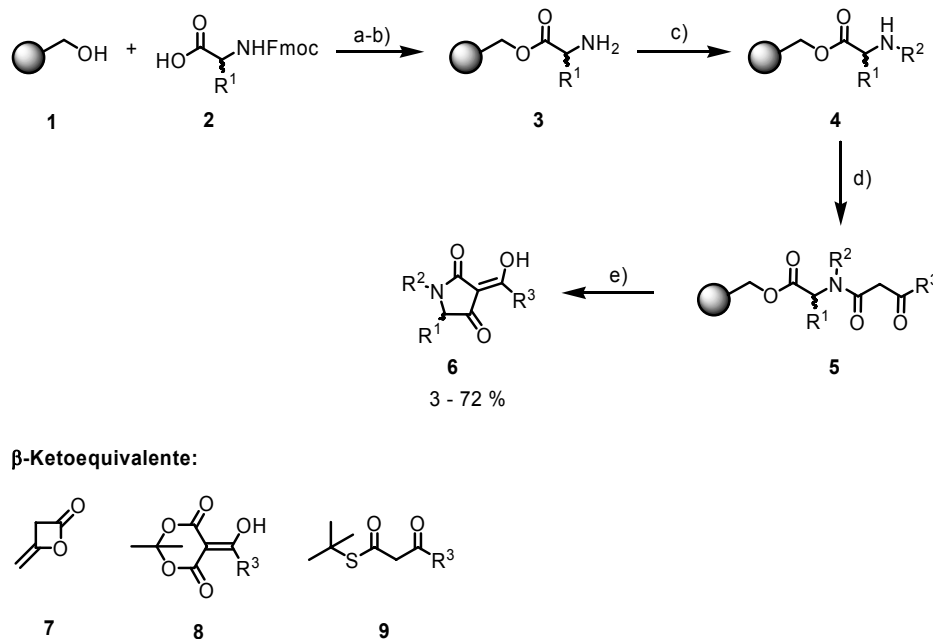


# 1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein chemisch-genetischer Ansatz entwickelt, um basierend auf dem Naturstoff Meloplin A<sup>[1]</sup> neue Effektoren des Ras-Signalwegs zu identifizieren und ihren Wirkmechanismus zu untersuchen.

Zunächst wurde durch eine Variation der von Romoff et al.<sup>[2]</sup> beschriebenen Festphasensynthese eine Bibliothek von 65 Meloplin A-Derivaten synthetisiert (Abbildung 1).



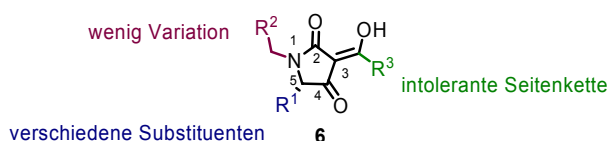
**Abbildung 1:** Zusammenfassung der am Harz synthetisierten Tetramsäuren. a) Aminosäure, DIC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/DMF, 0 °C, 1 h, dann Wang-Harz, DMF, DMAP, 6 h; b) 20 % Piperidin in DMF, 2\*20 min; c) Aminosäure-funktionalisiertes Harz, Aldehyd, NaOAc, NaB(OAc)<sub>3</sub>H, 16 h, THF, RT; d) Diketen, Triethylamin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 12 h oder 5-Acyl-Meldrumsäure, Toluol, 80 °C, 2 h oder Ag(OCOCF<sub>3</sub>), THF, RT 12 h; e) 0.1 M KOH in Methanol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Dioxan, 2 h, RT.

Auf der Suche nach neuen Modulatoren des Ras-Signalwegs wurde die Tetramsäure-Kollektion in einem Ras-spezifischen Phänotyp-Assay in der durch ein virales H-Ras-Onkogen transfizierten Zelllinie MDCK-F3 getestet. Inkubation dieser Zelllinie mit Meloplin A (30 μM) führte zu einer Reversion des Phänotyps.

Abgesehen von Meloplin A bewirkten zwei weitere strukturell verwandte Verbindungen eine Reversion des Phänotyps der MDCK-F3-Zellen.

Zusätzlich wurden die synthetisierten Tetramsäuren in einem Ras-spezifischen HLR-Elk 1-*Trans*-Reporter-gen-Assay getestet. 10 Verbindungen führten zu einer Inhibition der Luziferase-Expression um mehr als 30 %, ohne dabei zytotoxisch zu wirken.

Basierend auf den Ergebnissen der biologischen Assays ließ sich eine Struktur-Wirkungs-Analyse durchführen (Abbildung 2). Für die Aktivität erwies sich die lange Lipidkette des 3-Acylsubstituenten als unverzichtbar. Auch am Ring-Stickstoff konnten kaum größere Substituenten als eine Methylgruppe wie im Naturstoff eingeführt werden. Die größten Veränderungen, ohne Verlust der Aktivität in beiden Assays, konnten an Position fünf des Rings durchgeführt werden.



**Abbildung 2:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Struktur-Wirkungs-Analyse.

Zur Untersuchung des Wirkmechanismus von Melophlin A auf den Ras-Signalweg, sollten die Bindungspartner der Tetramsäure über einen affinitätschromatographischen Ansatz identifiziert werden. Als Trägermaterial wurden Streptavidin-beladene magnetische Partikel verwendet, die eine Immobilisierung der Inhibitoren über die Bindung von Biotin zu Streptavidin ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden ein aktives sowie ein inaktives biotinyliertes Melophlin A-Derivat dargestellt.

Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner wurden verschiedene Bedingungen zur Affinitätsaufreinigung getestet. Letztlich wurden das am Träger immobilisierte aktive Melophlin A-Analogon sowie die inaktive Verbindung mit HeLa-Zelllysat inkubiert. Nach Waschschritten zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine wurden die stärker bindenden Proteine durch Erhitzen von den Partikeln gelöst, auf einem SDS-Gel vorgetrennt und tryptisch verdaut. Anschließend wurden die Peptidbruchstücke mit der RP-Nano-LC-MS/MS analysiert. Aus den erhaltenen Spektren der tryptischen Peptide konnten über eine MASCOT-Suche die Ursursprogsproteine identifiziert werden.

Unter diesen Bedingungen wurden sechs Proteine als potentielle Interaktionspartner von Melophlin A identifiziert. Darunter befanden sich vier Proteine mit beschriebener Relevanz zum Ras-Signalweg, namentlich zwei Vertreter der Familie der Dynamine; Dynamin II und DNM1L sowie p120 Catenin und IQGAP3.

Die Identitäten der massenspektrometrisch identifizierten Proteine Dynamin II und p120 Catenin konnten per Western-Blot-Experiment mit spezifischen Antikörpern bestätigt werden. Gleichzeitig zeigten die Versuche, dass diese Proteine nicht detektierbar an das inaktive Kontrollmolekül binden.

Im Weiteren haben wir uns darauf konzentriert den Einfluss von Meloplin A auf die Funktion der Proteine der Dynaminfamilie näher zu untersuchen. Diese spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Zellprozessen, vor allem sind sie in endozytotische Vorgänge involviert. Funktionsfähige Endozytose hingegen ist Voraussetzung für eine Wachstumsfaktoren-abhängige volle Aktivierung von ERK, einer Kinase des Ras-Signalwegs.<sup>[3]</sup> Dominant-negative Mutanten von Dynaminen inhibieren sowohl Endozytose als auch EGF- oder Insulin-stimulierte ERK1/2-Aktivierung.<sup>[4]</sup>

Zunächst wurde die physikalische Bindung von Meloplin A an Dynamine mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz untersucht. Es konnte eine Bindung von Meloplin A an alle drei Mitglieder der Proteinfamilie gezeigt werden.

In einer Kooperation mit M Sc Amrita Rai der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manstein wurde zudem der Einfluss von Meloplin A auf Dynamin-abhängige Endozytose durch den Einsatz von Alexa-546-markiertem Transferrin untersucht. Die Experimente zeigten, dass Meloplin A bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  die Aufnahme von Transferrin in HeLa-Zellen um 70 % reduziert. Der hemmende Effekt von Meloplin A nimmt mit höheren Konzentrationen ab, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass Meloplin A in höheren Konzentrationen in wässrigen Medien Aggregate bildet.

Zusätzlich zeigten von Dipl.-Biol. Karin Warburg durchgeführte Experimente, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 in HeLa-Zellen nach Behandlung mit Meloplin A (10  $\mu\text{M}$ ) um 70 % zurückgeht. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die von Kobayashi et al.<sup>[1]</sup> beschriebene Reversion des Phänotyps Ras-transformierter Zellen durch Behandlung mit Meloplin A höchstwahrscheinlich auf eine Bindung von Meloplin A an Dynamine und damit einhergehend auf eine Hemmung von Endozytose und ERK1/2-Phosphorylierung zurückzuführen ist.

[1] S. Aoki, K. Higuchi, Y. Ye, et al., *Tetrahedron* **2000**, 56, 1833-1836.

[2] T. T. Romoff, L. Ma, Y. W. Wang, D. A. Campbell, *Synlett* **1998**, 1341-1342.

[3] S. Roy, B. Wyse, J. F. Hancock, *Molecular and Cellular Biology* **2002**, 22, 5128-5140.

[4] A. V. Vieira, C. Lamaze, S. L. Schmid, *Science* **1996**, 274, 2086-2089.

