagenz (IZC = Immunzytochemie, WB = Western Blot) | Verdün- nung | Stammkon- zentration | Quelle | Firma/Herkunft |
|--|-----------------|-------------------------|-----------|--|
| anti-HSET ^{WB} | 1:1000 | 0,2 mg/ml | Kaninchen | Abcam, Cambridge, UK |
| anti-Kaninchen-Alexa 488 ^{IZC} | 1:1000 | 2 mg/ml | Esel | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| anti-Kaninchen-IRDye 800 CW ^{WB} | 1:5000 | 1 mg/ml | Ziege | LI-COR Biosciences, Bad Homburg |
| anti-MAP4K4 ^{WB} | 1:500 | 1 mg/ml | Kaninchen | Cell Signaling Technology, Leiden, NL |
| anti-Kaninchen-Alexa 594 ^{IZC} | 1:500 | 2 mg/ml | Ziege | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| anti-Perizentrin ^{IZC} | 1:1000 | 0,2 mg/ml | Kaninchen | Abcam, Cambridge, UK |
| anti-Phosphohiston H3- Alexa 594 ^{IZC} | 1:500 | 1 mg/ml | Kaninchen | Cell Signaling Technology, Leiden, NL |
| anti- α -Tubulin ^{IZC} | 1:2000 | 0,5 mg/ml | Kaninchen | Abcam, Cambridge, UK |
| DAPI (4',6-Diamidin-2- phenylindol) ^{IZC} | 1:1000 | 1 mg/ml | | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| FITC-anti- α -Tubulin ^{IZC} | 1:500 | 1 mg/ml | Maus | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| HRP-anti-Kaninchen ^{WB} | 1:5000 | 0,8 mg/ml | Ziege | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| TRITC-Phalloidin ^{IZC} | 1:1000 | 1 mg/ml | | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

4.3 Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalie | Firma/Herkunft |
|---|--|
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg |
| Acetonitril | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Acrylamid | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| ActivX™ Desthiobiotin-ATP | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Adenosintriphosphat (ATP) | New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M. |
| all-trans-Retinsäure (ATRA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ameisensäure | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Ammoniumpersulfat (APS) | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| apo-Transferrin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| ATP-Magnesiumsalz (Mg-ATP) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Aurintricarboxylsäure (ATA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| AZ82 | Glix Laboratories Inc., Hopkinton, MA, USA |
| Bradford-Reagenz | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| <i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> (BDNF) | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Dithioerythrit (DTE) | GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg |
| Dithiothreitol (DTT) | GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg |
| DMEM/Ham's F12 (DMEM/F12, 1:1) | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg |
| Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Fetales Kälberserum (FBS) | Invitrogen, Darmstadt |
| Formaldehyd | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Glutathion (GSH) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Glycerin | GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg |
| Glycin | Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe |
| Guanidinhydrochlorid | J.T. Baker, Deventer, NL |
| Guanosintriphosphat (GTP) | tebu-bio GmbH, Offenbach |

| Chemikalie | Firma/Herkunft |
|--|---|
| Harnstoff | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Insulin, human | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Isorhynchophyllin | GL Biochem, Shanghai, China |
| Kenpaullon | Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg |
| Laktatdehydrogenase (LDH) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| L-Glutamin | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Magermilchpulver | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Methanol | Merck KGaA, Darmstadt |
| Mikrotubuli (Taxol-stabilisiert und lyophilisiert) | tebu-bio GmbH, Offenbach |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg |
| Natriumglutamat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Natriumpyruvat (100x) | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Natriumselenit | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Nikotinamid-Adenindinukleotid (NADH) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Nocodazol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Nonidet P-40 (NP-40) | US Biological, Salem, MA, USA |
| <i>Odyssey Blocking Buffer</i> | LI-COR Biosciences, Bad Homburg |
| PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot |
| PBS-Tabletten | Jena Bioscience GmbH, Jena |
| Penicillin/Streptomycin (100x) | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Phosphoenolpyruvat (PEP) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Pierce™ Streptavidin Agarose | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Ponceau S | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Progesteron | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Protease-/Phosphatase-Inhibitor | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Putrescin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Pyruvatkinase (PK) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

| Chemikalie | Firma/Herkunft |
|---------------------------------------|--|
| Rhynchophyllin | GL Biochem, Shanghai, China |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |
| Taxol | AppliChem GmbH, Darmstadt |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe |
| Thymidin | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) | Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe |
| Triton X-100 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Trypanblau | Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Trypsin/EDTA | PAN Biotech GmbH, Aidenbach |
| Tubulin | tebu-bio GmbH, Offenbach |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

4.4 Verbrauchsmaterialien

| Material | Firma/Herkunft |
|--|---|
| 96-Lochplatte (schwarz, schwarzer Boden) | Corning GmbH, Wiesbaden |
| 96-Lochplatte (schwarz, transparenter Boden) | Corning GmbH, Wiesbaden |
| 96-Lochplatte (transparent) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| 96-Lochplatte (weiß) | Corning GmbH, Wiesbaden |
| Autosampler-Röhrchen | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Desthiobiotin-ATP | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Gewebekulturflaschen | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| Kryoröhrchen | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Küvetten | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| <i>LoBind Tubes</i> | Eppendorf AG, Hamburg |
| Pipettenspitzen (10 µl) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl) | Diagonal GmbH & Co. KG, Münster |
| Polykarbonat-Reaktionsgefäße | Beckman Coulter, Krefeld |
| PVDF-Transfermembran | Merck KGaA, Darmstadt |
| Reaktionsgefäße (0,5-2 ml) | Eppendorf AG, Hamburg |
| Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) | Sarstedt, Nümbrecht |

| Material | Firma/Herkunft |
|--------------------|---|
| Spinsäule | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Whatman 3MM Papier | Whatman GmbH, Dassel |
| Zeba Spin-Säule | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |

4.5 Puffer und Lösungen

| Puffer | Zusammensetzung |
|----------------------------------|--|
| ADP-Glo-Puffer | 40 mM Tris (pH 7,5) 20 mM MgCl ₂ 0,1 mg/ml BSA |
| Blocklösung (Immunzytochemie) | 2 % (w/v) BSA in TBS-T |
| Blocklösung (Western Blot) | 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T |
| BRB80 | 80 mM PIPES 1 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA pH 6,8 |
| General Tubulin Buffer | 80 mM PIPES pH 6,9 1 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA |
| IP-Lysepuffer | 25 mM Tris (pH 7,4) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % NP-40 5 % (v/v) Glycerin |

Material

| Puffer | Zusammensetzung |
|--------------------------------------|--|
| Lagerungspuffer | 10 µM Taxol in BRB80 |
| Kinasepuffer | 20 mM HEPES 150 mM NaCl 0,1 % Triton X-100 pH 7,4 |
| Kryomedium | 5 % (v/v) DMSO in DMEM mit hohem Glukosegehalt (4,5 g/l) |
| Malachitgrün-Puffer | 25 mM PIPES (pH 6,7) 0,5 mM MgCl ₂ 0,05 mg/ml BSA 5 µM Taxol 1 mM DTT 0,01 % (v/v) Triton X-100 |
| N2-Supplement | 5 µg/ml Insulin 20 nM Progesteron 30 mM Natriumselenit 100 µg/ml apo-Transferrin 100 µM Putrescin in DMEM/F12 (1:1) |
| PBS (Jena Biosciences GmbH, Jena) | 140 mM NaCl 10 mM Phosphatpuffer 3 mM KCl pH 7,45 |

Material

| Puffer | Zusammensetzung |
|-----------------------|--|
| Perm-Puffer (4x) | 400 mM PIPES 40 mM EGTA 4 mM MgCl ₂ 0,4 % Triton X-100 pH 6,8 |
| Perm-Fix-Puffer | 3,7 % (v/v) Formaldehyd in Perm-Puffer |
| PM-Puffer | 15 mM PIPES (pH 7,0) 1 mM MgCl ₂ |
| SDS-Probenpuffer (5x) | 200 mM Tris (pH 6,8) 40 % (v/v) Glycerin 280 mM SDS 400 mM DTE 0,3 mM Bromphenolblau |
| SDS-Laufpuffer (10x) | 250 mM Tris 2,5 M Glycin 35 mM SDS |
| TBS | 10 mM Tris (pH 7,4) 150 mM NaCl |
| TBS-T | 0,1 % Tween-20 in TBS |
| Transferpuffer | 25 mM Tris 190 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol |

4.6 Allgemeine Laborgeräte

| Gerät | Firma/Herkunft |
|---|---|
| Brutschrank INE400 | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach |
| CoolSnap ES Kamera | Photometrics, Tucson, AZ, USA |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M mit Inkubator XL-3 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen |
| Inkubator Nuaire DHD Autoflow NU 5510 E | IBS tecnomara, Fernwald |
| Mastercycler epgradient S | Eppendorf AG, Hamburg |
| Mr. Frosty™ Freezing Container | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Neubauer-Zählkammer | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| Odyssey® FC Imaging System | LI-COR Biosciences, Bad Homburg |
| Orbitrap Velos Pro Ionenfallen-Massenspektrometer | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| pH-Meter | Mettler Toledo, Gießen |
| Pipetten ResearchPlus | Eppendorf AG, Hamburg |
| Plattenlesegerät Infinite M 200 | Tecan, Grödig, AUT |
| PowerPac Universal | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Schüttler Eppendorf Thermomixer comfort | Eppendorf AG, Hamburg |
| Serologische Pipetten | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| Sterilbank Nuaire | IBS tecnomara, Fernwald |
| Taumel-Rollenmischer TRM 50 | IDL GmbH & Co. KG, Nidderau |
| Trans Blot SD SemiDry Transfer Cell | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| UltiMate™ 3000 RSLCnano | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Ultrazentrifuge Optima MAX-XP | Beckman Coulter, Krefeld |
| Vakuumkonzentrator | Eppendorf AG, Hamburg |
| Wasserbad | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge 5430 | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge 5810R | Eppendorf AG, Hamburg |

4.7 Zellkulturmedien

| Medium | Zusätze | Firma/Herkunft |
|--|---|-----------------------------|
| <i>Complete DMEM/F12</i> | DMEM/F12 (1:1) 1 mM L-Glutamin 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin 3 % (v/v) N2-Supplement | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |
| DMEM mit hohem Glukosegehalt (4,5 g/l) | 10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin 1 % (v/v) Natriumpyruvat 1 % (v/v) Nicht-essentielle Aminosäuren | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |
| DMEM/F12 (1:1) | | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |
| N2-ATRA | 1 µM ATRA in <i>Complete DMEM/F12</i> | |

4.8 Kits

| Kit | Firma/Herkunft |
|--|---|
| SuperSignal West Pico Chemiluminescent Kit | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Kit | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| Z'-LYTE™ Kinase Assay | Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte |
| ADP-Glo™ Kinase Assay | Promega, Mannheim |
| Malachite Green Phosphate Assay Kit | BioAssay Systems, Hayward, CA, USA |

5 Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellsuspensionen wurden auf Eis überführt und in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Suspension wurde in eine 75 cm² Gewebekulturflasche überführt, die 10 ml Kulturmedium enthielt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem geeigneten Inkubator. Nach 24 h wurden die Zellen mehrfach mit 5 ml PBS gewaschen und mit 10 ml Kulturmedium versetzt, um das DMSO des Kryomediums zu entfernen.

5.1.2 Subkultivierung von Zellen

Bei einer Konfluenz von 90 % wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen von der Oberfläche wurden 2 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ für einige Minuten inkubiert. Durch leichtes Klopfen gegen die Flasche wurde gewährleistet, dass sich die Zellen von der Oberfläche lösten. Im Anschluss wurden 8 ml Kulturmedium hinzugegeben, um die Wirksamkeit des Trypsins durch Serumbestandteile zu inaktivieren, und die Zellen durch Pipettieren gemischt. Ein Teil der Zellsuspension wurde in eine neue Gewebekulturflasche mit 10 ml Kulturmedium überführt.

5.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat von Zellen

Die Zellzahl wurde nach Ablösen der Zellen durch Trypsin und Zugabe von Kulturmedium mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde das Deckglas durch Anhauchen befeuchtet und auf die Stege der Kammer gedrückt, bis Newtonsche Ringe sichtbar wurden. Die Zellsuspension wurde 1:1 mit Trypanblau gemischt, das zur Detektion von toten Zellen diente. 10 µl der Mischung wurden zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop vier große Quadrate ausgezählt, die aus jeweils 16 Kleinquadraten bestanden. Schließlich wurde der Mittelwert der einzelnen Quadrate berechnet und mit dem Faktor 2×10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

Zur Aussaat von Zellen wurde die benötigte Zellzahl für das Experiment berechnet und eine entsprechende Suspension durch Verdünnung in Kulturmedium hergestellt. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette in eine 96-Lochplatte übertragen, wobei 100 µl pro Loch ausgesät wurden. Der äußere Rand der Platte wurde mit Kulturmedium befüllt, um Verdunstungseffekte zu vermeiden. Wurde nur ein Teil der Platte verwendet, wurde mit freien Löchern ebenso verfahren.

5.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellsuspensionen wurden die Zellen in 175 cm² Gewebekulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und durch Zugabe von 4 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurden 20 ml Kulturmedium hinzugegeben und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Kapitel 5.1.3) bestimmt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 250 rcf zentrifugiert und das Pellet in Kulturmedium mit 5 % (v/v) DMSO resuspendiert, um eine Zellzahl von 5×10^5 pro ml zu erreichen. Jeweils 1 ml wurde in Kryoröhrchen pipettiert und in einen Mr. Frosty™ Freezing Container überführt, welcher einen langsamen Einfrierungsprozess der Zellsuspension bei -80 °C ermöglicht. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.1.5 Zellsynchronisation

Die Zellsynchronisation erfolgte mit einem einfachen Thymidin-Block, um eine Arretierung der Zellen in der G₁/S-Phase zu ermöglichen. Thymidin ist ein Inhibitor des Zellzyklus, der eine Rückkopplungs-Inhibition der Nukleotidsynthese hervorruft.^[128] Die Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät und nach 24 h mit 2 mM Thymidin behandelt. Durch mehrfaches Auswaschen mit PBS wurde das Thymidin nach 16 h entfernt und die Testsubstanzen in Kulturmedium hinzugegeben. Bei erneutem Eintritt der Zellpopulation in die Mitose wurden die Zellen fixiert, wobei der geeignete Zeitpunkt der Fixierung durch regelmäßige Kontrolle der Proben gewählt wurde.

5.1.6 Immunzytochemische Färbung von Zellen

Nach Inkubation mit den entsprechenden Testsubstanzen wurden die Zellen mit dem Perm-Fix-Puffer für 30 min fixiert und permeabilisiert. Nach Entfernung der Lösung wurde dreimal mit TBS-T gewaschen und die Blocklösung für 1 h hinzugegeben, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurden die entsprechenden Primärantikörper in der Blocklösung hinzugegeben und die Proben über Nacht im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen und mit den Zweitantikörpern in der Blocklösung für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in TBS gelagert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurde anhand des beschriebenen Protokolls (Kapitel 5.4) durchgeführt.

5.1.7 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Komplettlysaten mit den im Folgenden beschriebenen Methoden wurden die Zellen in 175 cm² Gewebekulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

5.1.7.1 Herstellung von Gesamtproteinlysaten für Desthiobiotin-ADP Pull Down-Experimente

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 % mit eiskaltem PBS dreimal gewaschen, bevor sie mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche gelöst wurden. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß übertragen und 5 min bei 500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat in 1 ml IP-Lysepuffer mit 0,01 % Protease/Phosphatase-Inhibitor resuspendiert und 10 min unter regelmäßigem Mischen auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß mit geringer Proteinbindung (*LoBind Tube*) überführt und 5 min zentrifugiert (16000 rcf, 4 °C). Der erhaltene Überstand wurde in ein neues *LoBind Tube* überführt. Parallel wurde eine *Zeba Spin*-Säule zur Entsalzung des Lysats mit Kinase-Puffer äquilibriert, indem die Säule 2 min zentrifugiert wurde, bevor 3 ml Kinasepuffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, bevor das Lysat auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert wurde (1000 rcf, 2 min). Das Lysat wurde mit 0,01 % Protease/Phosphatase-Inhibitor versetzt und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode (Kapitel 5.3.1) bestimmt. Das Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.1.7.2 Herstellung von Gesamtproteinlysaten für den *Cellular Thermal Shift Assay* (CETSA)

Bei einer Konfluenz der kultivierten Zellen von 90 % wurde das Medium entfernt und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA bei 37 °C und 5 % CO₂ abgelöst und in Medium aufgenommen. Die Suspension wurde für 4 min zentrifugiert (1250 rcf, 4 °C). Das Präzipitat wurde in 50 ml PBS aufgenommen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abermals wurde das Präzipitat in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert und wieder zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 1,5 ml eiskaltem PBS resuspendiert und die Suspension in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einem Heizschüttler bei 23 °C aufgetaut und erneut mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Dieser Zyklus wurde viermal wiederholt und das Lysat für 20 min (100000 rcf, 4 °C) zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt und das Lysat bei -80 °C gelagert.

5.1.8 Zellbasierter Assay zum Nachweis von phänotypischen Veränderungen und mitotischem Arrest

Zur Analyse phänotypischer Veränderungen und Zellarretierung in der Mitose wurden 3000 Zellen pro Loch in eine 96-Lochplatte ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium mit den Testsubstanzen in einer Konzentration von 30 µM ersetzt. Die Zellen wurden für 24 h mit den Substanzen behandelt und durch eine immunzytochemische Färbung mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Kapitel 5.1.6 und Kapitel 5.4). Phänotypische Veränderungen wurden anhand der immunzytochemischen Färbung von Tubulin (FITC-anti- α -Tubulin) und Aktin (TRITC-Phalloidin) visualisiert, der Nachweis von mitotischen Zellen erfolgte mittels Färbung von phosphoryliertem Histon H3 (phospho-Histon H3).

5.1.9 Zellbasiertes Screening zur Identifizierung neuromodulatorischer Substanzen

Der Ablauf des Testsystems zur Untersuchung potenziell neuromodulatorischer Moleküle auf das Neuritenwachstum wurde auf Basis eines publizierten Protokolls etabliert:^[126] Hierzu wurden 8000 SH-SY5Y-Zellen pro Loch in eine schwarze 96-Lochplatte mit transparentem Boden ausgesät. Die Platte wurde für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor das Medium entfernt und durch *Complete DMEM/F12* mit 1 µM all-trans-Retinsäure (ATRA) zur

Induzierung der Differenzierung ersetzt wurde. Für das Screening von Testsubstanzen wurde das Medium nach 72-stündiger Differenzierung verworfen und 10 μM der zu untersuchenden Substanzen in 100 μl *Complete DMEM/F12* appliziert. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen und durch frisches *Complete DMEM/F12* mit den entsprechenden Substanzen ersetzt und für weitere 48 h inkubiert, so dass sich eine Gesamtinkubationszeit von 96 h ergab. Die Analyse der Proben erfolgte mit immunzytochemischer Färbung und Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 5.1.6 und Kapitel 5.4). Dazu wurde die DNA mit DAPI und die Neuriten mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper gefärbt. Die Erhebung der fluoreszenzmikroskopischen Bilddaten und die halbautomatische Quantifizierung sind in Kapitel 5.4 beschrieben.

5.1.10 Zellbasiertes Testsystem zur Identifizierung neuroprotektiver Substanzen

Das Testsystem zur Identifizierung der neuroprotektiven Eigenschaften von Testsubstanzen wurde von B.Sc. Johanna Ebbeskotte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit etabliert und zur Analyse von Testsubstanzen angewandt.^[129] Hierzu wurden 20000 undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen pro Loch in eine schwarze 96-Lochplatte mit transparentem Boden ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Testsubstanzen wurden für 24 h in einer Konzentration von 10 μM hinzugegeben, bevor die Zellen mit PBS gewaschen und für 3,5 h mit 50 mM L-Glutaminsäure behandelt wurden.

Als Kontrollsubstanzen dienten die neuroprotektiven Naturstoffe Pregnenolon und Progesteron.^[130] Als Vehikelkontrolle wurde DMSO eingesetzt, welches als Referenzwert zur Normierung der Daten diente und als Wert 1 definiert wurde, da diese Kontrolle die neuronale Schädigung durch L-Glutaminsäure ohne Applikation potentiell protektiver Verbindungen darstellt. Zur Visualisierung gesunder SH-SY5Y-Zellen wurde DMSO ohne nachfolgende Behandlung mit L-Glutaminsäure appliziert.

Zur Färbung der DNA bzw. Visualisierung der Zellviabilität wurden die Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 und 25 $\mu\text{g/ml}$ Calcein-AM für 30 min behandelt. Nach Entfernung der Färbelösung durch mehrfaches Waschen mit PBS wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Die Erhebung der fluoreszenzmikroskopischen Bilddaten und die halbautomatische Quantifizierung sind in Kapitel 5.4 beschrieben.

Die Signifikanz der normierten Daten wurde durch einen Einstichproben-t-Test ermittelt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung von MAP4K4

Klonierung, Expression und Aufreinigung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kinase Kinase 4 (MAP4K4) wurde von M.Sc. Stefan Kleine im Rahmen seiner Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Daniel Rauh (Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund) durchgeführt.^[131] Hierzu wurde ein Expressionsvektor von der Firma Genent AG (Regensburg, heute zu Thermo Scientific gehörig) hergestellt: Dazu wurde das pLEX3-Plasmid verwendet. Das Plasmid enthielt das entsprechende DNA-Fragment der Aminosäuren 1 - 325 der Isoform 1 von MAP4K4, welches mit einem His₆-Tag versehen war.

Die Expression erfolgte in immortalisierten Sf9-Insektenzellen. Da sich diese Zellen mit Baculoviren infizieren lassen, wurde dieses System genutzt, um die Plasmid-DNA in die Zellen einzubringen. Unter Verwendung des Bacmid-DNA-Vektors und des Transfektionsreagenzes Gene Juice wurde die Plasmid-DNA transfiziert. Nach einer 6-tägigen Inkubationszeit wurde die erste Virengeneration entnommen, mit der die 2. Generation induziert und für vier Tage kultiviert wurde. Nach Induzierung der 3. Generation nach derselben Methode wurde diese zum Start der Proteinexpression in einer neuen Sf9-Kultur genutzt. Die Expressionskultur wurde für 72 h bei 27 °C inkubiert und anschließend geerntet.

Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (500 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 1 mM DTT, 5 % Glycerin, pH 8,0) resuspendiert und mechanisch lysiert, bevor enthaltenes Protein mittels einer Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätsaufreinigung unter Verwendung einer Ni-NTA Superflow-Säule (Qiagen, Hilden) gereinigt wurde. Hier schloss sich eine Abspaltung des His₆-Tags durch 1 U/μl Thrombin an. Über Anionenaustauscherchromatographie wurden die Proteine in Fraktionen aufgetrennt eluiert. MAP4K4-enhaltende Fraktionen wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.2.2 Kristallisation von MAP4K4

Für die Analyse des Bindungsmechanismus von MILI A-inspirierten Pyridonverbindungen an MAP4K4 wurde das gereinigte Protein mit der Testsubstanz **PS201S** co-kristallisiert. Die Kristallisationsexperimente wurden von M.Sc. Stefan Kleine^[131] mit 0,1 M MES-Lösung (pH 6,4 – 6,6) und 9 - 35 % PEG 8000 durchgeführt. Das Verhältnis zwischen Protein und niedermolekularem Liganden betrug 5:1. Die Kristallisation wurde nach der Hanging-Drop-

Methode durchgeführt und gefischte Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kristalle wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie auf Streuung getestet und entsprechende Kristalle am Paul Scherrer-Institut (Villingen, Schweiz) vermessen und prozessiert.

5.2.3 Klonierung, Expression und Reinigung der HSET-Motordomäne

Für die Expression und Aufreinigung der Motordomäne des Kinesins HSET wurde das Plasmid pGEX-F/A-HSET Δ 228 verwendet, das von Prof. Dr. Thomas Mayer (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt wurde. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte wurden von der Dortmund Protein Facility (DPF) durchgeführt. Das HSET Δ 228-Fragment wurde unter Verwendung der entsprechenden Primer in ein pOPIN-cHis-Vektorplasmid kloniert. Zur Expression der HSET-Motordomäne wurde die Sequenz- und Ligations-unabhängige Klonierung (engl. *sequence- and ligation-independent cloning*, SLIC) angewandt.^[132] Hierzu wurde das pOPIN-HSET Δ 228-His-Plasmid in chemisch kompetente BL21 (DE3) *Escherichia coli* (*E.coli*)-Zellen eingebracht und die Bakterien über Nacht in Autoinduzierungsmedium (TB-Medium mit 0,01 % Laktose und 2 mM MgSO₄) kultiviert. Die Zellen wurden um Faktor 100 verdünnt und für 4 h bei 37 °C und weitere 20 h bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurde mit einem Lysepuffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM TCEP und 0,5 mM AEBSF, 40 U/ml DNase) mit einem Zelldisruptor lysiert. Nach Zentrifugation bei 75600 rcf (10 °C, 30 min) wurde der Überstand mittels einer Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätsaufreinigung (HiTrap FF crude-Säule, GE Healthcare, Solingen) gereinigt. Das Protein wurde in 50 mM HEPES pH 8,0, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol und 1 mM TCEP eluiert und erhaltenes Protein in einem zweiten Schritt mittels Gelfiltration weiter gereinigt. Hierbei kam eine HiLoad 26/60 Superdex 75-Säule (GE Healthcare, Solingen) zum Einsatz. Das Protein wurde in 40 mM HEPES pH 7,4, 5 % Glycerin, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP eluiert und bei -80 °C gelagert.

5.2.4 Klonierung, Expression und Reinigung der Eg5-Motordomäne

Für die Expression und Aufreinigung wurde das Plasmid EG5_pQE80 mit einer Ampicillin-Resistenz verwendet, welches die DNA-Sequenz für die Motordomäne von Eg5 enthält. Das Plasmid wurde von Prof. Dr. Thomas Mayer (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt und in chemisch kompetente BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen transformiert. Die Bakterien wurden in Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 37 °C angezogen und die Plasmid-DNA mit einem QIAfilter Midi-Kit (QIAGEN, Hilden) isoliert und gereinigt. Die DNA-Konzentration wurde

spektrophotometrisch bestimmt und die Plasmid-DNA für die Sequenzierung zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifizierung vorbereitet. Dazu wurde ein BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) verwendet. 0,3 µg Plasmid-DNA wurden in einer PCR unter Verwendung von 1 µM der entsprechenden Primer-Oligonukleotide und der BigDye® Terminator v3.1-Reaktionslösung amplifiziert. Die vervielfältigten DNA-Fragmente wurden durch Gelfiltrationschromatographie mit einem NucleoSEQ®-Kit (Macherey-Nagel, Düren) von den weiteren PCR-Zusätzen gereinigt. Die Plasmidreinigung und Vorbereitung zur DNA-Sequenzierung wurde von M.Sc. Mylene Hübecker im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.^[133] Die Sequenzierung der Fragmente erfolgte unter Anwendung der fluoreszenzbasierten Sanger-Methode in der zentralen Biotechnologie-Einrichtung des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie.

Der offene Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF) der Eg5-Motordomäne wurde von der Dortmund Protein Facility (DPF) unter Verwendung von BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen exprimiert und gereinigt. Die Transformation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines Hitzeschocks, bevor eine Autoinduzierung in das T5-Promotor/Lac-Operator-Transkriptions-Translationssystem vorgenommen wurde. Hierzu wurden die Zellen in Glukose- und Laktose-enthaltendem Medium kultiviert und die Proteinexpression durch den Abbau von Glukose induziert. Die Zellen wurden lysiert und das Protein mit Hilfe einer Ni-NTA-Affinitätsaufreinigung und Gelfiltration gereinigt. Das erhaltene Protein wurde ankonzentriert und in 25 mM HEPES pH 7,2, 50 mM NaCl, 1 mM TCEP und 5 % Glycerin bei -80 °C gelagert.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Konzentrationen von Zelllysaten wurde die Methode nach Bradford eingesetzt.^[134] Hierbei wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 eingesetzt, der mit Arginin und weiteren basischen und neutralen Aminosäuren der Proteine interagiert, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs zu 595 nm verschiebt.^[135]

Vor der Konzentrationsmessung wurde zunächst eine Eichgerade mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt. Anschließend wurden 5 µl Proteinlösung mit 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz für 5 Minuten inkubiert. Die Absorption wurde photometrisch bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichgeraden berechnet.

5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von Proteinen eines Zelllysates nach ihrer Größe. Die Trennung erfolgte unter denaturierten Bedingungen, wozu diskontinuierliche Gele mit einem 10-prozentigen Trenngel und einem 5-prozentigen Sammelgel in der folgenden Zusammensetzung verwendet wurden.

| | <u>10 % Trenngel/ml</u> | <u>5 % Sammelgel/ml</u> |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| H ₂ O | 2,0 | 1,7 |
| 30 % Acrylamid | 1,65 | 0,415 |
| 1,5 M Tris (pH 8,8) | 1,25 | -/- |
| 1 M Tris (pH 6,8) | -/- | 0,315 |
| 10 % SDS | 0,05 | 0,025 |
| 10 % APS | 0,05 | 0,025 |
| TEMED | 0,002 | 0,0025 |

Die zu analysierenden Proben wurden zunächst mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht, bevor das Maximalvolumen aufgetragen wurde. Als Kontrolle wurden 5 µl des Proteinstandards verwendet. SDS-Laufpuffer diente als Kathoden- und Anodenpuffer. Die Trennung der Proteine wurde zunächst bei einer Spannung von 80 V gestartet, bevor nach 15 min die Spannung auf 120 V erhöht wurde. Der Lauf wurde gestoppt, nachdem die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

5.3.3 Immunoblot

5.3.3.1 Proteintransfer (Western Blotting)

Mit Hilfe eines Immunoblots wurden elektrophoretisch getrennte Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen, um das gewünschte Protein mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Das Gel wurde nach Abschluss der Elektrophorese 10 min in Transferpuffer inkubiert. Die Membran wurde zunächst für 30 s in Methanol aktiviert und ebenfalls 10 min in Transferpuffer inkubiert. Der Proteintransfer erfolgte nach dem *Semidry*-Verfahren. Hierzu wurde die Membran auf zwei Lagen Whatman-Papier platziert und das Gel auf die Membran aufgelegt. Anschließend wurden erneut zwei Lagen Whatman-Papier aufgelegt und zur Entfernung von Luftblasen zusammengedrückt und glatt gestrichen. Das Blotting erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 24 V für 80 min. Der

Proteintransfer wurde anschließend durch Zugabe einer Ponceau S-Lösung zur Membran überprüft. Die Färbelösung wurde nach kurzer Zeit mit Wasser abgewaschen und die Membran bei erfolgreichem Transfer in ein 50 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Anschließend wurden unspezifische Bindestellen der Membran für 1 h unter Schütteln blockiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBS-T wurde der entsprechende Primärantikörper in Blocklösung auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C geschüttelt.

5.3.3.2 Nachweis immobilisierter Proteine

Für den Nachweis von immobilisierten Proteinen auf PVDF-Membranen wurden HRP-gekoppelte Nachweisantikörper oder Infrarot-Farbstoffe verwendet. HRP-gekoppelte Antikörper wurden für die Detektion von ATP-bindenden Proteinen verwendet, die durch Desthiobiotin-ATP angereichert wurden (Kapitel 5.6.1). Antikörper, die an Infrarot-Farbstoffe gekoppelt waren, wurden zur Quantifizierung von Proteinbanden auf PVDF-Membranen eingesetzt. Dies erfolgte zur Auswertung von CETSA-Experimenten (Kapitel 5.6.2). Die Proteinbanden wurden in beiden Fällen mit einem *Odyssey® FC Imaging System* und der Bildbearbeitungssoftware *ImageStudio* visualisiert.

5.3.3.2.1 Nachweis immobilisierter Proteine durch HRP-gekoppelte Antikörper

Zur Verwendung von HRP-gekoppelten Antikörpern wurde die Membran nach Inkubation mit dem Primärantikörper zunächst mit TBS-T gewaschen und der Antikörper in Blocklösung appliziert. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit dem Nachweisantikörper behandelt, bevor erneut mit TBS-T gewaschen wurde. Die Entwicklung des Signals erfolgte mit dem *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Kit*. Hierzu wurden die Lösungen im Verhältnis 1:1 auf die Membran gegeben und kurz einwirken lassen. Die Entwicklungslösung wurde entfernt und die Membran visualisiert. Die Belichtungszeit betrug 30 s. War nur eine schwache Bandenintensität nachweisbar, wurde die Blotmembran erneut mit TBS-T gewaschen und mit dem *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Kit* mit dem identischen Protokoll nochmals entwickelt.

5.3.3.2 Nachweis immobilisierter Proteine durch Infrarot-Farbstoffe

Für den Nachweis von immobilisierten Proteinen durch Infrarot-Farbstoffe wurde die Membran nach Entfernen des Primärantikörpers mit TBS gewaschen und der Nachweisantikörper in *Odyssey Blocking Buffer* zugegeben. Die Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln lichtgeschützt inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschriff mit TBS, bevor die Membran umgehend gescannt wurde. Die Belichtungszeit betrug 30 s. Für die Quantifizierung der Bandenintensität wurde die Intensität der zu analysierenden Banden durch die ImageStudio-Software ermittelt. Die Ergebnisse wurden auf die Bandenintensität der Probe mit der niedrigsten verwendeten Temperatur normiert (definiert als 100).

5.3.4 Untersuchung der Beeinflussung von Testsubstanzen auf die Polymerisation von Tubulin

Zur Überprüfung einer möglichen Beeinflussung der Polymerisation von Tubulin durch antimittotische Testsubstanzen wurde ein Testsystem mit gereinigtem Tubulin aus Schweinehirn angewandt. Lyophilisiertes Schweinetubulin wurde hierzu in Tubulin-Puffer zu einer Endkonzentration von 100 μM resuspendiert. Die Versuchsansätze setzten sich dabei wie folgt zusammen:

| | |
|------------------|-------------------|
| 0,8 M | Natriumglutamat |
| 0,88 mM | MgCl ₂ |
| 10 μM | Tubulin |
| | Testsubstanz/DMSO |
| 0,5 mM | GTP |

Die Ansätze wurden nach Zugabe der Testsubstanzen für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie in eine 96-Lochplatte überführt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nun wurde GTP zum Starten der Polymerisationsreaktion hinzugegeben und die photometrische Messung umgehend gestartet. Die Absorption wurde bei 340 nm in Abständen von 30 s in einem Zeitraum von 60 Minuten gemessen. Die Messkurven wurden auf den Nullwert der entsprechenden Kurve (Absorption zum Zeitpunkt der ersten Messung) normiert.

5.3.5 Tryptischer Verdau von Proteinen und Aufreinigung über *Stage Tips*

Die Spaltung von Proteinen in Peptidfragmente durch die Protease Trypsin und die nachfolgende Aufreinigung wurden von Beate Schölermann durchgeführt. Trypsin lag in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in 10 mM HCl vor und wurde mit 100 mM Tris pH 8,5 und 1 mM CaCl₂ zur Herstellung einer geeigneten Stammlösung weiter verdünnt. Gereinigte Proteine wurden mit 1,5 µg Trypsin versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur verdaut.

Für hochauflösende Messungen der Bindung von Testsubstanzen an die HSET-Motordomäne wurden die durch tryptischen Verdau erzeugten Peptidfragmente mit Hilfe sogenannter *Stage Tips* weiter aufgereinigt und ankonzentriert.^[136] Hierzu wurden *Solid Phase Extraction* (SPE)-Disks verwendet, die doppelagig in eine Petrischale übertragen wurden. Mit Hilfe einer Kanüle wurde eine runde Minidisk ausgestochen und in eine Pipettenspitze transferiert. Die Disk wurde mit 100 µl Methanol aktiviert, 1 min inkubiert und bis zur vollständigen Trocknung bei 600 rcf zentrifugiert. Es erfolgte ein zweifacher Äquilibrierungsschritt mit jeweils 100 µl Puffer A (0,1 % Ameisensäure in H₂O), nachdem jeweils mit 2500 rcf zentrifugiert wurde, bis die Minidisk getrocknet war. Die Peptidprobe wurde aufgetragen und bei 600 rcf bis zur Trocknung zentrifugiert. Es schloss sich ein Waschschrift mit 100 µl Puffer A an, bei dem die Zentrifugation analog erfolgte. Die gereinigten und ankonzentrierten Peptide wurden mit 2 x 60 µl Puffer B (80 % Acetonitril, 20 % H₂O, 0,1 % Ameisensäure) eluiert, 1 min inkubiert und bis zur Trocknung der Disk bei 2500 rcf zentrifugiert. Das Eluat wurde mit einer Vakuumzentrifuge bei 30 °C für 4 h getrocknet und mittels nano-HPLC/MS/MS (Kapitel 5.7.3) von Dr. Petra Janning und Dipl.-Ing. Andreas Brockmeyer vermessen.

5.4 Fluoreszenzmikroskopie in Mikrotiterplatten

Die Aufnahme der mikroskopischen Bilddaten erfolgte mit einem automatischen Mikroskopie-System, bestehend aus dem Axiovert M 200-Mikroskop und einer CoolSnap ES Kamera und bezogen von der Visitron System GmbH, Puchheim. Durch dieses System konnten fluoreszenzgefärbte Proben in verschiedenen Wellenlängen automatisch visualisiert werden. Die automatische Bildaufnahme erfolgte an neun vordefinierten Punkten in jedem Loch. Die optische und quantitative Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Software MetaMorph® (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). Die verwendeten Filter basieren auf den Fluorophoren DAPI (Exzitations-/Emissionswellenlänge 358 nm/463 nm) und Texas Red (596 nm/613 nm) sowie dem grünfluoreszierenden Protein Azami-Green (Azami, 492 nm/505 nm). Die verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Einstellungen für fluoreszenzmikroskopische Experimente in der Software MetaMorph® (Menü „Screen Acquisition“)

Die Einstellungen wurden für alle durchgeführten Experimente verwendet.

| | |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Magnification | 20 x |
| Camera Binning | 2 |
| Gain | Gain 1 (1 x) |
| Multiple Sites per Well | ✓ |
| Multiple Wavelengths | ✓ |
| Show Images During Acquisition | ✓ |
| | |
| Dim [NxN] | 3 |
| Total Sites | 9 |
| Spacing Between Images | 0 |
| Auto Focus Each Side | None |
| | |
| Number of Waves | 3 |
| Exposure | DAPI (700 ms) |
| | Azami (800 ms) |
| | Texas Red (700 ms) |
| Target intensity | DAPI (2000) |
| | Azami (2000) |
| | Texas Red (2000) |
| | |
| Auto Focus Acquisition | Same Settings as Wavelength |

Die verwendeten Einstellungen für die automatische Fokussierung sind in Abbildung 5.1 dargestellt.

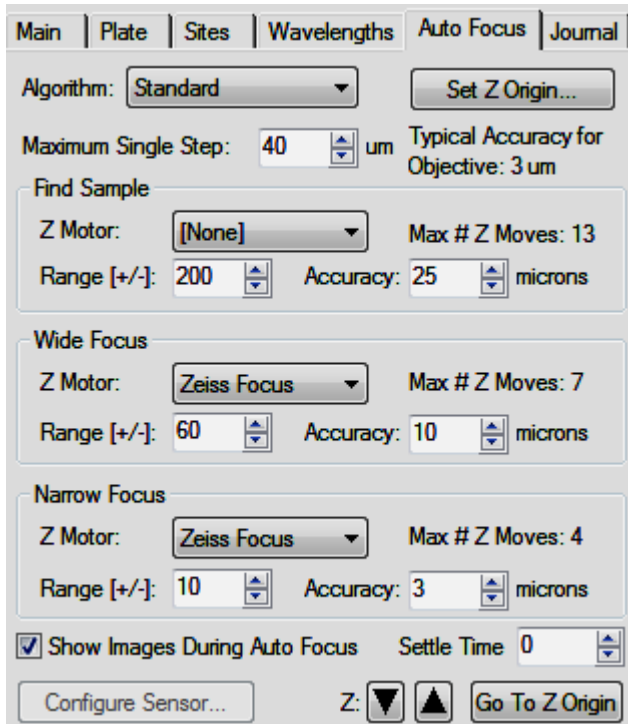


Abbildung 5.1: Einstellungen zur Autofokussierung im Untermenü „Auto Focus“ (MetaMorph®-Menü „Screen Acquisition“)

Die Einstellungen wurden für alle durchgeführten Experimente verwendet.

Zur Analyse des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen wurde nach automatischer Bildaufnahme die Länge der durch die Software detektierten Neuriten quantifiziert. Hierbei wurde das MetaMorph®-Analyseprogramm „Neurite Outgrowth“ verwendet. Zunächst war eine Anpassung der Einstellungen notwendig, die eine verlässliche Detektion der Neuriten gewährleistete. Die Einstellungen beinhalteten Grenzwerte bezüglich der Größe und Fluoreszenzintensität des Zellkerns und der Neuriten. Im Speziellen wurden maximale und minimale Durchmesser des Zellkerns und Neuriten ebenso wie die minimale Intensität, mit der sich die Strukturen von der Hintergrundfärbung abhoben, angepasst (Tabelle 5.2). Die statistische Auswertung der quantifizierten Daten erfolgte mit einem Zweistichproben-t-Test.

Tabelle 5.2: Einstellungen des MetaMorph®-Analyseprogramms „Neurite Outgrowth“ zur Detektion immunzytochemisch gefärbter DNA und Neuriten

| | |
|---|---------------|
| <u>DNA (DAPI)</u> | |
| Approximate minimal width | 5 µm |
| Approximate maximal width | 30 µm |
| Intensity above local background | 30 graylevels |
| | |
| <u>Azami (α-Tubulin)</u> | |
| Maximum width | 8 µm |
| Intensity above local background | 30 graylevels |
| Minimum cell growth to log as significant | 30 µm |

Zur Quantifizierung von mitotischen Zellen wurde das Analyseprogramm „Cell Cycle“ verwendet und die mitotischen Zellen über die Fluoreszenzintensität im Kanal Texas Red detektiert. Hierzu wurden die Größe des Zellkerns und die Fluoreszenzintensität der Zellkern- und phospho-Histon H3-Färbung entsprechend angepasst. Die Einstellungen des Analyseprogramms sind in Tabelle 5.3 aufgeführt.

Tabelle 5.3: Einstellungen des MetaMorph®-Analyseprogramms „Cell Cycle“ zur Detektion von immunzytochemisch gefärbtem phospho-Histon H3

| | |
|---|----------------|
| <u>DNA (DAPI)</u> | |
| Approximate minimal width | 5 µm |
| Approximate maximal width | 60 µm |
| Intensity above local background | 50 graylevels |
| | |
| <u>Texas Red (phospho-Histon H3-Alexa 594)</u> | |
| Intensity above local background | 150 graylevels |

Die Quantifizierung der Viabilität zur Identifizierung von neuroprotektiven Substanzen erfolgte mit dem Analyseprogramm „Multi Wavelength Cell Scoring“. Das Analyseprogramm ermöglicht die Detektion der Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle, so dass die Intensität als Maß für die Viabilität einer Zelle herangezogen werden kann. Die Analyse der Bilddaten erfolgte über die Fluoreszenzkanäle DAPI und Azami (Tabelle 5.4). Die statistische Auswertung der quantifizierten Daten erfolgte mit einem Einstichproben-t-Test.

Tabelle 5.4: Einstellungen des MetaMorph®-Analyseprogramms „Multi Wavelength Cell Scoring“ zur Detektion von immunzytochemisch gefärbter DNA und zur Erhebung der Zellviabilität durch Calcein-AM

| | |
|---|--------------------|
| <u>DNA (Hoechst 33342 - Kanal: DAPI)</u> | |
| Approximate minimal width | 5 µm |
| Approximate maximal width | 40 µm |
| Intensity above local background | 60 graylevels |
| | |
| <u>Azami (Calcein-AM)</u> | |
| Approximate minimal width | 5 µm |
| Approximate maximal width | 100 µm |
| Intensity above local background | 300 graylevels |
| Minimum stained area | 20 µm ² |

5.5 Testsysteme zur Aktivitätsmessung von Enzymen

5.5.1 Bestimmung der Kinaseaktivität

Kinaseprofilierungsexperimente wurden durch die *SelectScreen® Kinase Profiling Services* von der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Die Analyse der Kinaseinhibition erfolgte durch die Testsysteme *Z'-LYTE™ Kinase Assay*, *Adapta™ Universal Kinase Assay* und *LanthaScreen™ Eu Binding Assay*. Für Kinasen, die bei Thermo Fisher Scientific auf Inhibition durch synthetisierte Verbindungen überprüft werden können, ist jeweils eines der Testsysteme etabliert, so dass alle drei Plattformen zum Einsatz kamen. Bei dem *LanthaScreen™ Eu Binding Assay* wird die Verdrängung des Alexa Fluor®-Konjugats von der ATP-Bindestelle der Kinase durch die Testsubstanz analysiert, so dass in diesem Fall

eine Inhibition nicht zweifelsfrei bestätigt oder ausgeschlossen werden kann. Das *Z'-LYTE™*-Testsystem wurde zur Validierung der von Thermo Fisher Scientific erlangten Ergebnisse zusätzlich auch am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie durchgeführt. Die experimentellen Bedingungen wurden durch die Firma empirisch determiniert und sind daher für jede Kinase entsprechend festgelegt. Für die am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie durchgeführten Experimente wurden leicht abgewandelte Bedingungen verwendet, die im folgenden Kapitel genannt werden.

5.5.1.1 Bestimmung der Kinaseaktivität mit dem *Z'-LYTE™* Kinase Assay

Der *Z'-LYTE™* Kinase Assay stellt ein radiometrisches Testsystem zur Analyse der Aktivität verschiedener Kinasen in An- oder Abwesenheit von Testsubstanzen dar. Das Prinzip des Testsystems basiert auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Ein Donor (Coumarin) und ein Akzeptor (Fluoreszein) sind an die Enden eines Substrats gekoppelt. In der Kinase-Reaktion überträgt die Kinase das γ -Phosphat von ATP auf einen Serin- oder Threonin-Rest des Substrats. Als Positivkontrolle dient hierbei ein phosphoryliertes Substrat, als Negativkontrolle eine Probe ohne ATP. In einer Sekundärreaktion spaltet eine spezifische Protease nicht phosphorylierte Peptide, wodurch der Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor nicht mehr möglich ist. Phosphorylierte Peptide werden durch die Protease nicht gespalten. So entsteht eine unterschiedliche Sensitivität für phosphorylierte und nicht phosphorylierte Substratmoleküle, was in einer unterschiedlichen Fluoreszenzemission bei den entsprechenden Wellenlängen für die beiden FRET-Partner Coumarin und Fluoreszein resultiert.

Die Bestimmung der Kinaseaktivität mit Hilfe des *Z'-LYTE™* Kinase Assay wurde mit einer zuvor ermittelten Kinasekonzentration durchgeführt, die zu einer Phosphorylierung von 20 – 40 % des verwendeten Peptidsubstrates führte. Diese Konzentration betrug für die am Max-Planck-Institut durchgeführten Experimente 1 ng/ μ l.

MAP4K4, 2 μ M Substrat, 12,5 μ M ATP (soweit nicht anders angegeben) und die Testsubstanz wurden gemischt und 10 μ l der Probe in eine schwarze 384-Lochplatte überführt. Die Proben wurden für 30 s auf einem Horizontalschüttler gemischt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 5 μ l des Entwicklungsreagenz hinzugegeben, erneut für 30 s gemischt und für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 5 μ l Stopplösung wurde die Platte wiederum für 30 s geschüttelt und die Fluoreszenzemissionen von Coumarin (445 nm) und Fluoreszein (520 nm) umgehend an einem geeigneten Plattenleser detektiert.

5.5.1.2 Bestimmung der Kinaseaktivität mit dem Adapta™ Universal Kinase Assay

Der *Adapta™ Universal Kinase Assay* ist ein fluoreszentes Testsystem zur Bestimmung der Kinaseaktivität über die Bildung von ADP im Zuge der Phosphorylierung der Kinase. Das Format eignet sich aufgrund seiner starken Sensitivität für die Analyse von Kinasen mit schwacher Aktivität. In der Kinasereaktion werden Kinase, ATP, Substrat und Testsubstanz gemischt, bevor im folgenden Entwicklungsschritt ein Europium-markierter anti-ADP-Antikörper, ein Alexa Fluor® 647-markierter ADP-Indikator (engl. *tracer*) und EDTA hinzugegeben werden. Während EDTA die Kinasereaktion beendet, bindet der ADP-Indikator den ADP-Antikörper, was zu einem hohen Tracer-FRET-Signal führt. Das im Zuge der Kinasereaktion entstehende ADP verdrängt den Indikator vom Antikörper und sorgt für eine Abnahme des TR-FRET-Signals. Die Zugabe eines Inhibitors erhöht aufgrund der reduzierten ADP-Freisetzung das FRET-Signal, so dass die Signalintensität als Maß für die Kinaseaktivität herangezogen werden kann.

Zur Bestimmung der Kinaseinhibition wurde die Testsubstanz mit Kinase, Substrat und ATP in einem HEPES-Puffer verdünnt und 30 s auf einem Horizontalschüttler gemischt und 1 min bei 1000 rcf zentrifugiert, bevor die Kinasereaktion für 1 h bei Raumtemperatur ablief. Schließlich wurden 5 µl der Entwicklungslösung zugegeben und erneut für 30 s geschüttelt und für 1 min zentrifugiert. Nach weiteren 60 min wurde die Fluoreszenzemission von Donor (Alexa Fluor® 647, 665 nm) und Akzeptor (Europium, 615 nm) an einem geeigneten Plattenleser gemessen und über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten das TR-FRET-Signal und die Restaktivität der Kinase berechnet.

Als Positivkontrolle diente eine Probe, die ADP statt ATP enthielt, während die Negativkontrolle die aktive Kinase enthielt. Diese Kontrolle wurde entsprechend angepasst, um eine ADP-Konversion von < 40 % zu erhalten.

5.5.1.3 Bestimmung der Kinaseaktivität mit dem LanthaScreen™ Eu Kinase Binding Assay

Der *LanthaScreen™ Eu Kinase Binding Assay* basiert wie die vorangegangenen Testsysteme zur Bestimmung der Kinaseaktivität auf dem FRET-Prinzip. In diesem Fall werden ein Alexa Fluor®-Konjugat sowie ein Europium-markierter anti-Tag-Antikörper verwendet. Das Konjugat bindet an die ATP-Bindestelle der Kinase und wird von dem Antikörper gebunden, was in einem starken FRET-Signal resultiert. In Anwesenheit eines Inhibitors wird das Alexa Fluor®-Konjugat von der ATP-Bindestelle der Kinase verdrängt, was zu einer Abschwächung

des Signals führt. Analog zum *Adapta™ Universal Kinase Assay* kann anschließend das FRET-Signal und die daraus resultierende Kinaseaktivität anhand der Fluoreszenzintensitäten von Konjugat (665 nm) und Antikörper (615 nm) errechnet werden.

Testsubstanz, Kinase, Antikörper und Konjugat wurden gemischt und in eine weiße 384-Lochplatte überführt, die 30 s auf einem Horizontalschüttler gemischt wurde, bevor die Proben für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Emissionen bei 615 und 665 nm wurden umgehend mittels eines entsprechenden Plattenlesers detektiert. Als Positivkontrolle wurde eine hohe Konzentration eines bekannten Inhibitors der entsprechenden Kinase verwendet, die in einer geringen Emissionsrate resultiert. Die maximale Emissionsrate wurde aus einer Probe ohne Inhibitor bestimmt und fungierte als Negativkontrolle, da in diesem Fall keine Verdrängung des Konjugats vorlag.

5.5.2 Bestimmung der Kinesinaktivität mit dem ADP-Glo™ Kinase Assay

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von HSET unter dem Einfluss von Testsubstanzen wurde der ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega) verwendet. Das Testsystem basiert auf der Rückbildung von ADP, welches durch die ATPase-Aktivität des Proteins freigesetzt worden ist, zu ATP. ATP kann nach Zugabe von Luciferase und Luciferin durch die Lumineszenzintensität der Probe nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die DMSO anstelle einer Testsubstanz enthielt. 50 µM Aurintricarboxylsäure (ATA), das die Interaktion von Proteinen mit Nukleinsäuren inhibiert,^[137] wurden als Positivkontrolle verwendet.

0,9 µM HSET und 2 µM vorpolymerisierte Mikrotubuli wurden in ADP-Glo-Puffer gemischt und mit der Testsubstanz versetzt. 3 µl des Ansatzes wurden in Quadruplikaten in eine weiße 384-Lochplatte überführt und drei der Proben mit 400 µM ATP versetzt, um die Reaktion zu starten. Die Platte wurde gemischt und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 5 µl Glo-Reagenz in jedes Loch gegeben wurden, um die Rückbildung von ATP zu ermöglichen. Nach weiteren 40 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 µl der Detektionslösung hinzugegeben und weitere 60 min inkubiert.

Die Lumineszenz wurde an einem geeigneten Plattenleser ausgelesen und die Kinaseaktivität in Anwesenheit der Testsubstanzen anhand der Lumineszenzintensität errechnet. Die Probe ohne ATP diente als jeweilige Hintergrundkontrolle und wurde von den entsprechenden Proben mit ATP subtrahiert. Die Intensitäten der substanzbehandelten Proben wurden auf die Vehikelkontrolle normiert.

5.5.3 Messung der Enzymaktivität mit einem Malachitgrün-Testsystem

Mit Hilfe eines Testsystems auf Basis des Farbstoffes Malachitgrün wurde ebenfalls die ATPase-Aktivität von HSET bestimmt. Malachitgrün komplexiert freies Phosphat aus der ATPase-Reaktion in Anwesenheit von Ammoniummolybdat, was in einer grüengefärbten Lösung resultiert. Der Komplex kann photometrisch bei 620 nm detektiert und anschließend quantifiziert werden.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse wurden mit dem *Malachite Green Phosphate Assay Kit* durchgeführt. Zur Vorbereitung der Substanztestungen wurden Reagenz A und Reagenz B, die Malachitgrün und Ammoniummolybdat enthielten, im Verhältnis 100:1 gemischt. Des Weiteren wurde eine Standardreihe mit Phosphatkonzentrationen von 0 – 40 μM aus einer Stammlösung erstellt, die als Referenz zur Berechnung von Phosphatkonzentrationen in den Proben diente.

30 nM HSET und 100 nM vorpolymerisierte Mikrotubuli wurden in Malachitgrün-Puffer gemischt und mit der zu testenden Substanz versetzt. 18,5 μl wurden in eine transparente 96-Lochplatte transferiert und mit 1,5 μl ATP in der gewünschten Konzentration versetzt. Die Testung erfolgte als Duplikat, wobei eine Probe nicht mit ATP versetzt wurde, um als Hintergrundkontrolle zu fungieren. Als Kontrollen dienten erneut eine Probe mit DMSO und 50 μM ATA. Die Platte wurde auf einem Horizontalschüttler gemischt und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die ATPase-Reaktion zu ermöglichen. Anschließend wurden 20 μl der Reagenz A:Reagenz B-Lösung zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Proben wurden für 30 min bei Raumtemperatur zur ausreichenden Farbentwicklung inkubiert. Die Absorptionmessung bei 620 nm erfolgte umgehend an einem geeigneten Plattenleser.

Die Absorptionswerte der Probe ohne ATP wurden von den entsprechenden ATP-enthaltenden Proben subtrahiert. Die Phosphatkonzentrationen wurden anhand der Absorption in Relation zu der Standardreihe bestimmt und infolgedessen die prozentuale Inhibition des Kinesins bezogen auf die DMSO-behandelte Probe berechnet.

5.5.4 Aktivitätsmessung von Enzymen mit einem enzymgekoppelten Testsystem

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurde des Weiteren ein enzymgekoppeltes Testsystem verwendet, das in der Abteilung Molekulare Genetik (Prof. Dr. Thomas Mayer, Universität Konstanz) angewandt wurde. Dieses Testsystem nutzt die enzymatischen Reaktionen der Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase. Während der ATPase-Reaktion freigesetztes Phosphat wird von der Pyruvatkinase zur Phosphorylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) verwendet, wodurch Pyruvat entsteht. Dieses wird in der zweiten Reaktion durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat umgewandelt, wobei Nikotinamid-Adenindinukleotid (NADH) zu NAD^+ reduziert wird. NADH kann photometrisch bei 340 nm detektiert werden, weshalb die Abnahme der NADH-Absorption als Maß für die relative Enzymaktivität der ATPase angenommen werden kann.^[138]

Für die Testung von niedermolekularen Substanzen wurde der ADP-Glo-Puffer mit folgenden Bestandteilen verwendet.

| | |
|--------------------|---------------------|
| 0,5 μM | HSET |
| 2 μM | Mikrotubuli |
| 5 mM | PEP |
| 200 μM | NADH |
| 13 μg | Pyruvatkinase |
| 22,3 μg | Laktatdehydrogenase |
| 0,1 mg/ml | BSA |

Die Ansätze wurden mit 50 μM der Testsubstanz versetzt und in eine schwarze 384-Lochplatte mit transparentem Boden überführt. 50 μM ATP wurden zum Start der ATPase-Reaktion hinzugefügt und die Absorption unmittelbar nach ATP-Zugabe über einen Zeitraum von 10 min in Intervallen von 30 s bei 340 nm gemessen. Über die erhaltene Geradengleichung wurde die Restaktivität der Kinase mittels der negativen Steigung und dem damit verbundenen NADH-Verbrauch bestimmt.

5.5.5 Polymerisation von Mikrotubuli zur Durchführung von ATPase-Testsystemen

Für die Bestimmung der Mikrotubuli-stimulierten ATPase-Aktivität von HSET wurden in dieser Arbeit vorpolymerisierte Mikrotubuli oder Tubulin aus Schweinehirn, welches zunächst polymerisiert werden musste, verwendet.

Vorpolymerisierte Mikrotubuli wurden in PM-Puffer zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Diese Mikrotubuli wurden für den *ADP-GloTM Kinase Assay* und das *Malachite Green Phosphate Assay Kit* verwendet.

Für das enzymgekoppelte ATPase-Testsystem wurde Tubulin aus Schweinehirn verwendet, das von Prof. Dr. Thomas Mayer (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt wurde. 500 μl Tubulin wurden mit 33 % (w/v) Glycerin und 1 mM MgCl_2 auf Eis gemischt. Die Zugabe von 1 mM GTP startete die Polymerisationsreaktion, die für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt wurde. Das polymerisierte Tubulin wurde mit 20 μM Taxol versetzt und für 15 min bei $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 100000 rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit Lagerungspuffer gewaschen und schließlich in 150 μl Lagerungspuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers in 6 M Guanidinhydrochlorid zur Denaturierung von Tubulin bestimmt. Die Mikrotubuli wurden bei Raumtemperatur gelagert.

5.6 Validierung von Zielproteinen von Testsubstanzen

5.6.1 Zielprotein-Validierung mit Desthiobiotin-ATP

Die Validierung des Zielproteins MAP4K4 wurde mittels einer Proteinanreicherung mit Hilfe von Desthiobiotin-ATP, welches an Agarose-Resin-gebundenem Streptavidin immobilisiert wurde, durchgeführt. Desthiobiotin-ATP stellt ein ATP-Derivat dar, das eine stabile, aber reversible Bindung an die ATP-Bindestelle eines Proteins ausbildet.^[139] Die Bindung kann unter physiologischen Bedingungen wieder gelöst werden, um das Protein zu eluieren, was bei Verwendung von Biotin nicht möglich wäre.^[140] Dadurch können ATP-bindende Proteine spezifisch aus einem Proteingemisch herausgefiltert werden. Zur Validierung von ATP-bindenden Proteinen als Zielprotein einer Testsubstanz werden Lysat und Testsubstanz inkubiert, bevor Desthiobiotin-ATP und Streptavidin zur Immobilisierung der ATP-bindenden Proteine hinzugegeben werden.

Die Zielprotein-Validierung mit Desthiobiotin-ATP wurde mit SH-SY5Y-Lysaten durchgeführt, die mit der beschriebenen Methode hergestellt wurden (Kapitel 5.1.7.1). 1 mg Lysat wurde mit 10 µl 1 M MgCl₂ versetzt und für 1 min inkubiert. Im Anschluss wurde 1 % des Lysatvolumens verworfen und das entsprechende Volumen Testsubstanz oder DMSO zugefügt. Hierbei wurden Endkonzentrationen von 100 µM Testsubstanz bzw. 1 % DMSO eingesetzt. Zur Markierung der nicht gebundenen Proteine wurde eine Desthiobiotin-ATP-Probe in 12,5 µl H₂O resuspendiert und jedes Lysat mit 5 µl versetzt, so dass eine Endkonzentration von 20 µM in jeder Probe enthalten war. Die Proben wurden für 10 min mit Desthiobiotin-ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Volumen von 8 M Harnstoff in IP-Lysepuffer versetzt und 45 µl Agarose-Resin-gebundenes Streptavidin hinzugefügt, bevor die Probe unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Das Pellet wurde in 4 M Urea in IP-Lysepuffer resuspendiert und auf eine Spinsäule gegeben und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und die Proteine schließlich mit SDS-Probenpuffer eluiert, indem die Spinsäule für 10 min bei 95 °C aufgeköcht und zentrifugiert wurde. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert oder unmittelbar auf eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen.

5.6.2 Zielprotein-Validierung mit dem *Cellular thermal shift assay* (CETSA)

Der *Cellular thermal shift assay* (CETSA) wurde im Jahre 2013 erstmals beschrieben^[141] und basiert auf der Destabilisierung nativer Proteine durch Temperatureinfluss, was durch Bindung eines Inhibitors beeinflusst werden kann. Durch Erhitzen identischer Proben auf verschiedene Temperaturen, können mögliche Unterschiede der Schmelzpunkttemperatur des Proteins zwischen DMSO- und substanzbehandelten Proben bestimmt werden und die Bindung eines Inhibitors aufzeigen.^[142]

540 µl des mit der Methode in Kapitel 5.1.7.2 hergestellten Komplettlysats von MDA-MB-231-Zellen wurden zu je 60 µl in Reaktionsgefäße überführt und in einen PCR-Mastercycler platziert. Die Proben wurden auf Temperaturen im Bereich von 40,0 – 54,5 °C erhitzt, was mit dem Mastercycler-Programm CTSA1/CTSA2 durchgeführt wurde. Dazu wurde in beiden Mastercyclern jeweils ein Temperaturgradient erstellt, so dass die einzelnen Reihen während des laufenden Programms auf unterschiedliche Temperaturen erhitzt wurden. Im Einzelnen bestand der Temperaturgradient aus folgenden Werten: 40,0 °C, 44,2 °C, 48,0 °C, 48,4 °C, 48,8 °C, 49,3 °C, 49,9 °C, 51,6 °C und 54,5 °C. Alle Proben wurden für 3 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, bevor das Gerät bis zur weiteren Verwendung der Ansätze auf 4 °C herunterkühlte.

Die Proben wurden im Anschluss in Polykarbonat-Reaktionsgefäße überführt, die zur Verwendung in Ultrazentrifugen geeignet sind. Es schloss sich ein Ultrazentrifugationsschritt von 20 min bei 4 °C und 100000 rcf an, wobei aufgrund der Probenanzahl zwei Durchläufe durchgeführt werden mussten. Jeweils 50 µl der Probenüberstände wurden in *LoBind Tubes* überführt und mit 12,5 µl 5 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C aufgeköcht und bei -20 °C gelagert oder unmittelbar auf eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen.

5.7 Massenspektrometrische Methoden

5.7.1 Nachweis der kovalenten Bindung von Testsubstanzen durch die *in vitro* Peptid-Fangmethode

Zur Analyse von kovalenten Bindungen ausgewählter Testsubstanzen mit dem Zielprotein wurde die *in vitro* Peptid-Fangmethode (engl. *in vitro peptide trapping*) verwendet. Die Methode dient dem Nachweis der Bindung von niedermolekularen Substanzen an Testpeptide, worüber ein möglicher Bindungsmechanismus dargestellt werden kann. Durch die Massenzunahme des Peptids nach Bindung der Testsubstanz kann eine kovalente Bindung des Moleküls nachgewiesen werden.^[143]

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden von Beate Schölermann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie durchgeführt und analysiert. Dazu wurde der ursprüngliche experimentelle Ansatz auf Proteinebene transferiert, indem gereinigtes HSET-Protein eingesetzt wurde.

Für Bindungsstudien der Testsubstanzen an HSET wurden 57 µg aufgereinigtes HSET mit 50 µM Testsubstanz oder 0,5 % DMSO als Vehikelkontrolle in 25 mM Tris pH 7,4 gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden unter Verwendung von Amicon® Ultra 0,5 ml Filtern ankonzentriert und mit Trypsin verdaut. Die trypsinierten Proben wurden mit Fließinjektions-Massenspektrometrie (Kapitel 5.7.2) vermessen. Die Bindungsanalysen an Eg5 erfolgten analog, hierbei lag das Protein jedoch in 50 mM MOPS pH 7,4 vor.

Die Bindungsstudien von Substanzen mit dem Testpeptid Ac-YACAKASAHA wurden mit einem alternativen Protokoll durchgeführt. Das Peptid wurde mit 25 mM Tris pH 7,4 auf eine Konzentration von 0,4 mM eingestellt. 75 µl des Peptids wurden mit 50 µM der jeweiligen Substanz gemischt und unter Stickstoffbegasung 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der

Ansatz wurde bei 5000 rcf (10 min, 4 °C) zentrifugiert und der erhaltene Überstand um Faktor 10 mit einem Gemisch aus 95 % H₂O und 5 % Acetonitril verdünnt. Die Messung erfolgte ebenfalls mittels Fließinjektions-Massenspektrometrie.

Zur Analyse der exakten Bindestelle der Testsubstanz an HSET wurden einige Proben in einer hochauflösenden Messung (Nano-HPLC/MS/MS) (Kapitel 5.7.3) vermessen. Dazu wurden die tryptisch verdauten Peptide mittels *Stage Tips* weiter aufgereinigt (Kapitel 5.3.5).

5.7.2 Bindungsstudien von Testsubstanzen an Peptide mit Fließinjektions-Massenspektrometrie

Die Analyse intakter Proteine und Testpeptide mit Fließinjektions-Massenspektrometrie erfolgte mit Hilfe einer Agilent 1100 HPLC-Pumpe (Agilent, Ratingen) und einem Autosampler, der mit einem LTQ-XL-Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisationsquelle (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war. Das Gerät wurde durch die Xcalibur-Software gesteuert. 1 µl Peptidlösung wurden in eine 1:1-Mischung an Wasser und Acetonitril (+ 0,1 % Ameisensäure) mit einer Flussrate von 300 µl/min injiziert. Das System war mit dem Ionenfallen-Massenspektrometer durch ein Metallnadel-System verbunden. Als Massenbereich wurden 150 – 2000 m/z für den Nachweis von Testpeptiden verwendet. Über kollisionsinduzierte Dissoziation mit 20 V wurden Salzaddukte zerstört.

Die aufgenommenen Spektren wurden mit der Xcalibur-Software analysiert.

5.7.3 Bindungsstudien von Testsubstanzen an tryptisch verdaute Peptide mittels nano-HPLC/MS/MS

Für die detaillierte Analyse der Bindung von Testsubstanzen an das Kinesin HSET wurde anhand von tryptisch verdauten Peptidfragmenten eine Analyse mittels nano-HPLC/MS/MS durchgeführt. Die Separation der Peptide erfolgte mit einem UltiMate™ 3000 RSLCnano-System (Dionex, Germering), während die MS- und MS/MS-Experimente an einem Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt wurden. Dieses war mit einer Nano-Spray-Quelle ausgestattet (Nanospray Flex Ion Source, Thermo Fisher Scientific). Lyophilisierte Peptide wurden in 20 µl 0,1 % TFA resuspendiert und 3 µl injiziert. 0,1 % TFA wurden als Eluent verwendet, die Flussrate betrug 30 µl/min. Die Proben wurden im Anschluss für 5 min mit den gleichen Einstellungen entsalzt, bevor die Probe von der Vorsäule (5 µm, 100 Å, 300 µm ID * 5 mm, Dionex,

Germering) auf die nano-HPLC-Säule (PepMap100 RSLC C18 nano-HPLC column: 2 µm, 100 Å, 75 µm ID × 50 cm, nanoViper, Dionex, Germering) übertragen wurde. Hierzu wurde ein linearer Gradient verwendet: Dieser begann mit 95 % H₂O (+ 0,1 % Ameisensäure)/5 % Acetonitril (+ 0,1 % Ameisensäure) und wurde nach 95 min auf mit 70 % H₂O (+ 0,1 % Ameisensäure)/30 % Acetonitril (+ 0,1 % Ameisensäure) erhöht. Die Flussrate betrug hierbei 300 nl/min. Die nano-HPLC war mit der Quadrupol-Orbitrap mit einem beschichteten SilicaTip (ID 20 µm, Tip-ID 10 µm, New Objective, Woburn, MA, USA) verbunden. Aufgenommen wurde ein Massenbereich von 300 – 1650 m/z mit einer Auflösung von 70000. Hier schlossen sich zehn High Energy Collision Dissociation (HCD)-MS/MS-Scans für die am intensivsten geladenen Ionen an.

Die Daten wurden mit Hilfe der MaxQuant-Software (v.1.4.1.2) analysiert,^[144] unter Zuhilfenahme des Andromeda-Algorithmus und dem Abgleich der Probe mit der Sequenz des rekombinanten Proteins aus der MaxQuant-Datenbank. Der Abgleich erfolgte für einen kompletten tryptischen Verdau mit maximal zwei Fehlern. Als variable Proteinmodifikationen wurde Carbamidomethylierung von Cysteinen, Methioninoxidation und Addition von C₉H₃F₃N₂S an Cystein, Serin, Lysin oder Histidin gewählt. Die Massengenauigkeit betrug 4,5 ppm bzw. 20 ppm für MS/MS-Spektren. Die False Discovery Rate wurde auf 1 % gesetzt.

5.7.4 Stabilitätsanalyse von Testsubstanzen unter Einfluss von Glutathion

25 µl der jeweiligen Testsubstanz wurden mit 5 mM Glutathion (GSH) gemischt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Für die Messung wurden 50 µl des Ansatzes in ein Autosampler-Röhrchen übertragen. Verwendet wurde ein UltiMate™ 3000 RSLCnano-System mit einer NUCLEODUR® C₁₈ Gravity-Säule (2 mm – 50 mm, 1,8 µm), das mit einem Orbitrap Velos Pro Ionenfallen-Massenspektrometer gekoppelt war. Das Gerät wurde durch die Xcalibur-Software gesteuert. 10 µl der Probe wurden in eine Mischung aus 90 % H₂O (+ 0,1 % Ameisensäure) und 10 % Acetonitril (+ 0,1 % Ameisensäure) injiziert, die Flussrate betrug 250 µl/min. Der Gradient wurde nach 6 min auf 5 % H₂O (+ 0,1 % Ameisensäure) und 95 % Acetonitril (+ 0,1 % Ameisensäure) und nach 8,1 min erneut auf die Ausgangsmischung umgestellt.

Die erhaltenen Spektren wurden mit der Xcalibur-Software analysiert.

6 Ergebnisse

High-Content-Analysen (engl. Hochinformationsanalysen) sind ein probates Mittel zur Analyse verschiedener Parameter in den Neurowissenschaften. Als High-Content-Analyse wird der Prozess der Gewinnung großer Datenmengen durch Quantifizierung komplexer Eigenschaften aus Bilddaten von Zellen oder Geweben definiert. Dazu wird eine Kombination aus automatisierter Mikroskopie und automatisierter Bildanalyse verwendet.^[145] Initial werden durch Grenzwertbestimmungen und Testexperimente einzelne Parameter für die Bildaufnahme und –auswertung angepasst. Die Durchführung der Experimente kann so standardisiert ablaufen und der Durchsatz der getesteten Proben deutlich erhöht werden. Für die mikroskopischen Aufnahmen werden häufig Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die gewünschte Markerproteine oder –organellen spezifisch färben. Hierdurch können mehrere zelluläre Attribute gleichzeitig visualisiert und analysiert werden.^[145] Für die Analyse des Neuritenwachstums ist dieser Ansatz gut geeignet, da eine manuelle Auswertung in diesem Fall sehr zeitaufwändig wäre. Zu diesem Zweck sind in den vergangenen Jahren zahlreiche Ansätze entwickelt worden, die effektiv das Neuritenwachstum in zellbasierten Systemen analysieren. So ist die Software MetaMorph® für zahlreiche neurowissenschaftliche Untersuchungen eingesetzt worden.^[145] Die Software steuert die automatische Bildaufnahme und beinhaltet diverse Zusatzfunktionen, um verschiedenste Prozesse und Strukturen zu analysieren und darzustellen.^[145-146] Als frei erhältliche Programme zur Analyse von Neuriten anhand von mikroskopischem Bildmaterial stehen beispielsweise CellProfiler, NeuronCyto, NeuriteQuant und HCA-vision zur Verfügung,^[147] die entweder spezifisch für die Untersuchung von Neuriten sind oder über Anpassung einzelner Parameter hierzu genutzt werden können. Zusätzlich ist die Open Source-Software ImageJ ein geeignetes Werkzeug für verschiedenste biologische Applikationen,^[148] für das mit NeuriteTracer, NeurphologyJ und Neurite-J Zusatzmodule zur Analyse von neuronalen Parametern wie dem Neuritenwachstum verfügbar sind.^[149]

Zellbasierte Untersuchungen des Neuritenwachstums werden häufig mit immortalen Zelllinien durchgeführt, die aus neuronalen Tumoren isoliert und kultiviert wurden. Diese Zelllinien stellen eine unbegrenzte Quelle dar und können für die gewünschten Analysen entsprechend angepasst werden, z.B. durch Herab- oder Heraufregulierung einzelner Proteine.^[126] Im Vergleich zu primären Neuronen proliferieren diese Zellen unbegrenzt und minimieren die Variabilität zwischen einzelnen Kulturen. Auch wenn ähnliche Zelllinien aus Ratte oder Maus zur Verfügung stehen, kann durch Verwendung humaner Zellen die Expression human-spezifischer Proteine bzw. Isoformen sichergestellt werden.^[150] Nachteile dieser Zellen können zum Teil limitierte neuronale Funktionen und Transformationen mit

steigender Passagenzahl sein.^[126] Die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y stellt eine homogene Zellpopulation dar, die zahlreiche neuronale Markerproteine wie β III-Tubulin, Neurotrophin-Rezeptoren, Tau oder Mikrotubuli-assoziierte Proteine exprimiert und durch verschiedene Agenzien in eine Neuronen-ähnliche Population ausdifferenziert werden kann. Als Differenzierungsagenzien dienen all-trans-Retinsäure (engl. *all-trans retinoic acid*, ATRA), Phorbol ester, NGF oder Dibutyryl-cAMP (db-cAMP).^[150-151] Die ATRA-induzierte Differenzierung ist eine der häufigsten und am besten charakterisierten Methoden: ATRA aktiviert den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg (PI3K/Akt) und steigert die Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins.^[150] Außerdem wirkt ATRA positiv auf den Wnt-Signalweg sowie Proteinkinase A-involvierte Signalwege und steigert die Expression von Neurotrophin-Rezeptoren.^[151-152]

Unklar ist, ob ausdifferenzierte SH-SY5Y-Zellen exakte neuronale Funktionen ausführen, jedoch weisen sie starke strukturelle und biochemische Ähnlichkeiten zu primären Neuronen auf. Aufgrund des humanen Ursprungs und der vergleichsweise einfachen Handhabung im Labor hat sich SH-SY5Y zu einer Modellzelllinie für die Untersuchung neuronaler Prozesse, z.B. Neuritenwachstum, Neuroprotektion und Neurotoxizität, entwickelt.^[150-151] Des Weiteren wird die Zelllinie als Modell für neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer eingesetzt.^[153]

6.1 Etablierung eines Testsystems zur Identifizierung neurogener Substanzen

6.1.1 Testung der Inkubationszeit zur ATRA-induzierten Ausdifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen

Die Bedingungen zur Ausdifferenzierung der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y wurden aus einem Protokoll zur Untersuchung der Neurodegeneration übernommen.^[126] Dabei wurde 1 μ M ATRA zur Differenzierung verwendet. ATRA wird mit dem sogenannten N2-Supplement (N2-ATRA) kombiniert, das auf dem Zellkulturmedium DMEM/F12 basiert und apo-Transferrin, Insulin, Progesteron, Natriumselenit und Putrescin enthält. Diese Zusatzstoffe haben vielfältige protektive und förderliche Einflüsse auf kultivierte Zellen: Transferrin bindet Eisen (Fe^{3+}) mit hoher Affinität und transportiert es in Zellen, wodurch es vor toxischen Effekten und Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch freies Fe^{3+} schützt.^[154] Insulin stimuliert das Zellwachstum und die DNA-Synthese,^[155] während Progesteron neuroprotektive Eigenschaften aufweist, z.B. Schutz gegen oxidativen Stress oder Toxizität bei Nährstoffmangel.^[130a] Polyamine wie Putrescin sind essentiell für das Zellwachstum und

die Proliferation^[156] und inhibieren die immunogene Stickstoffmonoxid-Synthase.^[157] Das Spurenelement Selen, welches in Form von Natriumselenit im N2-Supplement enthalten ist, ist unabdingbar für die Aktivität der Glutathion-Peroxidase und schützt somit vor oxidativem Stress.^[158] Weiterhin zeigt es neuroprotektive Eigenschaften und ist als Bestandteil von Selenocystein an vielfältigen biologischen Funktionen beteiligt.^[158-159] Für eine initiale Ausbildung von Neuriten ist eine Inkubationszeit der SH-SY5Y-Zellen von mindestens 72 h in N2-ATRA notwendig.^[126]

In einem initialen Experiment wurde die Angabe der Inkubationszeit zur N2-ATRA-induzierten Ausdifferenzierung von SH-SY5Y überprüft und die Zellen über verschiedene Zeiträume von 3 – 14 Tagen in N2-ATRA kultiviert, bevor die Visualisierung durch eine immunohistochemische Färbung ermöglicht wurde. Hierzu wurde die DNA mit Hilfe von DAPI gefärbt. Zur Visualisierung der Neuriten sollte ein β III-Tubulin-spezifischer Antikörper verwendet werden, da dieser Tubulin-Isotyp in Neuroblastomzellen auch nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung in hohem Maße exprimiert wird.^[160] Da die Fluoreszenzintensität jedoch zu schwach war, um die Neuriten adäquat analysieren zu können, wurde ein α -Tubulin-spezifischer Antikörper verwendet, der sich durch hohe Intensität auszeichnete und daher für die halbautomatische Detektion der Neuriten geeignet ist. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilddaten erfolgte mit der Software MetaMorph® und dem Analyseprogramm „Neurite Outgrowth“. Nach Anpassung der Einstellungen (Kapitel 5.4) auf die zu analysierende immunohistochemische Färbung erhob das Programm automatisch die notwendigen Daten, die im Anschluss im Verhältnis zur entsprechenden Vehikelkontrolle gesichtet und ausgewertet wurden.

Nach 72-stündiger Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen in N2-ATRA konnte bereits ein initiales Neuritennetzwerk beobachtet werden, was bei Zellen ohne ATRA nicht der Fall war. Die unbehandelten Zellen zeigten größtenteils sehr kurze Neuriten, die aus diesem Grund nur einen unzureichenden Kontakt mit den Nachbarzellen aufwiesen (Abbildung 6.1A). Die halbautomatische Analyse ergab einen durchschnittlichen Anstieg des Neuritenwachstums von 19,8 μ m auf 24,7 μ m pro Zelle verglichen mit N2-behandelten Zellen, was einer Steigerung von 25 % entspricht. Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 5 Tage war bereits eine 79-prozentige Erhöhung der Neuritenlänge pro Zelle messbar. Bei Inkubationen von 8 bzw. 14 Tagen stieg die durchschnittliche Neuritenlänge weiter an (Abbildung 6.1B). Phänotypisch war ein kontinuierlich dichter werdendes Netzwerk bei den N2-ATRA-behandelten Zellen zu beobachten. Unter N2-Behandlung war dagegen die Oberfläche bei längeren Inkubationszeiten immer dichter bewachsen. Eine Ausdifferenzierung mit N2-ATRA geht mit einem Proliferationsstopp einher, wohingegen N2-behandelte Zellen weiter proliferieren.^[151] Dies hat zur Folge, dass nach 14 Tagen ein 10-facher Anstieg des

Neuritenwachstums pro Zelle zu verzeichnen war und die Neuritenlänge für die N2-behandelten Zellen auf 5 µm pro Zelle gesunken war. Abschließend wurde eine Inkubationszeit von 72 h in N2-ATRA für die folgenden Experimente festgesetzt: Zu diesem Zeitpunkt hatte sich bereits ein initiales neuronales Netzwerk gebildet, was durch nachfolgende Substanzbehandlung noch weiter gesteigert werden kann. Zusätzlich könnten in diesem Stadium der Neuritenbildung auch Substanzen identifiziert werden, welche einen retraktiven Effekt auf die Neuriten aufweisen.

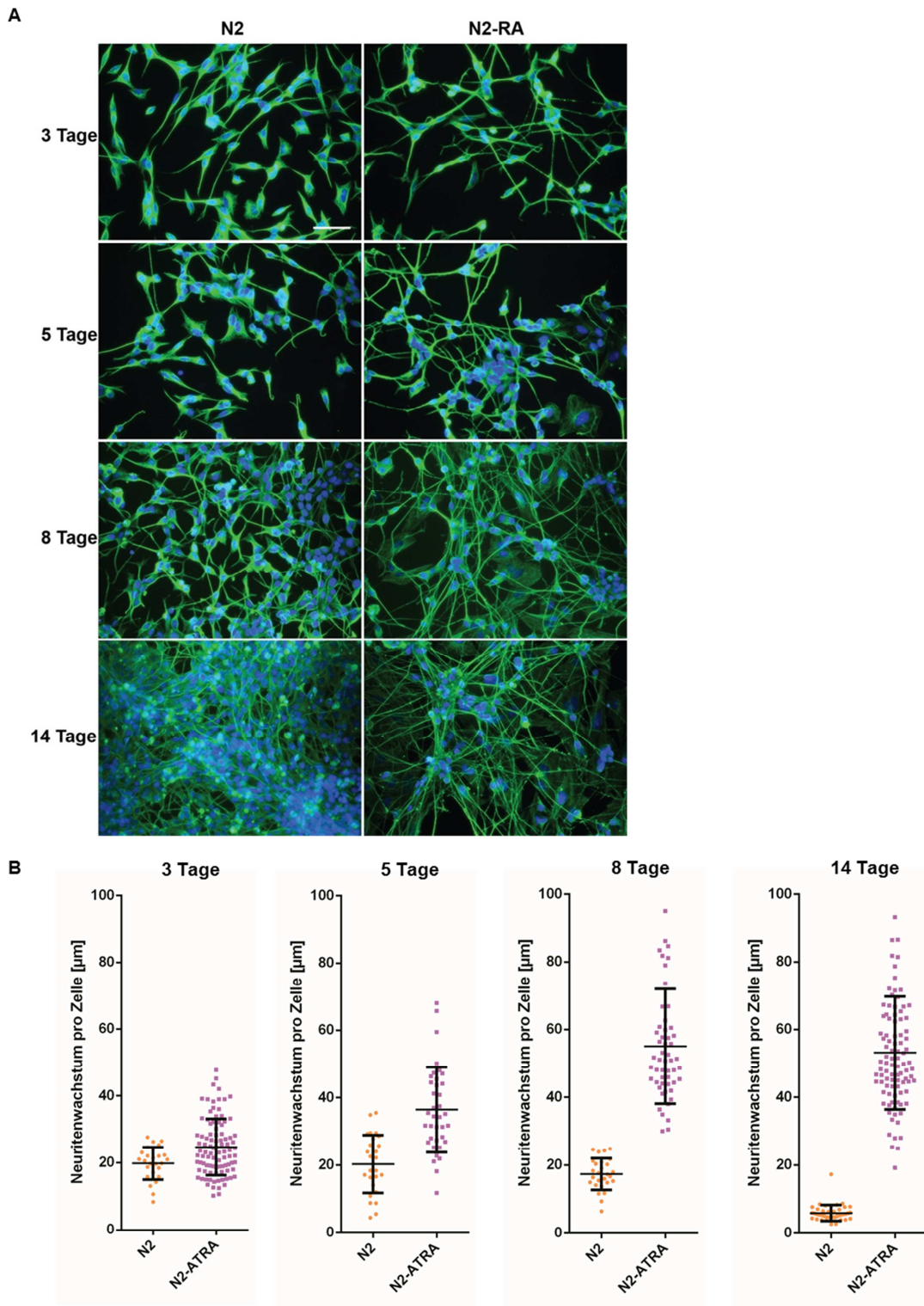


Abbildung 6.1: Einfluss von ATRA-induzierter Ausdifferenzierung auf das Neuritenwachstum von SH-SY5Y-Zellen

[A] Beispielaufnahmen der Zellen nach einer N2-ATRA-Behandlung über 3 – 14 Tage mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μ m. **[B]** Neuritenwachstum pro Zelle nach einer N2-ATRA-Behandlung über 3 - 14 Tage. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt im Vergleich zur entsprechenden N2-behandelten Kontrolle (n = 27 - 96). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt.

Das Analyseprogramm Neurite Outgrowth der Software MetaMorph® beinhaltet weitere Möglichkeiten zur Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen: Neben der Neuritenlänge können auch Parameter wie Neuritenanzahl und Anzahl der Verzweigungspunkte pro Zelle bestimmt werden. Dies wurde für die Analyse der geeigneten Inkubationszeit mit N2-ATRA-Medium durchgeführt, um auch die Effekte der N2-ATRA-Behandlung auf diese Parameter zu untersuchen (Abbildung 6.2). Nach drei Tagen konnte noch kein Effekt auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl detektiert werden, die Werte nahmen im Vergleich zu N2-behandelten SH-SY5Y-Zellen sogar leicht ab. Nach fünf Tagen war sowohl bei der Neuriten- als auch bei der Verzweigungsanzahl ein leichter Anstieg zu verzeichnen, der sich bei längeren Inkubationszeiten von 8 und 14 Tagen immer weiter steigerte. Nach zweiwöchiger Inkubation in N2-ATRA waren kaum noch Verzweigungspunkte nachweisbar, da die Zellpopulation zu dicht gewachsen war, was einerseits die Ausbildung von Neuriten und Verzweigungen einschränkt und andererseits die Detektion durch die Software erschweren kann.

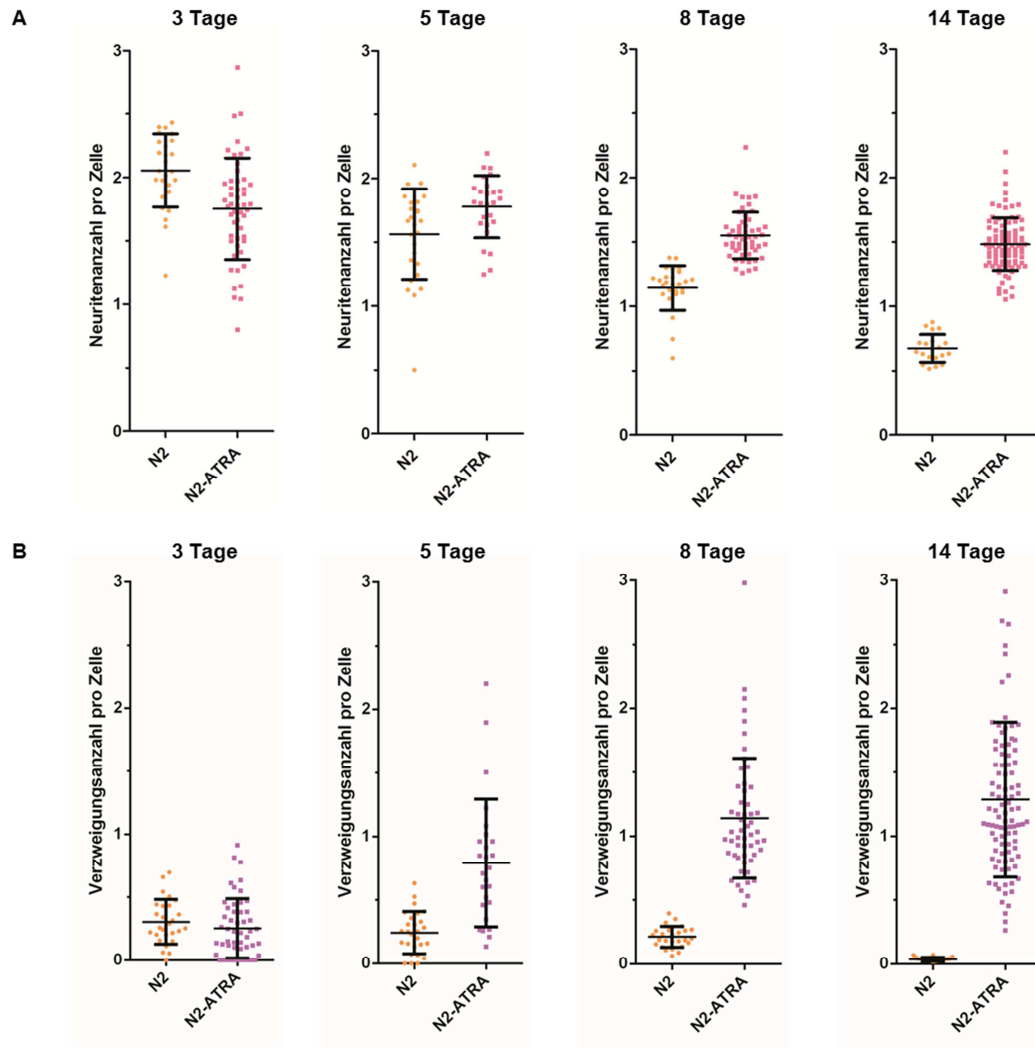


Abbildung 6.2: Einfluss von ATRA-induzierter Ausdifferenzierung auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen

Anzahl der **[A]** Neuriten und **[B]** Verzweigungen pro Zelle nach einer N2-ATRA-Behandlung über 3 – 14 Tage. Dargestellt ist die Neuriten- bzw. Verzweigungsanzahl pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt im Vergleich zur entsprechenden N2-behandelten Kontrolle (n = 20 - 96). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt.

6.1.2 Testung von Kontrollverbindungen zur Analyse neurogener Testsubstanzen

In den folgenden Experimenten zur Etablierung des Testsystems wurden Substanzen untersucht, die als Kontrollen zur Analyse von Testsubstanzen fungieren können. Hierbei wurden SH-SY5Y-Zellen nach erfolgter Differenzierung in N2-ATRA mit verschiedenen Konzentrationen von Dimethylsulfoxid (DMSO) und BDNF behandelt. DMSO bewirkt die teilweise Rückbildung bereits ausgebildeter Neuriten bei einer Endkonzentration von 1 % im Medium.^[161] Der Wachstumsfaktor BDNF bindet neben anderen Neurotrophinen an Trk-Rezeptoren und löst die Transkription differenzierungsfördernder Gene sowie die Aktivierung von Substraten aus, die sich positiv auf die Differenzierung auswirken.^[162] In der Literatur sind Behandlungen von SH-SY5Y-Zellen mit bis zu 100 ng/ml BDNF beschrieben.^[163] Daher wurden die Zellen für 96 h mit 0,1 – 1 % DMSO und 10 – 200 ng/ml BDNF behandelt (Abbildung 6.3). Die mikroskopischen Aufnahmen sowie die Auswertung der Rohdaten ergaben eine Bestätigung der aus der Literatur bekannten Effekte. Die Applizierung steigender DMSO-Konzentrationen resultierte in schrittweiser Abnahme der durchschnittlichen Neuritenlänge: Während N2-ATRA-behandelte Zellen eine Neuritenlänge von durchschnittlich 22 µm pro Zelle aufwiesen, nahm die Länge der Neuriten von Zellen, die in 1 % DMSO inkubiert wurden, auf 8 µm pro Zelle ab. Phänotypisch wiesen die Zellen keine äußerliche Beschädigung auf, jedoch war eine eindeutige Rückbildung der Neuriten erkennbar. Bei der Behandlung mit BDNF war der umgekehrte Einfluss zu beobachten: Die Neuritenlänge von 22 µm in N2-ATRA-behandelten Zellen stieg bei Inkubation mit 200 ng/ml BDNF auf 41 µm pro Zelle an. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war ein Anstieg des Neuritenwachstums nach der Behandlung mit BDNF zu beobachten, da sich bei offensichtlich unveränderter Zellzahl ein dichteres Netzwerk entwickelte.

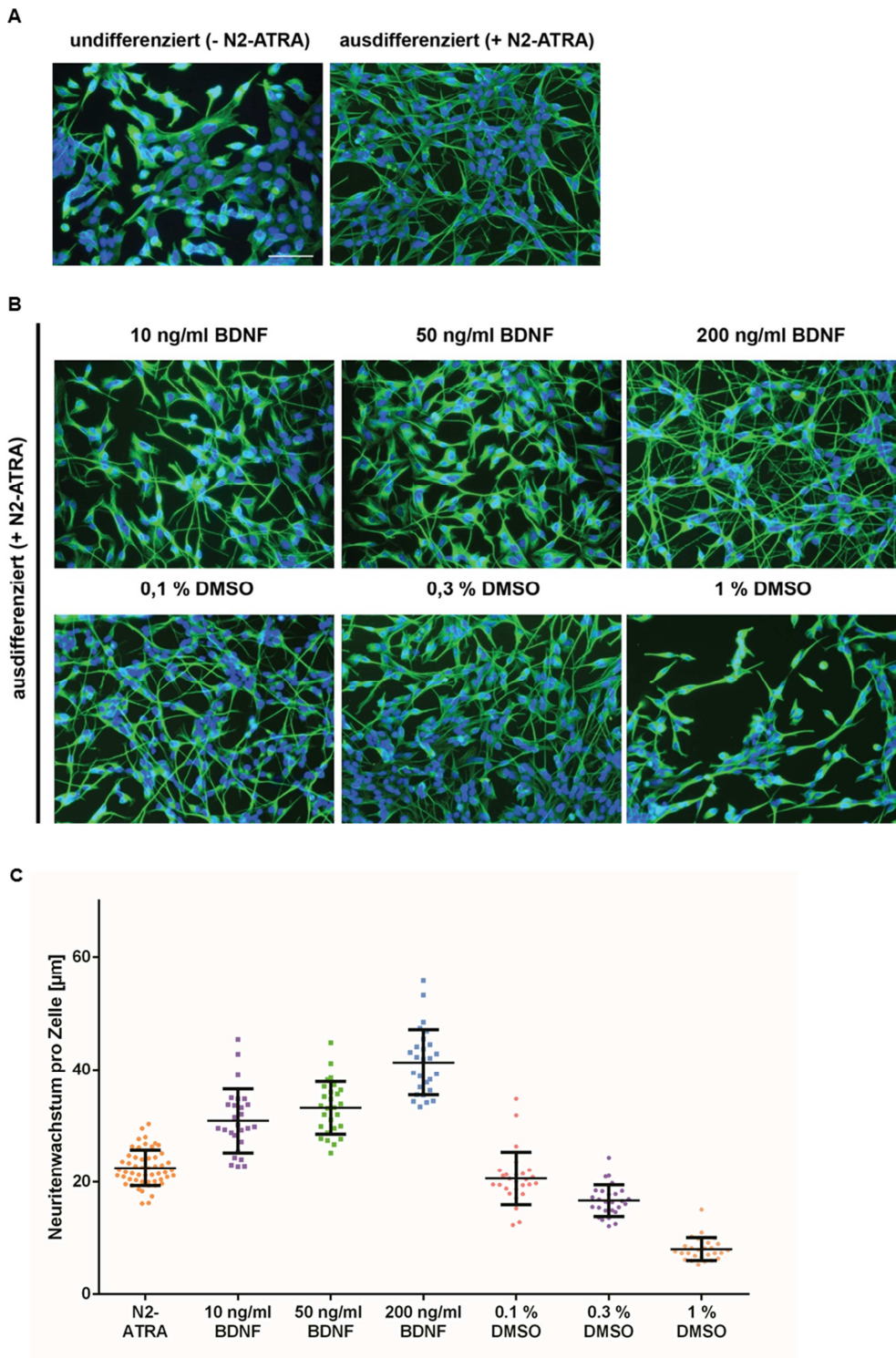


Abbildung 6.3: Einfluss von DMSO und BDNF auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 – 200 ng/ml BDNF bzw. 0,1 – 1 % DMSO behandelt. **[A]** Beispielaufnahmen der Zellen mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μm . **[B]** Neuritenwachstum pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zu N2-ATRA-behandelten Zellen (n = 27 - 54). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt.

6.2 Identifizierung neurogener Effekte von MILI A-Derivaten

Eine MILI A-inspirierte Substanzbibliothek wurde von Dr. Peter Schröder am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie im Verlauf seiner Promotion synthetisiert.^[164] Der Synthesansatz beruhte auf der Strategie der Biologie-orientierten Synthese (BIOS).^[3a] MILI A diente dabei durch seine bekannten neurogenen Effekte in PC-12-Zellen^[165] als prävalidierter Startpunkt zur Synthese niedermolekularer Substanzen des Naturstoffes mit potentieller biologischer Aktivität.

Im Vorfeld der in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen wurden 81 Vertreter dieser Substanzbibliothek auf primäre Hippokampusneuronen aus E18/E19 Sprague Dowley-Ratten in Hinblick auf neuromodulatorische Effekte getestet. Die Experimente wurden von der Firma Neuro-Zone (Mailand, Italien) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für 48 h mit den entsprechenden Substanzen behandelt und die Neuritenlänge anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen bestimmt. Als Kontrollen dienten in diesem Experiment ebenfalls DMSO als Vehikelkontrolle sowie 100 ng/ml BDNF als Positivkontrolle. Einige MILI A-inspirierte Substanzen wiesen in den hippokampalen Rattenneuronen neurotrophe Effekte auf: Insbesondere sind hierbei PS67S und PS171S (Abbildung 6.4) zu nennen, die nach Applikation von 1 μM die stärkste Steigerung des Neuritenwachstums mit 21,5 % und 21,3 % im Vergleich zur Vehikelkontrolle aufwiesen. PS171S wurde zusätzlich in einer Konzentration von 10 μM getestet und erhöhte in diesem Fall die durchschnittliche Neuritenlänge um 18,2 %. Damit befand sich die Wirkung der Substanzen im Bereich der Positivkontrolle BDNF, dessen Behandlung zu einer Steigerung von 18,3 % führte. Einige weitere Substanzen wiesen hohe Varianzen innerhalb der Einzelbilder auf, so dass ein Einfluss auf die Primärzellen nicht entscheidend bestätigt werden konnte. Für andere Verbindungen konnte die bei 1 μM gemessene Aktivität bei 10 μM nicht bestätigt werden. (Anhang, Tabelle 13.1).

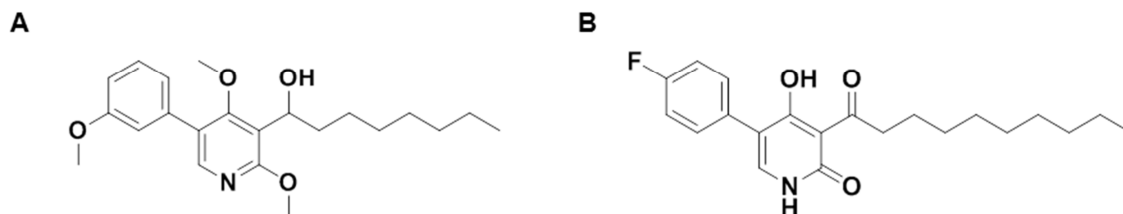


Abbildung 6.4: MILI A-inspirierte Substanzen mit neurotrophen Effekten auf primäre Rattenneuronen

Chemische Strukturen von **[A] PS67S** und **[B] PS171S**.

6.2.1 Einfluss von neuritogenen MILI A-Derivaten auf das Neuritenwachstum

Aus der MILI A-inspirierten Substanzkollektion wurden mit dem zuvor etablierten Testsystem 119 Verbindungen auf neuromodulatorische Effekte in SH-SY5Y-Zellen getestet. Alle Substanzen wurden bei einer Konzentration von 10 μM für 96 h appliziert.

Die zellbasierten Untersuchungen führten zur Identifizierung einiger hochsignifikanter Modulatoren des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen. Gemeinsame Charakteristika der Substanzen sind das Pyridon-Grundgerüst sowie der Phenylsubstituent an der C5-Position des Pyridons (Abbildung 6.5). Die effektivste Substanz war **PS201S**, die die Neuritenlänge pro Zelle um 72 % erhöhte. Phänotypisch waren nach der Behandlung mit **PS201S** ebenfalls Veränderungen des neuronalen Netzwerkes auszumachen: Eine offensichtlich erhöhte Anzahl von Verzweigungen der einzelnen Neuriten, die Startpunkte für neu entstandene Neuriten ermöglichen und damit die Verdichtung des Netzwerkes verstärken, war zu erkennen. Des Weiteren führte die Substanzbehandlung zu einer geringeren Zellzahl, die jedoch keinen Einfluss auf die Intensität des Netzwerkes hatte, was in einem Anstieg der durchschnittlichen Neuritenlänge resultierte. Einen alternativen Phänotyp ergab die Behandlung mit der Substanz **PS245S**: Bei gleichbleibender Zellzahl war eine erhöhte Anzahl von Neuriten erkennbar, wodurch sich ein wesentlich dichteres Netzwerk sowohl im Vergleich zu den anderen Modulatoren als auch zur DMSO-Kontrolle ergab. Insgesamt wurde eine Erhöhung der Neuritenlänge von 62 % gemessen. Applikation von **PS100S** führte mit 53 % in einem etwas geringeren Maße zu einer Erhöhung der Neuritenlänge, phänotypisch waren ähnliche Veränderungen wie bei der Behandlung mit **PS201S** zu erkennen, da auch hier eine leicht verringerte Zellzahl bei gleichbleibender Intensität des neuronalen Netzwerkes zu beobachten war. Der Phänotyp ähnelte dem nach einer Behandlung mit der verwendeten Positivkontrolle BDNF. **PS199S** zeigte einen Anstieg der Neuritenlänge von 62 % und ist mit Ausnahme der Position der Hydroxylgruppe identisch zu **PS201S**: Die Substanz besitzt einen 3-Hydroxyphenylsubstituenten, während die anderen neuritogenen Verbindungen eine Hydroxylgruppe an der C4-Position des Phenylrings besitzen.

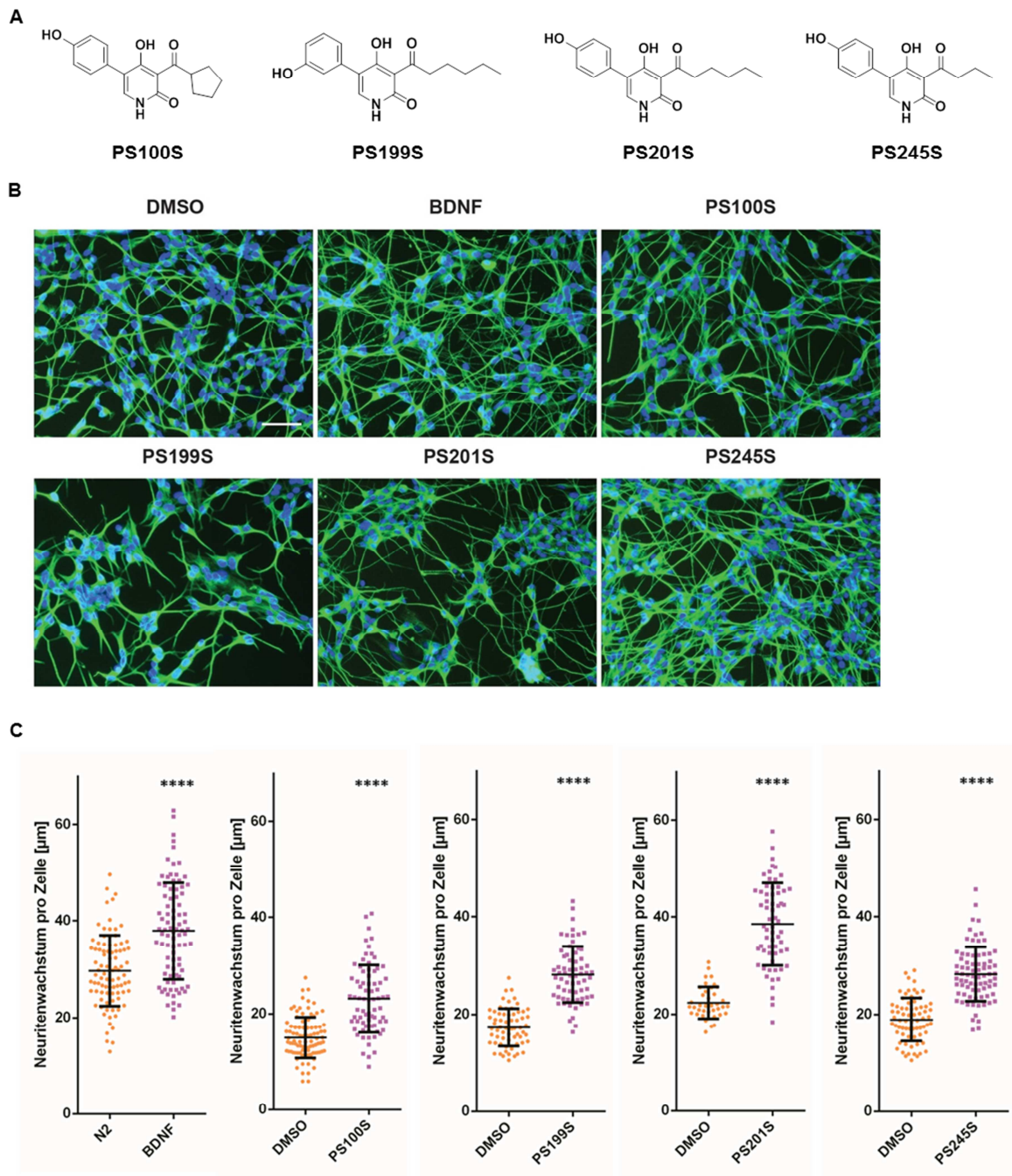


Abbildung 6.5: Neuritogene Eigenschaften von MILI A-inspirierten Pyridonverbindungen in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 μM der jeweiligen Substanz behandelt. **[A]** Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen nach Substanzbehandlung mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μm . **[C]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle ($n = 44 - 93$). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: $p < 0,0001$).

PS67S und **PS171S**, die neurotrophe Effekte auf primäre Rattenneuronen gezeigt hatten (Kapitel 6.2), konnten in SH-SY5Y-Zellen nicht als neuromodulatorische Substanzen bestätigt werden. Zwar wies **PS67S** anhand der erhobenen Daten eine Steigerung des Neuritenwachstums von 63 % auf. Die Zellpopulation wies jedoch in den meisten Fällen eine höhere Anzahl undifferenzierter Zellen als üblich auf, die optisch deutlich von differenzierten Zellen unterscheidbar sind. Aus diesem Grund gestaltet sich die Detektion der Neuriten durch die MetaMorph®-Software schwierig, da die undifferenzierten Zellen keinen verkleinerten Zellkörper aufweisen und dadurch die Mikrotubuli gut sichtbar sind. Die Software kann die Mikrotubuli in diesem Fall schwer von Neuriten unterscheiden, was zu unspezifisch hohen Werten führt.

6.2.2 Einfluss von Pyridin- und Fluorderivaten auf das Neuritenwachstum

Im Zuge der Herstellung der MILI A-inspirierten Substanzbibliothek wurden neben den 4-Hydroxy-2-pyridonen auch Verbindungen mit einem 2,4-Dimethoxypyridin-Grundgerüst synthetisiert. Darunter befanden sich Substanzen, die dieselben Substitutionsmuster wie die neurotrophen Pyridonverbindungen aufwiesen. Diese Substanzen wurden ebenfalls auf ihr Potential zur Modulation des Neuritenwachstums getestet, zeigten jedoch keine Auswirkungen auf das neuronale Netzwerk der SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 6.6). Ein deutlicher Anstieg der Neuritenlänge trat ausschließlich bei **PS641S**, dem Pyridinanalogen zu **PS199S**, auf. Nach Behandlung mit dieser Substanz konnte das Neuritenwachstum um 47 % gesteigert werden. Phänotypische Veränderungen zur Vehikelkontrolle waren jedoch in diesem Fall nicht nachweisbar. Die Pyridinverbindungen **PS606S** und **PS642S** waren bei einer Konzentration von 10 µM in SH-SY5Y-Zellen toxisch. Auch nach Applikation von 10 µM **PS238S** wurden in einem Teil der Proben offensichtlich zellschädigende Effekte nachgewiesen. Bei der Behandlung mit 1 µM dieser Substanzen erhöhte sich die Neuritenlänge geringfügig um 14 – 22 %, die Zellen zeigten ebenfalls keine phänotypischen Abweichungen. Die Inaktivität der Pyridinanaloga legt daher die Vermutung nahe, dass das 4-Hydroxy-2-pyridon-Grundgerüst essentiell für die neuritogene Aktivität der Militarinone ist. Diese Kernstruktur ist neben MILI A auch bei verwandten Pyridonalkaloiden wie Militarinon D, Farinoson A oder Pyridovericin (Abbildung 6.11) vorhanden.^[41]

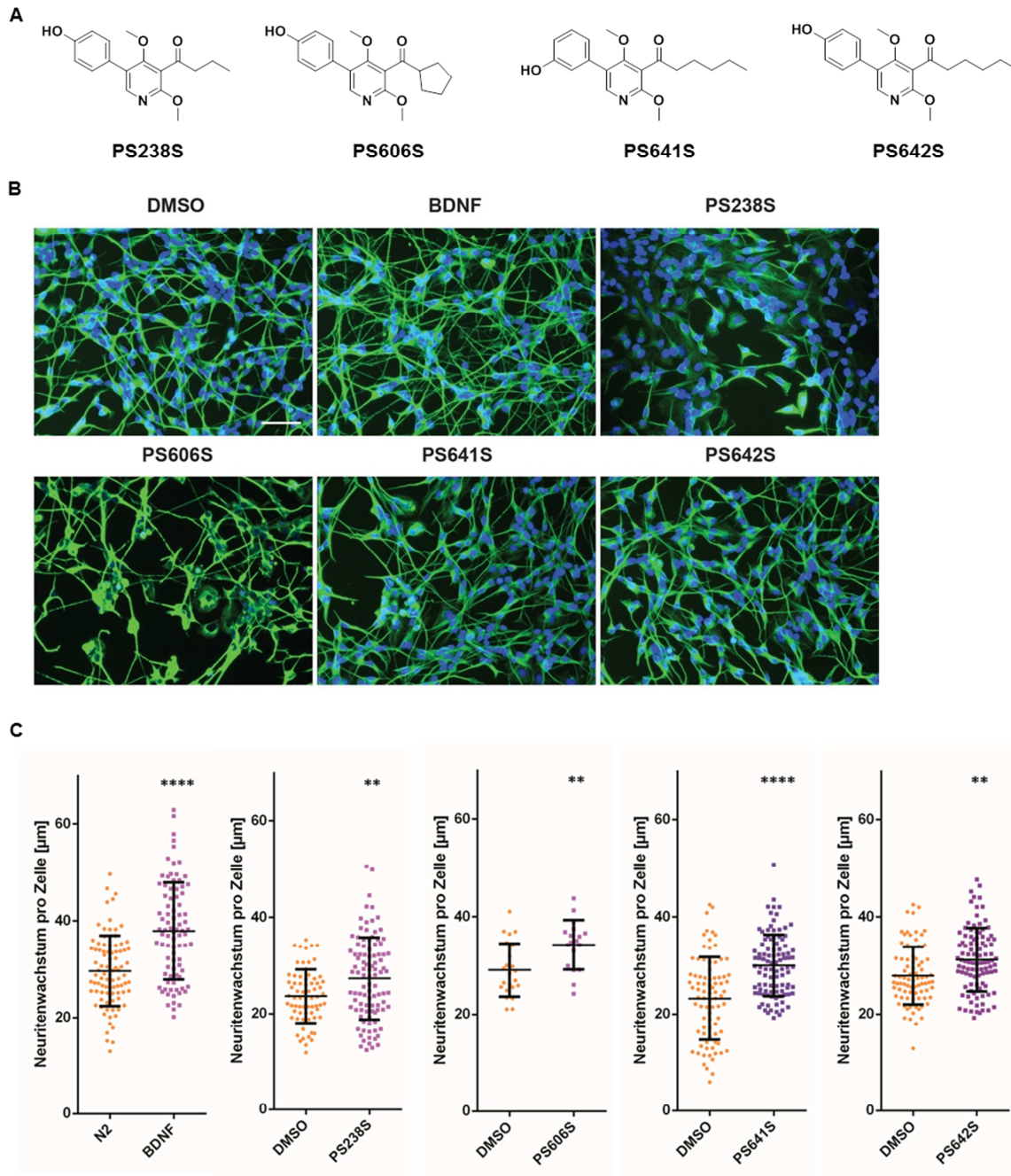


Abbildung 6.6: Einfluss von MILI A-inspirierten 2,4-Dimethoxypyridinen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit der jeweiligen Substanz behandelt (**PS238S**, **PS606S** und **PS642S**: 1 μ M; **PS641S**: 10 μ M). **[A]** Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μ m. **[C]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 18 - 72). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: p < 0,0001; **: p < 0,01).

Des Weiteren wurden im Verlauf der Synthese der MILI A-Substanzbibliothek auch Verbindungen hergestellt, bei denen ein fluorsubstituierter Phenylring vorlag. Im Fall der neurotrophen Substanzen waren entsprechende Derivate jedoch nur von **PS245S** und **PS100S** vorhanden. Die Behandlung von SH-SY5Y-Zellen mit den Substanzen **PS251S** und **PS282S** zeigte keine phänotypische Veränderung im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen (Abbildung 6.7). Ebenfalls war kein deutlicher Effekt auf die Neuritenlänge auszumachen. Die Behandlung mit den Substanzen erhöhte die durchschnittliche Neuritenlänge nur geringfügig um 2 – 8 %. Demnach führt eine Fluorsubstitution des Phenylrings zum Verlust der neurotrophen Aktivität der Verbindungen. Wie jedoch in Abbildung 6.5 gezeigt wurde, scheint die Position der Hydroxylgruppe am Phenylring zu einem bestimmten Maße variabel zu sein.

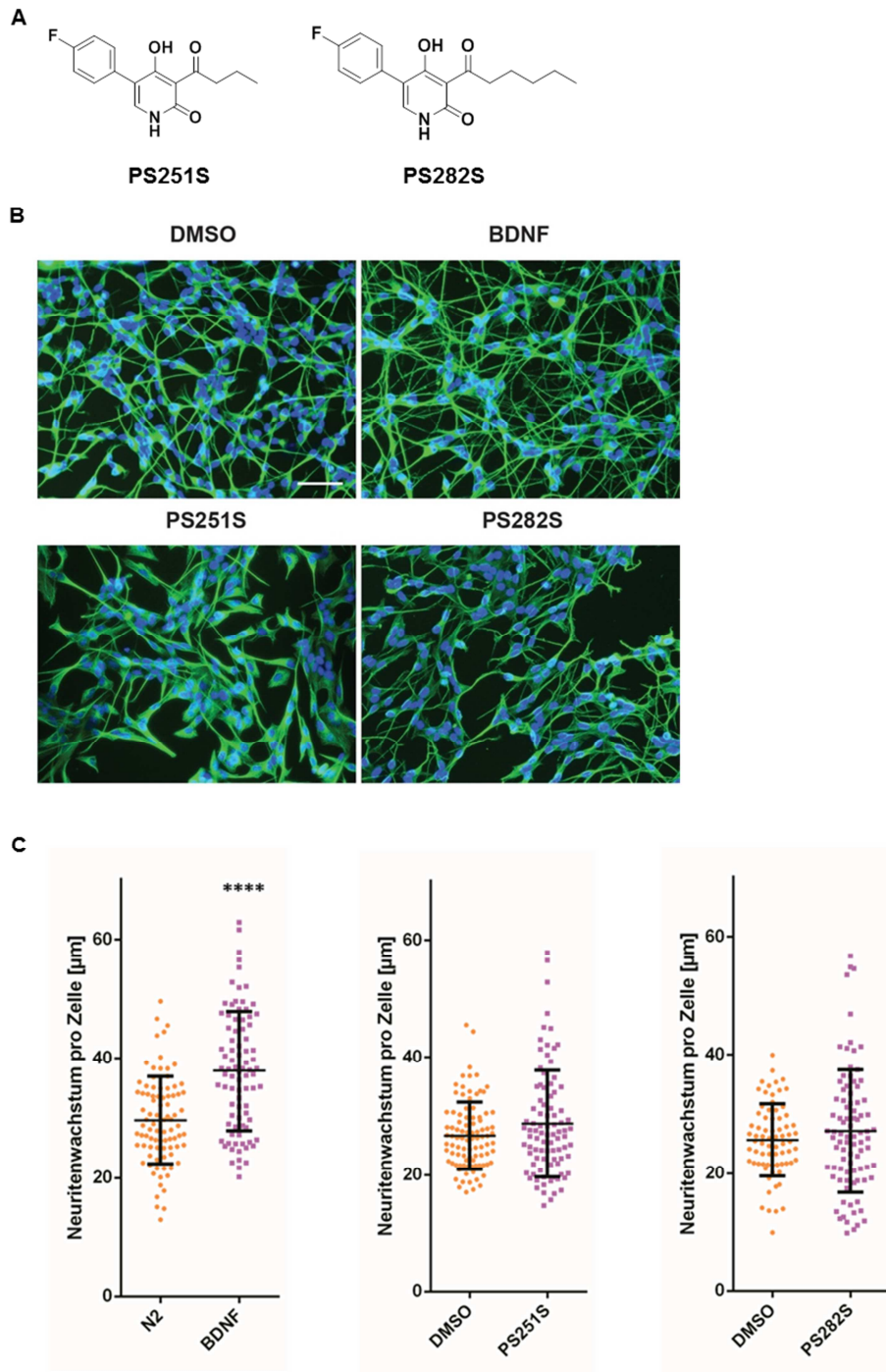


Abbildung 6.7: Einfluss von MILI A-inspirierten Pyridonverbindungen mit Fluorsubstitution auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 μM der jeweiligen Substanz behandelt. **[A]** Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μm . **[C]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle ($n = 51 - 88$). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: $p < 0,0001$).

6.2.3 Einfluss neuritogener MILI A-Derivate auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen

Zur näheren Charakterisierung der neuritogenen Effekte der MILI A-inspirierten Substanzen wurden auch die Neuriten- und Verzweigungsanzahlen pro Zelle analysiert: Nach der Behandlung mit den aktiven Substanzen konnten Steigerungen der durchschnittlichen Neuritenanzahl pro Zelle von 24 - 31 % mit geringer Signifikanz detektiert werden, was ungefähr dem Effekt der Positivkontrolle BDNF auf die Neuritenanzahl entsprach (Abbildung 6.8A). Die Anzahl der Verzweigungen pro Zelle konnte durch die Substanzbehandlung deutlich erhöht werden. Hierbei waren durch alle neuritogenen Verbindungen Steigerungen von ca. 100 % nachweisbar (Abbildung 6.8B). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Anzahl der nachweisbaren Neuriten und Verzweigungen sowohl in unbehandelten als auch in behandelten Zellen sehr gering sind. Im Falle der Neuritenanzahl wurden Durchschnittswerte von 1 – 3 Neuriten pro Zelle detektiert. Für die Vehikelkontrollen konnten zudem durchschnittlich < 0,75 Verzweigungspunkte pro Zelle quantifiziert werden, während die substanzbehandelten Zellen maximal 1,5 Verzweigungen pro Zelle ausbildeten. Durch das bereits nach der ATRA-induzierten Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen ausgebildete initiale Netzwerk ist die Bildung zusätzlicher Neuriten und Verzweigungen begrenzt. Daher sind diese Parameter aufgrund der geringen Anzahlen anfälliger für Schwankungen und die Schlussfolgerungen mit Vorsicht zu betrachten. Durch die Verwendung primärer Neuronen könnten genauere Aussagen zur Beeinflussung dieser Parameter getroffen werden.

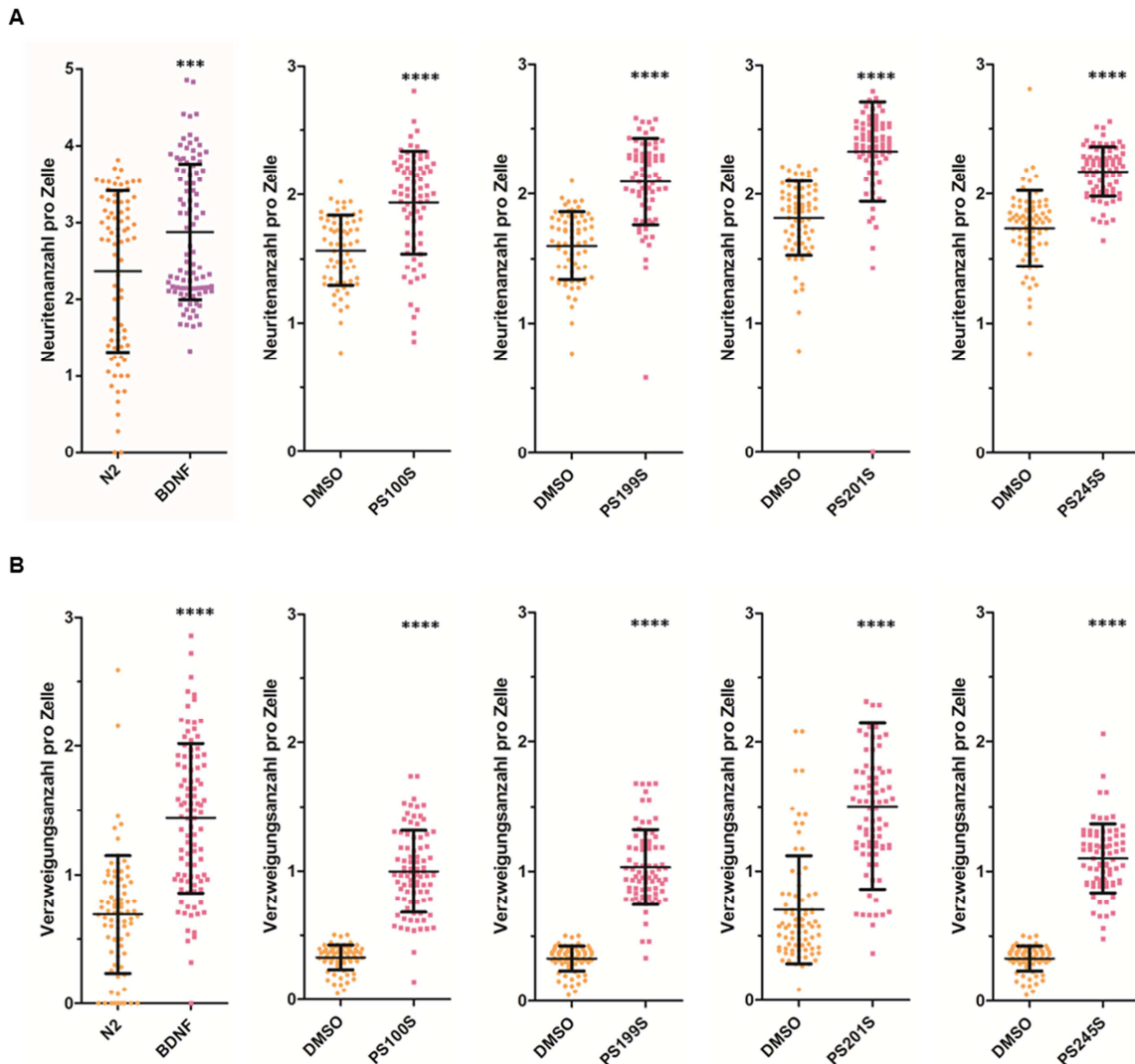


Abbildung 6.8: Einfluss der neurotrophen MILI A-Derivate auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 μM der jeweiligen Substanz behandelt. Dargestellt sind **[A]** Neuritenanzahl und **[B]** Verzweigungsanzahl pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle ($n = 69 - 96$). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$).

6.2.4 Einfluss der Behandlungsdauer auf die neuritogenen Effekte von MILI A-inspirierten Verbindungen

Um die weitere Entwicklung der neurotrophen Effekte auf SH-SY5Y-Zellen zu untersuchen, wurde die Inkubationszeit auf 7 Tage ausgedehnt (Abbildung 6.9). Die längere Inkubation mit den Substanzen wirkte sich auf die Neuritenlänge pro Zelle nur im Fall von **PS201S** aus, wobei nach siebentägiger Behandlung ein Anstieg um 173 % zur entsprechenden DMSO-Kontrollprobe zu verzeichnen war. Nach der Behandlung über 96 h betrug die Zunahme der

durchschnittlichen Neuritenlänge 72 % (Abbildung 6.5). Bei den anderen Substanzen nahm die Neuritenlänge bei längerer Inkubationszeit im Vergleich zu 96-stündiger Behandlung sogar ab, so dass die Zunahme nur noch maximal 41 % betrug. Aufgrund des intensiven Netzwerkes ist eine weitere Ausbildung von Neuriten offensichtlich nicht mehr möglich. Des Weiteren stieg die Zelldichte weiter an, da einige nicht ausdifferenzierte Zellen weiterhin in der Lage waren zu proliferieren. SH-SY5Y-Zellen zeigten nach einer Inkubation von 7 Tagen mit **PS199S** zusätzlich einen abgerundeten Phänotyp, wobei die Zelldichte zwar nicht beeinflusst wurde, aber ein möglicherweise zellschädigender Effekt bei verlängerter Inkubation mit der Verbindung vermutet werden kann.

Somit konnte eine Intensivierung des neuronalen Netzwerkes bei verlängerter Behandlungszeit nur im Fall von **PS201S** ermittelt werden, was noch einmal die potente Wirkung der aktivsten Verbindung dieser Substanzbibliothek verdeutlicht.

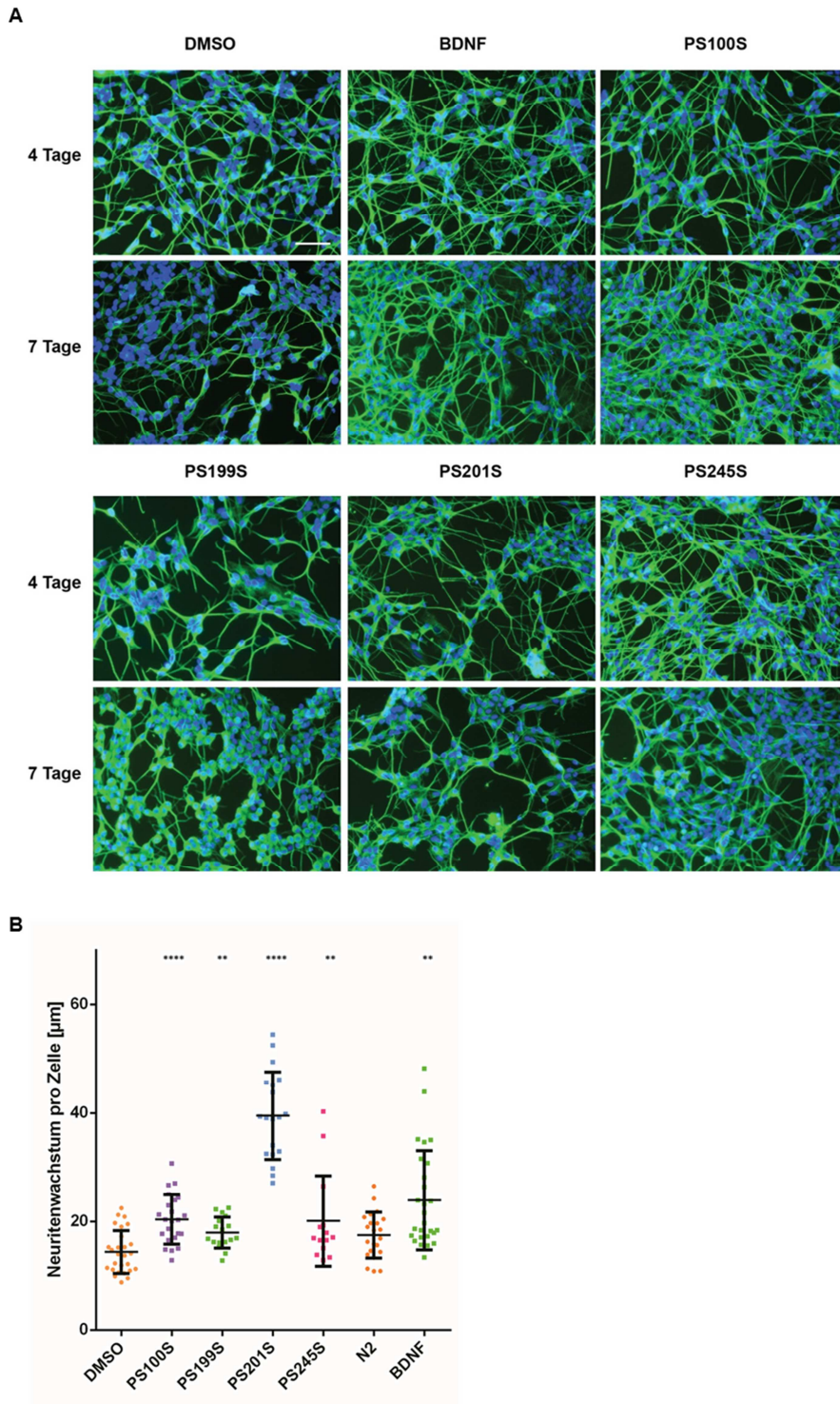


Abbildung 6.9: Einfluss der Behandlungsdauer auf die neurotrophen Effekte von MILI A-inspirierten 4-Hydroxy-2-pyridonen in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 4 - 7 Tage mit 10 µM der jeweiligen Substanz behandelt. **[A]** Beispielaufnahmen der Zellen nach der Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 µm. **[B]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung über 7 Tage. Dargestellt ist das Neuritenwachstum pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 17 - 27). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: p < 0,0001; **: p < 0,01).

SH-SY5Y-Zellen, die für 7 Tage mit den neurotrogenen MILI A-Derivaten behandelt wurden, wurden ebenfalls auf Veränderungen hinsichtlich der Neuriten- und Verzweigungsanzahl untersucht (Abbildung 6.10). Ein Effekt der neurotrophen Substanzen auf die Neuritenanzahl konnte ebenfalls nur nach Behandlung mit **PS201S** beobachtet werden. Hier war ein Anstieg von 51 % nachweisbar. Bei allen anderen Derivaten sowie bei BDNF war keine weitere Steigung im Vergleich mit der Neuritenanzahl nach 96 h zu erkennen, hier waren die Werte sogar leicht rückläufig. Eine Applizierung von **PS201S** über 7 Tage wies auch bei der Anzahl an Verzweigungspunkten einen stärkeren Effekt als nach 96 h auf; hier war im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Probe ein fast vierfacher Anstieg der Verzweigungsanzahl zu verzeichnen. Nach 96 h war eine Verdopplung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet worden. Im Fall der übrigen MILI A-Derivate und BDNF nahm die Verzweigungsanzahl im Vergleich zu 96-stündiger Behandlung deutlich ab, was auch hier auf die erhöhte Dichte des Netzwerkes zurückzuführen ist.

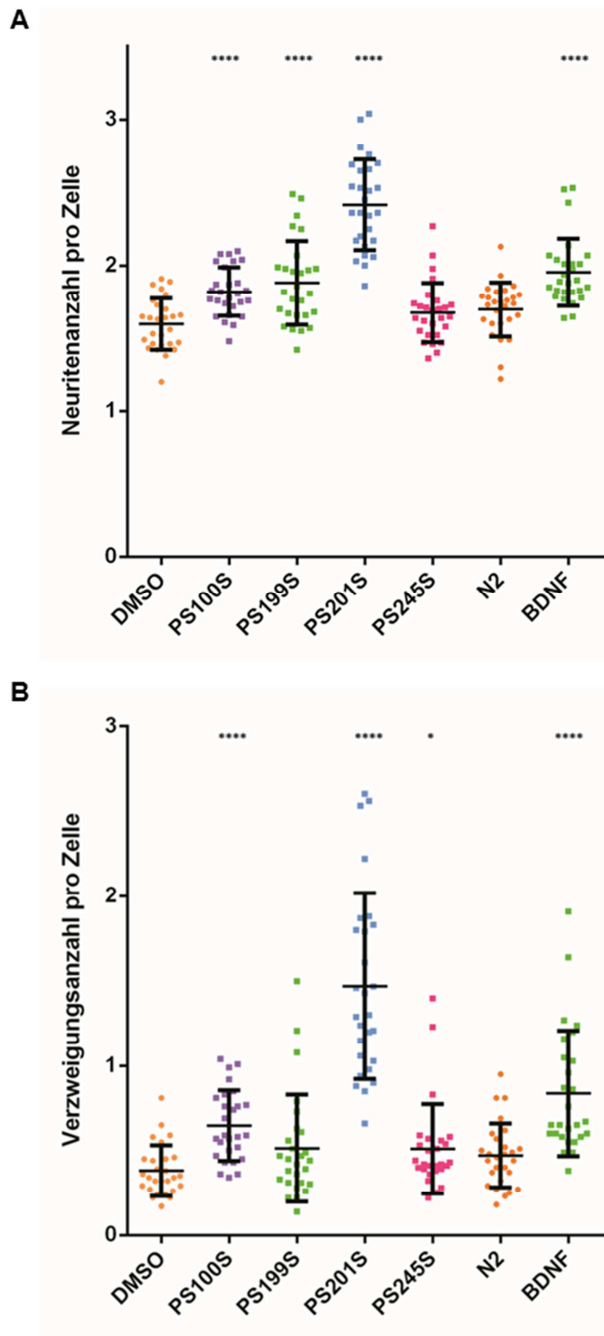


Abbildung 6.10: Einfluss von MILI A-inspirierten 4-Hydroxy-2-pyridonen auf die Anzahl an Neuriten und Verzweigungspunkten in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 7 Tage mit 10 μ M der jeweiligen Substanz behandelt. Dargestellt ist die **[A]** Neuritenanzahl und **[B]** Verzweigungsanzahl pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 27). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: p < 0,0001; *: p < 0,05).

6.2.5 Profilierung von Kinasen als potenzielle Zielproteine von neuritogenen MILI A-Derivaten

Im Anschluss an die Identifizierung von neuritogenen MILI A-Derivaten und deren Beeinflussung verschiedener Parameter in ATRA-differenzierten SH-SY5Y-Zellen wurde der Fokus auf den Wirkmechanismus der Substanzen gelegt. Hierbei wurde berücksichtigt, dass ein verwandter Naturstoff, das Pyridonalkaloid Pyridovericin (Abbildung 6.11), als Tyrosinkinase-Inhibitor beschrieben wurde.^[166] Dies legt die Vermutung einer Interaktion von weiteren Vertretern dieser Substanzklasse mit Kinasen nahe.

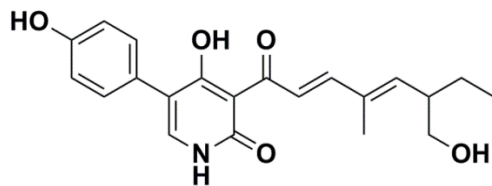


Abbildung 6.11: Chemische Struktur von Pyridovericin

Des Weiteren konnten mit Hilfe eines umfassenden RNAi-basierten Screening-Verfahrens zahlreiche Kinasen identifiziert werden, die mit der Förderung bzw. Inhibition des Neuritenwachstums assoziiert sind (Abbildung 6.12).^[167] Hierbei wurden 700 Kinase-Gene mit Hilfe von spezifischer siRNA herabreguliert und die Auswirkung auf SH-SY5Y-Zellen untersucht. Das experimentelle Design war ähnlich zu dem in dieser Arbeit beschriebenen etablierten Testsystem, wobei zur Herabregulierung der Kinasen bei Induzierung der Ausdifferenzierung siRNA mit hinzugegeben wurde. Anhand der Ergebnisse konnten die identifizierten Kinasen in drei Gruppen eingeteilt werden: wachstumsfördernde, wachstumshemmende und retraktionsfördernde Kinasen.^[167] Interessant sind hierbei insbesondere die beiden letztgenannten Gruppen, da die Inhibition solcher Kinasen das neuronale Wachstum steigern und vor der Rückbildung von Neuriten schützen.

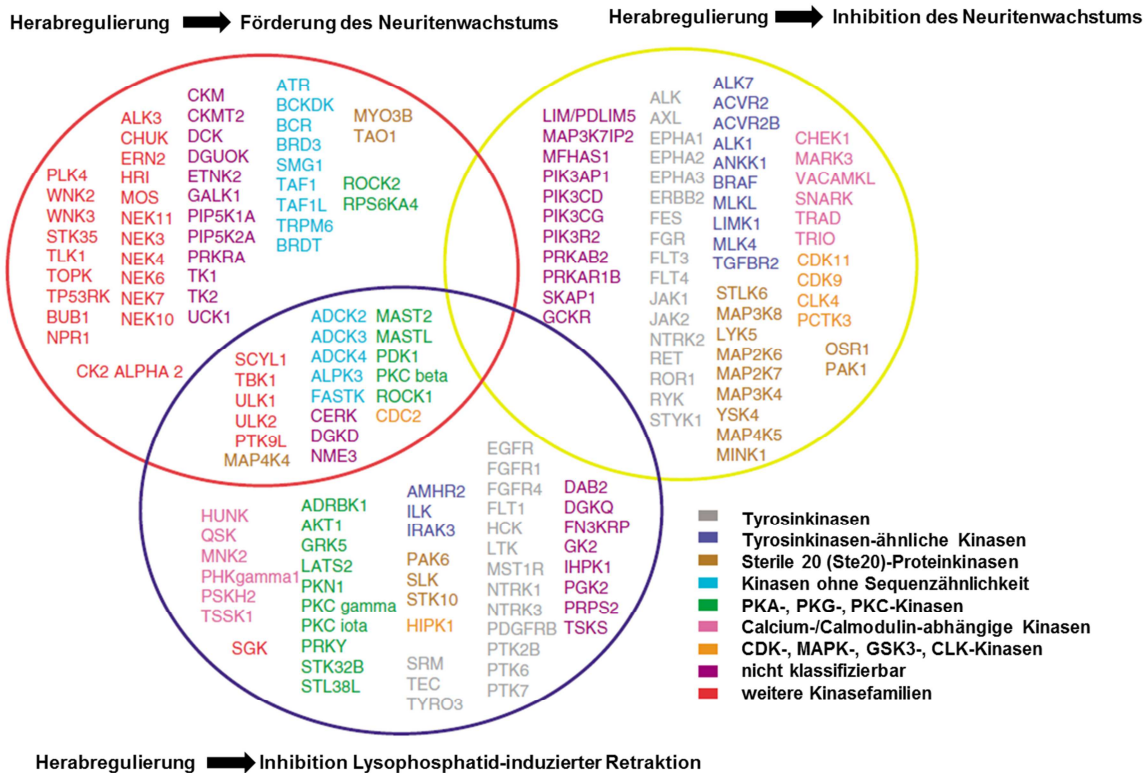


Abbildung 6.12: Mit Neuritenwachstum und – retraktion in Zusammenhang stehende Kinasen [modifiziert nach ^[167]]

RNAi-basierte Herabregulierung der gelb und rot umrandeten Kinasen führen zu Inhibition bzw. Förderung von Neuritenwachstum. Herabregulierung blau umrandeter Kinasen inhibieren die Lysophosphatidsäure-induzierte Retraktion der Neuriten.

Diese Kenntnisse waren ausschlaggebend dafür, das SelectScreen® Kinase Profiling der Firma Thermo Fisher Scientific in Anspruch zu nehmen. **PS100S** und **PS201S** wurden auf Inhibition von Kinasen getestet, die mit dem Neuritenwachstum in Zusammenhang stehen. Je nach Verfügbarkeit der Testsysteme wurde die Inhibition der jeweiligen Kinase mit Hilfe der Testsysteme Z'-LYTE™, Adapta™ oder dem LanthaScreen™ Bindungsassay bestimmt. Die Ergebnisse zeigten ein einheitliches Muster der Kinaseinhibition durch beide Substanzen (Tabelle 6.1). Nur in wenigen Fällen waren unterschiedlich starke Inhibitionen durch beide Substanzen zu beobachten: Beispielsweise unterschied sich der Effekt auf die Kinaseaktivität von WNK2, da bei der Inkubation mit **PS100S** ein 60-prozentige Inhibition gemessen wurde, während **PS201S** die Kinase lediglich zu 24 % inhibierte. Da die Messungen bei einer Substanzkonzentration von 20 µM erfolgten, ließ eine Inhibition von 60 % jedoch auf keine starke Inhibition der Kinase schließen. Eine nachfolgend in Auftrag gegebene Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) der WNK2-Inhibition durch **PS100S** bestätigte dies mit einem Wert von 35 µM, weshalb nähere Untersuchungen zu WNK2 nicht durchgeführt wurden. Der IC₅₀-Wert beschreibt die benötigte

Substanzkonzentration für eine 50-prozentige Inhibition.^[168] Andere Kinasen wurden bei einer Substanzkonzentration von 20 µM zu maximal 53 % inhibiert, weshalb IC₅₀-Bestimmungen für die Inhibition dieser Kinasen nicht durchgeführt wurden. **PS100S** und **PS201S** inhibierten in dieser Studie lediglich eine Kinase in hohem Maße, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 4 (MAP4K4). Die Kinase wurde von **PS100S** zu 89 % und von **PS201S** zu 109 % inhibiert, wobei der letztere Wert der Schwankung der Messwerte geschuldet ist.

Tabelle 6.1: Prozentuale Inhibition von ausgewählten Kinasen durch PS100S und PS201S

Die Messungen wurden mit den Z'-LYTE™-, Adapta™-, oder LanthaScreen™-Testsystemen von der Firma Thermo Fisher Scientific bei einer Substanzkonzentration von 20 µM als technische Duplikate durchgeführt. Inhibierte Kinasen sind grün hinterlegt. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

| Kinase | Inhibition [%] durch | | Testsystem |
|------------------------------|----------------------|------------|------------|
| | PS100S | PS201S | |
| ADRBK1 (GRK2) | - 9,7 ± 0,7 | 7,7 ± 2,9 | Z'-LYTE™ |
| AKT1 (PKB alpha) | 10,6 ± 5,5 | 4,8 ± 4,0 | Z'-LYTE™ |
| AKT2 (PKB beta) | | 10,4 ± 1,2 | Z'-LYTE™ |
| AURKC (Aurora C) | 4,3 ± 0,6 | 13,9 ± 0,9 | Z'-LYTE™ |
| CDK1/cyclin B | - 0,1 ± 1,7 | 6,7 ± 1,2 | Z'-LYTE™ |
| CDK5/p25 | 33,0 ± 2,7 | | Z'-LYTE™ |
| CDK5/p35 | 36,5 ± 1,2 | 24,5 ± 1,6 | Z'-LYTE™ |
| CHUK (IKK alpha) | 9,5 ± 0,5 | 19,1 ± 0,9 | Adapta™ |
| CSNK1A1 (CK1 alpha 1) | 0,9 ± 1,2 | 7,3 ± 0,7 | Z'-LYTE™ |
| CSNK1D (CK1 delta) | 5,3 ± 0,9 | 5,2 ± 0,5 | Z'-LYTE™ |
| CSNK1E (CK1 epsilon) | 14,1 ± 2,4 | 10,5 ± 0,2 | Z'-LYTE™ |
| CSNK1G1 (CK1 gamma 1) | 27,9 ± 1,3 | 25,1 ± 3,4 | Z'-LYTE™ |
| CSNK1G2 (CK1 gamma 2) | 10,7 ± 3,3 | 13,7 ± 3,2 | Z'-LYTE™ |
| CSNK1G3 (CK1 gamma 3) | 2,5 ± 0,3 | 17,7 ± 0,0 | Z'-LYTE™ |
| CSNK2A1 (CK2 alpha 1) | 2,1 ± 0,8 | 8,0 ± 1,3 | Z'-LYTE™ |
| CSNK2A2 (CK2 alpha 2) | - 14,7 ± 0,2 | 4,3 ± 1,6 | Z'-LYTE™ |
| DYRK1A | - 0,1 ± 0,7 | 6,5 ± 1,7 | Z'-LYTE™ |
| EGFR (ErbB1) | 1,4 ± 5,2 | 3,2 ± 0,7 | Z'-LYTE™ |
| FGFR1 | 13,0 ± 0,4 | 34,3 ± 1,3 | Z'-LYTE™ |

Ergebnisse

| Kinase | Inhibition [%] durch | | Testsystem |
|---|----------------------|--------------|---------------|
| | PS100S | PS201S | |
| FGFR4 | - 16,1 ± 2,9 | 15,4 ± 3,0 | Z'-LYTE™ |
| FLT1 (VEGFR1) | - 18,0 ± 4,5 | 15,8 ± 6,3 | Z'-LYTE™ |
| GRK5 | - 7,4 ± 1,1 | 8,9 ± 1,3 | Z'-LYTE™ |
| HCK | 4,3 ± 8,1 | 20,6 ± 0,9 | Z'-LYTE™ |
| HIPK1 (Myak) | - 6,2 ± 5,5 | - 1,4 ± 5,0 | Z'-LYTE™ |
| LTK (TYK1) | 42,8 ± 3,5 | 52,6 ± 4,2 | Z'-LYTE™ |
| MAP4K4 (HGK) | 88,6 ± 2,1 | 109,1 ± 3,0 | Z'-LYTE™ |
| MKNK2 (MNK2) | 19,8 ± 0,8 | 15,1 ± 1,7 | LanthaScreen™ |
| MST1R (RON) | 36,3 ± 3,3 | 6,4 ± 0,3 | Z'-LYTE™ |
| NEK4 | - 4,2 ± 2,2 | 5,3 ± 4,5 | Z'-LYTE™ |
| NEK6 | 10,9 ± 0,7 | 13,4 ± 8,3 | Z'-LYTE™ |
| NEK7 | 1,0 ± 3,5 | 12,9 ± 0,6 | Z'-LYTE™ |
| NTRK1 (TRKA) | - 9,7 ± 5,4 | 16,4 ± 2,6 | Z'-LYTE™ |
| NTRK3 (TRKC) | - 6,6 ± 1,9 | 40,4 ± 3,4 | Z'-LYTE™ |
| PAK6 | 28,7 ± 3,3 | - 12,7 ± 6,3 | Z'-LYTE™ |
| PDGFRB (PDGFR beta) | 8,7 ± 3,3 | 18,9 ± 1,0 | Z'-LYTE™ |
| PHKG1 | - 0,6 ± 1,9 | 6,9 ± 5,8 | Z'-LYTE™ |
| PI4KB (PI4K beta) | 47,0 ± 0,8 | 44,2 ± 0,7 | Adapta™ |
| PIK3C2A (PI3K-C2 alpha) | - 3,7 ± 2,6 | - 8,7 ± 1,4 | Adapta™ |
| PIK3C3 (hVPS34) | - 19,3 ± 5,3 | - 9,3 ± 3,2 | Adapta™ |
| PIK3CA/PIK3R1 (p110 alpha/p85 alpha) | 6,9 ± 8,5 | 3,9 ± 14,5 | Adapta™ |
| PIK3CD/PIK3R1 (p110 delta/p85 alpha) | 10,9 ± 4,1 | 1,0 ± 12,2 | Adapta™ |
| PIK3CG (p110 gamma) | - 2,5 ± 9,6 | - 4,8 ± 9,8 | Adapta™ |
| PKN1 (PRK1) | - 10,0 ± 6,3 | - 19,2 ± 4,6 | Z'-LYTE™ |
| PRKCB1 (PKC beta I) | 16,7 ± 3,4 | 1,5 ± 0,7 | Z'-LYTE™ |
| PRKCG (PKC gamma) | 40,8 ± 6,3 | 36,7 ± 3,8 | Z'-LYTE™ |
| PRKCI (PKC iota) | - 7,1 ± 6,7 | - 8,3 ± 0,2 | Z'-LYTE™ |
| PTK2B (FAK2) | 2,2 ± 1,8 | 8,5 ± 1,0 | Z'-LYTE™ |

| Kinase | Inhibition [%] durch | | Testsystem |
|-----------------------|----------------------|------------|---------------|
| | PS100S | PS201S | |
| PTK6 (Brk) | - 3,4 ± 3,0 | 7,7 ± 0,4 | Z'-LYTE™ |
| RPS6KA4 (MSK2) | 9,6 ± 2,4 | 32,1 ± 0,4 | Z'-LYTE™ |
| SGK (SGK1) | 33,8 ± 1,8 | 22,3 ± 2,1 | Z'-LYTE™ |
| SLK | 17,7 ± 0,4 | 2,6 ± 0,6 | LanthaScreen™ |
| SRMS (Srm) | 26,1 ± 1,2 | 23,5 ± 4,1 | Z'-LYTE™ |
| STK22D (TSSK1) | 3,2 ± 1,8 | 8,6 ± 2,3 | Z'-LYTE™ |
| TBK1 | 8,5 ± 0,1 | 11,8 ± 0,7 | Z'-LYTE™ |
| TEC | - 17,6 ± 7,9 | 6,8 ± 3,4 | LanthaScreen™ |
| TYRO3 (RSE) | 2,3 ± 3,0 | 15,1 ± 3,2 | Z'-LYTE™ |
| WNK2 | 59,6 ± 1,2 | 24,4 ± 2,1 | LanthaScreen™ |

MAP4K4, auch HGK (engl. *hematopoietic progenitor kinase*, hämatopoetische Vorläuferkinase) oder NIK (engl. *Nck-interacting kinase*, Nck-interagierende Kinase), zählt zu den Ste20/MAPK-Proteinkinasen und spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, bei Entzündungsprozessen sowie bei Diabetes und Atherosklerose. Das Ausschalten des entsprechenden Gens in Mausmodellen führt zum Tod im Embryonalzustand. MAP4K4 wird als mögliches Zielprotein in der Krebstherapie diskutiert^[169] und beeinflusst die Transformation, Adhäsion und Invasion in verschiedenen Tumorzelllinien.^[170] Des Weiteren kann MAP4K4 als Markerprotein für verschiedene Krebstypen gelten, da die MAP4K4-Expression mit schlechten Überlebensprognosen assoziiert ist.^[169] Inhibitoren der Kinaseaktivität von MAP4K4 sind bislang jedoch nur in wenigen Fällen beschrieben worden.^[171] Für den MAP4K4-Inhibitor Kenpaullon wurde beispielsweise das Eingreifen in den in Abbildung 6.13 dargestellten Signaltransduktionsweg gezeigt: Die Phosphorylierung der Kinase startet eine Signalkaskade, die Phosphorylierungsschritte weiterer Kinasen beinhaltet. Am Ende des Signalweges steht der Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher im phosphorylierten Zustand die Expression Zelltod-relevanter Gene antreibt. Die Inhibition von MAP4K4 bewirkt dadurch eine Steigerung der Viabilität der Zellen.^[171e]

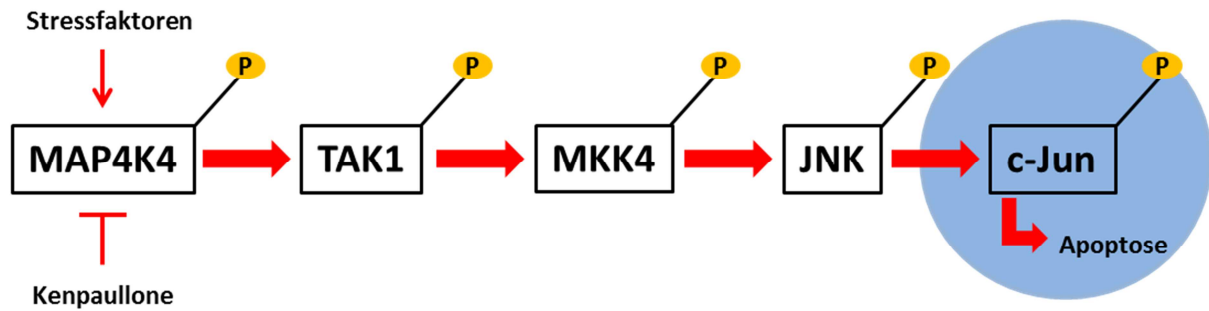


Abbildung 6.13: JNK-vermittelte Apoptose-Signalkaskade [modifiziert nach ^[171e]]

Der Signalweg wird durch stressbedingte MAP4K4-Aktivierung ausgelöst und führt über mehrere Schritte zur Phosphorylierung von c-Jun, was zur Transkription Apoptose-fördernder Gene führt. Kenpaullon blockiert den Signalweg durch Inhibition von MAP4K4.

6.2.6 Identifizierung und Validierung von MAP4K4 als Zielprotein von neurotogenen MILI A-Derivaten

Weitere 27 MILI A-Derivate wurden im Folgenden spezifisch auf eine Inhibition von MAP4K4 unter Anwendung der identischen Bedingungen mittels des Z'-LYTE™-Testsystems überprüft. Hierbei wurden neben den als neurotroph identifizierten Verbindungen auch eine Auswahl der entsprechenden Pyridin- und Fluorderivate untersucht. Des Weiteren wurden Substanzen mit Pyridon- oder Pyridin-Grundgerüst, hydroxylierte und fluorsubstituierte Verbindungen mit variablem Acylrest eingesetzt, um einen Überblick über die MAP4K4-Inhibition durch verschieden substituierte MILI A-inspirierte Verbindungen zu erhalten.

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Korrelation zwischen dem neurotogenen Potenzial und der Inhibition von MAP4K4 (Tabelle 6.2). Sämtliche Verbindungen, die als neurotogen identifiziert worden waren, konnten als MAP4K4-Inhibitoren bestätigt werden. Hierbei waren Inhibitionen von 85 – 99 % bei Applizierung von 20 µM nachweisbar. Die entsprechenden Pyridinderivate **PS238S**, **PS606S**, **PS641S** und **PS642S**, die keine neuromodulatorischen Effekte auf SH-SY5Y-Zellen gezeigt hatten, zeigten ebenfalls nur geringfügige MAP4K4-Inhibitionswerte von maximal 18 %. Ebenso war nur eine geringe Aktivität des Fluorderivats **PS251S** nachweisbar, für das eine 28-prozentige Inhibition der Kinase gemessen wurde.

Jedoch wurden mit **PS44S** und **PS248S** zwei weitere Substanzen identifiziert, die ebenfalls eine Inhibition von MAP4K4 aufwiesen. Alle weiteren getesteten Substanzen zeigten mit bis zu 53 % keine starke Inhibition der Kinase.

Tabelle 6.2: Prozentuale Inhibition von MAP4K4 durch ausgewählte MILI A-inspirierte Verbindungen

Die Messungen wurden mit dem Z'-LYTE™-Testsystem bei einer Substanzkonzentration von 20 µM als technische Duplikate durchgeführt. MAP4K4-Inhibitoren sind grün, zytotoxische Substanzen gelb hinterlegt. Der Einfluss auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y wurde bei einer Konzentration von 10 µM getestet, bei zytotoxischen Effekten zum Teil auch bei 1 µM.

| | MAP4K4 Inhibition [%] | | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | |
|---------------|--------------------------|-------------|--|-------------|
| | 20 µM | | 10 µM | |
| PS100S | 20 µM | 88,6 ± 2,1 | 10 µM | + 53,0 |
| PS124S | 20 µM | 22,5 ± 6,6 | 10 µM | zytotoxisch |
| PS150S | 20 µM | 16,8 ± 9,8 | 10 µM | + 5,3 |
| PS155S | 20 µM | 53,1 ± 5,7 | 10 µM | + 13,5 |
| PS173S | 20 µM | 27,6 ± 2,5 | 10 µM | zytotoxisch |
| PS175S | 20 µM | 30,4 ± 7,3 | 10 µM | + 11,6 |
| PS179S | 20 µM | 20,3 ± 4,8 | 10 µM | - 5,0 |
| PS184S | 20 µM | 16,2 ± 3,0 | 10 µM | - 3,4 |
| PS187S | 20 µM | 23,4 ± 0,3 | 10 µM | + 6,9 |
| PS196S | 20 µM | 2,0 ± 4,2 | 10 µM | + 25,2 |
| PS199S | 20 µM | 99,2 ± 1,2 | 10 µM | + 62,4 |
| PS201S | 20 µM | 84,6 ± 0,6 | 10 µM | + 72,0 |
| PS222S | 20 µM | 42,6 ± 5,1 | 10 µM | + 6,6 |
| PS227S | 20 µM | -10,3 ± 3,2 | 10 µM | - 5,5 |
| PS238S | 20 µM | 17,8 ± 5,6 | 1 µM | + 21,9 |
| PS245S | 20 µM | 100,0 ± 4,2 | 10 µM | + 61,9 |
| PS248S | 20 µM | 97,7 ± 0,5 | 10 µM | zytotoxisch |
| PS250S | 20 µM | 15,4 ± 0,6 | 10 µM | - 5,7 |
| PS251S | 20 µM | 27,6 ± 1,7 | 10 µM | - 0,8 |
| PS418S | 20 µM | 32,5 ± 1,7 | 10 µM | zytotoxisch |
| PS44S | 20 µM | 79,3 ± 1,1 | 10 µM | + 2,1 |
| PS600S | 20 µM | 22,8 ± 2,8 | 10 µM | + 29,5 |
| PS606S | 20 µM | 2,5 ± 7,6 | 1 µM | + 17,8 |
| PS641S | 20 µM | 7,4 ± 1,6 | 10 µM | + 46,7 |
| PS642S | 20 µM | -6,9 ± 5,9 | 1 µM | + 14,3 |
| PS83S | 20 µM | 17,1 ± 3,8 | 10 µM | + 0,0 |
| PS86S | 20 µM | -0,1 ± 12,5 | 10 µM | + 7,2 |

| PS99S | MAP4K4 Inhibition [%] | | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | |
|-------|-----------------------|----------------|---------------------------------------|-------|
| | 20 μ M | 43,4 \pm 1,5 | 10 μ M | -11,6 |

Die Verbindungen **PS44S** und **PS248S** waren nicht als neuritogene Substanzen identifiziert worden. Bei **PS44S** war keine Veränderung in Hinblick auf das Neuritenwachstum zu beobachten, wohingegen **PS248S** bei der Applizierung einer Konzentration von 10 μ M zytotoxische Effekte zeigte. **PS248S** weist eine *n*-Heptylkette am Acylrest auf, woraus sich der Grund des zellschädigenden Effektes ergeben könnte: Da MILI A sich durch seine amphiphile Struktur in die Zellmembran einlagert und langsam in das Zytoplasma entlassen wird, könnte die Alkylkette für eine Akkumulierung des Moleküls in der Membran sorgen und dadurch die Zelle schädigen. Diese Annahme lässt sich durch die Zytotoxizität von **PS124S**, **PS173S** und **PS418S** verstärken (Tabelle 6.2). Diese Substanzen führten bei Behandlung mit 10 μ M ebenfalls zum Tod von SH-SY5Y-Zellen und besitzen allesamt lange Alkylketten an derselben Position. **PS44S** weist wie die neurotrophen Pyridonalkaloide das 4-Hydroxy-2-pyridongerüst und den 4-Hydroxyphenylsubstituenten auf. Eine Aussage zur Inaktivität der Substanz ließ sich zu diesem Zeitpunkt nicht treffen, zumal **PS44S** auch am Acylrest mit einer Cyclopentangruppe einen ähnlichen Substituenten trug wie etwa die aktive Substanz **PS100S** mit einem Cyclohexansubstituenten (Abbildung 6.14).

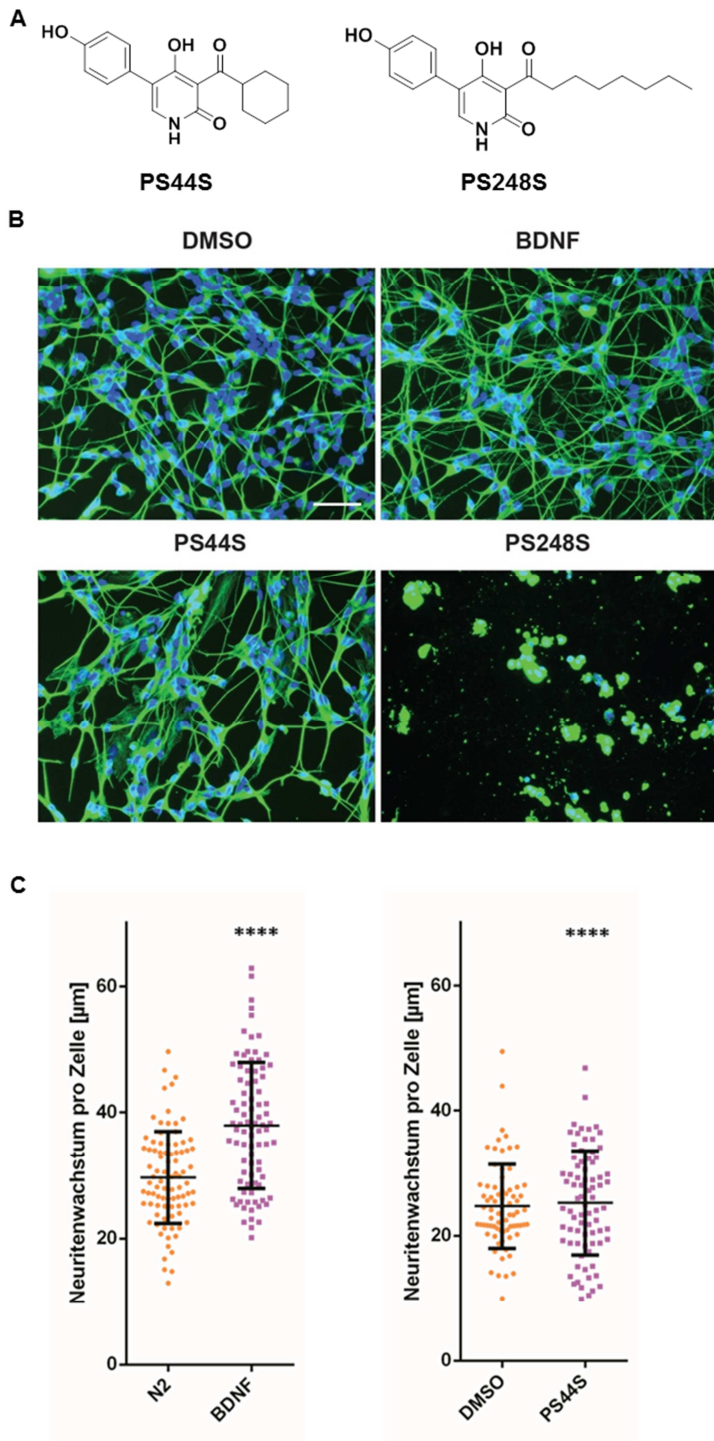


Abbildung 6.14: Einfluss der MILI A-inspirierten Pyridonverbindungen PS44S und PS248S auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 µM der jeweiligen Substanz behandelt. **[A]** Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 µm. **[C]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 74 - 79). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: p < 0,0001).

Die Firma Thermo Fisher Scientific wurde im Folgenden beauftragt, IC₅₀-Werte der MAP4K4-Inhibition durch die MILI A-Derivate zu bestimmen. Dazu wurden Substanzkonzentrationen ab dem nanomolaren Bereich bis zu 50 µM auf prozentuale MAP4K4-Inhibition getestet. Hierbei erwies sich die aktivste Substanz **PS201S** mit einem IC₅₀ von 2,3 µM auch als potentester MAP4K4-Inhibitor. **PS100S** und **PS245S** zeigten leicht geringere Werte (3,6 bzw. 3,2 µM), während für **PS199S** eine schwächere Aktivität gemessen wurde (8,6 µM). Somit konnte der Zusammenhang zwischen der Steigerung des Neuritenwachstums und der MAP4K4-Inhibition bestätigt werden. Für die zytotoxische Verbindung PS248S wurde zudem ein IC₅₀ von 5,2 µM bestimmt (Tabelle 6.3).

Tabelle 6.3: Korrelation des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen und der MAP4K4-Inhibition durch neuritogene MILI A-Derivate

Die IC₅₀-Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Z'-LYTE™-Testsystems bei der Firma Thermo Fisher Scientific. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 1 - 3). n.d.: nicht durchgeführt

| | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | IC ₅₀ MAP4K4 [µM] |
|---------------|---------------------------------------|------------------------------|
| PS44S | + 2,1 | n.d. |
| PS100S | + 53,0 | 3,6 ± 0,4 |
| PS199S | + 62,4 | 8,6 ± 2,0 |
| PS201S | + 72,0 | 2,3 ± 0,6 |
| PS245S | + 61,9 | 3,2 ± 0,3 |
| PS248S | zytotoxisch | 5,2 |

Kenpaullon wurde neben einer Vielzahl von weiteren Vertretern der Substanzklasse der Paullone als niedrig mikromolarer CDK1/Cyclin B-Inhibitor entdeckt.^[172] Weitere Untersuchungen identifizierten die Substanz auch als GSK-3-Inhibitor, der neuritogene Effekte auf neuronale Vorläuferzellen aufweist.^[173] Kinase-Profilierungsexperimente ermittelten eine 93-prozentige Inhibition der Kinaseaktivität von MAP4K4 bei einer Konzentration von 0,5 µM.^[174] Nähere Untersuchungen verifizierten eine effektive Herabregulierung der Phosphorylierung von Downstream-Kinasen (Abbildung 6.12).^[171e]

Der Effekt von Kenpaullon auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y wurde im Vergleich mit dem aktivsten MILI A-Derivat **PS201S** analysiert (Abbildung 6.15). 10 µM Kenpaullon steigerte das Neuritenwachstum um mehr als 100 % im Vergleich zur DMSO-Vehikelkontrolle und weist damit einen stärkeren Effekt als **PS201S** auf (72 %). Eine Steigerung des Effektes im Vergleich zu **PS201S** war anhand der starken Inhibition im

niedrigen mikromolaren Bereich erwartet worden. Phänotypisch konnte jedoch kein deutlich intensiveres Netzwerk nach Kenpaullon-Behandlung nachgewiesen werden. Die Neuriten- und Verzweigungsanzahlen waren im Vergleich zu **PS201S** nur geringfügig erhöht. Eine Behandlung mit 10 µM Kenpaullon führte zu einer Erhöhung der durchschnittlichen Neuritenanzahl von 33 % (**PS201S**: 28 %) und der Verzweigungsanzahl von 279 % (**PS201S**: 211 %).

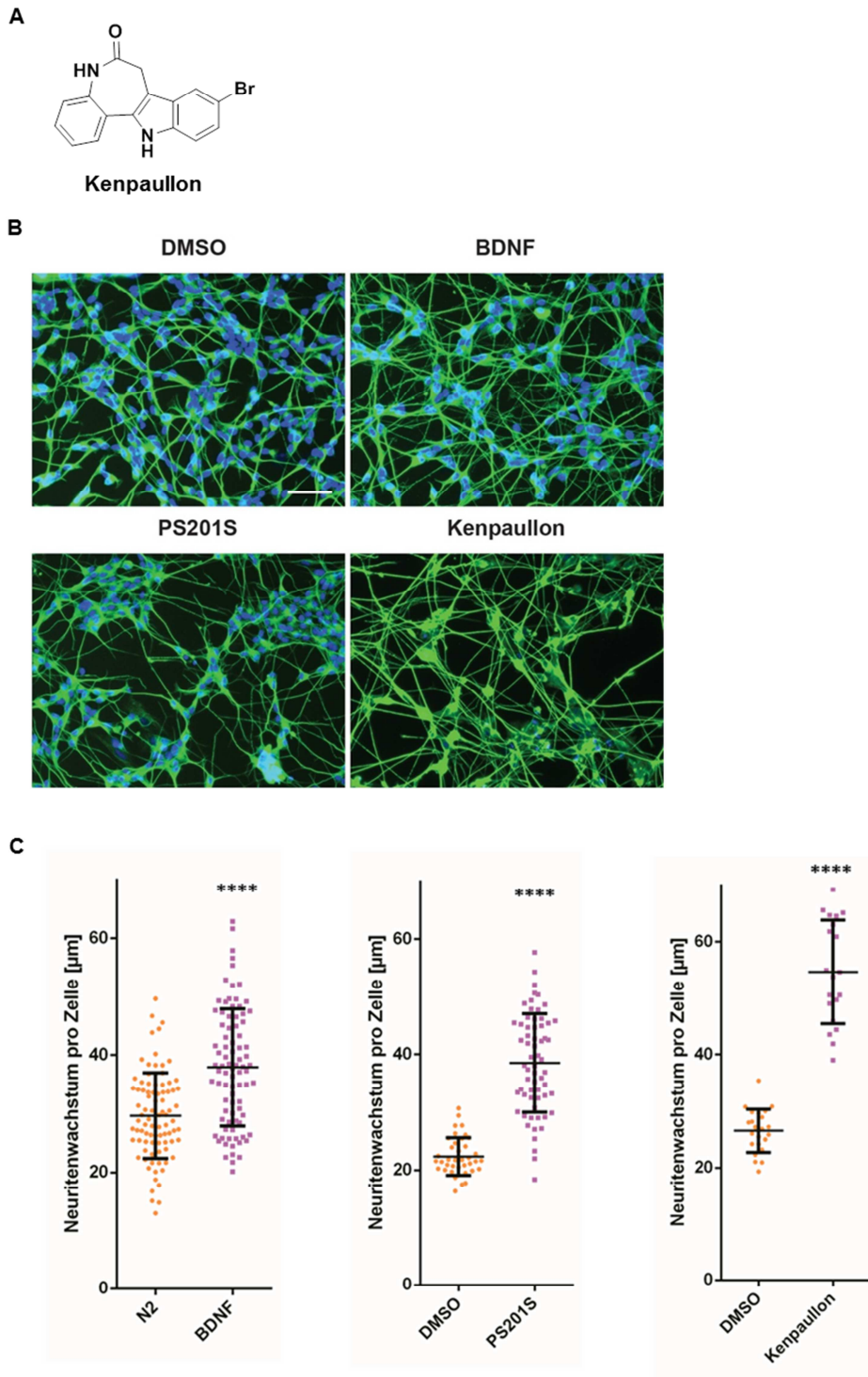


Abbildung 6.15: Neuritogene Eigenschaften des MAP4K4-Inhibitors Kenpaullon in SH-SY5Y-Zellen im Vergleich mit PS2015

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 μM Kenpaullon behandelt. **[A]** Chemische Struktur von Kenpaullon. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μm . **[C]** Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle ($n = 20 - 88$). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: $p < 0,0001$).

Die IC_{50} -Werte für die MAP4K4-Inhibition wurden im Anschluss am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie bestätigt (Tabelle 6.4). Da der Z'-LYTE™-Assay, mit dem die MAP4K4-Inhibition nachgewiesen wurde, auch kommerziell erhältlich ist, wurde dieser für die Validierung verwendet. Hierbei konnte die Inhibition von MAP4K4 im niedrigen mikromolaren Bereich bestätigt werden. **PS245S** war jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von Thermo Fisher Scientific mit einem IC_{50} von 2,7 μM die aktivste Substanz. **PS199S** zeigte eine stärkere Aktivität mit einem IC_{50} von 4,7 μM . Insgesamt befanden sich alle Verbindungen im selben Aktivitätsbereich wie bei den Testungen von Thermo Fisher Scientific.

Tabelle 6.4: Korrelation des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen und der MAP4K4-Inhibition durch neuritogene MILI A-Derivate

Die IC_{50} -Bestimmung erfolgte mit Hilfe des Z'-LYTE™-Testsystems (Thermo Fisher Scientific). Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$).

| | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | IC_{50} Thermo Fisher Scientific [μM] | IC_{50} MPI Dortmund [μM] |
|---------------|---------------------------------------|--|--|
| PS100S | + 53,0 | 3,6 \pm 0,4 | 4,5 \pm 1,8 |
| PS199S | + 62,4 | 8,6 \pm 2,0 | 4,7 \pm 0,9 |
| PS201S | + 72,0 | 2,3 \pm 0,6 | 4,4 \pm 0,3 |
| PS245S | + 61,9 | 3,2 \pm 0,3 | 2,7 \pm 0,3 |

Im Folgenden wurde anhand des Beispiels von **PS201S** der Wirkungsmechanismus der MILI A-Derivate detaillierter charakterisiert. Um festzustellen, ob ein kompetitiver Wirkungsmechanismus mit dem Substrat ATP vorliegt, wurde der Z'-LYTE™-Assay mit verschiedenen ATP-Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 6.16). Im Falle einer ATP-kompetitiven Bindung an MAP4K4 würde der IC_{50} mit steigenden ATP-Konzentrationen ebenfalls ansteigen, da bei höherer Substratkonzentration auch eine höhere Inhibitorkonzentration benötigt wird, um die Bindung des Inhibitors an die ATP-Bindestelle zu gewährleisten. Steigende ATP-Konzentrationen bis zu 50 μM führten zu einer schrittweisen Erhöhung des IC_{50} -Wertes: Betrag der Wert bei 12,5 μM ATP, was in den vorangegangenen Experimenten verwendet wurde, 4,0 μM , so stieg der Wert bis auf 14,9 μM bei 50 μM ATP. Somit konnte ein ATP-kompetitiver Wirkungsmechanismus für **PS201S** aufgezeigt werden.

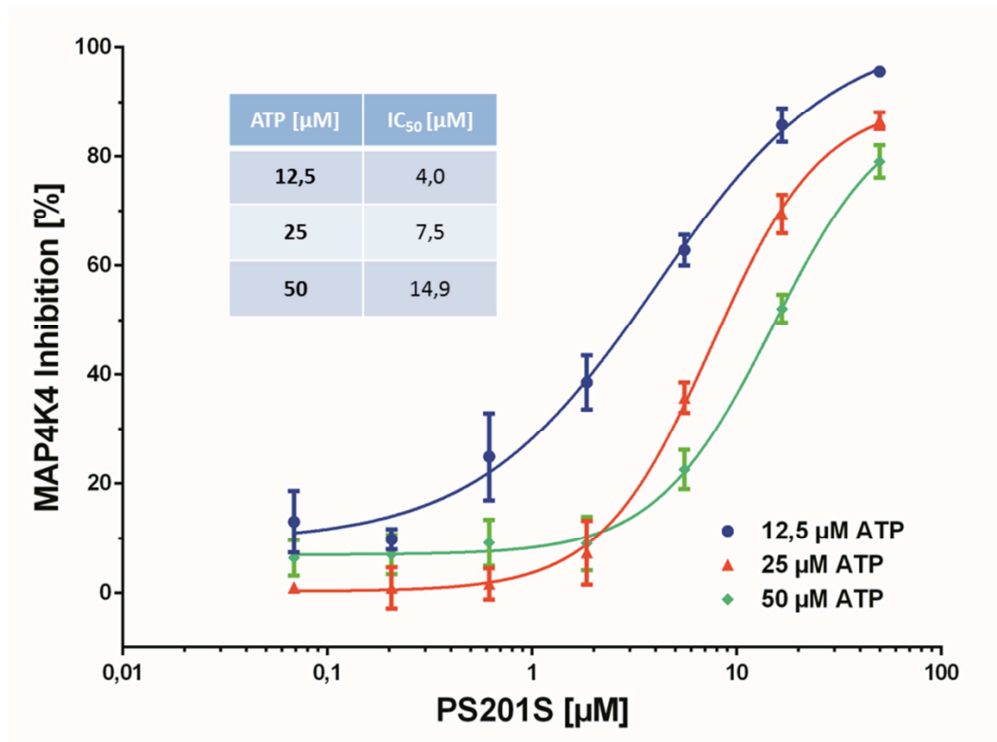


Abbildung 6.16: ATP-kompetitive Inhibition von MAP4K4 durch PS201S

Dargestellt ist die MAP4K4-Inhibition durch **PS201S** unter Zugabe verschiedener ATP-Konzentrationen. Die MAP4K4-Kinaseaktivität wurde mittels Z'-LYTE™ (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3).

Des Weiteren wurde die Michaelis-Menten-Konstante K_m bestimmt, die die Substratkonzentration bezeichnet, bei dessen Applizierung die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m kann mit Hilfe eines Dixon-Plots grafisch bestimmt werden. Dabei wird die Geschwindigkeit der Reaktion bei Applizierung verschiedener ATP- und Inhibitorkonzentrationen gemessen und die reziproke Substratkonzentration ($1/\text{ATP}$) gegen die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit ($1/v_{\text{max}}$) aufgetragen. Bei kompetitiven Inhibitoren liegt der Schnittpunkt der Geraden auf der Y-Achse, der Schnittpunkt einer Geraden mit der X-Achse determiniert den negativen reziproken K_m .^[175] Da mit Hilfe des Z'-LYTE™-Assays keine kinetische Messung durchgeführt werden konnte, wurde die reziproke Restaktivität von MAP4K4 anstatt der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen. Die Auftragung der Restaktivität des Proteins bei Zugabe von 1,85 – 16,6 µM **PS201S** ergab einen Schnittpunkt der Geraden im Bereich der Y-Achse (Abbildung 6.17). Zusätzlich wurden ansteigende K_m -Werte bei ansteigender Inhibitorkonzentration bestimmt, was ebenfalls für ATP-kompetitive Inhibitoren zutrifft, da mit höherer Inhibitorkonzentration auch mehr Substrat eingesetzt werden muss, um die Reaktionsgeschwindigkeit aufrechterhalten zu können.

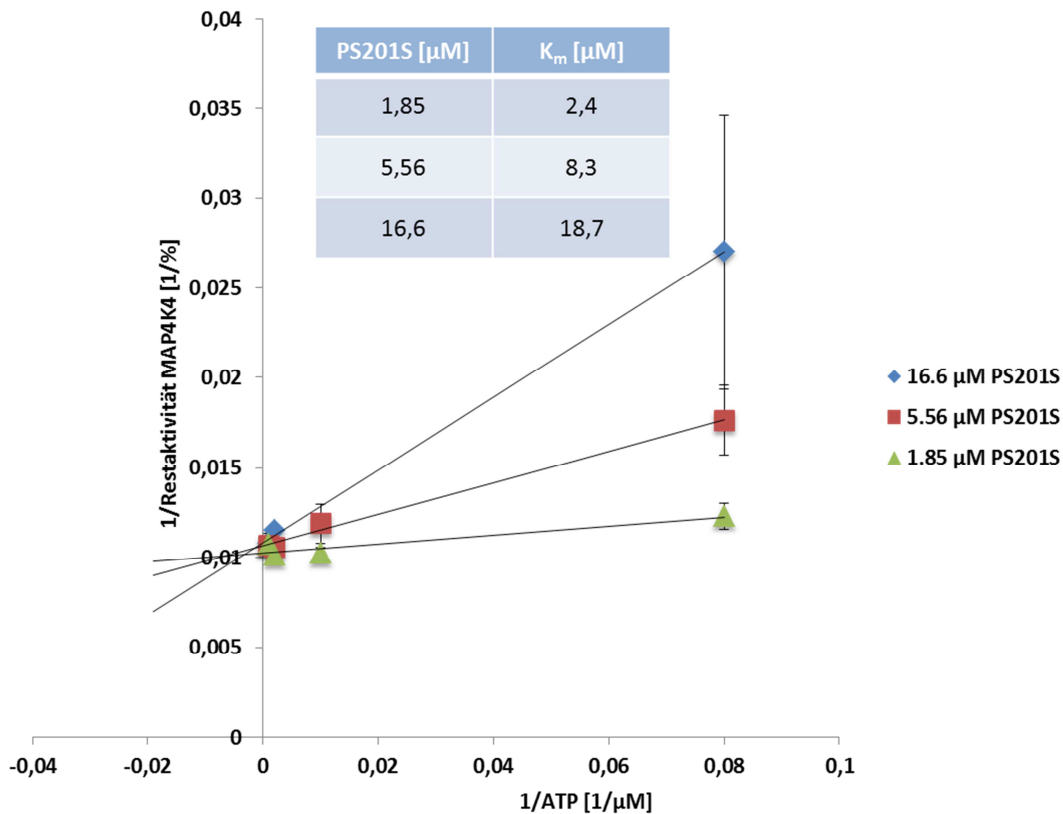


Abbildung 6.17: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m des Enzym-Substrat-Komplexes MAP4K4-PS201S mit Hilfe eines Dixon-Plots

Aufgetragen ist die reziproke MAP4K4-Restaktivität bei verschiedenen ATP-Konzentrationen nach Zugabe von 1,85 – 16,6 μM **PS201S**. Die MAP4K4-Kinaseaktivität wurde mittels Z'-LYTE™ (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$).

6.2.7 Zielprotein-Validierung durch Proteinanreicherung mit Desthiobiotin-ATP

Eine Methode zur Validierung von Kinaseinhibitoren ist die Verwendung von Desthiobiotin-gekoppeltem ATP, das an Streptavidin-konjugierten Beads immobilisiert wird. Desthiobiotin und ATP sind hierbei über ein Acyl-Phosphat-Motiv miteinander verbunden und binden kovalent an ATP-Bindestellen mit konserviertem Lysinrest.^[139] Durch die hochaffine Interaktion von Biotin und Streptavidin dienen Desthiobiotin-ATP-Konjugate als wirkungsvolles Mittel zur Untersuchung von ATP-bindenden Proteinen.^[176] Der Großteil des Kinoms wurde bereits unter Anwendung dieser Methodik identifiziert und analysiert.^[177]

Zur Bestätigung der intrazellulären Bindung von **PS201S** an MAP4K4 wurde ein Komplettlysate von SH-SY5Y nach Behandlung mit der Substanz bzw. DMSO als Kontrolle über Desthiobiotin-ATP an eine Streptavidin-Agarose-Matrix immobilisiert und die von **PS201S** nicht gebundene Kinase über einen Immunoblot analysiert (Abbildung 6.18). Dabei sollte im Falle der Bindung der Substanz eine Abnahme der Bandenintensität zu erkennen

sein, da **PS201S** mit ATP um die Bindestelle konkurriert, wodurch Desthiobiotin-ATP nicht binden kann. Jedoch konnte die intrazelluläre Bindung des Pyridonalkaloids an MAP4K4 nicht bestätigt werden. Für das mit **PS201S** behandelte Lysat wurde lediglich eine geringfügige Abnahme der Bandenintensität im Vergleich zum DMSO-behandelten Lysat detektiert, die reproduzierbar dargestellt werden konnte. Das parallel aufgetragene Komplettlusat, welches den MAP4K4-Gehalt vor der Proteinanreicherung repräsentiert, zeigte eine deutlich intensivere Proteinbande. Daher kann auch im DMSO-behandelten Lysat ein Großteil der Kinase nicht nachgewiesen werden.

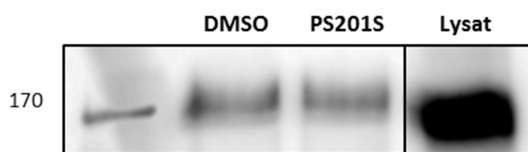


Abbildung 6.18: Immunoblot der Proteinanreicherung von MAP4K4

1 mg SH-SY5Y-Lysat wurde im Vorfeld mit 100 μM **PS201S** bzw. 1 % DMSO als Vehikelkontrolle behandelt, bevor ActivX™ Desthiobiotin-ATP-Proben zur Markierung nicht-gebundener ATPasen zugegeben wurde. Desthiobiotin-ATP-markierte Proteine wurden über eine Streptavidin-Agarose-Matrix immobilisiert. Dargestellt ist repräsentatives Ergebnis ($n = 3$).

6.2.8 Ermittlung des Bindungsmechanismus durch Co-Kristallisation von MAP4K4 und PS201S

Für eine detaillierte Charakterisierung des Bindungsmechanismus von **PS201S** wurde eine Co-Kristallstruktur von humanem Wildtyp-MAP4K4 mit der Substanz angefertigt. Die Aufreinigung der Kinase und die folgende Kristallisierung wurde von Dr. André Richters, Dr. Christian Becker und M.Sc. Stefan Kleine in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Daniel Rauh (Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund) durchgeführt. Die Analyse der Kristallstruktur ergab eine Typ I-Bindung des Inhibitors an MAP4K4, welche in der aktiven „DFG-in“-Konformation vorlag. Die Bindung erfolgte über das Pyridon-Grundgerüst, und zwar über Wasserstoffbrücken an Glu106 und Cys108. Diese Aminosäuren befinden sich in der sogenannten Scharnierregion (engl. *hinge region*), die dem Protein die Konformationsänderungen zwischen katalytisch aktiver und inaktiver Form ermöglicht. Dadurch wäre die *hinge region* beim Vorliegen der katalytisch inaktiven Form für den Inhibitor nicht zugänglich. Die 4-Hydroxyphenylgruppe bildet zudem eine Wasserstoffbrückenbindung zu Lys54 aus und fixiert dadurch die Bindung des Inhibitors, der zusätzlich von Tyr36 flankiert wird (Abbildung 6.19).

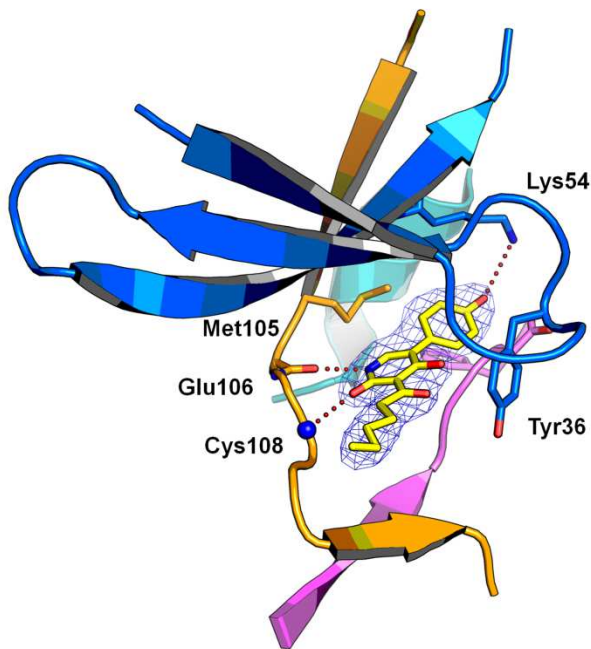


Abbildung 6.19: Kristallstruktur von Wildtyp-MAP4K4 im Komplex mit PS201S (Auflösung 2.1 Å)

Die Elektronendichte (2F₀-F_c) ist bei 1 σ konturiert. Wasserstoffbrücken sind durch rote gepunktete Linien dargestellt. Die Kinase befindet sich in der aktiven „DFG-in“-Konformation. Farbkodierung: Scharnierregion (orange), Helix C (türkis), DFG-Motif (pink), Glycin-reiche Schleife (blau), **PS201S** (gelbe Struktur).

6.2.9 Neuroprotektive Effekte von MILI A-inspirierten Substanzen

Zur weiteren Charakterisierung der MILI A-inspirierten Verbindungen wurde eine Auswahl der Substanzen auf neuroprotektive Effekte in undifferenzierten SH-SY5Y-Zellen untersucht. Ein entsprechendes Testsystem wurde von B.Sc. Johanna Ebbeskotte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie etabliert und angewandt.^[129] Die Zellen wurden zunächst mit den Testsubstanzen, anschließend mit L-Glutaminsäure zur Induzierung exzitotoxischer Bedingungen behandelt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe einer Hoechst 33342- und Calcein-AM-Färbung bestimmt. Calcein-AM wird durch intrazelluläre Esterasen zum fluoreszierenden Calcein konvertiert. Dazu sind jedoch nur intakte Zellen in der Lage, da diese die notwendige Esteraseaktivität besitzen.^[178] Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die DNA hierbei mit Hoechst 33342 gefärbt, da DAPI aufgrund der langsamen Signalentwicklung in lebenden Zellen nicht geeignet war.^[179]

Als stark neuroprotektive Substanz wurde die 2,4-Dimethoxypyridinverbindung **PS574S** identifiziert (Abbildung 6.20A). Die Behandlung der Zellen führte zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Steigerung der Zellviabilität (Abbildung 6.20B-C). Im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen wurde die Anzahl an intakten Zellen durch vorherige Inkubation

mit 30 μM **PS574S** um 170 % gesteigert. Der Effekt nahm bei Verringerung der Konzentration auf 10 und 1 μM auf 120 % bzw. 33 % ab. Da die Intensität der immunzytochemischen Färbung durch Calcein-AM als Maß für die Viabilität der einzelnen Zellen herangezogen wurde, war der protektive Effekt von **PS574S** anhand der Bilddaten ebenfalls deutlich erkennbar. Zellen, die mit DMSO und L-Glutaminsäure behandelt worden waren, wiesen eine geringe Anzahl von Zellen mit Calcein-AM-Färbung auf, während im Fall höherer Konzentrationen von **PS574S** der Großteil der Zellen eine intensive Färbung zeigte, was auf eine erhöhte Zellviabilität hinwies. Der gleiche neuroprotektive Effekt mit ähnlicher Steigerung der Zellviabilität war auch nach der Behandlung mit den Kontrollsubstanzen Pregnenolon und Progesteron nachweisbar. Beide Substanzen sind als neuroprotektiv beschrieben worden,^[130] was in vorangegangenen Experimenten im verwendeten Testsystem bestätigt wurde.

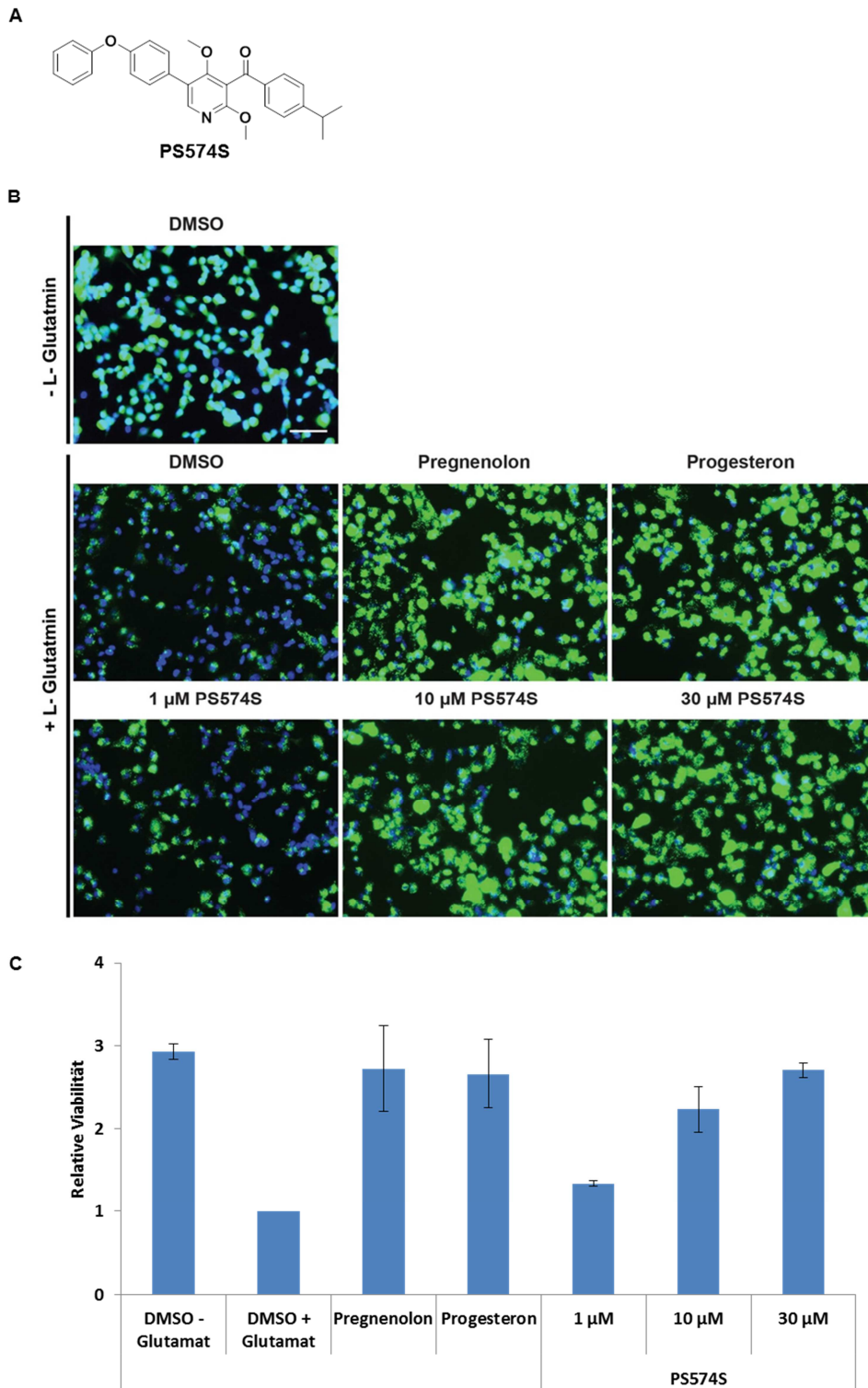


Abbildung 6.20: Neuroprotektiver Effekt der MILI A-inspirierten Pyridinverbindung PS574S in SH-SY5Y-Zellen

Undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 h mit 1 – 30 μM **PS574S** behandelt, bevor für 3,5 h mit 50 mM L-Glutaminsäure zur Induzierung von Exzitotoxizität inkubiert wurde. **[A]** Chemische Struktur von **PS574S**. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach der Substanzbehandlung. Dargestellt sind Überlagerungsbilder der jeweiligen DNA- (blau, Hoechst 33342) und Calcein-AM-Färbung (grün). Maßstabsbalken: 50 μm . **[C]** Quantifizierung der relativen Viabilität der Zellen nach der Substanzbehandlung im Verhältnis zur entsprechenden Vehikelkontrolle (DMSO + Glutamat). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$).

6.3 Identifizierung von antimitotischen MILI A-Derivaten

6.3.1 Phänotypische Effekte von MILI A-Derivaten

35 ausgewählte Verbindungen der MILI A-inspirierten Substanzkollektion wurden in der humanen Gebärmutterhalskrebszelllinie HeLa auf die Auslösung phänotypischer Veränderungen im Hinblick auf das Zytoskelett und die Mitose getestet. Dazu wurden HeLa-Zellen mit 30 μM jeder Substanz für 24 h behandelt und im Anschluss immunzytochemisch angefärbt. Hierbei diente DAPI zur Färbung der DNA und Bestimmung der Zellzahl, während durch die Färbung von Tubulin und Aktin die Hauptbestandteile des Zytoskeletts visualisiert wurden.

Sechs Substanzen führten zu einer phänotypischen Veränderung von HeLa-Zellen, die im Anschluss an die Behandlung eine erhöhte Anzahl abgerundeter Zellen und damit einhergehende intensive Färbung der Mikrotubuli aufwiesen (Abbildung 6.21 und Abbildung 6.22). Der stärkste Effekt konnte nach Behandlung mit den Verbindungen **PS222S**, **PS229S**, **PS238S** und **PS240S** beobachtet werden. **PS179S** und **PS227S** bewirkten in einem geringeren Anteil der Zellen phänotypische Veränderungen. Der Phänotyp suggerierte einen partiellen mitotischen Arrest der Zellpopulation. Ähnliche Effekte sind nach Behandlung mit Substanzen wie Taxol und Nocodazol nachweisbar,^[180] die mitotischen Arrest bewirken. In einigen Fällen war zusätzlich eine geringere Zellzahl zu verzeichnen, was zellschädigende bzw. zytotoxische Effekte als Folge der mitotischen Dysfunktion darstellt.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen zu neuromodulatorischen Effekten der MILI A-inspirierten Substanzen (Kapitel 6.2.1) zählten die potentiell antimitotischen Vertreter dieser Substanzbibliothek ausschließlich zu den 2,4-Dimethoxypyridinverbindungen. Insgesamt wiesen alle aktiven Moleküle kleinere Substituenten am Acylrest des Grundgerüsts auf. Drei der Substanzen besaßen einen fluorierten Phenylring, während der Substituent bei zwei Verbindungen hydroxyliert war. **PS229S** hingegen beinhaltete zwei Methoxysubstituenten am Phenylring.

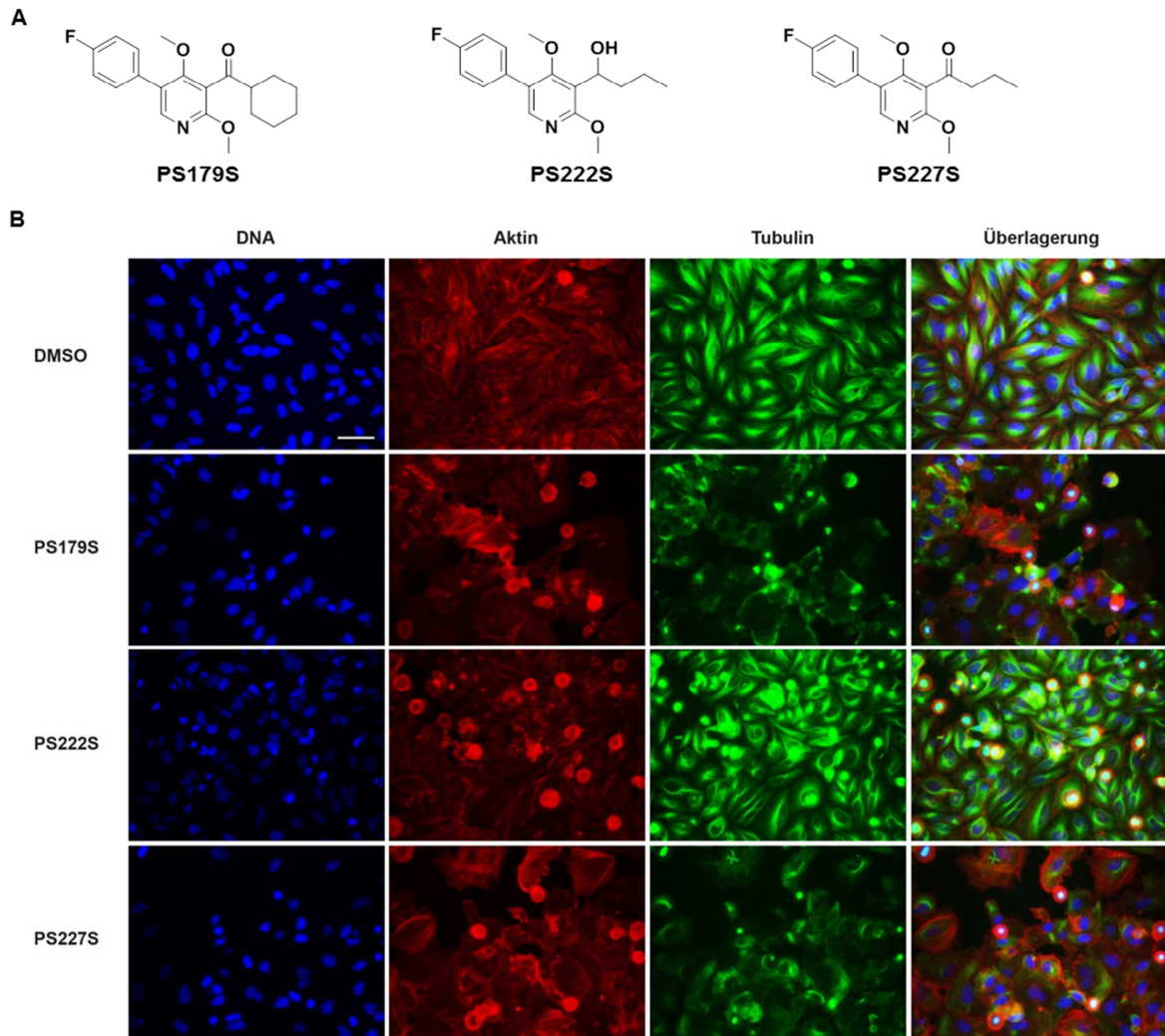


Abbildung 6.21: Phänotypische Veränderungen in HeLa-Zellen nach Behandlung mit MILI A-inspirierten Verbindungen

[A] Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Applikation von 30 μM der Substanzen über 24 h. Dargestellt sind DNA- (DAPI, blau), α -Tubulin- (FITC-gekoppelter α -Tubulin-Antikörper, grün) und Aktinfärbung (TRITC-Phalloidin, rot) sowie ein entsprechendes Überlagerungsbild. Maßstabsbalken: 50 μm .

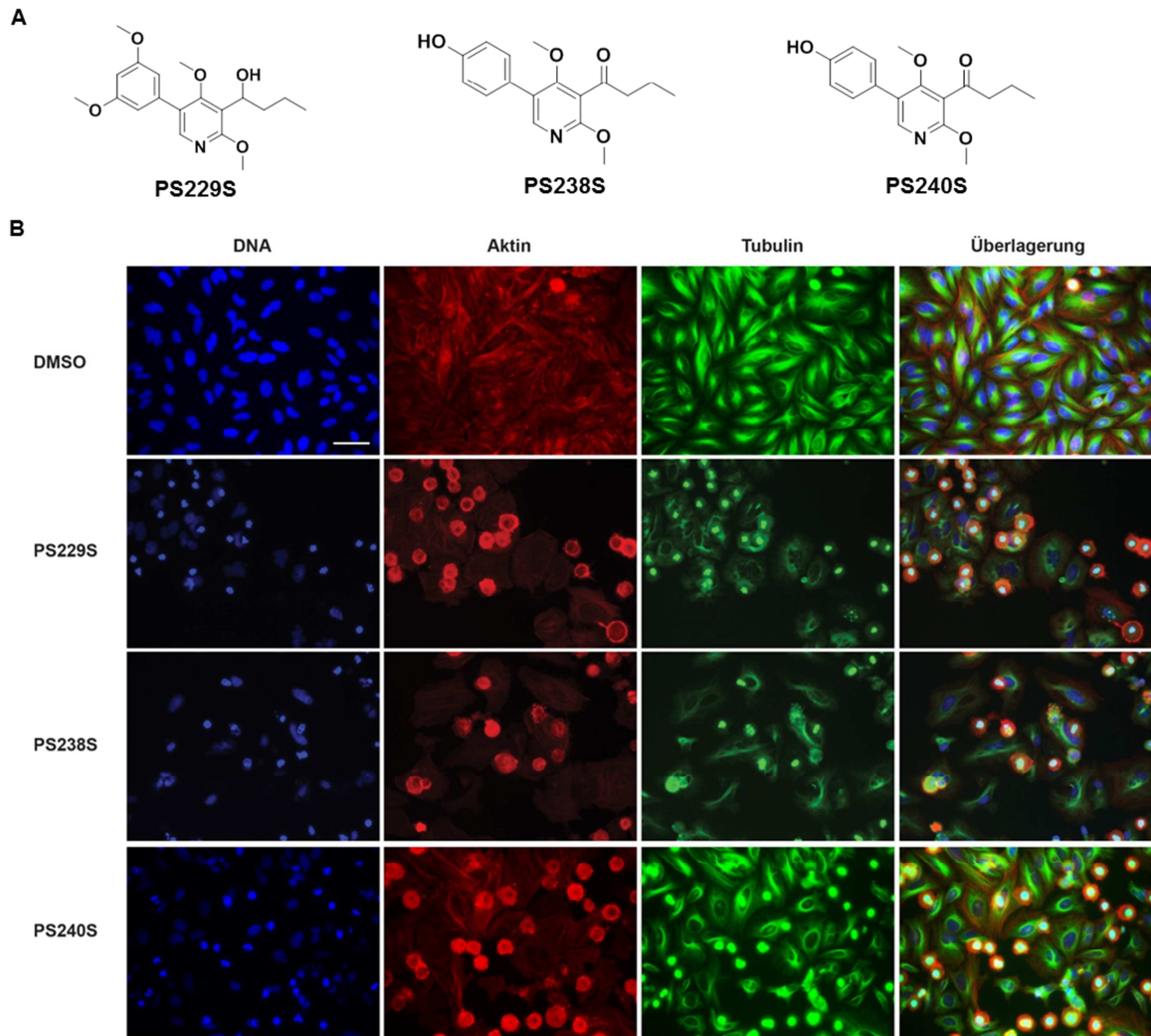


Abbildung 6.22: Phänotypische Veränderungen in HeLa-Zellen nach Behandlung mit MILI A-inspirierten Verbindungen

[A] Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Applikation von 30 μM der Substanzen über 24 h. Dargestellt sind DNA- (DAPI, blau), α -Tubulin- (FITC-gekoppelter α -Tubulin-Antikörper, grün) und Aktinfärbung (TRITC-Phalloidin, rot) sowie ein entsprechendes Überlagerungsbild. Maßstabsbalken: 50 μm .

Um einen mitotischen Arrest in den abgerundeten HeLa-Zellen mit intensiver Tubulin-Färbung zu bestätigen, wurden die Zellen in weiteren Untersuchungen mit einem Alexa 594-gekoppelten phospho-Histon H3-Antikörper immunzytochemisch gefärbt. Das Vorliegen von Histon H3 in dem phosphorylierten Zustand ist ein Indikator für in Mitose befindliche Zellen.^[181] Daher kann ein intensives Signal nach der Färbung von phospho-Histon H3 als Maß für mitotische Zellen verwendet werden. Hierzu wurde zur halbautomatischen Auswertung mit der MetaMorph®-Software anhand von Testanalysen ein Richtwert bestimmt, der als Grenzwert für die Detektion von mitotischen Zellen galt. Zellen mit einer Fluoreszenzintensität über diesem Grenzwert wurden als mitotische Zellen gewertet.

Die quantitative Auswertung verdeutlichte die Akkumulierung von mitotischen Zellen im Fall der Behandlung mit **PS229S** und **PS238S** (Abbildung 6.23). **PS238S** verursachte einen Anstieg der mitotischen Zellen auf 12 – 13 %, wenn 25 – 50 µM der Substanz hinzugegeben wurden. Die Behandlung mit 25 µM **PS229S** löste dagegen bereits einen Anteil von 20 % an mitotischen Zellen aus. Im Vergleich wiesen DMSO-behandelte Kontrollproben lediglich 2 % mitotische Zellen auf, weshalb **PS229S** einen 10-fachen Anstieg an Zellen in der Mitose bei einer Konz von 25 µM bewirkte.

Für die weiteren Substanzen **PS179S**, **PS222S**, **PS227S** und **PS240S** konnte ein antimitotischer Effekt mit Hilfe der Analyse phospho-Histon H3-positiver Zellen nicht bestätigt werden. Keine der Substanzen bewirkte eine deutliche Erhöhung des Anteils mitotischer Zellen.

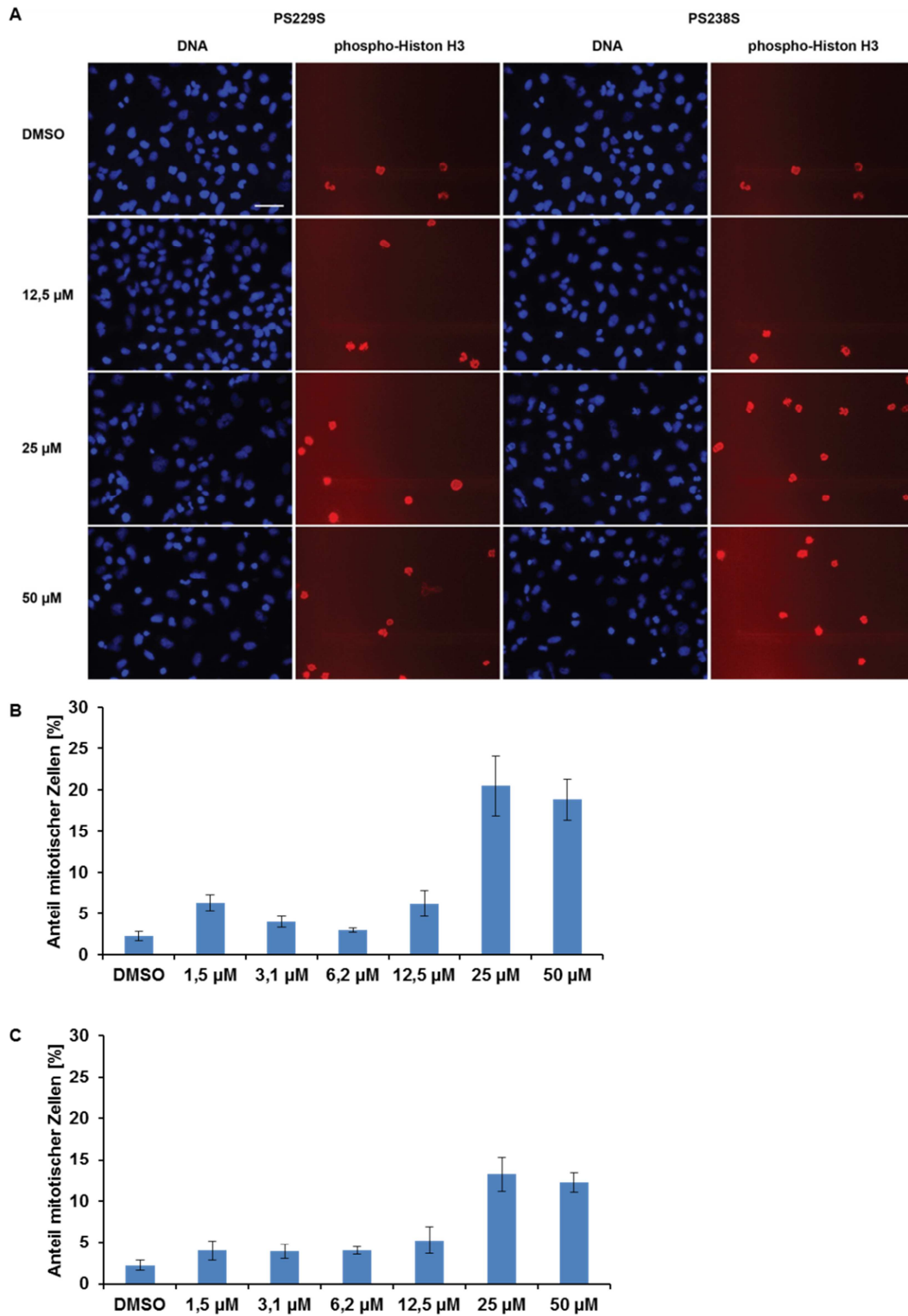


Abbildung 6.23: Quantitative Analyse von mitotischen HeLa-Zellen nach Applikation von PS229S und PS238S

[A] Beispielaufnahmen der Zellen nach Applikation von 30 µM der Substanzen über 24 h. Dargestellt sind DNA- (DAPI, blau) und phospho-Histon H3-Färbung (anti-phospho-Histon H3 Alexa 594, rot). Maßstabsbalken: 50 µm. **[B-C]** Quantitative Analyse der mitotischen HeLa-Zellen nach Behandlung mit **[B]** PS229S und **[C]** PS238S. Dargestellt ist der gemittelte Anteil an mitotischen Zellen der Einzelbilder im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ± Standardabweichung (n = 10 – 18).

6.3.2 Beeinflussung der Tubulin-Polymerisation durch MILI A-Derivate

Die Substanzen, die einen mitotischen Arrest auslösen, wurden in Hinblick auf eine Beeinflussung der Tubulin-Polymerisation untersucht. Mit Hilfe eines entsprechenden Testsystems lässt sich ein stabilisierender oder destabilisierender Effekt auf Tubulin aufzeigen. Stabilisierende Substanzen wie Taxol lösen eine rasche Polymerisation unmittelbar nach Reaktionsstart aus, während Destabilisatoren wie Nocodazol eine verzögerte Polymerisation bewirken, welche zusätzlich in einem Sättigungsprozess bei geringeren Absorptionswerten resultieren kann. Die Polymerisation von Tubulin wurde durch Zugabe von 0,5 mM GTP gestartet und die Entwicklung photometrisch in kurzen Abständen über einen Zeitraum von 60 min bestimmt. Für beide Substanzen konnte so gezeigt werden, dass die Polymerisation von Tubulin im Vergleich zu der DMSO-behandelten Probe leicht verzögert startete. Im Übrigen wurde bereits bei geringerer Absorption eine Sättigung erreicht, so dass eine leichte Beeinflussung der Tubulin-Polymerisation angenommen werden kann. Die Effekte sind jedoch als nicht sehr stark einzuschätzen, da die destabilisierende Substanz Nocodazol, welche in einer Konzentration von 1 μM als Kontrollprobe mitgeführt wurde, einen deutlich flacheren Kurvenverlauf nimmt und bei bereits geringeren Werten eine Sättigung erreicht (Abbildung 6.24).

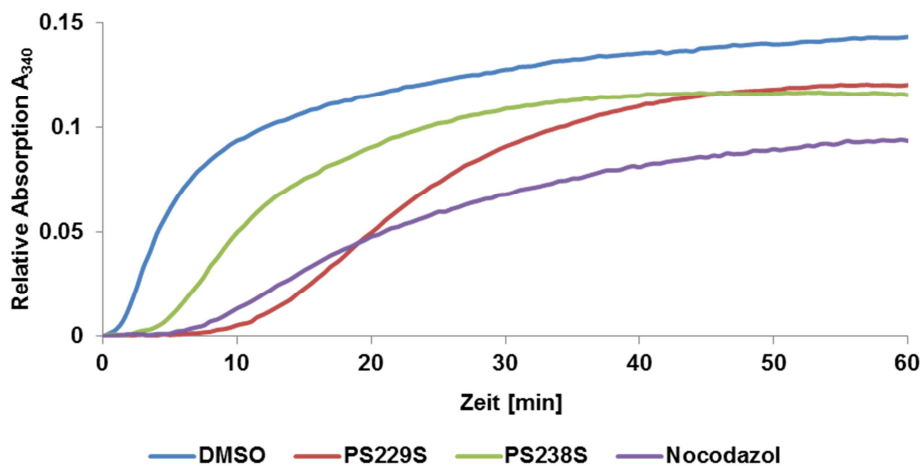


Abbildung 6.24: Einfluss der MILI A-Derivate PS229S und PS238S auf die *in vitro* Polymerisation von Tubulin

50 μM der Testsubstanzen bzw. 1 μM Nocodazol wurden mit 10 μM Tubulin für 20 Minuten bei Raumtemperatur und für 20 Minuten auf Eis zur erneuten Depolymerisation inkubiert. GTP wurde unmittelbar vor dem Start der Messung appliziert. Die Absorptionmessung bei 340 nm erfolgte jede 30 s über eine Zeitspanne von 60 Minuten. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden für jede Substanz auf den Wert 0 bei Zeitpunkt $t = 0$ normalisiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Datensatz ($n = 3$).

6.4 Identifizierung von Secoyohimbanen mit neuritogenen Effekten

In einem weiteren Projekt zur Identifizierung möglicher neuritogen wirkender Naturstoffderivate wurde eine Substanzbibliothek untersucht, welche aus Verbindungen mit der Secoyohimban-Kernstruktur besteht. Diese Kollektion wurde von Dr. Sara López-Tosco und Dr. Andrey Antonchick in der Abteilung Chemische Biologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie synthetisiert. Als prävalidierter Startpunkt zur Synthese dieser Substanzbibliothek dienten die Verbindungen Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin.^[54] Aufgrund der vielfältigen neuroaktiven Effekte dieser Verbindungen sollte die Bibliothek auf eine Beeinflussung des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen getestet werden.

13 Verbindungen wurden im Vorfeld der Untersuchungen am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie bereits auf primäre Rattenneuronen bei der Firma Neuro-Zone getestet. Die neuroprotektiven Naturstoffe Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin wiesen hierbei eine Steigerung des Neuritenwachstums von 13,3 % bzw. 18,1 % bei Applikation einer Konzentration von 1 μM auf. Der Effekt konnte bei der Testung von 10 μM für beide Substanzen allerdings nicht bestätigt werden (- 2,6 % bzw. - 0,1 %). Einzelne Substanzen aus der Secoyohimban-inspirierten Substanzbibliothek bewirkten ähnliche Effekte bei Behandlung mit 1 μM , was jedoch ebenfalls bei einer Erhöhung der Substanzkonzentration nicht verifiziert wurde (Anhang, Tabelle 13.3).

Insgesamt wurden 85 niedermolekulare Substanzen mit einer Konzentration von 10 μM auf neuromodulatorische Effekte in SH-SY5Y getestet, zusätzlich wurden auch die Ausgangssubstanzen Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin untersucht.

6.4.1 Effekte von Secoyohimbanen auf das Neuritenwachstum

Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin zeigten keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum: Beide Substanzen führten im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen zu keiner phänotypischen Veränderung in SH-SY5Y-Zellen. Ebenso war das Neuritenwachstum nach Substanzapplikation mit einer geringfügigen Abnahme von 12 % dem der Kontrolle ähnlich (Abbildung 6.25). Dies stimmt mit Angaben in der Literatur überein, da beide Substanzen als neuroprotektiv beschrieben sind und für Rhynchophyllin gezeigt wurde, dass es Zellen vor induziertem Neuritenwachstum unter bestimmten Bedingungen schützt.^[182] Des Weiteren sind in der Literatur keine Veröffentlichungen auffindbar, die eine neurotrophe Wirkung von Rhynchophyllin oder Isorhynchophyllin beschreiben.

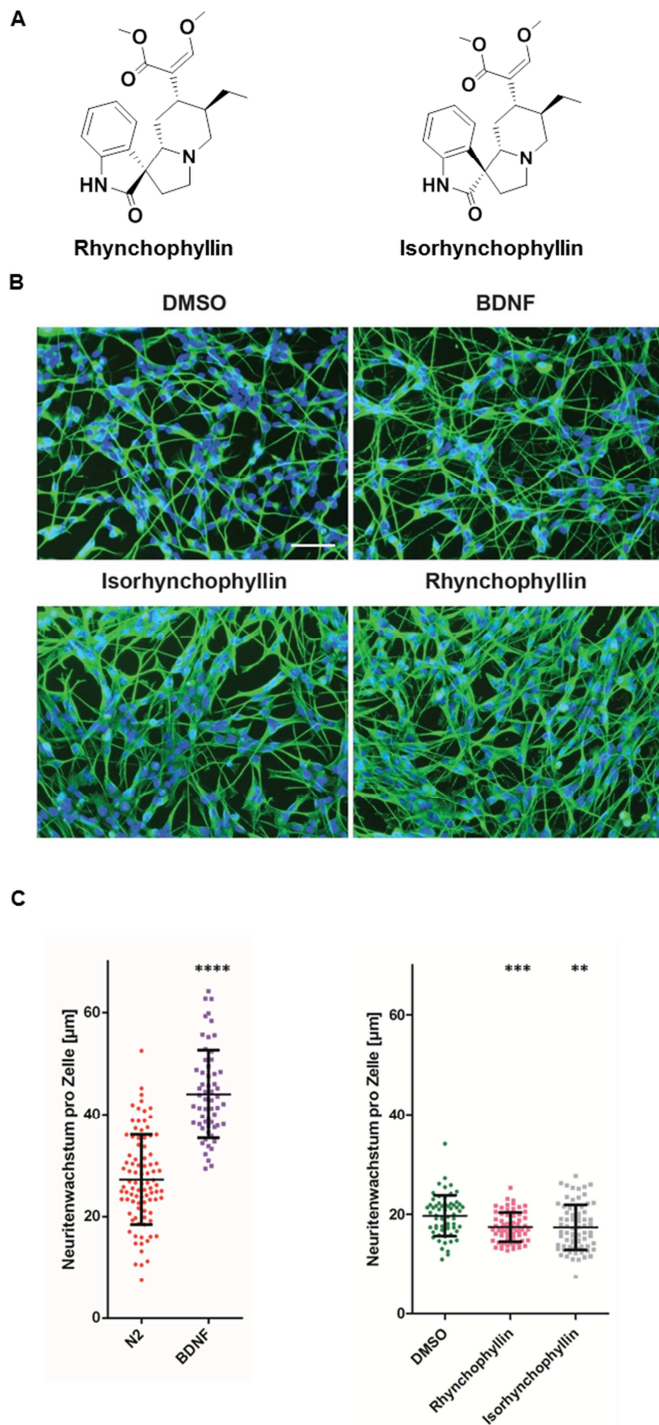


Abbildung 6.25: Einfluss von Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 μM der jeweiligen Substanz behandelt. **[A]** Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μm . **[C]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle ($n = 61 - 91$). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-test ermittelt (****: $p < 0,0001$).

Eine Auswahl an Secoyohimban-Derivaten war bereits zuvor auf neuritogene Aktivität hin untersucht worden.^[8a] Hierbei zeigten das *para*-Trifluoromethylphenyl-Derivat (+)-**6ba** und das *para*-Methoxyphenyl-Derivat (+)-**6fa** einen neurotrophen Effekt auf Motoneuronen, die durch Ausdifferenzierung aus embryonalen Stammzellen gewonnen worden waren. Die Gesamtneuritenlänge pro Zelle wurde durch beide Substanzen um ca. 20 - 30 % im Vergleich zur Vehikelkontrolle DMSO gesteigert, während die Positivkontrolle BDNF als 100 % Steigerung definiert war. Des Weiteren war eine Erhöhung der Anzahl an Verzweigungspunkten nachweisbar. In einem zweiten Experiment wurden hippokampale Rattenneuronen mit den Secoyohimbanen behandelt, wobei sich die Behandlung mit (+)-**6ia** und (+)-**6na** positiv auf das Neuritenwachstum auswirkte. Insbesondere (+)-**6ia** förderte in hohem Maße die Länge der einzelnen Neuronen, während die Anzahl der Neuriten pro Zelle im Vergleich zur Vehikelkontrolle deutlich abnahm. Insgesamt wurde die Gesamtneuritenlänge pro Zelle durch die Behandlung mit den beiden Substanzen um ca. 20 % gesteigert.^[8a]

Die vier Substanzen und deren entsprechenden Enantiomere wurden daher auf Modulation des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen untersucht, zeigten jedoch im etablierten Testsystem keinen Einfluss auf die Neuritenlänge pro Zelle. Im Fall der aktiv auf Motoneuronen getesteten Verbindungen wiesen die Zellen lediglich nach Behandlung mit (+)-**6ba** eine geringfügige Steigerung der Neuritenlänge pro Zelle auf (8 %), während die anderen Verbindungen keine Änderung oder sogar eine leichte Abnahme der Neuritenlänge (bis zu 10 %) verursachten. In Vergleich führte die Applikation von BDNF zu einer Erhöhung der durchschnittlichen Neuritenlänge von 66 %. Phänotypisch waren ebenfalls keine Änderungen nach Applikation der Secoyohimbane zu beobachten. Eine Verdichtung des neuronalen Netzwerkes war nicht auszumachen (Abbildung 6.26).

Phänotypische Veränderungen nach Behandlung mit den Substanzen, welche positiv auf Hippokampus-Neuronen von Ratten getestet worden waren, konnten ebenfalls nicht identifiziert werden (Abbildung 6.27). Die Substanzen lösten lediglich marginale Veränderungen der Neuritenlänge pro Zelle aus, eine Abnahme von 12 % bis hin zu einer Steigerung von 2 %. Hierbei konnte vom Enantiomerenpaar **6na** lediglich (+)-**6na** getestet werden, da das andere Enantiomer nicht stabil war.

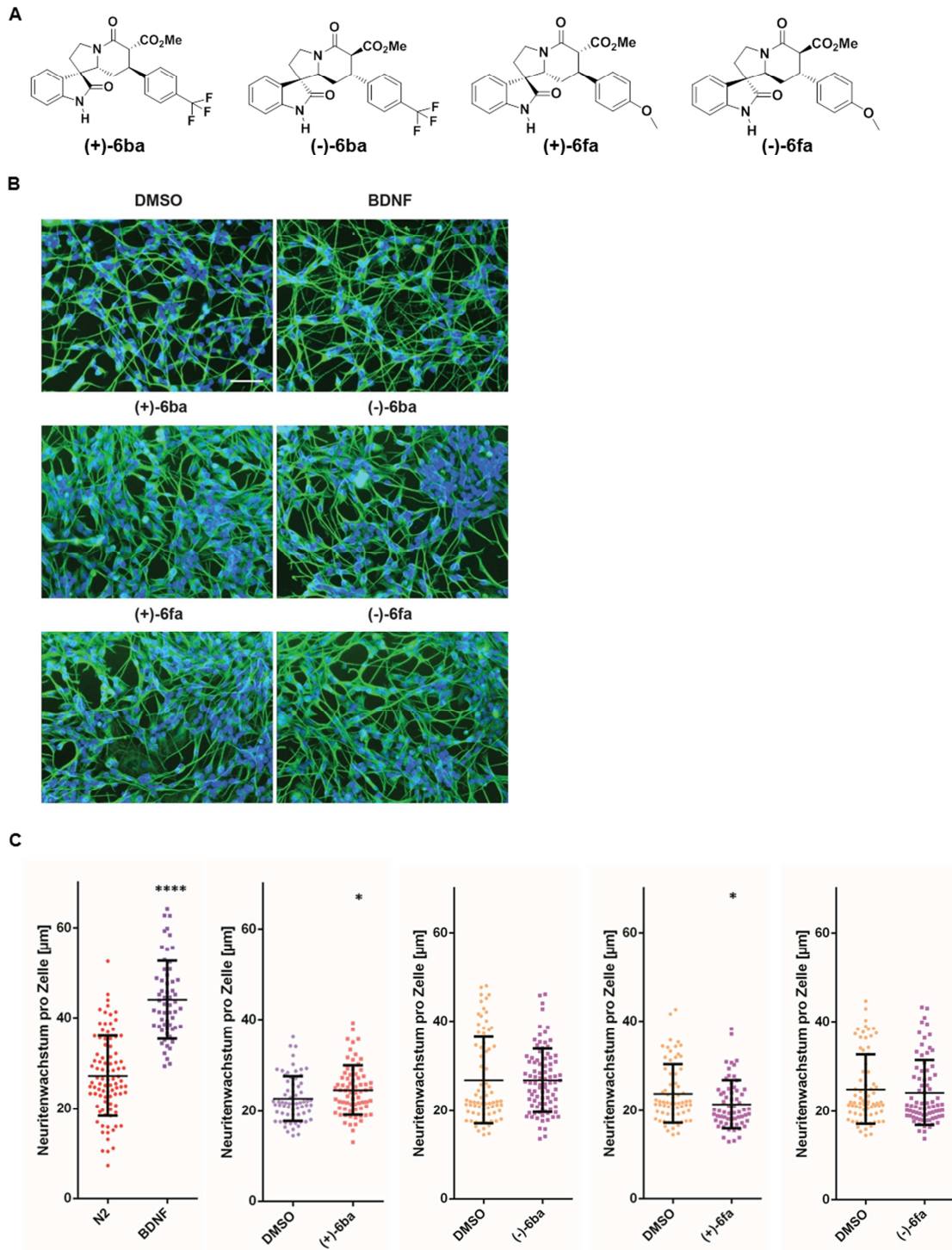


Abbildung 6.26: Einfluss von Secoyohimbanen mit ausgeprägten Effekten auf Motoneuronen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 µM der jeweiligen Substanz behandelt. **[A]** Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α-Tubulin-Färbung (grün, α-Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 µm. **[C]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 37 - 90). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: p < 0,0001; *: p < 0,05).

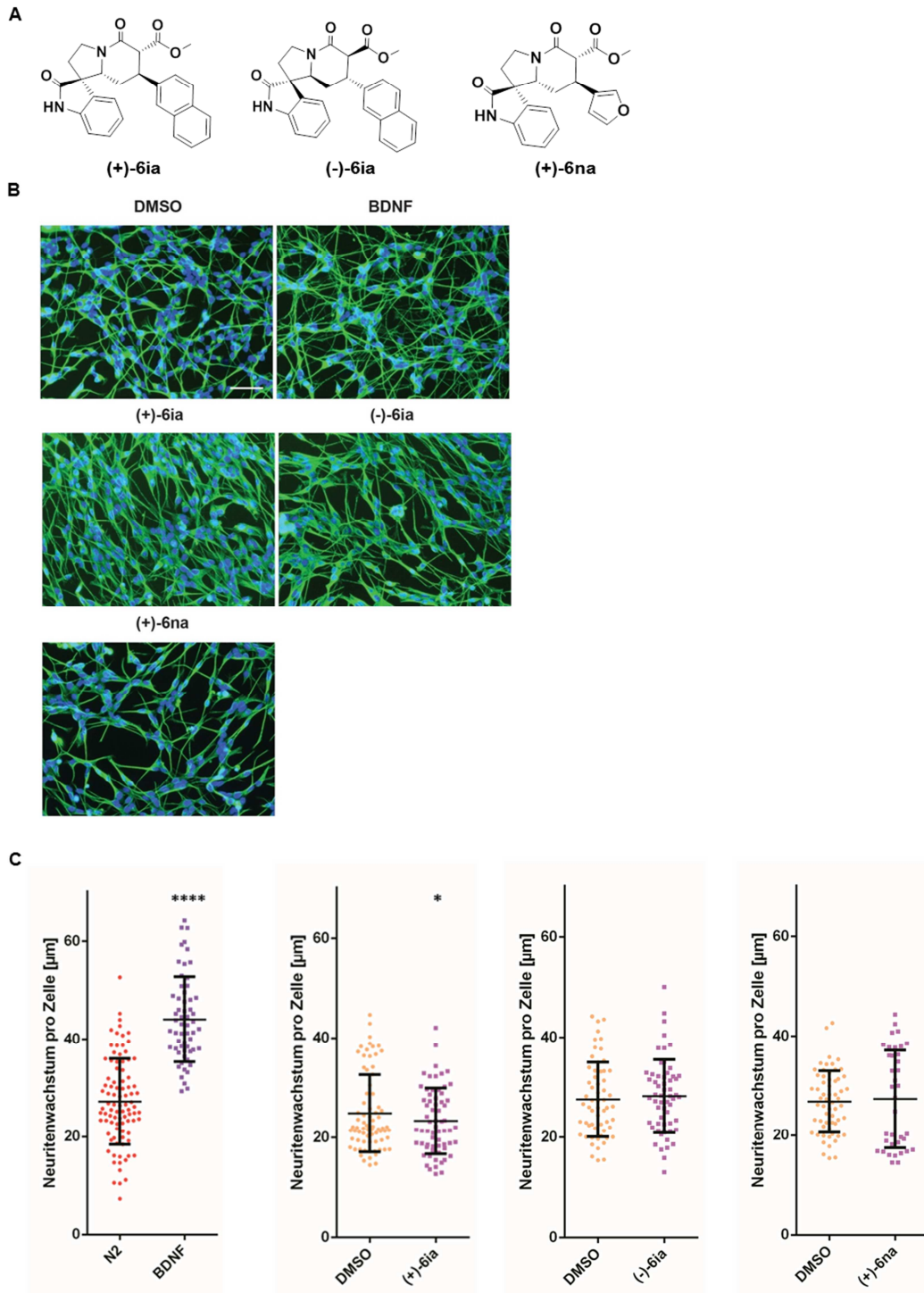


Abbildung 6.27: Einfluss von Secoyohimbanen mit ausgeprägten Effekten auf hippocampale Rattenneuronen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 µM der jeweiligen Substanz behandelt. **[A]** Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α-Tubulin-Färbung (grün, α-Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 µm. **[C]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 37 - 90). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: p < 0,0001; *: p < 0,05).

Zwei Enantiomerenpaare aus der Secoyohimban-inspirierten Substanzkollektion konnten erfolgreich als Modulatoren des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 6.28). (+)-**6ra** zeigte hierbei die stärkste Aktivität, indem die Neuritenlänge bei einer Konzentration von 1 μM um 42 % gesteigert werden konnte. Behandlungen mit 10 μM der Substanz führten zu zytotoxischen Effekten in SH-SY5Y-Zellen. Das entsprechende Enantiomer (-)-**6ra** erhöhte das Neuritenwachstum um 47 % bei Applikation von 10 μM der Substanz. (+)-**6qa** erhöhte die Neuritenlänge um 61 %, während (-)-**6qa** zu einer Steigerung von 20 % führte. Die Effekte beider Substanzen waren ebenfalls nach Applikation von 10 μM nachweisbar. Die neuritogenen Enantiomerenpaare tragen eine Furylgruppe mit 2-Chlorophenyl- bzw. 2,3-Dichlorophenylsubstituenten.

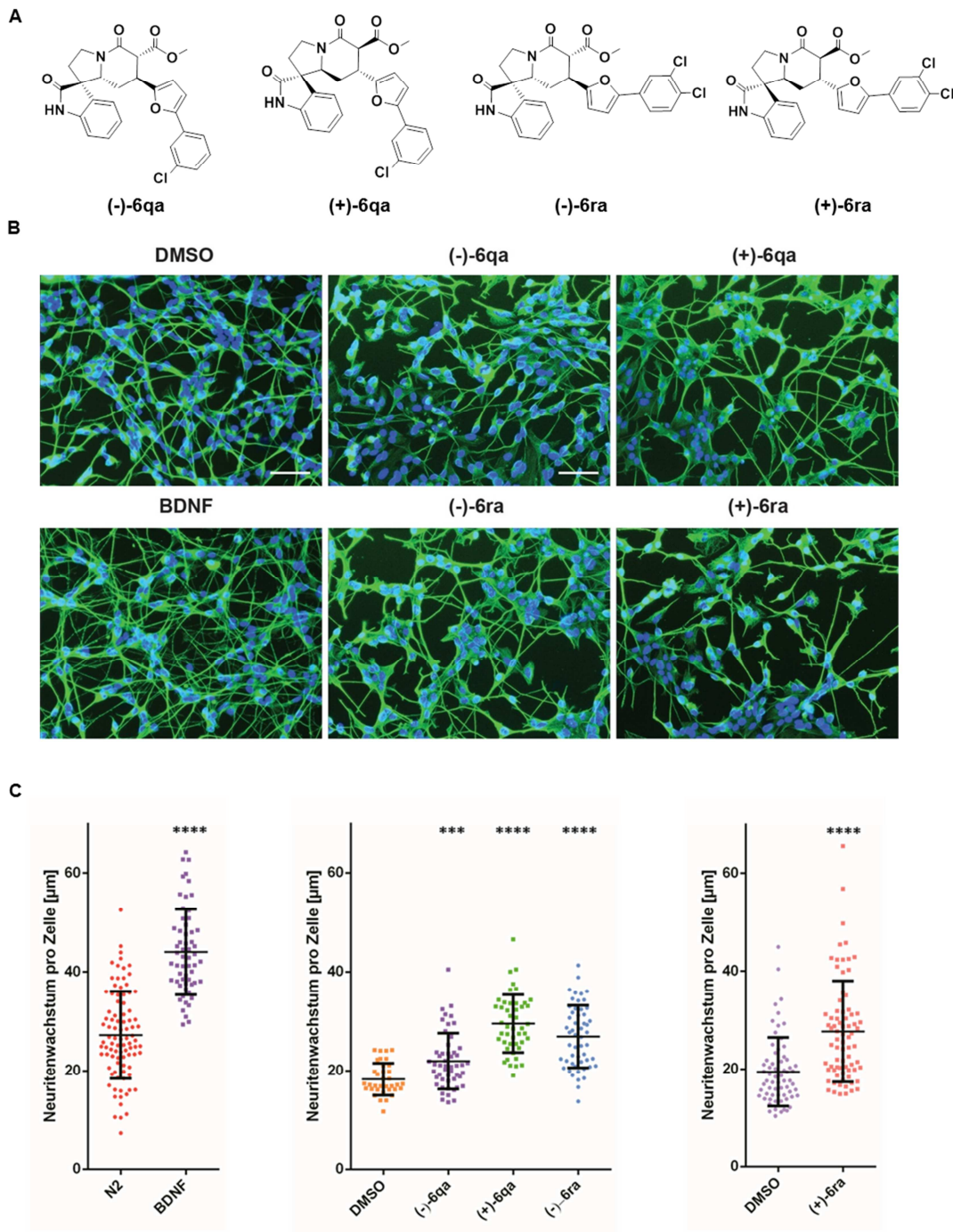


Abbildung 6.28: Neurotrophe Eigenschaften von Secoyohimbanen in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 1 μM (+)-**6ra** bzw. mit 10 μM der anderen Substanzen behandelt. **[A]** Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μm . **[C]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle ($n = 35 - 91$). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-test ermittelt (****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$).

6.4.2 Einfluss neuritogener Secoyohimbane auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl

Zur näheren Charakterisierung der Secoyohimban-inspirierten Substanzen wurden auch deren Effekte auf die Neuritenanzahl sowie die Anzahl an Verzweigungspunkten der Neuriten näher untersucht und quantifiziert (Tabelle 6.5). In Hinblick auf die Neuritenanzahl pro Zelle in SH-SY5Y-Zellen zeigte keine der Verbindungen eine deutliche Steigerung im Vergleich zur entsprechenden Vehikelkontrolle. Da jedoch auch die Positivkontrolle BDNF lediglich eine Steigerung von 13,5 % aufwies, sind die Angaben mit Vorsicht zu betrachten. Den stärksten Anstieg bewirkte (-)-**6ra** mit 17,0 %. Insgesamt waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den als neurotroph identifizierten und den inaktiven Substanzen nachweisbar.

Die Anzahl an Verzweigungspunkten war wie bereits bei vorherigen Untersuchungen dieses Parameters mit Werten von 0,3 – 1,7 sehr gering. Den stärksten Anstieg verzeichnete hier ebenfalls (-)-**6ra** mit 91,0 %, während die neurotrophe Kontrollsubstanz BDNF 52 % mehr Verzweigungspunkte als die entsprechende Kontrolle aufwies. Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin bewirkten keinerlei Änderung der Verzweigungsanzahl.

Tabelle 6.5: Einfluss von Secoyohimbanen auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 1 μ M (+)-6ra und mit 10 μ M aller anderen Substanzen behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Neuriten- und Verzweigungsanzahl pro Zelle der Einzelbilder im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 35 - 91). Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-test ermittelt (****: p < 0,0001; **: p < 0,01; *: p < 0,05). (Rhyn = Rhynchophyllin; Isorhyn = Isorhynchophyllin).

| | Neuritenanzahl | | | | Verzweigungsanzahl | | |
|----------------|----------------|---------------|-----------------|----------------|--------------------|---------------|-----------------|
| | Substanz | Kontrolle | Zu-/Abnahme [%] | | Substanz | Kontrolle | Zu-/Abnahme [%] |
| (+)-6qa | 1,7 \pm 0,4 | 1,6 \pm 0,4 | + 5,2**** | (+)-6qa | 0,6 \pm 0,3 | 0,4 \pm 0,2 | + 60,8**** |
| (-)-6qa | 1,8 \pm 0,5 | 1,6 \pm 0,4 | + 13,0** | (-)-6qa | 0,5 \pm 0,3 | 0,4 \pm 0,2 | + 37,0** |
| (+)-6ra | 2,2 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,3 | + 10,4**** | (+)-6ra | 0,6 \pm 0,3 | 0,3 \pm 0,2 | + 69,5**** |
| (-)-6ra | 1,9 \pm 0,3 | 1,6 \pm 0,4 | + 17,0**** | (-)-6ra | 0,7 \pm 0,4 | 0,4 \pm 0,2 | + 91,0**** |
| (+)-6na | 1,8 \pm 0,5 | 1,8 \pm 0,4 | - 0,6 | (+)-6na | | | |
| (+)-6ia | 1,8 \pm 0,5 | 1,8 \pm 0,4 | - 2,5 | (+)-6ia | | | |
| (-)-6ia | 1,7 \pm 0,6 | 1,8 \pm 0,4 | - 3,6**** | (-)-6ia | | | |
| (+)-6ba | 2,0 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | + 4,6** | (+)-6ba | | | |
| (-)-6ba | 2,0 \pm 0,2 | 1,9 \pm 0,2 | + 3,6* | (-)-6ba | | | |
| (+)-6fa | 1,9 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | - 3,8 | (+)-6fa | | | |
| (-)-6fa | 2,0 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,3 | + 2,9* | (-)-6fa | | | |
| BDNF | 2,1 \pm 0,4 | 1,8 \pm 0,3 | + 13,5**** | BDNF | 1,7 \pm 0,5 | 1,1 \pm 0,8 | + 51,8**** |
| Rhyn | 1,7 \pm 0,2 | 1,8 \pm 0,2 | - 5,4** | Rhyn | 0,5 \pm 0,1 | 0,5 \pm 0,2 | - 8,5 |
| Isorhyn | 1,7 \pm 0,3 | 1,8 \pm 0,2 | - 7,1** | Isorhyn | 0,5 \pm 0,2 | 0,5 \pm 0,2 | - 5,9 |

6.4.3 Konzentrationsabhängigkeit der neuritogenen Effekte von Secoyohimbanen

Die neuritogenen Enantiomerenpaare wurden des Weiteren auch auf eine Konzentrationsabhängigkeit ihrer Wirkung in SH-SY5Y-Zellen getestet. Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 1, 5, 10 und 30 μM appliziert, wobei alle Verbindungen bei 30 μM zytotoxisch auf die Zellen wirkten. Die aktivste Substanz (+)-**6ra**, die das Neuritenwachstum bereits bei 1 μM steigern konnte, führte bei Applizierung von 5 μM zu Zellschädigungen und bei 10 μM zum Zelltod. Ein eindeutiger konzentrationsabhängiger Effekt konnte bei (+)-**6qa** ermittelt werden: Behandlung mit 1 μM der Substanz führte zu einem geringen Anstieg des Neuritenwachstum (9 %), während Konzentrationen von 5 μM und 10 μM den Effekt schrittweise verstärkten (25 % bzw. 50 %). Für die weiteren neuritogenen Substanzen (-)-**6qa** und (-)-**6ra** konnte kein konzentrationsabhängiger Effekt beobachtet werden (Abbildung 6.29).

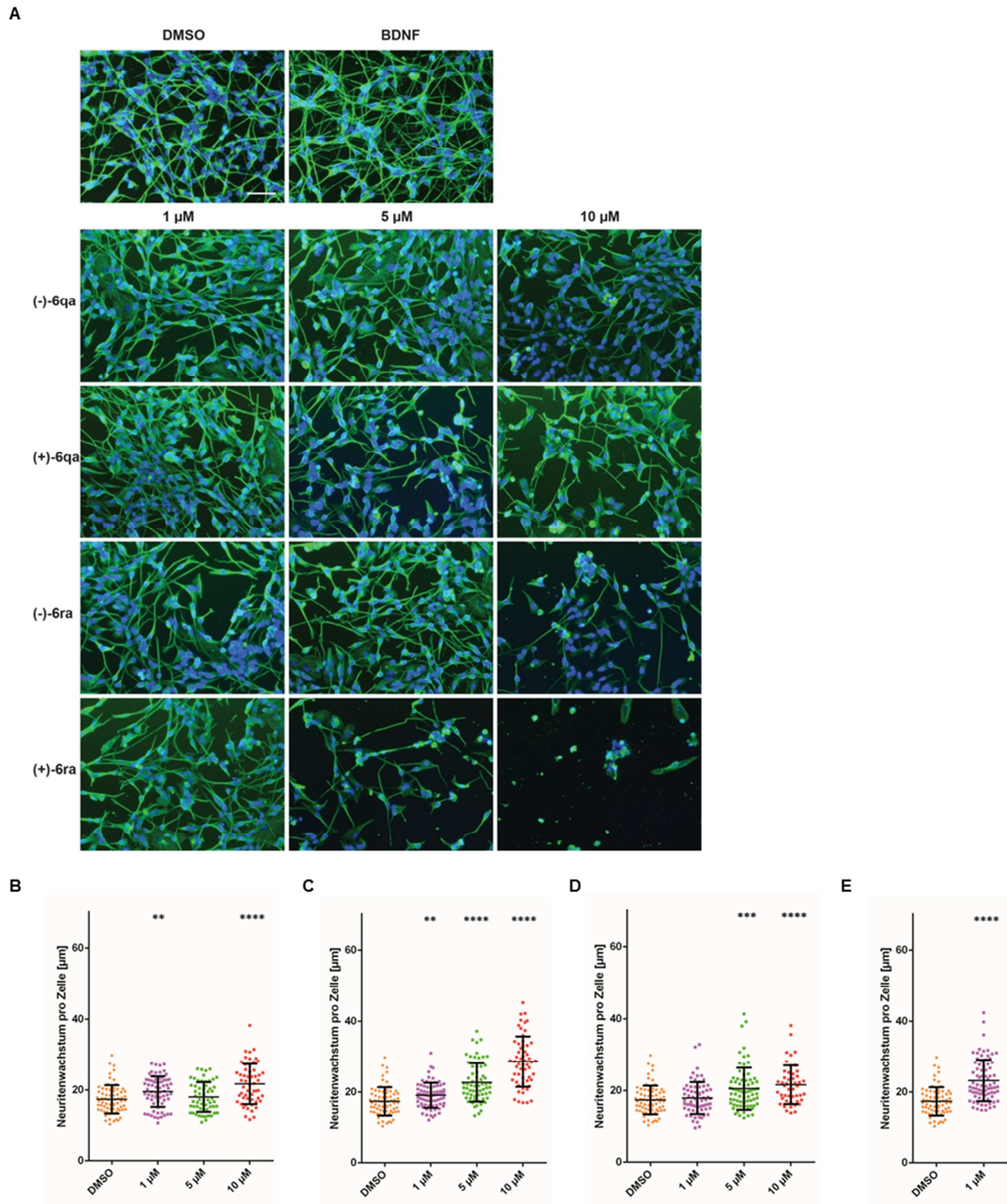


Abbildung 6.29: Konzentrationsabhängige Effekte der neurotrophen Secoyohimbane auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit den angegebenen Substanzkonzentrationen behandelt. **[A]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI) und α -Tubulin-Färbung (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper). Maßstabsbalken: 50 μ m. **[B-E]** Neuritenlänge pro Zelle nach Substanzbehandlung mit **[B]** (-)-6qa, **[C]** (+)-6qa, **[D]** (-)-6ra und **[E]** (+)-6ra. Dargestellt ist die Neuritenlänge pro Zelle jedes Einzelbildes als Datenpunkt, im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle ($n = 48 - 79$). Mittelwert und Standardabweichung sind durch schwarze Linien dargestellt. Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-test ermittelt (****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$).

Des Weiteren wurden auch die Parameter der Anzahl der Neuriten und Verzweigungspunkte in Hinblick auf konzentrationsabhängige Effekte durch die neuroaktiven Secoyohimbane getestet. Für keine der Substanzen konnte dabei eine schrittweise Erhöhung der Neuritenanzahl bei Erhöhung der applizierten Konzentration dargestellt werden. Die deutlichste Erhöhung der Neuritenanzahl wurde nach Behandlung mit 1 μM (+)-6ra gemessen (10,4 %). Auch die Positivkontrolle BDNF wies lediglich eine Steigerung von 13,5 % auf. Weitere Substanzen erhöhten die durchschnittliche Neuritenanzahl um maximal 8,8 % (Tabelle 6.6).

Tabelle 6.6: Konzentrationsabhängige Effekte der neurotrophen Secoyohimbane auf die Neuritenanzahl in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit den angegebenen Substanzkonzentrationen behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Neuritenanzahl pro Zelle der Einzelbilder im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (n = 48 - 79). Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-test ermittelt (****: p < 0,0001; **: p < 0,01). (Rhyn = Rhynchophyllin; Isorhyn = Isorhynchophyllin).

| | | Substanz | Kontrolle | Zu-/Abnahme [%] |
|---------|------------------|---------------|---------------|-----------------|
| (-)-6qa | 1 μM | 1,9 \pm 0,3 | 2,0 \pm 0,2 | - 0,7 |
| | 5 μM | 2,1 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | + 8,8**** |
| | 10 μM | 2,1 \pm 0,4 | 2,0 \pm 0,2 | + 8,0** |
| (+)6qa | 1 μM | 2,0 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | + 0,5 |
| | 5 μM | 2,0 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | - 0,1 |
| | 10 μM | 2,1 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | + 6,5** |
| (-)-6ra | 1 μM | 1,9 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | - 3,1 |
| | 5 μM | 2,0 \pm 0,3 | 2,0 \pm 0,2 | + 2,8 |
| | 10 μM | 2,0 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | + 2,1 |
| (+)-6ra | 1 μM | 2,2 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,2 | + 10,4**** |
| BDNF | | 2,1 \pm 0,4 | 1,8 \pm 0,3 | + 13,5 |
| Rhyn | | 1,7 \pm 0,2 | 1,8 \pm 0,2 | - 5,4 |
| Isorhyn | | 1,7 \pm 0,3 | 1,8 \pm 0,2 | - 7,1 |

Konzentrationsabhängige Steigerungen konnten nach Behandlung mit den neurotrophen Secoyohimbanen jedoch in Bezug auf die Verzweigungsanzahl bestimmt werden. Im Falle von (-)-**6qa** bewirkte die Substanzbehandlung mit steigenden Konzentrationen eine schrittweise prozentuale Zunahme der Anzahl an Verzweigungspunkten. Die Erhöhung stieg von 6,8 % bei Applikation von 1 μM auf bis zu 47,2 % bei 10 μM . Ebenso wurde bei Behandlung mit (-)-**6ra** eine Zunahme der Verzweigungsanzahl nur bei Konzentrationen von 5 – 10 μM detektiert, während 1 μM der Verbindung keine Auswirkungen auf diesen Parameter hatte. Im Falle von (+)-**6qa** war eine prozentuale Zunahme erst bei einer Konzentration von 10 μM bestimmbar. Substanz (+)-**6ra**, die nur bei 1 μM getestet werden konnte, wies die höchste Steigerung von 58,6 % auf, was eine größere Steigerung als bei der Positivkontrolle BDNF darstellte.

Tabelle 6.7: Konzentrationsabhängige Effekte der neurotrophen Secoyohimbane auf die Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit den angegebenen Substanzkonzentrationen behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Verzweigungsanzahl pro Zelle der Einzelbilder im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle (n = 80 - 81). Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-test ermittelt (****: p < 0,0001; ***: p < 0,001; **: p < 0,01; *: p < 0,05). (Rhyn = Rhynchophyllin; Isorhyn = Isorhynchophyllin).

| | | Substanz | Kontrolle | Zu-/Abnahme [%] |
|-----------------|------------------|---------------|---------------|-----------------|
| (-)- 6qa | 1 μM | 0,4 \pm 0,2 | 0,3 \pm 0,2 | + 6,8 |
| | 5 μM | 0,5 \pm 0,2 | 0,3 \pm 0,2 | + 33,2*** |
| | 10 μM | 0,5 \pm 0,3 | 0,3 \pm 0,2 | + 47,2*** |
| (+) 6qa | 1 μM | 0,3 \pm 0,2 | 0,3 \pm 0,2 | + 2,0 |
| | 5 μM | 0,3 \pm 0,2 | 0,3 \pm 0,2 | + 0,7 |
| | 10 μM | 0,5 \pm 0,3 | 0,3 \pm 0,2 | + 44,1**** |
| (-)- 6ra | 1 μM | 0,3 \pm 0,2 | 0,3 \pm 0,2 | - 12,8* |
| | 5 μM | 0,5 \pm 0,4 | 0,3 \pm 0,2 | + 41,1** |
| | 10 μM | 0,4 \pm 0,4 | 0,3 \pm 0,2 | + 32,6 |
| (+) 6ra | 1 μM | 0,5 \pm 0,2 | 0,3 \pm 0,2 | + 58,6**** |
| BDNF | | 1,7 \pm 0,5 | 1,1 \pm 0,8 | + 51,8 |
| Rhyn | | 0,5 \pm 0,1 | 0,5 \pm 0,2 | - 8,5 |
| Isorhyn | | 0,5 \pm 0,2 | 0,5 \pm 0,2 | - 5,9 |

6.5 Identifizierung von aktiven Substanzen aus einer Iridoid-inspirierten Substanzbibliothek

Neurobiologische Effekte von natürlich vorkommenden Iridoid-Glykosiden und Sesquiterpenoiden sind bereits bekannt.^[25, 183] Deren Kernstrukturen dienten als prävalidierte Startpunkte für die Synthese entsprechender Substanzkollektionen. Eine solche Substanzbibliothek wurde von Dr. Pierre-Yves Dakas am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie synthetisiert und beinhaltet Derivate von Naturstoffen mit dem Pentalenon- bzw. Cyclopenta[c]pyranon-Grundgerüst.^[8b]

Aufgrund der bekannten neuromodulatorischen Effekte von Iridoiden wurden 24 Vertreter der Substanzkollektion auf neurotrophe Einflüsse in primären hippocampalen Rattenneuronen getestet. Bei diesen Untersuchungen von der Firma Neuro-Zone konnte die Substanz **PYD2-16A1-1** mit einem erhöhten Neuritenwachstum von 21,4 % bei Applikation einer Konzentration von 1 µM ermittelt werden. Eine nachfolgende Testung von 10 µM der Substanz ergab mit 6,4 % einen deutlich geringeren Wert (Anhang, Tabelle 13.5).

6.5.1 Phänotypische Effekte von Iridoid-inspirierten Substanzen

Zunächst wurden HeLa-Zellen im zellbasierten Testverfahren auf phänotypische Veränderungen nach Behandlung mit 143 Substanzen dieser Kollektion untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit 30 µM jeder einzelnen Substanz behandelt und im Anschluss zur Visualisierung der DNA sowie der Zytoskelett-Bestandteile Aktin und Tubulin immunzytochemisch angefärbt. Nach Applikation mit **PYD1-72+247-1-1** und **PYD1-237C-1** konnten zahlreiche abgerundete Zellen mit intensiver Tubulin- und Aktin-Färbung detektiert werden. Eine dritte Substanz, **PYD1-235C-1**, zeigte einen leichteren Effekt mit ebenfalls einigen abgerundeten Zellen (Abbildung 6.30).

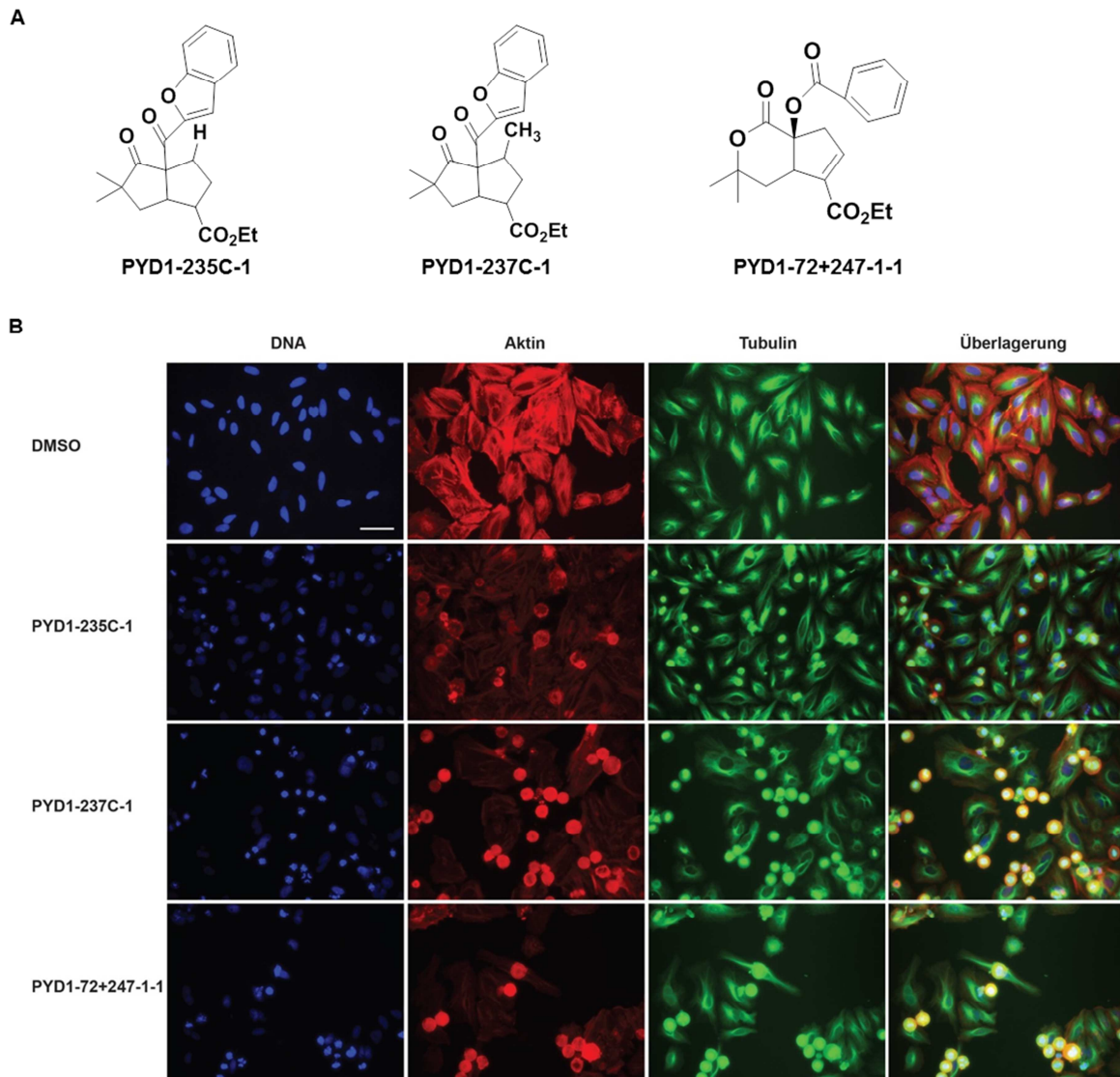


Abbildung 6.30: Einfluss von Iridoid-inspirierten Verbindungen auf HeLa-Zellen

[A] Chemische Strukturen der Substanzen. **[B]** Beispielaufnahmen der Zellen nach Applikation von 30 μM der Substanzen über 24 h. Dargestellt sind DNA- (DAPI, blau), α -Tubulin- (FITC-gekoppelter α -Tubulin-Antikörper, grün) und Aktinfärbung (TRITC-Phalloidin, rot) sowie ein entsprechendes Überlagerungsbild. Maßstabsbalken: 50 μm .

Die in Abbildung 6.30 dargestellten phänotypischen Veränderungen infolge der Substanzapplikationen führten zu der Vermutung von mitotischem Arrest. Durch eine immunzytochemische Färbung von phospho-Histon H3 sollte daher der Anteil an mitotischen Zellen quantifiziert werden. **PYD1-72+247-1-1** und **PYD1-237C-1** erhöhten konzentrationsabhängig die Anzahl phospho-Histon H3-positiver Zellen bei einer Konzentration von 50 μM um das Fünffache, bei Applikation einer Konzentration von 25 μM konnte eine Verdopplung der mitotischen Zellzahl gemessen werden (Abbildung 6.31). Für die dritte Substanz **PYD1-235C-1** wurde keine deutliche Erhöhung der mitotischen Zellzahl ermittelt.

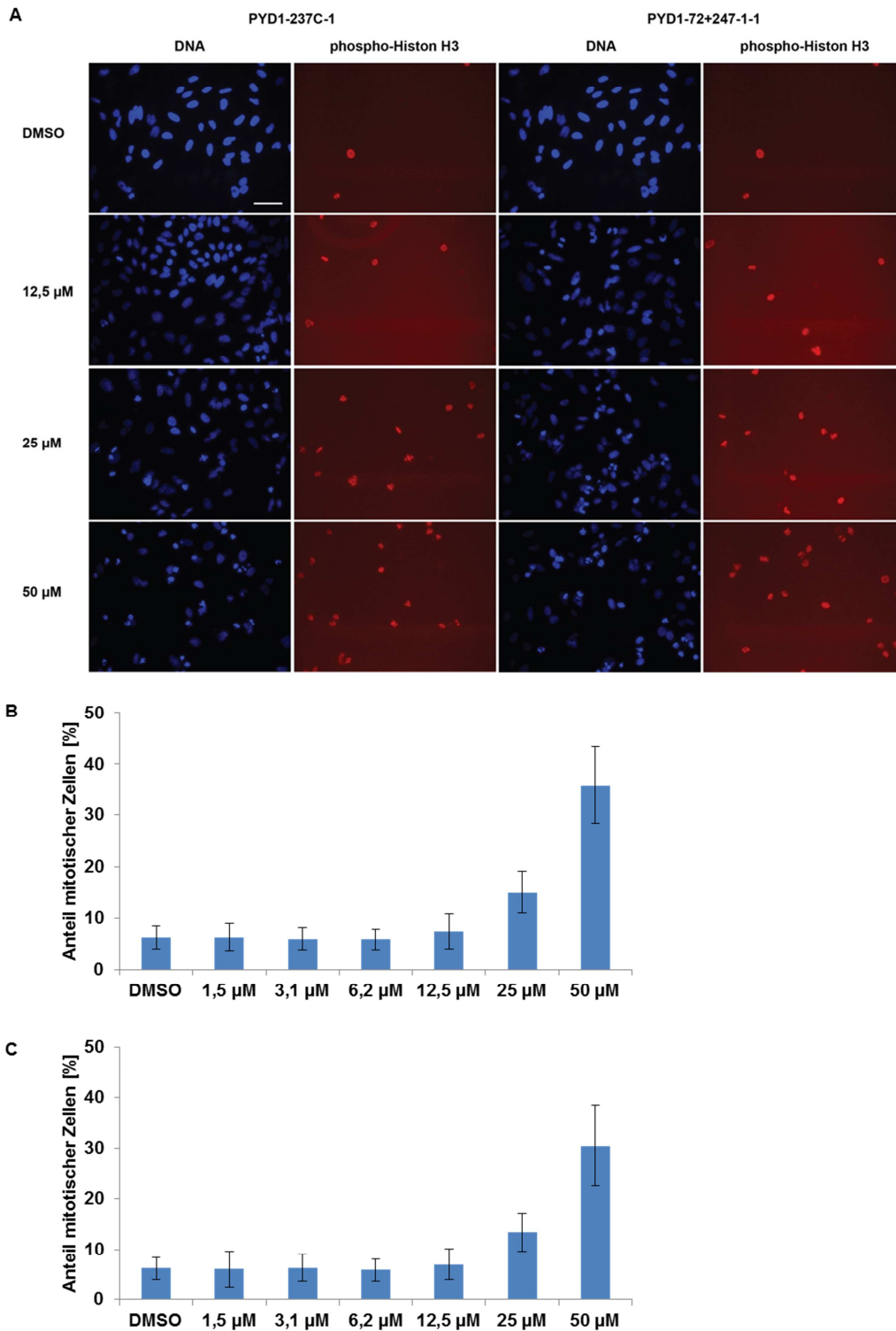


Abbildung 6.31: Quantitative Analyse von mitotischen HeLa-Zellen nach Behandlung mit PYD1-237C-1 und PYD1-72+247-1-1

[A] Beispielaufnahmen der Zellen nach Applikation von 30 µM der Substanzen über 24 h. Dargestellt sind DNA- (DAPI, blau) und phospho-Histon H3-Färbung (anti-phospho-Histon H3 Alexa 594, rot). Maßstabsbalken: 50 µm. Quantitative Analyse der mitotischen HeLa-Zellen nach Behandlung mit **[B]** PYD1-237C-1 und **[C]** PYD1-72+247-1-1. Dargestellt ist der gemittelte Anteil an mitotischen Zellen der Einzelbilder im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ± Standardabweichung (n = 10 – 18).

6.5.2 Beeinflussung der Tubulin-Polymerisation durch Iridoid-inspirierte Substanzen

Die Iridoid-inspirierten Substanzen, die den Anteil an mitotischen HeLa-Zellen erhöhten, wurden des Weiteren auch auf Beeinflussung der *in vitro*-Polymerisation von Tubulin überprüft. Beide Verbindungen wiesen eine Destabilisierung und damit reduzierte Tubulin-Polymerisation auf. Im Vergleich zur DMSO-Vehikelkontrolle startete die Polymerisation in Anwesenheit der Iridoid-inspirierten Substanzen verzögert nach wenigen Minuten und erreichte bei einem geringeren Absorptionsniveau bereits eine Sättigung (Abbildung 6.32), was dem Kurvenverlauf der destabilisierenden Kontrolle Nocodazol ähnelt.

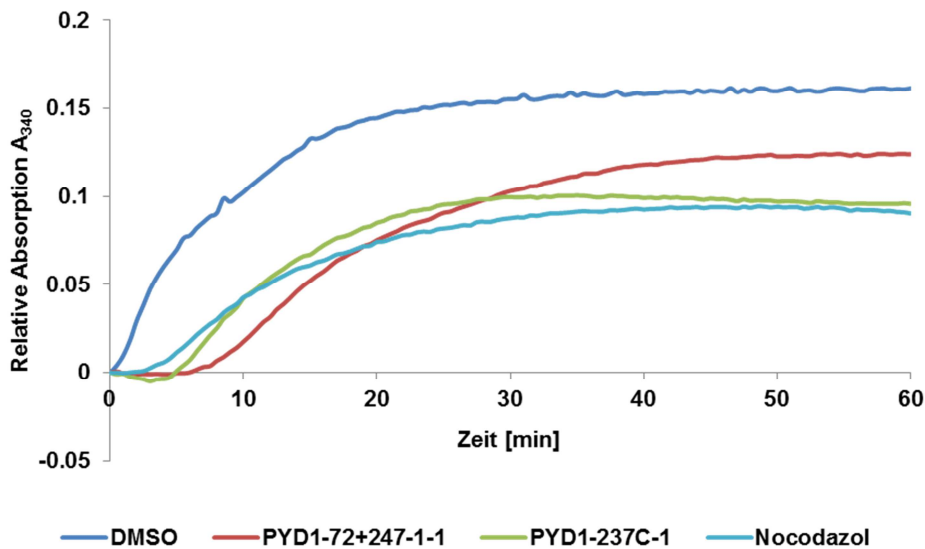


Abbildung 6.32: Einfluss der Iridoid-inspirierten Substanzen auf die *in vitro*-Polymerisation von Tubulin

50 μM der Testsubstanzen bzw. 1 μM Nocodazol wurden mit 10 μM Tubulin für 20 Minuten bei Raumtemperatur und für 20 Minuten auf Eis zur erneuten Depolymerisation inkubiert. GTP wurde unmittelbar vor dem Start der Messung appliziert. Die Absorptionsmessung bei 340 nm erfolgte jede 30 s über eine Zeitspanne von 60 Minuten. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden für jede Substanz auf den Wert 0 bei Zeitpunkt $t = 0$ normalisiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Datensatz ($n = 3$).

6.5.3 Neuromodulatorische Effekte von Iridoid-inspirierten Substanzen

Aufgrund des bekannten neuromodulatorischen Potenzials von Iridoiden und entsprechend inspirierten Verbindungen, verstärkt durch initiale Untersuchungen der Firma Neuro-Zone, wurden 56 Verbindungen der Substanzbibliothek von Dr. Pierre-Yves Dakas auf neurotrophe Effekte in SH-SY5Y-Zellen getestet. Keine der getesteten Substanzen zeigte jedoch einen

deutlichen neurotrophen Effekt auf die Zellen. **PYD2-60B-22-2** wies mit 38 % die höchste Steigerung auf, wobei eine starke Varianz innerhalb der einzelnen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen festgestellt wurde und dadurch ein deutlicher Effekt auf das Neuritenwachstum nicht identifiziert werden konnte (Anhang, Tabelle 13.6).

Eine weitere Iridoid-inspirierte Substanzkollektion wurde von Dr. Peter Schröder während seiner Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie synthetisiert. Hieraus wurden ebenfalls 52 Substanzen auf mögliche neurotrophe Effekte in SH-SY5Y-Zellen untersucht, wobei auch hier keine Verbindung mit deutlichem Einfluss auf das Neuritenwachstum identifiziert werden konnte (Anhang, Tabelle 13.7). Die Verbindungen **PS598S** und **PS629S** wiesen Steigerungen des Neuritenwachstums von 43 – 46 % auf, wobei aufgrund von starker Varianz ebenfalls nicht von einem deutlichen Effekt gesprochen werden konnte. Ebenso waren phänotypische Veränderungen der Zellen anhand der fluoreszenzmikroskopischen Daten nicht auszumachen. **PS402S** bewirkte zudem Zytotoxizität bei einer applizierten Konzentration von 10 μM , wohingegen alle weiteren Verbindungen als inaktiv auf die Neuroblastomzellen identifiziert wurden.

6.6 Identifizierung von Sulfonylpyrimidinen als kovalente HSET-Inhibitoren

Zur Identifizierung von Inhibitoren des mitotischen Kinesins HSET wurden zunächst 150000 Verbindungen in einem *in vitro*-Screening auf HSET-Inhibition überprüft. Das Screening wurde vom *Compound Management and Screening Center* (COMAS) in Dortmund durchgeführt. Die Substanzen wurden unter Zuhilfenahme des kommerziell erhältlichen ADP-Glo™ ATPase-Testsystems auf Inhibition der aufgereinigten HSET-Motordomäne im Beisein von vorpolymerisierten Mikrotubuli getestet. Das ADP-Glo™-Testsystem basiert auf der Rückbildung von ADP, welches in der ATPase-Reaktion des Kinesins entstanden ist, zum ursprünglichen ATP. Durch eine Luziferin/Luziferase-Reaktion kann die Menge des neu generierten ATP mit Hilfe eines Plattenlesers bestimmt werden.^[184]

6.6.1 Identifizierung und Bestätigung von 236038 als HSET-Inhibitor durch zellbasierte Untersuchungen

Das initiale Screening identifizierte ca. 600 niedermolekulare Substanzen, welche HSET inhibierten. Weiterführende Untersuchungen ergaben IC_{50} -Werte im Bereich von 1 – 50 μM . Ungefähr 10 % der identifizierten Moleküle wurden bereits zu diesem Zeitpunkt von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da sie als Tubulin-bindende Moleküle beschrieben sind

oder als Luziferase-Inhibitoren detektiert wurden. Letzteres wurde in einem zweiten Screening im COMAS evaluiert. Da Interaktionen der Verbindungen mit Mikrotubuli und/oder Luziferase zu Interferenzen bei der Messung führen können, wurden diese Substanzen nicht weiter untersucht. Mit den übrigen Substanzen erfolgten im Anschluss zellbasierte Experimente zur Bestimmung phänotypischer Veränderungen sowie zur quantitativen Analyse von mitotischem Arrest nach Behandlung mit den Verbindungen. Die zellbasierten Untersuchungen wurden von M.Sc. Mylene Hübecker und Beate Schölermann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie durchgeführt^[133] und führten zur Identifizierung einiger Verbindungen, die nach 24-stündiger Behandlung sowohl die Bildung multipolarer Spindeln als auch eine deutlich erhöhte Anzahl mitotischer Zellen und somit mitotischen Arrest in HeLa-Zellen auslösten. Die potenteste Substanz war hierbei das Sulfonylpyrimidin **236038**, das HSET mit einem IC₅₀-Wert von 3,9 µM inhibierte und den gewünschten Phänotyp einer HSET-Inhibition zeigte: Nach der Behandlung mit einer Konzentration von 25 µM konnten mittels einer Phospho-Histon H3-Färbung 23,7 % mitotische Zellen nachgewiesen werden, was einer zehnfachen Erhöhung im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen entsprach. Von den mitotischen Zellen wies ein Großteil multipolare Spindeln auf (Abbildung 6.33B).

In einem weiterführenden Experiment wurde die Rückbildung von bipolaren Strukturen nach Inhibition des Kinesins Eg5 untersucht. Da Eg5 als Kinesin in Richtung der Plus-Enden von Mikrotubuli orientiert ist, ist seine Wirkung der von HSET entgegengesetzt. Werden sowohl Eg5 als auch HSET inhibiert, führt dies zur Bildung von sogenannten pseudo-bipolaren Spindeln, da zwei der hauptsächlichen Vertreter der nach innen und außen gerichteten Kräfte bei der Bildung der mitotischen Spindel nicht funktional sind, was beispielsweise bei gleichzeitiger Inhibition von Eg5 und Dynein der Fall ist.^[99] Auch im Fall von **236038** konnte der gewünschte Phänotyp nachgewiesen werden, nachdem die Zellen mit 25 µM **236038** und 2 µM des Eg5-Inhibitors STLC behandelt worden waren.

Des Weiteren wurde **236038** auch unter identischen Bedingungen an der Brustkrebszelllinie BT-549 getestet (Abbildung 6.33C). Die Zellpopulation zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Zellen mit amplifizierten Zentrosomen aus: Insgesamt weisen 45 % der Zellen mehr als zwei Zentrosomen auf, darunter sind in der Mitose 31 % gruppierte, 11 % multipolare Spindeln und 3 % bipolare Spindeln mit zusätzlichen Zentrosomen entlang der mitotischen Spindel.^[77b] Daher ist diese Zelllinie besser zur Untersuchung von HSET-Inhibitoren geeignet als HeLa-Zellen, die lediglich 11 % Zellen mit zusätzlichen Zentrosomen aufweisen.^[77b] Interessanterweise war der Effekt der Substanz bei beiden Zelllinien ähnlich stark, da auch BT-549-Zellen nach Behandlung mit 25 µM **236038** eine hohe Anzahl mitotischer Zellen mit

entgrupperten Zentrosomen zeigten. Anhand des höheren Anteils an Zellen mit amplifizierten Zentrosomen wäre ein stärkerer Effekt in BT-549-Zellen erwartet worden.

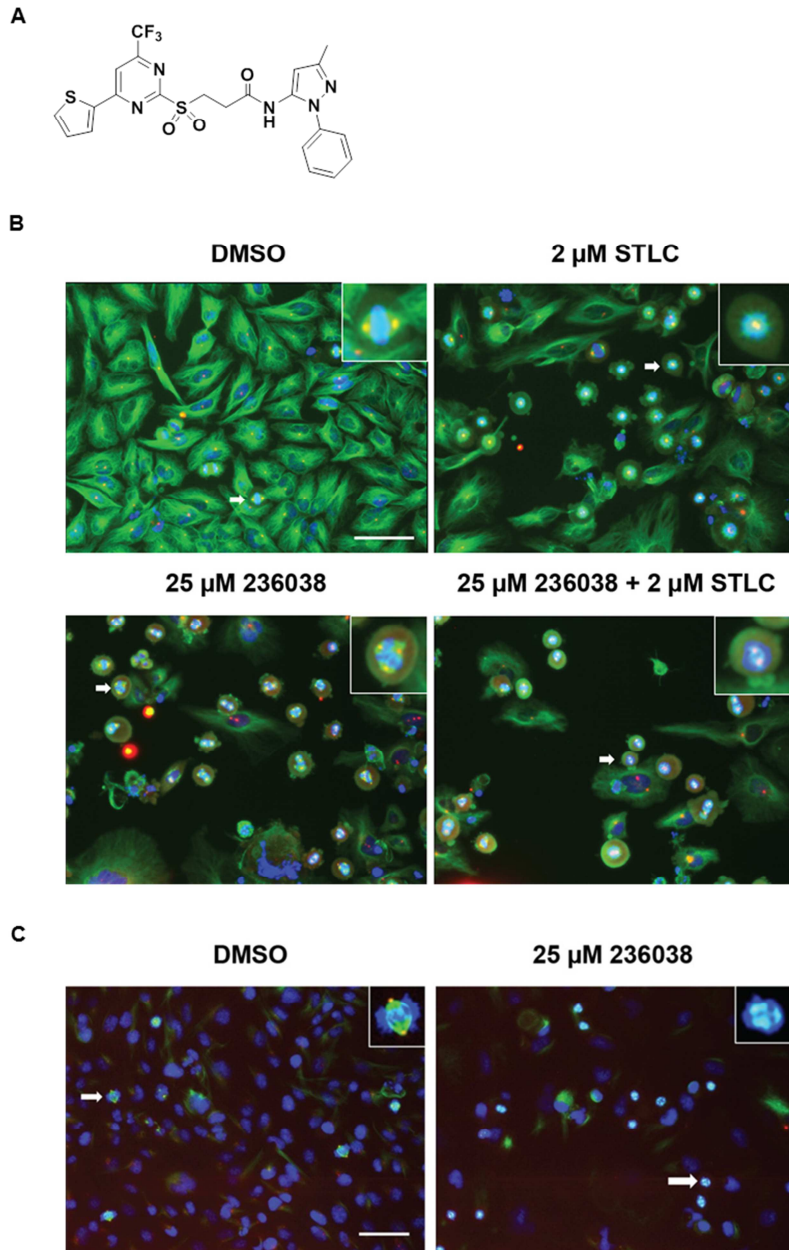


Abbildung 6.33: Effekte des Sulfonylpyrimidins 236038 auf HeLa- und BT-549-Zellen

[A] Chemische Struktur von **236038**. Beispielaufnahmen von **[B]** HeLa-Zellen nach Behandlung mit 25 μ M **236038** und / oder 2 μ M STLC und von **[C]** BT-549-Zellen nach Behandlung mit 25 μ M **236038**. Dargestellt sind Überlagerungsabbildungen der DNA- (blau, DAPI), α -Tubulin- (grün, α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper) und Perizentrin-Färbung (rot, Perizentrin-Antikörper und Alexa 594-gekoppelter Nachweisantikörper). Weiße Pfeile markieren Zellen, die im entsprechenden Kasten als Nahaufnahme dargestellt sind. Maßstabsbalken: 50 μ m.

6.6.2 Validierung der HSET-Bindung durch die *in vitro* Peptid-Fangmethode

Aufgrund der Sulfonylgruppe wurde ein kovalenter Bindungsmechanismus für **236038** vermutet. Als Anhaltspunkt diente hierbei die niedermolekulare Substanz 4-(3-Benzyloxy)phenyl)-2-Ethylsulfinyl-6-(Trifluoromethyl)pyrimidin (BETP), ein allosterischer Modulator des Glucagon-ähnlichen Peptid-1-Rezeptors (GLP-1R). Die Verbindung besitzt als Kernstruktur ebenfalls eine Sulfonylpyrimidingruppe und bindet spezifisch Cysteinreste im Zielprotein.^[185] Zur Verifizierung dieser Vermutung wurde die sogenannte *in vitro* Peptid-Fangmethode gewählt.^[143] Bei diesem Verfahren wird ein Testpeptid mit dem Inhibitor behandelt und massenspektrometrisch vermessen. Durch Bindung des Inhibitors erhöht sich die Masse des Peptids um das entsprechende Molekulargewicht, wodurch die Peptidmodifikation über die Massenzunahme bestimmt werden kann. Dieser Ansatz wurde im Fall der HSET-Inhibition durch die Sulfonylpyrimidine auf Proteinebene transferiert: Aufgereinigtes HSET wurde mit der Substanz inkubiert und im Anschluss tryptisch verdaut, bevor die einzelnen Peptide auf etwaige Massenzunahmen überprüft wurden. Diese Untersuchungen wurden von Beate Schölermann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie durchgeführt und bestätigten die Vermutung einer kovalenten Modifikation von HSET durch **236038**. Es konnte eine Bindung an die Cysteine Cys258 und Cys436 nachgewiesen, die Bindung an Cys143 und Cys178 wurde aufgrund der erhaltenen Daten vermutet, konnte jedoch nicht bestätigt werden. In einem parallelen Experiment war auch eine kovalente Bindung an Eg5 nachweisbar, hierbei sowie in allen weiteren Proben wurde jedoch keine hochauflösende Messung und somit keine detaillierte Analyse der Bindestellen durchgeführt. Für Cystein-bindende elektrophile Moleküle wurde in der Originalpublikation das Testpeptid Ac-YACAKASAHA eingesetzt, welches von Sascha Gentz (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) synthetisiert wurde, und ebenfalls in die Untersuchungen miteinbezogen wurde. Eine Bindung an Ac-YACAKASAHA konnte für **236038** ebenfalls gemessen werden. Die nicht-reaktive Salizylsäure diente als Negativkontrolle bei allen Messungen und reagierte nicht mit dem Testpeptid (Abbildung 6.34).

Unter Miteinbeziehung des nicht-reagierenden Teils des Peptids wurde eine Bindung des 4-Trifluoromethylpyrimidins an den entsprechenden Cysteinrest vermutet, wobei sich der restliche Teil des Moleküls unter Protonierung und einhergehender Bildung einer Sulfonsäure abspaltet.

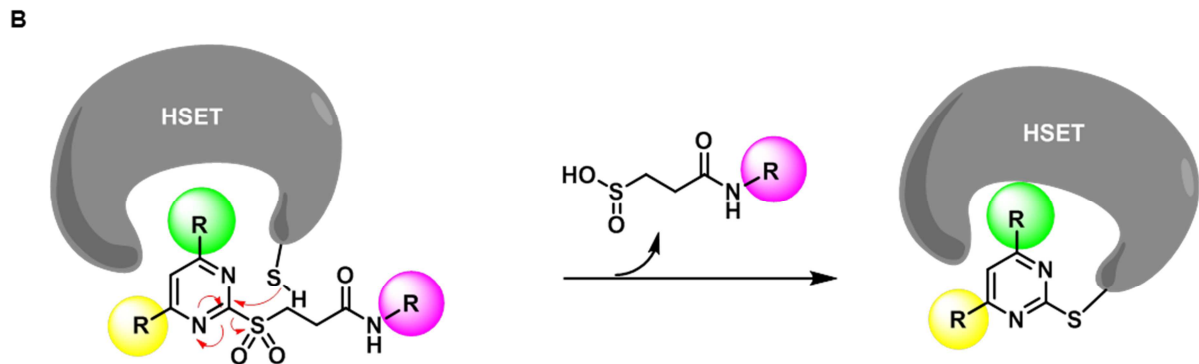
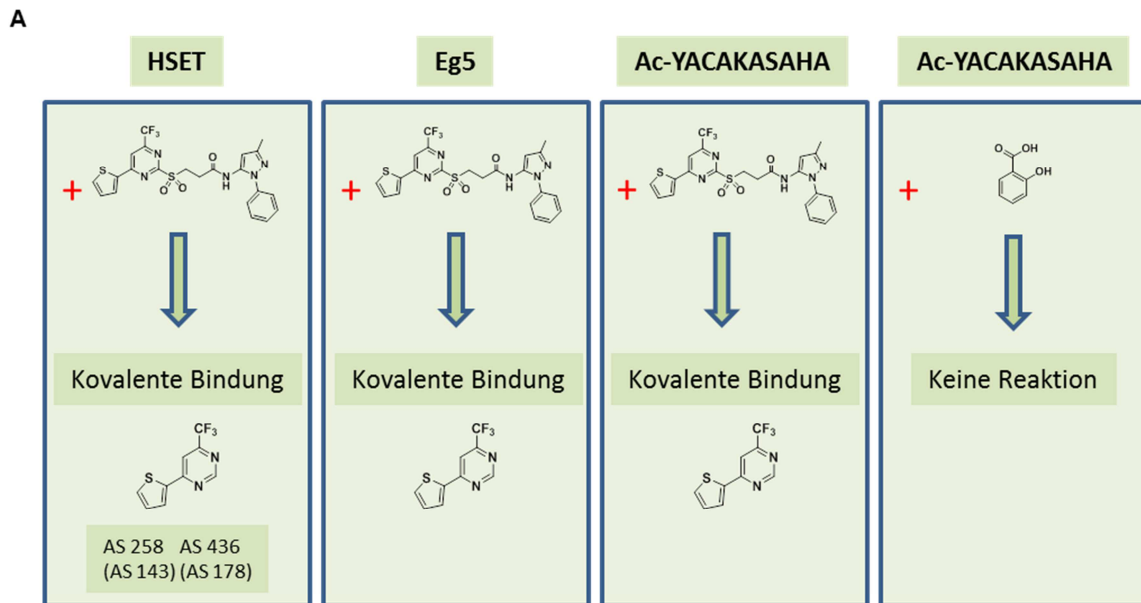


Abbildung 6.34: Validierung der kovalenten Bindung von 236038 an HSET mit der *in vitro* Peptid-Fangmethode

[A] Bindungsstudien der Substanz an HSET, Eg5 und das Testpeptid Ac-YACAKASAHA sowie der Negativkontrolle Salizylsäure an das Testpeptid Ac-YACAKASAHA. 75 µg aufgereinigtes HSET wurde mit 50 µM **236038** für 2 h inkubiert und mit 1,5 µg Trypsin verdaut und umgehend analysiert (Eg5, Ac-YACAKASAHA) oder über *Stage Tips* für eine hochauflösende Messung weiter aufgereinigt (HSET). **[B]** Bindungsmechanismus von **236038** an Cysteine anhand der massenspektrometrischen Daten.

Zusätzlich zu **236038** wurden im Zuge des Screenings auch weitere Sulfonylpyrimidine aus derselben Substanzbibliothek als *in vitro* HSET-Inhibitoren identifiziert, die zum großen Teil IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich aufwiesen. Die Substanzen wurden wie **236038** mit der Peptid-Fangmethode getestet. Für alle Verbindungen konnte ebenfalls eine kovalente Modifikation von HSET gezeigt werden, welche dem gleichen Bindungsmechanismus wie **236038** folgt. Für den Großteil der Substanzen wurde außerdem die Bindung an Eg5 und das Testpeptid Ac-YACAKASAHA überprüft, auch hier konnte in allen Fällen eine kovalente Modifikation beobachtet werden. Lediglich für Substanz **237157** wurde die Bindung an Eg5 und das Testpeptid nicht getestet.

Alle Sulfonylpyrimidine wurden zur Validierung ihrer Aktivität erneut mit dem ADP-Glo™-Testsystem gemessen. Hierbei wurde berücksichtigt, dass aufgrund der kovalenten Bindung konventionelle IC₅₀-Analysen nicht aussagekräftig sein können, sollte nicht explizit auf einheitliche experimentelle Bedingungen geachtet werden. Die Bindung eines kovalenten Inhibitors nähert sich über die Zeit der vollständigen Hemmung des Zielproteins an, so dass die Bestimmung von IC₅₀-Werten zu verschiedenen Zeitpunkten keine vergleichbaren Ergebnisse liefern können.^[168] Daher erfolgte die IC₅₀-Bestimmung stringent bei identischen Inkubationszeiten. Die Ergebnisse werden daher im Folgenden als apparente IC₅₀-Werte (IC_{50 app}) bezeichnet. Im Rahmen des Screenings wurden durch das COMAS-Team IC₅₀-Werte im Bereich von 2,1 – 12,0 µM bestimmt (Tabelle 6.8, IC_{50 app} COMAS), die am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie zum großen Teil bestätigt werden konnten (Tabelle 6.8, IC_{50 app} MPI). Die Validierung der Ergebnisse wurde von Emiko Sanada in der Arbeitsgruppe von Dr. Nobumoto Watanabe (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) durchgeführt. Hierbei wurde ein apparenter IC₅₀ von 12 µM für die HSET-Inhibition durch **236038** bestimmt, was einen schwächeren Effekt darstellt als im ursprünglichen Screening. Dort war unter Verwendung identischer experimenteller Bedingungen ein IC_{50 app} von 3,9 µM detektiert worden. Eine ähnlich schwächere Aktivität war auch für die Sulfonylpyrimidine **236040** und **236054** messbar. Die Substanzen **236034**, **236035** und **237157** zeigten einen potenteren Effekt mit IC_{50 app}-Werten im Bereich von 3,5 – 6,2 µM und wiesen damit eine Aktivität in einem ähnlichen Bereich wie in den vorherigen Messungen auf. **236056** zeigte im ursprünglichen Screening mit 12 µM die schwächste Aktivität, bei der Validierung wurde ein IC_{50 app} von 21 µM detektiert. Für die Substanz **236037** konnte der inhibitorische Effekt nicht bestätigt werden: Nachdem zuvor Werte von 2,4 µM und 3,4 µM detektiert wurden, war bei den Validierungsmessungen keine Aktivität nachweisbar (Tabelle 6.8).

Im Gegensatz zu **236038** führte eine Behandlung mit den anderen Sulfonylpyrimidinen in HeLa-Zellen unter den identischen Bedingungen jedoch nicht zu mitotischem Arrest und der Entwicklung multipolarer Spindeln. Die Zellen wiesen keine phänotypischen Veränderungen im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen auf. Mit Hilfe von Lebendzellexperimenten konnte auch ein zytotoxischer Einfluss dieser Substanzen gezeigt werden, jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt als **236038**. Dieser verzögerte Effekt könnte aus einer schwächeren Zellpenetration der Verbindungen resultieren.

Tabelle 6.8: Bindungsverhalten der Sulfonylpyrimidine und apparente IC₅₀-Werte für HSET

Die Bestimmung der IC_{50 app}-Werte wurde von Emiko Sanada (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) durchgeführt. Dargestellt sind gemittelte Messwerte aus drei technischen Replikaten. (+: kovalente Bindung nachgewiesen; n.d.: keine Messung durchgeführt).

| | Chemische Struktur | Kovalente Bindung an | | | IC _{50 app} COMAS [μM] | IC _{50 app} MPI [μM] | IC _{50 app} RIKEN [μM] |
|--------|--------------------|----------------------|------|-------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | | HSET | Eg5 | Test-peptid | | | |
| 236038 | | + | + | + | 3,9 | 3,8 | 12,0 |
| 236034 | | + | + | + | 3,7 | 2,7 | 5,3 |
| 236035 | | + | + | + | 2,1 | 3,1 | 6,2 |
| 236037 | | + | + | + | 3,4 | 2,4 | > 50 |
| 236040 | | + | + | + | 2,8 | 2,5 | 12,0 |
| 236054 | | + | + | + | 4,3 | 28 | 12,0 |
| 236056 | | + | + | + | 12,0 | > 50 | 21,0 |
| 237157 | | + | n.d. | n.d. | 4,4 | 2,2 | 3,5 |

Die Inhibition des Kinesins HSET durch Sulfonylpyrimidine konnte somit durch die Bindungsstudien sowie durch drei individuelle Bestimmungen der $IC_{50 \text{ app}}$ -Werte mit identischem Protokoll verifiziert werden. Anhand der chemischen Strukturen der Inhibitoren kann die Substanz **237157** als Grundgerüst der Inhibitoren definiert werden. Die Substanz trägt das Sulfonylpyrimidin-Kerngerüst mit den Thiophen- und Trifluoromethylsubstituenten, die sich in allen weiteren Substanzen wiederentdecken lassen. Die einzelnen Verbindungen unterscheiden sich daher lediglich durch die Alkylgruppe und das Amid, welches starke Variationen unter den acht Substanzen aufweist. Die Wichtigkeit der einzelnen Substituenten wird zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit in einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung dargestellt (Kapitel 6.6.7).

6.6.3 Validierung der HSET-Inhibition durch den bekannten Inhibitor AZ82

AZ82 sollte aufgrund seiner starken und selektiven HSET-Inhibition als Kontrollsubstanz für nachfolgende Experimente verwendet werden. Dazu wurde zunächst die Inhibition der ATPase-Aktivität von HSET mit Hilfe des etablierten ADP-Glo™-Testsystems überprüft. Zum einen wurde die Wirksamkeit des Inhibitors bei der ATP-Konzentration von 75 μM getestet, des Weiteren auch die für **AZ82** beschriebene ATP-Kompetition, wozu die ATP-Konzentration schrittweise auf 400 μM erhöht wurde. Jedoch war es nicht möglich den publizierten Effekt von **AZ82** mit Hilfe des ADP-Glo™-Testsystems darzustellen. Bei Verwendung einer ATP-Konzentration von 75 μM , welche ebenfalls für die ursprüngliche Charakterisierung von **AZ82** genutzt wurde, wurde ein $IC_{50 \text{ app}}$ von 3,6 μM gemessen. Dies entspricht einer etwa zehnfach schwächeren Aktivität im Vergleich zu der publizierten Aktivität von 0,3 μM . Ebenso konnte keine ATP-kompetitive Inhibition mit dem ADP-Glo™-Testsystem nachgewiesen werden, da für höhere ATP-Konzentrationen IC_{50} -Werte von 4,6 bzw. 3,4 μM gemessen wurden.

Wu et al. nutzten bei ihrer Charakterisierung von **AZ82** ein Testsystem, das auf der Komplexbildung von während der ATPase-Reaktion freigesetztem Phosphat mit Malachitgrün basiert.^[93] Dieses Testsystem wurde im Folgenden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits getestet. Die Messungen erfolgten unter Verwendung der identischen Puffer- und Inkubationsbedingungen, ansonsten wurde nach Angabe des Herstellers verfahren. Mit Hilfe des Malachitgrün-Testsystems konnte der publizierte Effekt bestätigt werden. Bei Zugabe von 75 μM ATP wurde ein IC_{50} -Wert von 0,1 μM gemessen, womit die Aktivität gegenüber der publizierten Inhibition sogar leicht gesteigert werden konnte. Der apparente IC_{50} stieg bei einer schrittweisen Erhöhung der ATP-Konzentration auf 400 μM ATP auf 0,5 μM an,

wodurch der ATP-kompetitive Wirkmechanismus von **AZ82** mit publizierten Konditionen verifiziert werden konnte (Abbildung 6.35).

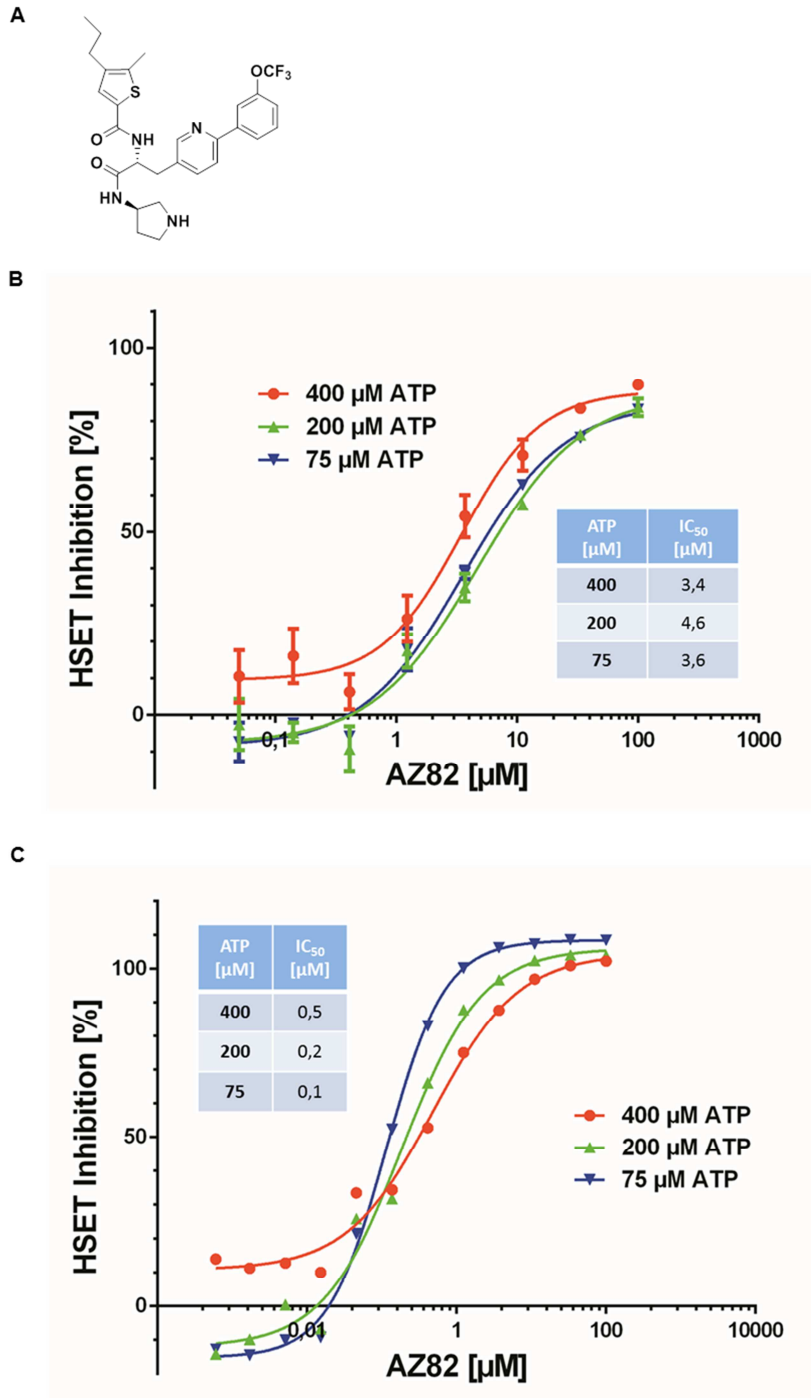


Abbildung 6.35: ATP-kompetitive HSET-Inhibition durch AZ82

[A] Chemische Struktur von **AZ82**. Die HSET-Inhibition durch 0,015 – 100 µM **AZ82** wurde unter Zugabe von 75, 200 und 400 µM ATP mittels **[B]** ADP-Glo™ und **[C]** *Malachite Green Phosphate Assay Kit* gemessen. Repräsentative Ergebnisse mit beiden Testsystemen sind dargestellt (n = 3).

AZ82-Behandlung führt zur Bildung von multipolaren Spindeln durch Verhinderung der Gruppierung von Zentrosomen in Folge der Inhibierung von HSET. Dieser Effekt wurde bereits bei einer Konzentration von 0,4 μM in BT-549-Zellen beobachtet. Zusätzlich treten zytotoxische Effekte ab einer Konzentration von 4 μM auf.^[93] Zellbasierte Untersuchungen mit **AZ82** wurden in dieser Arbeit mit MDA-MB-231-Zellen durchgeführt, die ebenso wie BT-549-Zellen eine hohe Anzahl an Zellen mit multiplen Zentrosomen aufweisen.^[77b] Die Zellen wurden zunächst durch Behandlung mit 2 mM Thymidin in der G₁/S-Phase synchronisiert,^[128] um die Anzahl mitotischer Zellen zu erhöhen und die Wirkungsweise von **AZ82** effektiver untersuchen zu können. Nach Beendigung des Thymidinblocks und Zugabe verschiedener Konzentrationen von **AZ82** konnten jedoch keine multipolaren Spindeln bei erneutem Eintritt in die Mitose beobachtet werden. Vielmehr waren nach Substanzbehandlung in allen Proben ausschließlich bipolare Spindeln auszumachen. Weitere Effekte nach Substanzapplikation waren ebenfalls nicht ermittelbar, da mit bis zu 10 μM **AZ82** behandelte MDA-MB-231-Zellen keine phänotypischen Veränderungen zu der entsprechenden DMSO-Kontrolle aufwiesen (Abbildung 6.36). Zudem konnte der publizierte zytotoxische Effekt nicht verifiziert werden. Erst bei Konzentrationen ab 20 μM konnte Zytotoxizität in MDA-MB-231 beobachtet werden.

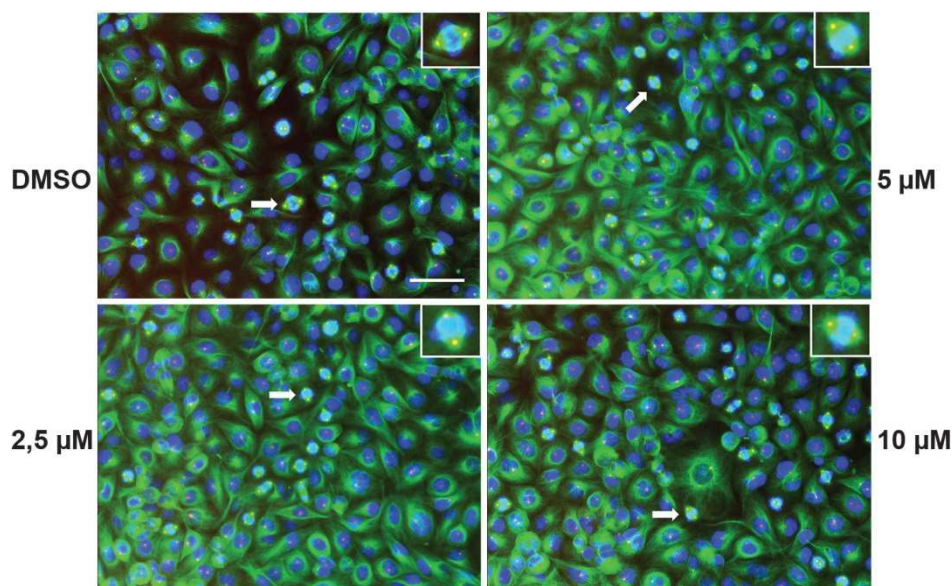


Abbildung 6.36: Zellbasierte Untersuchungen der HSET-Inhibition durch AZ82

Nach 16-stündigem Thymidin-Block wurden MDA-MB-231-Zellen für 8 h mit verschiedenen AZ82-Konzentrationen behandelt. Dargestellt sind Beispielaufnahmen von MDA-MB-231-Zellen nach Substanzapplikation mit Überlagerung der DNA- (blau, DAPI), α -Tubulin- (grün, FITC-gekoppelter α -Tubulin-Antikörper) und Perizentrin-Färbung (rot, Perizentrin-Antikörper und Alexa 594-gekoppelter Nachweisantikörper). Weiße Pfeile markieren Zellen, die im entsprechenden Kasten als Nahaufnahme dargestellt sind. Maßstabsbalken: 50 μm .

6.6.4 Problemlösungsansätze zu biochemischen Untersuchungen von HSET-Inhibitoren

Nachdem der inhibitorische Effekt von **AZ82** lediglich mit Hilfe des Malachitgrün-Testsystems bestätigt werden konnte, wurden auch die Sulfonylpyrimidine unter diesen Bedingungen getestet. Für keine der Substanzen konnte in diesem Testsystem das inhibitorische Potenzial bestätigt werden, obwohl Konzentrationen von 50 μM eingesetzt wurden. Es konnte eine maximale HSET-Inhibition von 15 % bestimmt werden. Daher wurden umfangreiche Problemlösungsansätze durchgeführt, um die experimentellen Bedingungen zu modifizieren, so dass eine HSET-Inhibition aller Substanzen unter den identischen Bedingungen nachweisbar war. Abschließend konnte der Grund in der unterschiedlichen Pufferzusammensetzung ausgemacht werden, da die Inhibition durch die Sulfonylpyrimidine unter Verwendung des ADP-Glo™-Puffers im Malachitgrün-Testsystem gemessen werden konnte. Jedoch war die Aktivität von **AZ82** hierbei deutlich geringer als unter den publizierten Pufferbedingungen. Insgesamt war jedoch die Bestimmung der Inhibition der HSET-ATPase-Aktivität unter diesen Bedingungen für **AZ82** und die Sulfonylpyrimidine möglich.

Während der Bearbeitung der Problemlösungsansätze wurde die Inhibition von HSET durch die Testsubstanzen mit Hilfe eines enzymgekoppelten ATPase-Testsystems in der Abteilung für molekulare Genetik (Prof. Dr. Thomas U. Mayer) an der Universität Konstanz untersucht.

Die Ergebnisse des enzymgekoppelten Testsystems bestätigten die starke Enzyminhibition durch die Sulfonylpyrimidine nach Zugabe einer Konzentration von 50 μM . Im Beisein des Reduktionsmittels DTT (1 mM) nahm die Inhibition der ATPase-Aktivität von HSET zum Teil rapide ab. Für die Substanz **236038** war eine geringere Abnahme nach DTT-Zugabe zu erkennen (ca. 22 %), wohingegen die Inhibition durch **236037** nur noch 20 % betrug, nachdem dieses Sulfonylpyrimidin HSET im ursprünglichen ADP-Glo™-Puffer zu 80 % inhibierte. Ein ähnlicher Effekt der Substanzen konnte bei Zugabe von 10 mM Glutathion (GSH) zum Reaktionsansatz beobachtet werden. Ebenso war die Abnahme der Aktivität im Beisein von 1 mM DTT für ausgewählte Substanzen auch im ADP-Glo™-Testsystem nachweisbar. **AZ82** zeigte keinerlei abgeschwächte Inhibition im Beisein von 1 mM DTT, sondern inhibierte HSET in demselben Maße wie in den vorherigen Untersuchungen (Abbildung 6.37).

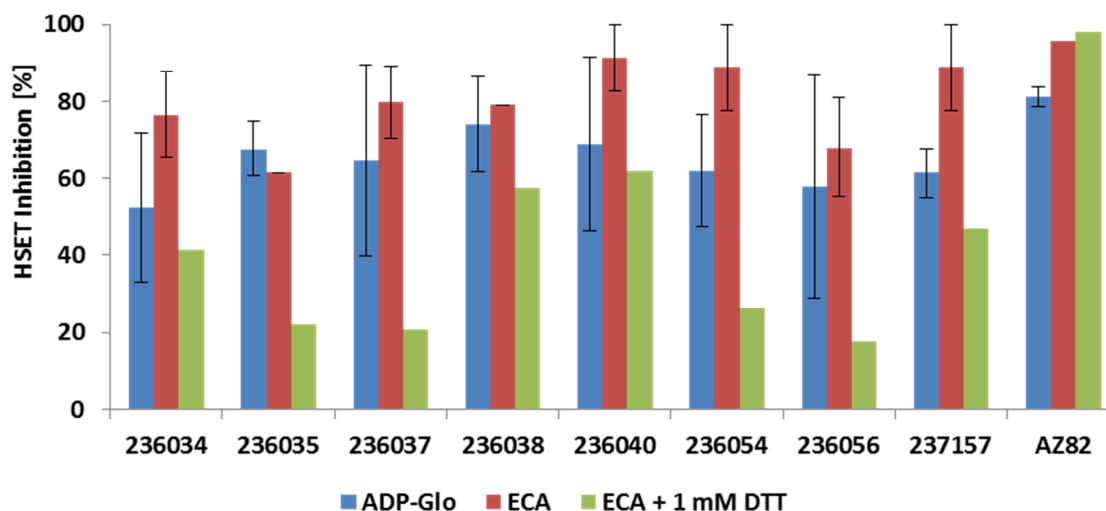


Abbildung 6.37: HSET-Inhibition durch Sulfonylpyrimidine unter Zugabe von DTT

50 μM jeder Substanz wurde mit Hilfe des enzymgekoppelten Testsystems (ECA) mit / ohne 1 mM DTT und mit dem ADP-Glo™-Testsystem auf Inhibition von HSET überprüft. Für die Thiol-abhängige Inhibition von HSET wurden verschiedene Bedingungen getestet, so dass zum Teil lediglich ein technisches Replikat pro Bedingung gemessen wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 1 - 3$).

6.6.5 Thiol-abhängige Aktivität von Sulfonylpyrimidinen

Aufgrund der schwachen Aktivität bei der Zugabe von Thiolverbindungen und sowie der enthaltenen Sulfonylgruppe der Inhibitoren wurde ein partielles Abfangen der Inhibitoren durch Thiole vermutet. Zur Überprüfung dieser These wurde die Stabilität der Substanzen nach Inkubation in einer GSH-Lösung getestet: Eingesetzt wurde eine Konzentration von 25 μM , die bereits in den zellbasierten Assays verwendet wurde. Die Proben wurden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ für 24 h inkubiert, um ähnliche Bedingungen wie in den zellulären Untersuchungen zu ermöglichen. Da exakte durchschnittliche Thiolkonzentrationen für die verwendeten Zelllinien nicht ermittelt werden konnten, wurde eine GSH-Konzentration von 5 mM eingesetzt, da die durchschnittliche intrazelluläre Thiol-Konzentration im Bereich von 0,5 – 10 mM liegt.^[186] Als potenzielle Reaktion wurde ein Addukt aus GSH mit dem Thiophen-substituierten Pyrimidin angenommen. Unter Bildung einer Sulfonsäure würde der übrige Teil des Moleküls abgespalten, was dem Reaktionsmechanismus der Bindung der Substanz an HSET entspricht.

Ohne Zugabe von GSH war in den Spektren ein einzelner Peak nachweisbar, der die Substanz **236038** repräsentierte. Nach Thiolzugabe konnten zwei zusätzliche Peaks detektiert werden, bei denen es sich um das vermutete Produkt und das abgespaltene Fragment handelte. Ein beträchtlicher Teil der applizierten Substanz konnte jedoch auch

nach 24-stündiger Inkubation in GSH als intakte Substanz identifiziert werden. Für die restlichen Sulfonylpyrimidine wurden unterschiedlich hohe Anteile an intakter Substanz detektiert. Für **AZ82** wurde keine Reaktion mit GSH nachgewiesen, auch nach einer Inkubation mit dem Thiol wurde lediglich ein Peak detektiert, der intaktes **AZ82** repräsentierte (Abbildung 6.38).

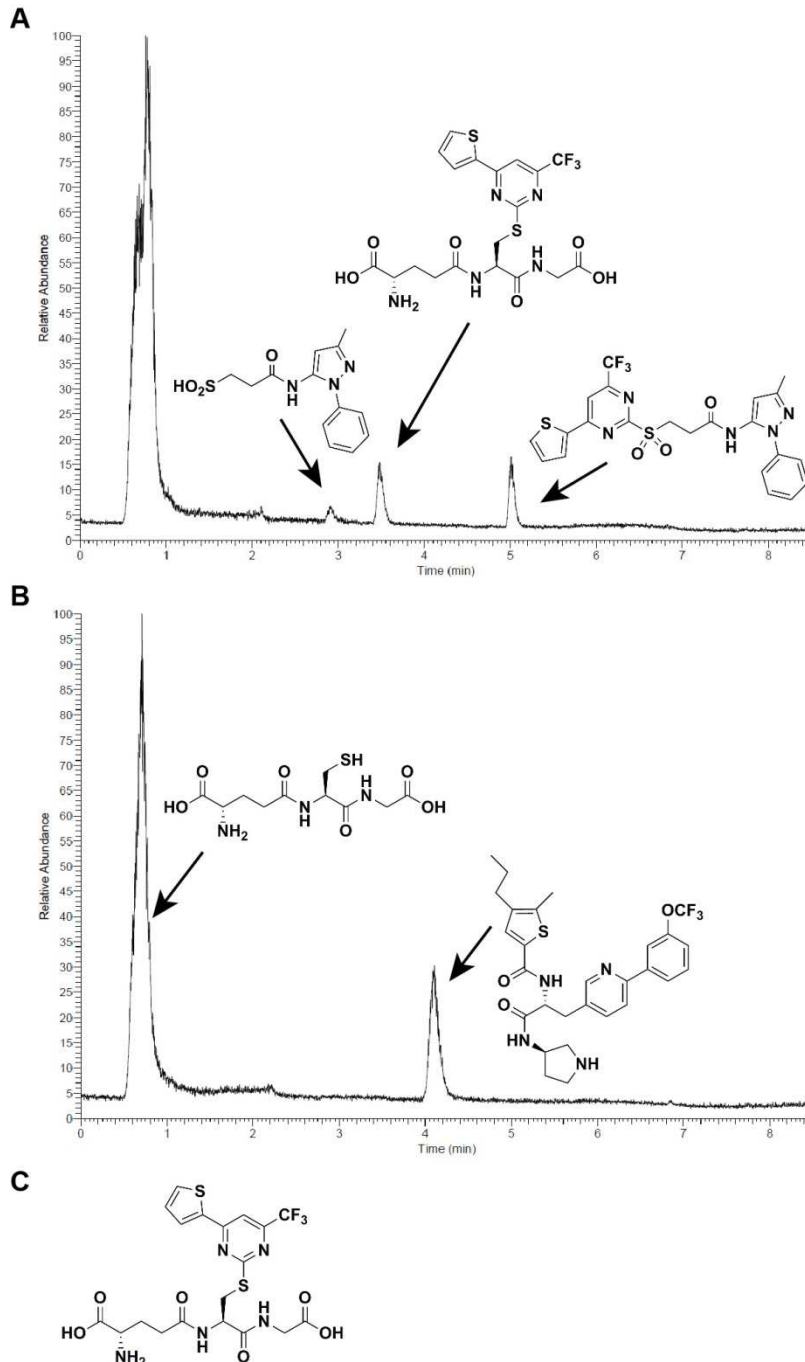


Abbildung 6.38: Reaktivität von 236038 und AZ82 mit GSH

[A-B] LC-MS-Spektren von **[A]** 236038 und **[B]** AZ82 nach 24-stündiger Inkubation mit 5 mM GSH bei 37 °C mit den entsprechenden Strukturen. **[C]** Reaktionsprodukt von 236038 und GSH.

6.6.6 Validierung der intrazellulären kovalenten HSET-Bindung mit dem *Cellular thermal shift assay* (CETSA)

Die vorstehend beschriebenen Experimente wiesen das Sulfonylpyrimidin **236038** als einen kovalenten HSET-Inhibitor aus, der *in vitro* mit Thiolen reagiert, was die Wirksamkeit der Verbindung im zellulären Umfeld abschwächen kann. Nach Bestimmung der massenspektrometrischen Daten zur Reaktivität mit Thiolverbindungen wurde jedoch angenommen, dass die nach Thiol-Behandlung weiterhin intakte Substanzmenge ausreichend ist, um das Zielprotein HSET intrazellulär binden und modifizieren zu können. Um die intrazelluläre Bindung nachzuweisen, wurde die Modifizierung des Schmelzpunktes des Proteins mit Hilfe des *Cellular thermal shift assay* (CETSA) untersucht. Die Methode basiert auf der Destabilisierung nativer Proteine durch Temperatureinfluss, was durch Bindung eines Inhibitors beeinflusst werden kann. Durch Erhitzen identischer Proben auf verschiedene Temperaturen können mögliche Unterschiede der Schmelztemperatur zwischen DMSO- und Substanz-behandelten Proben bestimmt werden und die Bindung eines Inhibitors aufzeigen.^[142]

Initiale Experimente wurden mit BT-549-Zellen durchgeführt, welche auch für die Analyse der Multipolarität nach Behandlung mit **236038** verwendet worden waren (Kapitel 6.6.1). Die HSET-Expression in dieser Zelllinie war jedoch zu gering, so dass die Bandenintensität der Immunoblots entsprechend schwach ausfiel und eine verlässliche Quantifizierung der Ergebnisse nicht möglich war. Daher wurden MDA-MB-231-Zellen verwendet, die mit DMSO bzw. 10 µM **236038** behandelt und auf Temperaturen im Bereich von 40,0 – 54,5 °C erhitzt wurden. Der Schwerpunkt des Temperaturbereiches wurde dabei auf den Bereich von ca. 48 – 51 °C gelegt, da die Proteinstabilität in diesem Bereich deutlich abnahm und somit eine abrupte Abnahme der Bandenintensität auf dem Immunoblot zu verzeichnen war. Eine deutliche Verschiebung des Schmelzpunktes nach vorheriger Substanzapplikation konnte jedoch auch nach Anpassung des Temperaturbereiches nicht nachgewiesen werden. Abbildung 6.39 zeigt ein repräsentatives Experiment, in dem eine leichte Verschiebung beobachtet wurde, jedoch konnte dieses Resultat in folgenden Messungen nicht bestätigt werden.

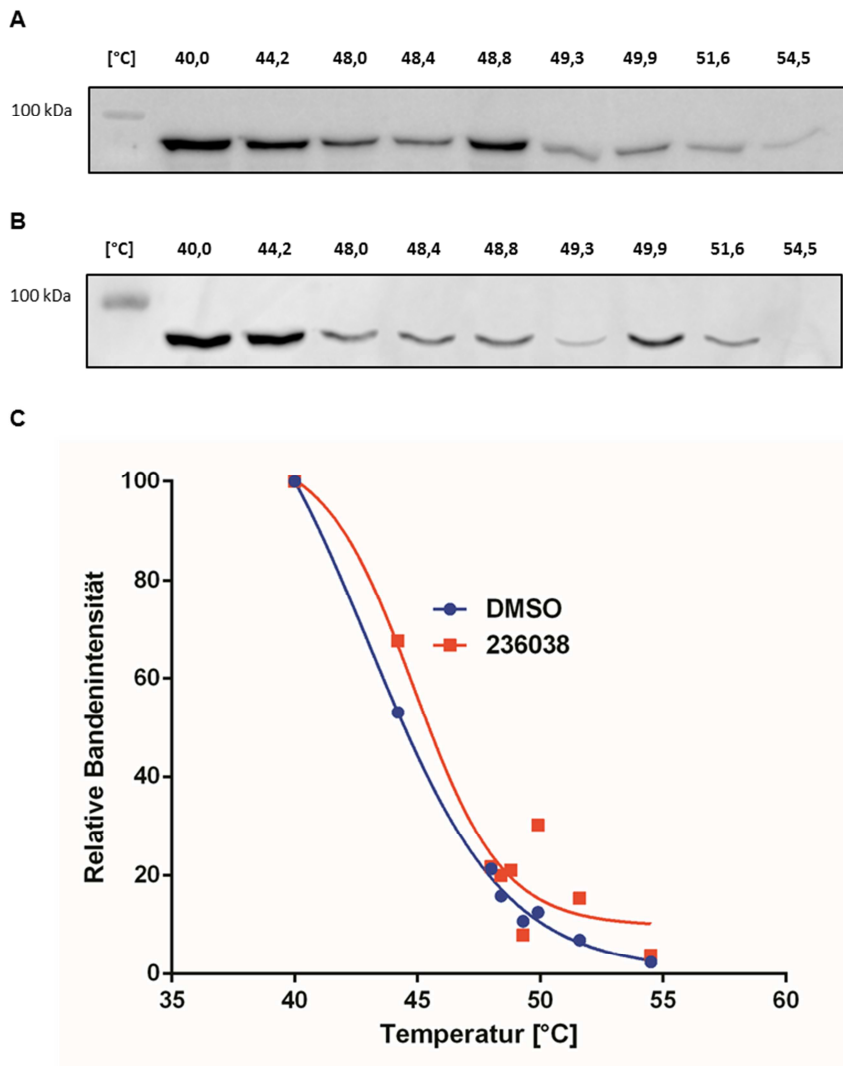


Abbildung 6.39: Untersuchung der intrazellulären Bindung von HSET durch 236038

MDA-MB-231-Zellen wurden für 24 h mit 10 μM **236038** behandelt und die einzelnen Lysate auf Temperaturen im Bereich von 40,0 – 54,4 °C erhitzt. HSET wurde mit Hilfe eines Immunoblots mit einem entsprechenden Antikörper detektiert. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen von Immunoblots mit **[A]** DMSO- und **[B]** **236038**-behandelten Lysaten. **[C]** Die entsprechenden Proteinbanden wurden mit Hilfe der ImageStudio-Software auf die Bandenintensität der niedrigsten Temperatur (40,0 °C) normiert (definiert als 100).

6.6.7 Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Inhibition von HSET durch Sulfonylpyrimidine

Zum besseren Verständnis der kovalenten Interaktion der Sulfonylpyrimidine mit HSET, wurde eine systematische Struktur-Aktivitäts-Beziehung erstellt. Hierbei wurden alle Derivate berücksichtigt, die im Verlauf des Projekts von Dr. Erchang Shang (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) und Kenshirou Shimizu (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) synthetisiert wurden. Die Struktur-Aktivitäts-Beziehung wurde von Dr. Erchang Shang basierend auf der Verbindung **236035** angefertigt, welche im Screening des

COMAS identifiziert und später ebenfalls als kovalenter HSET-Inhibitor verifiziert worden war. Bei der Validierung der Messungen im ADP-Glo™-Testsystem wurde ein IC₅₀ von 19,6 µM bestimmt.

Anhand der Aktivität konnten zunächst die Sulfonylgruppe und der Trifluoromethyl-Substituent als essentiell für die HSET-Inhibition dieser Substanzklasse festgesetzt werden. Für keinen der alternativen Substituenten war eine Inhibition gegen die ATPase-Aktivität der HSET-Motordomäne feststellbar (**MA-006, -007, -050, -052, -053, -077**, Anhang, Abbildung 13.1 und Abbildung 13.2).

Von Dr. Erchang Shang wurden Derivate zur Charakterisierung des Thiophen-Substituenten am Pyrimidin synthetisiert. Ein Austausch des Thiophens durch Furan oder Benzol führte zu einem zweifachen Anstieg der Aktivität (**est-001, -002**). Die Einführung einer *meta*-Chloro-Substitution ergab eine drei- bis fünffache Verbesserung der Aktivität (**est-010, -029**). Des Weiteren betragen die IC₅₀-Werte bei 2,3- oder 3,5-Disubstitutionen 3,9 – 5,1 µM (**est-012, -021, -022**), während Multisubstitutionen oder sperrige Gruppen zu verminderter Inhibition führten (**est-004, -018, -024**). Insgesamt wurden *meta*-Chloro- oder 2,3-disubstituierte aromatische Ringe als optimierte Gruppen für diese Position identifiziert (Anhang, Abbildung 13.3).

Eine Substanzbibliothek mit Variationen der Amidgruppe wurde von Kenshirou Shimizu synthetisiert. Die Einführung von 2,4-Dichlorobenzyl, 3,5-Difluorobenzyl oder Benzylethyl (**MA-015, -030, -033**) führte zu einer dreifach verstärkten HSET-Inhibition. Weitere Derivate veränderten das inhibitorische Potenzial der Verbindung nicht oder nur geringfügig, während die Einführung eines *n*-Hexyl-Amids mit 5,5 µM die stärkste Aktivität aufwies (**MA-041**). Die Verwendung eines (CH₂)₃-Linkers ergab mit einem IC₅₀ von 5,9 µM eine deutliche Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur Ausgangssubstanz (**MA-023**, Anhang, Abbildung 13.4). Im Vergleich mit anderen Substanzen konnte (CH₂)₃ als die passendste Linkerlänge ermittelt werden (**MA-035, -023, -024, -065, -067**, Anhang, Abbildung 13.5). Eine Verbindung mit einem *n*-Hexyl-Amid und einem (CH₂)₃-Linker wurde im Zuge der Herstellung der Substanzkollektionen jedoch nicht synthetisiert, so dass die Kombination beider Gruppen nicht getestet werden konnte.

Abbildung 6.40 zeigt zusammenfassend die erlangten Informationen aus der Struktur-Aktivitäts-Analyse unter Zuhilfenahme der synthetisierten Substanzkollektionen von Dr. Erchang Shang und Kenshirou Shimizu. Eine gute Abgangsgruppe (Sulfon) und eine elektronenziehende Gruppe (Trifluoromethyl) scheinen essentiell für die kovalente Interaktion mit HSET zu sein. Die Thiophen- und Amidsubstituenten sowie der Kohlenstofflinker zeigen

einen größeren Toleranzbereich, für den einige Substituenten gezeigt werden konnten, die die Aktivität der Verbindung steigern.

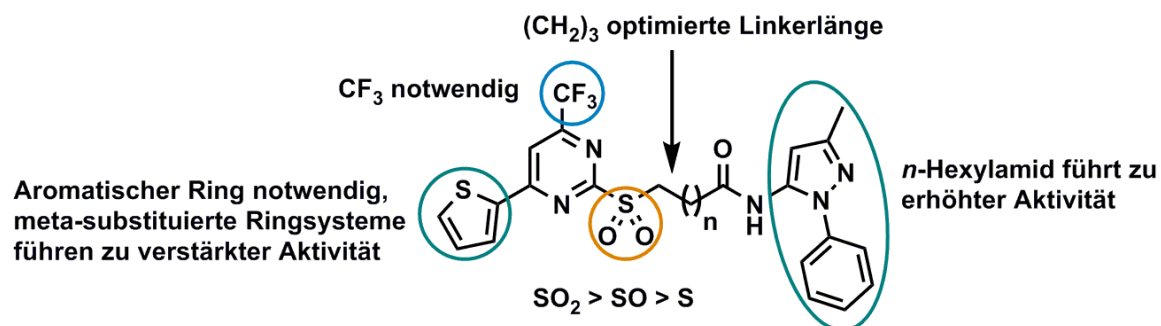


Abbildung 6.40: Zusammenfassung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine

Farblich gekennzeichnete Substituenten wurden innerhalb der Substanzkollektionen von Dr. Erchang Shang und Kenshirou Shimizu auf ihre Kontribution zur HSET-Inhibition untersucht. Die Struktur-Aktivitäts-Beziehung wurde von Dr. Erchang Shang basierend auf den IC₅₀-Werten aus dem ADP-Glo™-Testsystem erarbeitet.

7 Diskussion

7.1 Etablierung eines zellbasierten Testsystems zur Identifizierung neuromodulatorischer Substanzen in SH-SY5Y-Zellen

Naturstoffe modulieren zahlreiche biologische Prozesse durch Beeinflussung von Signaltransduktionswegen. Dabei werden Proteinbestandteile dieser Signalwege, z.B. Kinasen oder Rezeptoren, direkt gebunden.^[22] Solche Beeinflussungen biologischer Prozesse schließen auch das zentrale Nervensystem ein, wo viele natürlich vorkommende Verbindungen Neuronen vor schädigenden Einflüssen schützen oder das Neuritenwachstum der Zellen fördern können.^[39-40] Für neurodegenerative Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder ALS stehen bis heute keine Behandlungsmethoden zur Verfügung, die die Krankheiten vollständig zu heilen vermögen.^[30] Daher besteht ein großer Bedarf an neuartigen Wirkstoffen gegen diese Krankheiten, wozu vermehrt die Erforschung neuroprotektiver und neurotropher Verbindungen benötigt wird.^[8b] Neuromodulatorische Effekte weisen unter anderem Vertreter der natürlich vorkommenden Substanzklassen der Pyridonalkaloide, Iridoide und Indolalkaloide auf.^[25, 41, 60] Diese Substanzklassen wurden als prävalidierte Startpunkte zur biologisch-orientierten Synthese neuartiger Verbindungen mit potenziell neuromodulatorischen Effekten verwendet. Die Synthese entsprechender Substanzbibliotheken wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie durchgeführt.

Zur Analyse des neurotrophen Potenzials der Verbindungen wurde ein zellbasiertes Testsystem auf Basis des Protokolls von Forsby et al. etabliert.^[126] Die hierbei verwendete humane Zelllinie SH-SY5Y, ursprünglich aus einem metastasierten Knochenmarkstumor isoliert, ist ein weit verbreitetes Modell für verschiedene neuronale Prozesse und neurodegenerative Erkrankungen.^[151, 187] Durch die Möglichkeit, viele Substanzen parallel testen zu können, erschien die Verwendung dieser Zelllinie praktisch für den gewählten Ansatz.^[126] Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Screening unter Verwendung der SH-SY5Y-Zellen aufwändig war. Durch das verhältnismäßig langsame Wachstum der Zellen ist die Testung der Verbindungen zeitintensiv und daher anfälliger für Kontaminationen. Die Etablierung des Testsystems begann mit der Validierung des publizierten Protokolls, das die Bedingungen zur Ausdifferenzierung der Neuroblastomzellen in neuronähnliche Zellen beinhaltet. SH-SY5Y-Zellen können bereits 72 h nach initiiertem Differenzierung mittels 1 μ M ATRA zur Analyse von Testsubstanzen verwendet werden.^[126] Daher wurde das Wachstum der Neuriten über einen Zeitraum von 3 bis 14 Tagen beobachtet und quantifiziert. Hierbei konnten die publizierten Angaben bestätigt werden, da sich 72 h nach Zugabe von 1 μ M ATRA bereits ein neuronales Netzwerk gebildet hatte, das

als Grundlage für die weitere Verstärkung des Neuritenwachstums durch die Testsubstanzen dienen konnte. Quantitativ war zwar lediglich ein Zuwachs von 25 % in der Neuritenlänge messbar, phänotypisch jedoch ein eindeutig gesteigertes Neuritenwachstum erkennbar. Hierbei ist entscheidend, dass die Zellen phänotypisch in eine neuronähnliche Population ausdifferenziert sind, sich jedoch nur ein initiales Netzwerk ausgebildet hat, so dass verstärktes Wachstum durch anschließend applizierte Testsubstanzen eindeutig detektiert werden kann. Die *in vitro*-Kultivierung von isolierten primären Neuronen zeigte eine Neuritenausbildung innerhalb der ersten 36 h und eine neuronale Polarisierung mit Neuritenverlängerung zu Axonen binnen 72 h.^[9] Nach 72-stündiger ATRA-Behandlung wiesen viele Zellen bereits längere Neuriten auf, was auf eine Polarisierung der Neuriten schließen ließ.^[10] Bei einzelnen Zellen schien ebenfalls die Weiterentwicklung der kürzeren Neuriten zu Dendriten begonnen zu haben, da zum Teil bereits Verzweigungen erkennbar sind. Anhand der erhobenen Daten konnte nach 72 h kein Effekt auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl pro Zelle detektiert werden. Die Neuritenanzahl nahm hier im Vergleich zu den Zellen, die ohne ATRA kultiviert wurden, sogar leicht ab, was jedoch der hohen Schwankung der Werte geschuldet war. Zellen ohne ATRA-induzierte Differenzierung wiesen in einigen Fällen auch längere Neuriten auf, wobei der Großteil der Zellen nur kurze Filopodien besaß, die offensichtlich von der Software ebenfalls als Neuriten detektiert wurden. Bei Verlängerung der Ausdifferenzierung bis zu 14 Tagen stieg die Neuritenlänge pro Zelle schrittweise an, während in den Zellpopulationen vorhandene undifferenzierte Zellen weiter proliferierten, so dass die Population nach und nach größer wurde und daher der vorhandene Platz zum Wachstum der Neuriten kontinuierlich abnahm. Die Inkubation in Kulturmedium mit dem N2-Supplement unterstützt die Differenzierung und Neuritenbildung der Zellen in Abwesenheit von Serum,^[188] während der Stopp der Proliferation durch Zugabe von ATRA erfolgt.^[151] Analog verhielt es sich für die Neuriten- und Verzweigungsanzahl, die ebenfalls bei undifferenzierten Zellen schrittweise sanken. Nach 14 Tagen war die Länge der Neuriten undifferenzierter Zellen auf 5 µm pro Zelle gesunken und bei ATRA-induzierter Differenzierung über den gleichen Zeitraum auf über 50 µm pro Zelle gestiegen.

ATRA-induzierte Differenzierung wird häufig über einen längeren Zeitraum bei einer Konzentration von 10 µM durchgeführt.^[163, 189] Für die Testung der Substanzen wurde jedoch eine Behandlung mit 1 µM ATRA über 72 h festgelegt, was auch im verwendeten Protokoll empfohlen wurde.^[126] Diese Bedingungen zeigten ein ausreichendes initiales Neuritenwachstum und waren daher für die nachfolgende Steigerung des Neuritenwachstums durch Substanzbehandlung geeignet.

Zur Einordnung der neuromodulatorischen Effekte von Testsubstanzen auf SH-SY5Y-Zellen mussten entsprechende Kontrollproben auf ihre Verwendbarkeit in dem Testsystem

überprüft werden. Neben der Vehikelkontrolle sollte jeweils eine Positivkontrolle für erhöhtes Neuritenwachstum und Wachstumsabnahme eingesetzt werden. Damit konnte sichergestellt werden, dass mit dem identischen System auch neurodegenerative Verbindungen anhand der Retraktion der Neuriten ermittelt werden können. Als Vehikelkontrolle wurde DMSO verwendet, da alle Testsubstanzen als Stammlösungen in DMSO vorlagen. DMSO weist bei einer Konzentration von 1 % einen retraktiven Effekt auf die Neuriten ausdifferenzierter Zellen eines PC-12-Subklons auf, während Konzentrationen bis 0,5 % DMSO keinen Einfluss auf die Zellen zeigen.^[161] Daher wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von DMSO auf SH-SY5Y-Zellen überprüft und ergab eine deutliche Retraktion ATRA-induzierter Neuriten bei Applikation von 1 % DMSO. N2-ATRA-ausdifferenzierte Zellen zeigten eine durchschnittliche Neuritenlänge von 22 µm, die durch 1 % DMSO auf 8 µm abnahm. Somit konnte der beschriebene Effekt hoher DMSO-Konzentrationen bestätigt werden und befähigte DMSO zur Verwendung als Kontrollsubstanz für die Retraktion von Neuriten. Darüber hinaus zeigten die Daten, dass Konzentrationen von 0,1 bis 0,3 % DMSO das Neuritenwachstum nur marginal verringern. Daher konnten die Testsubstanzen ohne hinderlichen Einfluss des Lösungsmittels in Konzentrationen bis zu 30 µM getestet werden. Als Kontrolle für die Verstärkung der Substanzbehandlung auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen wurde BDNF gewählt. Das Neurotrophin wurde in ähnlichen Testsystemen in Konzentrationen bis zu 100 ng/ml als Kontrolle verwendet.^[163] Die neurotrophe Wirkung von BDNF resultiert aus der Bindung an den TrkB-Rezeptor, der in SH-SY5Y durch ATRA-induzierte Differenzierung exprimiert wird,^[151, 190] was BDNF zur Verwendung als Kontrollsubstanz befähigt. Die Überprüfung dieses Effektes ergab unter den getesteten Bedingungen bei Applikation von 200 ng/ml BDNF einen Anstieg der Neuritenlänge von 22 µm auf 41 µm pro Zelle. Phänotypisch war ein dichtes neuronales Netzwerk erkennbar, das sich deutlich von ausdifferenzierten Zellen ohne nachfolgende BDNF-Behandlung unterschied. Die intensive Ausprägung eines neuronalen Netzwerkes ist für die Behandlung mit BDNF nach initiiertem Differenzierung bekannt.^[163, 189] Die Testung geringerer Konzentrationen ergab nur einen leichten Anstieg der durchschnittlichen Neuritenlänge, was sich auch phänotypisch in einem geringer ausgebildeten Netzwerk niederschlug. Daher wurden 200 ng/ml BDNF als Positivkontrolle für gesteigertes Neuritenwachstum verwendet.

7.2 Identifizierung und Charakterisierung neurotropher Substanzen aus einer MILI A-inspirierten Substanzbibliothek

Nach der Auswahl der Kontrollsubstanzen konnten Substanzkollektionen auf Basis neurotropher Naturstoffe auf mögliche neuromodulatorische Effekte untersucht werden. Als

erste Kollektion wurden 119 Verbindungen von Dr. Peter Schröder getestet, die von dem Pyridonalkaloid MILI A abgeleitet waren. Für vier Pyridonverbindungen wurde ein deutlicher Anstieg des Neuritenwachstums nach Behandlung mit 10 μ M der Substanzen detektiert. Die Länge der durch ATRA-induzierte Differenzierung initiierten Neuriten wurde nach 96-stündiger Behandlung im Vergleich zur Vehikelkontrolle zu 53 - 72 % erhöht. Die aktivste Substanz **PS201S** (Abbildung 7.1) zeigte auch phänotypische Veränderungen im Vergleich zur DMSO-Vehikelkontrolle, da eine geringere Zellzahl mit deutlich intensiviertem Neuritenwachstum erkennbar war. Die vier Verbindungen wiesen allesamt das 4-Hydroxy-2-pyridon-Grundgerüst mit einem 4-Hydroxyphenylsubstituenten auf. Entsprechende Derivate, die eine *p*-Fluorophenylgruppe oder das 2,4-Dimethoxypyridin-Grundgerüst trugen, wiesen keinerlei Einfluss auf das Neuritenwachstum der SH-SY5Y-Zellen auf.

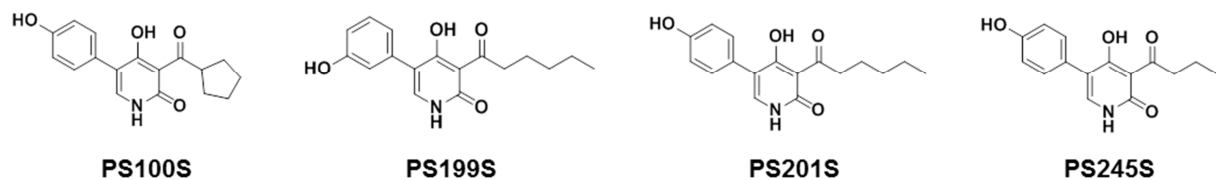


Abbildung 7.1: Chemische Strukturen der neurotrophen 4-Hydroxy-2-pyridone

Die aktiven Pyridonverbindungen wurden des Weiteren auf mögliche Einflüsse hinsichtlich der Neuriten- und Verzweigungsanzahl der Zellen untersucht. Die Ergebnisse können jedoch nur Anhaltspunkte für mögliche Effekte auf diese Parameter geben, da sich aufgrund des geringen Raumes wenig Möglichkeiten zum intensiven Wachstum der Neuriten und dadurch auch der Bildung von Verzweigungen boten. In Bezug auf die Anzahl der Neuriten pro Zelle konnten lediglich Zunahmen von 24 - 31 % detektiert werden, während die Anzahl der Verzweigungen nach Substanzbehandlung um das Doppelte zunahm. Unbehandelte oder mit DMSO behandelte Zellen wiesen durchschnittlich 1,5 – 2,0 Neuriten pro Zelle auf, während der Wert für die substanzbehandelten Zellen auf 2,0 – 3,0 Neuriten anstieg. Im Falle der Verzweigungspunkte wurden lediglich Werte im Bereich von 0,3 – 1,5 detektiert. Durch diese geringen Werte sind eindeutige Effekte in Bezug auf diese Parameter schwer zu bestimmen. Die Behandlung mit der Positivkontrolle BDNF ergab ähnliche Steigerungen der Neuriten- und Verzweigungsanzahl. Da BDNF das Wachstum dendritischer Verästelungen ebenso wie das Axonenwachstum fördert,^[191] wäre hier ein deutlicher Anstieg zu erwarten gewesen. Der geringe Platz kann auch in diesem Fall die fehlende Verzweigung und Neuritenbildung erklären. Auch phänotypisch konnten nach Behandlung mit den Pyridonalkaloiden keine Auswirkungen detektiert werden. Eine Ausnahme bildet hierbei

PS201S, welches eine eindeutige phänotypische Veränderung des neuronalen Netzwerks und eine Steigerung der durchschnittlichen Neuritenlänge hervorrief. Eine Erhöhung der Neuriten- und Verzweigungsanzahl konnte anhand des Phänotyps der Zellen ebenfalls vermutet werden.

Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 7 Tage ergab eine weitere Steigerung des durchschnittlichen Neuritenwachstums bei Behandlung mit **PS201S** um mehr als 100 %. Auch die Anzahl an Verzweigungen pro Zelle konnte erneut erhöht werden. Dies war auch phänotypisch deutlich zu erkennen, da eine größere Anzahl kurzer Neuriten entlang der bereits etablierten Neuriten entstanden war. Dies stimmt mit dem zeitlichen Ablauf der neuronalen Entwicklung überein, da zum Zeitpunkt der Fixierung der Zellen die dendritische Verzweigung bereits abläuft.^[10] Für die weiteren aktiven Pyridonalkaloide konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die Zellen wiesen eine deutlich erhöhte Zellzahl im Vergleich zur Behandlung über 96 h auf, was mit dem Auftreten undifferenzierter Zellen zusammenhängen könnte. In einigen Fällen konnten während des Screenings undifferenzierte Zellen auf den Bildern ausgemacht werden, die sich phänotypisch eindeutig von differenzierten SH-SY5Y-Zellen unterschieden. Da undifferenzierte Zellen weiter proliferieren, nimmt die Zelldichte bei längerer Inkubationszeit entsprechend zu.

Eine Literaturrecherche zur Ermittlung möglicher Zielproteine der neurotrophen MILI A-Derivate fokussierte sich zunächst auf bekannte Wirkmechanismen von 4-Hydroxy-2-pyridonen. MILI A ist jedoch der einzige neurotrophe Vertreter dieser Substanzklasse, für den Informationen zum Wirkmechanismus bekannt sind. Die Verbindung wirkt über einen ähnlichen Mechanismus wie NGF, jedoch vermutlich ohne Bindung an den TrkA-Rezeptor.^[46] Das genaue Zielprotein ist allerdings unbekannt. Unter den biologisch aktiven 4-Hydroxy-2-pyridonen ist ausschließlich für Pyridovericin, das bei einer Konzentration von 100 µg/ml Tyrosinkinase in NIH3T3-Zellen inhibiert, das Zielprotein ermittelt worden.^[166] Darüber hinaus sind antiallergische und antiproliferative Effekte von Pyridovericin bekannt.^[192] Der Zusammenhang zwischen Kinasen und dem Neuritenwachstum wurde detailliert durch die Studie von Loh et al. beschrieben, die anhand eines RNAi-basierten Screenings zahlreiche Kinasen bestimmen konnten, die am Wachstum und an der Retraktion von Neuriten beteiligt sind.^[167] Aus diesem Grund wurden die aktiven Substanzen **PS100S** und **PS201S** auf sämtliche Kinasen getestet, die in dieser Studie einen Bezug zum Neuritenwachstum gezeigt hatten und in der Auswahl des SelectScreen® der Firma Thermo Fisher Scientific verfügbar waren. So wurde in Anwesenheit von 20 µM der Substanzen die Aktivität von 45 Kinasen ermittelt, von denen als einzige die Mitogen-aktivierte Kinase Kinase Kinase Kinase 4 (MAP4K4) in hohem Maße (89 - 109 %) inhibiert wurde.

MAP4K4 zählt zu der Ste20/MAP4K-Kinasefamilie und ist in zahlreichen Krebstypen und Tumorzelllinien überexprimiert.^[171a] Innerhalb der Kinasefamilie ist MAP4K4 neben TNIK, MINK1 und NESK einer von vier Vertretern der GCK-IV-Unterfamilie.^[169] Die Kinase besteht aus einer Kinasedomäne und einer C-terminalen Zitron-homologen Domäne, die für die positive oder negative Regulation durch vorgeschaltete Kinasen wichtig ist.^[169] MAP4K4 wird in allen Gewebetypen exprimiert, wobei in einigen Geweben, unter anderem im Gehirn, ein erhöhter Gehalt vorliegt.^[170] MAP4K4 spielt eine wichtige Rolle in der Invasivität, Adhäsion, Migration und Transformation von Tumorzellen^[193] und ist in 40 der NCI-60-Tumorzelllinien überexprimiert, was es zu einem möglichen Zielprotein für neuartige Wirkstoffe macht.^[169-170] MAP4K4 ist darüber hinaus ein potenzieller Regulator der Regeneration von Skelettmuskeln und wird als Zielprotein für die Therapie von Krankheiten wie Kachexie diskutiert.^[171d] Essentielle Funktionen der Kinase sind in verschiedenen Prozessen wie der Embryonalentwicklung, Entzündungen, Diabetes und der Zelldynamik bekannt.^[169, 194] In Bezug auf neuronale Zellen ist MAP4K4 erst in den letzten Jahren näher untersucht worden. Loh et al. wiesen MAP4K4 jedoch als relevant für das Neuritenwachstum nach, da eine Herabregulierung der Kinase zu verstärktem Wachstum führte.^[167] In einer weiteren Studie wurde eine parallele Inhibition von MAP4K4 und GSK-3 β durch die niedermolekulare Substanz Kenpaullon als überlebensfördernd für Motoneuronen gezeigt.^[171e] MAP4K4 aktiviert über mehrere nachgeschaltete Kinasen die c-Jun N-terminale Kinase (JNK)^[195] und ist dadurch in einen JNK-vermittelten Apoptose-Signalweg involviert (Abbildung 7.2).^[171e] Eine Behandlung von ATRA-differenzierten SH-SY5Y-Zellen durch Kenpaullon führte in dem etablierten Testsystem zu einer Erhöhung des Neuritenwachstums um 106 %. Die Steigerung des Neuritenwachstums in Folge von **PS201S**-Behandlung scheint daher über den gleichen Signalweg ermöglicht zu werden wie die verbesserte Überlebensfähigkeit der Motoneuronen durch Kenpaullon.

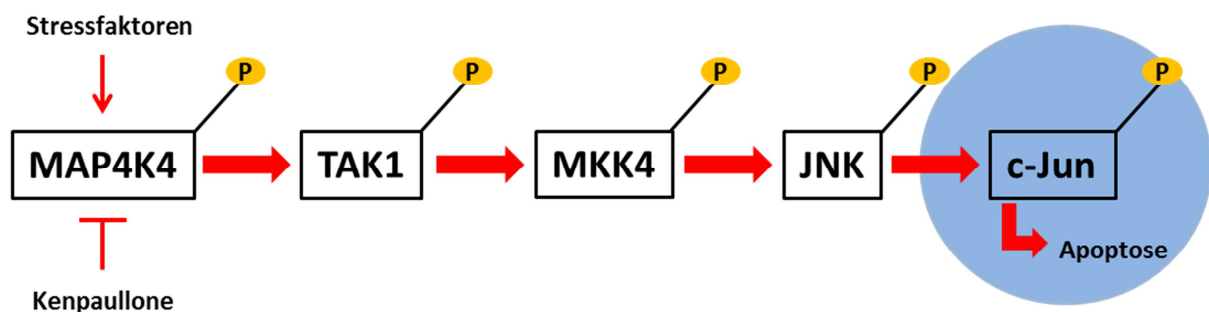


Abbildung 7.2: JNK-vermittelte Apoptose-Signalkaskade

Der Signalweg wird durch stressbedingte MAP4K4-Aktivierung ausgelöst und führt über mehrere Schritte zur Phosphorylierung von c-Jun, was zur Transkription Apoptose-fördernder Gene führt. Kenpaullon blockiert den Signalweg durch Inhibition von MAP4K4 [modifiziert nach ^[171e]]

In den vergangenen Jahren sind einige Inhibitoren der Kinaseaktivität von MAP4K4 entwickelt worden. Ein virtueller Screeningansatz führte zu der Identifizierung eines potenten Inhibitors mit einem IC_{50} -Wert von 94 nM. Über eine Struktur-Aktivitäts-Analyse zahlreicher Derivate wurde durch die Substanz PF-6260933 (Abbildung 7.2) die Aktivität gesteigert ($IC_{50} = 3,7$ nM). PF-6260933 wies jedoch keine Spezifität für MAP4K4 auf, sondern wurde ebenfalls als starker Inhibitor der eng verwandten GCK-Kinasen ZC2, ZC3, TNIK und MINK1 detektiert. Für TNIK und MINK1 wurden ebenfalls IC_{50} -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich gemessen. Innerhalb der GCK-Kinasen ist die ATP-Bindestelle hoch konserviert und weist Homologien von über 95 % auf,^[171a] wodurch eine spezifische Wirkung für einen Inhibitor in dieser Unterfamilie stark eingeschränkt ist. Eine potenzielle Selektivität von MAP4K4-Inhibitoren wird jedoch dadurch gesteigert, dass die Phosphat-bindende Schleife (engl. *phosphate-binding loop*, *P-loop*) nicht wie üblich in einer verlängerten, sondern einer kettenförmigen Konformation vorliegt.^[171a] Dies tritt nur bei 12,5 % aller Kinasen auf.^[196]

Potenzielle MAP4K4-Inhibitoren wurden basierend auf einem Pyrrolotriazin-Gerüst mit verschiedenen Substitutionsmustern detektiert, von denen einige hervorragende Bioverfügbarkeiten in Tiermodellen aufwiesen (GNE-495, 35, 44, Abbildung 7.3).^[171c, 171d] Entscheidend bei diesen Verbindungen ist eine Aminogruppe am Pyrrolotriazin, durch die eine Wasserstoffbrückenbindung zu Glu106 ermöglicht wird.^[171c] Über die gleiche Substitution bindet eine 4-Aminopyridopyrimidin-Verbindung mit nanomolarer Aktivität (29, Abbildung 7.2).^[197] Als MAP4K4-Inhibitor wurde auch ein Derivat des ROCK-Inhibitors Y-27632 (YA2, Abbildung 7.2) beschrieben, bei dem die Inhibition im Zuge von Selektivitätsanalysen ermittelt wurde.^[171b] Detaillierte Bindungsstudien mit MAP4K4 wurden hier nicht durchgeführt, jedoch besitzt diese Verbindung ebenfalls ein aminosubstituiertes Ringsystem, weshalb ein ähnlicher Bindungsmechanismus vermutet werden kann.

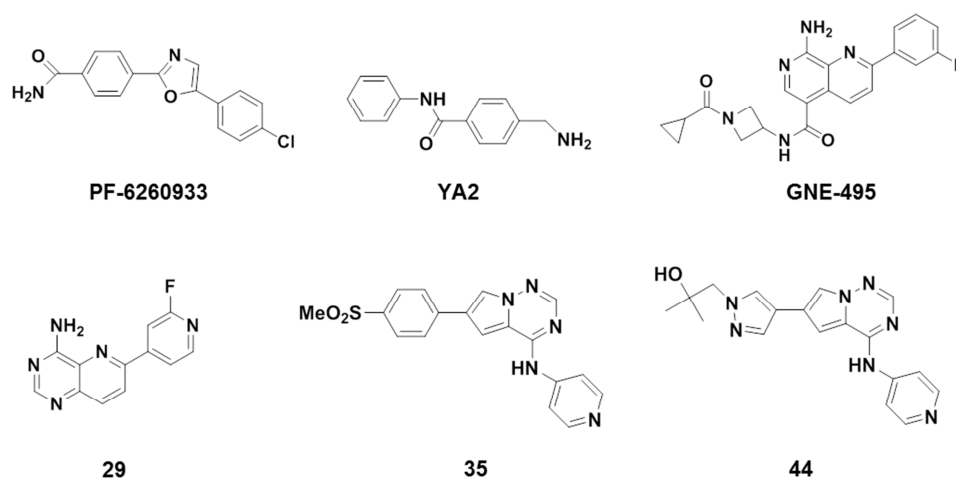


Abbildung 7.3: Auswahl bekannter Inhibitoren von MAP4K4

Zur detaillierteren Untersuchung des Bindungsmechanismus von **PS201S** an MAP4K4 wurde die Substanz mit der humanen Wildtyp-Kinase co-kristallisiert. Anhand der Kristallstruktur konnte ermittelt werden, dass es sich um einen Typ I-Inhibitor handelt, der über zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren Glu106 und Cys108 interagiert. Eine weitere Interaktion findet über die Hydroxylgruppe des 4-Hydroxyphenylsubstituenten mit Lys54 statt. Durch diese Interaktion könnte sich anhand der Kristallstruktur erklären lassen, weshalb die an gleicher Position fluorsubstituierten Analoga der aktiven Substanzen weder das Neuritenwachstum verstärken noch MAP4K4 inhibieren. Fluorderivate wurden im Zuge der Synthese der Substanzbibliothek ausschließlich für **PS100S** und **PS245S** synthetisiert. Diese Verbindungen sind als **PS282S** bzw. **PS251S** benannt. Beide Substanzen verstärken das Neuritenwachstum lediglich um 2 – 8 %, während keine phänotypischen Unterschiede zur entsprechenden Vehikelkontrolle zu beobachten sind. Lys54 ist als wichtiger Aminosäurerest bei der Regulation der Kinaseaktivität von MAP4K4 bekannt, da eine Mutation dieser Aminosäure zu Arginin zu einer kompletten Aufhebung der Kinaseaktivität führt.^[169]

PS201S weist eine Pentyl-Seitenkette auf und ist dadurch geeignet für die Bindung an die ATP-Bindestelle, wobei diese jedoch räumlich limitiert zu sein scheint. Heptylketten wie bei der Substanz **PS248S** (Abbildung 7.4) werden jedoch noch toleriert, da diese Substanz MAP4K4 mit ähnlicher Potenz inhibiert (5,2 μM). Die Substanz ist in SH-SY5Y-Zellen jedoch zytotoxisch, was sich durch die längere Seitenkette erklären ließe. Allerdings besitzt MIL1 A ebenso wie die weiteren neurotrophen Pyridonalkaloide eine noch längere Seitenkette, so dass im Fall von **PS248S** andere Wechselwirkungen, eventuell durch die nicht vorhandenen Doppelbindungen, der Grund für die Toxizität zu sein scheinen. Weitere Derivate mit langer Seitenkette, wie **PS124S** oder **PS418S** (Abbildung 7.4), zeigten ebenfalls zytotoxische Effekte.

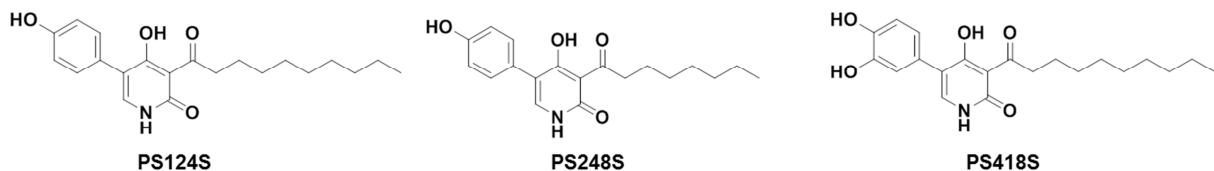


Abbildung 7.4: Chemische Strukturen von 4-Hydroxy-2-pyridonen mit zytotoxischen Effekten in SH-SY5Y-Zellen

Synthetisierte Verbindungen, die das 2,4-Dimethoxypyridin-Grundgerüst trugen, aber ansonsten analog zu den aktiven Pyridonverbindungen waren, wurden ebenfalls als inaktiv

bestimmt. Eine deutliche Verstärkung des Neuritenwachstums wurde lediglich im Fall von **PS641S**, dem Pyridinanalogen zu **PS199S**, beobachtet. Hier lag jedoch keine phänotypische Veränderung zu der DMSO-behandelten Kontrolle vor, so dass hier Fehler bei der Messung oder Quantifizierung aufgetreten sein können. Die weiteren Pyridinanaloga erhöhten das Neuritenwachstum um 14 – 22 %, zudem wiesen einige Substanzen zytotoxische Effekte bei einer Konzentration von 10 μM auf. Die Kristallstruktur lässt darauf schließen, dass 2,4-Dimethoxyypyridine eine geringe Affinität zu MAP4K4 aufweisen, da keine Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu106 und Cys108 ausgebildet werden können. Diese scheinen essentiell für die Bindung zu sein.

Die Verbindungen **PS67S** und **PS171S** (Abbildung 7.5) wurden im Screening der Firma Neuro-Zone in primären hippokampalen Rattenneuronen als neurotroph ermittelt und erhöhten das Neuritenwachstum dort um 21 %. Verglichen mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten ist die Zunahme des Neuritenwachstums recht gering. Zahlreiche MILI A-Derivate lösten Steigerungen in diesem Prozentbereich aus, was jedoch nicht als neurotrophe Aktivität gewertet wurde. Im hier verwendeten Testsystem wurden für Substanzen mit einem um 20 % erhöhten Neuritenwachstum keine phänotypischen Veränderungen festgestellt. Insgesamt ergaben sich derartige Varianzen durch Schwankungen in den Messungen, da die durchschnittliche Neuritenlänge beispielsweise bei leicht verminderter Zellzahl bereits leicht zunahm. **PS67S** und **PS171S** wurden als inaktive Substanzen auf SH-SY5Y identifiziert. **PS67S** wies zwar eine Zunahme der Neuritenlänge von 63 % auf, was jedoch auf unspezifische Detektionen von Mikrotubuli undifferenzierter Zellen zurückzuführen ist. Aufgrund der strukturellen Notwendigkeiten, die zu einer starken Affinität für die ATP-Bindestelle führen, wäre eine Inhibition durch **PS67S** und **PS171S** überraschend gewesen. Während es sich bei **PS67S** um ein 2,4-Dimethoxyypyridin handelt, besitzt **PS171S** einen *p*-Fluorophenylsubstituenten und eine C_9 -Seitenkette.

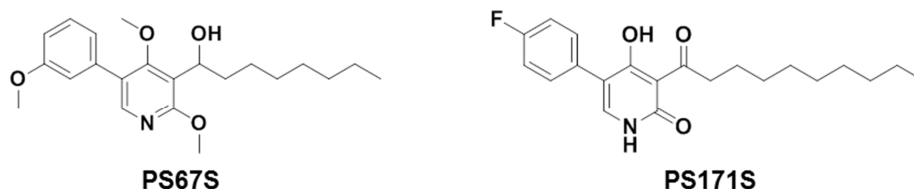


Abbildung 7.5: Chemische Strukturen der MILI A-Derivate PS67S und PS171S mit neurotrophem Einflüssen auf primäre Neuronen

Alle bislang beschriebenen MAP4K4-Inhibitoren binden ebenso wie **PS201S** an die Bindestelle von ATP und sollten dadurch kompetitiv zum Substrat wirken, auch wenn

derartige Analysen in keinem Fall durchgeführt wurden. Daher wurden für **PS201S** ausführliche Untersuchungen zur ATP-Kompetition durchgeführt. Schließlich konnte ein ATP-kompetitiver Inhibitionsmechanismus verifiziert werden. Diese Ergebnisse wurden durch die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m anhand eines Dixon-Plots bestätigt. Der K_m stieg mit steigender Substanzkonzentration an, während der Schnittpunkt der einzelnen Geraden auf der Y-Achse determiniert wurde. Dies ist charakteristisch für kompetitive Inhibitoren.^[175] Die Co-Kristallisierung von **PS201S** und MAP4K4 ergab eine Bindung des Inhibitors an die ATP-Bindestelle, wodurch eine konkurrierende Situation zwischen dem Substrat und dem Inhibitor um die Bindestelle entsteht und bei höherer ATP-Konzentration eine höhere Inhibitorkonzentrationen notwendig ist, um die Hälfte der Proteinmenge zu inhibieren und so die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.

MAP4K4-Inhibitoren wurden anfangs nicht mit neurodegenerativen Krankheiten in Verbindung gebracht. Erst Yang et al. zeigten in ihrer Studie zur Steigerung der Viabilität von humanen Motoneuronen in ALS, dass der unselektive Kinaseinhibitor Kenpaullon das Überleben von SOD1-mutierten Motoneuronen durch duale Inhibition von GSK-3 β und MAP4K4 verbessert.^[171e] Kenpaullon wurde ursprünglich als CDK1/Cyclin-B-Inhibitor beschrieben,^[172] inhibiert jedoch zusätzlich auch weitere CDKs und die GSK-Kinasen MINK1, MAP4K2 und MAP4K5 zu 70 – 80 %, ^[174] was die starke Homologie innerhalb der GSK-Unterfamilie verdeutlicht. In neuronalen Vorläuferzellen scheint GSK-3 β in Proliferation und Differenzierung involviert zu sein,^[171e] während Inhibition der Kinase vor Tau-Aggregation und Plaquebildung bei Morbus Alzheimer schützt.^[198] Inhibition von GSK-3 β ist mit dem Schutz vor neuronaler Apoptose assoziiert.^[11b, 171e] GSK-3 β wird durch 20 μ M **PS201S** nur sehr schwach inhibiert (18,9 %), was erklären könnte, dass die Verstärkung des Neuritenwachstums durch 10 μ M **PS201S** (+ 72 %) im Vergleich zu 10 μ M Kenpaullon (+ 106 %) etwas schwächer ist und die Zellen nach Kenpaullon-Behandlung über ein noch intensiveres Neuritennetzwerk verfügen als bei Behandlung mit dem Pyridonalkaloid. Des Weiteren weist Kenpaullon bei einer Konzentration von 0,5 μ M bereits eine 93-prozentige Inhibition von MAP4K4 auf,^[174] während der IC_{50} von **PS201S** für die Inhibition von MAP4K4 bei 2,3 μ M (Thermo Fisher Scientific) bzw. 4,4 μ M (Validierung am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie) liegt. Der JNK-Apoptose-Signalweg gliedert sich in drei Ebenen, beginnend mit einer Reihe von Signalmolekülen, wie MAP4K4 oder verschiedene MEKK- oder MLK-Kinasen, die die MAPK-Kinasen MKK4 und MKK7 phosphorylieren. Die Phosphorylierung dieser Kinasen führt wiederum zur Phosphorylierung der JNK-Isoformen JNK1, JNK2 und JNK3.^[199] Durch den MAP4K4-Inhibitor Kenpaullon wurde die verminderte Phosphorylierung der JNK-Signalweg-Komponenten TAK1, MKK4, JNK und c-Jun ermittelt. Phospho-c-Jun ist in neuronalen Zellen mit stressinduzierter Apoptose assoziiert.^[171e]

Die multifunktionalen JNK-Kinasen vermitteln neuronale Apoptose als Folge verschiedener stressbedingter Stimuli: Hierzu zählen Mangel an trophischen Faktoren, oxidativer Stress, DNA-Schädigung oder Exzitotoxizität. Daher spielt der JNK-Apoptose-Signalweg eine wichtige Rolle in neurodegenerativen Krankheiten. Beispielsweise ist im Zuge von Tau-Aggregationen bei Morbus Alzheimer ein erhöhter JNK-Gehalt detektiert worden, während eine geringe Tau-Phosphorylierung mit geringer JNK-Aktivierung einhergeht.^[199a] Daher stellen Inhibitoren des JNK-vermittelten Apoptose-Signalwegs vielversprechende Behandlungsmöglichkeiten für neurodegenerative Krankheiten dar. Zahlreiche JNK-Inhibitoren sind beschrieben und bereits in klinischen Studien untersucht worden.^[36, 38] Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Inhibitoren von MAP4K4 wäre JNK jedoch nicht direkt inhibiert, sondern die Auswirkung des Signalwegs bereits auf einer vorgeschalteten Ebene unterbunden. Somit wird lediglich der JNK-vermittelte Zelltod verhindert, vermutlich jedoch nicht die zahlreichen weiteren Funktionen der Kinase, zu denen Zellmigration, Proliferation und mitotischer Arrest zählen.^[169] So können auch die beschriebenen MILI A-Derivate einen sinnvollen Beitrag zur Erforschung neuartiger Wirkstoffmöglichkeiten zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen leisten.

Die intrazelluläre Bindung von MAP4K4 durch das aktivste 4-Hydroxy-2-pyridon **PS201S** konnte mit Hilfe der ATP-basierten Pull-Down-Methode nicht verifiziert werden. Gegenüber dem DMSO-behandelten Lysat war bei der **PS201S**-behandelten Probe nur eine marginale Abnahme der Bandenintensität zu erkennen. Verglichen mit einem Lysat, welches nicht für die Proteinanreicherung genutzt worden war, war auch in der Vehikelkontrolle eine deutlich geringere Intensität zu beobachten, was auf starken Verlust von Protein im Laufe der Pull-Down-Methode hindeutet. Dadurch ist die Methode weniger sensitiv für Intensitätsunterschiede. Hier wäre eine Ankonzentrierung des Lysats möglich, um die Sensitivität zu erhöhen. Zudem könnte die Lyse der Zellen und die Denaturierung der Proteine optimiert werden, um einen höheren Proteingehalt zu erreichen. Alternativ könnte für die Bestätigung der intrazellulären Bindung beispielsweise der *Cellular thermal shift assay* (CETSA) verwendet werden,^[200] der an anderer Stelle in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Bezüglich der Selektivität von **PS201S** wären auch proteomweite Untersuchungen interessant, um weitere Proteine, die unter Umständen ebenfalls durch die Substanz moduliert werden, zu identifizieren. Dies könnte auch Aufschluss darüber geben, ob weitere Kinasen ebenfalls intrazellulär mit PS201S interagieren.

Die hier erläuterten Untersuchungen zu den neurotrophen 4-Hydroxy-2-pyridonen auf Basis von MILI A stellen eine geeignete Basis für die Erforschung neuartiger Wirkstoffe gegen neurodegenerative Krankheiten dar. Dies wurde insbesondere am Beispiel der aktivsten Substanz **PS201S**, die die GCK-Kinase MAP4K4 in Konkurrenz mit ATP inhibiert.

Im Zuge der Untersuchung von Testsubstanzen auf neuroprotektive Eigenschaften wurde eine Pyridinverbindung der MILI A-inspirierten Substanzkollektion als neuroprotektiv ermittelt. Eine Vorinkubation mit 30 μM **PS574S** erhöhte die Anzahl intakter Zellen nach L-Glutaminsäure-Behandlung um 170 % im Vergleich zu Zellen, die ausschließlich mit L-Glutaminsäure behandelt worden waren. Der protektive Effekt war konzentrationsabhängig, da die Zunahme der lebenden Zellen bei Applikation von 10 bzw. 1 μM der Substanz 120 % bzw. 33 % betrug. Bei höheren Konzentrationen wies **PS574S** damit einen Effekt auf, der mit den neuroprotektiven Naturstoffen Pregnenolon und Progesteron vergleichbar war. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass Glutamat-induzierte neuronale Schädigung in SH-SY5Y-Zellen nicht über einen NMDA-Rezeptor-vermittelten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration ausgelöst wird,^[23] sondern über oxidativen Stress, was unabhängig von diesem Rezeptor abläuft. Die Expression von NMDA-Rezeptoren wurde in SH-SY5Y-Zellen zwar bestätigt, jedoch postulierten Sun et al., dass exzitotoxische Effekte nicht über diese Rezeptoren vermittelt werden. Nach 24-stündiger Glutamat-Behandlung wurde in dieser Studie ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration gemessen, was jedoch unabhängig der Glutamat-Rezeptoren geschah. Der toxische Effekt entsteht vielmehr durch den Glutamat-Cystin-Antiporter, was das Gleichgewicht der intra- und extrazellulären Thiolkonzentrationen verändert.^[201] Die als Kontrollsubstanzen eingesetzten Neurosteroidoide Pregnenolon und Progesteron wirken hingegen nicht über NMDA-Rezeptoren und können daher als protektive Kontrollen eingesetzt werden. Für Progesteron sind zahlreiche Einflüsse auf intrazelluläre Signalwege wie den MAPK- und den PI3K/Akt-Signalweg bekannt, was zu erhöhter Expression antiapoptotischer Proteine führt.^[130a] Der genaue Mechanismus der Neuroprotektion durch Pregnenolon ist nicht gänzlich entschlüsselt, ein entscheidender Effekt besteht vermutlich in der Beeinflussung der Aromatase.^[202] Auch wenn ein regulatorischer Effekt der NMDA-Rezeptor-Aktivität bekannt ist,^[130b] scheinen NMDA-Rezeptor-abhängige Prozesse nicht ausschlaggebend für den protektiven Einfluss von Pregnenolon zu sein. Dies wird durch die Inaktivität des Naturstoffes Rhynchophyllin verstärkt, welcher ebenfalls als mögliche Kontrollsubstanz getestet wurde, jedoch keine protektive Aktivität auf SH-SY5Y-Zellen aufweist. Rhynchophyllin wirkt als Antagonist des NMDA-Rezeptors und inhibiert nachfolgende Signalwege nach Induzierung der Exzitotoxizität und vermindert oxidativen Stress.^[57] Da über die biologische Aktivität von Pyridinderivaten der 4-Hydroxy-2-pyridone kaum Informationen bekannt sind, könnte diese Erkenntnis ein möglicher Startpunkt für weitere Untersuchungen zur Neuroprotektion von 2,4-Dimethoxypyridinen sein.

7.3 Identifizierung und Charakterisierung antimittotischer Substanzen aus MILI A- und Iridoid-inspirierten Substanzbibliotheken

Mit Hilfe eines zellbasierten Screenings in HeLa-Zellen wurde eine Auswahl der Substanzbibliotheken basierend auf MILI A und Iridoiden auf Veränderungen des Phänotyps untersucht. Die Zellen wurden für 24 h mit 30 μM der Substanzen behandelt und durch immunzytochemische Färbung DNA, Tubulin und Aktin visualisiert. Phänotypische Veränderungen nach Substanzbehandlung konnten für sechs Verbindungen detektiert werden. Die Zellpopulationen wiesen in den meisten Fällen eine hohe Anzahl abgerundeter Zellen mit intensiver Tubulinfärbung auf. Dieser Phänotyp ähnelt einer Behandlung mit dem Tubulin-Binder Taxol^[203] und deutete somit auf mitotischen Arrest hin. Die Anzahlen der abgerundeten Zellen waren auch im Vergleich zur DMSO-Vehikelkontrolle eindeutig erhöht. Nach Behandlung mit **PS179S** und **PS227S** zeigten die Zellen nur eine leicht erhöhte Anzahl abgerundeter Zellen, jedoch ebenfalls veränderte Tubulin- und Aktinstrukturen, was ein Anzeichen für toxische Effekte dieser Verbindungen sein könnte. Eine Arretierung der Zellen in der Mitose war durch eine phospho-Histon H3-Färbung für **PS229S** und **PS238S** (Abbildung 7.6) nachweisbar. **PS229S** löste einen mitotischen Arrest in etwa 20 % der Zellen bei einer Applikation von 25 μM aus, während der Einfluss von **PS238S** mit 13 % etwas schwächer war. DMSO-behandelte Zellen wiesen 2 % mitotische Zellen auf. Überraschend war, dass im Fall von **PS222S** und **PS240S** kein mitotischer Arrest nach Behandlung mit den Substanzen nachweisbar war, obwohl ebenfalls ein großer Teil der Zellpopulation einen abgerundeten Phänotyp aufwies. Für **PS229S** und **PS238S** wurde zudem ein leichter inhibitorischer Einfluss auf die Polymerisation von Tubulin festgestellt. Für Pyridonalkaloide aus natürlichen Quellen sind zahlreiche biologische Aktivitäten bekannt, jedoch gibt es nur wenige Vertreter mit bekannten antiproliferativen Eigenschaften. Eine Studie zu biologischen Aktivitäten ausgewählter Verbindungen dieser Substanzklasse zeigte antiproliferative Effekte einiger Pyridonalkaloide auf Jurkat-Zellen. Prebassianin B und Pyridovericin unterbanden die Zellproliferation mit IC_{50} -Werten von 7 – 8 μM .^[192b] In HeLa-Zellen waren die Einflüsse schwächer, Prebassianin B zeigte mit 16 μM den stärksten Effekt.^[192b] Die in dieser Arbeit ermittelten antiproliferativen Substanzen basierten zwar auf den bioaktiven 4-Hydroxy-2-pyridonen, jedoch besaßen die Verbindungen das 2,4-Dimethoxypyridin-Grundgerüst. Antiproliferative Substanzen mit einer Pyridin-Kernstruktur sind ebenfalls rar. Temple et al. beschrieben eine proliferationshemmende Wirkung von 1,2-Dihydropyrido[3,4-b]pyrazin-7-carbamat, welches ebenfalls einen Pyridinring trägt. Die Verbindung ist ebenso wie zahlreiche Derivate ein potenter Inhibitor der Proliferation in kultivierten Leukämiezellen.^[204] 1,2-Dihydropyrido[3,4-b]pyrazin-7-carbamat wurde als Tubulin-Binder beschrieben, der an die Colchicin-Bindestelle bindet.^[204b] Die Bindung an die Colchicin-Bindestelle führt zur Destabilisierung der Mikrotubuli, da eine geradlinige Struktur des Tubulin-Dimers durch die

Bindung aus sterischen Gründen verhindert wird.^[113] Somit wären **PS229S** und **PS238S** als Tubulin-Bindungspartner über die Colchicin-Bindestelle denkbar, wobei der Effekt auf die Bildung der Mikrotubuli in der Mitose eher schwach sein dürfte, da der Effekt der Substanz deutlich schwächer als der von Nocodazol ist. Nocodazol bindet ebenfalls an die Colchicin-Bindestelle und weist einen starken destabilisierenden Effekt auf die Polymerisation von Tubulin-Dimeren auf, was die Verbindung zu einer weit verbreiteten Kontrollsubstanz für Tubulin-bindende Moleküle macht.^[113]

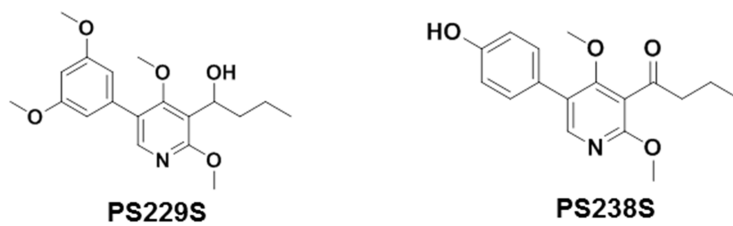


Abbildung 7.6: Chemische Strukturen der 2,4-Dimethoxypyridine mit antiproliferativen Eigenschaften

Einen ähnlichen Effekt zeigten auch drei Iridoid-inspirierte Verbindungen aus der Substanzbibliothek von Dr. Pierre-Yves Dakas. Die Verbindungen **PYD1-72+247-1-1**, **PYD1-235C-1** und **PYD1-237C-1** (Abbildung 7.7) führten bei einer Konzentration von 30 μM zu einer deutlich erhöhten Anzahl abgerundeter Zellen mit intensiver Tubulin- und Aktinfärbung. Für die Substanzen **PYD1-72+247-1-1** und **PYD1-237C-1** (Abbildung 7.7) konnte durch eine phospho-Histon H3-Färbung ein konzentrationsabhängiger mitotischer Arrest ermittelt werden. Bei Applikation von 50 μM beider Substanzen waren über 30 % mitotische Zellen nachweisbar, während DMSO-behandelte Zellen 6 % mitotische Zellen aufwiesen. Das intensiv charakterisierte, natürliche Iridoid Catalpol (Abbildung 7.7) weist zahlreiche biologische Aktivitäten auf, zu denen auch eine antiproliferative Wirkung zählt.^[25] Catalpol wurde als DNA-Polymerase-Inhibitor mit einem IC_{50} von 47,8 μM beschrieben, was durch Derivatisierung auf 1,8 – 4,8 μM verbessert werden konnte.^[205] In den phospho-Histon H3-Färbungen wurde eine gesteigerte Anzahl mitotischer Zellen bestimmt, weshalb eine Wirkung auf die DNA-Polymerase jedoch nicht in Frage kommt, da eine Inhibition der DNA-Polymerase zu einem Arrest in der G_0/G_1 -Phase führt.^[205] Analog zu den 2,4-Dimethoxypyridinen konnte für beide Verbindungen ein destabilisierender Effekt auf die Tubulin-Polymerisation gezeigt werden.

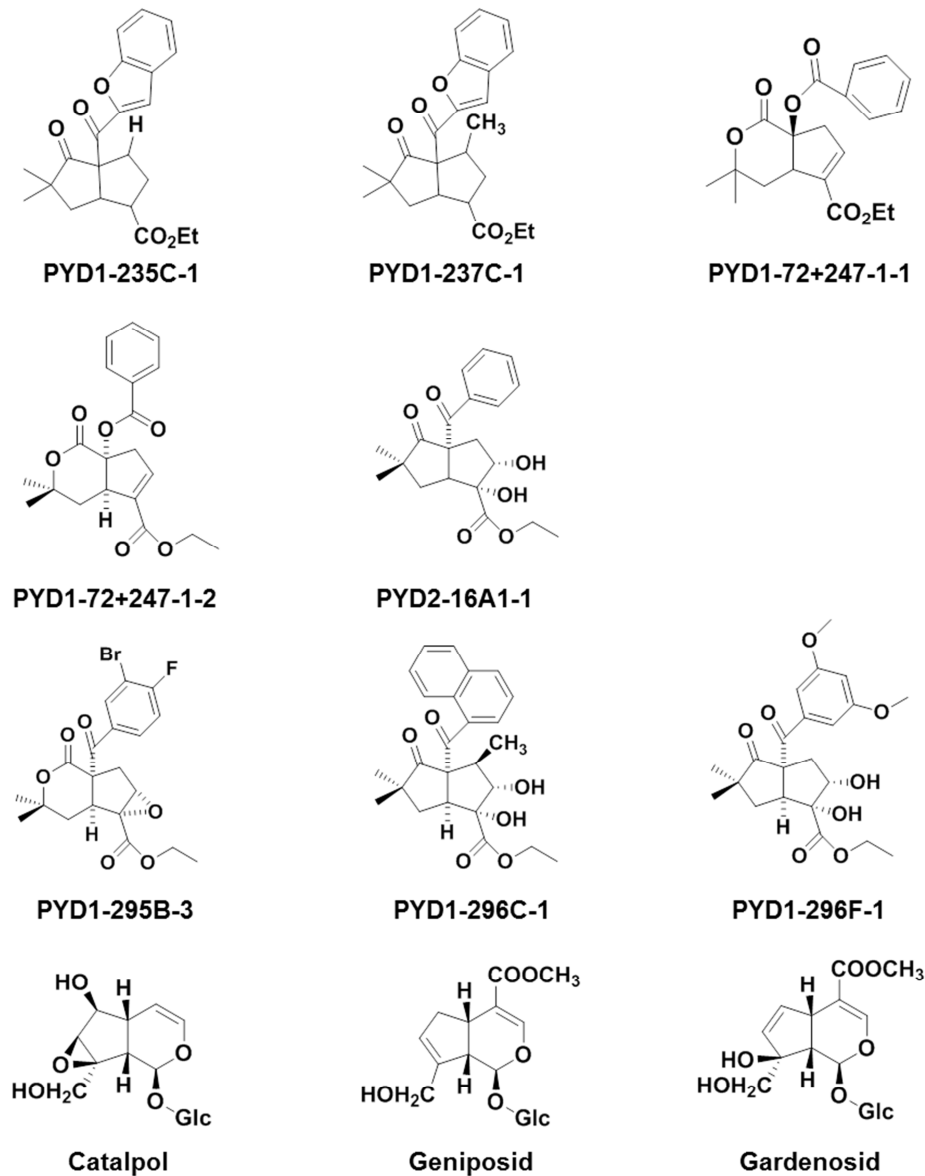


Abbildung 7.7: Vergleich der chemischen Strukturen der als antiproliferativ (PYD1-235C-1, PYD1-237C-1, PYD1-72+247-1-2) und neurotroph auf hippokampale Rattenneuronen (PYD1-72+247-1-2, PYD2-16A1-1) und Motoneuronen (PYD1-295B-3, PYD1-296C-1, PYD1-296F-1) getesteten Iridoide

Neben der bereits erwähnten Bindung an die Colchicin-Bindestelle resultiert auch eine Bindung an die Vinca-Bindestelle in einer Destabilisierung von Mikrotubuli und daraus folgender Zerstörung der mitotischen Spindel und mitotischem Arrest.^[72, 108] Bei mitotischem Arrest sind auch Beeinflussungen weiterer Bestandteile der Mitose möglich. Ein Beispiel ist der *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC), welcher die Mitose bei fehlerhaft an die Kinetochore angehefteten Spindel-Mikrotubuli stoppt, bis der Fehler behoben ist.^[67] Als weiterer Kontrollpunkt dient der *Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome* (APC/C), der zum Übergang in die Anaphase passiert werden muss.^[71] Zu dem hier detektierten mitotischen Arrest könnten daher auch Inhibitionen von Bestandteilen dieser Kontrollpunkte führen.

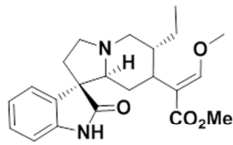
Ebenso ist die Inhibition von Proteinen, die für die Fehlerbehebung unmittelbar benötigt werden, möglich, z.B. Aurora B, Hec1 oder Mps1.^[67]

Einige der Iridoid-basierten Substanzen von Dr. Pierre-Yves Dakas hatten in vorhergehenden Untersuchungen verstärkende Effekte auf das Neuritenwachstum gezeigt. Die Behandlung mit **PYD1-72+247-1-2** ergab in hippokampalen Rattenneuronen eine verminderte Anzahl an Neuriten, die dafür eine doppelte Länge im Vergleich zu DMSO- oder unbehandelten Zellen aufwies. Einen ähnlichen Effekt zeigte **PYD1-295B-3** in Motoneuronen, während **PYD1-296C-1** in diesen Zellen die Gesamtnuritenlänge erhöhte.^[8b] Im Zuge der Experimente der Firma Neuro-Zone in hippokampalen Rattenneuronen wurde **PYD2-16A1-1** als die potenteste Verbindung identifiziert und wies eine Erhöhung des Neuritenwachstums um 21,4 % bei Applikation von 1 μ M auf.^[8b] Trotz dieser vielversprechenden Voruntersuchungen konnten keine neurotrophen Substanzen aus den Iridoid-inspirierten Substanzkolektionen von Dr. Pierre-Yves Dakas und Dr. Peter Schröder in SH-SY5Y-Zellen identifiziert werden. Zwar weisen die synthetisierten Verbindungen keinen Glukoserest auf, der für natürlich vorkommende Iridoide charakteristisch ist,^[25] allerdings kann dies als Grund für die fehlende Aktivität ausgeschlossen werden. Es wurde auch für ein aglykones Derivat von Geniposid eine neurotrophe Aktivität nachgewiesen.^[206] Verstärkungen des Neuritenwachstums wiesen auch die gut charakterisierten Iridoide Catalpol, Geniposid und Gardenosid (Abbildung 7.7) auf.^[25] Da diese Iridoide jedoch mit Ausnahme des Glukoserests einfache Substitutionen besitzen, könnten in vielen Fällen die sperrigen Substituenten ein Grund für die Inaktivität der Substanzkolektionen sein. Die unterschiedliche Aktivität von **PYD2-16A1-1** ließe sich durch Unterschiede zwischen primären Neuronen und neuronalen Tumorzelllinien erklären. Auch wenn SH-SY5Y-Zellen seit langem intensiv in den Neurowissenschaften genutzt werden und biochemische und funktionelle Ähnlichkeiten mit Primärzellen aufweisen, ist bis heute unklar, ob ausdifferenzierte SH-SY5Y identische Eigenschaften besitzen. Unterschiede können sich auch durch die verwendeten Differenzierungsreagenzien ergeben, die über die Modulation unterschiedlicher Mechanismen wirken.^[151, 207]

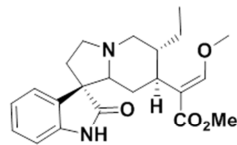
Ebenso waren bei keiner der Iridoid-inspirierten Substanzen neuroprotektive Effekte nachweisbar. Hier wären aufgrund der zahlreichen neuroprotektiven Eigenschaften von natürlich vorkommenden Iridoiden^[25] schützende Einflüsse auf die Nervenzellen zu erwarten gewesen.

7.4 Identifizierung und Charakterisierung neurotropher Substanzen aus einer Secoyohimban-inspirierten Substanzbibliothek

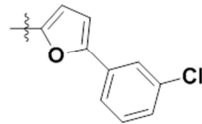
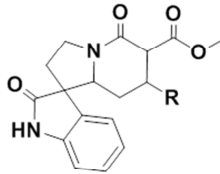
Indolalkaloide mit dem Secoyohimban-Grundgerüst sind für zahlreiche biologische Aktivitäten bekannt.^[54, 61a, 62a, 63] Für die Erforschung neuartiger Wirkstoffe sind insbesondere die Substanzen Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin aus *Uncaria rhynchophylla* aufgrund ihrer neuromodulatorischen Eigenschaften interessant.^[54] Kürzlich konnten zudem positive Einflüsse von Derivaten dieser Naturstoffe auf das Neuritenwachstum primärer Neuronen nachgewiesen werden.^[8a] In dieser Arbeit wurden 87 auf Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin basierende Verbindungen auf neuromodulatorische Effekte untersucht, was zur Identifizierung von zwei Enantiomerenpaaren mit neurotropher Wirkung in SH-SY5Y-Zellen führte. Die Verbindungen (+)-**6qa**, (-)-**6qa** und (-)-**6ra** (Abbildung 7.8) erhöhten die durchschnittliche Neuritenlänge um 20 – 61 % bei Behandlung mit 10 µM. (+)-**6ra** wirkte bei Applikation dieser Konzentration toxisch, steigerte jedoch bei 1 µM das Neuritenwachstum um 42 % und stellte damit den aktivsten Vertreter dieser Substanzbibliothek dar. Für (-)-**6qa** konnte zusätzlich ein konzentrationsabhängiger neurotropher Effekt anhand einer schrittweise steigenden Neuritenlänge ermittelt werden. Die aktiven Enantiomerenpaare wiesen Furylgruppen mit 2-Chlorophenyl- bzw. 2,3-Dichlorophenylsubstituenten auf, was auf eine Interaktion der Halogensubstituenten mit dem Zielprotein hindeutet. Insbesondere scheint die Halogenierung an C2 wichtig für die Bindung zu sein. Im Gegensatz dazu besaßen die neuroaktiven Verbindungen in Motoneuronen einfache Phenylgruppen mit Substitutionen an C2, die hier allerdings aus Trifluoromethyl- (**6ba**) und Methoxygruppen (**6fa**) bestanden. Secoyohimbane mit neurotrophen Effekten auf Hippokampus-Neuronen wiesen jedoch Naphthyl- (**6ia**) und Furylsubstituenten (**6na**) auf (Abbildung 7.8). Insgesamt ist ein gemeinsamer Bindungsmechanismus über die variierten Substituenten unwahrscheinlich, da unterschiedliche Substituenten toleriert werden. Daher sind verschiedene Zielproteine denkbar. Alternativ könnte die Bindung über Bestandteile des Grundgerüsts ermöglicht werden, da dieses für alle Vertreter der Substanzbibliothek identisch ist.



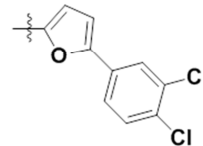
Rhynchophyllin



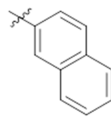
Isorhynchophyllin



(±)-6qa



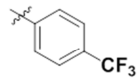
(±)-6ra



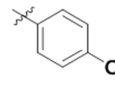
(±)-6ia



(±)-6na



(±)-6ba



(±)-6fa

Abbildung 7.8: Vergleich der chemischen Strukturen von Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin mit Secoyohimbanen mit neurotrophen Effekten in SH-SY5Y-Zellen (6qa, 6ra), hippocampalen Rattenneuronen (6ia, 6na) und Motoneuronen (6ba, 6fa)

Die Verbindung (+)-**6ia** zeigte in hippocampalen Rattenneuronen einen deutlichen Effekt auf die Länge der einzelnen Neuriten, die nach Substanzbehandlung die doppelte Länge im Vergleich zur DMSO-Vehikelkontrolle aufwiesen. Die Gesamtneuritenlänge wurde hierbei nicht beeinflusst, da die Zellen deutlich weniger Neuriten aufwiesen als die Kontrolle.^[8a] Aus diesem Grund wurden sowohl die in primären Neuronen aktiven Substanzen als auch die neurotrophen Verbindungen in SH-SY5Y-Zellen auf mögliche Einflüsse auf die Neuritenanzahl getestet. Keine der in Abbildung 7.8 gezeigten Verbindungen wies jedoch einen merklichen Effekt auf die Neuritenanzahl in SH-SY5Y-Zellen auf. Die gemessenen Neuritenanzahlen pro Zelle lagen im Bereich von 1,6 – 2,2, während die prozentuale Zunahme maximal 17 % erreichte. Auch die Positivkontrolle BDNF steigerte trotz des bekannten Effektes auf die dendritische Verästelung^[35] die Neuritenanzahl lediglich um 13 %. Phänotypisch konnten ebenfalls keine Einflüsse auf die Neuritenanzahl erkannt werden. Im Gegensatz zum aktiven Pyridonalkaloid **PS201S** wiesen die Zellen keine besonderen phänotypischen Änderungen auf, da nur das bestehende Netzwerk intensiviert wurde. Auch

hier verringert sich aufgrund der Verdichtung des Netzwerkes der Raum für die Bildung oder Verzweigung der Neuriten, was in geringen Veränderungen der Anzahlen resultiert. Die Verzweigungsanzahl wurde zusätzlich für die neurotrophen Verbindungen in SH-SY5Y-Zellen bestimmt und zeigte eine hochsignifikante Zunahme von 37 – 91 %. Jedoch waren die Verzweigungsanzahlen, wie schon für die Pyridonalkaloide beschrieben, mit 0,3 – 1,7 Verzweigungen pro Zelle sehr gering. Daher können auch hier keine verlässlichen Aussagen über mögliche Effekte auf die Verästelung der Neuriten getroffen werden.

Detaillierte Informationen über den Bindungsmechanismus der Naturstoffe Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin an ihre Zielproteine sind nicht bekannt. Beide Verbindungen sind Antagonisten der NMDA-Rezeptoren, deren Agonist Glutamat eine entscheidende Rolle im Prozess der Exzitotoxizität spielt.^[208] Der oxidative Stress nach Induzierung der Exzitotoxizität wird durch Bindung von Rhynchophyllin an den NMDA-Rezeptor inhibiert.^[57] Da die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität in SH-SY5Y über NMDA-unabhängige Prozesse zum Zelltod führt,^[201] war im Zuge der Untersuchung neuroprotektiver Effekte von Testsubstanzen keine Aktivität von Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin ermittelt worden. Isorhynchophyllin wirkt auch als Antagonist des Serotonin-Rezeptors 5-HT_{2A}.^[59] Mit Hilfe eines selektiven 5-HT_{2A}-Antagonisten konnte die Beteiligung dieses Rezeptors am Neuritenwachstum aufgezeigt werden.^[209] Eine neurotrophe Wirkung von Isorhynchophyllin konnte allerdings nicht bestimmt werden, vielmehr war sogar eine Abnahme des Wachstums um 12 % zu beobachten. Da Isorhynchophyllin zusätzlich den NMDA-Rezeptor blockiert, ist der Naturstoff nicht selektiv, weshalb der nicht vorhandene Effekt auf das Neuritenwachstum durch Bindung an verschiedene Zielproteine entstehen könnte.

Für die Naturstoffe Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin wurden keinerlei Veränderungen im Vergleich zur Vehikelkontrolle bestimmt. Übersichtsartikel zu den bekannten neuromodulatorischen Eigenschaften der Verbindungen weisen auf keine neurotrophen Effekte hin.^[54] Zusätzlich wurde für Rhynchophyllin ein inhibitorischer Einfluss auf NGF-induziertes Neuritenwachstum in Rattenneuronen beschrieben. Als Mechanismus wird eine Interaktion mit dem NGF-Rezeptor TrkA diskutiert.^[182] In den Untersuchungen der Firma Neuro-Zone wurde eine Zunahme des Neuritenwachstums bei Behandlung mit 1 µM Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin ermittelt, was zu einer Steigerung von 13,3 % bzw. 18,1 % führte. Bei Applikation einer höheren Konzentration war allerdings keine Erhöhung messbar, so dass ein neurotropher Effekt hier nicht bestätigt wurde.

7.5 Charakterisierung von Sulfonylpyrimidinen als kovalente HSET-Inhibitoren

Das mitotische Kinesin HSET gilt als vielversprechendes Zielprotein für die Erforschung neuartiger Wirkstoffe zur Therapie von Krebserkrankungen. HSET ist in Tumorzellen mit amplifizierten Zentrosomen essentiell für die korrekte Durchführung der zentrosomalen Gruppierung,^[95] die die häufigste Strategie zur Bewerkstelligung der Mitose bei erhöhter Zentrosomenzahl darstellt.^[73] Für die Ausbildung der mitotischen Spindel bei korrekter Zentrosomenzahl ist das Kinesin aufgrund der funktionellen Dominanz der Zentrosomen nicht erforderlich,^[94] sondern wird für die Gruppierung nicht-zentrosomaler Pole durch Polymerisation der Mikrotubuli benötigt.^[95] Durch den exklusiven Bedarf für Tumorzellen stellt HSET ein vielversprechendes Ziel für Wirkstoffe dar, da gesundes Gewebe nicht geschädigt wäre.^[77b] Schädliche Nebenwirkungen durch Behandlungsstrategien von Krebserkrankungen sind weit verbreitet.^[72, 77a, 114]

Der Ausgangspunkt zur Erforschung neuartiger HSET-Inhibitoren bildete ein Screening, bei dem ca. 150000 Verbindungen aus der Substanzbibliothek des COMAS mit dem kommerziell verfügbaren ADP-Glo™-Testsystem auf Inhibition der ATPase-Aktivität der HSET-Motordomäne getestet wurden. Das Screening wurde in Anwesenheit vorpolymerisierter Mikrotubuli durchgeführt, da bei diesen Bedingungen die ATPase-Aktivität bis zu 10000-fach verstärkt wird.^[210] 600 Substanzen wiesen mit IC₅₀-Werten im Bereich von 1 – 50 µM eine inhibitorische Aktivität gegen die ATPase-Aktivität des Kinesins auf. Ein Teil der als aktiv detektierten Verbindungen wurde jedoch aufgrund von Interaktionen mit Testkomponenten ausgeschlossen. Diese Substanzen reagierten entweder mit den Mikrotubuli oder mit dem ADP-Glo™-Bestandteil Luciferase.^[184]

Als vielversprechende Substanz wurde das Sulfonylpyrimidin **236038** identifiziert (Abbildung 7.9). **236038** wies im ursprünglichen Screening einen IC₅₀ von 3,9 µM gegen die ATPase-Aktivität der HSET-Motordomäne auf. Spätere Validierungsexperimente ergaben einen IC₅₀ von 12 µM. Die von M.Sc. Mylene Hübecker und Beate Schölermann durchgeführten zellulären Tests mit HeLa-Zellen ergaben den anhand der Literatur erwarteten Phänotyp: Es konnten 23,7 % mitotische Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 25 µM des Inhibitors quantifiziert werden, von denen ein Großteil multipolare Strukturen aufwies. Mitotischer Arrest und Multipolarität traten hierbei bereits nach wenigen Stunden auf. Diese Resultate unterstützen die Inhibition des Kinesins, da die bisher beschriebenen, niedermolekularen HSET-Inhibitoren multipolare Spindeln hervorriefen.^[93, 98, 125] RNAi-induzierte Herabregulierung des Kinesins erzeugte ebenfalls Multipolarität.^[77b] Zur Charakterisierung der publizierten HSET-Inhibitoren wurden ausschließlich Zelllinien eingesetzt, die eine

erhöhte Zellzahl mit amplifizierten Zentrosomen beinhalten. Zahlreiche Zelllinien sind in Bezug auf die Zentrosomenzahl bereits charakterisiert worden. Die Brustkarzinomzelllinie BT-549 weist 45 % Zellen mit multiplen Zentrosomen auf, 31 % der Zellen beinhalten gruppierte Zentrosomen.^[77b] Somit sind diese Zellen zur Untersuchung der zentrosomalen Gruppierung geeignet. In BT-549-Zellen führte die Behandlung mit **236038** ebenfalls zu mitotischem Arrest in einem Großteil der Zellen, der mit multipolaren Spindeln einherging.

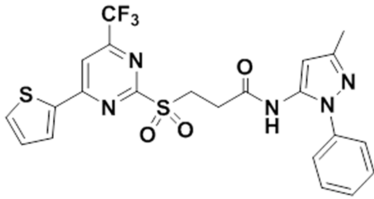


Abbildung 7.9: Kovalenter HSET-Inhibitor 236038

Überraschend war jedoch das Auftreten des Effektes in HeLa- und BT-549-Zellen mit der gleichen Intensität. Zieht man den Anteil an Zellen mit multiplen Zentrosomen als Maßstab heran, müsste der Effekt in BT-549-Zellen deutlich stärker als bei HeLa auftreten. Demgegenüber sollte in HeLa-Zellen kaum Multipolarität zu beobachten sein, da lediglich 11 % der Zellen mehr als zwei Zentrosomen aufweisen.^[77b] Kleylein-Sohn et al. beobachteten in Zellen mit korrekter Zentrosomenzahl bei HSET-Inhibition keinerlei Fragmentierung der mitotischen Spindel und daher keine Multipolarität. Bei korrekter Zentrosomenzahl ist HSET für das Gruppieren von nicht-zentrosomalen Strukturen erforderlich.^[95] HeLa-Zellen wurden bei der Charakterisierung von **AZ82** als Kontrollzelllinie verwendet und wiesen nach Behandlung mit dem HSET-Inhibitor keine phänotypischen Veränderungen auf.^[93] Zudem konnten van Heesbeen et al. nach HSET-Herabregulierung in U2OS-Zellen einen geringen Anteil an Zellen mit multipolaren Spindeln detektieren, die in etwa dem Anteil der Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen in dieser Zelllinie entspricht.^[77b, 99] Zhu et al. detektierten jedoch nach Zugabe HSET-spezifischer siRNA multipolare Spindeln in HeLa-Zellen, obwohl funktionell dominante Zentrosomen vorhanden waren.^[83a] Diese Erkenntnisse sowie die zellbasierten Untersuchungen mit **236038** verdeutlichen, dass trotz zahlreicher Studien die Funktion von HSET in Zellen mit bipolaren Strukturen nach wie vor nicht vollständig geklärt ist.

Im Zuge des Screenings wurden neben **236038** noch weitere Sulfonylpyrimidine identifiziert, die ebenfalls im niedrigen mikromolaren Bereich die ATPase-Aktivität der HSET-Motordomäne inhibierten. Der Großteil der Substanzen wies apparente IC_{50} -Werte im

Bereich von 2 – 5 μM bei der Validierung am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie auf, während im Zuge der Validierung am RIKEN Center for Sustainable Resource Science meist schwächere Aktivitäten der Moleküle ermittelt wurden. Für Substanz **236037** wurde die inhibitorische Aktivität gegenüber HSET schließlich devalidiert. Im Falle kovalenter Inhibitoren ist eine strikte Einhaltung des Arbeitsablaufes bei der Bestimmung von IC_{50} -Werten notwendig. Durch die irreversible Bindung sind halbmaximale Inhibitionen nicht vergleichbar, wenn sie zu unterschiedlichen Zeiten nach Substanzzugabe gemessen werden.^[168] Daher wurde bei sämtlichen Experimenten auf die identische Durchführung des Zeitablaufes geachtet, so dass die gemessenen Werte vergleichbar sind. Das verwendete ADP-Glo™-Testsystem zeigte in den durchgeführten Experimenten zum Teil fluktuierende Werte, was entsprechend die schwankenden Messwerte erklärt.

Die als HSET-Inhibitoren identifizierten Verbindungen wiesen das charakteristische Sulfonylpyrimidin-Grundgerüst mit 4-Trifluoromethyl- und Thiophen-Substituenten auf und unterschieden sich ausschließlich in der Amidgruppe. Hier war in Bezug auf die Aktivität keine Präferenz für bestimmte Substituenten erkennbar. Interessanterweise war die aktivste Substanz in der Validierungsstudie am RIKEN Center for Sustainable Resource Science die Verbindung **237157**, die anstatt der längeren Seitenkette der übrigen Derivate lediglich methyliert ist. Daher könnte eine kürzere Seitenkette möglicherweise die Aktivität steigern. Da jedoch keine weiteren Derivate mit verkürzter Seitenkette vorhanden waren, konnte diese Vermutung nicht näher untersucht werden. Mit Ausnahme von **236038** zeigten die Sulfonylpyrimidine keine der erwarteten phänotypischen Veränderungen sowohl in HeLa- als auch in BT-549-Zellen. Aufgrund der ähnlichen Aktivität in den *in vitro*-Experimenten war dies überraschend. Lebendzelleexperimente zeigten jedoch zytotoxische Effekte nach Substanzbehandlungen von 24 – 72 h. Anhand der Aufnahmen war eine Lebendzellanalyse der mitotischen Spindel nicht möglich, so dass hier weder bestätigt noch ausgeschlossen werden kann, ob eine Multipolarität infolge der HSET-Inhibition auch bei den weiteren Verbindungen der Grund für die Toxizität sein kann.

Die Aktivierung des SAC in Folge fehlerhafter Anheftung der Chromosomen an die Kinetochore^[67] erklärt den mitotischen Arrest nach Behandlung mit HSET-Inhibitoren. Durch die Aufhebung der Bipolarität in Folge der HSET-Inhibition ist die korrekte Positionierung der Chromosomen im Zentrum der mitotischen Spindel nicht mehr möglich.^[83a] Die Aktivierung des SAC ermöglicht der Zelle die Behebung der fehlerhaften Zusammensetzung der Spindel.^[77b] Falls dieser Fehler, wie bei der Inhibition eines essentiellen Bestandteils der mitotischen Spindel, nicht behoben werden kann, wird der apoptotische Tod der Zelle ausgelöst.^[72] Bei der HSET-Inhibition durch **236038** konnte durch Lebendzelleexperimente beobachtet werden, dass die Zellen in Anwesenheit des Inhibitors nach 24 – 48 h sterben.

In weiteren zellbasierten Tests wurde auch das Potenzial des Inhibitors **236038** zur Wiederherstellung der Bipolarität nach STLC-induzierter Monopolarität untersucht. STLC inhibiert selektiv das Kinesin Eg5, das antagonistisch zu HSET wirkt.^[94, 116] Die selektive Eg5-Inhibition bewirkt die Verhinderung der Zentrosomenteilung und führt zu einer monoastralen Struktur, in der sich die Zentrosomen im Zentrum und die Chromosomen darum bilden.^[64] Gleichzeitige Eg5- und HSET-Inhibition resultiert in pseudo-bipolaren Spindeln.^[93] Dieser Effekt konnte auch bei Behandlung von HeLa-Zellen mit **236038** und STLC beobachtet werden. Die Bipolarität konnte in den meisten Zellen wiederhergestellt werden, während bei alleiniger HSET-Inhibition hauptsächlich multipolare Spindeln und bei alleiniger Eg5-Inhibition monopolare Strukturen auftraten.

Die chemische Struktur des Inhibitors ließ eine kovalente Bindung an das Zielprotein vermuten. Der GLP-1R-Agonist BETP besitzt ebenfalls eine Sulfonylgruppe, die Cysteine kovalent bindet.^[185a] Die Bindungsstudien mit gereinigter HSET-Motordomäne und **236038** zeigten ebenfalls eine kovalente Bindung des Inhibitors an zwei Cysteine des Kinesins auf. Vergleiche mit der Proteinstruktur ergaben, dass diese Cysteine nicht im Bereich der Nukleotid-Bindestelle von HSET liegen. **AZ82** hingegen bindet nahe der Nukleotid-Bindestelle, was in der ATP-kompetitiven Wirkung dieses Inhibitors resultiert.^[93] Die Massenzunahme des Proteins betrug an beiden Cysteinen 261 Da. Daraus ließ sich eine Bindung des Pyrimidin-Grundgerüsts mit den Trifluoromethyl- und Thiophen-Substituenten an das Cystein vermuten. Reaktivitäten von **236038** mit der gereinigten Motordomäne des antagonistischen Kinesins Eg5 und dem Testpeptid Ac-YACAKASAHA wurden ebenfalls überprüft und ergaben kovalente Bindungen durch den gleichen Mechanismus. Da die Sulfonylgruppe sehr reaktiv ist, sind Bindungen an weitere Proteine sehr wahrscheinlich. Die Mikrotubuli-stimulierte ATPase-Aktivität von Eg5 wird durch die Bindung von **236038** jedoch nicht beeinflusst, da ein zusätzliches Screening, das mit der Eg5-Motordomäne durchgeführt wurde, keine Inhibition der Mikrotubuli-stimulierten Aktivität dieses Kinesins ergab. Die weiteren als Inhibitoren der ATPase-Aktivität der HSET-Motordomäne identifizierten Sulfonylpyrimidine banden sowohl HSET als auch Eg5 und Ac-YACAKASAHA kovalent. Dies unterstreicht die kovalente Bindung an Cysteine, die unabhängig von der jeweiligen Seitenkette des Moleküls zu sein scheint.

Die Validierung der Resultate des Screenings gegen die ATPase-Aktivität der HSET-Motordomäne ergab Probleme bei der Anwendung des HSET-Inhibitors **AZ82** als Kontrollsubstanz. Mit dem verwendeten ADP-Glo™-Testsystem war zwar bei Applikation von 50 µM **AZ82** eine starke Inhibition der ATPase-Aktivität von ca. 80 % nachweisbar, jedoch war die Aktivität des Inhibitors im Vergleich zu den publizierten Daten ($IC_{50} = 0,3 \mu\text{M}$) um das Zehnfache schwächer ($IC_{50} = 3,4 \mu\text{M}$). Zusätzlich konnte die publizierte ATP-kompetitive

Inhibition von **AZ82** nicht bestätigt werden. Da die Autoren ein Testsystem basierend auf dem Farbstoff Malachitgrün verwendeten,^[93] wurde ein entsprechendes System zur Testung von **AZ82** eingesetzt. Unter diesen Bedingungen war eine Validierung der publizierten Daten möglich. Folgeexperimente konnten jedoch nur marginale Inhibitionen der Sulfonylpyrimidine in diesem Testsystem messen. Durch zahlreiche Problemlösungsansätze wurde versucht den Grund der fehlenden Kinesininhibition durch Sulfonylpyrimidine im Malachitgrün-Testsystem zu ermitteln, was schließlich durch Analyse der Inhibition in Anwesenheit von DTT gelang. Hierbei wurde eine zum Teil drastische Abnahme der inhibitorischen Aktivität bei paralleler Zugabe von 1 mM DTT gemessen, während die Inhibition der ATPase-Aktivität durch **AZ82** nicht beeinflusst wurde. DTT war als Pufferbestandteil in den Proben im Malachitgrün-Testsystem enthalten, nicht jedoch im ADP-Glo™-Testsystem. Aufgrund der reaktiven Sulfonylgruppe, die bereits zur kovalenten Bindung des Inhibitors an Cysteine des Zielproteins beigetragen hatte, ist eine Reaktion mit Thiolverbindungen erklärbar. Für niedermolekulare Inhibitoren, die Cysteine modifizieren, wurde bereits Reaktivität mit Thiolen beschrieben.^[211] Im Puffer enthaltene starke Reduktionsmittel wie DTT sind des Weiteren imstande, mit redoxaktiven Verbindungen unter Bildung von H₂O₂ zu reagieren, was eine Inaktivierung der Enzymaktivität zur Folge hätte.^[212] Eine mögliche Redoxaktivität wurde nach entsprechenden Tests ausgeschlossen. Die Reaktionsfähigkeit der Sulfonylpyrimidine mit Thiolen wurde durch eine massenspektrometrische Messung nach Inkubation der Substanzen mit 5 mM GSH überprüft. Für den HSET-Inhibitor **236038** wurden im zugehörigen Spektrum drei Peaks detektiert, was auf eine Reaktion mit GSH schließen ließ. Die Peaks wurden anhand der entsprechenden Masse als intakte Substanz, Substanz-GSH-Addukt und abgespaltenes Fragment identifiziert. **236038** bindet kovalent durch eine nukleophile aromatische Substitution (S_NAr) an GSH: Die Thiolgruppe von GSH attackiert den Pyrimidinring von **236038**, während die Sulfonylgruppe unter Bildung einer Sulfonsäure als Abgangsgruppe fungiert. Der Trifluoromethylsubstituent erhöht als elektronenziehende Gruppe die Reaktivität des Pyrimidins für den nukleophilen Angriff der Thiolgruppe (Abbildung 7.10).

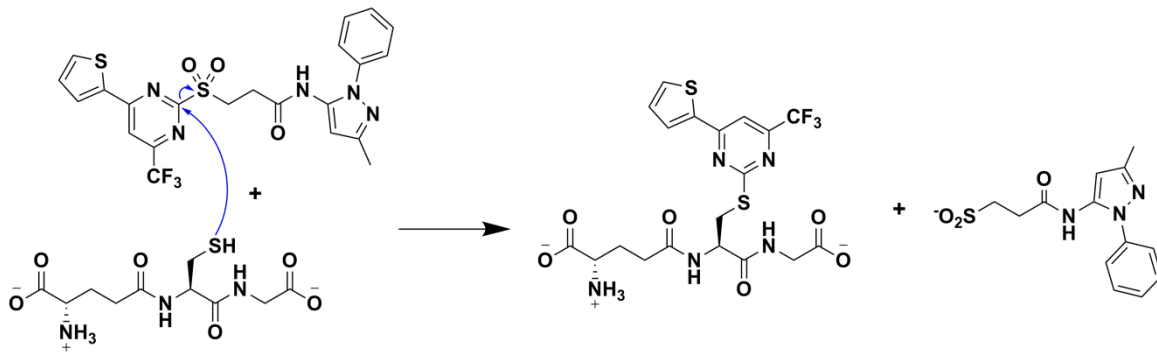


Abbildung 7.10: Reaktionsmechanismus der Adduktbildung von 236038 mit GSH

Somit ließ sich die vermutete Reaktion mit Thiolen bestätigen, wobei jedoch ein erheblicher Anteil der Substanz als intakt nachgewiesen wurde. Dies lässt darauf schließen, dass ein Teil der Substanz auch in lebenden Zellen von intrazellulären Thiolen gebunden wird und daher nicht mit HSET interagieren kann. Die Reaktion mit Thiolen scheint jedoch langsam abzulaufen, so dass nach 24 h bei durchschnittlicher physiologischer Thiolkonzentration^[186] noch ein Teil der Substanz intakt zu sein scheint. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Substanz auch unter physiologischen Bedingungen ihr Zielprotein, das Kinesin HSET, trotz potenziellem Abfangen durch Thiolverbindungen binden kann. Im Vergleich zu **236038** war nach Inkubation von **AZ82** mit GSH lediglich ein Peak nachweisbar, der als intaktes **AZ82** identifiziert wurde. Somit war keine Reaktion von **AZ82** mit GSH detektierbar, was auch aufgrund der chemischen Struktur des Inhibitors nicht vermutet worden war. Die weiteren als HSET-Inhibitoren identifizierten Sulfonylpyrimidine reagierten ebenfalls mit GSH, was in der Detektion dreier Peaks in den entsprechenden Spektren resultierte. Die Mengen an Substanz, die hierbei als intakt detektiert wurden, variierten innerhalb der aktiven Sulfonylpyrimidine. Rückschlüsse auf mögliche strukturelle Präferenzen der Aggregatbildung mit GSH ließen sich nicht ziehen.

Die intrazelluläre Bindung von **236038** an HSET wurde mit Hilfe von CETSA-Experimenten untersucht. Da das ursprüngliche Protokoll dieses Ansatzes eine Substanzbehandlung des Zelllysates und nicht der lebenden Zellen beinhaltet,^[141] wurde das Protokoll entsprechend angepasst, so dass bereits behandelte Zellen lysiert wurden, um kovalent modifiziertes Protein gegen unbehandeltes Protein zu untersuchen. Hierzu wurde das ursprüngliche Protokoll lediglich in Bezug auf den Zeitpunkt der Substanzbehandlung abgewandelt. Die intrazelluläre Bindung an HSET und die damit einhergehende Verschiebung der Schmelztemperatur konnte allerdings nicht reproduzierbar gezeigt werden. In dem in dieser Arbeit dargestellten Beispielerperiment wurde eine geringe Erhöhung der Schmelztemperatur nach Behandlung mit **236038** bestimmt, diese war jedoch in den Folgeexperimenten nicht darstellbar.

Dieses entsprechend angepasste Protokoll wurde in der Literatur bisher nicht angewandt. Für ähnliche Experimente wurde der *In-cell-CETSA* genutzt, bei dem behandelte Zellen erhitzt und anschließend lysiert werden.^[213] Dieses Protokoll wäre für künftige Untersuchungen ein alternativer Ansatz zur Detektion der intrazellulären Bindung. Außerdem wären konzentrationsabhängige Experimente hilfreich. Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurden bei einer Konzentration von 10 μM durchgeführt. Diese Konzentration ist zwar geringer als vorherige zelluläre Untersuchungen, die mit 25 μM des Inhibitors durchgeführt wurden. Der identische Phänotyp war mit gleicher Intensität auch bei einer Konzentration von 10 μM zu beobachten, dennoch sollten höhere Konzentrationen einen genaueren Aufschluss über die Bindung des Zielproteins geben.

Die schwache Aktivität von **AZ82** im ADP-Glo™-Testsystem konnte jedoch trotz umfangreicher Problemlösungsansätze nicht ermittelt werden. Ebenso war es nicht möglich, die Aktivität des Inhibitors in Zellen zu detektieren. Die publizierte Aktivität von **AZ82** umfasst die Entstehung mehrheitlich multipolarer Spindeln bei einer Konzentration von 0,4 μM , während ab 4 μM bereits Toxizität zu beobachten ist. Identifiziert wurden diese Effekte nach einer Inkubationszeit von 16 h in BT-549-Zellen, die einen hohen Anteil an Zellen mit amplifizierten Zentrosomen aufweisen.^[77b] In dieser Arbeit wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von **AZ82** auf MDA-MB-231 getestet, eine Brustkarzinomzelllinie mit einem ebenfalls hohen Zellanteil mit zusätzlichen Zentrosomen.^[77b] MDA-MB-231-Zellen wiesen nach Behandlung mit bis zu 10 μM keine phänotypischen Veränderungen auf, während zytotoxische Effekte erst ab 20 μM auftraten. Um möglichst viele mitotische Zellen beobachten zu können, wurden die Zellen vor der Behandlung mit **AZ82** durch Thymidinzugabe blockiert, was zu einem mitotischen Arrest führt.^[128] Mitotische MDA-MB-231-Zellen waren auch nach **AZ82**-Behandlung zum großen Teil bipolar, so dass kein Einfluss auf die zentrosomale Gruppierung detektiert werden konnte. Ein zusätzliches Experiment mit den in der Literatur verwendeten BT-549-Zellen ergab ebenfalls nicht den erwarteten Phänotyp. Die biochemische Charakterisierung von **AZ82** wurde zum Teil in Abwesenheit von Serum durchgeführt,^[93] so dass **AZ82** möglicherweise mit dem verwendeten fetalen Kälberserum interagieren könnte. Experimente mit verminderter Serumkonzentration waren jedoch ebenfalls nicht erfolgreich.

Mit Hilfe einer detaillierten Struktur-Aktivitäts-Analyse von Dr. Erchang Shang konnten weitere Informationen zum Verständnis der Interaktion der Sulfonylpyrimidine mit HSET erlangt werden. Des Weiteren war es möglich, die Aktivität durch Einführen alternativer Substituenten im Vergleich zur Ausgangssubstanz **236038** um das Vierfache zu steigern. Eine Übersicht der Struktur-Aktivitäts-Analyse ist in Abbildung 7.11 dargestellt. Zunächst wurde die Notwendigkeit der Sulfonylgruppe, über die die Modifikation der Cysteine des

Zielproteins ermöglicht wird, bestätigt. Bei Verwendung eines Thioethers an der gleichen Position war bei sämtlichen Verbindungen keine Aktivität im Vergleich zur entsprechenden Sulfonylverbindung messbar. Wurde ein Sulfinylsubstituent an dieser Position eingeführt, war zum Teil eine verminderte Aktivität messbar, teilweise ging die Aktivität gänzlich verloren. Der elektronenziehende 4-Trifluoromethylsubstituent am Pyrimidin wurde ebenfalls als essentiell nachgewiesen. Andere eingeführte Substituenten an diesen Stellen führten zum Verlust der Aktivität. Im Gegensatz dazu ist der Thiophensubstituent am Pyrimidin nicht essentiell für die Aktivität der Verbindungen. Hier konnte durch Einführung verschiedener Substituenten eine zum Teil deutliche Steigerung der Aktivität erzielt werden. Insgesamt wurden mono- oder disubstituierte Ringsysteme als optimierte Gruppen für diese Position identifiziert. Substituenten, die zu einer gesteigerten Aktivität der Verbindung führten, waren in sämtlichen Fällen halogeniert oder beinhalteten halogenierte Substituenten. An dieser Position könnte demnach eine Interaktion über Halogene die Affinität des Inhibitors für die Bindestelle steigern, womöglich durch Stabilisierung der Bindung an umgebende Aminosäurenreste. Ebenfalls scheint die Bindestelle räumlich begrenzt zu sein, da sperrige Gruppen wie größere und mehrfach substituierte Ringsysteme oder Phenylester in den meisten Fällen keine Inhibition des Kinesins mehr aufweisen. Längere Alkylketten führen ebenfalls zum Verlust der Aktivität.

Bei der Variation der Anhangsgruppe des Amids zeigten verschiedene Substituenten eine drastische Steigerung der Aktivität, wobei die Einführung einer *n*-Hexylgruppe mit 5,5 μM zu den potentesten Gruppen zählte. An dieser Position scheint demnach keine räumliche Begrenzung der Bindestelle vorzuliegen. Sperrigere Gruppen zeigten hier zwar ebenfalls schwächere Aktivitäten, jedoch lag nur in einem Fall ein kompletter Aktivitätsverlust vor. Diese Vermutung ließ sich durch die Testung verschiedener Linkerlängen zwischen Amid und Sulfonylgruppe bestätigen. Hierbei wurde eine dreifache Verbesserung der Aktivität durch Verlängerung des Kohlenstofflinkers von $(\text{CH}_2)_2$ auf $(\text{CH}_2)_3$ gezeigt. Eine Verlängerung auf $(\text{CH}_2)_5$ wies ebenfalls eine leichte Verstärkung im Vergleich zur Ausgangsverbindung auf. Eine Verlängerung des Linkers, gepaart mit der Einführung der *n*-Hexylgruppe, spiegelt die mögliche räumliche Ausdehnung der Verbindung an dieser Position wider. Derivate mit *n*-Hexyl-Amid und verlängertem Kohlenstofflinker wurden jedoch nicht synthetisiert, so dass eine Analyse dieser Kombination nicht möglich war. Hierdurch könnte die maximale Ausdehnung der Verbindung überprüft werden.

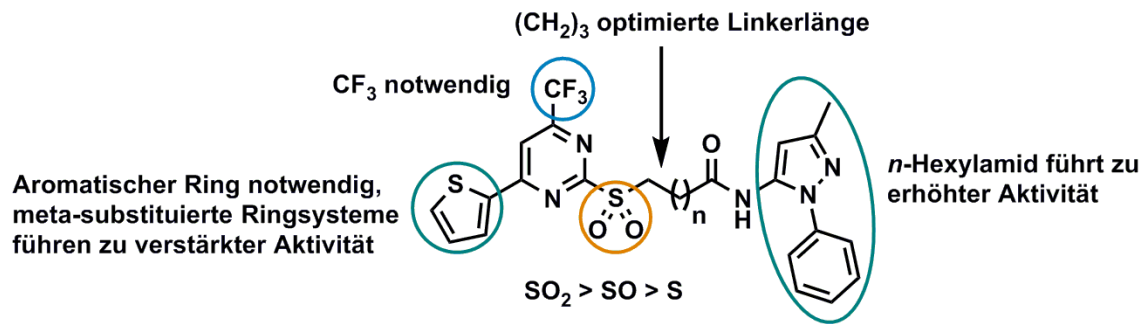


Abbildung 7.11: Zusammenfassung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine

Farblich gekennzeichnete Substituenten wurden innerhalb der Substanzkollektionen von Dr. Erchang Shang und Kenshirou Shimizu auf ihre Kontribution zur HSET-Inhibition untersucht. Die Struktur-Aktivitäts-Beziehung wurde von Dr. Erchang Shang basierend auf den IC₅₀-Werten aus dem ADP-Glo™-Testsystem erarbeitet.

Insgesamt stellen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zu den Sulfonylpyrimidinen einen geeigneten Startpunkt für weitere Untersuchungen zu kovalent bindenden HSET-Inhibitoren dar. Mit Hilfe der Struktur-Aktivitäts-Beziehung zahlreicher synthetisierter Derivate konnten nähere Informationen zur Notwendigkeit der einzelnen Substitutionen erlangt werden, die zur Verbesserung der Aktivität der Verbindung durch Derivatisierung beitragen können.

8 Ausblick

Durch die MILI A-inspirierten, neurotrophen 4-Hydroxy-2-pyridonverbindungen wurden Inhibitoren der für die Neuritogenese relevanten Kinase MAP4K4 identifiziert. MAP4K4 zählt zu der GCK-IV-Unterfamilie der Ste20/MAP4K-Kinasefamilie und weist in der ATP-Binderegion starke Homologien zu den weiteren GCK-IV-Kinasen TNIK, MINK1 und NESK auf. Zur Bestimmung der Selektivität der Inhibitoren ist die Testung weiterer Kinasen notwendig, insbesondere der GCK-IV-Kinasen. Des Weiteren waren nicht alle Kinasen, für die ein Zusammenhang mit dem Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen beschrieben wurde, im angewandten Kinasescreening verfügbar.

Mit Hilfe einer Proteianreicherung durch Desthiobiotin-ATP konnte die intrazelluläre Bindung des aktivsten 4-Hydroxy-2-pyridons an MAP4K4 nicht bestätigt werden. Hier werden folglich weitere Untersuchungen benötigt, um die Inhibition der Kinase auch in neuronalen Zellen zu belegen. Alternativ können proteomweite Verfahren angewandt werden, mit denen auch weitere Proteine identifiziert werden könnten, die möglicherweise von der Substanz gebunden werden. Ein weiterer Ansatz ist der *Cellular Thermal Shift Assay* (CETSA), welcher an anderer Stelle in dieser Arbeit eingesetzt wurde, um die Bindung an das Zielprotein nachzuweisen. Zusätzlich zur Identifikation möglicher weiterer Zielproteine des Inhibitors steht auch eine Bestätigung der intrazellulären Blockierung des JNK-vermittelten Apoptose-Signalweges aus. Hierzu ist die Analyse der Phosphorylierung der nachgeschalteten Proteine TAK1, MKK4, JNK und c-Jun infolge der MAP4K4-Inhibition durch den Inhibitor notwendig.

Einzelne 2,4-Dimethoxypyridine lösten zudem mitotischen Arrest in HeLa-Zellen aus und wiesen neuroprotektive Eigenschaften in SH-SY5Y-Zellen auf. Da derartige Substanzen bislang kaum mit Neuroprotektion und anormaler Mitose in Verbindung gebracht wurden, werden weitere Informationen über die Bindestelle bzw. den Wirkmechanismus der Verbindungen benötigt.

Die Analyse der Selektivität steht auch für das HSET-inhibierende Sulfonylpyrimidin aus. Durch die reaktive Sulfonylgruppe sind neben dem Kinesin Eg5 weitere Proteinmodifikationen sehr wahrscheinlich. Hier sollte der Fokus insbesondere auf mitotische Kinasen und weitere Elemente der mitotischen Spindel gelegt werden, um den genauen Mechanismus darzustellen, der der Multipolarität infolge der Substanzbehandlung zugrunde liegt. Dazu zählt auch die Bestätigung der intrazellulären Bindung des Inhibitors an HSET, die in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte. Mit Hilfe von CETSA-Experimenten können in Substanz-behandelten Zellen die Bindung an das identifizierte Zielprotein nachgewiesen

und proteomweit zusätzlich modifizierte Proteine ausgemacht werden. Hierfür sollte auf bekannte Protokolle zur Durchführung des CETSA in lebenden Zellen zurückgegriffen werden. Des Weiteren ist eine detaillierte Analyse der weiteren Sulfonylpyrimidine, die ebenfalls als HSET-Inhibitoren bestimmt wurden und bei längerer Behandlung zum Zelltod führen, notwendig. Hier muss der Aufbau der zellbasierten Untersuchungen angepasst werden, um entsprechende phänotypische Veränderungen zu detektieren.

9 Literaturverzeichnis

- [1] B. R. Stockwell, *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 116-125.
- [2] E. Lenci, A. Guarna, A. Trabocchi, *Molecules* **2014**, *19*, 16506-16528.
- [3] a) H. van Hattum, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11853-11859; b) W. Wilk, T. J. Zimmermann, M. Kaiser, H. Waldmann, *Biol. Chem.* **2010**, *391*, 491-497.
- [4] S. Wetzel, R. S. Bon, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 10800-10826.
- [5] S. A. Sundberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 47-53.
- [6] B. Lomenick, R. W. Olsen, J. Huang, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 34-46.
- [7] M. R. Arkin, Y. Tang, J. A. Wells, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1102-1114.
- [8] a) A. P. Antonchick, S. Lopez-Tosco, J. Parga, S. Sievers, M. Schürmann, H. Preut, S. Höing, H. R. Schöler, J. Sternecker, D. Rauh, H. Waldmann, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 500-509; b) P. Y. Dakas, J. A. Parga, S. Hoing, H. R. Scholer, J. Sternecker, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 9576-9581; c) L. Laraia, K. Ohsawa, G. Konstantinidis, L. Robke, Y. W. Wu, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 2145-2150; d) P. Schroder, J. O. Bauer, C. Strohmam, K. Kumar, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10242-10255; e) P. Schroder, T. Forster, S. Kleine, C. Becker, A. Richters, S. Ziegler, D. Rauh, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 12398-12403; f) J. Svenda, M. Sheremet, L. Kremer, L. Maier, J. O. Bauer, C. Strohmam, S. Ziegler, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 5596-5602.
- [9] C. G. Dotti, C. A. Sullivan, G. A. Banker, *J. Neurosci.* **1988**, *8*, 1454-1468.
- [10] T. Takano, C. Xu, Y. Funahashi, T. Namba, K. Kaibuchi, *Development* **2015**, *142*, 2088-2093.
- [11] a) R. Sainath, G. Gallo, *Cell Tissue Res.* **2015**, *359*, 267-278; b) N. Arimura, K. Kaibuchi, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 194-205.
- [12] C. Yang, T. Svitkina, *Cell Adh Migr* **2011**, *5*, 402-408.
- [13] E. Menna, G. Fossati, G. Scita, M. Matteoli, *Eur. J. Neurosci.* **2011**, *34*, 1655-1662.
- [14] a) J. S. Da Silva, M. Medina, C. Zuliani, A. Di Nardo, W. Witke, C. G. Dotti, *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 1267-1279; b) A. R. Ketschek, S. L. Jones, G. Gallo, *Dev. Neurobiol.* **2007**, *67*, 1305-1320.
- [15] L. Dehmelt, F. M. Smart, R. S. Ozer, S. Halpain, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 9479-9490.
- [16] A. M. Davies, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, R198-200.
- [17] K. C. Flynn, *Bioarchitecture* **2013**, *3*, 86-109.
- [18] F. Valtorta, C. Leoni, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1999**, *354*, 387-394.
- [19] Y. Funahashi, T. Namba, S. Nakamuta, K. Kaibuchi, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2014**, *27*, 215-223.
- [20] S. Basu, B. Ellinger, S. Rizzo, C. Deraeve, M. Schurmann, H. Preut, H. D. Arndt, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 6805-6810.
- [21] S. O. Bachurin, E. V. Bovina, A. A. Ustyugov, *Med. Res. Rev.* **2017**.
- [22] E. Bagli, A. Goussia, M. M. Moschos, N. Agnantis, G. Kitsos, *In Vivo* **2016**, *30*, 535-547.
- [23] Q. Wang, S. Yu, A. Simonyi, G. Y. Sun, A. Y. Sun, *Mol. Neurobiol.* **2005**, *31*, 3-16.
- [24] X. X. Dong, Y. Wang, Z. H. Qin, *Acta Pharmacol. Sin.* **2009**, *30*, 379-387.
- [25] R. Tundis, M. R. Loizzo, F. Menichini, G. A. Statti, F. Menichini, *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 399-420.

- [26] S. Roy, B. Zhang, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, *Acta Neuropathol.* **2005**, *109*, 5-13.
- [27] C. Ballatore, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 663-672.
- [28] J. Q. Trojanowski, A. B. Smith, D. Hurn, V. M. Lee, *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, *6*, 683-686.
- [29] O. von Bohlen und Halbach, *Cell Tissue Res.* **2004**, *318*, 163-174.
- [30] J. Xu, M. H. Lacoske, E. A. Theodorakis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 956-987.
- [31] a) P. Anand, B. Singh, *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36*, 375-399; b) B. Bulic, M. Pickhardt, B. Schmidt, E. M. Mandelkow, H. Waldmann, E. Mandelkow, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 1740-1752; c) T. E. Golde, E. H. Koo, K. M. Felsenstein, B. A. Osborne, L. Miele, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 2898-2907.
- [32] W. G. Meissner, M. Frasier, T. Gasser, C. G. Goetz, A. Lozano, P. Piccini, J. A. Obeso, O. Rascol, A. Schapira, V. Voon, D. M. Weiner, F. Tison, E. Bezard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 377-393.
- [33] M. A. Glicksman, *Expert opinion on drug discovery* **2011**, *6*, 1127-1138.
- [34] S. J. Allen, J. J. Watson, D. K. Shoemark, N. U. Barua, N. K. Patel, *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 155-175.
- [35] S. Pezet, M. Malcangio, *Expert Opin. Ther. Targets* **2004**, *8*, 391-399.
- [36] S. Mehan, H. Meena, D. Sharma, R. Sankhla, *J. Mol. Neurosci.* **2011**, *43*, 376-390.
- [37] C. R. Weston, R. J. Davis, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, *19*, 142-149.
- [38] M. Suckfuell, M. Canis, S. Strieth, H. Scherer, A. Haisch, *Acta Otolaryngol.* **2007**, *127*, 938-942.
- [39] S. V. More, S. Koppula, I. S. Kim, H. Kumar, B. W. Kim, D. K. Choi, *Molecules* **2012**, *17*, 6728-6753.
- [40] H. G. Araujo-Filho, L. J. Quintans-Junior, A. S. Barreto, J. R. Almeida, R. S. Barreto, J. S. Quintans, *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 647-658.
- [41] H. J. Jessen, K. Gademann, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1168-1185.
- [42] K. Schmidt, W. Gunther, S. Stoyanova, B. Schubert, Z. Li, M. Hamburger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 197-199.
- [43] Y. Cheng, B. Schneider, U. Riese, B. Schubert, Z. Li, M. Hamburger, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1854-1858.
- [44] H. J. Jessen, D. Barbaras, M. Hamburger, K. Gademann, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3446-3449.
- [45] Y. Cheng, B. Schneider, U. Riese, B. Schubert, Z. Li, M. Hamburger, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 436-438.
- [46] U. Riese, E. Ziegler, M. Hamburger, *FEBS Lett.* **2004**, *577*, 455-459.
- [47] L. J. El-Naggar, J. L. Beal, *J. Nat. Prod.* **1980**, *43*, 649-707.
- [48] a) D. Q. Li, Y. M. Bao, Y. Li, C. F. Wang, Y. Liu, L. J. An, *Brain Res.* **2006**, *1115*, 179-185; b) Y. Y. Tian, L. J. An, L. Jiang, Y. L. Duan, J. Chen, B. Jiang, *Life Sci.* **2006**, *80*, 193-199.
- [49] P. Lee, J. Lee, S. Y. Choi, S. E. Lee, S. Lee, D. Son, *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 174-176.
- [50] J. Liu, X. Zheng, F. Yin, Y. Hu, L. Guo, X. Deng, G. Chen, J. Jiajia, H. Zhang, *Int. J. Dev. Neurosci.* **2006**, *24*, 419-424.
- [51] a) W. Liu, G. Li, C. Holscher, L. Li, *Rev. Neurosci.* **2015**, *26*, 371-383; b) B. Jiang, J. Du, J. H. Liu, Y. M. Bao, L. J. An, *Brain Res.* **2008**, *1188*, 139-147.
- [52] P. Li, K. Matsunaga, T. Yamakuni, Y. Ohizumi, *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *406*, 203-208.

- [53] S. R. Kim, K. A. Koo, S. H. Sung, C. J. Ma, J. S. Yoon, Y. C. Kim, *J. Neurosci. Res.* **2003**, *74*, 948-955.
- [54] a) J. Y. Zhou, S. W. Zhou, *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *132*, 15-27; b) J. Y. Zhou, S. W. Zhou, *Fitoterapia* **2012**, *83*, 617-626.
- [55] J. D. Phillipson, S. R. Hemingway, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2795-2798.
- [56] T. H. Kang, Y. Murakami, K. Matsumoto, H. Takayama, M. Kitajima, N. Aimi, H. Watanabe, *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *455*, 27-34.
- [57] C. L. Hsieh, T. Y. Ho, S. Y. Su, W. Y. Lo, C. H. Liu, N. Y. Tang, *Am. J. Chin. Med.* **2009**, *37*, 351-360.
- [58] Y. Song, R. Qu, S. Zhu, R. Zhang, S. Ma, *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 1528-1533.
- [59] K. Matsumoto, R. Morishige, Y. Murakami, M. Tohda, H. Takayama, I. Sakakibara, H. Watanabe, *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *517*, 191-199.
- [60] A. Ndagijimana, X. Wang, G. Pan, F. Zhang, H. Feng, O. Olaleye, *Fitoterapia* **2013**, *86*, 35-47.
- [61] a) R. Bassleer, M. C. Depauw-Gillet, B. Massart, J. M. Marnette, P. Wiliquet, M. Caprasse, L. Angenot, *Planta Med.* **1982**, *45*, 123-126; b) O. Dideberg, J. Lamotte-Brasseur, L. Dupont, H. Campsteyn, M. Vermeire, L. Angenot, *Acta Crystallogr. B* **1977**, *33*, 1796-1801.
- [62] a) S. Cheenpracha, T. Ritthiwigrom, S. Laphookhieo, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 723-726; b) T. H. Kang, K. Matsumoto, M. Tohda, Y. Murakami, H. Takayama, M. Kitajima, N. Aimi, H. Watanabe, *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *444*, 39-45; c) K. Zaima, I. Koga, N. Iwasawa, T. Hosoya, Y. Hirasawa, T. Kaneda, I. S. Ismail, N. H. Lajis, H. Morita, *J. Nat. Med.* **2013**, *67*, 9-16.
- [63] C. B. Cui, H. Kakeya, H. Osada, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12651-12666.
- [64] V. Sarli, A. Giannis, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 293-298.
- [65] a) A. Desai, T. J. Mitchison, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1997**, *13*, 83-117; b) S. L. Prosser, L. Pelletier, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 187-201.
- [66] K. Fukasawa, *Cancer Lett.* **2005**, *230*, 6-19.
- [67] A. L. Salmela, M. J. Kallio, *Chromosoma* **2013**, *122*, 431-449.
- [68] A. Musacchio, *Curr. Biol.* **2015**, *25*, R1002-1018.
- [69] N. Keen, S. Taylor, *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 185-195.
- [70] Z. Zhou, M. He, A. A. Shah, Y. Wan, *Cell Div* **2016**, *11*, 9.
- [71] I. Primorac, A. Musacchio, *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 177-189.
- [72] R. J. van Vuuren, M. H. Visagie, A. E. Theron, A. M. Joubert, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *76*, 1101-1112.
- [73] E. A. Nigg, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 815-825.
- [74] Y. Zheng, M. L. Wong, B. Alberts, T. Mitchison, *Nature* **1995**, *378*, 578-583.
- [75] J. B. Woodruff, O. Wueseke, A. A. Hyman, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2014**, 369.
- [76] K. Fukasawa, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 911-924.
- [77] a) S. A. Godinho, M. Kwon, D. Pellman, *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 85-98; b) M. Kwon, S. A. Godinho, N. S. Chandhok, N. J. Ganem, A. Azioune, M. Thery, D. Pellman, *Genes Dev.* **2008**, *22*, 2189-2203.
- [78] S. A. Godinho, D. Pellman, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2014**, 369.
- [79] D. Ring, R. Hubble, M. Kirschner, *J. Cell Biol.* **1982**, *94*, 549-556.
- [80] W. L. Lingle, J. L. Salisbury, *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 1941-1951.
- [81] a) K. Drosopoulos, C. Tang, W. C. Chao, S. Linardopoulos, *Nature communications* **2014**, *5*, 3686; b) N. J. Quintyne, J. E. Reing, D. R. Hoffelder, S. M. Gollin, W. S. Saunders, *Science* **2005**, *307*, 127-129.

- [82] D. Yuan, B. Ma, C. Wu, J. Yang, L. Zhang, S. Liu, L. Wu, Y. Kano, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1271-1274.
- [83] a) C. Zhu, J. Zhao, M. Bibikova, J. D. Levenson, E. Bossy-Wetzel, J. B. Fan, R. T. Abraham, W. Jiang, *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 3187-3199; b) L. Wordeman, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2010**, *21*, 260-268.
- [84] K. J. Verhey, J. W. Hammond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 765-777.
- [85] D. Huszar, M. E. Theoclitou, J. Skolnik, R. Herbst, *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 197-208.
- [86] H. Miki, Y. Okada, N. Hirokawa, *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 467-476.
- [87] O. Rath, F. Kozielski, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 527-539.
- [88] N. Hirokawa, Y. Noda, Y. Tanaka, S. Niwa, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 682-696.
- [89] A. Bachmann, A. Straube, *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 79-83.
- [90] A. L. Yount, H. Zong, C. E. Walczak, *Exp. Cell Res.* **2015**, *334*, 70-77.
- [91] a) G. Goshima, R. D. Vale, *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 3896-3907; b) S. Cai, L. N. Weaver, S. C. Ems-McClung, C. E. Walczak, *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1348-1359.
- [92] K. D. Brown, K. W. Wood, D. W. Cleveland, *J. Cell Sci.* **1996**, *109* (Pt 5), 961-969.
- [93] J. Wu, K. Mikule, W. Wang, N. Su, P. Petteruti, F. Gharahdaghi, E. Code, X. Zhu, K. Jacques, Z. Lai, B. Yang, M. L. Lamb, C. Chuaqui, N. Keen, H. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2201-2208.
- [94] V. Mountain, C. Simerly, L. Howard, A. Ando, G. Schatten, D. A. Compton, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 351-366.
- [95] J. Kleylein-Sohn, B. Pollinger, M. Ohmer, F. Hofmann, E. A. Nigg, B. A. Hemmings, M. Wartmann, *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 5391-5402.
- [96] G. Goshima, R. D. Vale, *J. Cell Biol.* **2003**, *162*, 1003-1016.
- [97] a) T. U. Mayer, T. M. Kapoor, S. J. Haggarty, R. W. King, S. L. Schreiber, T. J. Mitchison, *Science* **1999**, *286*, 971-974; b) J. A. Good, D. A. Skoufias, F. Kozielski, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*, 935-945.
- [98] C. A. Watts, F. M. Richards, A. Bender, P. J. Bond, O. Korb, O. Kern, M. Riddick, P. Owen, R. M. Myers, J. Raff, F. Gergely, D. I. Jodrell, S. V. Ley, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1399-1410.
- [99] R. G. van Heesbeen, M. E. Tanenbaum, R. H. Medema, *Cell reports* **2014**, *8*, 948-956.
- [100] S. Pawar, S. Donthamsetty, V. Pannu, P. Rida, A. Ogden, N. Bowen, R. Osan, G. Cantuaria, R. Aneja, *Journal of ovarian research* **2014**, *7*, 53.
- [101] K. Mittal, H. Choi da, S. Klimov, S. Pawar, R. Kaur, A. K. Mitra, M. V. Gupta, R. Sams, G. Cantuaria, P. C. Rida, R. Aneja, *Journal of ovarian research* **2016**, *9*, 17.
- [102] E. Zhi, P. Li, H. Chen, P. Xu, X. Zhu, Z. Zhu, Z. He, Z. Li, *Genes* **2016**, *7*.
- [103] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [104] C. J. Brown, S. Lain, C. S. Verma, A. R. Fersht, D. P. Lane, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 862-873.
- [105] P. Carmeliet, *Oncology* **2005**, *69*, 4-10.
- [106] M. Dougan, G. Dranoff, *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 83-117.
- [107] a) R. V. Chari, M. L. Miller, W. C. Widdison, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 3796-3827; b) A. M. Scott, J. D. Wolchok, L. J. Old, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 278-287.
- [108] M. A. Jordan, L. Wilson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253-265.
- [109] R. A. Veldhoen, S. L. Banman, D. R. Hemmerling, R. Odsen, T. Simmen, A. J. Simmonds, D. A. Underhill, I. S. Goping, *Oncogene* **2013**, *32*, 736-746.

- [110] a) A. Rogalska, A. Marczak, A. Gajek, M. Szwed, A. Sliwinska, J. Drzewoski, Z. Jozwiak, *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 239-249; b) J. Li, J. Ren, W. Sun, *Breast Cancer* **2017**, *24*, 171-179.
- [111] a) M. J. Edelman, W. A. Harb, S. E. Pal, R. V. Boccia, M. J. Kraut, P. Bonomi, B. A. Conley, J. S. Rogers, R. A. Messmann, E. B. Garon, *J. Thorac. Oncol.* **2012**, *7*, 1618-1621; b) R. W. Naumann, R. L. Coleman, R. A. Burger, E. A. Sausville, E. Kutarska, S. A. Ghamande, N. Y. Gabrail, S. E. Depasquale, E. Nowara, L. Gilbert, R. H. Gersh, M. G. Teneriello, W. A. Harb, P. A. Konstantinopoulos, R. T. Penson, J. T. Symanowski, C. D. Lovejoy, C. P. Leamon, D. E. Morgenstern, R. A. Messmann, *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 4400-4406.
- [112] C. P. Leamon, I. R. Vlahov, J. A. Reddy, M. Vetzal, H. K. Santhapuram, F. You, A. Bloomfield, R. Dorton, M. Nelson, P. Kleindl, J. F. Vaughn, E. Westrick, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 560-568.
- [113] Y. Lu, J. Chen, M. Xiao, W. Li, D. D. Miller, *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 2943-2971.
- [114] G. Bergnes, K. Brejc, L. Belmont, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 127-145.
- [115] K. E. Gascoigne, S. S. Taylor, *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 2579-2585.
- [116] D. A. Skoufias, S. DeBonis, Y. Saoudi, L. Lebeau, I. Crevel, R. Cross, R. H. Wade, D. Hackney, F. Kozielski, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17559-17569.
- [117] S. M. Myers, I. Collins, *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 463-489.
- [118] L. Luo, C. A. Parrish, N. Nevins, D. E. McNulty, A. M. Chaudhari, J. D. Carson, V. Sudakin, A. N. Shaw, R. Lehr, H. Zhao, S. Sweitzer, L. Lad, K. W. Wood, R. Sakowicz, R. S. Annan, P. S. Huang, J. R. Jackson, D. Dhanak, R. A. Copeland, K. R. Auger, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 722-726.
- [119] X. Qian, A. McDonald, H. J. Zhou, N. D. Adams, C. A. Parrish, K. J. Duffy, D. M. Fitch, R. Tedesco, L. W. Ashcraft, B. Yao, H. Jiang, J. K. Huang, M. V. Marin, C. E. Aroyan, J. Wang, S. Ahmed, J. L. Burgess, A. M. Chaudhari, C. A. Donatelli, M. G. Darcy, L. H. Ridgers, K. A. Newlander, S. J. Schmidt, D. Chai, M. Colon, M. N. Zimmerman, L. Lad, R. Sakowicz, S. Schauer, L. Belmont, R. Baliga, D. W. Pierce, J. T. Finer, Z. Wang, B. P. Morgan, D. J. Morgans, Jr., K. R. Auger, C. M. Sung, J. D. Carson, L. Luo, E. D. Hugger, R. A. Copeland, D. Sutton, J. D. Elliott, J. R. Jackson, K. W. Wood, D. Dhanak, G. Bergnes, S. D. Knight, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 30-34.
- [120] V. Chung, E. I. Heath, W. R. Schelman, B. M. Johnson, L. C. Kirby, K. M. Lynch, J. D. Botbyl, T. A. Lampkin, K. D. Holen, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *69*, 733-741.
- [121] X. Ding, F. Yan, P. Yao, Z. Yang, W. Wan, X. Wang, J. Liu, X. Gao, A. Abrieu, T. Zhu, J. Zhang, Z. Dou, X. Yao, *Cell Res.* **2010**, *20*, 1386-1389.
- [122] M. C. Henderson, Y. J. Shaw, H. Wang, H. Han, L. H. Hurley, G. Flynn, R. T. Dorr, D. D. Von Hoff, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 36-44.
- [123] S. Tcherniuk, S. Deshayes, V. Sarli, G. Divita, A. Abrieu, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 631-641.
- [124] B. Yang, M. L. Lamb, T. Zhang, E. J. Hennessy, G. Grewal, L. Sha, M. Zambrowski, M. H. Block, J. E. Dowling, N. Su, J. Wu, T. Deegan, K. Mikule, W. Wang, R. Kaspera, C. Chuaqui, H. Chen, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9958-9970.
- [125] W. Zhang, L. Zhai, Y. Wang, R. J. Boohaker, W. Lu, V. V. Gupta, I. Padmalayam, R. J. Bostwick, E. L. White, L. J. Ross, J. Maddry, S. Ananthan, C. E. Augelli-Szafran, M. J. Suto, B. Xu, R. Li, Y. Li, *Biochem. J.* **2016**, *473*, 1027-1035.
- [126] A. Forsby, in *Cell Culture Techniques, Vol. 56* (Eds.: M. Aschner, C. Suñol, A. Bal-Price), Humana Press, **2011**, pp. 255-268.

- [127] a) Y. Y. Hsu, Y. T. Tseng, Y. C. Lo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *272*, 787-796; b) H. B. Kim, B. S. Yoo, *Toxicol Res* **2016**, *32*, 239-243; c) U. Wolfle, B. Haarhaus, A. Kersten, B. Fiebich, M. J. Hug, C. M. Schempp, *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 1494-1500.
- [128] J. Jackman, P. M. O'Connor, in *Curr. Protoc. Cell Biol.* (Eds.: J. S. Bonifacino, M. Dasso, J. Lippincott-Schwartz), John Wiley & Sons, Inc., **1998**, pp. 8.3.1-8.3.20.
- [129] J. Ebbeskotte, Technical University of Dortmund (Dortmund), **2015**.
- [130] a) M. Singh, C. Su, *Horm. Behav.* **2013**, *63*, 284-290; b) S. Veiga, L. M. Garcia-Segura, I. Azcoitia, *J. Neurobiol.* **2003**, *56*, 398-406.
- [131] S. Kleine, Technical University of Dortmund (Dortmund), **2014**.
- [132] M. Z. Li, S. J. Elledge, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *852*, 51-59.
- [133] M. Hübecker, University of Duisburg-Essen (Essen), **2014**.
- [134] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [135] S. J. Compton, C. G. Jones, *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369-374.
- [136] J. Rappsilber, M. Mann, Y. Ishihama, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1896-1906.
- [137] U. Ghosh, K. Giri, N. P. Bhattacharyya, *Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, *74*, 1145-1151.
- [138] P. Sehgal, C. Olesen, J. V. Moller, *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1377*, 105-109.
- [139] Y. Xiao, Y. Wang, *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 601-619.
- [140] J. D. Hirsch, L. Eslamizar, B. J. Filanoski, N. Malekzadeh, R. P. Haugland, J. M. Beechem, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **2002**, *308*, 343-357.
- [141] D. M. Molina, R. Jafari, M. Ignatushchenko, T. Seki, E. A. Larsson, C. Dan, L. Sreekumar, Y. H. Cao, P. Nordlund, *Science* **2013**, *341*, 84-87.
- [142] T. B. Durham, M. J. Blanco, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 998-1008.
- [143] C. Wei, L. S. Chupak, T. Philip, B. M. Johnson, R. Gentles, D. M. Drexler, *J. Biomol. Screen.* **2014**, *19*, 297-307.
- [144] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367-1372.
- [145] M. Dragunow, *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9*, 779-788.
- [146] a) L. Fusco, R. Lefort, K. Smith, F. Benmansour, G. Gonzalez, C. Barillari, B. Rinn, F. Fleuret, P. Fua, O. Pertz, *J. Cell Biol.* **2016**, *212*, 91-111; b) M. Hu, M. E. Schurdak, P. S. Puttfarcken, R. El Kouhen, M. Gopalakrishnan, J. Li, *Brain Res.* **2007**, *1151*, 227-235; c) M. A. Marzinke, T. Mavencamp, J. Duratinsky, M. Clagett-Dame, *Arch. Biochem. Biophys.* **2013**, *540*, 94-100.
- [147] a) M. A. Bray, M. S. Vokes, A. E. Carpenter, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2015**, *109*, 14 17 11-13; b) L. Dehmelt, G. Poplawski, E. Hwang, S. Halpain, *BMC Neurosci.* **2011**, *12*, 100; c) D. Wang, R. Lagerstrom, C. Sun, L. Bishof, P. Valotton, M. Gotte, *J. Biomol. Screen.* **2010**, *15*, 1165-1170; d) W. Yu, H. K. Lee, S. Hariharan, W. Bu, S. Ahmed, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **2009**, *75*, 289-297.
- [148] T. J. Collins, *BioTechniques* **2007**, *43*, 25-30.
- [149] a) S. Y. Ho, C. Y. Chao, H. L. Huang, T. W. Chiu, P. Charoenkwan, E. Hwang, *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, 230; b) M. Pool, J. Thiemann, A. Bar-Or, A. E. Fournier, *J. Neurosci. Methods* **2008**, *168*, 134-139; c) A. Torres-Espin, D. Santos, F. Gonzalez-Perez, J. del Valle, X. Navarro, *J. Neurosci. Methods* **2014**, *236*, 26-39.
- [150] J. Kovalevich, D. Langford, in *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols, Vol. 1078* (Eds.: S. Amini, M. K. White), Springer Science+Business Media New York, **2013**, pp. 9-21.
- [151] H. R. Xie, L. S. Hu, G. Y. Li, *Chin. Med. J. (Engl.)* **2010**, *123*, 1086-1092.

- [152] a) S. N. Kim, S. G. Kim, S. D. Park, Y. S. Cho-Chung, S. H. Hong, *J. Cell. Physiol.* **2000**, *182*, 421-428; b) K. Uemura, N. Kitagawa, R. Kohno, A. Kuzuya, T. Kageyama, H. Shibasaki, S. Shimohama, *J. Neurosci. Res.* **2003**, *73*, 166-175.
- [153] a) L. Agholme, T. Lindstrom, K. Kagedal, J. Marcusson, M. Hallbeck, *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *20*, 1069-1082; b) H. Xicoy, B. Wieringa, G. J. Martens, *Mol. Neurodegener.* **2017**, *12*, 10.
- [154] a) K. Gkouvatsos, G. Papanikolaou, K. Pantopoulos, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 188-202; b) G. Papanikolaou, K. Pantopoulos, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *202*, 199-211.
- [155] D. S. Straus, *Life Sci.* **1981**, *29*, 2131-2139.
- [156] G. Landau, Z. Bercovich, M. H. Park, C. Kahana, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 12474-12481.
- [157] C. Bogdan, *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 907-916.
- [158] J. E. Yeo, S. K. Kang, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1772*, 1199-1210.
- [159] N. D. Solovyev, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *153*, 1-12.
- [160] J. Guo, C. Walss-Bass, R. F. Luduena, *Cytoskeleton* **2010**, *67*, 431-441.
- [161] N. M. Radio, J. M. Breier, T. J. Shafer, W. R. Mundy, *Toxicol. Sci.* **2008**, *105*, 106-118.
- [162] S. D. Skaper, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *846*, 1-12.
- [163] a) R. D. Price, T. Oe, T. Yamaji, N. Matsuoka, *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 155-164; b) M. D. Qian, J. Zhang, X. Y. Tan, A. Wood, D. Gill, S. Cho, *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 9394-9403.
- [164] P. Schröder, Technical University of Dortmund (Dortmund), **2014**.
- [165] P. Kuenzi, S. Kiefer, A. Koryakina, M. Hamburger, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **2008**, *13*, 364-376.
- [166] S. Takahashi, K. Uchida, N. Kakinuma, R. Hashimoto, T. Yanagisawa, A. Nakagawa, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1998**, *51*, 1051-1054.
- [167] S. H. Loh, L. Francescut, P. Lingor, M. Bahr, P. Nicotera, *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 283-298.
- [168] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307-317.
- [169] X. Gao, C. Gao, G. Liu, J. Hu, *Cell & bioscience* **2016**, *6*, 56.
- [170] J. H. Wright, X. Wang, G. Manning, B. J. LaMere, P. Le, S. Zhu, D. Khatry, P. M. Flanagan, S. D. Buckley, D. B. Whyte, A. R. Howlett, J. R. Bischoff, K. E. Lipson, B. Jallal, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 2068-2082.
- [171] a) M. Ammirati, S. W. Bagley, S. K. Bhattacharya, L. Buckbinder, A. A. Carlo, R. Conrad, C. Cortes, R. L. Dow, M. S. Dowling, A. El-Kattan, K. Ford, C. R. Guimaraes, D. Hepworth, W. Jiao, J. LaPerle, S. Liu, A. Londregan, P. M. Loria, A. M. Mathiowetz, M. Munchhof, S. T. Orr, D. N. Petersen, D. A. Price, A. Skoura, A. C. Smith, J. Wang, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1128-1133; b) L. Hampson, X. T. He, A. W. Oliver, J. A. Hadfield, T. Kemp, J. Butler, A. McGown, H. C. Kitchener, I. N. Hampson, *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 829-839; c) C. O. Ndubaku, T. D. Crawford, H. Chen, J. W. Boggs, J. Drobnick, S. F. Harris, R. Jesudason, E. McNamara, J. Nonomiya, A. Sambrone, S. Schmidt, T. Smyczek, P. Vitorino, L. Wang, P. Wu, S. Yeung, J. Chen, K. Chen, C. Z. Ding, T. Wang, Z. Xu, S. E. Gould, L. J. Murray, W. Ye, *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 913-918; d) L. Wang, M. Stanley, J. W. Boggs, T. D. Crawford, B. J. Bravo, A. M. Giannetti, S. F. Harris, S. R. Magnuson, J. Nonomiya, S. Schmidt, P. Wu, W. Ye, S. E. Gould, L. J. Murray, C. O. Ndubaku, H. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4546-4552; e) Y. M. Yang, S. K. Gupta, K. J. Kim,

- B. E. Powers, A. Cerqueira, B. J. Wainger, H. D. Ngo, K. A. Rosowski, P. A. Schein, C. A. Ackeifi, A. C. Arvanites, L. S. Davidow, C. J. Woolf, L. L. Rubin, *Cell stem cell* **2013**, *12*, 713-726.
- [172] C. Schultz, A. Link, M. Leost, D. W. Zaharevitz, R. Gussio, E. A. Sausville, L. Meijer, C. Kunick, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2909-2919.
- [173] C. Lange, E. Mix, J. Frahm, A. Glass, J. Muller, O. Schmitt, A. C. Schmole, K. Klemm, S. Ortinau, R. Hubner, M. J. Frech, A. Wree, A. Rolfs, *Neurosci. Lett.* **2011**, *488*, 36-40.
- [174] T. Anastassiadis, S. W. Deacon, K. Devarajan, H. Ma, J. R. Peterson, *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 1039-1045.
- [175] M. Dixon, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170-171.
- [176] C. E. Chivers, A. L. Koner, E. D. Lowe, M. Howarth, *Biochem. J.* **2011**, *435*, 55-63.
- [177] M. P. Patricelli, A. K. Szardenings, M. Liyanage, T. K. Nomanbhoy, M. Wu, H. Weissig, A. Aban, D. Chun, S. Tanner, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **2007**, *46*, 350-358.
- [178] D. Bratosin, L. Mitrofan, C. Palii, J. Estaquier, J. Montreuil, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **2005**, *66*, 78-84.
- [179] A. Krishan, P. D. Dandekar, *J. Histochem. Cytochem.* **2005**, *53*, 1033-1036.
- [180] a) A. L. Blajeski, V. A. Phan, T. J. Kottke, S. H. Kaufmann, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 91-99; b) A. Hui, G. V. Kulkarni, W. L. Hunter, C. A. McCulloch, T. F. Cruz, *Arthritis Rheum.* **1997**, *40*, 1073-1084.
- [181] a) M. J. Hendzel, Y. Wei, M. A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B. R. Brinkley, D. P. Bazett-Jones, C. D. Allis, *Chromosoma* **1997**, *106*, 348-360; b) B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature* **2000**, *403*, 41-45.
- [182] C. Murayama, S. Watanabe, M. Nakamura, H. Norimoto, *Molecules* **2015**, *20*, 14959-14969.
- [183] Y. Guo, J. Xu, Y. Li, R. Watanabe, Y. Oshima, T. Yamakuni, Y. Ohizumi, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2006**, *54*, 123-125.
- [184] H. Zegzouti, M. Zdanovskaia, K. Hsiao, S. A. Goueli, *Assay Drug Dev. Technol.* **2009**, *7*, 560-572.
- [185] a) W. M. Nolte, J. P. Fortin, B. D. Stevens, G. E. Aspnes, D. A. Griffith, L. R. Hoth, R. B. Ruggeri, A. M. Mathiowetz, C. Limberakis, D. Hepworth, P. A. Carpino, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 629-631; b) F. S. Willard, D. Wooten, A. D. Showalter, E. E. Savage, J. Ficorilli, T. B. Farb, K. Bokvist, J. Alsina-Fernandez, S. G. Furness, A. Christopoulos, P. M. Sexton, K. W. Sloop, *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 1066-1073.
- [186] V. I. Lushchak, *Journal of amino acids* **2012**, *2012*, 736837.
- [187] J. L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, L. S. Freedman, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 3751-3757.
- [188] J. E. Bottenstein, G. H. Sato, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 514-517.
- [189] a) A. Jamsa, K. Hasslund, R. F. Cowburn, A. Backstrom, M. Vasange, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *319*, 993-1000; b) H. Shiohira, A. Kitaoka, M. Enjoji, T. Uno, M. Nakashima, *Biomed. Res.* **2012**, *33*, 291-297.
- [190] G. Cernaianu, P. Brandmaier, G. Scholz, O. P. Ackermann, R. Alt, K. Rothe, M. Cross, H. Witzigmann, R. B. Trobs, *J. Pediatr. Surg.* **2008**, *43*, 1284-1294.
- [191] Y. Yan, B. A. Eipper, R. E. Mains, *Neuropharmacology* **2016**, *107*, 227-238.
- [192] a) M. de Souza Santos, W. Jonis Andrioli, M. P. Freire de Morais Del Lama, J. Kenupp Bastos, N. P. Nanayakkara, R. M. Zumstein Georgetto Naal, *Int. Immunopharmacol.* **2013**, *15*, 532-538; b) F. Ding, M. L. Leow, J. Ma, R. William, H. Liao, X. W. Liu, *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 2548-2554.

- [193] J. J. Liang, H. Wang, A. Rashid, T. H. Tan, R. F. Hwang, S. R. Hamilton, J. L. Abbruzzese, D. B. Evans, H. Wang, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7043-7049.
- [194] J. V. Virbasius, M. P. Czech, *Trends Endocrinol. Metab.* **2016**, *27*, 484-492.
- [195] a) Y. C. Su, J. Han, S. Xu, M. Cobb, E. Y. Skolnik, *EMBO J.* **1997**, *16*, 1279-1290; b) Z. Yao, G. Zhou, X. S. Wang, A. Brown, K. Diener, H. Gan, T. H. Tan, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2118-2125.
- [196] C. R. Guimaraes, B. K. Rai, M. J. Munchhof, S. Liu, J. Wang, S. K. Bhattacharya, L. Buckbinder, *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 1199-1204.
- [197] T. D. Crawford, C. O. Ndubaku, H. Chen, J. W. Boggs, B. J. Bravo, K. Delatorre, A. M. Giannetti, S. E. Gould, S. F. Harris, S. R. Magnuson, E. McNamara, L. J. Murray, J. Nonomiya, A. Sambrone, S. Schmidt, T. Smyczek, M. Stanley, P. Vitorino, L. Wang, K. West, P. Wu, W. Ye, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3484-3493.
- [198] P. Lei, S. Ayton, A. I. Bush, P. A. Adlard, *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, *2011*, 189246.
- [199] a) J. Cui, M. Zhang, Y. Q. Zhang, Z. H. Xu, *Acta Pharmacol. Sin.* **2007**, *28*, 601-608; b) E. T. Coffey, *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 285-299.
- [200] M. M. Savitski, F. B. Reinhard, H. Franken, T. Werner, M. F. Savitski, D. Eberhard, D. Martinez Molina, R. Jafari, R. B. Dovega, S. Klaeger, B. Kuster, P. Nordlund, M. Bantscheff, G. Drewes, *Science* **2014**, *346*, 1255784.
- [201] Z. W. Sun, L. Zhang, S. J. Zhu, W. C. Chen, B. Mei, *Neurosci. Bull.* **2010**, *26*, 8-16.
- [202] K. K. Borowicz, B. Piskorska, M. Banach, S. J. Czuczwar, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2011**, *2*, 50.
- [203] M. A. Jordan, K. Wendell, S. Gardiner, W. B. Derry, H. Copp, L. Wilson, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 816-825.
- [204] a) C. Temple, Jr., G. A. Rener, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2089-2092; b) C. Temple, Jr., G. A. Rener, W. R. Waud, P. E. Noker, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3686-3690.
- [205] C. R. Pungitore, L. G. Leon, C. Garcia, V. S. Martin, C. E. Tonn, J. M. Padron, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1332-1335.
- [206] M. Yamazaki, K. Chiba, T. Mohri, *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 791-795.
- [207] J. Gordon, S. Amini, M. K. White, *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1078*, 1-8.
- [208] A. A. Kritis, E. G. Stamoula, K. A. Paniskaki, T. D. Vavilis, *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 91.
- [209] T. Ishima, T. Futamura, Y. Ohgi, N. Yoshimi, T. Kikuchi, K. Hashimoto, *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2015**, *25*, 505-511.
- [210] S. DeBonis, D. A. Skoufias, L. Lebeau, R. Lopez, G. Robin, R. L. Margolis, R. H. Wade, F. Kozielski, *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1079-1090.
- [211] a) H. Eng, R. Sharma, T. S. McDonald, D. J. Edmonds, J. P. Fortin, X. Li, B. D. Stevens, D. A. Griffith, C. Limberakis, W. M. Nolte, D. A. Price, M. Jackson, A. S. Kalgutkar, *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 1470-1479; b) L. Li, X. Jiang, S. Huang, Z. Ying, Z. Zhang, C. Pan, S. Li, X. Wang, Z. Zhang, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**.
- [212] M. G. Acker, D. S. Auld, *Perspectives in Science* **2014**, *1*, 56-73.
- [213] H. Almqvist, H. Axelsson, R. Jafari, C. Dan, A. Mateus, M. Haraldsson, A. Larsson, D. Martinez Molina, P. Artursson, T. Lundback, P. Nordlund, *Nature communications* **2016**, *7*, 11040.

10 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 3.1: Vergleichende Darstellung der [A] vorwärts- und [B] rückwärtsgerichteten chemischen Genetik (modifiziert nach ^[21]) | 5 |
| Abbildung 3.2: Neuronale Morphogenese anhand von hippokampalen Mausneuronen (modifiziert nach ^[9, 18]) | 9 |
| Abbildung 3.3: Neurotrophe Pyridonalkaloide aus <i>Paecilomyces</i> -Arten | 13 |
| Abbildung 3.4: Natürlich vorkommende neuromodulatorische Iridoide | 14 |
| Abbildung 3.5: Neuroprotektive Indolalkaloide aus <i>Uncaria rhynchophylla</i> | 15 |
| Abbildung 3.6: Phasen der Zellteilung (modifiziert nach ^[64]) | 17 |
| Abbildung 3.7: Beispielmechanismen für die Entstehung abweichender Zentrosomenzahlen (modifiziert nach ^[73]) | 20 |
| Abbildung 3.8: Mechanismen zur Bewerkstelligung von pseudo-bipolarer Mitose (modifiziert nach ^[77a]) | 21 |
| Abbildung 3.9: Aufbau von Motorproteinen der Kinesin-Superfamilie am Beispiel der Homodimere der Kinesin-14-Familie (modifiziert nach ^[84]) | 23 |
| Abbildung 3.10: Multipolare Spindel nach HSET-Inhibition oder –Herabregulierung und monoastrale Spindel nach Inhibition oder Herabregulierung von Eg5 (modifiziert nach ^[64, 77a]) | 25 |
| Abbildung 3.11: Ausgewählte Tubulin-bindende Therapeutika | 27 |
| Abbildung 3.12: Inhibitoren des mitotischen Kinesins Eg5 | 29 |
| Abbildung 3.13: Inhibitoren des mitotischen Kinesins CENP-E | 29 |
| Abbildung 3.14: Inhibitoren des mitotischen Kinesins HSET | 30 |
| Abbildung 5.1: Einstellungen zur Autofokussierung im Untermenü „Auto Focus“ (MetaMorph®-Menü „Screen Acquisition“) | 56 |
| Abbildung 6.1: Einfluss von ATRA-induzierter Ausdifferenzierung auf das Neuritenwachstum von SH-SY5Y-Zellen | 73 |
| Abbildung 6.2: Einfluss von ATRA-induzierter Ausdifferenzierung auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen | 75 |
| Abbildung 6.3: Einfluss von DMSO und BDNF auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 77 |
| Abbildung 6.4: MILI A-inspirierte Substanzen mit neurotrophen Effekten auf primäre Rattenneuronen | 78 |
| Abbildung 6.5: Neuritogene Eigenschaften von MILI A-inspirierten Pyridonverbindungen in SH-SY5Y-Zellen | 80 |
| Abbildung 6.6: Einfluss von MILI A-inspirierten 2,4-Dimethoxypyridinen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 82 |
| Abbildung 6.7: Einfluss von MILI A-inspirierten Pyridonverbindungen mit Fluorsubstitution auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 84 |
| Abbildung 6.8: Einfluss der neurotrophen MILI A-Derivate auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen | 86 |
| Abbildung 6.9: Einfluss der Behandlungsdauer auf die neurotrophen Effekte von MILI A-inspirierten 4-Hydroxy-2-pyridonen in SH-SY5Y-Zellen | 88 |
| Abbildung 6.10: Einfluss von MILI A-inspirierten 4-Hydroxy-2-pyridonen auf die Anzahl an Neuriten und Verzweigungspunkten in SH-SY5Y-Zellen | 90 |
| Abbildung 6.11: Chemische Struktur von Pyridovericin | 91 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 6.12: Mit Neuritenwachstum und – retraktion in Zusammenhang stehende Kinasen [modifiziert nach ^[167]] | 92 |
| Abbildung 6.13: JNK-vermittelte Apoptose-Signalkaskade [modifiziert nach ^[171e]] | 96 |
| Abbildung 6.14: Einfluss der MILI A-inspirierten Pyridonverbindungen PS44S und PS248S auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen..... | 99 |
| Abbildung 6.15: Neuritogene Eigenschaften des MAP4K4-Inhibitors Kenpaullon in SH-SY5Y-Zellen im Vergleich mit PS201S | 102 |
| Abbildung 6.16: ATP-kompetitive Inhibition von MAP4K4 durch PS201S | 104 |
| Abbildung 6.17: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m des Enzym-Substrat-Komplexes MAP4K4-PS201S mit Hilfe eines Dixon-Plots | 105 |
| Abbildung 6.18: Immunoblot der Proteinanreicherung von MAP4K4..... | 106 |
| Abbildung 6.19: Kristallstruktur von Wildtyp-MAP4K4 im Komplex mit PS201S (Auflösung 2.1 Å) | 107 |
| Abbildung 6.20: Neuroprotektiver Effekt der MILI A-inspirierten Pyridinverbindung PS574S in SH-SY5Y-Zellen | 109 |
| Abbildung 6.21: Phänotypische Veränderungen in HeLa-Zellen nach Behandlung mit MILI A-inspirierten Verbindungen..... | 111 |
| Abbildung 6.22: Phänotypische Veränderungen in HeLa-Zellen nach Behandlung mit MILI A-inspirierten Verbindungen..... | 112 |
| Abbildung 6.23: Quantitative Analyse von mitotischen HeLa-Zellen nach Applikation von PS229S und PS238S | 114 |
| Abbildung 6.24: Einfluss der MILI A-Derivate PS229S und PS238S auf die <i>in vitro</i> Polymerisation von Tubulin | 115 |
| Abbildung 6.25: Einfluss von Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 117 |
| Abbildung 6.26: Einfluss von Secoyohimbanen mit ausgeprägten Effekten auf Motoneuronen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen..... | 119 |
| Abbildung 6.27: Einfluss von Secoyohimbanen mit ausgeprägten Effekten auf hippocampale Rattenneuronen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 120 |
| Abbildung 6.28: Neurotrophe Eigenschaften von Secoyohimbanen in SH-SY5Y-Zellen | 122 |
| Abbildung 6.29: Konzentrationsabhängige Effekte der neurotrophen Secoyohimbane auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 126 |
| Abbildung 6.30: Einfluss von Iridoid-inspirierten Verbindungen auf HeLa-Zellen | 130 |
| Abbildung 6.31: Quantitative Analyse von mitotischen HeLa-Zellen nach Behandlung mit PYD1-237C-1 und PYD1-72+247-1-1..... | 132 |
| Abbildung 6.32: Einfluss der Iridoid-inspirierten Substanzen auf die <i>in vitro</i> -Polymerisation von Tubulin..... | 133 |
| Abbildung 6.33: Effekte des Sulfonylpyrimidins 236038 auf HeLa- und BT-549-Zellen | 136 |
| Abbildung 6.34: Validierung der kovalenten Bindung von 236038 an HSET mit der <i>in vitro</i> Peptid-Fangmethode | 138 |
| Abbildung 6.35: ATP-kompetitive HSET-Inhibition durch AZ82..... | 142 |
| Abbildung 6.36: Zellbasierte Untersuchungen der HSET-Inhibition durch AZ82 | 143 |
| Abbildung 6.37: HSET-Inhibition durch Sulfonylpyrimidine unter Zugabe von DTT..... | 145 |
| Abbildung 6.38: Reaktivität von 236038 und AZ82 mit GSH..... | 146 |
| Abbildung 6.39: Untersuchung der intrazellulären Bindung von HSET durch 236038..... | 148 |
| Abbildung 6.40: Zusammenfassung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine | 150 |
| Abbildung 7.1: Chemische Strukturen der neurotrophen 4-Hydroxy-2-pyridone..... | 154 |
| Abbildung 7.2: JNK-vermittelte Apoptose-Signalkaskade | 156 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 7.3: Auswahl bekannter Inhibitoren von MAP4K4 | 157 |
| Abbildung 7.4: Chemische Strukturen von 4-Hydroxy-2-pyridonen mit zytotoxischen Effekten in SH-SY5Y-Zellen | 158 |
| Abbildung 7.5: Chemische Strukturen der MILI A-Derivate PS67S und PS171S mit neurotrophen Einflüssen auf primäre Neuronen | 159 |
| Abbildung 7.6: Chemische Strukturen der 2,4-Dimethoxypyridine mit antiproliferativen Eigenschaften | 164 |
| Abbildung 7.7: Vergleich der chemischen Strukturen der als antiproliferativ (PYD1-235C-1, PYD1-237C-1, PYD1-72+247-1-2) und neurotroph auf hippokampale Rattenneuronen (PYD1-72+247-1-2, PYD2-16A1-1) und Motoneuronen (PYD1-295B-3, PYD1-296C-1, PYD1-296F-1) getesteten Iridoide | 165 |
| Abbildung 7.8: Vergleich der chemischen Strukturen von Rhynchophyllin und Isorhynchophyllin mit Secoyohimbanen mit neurotrophen Effekten in SH-SY5Y-Zellen (6qa, 6ra), hippokampalen Rattenneuronen (6ia, 6na) und Motoneuronen (6ba, 6fa) | 168 |
| Abbildung 7.9: Kovalenter HSET-Inhibitor 236038..... | 171 |
| Abbildung 7.10: Reaktionsmechanismus der Adduktbildung von 236038 mit GSH..... | 175 |
| Abbildung 7.11: Zusammenfassung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine | 178 |
| Abbildung 13.1: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Pyrimidinverbindungen | 216 |
| Abbildung 13.2: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine | 216 |
| Abbildung 13.3: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine | 217 |
| Abbildung 13.4: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine | 218 |
| Abbildung 13.5: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine | 219 |

11 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 5.1: Einstellungen für fluoreszenzmikroskopische Experimente in der Software MetaMorph® (Menü „Screen Acquisition“) | 55 |
| Tabelle 5.2: Einstellungen des MetaMorph®-Analyseprogramms „Neurite Outgrowth“ zur Detektion immunzytochemisch gefärbter DNA und Neuriten | 57 |
| Tabelle 5.3: Einstellungen des MetaMorph®-Analyseprogramms „Cell Cycle“ zur Detektion von immunzytochemisch gefärbtem phospho-Histon H3 | 57 |
| Tabelle 5.4: Einstellungen des MetaMorph®-Analyseprogramms „Multi Wavelength Cell Scoring“ zur Detektion von immunzytochemisch gefärbter DNA und zur Erhebung der Zellviabilität durch Calcein-AM | 58 |
| Tabelle 6.1: Prozentuale Inhibition von ausgewählten Kinasen durch PS100S und PS201S93 | |
| Tabelle 6.2: Prozentuale Inhibition von MAP4K4 durch ausgewählte MILI A-inspirierte Verbindungen | 97 |
| Tabelle 6.3: Korrelation des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen und der MAP4K4-Inhibition durch neuritogene MILI A-Derivate | 100 |
| Tabelle 6.4: Korrelation des Neuritenwachstums in SH-SY5Y-Zellen und der MAP4K4-Inhibition durch neuritogene MILI A-Derivate | 103 |
| Tabelle 6.5: Einfluss von Secoyohimbanen auf die Neuriten- und Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen | 124 |
| Tabelle 6.6: Konzentrationsabhängige Effekte der neurotrophen Secoyohimbane auf die Neuritenanzahl in SH-SY5Y-Zellen | 127 |
| Tabelle 6.7: Konzentrationsabhängige Effekte der neurotrophen Secoyohimbane auf die Verzweigungsanzahl in SH-SY5Y-Zellen | 128 |
| Tabelle 6.8: Bindungsverhalten der Sulfonylpyrimidine und apparente IC ₅₀ -Werte für HSET | 140 |
| Tabelle 13.1: Einfluss von MILI A-inspirierten Verbindungen auf das Neuritenwachstum in Hippokampus-Neuronen von E18/E19 Sprague-Dowley-Ratten | 199 |
| Tabelle 13.2: Einfluss von MILI A-inspirierten Verbindungen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 201 |
| Tabelle 13.3: Einfluss von Secoyohimban-inspirierten Substanzen auf das Neuritenwachstum in Hippokampus-Neuronen von E18/E19 Sprague-Dowley-Ratten | 206 |
| Tabelle 13.4: Einfluss von Secoyohimban-inspirierten Substanzen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 207 |
| Tabelle 13.5: Einfluss von Iridoid-inspirierten Substanzen von Dr. Pierre-Yves Dakas auf das Neuritenwachstum in Hippokampus-Neuronen von E18/E19 Sprague-Dowley-Ratten | 211 |
| Tabelle 13.6: Einfluss von Iridoid-inspirierten Substanzen von Dr. Pierre-Yves Dakas auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 212 |
| Tabelle 13.7: Einfluss von Iridoid-inspirierten Substanzen von Dr. Peter Schröder auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen | 214 |

12 Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| Å | Ångström |
| Ac | Acetyl |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AEBSF | 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid |
| AM | Acetoxymethylester |
| ATPase | Adenosintriphosphatase |
| bzw. | beziehungsweise |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| Cys | Cystein |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| FITC | Fluoreszein-Isothiocyanat |
| Glu | Glutaminsäure |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| His-Tag | Polyhistidin-Aminosäuresequenz |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| IR | Infrarot |
| kDa | Kilodalton |
| Lys | Lysin |
| m/z | Masse-zu-Ladung-Verhältnis |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| Met | Methionin |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| min | Minute |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |

| Abkürzung | Bedeutung |
|----------------------------------|---|
| NaH ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NCI-60 | 60 Tumor-Zelllinien des US National Cancer Institute (NCI) |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG 8000 | Polyethylenglykol (Molekulargewicht 8 kDa) |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| rcf | relative Zentrifugalbeschleunigung |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| s | Sekunde |
| siRNA | kleine eingreifende RNA (engl. <i>small interfering RNA</i>) |
| TB-Medium | Terrific-Broth-Medium |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung |
| TBS-T | Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 |
| TCEP | Tris(2-carboxyethyl)phosphin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TRITC | Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat |
| Tyr | Tyrosin |
| U | Unit |
| u.a. | unter anderem |
| V | Volt |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| z.B. | zum Beispiel |

13 Anhang

Tabelle 13.1: Einfluss von MILI A-inspirierten Verbindungen auf das Neuritenwachstum in Hippokampus-Neuronen von E18/E19 Sprague-Dowley-Ratten

Die Zellen wurden für 48 h mit 1 μM und zum Teil zusätzlich mit 10 μM der jeweiligen Substanz behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums aus fünf Bildaufnahmen. Die Messungen wurden von der Firma Neuro-Zone durchgeführt.

| | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | | | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | |
|---------------|---------------------------------------|------------------|---------------|---------------------------------------|-------------------|
| | 10 μM | 1 μM | | 10 μM | 1 μM |
| PS100S | | + 3,5 \pm 4,4 | PS228S | - 6,8 \pm 5,2 | + 4,3 \pm 11,6 |
| PS104S | | + 3,2 \pm 10,7 | PS229S | - 5,0 \pm 4,4 | + 11,5 \pm 8,9 |
| PS118S | | - 1,2 \pm 7,8 | PS234S | + 3,1 \pm 6,1 | + 11,2 \pm 9,2 |
| PS122S | + 2,1 \pm 9,7 | + 7,4 \pm 6,9 | PS235S | - 4,7 \pm 8,9 | + 0,5 \pm 6,5 |
| PS123S | | + 0,8 \pm 5,5 | PS238S | + 1,1 \pm 5,1 | + 16,7 \pm 4,9 |
| PS124S | | + 5,3 \pm 4,3 | PS239S | - 1,6 \pm 5,0 | + 10,6 \pm 7,0 |
| PS138S | | + 4,5 \pm 5,2 | PS240S | - 4,8 \pm 9,4 | + 3,2 \pm 6,6 |
| PS139S | | + 10,0 \pm 8,9 | PS242S | - 5,3 \pm 2,6 | - 4,9 \pm 5,4 |
| PS151S | | + 12,9 \pm 0,9 | PS245S | - 0,7 \pm 6,5 | + 5,4 \pm 9,7 |
| PS155S | | + 1,7 \pm 9,0 | PS247S | + 6,2 \pm 10,4 | + 10,5 \pm 11,5 |
| PS157S | | - 4,3 \pm 4,7 | PS248S | - 7,2 \pm 5,0 | + 5,7 \pm 6,8 |
| PS158S | | - 7,5 \pm 3,5 | PS250S | - 5,1 \pm 9,1 | + 7,8 \pm 8,4 |
| PS163S | | - 4,7 \pm 4,1 | PS251S | - 2,5 \pm 3,5 | + 6,7 \pm 6,3 |
| PS166S | - 12,6 \pm 6,2 | - 0,5 \pm 5,9 | PS252S | + 7,7 \pm 3,3 | + 24,5 \pm 8,8 |
| PS170S | - 13,2 \pm 2,9 | - 1,2 \pm 5,4 | PS254S | + 2,0 \pm 6,2 | + 2,0 \pm 6,0 |
| PS171S | + 18,2 \pm 6,7 | + 21,3 \pm 5,8 | PS255S | - 4,9 \pm 5,6 | + 1,2 \pm 8,4 |
| PS172S | + 1,6 \pm 2,7 | + 6,1 \pm 9,8 | PS268S | - 5,7 \pm 6,1 | - 1,0 \pm 4,0 |
| PS173S | + 2,0 \pm 12,3 | + 8,6 \pm 12,0 | PS272S | - 8,1 \pm 4,4 | + 1,5 \pm 2,2 |
| PS174S | + 1,6 \pm 3,9 | + 2,8 \pm 3,9 | PS274S | - 2,4 \pm 6,9 | + 3,4 \pm 7,7 |
| PS175S | + 7,1 \pm 6,9 | + 9,5 \pm 4,7 | PS277S | - 0,9 \pm 2,7 | + 9,4 \pm 11,0 |
| PS176S | | + 8,2 \pm 10,1 | PS279S | + 3,3 \pm 5,7 | + 5,8 \pm 11,3 |
| PS177S | - 10,9 \pm 5,2 | - 4,4 \pm 6,6 | PS280S | - 7,5 \pm 2,9 | - 4,7 \pm 4,5 |
| PS178S | | - 6,1 \pm 5,8 | PS282S | - 9,4 \pm 6,4 | - 4,6 \pm 6,6 |
| PS179S | - 8,5 \pm 8,4 | - 2,9 \pm 9,1 | PS286S | - 9,0 \pm 7,2 | - 7,1 \pm 6,4 |

| | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | | | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | |
|---------------|--|------------------|---------------|--|-------------------|
| | 10 μ M | 1 μ M | | 10 μ M | 1 μ M |
| PS180S | - 7,8 \pm 2,8 | - 12,3 \pm 5,7 | PS287S | - 7,7 \pm 8,0 | - 3,6 \pm 8,6 |
| PS184S | - 4,0 \pm 9,5 | + 3,3 \pm 8,1 | PS288S | - 1,7 \pm 5,8 | + 0,8 \pm 5,2 |
| PS185S | | - 2,4 \pm 3,2 | PS28SE | + 0,8 \pm 5,2 | + 11,9 \pm 8,5 |
| PS186S | - 5,5 \pm 3,1 | + 3,2 \pm 4,7 | PS292S | + 1,8 \pm 9,3 | + 10,0 \pm 4,8 |
| PS187S | | - 2,7 \pm 4,4 | PS293S | - 5,7 \pm 3,6 | - 3,9 \pm 3,8 |
| PS194S | | - 1,8 \pm 3,6 | PS296S | - 5,4 \pm 6,3 | + 1,2 \pm 7,2 |
| PS196S | - 15,4 \pm 3,8 | - 3,5 \pm 2,3 | PS297S | - 7,3 \pm 3,6 | + 0,3 \pm 4,3 |
| PS198S | - 7,8 \pm 5,1 | + 8,3 \pm 10,3 | PS298S | - 5,5 \pm 7,8 | - 0,3 \pm 7,0 |
| PS199S | + 7,8 \pm 7,0 | + 13,0 \pm 9,6 | PS299S | - 6,8 \pm 3,8 | - 1,2 \pm 8,5 |
| PS1K | + 3,9 \pm 8,9 | + 6,5 \pm 6,3 | PS2S | + 4,7 \pm 6,1 | + 16,6 \pm 11,1 |
| PS201S | + 1,8 \pm 7,9 | + 9,0 \pm 14,3 | PS300S | - 13,7 \pm 6,7 | - 5,5 \pm 6,5 |
| PS219S | + 2,4 \pm 5,9 | + 2,4 \pm 7,7 | PS301S | + 2,8 \pm 9,7 | + 12,2 \pm 6,2 |
| PS220S | + 6,2 \pm 5,4 | + 9,4 \pm 10,4 | PS38S | + 6,6 \pm 7,8 | + 14,1 \pm 10,7 |
| PS222S | + 2,1 \pm 7,2 | + 6,2 \pm 7,5 | PS67S | | + 21,5 \pm 5,7 |
| PS223S | - 2,3 \pm 3,3 | + 14,8 \pm 4,6 | PS83S | | + 14,0 \pm 15,2 |
| PS226S | + 3,9 \pm 13,2 | + 4,0 \pm 11,9 | PS85S | | + 6,7 \pm 3,7 |
| PS227S | + 0,1 \pm 5,8 | + 8,6 \pm 9,6 | BDNF | | + 18,3 \pm 8,5 |

Tabelle 13.2: Einfluss von MILI A-inspirierten Verbindungen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 μM oder 1 μM der jeweiligen Substanz behandelt. Die Bilddaten wurden anhand einer DNA- (DAPI) und α -Tubulin-Färbung (α -Tubulin-Antikörper und Alexa488-gekoppelter Nachweisantikörper) halbautomatisch ausgewertet und quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Neuritenlänge pro Zelle aller Einzelbilder im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 17 – 96). Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: $p < 0,0001$; **: $p < 0,01$).

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|-------------------|------------------------------------|--|---|---|
| BDNF | 10 μM | 37,9 \pm 10,0 | 29,7 \pm 7,3 | + 27,8**** |
| Kenpaullon | 10 μM | 54,6 \pm 9,2 | 26,5 \pm 3,8 | + 106,0 |
| PS100S | 10 μM | 23,1 \pm 7,0 | 15,1 \pm 4,2 | + 53,0**** |
| PS104S | 10 μM | 25,5 \pm 4,6 | 20,5 \pm 3,9 | + 24,2 |
| PS118S | 10 μM | 21,2 \pm 2,9 | 18,7 \pm 1,9 | + 13,2 |
| PS122S | 10 μM | 23,1 \pm 7,5 | 18,1 \pm 2,7 | + 27,3 |
| PS123S | 10 μM | 31,4 \pm 6,5 | 26,4 \pm 4,4 | + 18,9 |
| PS124S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS138S12 | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS139S | 10 μM | 17,7 \pm 2,4 | 16,9 \pm 3,7 | + 4,7 |
| PS150S | 10 μM | 27,9 \pm 6,0 | 26,5 \pm 3,7 | + 5,3 |
| PS151S | 10 μM | 29,0 \pm 9,4 | 20,5 \pm 3,9 | + 41,4 |
| PS155S | 10 μM | 30,1 \pm 9,7 | 26,5 \pm 3,7 | + 13,5 |
| PS157S | 10 μM | 18,6 \pm 2,6 | 18,5 \pm 3,6 | + 0,8 |
| PS158S | 10 μM | 17,3 \pm 2,0 | 15,1 \pm 1,4 | + 14,7 |
| PS160S | 10 μM | 39,1 \pm 9,8 | 26,5 \pm 3,7 | + 47,3 |
| PS161S | 10 μM | 25,7 \pm 2,5 | 26,4 \pm 4,4 | - 2,5 |
| PS163S | 10 μM | 22,7 \pm 2,8 | 13,4 \pm 1,2 | + 69,0 |
| PS166S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS170S | 10 μM | 15,8 \pm 3,4 | 18,5 \pm 3,6 | - 14,3 |
| PS171S | 10 μM | 12,0 \pm 2,9 | 13,4 \pm 1,2 | -10,4 |
| PS172S | 10 μM | 24,7 \pm 3,9 | 18,7 \pm 1,9 | + 32,3 |
| PS173S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS174S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS175S | 10 μM | 29,6 \pm 6,4 | 26,5 \pm 3,7 | + 11,6 |
| PS176S | 10 μM | 18,8 \pm 3,5 | 18,1 \pm 2,7 | + 4,0 |

Anhang

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|--------|------------------|--|---|---|
| PS177S | 10 μM | 24,7 \pm 7,7 | 17,1 \pm 3,0 | + 43,9 |
| PS178S | 10 μM | 19,4 \pm 3,4 | 18,7 \pm 1,9 | + 3,9 |
| PS179S | 10 μM | 23,9 \pm 16,8 | 25,1 \pm 7,9 | - 5,0 |
| PS180S | 10 μM | 22,4 \pm 5,5 | 18,5 \pm 3,6 | + 21,1 |
| PS184S | 10 μM | 24,3 \pm 7,2 | 25,1 \pm 7,9 | - 3,4 |
| PS185S | 10 μM | 24,4 \pm 4,8 | 18,1 \pm 2,7 | + 35,0 |
| PS186S | 10 μM | 22,6 \pm 3,7 | 18,7 \pm 1,9 | + 21,0 |
| PS187S | 10 μM | 26,9 \pm 8,1 | 25,1 \pm 7,9 | + 6,9 |
| PS194S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS196S | 10 μM | 33,0 \pm 7,4 | 26,4 \pm 4,4 | + 25,2 |
| PS199S | 10 μM | 28,1 \pm 5,7 | 17,3 \pm 3,8 | + 62,4**** |
| PS201S | 10 μM | 38,7 \pm 8,5 | 22,5 \pm 3,2 | + 72,0**** |
| PS219S | 10 μM | 27,3 \pm 3,9 | 26,4 \pm 4,4 | + 3,6 |
| PS220S | 10 μM | 22,8 \pm 4,2 | | + 23,3 |
| PS222S | 10 μM | 32,9 \pm 7,5 | 30,9 \pm 8,6 | + 6,6 |
| PS223S | 10 μM | 21,6 \pm 5,0 | 17,1 \pm 3,0 | + 26,0 |
| PS226S | 10 μM | 19,9 \pm 2,5 | 20,5 \pm 3,9 | - 3,1 |
| PS227S | 10 μM | 29,2 \pm 7,0 | 30,9 \pm 8,6 | - 5,5 |
| PS228S | 10 μM | 22,8 \pm 3,4 | 18,7 \pm 1,9 | + 22,2 |
| PS229S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS234S | 10 μM | 20,5 \pm 7,0 | 20,5 \pm 3,9 | - 0,2 |
| PS235S | 10 μM | 30,9 \pm 5,5 | 26,4 \pm 4,4 | + 16,9 |
| PS238S | 10 μM | 15,9 \pm 2,6 | 17,1 \pm 3,0 | - 6,9 |
| | 1 μM | 26,7 \pm 9,3 | 21,9 \pm 5,6 | + 21,9** |
| PS239S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS242S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS245S | 10 μM | 28,4 \pm 4,1 | 17,5 \pm 2,9 | + 61,9**** |
| PS247S | 10 μM | 36,3 \pm 7,2 | 26,4 \pm 4,4 | + 37,5 |
| PS248S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS250S | 10 μM | 29,1 \pm 4,9 | 30,9 \pm 8,6 | - 5,7 |
| PS251S | 10 μM | 24,0 \pm 3,8 | 24,2 \pm 7,2 | - 0,8 |
| PS252S | 10 μM | 29,8 \pm 7,3 | 27,9 \pm 5,7 | + 7,0 |

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|--------|------------------|--|---|---|
| PS254S | 10 μM | 38,2 \pm 7,6 | 27,0 \pm 4,5 | + 41,5 |
| PS255S | 10 μM | 22,4 \pm 4,5 | 15,1 \pm 1,4 | + 48,5 |
| PS279S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS280S | 10 μM | 18,4 \pm 2,8 | 18,5 \pm 3,6 | - 0,4 |
| PS282S | 10 μM | 35,0 \pm 10,4 | 27,9 \pm 5,7 | + 25,7 |
| PS350S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS360S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS418S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS423S | 10 μM | 20,0 \pm 3,4 | 20,5 \pm 3,9 | - 2,5 |
| PS425S | 10 μM | 16,5 \pm 2,1 | 18,5 \pm 3,6 | - 10,6 |
| PS426S | 10 μM | 20,2 \pm 4,1 | 15,1 \pm 1,4 | + 34,2 |
| PS428S | 10 μM | 20,3 \pm 2,7 | 15,1 \pm 1,4 | + 34,3 |
| PS429S | 10 μM | 22,3 \pm 5,1 | 16,9 \pm 3,7 | + 32,2 |
| PS430S | 10 μM | 22,2 \pm 4,5 | 18,7 \pm 1,9 | + 18,8 |
| PS435S | 10 μM | 19,1 \pm 2,3 | 18,1 \pm 2,7 | + 5,6 |
| PS439S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS446S | 10 μM | 34,3 \pm 8,5 | 33,6 \pm 4,9 | + 2,2 |
| PS448S | 10 μM | 28,0 \pm 4,2 | 26,4 \pm 4,4 | + 6,2 |
| PS449S | 10 μM | 36,6 \pm 11,1 | 27,0 \pm 4,5 | + 35,4 |
| PS44S | 10 μM | 25,2 \pm 8,3 | 24,7 \pm 6,7 | + 2,1 |
| PS450S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS451S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS454S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS455S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS461S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS462S | 10 μM | 26,0 \pm 6,5 | 27,0 \pm 4,5 | - 3,9 |
| PS464S | 10 μM | 20,0 \pm 3,0 | 15,1 \pm 1,4 | + 32,8 |
| PS466S | 10 μM | 24,0 \pm 3,4 | 26,4 \pm 4,4 | - 9,1 |
| PS467S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS469S | 10 μM | 19,1 \pm 2,7 | 15,1 \pm 1,4 | + 26,7 |
| PS470S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS471S | 10 μM | 24,9 \pm 5,6 | 20,5 \pm 3,9 | + 21,4 |

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|--------|------------------|--|---|---|
| PS472S | 10 μM | 19,6 \pm 5,7 | 18,1 \pm 2,7 | + 8,3 |
| PS539S | 10 μM | 14,5 \pm 1,7 | 13,6 \pm 2,2 | + 6,5 |
| PS541S | 10 μM | 15,0 \pm 2,3 | 15,4 \pm 2,7 | - 2,6 |
| PS542S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS546S | 10 μM | 16,6 \pm 2,4 | 13,6 \pm 2,2 | + 22,5 |
| PS547S | 10 μM | 18,2 \pm 3,3 | 13,6 \pm 2,2 | + 34,3 |
| PS548S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS550S | 10 μM | 18,6 \pm 5,0 | 15,4 \pm 2,7 | + 20,6 |
| PS551S | 10 μM | 19,8 \pm 3,0 | 13,6 \pm 2,2 | + 46,1 |
| PS553S | 10 μM | 16,3 \pm 3,2 | 13,6 \pm 2,2 | + 20,3 |
| PS554S | 10 μM | 15,3 \pm 1,7 | 15,5 \pm 3,1 | - 1,2 |
| PS555S | 10 μM | 15,9 \pm 3,2 | 13,6 \pm 2,2 | + 17,2 |
| PS556S | 10 μM | 12,2 \pm 1,7 | 15,4 \pm 2,7 | - 21,0 |
| PS557S | 10 μM | 15,6 \pm 2,7 | 13,6 \pm 2,2 | + 15,2 |
| PS558S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS564S | 10 μM | 20,5 \pm 5,4 | 15,5 \pm 3,1 | + 31,9 |
| PS565S | 10 μM | 16,9 \pm 3,7 | 15,4 \pm 2,7 | + 9,7 |
| PS566S | 10 μM | 20,4 \pm 2,4 | 15,5 \pm 3,1 | + 31,3 |
| PS567S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS569S | 10 μM | 20,8 \pm 3,4 | 15,5 \pm 3,1 | + 33,7 |
| PS571S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS573S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS574S | 10 μM | 25,8 \pm 7,3 | 21,0 \pm 3,4 | + 22,9 |
| PS576S | 10 μM | 19,5 \pm 2,7 | 15,5 \pm 3,1 | + 25,5 |
| PS584S | 10 μM | 17,9 \pm 3,5 | 13,6 \pm 2,2 | + 31,7 |
| PS586S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS589S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS58S | 10 μM | 17,9 \pm 3,0 | 16,9 \pm 3,7 | + 5,9 |
| PS600S | 10 μM | 22,7 \pm 3,8 | 17,5 \pm 2,9 | + 29,5 |
| PS601S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS606S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| | 1 μM | 34,3 \pm 5,1 | 29,1 \pm 5,5 | + 17,8** |

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|---------|------------------|--|---|---|
| PS60S | 10 μM | 17,1 \pm 2,1 | 15,1 \pm 1,4 | + 13,6 |
| PS619S | 10 μM | 39,2 \pm 7,9 | 29,1 \pm 5,3 | + 34,8 |
| PS633S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS641S | 10 μM | 31,1 \pm 6,9 | 21,2 \pm 10,2 | + 46,7**** |
| PS642S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| | 1 μM | 33,5 \pm 6,5 | 29,3 \pm 6,6 | + 14,3** |
| PS644S | 10 μM | 19,0 \pm 3,0 | 18,7 \pm 1,9 | + 1,9 |
| PS67S12 | 10 μM | 21,9 \pm 2,9 | 13,4 \pm 1,2 | + 63,4 |
| PS79S | 10 μM | 19,7 \pm 3,8 | 18,5 \pm 3,6 | + 6,8 |
| PS81S | 10 μM | | | zytotoxisch |
| PS83S | 10 μM | 13,4 \pm 2,1 | 13,4 \pm 1,2 | 0,0 |
| PS85S | 10 μM | 24,5 \pm 5,0 | 18,5 \pm 3,6 | + 32,9 |
| PS86S | 10 μM | 14,4 \pm 2,6 | 13,4 \pm 1,2 | + 7,2 |
| PS99S | 10 μM | 26,1 \pm 5,2 | 29,5 \pm 7,5 | - 11,7 |

Tabelle 13.3: Einfluss von Secoyohimban-inspirierten Substanzen auf das Neuritenwachstum in Hippokampus-Neuronen von E18/E19 Sprague-Dowley-Ratten

Die Zellen wurden für 48 h mit 1 μM und/oder 10 μM der jeweiligen Substanz behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums aus fünf Bildaufnahmen. Die Messungen wurden von der Firma Neuro-Zone durchgeführt.

| | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | |
|--------------------------|--|-----------------------------------|
| | 10 μM | 1 μM |
| Rhynchophyllin | - 2,6 \pm 6,6 | + 13,3 \pm 7,1 |
| Isorhynchophyllin | - 0,1 \pm 5,8 | 18,1 \pm 9,9 |
| (+)-6aa | - 0,4 \pm 4,6 | + 3,2 \pm 6,3 |
| (+)-6fa | - 6,1 \pm 2,3 | + 7,9 \pm 3,1 |
| (-)-6ca | - 9,7 \pm 5,9 | + 8,2 \pm 6,8 |
| (+)-6ea | - 12,6 \pm 6,0 | + 13,7 \pm 8,9 |
| (+)-6da | + 1,2 \pm 2,0 | + 11,2 \pm 4,6 |
| (+)-6ha | + 0,5 \pm 9,3 | + 18,3 \pm 3,0 |
| (+)-6ma | - 12,5 \pm 10,7 | + 9,2 \pm 5,7 |
| (+)-6na | + 4,3 \pm 10,3 | + 9,1 \pm 3,4 |
| (+)-6ba | - 6,5 \pm 9,7 | + 15,3 \pm 5,8 |
| (+)-6ga | - 3,7 \pm 8,5 | + 17,2 \pm 4,1 |
| (+)-6ia | - 3,8 \pm 7,2 | + 8,7 \pm 6,0 |

Tabelle 13.4: Einfluss von Secoyohimban-inspirierten Substanzen auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 1 μM (+)-6ra und 10 μM der weiteren Substanzen behandelt. Die Bilddaten wurden anhand einer DNA- (DAPI) und α -Tubulin-Färbung (α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper) halbautomatisch ausgewertet und quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Neuritenlänge pro Zelle aller Einzelbilder im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 17 – 91). Statistische Signifikanz wurde durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (****: p < 0,0001; ***: p < 0,001; **: p < 0,01).

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] |
|----------|------------------|--|---|---|
| (-)-6aa | 10 μM | 35,1 \pm 6,9 | 35,9 \pm 6,0 | - 2,0 |
| (-)-6aaA | 10 μM | 30,0 \pm 6,4 | 32,8 \pm 4,4 | - 8,7 |
| (-)-6aaB | 10 μM | 29,1 \pm 4,9 | 25,8 \pm 2,9 | + 12,5 |
| (-)-6aaC | 10 μM | 29,3 \pm 3,0 | 29,1 \pm 3,1 | + 0,8 |
| (-)-6aaD | 10 μM | 29,3 \pm 7,9 | 29,1 \pm 3,1 | + 0,6 |
| (-)-6aaE | 10 μM | 35,0 \pm 7,0 | 35,9 \pm 6,0 | - 2,3 |
| (-)-6ba | 10 μM | 26,8 \pm 7,1 | 26,8 \pm 9,7 | 0,0 |
| (-)-6ca | 10 μM | 26,4 \pm 4,9 | 35,9 \pm 6,0 | - 26,4 |
| (-)-6da | 10 μM | 27,7 \pm 4,5 | 29,2 \pm 4,2 | - 4,9 |
| (-)-6ea | 10 μM | 24,7 \pm 5,3 | 29,1 \pm 3,1 | - 15,1 |
| (-)-6fa | 10 μM | 24,1 \pm 7,3 | 24,9 \pm 7,8 | - 3,2 |
| (-)-6faA | 10 μM | 30,8 \pm 5,6 | 29,2 \pm 4,2 | + 5,6 |
| (-)-6faB | 10 μM | 31,7 \pm 4,9 | 25,8 \pm 2,9 | + 22,5 |
| (-)-6faC | 10 μM | 37,0 \pm 5,2 | 29,2 \pm 4,2 | + 27,0 |
| (-)-6faD | 10 μM | 36,0 \pm 6,7 | 25,8 \pm 2,9 | + 39,3 |
| (-)-6ga | 10 μM | 22,4 \pm 3,9 | 33,7 \pm 6,7 | - 33,6 |
| (-)-6ha | 10 μM | 26,7 \pm 2,9 | 32,8 \pm 4,4 | - 18,7 |
| (-)-6hb | 10 μM | 25,2 \pm 4,9 | 33,7 \pm 6,7 | - 25,1 |
| (-)-6ia | 10 μM | 28,2 \pm 7,3 | 27,6 \pm 7,5 | + 2,2 |
| (-)-6ib | 10 μM | 26,1 \pm 5,3 | 33,7 \pm 6,7 | - 22,6 |
| (-)-6ja | 10 μM | 30,9 \pm 4,3 | 25,8 \pm 2,9 | + 19,5 |
| (-)-6ka | 10 μM | 27,5 \pm 7,8 | 29,2 \pm 4,2 | - 5,9 |
| (-)-6la | 10 μM | 30,1 \pm 5,4 | 29,2 \pm 4,2 | + 3,2 |
| (-)-6nb | 10 μM | 28,4 \pm 4,5 | 25,8 \pm 2,9 | + 9,9 |
| (-)-6oa | 10 μM | 29,7 \pm 5,9 | 35,9 \pm 6,0 | - 17,2 |

Anhang

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] |
|----------|------------------|--|---|---|
| (-)-6pa | 10 μM | 30,8 \pm 6,8 | 33,7 \pm 6,7 | - 8,6 |
| (-)-6qa | 10 μM | 22,0 \pm 5,7 | 18,3 \pm 3,2 | 20,2*** |
| (-)-6ra | 1 μM | 26,9 \pm 6,3 | 18,3 \pm 3,2 | + 47,0**** |
| (-)-6sa | 10 μM | 28,5 \pm 4,1 | 32,8 \pm 4,4 | - 13,1 |
| (-)-6saA | 10 μM | 30,3 \pm 6,1 | 25,8 \pm 2,9 | + 17,3 |
| (-)-6saB | 10 μM | 27,3 \pm 5,5 | 29,2 \pm 4,2 | - 6,5 |
| (-)-6saC | 10 μM | 30,3 \pm 4,5 | 29,1 \pm 3,1 | + 4,1 |
| (-)-6saD | 10 μM | 37,4 \pm 8,7 | 33,7 \pm 6,7 | + 11,1 |
| (-)-6ta | 10 μM | 33,8 \pm 8,5 | 29,1 \pm 3,1 | + 16,2 |
| (-)-6ua | 10 μM | 31,9 \pm 5,4 | 25,8 \pm 2,9 | + 23,5 |
| (-)-6ua | 10 μM | 30,4 \pm 5,7 | 35,9 \pm 6,0 | - 15,3 |
| (-)-6uaA | 10 μM | 29,9 \pm 4,5 | 29,1 \pm 3,1 | + 2,8 |
| (-)-6uaB | 10 μM | 24,6 \pm 3,7 | 33,7 \pm 6,7 | - 26,9 |
| (-)-6uaC | 10 μM | 35,0 \pm 6,3 | 29,2 \pm 4,2 | + 19,8 |
| (-)-6uaD | 10 μM | 36,7 \pm 4,9 | 32,8 \pm 4,4 | + 11,9 |
| (-)-6wa | 10 μM | 25,7 \pm 6,4 | 25,8 \pm 2,9 | - 0,7 |
| (-)-6xa | 10 μM | 23,6 \pm 3,6 | 29,1 \pm 3,1 | - 19,0 |
| (-)-6ya | 10 μM | 27,5 \pm 8,1 | 29,1 \pm 3,1 | - 5,5 |
| (+)-6aa | 10 μM | 29,5 \pm 6,2 | 32,8 \pm 4,4 | - 10,0 |
| (+)-6aaA | 10 μM | 34,0 \pm 5,0 | 33,7 \pm 6,7 | + 0,9 |
| (+)-6aaB | 10 μM | 31,3 \pm 5,4 | 29,1 \pm 3,1 | + 7,6 |
| (+)-6aaC | 10 μM | 38,5 \pm 6,3 | 33,7 \pm 6,7 | + 14,3 |
| (+)-6aaD | 10 μM | 29,6 \pm 5,9 | 35,9 \pm 6,0 | - 17,3 |
| (+)-6aaE | 10 μM | 28,7 \pm 3,6 | 33,7 \pm 6,7 | - 14,8 |
| (+)-6ba | 10 μM | 24,6 \pm 5,4 | 22,7 \pm 5,0 | + 8,4 |
| (+)-6ca | 10 μM | 29,0 \pm 4,7 | 35,9 \pm 6,0 | - 19,2 |
| (+)-6da | 10 μM | 25,2 \pm 6,5 | 33,7 \pm 6,7 | - 25,2 |
| (+)-6ea | 10 μM | 29,0 \pm 4,8 | 25,8 \pm 2,9 | + 12,2 |
| (+)-6fa | 10 μM | 21,3 \pm 5,5 | 23,9 \pm 6,6 | - 10,9 |
| (+)-6faA | 10 μM | 24,7 \pm 5,0 | 25,8 \pm 2,9 | - 4,6 |
| (+)-6faB | 10 μM | 28,8 \pm 3,1 | 29,2 \pm 4,2 | - 1,4 |

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] |
|----------|------------------|--|---|---|
| (+)-6faC | 10 μM | 36,0 \pm 6,3 | 35,9 \pm 6,0 | + 0,3 |
| (+)-6faD | 10 μM | 32,1 \pm 5,4 | 29,1 \pm 3,1 | + 10,4 |
| (+)-6ga | 10 μM | 28,0 \pm 4,9 | 29,1 \pm 3,1 | - 3,6 |
| (+)-6ha | 10 μM | 25,3 \pm 6,5 | 35,9 \pm 6,0 | - 29,3 |
| (+)-6hb | 10 μM | 30,6 \pm 3,8 | 32,8 \pm 4,4 | - 6,7 |
| (+)-6ia | 10 μM | 24,2 \pm 7,0 | 27,7 \pm 7,3 | - 12,6 |
| (+)-6ib | 10 μM | 32,6 \pm 5,9 | 35,9 \pm 6,0 | - 9,0 |
| (+)-6ma | 10 μM | 28,7 \pm 4,7 | 29,2 \pm 4,2 | - 1,5 |
| (+)-6na | 10 μM | 27,3 \pm 9,9 | 26,8 \pm 6,2 | + 1,9 |
| (+)-6nb | 10 μM | 20,7 \pm 4,3 | 32,8 \pm 4,4 | - 36,8 |
| (+)-6oa | 10 μM | 23,8 \pm 4,0 | 29,1 \pm 3,1 | - 18,0 |
| (+)-6pa | 10 μM | 38,6 \pm 5,6 | 32,8 \pm 4,4 | + 17,7 |
| (+)-6qa | 10 μM | 29,5 \pm 5,9 | 18,3 \pm 3,2 | + 61,2**** |
| (+)-6ra | 1 μM | 27,7 \pm 10,3 | 19,4 \pm 7,0 | + 42,8**** |
| (+)-6sa | 10 μM | 30,2 \pm 5,7 | 25,8 \pm 2,9 | + 16,9 |
| (+)-6saA | 10 μM | 25,5 \pm 4,0 | 33,7 \pm 6,7 | - 24,2 |
| (+)-6saB | 10 μM | 29,3 \pm 4,7 | 32,8 \pm 4,4 | - 10,8 |
| (+)-6saC | 10 μM | 32,4 \pm 4,8 | 35,9 \pm 6,0 | - 9,6 |
| (+)-6saD | 10 μM | 32,0 \pm 6,1 | 25,8 \pm 2,9 | + 23,7 |
| (+)-6ta | 10 μM | 38,1 \pm 4,7 | 35,9 \pm 6,0 | + 6,2 |
| (+)-6ua | 10 μM | 33,0 \pm 5,2 | 29,2 \pm 4,2 | + 13,1 |
| (+)-6ua | 10 μM | 30,3 \pm 4,6 | 29,2 \pm 4,2 | + 3,8 |
| (+)-6uaA | 10 μM | 24,4 \pm 5,8 | 29,1 \pm 3,1 | - 16,2 |
| (+)-6uaB | 10 μM | 27,8 \pm 5,4 | 29,1 \pm 3,1 | - 4,4 |
| (+)-6uaC | 10 μM | 27,4 \pm 3,7 | 29,1 \pm 3,1 | - 5,7 |
| (+)-6uaD | 10 μM | 33,0 \pm 6,2 | 32,8 \pm 4,4 | + 0,6 |
| (+)-6wa | 10 μM | 31,0 \pm 7,3 | 29,2 \pm 4,2 | + 6,2 |
| (+)-6xa | 10 μM | 31,6 \pm 7,4 | 33,7 \pm 6,7 | - 6,1 |
| (+)-6ya | 10 μM | 32,9 \pm 6,6 | 35,9 \pm 6,0 | - 8,3 |
| BDNF | 10 μM | 45,1 \pm 10,3 | 27,2 \pm 8,8 | + 65,8**** |

| | | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] |
|------------------------|------------------|--|---|---|
| Isorhyncho- phyllin | 10 μM | 17,4 \pm 2,9 | 19,7 \pm 4,1 | - 11,7** |
| Rhyncho- phyllin | 10 μM | 17,4 \pm 4,5 | 19,7 \pm 4,1 | - 11,7*** |

Tabelle 13.5: Einfluss von Iridoid-inspirierten Substanzen von Dr. Pierre-Yves Dakas auf das Neuritenwachstum in Hippokampus-Neuronen von E18/E19 Sprague-Dowley-Ratten

Die Zellen wurden für 48 h mit 1 μM und zum Teil zusätzlich mit 10 μM der jeweiligen Substanz behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums aus fünf Bildaufnahmen. Die Messungen wurden von der Firma Neuro-Zone durchgeführt.

| | Zu-/Abnahme des Neuritenwachstums [%] | |
|-----------------|---------------------------------------|------------------|
| | 10 μM | 1 μM |
| PYD1-241-1 | | - 1,1 \pm 9,7 |
| PYD1-246-1 | | + 0,6 \pm 5,6 |
| PYD1-267-1 | | - 0,3 \pm 7,2 |
| PYD1-276A-1 | | + 4,7 \pm 7,6 |
| PYD1-276B-2 | | - 3,8 \pm 3,2 |
| PYD1-278-1 | | + 1,3 \pm 7,0 |
| PYD1-290B-1 | | + 4,7 \pm 5,4 |
| PYD1-290C-1 | | + 9,3 \pm 8,2 |
| PYD1-290D-1 | | + 6,6 \pm 7,5 |
| PYD1-290E-1 | | + 9,6 \pm 6,4 |
| PYD1-290F-2 | | + 5,7 \pm 13,6 |
| PYD1-290H-2 | | + 7,9 \pm 2,8 |
| PYD1-290I-1 | | + 4,5 \pm 4,2 |
| PYD1-293A-1 | | + 0,7 \pm 7,6 |
| PYD1-293B-1 | | - 12,5 \pm 3,6 |
| PYD1-293C-1 | | - 14,1 \pm 3,3 |
| PYD1-293D-1 | | + 5,6 \pm 4,0 |
| PYD1-293E-1 | | + 2,0 \pm 10,6 |
| PYD1-293G-1 | | + 7,0 \pm 10,3 |
| PYD1-295B-3 | | - 2,5 \pm 5,7 |
| PYD1-296F-1 | | + 11,7 \pm 6,0 |
| PYD1-72+247-1-1 | - 10,9 \pm 4,8 | + 1,8 \pm 2,6 |
| PYD1-72+247-1-2 | - 10,5 \pm 3,8 | - 1,1 \pm 7,8 |
| PYD2-16A1-1 | + 6,4 \pm 9,4 | + 21,4 \pm 5,3 |

Tabelle 13.6: Einfluss von Iridoid-inspirierten Substanzen von Dr. Pierre-Yves Dakas auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 μM der Substanzen behandelt. Die Bilddaten wurden anhand einer DNA- (DAPI) und α -Tubulin-Färbung (α -Tubulin-Antikörper und Alexa488-gekoppelter Nachweisantikörper) halbautomatisch ausgewertet und quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Neuritenlänge pro Zelle aller Einzelbilder im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 14 - 27).

| | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|------------------------|--|---|---|
| BDNF | 37,9 \pm 10,0 | 29,7 \pm 7,3 | + 27,6 |
| PYD1-241-1 | 24,0 \pm 3,9 | 28,1 \pm 4,9 | - 14,7 |
| PYD1-246-1 | 30,9 \pm 7,6 | 28,1 \pm 4,9 | + 10,1 |
| PYD1-267-1 | 32,7 \pm 5,5 | 32,6 \pm 7,4 | + 0,2 |
| PYD1-276A-1 | 24,2 \pm 4,2 | 28,1 \pm 4,9 | - 13,8 |
| PYD1-276B-2 | 30,0 \pm 5,9 | 28,1 \pm 4,9 | + 6,6 |
| PYD1-278-1 | 29,8 \pm 6,1 | 32,0 \pm 6,3 | - 6,7 |
| PYD1-290B-1 | 28,4 \pm 3,9 | 28,1 \pm 4,9 | + 0,9 |
| PYD1-290C-1 | 31,1 \pm 4,0 | 33,8 \pm 7,6 | - 7,9 |
| PYD1-290D-1 | 31,9 \pm 7,7 | 25,2 \pm 3,9 | 26,9 |
| PYD1-290E-1 | 30,3 \pm 6,2 | 25,2 \pm 3,9 | 20,6 |
| PYD1-290F-2 | | | zytotoxisch |
| PYD1-290H-2 | 34,9 \pm 4,6 | 32,0 \pm 6,3 | + 9,2 |
| PYD1-290I-1 | 31,6 \pm 5,3 | 25,2 \pm 3,9 | + 25,5 |
| PYD1-293A-1 | 28,3 \pm 4,8 | 33,8 \pm 7,6 | - 16,2 |
| PYD1-293B-1 | 26,9 \pm 4,2 | 33,8 \pm 7,6 | -20,3 |
| PYD1-293C-1 | 32,9 \pm 6,1 | 33,8 \pm 7,6 | - 2,4 |
| PYD1-293D-1 | 35,1 \pm 7,7 | 33,8 \pm 7,6 | + 4,0 |
| PYD1-293E-1 | 29,0 \pm 4,6 | 28,1 \pm 4,9 | + 3,3 |
| PYD1-293G-1 | 35,3 \pm 10,3 | 32,0 \pm 6,3 | + 10,5 |
| PYD1-295B-3 | 27,5 \pm 4,1 | 32,6 \pm 7,4 | - 15,5 |
| PYD1-296F-1 | 27,1 \pm 7,3 | 32,6 \pm 7,4 | - 16,7 |
| PYD1-72+247-1-1 | 36,3 \pm 9,3 | 27,9 \pm 5,7 | + 30,4 |
| PYD1-72+247-1-2 | 30,7 \pm 4,9 | 32,6 \pm 7,4 | - 5,7 |
| PYD2-16A1-1 | 30,6 \pm 6,0 | 32,6 \pm 7,4 | - 6,1 |
| PYD2-40B-1+2 | 24,6 \pm 3,9 | 25,2 \pm 3,9 | - 2,0 |
| PYD2-4-1-2 | 27,0 \pm 4,6 | 28,1 \pm 4,9 | - 3,9 |
| PYD2-47B-1-2 | 29,2 \pm 5,3 | 33,8 \pm 7,6 | - 13,5 |

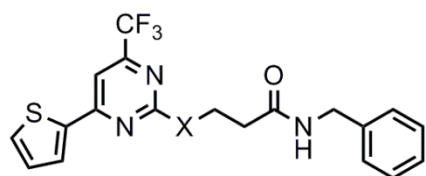
| | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|----------------|--|---|---|
| PYD2-5-1-1 | 28,7 \pm 5,0 | 33,8 \pm 7,6 | - 15,1 |
| PYD2-5-1-2 | 33,9 \pm 9,5 | 33,8 \pm 7,6 | 0,5 |
| PYD2-60B-22-2 | 29,6 \pm 6,0 | 21,4 \pm 3,2 | + 38,1 |
| PYD2-63B2-2 | 26,9 \pm 4,5 | 28,1 \pm 4,9 | - 4,3 |
| PYD2-69A-3-3 | 37,5 \pm 8,8 | 32,0 \pm 6,3 | + 17,2 |
| PYD2-69B-1+2-1 | 34,6 \pm 5,4 | 33,8 \pm 7,6 | + 2,4 |
| PYD2-72B-2-1 | 33,3 \pm 5,3 | 33,8 \pm 7,6 | - 1,3 |
| PYD2-78A-1-2 | 32,3 \pm 6,1 | 33,8 \pm 7,6 | - 4,4 |
| PYD2-78A-2-1 | 27,7 \pm 3,3 | 28,1 \pm 4,9 | - 1,5 |
| PYD2-78A-3-1 | 32,8 \pm 5,3 | 33,8 \pm 7,6 | - 2,8 |
| PYD2-78A-4-2 | 31,3 \pm 3,6 | 33,8 \pm 7,6 | - 7,4 |
| PYD2-78A-5-1 | 31,6 \pm 4,0 | 28,1 \pm 4,9 | + 12,6 |
| PYD2-78B-1-1 | 33,6 \pm 6,5 | 32,0 \pm 6,3 | + 4,9 |
| PYD2-78B-2-1 | 29,7 \pm 4,3 | 28,1 \pm 4,9 | + 5,5 |
| PYD2-78B-3-1 | 35,1 \pm 8,7 | 32,0 \pm 6,3 | + 9,8 |
| PYD2-78B-4-1 | 23,0 \pm 4,9 | 25,2 \pm 3,9 | - 8,7 |
| PYD2-78B-5-1 | 29,0 \pm 3,7 | 28,1 \pm 4,9 | + 3,0 |
| PYD2-79C-1-1 | 34,2 \pm 7,1 | 32,0 \pm 6,3 | + 7,0 |
| PYD2-79C-2-1 | 26,1 \pm 4,9 | 25,2 \pm 3,9 | + 3,6 |
| PYD2-79C-3-1 | 38,4 \pm 5,8 | 33,8 \pm 7,6 | + 13,6 |
| PYD2-79C-4-2 | 31,3 \pm 6,7 | 33,8 \pm 7,6 | - 7,3 |
| PYD2-79C-5-2 | 31,8 \pm 8,6 | 25,2 \pm 3,9 | + 26,4 |
| PYD2-79C-6-2 | 33,4 \pm 8,1 | 33,8 \pm 7,6 | - 1,1 |
| PYD2-79D-1-2 | 26,1 \pm 5,4 | 28,1 \pm 4,9 | - 7,0 |
| PYD2-79D-2-2 | 26,3 \pm 4,0 | 28,1 \pm 4,9 | - 6,3 |
| PYD2-79D-3-1 | 29,6 \pm 5,0 | 28,1 \pm 4,9 | + 5,5 |
| PYD2-79D-4-1 | | | zytotoxisch |
| PYD2-79D-5-2 | 25,9 \pm 6,0 | 25,2 \pm 3,9 | + 3,0 |
| PYD2-79D-6-2 | 27,7 \pm 7,0 | 25,2 \pm 3,9 | + 10,3 |

Tabelle 13.7: Einfluss von Iridoid-inspirierten Substanzen von Dr. Peter Schröder auf das Neuritenwachstum in SH-SY5Y-Zellen

Nach ATRA-induzierter Ausdifferenzierung wurden die Zellen für 96 h mit 10 μM der Substanzen behandelt. Die Bilddaten wurden anhand einer DNA- (DAPI) und α -Tubulin-Färbung (α -Tubulin-Antikörper und Alexa 488-gekoppelter Nachweisantikörper) halbautomatisch ausgewertet und quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Neuritenlänge pro Zelle aller Einzelbilder im Vergleich zur entsprechenden DMSO-Kontrolle (n = 14 – 27).

| | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|---------------|--|---|---|
| BDNF | 37,9 \pm 10,0 | 29,7 \pm 7,3 | + 27,6 |
| PS268S | 22,1 \pm 4,0 | 20,8 \pm 2,8 | + 6,2 |
| PS272S | 27,1 \pm 4,6 | 26,8 \pm 4,6 | + 1,1 |
| PS274S | 28,5 \pm 4,6 | 32,7 \pm 6,9 | - 13,0 |
| PS286S | 25,4 \pm 4,6 | 26,8 \pm 4,6 | - 5,2 |
| PS288S | 24,3 \pm 3,5 | 26,6 \pm 5,5 | - 8,6 |
| PS292S | 21,7 \pm 4,8 | 20,8 \pm 2,8 | + 4,1 |
| PS293S | 26,6 \pm 5,7 | 26,6 \pm 5,5 | - 0,1 |
| PS296S | 21,5 \pm 3,1 | 20,8 \pm 2,8 | + 3,0 |
| PS298S | 33,6 \pm 7,3 | 26,6 \pm 5,5 | + 26,1 |
| PS299S | 33,3 \pm 9,3 | 32,7 \pm 6,9 | + 1,7 |
| PS300S | 28,7 \pm 6,2 | 26,8 \pm 4,6 | + 7,2 |
| PS332S | 20,7 \pm 4,4 | 21,0 \pm 3,4 | - 1,5 |
| PS333S | 31,0 \pm 8,1 | 32,7 \pm 6,9 | - 5,3 |
| PS336S | 27,9 \pm 3,5 | 26,6 \pm 5,5 | + 4,7 |
| PS337S | 20,2 \pm 4,0 | 20,8 \pm 2,8 | - 2,9 |
| PS368S | 28,0 \pm 6,9 | 28,2 \pm 5,0 | - 0,6 |
| PS369S | 26,5 \pm 5,8 | 28,2 \pm 5,0 | - 6,0 |
| PS393S | 26,7 \pm 7,9 | 24,2 \pm 7,2 | + 10,1 |
| PS394S | 26,0 \pm 5,4 | 26,6 \pm 5,5 | - 2,1 |
| PS395S | 23,5 \pm 4,0 | 20,8 \pm 2,8 | + 12,7 |
| PS396S | 32,6 \pm 4,0 | 26,8 \pm 4,6 | + 21,6 |
| PS397S | 33,9 \pm 6,8 | 26,6 \pm 5,5 | + 27,2 |
| PS398S | 36,1 \pm 7,5 | 28,2 \pm 5,0 | + 28,1 |
| PS399S | 30,1 \pm 5,7 | 26,8 \pm 4,6 | + 12,3 |
| PS401S | 29,7 \pm 4,4 | 26,8 \pm 4,6 | + 10,9 |
| PS402S | | | zytotoxisch |

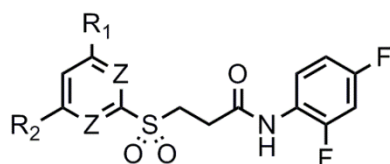
| | Neuritenwachstum Substanz [μM] | Neuritenwachstum Kontrolle [μM] | Zu-/Abnahme des Neuriten- wachstums [%] |
|---------------|--|---|---|
| PS403S | 30,5 \pm 6,3 | 28,2 \pm 5,0 | + 8,3 |
| PS404S | 14,7 \pm 1,6 | 15,4 \pm 2,7 | - 4,6 |
| PS481S | 27,2 \pm 4,0 | 26,8 \pm 4,6 | + 1,5 |
| PS483S | 34,1 \pm 6,5 | 28,2 \pm 5,0 | + 20,9 |
| PS484S | 19,6 \pm 4,1 | 20,8 \pm 2,8 | - 5,8 |
| PS485S | 30,0 \pm 5,7 | 26,6 \pm 5,5 | + 12,7 |
| PS492S | 32,9 \pm 3,4 | 26,8 \pm 4,6 | + 22,7 |
| PS493S | 21,9 \pm 3,2 | 24,2 \pm 7,2 | - 9,5 |
| PS496S | 21,0 \pm 3,6 | 20,8 \pm 2,8 | + 0,8 |
| PS497S | 26,9 \pm 3,8 | 24,2 \pm 7,2 | + 11,0 |
| PS528S | 28,3 \pm 5,8 | 28,2 \pm 5,0 | + 0,3 |
| PS534S | 23,8 \pm 3,6 | 32,7 \pm 6,9 | - 27,5 |
| PS535S | 27,1 \pm 9,9 | 28,7 \pm 4,5 | - 5,3 |
| PS536S | 33,5 \pm 7,4 | 28,7 \pm 4,5 | + 16,9 |
| PS537S | 25,9 \pm 6,1 | 32,7 \pm 6,9 | - 21,0 |
| PS549S | 34,4 \pm 8,2 | 32,7 \pm 6,9 | + 5,0 |
| PS576S | 20,6 \pm 3,4 | 21,0 \pm 3,4 | - 2,0 |
| PS578S | 29,0 \pm 5,7 | 28,7 \pm 4,5 | + 1,1 |
| PS579S | 33,2 \pm 4,0 | 28,7 \pm 4,5 | + 15,7 |
| PS580S | 25,7 \pm 7,7 | 28,7 \pm 4,5 | - 10,4 |
| PS581S | 32,8 \pm 5,4 | 28,7 \pm 4,5 | + 14,3 |
| PS583S | 31,0 \pm 9,3 | 27,9 \pm 5,7 | + 11,2 |
| PS598S | 30,0 \pm 6,3 | 21,0 \pm 3,4 | + 42,8 |
| PS602S | 27,2 \pm 6,6 | 21,0 \pm 3,4 | + 29,6 |
| PS629S | 33,4 \pm 5,6 | 22,9 \pm 5,0 | + 45,7 |
| PS630S | 31,7 \pm 10,1 | 22,9 \pm 5,0 | + 38,3 |



| | X | IC ₅₀ (μM) |
|--------|-----------------|-----------------------|
| MA-006 | S | >50 |
| MA-007 | SO | >50 |
| MA-008 | SO ₂ | 3.5 |

Abbildung 13.1: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Pyrimidinverbindungen

HSET-Inhibition durch Verbindungen mit variiertem Sulfonylgruppe. Die Bestimmung der IC_{50 app}-Werte wurde von Emiko Sanada (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) mittels ADP-Glo™ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei technischen Replikaten (N = 3).



| | R ₁ | R ₂ | Z | IC ₅₀ (μM) |
|--------|-----------------|----------------|----|-----------------------|
| MA-077 | CH ₃ | | N | >50 |
| MA-050 | | | N | >50 |
| MA-053 | H | H | N | >50 |
| MA-052 | H | H | CH | >50 |

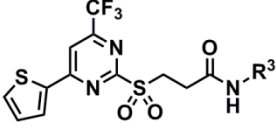
Abbildung 13.2: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine

HSET-Inhibition durch Verbindungen mit variiertem Trifluoromethyl- und Thiophen-Substituenten. Die Bestimmung der IC_{50 app}-Werte wurde von Emiko Sanada (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) mittels ADP-Glo™ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei technischen Replikaten (N = 3).

| | R ² | IC ₅₀ (μM) | | R ² | IC ₅₀ (μM) |
|----------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|-----------------------|
| 236035 | | 19,6 | est-012 | | 4,4 |
| est-003 | | 10,2 | est-017 | | 26,4 |
| est-028 | | 21,5 | est-018 | | >50 |
| est-029 | | 5,9 | est-022 | | 5,1 |
| est-002 | | 11,7 | est-024 | | >50 |
| est-001 | | 10,4 | est-004 | | >50 |
| est-005 | | 9,7 | est-016 | | 12,2 |
| est-010 | | 3,8 | MA-037 | | >50 |
| est-011 | | 8,1 | est-021 | | 3,9 |
| est-023 | | 9,4 | est-025 | | >50 |
| est-009 | | 9,6 | | | |
| est-014 | | 11,0 | | | |
| est-015 | | 8,2 | | | |

Abbildung 13.3: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine

HSET-Inhibition durch Verbindungen mit variiertem Thiophensubstituenten. Die Bestimmung der IC₅₀_{app}-Werte wurde von Emiko Sanada (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) mittels ADP-Glo™ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei technischen Replikaten (N = 3).



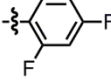
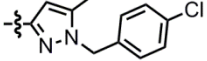
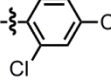
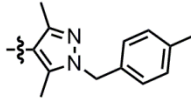
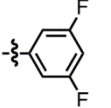
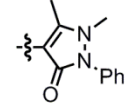
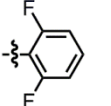
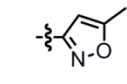
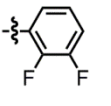
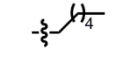
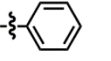
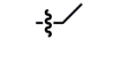
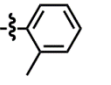
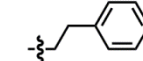
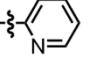
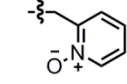
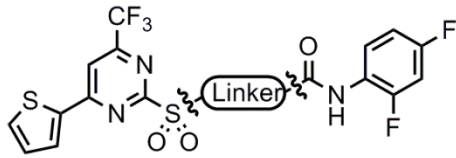
| | R ³ | IC ₅₀ (μM) | R ³ | IC ₅₀ (μM) | |
|---------------|---|-----------------------|----------------|---|------|
| 236035 |  | 19,6 | 236039 |  | 12,7 |
| MA-030 |  | 8,3 | 236040 |  | 12,2 |
| MA-033 |  | 7,0 | 236037 |  | >50 |
| MA-034 |  | 19,1 | MA-017 |  | >30 |
| MA-032 |  | 10,3 | MA-041 |  | 5,5 |
| MA-013 |  | 14,3 | MA-021 |  | 18,0 |
| MA-005 |  | 14,9 | MA-015 |  | 7,9 |
| MA-039 |  | 11,0 | MA-028 |  | >30 |

Abbildung 13.4: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine

HSET-Inhibition durch Verbindungen mit variiertes Amidgruppe. Die Bestimmung der IC_{50 app}-Werte wurde von Emiko Sanada (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) mittels ADP-Glo™ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei technischen Replikaten (N = 3).



| | Linker | IC ₅₀ (μ M) |
|--------|--------|-----------------------------|
| 236035 | | 19,6 |
| MA-035 | | >30 |
| MA-023 | | 5,9 |
| MA-024 | | 17,2 |
| MA-065 | | 10,4 |
| MA-067 | | 13,8 |

Abbildung 13.5: Struktur-Aktivitäts-Beziehung ausgewählter Sulfonylpyrimidine

HSET-Inhibition durch Verbindungen mit variiert Länge des Kohlenstofflinkers. Die Bestimmung der IC_{50 app}-Werte wurde von Emiko Sanada (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) mittels ADP-Glo™ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei technischen Replikaten (N = 3).

14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Waldmann für die Möglichkeit, in der Abteilung Chemische Biologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie meine Dissertation anzufertigen. Darüber hinaus danke ich ihm für die Bereitstellung der interessanten Forschungsthemen, die fortwährende Unterstützung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen in der Abteilung.

Bei Herrn PD Dr. Leif Dehmelt möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Frau Dr. Slava Ziegler danke ich ganz herzlich für ihre hervorragende Betreuung während der Promotion und für ihre immerwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen. Darüber hinaus danke ich ihr für die intensive Durchsicht der Arbeit.

Dr. Peter Schröder, Dr. Andrey Antonchick, Dr. Sara López-Tosco und Dr. Pierre-Yves Dakas danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Synthese der Substanzbibliotheken für die neuromodulatorischen Experimente.

Bei Prof. Dr. Daniel Rauh, Dr. André Richters, Dr. Christian Becker und M.Sc. Stefan Kleine bedanke ich mich für die Kooperation hinsichtlich der Expression und Aufreinigung von MAP4K4 und für die Anfertigung der Co-Kristallstruktur.

Dr. Nobumoto Watanabe (RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Wako, Japan) danke ich herzlich für die ergiebige Kooperation und die zahlreichen Diskussionen im Laufe des Projektes. Des Weiteren danke ich Emiko Sanada für die Validierung der Screening-Resultate und Kenshirou Shimizu für die Synthese der Substanzbibliothek.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Mayer bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit eines Forschungsaufenthalts in seiner Arbeitsgruppe Molekulare Genetik an der Universität Konstanz und seine Unterstützung für den Fortgang des Projektes. Dr. Martin Möckel danke ich für seine kompetente und freundliche Betreuung bei der Laborarbeit während des Aufenthalts in Konstanz.

Bei Dr. Erchang Shang, M.Sc. Mylene Hübecker und Beate Schölermann bedanke ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung. Dr. Erchang Shang danke ich darüber hinaus für die Synthese der Substanzbibliothek.

Meiner Bachelor-Studentin Johanna Ebbeskotte danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die Etablierung des Testsystems zur Identifizierung neuroprotektiver Substanzen.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Chemische Biologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die vielen Aktivitäten neben dem Laboralltag. Hier möchte ich insbesondere der „MPI Xmas Band“ für die schöne Atmosphäre in der Band und die gemeinsamen Auftritte auf den Weihnachtsfeiern danken.

Ich danke meinen Eltern Birgit und Friedhelm Förster von Herzen für ihre immerwährende Unterstützung. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen, zu studieren und diese Dissertation anzufertigen.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Mirja, die diesen Lebensabschnitt zu etwas Besonderem gemacht hat. Du warst in jeder Situation für mich da und hast mich immer wieder motiviert und aufgebaut. Danke für alles!

15 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Förster, Tim

Name, Vorname
(Surname, first name)

154957

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

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

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

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

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

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

The submission of a false affidavit is punishable.

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

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Identifizierung und Charakterisierung neurotropher Naturstoffderivate und

kovalenter Kinesininhibitoren

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)