

# **Untersuchungen zur Rolle von Acyl Protein Thioesterase (APT1) bei der Acylierung von Ras-Isoformen**

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

## **Dissertation**

von  
Diplom-Biologe  
**Dirk Pendzialek**  
aus Bottrop

**Dekan: Prof. Dr. Norbert Krause**

**1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody**

**Tag der mündlichen Prüfung: 12. Oktober 2007**

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann am Fachbereich Chemie der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, in der Zeit von Mai 2003 bis August 2007 angefertigt.

*Der Weg des Geistes ist der Umweg.*  
Georg Wilhelm Friedrich Hegel

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Ras und Krebs – Wenn ein Multitalent Amok läuft	5
1.2. Ras und Acylierung – Ein Protein im Kreisverkehr	11
1.3. Chemische Biologie – Mehr als nur ein Zweckbündnis für das Verständnis von Krebs	14
1.4. Acyl Protein Thioesterase 1 (APT1) – Ein Schlüsselprotein bei der Deacylierung von Ras-Isoformen	18
1.5. Zielsetzung und Motivation der Arbeit	21
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1. Zellkultur	22
2.1.1. MDCK/MDCK-f3 Zellen	22
2.1.2. PC12 Zellen	22
2.1.3. HLR Zellen	22
2.1.4. HeLa Zellen	23
2.1.5. Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen	23
2.1.6. Zelllyse	24
2.1.6.1. Einfache Zelllyse	24
2.1.6.2. Fraktionierte Zelllyse zur Trennung des Cytoplasmas vom Nukleus	25
2.1.6.3. Fraktionierte Zelllyse zur Trennung von Cytoplasma, Membranen und Nukleus vom Cytoskelett	27
2.2. Histochemische Färbungen und Mikroskopische Auswertung	28
2.2.1. Färbung mit Coelestin Blau	28
2.2.2. Fluoreszenzfärbungen	29

2.2.3. Mikroskopie	30
2.3. Reporteragenassay	30
2.4. Rücktransformationsassay	32
2.5. Proliferationsassay mit WST-1	33
2.6. Apoptosenachweis mit Apo-ONE®	34
2.7. APT1 Inhibitions- und Aktivitätsassays	35
2.7.1. Acylierungs Assay	35
2.7.2. ADIFAB Assay	37
2.7.3. GerMant Assay	39
2.8. Proteinbiochemische Methoden	41
2.8.1. Affinitätsaufreinigung mit biotinylierten Raspalinderivaten	41
2.8.2. SDS-PAGE ( <u>S</u> odium- <u>d</u> odecyl- <u>s</u> ulfate <u>P</u> olyacrylamide <u>G</u> ele <u>e</u> lectrophoresis)	43
2.8.3. Tryptischer Verdau	46
2.8.4. Western Blot	48
2.8.5. MALDI –TOF ( <u>M</u> atrix <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esoprtion <u>i</u> onisation – <u>T</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light) Massenspektrometrie	51
2.8.6. HPLC-ESI MS/MS ( <u>H</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatographie – <u>E</u> lectrospray <u>i</u> onisation) Massenspektrometrie	53
2.9. Geräte und Verbrauchsmaterial	56
2.9.1. Allgemeine Laborgeräte	56
2.9.2. Gelelektrophorese und Western Blotting	57
2.9.3. Massenspektroskopie	57
2.9.4. Mikroskopie & Zellkultur	57
2.9.5. Reagenzien	58
2.9.6. Antikörper	60

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1. Stereoselektivität von APT1	61
3.2. Einfluss von APT1 auf die nicht-enzymatische Acylierung	62
3.3. Palmitoylierungsaktivität von APT1	63
3.4. Einfluss von Raspalin 4 auf den Ras-Signalweg	65
3.5. Untersuchung der Phosphorylierungszustände der MAPK- Module	68
3.6. Effekt von Raspalin 4 auf den Phänotyp von MDCK-f3 Zellen	70
3.7. Evaluierung von Affinitätssonden zur Identifizierung der zellulären Ziele von Raspalin 4	74
3.7.1. Wirkung der Affinitätssonden auf Zellen	75
3.7.2. Spezifität der Affinitätssonden für APT1	78
3.7.3. Überprüfung der Effektivität und Spezifität der Affinitätssonden in PC12 Zelllysaten	79
3.8. Bestimmung der zellulären Ziele von Raspalin 4	87
<b>4. Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1. Bedeutung von APT1 für die Palmitoylierung	90
4.2. Effekt von Raspalin 4 auf Zellen	93
4.3. Evaluierung der Affinitätssonden	94
4.4. Identifizierung der Zielproteine	97
4.4.1. Durch den in-Gel Verdau identifizierte Proteine	97
4.4.2. Durch den Direktverdau (´on-bead´ Verdau) identifizierte Proteine	101
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>6. Ausblick</b>	<b>110</b>

<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>124</b>
9.1. Abkürzungsverzeichnis	124
9.2. Kontaminationsmassen	126
<b>9. Danksagung</b>	<b>127</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>128</b>

## 1.1. Ras und Krebs – Wenn ein Multitalent Amok läuft

Krebs ist mit 10.9 Millionen Neuerkrankungen jährlich (Parkin *et al.*, 2005) nach wie vor die zweithäufigste Todesursache weltweit, nach Herz-Kreislaufkrankungen. Ausgelöst wird Krebs durch Mutationen in Genen, welche für die Homöostase der Zelle verantwortlich sind. In einer gesunden Zelle ist der Zyklus zwischen Wachstum, Teilung, Differenzierung und Stasis streng reguliert. Dies gewährleistet, dass Zellen ihre Aufgaben in den jeweiligen Organen erfüllen können. Wächst eine Zelle jedoch unkontrolliert, spricht man von Krebs. Gene, welche durch Mutation zu Krebs führen, bezeichnet man auch als Proto-Onkogene. Ist eine Mutation erfolgt, spricht man entsprechend von Onkogenen. Neben spontanen Mutationen können äußere Einflüsse (UV-Strahlung, Virusinfektionen, Alkohol, Tabakrauch, mutagene Substanzen in Luft und Wasser, etc.) Mutationen induzieren. Hinzu kommt in vielen Fällen eine erblich bedingte Prädisposition für bestimmte Krebsarten (Featherstone *et al.*, 2007, Marsh und Zori, 2002).

Eines der am besten untersuchten Onkogene ist das *ras*-Onkogen. Bei etwa 30% aller Krebsarten liegt eine Mutation des *ras*-Gens vor. In Einzelfällen liegt die Mutationshäufigkeit sogar bei 90%, wie etwa bei Adenokarzinomen der Bauchspeicheldrüse (Bos, 1989).

Ras gehört zur Superfamilie der regulatorischen GTPasen, welche sich in weitere Unterfamilien gliedert. Da alle Mitglieder der Ras-Familie ein Molekulargewicht von ca. 20 bis 35 kDa haben, bezeichnet man diese auch als Familie der kleinen GTPasen. Diese wird auch als Ras-Superfamilie bezeichnet. Diese Familie läßt sich anhand der Funktion in weitere Unterfamilien gliedern. In Tabelle 1.1 sind die Mitglieder der Unterfamilien aufgeführt.

**Tabelle 1.1:** Die Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen und deren Funktion

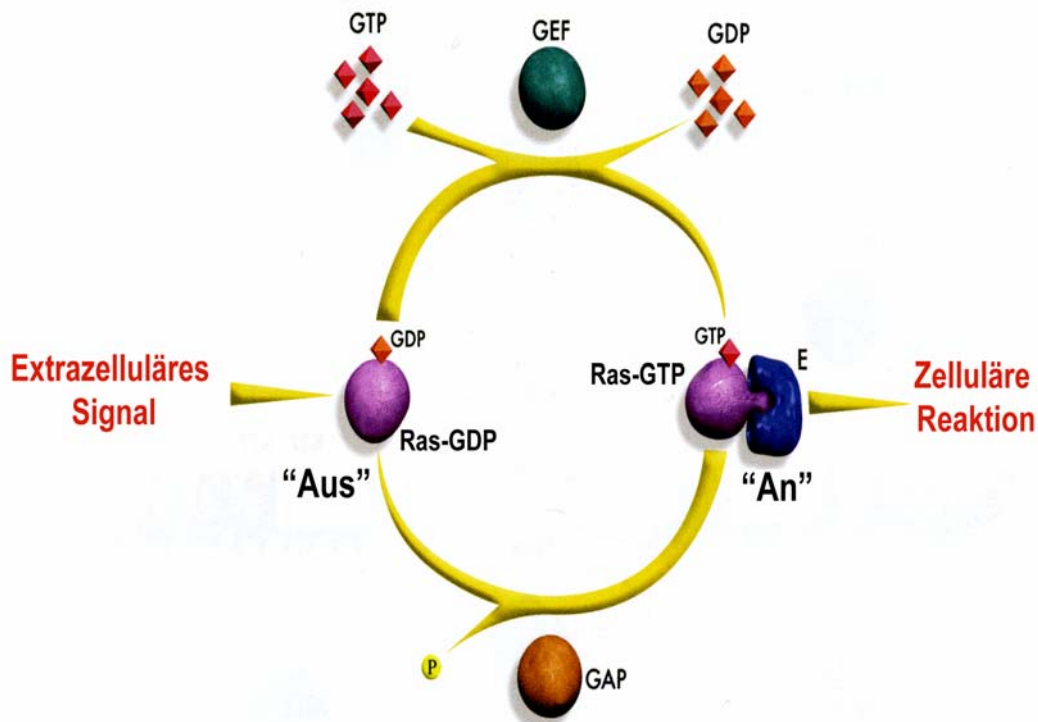
Unterfamilie	Funktion
Ras, Rap, Ral	Proliferation, Differenzierung
Rac, Rho, Cdc42	Reorganisation des Cytoskeletts
Arf	Vesikeltransport vom ER zum cis-Golgi
Ypt, Rab	Endo- und Exocytose, Vesikelfusion
Ran, TC4	Kernimport und -export



Da sich diese Arbeit in erster Linie mit Ras assoziierten Signalwegen befaßt, soll auf Ras an dieser Stelle genauer eingegangen werden. Ras-Proteine wurden erstmals in retroviral ausgelösten Sarkom bei Ratten nachgewiesen, woher sie ihren Namen erhielten (*rat sarcoma*). Es gibt mehrere Ras-Isoformen. Die bekanntesten und am besten untersuchten sind H(*arvey*)-Ras, N(*euromblastoma*)-Ras und K(*irsten*)-Ras4A & 4B. Darüber hinaus gibt es noch einige homologe Proteine, wie M-Ras, R-Ras, Rap, Ral und TC21, die aber nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollen.

Der Unterschied der Isoformen besteht in erster Linie in der C-terminalen Aminosäuresequenz und der Art der Lipidierung des C-Terminus. Auf die Einzelheiten dieser Modifikation und deren Bedeutung wird in Kapitel 1.2. näher eingegangen.

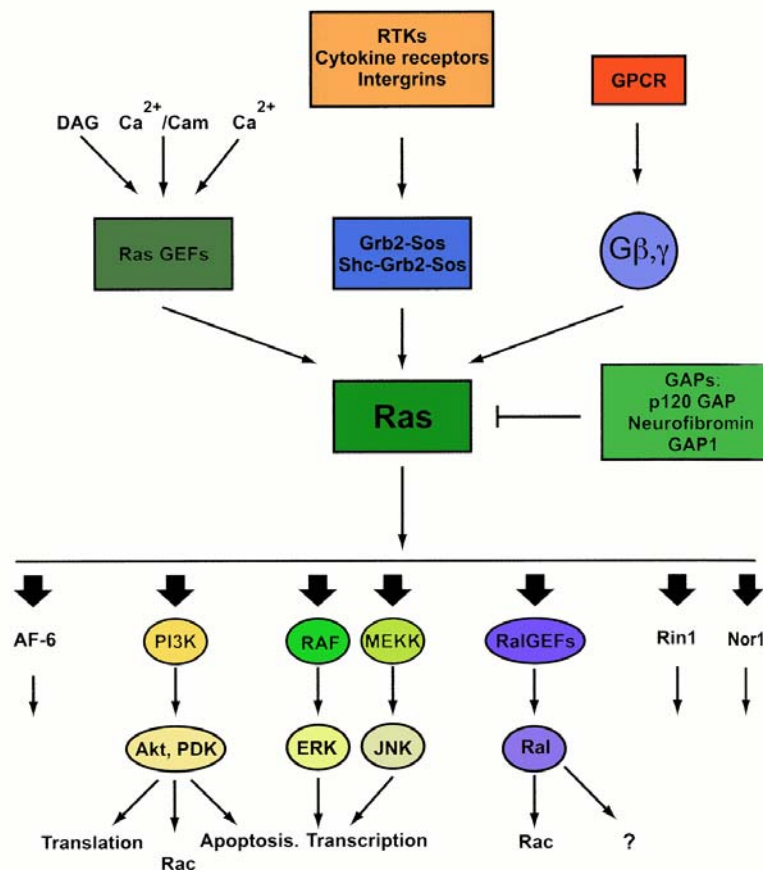
Von Natur aus ist Ras eine äußerst ineffiziente GTPase, zum einen ist die Hydrolyse mit  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  sehr langsam, zum anderen ist die GDP-Bindung sehr stabil und dissoziiert entsprechend schlecht. Der kontinuierliche Austausch von GDP gegen GTP erfolgt daher so langsam, dass dies für die schnelle Weiterleitung von Signalen nicht ausreicht. Tatsächlich kann man fast von einem 'toten' Enzym sprechen. Wie aber kann ein totes Enzym eine solch wichtige Funktion ausüben? Der Schlüssel liegt in dem Einfluss Ras-spezifischer GTPase aktivierender Proteine (GAPs), welche die Hydrolyse um das 100000-fache beschleunigen können. Die Dissoziation wiederum wird durch Proteine, welche die Dissoziation von GDP unterstützen (GEFs = G-nukleotide exchange factors) beschleunigt. Während die GAPs durch die Beschleunigung der Hydrolyse die Lebenszeit des aktiven Zustandes drastisch verkürzen und somit als negative Regulatoren fungieren, führen GEFs zu einer Aktivierung und somit zur Signalweiterleitung, da der Austausch von GDP gegen GTP induziert wird (Abb. 1.1, S. 6).



Upstate 2005

**Abbildung 1.1:** Regulation der Ras-Aktivität durch GEFs und GAPs. Durch ein extrazelluläres Signal wird der Austausch von GDP gegen GTP durch GEF vermittelt und Ras somit aktiviert. Durch negative Rückkopplung oder weitere extrazelluläre Signale wird mit Hilfe des GAPs die Hydrolyse beschleunigt und Ras wieder deaktiviert.

Das zu Beginn eher einfache Bild der linearen Signalweiterleitung durch Ras muß nach neueren Erkenntnissen revidiert werden. Ras ist viel mehr als Schaltstation zu verstehen, welche vielfältige Signale zu unterschiedlichen Effektorproteinen weiterleitet (Shields et al., 2000, Matozaki et al. 2000). Daher ist es umso verständlicher, dass eine Störung dieser Weiterleitung schwerwiegende Folgen für die Zelle bzw. den ganzen Organismus hat. Abbildung 1.2 gibt einen groben Überblick über die Ras-assoziierten Signalwege.

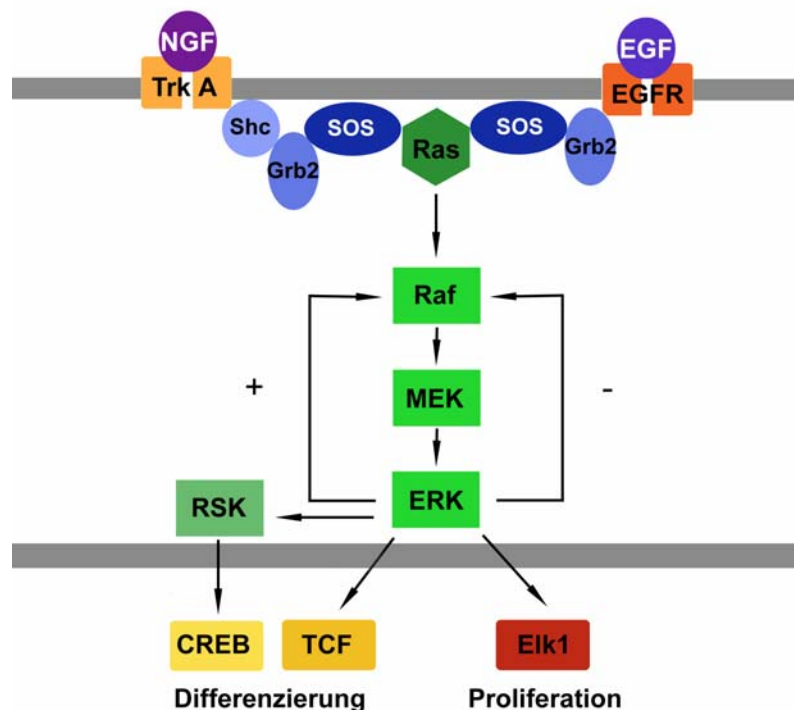


**Abbildung 1.2 (modifiziert nach G. Krauss 'Biochemistry of Signal Transduction and Regulation', 3. Auflage, 2003):** Zusammenfassung der Ras-assoziierten Signalwege. Einkommende Signale werden hauptsächlich über Ras-GEFs, den Shc-Grb2-mSOS Komplex, sowie über den  $\beta\gamma$ -Komplex der heterotrimeren G-Proteine vermittelt. Die negative Regulation erfolgt über verschiedene GAPs. Aktiviertes Ras beeinflusst die Transkription über die MAPK-Kaskade. Ein weiterer Weg, über den Ras sowohl Proliferation als auch Apoptose bzw. die Unterbindung derselben, steuert ist der PI3/Akt Kinase Signalweg. Verbindung zu Rac besteht über direkten Einfluß auf Ral-GEFs und über den Akt Kinase Signalweg. Die über AF-6, Rin1 und Nor1 aktivierten Signalwege sind noch relativ unerforscht.

Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung für die Entstehung von Krebs und damit auch der hier vorgestellten Versuche, soll die 'Ras-MAPK'-Signalkaskade und insbesondere deren Bedeutung bei der Teilung und Differenzierung von PC12 Zellen (Santos *et al.*, 2007) eingehender besprochen werden.

Ob sich PC12 Zellen teilen oder differenzieren, wird durch exogene Signale bestimmt (Abb. 1.3). Stimulierung mit 'epidermal growth factor' (EGF) und entsprechender Aktivierung des EGF-Rezeptors führt zur Proliferation. Wird die Zelle durch 'nerve growth factor' (NGF) stimuliert und Rezeptortyrosinkinase TrkA aktiviert, führt dies zur Differenzierung bzw. zum

Neuritenwachstum. In beiden Fällen wird über einen Signalkomplex Ras-GDP rekrutiert und aktiviert (Ras-GTP). Ras-GTP wiederum aktiviert Raf, welches MEK phosphoryliert. MEK phosphoryliert seinerseits ERK. ERK dimerisiert daraufhin und wandert in den Nukleus, wo es den Transkriptionsfaktor Elk im Falle der Stimulation durch EGF phosphoryliert und somit aktiviert. Bei der Stimulation mit NGF wird der Transkriptionsfaktor TCF ebenfalls direkt über ERK aktiviert oder es kommt zu einer Aktivierung von CREB. Hierbei aktiviert ERK jedoch zunächst RSK, welches dann in den Nukleus wandert, um CREB zu aktivieren. Beide Transkriptionsfaktoren sind für das Neuritenwachstum unerlässlich (Sun *et al.*, 2006).



**Abbildung 1.3:** Integration der Signale in PC12 Zellen bei Stimulation mit NGF oder EGF. Nach der Bindung von NGF an TrkA wird das Signal über den Shc-Grb2-SOS-Komplex an Ras weitergegeben woraufhin die Ras-MAPK Kaskade aktiviert wird und über CREB und TCF die Differenzierung eingeleitet wird. Die Bindung von EGF an den EGF Rezeptor rekrutiert über den Grb2-SOS Komplex Ras, welches wieder die Ras-MAPK Kaskade aktiviert. In diesem Fall wird die Proliferation über den Transkriptionsfaktor Elk1 aktiviert.

Ein deutlicher Unterschied zwischen Stimulierung mit EGF und NGF liegt in der Integration der Signale. Während EGF zu einer transienten Aktivierung führt, bei der der Höhepunkt bereits nach wenigen Minuten erreicht ist, führt NGF Stimulierung zu einer anhaltenden Aktivierung des Signalweges

(Santos *et al.*, 2007, Kholodenko, 2007). Erreicht wird dies durch eine positive Rückkopplungsschleife bei Stimulierung mit NGF und einer entsprechend negativen Rückkopplungsschleife bei Stimulierung mit EGF (Abb. 1.3).

Der EGF und NGF Signalweg sind deutlich komplexer und verzweigter, als dies hier vorgestellt wurde, die ausführliche Beschreibung überschreitet jedoch bei weitem den Rahmen dieser Einleitung.

Zusammenfassend sei gesagt, dass die hier vorgestellte 'Ras-MAPK'-Signalkaskade eines der zentralen Module für die korrekte Funktion der Zelle darstellt und dass Ras eine entscheidende Rolle in der Regulation dieses Signalweges einnimmt. Dies verdeutlicht, warum Mutationen in Ras-Genen so dramatische Folgen für das Schicksal einzelner Zellen und letztlich auch den ganzen Organismus haben. Aus diesem Grund ist der EGF induzierte Signalweg auch für die Krebstherapie von großem Interesse (Shawver *et al.*, 2002, Kolch, 2003). In Abschnitt 1.4. soll auf diesen Aspekt noch genauer eingegangen werden.

## 1.2. Ras und Acylierung – Ein Protein im Kreisverkehr

Für die korrekte Funktion von Ras ist die Lipidierung des C-Terminus entscheidend. Sie beeinflusst entscheidend die spätere Funktion und Lokalisation (Resh, 1999, Zhang *et al.*, 1996).

Der erste Schritt der Lipidierung von Ras-Proteinen ist meist die Prenylierung. Die Prenylierung erfolgt an der sogenannten CAAX-Box. C steht hierbei für Cystein, A steht für eine beliebige aliphatische Aminosäure und X kann eine beliebige Aminosäure sein.

Während die Farnesylierung erfolgt, wenn X eine beliebige Aminosäure außer Leucin ist, erfolgt die Geranylgeranylierung nur, wenn X Leucin ist (Reid *et al.*, 2004). Als Substrat dient Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat, welches jeweils entsprechend durch eine Farnesyltransferase (FTase) und eine Geranylgeranyltransferase (GGTase) über die Ausbildung eines Thioethers an das Cystein gebunden wird.

Nach der Prenylierung wird das –AAX Motiv durch Endoproteasen abgespalten (Gutierrez et al., 1989, Schmidt et al., 1998) und das verbleibende Cystein wird carboxymethyliert. Sowohl die CAAX-Endoproteasen, als auch die Carboxymethyltransferasen sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Schmidt et al., 1998, Dai et al., 1994).

Die Prenylierung bewirkt jedoch noch keine stabile Membranassoziation, welche für die Funktion und korrekte Lokalisation von Ras unerlässlich ist. Eine stabile Membranassoziation wird bei Ras in erster Linie durch einfache (N-Ras) oder auch doppelte Palmitoylierung (H-Ras, K-Ras4A) erreicht. Bei K-Ras 4B wird die stabile Membranassoziation durch eine polybasische Sequenz erzielt. Im Gegensatz zur Farnesylierung gibt es für die Palmitoylierung kein Konsensusmotiv. Bei der S-Palmitoylierung wird Palmitat durch eine Thioesterbindung mit einem Cystein verknüpft. Als Substrat dient Palmitoyl-CoA. Die Palmitoylierung erfolgt meist in der Nähe von Transmembrandomänen oder bei nicht integralen Proteinen wie Ras, in der Nachbarschaft membranassoziiierter Bereiche (Dunphy und Linder 1998, Resh 1999, Bijlmarkers und Marsh 2003).

Obwohl die Bedeutung der Palmitoylierung lange bekannt ist, war die Identifizierung und Aufreinigung von möglichen Palmitoyltransferasen lange problematisch. So konnten Das *et al.*, (1997) aus Erythrocyten ein Protein isolieren, welches Spectrin, ein corticales Cytoskelettprotein, palmitoyliert. Eine Charakterisierung dieses Proteins blieb jedoch aus.

Ein weiteres Protein, welches als mögliche Palmitoyltransferase für Säugetier-Ras entdeckt wurde, entpuppte sich später als Thiolase A. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, welches in Peroxisomen lokalisiert ist und den abschließenden Schritt der  $\beta$ -Oxidation katalysiert (Liu *et al.*, 1996). In Hefe konnten erstmals die Gene und später auch der entsprechende Enzymkomplex identifiziert werden, welche das Hefe-Homolog zu Ras, Ras2p, palmitoylieren (Bartels *et al.*, 1999, Zhao *et al.*, 2002). Mutationen der Gene ERF2 und ERF4 reduzieren den Anteil an palmitoyliertem Ras2p und der aufgereinigte Erf2p-Erf4p Komplex palmitoyliert nachweislich Ras2p *in vitro*. Hierbei handelt es sich um Proteine mit cysteinreichen Domänen, innerhalb welcher sich eine für diese Proteine typische Asp-His-His-Cys (DHHC)-Sequenz befindet. Erst kürzlich wurde auch das humane Homolog

entdeckt (Swarthout *et al.*, 2005). Das humane Homolog DHHC9 bildet hierbei einen Komplex mit dem Golgi-lokalisierten Protein GCP16.

Neben der enzymatischen wird auch die nicht-enzymatische Palmitoylierung diskutiert. *In vitro* konnte dies für SNAP-25 (Veit, 2000), G<sub>α</sub>-Untereinheiten (Duncan und Gilman, 1996) und auch für Ras (s. Ergebnisse 3.2.) gezeigt werden. Im Falle der G<sub>α</sub>-Untereinheiten konnte zudem gezeigt werden, dass die notwendigen Bedingungen für die Autokatalyse durchaus eine physiologische Relevanz vermuten lassen. Bei physiologischem pH findet die Acylierung nur an Cys3 statt und ist abhängig von der N-terminalen Myristoylierung.

Inwieweit die Geschwindigkeit der Reaktion für eine schnelle Signalantwort, insbesondere bei Ras, ausreichend ist, bleibt jedoch fraglich.

Nachdem die Grundlagen der Lipidmodifikation von Ras erläutert wurden, soll auf die Bedeutung, insbesondere der Palmitoylierung, für die Funktion von Ras näher eingegangen werden.

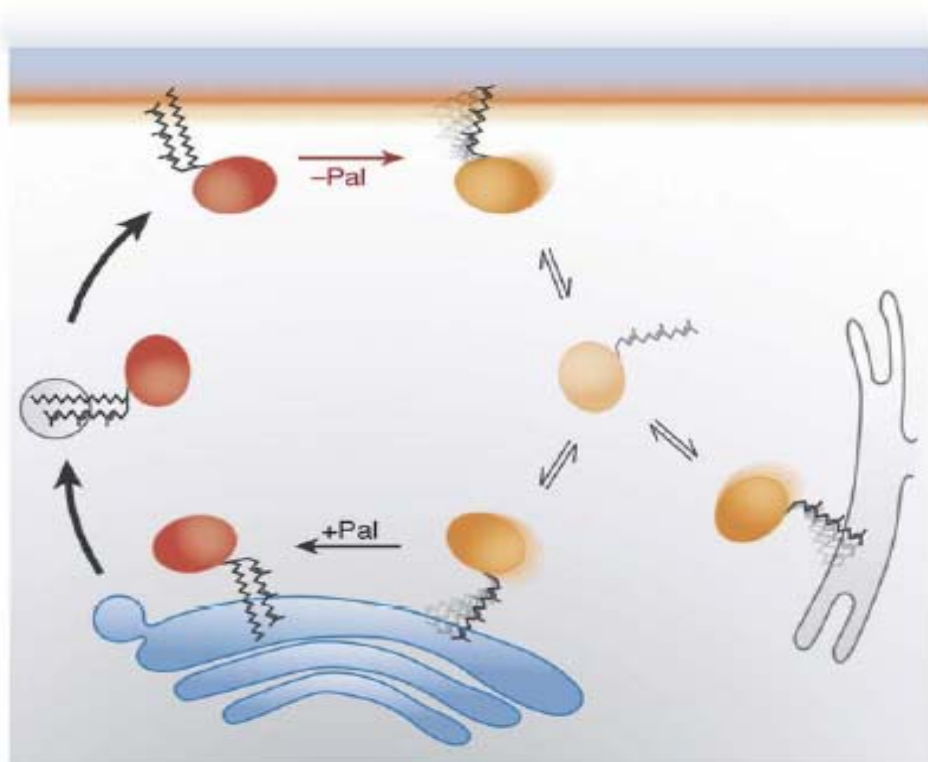
Nach erfolgter Farnesylierung verlässt Ras das endoplasmatische Reticulum und wandert mittels vesikulärem Transport zum Golgi Apparat (Choy *et al.*, 1999). Dort findet die Palmitoylierung statt, welche für den Weitertransport und die Insertion in die Plasmamembran notwendig ist (Magee und Marshall, 1999). Eine Ausnahme bildet hier lediglich K-Ras4B, welches diesen exocytotischen Pfad umgeht und durch Mikrotubulusassoziation mittels der polybasischen Lysinsequenz direkt zur Plasmamembran wandert (Apolloni *et al.*, 2000, Thissen *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 2000).

Obwohl die Palmitoylierung für eine korrekte Lokalisation und Funktion eine zentrale Rolle spielt, soll nicht unerwähnt bleiben, dass Ras durchaus auch ohne Palmitoylierung aktiv sein kann. Chiu *et al.* (2002) konnten mit Hilfe eines GFP(green-fluorescent-protein)-markierten Fusionskonstrukts der Ras-bindenden Domäne von Raf-1 zeigen, dass selbst mit nicht palmitoylierbarem (und somit Endomembran gebundenem) H-Ras eine Kolokalisation am ER und Golgi erfolgte. Diese Erkenntnisse stellen nicht die Wichtigkeit der Palmitoylierung in Frage, sondern zeigen lediglich, wie vielseitig die Funktionen von Ras sind und dass die Palmitoylierung nicht, wie zuvor angenommen, unbedingt notwendig für die Signalfunktion von Ras ist. Tatsächlich zeigt sich, dass die unterschiedlichen Funktionen von



Ras bzw. der einzelnen Isoformen auch durch die Lokalisation moduliert werden (Voice *et al.*, 1999).

Darüberhinaus zeigen neuere Untersuchungen zur Lokalisation von Ras, dass palmitoyliertes Ras nicht, wie bisher angenommen, einem unidirektionalen Weg folgt und nur in der Plasmamembran lokalisiert. Tatsächlich befindet sich auch palmitoyliertes Ras am Golgi-Apparat, dessen hohe Konzentration sich nicht allein mit dem Übergangszustand zwischen Farnesylierung, Palmitoylierung und anschließendem Weitertransport zur Plasmamembran erklären lässt (Rocks *et al.*, 2005). Viel mehr scheint es ein dynamischer Zyklus zwischen Palmitoylierung und Depalmitoylierung zu sein, der für eine korrekte Lokalisation und Signaltransduktion sorgt (Abb. 1.4, S. 13).



**Abbildung 1.4 (Quelle: Rocks *et al.*, 2006):** Ras Zyklus zwischen Golgi und Plasmamembran. Am Golgi wird bereits farnesyliertes Ras palmitoyliert und über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert. Durch Depalmitoylierung erfolgt die Dissoziation von der Plasmamembran und Ras verteilt sich gleichmäßig im Cytosol und den umliegenden Membranen und wird am Golgi erneut palmitoyliert, womit der Zyklus von neuem beginnt. Palmitoyliertes Ras ist rot dargestellt und depalmitoyliertes Ras gelb.



### 1.3. Chemische Biologie – Mehr als ein Zweckbündnis für das Verständnis von Krebs

Lange Zeit zielte die Krebstherapie darauf ab, Krebszellen schneller zu töten, als gesunde Zellen. Da sich Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen schneller teilen, werden häufig Medikamente verabreicht, welche die Zellteilung beeinflussen. Eines der bekanntesten Mittel mit solch einer antimittotischen Wirkung ist Paclitaxel (Taxol). Es wurde erstmals in den späten 1960igern aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert. Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass diese Substanz Antitumoraktivität besitzt (Wani *et al.*, 1971). Paclitaxel greift in die Dynamik der Mikrotubuli ein, indem es diese stabilisiert, was Zellen in der G2/M Phase des Zellzyklus arretiert und somit die Teilung verhindert (Verweij *et al.*, 1994). Dies führt allerdings auch zu starker Toxizität bei gesunden Zellen. Aus diesem Grund ist es häufig notwendig den Patienten weitere Mittel gegen die starken Nebenwirkungen zu verabreichen. Diese haben nicht selten ebenfalls Nebenwirkungen, welche durch weitere Medikamente eingedämmt werden müssen. Daher ist ein Ziel der Krebsforschung Substanzen zu finden, welche spezifisch Krebszellen angreifen und entsprechend geringe Nebenwirkung haben. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Entwicklung von Inhibitoren gegen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) (Shawver *et al.*, 2002), zu denen auch der EGF-Rezeptor (EGFR) gehört. Ein Inhibitor, welcher den EGFR inhibiert und bereits erfolgreich zur Behandlung von Krebs eingesetzt wird ist Gefitinib (Albanell *et al.*, 2001, Baselga *et al.*, 2000). Tatsächlich hat Gefitinib deutlich geringere Nebenwirkungen als Paclitaxel (Birnbaum und Ready, 2005).

Eine Disziplin, welche sich eingehend mit der Identifizierung und Evaluierung zielspezifischer Substanzen befasst, ist die chemische Biologie. Während die Molekulargenetik und Molekularbiologie versuchen, durch gezielte Mutation einzelner Gene oder in neuerer Zeit durch gezieltes Abschalten von Genen mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi) den Mechanismen des Lebens auf die Spur zu kommen (Kittler und Buchholz, 2003), versucht die chemische Biologie dies mit Hilfe niedermolekularer Substanzen (< 700 Da) zu erreichen. Dies gilt sowohl für die Grundlagenforschung, als auch für die Entdeckung und Entwicklung neuer Medikamente.

Aufgrund der Parallelen zur Molekulargenetik hat sich auch der Begriff der chemischen Genetik geprägt. Der Gebrauch von niedermolekularen Substanzen hat einige Vorteile. Da in einigen Fällen genetische Knockout-Mutanten zum Tod führen, lässt sich keine direkte Aussage über den tatsächlichen Effekt der Mutation fällen. Niedermolekulare Substanzen lassen sich hingegen zu jedem beliebigen Zeitpunkt verabreichen und erzeugen so einen beobachtbaren Effekt. Ferner lässt sich das Ausmaß der Wirkung über die Konzentration kontrollieren. Darüberhinaus tritt die Wirkung schnell ein und ist nur diffusionslimitiert.

Je nach Herangehensweise unterscheidet man zwischen vorwärts- und rückwärtsgerichteter chemischer Genetik. Im Fall der vorwärtsgerichteten chemischen Genetik generiert man eine diversitätsorientierte Substanzbibliothek und testet diese an Zellen und/oder ganzen Organismen. Hierbei wählt man jene aus, die einen abweichenden Phänotyp erzeugen. Anschließend bedient man sich molekularbiologischer und biochemischer Methoden, um das Zielprotein zu identifizieren.

Bei der rückwärtsgerichteten chemischen Genetik testet man eine Substanzbibliothek an einem bestimmten Enzym oder auch einer Gruppe von Enzymen. Sobald ein Inhibitor entdeckt ist, wird dieser in lebenden Systemen getestet. Auf diese Weise erhält man anhand der Änderung des Phänotyps Informationen über die Bedeutung des jeweiligen Enzyms für den Organismus. Analog dazu lassen sich auch Aktivatoren eines Enzyms in gleicher Weise testen. Während die rückwärtsgerichtete chemische Genetik in erster Linie ein Werkzeug der Grundlagenforschung ist, wo es darum geht die Funktion eines Enzyms besser zu verstehen, kommt die vorwärtsgerichtete chemische Genetik vor allem bei der Entdeckung und Entwicklung neuer Medikamente zum Einsatz. So wurden bereits einige Inhibitoren mit Potential als Krebsmittel auf diese Weise entdeckt. Dazu gehören der Hsp90 Inhibitor Geldanamycin (Whitesell *et al.*, 1994), der Golgi-Disruptor Brefeldin A (Chardin und McCormick, 1999), Isogranulatimide, einem G2 Checkpoint Kinase Inhibitor (Roberge *et al.*, 1998), sowie Monastrol einem Inhibitor des bipolaren Spindelapparates (Mayer *et al.*, 1999).

Eine vielversprechende Methode zur Identifizierung von Zielproteinen einer Substanz ist die Affinitätsaufreinigung. Hiermit lässt sich bei der vorwärtsgerichteten chemischen Genetik feststellen, wie der beobachtete

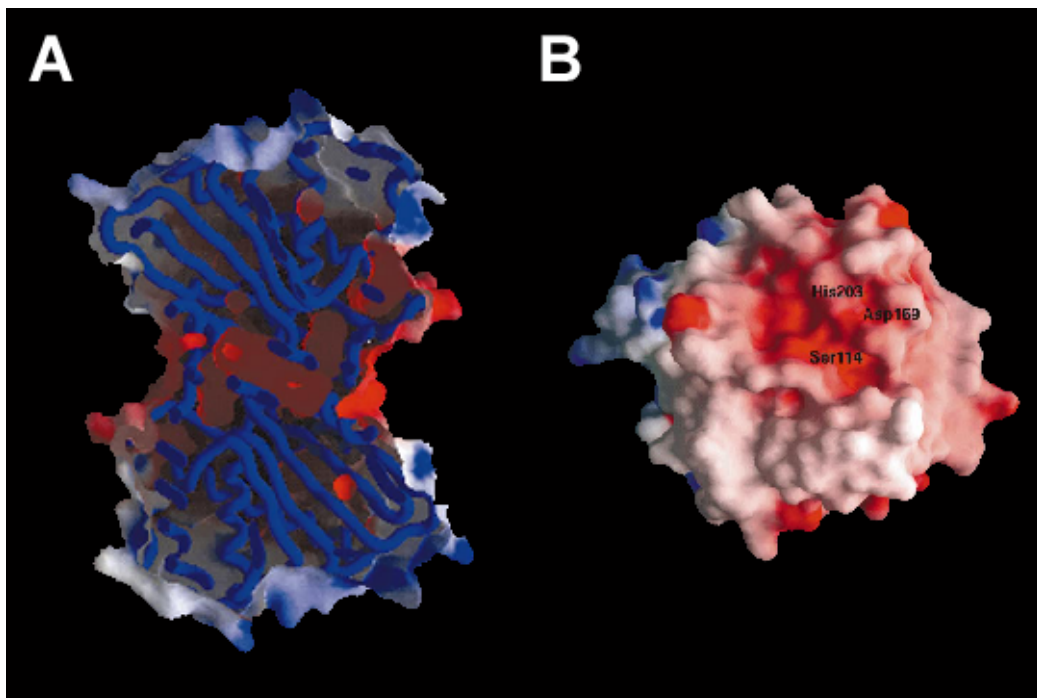
Effekt auf Enzymebene zu verstehen ist, da man mit Hilfe dieser Methode die Bindungspartner einer Substanz bestimmen kann (Hart, 2005, Austen und Dohrmann, 2005). Im Fall der rückwärtsgerichteten chemischen Genetik dient diese Methode zur Überprüfung der Spezifität. So lässt sich überprüfen, ob der *in vitro* positiv getestete Inhibitor neben dem Zielprotein noch weitere Proteine bindet. Dies ist insbesondere bei der Beurteilung der Bedeutung der Substanz bzw. des Enzyms für den Organismus wichtig, da ein beobachteter Phänotyp in einigen Fällen nicht durch die Wirkung auf dieses Enzym, sondern auf eine Kreuzreaktion mit anderen Enzymen zurückgehen kann (Guiffant *et al.*, 2007, Brehmer *et al.*, 2004). Darüber hinaus lassen sich mögliche Nebenwirkungen besser abschätzen, falls die Substanz das Potential hat, ein Medikament zu werden.

Ein entscheidender Faktor der Affinitätsaufreinigung ist die Wahl des richtigen Verbindungsstückes (engl.: Linker) und des Affinitätsmarkers.

Die gängigsten Linker bestehen entweder aus Alkylketten (Greenbaum *et al.*, 2002) oder Polyethylenglykol(PEG)-Ketten (Wan *et al.*, 2004, Knockaert *et al.*, 2000, Mandal *et al.*, 2005). Aufgrund der höheren Hydrophilizität, hat sich der PEG-Linker jedoch häufig bewährt. Dies ist besonders wichtig, wenn ein Biotin/Streptavidin-System für die Aufreinigung verwendet wird (Trester-Zedlitz *et al.*, 2003), da Biotin die Löslichkeit stark herabsetzt (0,2 g/l in Wasser). Darüberhinaus gibt es verschiedene Kombinationen mit zusätzlichen funktionellen Gruppen, welche eine kovalente Verbindung mit dem Affinitätsmarker ermöglichen (z.B. Benzophenon) und/oder Fluoreszenzmarkern zur besseren Detektion (Trester-Zedlitz *et al.*, 2003, Adam *et al.*, 2002). Zusammenfassend sei gesagt, dass die Affinitätsaufreinigung bzw. die gesamte chemische Genetik ein schnell wachsendes Forschungsgebiet ist, welches genauso vielfältig und komplex ist, wie die Methoden, derer es sich zur Beantwortung der Fragestellungen bedient. Aus diesem Grund ergibt sich für jede Problematik eine Vielzahl von Lösungsansätzen.

#### 1.4. Acyl Protein Thioesterase 1 (APT1) – Ein Schlüsselprotein bei der Deacylierung von Ras-Isoformen

Im Jahr 2000 gelang Devedjiev *et al.* mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse die Bestimmung der räumlichen Struktur von APT1 mit einer Auflösung von 1.5 Å. Demnach handelt es sich bei APT1 um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa, welches vermutlich als Homodimer vorliegt (Abb. 1.5).

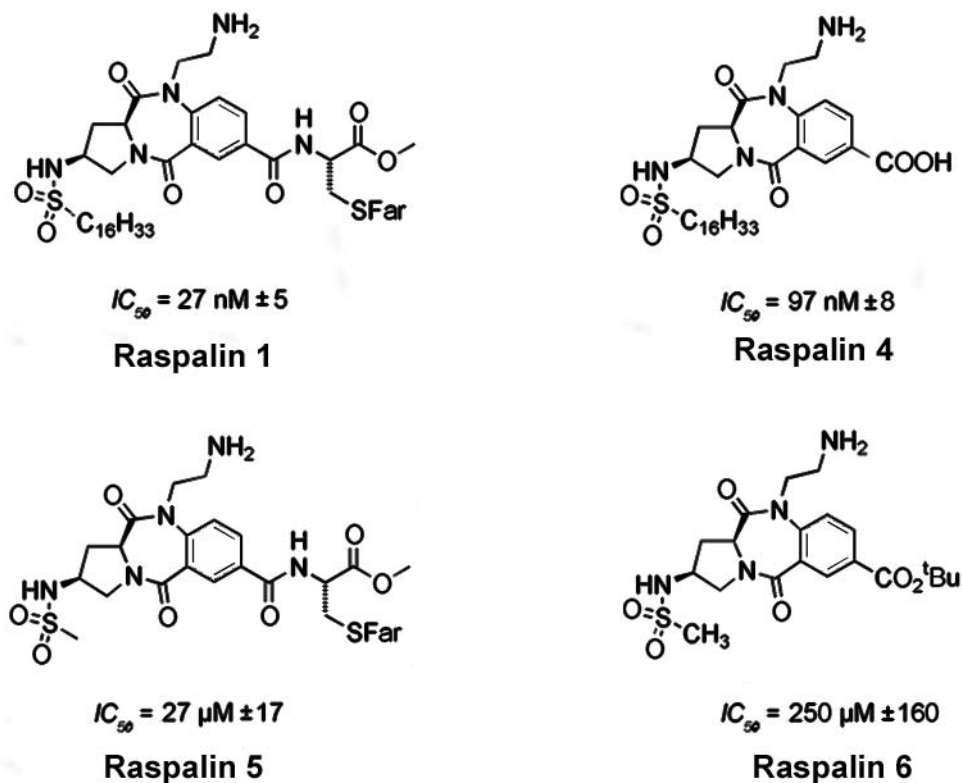


**Abbildung 1.5:** Struktur von APT1. **A:** Seitenansicht des Homodimers mit angezeigter Ladungsverteilung. Das aktive Zentrum befindet sich an der Interaktionsfläche zwischen den beiden Monomeren, dargestellt in rot. Die blauen Strukturen repräsentieren das Peptidrückgrat. **B:** Eine horizontal um 90° gedrehte Ansicht des aktiven Zentrums des Monomers mit der katalytischen Triade aus Serin114, Asparaginsäure163 und Histidin203. Positiv geladene Bereiche sind blau dargestellt und negativ geladene rot.

APT1 gehört zur Klasse der kanonischen  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen mit der für diese Enzymgruppe typischen, katalytischen Triade und einer auffälligen Ähnlichkeit mit einer Carboxylesterase aus *Pseudomonas fluorescens* (CPf; Kim *et al.*, 1997).

Es ist bekannt, dass APT1 Ras Isoformen, aber auch heterotrimere G-Proteine depalmitoyliert (Duncan und Gilman, 1998). Wie bereits in Abschnitt 1.2. näher erläutert wurde, führt die Palmitoylierung bei Ras und

anderen Proteinen zu einer stabilen Verankerung in der Plasmamembran und damit verbunden zu einer Aktivierung. Entsprechend führt die Depalmitoylierung zur Inaktivierung und ist somit ein wichtiger Regulierungsmechanismus bei der Singalübertragung (Dunphy und Linder, 1998, Qanbar und Bouvier, 2003, Dietrich *et al.*, 2005, Rocks *et al.*, 2005). Um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen, wurden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren entwickelt (Deck *et al.*, 2005). Hierbei handelt es sich um Benzodiazepindionderivate, welche den C-Terminus von H-Ras imitieren. Diese Peptidmimetika sollten mit dem natürlichen Substrat konkurrieren bzw. dieses verdrängen und so zu einer Inaktivierung von APT1 führen. Bei *in vitro* Versuchen zeigten sich besonders die doppelt lipidierten Derivate als wirksam, wobei die Palmitoylgruppe die entscheidende Modifikation zu sein schien. Derivate, welche nur einen Farnesylrest oder gar keine Lipidmodifikation trugen, inhibieren nur schlecht oder gar nicht (Abb. 1.6).

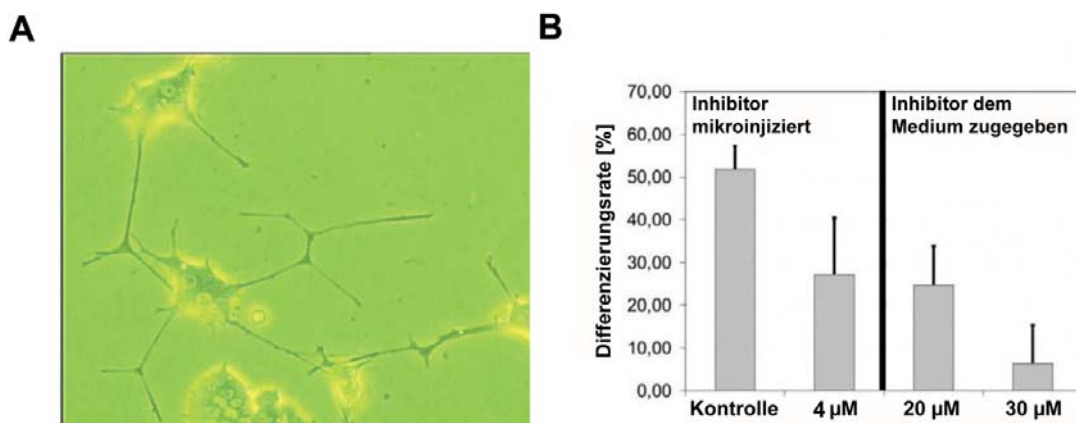


**Abbildung 1.6:** Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität der Benzodiazepindione. Namensgebung nach Deck *et al.*, 2005.

In Versuchen mit PC12 Zellen (Pheochromocytoma, Nebenniere) war jedoch ein Effekt zu beobachten der nicht zu der Hypothese passte. PC12

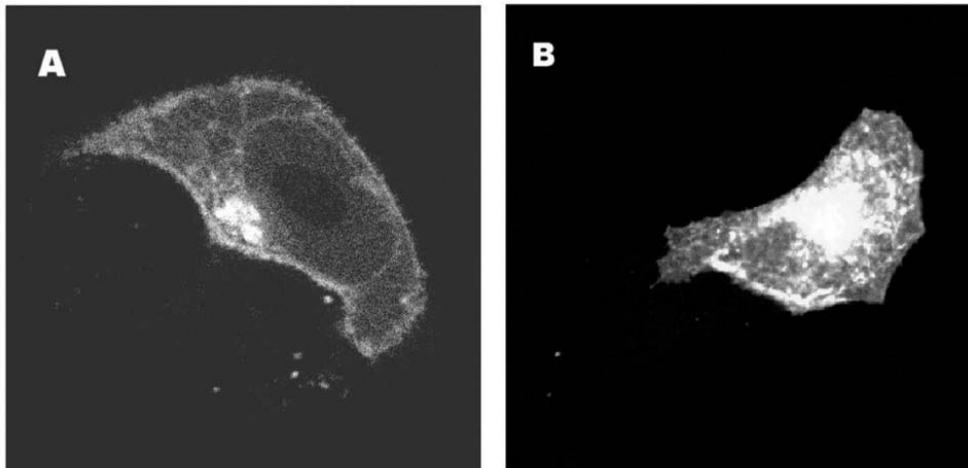
Zellen zeigen nach Stimulation mit NGF (Nerve Growth Factor) Neuritenwachstum, welches auf die Aktivierung des Ras Signalweges zurückgeht. Eine weitere Möglichkeit das Neuritenwachstum zu induzieren, ist daher auch die Mikroinjektion mit rekombinantem, onkogenem RasG12V (Vaudry *et al.*, 2002).

Analog dazu wurden die Zellen mit einem semisynthetischen, onkogenen N-Ras-Konstrukt mikroinjiziert, welches bereits über einen Cysteinmethylester farnesyliert ist und ein zweites, freies und somit palmitoylierbares Cystein besitzt (Bader *et al.*, 2000, Kuhn *et al.*, 2001). Auch mit diesem Konstrukt lässt sich Neuritenwachstum auslösen (Abb. 1.7A). Eine Inhibition von APT1 hätte dazu führen müssen, dass das Neuritenwachstum bei Koinjektion bzw. Zugabe der APT1 Inhibitoren zum Medium stärker wird, da Ras nicht länger depalmitoyliert wird und somit dauerhaft in der Plasmamembran und damit aktiv bleibt. Genau das Gegenteil, also eine Reduktion des Neuritenwachstums war der Fall (Abb. 1.7B).



**Abbildung 1.7:** Einfluß der Raspaline auf das Neuritenwachstum. **A:** PC12 Zellen mit deutlichem Neuritenwachstum; Färbung: Fluorescein-Dextrin **B:** Reduktion des Neuritenwachstums durch Benzodiazepinderivate.

Um sicher zu gehen, dass dieser Effekt tatsächlich auf die Inhibition der Palmitoylierung zurückgeht, wurden MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten, palmitoylierbarem N-Ras-Konstrukt ohne und mit Inhibitor mikroinjiziert (Abb. 1.8).



**Abbildung 1.8:** Lokalisation eines fluoreszenzmarkierten, palmitoylierbaren N-Ras-Konstruktes. **A:** Lokalisation des Konstruktes in Plasmamembran und Golgi ohne Inhibitor; **B:** Gleichmäßige Verteilung des Konstruktes innerhalb der Zelle bei Koinjektion mit 2  $\mu\text{M}$  Inhibitor. Fluoreszenzmarker: Bodipy FL.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde diese Substanzklasse Raspaline genannt (Ras palmitoylating inhibitors).

### 1.5. Zielsetzung und Motivation der Arbeit

Aus den in 1.4. vorgestellten Ergebnissen lassen sich zwei Hypothesen ableiten:

1. APT1 ist auch in der Lage zu palmitoylieren und die Richtung der Reaktion hängt vom physiologischen Umfeld ab, eine Eigenschaft die sogar erfolgreich bei der Peptidsynthese genutzt wurde (Oka und Morihaka, 1977).
2. Neben APT1 gibt es in der Zelle weitere Zielproteine, welche mit gleicher oder sogar höherer Affinität von den Raspalinen gebunden werden, sodass die Hemmung des Neuritenwachstums nicht allein durch die Inhibition von APT1 bedingt ist.

Diese beiden Hypothesen zu überprüfen war Ziel dieser Arbeit.

Um die mögliche Rolle von APT1 bei der Acylierung zu überprüfen, wurde die Aktivität indirekt (Nachweis der freien Fettsäure mit ADIFAB, s. 2.7.2.)



und direkt (Bestimmung der Aktivität mit radioaktiv markiertem Palmitoyl-Coenzym A und fluoreszenzmarkiertem Substratpeptid, s. 2.7.1. und 2.7.3.) untersucht.

Die Wirkung der Raspaline wurde zudem in Zelllinien überprüft, welche Rückschlüsse über die Wirkung auf den Ras-MAPK Signalweg zulassen. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Reporterzelllinie, welche die Aktivierung bzw. Inhibition des Ras-MAPK Signalweges durch vermehrte bzw. verminderte Luziferaseaktivität messbar macht (HLR Zellen, s. 2.1.3.). Zum anderen wurde eine Zelllinie verwendet, welche durch gezielte Mutation dauerhaft aktives H-Ras exprimiert (MDCK-f3 Zellen, s.2.1.1.). Diese Zellen zeigen einen fibroblastenartigen Phänotyp und bilden kaum Zell-Zell Kontakte. Eine Inhibition des Ras-MAPK Signalweges führt zu einer Umkehrung des Phänotyps. Die Zellen bilden daraufhin wieder Zell-Zell Kontakte und zeigen epitheliales Wachstum.

Darüberhinaus wurde der Phosphorylierungszustand ausgesuchter Ras-MAPK Module untersucht, um den Ansatzpunkt der Raspaline im Ras-MAPK Signalweg zu bestimmen. Eine ausbleibende Phosphorylierung ist ein Zeichen dafür, dass die Signalkaskade unterbrochen ist.

Da diese Versuche zunächst nur einen ersten Anhaltspunkt über die Wirkweise der Raspaline und der Bedeutung von APT1 bei der Acylierung von Ras-Isoformen geben, wurden Affinitätssonden auf der Basis von Raspalin 4 entwickelt und validiert. Mit Hilfe dieser Sonden sollte die Isolierung von APT1 aus Zelllysaten und möglichen anderen Zielproteinen erfolgen, um so den Wirkungsmechanismus der Raspaline besser einschätzen zu können.



## 2.1. Zellkultur

### 2.1.1. MDCK/MDCK-f3 Zellen (Madin Darby Kidney Cells)

MDCK und MDCK-f3 Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in DMEM mit 5 % essentiellen Aminosäuren, 5 % L-Glutamin, 0,5 % Penicillin /Streptomycin, 5 % fötalem Kälberserum bei 37°C und 7.5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.1.2. PC 12 Zellen (Pheochromocytoma)

PC12 Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in DMEM mit 5 % essentiellen Aminosäuren, 5 % L-Glutamin, 0,5 % Penicillin/Streptomycin, 5 % fetalem Kälberserum und 10% Pferdeserum bei 37°C und 7.5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Um das Anwachsen der Zellen zu unterstützen, wurden die Kulturflaschen vor dem Aussäen mit Collagen beschichtet.

### 2.1.3. HeLa Zellen (Henrietta Lacks)

HeLa Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in DMEM mit 5 % essentiellen Aminosäuren, 5 % L-Glutamin, 0,5 % Penicillin/Streptomycin, 10 % fötalem Kälberserum (hitzeinaktiviert) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.1.4. HLR Zellen (HeLa Luciferase Reportergene)

HLR Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in DMEM mit 5 % essentiellen Aminosäuren, 5 % L-Glutamin, 0,5 % Penicillin/Streptomycin, G418 (250 µg/ml), Hygromycin (100 µg/ml), 10 % fötalem Kälberserum bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.1.5. Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen

Zellaliquots wurden bei 37°C im Wärmebad aufgetaut und sobald kein Eis mehr sichtbar war 1:20 in dem jeweiligen Medium verdünnt und in Kulturschalen ausgesät. Nach einer ein- bis zweitägigen Anwuchsphase wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht. Sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie wie folgt passagiert:

- 2x waschen mit je 5 ml PBS
- 2 ml Trypsin zugeben und für 2-5 min einwirken lassen
- Zellen durch Klopfen gegen die Kulturschale ablösen
- 5 ml Medium zugeben und Zellen vereinzeln
- Je nach Bedarf Zellen auf Kulturflaschen und Mikrotiterplatten verteilen

Zellen, welche eingefroren werden sollten, wurden nach dem Trypsinieren bei 4000 rpm für 2 min abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in 200 µl Aliquots aufgeteilt und langsam herabgekühlt (15 min bei 4°C, 2 Stunden bei - 20°C, über Nacht bei - 80°C) und dann in flüssigem Stickstoff eingelagert.

#### **Puffer und Lösungen**

##### 1x PBS

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

150 mM NaCl

pH 7.4 in H<sub>2</sub>O

##### Trypsin-Lösung

Trypsin-EDTA 0.05% in DMEM

##### Einfriermedium

Standardmedium für die jeweilige Zelllinie

10% DMSO

### 2.1.6. Zellyse

Die Zellen wurden entsprechend dem Zweck und Ziel des Experiments auf verschiedene Weise lysiert.

#### 2.1.6.1. Einfache Zellyse

Für die Affinitätsaufreinigung und den anschließenden In-Gel Verdau wurden PC12 Zellen vollständig lysiert, ohne dabei die Zellkompartimente voneinander zu trennen.

#### Durchführung

- Bei Erreichen der Konfluenz in 75 cm<sup>2</sup> Kulturschalen vor der Lyse über Nacht mit 100 ng/ml NGF stimulieren
- Zellen 1x mit 5 ml PBS waschen
- PBS vollständig entfernen, 1 ml Lysepuffer zugeben und Zellen mit einem Schaber ablösen
- Lyseansatz für 20 min auf Eis stellen und gelegentlich kurz vortexen
- Lysat einige Male durch eine 26G Kanüle ziehen, bis das Lysat homogen erscheint
- Zur Abtrennung von Zelltrümmern und Membranresten 20 min bei 12000g und 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen und entweder sofort weiterverwenden oder bei – 20°C einlagern

#### Puffer und Lösungen

##### Lysispuffer

50 mM PIPES

50 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM EGTA

0.1 % NP40

0.1 % Triton X-100

0.1 % Tween 20

0.1 % 2-Mercaptoethanol,

Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini

pH 7.4

in H<sub>2</sub>O

NGF-Stammlösung

100 µg/ml in DMEM

### **2.1.6.2. Fraktionierte Zellyse zur Trennung des Cytoplasmas vom Nukleus**

Um den Phosphorylierungszustand und die Lokalisation einzelner Signalproteine der Ras-MAPK Signalkaskade besser untersuchen zu können, wurde eine fraktionierte Zellyse durchgeführt, durch die Cytoplasma und Nukleus voneinander getrennt werden.

#### **Durchführung**

- Bei Erreichen der Konfluenz in 75 cm<sup>2</sup> Kulturschalen für 15 min mit 200 ng/ml EGF stimulieren
- Zellen 1x mit 5 ml eiskaltem PBS waschen
- PBS möglichst vollständig entfernen, 500 µl Waschpuffer zugeben, Zellen mit einem Schaber ablösen und für 5 min bei 12000g und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellen in 200 µl Lysispuffer A resuspendieren, kurz vortexen und wieder 5 min bei 12000g und 4°C zentrifugieren
- Der Überstand enthält die cytoplasmatische Fraktion.
- Nachdem der Überstand entfernt worden ist, 200 µl Lysispuffer B zugeben und 2x 5 s mit Ultraschall (Leistung 40 Watt) aufschließen und anschließend kurz vortexen
- Suspension erneut für 5 min bei 12000g und 4°C zentrifugieren
- Der Überstand enthält die nukleare Fraktion

Die Zellfraktionen wurden sofort weiterverwendet oder bei – 20°C eingefroren.

## **Puffer und Lösungen**

### Waschpuffer

50 mM  $\beta$ -Glycerophosphate

1.5 mM EGTA

1 mM EDTA

1mM DTT mM

0.1 mM  $\text{NaVO}_4$

Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini

pH 7.3

in  $\text{H}_2\text{O}$

### Lysispuffer A

40 mM HEPES

0.1% NP-40

5 mM EGTA

5 mM  $\text{MgCl}_2$

1mM DTT

1 mM  $\text{NaVO}_4$

Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini

pH 7.5

in  $\text{H}_2\text{O}$

### Lysispuffer B

50 mM  $\beta$ -Glycerophosphat

420 mM NaCl

1.5 mM  $\text{MgCl}_2$

0.2 mM EDTA

1mM DTT

25% Glycerol

pH 7.3

in  $\text{H}_2\text{O}$

### EGF-Stammlösung

100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in  $\text{H}_2\text{O}$

### **2.1.6.3. Fraktionierte Zellyse zur Trennung von Cytoplasma, Membranen und Nukleus vom Cytoskelett**

Da das Cytoskelett einen großen Anteil der zellulären Proteine ausmacht und somit Proteine, welche in geringeren Mengen vorhanden sind bei der Affinitätsaufreinigung überlagert werden könnten, wurde das Zellysat mit Hilfe des Qproteome Kits von Qiagen vom Cytoskelett befreit. Weiterhin wurde das verbleibende Zellysat in Cytosol-, Membran- und Nukleusfraktionen aufgetrennt.

Wie schon zuvor wurden die Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und über Nacht mit 100 ng/ml NGF stimuliert.

#### **Durchführung**

Die Durchführung erfolgte gemäß dem mitgelieferten Protokoll.

#### **Puffer und Lösungen**

Mit Ausnahme des PBS, entstammten alle verwendeten Puffer dem Qiagen Qproteome Kit.

## 2.2. Histochemische Färbungen

Um den Einfluss der untersuchten Substanzen auf Zellen besser sichtbar zu machen, wurden diese fixiert und angefärbt. Je nach Fragestellung wurden verschiedene Färbungen und Zelllinien verwendet.

Bei der rein histologischen Färbung mit Coelestin Blau wurde die ganze Zelle unspezifisch gefärbt. Diese Färbung gibt daher in erster Linie Aufschluss über die Zellform und ob eine zu untersuchende Substanz einen Einfluss auf den Phänotyp hat.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden hingegen vor allem dann verwendet, wenn zusätzlich auch der Einfluss speziell auf das Cytoskelett von Interesse war. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper und Proteine verwendet, welche spezifisch an den jeweiligen Cytoskelettstrukturen binden, oder im Fall der Kernfärbung mit DAPI, einem DNA-Interkalator, selbst fluoreszieren und mit der Zellstruktur interagieren.

Alle Zellen wurden für die Färbung in 96-Kavitäten Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zellzahl wurde für die Zelllinien wie folgt gewählt:

BSC-1 Zellen:  $4 \times 10^3$  Zellen/Kavität

MDCK-f3 Zellen:  $3 \times 10^3$  Zellen/Kavität

### 2.2.1. Färbung mit Coelestin Blau

#### Durchführung

- Medium entfernen und kurz mit 200  $\mu$ l PBS pro Kavität waschen
- Zellen mit 4% Formaldehyd für 10 min fixieren
- 2x kurz mit A. dest waschen
- 2 min in A. dest stehen lassen
- 30 sek – 1 min mit Coelestin Blau färben
- 5 min in 70% Ethanol differenzieren
- Ethanol entfernen 1x kurz mit PBS waschen und anschließend 200  $\mu$ l PBS zugeben

## **Puffer und Lösungen**

### Formaldehyd-Stammlösung

37%ige para-Formaldehyd-Lösung

Vor Gebrauch 1:10 mit PBS verdünnen

### Coelestin Blau:

100 ml 5% Eisenammoniumalaun in H<sub>2</sub>O

0,5 g Coelestin Blau zugeben

3 min kochen

abkühlen lassen, filtrieren und 14 ml Glycerin zugeben

## **2.2.2. Fluoreszenzfärbung des Cytoskeletts**

### **Durchführung**

- Medium entfernen und kurz mit 200 µl PBS pro Kavität waschen.
- Zellen mit 4% Formaldehyd für 10 min fixieren
- 3x 5 min mit je 200 µl PBS-T waschen
- 1h (ggf. über Nacht) mit 5% BSA in PBS blockieren
- Blockierlösung entfernen und je 40 µl Färbelösung zugeben und für 1 h im Dunkeln inkubieren
- 3x 5 min mit PBS-T waschen und anschließend 200 µl PBS zugeben

Die Mikrotiterplatten können bis zu einem Monat im Dunkeln bei 4°C gelagert werden.

## **Puffer und Lösungen**

### PBS-T

1x PBS

0,1% Tween 20



### Färbelösung

1x PBS-T

DAPI 1:15000 verdünnt

Phalloidin-TRITC 1:1000 verdünnt

Anti-Tubulin FITC 1:500 verdünnt

5% BSA

### **2.2.3. Mikroskopie**

Alle mikroskopischen Bilder wurden mit dem Axiovert 200M (Zeiss) aufgenommen. Für die automatische Bildaufnahme und die anschließende Bearbeitung wurde die Software Metamorph Version 6.2r4 verwendet.

Pro Kavität wurden im Falle der Coelestin Blau Färbung sechs und bei Färbung des Cytoskeletts mit Fluoreszenzmarkern vier Bilder im Abstand von 50  $\mu$ M aufgenommen. Alle Bilder wurden bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die Bildaquisition wurden vorgefertigte Protokolle verwendet. Für die Coelestin Blau Färbung war dies *RücktransCB2.hts* und für Fluoreszenz *Cytoskelett.hts*.

### **2.3. Reporterassay**

Um den Einfluss der verwendeten Substanzen auf den Ras-MAPK-Signalweg zu untersuchen, wurden mit Luziferase stabil transfizierte HeLa Zellen verwendet (Stratagene). Bei dieser Zelllinie ist die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors Elk-1 stabil mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4 Promoters fusioniert, welcher die Expression der Luziferase steuert.

Das bedeutet, dass eine Inhibition des Ras-MAPK Signalweges mit einer verminderten Expression der Luziferase und somit mit einem geringeren Signal einher geht. Die Bestimmung der Aktivität erfolgt entsprechend über die Messung der Luminiszenz. Der Assay wurde dazu in weißen 96-Kavitäten Mikrotiterplatten durchgeführt.

## Durchführung

- Pro Kavität  $2 \times 10^4$  Zellen aussäen und für 24 h wachsen lassen
- Normales Medium entfernen und durch Hungermedium (DMEM mit lediglich 0,5% fötalem Kälberserum) ersetzen
- Pro Kavität 30  $\mu\text{M}$  Substanz zugeben und erneut über 24 h inkubieren (Bei Substanzen, die eine Inhibition zeigten, wurde noch ein weiterer Test mit 30, 10 und 1  $\mu\text{M}$  Substanz durchgeführt.)
- Stimulation mit 200 ng/ml EGF für 6h
- Jeweils 30  $\mu\text{l}$  Lysepuffer zugeben und für 15 min inkubieren
- 100  $\mu\text{l}$  Luziferasereagenz zugeben und sofort messen

## Puffer und Lösungen

### Lysepuffer

40 mM Tricin

50 mM NaCl

2 mM EDTA

1 mM  $\text{MgSO}_4$

5 mM DTT

1 % Triton X-100

in  $\text{H}_2\text{O}$

### Luziferase Assaypuffer

40 mM Tricin

0.5 mM ATP

10 mM  $\text{MgSO}_4$

0.5 mM EDTA

0.5 mM Coenzym A

0.5 mM Luziferin

10 mM DTT

in  $\text{H}_2\text{O}$

Mit 1 M Tris auf pH 7.8 einstellen

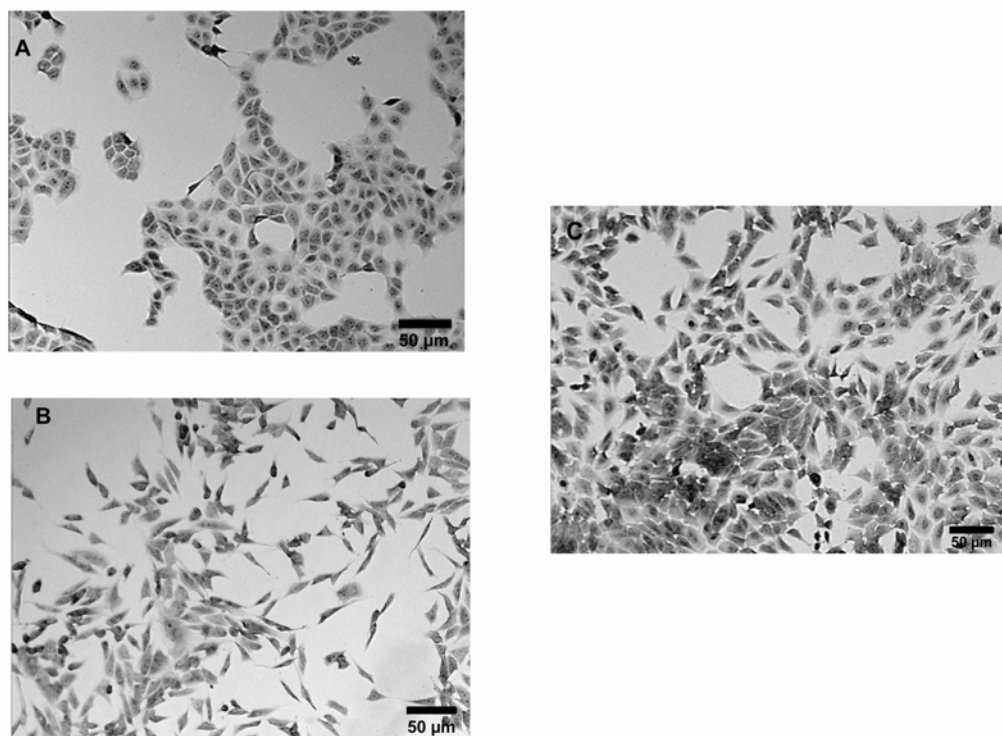
### EGF-Stammlösung

100  $\mu\text{g/ml}$  in  $\text{H}_2\text{O}$

## 2.4. Rücktransformationsassay

Eine weitere Zelllinie, mit der sich der Effekt von Substanzen auf den Ras-MAPK-Signalweg überprüfen lässt, ist die MDCK-f3 Zelllinie. Bei diesen Zellen handelt es sich um H-Ras transformierte Zellen (Behrens *et al.*, 1989), welche im Vergleich zu untransformierten MDCK-Zellen einen spindelförmigen, fibroblastenartigen Phänotyp aufweisen und darüberhinaus nur wenige bis keine Zell-Zell-Kontakte ausbilden (s. Abb. 2.1 A & B).

Wirkt eine Substanz auf den Ras-MAPK-Signalweg führt dies zu einer Rücktransformation. Dies äußert sich in einer Änderung des Phänotyps, bei dem die Zellen wieder eher rundlich werden und vermehrt Zell-Zell-Kontakte ausbilden (s. Abb. 2.1 C). Als Positivkontrolle wurde in diesem Fall 30  $\mu\text{M}$  des bekannten MEK Inhibitors U0126 (Favata *et al.*, 1998) zugegeben.



**Abbildung 2.1:** Rücktransformation bei MDCK-f3 Zellen. **A:** untransformierte MDCK Zellen; **B:** H-Ras transformierte MDCK-f3 Zellen; **C:** rücktransformierte MDCK-f3 Zellen nach Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  U0126. Färbung: Coelestin Blau

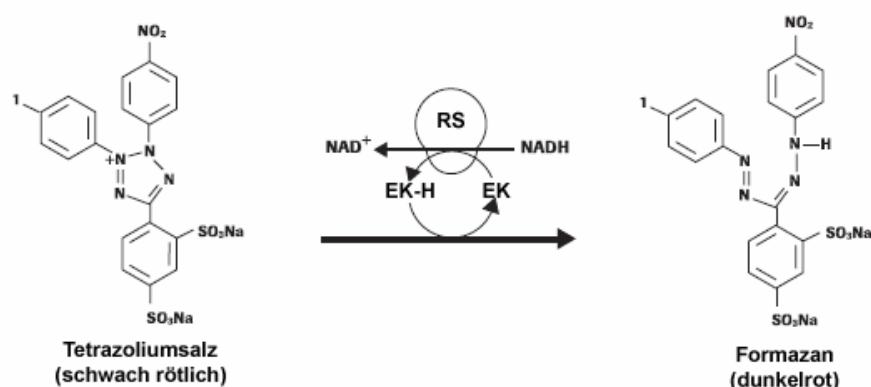
## Durchführung

In 96-Kavitäten Mikrotiterplatten wurden pro Kavität  $3 \times 10^3$  Zellen ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden  $30 \mu\text{M}$  der jeweiligen Substanz zugegeben. Wurde ein Effekt beobachtet, wurde die Substanz bei  $100$ ,  $50$ ,  $25$  und  $10 \mu\text{M}$  getestet. Jede Konzentration wurde pro Platte mindestens zweifach getestet. Nach einer weiteren Inkubationsphase über Nacht wurde die Platte mit dem Mikroskop abfotografiert (s. 2.2.3.).

## 2.5. Proliferationsassay mit WST-1

Da es für die Beurteilung der Ergebnisse wichtig war, ob die beobachteten Effekte durch die direkte Wirkung der jeweiligen Substanz auf den Metabolismus der Zelle oder durch reine Toxizität bedingt war, wurde dies mit WST-1 überprüft.

Bei WST-1 handelt es sich um ein Tetrazoliumsalz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat), welches durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein tiefrotes Formazan umgesetzt wird (Abb. 2.2). Die Stärke der Färbung korreliert daher direkt mit der Anzahl lebender und metabolisch aktiver Zellen.



**Abbildung 2.2:** Spaltung des Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) zu Formazan. EK = Elektronenkupplungsreagenz, RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium Reduktase System.

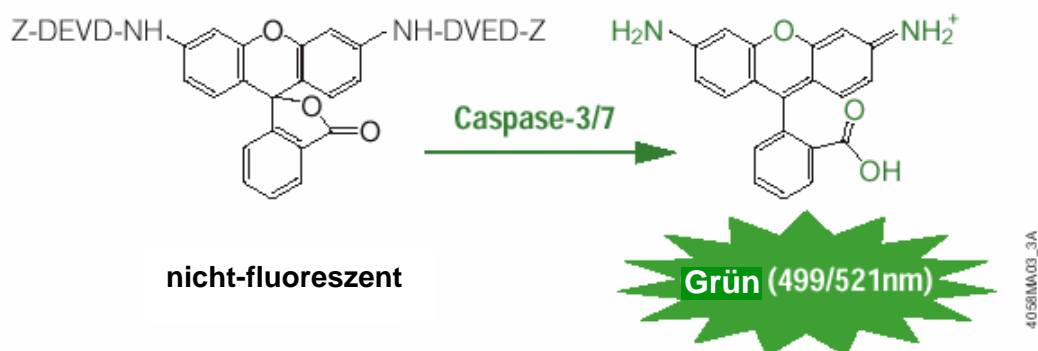
## Durchführung

Die Bestimmung der Proliferation erfolgte immer vor dem Färben der Zellen. Hierzu wurde bei 180 µl Medium/Kavität jeweils 20 µl WST-1 zugegeben (Verdünnung 1:10). Anschließend wurden die Zellen für 30 – 45 min im Brutschrank inkubiert, bevor die Absorption bei 450 nm bestimmt wurde.

## 2.6. Apoptosenachweis mit Apo-ONE®

Bei dem Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay handelt es sich um einen fluoreszenzbasierten Assay. Dieser Assay diente in erster Linie zur Überprüfung, ob es sich bei dem beobachteten Phänotyp bei MDCK-f3 Zellen um Rücktransformation handelt. Das Abrunden der Zellen während der Apoptose kann auf den ersten Blick leicht als Rücktransformation missgedeutet werden.

Der mitgelieferte Puffer lysiert die Zellen und schafft die optimalen Bedingungen für den Nachweis der Caspase 3/7 Aktivität. Als Substrat dient Rhodamin 110, bis-(N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-L-Asparginsäureamid; Z-DEVD-R110). Hierbei handelt es sich um ein Substrat welches durch die Caspase 3/7 in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt wird (Abb. 2.3). Durch Anregung bei 499 nm lässt sich ein Anstieg der Fluoreszenz bei 521 nm messen (Alnemri *et al.*, 1996).



**Abbildung 2.3:** Abspaltung der Z-DEVD Sequenz vom Rhodamin durch Caspase-3/7.

## Durchführung

- Pro Kavität  $3 \times 10^3$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  aussäen und über Nacht wachsen lassen, drei Kavitäten bleiben dabei frei ('Blank'-Kontrolle)
- Substanz in den zu untersuchenden Konzentrationen (standardmäßig 50, 25 und 10  $\mu\text{M}$ ) zugeben. Als Negativkontrolle wird nur DMSO zugegeben, als Positivkontrolle dient Staurosporin. Jede Probe wird doppelt bestimmt. Erneut über Nacht inkubieren
- Substrat mit Puffer 1:100 verdünnen, 100  $\mu\text{l}$  pro Kavität zugeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren und anschließend messen

## Puffer und Lösungen

Mit Ausnahme des Zellmediums, entstammten alle verwendeten Puffer dem Apo-ONE® Assay Kit.

## 2.7. APT1 Inhibitions- und Aktivitätsassays

Für alle hier vorgestellten Versuche wurde rekombinantes, humanes APT1 verwendet. Das aufgereinigte Protein wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Jürgen Kuhlmann (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt.

### 2.7.1. Acylierungs Assay

Der Einfluß von APT1 auf die nicht-enzymatische Acylierung wurde mit Hilfe eines radioaktiv markierten Palmitoyl-CoenzymA (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Christiane Kleuss, Charité Berlin) überprüft.

Als Palmitoylakzeptor diente ein palmitolyierbares H-Ras Konstrukt. Die erfolgte Palmitoylierung läßt sich anschließend über die Messung der Radioaktivität mit einem 'Phospho-Imager' überprüfen. Analog zur Detektion mit einem Röntgenfilm und einer Luminolreaktion (s.a. 2.8.4.) wird hier die Radioaktivität von einem Film detektiert, welcher aus Phosphorkristallen besteht. Die radioaktive Strahlung versetzt die Kristalle

in einen stabilen angeregten Zustand. Ein Laserscanner versetzt die Kristalle nun in einen noch stärkeren, aber instabilen Anregungszustand. Die frei werdende Energie beim Rückfall auf das geringere Energieniveau wird dann erfasst und mit dem Computer sichtbar gemacht.

Diese Methode ist deutlich empfindlicher als die herkömmliche Westernblot-Detektion mit einem Antikörper und einer Luminolreaktion.

Vor der Detektion wurde die Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und getrocknet.

### **Durchführung**

- 1 mM PalmitoylCoenzymA mit 20  $\mu$ M H-Ras in Abwesenheit oder in Anwesenheit von 10  $\mu$ M APT1 inkubieren
- Nach 5, 10, 30 und 60 min jeweils 2  $\mu$ l entnehmen und die Reaktion mit 10  $\mu$ l 1x Laemmlipuffer stoppen
- Nach erfolgter Gelelektrophorese und anschließendem Westernblot Membran 2 h im Trockenschrank bei 40°C trocknen
- Membran über Nacht entwickeln und anschließend mit einem PhosphorImager auswerten

### **Puffer und Lösungen**

#### APT1-Lagerunspuffer

50 mM Tris

150 mM NaCl

5 mM DTT

1 mM EDTA

pH 8

in H<sub>2</sub>O

#### H-Ras Stammlösung

1mM H-Ras in

50 mM Tris

150 mM NaCl

5 mM DTT

1 mM EDTA

pH 8  
in H<sub>2</sub>O

#### Assaypuffer

15 mM CHAPS  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 6.8  
in H<sub>2</sub>O

#### PalmitoylCoenzymA Stammlösung

10 mM PalmitoylCoenzymA mit 10<sup>3</sup> cpm/μl in  
20 mM HEPES  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7.4  
in H<sub>2</sub>O

### 2.7.2. ADIFAB Assay

Zur Untersuchung der Aktivität von APT1 wurde u.a. ADIFAB (AcryloDated Intestinal Fatty Acid Binding protein) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein fluoreszenzmarkiertes Protein, welches in der Lage ist freie Fettsäuren zu binden. Die Bindung der Fettsäure führt zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 432 nm nach 505 nm (Anregungswellenlänge: 365 nm). Anhand des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten bei den beiden Wellenlängen lässt sich die Konzentration der freien Fettsäuren mit folgender Formel berechnen (Richieri *et al.*, 1999):

$$[\text{FFA}] = K_d Q (R - R_0) / (R_{\text{max}} - R)$$

FFA = Konzentration an freier Fettsäure

K<sub>d</sub> = Dissoziationskonstante von Palmitinsäure = **0.32 μM**

Q = Verhältnis von minimaler Fluoreszenzintensität (F<sub>0</sub>, keine Fettsäure gebunden) zu maximaler Fluoreszenzintensität (F<sub>max</sub>, ADIFAB mit Fettsäure gesättigt) bei 432 nm = **19.5**



R = Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 505 nm und 432 nm

( $F_{505}/F_{432}$ )

$R_0$  = Verhältnis  $F_{505}/F_{432}$  in Abwesenheit von freien Fettsäuren

$R_{\max}$  = Verhältnis  $F_{505}/F_{432}$  bei vollständiger Sättigung = **11.5**

### Durchführung

- Blankmessung (Assaypuffer mit 1  $\mu$ M Peptid) für 10 Zyklen (1 Zyklus = 4 Messungen  $\equiv$  ca. 13 min.)
- Zugabe von 100 nM ADIFAB und Inkubation für 30 min (Stabilisierung des Signals), Messung für weitere 10 Zyklen
- Zugabe von 1  $\mu$ M APT1 und Inkubation für 60-70 Zyklen, bis das Signal in Sättigung geht

### Puffer und Lösungen

#### APT1-Lagerungspuffer

50 mM Tris

150 mM NaCl

5 mM DTT

1 mM EDTA

pH 8

in H<sub>2</sub>O

#### Assaypuffer

20 mM HEPES

150 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH 7.4

in H<sub>2</sub>O

Vor Gebrauch für 30 min unter Argon im Ultraschallbad entgasen !

#### Peptid-Stammlösung

C-Terminus von H-Ras (synthetisiert in L- und D-Konfiguration):

Ac-Met-Ser-Cys(Pal)-Lys-Cys(Far)-OCH<sub>3</sub>

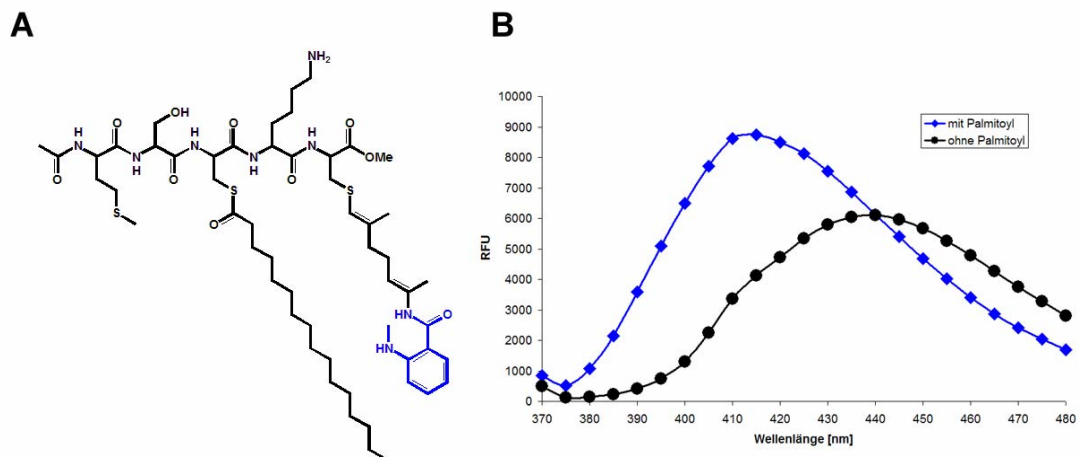
10 mM in DMSO (Dimethylsulfoxid)

ADIFAB-Stammlösung

13  $\mu\text{M}$  ADIFAB in  
 50 mM Tris  
 1 mM EGTA  
 0,05 %  $\text{NaN}_3$   
 pH 7.4  
 in  $\text{H}_2\text{O}$

**2.7.3. GeranylMant Assay**

Während für die Untersuchung der Depalmitoylierungsaktivität von APT1 ADIFAB verwendet wurde, diente ein fluoreszenzmodifiziertes Substratpeptid (Kuhn *et al.*, 2001) als direkter Indikator für die Palmitoylierungsaktivität. Hierbei wurde das Farnesyl durch ein GeranylMant ersetzt (Abb. 2.4A). Das Anfügen des Palmitoyls führt zu einer Verschiebung des Intensitätsmaximums von 440 nm nach 410 nm (Anregungswellenlänge: 350 nm, Abb. 2.4B).



**Abbildung 2.4:** Fluoreszenzmarkiertes Peptid zur APT1-Aktivitätsmessung. **A:** Struktur des Pentapeptids; blau: fluoreszierende Mant-Einheit am Geranyl; **B:** blaue Rauten: Spektrum des Peptids mit Palmitoyl; schwarze Kreise: Spektrum des Peptids ohne Palmitoyl.

## **Durchführung**

Bevor APT1 zugegeben wurde, wurde zunächst eine Blankmessung mit 10  $\mu$ M Palmitat und 10 nM Peptid für 10 Zyklen in Assaypuffer vorgenommen. Danach wurde 10 nM APT1 zugegeben und für 70 – 80 Zyklen weitergemessen.

## **Puffer und Lösungen**

### Assaypuffer

Wie ADIFAB-Assaypuffer + 10% DMSO

### Peptid-Stammlösung

C-Terminus von H-Ras:

Ac-Met-Ser-Cys-Lys-Cys(GerMant)-OCH<sub>3</sub>

10 mM in DMSO

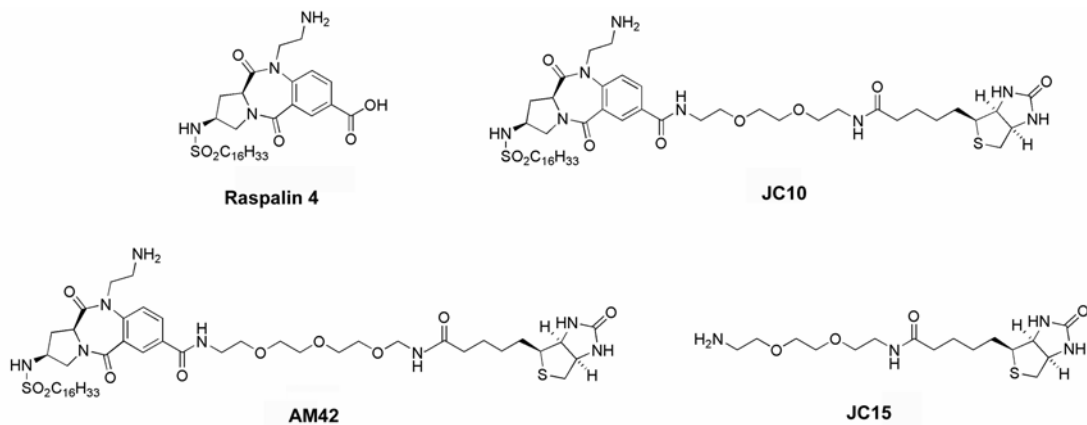
### Palmitat-Stammlösung

1 mM Palmitinsäure in DMSO

## 2.8. Proteinbiochemische Methoden

### 2.8.1. Affinitätsaufreinigung mit Raspalinderivaten

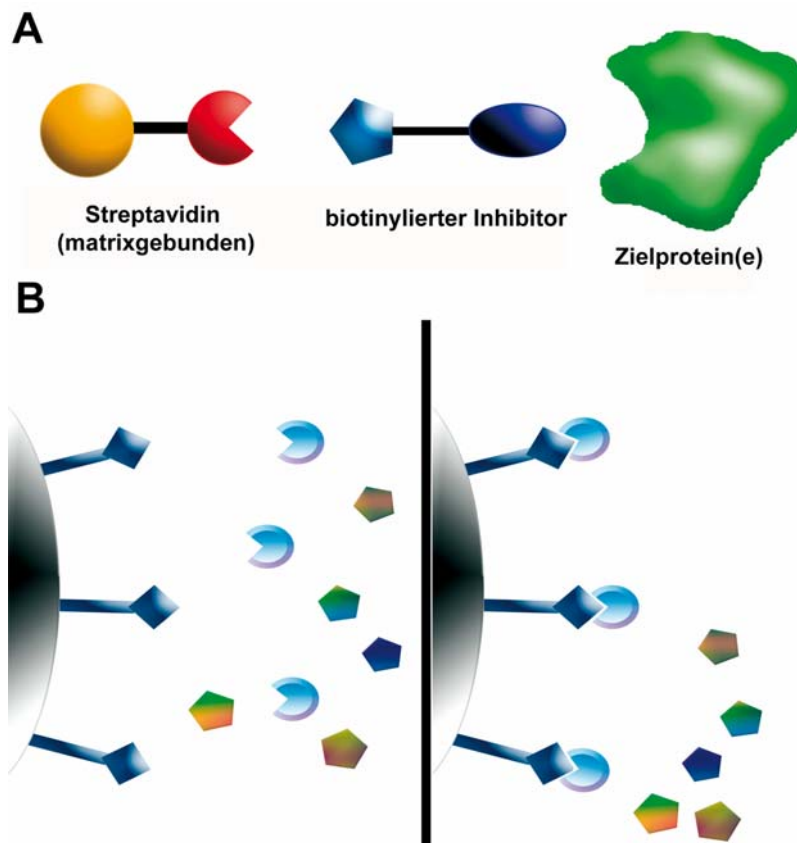
Um die zellulären Ziele der Raspaline zu bestimmen, wurden, basierend auf **Raspalin 4**, die biotinylierten Derivate **JC10** und **AM42** synthetisiert. Der Unterschied zwischen diesen Derivaten besteht in der Länge der Polyethylglykollinker (PEG-Linker): Derivat **JC10** besitzt zwei und Derivat **AM42** drei PEG Einheiten. Darüberhinaus wurde **JC15**, welches lediglich aus zwei PEG Einheiten und dem Biotin steht, als Kontrolle verwendet (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5:** Strukturen der verwendeten Benzodiazepinderivate. **oben links:** Raspalin 4, Benzodiazepin mit Palmitoyl und freier Säurefunktion; **oben rechts:** JC10, Raspalin 4 über die Säurefunktion mit zwei PEG-Einheiten an Biotin gekoppelt; **unten links:** AM42, Raspalin 4 über die Säurefunktion mit drei PEG-Einheiten an Biotin gekoppelt; **unten rechts:** JC15, Biotin mit zwei PEG-Einheiten.

Das Prinzip der Affinitätsaufreinigung basiert zum einen auf der Affinität des Inhibitors zu seinen zellulären Zielproteinen und zum anderen auf der Affinität des Biotins zu Streptavidin (Abbildung 2.6A). Diese entspricht fast einer kovalenten Bindung ( $K_d = 10^{-16}$  M).

Das Streptavidin ist zusätzlich kovalent an magnetische Partikel gebunden, um die anschließende Aufreinigung zu erleichtern (Abbildung 2.6B).



**Abbildung 2.6:** Prinzip der Affinitätsaufreinigung. **A:** v.l.n.r.: matrixgebundenes Streptavidin, Inhibitor an Biotin gekoppelt; Inhibitor bindet an Zielprotein und Biotin an Streptavidin; **B:** immobilisierter Inhibitor wird mit Lysat inkubiert, nach dem Waschen bleiben Zielproteine am Inhibitor gebunden.

Da auch in der Zelle Biotin und biotinylierte Proteine vorkommen, wurde die Konjugation vor dem Pulldown vorgenommen, um unspezifische Bindung zu minimieren.

Je nach Experiment wurde das Verhältnis von Streptavidinpartikeln zu Lysat variiert. In der Regel wurden für Gelelektrophoretischen Analysen Lysat und Partikel im Verhältnis 1:1 und für die ESI-HPLC MS/MS Analysen 2:1 verwendet. Für die Gelelektrophorese wurden meist 500  $\mu$ l Lysat verwendet. Auf eine Proteinbestimmung wurde hier verzichtet, da das Lysat unverdünnt verwendet wurde, um möglichst auch schwächere Banden erkennen zu können. Für die ESI-HPLC MS/MS Analyse, wurde zuvor eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt, um die Proben miteinander vergleichen zu können.

## Durchführung

- Benötigte Menge Streptavidinpartikel entnehmen und für 5 min in Magnetständer stellen, um die Partikel aus der Lösung zu entfernen
- Lagerlösung entfernen und gleiche Menge einer 10  $\mu\text{M}$  Lösung des jeweiligen Derivates in PBS zugeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Partikellösung erneut für 5 min auf den Magnetständer stellen, Lösung entfernen
- Partikel 2x kurz mit PBS-T waschen
- Lysat zugeben und für 1 h auf Eis inkubieren und schütteln
- Lysat entfernen und Partikel 4x für 5 min mit Waschpuffer waschen. Beim Direktverdau werden die Partikel noch 2x kurz mit Verdaulösung gewaschen (Entfernung von Detergenzien)
- Pro 100  $\mu\text{l}$  verwendetem Lysat 10  $\mu\text{l}$  Laemmli-Puffer zugeben, vortexen und für 5 -7 min bei 95°C eluieren

## Puffer und Lösungen

### Waschpuffer

Lysepuffer (s. 1.7.1.) + 100 mM  $\text{MgCl}_2$   
in  $\text{H}_2\text{O}$

### Verdaulösung (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Trypsin)

0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Trypsin-Stock (in 10 mM HCl) 1:10 in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  verdünnt  
in  $\text{H}_2\text{O}$

## 2.8.2. SDS-PAGE (Sodium-dodecyl-sulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis)

Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese basiert auf der Trennung von Proteinen anhand ihrer Größe in einer Gelmatrix aus Polyacrylamid. Große Proteine wandern in einem elektrischen Feld langsamer durch die Gelmatrix als kleine Proteine, da sie die Gelmatrix schwerer passieren können. Um den Einfluss der Eigenladung der Proteine zu minimieren, werden die Proteine durch Erhitzen denaturiert. Der

Probenpuffer enthält zusätzlich SDS, welches Mizellen bildet, in die die Proteine eingeschlossen werden. Dadurch erhält das Protein eine negative Nettoladung, sodass hauptsächlich die Größe die Wanderungsgeschwindigkeit bedingt. Die hier verwendete Methode basiert auf der von Laemmli (Laemmli, 1970). Für diese Arbeit wurde sowohl das Miniprotean 3 System, als auch das Protean XL System von BioRad verwendet. Für die Evaluierung der Affinitätsaufreinigungsexperimente und für Westernblots wurde neben den selbstgegossenen Gelen auch gebrauchsfertige 15%-ige, sowie Gradientengele von BioRad verwendet.

### **Durchführung**

- Trenngel in die Apparatur füllen mit Ethanol überschichten und für etwa 15 min polymerisieren lassen
- Ethanol vorsichtig mit einem Papiertuch absaugen und Sammelgel einfüllen, Kamm vorsichtig einsetzen (Luftblasen vermeiden !) und für 30 min auspolymerisieren lassen
- Proben vorsichtig in die Geltaschen füllen (20 µl beim Minigel, 50 µl beim XL-Gel)
- Proben für 10 min in das Gel einlaufen lassen (20 mA für Minigele, 40 mA für XL-Gele)
- 1-1.5 h bei konstanter Stromstärke laufen lassen (40 mA für Minigele, 60 mA für XL-Gele, Anm.: Laufzeit XL-Gele: 4-6 h)
- Gel aus der Apparatur entfernen und in Coomassie Färbelösung für 45 – 60 min färben
- Färbelösung abgießen, Entfärber zugeben und über Nacht entfärben

### **Puffer und Lösungen**

#### 4x Trenngelpuffer

1.5 M Tris-Cl, pH 8.8

#### 4x Sammelgelpuffer

0.5 M Tris-Cl, pH 6.8

#### SDS-Stammlösung

10% SDS in H<sub>2</sub>O

Ammoniumpersulfat(APS)-Stammlösung

10% in H<sub>2</sub>O

10x Laufpuffer

0.25 M Tris

1.92 M Glycine

1% SDS

in H<sub>2</sub>O

2x Probenpuffer

125 mM Tris-Cl

4% SDS

20% Glycerol

5 mM DTT

in H<sub>2</sub>O

Färbelösung

0.1% Coomassie Brilliant Blue G-250

20 % Methanol

10% Eisessig

in H<sub>2</sub>O

Entfärber

20% Methanol

10% Eisessig

in H<sub>2</sub>O



### 2.8.3. Tryptischer Verdau

Um die Proteine aus der Affinitätsaufreinigung identifizieren zu können, wurden diese tryptisch verdaut. Trypsin ist eine Endopeptidase und gehört zu den Serinproteasen. Trypsin spaltet Peptidbindungen regioselektiv c-terminal von Arginin und Lysin, es sei denn, es folgt ein Prolin. Das pH-Optimum von Trypsin liegt bei 8-9, die Verwendung von Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) als Verdauopuffer sorgt für diesen pH-Wert. Da jedes Protein unterschiedlich viele Arginine und Lysine besitzt, erzeugt der Verdau ein Proteinspezifisches Peptidmuster, einen sogenannten Peptidmassen-Fingerabdruck, welcher mit dem MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) erfasst werden kann.

Mit Hilfe von ESI (Electrospray Ionisation)-MS/MS Analysen lassen sich darüberhinaus auch die Peptidsequenzen aufschlüsseln, was eine exaktere Analyse ermöglicht (s.a. 2.8.4. und 2.8.5.).

#### Durchführung

##### in-Gel Verdau

- Gelstücke ausschneiden, in etwa 1-2 mm große Stücke zerteilen und 30 min in 200  $\mu\text{l}$  (Menge gilt für 5-10 mm breite Banden) Waschlösung 1 bei 37°C schütteln
- Waschlösung 1 entfernen, durch Waschlösung 2 ersetzen und für 15 min bei 37°C schütteln (Sollten die Gelstücke noch nicht vollständig entfärbt sein, wird erneut für 15 min mit Waschlösung 1 gewaschen)
- Waschlösung entfernen, 100  $\mu\text{l}$  Reduktionslösung zugeben und bei 37°C für 45 min schütteln
- Reduktionslösung entfernen, durch 100  $\mu\text{l}$  Alkylierungslösung ersetzen und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur schütteln
- Alkylierungslösung entfernen und 2x 15 min mit 200  $\mu\text{l}$  Waschlösung 2 waschen
- Waschlösung entfernen, 50  $\mu\text{l}$  Acetonitril zugeben und für 10 min dehydrieren
- Acetonitril entfernen und Gelstücke im Abzug für 5 – 10 min trocknen

- 10 – 15 µl (je nach Größe der Gelstücke, die Gelstücke sollten vollständig quellen) Verdaulösung zugeben und 15 min bei Raumtemperatur quellen lassen
- 20 µl Verdaulösung ohne Trypsin zugeben und über Nacht bei 30°C schütteln
- Gelstücke für 30 min im Ultraschallbad inkubieren, danach 3,5 µl 10% Trifluoressigsäure zugeben und weitere 30 min im Ultraschallbad inkubieren.
- Proben mit PerfectPure C<sub>18</sub>-Tips von Eppendorf nach Angaben des Herstellers aufkonzentrieren, in 2 µl Matrix eluieren und auf eine MALDI-Platte auftragen

### **Direktverdau (´on-bead´-Verdau)**

- nach 2-maligem Waschen mit Verdaupuffer wird je nach Proteinkonzentration und Menge der Partikel 50-100 µl Verdaulösung zugegeben
- Partikel durch kurzes Vortexen in Verdaulösung resuspendieren und über Nacht bei 30°C inkubieren
- Partikel auf Magnetständer stellen und für 15 min stehen lassen (Partikel müssen vollständig aus der Lösung entfernt werden !)
- 10 – 20 µl für die ESI MS/MS Analyse entnehmen

### **Puffer und Lösungen**

#### Waschlösung 1

25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O/Acetonitril 3:1

#### Waschlösung 2

25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O/Acetonitril 1:1

#### Reduktionslösung

50 mM DTT gelöst in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>  
in H<sub>2</sub>O

### Alkylierungslösung

55 mM Jodacetamid in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$   
in  $\text{H}_2\text{O}$

### Verdauungslösung

0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Trypsin in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$   
in  $\text{H}_2\text{O}$

### Matrix

10 mg/ml  $\alpha$ -Cyano-Zimtsäure in  $\text{H}_2\text{O}$ /Acetonitril/Isopropanol (2:1:1)

## **2.8.4. Western Blot**

Bei dem Western Blot oder auch Immunoblot werden Proteine mit einem Antikörper nachgewiesen. Hierzu werden die zuvor gelelektrophoretisch getrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose- oder Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran übertragen. Für den Transfer wurde das Transblot-System von Biorad verwendet, bei welchem nur die Membran, das Gel und die Filterpapiere, welche den Kontakt zu den Elektroden herstellen, mit Puffer getränkt werden. Der Nachweis erfolgte mit einem Zwei-Antikörper-System. Hierzu wurde die Membran mit dem primären Antikörper gegen das Protein von Interesse inkubiert. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper zugegeben, welcher spezifisch gegen den primären Antikörper ist. Dies führt zu einer Signalverstärkung und damit zu einer höheren Empfindlichkeit. Der sekundäre Antikörper ist zudem mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Gibt man nun  $\text{H}_2\text{O}_2$  und ein Substrat, in diesem Fall Luminol hinzu, läßt sich die durch die Reaktion entstehende Luminiszenz mit einem Röntgenfilm festhalten und so das Protein detektieren.

## Durchführung

- Gel aus der Gelelektrophoresekammer entfernen, vorsichtig zwischen den Scheiben herauslösen und kurz mit Wasser waschen
- PVDF Membran zurecht schneiden und für 20 sek in Methanol aktivieren
- Gel und Membran für 20 min in Blotpuffer inkubieren
- Filterpapier mit Blotpuffer vollsaugen lassen
- Ein Filterpapier auf die untere Elektrode legen, Membran auflegen und vorsichtig mit einem Reagenzglas Blasen herausstreichen
- Gel vorsichtig auf die Membran auflegen und erneut Blasen herausstreichen, zweites Filterpapier auflegen und mit leichtem Druck anpressen
- Obere Elektrode auflegen, Apparatur schließen und für 40 min bei konstanten 20 V Proteine transferieren
- Apparatur öffnen und Membran vorsichtig ablösen und für 30 – 60 min in Färbelösung schütteln
- Färbelösung entfernen und 30 – 60 min auf dem Schüttler blockieren (Blockierlösungen variieren mit verwendetem Antikörper, s. Puffer und Lösungen)
- Blockierlösung entfernen, primären Antikörper zugeben und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubieren
- Antikörperlösung entfernen und 3x 10 min mit TBS-T waschen
- Sekundären Antikörper zugeben und 1 - 4 h bei Raumtemperatur inkubieren
- Antikörperlösung entfernen und erneut 3x 10 min mit TBS-T waschen
- Substratlösung zugeben und für 5 min inkubieren
- Membran aus der Lösung nehmen und kurz abtropfen lassen
- Membran in eine Belichtungskassette zusammen mit einem Röntgenfilm legen für 1 – 30 min (je nach Stärke des Signals) belichten
- Film entwickeln und fixieren

In einigen Fällen waren mehr als nur ein Protein von Interesse. Um größtmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Membranen von den Antikörpern befreit ('gestrippt'). Hierzu wurden die Membranen für 2-4 min mit 'Stripping'-Puffer gewaschen und nach zweimaligem Waschen mit A. dest. mit weiteren Antikörpern behandelt.

### **Puffer und Lösungen**

#### TBS

100 mM Tris-Cl

150 mM NaCl

pH 7.5

in H<sub>2</sub>O

#### TBS-T

0,1 Tween 20 in TBS

#### Färbelösung

0,1 % Tusche in TBS-T

#### Blockierlösung

Für phospho-Antikörper (pMEK und pERK, pElk) 3% SlimFast (Schoko) in TBS-T

Für APT1-Antikörper 3% SlimFast in TBS-T

#### Primäre Antikörperlösungen

pMEK 1:2000 in 1,5% SlimFast in TBS-T

pERK 1:2000 in 1,5% SlimFast in TBS-T

pElk 1:500 in 1,5% SlimFast in TBS-T

APT1 1:10000 in TBS-T

#### Sekundärer Antikörper

Ziege Anti-Kaninchen Meerrettichperoxidase konjugiert 1:15000 in TBS-T

### Substratlösung

Super Signal West Pico Enhancer Lösung 1:1 mit Super Signal West Pico Peroxid Lösung mischen

### ‘Stripping’ - Puffer

7 M Guanidin Hydrochlorid

50 mM Glycin

0,05 mM EDTA

0,1 mM KCl

20 mM Mercaptoethanol (erst kurz vor Gebrauch zugeben)

pH 10.8

in H<sub>2</sub>O

## **2.8.5. MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionisation-Time of flight) Massenspektrometrie**

Die Massenanalyse mit Hilfe des MALDI-TOF bietet eine effektive bioanalytische Methode zur Untersuchung verschiedener biologischer Fragestellungen (Hillenkamp und Karas, 1990).

Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Desorption und der Ionisierung der Probe zusammen mit einer sogenannten Matrix durch einen UV-Laser und der Bestimmung der Flugzeit der erzeugten Ionen. Hierbei absorbiert die Matrix die Energie des Lasers, was zu einer explosionsartigen Desorption von Matrix und Probe von der MALDI-Platte führt. Es kommt zur Entstehung eines kurzlebigen Plasmas, welches aus neutralen und positiv geladenen Matrixteilchen, sowie neutralen Probenpartikeln besteht. In diesem Plasma kollidieren die positiv geladenen Matrixteilchen (Matrixionen) mit neutralen Probenpartikeln und übertragen so ihre positive Ladung auf die Probe. So entstehen hauptsächlich einfach positiv geladene Probenionen. Die erzeugten Probenionen werden nun durch Anlegen eines starken elektrischen Feldes beschleunigt, wobei das elektrische Feld meist etwas zeitverzögert angelegt wird. Da alle Ionen mit der gleichen Energie im feldfreien Raum beschleunigt werden, erreichen kleinere Ionen den Detektor früher als größere, aufgrund ihrer höheren Geschwindigkeit.

Die Ionisation mit sehr großer Energie hat allerdings auch zur Folge, dass Probenionen spontan zerfallen. Geschieht dies nach der Ionisierung im feldfreien Raum, führt dies zu sehr breiten Signalen, da eine Wolke aus Fragmenten zeitgleich auf den Detektor trifft.

Um dieses Problem zu umgehen, schaltet man einen Reflektor vor den Detektor, welcher in der Lage ist, nicht-fragmentierte Probenionen zu fokussieren. Dadurch erhält man starke, gut abgegrenzte Signale.

Da das Signal nicht nur vom jeweiligen Massenspektrometer abhängt, sondern auch von der verwendeten Matrix und der Beschaffenheit der MALDI-Platte, kann dies zu unerwünschten Abweichungen führen. Um solche Material bedingten Fehler auszugleichen, werden interne Standards, welche der Probe zugegeben werden, oder externe Standards, welche in der Nähe der Probe aufgebracht werden, verwendet. Bei den Standards handelt es sich meist um Peptidfragmente mit bekannter Masse, anhand welcher im nachhinein eine Kalibrierung des erhaltenen Massenspektrums vorgenommen wird.

### **Durchführung**

Pro Probe wurden jeweils 2 µl zusammen mit 1 µl Standard in nächster Nähe zur Probe aufgetragen.

Die gewählten Einstellungen des MALDI waren wie folgt:

Method:	Peptidereflector1-2k.bic
Accelerating:	20000 V
Grid:	76 %
Guide Wire:	0.002 %
Delay Time:	100 nsec
Shots/Spectrum:	200
Mass Range:	800 – 3000 Da

### **Auswertung**

Die aufgenommenen Spektren wurden mit dem Data Explorer Version 5.1 ausgewertet. Zunächst wurden die Spektren mit Hilfe der Kalibrierfunktion und den dafür aufgenommenen Kalibrierungsspektren korrigiert. Mit Hilfe einer Liste (s. Anhang 9.2.) von häufigen Kontaminationsmassen wurden nur solche Signale für die Auswertung verwendet, welche nicht in dieser

Liste waren und ein klares Isotopenmuster (mindestens zwei klare Signale mit einem Abstand von einer Masse) aufwiesen.

Die Liste der so erhaltenen Massen wurde in die Mascot Suchmaschine eingegeben ([http:// www.matrixscience.com /cgi/search\\_form. pl? FORMVER =2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)). Die gewählten Einstellungen waren wie folgt:

Database: SwissProt und/oder NCBI

Taxonomy: Rodents

Enzyme: Trypsin

Missed Cleavages: 0

Fixed Modifications: keine

Variable Modifications: Carbamidomethyl (C)

Peptide tolerance  $\pm$ : 0.5 Da

Bei diesen Einstellungen liegt die Signifikanzgrenze bei 56. Diese Punktzahl resultiert aus folgender Formel:  $-10\text{Log}(P)$ , wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass es sich bei dem gefundenen Treffer um eine zufällige Übereinstimmung handelt. Das wiederum bedeutet, dass jeder Treffer, der diese Punktzahl erreicht oder überschreitet mit 95%iger Wahrscheinlichkeit ein echter Treffer ist ( $p < 0.05$ ).

Zunächst wurde in der Swissprot Datenbank gesucht. In einigen Fällen wurde darüberhinaus auch in der NCBI Datenbank gesucht, wenn das Ergebnis der ersten Suche keine plausiblen Ergebnisse brachte ( $\rightarrow$  Mögliches Fehlen des gefunden Proteins in der Datenbank).

### **2.8.6 HPLC-ESI (High performance liquid chromatography - Electrospray ionisation) Massenspektrometrie**

Bei der Elektrospray Ionisierung wird die Probenlösung in ein elektrisches Feld dispersiert. Dadurch entsteht ein Sprühnebel aus stark geladenen Tröpfchen. Darüberhinaus wird dieser Nebel durch eine beheizte Kapillare geleitet, bevor sie ins Vakuum übertritt, sodass das Lösungsmittel verdunstet. Durch das Vakuum im Massenspektrometer verringert sich das Volumen der Tröpfchen weiter und die Partialladung



nimmt entsprechend zu. Über eine Ionenoptik werden die Ionen in eine lineare Quadrupolfalle fokussiert und dort durch Anlegen einer Radiofrequenz mit großer Frequenzbreite und geringer Amplitude festgehalten. Sobald die Ionenfalle voll ist, also eine festgelegte Ladungsdichte erreicht ist, wird der Ionenstrahl blockiert und eine weitere stark fokussierte Frequenz hoher Amplitude wird an die Falle angelegt. Ionen, welche mit dieser Frequenz resonieren werden aus der Falle herauskatapuliert und landen im Detektor. Auf diese Weise wird ein Spektrum im Massenbereich zwischen 600 – 2000 Dalton aufgenommen. Von Signalen mit einer Intensität von mehr als 10000 'counts' wird dann zusätzlich ein MS/MS Spektrum aufgenommen.

Die Aufnahme eines MS/MS ist möglich, weil die milden Ionisationsbedingungen eine spontane Fragmentierung verhindern. Um eine kontrollierte Fragmentierung zu erzielen wird zunächst eine einzelne Frequenz angelegt und deren Amplitude langsam erhöht, dadurch werden die Ionen zunächst nicht aus der Falle herausgeschleudert, sondern sie beginnen zu oszillieren. Die Falle ist mit Helium gefüllt, mit welchem die Ionen nun kollidieren. Durch gezielte Variation der Frequenzamplitude läßt sich die Kollisionsenergie so regulieren, dass die Ionen kontrolliert fragmentieren.

Im Fall von Peptiden wird die Energie meist so gewählt, dass hauptsächlich die Peptidbindungen fragmentieren. Die so erhaltenen Fragmente werden nach der Nomenklatur von Roepstorff (Roepstorff und Fohlman, 1984) als b- und y-Serie bezeichnet. Bei der b-Serie tragen die Fragmente die Ladung in der N-terminalen Region, entsprechend befindet sich die Ladung bei der y-Serie in der C-terminalen Region.

Obwohl eine Probe auch direkt ionisiert werden kann, erfolgt zunächst meist eine Auftrennung über eine HPLC, da dies die Auflösung von komplexen Proben mit einer großen Anzahl an Proteinen bzw. Peptiden erhöht. Meist verwendet man eine C<sub>18</sub> Säule. An dieser binden die Peptidfragmente aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten und den Peptiden.

Eine Elution wird durch Veränderung des Anteiles an organischem Lösungsmittel, meist Acetonitril, erreicht. Dadurch eluieren zuerst kleine polare Peptide und zum Schluß große unpolare Peptide.

### Durchführung

Für die Versuche wurde eine Agilent HPLC Anlage mit Autosampler und UV-Diodenarray Detektor mit einem Spektralbereich von 190 – 400 nm verwendet. Die Temperatur im Autosampler betrug konstant 10°C. Bei der Säule handelt es sich um eine Waters Atlantis dC<sub>18</sub> mit einer Partikelgröße von 3 µm, einer Länge von 150 mm und einem Durchmesser von 2.1 mm. Es wurden jeweils 20 µl Probe auf die Säule gegeben und über einen Zeitraum von 85 min bei einer Flußrate von 200 µl/min eluiert. Der Lösungsmittelgradient ist in Tabelle 2.2. festgehalten.

**Tabelle 2.2.:** Lösungsmittelgradient für die Auftrennung des Peptidgemisches

<b>Zeit [min]</b>	<b>Lösungsmittel A: 0,1% Ameisensäure in H<sub>2</sub>O</b> <b>Lösungsmittel B: 0,1% Ameisensäure in Acetonitril</b>	
0 - 5	isokratisch	<b>100 % A, 0% B</b>
5 - 60	kontinuierlich	<b>40% A, 60% B</b>
60 - 70	kontinuierlich	<b>20% A, 80% B</b>
70 – 75	isokratisch	<b>20% A, 80% B</b>
75 - 76	kontinuierlich	<b>100% A, 0% B</b>
76 - 85	isokratisch	<b>100% A, 0% B</b>

### Auswertung

Die aufgenommenen Spektren wurden im Bioworks Browser überprüft und mit Hilfe von 'TurboSequestSearch' in das dta-Format umgewandelt. Dieses Format läßt sich durch ein Programm namens 'Merge MS/MS' von Finnigan, in ein anderes Dateiformat umwandeln. Diese Datei kann dann in die Suchmaschine von Mascot geladen werden ([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS)). Die Einstellungen für die Suchmaske waren wie folgt:

Database: SwissProt und/oder NCBI

Taxonomy: Rodents  
Enzyme: Trypsin  
Missed Cleavages: 0  
Fixed Modifications: keine  
Variable Modifications: unmodified  
Quantitation: none  
Peptide tolerance: 1.2 Da  
# <sup>13</sup>C: 0  
MS/MS tolerance: 0.6 Da  
Peptide Charge: +1, +2 and +3

Bei diesen Einstellungen liegt die notwendige Punktzahl für ein Erreichen der Signifikanzgrenze ( $p < 0.05$ ) bei 26.

## **2.9. Geräte und Verbrauchsmaterial**

### **2.9.1. Allgemeine Laborgeräte**

96 Kavitäten Mikrotiterplatten, F-Form, 655061 (Greiner, Solingen, D)  
BAS Reader 2.9 (Fuji Photo Film, Kanagawa, JP)  
Fluoreszenzküvetten Hellma Suprasil 104F-QS 10 mm (Roth, Karlsruhe, D)  
FluoroMAX II (SPEX Instruments, S.A., Inc., New Jersey, USA)  
Imaging Plates BAS MP 2040S (Fuji Photo Film, Kanagawa, JP)  
pH-Meter CG 840 (Schott, Mainz, D)  
Phosphoimager, BAS-1500( Fuji Photo Film, Kanagawa, JP)  
Rührer IKAMAG RH (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, D)  
Schüttler Eppendorf Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, D)  
Spektrometer Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, D)  
Spektrometer Infinite M200 (Tecan, Crailsheim, D)  
Spektrometer Multiscan Ascent (Thermo-Fischer, Waltham, USA)  
Ultraschallbad Sonorex RK 100 H (Bandelin, Möhrfelden-Wall, D)  
Vortex Genie 2 (Roth, Karlsruhe, D)  
Zentrifuge Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Hamburg, D)

### 2.9.2. Gelelektrophorese und Western Blotting

Invitrogen ZOOM® 2D-Gelsystem (Invitrogen, Karlsruhe, D)

MiniProtean 3 Gelelektrophorese System (BioRad, Hercules, USA)

Protean II xi XL Gelelektrophorese System (BioRad, Hercules, USA)

PVDF-Transfermembran, 0.45 µm, 88518 (Pierce, Rockford, USA)

Ready Gel Tris-HCl Gel, 15%, 10-well, 30 µl, 161-1103 (BioRad, Hercules, USA)

Ready Gel Tris-HCl Gel, 4–20%, 10-well, 30 µl, 161-1105 (BioRad, Hercules, USA)

Röntgenfilm, CL-Xposure, 8"x10", 34091 (Pierce, Rockford, USA)

Trans-Blot, Transferkammer, 170-3940 (BioRad, Hercules, USA)

### 2.9.3. Massenspektroskopie

C<sub>18</sub> – Säule Atlantis dC<sub>18</sub> (Waters, Milford, USA)

ESI LTQ (Thermo-Fischer, Waltham, USA)

HPLC Agilent 1100 Serie (Agilent, Santa Clara, USA)

MALDI-TOF Voyager-DE Pro (Applied Biosystems, Foster City, USA)

MALDI-Platte P/N: V700666 (Applied Biosystems, Foster City, USA)

### 2.9.4. Mikroskopie & Zellkultur

6 Kavitäten Zellkulturschale, 353046 (Falcon, Bedford, USA)

96 Kavitäten Mikrotiterplatten µClear, schwarz, F-Boden, 655097 (Greiner, Solingen, D)

96 Kavitäten Mikrotiterplatten Luminiszenz, weiß, F-Boden, 655074 (Greiner, Solingen, D)

96 Kavitäten Mikrotiterplatten, transparent, steril, 353072 (Falcon, Bedford, USA)

Inkubator Nuaire DHD Autoflow, CO<sub>2</sub>-Luftmantel Inkubator NU 5510 E (Nuaire, Fernwald, D)

Kamera CoolSnap ES (Roper Scientific Photometrics, Tucson, USA)

Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena)

Mikroskop Labovert (Leitz, Wetzlar, D)  
Neubauer Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D)  
Sterilbank Microflow (NuncNalge, Rochester, USA)  
Wasserbad Memmert (Hettich AG, Bäch, CH)  
Zellkulturschale 75 cm<sup>2</sup>, 353136 (Falcon, Bedford, USA)  
Zentrifuge

### 2.9.5. Reagenzien

1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT), 1008 (Gerbu, Gaiberg, D)  
2-Mercaptoethanol, 28625 (Serva, Heidelberg, D)  
 $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure, C8982 (Sigma, Steinheim, D)  
Acetonitril, 9017 (J.T. Baker, Deventer, NL)  
Acrylamid 4K-Lösung 30%, Mix 37,5 : 1, A1672 (AppliChem, Darmstadt, D)  
ADIFAB, A3880 (Molecular Probes, Karlsruhe, D)  
Aminosäuren, nicht-essentiell, 100x, 11140 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)  
Ammoniumpersulfat, 13375.01 (Serva, Heidelberg, D)  
Adenosintriphosphat (ATP) A7699 (Sigma Steinheim, D)  
Bromphenol Blau, B0126 (Sigma, Steinheim, D)  
Coelestin Blau C7143 (Sigma, Steinheim, D)  
Coenzym A, C3144 (Sigma, Steinheim, D)  
Collagen R, 47254 (Serva, Heidelberg, D)  
Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor, 11836170001 (Roche, Penzberg, D)  
Coomassie Brilliant Blau G-250, 17524.02 (Serva, Heidelberg, D)  
DAPI dilaktat, D9564 (Sigma, Steinheim, D)  
Dimethylsulfoxid (DMSO), 26385 (Serva, Heidelberg, D)  
Eisenammoniumalaun,  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ , 221260 (Sigma-Aldrich, Steinheim, D))  
Epidermal Growth Factor (EGF), 13247- 051 (Invitrogen, Karlsruhe, D)  
Ethylidiamin Tetraacetat (EDTA), 1034 (Gerbu, Gaiberg, D)  
Ethylenglycol-bis(2-Aminoethylether)N, N, N', N'- Tetraessigsäure (EGTA), E3889 (Sigma, Steinheim, D)  
G 418, G81168 (Sigma, Steinheim, D)

Glycerol 99%, 15523 (Riedel-de Haen, Seelze, D)  
HEPES Natriumsalz, 25249 (Serva, Heidelberg, D)  
Hygromycin, 56682 (Fluka, Steinheim, D)  
Jodacetamid, I1149 (Sigma, Steinheim, D)  
Kälberserum, 10270 – 106 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)  
KCl, 0509 (J.T. Baker, Deventer, NL)  
Kim's Ink Liquid No. 29 (Idee-Creativ, Bochum, D)  
Luziferin, E1602 (Promega, Mannheim, D)  
Medium DMEM, 1x, 41965 (GIBCO, Karlsruhe, D)  
MgCl<sub>2</sub>, 0162 (J.T. Baker, Deventer, NL)  
MgSO<sub>4</sub>, 63136 (Fluka, Steinheim, D)  
NaCl, 71379 (Fluka, Steinheim)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1.06580.0500 (Merck, Darmstadt, D)  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 191442 (ICN Biomedicals, Aurora, USA)  
Natriumdodecylsulfat (SDS-b), (Gerbu, Gaiberg, D)  
Natriumpyruvat MEM, 100 mM, 11360-039 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)  
Nerve Growth Factor (NGF 7s, Maus), 100 µg, 01-170 (Upstate-Millipore, Billerica, USA)  
NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 09830 (Fluka, Steinheim, D)  
N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED), T9281 (Sigma, Steinheim, D)  
NP-40, 492015 (Calbiochem, Darmstadt, D)  
Penicillin-Streptomycin-Lösung, P 4333 (Sigma, Steinheim, D)  
Pferdeserum, 16050 – 122 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)  
Phalloidin-TRITC, P1951 (Sigma, Steinheim, D)  
PIPES, P1851 (Sigma, Steinheim, D)  
Precision Plus Dual Color Molekulargewichts Standard, 161-0374 (BioRad, Hercules, USA)  
Qproteome Kit, 60522010 (Quiagen, Hilden, D)  
Rinderserum Albumin (BSA), A7906 (Sigma, Steinheim, D)  
Sequazyme Peptide Mass Standard Kit, Kalibrierungslösungen 1 & 2, P2-3143-00 (Applied Biosystems, Foster City, USA)  
SlimFast Schoko (Allpharm Vertriebs GmbH, Messel, D)

Streptavidin Magnetpartikel, 4 mg/ml, S1420S (New England Biolabs, Ipswich, USA)

SNAP Silver Stain Kit for Mass Spectrometry, 24600 (Pierce, Rockford, USA)

Super Signal West Pico Luminol Enhancer Lösung, 1856136 (Pierce, Rockford, USA)

Super Signal West Pico Peroxide Lösung, 1856135 (Pierce, Rockford, USA)

Tricin, 93355 (Fluka, Steinheim, D)

Trifluoressigsäure, T6508 (Sigma, Steinheim, D)

Tris, 4855.2 (Roth, Karlsruhe)

Triton X-100, 37240 (Serva, Heidelberg, D)

Trypsin-EDTA 0.05%, 25300 (GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D)

Trypsin, recombinant, proteomics grade, 03708985001 (Roche, Penzberg, D)

Tween 20, 37470 (Serva, Heidelberg, D)

### **2.9.6. Antikörper**

$\alpha$ -Tubulin-FITC Antikörper, F2168 (Sigma, Steinheim, D)

hAPT1 Antikörper (Hergestellt im Auftrag von Biogenes, Berlin, D)

pElk-1 Antikörper, sc-7979-R (Santa Cruz, Delaware, USA)

pERK 1/2, sc-16982-R (Santa Cruz, Delaware, USA)

pMEK 1/2, sc-7995-R (Santa Cruz, Delaware, USA)

Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper, Meerrettichperoxidase konjugiert, Immuno-pure, 31460 (Pierce, Rockford, USA)

### 3. Ergebnisse

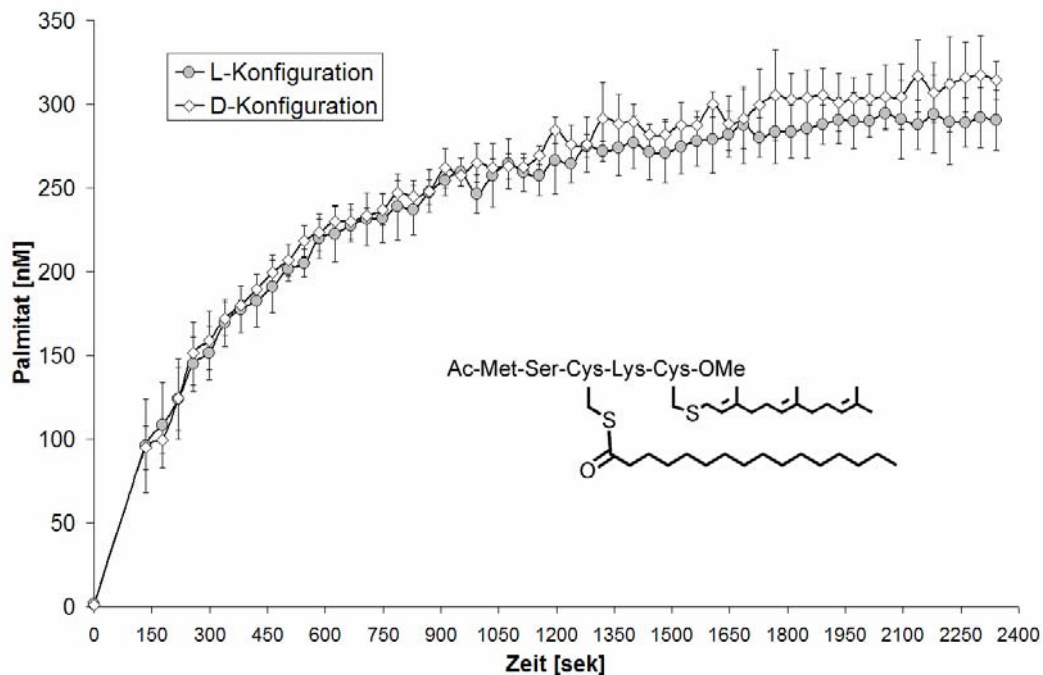
In den hier vorgestellten Versuchen wurde zunächst die Funktion von APT1 und die mögliche Rolle bei der Palmitoylierung untersucht. Anschließend wurde die Bedeutung der Inhibition durch die Raspaline im zellulären Kontext überprüft.

#### 3.1. Stereoselektivität von APT1

Ein erster Schritt zur Beantwortung der Frage, ob APT1 als palmitoylierendes Enzym in Frage kommt, war die Überprüfung der Stereoselektivität. Bei Mikroinjektionsversuchen in PC 12 Zellen mit einem Ras-Fusionsprotein, welches einen palmitoylierbaren C-Terminus aus D – Aminosäuren besaß, konnte gezeigt werden, dass ebenfalls eine Palmitoylierung erfolgt (Deck *et al.*, 2005). Dies zeigte sich durch die Induktion des Neuritenwachstums nach der Mikroinjektion, wie sie zuvor ebenfalls für das Fusionsprotein mit einem L-Aminosäuren tragenden C-Terminus beobachten worden war (Wagner *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Das Enzym, welches die Palmitoylierung katalysiert, muss demnach stereotolerant sein. Um zu überprüfen, ob APT1 dieses Kriterium generell erfüllt, wurden zunächst *in vitro*-Depalmitoylierungsexperimente mit L- und D-Pentapeptiden durchgeführt, welche dem C-Terminus von H-Ras entsprachen. Als Indikator für die Reaktion diente ADIFAB, welches freie Fettsäuren detektiert (s. 2.7.2.).

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, gleichen sich in beiden Fällen Geschwindigkeit und Endkonzentration. Der Mittelwert aus vier unabhängigen Messungen der Endkonzentration bei dem L-Peptid liegt bei 291 nM ( $\pm 18$  nM) und bei dem D-Peptid bei 314 nM ( $\pm 11$  nM) und ist damit nicht signifikant unterschiedlich (t-Test,  $p > 0.05$ ). Die mittlere Standardabweichung über die ganze Messung beträgt beim L-Peptid 15 nM und beim D-Peptid 13 nM. Es zeigt sich also, dass APT1 tatsächlich keine Stereoselektivität aufweist.

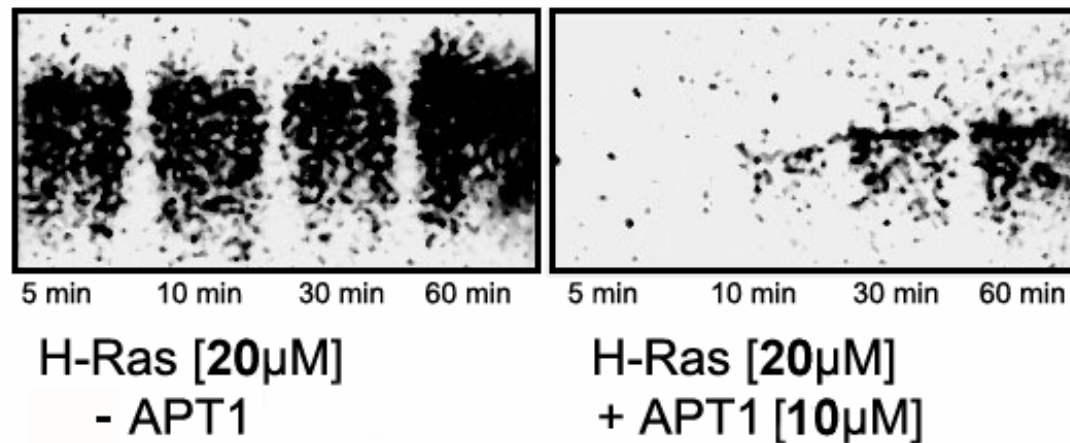




**Abbildung 3.1:** Depalmitoylierung von L- und D-Peptiden durch APT1. Die Depalmitoylierung ist dargestellt als freigesetzte Fettsäure (in nM) über die Zeit (in sek). graue Kreise: Peptid in L-Konfiguration; weiße Rauten: Peptid in D-Konfiguration. Vertikale Linien: Standardabweichung.

### 3.2. Einfluss von APT1 auf die nicht-enzymatische Acylierung

Da die Versuche zur Stereotoleranz gezeigt hatten, dass APT1 dieses Kriterium erfüllt und somit durchaus als palmitoylierendes Enzym in Frage kommt, wurde als nächstes der direkte Einfluss auf die nicht-enzymatische Acylierung untersucht. Sollte APT1 in der Lage sein zu palmitoylieren, müsste sich dies in einer beschleunigten Acylierung zeigen. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst 20  $\mu\text{M}$  eines nicht palmitoylierbaren H-Ras-Konstruktes mit 1 mM radioaktiv markiertem Palmitoyl-CoenzymA (PalCoA) inkubiert. Anschließend wurde die Radioaktivität von H-Ras nach 5, 10, 30 und 60 Minuten bestimmt, welcher bei erfolgter Palmitoylierung entsprechend ansteigt. Zuvor wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde der Versuch in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  APT1 wiederholt.

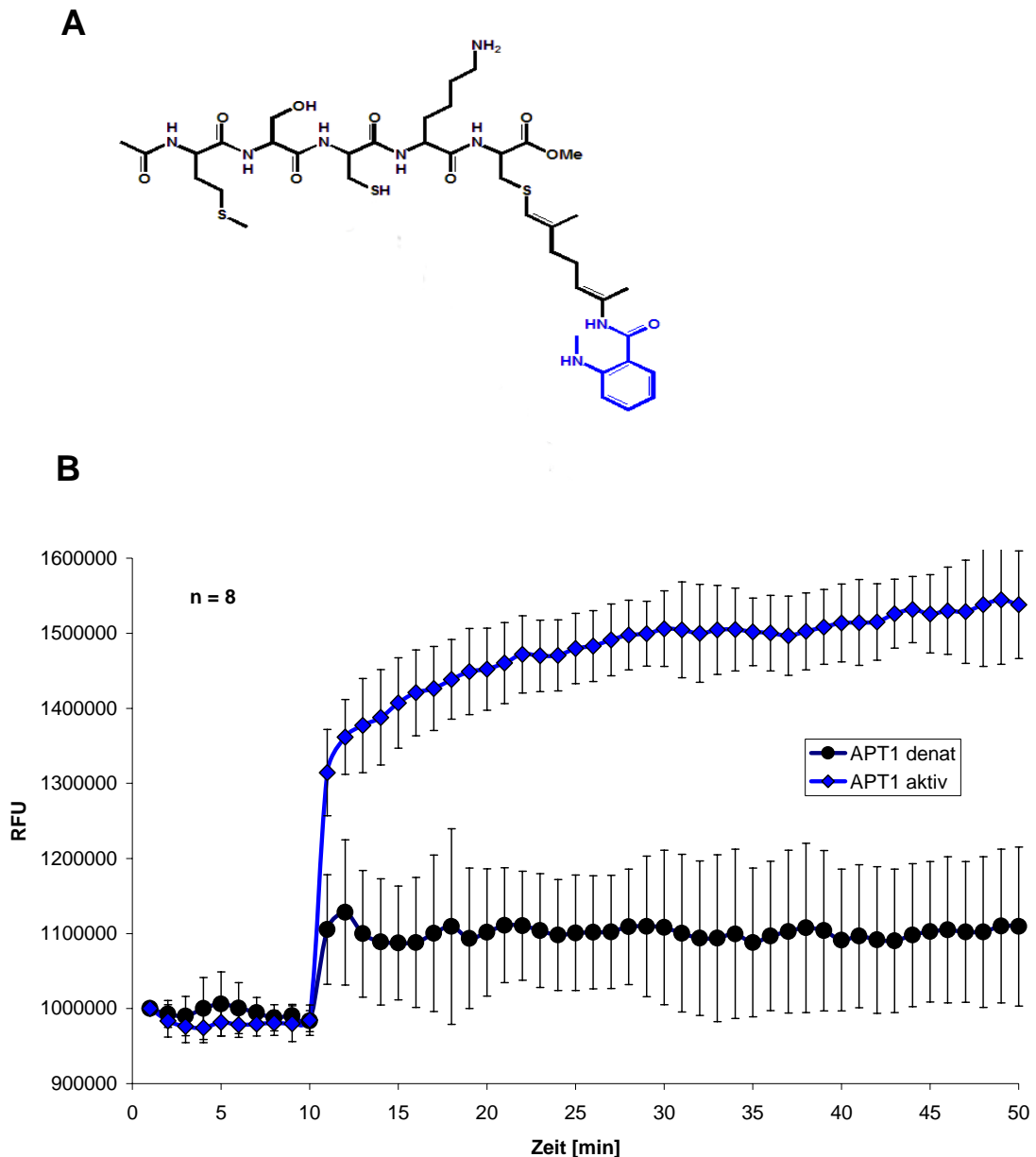


**Abbildung 3.2:** Einfluss von APT1 auf die nicht-enzymatische Acylierung durch PalCoA.  
**links:** Nicht-enzymatische Acylierung nach 5, 10, 30 und 60 min ohne APT1; **rechts:** Nicht-enzymatische Acylierung in Anwesenheit von APT1 nach 5, 10, 30 und 60 min.

Es zeigt sich, dass APT1 die nicht-enzymatische Acylierung nicht unterstützt, sondern ihr entgegen wirkt (Abb. 3.2). Während ohne APT1 bereits nach 5 Minuten ein starkes Signal zu sehen ist, welches im Verlauf lediglich nach 60 Minuten noch etwas stärker wird, ist in Anwesenheit von APT1 bei 5 Minuten keine Radioaktivität nachweisbar. Im weiteren Verlauf nimmt das Signal zwar weiter zu, erreicht aber nicht die Intensität wie in dem Ansatz ohne APT1.

### 3.3. Palmitoylierungsaktivität von APT1

Wie in 3.2. gezeigt werden konnte, lieferten die Versuche mit radioaktiv markiertem PalmitoylCoenzymA, keinen Hinweis auf eine mögliche Palmitoylierung von Ras-Proteinen durch APT1. Daher wurde ein weiterer experimenteller Ansatz gewählt, um zu überprüfen ob APT1 prinzipiell in der Lage ist Ras-Proteine zu palmitoylieren. Hierzu wurden 10 nM APT1 zusammen mit 10 nM des fluoreszenzmarkierten C-Terminus von H-Ras als Substrat (Abb.3.3A) und 1 µM freiem Palmitat inkubiert (Abb. 3.3B). Als Kontrolle diente denaturiertes APT1.



**Abbildung 3.3A:** Struktur des fluoreszenzmarkierten, palmitoylierbaren Substratpeptides, basierend auf dem C-Terminus von H-Ras; der Farnesylrest ist ersetzt durch einen GeranylMant Rest **B:** Palmitoylierungsaktivität von APT1. Die Palmitoylierung des Substrates gemessen als Änderung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) über die Zeit (in min). Die Zugabe von APT1 erfolgte nach einer Präinkubationsphase von 10 min. blaue Rauten: aktives APT1; schwarze Kreise: denaturiertes APT1. Vertikale Balken: Standardabweichung.

Es zeigt sich, dass APT1 in der Lage ist, das Substratpeptid, welches dem C-Terminus von H-Ras entspricht, zu palmitoylieren. Nach Zugabe von APT1 erfolgt ein schneller Anstieg der Fluoreszenz, während der Fluoreszenzunterschied bei dem denaturierten APT1 deutlich geringer ausfällt. Die relative Fluoreszenz stieg bei aktivem APT1 von etwa 98.3 x

$10^4$  Einheiten ( $\pm 1.4 \times 10^4$  Einheiten) auf etwa  $153.8 \times 10^4$  Einheiten ( $\pm 7.2 \times 10^4$  Einheiten), während bei inaktiviertem APT1 nur ein Anstieg von  $98.5 \times 10^4$  Einheiten ( $\pm 2.0 \times 10^4$  Einheiten) auf  $110.9 \times 10^4$  Einheiten ( $\pm 8.1 \times 10^4$  Einheiten) zu beobachten war. Bei den angegebenen Werten handelt es sich jeweils um den letzten Wert vor Zugabe von APT1 und um den letzten Wert vor Beendigung des Versuches.

Der Unterschied zwischen aktivem und inaktivem APT1 ist tatsächlich höchst signifikant (t-Test,  $p < 0,001$ ). Der leichte Anstieg der Fluoreszenz bei dem inaktivierten APT1 ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die allgemeine Veränderung der Umgebung des Fluorophors durch die Zugabe von APT1 zurückzuführen.

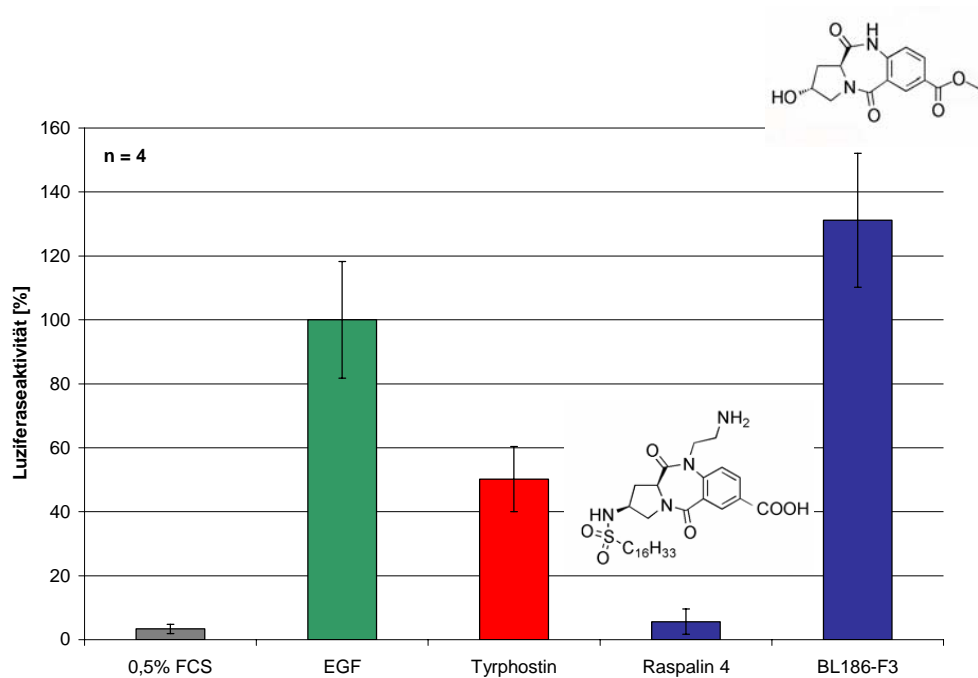
### 3.4. Einfluss der Raspaline auf den Ras-Signalweg

Die bisher vorgestellten Versuche mit APT1 konnten zeigen, dass APT1 in der Lage ist den C-Terminus von H-Ras zu palmitolieren. Darüberhinaus ist es in weiteren Versuchen mit einem ebenfalls fluoreszenzmarkierten N-Ras Konstrukt gelungen zu zeigen, dass diese Reaktion durch Raspalin 4 inhibiert wird (Deck *et al.*, 2005).

Diese Ergebnisse liefern zwar einen ersten Anhaltspunkt über den Zusammenhang von APT1 mit der beobachteten Reduktion des Neuritenwachstums, ob die Reduktion tatsächlich auf die Inhibition von APT1 bzw. die Inhibition des Ras-MAPK-Signalweges im Allgemeinen zurückgeht, lässt sich jedoch nur mit Experimenten in zellulären Systemen klären.

Um einen ersten Anhaltspunkt für diesen Zusammenhang zu erhalten, wurde Raspalin 4 in einem zellbasierten Ras-MAPK Reporterassay getestet. Eine verminderte Luziferaseaktivität zeigt in dieser Zelllinie hierbei einen möglichen Zusammenhang mit der Inhibition des Ras-MAPK-Signalweges an, da die Expression der Luziferase direkt an den Ras-MAPK Signalweg gebunden ist (s. 2.3.). Die Zellen wurden mit  $30 \mu\text{M}$  Raspalin 4 behandelt. Zusätzlich wurden Zellen unstimuliert belassen (minimale Luziferaseaktivität), mit EGF stimuliert (maximale Luziferaseaktivität), mit  $30 \mu\text{M}$  Tyrphostin 47 inkubiert (bekannter

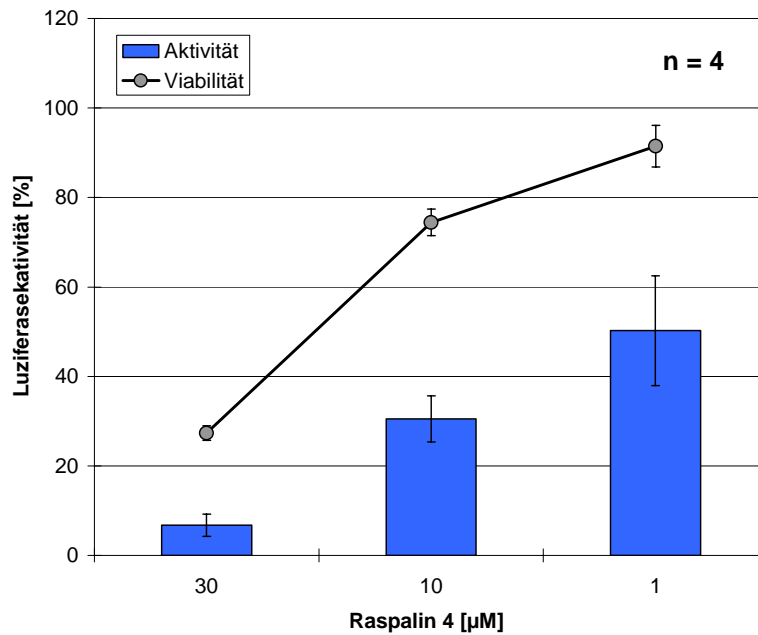
Tyrosinkinase-Inhibitor, Positivkontrolle) und mit 30  $\mu$ M BL 186-F3 (ein Benzodiazepinderivat ohne Palmitoyl und Farnesyl, Negativkontrolle). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 zusammengefasst.



**Abbildung 3.4:** Einfluss von Raspalin 4 auf den Ras-MAPK-Signalweg. V.l.n.r.: grauer Balken: Zellen unstimuliert, grüner Balken: Zellen stimuliert mit EGF, roter Balken: Zellen stimuliert mit EGF und mit Tyrphostin inkubiert, 1. blauer Balken: Zellen stimuliert mit EGF und mit Raspalin 4 inkubiert, 2. blauer Balken: Zellen stimuliert mit EGF und mit BL 186-F3 inkubiert. Vertikale Balken: Standardabweichung.

Es zeigt sich, dass die Luziferaseaktivität bei Inkubation mit Raspalin 4 auf etwa 5.62 % ( $\pm$  3.92 %) zurückgeht. Die Aktivität bei der Inkubation mit Tyrphostin geht im Vergleich dazu nur auf etwa 50.27 % ( $\pm$  10.17 %) zurück. Die Inkubation mit der Kontrollsubstanz BL186-F3 führt im Gegensatz dazu zu einer Erhöhung der Aktivität auf 131.17 % ( $\pm$  20.98 %). Obwohl es sich hierbei um eine etwa 30%-ige Erhöhung handelt, liegt dies unter Berücksichtigung der Standardabweichung noch im Rahmen der auch in anderen Versuchen beobachtenden Schwankungen.

Da die starke Inhibition auch durch Toxizität bedingt sein kann, wurden die Zellen erneut mit verschiedenen Konzentrationen Raspalin 4 inkubiert und zusätzlich dazu auch die Toxizität mit dem WST-1 Proliferationsassay getestet (Abb. 3.5).



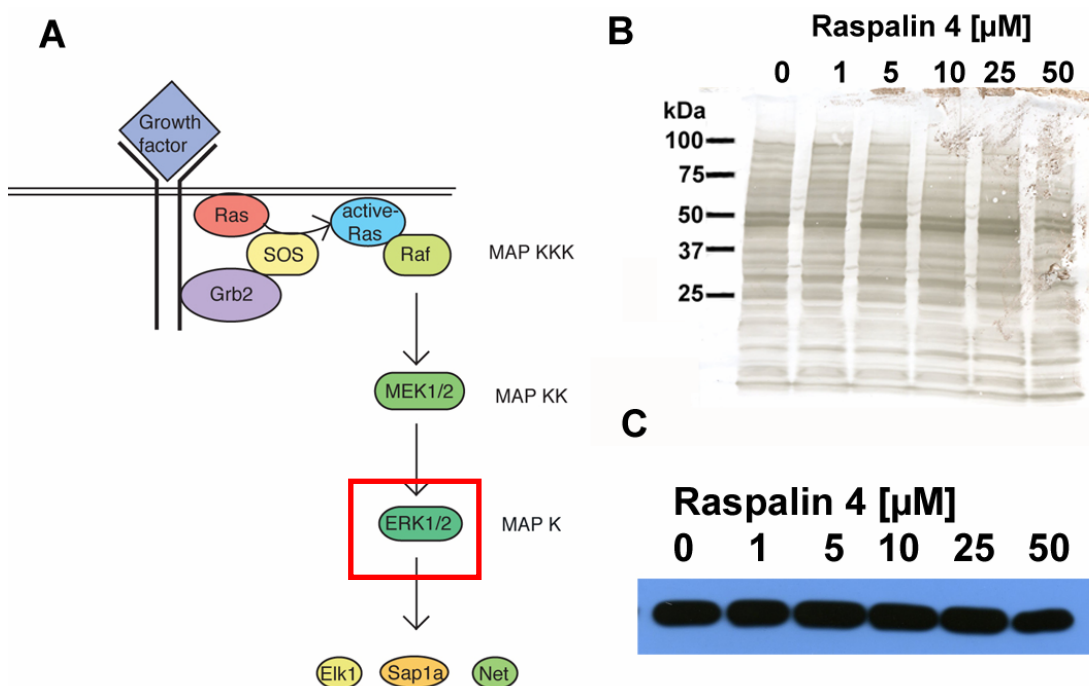
**Abbildung 3.5:** Einfluss von Raspalin 4 auf die Luziferaseaktivität und Viabilität in Abhängigkeit von der Konzentration. blaue Balken: Luziferaseaktivität nach Inkubation mit 30, 10 und 1 µM Raspalin 4 (v.l.n.r.); graue Kreise: Viabilität der Zellen bei 30, 10 und 1 µM Raspalin 4. Vertikale Balken: Standardabweichung.

Wie deutlich zu erkennen ist, ist Raspalin 4 bei 30 µM stark toxisch. Wie schon zuvor ist die Aktivität stark reduziert (6.74 % ( $\pm$  2.52 %)), allerdings liegt die Viabilität der Zellen bei 27.35 % ( $\pm$  1.62 %). Bei 10 µM liegt die Viabilität bereits wieder bei 74.42 % ( $\pm$  2.99 %), Raspalin 4 ist also bereits deutlich weniger toxisch als bei 30 µM, während die Luziferaseaktivität mit 30.54 % ( $\pm$  5.14 %) immer noch deutlich reduziert ist. Bei einer Konzentration von 1 µM ist mit 91.46 % ( $\pm$  4.68 %) Viabilität keine nennenswerte Toxizität mehr zu beobachten. Dieser Wert liegt im Rahmen dessen, was aufgrund von Abweichungen der Zellzahl auch bei DMSO-Kontrollen als Schwankung beobachtet wurde. Die Luziferaseaktivität hingegen ist mit 50.22 % ( $\pm$  12.26 %) immer noch signifikant (t-Test,  $p < 0.05$ ) reduziert.

### 3.5. Untersuchung der Phosphorylierungszustände der Ras-MAPK-Module

Der Reporteragen Assay gibt nur einen ersten Anhaltspunkt, was den Effekt einer Substanz auf den Ras-MAPK-Signalweg betrifft. Daher wurde versucht, anhand der Phosphorylierung, ein genaueres Bild des Ansatzpunktes im Signalweg zu erhalten.

Zunächst wurde die Phosphorylierung von ERK 1/2 überprüft. Hierzu wurden HeLa Zellen über Nacht mit steigenden Konzentrationen an Raspalin 4 inkubiert und anschließend ein Western-Blot zur Bestimmung der Menge an phosphoryliertem ERK 1/2 durchgeführt (Abb. 3.6).

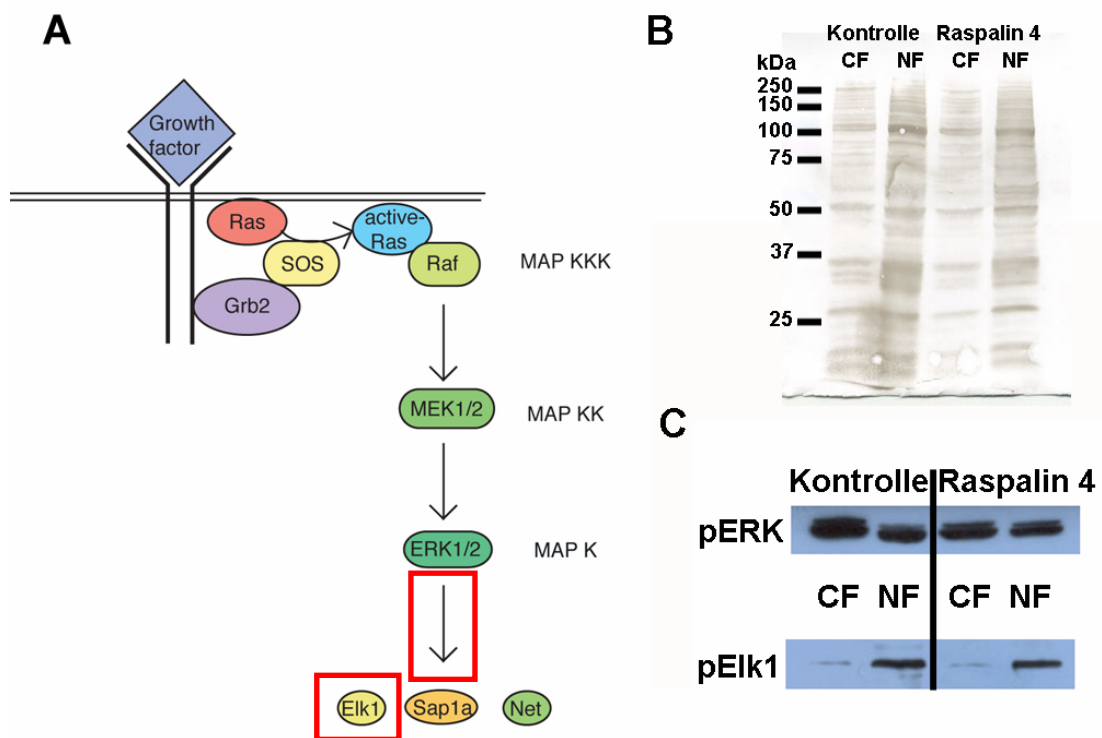


**Abbildung 3.6:** Einfluss von Raspalin 4 auf die Phosphorylierung von ERK 1/2. **A:** Ras-MAPK-Signalweg (stark vereinfacht). Rot markiert: ERK 1/2; **B:** Western Blot mit Tusche gefärbt zur Ladekontrolle; **C:** Phosphorylierungszustand von ERK 1/2 bei 0, 1, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$  Raspalin 4.

Es zeigt sich, dass die Phosphorylierung von ERK 1/2 bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Raspalin 4 unbeeinträchtigt bleibt.

Dies deutet darauf hin, dass die Inhibition unterhalb von ERK 1/2 stattfindet.

Aus diesem Grund wurde als nächstes überprüft, ob die Translokation von ERK 1/2 in den Nukleus, welche für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk1 unerlässlich ist, durch Raspalin 4 verhindert wird und ob in diesem Zusammenhang die Phosphorylierung von Elk 1 beeinflusst wird.



**Abbildung 3.7:** Einfluss von 30  $\mu\text{M}$  Raspalin 4 auf die Translokation von ERK 1/2 in den Nukleus und die Phosphorylierung von Elk 1. **A:** Ras-MAPK-Signalweg (stark vereinfacht). Rot markiert: Translokation von ERK 1/2; Elk 1; **B:** Western Blot mit Tusche gefärbt zur Ladekontrolle; **C oben:** Anteil von pERK 1/2 in der Cytoplasmafraktion (CF) und in der Nukleusfraktion (NF), links: Kontrolle; rechts: 30  $\mu\text{M}$  Raspalin 4; **Unten:** Anteil von pElk 1 in der Cytoplasmafraktion (CF) und in der Nukleusfraktion (NF), links: Kontrolle; rechts: 30  $\mu\text{M}$  Raspalin 4.

In Abbildung 3.7 ist klar zu sehen, dass bei Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  Raspalin 4 weder die Translokation von ERK 1/2 in den Nukleus, noch die Phosphorylierung von Elk 1 beeinflusst wird. Der Einfluss auf den Signalweg scheint daher weiter unten im Signalweg zu liegen, also direkt bei der Transkription und/oder Translation oder über einen anderen integrativen Signalweg bedingt sein.



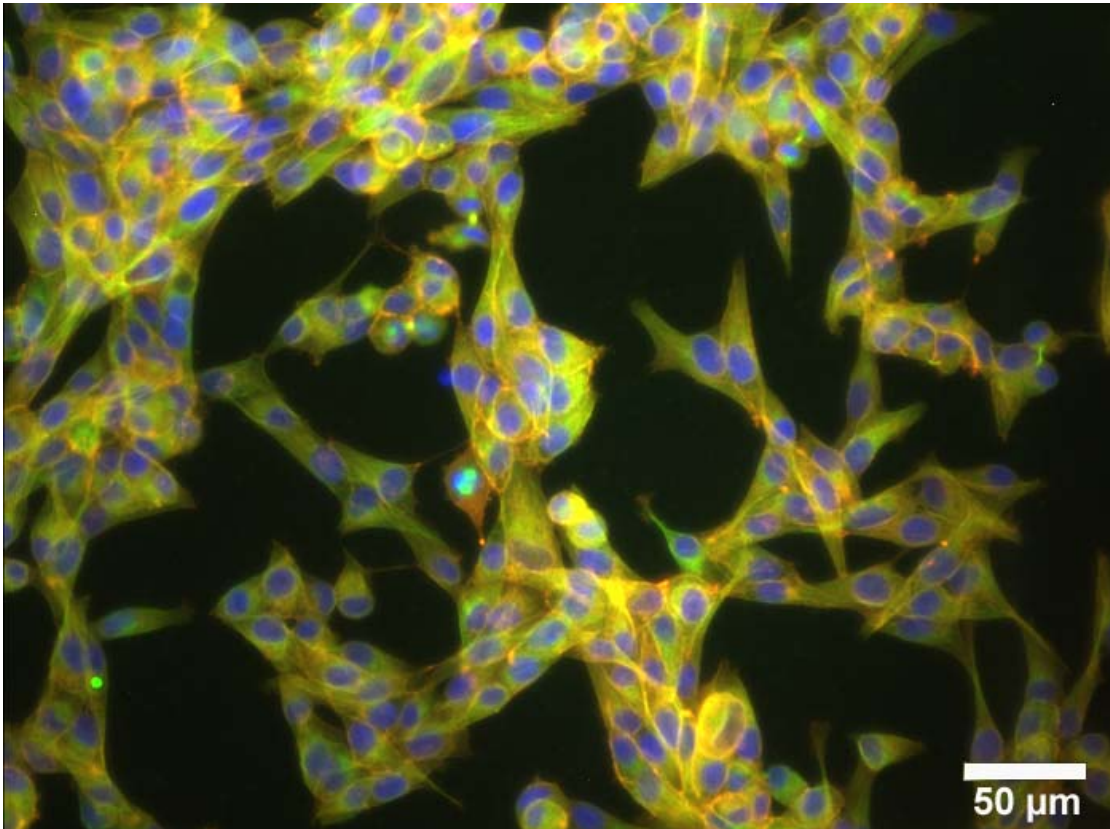
### 3.6. Effekt von Raspalin 4 auf den Phänotyp von MDCK- f3 Zellen

Da die Überprüfung der Phosphorylierung keinen positiven Befund ergab, wurde Raspalin 4 in einer weiteren Zelllinie getestet, um zusätzliche Hinweise über den Wirkungsmechanismus zu erhalten.

Hierfür wurden H-Ras transformierte MDCK-f3 Zellen verwendet (s. 2.4.). Wirkt eine Substanz auf den Ras-MAPK-Signalweg, führt dies zu einer Rücktransformation. Dies äußert sich in einer Änderung des Phänotyps, bei dem die Zellen wieder ein eher epitheliales Aussehen annehmen und vermehrt Zell-Zell-Kontakte ausbilden.

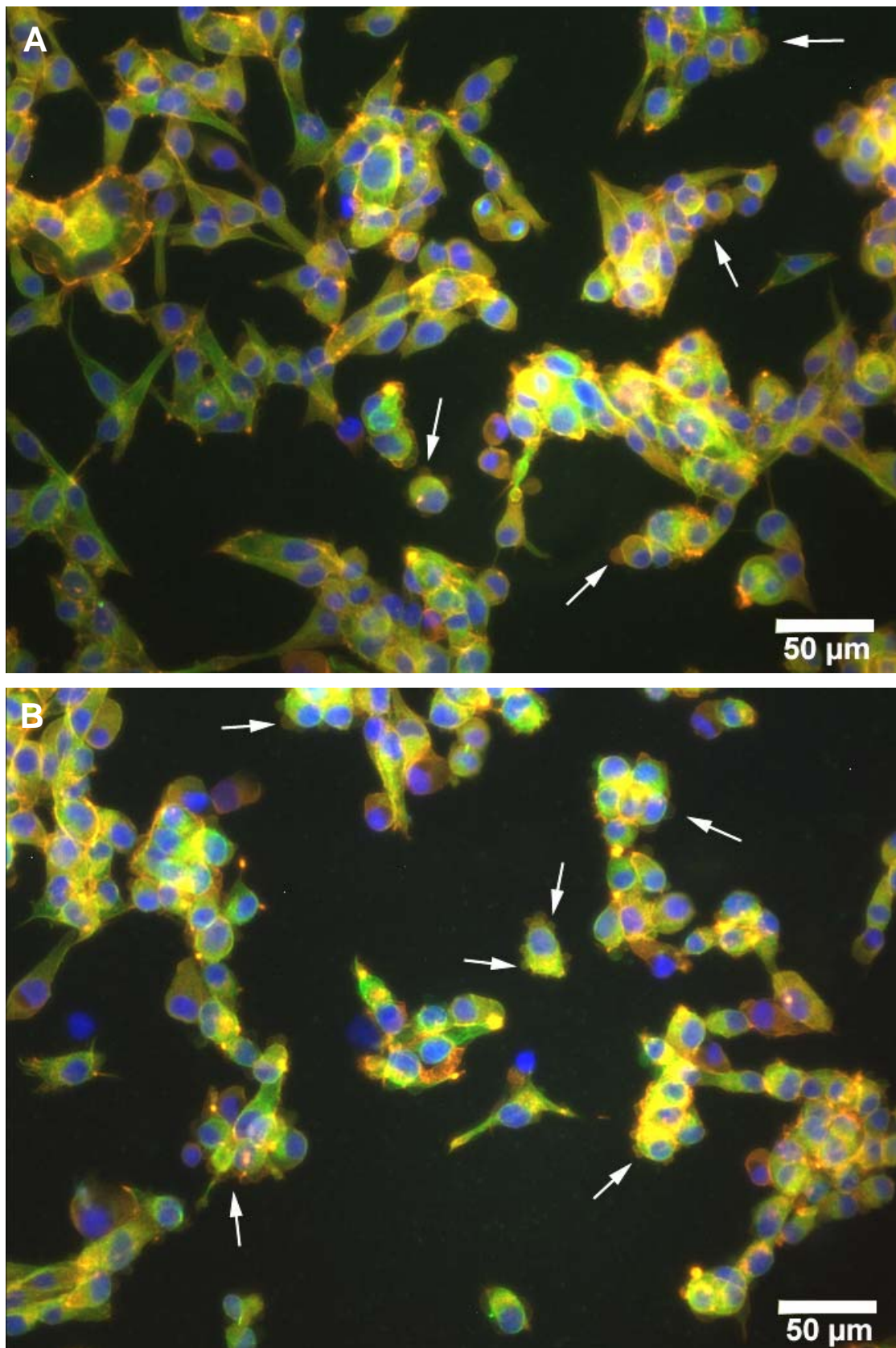
Die Zellen wurden über Nacht mit 50, 25 und 10  $\mu\text{M}$  Raspalin 4 inkubiert. Da die bei den Kontrollexperimenten verwendete Coelestin Blau Färbung nur bedingt eine Aussage über den Effekt auf das Cytoskelett und andere morphologische Aspekte zulässt, wurden die Zellen mit Fluoreszenzmarkern (s. 2.2.) für Aktin, Tubulin und den Zellkern angefärbt.

Auch bei den Kontrollen der MDCK-f3 Zellen zeigt sich ein normales Bild dieser Zellen mit dem typischen fibroblastenartigen Erscheinungsbild und dem unkontrolliertem Wachstum und dem fast vollständigen Fehlen von Zell-Zell-Kontakten (Abb. 3.8, S. 71).



**Abbildung 3.8:** MDCK-f3 Zellen über Nacht inkubiert mit DMSO (Kontrolle). rot: Actin; grün: Tubulin; blau: Zellkern.

Bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Raspalin 4 zeigt sich ein anderes Bild. Wie in Abbildung 3.9 A (S. 72) zu sehen ist sind einige Zellen bereits abgerundet und es sind blasige Ausstülpungen zu erkennen. Außerdem ist an einigen Stellen das Aktinskelett stark kondensiert. Der Effekt verstärkt sich bei 30  $\mu\text{M}$  Raspalin 4 nochmals (Abb. 3.9 B, S. 72).

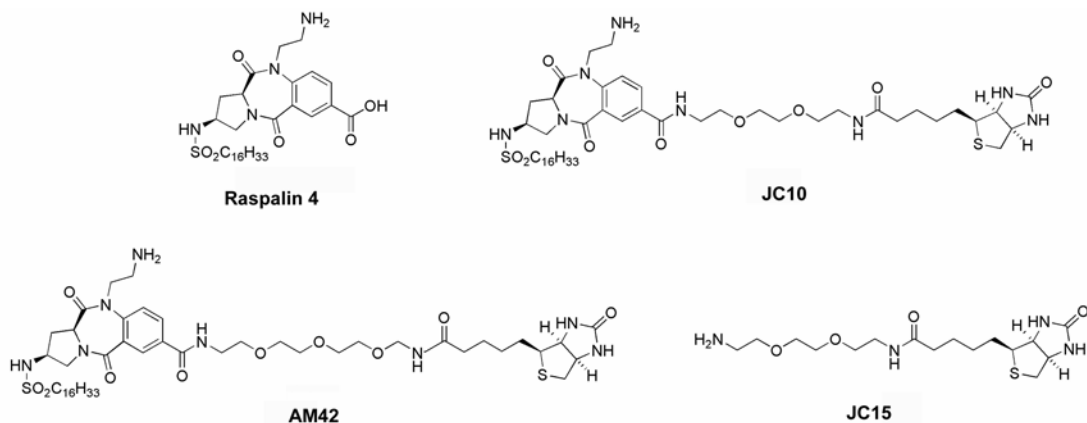


**Abbildung 3.9:** Einfluss von Raspalin 4 auf MDCK-f3 Zellen. **A:** MDCK-f3 Zellen über Nacht inkubiert mit 10 µM Raspalin 4 **B:** MDCK-f3 Zellen über Nacht inkubiert mit 30 µM Raspalin 4. rot: Actin; grün: Tubulin; blau: Zellkern; weiße Pfeile: blasige Ausstülpungen.

Zell-Zell-Kontakte sind jedoch nicht zu erkennen und die Morphologie entspricht im Allgemeinen nicht der von rücktransformierten Zellen, da die Zellen eher epithelial erscheinen, während hier eine Abrundung zu erkennen ist. Darüberhinaus sind an den Rändern einiger Zellen blasige Ausstülpungen zu erkennen, ein Zeichen für Zellen, welche möglicherweise apoptotisch sind (Kerr *et al.*, 1972). Eine Überprüfung mit einem Apoptose Test (ApoONE®, Promega), welcher die Aktivität der Caspase 3/7 misst, zeigte jedoch keinen Hinweis auf Apoptose bei den eingesetzten Konzentrationen (1, 10 und 30  $\mu\text{M}$ ). Da bei diesen Konzentrationen mit WST-1 keine Zytotoxizität festgestellt werden konnte, ist dies als Ursache für den beobachteten Effekt unwahrscheinlich. Mögliche Ursachen für dieses abweichende Ergebnis werden in der Diskussion näher erörtert.

### 3.7. Evaluierung von Affinitätssonden zur Identifizierung der zellulären Ziele von Raspalin 4

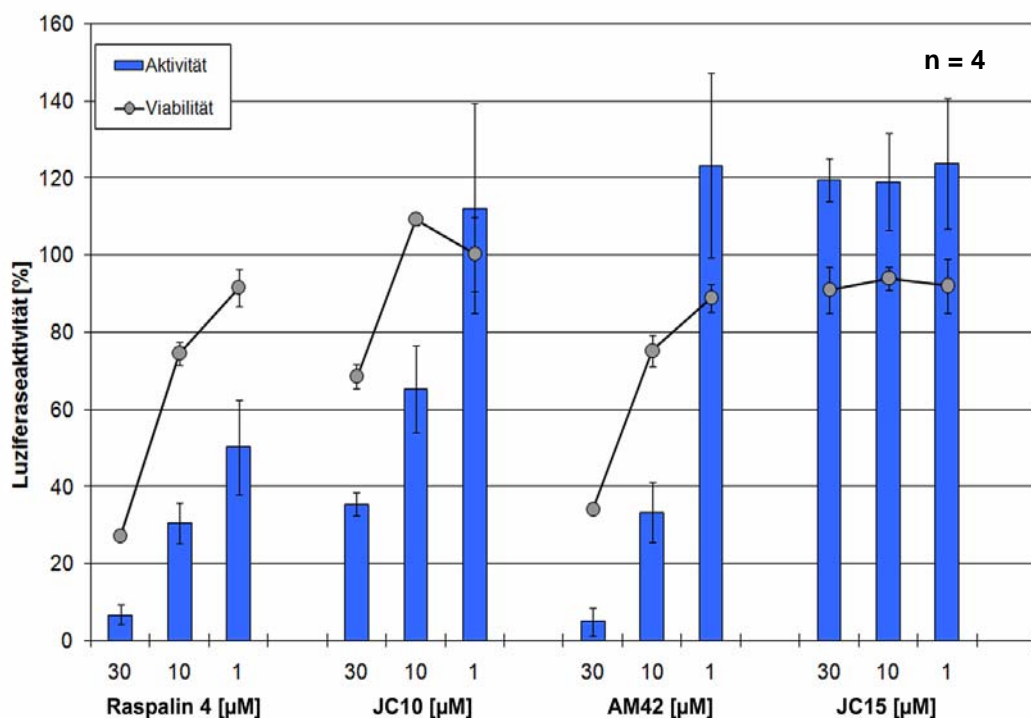
Da die bisherigen Versuche keinen direkten Rückschluss über den Wirkungsmechanismus von Raspalin 4 und die Bedeutung von APT1 bei den beobachteten Effekten zuließen, wurde ein auf Affinitätsaufreinigung basierender Ansatz gewählt. Hierfür wurde Raspalin 4 an der freien Carbonsäurefunktion über einen Polyethylenglykol(PEG)-Linker an ein Biotin gekoppelt (Abb. 3.10). Es wurden zwei Derivate validiert. Ein Derivat wurde über zwei (JC10) Ethylenglykoleinheiten und ein weiteres über drei (AM42) mit dem Biotin gekoppelt. Ferner diente das Biotin mit zwei Ethylenglykoleinheiten ohne Inhibitor als Kontrolle (JC15). Auf diese Weise sollten die Zielproteine identifiziert werden, indem man diese direkt aus dem Zelllysate isoliert (engl. Pulldown).



**Abbildung 3.10:** Strukturen der verwendeten Benzodiazepinderivate. **oben links:** Raspalin 4, Benzodiazepin mit Palmitoyl und freier Säurefunktion; **oben rechts:** JC10, Raspalin 4 über die Säurefunktion mit zwei PEG-Einheiten an Biotin gekoppelt; **unten links:** AM42, Raspalin 4 über die Säurefunktion mit drei PEG-Einheiten an Biotin gekoppelt; **unten rechts:** JC15, Biotin mit zwei PEG-Einheiten.

### 3.7.1. Wirkung der Affinitätssonden auf Zellen

Um zu überprüfen, ob die Modifikation einen Einfluss auf die Aktivität des Inhibitors hat, wurden die Raspalinderivate JC10 und AM42 ebenfalls an HLR und MDCK-f3 Zellen getestet. Es zeigte sich, dass die Wirkung nur minimal beeinträchtigt wird (Abb. 3.11 und 3.12A & B). Es war allerdings eine etwas höhere Cytotoxizität im Falle von AM42 zu beobachten. Dies geht vermutlich auf die veränderte Löslichkeit durch die Biotin-PEG Modifikation zurück. Da die Affinitätssonden vor der Aufreinigung an die magnetischen Streptavidinpartikel gekoppelt wurden und die Aufreinigung mit bereits lysierten Zellen erfolgte, ist dies allerdings nicht von Bedeutung.



**Abbildung 3.11:** Wirkung der Affinitätssonden auf die Luziferaseaktivität in HLR Zellen. blaue Balken: Luziferaseaktivität nach Inkubation mit 30, 10 und 1 µM Raspalin 4, JC10, AM42 und JC15 (v.l.n.r.); graue Kreise: Viabilität der Zellen bei 30, 10 und 1 µM. Vertikale Balken: Standardabweichung.

Hieraus wird ersichtlich, dass auch die Affinitätssonden noch einen Einfluss auf den Ras-MAPK Signalweg haben, was sich in der verminderten Luziferaseaktivität deutlich widerspiegelt. Während JC10 etwas weniger toxisch ist (Zellviabilität bei 30, 10 und 1 µM: 68.47 % ( $\pm$  3.15 %), 109.16 %



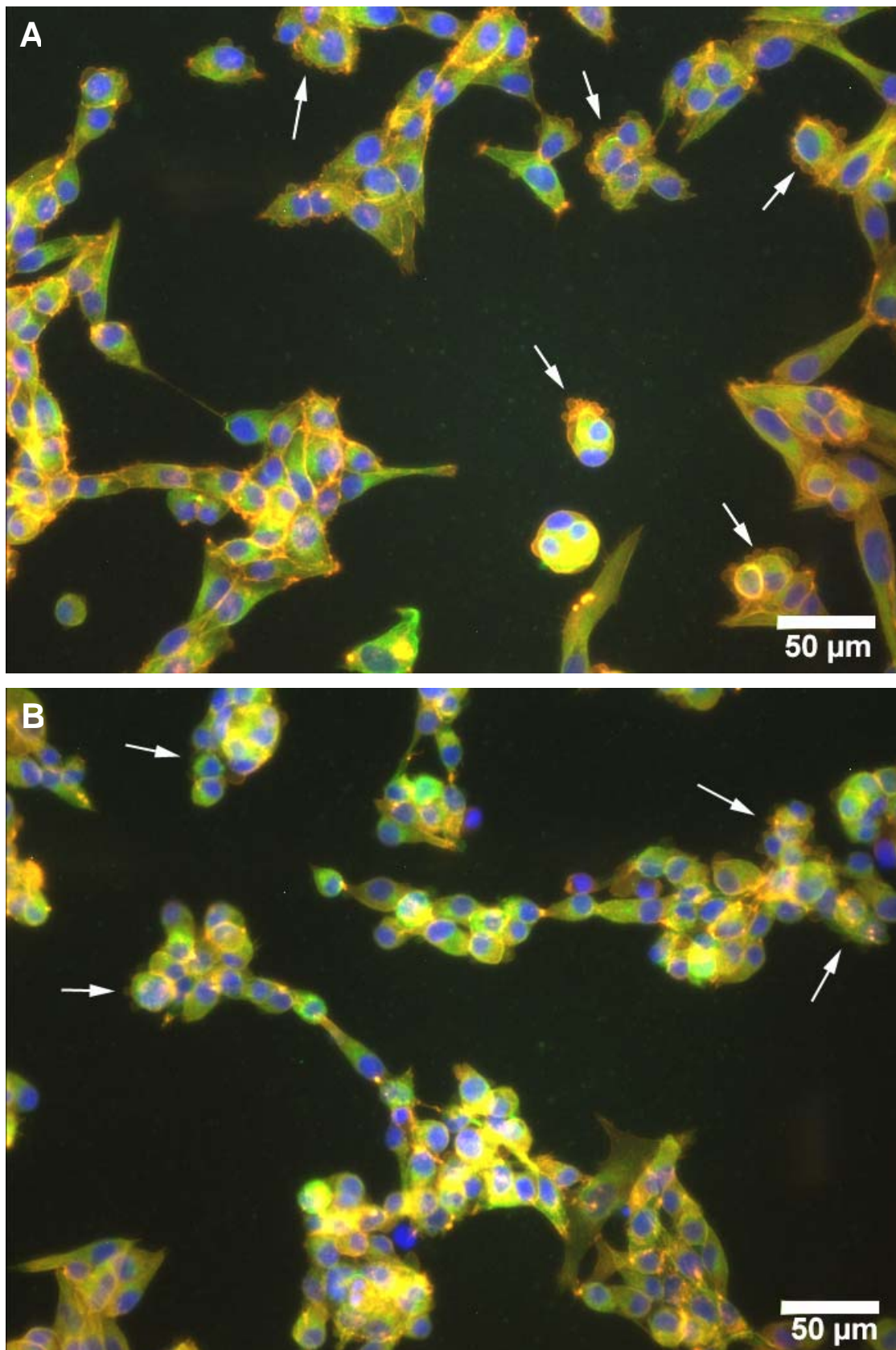
( $\pm 1.58$  %) und 100.27 % ( $\pm 9.63$  %)), aber auch etwas weniger stark die Luziferaseaktivität beeinflusst (Luziferaseaktivität bei 30, 10 und 1  $\mu\text{M}$ : 35.49 % ( $\pm 3.05$  %), 65.31 % ( $\pm 11.33$  %) und 112.17 % ( $\pm 27.36$  %)), ist bei AM42 eine mit Raspalin 4 vergleichbare Toxizität zu beobachten (Zellviabilität bei 30, 10 und 1  $\mu\text{M}$ : 34.06 % ( $\pm 0.56$  %), 75.22 % ( $\pm 4.11$  %) und 88.82 % ( $\pm 3.61$  %)), während die Inhibition etwas schwächer ausfällt (Luziferaseaktivität bei 30, 10 und 1  $\mu\text{M}$ : 4.94 % ( $\pm 3.58$  %), 33.32 % ( $\pm 4.12$  %) und 123.28 % ( $\pm 23.89$  %)). Bei beiden Affinitätssonden ist bei 1  $\mu\text{M}$  keine Toxizität und auch keine Inhibition der Luziferaseaktivität mehr zu beobachten.

Wie zu erwarten, ist bei JC15, welches als Kontrolle verwendet wurde, weder Toxizität noch Inhibition der Luziferaseaktivität zu sehen.

Bei MDCK-f3 Zellen zeigt sich bei beiden Affinitätssonden ebenfalls ein mit Raspalin 4 vergleichbarer Effekt (Abb. 3.12 A & B, S. 77).

Es zeigt sich auch hier, dass JC10, wie auch zuvor bei den HLR Zellen, einen etwas schwächeren Effekt hat. Die Zellen sind zwar auch abgerundet und es sind deutlich blasige Austülpungen zu sehen, aber der Effekt ist etwas schwächer als bei Raspalin 4 (Abb.3.9). Bei AM42 ist der Effekt deutlich stärker. Insgesamt sind die Zellen stärker abgerundet und Zellen erscheinen deutlich kompakter.

In beiden Versuchen zeigt sich also, dass die Aktivität durch die Modifikation nur geringfügig beeinträchtigt wird.

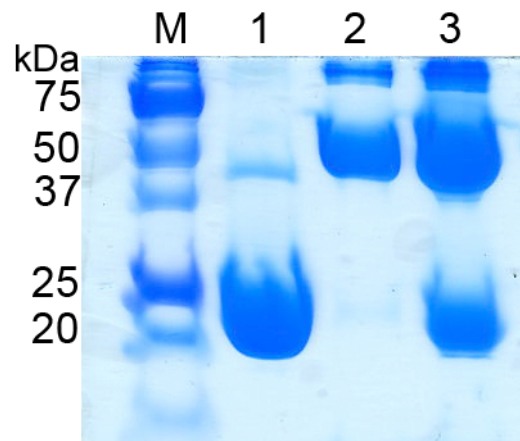


**Abbildung 3.12:** MDCK-f3 Zellen über Nacht inkubiert mit **A:** 10  $\mu$ M JC10 und **B:** 10  $\mu$ M AM42. rot: Actin; grün: Tubulin; blau: Zellkern; weiße Pfeile: blasige Ausstülpungen.



### 3.7.2. Spezifität der Affinitätssonden für APT1

Zunächst wurde ein Pulldown mit JC10 (Biotin und 2 PEG-Einheiten) und unkonjugierten, magnetischen Streptavidinpartikeln durchgeführt, um zu testen, ob es generell möglich ist APT1 aus einer Lösung zu isolieren. Dazu wurde jeweils 10  $\mu\text{M}$  APT1 in 100  $\mu\text{l}$  Puffer suspendiert und entweder mit 20  $\mu\text{M}$  JC10 inkubiert oder unbehandelt belassen und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  einer Suspension magnetischer Streptavidinpartikel zugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert, um den biotinylierten Marker aus der Lösung zu entfernen. Das Ergebnis der anschließenden Gelelektrophorese zur Detektion von APT1 ist in Abbildung 3.13 zu sehen.



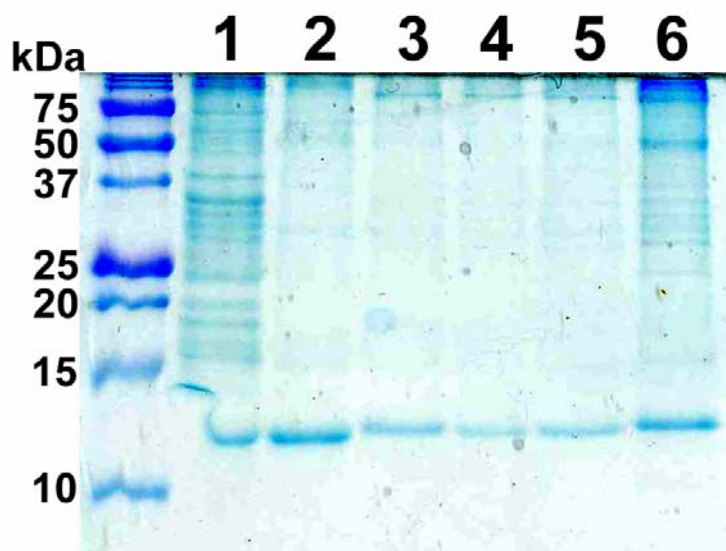
M: Marker  
 1: APT1  
 2: APT1-Pulldown - JC 10  
 3: APT1-Pulldown + JC 10

**Abbildung 3.13:** Kontrollversuch zur Affinitätsaufreinigung mit aufgereinigtem APT1 in Puffer. 15%iges SDS-Gel mit Coomassie gefärbt.

Wie sich zeigt, ist lediglich bei dem mit JC10 inkubierten Ansatz die APT1-spezifische Bande bei 25 kDa zu beobachten. Darüberhinaus ist bei beiden Ansätzen eine etwa gleichstarke Bande bei 50 kDa zusehen, welche auch bei dem aufgereinigtem APT1 schwach zu sehen ist. Wie sich bei späteren Versuchen zur Spezifität der Affinitätssonden herausstellte, scheint es sich hierbei um das Homodimer von APT1 zu handeln (s. 3.7.3., S. 80 & 81).

### 3.7.3. Überprüfung der Effektivität und Spezifität der Affinitätssonden in PC12 Zelllysaten

Als nächstes wurde JC10 mit PC12-Zelllysate inkubiert. Hierfür wurden PC12 Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen kultiviert und bei Erreichen der Konfluenz mit 1 ml Lysepuffer (s. 2.1.6.1.) lysiert. Eine Proteinbestimmung wurde nicht vorgenommen, da der Lysepuffer mit dem Nachweisreagenz reagiert. Erfahrungsgemäß liegt die Proteinmenge bei konfluent gewachsenen Zellen in 75 cm<sup>2</sup> bei etwa 1,5 – 2 mg/ml. Als Kontrolle wurden sowohl die unkonjugierten, magnetischen Streptavidinpartikel, als auch mit Biotin und mit JC15 konjugierte Partikel mitgeführt (Abb. 3.14).

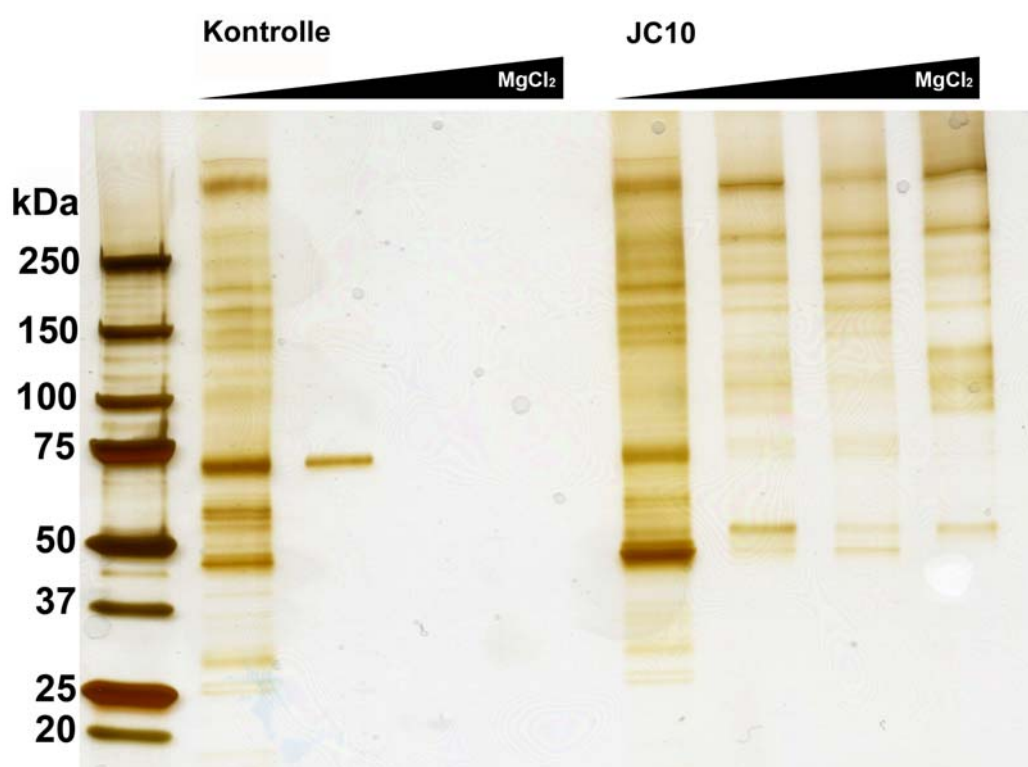


**Abbildung 3.14:** Kontrollversuch zur Bindungscharakteristik mit je 100 µl PC12 Zelllysate. v.l.n.r: **1:** 1. Waschfraktion; **2:** 2. Waschfraktion; **3:** unkonjugierte Streptavidinartikel; **4:** Partikel mit Biotin konjugiert; **5:** mit JC15 konjugierte Partikel; **6:** mit JC10 konjugierte Partikel. 15%iges SDS-Gel mit Coomassie gefärbt.

Wie zu sehen ist, ist die unspezifische Bindungen bei den Kontrollansätzen etwa gleich (**1-5**). Ferner ist zu erkennen, dass bei der ersten Waschfraktion (**1**) noch sehr viele Proteine eluieren, während bereits bei der zweiten Waschfraktion (**2**) kaum noch Proteine zu erkennen sind. Es zeigt sich allerdings auch, dass bei dem Ansatz mit JC10 (**6**) trotzdem noch

eine relativ große Anzahl von Banden zu erkennen ist. Da nicht auszuschließen war, dass es sich hierbei um unspezifische Bindung handelt, wurden dem Waschpuffer steigende Mengen Magnesiumchlorid zugesetzt. Es ist bekannt, dass chaotrope Salze unspezifische Bindungen, welche hauptsächlich auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückgehen, minimieren können (Rehm, 2002).

Hierfür wurde der Pulldown zum einen mit unkonjugierten Partikeln und mit JC10 konjugierten Partikeln durchgeführt. Dem Waschpuffer wurden dabei steigende Konzentrationen Magnesiumchlorid zugegeben (Abb. 3.15).



**Abbildung 3.15:** Kontrollversuch zum Einfluss von Magnesiumchlorid auf unspezifische Bindungen mit 100  $\mu$ l PC12 Zelllysat. Sowohl die Kontrolle (links) als auch die mit JC10 konjugierten Partikel (rechts) wurden mit 10, 50, 100 und 200 mM  $MgCl_2$  in Puffer gewaschen. Konzentrationen steigen jeweils von links nach rechts. 4-15 %iges Gradienten SDS-Gel mit Silber gefärbt.

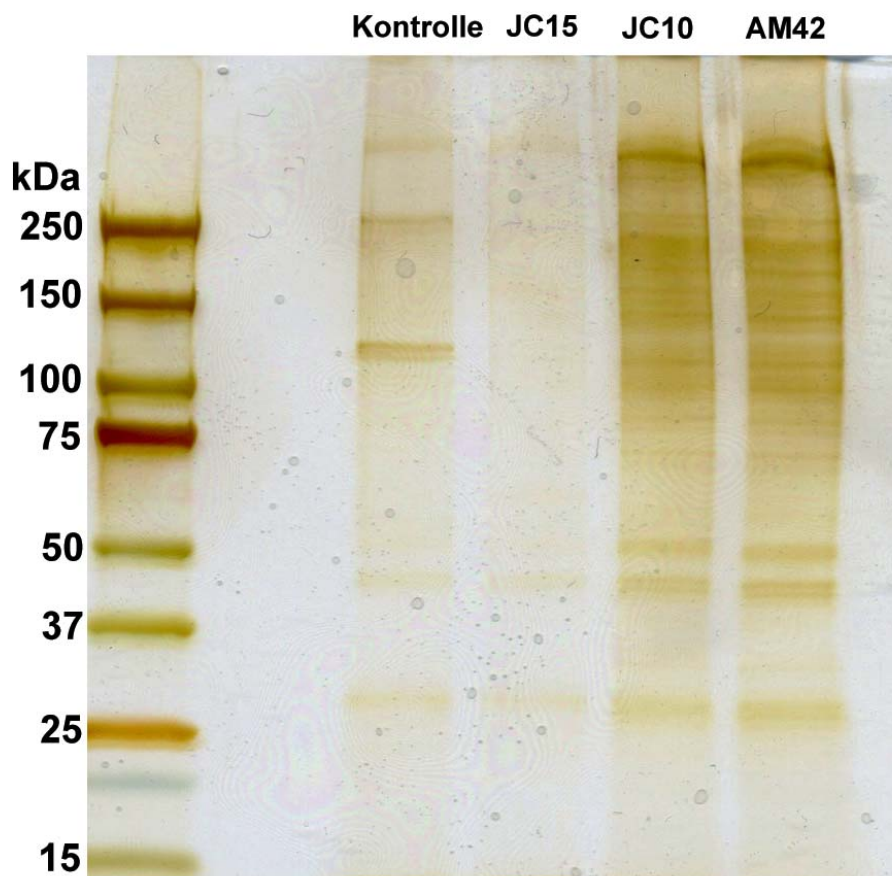
Es ist zu erkennen, dass bei 50 mM Magnesiumchlorid bereits nur noch eine Bande in der Kontrolle zu erkennen ist (Empfindlichkeit der Silberfärbung: 25 ng Protein). Bei 100 mM Magnesiumchlorid sind mit der Silberfärbung keine Banden mehr in der Kontrolle zu sehen.

Aus diesem Grund wurde dem Waschpuffer bei allen folgenden Versuchen 100 mM Magnesiumchlorid zugegeben.

Es fällt außerdem auf, dass bei den Ansätzen mit JC10 die Anzahl und Intensität der Banden zwar geringer wird, aber nach wie vor noch relativ viele Banden zu sehen sind.

Da auch die Linkerlänge Einfluss auf die unspezifische Bindung hat, wurde ein weiteres Derivat synthetisiert, welches anstatt über zwei über drei PEG-Einheiten mit dem Biotin verbunden ist (Erhöhung der Hydrophilizität). Dieses Derivat wird im Folgenden als AM42 bezeichnet (s. a. 2.7.1., Abb. 2.3).

Um die beiden Affinitätsmarker miteinander zu vergleichen, wurde erneut ein Pulldown durchgeführt (Abb. 3.19).

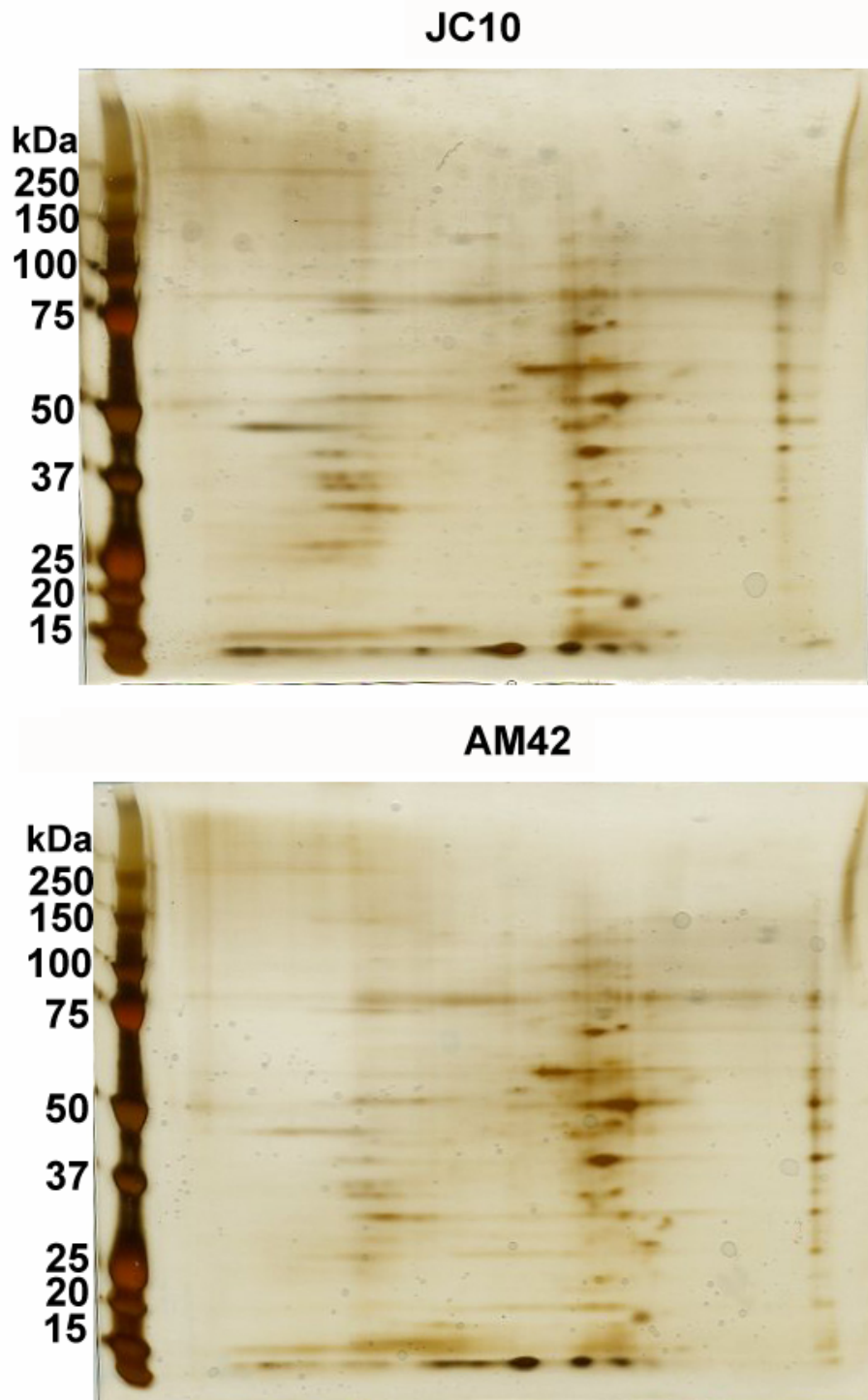


**Abbildung 3.16:** Einfluss der Linkerlänge auf die unspezifische Bindung. V.l.n.r.: Kontrolle: nur Partikel; JC15: Biotin und Linker; JC10: Linker mit 2 PEG-Einheiten; AM42: Linker mit 3 PEG-Einheiten. Es wurden 100 µl PC12 Zelllysate/Pulldown verwendet; Gewaschen wurde jeweils mit 100 mM MgCl<sub>2</sub>. 4-15%iges Gradienten SDS-Gel mit Silber gefärbt.

Wie sich zeigt, hat der Linker selbst bereits einen positiven Effekt auf die unspezifische Bindung da nach dem Waschen nur noch schwache Banden zu erkennen sind, während bei der Kontrolle (unkonjugierte Streptavidinpartikel) noch einige Banden zu sehen sind. Bei JC10 und AM42 sind deutlich mehr Banden zu sehen. Allerdings ist kein deutlicher Unterscheid zwischen den beiden Affinitätssonden zu erkennen.

Zudem fällt auf, dass im Bereich zwischen 25 und 50 kDa einige Banden zu sehen sind welche schwach auch in der Kontrolle und bei JC15 zu erkennen sind. Hierbei könnte es sich um Proteine handeln, welche unspezifisch am Inhibitor binden, da die Bandenintensität bei JC15 sehr gering ist und erst in Anwesenheit des Inhibitors wieder deutlich stärker wird. Auf diesen Effekt wird in der Diskussion noch genauer eingegangen.

Aufgrund der großen Anzahl der Proteine wurde zusätzlich eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt, da sich aufgrund der besseren Auflösung die beiden Affinitätssonden besser miteinander vergleichen lassen (Abb. 3.17, S. 83).

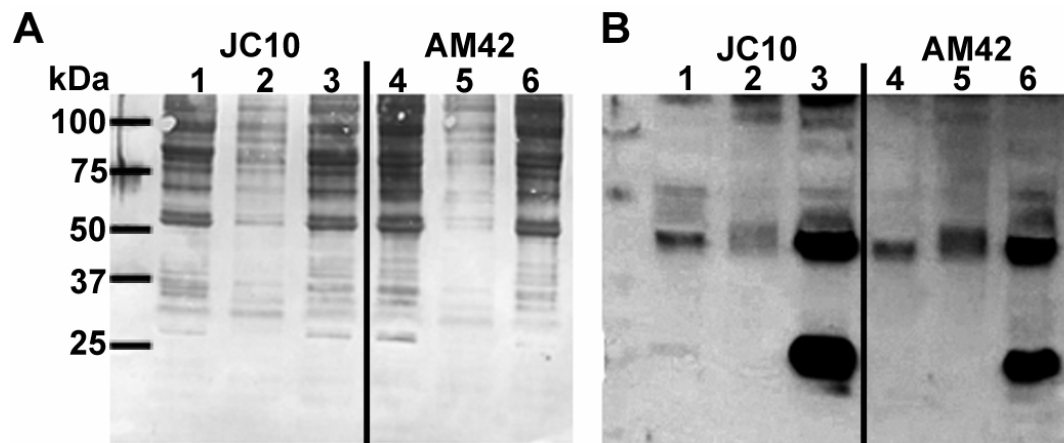


**Abbildung 3.17:** Vergleich der Affinitätssonden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese. oben: JC10; unten: AM42; pH-Gradient 3-10, linear von links nach rechts. Pulldown mit 100  $\mu$ l PC12 Zelllysate; Gel mit Silber gefärbt.

Vergleicht man die beiden Gele miteinander, so sind lediglich geringe Unterschiede festzustellen. Leichte Variation in der Stärke der Färbung sind zum Teil durch die Methodik bedingt.



Um zu überprüfen, ob die Linkerlänge einen direkten Einfluss auf die Bindung von APT1 an den Affinitätssonden hat, wurde der Pulldown geblottet und mit einem APT1-Antikörper inkubiert. Neben den beiden Affinitätssonden wurden die Partikel einmal mit Waschpuffer ohne Magnesiumchlorid und einmal mit 100 mM Magnesiumchlorid gewaschen (Abb. 3.18).



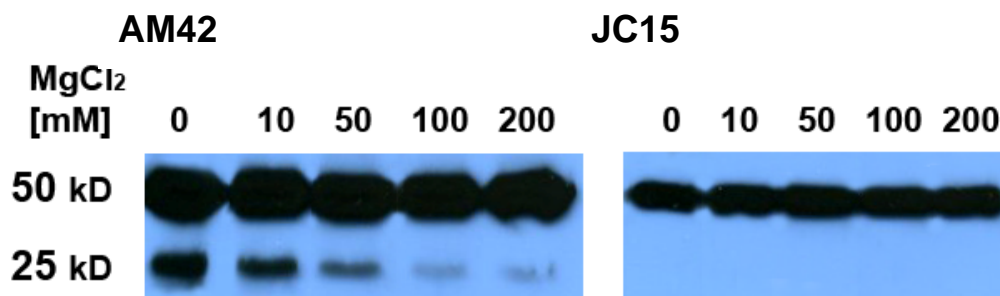
**Abbildung 3.18:** Vergleich der Affinitätssonde und Nachweis von APT1. **A:** 1: Pulldown mit JC10 gewaschen mit Puffer ohne  $MgCl_2$ ; 2: Pulldown mit JC10 gewaschen mit Puffer mit 100 mM  $MgCl_2$ ; 3: Pulldown mit JC10 und Zugabe von 10  $\mu M$  APT1 zum Lysat, gewaschen mit Puffer ohne  $MgCl_2$ ; 4: Pulldown mit AM42 gewaschen mit Puffer ohne  $MgCl_2$ ; 5: Pulldown mit AM42 gewaschen mit Puffer mit 100 mM  $MgCl_2$ ; 6: Pulldown mit JC10 und Zugabe von 10  $\mu M$  APT1 zum Lysat, gewaschen mit Puffer ohne  $MgCl_2$ ; Western Blot gefärbt mit Tusche; **B:** Blotmembran aus A mit APT1-Antikörper inkubiert.

Schon bei der Färbung des Western Blots mit Tusche zeigte sich erneut, dass Waschen mit Magnesiumchlorid unspezifische Bindung minimiert, was an dem schwächer werden der Färbung zu erkennen ist. Auch ist wieder kein Unterschied zwischen den beiden Affinitätssonden zu sehen.

Der Nachweis von APT1 mit dem Antikörper zeigt, dass bei beiden Affinitätssonden ein Signal zu erkennen ist. Es fällt jedoch auf, dass vor allem ein Signal bei 50 kDa auftritt und das Signal bei 25 kDa sehr schwach bzw. bei AM42 gar nicht erkennbar ist (**1 & 4**). Bei beiden Affinitätssonden wird das Signal nach dem Waschen mit 100 mM Magnesiumchlorid deutlich schwächer (**2 & 5**). Als Referenz und um zu überprüfen, ob APT1 eventuell von anderen Proteinen verdrängt wird, wurde dem Lysat 10  $\mu M$  APT1 zugegeben. Hier zeigt sich ein starkes

Signal bei beiden Affinitätsmarkern sowohl bei 25 kDa, als auch bei 50 kDa (3 & 6).

Da sich nun die Frage stellte, wie stark der Einfluss der Magnesiumchloridkonzentration auf die Bindung von APT1 an die Affinitätssonde ist, wurde ein Pulldown mit APT1 in Puffer durchgeführt. Anschließend wurden die Partikel mit steigenden Konzentrationen Magnesiumchlorid gewaschen (Abb. 3.19).



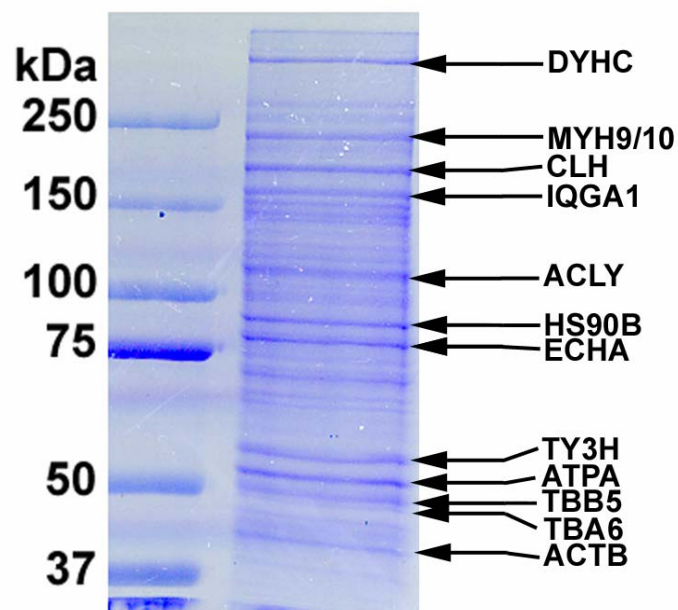
**Abbildung 3.19:** Einfluss der Magnesiumchloridkonzentration auf APT1. links: Pulldown mit AM 42 gewaschen mit (v.l.n.r.) 0, 10, 50 , 100 und 200 mM MgCl<sub>2</sub>; rechts: Pulldown mit JC15 gewaschen mit (v.l.n.r.) 0, 10, 50 , 100 und 200 mM MgCl<sub>2</sub>; APT1 Nachweis mit Antikörper.

Es ist zu erkennen, dass die Bande bei 25 kDa bei AM42 mit zunehmender Magnesiumchloridkonzentration schwächer wird. Bei JC15 hingegen fehlt sie völlig. Darüberhinaus fällt allerdings auch auf, dass die Bande bei 50 kDa von der Magnesiumchloridkonzentration unbeeinflusst bleibt. Außerdem gilt dies auch für JC15, hier ist die Bande bei 50 kDa zwar deutlich schwächer, bleibt aber ebenfalls unbeeinflusst. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass APT1 in der dimerisierten Form zum Teil auch unspezifisch bindet. Das es sich bei der 50 kDa Bande um APT1 handelt wurde mit einem tryptischen Verdau überprüft und bestätigt.



### 3.8. Bestimmung der zellulären Ziele von Raspalin 4

Zur Identifizierung der Proteine aus dem Pulldown wurden die Proteine auf ein präparatives 7.5%iges SDS-Gel aufgetragen. Die geringe Acrylamidkonzentration ermöglicht eine hohe Auflösung im oberen Molekulargewichtsbereich (> 30 kDa), dies ist insofern von Vorteil, als dass die nachweisbaren Proteine alle oberhalb dieser Grenze liegen (Abb. 3.20). Banden aus fünf unabhängigen Pulldowns wurden jeweils ausgeschnitten, verdaut und mit MALDI Massenspektrometrie analysiert. Die Pfeile in Abbildung 3.20 kennzeichnen die Proteine, welche mit signifikanter Punktzahl ( $p < 0.05$ ) durch die Mascot Suchmaschine identifiziert konnten.



**Abbildung 3.20:** Durch In-Gel Verdau identifizierte Proteine. Die Pfeile kennzeichnen die Banden, welche mit Mascot identifiziert (Signifikanzgrenze:  $p < 0.05$ ) werden konnten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Proteine mit den Swisshot Akzessions Abkürzungen angegeben. 7.5%iges SDS-Gel mit Coomassie gefärbt.

Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

**Tabelle 3.1:** Identifizierte Proteine des In-Gel Verdaus.

Protein	Anzahl der Identifizierungen aus 5 Pulldowns	Protein	Anzahl der Identifizierungen aus 5 Pulldowns
Tubulin $\alpha$ (TBA6)	5	Actin cytoplasmatisch (ACTB)	2
Tubulin $\beta$ (TBB5)	4	Dynein (DYHC)	2
Tyrosin-3-Monooxygenase (TY3H)	4	Clathrin (CLH)	2
HSP90 (HS90B)	3	Myosin (MYH9/10)	1
ATP Synthase (ATPA)	2	Trifunctional enzyme subunit alpha' (ECHA)	1
ATP Citrat Synthase (ACLY)	2	IQGAP1 (IQGA1)	1

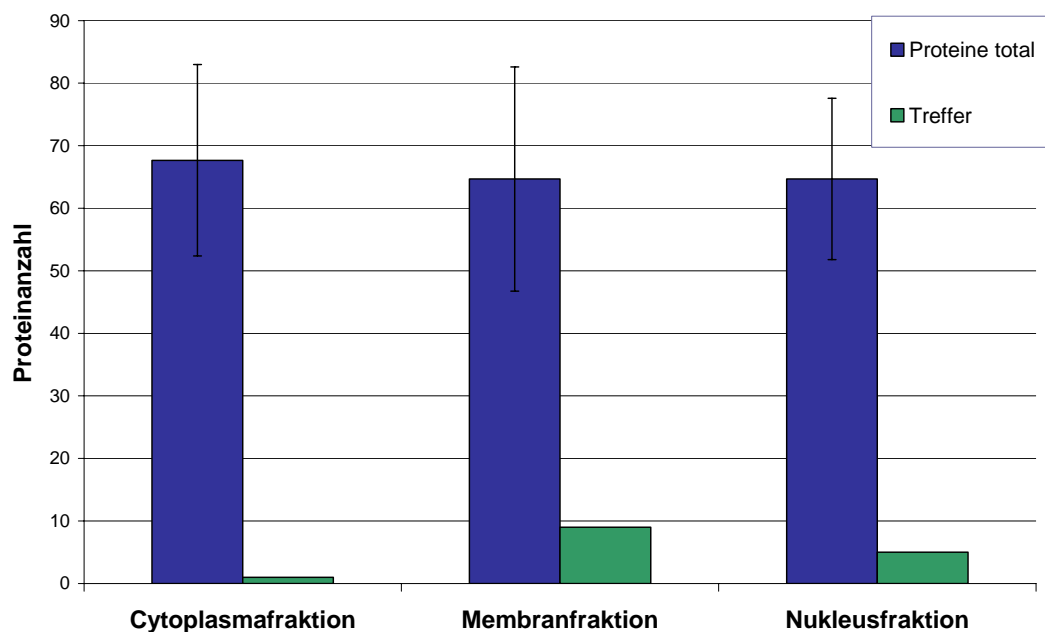
Obwohl die Kontrollexperimente zeigen, dass durch die Waschbedingungen unspezifische Bindungen nahezu komplett unterbunden werden (Abb. 3.15), und die Banden erst in Anwesenheit des Inhibitors wieder deutlich stärker werden, ist eine unspezifische Bindung nicht gänzlich auszuschließen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden bei drei weiteren Pulldowns das Lysat fraktioniert. Durch die Fraktionierung erfolgt eine Aufteilung in Membran, Cytoplasma und Nukleus, sowie die weitgehende Entfernung des Cytoskeletts (s. 2.1.6.3.). Auch diese Herangehensweise kann eine unspezifische Bindung nicht völlig ausschließen, aber zumindest ermöglicht die Aufteilung eine bessere Auflösung. In den einzelnen Fraktionen tauchen natürlich die für die jeweilige Fraktion besonders hoch exprimierten Proteine ebenfalls verstärkt auf. Allerdings erhöht die Auftrennung die Wahrscheinlichkeit auch nicht so stark exprimierter Proteine zu detektieren, welche sonst von stärker exprimierten Proteinen entweder überlagert oder sogar verdrängt werden. Darüberhinaus wurde

der Verdau direkt an den Streptavidinpartikeln durchgeführt, ohne die Proteine zu zuvor zu eluieren. Die Bestimmung der Peptidfragmente

erfolgte mit Hilfe der ESI-MS/MS Analyse. Diese Methode zeichnet sich durch ihre höhere Empfindlichkeit aus, sodass auch geringe Mengen an Protein in der Kontrolle noch nachweisbar sind.

Die Suche erfolgte ebenfalls mit Mascot. In diesem Fall wurden Proteine als identifiziert betrachtet, welche nicht in der Kontrolle auftauchten und in allen drei Ansätzen gefunden wurden (Signifikanzgrenze  $p < 0.05$ ). Bei diesem Versuch zeigte sich, dass auch in der Kontrolle noch eine große Anzahl an Proteinen nachweisbar war, welche aber insgesamt geringer ist, als die Menge der Proteine, welche mit AM42 isoliert werden (Abb. 3.21).



**Abbildung 3.21:** Anteil der als Treffer identifizierten Proteine an der Gesamtanzahl an isolierten Proteinen. blaue Balken: Gesamtanzahl der isolierten Proteine pro Fraktion; grüne Balken: Als Treffer identifizierte Proteine. Vertikale Linien: Standardabweichung.

Nach Abzug der mit der Kontrolle übereinstimmenden Proteine bleibt nur noch eine vergleichsweise geringe Anzahl übrig (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Identifizierte Proteine des Direktverdaus.

Zellfraktion	Proteine
<b>Cytoplasmafraktion</b>	Elongation Factor 1-alpha 2
<b>Membranfraktion</b>	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor
	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor
	Sodium/Potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor
	ADP/ATP translocase 2
	Coiled-coil domain-containing protein 47 precursor
	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein
	Synaptic glycoprotein SC2
	Elongation Factor 1-alpha 1
	Synaptotagmin 1
<b>Nukleusfraktion</b>	Lamin A
	Polypyrimidine tract-binding protein 1
	Nucleophosmin (Nuclear Phosphoprotein B23)
	Nuclear pore complex protein Nup107

Es fällt im Vergleich zum In-Gel Verdau auf, dass es kaum Übereinstimmungen zwischen den identifizierten Proteinen aus den beiden Versuchen gibt. Lediglich ATP Synthase und 'Trifunctional enzyme subunit alpha' konnten auch mit dem ESI nachgewiesen werden. Der Grund hierfür liegt darin, dass die zuvor im Gel gefunden Proteine auch in der Kontrolle vorhanden waren und somit nicht in die Liste aufgenommen wurden. Weiterhin ist auffällig, dass mit 9 Proteinen der größte Anteil der identifizierten Proteine in der Membranfraktion zu finden ist. Auf die Bedeutung dieser Befunde wird in der Diskussion noch näher eingegangen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Bedeutung von APT1 für die Palmitoylierung

Die Palmitoylierung von Ras-Isoformen ist die Grundvoraussetzung für deren korrekte Lokalisation und Funktion. Obwohl APT1 zunächst als Schlüsselenzym für die Deacylierung von H-Ras und die  $\alpha$ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine identifiziert wurde, ist eine mögliche Rolle bei der Palmitoylierung nicht auszuschließen. Mit DHHC9 und GCP16 konnten zwar bereits potentielle Kandidaten für die Palmitoylierung von Ras-Isoformen identifiziert werden (Swarthout et al., 2005), dies konnte bisher jedoch nur *in vitro* nachgewiesen werden.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte eine Palmitoylierungsaktivität *in vitro* auch für APT1 gezeigt werden. APT1 war in der Lage, ein Pentapeptid zu palmitoylieren, welches dem C-Terminus von H-Ras entsprach. Bei Versuchen mit einem synthetisch modifizierten N-Ras-Protein, welches analog zum hier verwendeten Substratpeptid auf Palmitoylierung mit einer messbaren Verschiebung des Fluoreszenzmaximums reagiert, konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass sich diese Reaktion mit Raspalin 4 inhibieren lässt (Deck et al., 2005).

Dieses Ergebnis ist zunächst nicht verwunderlich, da enzymatische Reaktionen immer dem Gesetz der Reversibilität folgen.

Die Umkehrung der Katalyserichtung lässt sich sogar für die Synthese von Peptiden nutzen (Oka und Morihara, 1977).  $\alpha$ -Chymotrypsin (eine Serinprotease) und Papain (eine Cysteinprotease), katalysieren anstelle der proteolytischen Hydrolyse die Bildung von Peptiden. Ausschlaggebend ist hierbei die Konzentration, von Enzym und Substrat, sowie die Löslichkeit der Produkte und der pH-Wert der Lösung. Um die Reaktionsrichtung umzukehren müssen  $\alpha$ -Chymotrypsin und die einzelnen Peptide in hohen Konzentrationen vorliegen. Gibt es darüberhinaus neben Wasser noch ein weiteres Lösungsmittel und liegt in diesem Fall ein Zwei-Phasen-System vor, wird die Hydrolyse weitgehend verhindert und der nukleophile Angriff unterstützt. Wenn zusätzlich das Produkt hydrophober ist als das Edukt, wird dies in einem Zwei-Phasen-System entfernt, indem es in die nicht-wässrige

diffundiert. Dies treibt die Reaktion zusätzlich an, solange weiterhin ein Überschuss an Edukt bestehen bleibt.

Die Palmitoylierungsaktivität von APT1 kann ebenfalls auf diese Weise erklärt werden. Die Bildung eines Thioesters ausgehend von einem Thiol und einer freien Säure kann als analoger Mechanismus zur Peptidsynthese durch Proteasen betrachtet werden. Tatsächlich besitzt APT1 die gleiche katalytische Triade wie Serin- und Cysteinproteasen. Für diese Enzyme konnte, wie schon erwähnt, gezeigt werden, dass die Katalyse der Synthesereaktion gegenüber der Hydrolyse begünstigt werden kann. So lässt sich das Energieniveau des Übergangszustandes durch Veränderung der entropischen und enthalpischen Rahmenbedingungen herabsetzen. Dies kann erreicht werden, indem die Enzyme die Substrate lokal konzentrieren und korrekt orientieren. Dabei werden die Beweglichkeit der für den Übergangszustand wichtigen Gruppen minimiert und entsprechend die Aktivierungsentropie verringert. Zusätzlich wird durch Veränderungen in der Ladungsverteilung im aktiven Zentrum und einer Veränderung der Geometrie der Substratbindung eine Verringerung der Aktivierungsenthalpie erreicht.

Neben diesen enzymatischen Voraussetzungen herrschen im zellulären Umfeld die für die Acylierung notwendigen Bedingungen vor. Am Golgi-Apparat, wo die Acylierung der Ras-Isoformen erfolgt (Choy *et al.*, 1999), liegt mit der Golgimembran und dem umgebenden Cytosol ein Zwei-Phasen-System vor, wie es für die Reaktion benötigt wird. Ferner ist Ras nach erfolgter Palmitoylierung hydrophober als vorher, womit ein weiteres Kriterium erfüllt wäre. Da Ras nachfolgend über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran weiterbefördert wird, ist auch die Entfernung des Eduktes gegeben.

Obwohl nicht außer Acht zu lassen ist, dass neben dem bereits in Hefe identifizierten Palmitoyltransferasekomplex Erf2p-Erf4p (Bartels *et al.*, 1999, Zhao *et al.*, 2002) mittlerweile auch das humane Homolog identifiziert werden konnte (Swarthout *et al.*, 2005), ist eine Acylierung durch APT1 nicht ausgeschlossen. Für APT1 konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es in der Lage ist, Ras-Proteine *in vitro* zu depalmitoylieren und zu palmitoylieren.

Für beide Kandidaten ist die Bedeutung für die *in vivo* Acylierung jedoch noch nicht geklärt.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Inhibition der Depalmitoylierung für die Hemmung des Neuritenwachstums verantwortlich ist.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, zeigen neue Untersuchungen, dass der Zyklus von Palmitoylierung/Depalmitoylierung für die korrekte Lokalisation und Funktion von Ras entscheidend ist (Rocks et al., 2005 & 2006). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl nicht-palmitoylierbares N-Ras, als auch hexadecyliertes N-Ras, welches eine stabile Palmitoylierung simuliert, unspezifisch im gesamten Membransystem lokalisieren (Rocks et al., 2005). Daher wäre es denkbar, dass eine Verhinderung der Depalmitoylierung durch die Inhibition von APT1 und somit eine Unterbrechung des Zyklus auf diese Weise ebenfalls die Aktivierung von Ras negativ beeinflusst.

Dass das Neuritenwachstum durch Raspaline auf diese Weise inhibiert wird, kann nach wie vor nicht ausgeschlossen werden. Allerdings deuten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche darauf hin, dass Raspaline auf mehreren Ebenen das Neuritenwachstum behindern (s. 4.2. & 4.4.).

Klarheit kann in jedem Fall nur eine Überprüfung der Funktion und Aktivität von APT1 *in vivo* bringen. Versuche mit siRNA gegen APT1 und den bereits erwähnten neo-Ras-Proteinen wären eine Möglichkeit dies zu überprüfen, da ein 'Ausschalten' (engl. knock-down) von APT1 zeigen müsste, ob und wie die Lokalisation von Ras beeinflusst wird. Eine weitere Möglichkeit wäre das Einbringen von radioaktiv markiertem Palmitat. So ließe sich nachvollziehen, wie sich der Anteil von Palmitoyliertem Ras in An- und Abwesenheit von APT1 verändert.

## 4.2. Effekt von Raspalin 4 auf Zellen

Da die Versuche an PC12 Zellen einen Hinweis gaben, dass Raspalin 4 auf den Ras-Signalweg wirkt, wurde versucht dies in weiteren Zelllinien zu verifizieren. Als erstes wurde dies an HLR Zellen getestet. In diesen Zellen ist die Expression von Luziferase an den Ras-MAPK Signalweg gekoppelt (s. 2.3.). Nicht nur hier führte Raspalin 4 zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität, sondern auch bei MDCK-f3 Zellen war eine Veränderung des Phänotyps zu beobachten. Dieser war zwar nicht mit Rücktransformation zu erklären, denn es zeigten sich keine vermehrten Zell-Zell Kontakte, sondern die Zellen waren abgerundet. Dies deutet auf Apoptose hin. Während bei der Coelstin Blau Färbung lediglich eine Abrundung zu beobachten war, war mit der differenzierten Fluoreszenzfärbung nicht nur die Abrundung sondern auch blasige Ausstülpungen bei einigen Zellen zu beobachten.

Das im ApoONE®-Assay dieser Befund nicht bestätigt werden konnte, kann mehrere Gründe haben. Tatsächlich zeigten nur einige Zellen deutliche Anzeichen für Apoptose, sodass die Anzahl der noch nicht oder noch nicht stark apoptotischen Zellen das Signal überlagert haben könnten.

Dass es sich bei dem Effekt um ein Artefakt handelt, ist trotzdem unwahrscheinlich, da die Wirkung eindeutig konzentrationsabhängig ist. Um diesen Befund aber eindeutig zu klären, wäre es sinnvoll für zukünftige Untersuchungen Apoptosetests zu verwenden, welche andere Faktoren detektieren, die bereits frühe Symptome der Apoptose erkennen, wie z.B. die Externalisierung von Phosphatidylserin. Dass die beobachteten Effekte auf Cytotoxizität zurückgehen, ist auszuschließen, da Raspalin 4 bei den für diese Versuche verwendeten Konzentrationen in diesen Zellen nicht toxisch ist. Lediglich bei HLR Zellen zeigte sich eine erhöhte Toxizität. Diese erhöhte Empfindlichkeit ist durch die Transformation bedingt und wurde auch schon bei anderen Substanzgruppen beobachtet (mündliche Mitteilung Dipl.-Biol. Sascha Menninger, MPI für molekulare Physiologie, Dortmund).

Eine Überprüfung des Phosphorylierungszustandes von ERK und Elk-1, zeigte, dass diese unbeeinflusst bleibt. ERK ist die letzte Kinase in der Signalkaskade des Ras-MAPK Signalkaskade (s. 1.1., Abb. 1.3). Somit



scheint die Kaskade bis zu diesem Punkt unbeeinflusst zu bleiben. Die Phosphorylierung von Elk-1, dem letzten Schritt vor der Transkription, ist ebenfalls nicht beeinträchtigt. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Inhibition der Palmitoylierung von Ras, ob über APT1 oder auf anderem Wege, die Signalkaskade gleich zu Beginn beeinträchtigt, sodass die Phosphorylierung ausbleibt. Wie in Abschnitt 4.4. noch deutlich wird, scheint der Mechanismus daher ein anderer zu sein bzw. die Inhibition scheint deutlich weiter unten im Signalweg stattzufinden als bisher angenommen.

### 4.3. Evaluierung der Affinitätssonden

Ein zentrales Thema dieser Arbeit war die Entwicklung einer Affinitätssonde zur Bestimmung der zellulären Ziele von Raspalin 4 bzw. den Raspalinen im Allgemeinen. Obwohl es bereits viele Beispiele für die erfolgreiche Anwendung von Affinitätssonden gibt, muss die Evaluierung der einzelnen Sonden in jedem Fall erneut durchgeführt werden, da die Struktur und die damit verbundenen Eigenschaften (Ladung, Löslichkeit, Größe, etc.) der jeweiligen Substanz die Eigenschaften der Affinitätssonde maßgeblich beeinflussen. Neben der Wahl der richtigen Position für die Modifikation ist daher die Wahl des Linkers und der Affinitätsgruppe von entscheidender Bedeutung für den Erfolg.

Die geeignete Position für die Modifikation lässt sich durch Synthese einer Bibliothek und der Überprüfung der Aktivität der Derivate ermitteln. So erhält man gute Rückschlüsse über die für die Aktivität wichtigen Seitengruppen. Die Wahl des Linkers hängt zum einen von der Löslichkeit der zu untersuchenden Substanz ab, wobei sich PEG als gut geeignet erwiesen hat. Darüberhinaus spielt die Länge eine wichtige Rolle. Während zu kurze Linker die Bindung behindern, indem das Molekül nicht voll zugänglich ist, können zu lange Linker dazu führen, dass sich die immobilisierten Moleküle aufgrund zu großer Flexibilität ineinander verwinden und so ebenfalls unzugänglich werden (Guiffant *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurden Derivate mit zwei (JC10) und drei (AM42) PEG-Einheiten getestet. Im Bezug auf die Bindungseigenschaften war kein

nennenswerter Unterschied feststellbar. Die Löslichkeit wurde jedoch deutlich verbessert, während JC10 in hohen Konzentrationen ( $> 100 \mu\text{M}$ ) in wässriger Lösung ausfiel, blieb AM42 in Lösung. Die Erhöhung der Löslichkeit ist insofern meist von Vorteil, als dass auch unspezifische Bindungen aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen minimiert werden. Interessanterweise war trotz der unterschiedlichen Löslichkeit kein Unterschied im Bindungsmuster der beiden Derivate zu erkennen. Auch auf die Bindung von APT1 hat die Linkerlänge keinen Einfluß. Da aber AM42 zur Zeit der Erstellung dieser Arbeit in größeren Mengen zugänglich war, wurden alle weiteren Versuche damit durchgeführt.

Im Hinblick auf die Bindung von APT1 war auffällig, dass die Affinitätssonden sowohl monomeres als auch dimeres APT1 aus der Lösung entfernten. Die Eigenschaften der Bindung unterscheiden sich jedoch deutlich. Während das Dimer auch unspezifisch, wenn auch in geringerem Ausmaß, an der Kontrolle (JC15, Biotin+PEG) bindet, bindet das Monomer spezifisch an den Affinitätssonde. Darüberhinaus bleibt die Bindung des Dimers durch Magnesiumchlorid unbeeinflusst, während die Bindung des Monomers mit steigender Konzentration abnimmt. Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, dass beim Dimer aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auch unspezifische Bindung partiell zum Tragen kommt.

Da bei diesen Versuchen bereits ersichtlich wurde, dass neben APT1 auch noch weitere Proteine an die Affinitätssonden binden, war ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit diese Protein zu identifizieren, um den Effekt in PC12 Zellen zu verstehen.

Das Hauptproblem bei der Affinitätsaufreinigung ist, wie schon erwähnt, unspezifische Bindung. Neben stringenten Waschprotokollen mit hohen Konzentrationen an Magnesiumchlorid bzw. chaotropen Salzen im Allgemeinen, führte auch die Verwendung des PEG-Linkers, aufgrund seiner Hydrophilie, zu einer weiteren Minimierung der unspezifischen Bindungen. Dies zeigte sich auch sehr deutlich in den Kontrollversuchen mit JC15 (Abb. 3.19). Im Vergleich zu Versuchen mit unkonjugierten Streptavidinpartikeln, wurden die Banden bei den mit JC15 konjugierten Partikeln deutlich schwächer. Die Anwesenheit des PEG-Linkers vermindert also die unspezifische Bindung sichtbar.

Allerdings wurden einige der Banden, welche noch sehr schwach zu erkennen waren, bei Verwendung von JC10 und AM42 wieder stärker. Dies kann bedeuten, dass diese Proteine spezifisch an den Inhibitor binden.

Da die hydrophobe Palmitoylgruppe des Inhibitors ebenfalls unspezifische Bindungen begünstigt, ist dies nicht gänzlich auszuschließen.

Auffällig ist, dass nahezu alle Proteine aus dem in-Gel Verdau zu den Strukturproteinen und zu den für die Zellhomeostase wichtigen Proteinen gehören. Diese Proteine sind in Zellen sehr stark exprimiert. Es ist bekannt, dass diese Proteine häufig unspezifisch an Affinitätssonden binden (Shiyama et al., 2004) und so spezifisch bindende Proteine verdrängen oder, wenn es sich zudem um gering exprimierte Proteine handelt, das Signal bei der massenspektrometrischen Analyse überlagern. Dies wiederum führt dazu, dass Zielproteine, welche geringer exprimiert sind, trotz größerer Affinität nicht identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde dieses Problem auf zwei Ebenen adressiert. Mit Hilfe einer Auftrennung des Lysates in einzelne Fraktionen (Membran-, Nukleus-, Cytoplasmafraktion) und der gleichzeitigen Entfernung des Cytoskeletts (QProteome Kit, Qiagen) konnte die Effizienz des Pulldowns deutlich verbessert werden. Ein zusätzlicher Vorteil der Fraktionierung ist, dass man einen ersten Anhaltspunkt über die mögliche Lokalisierung des Inhibitors innerhalb der Zelle erhält (s. a. 4.4.).

Eine weitere Verbesserung brachte die Analyse des Verdau mit dem ESI-MS/MS. Im Gegensatz zum in-Gel Verdau mit anschließender MALDI-TOF MS Analyse war hier auch eine Überprüfung der an der Kontrolle haftenden Proteine möglich. Dies liegt an der höheren Empfindlichkeit. Für den in-Gel Verdau waren nur Proteine zugänglich, welche deutlich mit Coomassie gefärbt waren. In der Kontrolle waren jedoch meist keine oder nur sehr schwache Banden zu erkennen. Mit der ESI MS/MS Analyse konnten auch die an der Kontrolle gebundenen Proteine identifiziert werden. Es wurden daraufhin nur Proteine als identifiziert gewertet, welche nicht in der Kontrolle vorhanden waren. Allerdings ist auch hier nicht auszuschließen, dass einige Proteine, welche auch in der Kontrolle zu finden waren, trotzdem spezifisch an der Affinitätssonde binden. Dies gilt besonders dann, wenn diese bei der Identifizierung eine höhere Punktzahl erreichen (entspricht mehr

Peptidfragmenten des jeweiligen Proteins) und somit in größeren Mengen als in der Kontrolle vorhanden sind. Dies zu überprüfen würde jedoch bedeuten, dass mehr als 50 Proteine auf ihre Spezifität als Bindungspartner überprüft werden müssten. Daher wurde sich auf die Proteine beschränkt, welche nicht in der Kontrolle vorhanden waren, da diese offensichtlich mit großer Spezifität an den Inhibitor binden.

Die Fraktionierung und die Möglichkeit zur Auswertung der Kontrolle hatten zur Folge, dass nur zwei Proteine, welche auch im in-Gel Verdau identifiziert wurden, weiterhin zu den Treffern gezählt wurden. Allerdings sind einige der auf diese Weise identifizierten Proteine (z.B. Lamin A, Elongationsfaktor1 alpha 1&2, ATP Synthase) in den jeweiligen Kompartimenten ebenfalls stark exprimiert. Da diese Proteine aber nicht in der Kontrolle vorhanden waren, ist eine spezifische Bindung sehr wahrscheinlich.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier beschriebene Methode den Anteil der unspezifischen Bindung deutlich minimiert. Endgültige Gewissheit kann in jedem Fall nur eine Überprüfung der Bindungs- und Inhibitionseigenschaften *in vitro* bringen.

#### **4.4. Identifizierung der Zielproteine**

Im Folgenden werden alle identifizierten Proteine aus beiden Analyseverfahren diskutiert und deren mögliche Bedeutung für den beobachteten Effekt erörtert. Eine Bewertung der Spezifität der Bindung erfolgt jedoch nicht, da dies nur durch experimentelle Überprüfung eindeutig geklärt werden kann.

##### **4.4.1. Durch den in-Gel Verdau identifizierte Proteine**

Zu den am häufigsten beim in-Gel Verdau identifizierten Proteinen gehörten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, aber auch Aktin konnte mehrfach identifiziert werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um wichtige Strukturproteine der Zelle. Tubulin bildet aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten Mikrotubuli, welche sowohl der Zelle ihre Form geben, als auch auch bei der Bewegung der Zelle

eine Rolle spielen. Aktin ist ebenfalls Teil des Cytoskeletts und verleiht der Zelle Stabilität. Selbstverständlich führt eine Inhibierung der korrekten Anordnung dieser Strukturkomponenten auch zu einer negativen Beeinflussung des Neuritenwachstums (Neely *et al.*, 1999, Teichman-Weinberg *et al.*, 1988).

Wie bereits in 4.1. erwähnt, ist HSP90 hauptsächlich als Chaperon bekannt, welches die korrekte Faltung von Proteinen unterstützt. Darüber hinaus spielt es aber auch bei weiteren zellulären Prozessen eine Rolle. So bildet es Signalkomplexe, die auch für das Neuritenwachstum von Bedeutung sind. Dou *et al.* (2005) konnten zeigen, dass Inhibition von HSP90 zu einer Herabsetzung der ERK Phosphorylierung durch Inhibition der Komplexbildung mit Raf führt. Da dies aber in den hier vorgestellten Versuchen nicht zu beobachten war, liegt es nahe, dass der Mechanismus der Inhibition bzw. der Bindung im Allgemeinen ein anderer ist. Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt wäre hier die Interaktion mit N-WASP. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition der Bindung von HSP90 an N-WASP zu einer Verhinderung der korrekten Aktinpolymerisation führt, welche für das Neuritenwachstum in PC12 Zellen notwendig ist (Park *et al.*, 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass HSP90 *in vitro* an Tubulindimere bindet und so die Mikrotubulusbildung verhindert (Garnier *et al.*, 1998).

Eine weitere Gruppe von Proteinen, welche identifiziert werden konnte, sind die für den zellulären Transport, Zellmotilität und Chemotaxis wichtigen Proteine Myosin, Dynein und Clathrin.

Bei den hier gefundenen Myosinen handelt es sich jeweils um die schweren Ketten der Myosinisoformen IIA und IIB des nichtmuskulären Myosins. Bei Myosin II handelt es sich um das am umfassendsten untersuchte Myosin im Bezug auf die neuronale Entwicklung (Brown und Bridgman, 2004). Durch die Phosphorylierung der leichten Kette wird die Bindung an Aktin aktiviert und die bipolare Filamentbildung durch Induktion einer Konformationsänderung der schweren Kette ermöglicht (Suzuki *et al.*, 1978). Die Aktinbindung führt darüberhinaus zu einer Aktivierung der ATPase-Aktivität der schweren Kette (Brown und Bridgman, 2004). Ferner konnten Wylie *et al.* (1998) zeigen, dass das Neuritenwachstum in Maus

Neuroblastoma Zellen (Neuro-2A) durch Zugabe von Antisense-Oligodeoxyribonukleotiden gegen Myosin IIB inhibiert wird. Hier wären zwei Ansatzpunkte des Inhibitors denkbar. Da der Inhibitor ebenfalls an Aktin bindet, deutet dies darauf hin, dass die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen durch den Inhibitor möglicherweise unterbunden wird.

Dynein, welches ebenfalls zu den Motorproteinen gehört, ist bei der neuronalen Migration von großer Bedeutung. Es bildet Komplexe mit NudC und Lis1, beides Proteine, welche für die korrekte neuronale Entwicklung unerlässlich sind (Morris *et al.*, 1998). Der Komplex dieser Proteine kolokalisiert mit Tubulin  $\alpha$  am Mikrotubulus organisierenden Zentrum (Aumais *et al.*, 2001). Darüberhinaus bildet das Zusammenspiel von Dynein, intakten Mikrotubuli und p150<sup>Glued</sup> Dynaktin, eine wichtige Schlüsselkomponente des cytoplasmischen Dynein/Dynaktin Motorkomplexes (Allan, 2000), welcher eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Mitogen aktivierter Proteinkinase Kinase 6 (MKK6) und p38 MAPKs spielt (Cheung *et al.*, 2004). p38 inhibiert die Apoptose in PC12 Zellen (Cai *et al.*, 2006). Neben der direkten Bindung an die Motorproteine und der damit verbundenen Behinderung des Neuritenwachstums, wäre daher in diesem Fall auch ein aktivierender Einfluss auf p38 möglich, welcher durch die Aktivierung der Apoptose dem Neuritenwachstum entgegenwirkt.

Clathrin ist ein wichtiges Strukturprotein bei der Endocytose. Es umschließt die zu internalisierenden Vesikel. Wird z. B. die Vesikelbildung durch Inhibition bzw. gezielte Mutagenese des Dynamins verhindert, so wird die Signalweiterleitung unterbrochen (Damke *et al.*, 1994).

Ein weiteres Protein, welches identifiziert wurde, ist die ATP Synthase. Die ATP Synthase kommt bei Eukaryoten in erster Linie in der mitochondrialen Membran vor, wo sie, getrieben über einen Protonengradienten, aus ADP und Phosphat ATP bildet und somit der Zelle Energie liefert. Eine Inhibition führt selbstverständlich zum Verlust des für sämtliche Zellprozesse und Signalweiterleitung notwendigen ATPs und damit zum Erliegen sämtlicher ATP-abhängiger Prozesse.

Es wurden auch ATP Citrat Synthase und die alpha Untereinheit des trifunktionalen Enzyms (TP-alpha) gefunden. Während ATP Citrat Synthase unter Verbrauch von ATP aus Citrat und Coenzym A das für die Lipidsynthese notwendige Acetyl CoA herstellt spielt TP-alpha bei der  $\beta$ -Oxidation eine Rolle (Uchida et al., 1992). Beides sind wichtige Proteine im Fettsäure Metabolismus. Können aufgrund einer Inhibition dieser Enzyme keine Fettsäuren hergestellt werden, hat dies grundlegenden Einfluss auf die Ras-abhängigen Signalwege, da für die korrekte Lokalisation und Funktion von Ras die Lipidierung und insbesondere die Palmitoylierung eine große Rolle spielt (Deck et al., 2005, Bijlmakers und Marsh, 2003).

Ein Protein welches ebenfalls mehrfach identifiziert werden konnte, ist die Tyrosin-3-monooxygenase. Diese Enzym katalysiert die Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Dopaminsynthese (Dunkley et al., 2004). L-DOPA alleine führt zwar nicht zu ausgeprägtem Neuritenwachstum, hat aber einen synergistischen Einfluss im Zusammenspiel mit NGF (Mena et al., 1998). Daher könnte eine Inhibition die Neuritenbildung entsprechend negativ beeinflussen.

Weiterhin wurde IQGAP1 identifiziert. Es besitzt sequenzielle Ähnlichkeit mit Ras GTPase aktivierenden Proteinen. Es moduliert u.a. die Anordnung und strukturelle Organisation von Aktin, zum einen direkt, wobei es hier die Polymerisierung unterstützt (Erickson et al., 1997) und zum anderen indirekt durch Interaktion mit Rac1 und Cdc42 (Brown und Sacks, 2006). Außerdem aggregiert es mit wachsenden Mikrotubuli über CLIP-170 (Fukata et al., 2002). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass IQGAP1 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung das Neuritenwachstum unterstützt (Li et al., 2005).

Wie sich hier zeigt, interagieren einige der identifizierten Proteine direkt oder indirekt miteinander, so dass nicht auszuschließen ist, dass einige der Proteine als Komplexe vorlagen und so zusammen aus dem Lysat isoliert wurden.

#### 4.4.2. Durch den Direktverdau (‘on-bead’ Verdau) identifizierte Proteine

Die im Direktverdau identifizierten Proteine sind bis auf zwei Ausnahmen nicht mit denen aus dem in-Gel Verdau identisch. Lediglich TP-alpha und ATP Synthase gehören nach wie vor zu den Treffern. Der Hauptgrund für diesen Unterschied, nämlich die Fraktionierung des Lysats, wurde bereits in 4.3. erläutert. Ein weiterer Unterschied besteht in der Probenanalyse und -auswertung. Beim in-Gel Verdau wurden alle sichtbaren Banden verdaut und untersucht. Eine einmalige Identifikation mit signifikanter Punktzahl in Mascot war hierbei ausreichend. Ein Vergleich mit der Kontrolle war in diesem Fall nicht möglich, da die Banden nicht sichtbar oder zu schwach (= zu wenig Protein) für die Analyse waren. Bei dem ‘on-bead’ Verdau hingegen erfolgte ein Abgleich mit der Kontrolle, da auch hier Proteine identifiziert werden konnten. Darüberhinaus wurden bei diesen Versuchen nur Proteine als identifiziert gewertet, welche nicht in der Kontrolle gefunden wurden und in allen drei Ansätzen nachweisbar waren. Beim ‘on-bead’ Verdau ist auffällig, dass ein Großteil der identifizierten Proteine aus der Membranfraktion isoliert wurde. Darüberhinaus sind hierbei nahezu die Hälfte dieser Proteine (4 von 9) mitochondriale Proteine. Neben den bereits im in-Gel Verdau identifizierten mitochondrialen Proteinen TP-alpha und ATP Synthase wurden außerdem noch ATP/ADP Translokase 2 und das strukturell verwandte, mitochondriale 2-Oxoglutarat/Malat Carrier Protein identifiziert. Während ATP/ADP Translokase 2 für den Transport von ATP und ADP über die mitochondriale Membran verantwortlich ist, transportiert das 2-Oxoglutarat/Malat Carrier Protein 2-Oxoglutarat über die innere mitochondriale Membran im elektroneutralen Austausch gegen Malat und andere Dicarbonsäuren. Dieser Prozess ist für metabolische, Citratzyklus bezogene Prozesse, zu denen auch der Fettsäuremetabolismus und die Gluconeogenese gehören, von Bedeutung. Generell scheint Raspalin 4 also Einfluß auf den mitochondrialen Energiehaushalt zu haben. Interessant ist, dass die ATP/ADP Translokase 2 auch bei der Induktion von Apoptose eine Rolle spielt. Während der Apoptose inhibiert Bax, ein proapoptotischer Faktor, die ATP/ADP Translokase 2 und unterstützt so das



Fortschreiten der Apoptose (Belzacq *et al.*, 2003). Dies ist insofern interessant, als dass auch Nucleophosmin (B23), welches in der Nukleusfraktion gefunden wurde, eine Rolle bei der Apoptose spielt. Nucleophosmin (B23) ist eine wichtige Schaltstelle bei der Weiterleitung der durch NGF induzierten anti-apoptotischen Signale (Ahn *et al.*, 2005). Bei B23 handelt es sich um einen nuklearen Rezeptor für Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Es ist bekannt, dass der PI3K-Akt Signalweg entscheidend für das Überleben von Neuronen ist (Brunet *et al.*, 2001). Zusammen mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit MDCK-f3 Zellen, bei denen ebenfalls Hinweise auf Apoptose zu erkennen waren (s. 3.5.) wäre ein Einfluß von Rascalin 4 durch Inhibition dieser beiden Proteine durchaus denkbar.

Neben den für den Fettsäuremetabolismus und den allgemeinen Energiehaushalt wichtigen Proteinen wurde in der Membranfraktion auch 'Elongation Factor 1 alpha-1' (EF1A-1) identifiziert. Zusätzlich wurde in der cytoplasmatischen Fraktion der 'Elongation Factor 1 alpha-2' (EF1A-2) gefunden. Dies ist nicht ungewöhnlich, da sowohl EF1A-1, als auch EF1A-2 im Nukleus und im Cytoplasma vorkommen können.

Bei EF1A-2 handelt es sich um eine stark homologe Isoform zu EF1A-1 (92%), deren Expression sich während der Zellentwicklung umgekehrt proportional zu EF1A-1 verhält. EF1A-1 ist vor allem während der Entwicklung von Nervenzellen stark exprimiert. EF1A-2 hingegen ist bei ausdifferenzierten Zellen stärker vertreten (Lee *et al.*, 1993, Khalyfa *et al.*, 2001). Die hauptsächliche Funktion dieser Proteine besteht in dem Transport von Aminoacyl tRNAs zu den kleinen Untereinheiten der Ribosomen während der Proteinbiosynthese (Negrutskii und El'skaya, 1998).

In PC12 Zellen führt Stimulation mit NGF zu einer verstärkten Expression von EF1A-1 (Petroulakis und Wang, 2002). Eine Inhibition würde somit die Expression der für das Neuritenwachstum nötigen Proteine verhindern. Hierbei erfolgt die Signalweiterleitung allerdings nicht über den Ras-MAPK Signalweg, sondern über die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Die Inhibition von EF1A-1 würde zudem den beobachteten Effekt bei HLR Zellen erklären, da auch bei einer Stimulation mit EGF EF1A-1 hochreguliert wird

und somit die Expression der in diesem Fall proliferationsrelevanten Proteine verhindert wird (Talukder *et al.*, 2001). Hier erfolgt die Weiterleitung jedoch wieder über den Ras-MAPK Signalweg, denn Talukder *et al.* konnten zeigen, dass die Inhibition von MEK die Hochregulation von EF1A-1 verhindert. Eine direkte Inhibition von EF1A-1 hätte daher keinen Einfluß auf die Phosphorylierung der Ras-MAPK Signalkaskade, da EF1A-1 am Ende der Kaskade steht.

EF1A-2 hat neben der Proteinbiosynthese auch noch direkten Einfluß auf die Integration von apoptotischen Signalen. So führt eine Überexpression zum Schutz vor Apoptose (Ruest *et al.*, 2002).

Eine Inhibition dieser Proteine hätte daher zur Folge, dass die notwendigen Proteine für die Differenzierung nicht oder nur unzureichend exprimiert werden und darüberhinaus pro-apoptotische Signale verstärkt werden.

Ein weiteres identifiziertes Protein aus der Membranfraktion, welches für das Neuritenwachstum in PC12 Zellen von Bedeutung ist, ist Synaptotagmin 1. Synaptotagmin 1 findet sich zusammen mit anderen präsynaptischen Proteinen (z.B. SNAP-25, Syntaxin IA) in den Wachstumskonen von Nervenzellen. Synaptotagmin ist besonders bei der Neurotransmitterfreisetzung von Bedeutung. Es besitzt Funktion als Kalziumsensor und vermittelt auf diesem Weg die Freisetzung von Neurotransmittern (Geppert und Südhof, 1998) und ist darüberhinaus auch Bestandteil des exocytotischen Fusionskomplexes (Schiavo *et al.*, 1997). Es gibt allerdings auch Hinweise, dass Synaptotagmin unabhängig von der Kalziumkonzentration die Neurotransmitterfreisetzung steuern kann (Thomas und Elferink, 1998). Obwohl die Transmitterfreisetzung im Rahmen dieser Untersuchung nicht überprüft wurde, könnte eine Inhibition trotzdem Relevanz haben, denn Fukuda und Mikoshiba (2000) konnten zeigen, dass Überexpression der Synaptotagmin Isoformen 1 und 2 zu einem verstärkten Neuritenwachstum in PC12 Zellen führt. Eine Inhibition könnte somit das Neuritenwachstum negativ beeinflussen.

Proteine, die neben dem bereits erwähnten Nucleophosmin (B23) in der Nukleusfraktion identifiziert werden konnten, sind Lamin A, Nucleoporin(Nup)-

107 (Nup107) und Polypyrimidin-traktbindendes Protein (PTB) . Während Lamin A, welches zur Gruppe der Intermediärfilamente gehört, eine wichtige Strukturkomponente im Nukleus bildet und darüberhinaus auch bei der Integration von Signalen eine Rolle spielt, ist Nup107 Teil des nuklearen Porenkomplexes.

Versuche an Mäusen zeigen, dass eine Mutation bei Lamin A zu einer Aktivierung des Ras-MAPK Signalweges führt (Muchir *et al.*, 2007). Die genauen Mechanismen sind allerdings noch unklar. Da Muchir *et al.* nur den Aktivierungszustand in Mäuseherzen untersucht haben, bleibt fraglich, inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf andere Gewebe und Organe übertragen lassen. Dieser Befund und die Tatsache, dass bei den hier vorgestellten Versuchen keine Aktivierung des Ras-MAPK Signalweges zu beobachten war (s. 3.4.), legt die Vermutung nahe, dass Raspalin 4 auf andere Weise auf Lamin A wirkt.

Nup107 ist, wie bereits erwähnt, Bestandteil des nuklearen Porenkomplexes. Der Porenkomplex hat auch eine wichtige Funktion bei der korrekten Anordnung des Kinetochors während der Mitose. Behandlung mit kleinen interferierenden RNAs (siRNAs, small interfering RNAs) führte zu einem Ausbleiben der bipolaren Anordnung der Kinetochore und somit zu einer nicht korrekten Trennung der DNA (Orjalo *et al.*, 2006). Da jedoch bei den hier vorgenommenen Versuchen mit BSC-1 und MDCK-f3 Zellen keine Beeinträchtigung der Mitose zu beobachten war, ist anzunehmen, dass die Rolle von Nup107 als Bestandteil des nuklearen Porenkomplexes eher von Bedeutung ist. Tatsächlich konnten Boehmer *et al.* (2003) zeigen, dass die Depletion von Nup107 mit Hilfe von siRNAs auch zur Depletion der anderen Nups führt, sodass die Ausbildung des nuklearen Porenkomplexes verhindert wird. Interessanterweise konnte kein Einfluß auf die Viabilität der Zellen beobachtet werden. Welchen Effekt die Bindung von Raspalin 4 an Nup107 auf Zellen hat bzw. inwieweit das Neuritenwachstum dadurch beeinflusst wird bleibt daher unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Als letztes sei noch PTB erwähnt. Hierbei handelt es sich um ein Protein der Ribonukleoprotein Partikel Proteinfamilie. Mitglieder dieser Familie sind in viele Aspekte des mRNA Metabolismus involviert (Krecic und Swanson, 1999). Wird in PC12 Zellen das Neuritenwachstum über den Protein Kinase

A (PKA) Signalweg angeregt, führt dies zur Relokalisation von PTB ins Cytoplasma. Inhibition der Expression von PTB mit siRNA beeinträchtigt das Neuritenwachstum (Ma *et al.*, 2007). Dass PTB auch eine Rolle beim NGF induzierten Neuritenwachstum spielt, konnte bisher nicht gezeigt werden. Lediglich für ein PTB Homolog, nPTB, konnten Ichikawa *et al.* (2002) zeigen, dass Stimulierung mit NGF zur Relokalisation führt.

Welche Bedeutung die Bindung von PTB hat, bleibt unklar, zumal sich trotz Stimulierung mit NGF, PTB nach wie vor im Nukleus befindet.

Bei den zwei verbleibenden Proteinen aus der Membranfraktion, dem synaptischen Glycoprotein 2 und um dem 'coiled-coil Domänen beinhaltenden Protein 47', konnten keine Rückschlüsse auf die Bedeutung für das Neuritenwachstum bzw. deren generelle Funktion gezogen werden, da zu dem Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nur wenig über diese Proteine bekannt war. Zu beiden konnten weder entsprechende Veröffentlichungen gefunden werden, noch konnten bei Onlinedatenbankrecherchen (Swissprot, UniProt) Hinweise auf die Funktion gefunden werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass Raspalin 4 das Neuritenwachstum auf mehreren Ebenen negativ zu beeinflussen scheint. Neben dem allgemeinen Effekt auf den Energiehaushalt und Fettsäuremetabolismus, wirkt Raspalin 4 auch direkt auf für das Neuritenwachstum wichtige Elemente, sowie auf Mechanismen, welche bei der Apoptose bzw. der Verhinderung derselben von Bedeutung sind. Gerade die letzten beiden Punkte scheinen hier von übergeordneter Bedeutung zu sein. Zum einen wird die Expression von Proteinen verhindert, die für das Neuritenwachstum wichtig sind, zum anderen werden pro-apoptische Mechanismen unterstützt, welche ebenfalls dem Neuritenwachstum entgegen wirken. Der Einfluß auf den Energiehaushalt und den Fettsäuremetabolismus scheint dagegen eher eine untergeordnete Rolle zuzukommen, da sich dies sonst in stärkerer Cytotoxizität geäußert hätte.

Außerdem läßt sich abschließend sagen, dass APT1 offensichtlich nicht das Hauptzielprotein von Raspalin 4 zu sein scheint. APT1 konnte zwar mit Hilfe

von Antikörpern in den Affinitätsaufreinigungen nachgewiesen werden, konnte aber nicht in den Verdauungen gefunden werden, und zwar weder unter den signifikanten Proteinen noch unter den verbleibenden Proteinen ohne signifikante Punktzahl. Nichtsdestoweniger ist ein Beitrag zum Gesamteffekt durch die Beeinflussung der Ras-Palmitoylierung nicht auszuschließen. Klarheit können nur weiterführende Untersuchungen bringen, die diese Frage direkt adressieren, etwa durch Versuche mit fluoreszenzmarkierten neo-Ras-Proteinen oder Ras-Fusionsproteinen (z.B. mit GFP oder YFP). Versuche, welche solche Methoden nutzen, um die Bedeutung der Palmitoylierung von Ras-Isoformen und den damit verbundenen Einfluss auf die Signaleigenschaften zu untersuchen, wurden erst kürzlich veröffentlicht (Rocks *et al.*, 2005 & 2006).

## 5. Zusammenfassung

Die Mechanismen der Krebsentstehung zu verstehen ist von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung neuer Medikamente, besonders dann, wenn man gezielt Krebs behandeln will, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen. In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte im Hinblick auf diese übergeordneten Ziele untersucht. Zum einen wurde die Rolle von APT1 bei der Regulation von Ras, einem für die Entstehung von Krebs äußerst wichtigen Enzym, untersucht. Zum anderen wurden die zellulären Ziele einer ursprünglich als APT1 Inhibitor synthetisierten Substanz bzw. Substanzgruppe bestimmt. Gerade der zweite Ansatz ist für die Entwicklung zukünftiger Medikamente von Bedeutung. Denn die Identifizierung der Bindungspartner auf zellulärer Ebene ermöglicht erste Rückschlüsse über mögliche Nebenwirkungen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse und deren Bedeutung im Bezug auf die oben genannten Aspekte zusammengefasst:

1. In einem *in vitro* Depalmitoylierungs-Assay konnte gezeigt werden, dass APT1 sowohl L- als auch D-Peptide, welche dem C-Terminus von H-Ras entlehnt waren, gleichermaßen depalmitoyliert. Damit ist die Grundvoraussetzung für die putative Palmitoyltransferase, nämlich die Stereotoleranz, erfüllt (s. Deck *et al.*, 2005). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass APT1 *in vitro* in der Lage ist, ein fluoreszenzmarkiertes Substratpeptid, welches ebenfalls dem C-Terminus von H-Ras entlehnt war, zu palmitoylieren. Die Relevanz für Zellen und ganze Organismen muss jedoch noch überprüft werden, da hier nur eine Überprüfung *in vitro* erfolgreich durchgeführt wurde.
2. Die Wirkung von Raspalin 4 konnte mit Hilfe von Zellexperimenten und biochemischen Versuchen eingehend analysiert werden. In HLR Zellen, einer Reporterzelllinie, welche bei Inhibition der Ras-MAPK Kaskade, mit einer verminderten Expression von Luziferase reagiert, führte Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Raspalin 4 zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität auf 50 % ausgehend von der Maximalaktivität. Dies gab bereits erste

Hinweise darauf, dass die Raspaline den Ras-MAPK Signalweg möglicherweise auf indirektem Wege beeinflussen.

In MDCK-f3 Zellen, einer Zelllinie welche konstitutiv aktives H-Ras exprimiert und auf Inhibition des Ras-MAPK Signalweges mit einer Änderung des Phänotyps reagiert, zeigte Raspalin 4 ebenfalls einen Effekt. Gewöhnlich reagieren diese Zellen, bei Substanzen, welche auf den Ras-MAPK Signalweg wirken, mit epitheliale Wachstum und der vermehrten Ausbildung von Zell-Zell Kontakten. Raspalin 4 hingegen bewirkte ein Abrunden der Zellen und vereinzelt blasige Ausstülpungen bei 10  $\mu$ M, einer Konzentration bei der keine Cytotoxizität messbar war. Dies lieferte erste Hinweise auf eine mögliche Induktion der Apoptose.

Die Überprüfung der Phosphorylierung von ERK und Elk-1 zeigte, dass diese durch Raspalin 4 unbeeinflusst bleibt. Da die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 der letzte Schritt im Signalweg ist, deutet dies daraufhin, dass Raspalin 4 den Ras-MAPK Signalweg entweder auf der Ebene der Transkription/Translation oder auf indirektem Weg beeinflusst.

3. Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Affinitätssonden, JC10 und AM42, miteinander verglichen und evaluiert. Mit beiden Affinitätssonden konnte APT1 aus Zelllysaten isoliert werden. Neben APT1 war auch eine große Anzahl weiterer Proteine im SDS-Gel erkennbar. Daraufhin wurden weitere Schritte unternommen um die Aufreinigung zu optimieren (stringente Waschprotokolle mit hohen Salzkonzentrationen und Auftrennung des Lysats in Cytosol-, Membran-, und Nukleusfraktion und Entfernung des Cytoskeletts). Anschließend gelang es mit Hilfe der HPLC-ESI Massenspektrometrie folgende Proteine zu identifizieren:

**Cytosol:** Elongation Factor 1-alpha 2

**Membran:** Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor, ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor, Sodium/Potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor, ADP/ATP translocase 2, Coiled-coil domain-containing protein 47

precursor, Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein, Elongation Factor 1-alpha 1, Synaptotagmin 1

**Nukleus:** Lamin A, Polypyrimidine tract-binding protein 1, Nucleophosmin (Nuclear Phosphoprotein B23), Nuclear pore complex protein Nup107

Eine umfassende Literaturrecherche, bei der die Proteine im Hinblick auf ihre Bedeutung für das Neuritenwachstum untersucht wurden, ergab, dass Ruspalin 4 das Neuritenwachstum vermutlich auf drei Ebenen beeinflusst:

1. Direkte Beeinflussung des Neuritenwachstums (Elongation Factor 1-alpha 1, Synaptotagmin 1)
2. Indirekte Beeinflussung des Neuritenwachstums durch Begünstigung proapoptotischer Faktoren (Elongation Factor 1-alpha 2, ADP/ATP translocase 2, Nucleophosmin (Nuclear Phosphoprotein B23))
3. Indirekte Beeinflussung des Neuritenwachstums durch Beeinträchtigung des Energiehaushaltes und des Fettsäuremetabolismus (Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor, ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor, Sodium/Potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor, ADP/ATP translocase 2, Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein)

Bei diesen drei Punkten kommt den ersten beiden eine größere Bedeutung zu, da Punkt drei sich zumindest nicht in einer erhöhten Toxizität bemerkbar macht. Allerdings könnte die Störung der allgemeinen Zellhomeostase ebenfalls die Apoptose zusätzlich begünstigen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass APT1 nach wie vor als Palmitoyltransferase in Frage kommt, wobei eine Überprüfung *in vivo* notwendig ist, um dies zu bestätigen.

Die Inhibition des Neuritenwachstums in PC2 Zellen durch Ruspalin 4 geht vermutlich auf einen umfassenden Effekt auf mehreren Ebenen zurück. Ein Beitrag durch Inhibition von APT1 bzw. Beeinflussung des Palmitoylierungszustandes von Ras ist hierbei nicht auszuschließen. Auch hier sind weitere Experimente nötig, um Klarheit zu erlangen.



## 6. Ausblick

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis des Wirkungsmechanismus der Raspaline. Nachfolgend muss nun überprüft werden, welche der identifizierten Proteine tatsächlich spezifisch an Raspalin 4 binden. Als erstes wäre hier eine Expression der Proteine nötig, sodass sich die Art der Bindung mit biochemischen Methoden überprüfen lässt. Die Vorgehensweise hängt hierbei stark vom jeweiligen Protein ab. Im Optimalfall lässt sich das natürliche Substrat durch einen Chromophor ersetzen. Auf diese Weise ließe sich die Inhibition oder gegebenenfalls die Aktivierung der Proteine durch Raspalin 4 bestimmen. Nur so kann ermittelt werden, welche Proteine hauptsächlich für den beobachteten Effekt verantwortlich sind, wobei auch ein Zusammenspiel aller identifizierten Proteine nicht auszuschließen ist. Für den Fall, dass dies nicht möglich ist, ließe sich mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Raspalinderivates mittels Oberflächen Plasmon Resonanz (surface plasmon resonance, SPR) zumindest die Affinität bestimmen.

Zusätzlich zu diesen Experimenten wären Experimente mit siRNA gegen die jeweiligen Proteine eine weitere Möglichkeit, um die Bedeutung der einzelnen Proteine für die Neuritogenese zu untersuchen. Dies ist insbesondere für die Proteine von Interesse, welche bisher noch nicht mit der Neuritogenese in Verbindung gebracht worden sind.

Experimente mit siRNA sind ein weiterer valider Ansatz, um die Bedeutung von APT1 für die korrekte Funktion besser zu verstehen. Tatsächlich wurden bereits erste vielversprechende Untersuchungen mit siRNAs gegen APT1 unternommen. Wie bereits in der Diskussion erwähnt, gibt es mittlerweile Hinweise, dass die Inhibition der Depalmitoylierung die Aktivierung von Ras ebenfalls negativ beeinflusst, da dies den Ras-Zyklus unterbricht. Trotzdem wäre es interessant zu überprüfen, ob APT1 nicht doch auch eine Rolle bei der Palmitoylierung spielt. Ein Ansatz für die Überprüfung wäre die Inkoooperation eines radioaktiven Palmitats in An- und Abwesenheit eines APT1 Inhibitors. Da es mittlerweile gute Inhibitoren für APT1 gibt, wäre dies durchaus möglich. Die Identifizierung von eventuellen Kofaktoren und Proteinkomplexen würde ebenfalls Aufschluss über die Rolle und den genauen Wirkungsmechanismus von APT1 geben.

## 7. Literaturverzeichnis

Adam G.C., Sorensen E.J., Cravatt B.F., Trifunctional Chemical Probes for the Consolidated Detection and Identification of Enzyme Activities from Complex Proteomes, *Mol Cell Proteomics*, **2002**, 1, 828-835.

Ahn J.Y., Liu X., Cheng D., Peng J., Chan P.K., Wade P.A., Ye K., Nucleophosmin/B23, a Nuclear PI(3,4,5)P3 Receptor, Mediates the Antiapoptotic Actions of NGF by Inhibiting CAD. *Molecular Cell*, **2005**, 18, 435-445.

Albanell J., Rojo F., Baselga J., Pharmacodynamic studies with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839, *Semin.Oncol.*, **2001**, 28, 56 –66.

Allan V., Dynactin, *Current Biology*, **2000**, 10, R432.

Alnemri, E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J., Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature, *Cell*, **1996**, 87, 171.

Apolloni A., Prior I. A., Lindsay M., Parton R. G., Hancock J. F., H-ras but Not K-ras Traffics to the Plasma Membrane through the Exocytic Pathway, *Mol. Cell.Biol.*, **2000**, 20, 2475-2487.

Ashe C., Berry M.D., Apoptotic signaling cascades., *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **2003**, 27, 199-214.

Aumais J.P., Tunstead J. R., McNeil R. S., Schaar B. T., McConnell S. K., Lin S. H., Clark G. D., Yu-Lee L. Y., NudC associates with Lis1 and the dynein motor at the leading pole of neurons, *J.Neurosci.* **2001**, 21, 187RC

Austen M., Dohrmann C., Phenotype-first screening for the identification of novel drug targets, *Drug Discovery Today*, **2005**, 10, 275-285

- Bader B., Kuhn K., Owen D.J., Waldmann H., Wittinghofer A., Kuhlmann J., Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction, *Nature*, **2000**, *403*, 223–222.
- Bartels D. J., Mitchell D. A., Dong X., and Deschenes R. J., Erf2, a Novel Gene Product That Affects the Localization and Palmitoylation of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol.Cell.Biol.*, **1999**, *19*, 6775-6787.
- Baselga J., Herbst R., Lorusso P., Rischin D., Continuous administration of ZD1839 (Iressa), a novel oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), in patients with five selected tumor types: evidence of activity and good tolerability, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **2000**, *19*, 177a.
- Becker F., Murthi K., Smith C., Come J., Costa-Roldan N., Kaufmann C., Hanke U., Degenhart C., Baumann S., Wallner W., A Three-Hybrid Approach to Scanning the Proteome for Targets of Small Molecule Kinase Inhibitors, *Chemistry & Biology*, **2004**, *11*, 211-223.
- Behrens J., Mareel M. M., Van Roy F. M., Birchmeier W., Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion, *J.Cell Biol.*, **1989**, *108*, 2435-2447.
- Belzacq A.S., Vieira H.L.A., Verrier F., Vandecasteele G., Cohen I., Prevost C. M., Larquet E., Pariselli F., Petit P.X., Kahn A., Rizzuto R., Brenner C., Kroemer G., Bcl-2 and Bax Modulate Adenine Nucleotide Translocase Activity, *Cancer Res*, **2003**, *63*, 541-546.
- Bijlmakers M.-J., and Marsh M., The on-off story of protein palmitoylation, *Trends in Cell Biology*, **2003**, *13*, 32-42.
- Birnbaum A., Ready N., Gefitinib therapy for non-small cell lung cancer, *Curr Treat Options Oncol.*, **2005**, *6*, 75-81

- Boehmer T., Enninga J., Dales S., Blobel G., Zhong H., Depletion of a single nucleoporin, Nup107, prevents the assembly of a subset of nucleoporins into the nuclear pore complex, *PNAS*, **2003**, *100*, 981–985.
- Bos J.L., ras Oncogenes in Human Cancer: A Review, *Cancer Res*, **1989**, *49*, 4682-4689.
- Bradford M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*, 248-254.
- Brehmer D., Godl K., Zech B., Wissing J., Daub H., Proteome-wide identification of cellular targets affected by bisindolylmaleimide-type protein kinase C inhibitors, *Mol Cell Proteomics*, **2004**, *3*, 490-500.
- Brown M.D., Sacks D.B., IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP, *Trends in Cell Biology*, **2006**, *16*, 242-249.
- Brown M. E., Bridgman P.C., Myosin function in nervous and sensory systems., *Journal of Neurobiology*, **2004**, *58*, 118-130.
- Brunet A., Datta S. R., Greenberg M. E., Transcription-dependent and - independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway, *Current Opinion in Neurobiology*, **2001**, *11*, 297-305.
- Cai B., Chang S.H., Becker E.B.E., Bonni A., Xia Z., p38 MAP Kinase Mediates Apoptosis through Phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J.Biol.Chem.*,**2006**, *281*, 25215-25222.
- Chardin P., McCormick F., Brefeldin A: The Advantage of Being Uncompetitive, *Cell*, **1999**, *97*, 153-155.

- Chen Z., Otto J. C., Bergo M. O., Young S. G., Casey P. J., The C-terminal Polylysine Region and Methylation of K-Ras Are Critical for the Interaction between K-Ras and Microtubules, *J.Biol.Chem.*, **2000**, 275, 41251-41257.
- Cheung P.Y., Zhang Y., Long J., Lin S., Zhang M., Jiang Y., Wu Z., MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly *J.Biol.Chem.*, **2004**, 279, 45308-45311.
- Chiu V. K., Bivona T., Hach A., Sajous J. B., Silletti J., Wiener H., Johnson R. L., Cox A. D., and Philips M. R., Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi, *Nature Cell Biology*, **2002**, 4, 343-347.
- Choy E., Chiu V. K., Silletti J., Feoktistov M., Morimoto T., Michaelson D., Ivanov I. E., Philips M. R., Endomembrane Trafficking of Ras: The CAAX Motif Targets Proteins to the ER and Golgi, *Cell*, **1999**, 98, 69-80.
- Dai Q., Choy E., Chiu V., Romano J., Slivka S. R., Steitz S. A., Michaelis S., Philips M. R., Mammalian Prenylcysteine Carboxyl Methyltransferase Is in the Endoplasmic Reticulum, *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**, 273, 15030-15034.
- Damke H., Baba T., Warnock D. E., Schmid S. L., Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation *J.Cell Biol.* **1994**, 127, 915-934.
- Das A. K., Dasgupta B., Bhattacharya R., and Basu J., Purification and Biochemical Characterization of a protein-palmitoyl Acyltransferase from Human Erythrocytes, *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 11021-11025.
- Deck P., Pendzialek D., Biel M., Wagner M., Popkirova B., Ludolph B., Kragol G., Kuhlmann J., Giannis A., Waldmann H., Development and Biological Evaluation of Acyl Protein Thioesterase 1 (APT1) Inhibitors, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **2005**, 44, 4975-4980.

- Devedjiev Y., Dauter Z., Kuznetsov S.R., Jones T.L.Z., Derewenda Z.S., Crystal Structure of the Human Acyl Protein Thioesterase I from Single X-Ray Data Set to 1.5 Å, *Structure*, **2000**, 8,1137-1146.
- Dietrich L.E.P., LaGrassa T. J., Rohde J., Cristodero M., Meiringer C.T.A., Ungermann C., ATP-independent Control of Vac8 Palmitoylation by a SNARE Subcomplex on Yeast Vacuoles, *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 15348-15355.
- Dou F., Yuan L.D., Zhu J.J, Heat shock protein 90 indirectly regulates ERK activity by affecting Raf protein metabolism, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **2005**, 37, 501-505.
- Duncan J.A., Gilman A. G., Autoacylation of G Protein alpha Subunits, *J.Biol.Chem.* **1996**, 271, 23594-23600.
- Duncan J. A., Gilman A. G., A Cytoplasmic Acyl-Protein Thioesterase That Removes Palmitate from G Protein  $\alpha$  Subunits and p21<sup>RAS</sup>, *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**, 273, 15830-15837.
- Dunkley P.R., Bobrovskaya L., Graham M. E., Nagy-Felsobuki E. I., Dickson P. W., Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences, *Journal of Neurochemistry*, **2004**, 91, 1025-1043.
- Dunphy J.T., Linder M. E., Signalling functions of protein palmitoylation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1998**, 1436, 245-261.
- Erickson J.W., Cerione R. A., Hart M. J., Identification of an Actin Cytoskeletal Complex That Includes IQGAP and the Cdc42 GTPase, *J.Biol.Chem.* **1997**, 272, 24443-24447.
- Favata M., Horiuchi K.Y., Manos E.J., Daulerio A.J., Stradley D.A., Feeser W.S., Van Dyk D.E., Pitts W.J., Earl R.A., Hobbs F., Copeland R.A., Magolda R.L., Scherle P.A., Trzaskos J.M., Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 18623-18632.

- Featherstone C., Colley A., Tucker K., Kirk J., Barton M.B., Estimating the referral rate for cancer genetic assessment from a systematic review of the evidence, *British Journal of Cancer*, **2007**, 96, 391-398.
- Fukata M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., Kaibuchi K., Rac1 and Cdc42 Capture Microtubules through IQGAP1 and CLIP-170, *Cell*, **2002**, 109, 873-885
- Fukuda M., Mikoshiba K., Expression of synaptotagmin I or II promotes neurite outgrowth in PC12 cells, *Neuroscience Letters*, **2000**, 295, 33-36.
- Garnier C., Barbier P., Gilli R., Lopez C., Peyrot V., Briand C., Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, **1998**, 250, 414-419.
- Geppert M., Sudhof T.C., RAB3 and Synaptotagmin: The Yin and Yang of Synaptic Membrane Fusion, *Annual Review of Neuroscience*, **1998**, 21, 75-95.
- Guiffant D., Tribouillard D., Gug F., Galons H., Meijer L., Blondel M., Bach S., Identification of intracellular targets of small molecular weight chemical compounds using affinity chromatography, *Biotechnology Journal*, **2007**, 2, 68-75
- Gutierrez L., Magee A. I., Marshall C. J., Hancock J. F., Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis, *EMBO Journal*, **1989**, 8, 1093-1098
- Greenbaum D.C., Arnold W.D., Lu F., Hayrapetian L., Baruch A., Krumrine J., Toba S., Chehade K., Brömme D., Kuntz I.D., Bogoy M., Small molecule affinity fingerprinting. A tool for enzyme family subclassification, target identification, and inhibitor design, *Chemistry & Biology*, **2002**, 9, 1085–1094.

- Hart C.P., Finding the target after screening the phenotype, *Drug Discovery Today*, **2005**, *10*, 513-519
- Hillenkamp F., Karas M., Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization, *Methods Enzymol.*, **1990**, *193*, 280-295.
- Ichikawa M., Kikuchi T., Tateiwa H., Gotoh N., Ohta K., Arai J., Yoshimura N., Role of PTB-like protein, a neuronal RNA-binding protein, during the differentiation of PC12 cells., *J Biochem*, **2002**, *131*, 861-8.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer.*, **1972**, *26*, 239-257.
- Khalyfa A., Bourbeau D., Chen E., Petroulakis E., Pan J., Xu S., Wang E., Characterization of Elongation Factor-1A (eEF1A-1) and eEF1A-2/S1 Protein Expression in Normal and wasted Mice *J.Biol.Chem.*, **2001**, *276*, 22915-22922.
- Kholodenko B.N., Untangling the signalling wires, *Nat Cell Biol*, **2007**, *9*, 247.
- Kittler R., Buchholz F., RNA interference: gene silencing in the fast lane, *Cancer Biology*, **2003**, *13*, 259-265.
- Kim K.K., Song H.K., Shin D.H., Hwang K.Y., Choe S., Yoo O.J., Suh S.W., Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an alpha/beta hydrolase with broad substrate specificity, *Structure*, **1997**, *5*, 1571–1584.
- Kley N., Chemical Dimerizers and Three-Hybrid Systems: Scanning the Proteome for Targets of Organic Small Molecules, *Chemistry & Biology*, **2004**, *11*, 599-608.



- Knockaert M., Gray N., Damiens E., Chang Y.T., Grellier P., Grant K., Fergusson D., Mottram J., Soete M., Dubremetz J.F., Le Roch K., Doerig C., Schultz P.G., Meijer L., Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors, *Chemistry & Biology*, **2000**, 7, 411-422.
- Kolch W., Ras/Raf signalling and emerging pharmacotherapeutic targets, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **2003**, 3, 709.
- Krecic A.M., Swanson M. S., hnRNP complexes: composition, structure, and function, *Current Opinion in Cell Biology*, **1999**, 11, 363-371.
- Kuhn K., Owen D.J., Bader B., Wittinghofer A., Kuhlmann J., Waldmann H., Synthesis of Functional Ras Lipoproteins and Fluorescent Derivatives, *J.Am. Chem.Soc.*, **2001**, 123, 1023 –1035.
- Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **1970**, 227, 680-685.
- Lee S., Wolfraim L.A., Wang E., Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development, *J.Biol.Chem.*, **1993**, 268, 24453-24459.
- Li Z., McNulty D. E., Marler K. J. M., Lim L., Hall C., Annan R. S., Sacks D. B., IQGAP1 Promotes Neurite Outgrowth in a Phosphorylation-dependent Manner, *J.Biol.Chem.* **2005**, 280, 13871-13878.
- Licitra E., Liu J. O., A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions, *PNAS*, **1996**, 93, 12817-12821.
- Liu L., Dudlers T., Gelb M. H., Purification of a Protein Palmitoyltransferase that Acts on H-Ras Protein and on a C-terminal N-Ras Peptide, *J.Biol.Chem.*, **1996**, 271, 23269-23276.

- Ma S., Liu G., Sun Y., Xie J., Relocalization of the polypyrimidine tract-binding protein during PKA-induced neurite growth, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, 1773, 912–923.
- Magee T., Marshall C., New Insights into the Interaction of Ras with the Plasma Membrane, *Cell*, **1999**, 98, 9-12.
- Mandal A.K., Hines J., Kuramochi K., Crews C.M., Developing microcolin A analogs as biological probes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, 15, 4043-4047.
- Marsh D.J., Zori R.T., Genetic insights into familial cancers - update and recent discoveries, *Cancer Letters*, **2002**, 181, 125-164.
- Matozaki T., Nakanishi H., Takai Y., Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades, *Cell Signal.*, **2000**, 12, 515–524.
- Mayer T.U., Kapoor T. M., Haggarty S. J., King R. W., Schreiber S. L., Mitchison T. J., Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen, *Science*, **1999**, 286, 971-974.
- Mena M.A., Davila V., Bogalovsky J., Sulzer D., A Synergistic Neurotrophic Response to *L*-Dihydroxyphenylalanine and Nerve Growth Factor, *Mol Pharmacol.*, **1998**, 54, 678-686.
- Morris S.M., Albrecht U., Reiner O., Eichele G., Yu-Lee L., The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, *NudC* *Current Biology*, **1998**, 8, 603-606.
- Muchir A., Pavlidis P., Decostre V., Herron A.J., Arimura T., Bonne G., Worman H.J., Activation of MAPK pathways links *LMNA* mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, *J. Clin. Invest.*, **2007**, 117, 1282–1293.

- Neely M.D., Sidell K.R., Graham D.G., Montine T.J., The Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal Inhibits Neurite Outgrowth, Disrupts Neuronal Microtubules, and Modifies Cellular Tubulin, *J. Neurochem*, **1999**, *72*, 2323-2333.
- Negrutskii B.S., El'skaya A.V., Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, **1998**, *60*, 47-78.
- Oka T., Morihaka K., Trypsin as a Catalyst for Peptide Synthesis, *J Biochem (Tokyo)*, **1977**, *82*, 1055-1062.
- Orjalo A.V., Arnaoutov A., Shen Z., Boyarchuk Y., Zeitlin S.G., Fontoura B., Briggs S., Dasso M., Forbes D.J., The Nup107-160 Nucleoporin Complex Is Required for Correct Bipolar Spindle Assembly, *Molecular Biology of the Cell*, **2006**, *17*, 3806–3818.
- Park S.J., Suetsugu S., Takenawa T., Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation *The EMBO Journal* **2005**, *24*, 1557-1570
- Parkin M.D., Bray F., Ferlay J., Pisani P., Global Cancer Statistics, 2002., *CA Cancer J Clin*, **2005**, *55*, 74-108.
- Petroulakis E., Wang E., Nerve Growth Factor Specifically Stimulates Translation of Eukaryotic Elongation Factor 1A-1 (eEF1A-1) mRNA by Recruitment to Polyribosomes in PC12 Cells, *Journal of Biological Chemistry*, **2002**, *277*, 18718-18727.
- Qanbar R., Bouvier M., Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function, *Pharmacology & Therapeutics*, **2003**, *97*, 1-33.

- Rehm H., *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics*, **2002**, Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage.
- Reid T.S., Terry K.L., Casey P.J., Beese L.S., *Journal of Molecular Biology*, Crystallographic Analysis of CaaX Prenyltransferases Complexed with Substrates Defines Rules of Protein Substrate Selectivity **2004**, *343*, 417-433.
- Resh M. D., Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1999**, *1451*, 1-16.
- Richieri G.V., Ogata R.T., Kleinfeld A.M., The measurement of free fatty acid concentration with fluorescent probe ADIFAB: A practical guide for the use of the ADIFAB probe, *Mol.Cell.Biochem.*, **1999**, *192*, 87-94.
- Rocks O., Peyker A., Kahms M., Verveer P. J., Koerner C., Lumbierres M., Kuhlmann J., Waldmann H., Wittinghofer A., Bastiaens P. I.H., An Acylation Cycle Regulates Localization and Activity of Palmitoylated Ras Isoforms, *Science*, **2005**, *307*, 1746-1752.
- Rocks O., Peyker A., Bastiaens P. I.H., Spatio-temporal segregation of Ras signals: One ship, three anchors, many harbors, *Curr. Op. In Cell Biology*, **2006**, *18*, 351-357.
- Roepstorff P., Fohlman J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *J. Biomed Mass Spectrom.*, **1984**, *11*, 601.
- Ruest L.B., Marcotte R., Wang E., Peptide Elongation Factor eEF1A-2/S1 Expression in Cultured Differentiated Myotubes and Its Protective Effect against Caspase-3-mediated Apoptosis, *J.Biol.Chem.*, **2002**, *277*, 5418-5425.

- Santos S.D.M., Verveer P.J., Bastiaens P.I.H., Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate, *Nat Cell Biol*, **2007**, advanced online publication.
- Schmidt W. K., Tam A., Fujimura-Kamada K., Michaelis S., Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage, *PNAS*, **1998**, *95*, 11175-11180
- Schiavo G., Stenbeck G., Rothman J.E., Söllner T.H., Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses, *PNAS*, **1997**, *94*, 997-1001.
- Shawver L.K., Slamon D., Ullrich A., Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy *Cancer Cell*, **2002**, *1*, 117-123
- Shields J.M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., Der C.J., Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over', *Trends Cell Biol.*, **2000**, *10*, 147-154
- Shiyama T., Furuya M., Yamazaki A., Terada T., Tanaka A., Design and synthesis of novel hydrophilic spacers for the reduction of nonspecific binding proteins on affinity resins, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, *12*, 2831-2841.
- Sun P., Watanabe H., Takano K., Yokoyama T., Fujisawa J. I., Endo T., Sustained activation of M-Ras induced by nerve growth factor is essential for neuronal differentiation of PC12 cells, *Genes to Cells*, **2006**, *11*, 1097-1113.
- Suzuki H., Onishi K., Takahashi K., Watanabe S., Structure and function of chicken gizzard myosin, *J. Biochem.*, **1978**, *84*, 1529-1542.
- Swarthout J.T., Lobo S., Farh L., Croke M. R., Greentree W. K., Deschenes R. J., Linder M. E., DHHC9 and GCP16 Constitute a Human Protein Fatty

- Acyltransferase with Specificity for H- and N-Ras, *J.Biol.Chem.*, **2005**, 280, 31141-31148.
- Talukder A.H., Jorgensen H.F., Mandal M., Mishra S.K., Vadlamudi R.K., Clark B.F.C., Mendelsohn J., Kumar R., Regulation of Elongation Factor-1alpha Expression by Growth Factors and Anti-receptor Blocking Antibodies, *J.Biol.Chem.*, **2001**, 276, 5636-5642.
- Teichman-Weinberg A., Littauer U.Z., Ginzburg I., The inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells by tubulin antisense oligodeoxyribonucleotides, *Gene*, **1988**, 72, 297-307.
- Thissen J.A., Gross J. M., Subramanian K., Meyer T., Casey P. J., Prenylation-dependent Association of Ki-Ras with Microtubules. Evidence For a Role In Subcellular Trafficking, *J.Biol.Chem.*, **1997**, 272, 30362-30370.
- Trester-Zedlit M., Kamada K., Burley S.K., Fenyo D., Chait B.T., Muir T.W., A Modular Cross-Linking Approach for Exploring Protein Interactions, *J.Am.Chem.Soc.*, **2003**, 125, 2416-2425.
- Uchida Y., Izai K., Orii T., Hashimoto T., Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein, *J.Biol.Chem.*, **1992**, 267, 1034-1041
- Vaudry D., S.Stork P.J., Lazarovici P., Eiden L.E., ignaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections *Science*, 2002 , 296 ,1648 – 1649.
- Verweij J., Clavel M., Chevalier B., Paclitaxel (Taxol<sup>TM</sup>) and docetaxel (Taxotere<sup>TM</sup>): Not simply two of a kind, *Ann Oncol*, **1994**, 5, 495-505.

- Veit M., Becher A., Ahnert-Hilger G., Synaptobrevin 2 Is Palmitoylated in Synaptic Vesicles Prepared from Adult, But Not from Embryonic Brain, *Molecular and Cellular Neuroscience*, **2000**, *15*, 408-416.
- Voice J.K., Klemke R. L., Le A., Jackson J. H., Four Human Ras Homologs Differ in Their Abilities to Activate Raf-1, Induce Transformation, and Stimulate Cell Motility, *J.Biol.Chem.*, **1999**, *274*, 17164-17170.
- Wan Y., Hur W., Cho C.Y., Liu Y., Adrian F.J., Lozach O., Bach S., Mayer T., Fabbro D., Meijer L., Synthesis and target identification of hymenialdisine analogs, *Chemistry & Biology*, **2004**, *11*, 247–259.
- Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A.T., Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2325-2327.
- Whitesell L., Mimnaugh E. G., Costa B. D., Myers C. E., Neckers L. M., Inhibition of Heat Shock Protein HSP90-pp60v-src Heteroprotein Complex Formation by Benzoquinone Ansamycins: Essential Role for Stress Proteins in Oncogenic Transformation, *PNAS*, **1994**, *91*, 8324-8328.
- Wylie S.R., Wu P. J., Patel H., Chantler P. D., A conventional myosin motor drives neurite outgrowth, *PNAS* **1998**, *95*, 12967-12972.
- Zhang F. L., Casey P. J., Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences, *Annual Reviews of Biochemistry*, **1996**, *65*, 241-269
- Zhao L., Lobo S., Dong X., Ault A. D., Deschenes R. J., Erf4p and Erf2p Form an Endoplasmic Reticulum-associated Complex Involved in the Plasma Membrane Localization of Yeast Ras Proteins, *J.Biol.Chem.*, **2002**, *277*, 49352-49359.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

ADIFAB	Acrylo-dated intestinal Fatty Acid binding Protein
APS	Ammonium-Persulfat
BSA	Rinder-Serum-Albumin
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERK	Extracellular regulated kinase
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FTase	Farnesyl-Transferase
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	Green fluorescent protein
GGTase	Geranylgeranyl-Transferase
Grb	Growth factor receptor binding protein
CREB	cAMP responsive element-binding protein
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
kDa	Kilodalton
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ ionisation - time of flight
mant	Methylantranilolyl



MAP	Mitogen activated protein
MEK	MAP/ERK-Kinase
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethanesulfonsäure)
PVDF	Polyvinylidifluorid
Raf	Rapid fibrosarcosis
Ras	Rat sarcoma
RFU	Relative fluorescence unit(s)
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
siRNA	small interfering RNA
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RSK	Ribosomal S6 kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
s	Sekunden
Sos	son of sevenless
SPR	Surface plasmon resonance
Shc	Src homology 2 domain-containing-transforming protein
TBS	Tris buffered saline
TCF	Ternary complex factor
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrkA	Tyrosinkinase A
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
YFP	Yellow fluorescent protein

## 8.2. Kontaminationsmassen

### Kontaminationsmassen:

<b>600</b>	<b>1200</b>
613,29	1206,12
629,29	1229,52
644,04	1233,61
657,31	1277,72
666,02	<b>1300</b>
671,44	1308,69
693,43	1314,39
<b>700</b>	1370,49
701,36	<b>1400</b>
717,33	<b>1500</b>
745,39	1567,96
774,21	1553,84
<b>800</b>	1584,92
801,51	<b>1600</b>
832,48	1639,81
842,42	1660,64
845,65	<b>1700</b>
854,95	1765,56
861,10	<b>1600</b>
876,95	1639,81
870,94	1660,64
889,55	<b>1700</b>
892,85	1765,56
898,39	<b>1800</b>
<b>900</b>	
905,33	<b>1900</b>
979,16	1994,07
985,18	1937,75
<b>1000</b>	1953,76
1001,16	<b>2000</b>
1026,53	
1028,62	<b>2100</b>
1039,52	2166,17
1045,47	2135,67
1060,1	<b>2200</b>
1066,09	2210,95
1069,54	2232,92
1085,57	2248,90
<b>1100</b>	2283,28
1109,40	2299,04
1125,36	<b>2300</b>
1190,19	2304,99
	2384,09

## 9. Danksagung

---

Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die damit verbundene finanzielle und materielle Unterstützung. Darüberhinaus bedanke ich mich für die damit verbundene Möglichkeit als erster Biologe unter lauter Chemikern zu promovieren, was eine äußerst interessante und lehrreiche Erfahrung war.

Prof. Dr. Adri J. Minnaard und Dr. Javier Cuesta danke ich für die Synthese der Affinitätssonden und den damit verbundenen interessanten Austausch der hin und wieder auch über den rein wissenschaftlichen Rahmen hinausging.

Der Arbeitsgruppe von PD Dr. Jürgen Kuhlmann und hier insbesondere Robin Vetter möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

Dr. Katja Hübel, Dr. Petra Janning, Karin Warburg, Sascha Menninger und Tanja Knoth danke ich für die Durchsicht meiner Arbeit.

Karin Warburg, Sascha Menninger und Tanja Knoth danke ich darüberhinaus für die nette Zusammenarbeit im Labor.

Allen `Insassen` des Büros A 3.28 (`Station IV`) danke ich für die das entspannte und häufig sehr heitere Arbeitsklima.

Außerdem möchte ich allen danken, die dafür gesorgt haben, dass ich mich gerne an die Zeit am MPI erinnern werde.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und Denise für die Unterstützung während der gesamten Promotion danken.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Dirk Pendzialek

geboren am 02.06.1975 in Bottrop

ledig

### Studium

05/03 – 10/07

Promotion in der Abteilung Chemische Biologie (Leiter Herr Prof. H. Waldmann) am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

09/01 – 09/02

Anfertigung der Diplomarbeit in der AG Vergleichende Endokrinologie (Leiter Herr Prof. V. Blüm) am Lehrstuhl für Tierphysiologie der Ruhr-Universität Bochum

08/01 – 09/01

Absolvierung der mündlichen Diplomprüfungen in den Fächern Zoologie, Tierphysiologie, Biophysik und dem außerbiologischen Nebenfach Biochemie

01/01 – 08/01

Sechs Kolloquien als zusätzliche Vorbereitung auf die mündliche Prüfung bei Herrn Prof. V. Blüm

04/99 – 12/00

Hauptstudium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

10/96 – 03/99

Grundstudium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

### Schulische Ausbildung

08/85 – 06/94

Josef-Albers-Gymnasium Bottrop

08/81 – 06/85

Gemeinschaftsgrundschule Rheinbaben Bottrop

Bochum, 03.09.07

## EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

---

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den

---

Dirk Pendzialek