

Identifikation Mitose- und Zytoskelett-modulierender Substanzen mittels vorwärts gerichteter Chemischer Genetik

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
Claas Gerding-Reimers
aus Sulingen

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage
1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Roger Goody

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 vom Mai 2007 bis zum März 2011 angefertigt.

Die meisten Probleme entstehen bei ihrer Lösung
(von Leonardo da Vinci)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 <i>Chemische Genetik</i> | 2 |
| 1.1.1 Klassische Genetik – Chemische Genetik | 2 |
| 1.1.2 Die Substanzbibliothek | 5 |
| 1.1.3 Der zelluläre Screen | 7 |
| 1.1.4 Die Identifikation und Validierung des Zielproteins einer Substanz | 11 |
| 1.2 <i>Der Zellzyklus</i> | 15 |
| 1.2.1 Ein deregulierter Zellzyklus führt zu Krebs | 16 |
| 1.2.2 Chemische Inhibitoren des Zellzyklus | 17 |
| 1.3 <i>Die Mitose und das Zytoskelett</i> | 18 |
| 1.3.1 MT – Aufbau und Dynamik | 20 |
| 1.3.2 Chemische Inhibitoren der MT-Dynamik | 23 |
| 1.3.3 Aktinfilamente | 25 |
| 2. Ziel der Arbeit | 28 |
| 3. Material | 29 |
| 3.1 <i>Zelllinien</i> | 29 |
| 3.2 <i>Zellkulturmedien</i> | 29 |
| 3.3 <i>Proteinstandards, Antikörper und Fluoreszenz-Marker</i> | 30 |
| 3.3.1 Proteinstandards | 30 |
| 3.3.2 Antikörper | 30 |
| 3.3.3 Fluoreszenzmarker | 31 |
| 3.4 <i>Chemikalien und Reagenzien</i> | 32 |
| 3.5 <i>Puffer und Lösungen</i> | 33 |
| 4. Methoden | 36 |
| 4.1 <i>Zellbiologische Methoden</i> | 36 |
| 4.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen | 36 |
| 4.1.2 Bestimmung der Zellzahl | 36 |
| 4.1.3 Kryokonservierung der Zellen | 36 |
| 4.1.4 Auftauen von Zellen | 37 |
| 4.1.5 Isotopenmarkierung von HeLa Zellen mittels SILAC | 37 |
| 4.1.6 Etablierung einer Taxol resistenten Hela-Zelllinie | 37 |
| 4.1.7 Fixierung von Zellen | 38 |
| 4.1.8 Färbungen zellulärer Bestandteile | 39 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.1.9 | Phänotypischer Screen in BSC-1 und HeLa Zellen..... | 40 |
| 4.1.10 | MDCK-F3 Rücktransformationsassay | 41 |
| 4.1.11 | Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie auf Mikrotiterplatten | 41 |
| 4.1.12 | Durchflusszytometrische Ermittlung des DNA-Gehalts | 42 |
| 4.1.13 | Durchflusszytometrische Ermittlung der Apoptose | 42 |
| 4.1.14 | Ermittlung der Zellproliferation mittels WST-1 Reagenz..... | 44 |
| 4.1.15 | Bestimmung der Zellvitalität und –proliferation mit Trypan Blau..... | 45 |
| 4.1.16 | Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität..... | 45 |
| 4.1.17 | Nachweis des PARP1 Spaltproduktes..... | 46 |
| 4.1.18 | Mikrotubuli Repolymerisation in BSC-1 Zellen | 46 |
| 4.2 | <i>Proteinbiochemische Methoden</i> | 47 |
| 4.2.1 | p53/MDM2 enzymgekoppelter Immunadsorptionstest | 47 |
| 4.2.2 | <i>In vitro</i> Tubulin-Polymerisationsassay | 48 |
| 4.2.3 | Herstellung von Proteinextrakten | 49 |
| 4.2.4 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 50 |
| 4.2.5 | Affinitätsaufreinigung potentieller Zielproteine mittels biotinylierter Derivate | 50 |
| 4.2.6 | SDS-Gelelektrophorese..... | 51 |
| 4.2.7 | Identifikation und relative Quantifizierung nano-LC MS/MS | 51 |
| 4.2.8 | Immunodetektion nach Affinitätsaufreinigung..... | 52 |
| 4.2.9 | Konformationsanalyse von Tubulin mittels Tryptophan Fluoreszenz | 53 |
| 4.2.10 | Konformationsanalyse von Tubulin mittels BIS-ANS Fluoreszenz | 53 |
| 4.2.11 | Colchicin Kompetitionsassay | 54 |
| 4.2.12 | BODIPY-FL-Vinblastin Kompetitionsassay..... | 54 |
| 4.2.13 | Bestimmung der GTPase-Aktivität von Tubulin | 55 |
| 4.3 | <i>Verwendung des Pipettierroboters Sciclone ALH500</i> | 55 |
| 5. | Ergebnisse | 57 |
| 5.1 | <i>Untersuchung einer Naturstoff-Substanzbibliothek mittels zellbasierter Assays</i> | 57 |
| 5.1.1 | High Content Screening | 57 |
| 5.1.2 | Charakterisierung der Wirkung von Maistemonin und Coreanosid F1 | 64 |
| 5.1.3 | Die Wirkung von Podoverin A auf die Mikrotubuli und den Zellzyklus..... | 67 |
| 5.2 | <i>Biologische Charakterisierung von Spirooxindolen</i> | 72 |
| 5.2.1 | Der Einfluss von 6k auf den eukaryotischen Zellzyklus..... | 73 |
| 5.2.2 | Die Wirkung von 6k auf die p53/MDM2-Interaktion | 75 |
| 5.2.3 | Studien zur Wirkung von 6k auf Mikrotubuli und Mitose..... | 77 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.3 | <i>Untersuchung einer Tetrahydropyran-Substanzbibliothek</i> | 83 |
| 5.3.1 | Die Identifikation von Tubulexin A | 83 |
| 5.3.2 | Die zellulären Effekte von Tubulexin A | 84 |
| 5.3.3 | Die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Tetrahydropyrane | 94 |
| 5.3.4 | Identifikation der Zielproteine der Tubulexine durch Chemische Proteomik | 96 |
| 5.3.5 | Validierung von $\alpha\beta$ -Tubulin als direktes Zielprotein | 99 |
| 5.3.6 | Die Wirkung von Tubulexin A auf Taxol-resistente HeLa Zellen | 104 |
| 6. | Diskussion | 106 |
| 6.1 | <i>Untersuchung einer Naturstoff-Substanzbibliothek</i> | 106 |
| 6.1.1 | Validierung und Bewertung der High Content Screens | 106 |
| 6.1.2 | Die Identifikation von Naturstoffen mit unbeschriebener Bioaktivität | 108 |
| 6.2 | <i>Biologische Charakterisierung einer Spirooxindol Substanzbibliothek</i> | 112 |
| 6.2.1 | Bewertung der biologischen Effekte von (-)-6k | 112 |
| 6.2.2 | Bewertung des p53-unabhängigen biologischen Effekts von 6k | 113 |
| 6.2.3 | Mögliche Zielproteine von (-)-6k | 115 |
| 6.3 | <i>Die Tubulexine</i> | 118 |
| 6.3.1 | Die zellulären Effekte der Tubulexine und ihre Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) | 118 |
| 6.3.2 | Die SILAC basierte Affinitätschromatographie | 119 |
| 6.3.3 | <i>In vitro</i> Studien zur Validierung der Zielproteine $\alpha\beta$ -Tubulin | 125 |
| 6.3.4 | Überlegungen zur Wirkung von Tubulexin A auf die Tubulin-Dynamik und die mögliche Involvierung von CAS | 127 |
| 6.3.5 | Das Potential der Tubulexine als Leitstrukturen für TBAs | 128 |
| 7. | Zusammenfassung | 131 |
| 8. | Anhang | 133 |
| 9. | Literaturverzeichnis | 143 |
| 10. | Abkürzungsverzeichnis | 160 |
| 11. | Danksagung | 163 |
| 12. | Eidesstattliche Erklärung | 165 |

1. Einleitung

Aufgrund mikroskopischer Studien erkannte Theodor Schwann 1839, dass Tiere ebenso wie Pflanzen aus Zellen aufgebaut sind, kleinsten selbständig lebenden Einheiten [1]. Er postulierte, dass es sich bei der Zelle um ein allgemeines Struktur- und Entwicklungsprinzip der lebenden Materie handelt und begründete mit seiner Zelltheorie den Beginn der Zellbiologie. Um 1855 prägte Rudolf Virchow den Satz „*omnis cellula e cellula*“ (Zellen entstehen nur aus Zellen). Es wurde klar, dass die Entstehung zweier Tochterzellen aus einer Mutterzelle in hohem Maße reguliert sein muss. Die zentrale Instanz der Zellvermehrung ist der Zellzyklus, währenddessen eine Zelle verschiedene Stadien durchläuft, um sich und ihre Erbinformation schließlich während der Mitose zu verdoppeln. Diese Einsichten faszinieren Biologen, Chemiker und Mediziner bis heute, denn Fehler in diesen hochkonservierten Prozessen führen zu schwerwiegenden Erkrankungen, wie Krebs (siehe 1.2.1).

Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die DNA als Träger der Erbsubstanz von Zellen erkannt [2]. Daraus folgte die Erkenntnis, dass das Erbgut des Menschen aus ca. 20.000-25.000 Genen besteht [3-5]. Im Gegensatz dazu besteht das Genom von Reis mehr als doppelt so viel Genen [6,7]. Aufgrund dessen erschloss sich, dass die Komplexität eines Organismus nicht einfach durch die Menge der Erbinformation definiert ist. So besitzen selbst komplette genetische Modelle klare Grenzen für die Erkennung und Behandlung von Krankheiten [8]. Das Proteom beschreibt die Gesamtheit aller Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen, wobei Proteine durch DNA kodiert werden. Die statische Gensequenz gibt allerdings keine Information über das dynamische Proteom; sie zeigt z.B. nicht, welche Proteine interagieren, wie diese Interaktion stattfindet, wo ein Protein zu verschiedenen Bedingungen in einer Zelle lokalisiert ist, unter welchen Umständen es exprimiert wird oder welche posttranslationalen Modifikationen das Protein besitzt [9]. Die Komplexität eines Lebewesens muss also durch das dynamische Proteom erklärbar sein, was beim Menschen aus über 100.000 Proteinen besteht. Als zelluläre „Arbeitspferde“ ermöglichen Proteine verschiedene zelluläre Funktionen. So werden auch der Zellzyklus sowie die Mitose durch ein komplexes Netzwerk an Proteinen angetrieben und reguliert (siehe 1.2 und 1.3). Ein Verständnis der Proteinfunktionen ist also elementar für die Erkenntnis biologischer Zusammenhänge. Vom biomedizinischen Standpunkt aus sind Proteine, die in krankheitsrelevanten Prozessen involviert sind, interessante Biomoleküle. Dies wird anhand der derzeit

mehrheitlichen Verwendung von Protein- und nicht Gen-gerichteten Medikamenten gestützt.

1.1 Chemische Genetik

In den letzten Jahren etablierte sich ein rapide wachsendes Forschungsfeld, die Chemische Genetik. Dieses ist ein systematischer Ansatz, um biologische Zusammenhänge mittels niedermolekularer Verbindungen als Werkzeuge aufzuklären [10,11]. Die Verwendung von chemischen Substanzen kann hierbei neben dem Verständnis von Proteinfunktionen zur Identifikation chemischer Wirkstoffkandidaten für die Modulation krankheitsrelevanter Proteinfunktionen führen. Letzteres wurde besonders durch den zunächst von Timothy J. Mitchison verwendeten Begriff Pharmakologische Genetik nahe legt [12].

Der Begriff Chemische Genetik wurde von Stuart J. Schreiber um 1998 etabliert [11]. Er entstand in Anlehnung an den klassisch genetischen Ansatz, bei dem biologische Auswirkungen von Mutationen in Genen untersucht werden. Das Äquivalent der Mutation eines Gens wird bei dem chemisch genetischen Ansatz durch die Verwendung von niedermolekularen Substanzen induziert, welche als Modulatoren eines Proteins oder einer Proteinfunktion wirken.

1.1.1 Klassische Genetik – Chemische Genetik

Abhängig von der Art der Untersuchung werden chemisch genetische Untersuchungen analog zu der klassischen Genetik in vorwärts gerichtet und rückwärts gerichtet unterschieden [13-15]. Ein schematischer Vergleich dieser Ansätze in Gegenüberstellung zur klassischen Genetik ist in Abbildung 1 dargestellt. In der vorwärts gerichteten Chemischen Genetik werden Substanzen eingesetzt, um eine Veränderung des Phänotyps eines biologischen Testsystems zu verursachen. Schließlich wird das für den Phänotyp verantwortliche modulierte Protein identifiziert, um die molekulare Wirkung der Testsubstanz zu verstehen. Rückwärts gerichtete chemische Genetik hingegen nutzt zielgerichtet synthetisierte chemische Substanzen, welche die Funktion eines bestimmten Proteins modulieren sollen. Nachfolgend schließen sich Untersuchungen zu der physiologischen Aktivität der Substanz in phänotypischen Testsystemen an.

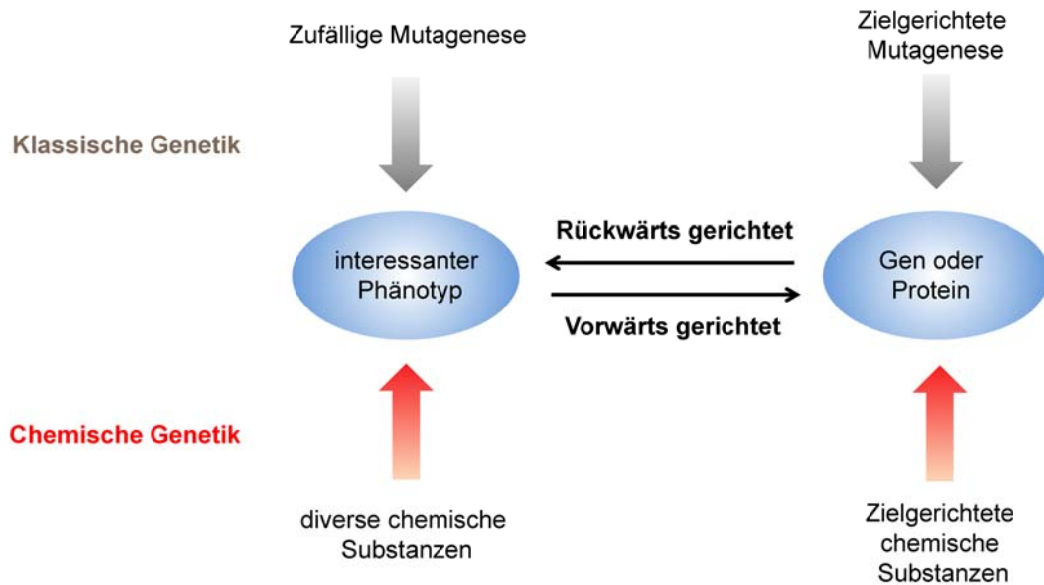


Abbildung 1. Vergleich der klassischen Genetik mit der Chemischen Genetik. Schematisch dargestellt ist die Vorgehensweise beider Ansätze mit der Unterteilung in den vorwärts gerichteten und den rückwärts gerichteten Ansatz. In der klassischen Genetik werden Gene mutiert im Gegensatz zur Modulation von Proteinfunktionen in der Chemischen Genetik.

Der chemisch genetische Ansatz bietet mehrere Alternativen gegenüber der klassischen Genetik. Um durch klassisch genetische Studien die biologischen Auswirkungen einer Gen-Mutation zu untersuchen, muss wenigstens ein Reproduktionszyklus des Genmaterials durchgeführt worden sein. Daher wird klassische Genetik hauptsächlich in biologischen Systemen mit einer hohen Reproduktionsrate, wie Bakterien, Hefen und Fruchtfliegen durchgeführt [16]. Der chemisch genetische Ansatz hingegen kann auch problemlos in hochorganisierten Systemen, z.B. in Säugerzellen durchgeführt werden, da der biologische Effekt durch die Bindung eines Moleküls an sein Zielprotein normalerweise rapide eintritt und potentiell nur durch Diffusion limitiert ist [15]. Außerdem studiert die klassische Genetik eine Gen-Funktion üblicherweise durch eine Deletion eines Genprodukts. Durch diesen *knockout* wird das kodierte Protein vollständig vom Organismus entfernt [10]. Dieses kann zu letalen Auswirkungen führen und gibt außerdem keine Informationen über potentiell relevante Protein-Protein Interaktionen und das dynamische Verhalten eines Proteins im zellulären Kontext wie z.B. eine mögliche subzelluläre Lokalisation. Für viele Proteine gilt außerdem, dass sie aufgrund mehrerer Domänen diverse Funktionen besitzen. Durch den klassisch genetischen *knockout* wird daher die gesamte Funktion eines Proteins eliminiert, was Studien zur Wirkung einzelner Proteinfunktionen sehr erschwert und letale Auswirkungen haben kann. Im Gegensatz dazu können chemische Substanzen spezielle Funktionen eines

Proteins stören, ohne andere zu beeinflussen. Außerdem es ist möglich, die biologische Funktion eines essentiellen Proteins durch subletale Dosen der Substanz zu untersuchen [14,17]. Weitere Vorteile des chemisch genetischen Ansatzes sind zeitliche Kontrolle und in den meisten Fällen eine Reversibilität der modulierten Proteinfunktion durch Entfernung der Substanz [13,14]. Substanzen mit interessantem Aktivitätsprofil können des Weiteren möglicherweise in der medikamentösen Behandlung von diversen Krankheiten eingesetzt werden und tragen somit zur Wirkstofffindung bei.

Einer der größten Vorteile der klassischen Genetik gegenüber der Chemischen Genetik ist zum einen die generelle Anwendbarkeit und zum anderen die Spezifität eines *knockouts*, der theoretisch für jedes beliebige Gen durchgeführt werden kann, sofern die Sequenz des Genoms für den betreffenden Organismus bekannt ist. Von diesen Möglichkeiten ist die Chemische Genetik zurzeit weit entfernt: Chemische Substanzen besitzen oft unspezifische sekundäre Effekte, bei denen andere Proteine, als das primäre Zielprotein gebunden werden. Dieses kann die biologische Analyse des Zielproteins sehr erschweren und außerdem zu toxischen Effekten führen. [14,17-19]. Weiterhin sind nur für eine kleine Anzahl an Proteinen zur Zeit spezifische Bindungspartner identifiziert worden [15,19]. Die Chemische Genomik beschreibt die enorme Herausforderung, für jedes Genprodukt ein spezifisches bindendes Molekül zu identifizieren, um sich neben der klassischen Genomik zu etablieren [10,15].

Es ist eine Frage der Aufgabenstellung, ob der vorwärts gerichtete oder der rückwärts gerichtete chemisch genetische Ansatz für eine biologische Fragestellung genutzt wird. Beide Ansätze werden mit großem Erfolg in der Chemischen Genetik verwendet. Hierbei sei auf diverse Übersichtsartikel verwiesen [10,14,20]. Der in dieser Arbeit verwendete vorwärts gerichtete Ansatz besitzt folgende Vorteile:

- a) *Bioaktive Substanzen werden durch die Nutzung Phänotyp-basierter Testsysteme vorvalidiert, indem nur zellpermeable Wirkstoffe identifiziert werden.*
- b) *Ein eventueller Effekt der Testsubstanz auf ein Protein wird direkt im physiologischen Kontext beobachtet.*
- c) *Es können chemische Modulatoren von Proteinen identifiziert werden, für die kein Bindungspartner bekannt ist.*
- d) *Es können neuartige chemische Modulatoren für bekannte, biologisch interessante Proteine und Prozesse identifiziert werden.*

Da die eventuelle Bioaktivität einer Substanz, wie erwähnt, nicht vorhersehbar ist, müssen solche Wirkstoffe unter einer größeren Anzahl von Substanzen identifiziert werden. Schlüsselfaktoren hierfür sind daher sowohl die Zusammensetzung der

sogenannten Substanzbibliothek (siehe 1.1.2) als auch Screens (Testsysteme), welche die Substanzen mit der gewünschten Aktivität erkennen (siehe 1.1.3) [19]. Als größte Herausforderung des vorwärts gerichteten Ansatzes gilt die Identifikation des molekularen Ziels einer bioaktiven Testsubstanz [21] (siehe 1.1.4).

1.1.2 Die Substanzbibliothek

Ein sinnvoller Aufbau der Substanzbibliothek ist essentiell für die Chemische Genetik, um eine möglichst große Anzahl an bioaktiven Verbindungen zu erhalten. Der „chemische Raum“ wirkstoffartiger Substanzen beschreibt die Menge an chemischen Verbindungen, die prinzipiell synthetisiert werden können. Berechnungen haben ergeben, dass eine theoretische Anzahl von 10^{63} Wirkstoffartiger Substanzen existiert [22,23]. Jedoch besitzt nur eine kleine Fraktion dieser Substanzen Bioaktivität. [24]. Da Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts große Fortschritte in der kombinatorischen Synthese chemischer Verbindungen erreicht wurden und auch die biologische Testung dieser Substanzen automatisiert werden konnte, setzte die Pharmaindustrie auf die Erstellung großer Substanzbibliotheken, bestehend aus mehreren 100.000 bis zu Millionen Verbindungen [25]. Die Kriterien für die Auswahl und Synthese waren neben der geringen Molekülgröße außerdem die chemische Zugänglichkeit. Jedoch wies nur eine geringe Anzahl dieser Substanzen Bioaktivität auf, was im Gegensatz zur relativ großen Anzahl bioaktiver Substanzen aus Naturstoffen zusammengestellten Substanzbibliotheken stand [26]. Man kam zu der Erkenntnis, dass es intrinsische strukturelle Unterschiede zwischen Naturstoffen und synthetischen Molekülen gibt [27]. In den synthetischen Substanzbibliotheken fehlte die Komplexität der Naturstoffe, welche multiple stereogene Zentren, heterozyklische Substituenten und polyzyklische Strukturen besitzen. Es wurde klar, dass die Evolution eine effiziente Selektion von bioaktiven Strukturmotiven betrieben hat. Naturstoffe können als eine Population von privilegierten Strukturen gesehen werden, die spezifisch mit einer großen Vielfalt an Proteinen und anderen Zielmolekülen für spezielle Aufgaben interagieren [28,29]. Dieses wird dadurch deutlich, dass 63% der derzeitigen im klinischen Einsatz befindlichen niedermolekularen Verbindungen reine Naturstoffe oder durch chemische Modifikation von diesen abgeleitet sind. Bei der Behandlung von Krebs beträgt diese Anzahl sogar 79,8% [25,30].

Auch wenn in der Chemischen Genetik nicht wie in der Pharmaindustrie ausschließlich potentielle Wirkstoffe gegen Krankheiten gesucht werden, sind diese Prinzipien ebenso auf das Ziel übertragbar, chemische Substanzen als molekulare Sonden zur Aufklärung biologischer Zusammenhänge zu verwenden. Aufgrund der

Erfahrungen mit den synthetischen Substanzbibliotheken wurden chemische Strategien entwickelt, um Substanzen mit der beschriebenen strukturellen Komplexität der Naturstoffe zu synthetisieren. Diese Substanzbibliotheken sollten den chemischen Raum bioaktiver Verbindungen bestmöglich abdecken. Schreiber et al. entwickelten das Konzept DOS (Diversität orientierte Synthese) [31]. DOS konzentriert sich auf die Herstellung von strukturell diversen und komplexen Substanzbibliotheken. Hierbei wird von einfachem Ausgangsmaterial gestartet, um schließlich strukturell divergierende Substanzen zu erhalten [32]. Wie vergleichende Studien einer Bibliothek aus strukturell komplexen Makroliden mit ihren einfacheren Vorgängerstrukturen zeigten, erhöht eine vergrößerte Komplexität die Bioaktivität [33]. Des Weiteren zeigten die weniger komplexen Derivate Bioaktivität in verschiedenen Testsystemen. Neben einer vergrößerten Anzahl aktiver Substanzen scheinen also Substanzbibliotheken, die nach dem DOS-Prinzip erstellt wurden, eine erhöhte Selektivität und Spezifität gegenüber ihrem molekularen Ziel zu besitzen. Die große Anzahl an Veröffentlichungen mit dem Term *diversity oriented synthesis* zeigt den Erfolg dieses Ansatzes. Mit BIOS (Biologie orientierte Synthese) führten Waldmann und Mitarbeiter eine weitere Strategie ein [34]. Die Synthese von Substanzen fokussiert sich hierbei auf die Regionen des chemischen Raumes, die mit biologischer Aktivität in Zusammenhang stehen. Naturstoffe werden als evolutionär prävalidierte Strukturen betrachtet und ihre Grundgerüste als Ausgangsmaterial für die Synthese von Naturstoff-basierten Substanzbibliotheken mit fokussierter Diversität verwendet. Neben Naturstoffen kann dieses Prinzip auf andersartige pharmakologisch wirksame Substanzen mit bekannter Bioaktivität ausgedehnt werden [35-37]. BIOS basiert auf zwei Konzepten, die von Waldmann und Mitarbeitern entwickelt wurden. In dem ersten Konzept wurde ein *scaffold tree*, eine hierarchische Korrelation der Strukturen von Naturstoffen, erschaffen. Das daraus resultierende Diagramm zeigt eine strukturelle Klassifikation von Naturstoffen (SCONP) und erlaubt eine Klassifikation von Substanzen und Navigation innerhalb des biologisch relevanten chemischen Raumes [38]. Durch eine reduktionistische Herangehensweise wurden die Strukturen von Naturstoffen anhand diverser chemischer Regeln in ihre Grundgerüste aufgeteilt. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl an Grundstrukturen innerhalb bioaktiver Naturstoffe limitiert und konserviert ist. Der *scaffold tree* repräsentiert in der Chemischen Genetik biologisch relevante Grundstrukturen, die als Ausgangspunkte für die Synthese Naturstoff-basierter Substanzbibliotheken dienen. Das zweite Konzept ist das *protein structure similarity clustering* (PSSC) [39]. Analog zu der Klassifikation von Naturstoffen durch den *scaffold tree* werden beim PSSC evolutionär konservierte Proteinstrukturen kartiert. Auf der Grundlage von Proteinen mit

bekanntem chemischen Liganden ist es hierbei das Ziel, Inhibitoren und Liganden zu synthetisieren, die strukturell verwandte Proteine binden. Diese Substanzen können somit zur näheren Untersuchung dieser Proteine dienen. Aufgrund der Fokussierung auf das molekulare Ziel hat dieser Ansatz großes Potential bei rückwärts gerichteten chemisch genetischen Untersuchungen. Biologische Studien von Waldmann und Mitarbeitern zeigten bereits, dass die BIOS-Strategie ein vielversprechender Ansatz zu einer quantitativen und qualitativen Erhöhung der Bioaktivität von Substanzbibliotheken ist [32,37].

1.1.3 Der zelluläre Screen

Um bioaktive Substanzen innerhalb einer Substanzbibliothek zu identifizieren, muss zunächst ein geeigneter Screen (Testsystem) gewählt werden. Dieses entspricht bei dem vorwärts gerichteten chemisch genetischen Ansatz einem zellulären System, welches möglichst große physiologische Relevanz aufweisen sollte. Generell sind Organismen, also multizelluläre Systeme, physiologisch relevanter als einzelne Zellen. Doch obwohl es in jüngster Zeit große Fortschritte in dem Screening mit mehrzelligen Organismen, wie Zebrafischen, Pflanzen und Nematoden gibt [40], handelt es sich hierbei um Organismen mit geringer Ähnlichkeit zu dem Genom und Proteom des Menschen [41]. Daher ist es unwahrscheinlich, in solchen Modellen Wirkstoffe zu identifizieren, die aktiv im menschlichen Körper sind und somit auch potentiell in der Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden können [41]. Aus diesem Grund werden meistens unizelluläre Systeme, wie Säugetier-Zellen als Screening-Modell verwendet, die hohe Ähnlichkeit zu denen des Menschen aufweisen. Um eine große Anzahl an Substanzen im Format eines Screens zu untersuchen, muss dieses Modell in hohem Durchsatz verwendbar sein. Hierfür werden typischerweise Mikrotiterplatten verwendet (Abbildung 2A). In diesen miniaturisierten Formaten können mehrere Wirkstoffe parallel untersucht werden, um die Wirkstoffsuche zu beschleunigen. Die Miniaturisierung des Ansatzes ist hierbei nicht beliebig erweiterbar. Während in biochemischen Testsystemen aufgrund der Homogenität chemischer Reaktionen eine Miniaturisierung einfacher durchzuführen ist, führt dieses in zellbasierten Testsystemen zu einer Reduktion der Zellzahl, was die Analyse ab einem gewissen Punkt sehr erschweren kann [42]. Es ist wichtig, dass die Ergebnisse eines Screens reproduzierbar sind. Außerdem sollten, falls vorhanden, Positivkontrollen verwendet werden, die eine Referenz für den gesuchten Effekt darstellen [14,40,42].

Zelluläre Veränderungen können im Format eines Screens durch verschiedene methodische Ansätze bestimmt werden (Abbildung 2 B-D). Abhängig von der

biologischen Fragestellung besitzen die verschiedenen Ansätze Vor- und Nachteile. Zytoblot-Assays und Reporteragen-Assays bestimmen das Vorkommen eines bestimmten Gens oder Proteins als Marker. Diese Ansätze besitzen somit z.B. großes Potential in der Untersuchung von Signalwegen. Mit dem Zytoblot-Assay können durch Immunodetektion Zellzustände wie die Phosphorylierung eines bestimmten Proteins in hohem Durchsatz analysiert werden [43]. Bei dem Reporteragen-Assay handelt es sich um ein zumeist Lumineszenz-basiertes Testsystem, welches in hohem Durchsatz die Expression eines bestimmten Reporterproteins durch enzymatische Luciferase-Aktivität anzeigt. Bei diesem Ansatz sollte man sich der Gefahr bewusst sein, dass auch solche Substanzen identifiziert werden, welche direkt die Luciferase-Reaktion modulieren, was zu einer beträchtlichen Anzahl falsch positiver Treffer führen kann [44-46].

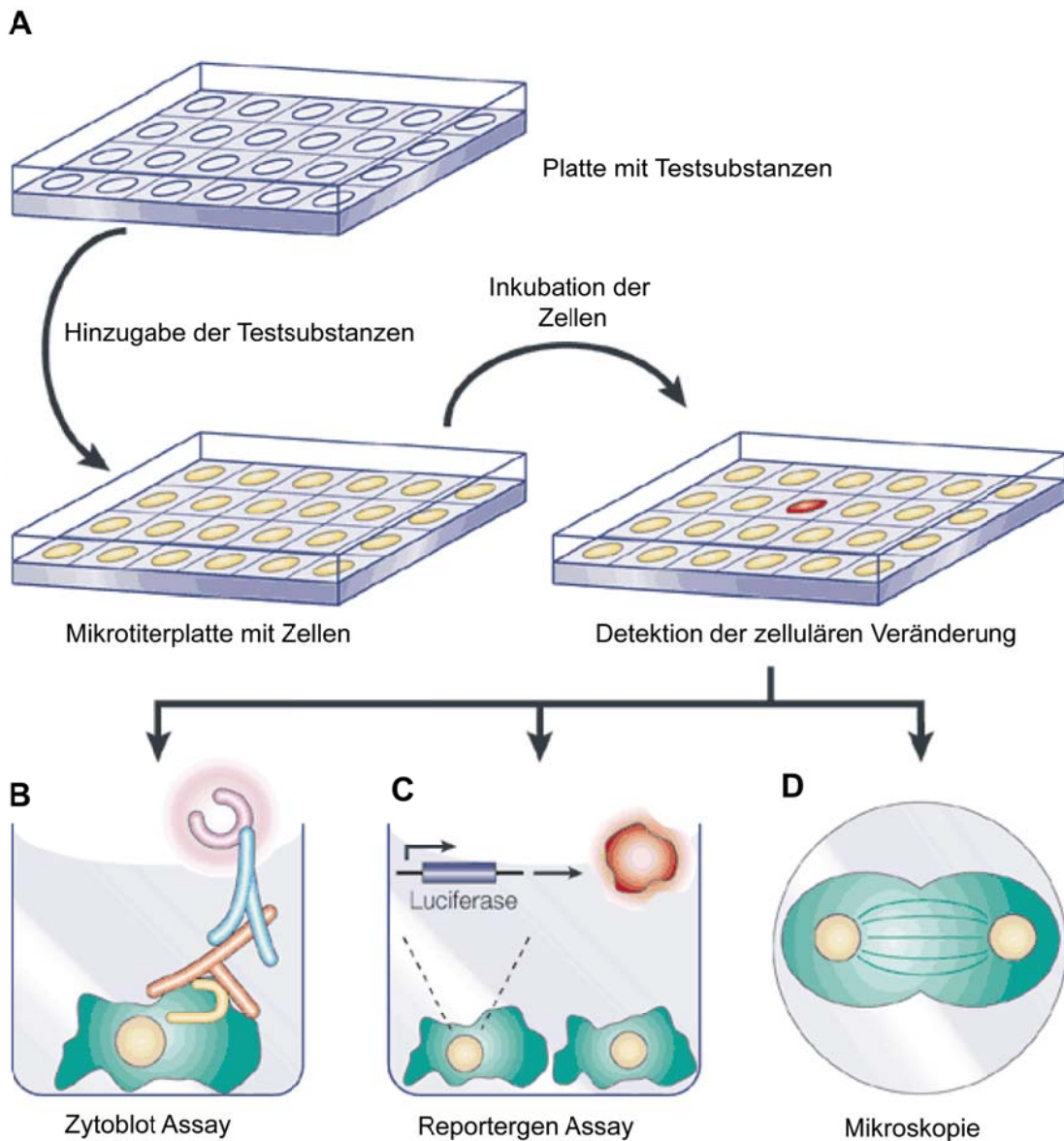


Abbildung 2. Beispiele zellulärer Screening Ansätze. (verändert nach Stockwell [16]). Diese Assays bestimmen den Einfluss von einer Kollektion von Substanzen auf einen spezifischen biologischen Prozess. **A.** Um eine große Anzahl an Substanzen zu testen wird eine Mikrotiterplatte mit den zu untersuchenden Zellen vorbereitet und die Testsubstanzen in die Kavitäten der Platte hinzugefügt. **B–D.** Eine von verschiedenen Möglichkeiten zur Detektion der zellulären Effekte jeder Substanz. **B.** Ein Antikörper detektiert posttranslationale oder biosynthetische Veränderungen innerhalb einer Zelle. **C.** Ein Reportergen Assay detektiert Veränderungen in der Gen-Expression eines spezifischen Promotors. **D.** Morphologische oder andere zelluläre Veränderungen werden mikroskopisch visualisiert. In jedem Fall werden diejenigen Substanzen, welche die gewünschten zellulären Veränderungen (Phänotyp) verursachen, in Folgestudien näher untersucht (rot markiert in der Mikrotiterplatte)

Automatisierte Fluoreszenzmikroskopie stellt ein leistungsfähiges Werkzeug für Phänotyp basiertes Screening dar. „A picture says more than a thousand words“ (ein Bild sagt mehr als tausend Worte); diese berühmte Phrase, die um 1921 von einem amerikanischen Werbekaufmann geprägt wurde, um die Kraft von Grafiken zur

Informationsweitergabe zu erläutern, beschreibt passend die Stärke des Mikroskopie-basierten Screenings (Abbildung 2D) [47]. Durch Fluoreszenzmikroskopie kann praktisch jede physiologische Veränderung einzelner Zellen analysiert werden [48]. Im Gegensatz zu anderen Herangehensweisen, wie dem Zytoblot und den Reporter-Gen-Assays können sowohl unerwünschte Wirkungen wie z.B. Zytotoxizität einer Testsubstanz als auch unerwartete, interessante Veränderungen der Zellphysiologie und Zellmorphologie enthüllt werden, die bei dem Design des Systems nicht antizipiert wurden. [47,48]. Außerdem ist eine Kombination von bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffen möglich, was die Analyse mehrerer zellulärer Parameter gleichzeitig ermöglicht [49]. Fluoreszenzmikroskopie ist hochsensitiv, so dass geringe Zellzahlen für den Screen ausreichen und auch wenig exprimierte Biomoleküle detektiert werden können [48]. Zurzeit stellt Fluoreszenzmikroskopie wahrscheinlich die beste Strategie des zellbasierten Screenings dar, um eine große Spannweite an Bioaktivitäten einer Substanzbibliothek aufzudecken. Dieses beinhaltet auch typische Veränderungen in der Zellmorphologie, wie sie z.B. in der Mitose auftreten (siehe 1.3). Daher besitzt dieser Ansatz großes Potential in der Identifikation von Mitose modulierenden Substanzen, die sowohl im Zentrum der Krebsforschung, als auch dieser Arbeit stehen. Wegen des großen Informationsgehaltes wird ein zellulärer, Mikroskopie basierter Screen auch *High Content Screen* genannt [48,50].

Als *High Content Screening* Methode der Zukunft besitzt die Durchflusszytometrie aufgrund von Verbesserungen im Durchsatz der Testproben großes Potential [51,52]. Hierdurch können bis zu 17 Proteine mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) parallel untersucht werden [53].

Das klassische Beispiel für den Erfolg des zellbasierten Screenings ist die Identifikation des Wirkstoffes Monastrol durch eine Kombination der Zytoblot-Methode mit dem *High Content Screening* [54]. Hierdurch wurde zunächst erkannt, dass der Wirkstoff strukturelle Anomalitäten des mitotischen Spindelapparates verursachte. Aufgrund wissenschaftlich fundierter Schätzungen mit Hilfe bereits beschriebener Proteinfunktionen gelangte die Forschungsgruppe von T.J. Mitchison zu der Annahme, mitotische Kinesine seien mögliche Zielproteine dieser Substanz. Im weiteren Verlauf konnte das Kinesin Eg5 als Zielprotein dieser Substanz identifiziert werden. Dieses Beispiel zeigt, dass die Identifikation einer Substanz durch zelluläres Screening nur einen Anhaltspunkt seiner physiologischen Wirkungsweise gibt und eine große Anzahl möglicher Zielproteine verbleiben. Daher schließt sich nach dem zellulären Screening im vorwärts gerichteten Ansatz die Identifikation des Zielproteins an, um in Korrelation zu dem Phänotyp die molekulare Wirkung der Substanz zu verstehen.

1.1.4 Die Identifikation und Validierung des Zielproteins einer Substanz

Die Identifikation und Validierung des Zielproteins ist der schwierigste und zeitintensivste Schritt des vorwärts gerichteten chemisch genetischen Ansatzes. Hierfür gibt es bislang keine generelle Strategie [21]. Die Bewertung des weiteren Vorgehens nach dem zellbasierten Screening sollte daher individuell für jedes bioaktive Molekül erfolgen.

Die affinitätsbasierte Aufreinigung (*pulldown*) ist der klassische Weg zur Identifikation des Zielproteins einer Substanz [55]. Hierfür wird die Testsubstanz auf einem Trägermaterial immobilisiert. Hierauf erfolgt eine Inkubation mit zellulären Proteinextrakten, was die Bindung potentieller Zielproteine der Substanz erlaubt. In der Folge werden unspezifisch gebundene Proteine durch eine Serie von Waschschritten eluiert. Bei geeigneten Bedingungen wird die Interaktion spezifisch gebundener Proteine mit der Testsubstanz aufgelöst. Die folgende Identifikation der gebundenen Proteine erfolgt zumeist über massenspektrometrische Analyse nach Größenauffrennung der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese und proteolytischem Verdau mit Proteasen, wie Trypsin [56,57]. Potentielle Zielproteine lassen sich durch einen Sequenzabgleich der tryptischen Peptide mit einer Proteindatenbank identifizieren.

Eine erfolgreiche Variante dieses Ansatzes ist die komparative Affinitätsaufreinigung [58]. Hierbei wird ein weiterer *pulldown* mit einem strukturell ähnlichem und nicht bioaktivem Analogon des zu untersuchenden Molekül durchgeführt. Durch einen Vergleich der gebundenen Peptide von der Testsubstanz mit den von der Kontrollsubstanz gebundenen können somit Proteine, die an beiden Substanzen binden, als unspezifische Liganden betrachtet werden, während potentielle Zielproteine exklusiv an die bioaktive Substanz binden sollten. In der Praxis ist es jedoch oft schwierig, eine strukturähnliche Kontrollsubstanz zu identifizieren, die keinerlei Bioaktivität aufweist und somit besteht die Gefahr, dass tatsächliche Zielproteine in geringerem Maße auch in dem Kontrollansatz identifiziert werden. Dadurch kann es vorkommen, dass tatsächliche Zielproteine einer Substanz fälschlicherweise als unspezifische Bindungspartner charakterisiert werden [59]. Aus diesem Grund ist es z.B. besonders schwierig, mit dieser Methode Zielproteine zu identifizieren, die in der Zelle hochexprimiert sind und daher großes Potential haben, in gewissem Maße unspezifische Bindungen einzugehen. Diese Sichtweise kann auch umgekehrt werden: besitzen sowohl die Test-, als auch die Kontrollsubstanz eine gewisse Affinität für das Zielprotein könnte dieses durch eine massenspektrometrische Identifikation in beiden Ansätzen maskiert sein.

Aufgrund der Einschränkungen der klassischen komparativen Affinitätsaufreinigung entwickelten sich Methoden, mit denen Bindung der aktiven Substanz und der inaktiven Substanz an Proteine nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ bewertet werden kann. Eine Kombination von isotoopenmarkierten Aminosäuren mit der komparativen Affinitätsaufreinigung zeigte bereits großes Potential, solche Bindungsunterschiede zu quantifizieren. [60]. Es gibt verschiedene Strategien der Isotoopenmarkierung von Aminosäuren. Hierbei ist SILAC (*Stable Isotope Labelling of Amino Acids In Cell Culture*) [61] eine Weiterentwicklung der Methode ICAT (*Isotope Coded Affinity Tags*) [62,63]. Ein Vergleich der Anwendung beider Methoden in der komparativen Affinitätsaufreinigung wird in Abbildung 3 dargestellt. Bei beiden Strategien werden Peptide oder Proteine entweder mit schweren (*heavy*) oder leichten (*light*) Isotoopen markiert. Nach einer komparativen Affinitätsaufreinigung mit aktiver und inaktiver Substanz können somit gebundene Peptid- bzw. Proteinmengen aufgrund der charakteristischen Massenunterschiede der Isotope mittels massenspektrometrischer Analyse relativ quantifiziert werden [60,64]. Die Isotoopenmarkierung bei den Methoden geschieht auf unterschiedlichen Ebenen. Bei ICAT werden zuvor reduzierte Cysteinreste gebundener Peptide mittels Reagenzien isotoopenmarkiert. Dieses wird nach der Affinitätsaufreinigung durchgeführt. Hingegen wird bei der Methode SILAC das zelluläre Proteom durch den Einbau isotoopenschwererer oder leichter Aminosäuren während der Zellkultur markiert, worauf die Affinitätsaufreinigung folgt. Der SILAC-Ansatz hat gegenüber ICAT mehrere Vorteile, wie z.B. die erhöhte Effizienz durch die Markierung des Proteoms, wodurch keine Varianzen zwischen verschiedenen Proben auftreten und die Möglichkeit, Proteine mit wenigen oder keinen Cysteinresten nachzuweisen [65]. Mit ITRAQ existiert eine weitere Abwandlung von ICAT. Wie dort werden chemische Verbindungen zur Markierung von Peptiden eingesetzt. Hierbei ist es jedoch möglich, die Bindungseigenschaften von acht Substanzen parallel zu untersuchen [66,67].

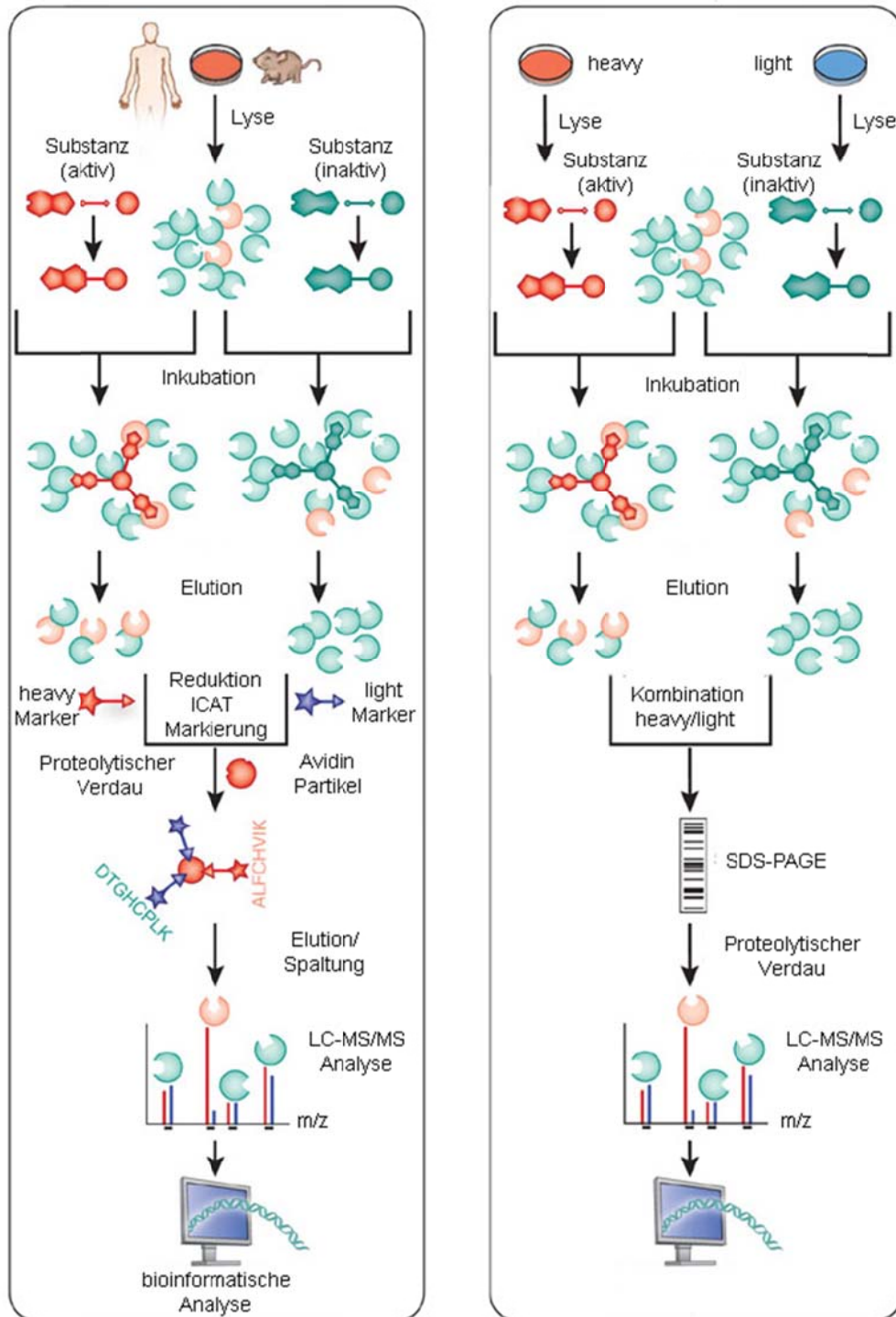


Abbildung 3 ICAT und SILAC in der komparativen Affinitätschromatografie. (verändert nach Rix und Superti-Furga [60]) **A.** ICAT. Durch Affinitätsaufreinigung gebundene Proteine eines zellulären Proteinextraktes werden nach Bindung an die immobilisierten Substanzen isotonenmarkiert **B.** SILAC. Das Proteom einer Zellkultur wird vor der Affinitätsaufreinigung mit unterschiedlichen Isotopen markiert. **A** und **B.** Isotopenschwer (*heavy*) und isotopenleicht (*light*) markierte Proben werden zusammengeführt, proteolytisch verdaut und nach massenspektrometrischer Analyse erfolgt die Analyse der Zielproteine durch den Vergleich der Peptidfragmente mit einer Proteindatenbank. Die von der Testsubstanz in höherem Maße gebundenen Proteine (hellrot) besitzen ein signifikant größeres Intensitäts- / Massen-Verhältnis in der massenspektrometrischen Analyse und können aufgrund der unterschiedlichen Proteinmarkierung zugeordnet werden.

Die beschriebenen Methoden der Affinitätsreinigung benötigen zumeist eine chemische Modifikation der Testsubstanz, die ihre Immobilisation auf einem Trägermaterial ermöglicht. Hierbei ist es jedoch möglich, dass dieses zu einem Verlust der Bioaktivität der Testsubstanz führt. In vielen Fällen ist daher die chemische Veränderung der Substanz nicht möglich. In diesem Fall müssen alternative Methoden zur Identifikation der Zielproteine einer Substanz angewendet werden. Besonders erwähnenswert sind gentechnische Methoden wie das *haploinsufficiency profiling*, bei der keine Modulation der Testsubstanz notwendig ist [68]. Bei weiteren genetischen Ansätzen wie dem Phagen-Display und dem Hefe-3-Hybrid System sind Schritte der Affinitätsaufreinigung potentieller Zielproteine einer Substanz mit eingeschlossen [69]. Der Vorteil ist eine hieraus hervorgehende künstliche Erhöhung der relativen zellulären Menge des Zielproteins, was besonders bei der Identifikation von gering exprimierten Proteinen Vorteile haben kann [58].

Weil das Verständnis der Biologie größer wird, können durch wissenschaftlich fundierte Schätzungen, wie im bereits beschriebenen Fall des Kinesin-Inhibitors Monastrol (siehe 1.1.3), Zielproteine identifiziert werden. In diesen Fällen können die möglichen Zielproteine durch Testansätze mit sich reduzierender Komplexität sequentiell eingeschränkt werden und das Zielprotein durch direkte biologische oder biochemische Tests schließlich bestätigt werden [70]. Ein weiteres Beispiel für diesen Ansatz ist die Identifikation von Tubulin als Zielprotein von Taxol mit Hilfe des bekannten Effekts des Wirkstoffes Colchicin auf das Protein [71,72]. Eine Verwendung dieses Ansatzes ist empfehlenswert, da hierdurch keine Modifikation der Substanz benötigt wird und er insbesondere in Kombination mit direkten Methoden wie der Affinitätschromatografie zur Validierung des Zielproteins einer Substanz beitragen kann. Weitere Möglichkeiten, ein potentielles Zielprotein im physiologischen Kontext zu validieren, ist die siRNA Technologie, bei der ein *knockdown* des Protein kodierenden Gens durchgeführt wird. Eine Validierung des Zielproteins wäre hierbei durch die Induktion eines ähnlichen Phänotyps wie nach der Substanzapplikation aufgezeigt. Die direkte Bindung einer Substanz an ein Protein kann durch biochemische Tests wie die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie validiert werden. Falls die Proteinstruktur des potentiellen Zielproteins bekannt ist, können mittels *in silico* Studien molekulare Modelle des Protein-Substanz-Komplexes erstellt werden, um die Bindung zu verstehen und potentielle mit der Testsubstanz interagierende Aminosäuren zu erkennen.

1.2 Der Zellzyklus

Die Zelle durchläuft während des Zellzyklus eine große Umstrukturierung ihrer Bestandteile mit dem Ziel der Zellvermehrung. Der Zellzyklus lässt sich in 4 individuelle Phasen einordnen: In der S-Phase (Synthese) wird das Genmaterial repliziert, um für beide Tochterzellen Kopien zu erstellen. Innerhalb der G2-Phase werden Makromoleküle synthetisiert und die Zelle verdoppelt praktisch ihre Größe. Während der M-Phase (Mitose) zerfällt die Kernhülle der Mutterzelle und die einander entsprechenden Chromosomen werden zu gegenüberliegenden Polen der Zelle gezogen. Dabei wird jede Gruppe von Tochterchromosomen von einer neu gebildeten Kernhülle umgeben. Schließlich teilt sich die Zelle, so dass zwei Tochterzellen entstehen. Nachdem die Zelle die Mitose durchlaufen hat, kann sie wieder in die G1-Phase eintreten, in der zelluläre Vorbereitungen für die nächste Zellteilung getroffen werden. G1-, S- und G2-Phase werden auch oft Interphase genannt, während in der Mitose (M-Phase) solch große zelluläre Umstrukturierungen stattfinden, dass sie selbst in mehrere Phasen unterteilt werden kann (siehe 1.3 und Abbildung 4).

Die während des Zellzyklus ablaufenden Vorgänge werden durch ein komplexes molekulares Netzwerk reguliert. Nach einer entsprechenden Vergrößerung der Zellmasse muss sichergestellt werden, dass eine Zelle ihr komplettes Genom fehlerfrei dupliziert und während der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergibt. Eine gesunde Zelle besitzt daher diverse Kontrollpunkte, die ein Eintreten in die folgende Phase verhindern, bevor die vorherige erfolgreich beendet wurde [73]. Können Schäden nicht beseitigt werden, unterläuft eine solche Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose. Kontrollpunkte sind in mehreren Phasen des Zellzyklus zu finden. Eventuelle Schäden an der DNA werden am G1-Phase Kontrollpunkt überprüft, ehe der S-Phase Kontrollpunkt den Zellzyklus für die Dauer der Reparatur defekter DNA verzögert [74]. Diese Kontrollpunkte werden häufig als G1/S Kontrollpunkt zusammengefasst. Der nachfolgende G2-Kontrollpunkt sichert die vollständige Replikation des Genmaterials ab, bevor die Zelle in die Mitose übergeht. Eine sehr effiziente Kontrolle ist der Spindelkontrollpunkt in der Metaphase der Mitose. Hierdurch wird kontrolliert, ob die Chromosomen über ihre Anhaftungsstellen, die sogenannten Kinetochore, in korrekter Weise mit den bipolaren Spindel-Mikrotubuli verbunden sind. Ist dies der Fall, kann der Zellzyklus mit der Anaphase fortgeführt werden [75]. Erkennen die zellulären Regulatoren entweder Fehler in der G2-oder der M-Phase wird der resultierende Zellzyklusarrest als G2/M Arrest bezeichnet.

Schlüsselproteine in der Regulation des Zellzyklus sind die CDKs (*cyclin dependent kinases*) mit ihren regulatorischen Proteinen, den Cyclinen [76]. Die CDKs wirken als

Motoren des Zellzyklus, die sein Voranschreiten durch die verschiedenen Phasen ermöglichen. Die Kinasen sind nur im Komplex mit Cyclinen aktiv und bilden daher mit ihnen, um zusammen als Kontrollschalter des Zellzyklus zu fungieren. Das Zusammenspiel wird durch eine komplexe Regulation durch posttranslationale Modifikation ermöglicht, bei der die Cycline von den CDKs über Phosphorylierung aktiviert werden. Die Konzentration der Cycline wird hierbei anhand verschiedener Mechanismen reguliert: Ubiquitinierung verursacht den Abbau der Proteine, und Cyclin-Expression kann durch Wachstumsfaktoren reguliert werden. Aufgrund dieser koordinierten Kontrolle kann die Aktivität der CDKs und somit auch ein Voranschreiten des Zellzyklus gesteuert werden [77,78].

Von hoher Relevanz in der Regulation des Zellzyklus ist das Protein p53, welches häufig als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird [76,79]. In der Funktion als Tumorsuppressor ist es seine Aufgabe, den Zellzyklus nach DNA-Schäden und somit in der G1/S-Phase anzuhalten [80]. Wenn der Schaden irreparabel ist, verursacht p53 schließlich Apoptose dieser Zellen, um beschädigtes Genmaterial zu beseitigen. Das zelluläre Vorkommen von p53 und somit dessen Aktivität wird hierbei durch eine gerichtete Transkription, posttranslationale Aktivierung und Inhibition seines Ubiquitin-abhängigen Abbaus ermöglicht. Hierdurch wird die nötige Zeit für p53 geschaffen, um Beschädigungen des Genmaterials zu reparieren. Das Protein MDM2 (*murine double minute 2*) hingegen kann die zelluläre Menge von p53 auf der Transkriptionsebene und durch Ubiquitinierung negativ regulieren [81-84]. Neben dem typischen Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase aufgrund einer erhöhten Konzentration von p53, beeinflusst das Protein außerdem die Aktivierung des G2/M Kontrollpunktes [85,86].

1.2.1 Ein deregulierter Zellzyklus führt zu Krebs

Krebs ist verantwortlich für ein Achtel aller Todesfälle weltweit [87]. Die Krankheit umfasst mehr als 100 verschiedene Unterarten mit verschiedenen Risikofaktoren und kann sich in den meisten Zelltypen und Organen des menschlichen Körpers ausbreiten. Der Ursprung im Entstehungsprozess von Krebszellen sind genetische Veränderungen, welche eine schnellere Vermehrung im Verhältnis zu gesunden Zellen ermöglichen. Weitere Mutationen können schließlich dazu führen, dass diese Zellen in fremden Gewebe eindringen und in Organen Metastasen bilden können [88-90]. Durchschnittlich kommt es bei einer von 10^7 Zellteilungen zu einer Mutation, wobei die Gesamtanzahl menschlicher Zellen 2×10^{14} beträgt. Daher scheint es bemerkenswert, dass nur ein Drittel aller Menschen einmal im Leben an Krebs erkrankt. Die relative Seltenheit von Krebs ist der Effektivität der Regulationsmechanismen des Zellzyklus zuzuschreiben. Krebszellen entstehen nur,

wenn diese Kontrollmechanismen nicht mehr funktionieren [88]. Daher ist es nicht überraschend, dass es häufig Veränderungen in den Genen der den Zellzyklus regulierenden Proteine sind, die zur Entstehung von Krebszellen führen. Da die Aktivität dieser Proteine von vorgeschalteten Signalwegen reguliert wird, tragen Krebszellen auch häufig innerhalb dieser Signalwege Mutationen, die zu einer veränderten Aktivität der beteiligten Proteine führen. Einige der veränderten Proteine sollen in der Folge erwähnt werden. So befinden sich in Krebszellen vielfach Veränderungen im zellulären Vorkommen des CDK-Systems [89,91-94]. Eine große Rolle in der Beeinflussung des CDK-Systems spielt der Ras-abhängige MAPK (*mitogen activated kinase*)-Signalweg. Das Protein Ras ist in ca. 30% aller Tumoren durch Mutation konstitutiv aktiv und wirkt durch Aktivierung des CDK/Cyclin-Systems als Motor eines unkontrollierten Fortschreitens des Zellzyklus [95,96]. Außerdem ist das zelluläre Vorkommen des Proteins p53 in vielen Krebszellen verändert. Die wichtige Funktion des Proteins in der Entstehung von Krebs wird dadurch deutlich, dass 50% aller menschlicher Tumore Mutationen im Protein p53 aufweisen [97]. Des Weiteren besitzen 7% eine erhöhte Genexpression seines Gegenspielers MDM2 [98].

Das zunehmende Verständnis der molekularen Zusammenhänge führte zu dem Erkennen potentieller Angriffspunkte gegen Krebs. So wird seit Jahren nach chemischen Modulatoren von Proteinen des Zellzyklus geforscht, um die Vermehrung von Krebszellen zu verhindern. Solche Substanzen induzieren einen Zellzyklusarrest durch Interferenz mit verschiedenen molekularen Instanzen des Zellzyklus und werden im klinischen Gebrauch oft in Kombination verwandt [99].

1.2.2 Chemische Inhibitoren des Zellzyklus

Es gibt verschiedene Ansätze zur Identifikation von Substanzen, die als Inhibitoren des Zellzyklus wirken und somit das Wachstum von Krebszellen inhibieren. Eine Herangehensweise hierfür ist die Suche nach chemischen Modulatoren von Zellzyklus regulierenden Proteinen. Eine Modulation von Onkogenen (z.B. Ras oder bestimmte CDKs) oder Tumorsuppressoren (z.B. p53) hat großes Potential, spezifisch die Vermehrung von Tumorzellen zu stoppen.

Inhibitoren diverser CDKs können aufgrund der beschriebenen Wirkung des CDK/Cyclin-Regulationssystems während des gesamten Zellzyklus zu dessen Arretierung in verschiedenen Phasen eingesetzt werden [100]. Eine Inhibition der Aktivität von Ras kann z.B. durch eine Störung seiner für die Signaltransduktion entscheidenden endomembranen Sublokalisierung durch Substanzen wie Palmostatin B erreicht werden [101]. Auch die Inhibition der p53/MDM2-Interaktion ist ein interessantes Ziel chemischer Wirkstoffe: Substanzen wie Nutlin-3 oder diverse

Spirooxindole können durch diese Wirkung einen Arrest in der G1/S oder der G2/M-Phase induzieren und stellen somit ein vielversprechendes Werkzeug zur Krebsbekämpfung dar [102-106].

Weitere Ansätze zur Krebsbekämpfung verfolgen die Identifikation von Substanzen, die elementare Bestandteile des Zellzyklus stören, die in Krebszellen meistens nicht moduliert sind und somit zu einem Arrest des Zellzyklus führen. Diese Substanzen wirken somit auch auf gesunde Zellen, jedoch ist aufgrund der höheren Teilungsrate von Krebszellen eine gewisse Spezifität gegenüber diesen gegeben. Dieser Ansatz ist höchst erfolgreich in der Behandlung von Krebs. So werden Platin-Derivate wie cis-Platin zur Behandlung diverser Tumoren eingesetzt. Nach der Bindung des intrazellulär aktivierten Wirkstoffes an Purinbasen kommt es zur Störung der Struktur des DNA-Doppelstranges [107,108]. Als Folge ist die zelluläre DNA-Synthese blockiert, wodurch die Zellen in der G1/S-Phase arretiert sind [109]. Ähnlich erfolgreich sind Substanzen, die als Modulatoren von Bestandteilen des Zytoskelettes einen mitotischen Arrest induzieren. Aufgrund der hohen Relevanz für die vorliegende Arbeit werden die Zusammenhänge zwischen der Mitose und Bestandteilen des Zytoskelettes im folgenden Abschnitt (1.3) detaillierter erläutert.

1.3 Die Mitose und das Zytoskelett

In der Mitose (M-Phase) kommt es zu starken morphologischen Veränderungen einer Zelle und es kommt zu einer typischen Abrundung der Zelle [110]. Die dynamischen Umstrukturierungen von Bestandteilen des Zytoskelettes, den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli, sind hierfür Schlüsselprozesse. Zu Beginn der Mitose in der Prophase kondensieren die Chromosomen und die Centrosomen der zukünftigen Tochterzellen wandern zu den Zellpolen (Abbildung 4).

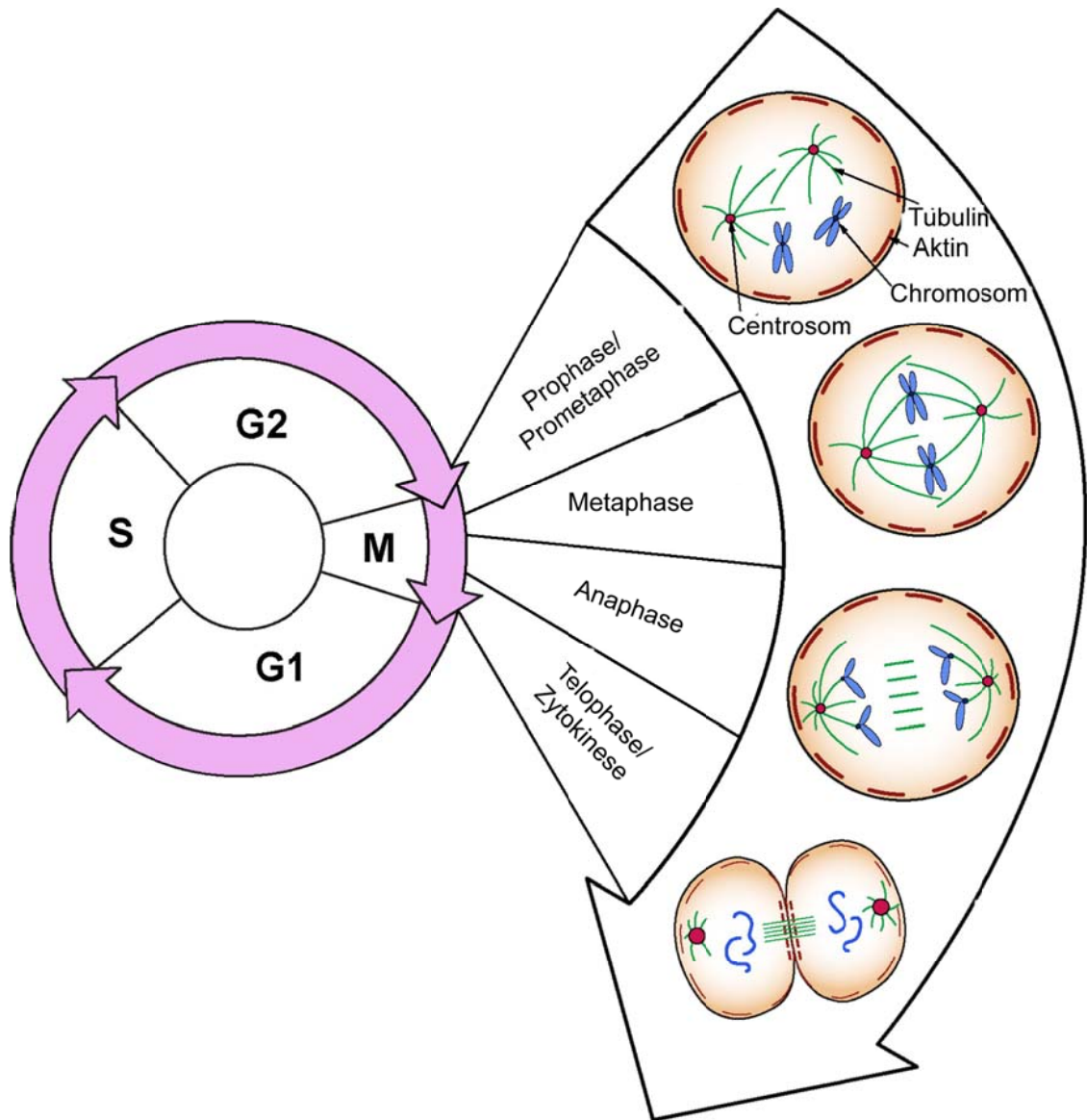


Abbildung 4. Der eukaryotische Zellzyklus. (verändert nach Heng [111]). Dargestellt sind die verschiedenen Phasen des Zellzyklus G1, S, G2 und M. Zelluläre Veränderungen während der hochdynamischen M-Phase sind gesondert dargestellt.

Die Centrosomen stellen das MTOC (*microtubule organizing centre*) dar, an dem die Keimbildung des aus Mikrotubuli (MT) aufgebauten Spindelapparates ihren Ursprung findet (siehe 1.3.1) [112]. In der Prometaphase zerfällt die Kernhülle und die Spindel-MT wachsen bis zur Mitte der Zelle, wo die Chromosomen sich weiter verdichten. Der Spindelapparat tritt schließlich über die Kinetochore mit den Chromosomen in Kontakt und organisiert diese in der zentralen Ebene der Zelle. Die Metaphase wird erreicht wenn der Spindelapparat vollständig ausgebildet ist, was bedeutet, dass jedes Schwesterchromatid über die MT mit den Zellpolen verbunden ist. Durch die Verkürzung des Spindelapparates werden die Schwesterchromatiden in der Anaphase zu den entgegengesetzten Polen gezogen. In der anschließenden

Telophase bildet sich schließlich die Kernhülle neu. Durch die Zytokinese, in der das Aktin-Zytoskelett eine große Rolle spielt, teilt sich schließlich die Zelle [113-115].

Aufgrund ihrer wichtigen Rollen während der Mitose stellen MT und ferner auch Aktinfilamente sehr attraktive Ziele für die Regulation des Zellzyklus und somit der Krebstherapie dar [116].

1.3.1 Mikrotubuli – Aufbau und Dynamik

Zusammen mit den Aktinfilamenten und den Intermediärfilamenten sind MT die Hauptbestandteile des eukaryotischen Zytoskelettes [117]. Neben ihrer Schlüsselrolle in der Mitose sind MT in verschiedenen zellulären Funktionen wie der strukturellen Unterstützung der Zelle, Lokalisierung von Organellen und dem intrazellulären Verkehr involviert [118,119]. Ein Mikrotubulus besteht aus 13 Protofilamenten, die sich zu einer hohlen röhrenartigen Struktur von 25 nm Durchmesser zusammenlagern. Die Protofilamente sind aus linear angeordneten $\alpha\beta$ -Tubulin Heterodimeren aufgebaut. Durch diese Anordnung sind MT polar, wobei das sog. Minus-Ende von α -Tubulin und das Plus-Ende von β -Tubulin dargestellt wird (Abbildung 5A). Die MT-Polymerisation ist ein komplexer Prozess, der eine kooperative Assemblierung von $\alpha\beta$ -Tubulin gefolgt durch GTP Hydrolyse zu GDP mit einschließt, welche die Energie für die Polymerisation bereitstellt [120]. Beide Tubulin-Isoformen besitzen eine GTP-Bindestelle, wobei nur ausschließlich von β -Tubulin gebundenes GTP austauschbar ist und während der Polymerisation hydrolysiert wird [121].

Die Polymerisation von MT geschieht in zwei wichtigen Schritten, die Keimbildung und Elongation, und folgt *in vitro* und *in vivo* den gleichen Prinzipien [122,123]. Die Keimbildung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Tubulin-Polymerisation und beginnt am Minus-Ende. Hier wird zunächst ein Oligomer aus 6-12 $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimeren gebildet. Ein solcher Keim ist genügend stabil, so dass am Plus-Ende weitere GTP-gebundene $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimere hinzugefügt werden können. In dieser Elongationsphase erhöht sich die Polymerisationsgeschwindigkeit rapide. Schließlich erreicht die MT-Assemblierung eine Sättigung, bei der die Assoziation und Dissoziation der Tubulin-Untereinheiten am Ende der MT ausgeglichen sind und es keinen Netto-Zuwachs des Polymers gibt. Dieses geschieht, wenn eine kritische Konzentration der gelösten Tubulin-Dimere erreicht ist. Somit kann die Tubulin-Polymerisation in Abhängigkeit von der Zeit mit einer sigmoiden Kurve beschrieben werden.

MT sind instabile Polymere und zeigen zwei Arten von dynamischen Verhalten, den „Tretmühleneffekt“ und die „dynamische Instabilität“. Grundlage für den

„Tretmühleneffekt“ ist, dass GTP-gebundene Tubulin-Dimere bevorzugt an MT-Enden assoziieren, während GDP-gebundene Tubulin-Dimere von den Enden dissoziieren. Der Tretmühleneffekt beschreibt also die Netto-Assoziation von Tubulin-Dimeren am Plus-Ende gekoppelt mit einer Netto-Dissoziation am Minus-Ende der MT [124,125]. Dieses führt zu einem Fluss von $\alpha\beta$ Tubulinuntereinheiten von einem zum anderen Ende ohne dass sich die Länge der MT signifikant verändert. Die zweite Form, die „dynamische Instabilität“ ist die vorherrschende Form der MT-Dynamik [126,127] und beschreibt ein stetiges Wechseln der MT-Enden zwischen Wachstumsphasen und Verkürzungsphasen. Hierbei dient GTP gebundenes Tubulin am Plus-Ende der MT als eine Art Schutzkappe vor einer Depolymerisation und der Mikrotubulus kann wachsen. Kommt es zum Verlust der GTP-Kappe durch Hydrolyse, führt dieses zur Kürzung des Polymers. Der Übergang von einer Wachstumsphase zu einer Verkürzungsphase wird *catastrophe* genannt, im umgekehrten Fall spricht man von einem *rescue* (Abbildung 5B).

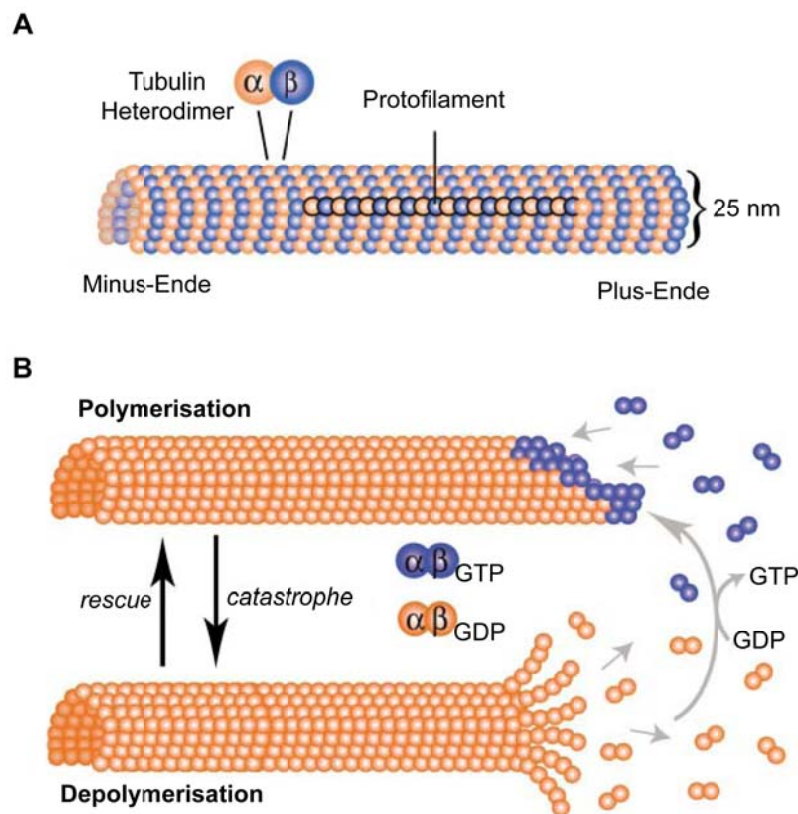


Abbildung 5: MT-Struktur und Dynamik. (verändert nach Kline-Smith [128]) **A.** Die Struktur der MT. Die generelle MT-Struktur ist hier mit α -Tubulin in orange und β -Tubulin in blau gezeigt. Ein einzelnes Protofilament im Mikrotubulus ist schwarz umrandet. **B.** MT schalten zwischen Stufen der Polymerisation und Depolymerisation, ein Verhalten, welches zentral für die dynamische Instabilität ist. Obwohl die dynamische Instabilität beide MT-Enden mit einbezieht, wird sie hier vereinfacht für ein Ende dargestellt. GDP-gebundenes Tubulin ist in orange und GTP-gebundenes Tubulin, welches die GTP-Kappe generiert, in blau dargestellt.

Durch die Expression verschiedener Tubulin-Isotypen, posttranslationale Modifikationen von Tubulin und MAPs (MT assoziierte Proteine) und TIPs (Tubulin interagierenden Proteine) reguliert die Zelle in einem komplexen Zusammenspiel das dynamische Verhalten der MT [119]. Die Assoziation bestimmter TIPs (Tubulin interagierende Proteine), die durch die Bindung an die MT-Enden einen Spezialfall der MAPs darstellen, mit dem Plus-Ende kann z.B. die Stabilität der MT erhöhen. Daher ist die Geschwindigkeit der MT-Polymerisation *in vivo* 10 mal schneller als *in vitro* [117]. Andere Proteine vergrößern die dynamische Instabilität der MT durch eine Erhöhung der *catastrophe*-Rate. MAPs können außerdem die MT quervernetzen und die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln [113,129]. Massenspektrometrische Analysen des Spindelapparates mitotischer HeLa Zellen identifizierten insgesamt 795 assoziierte Proteine, ähnliche Studien kommen zu vergleichbaren Ergebnissen [117,130]. Die Funktion einer Vielzahl dieser Proteine im Zusammenhang mit der Mitose und dem zellulären MT-Netzwerk ist bisher unbekannt. Auch die lokale Ausprägung der MT ist hochorganisiert. Das in der Nähe des Zellkerns lokalisierte Centrosom stellt als MTOC den Ursprungsort des MT-Netzwerks dar. In Zellen, die sich in der Interphase befinden, strahlen die MT startend mit dem Minus-Ende vom MTOC aus und ihr Plus-Ende wächst zur Zellperipherie. Vor Beginn der Mitose dupliziert sich das Centrosom und somit entstehen die beiden Pole des Spindelapparates. Das MTOC stellt eine effiziente Plattform für die $\alpha\beta$ -Tubulin-Polymerisation dar [123,131]. Hierbei kommt dem Protein γ -Tubulin eine wichtige Rolle zu, indem es als wichtiger Bestandteil des MTOCs die Keimbildung ermöglicht. Das relativ instabile Minus-Ende der MT wird durch Bindung an Bestandteile des Centrosoms stabilisiert und durch diese Verankerung wird seine Depolymerisation verhindert [131]. Die essentielle Rolle von γ -Tubulin für die Keimbildung wurde in einer Reihe von Studien belegt [123]. Des Weiteren führte ein *knockout* dieses Proteins z.B. zu einem Verlust des bipolaren mitotischen Spindelapparates und letalen Auswirkungen in *Aspergillus nidulans* [132,133].

In der Mitose löst sich das Interphase-Netzwerk der MT auf. Während der Mitose sind die MT durch ihre Dynamik Schlüsselproteine, insbesondere die „dynamische Instabilität“ erlaubt es ihnen, solche komplexe Strukturen wie den Spindelapparat auszubilden, um die Verteilung der Chromosomen an die Tochterzellen zu ermöglichen (siehe 1.3) [118,119,134]. Daher sind die MT in der M-Phase des Zellzyklus 4-100 mal dynamischer als die MT der Interphase und sie assemblieren und disassemblieren rapide nach den zellulären Notwendigkeiten [135,136].

1.3.2 Chemische Inhibitoren der MT-Dynamik

Die wichtige Rolle der MT in der Zellteilung macht sie zu einem relevanten Ziel für die Identifizierung von chemotherapeutischen Agenzien gegen sich rapide teilende Krebszellen [137]. Diese Tubulin-bindenden Agenzien (TBAs) interferieren mit der MT-Dynamik und wirken daher besonders den essentiellen Umstrukturierungen des Spindelapparates während der Mitose entgegen. Als Folge dessen wird der Spindelkontrollpunkt aktiviert und somit ein mitotischer Arrest induziert. Im weiteren Prozess wird die Apoptose eingeleitet oder es entstehen mehrkernige bzw. polyploide Zellen [119]. Diese Effekte können von zwei Arten von TBAs erreicht werden, den MT-destabilisierenden und den MT-stabilisierenden Substanzen. Bei hohen Konzentrationen führen MT-destabilisierende Substanzen zu einer Verringerung der MT-Polymermasse, wohingegen die MT-stabilisierende Substanzen die Polymermasse erhöhen. Zu den destabilisierenden Substanzen gehören die Vinca Alkaloide; die Naturstoffe Vinblastin und Vincristin wurden aus der Rosafarbenen Catharanthe (*Catharanthus roseus*) isoliert. Die Vinca Alkaloide besitzen einen großen Anteil daran, dass die Verbindung zwischen MT und Krebs erkannt wurde. So führte die Behandlung von Personen mit diesen Substanzen zu einer reduzierten Anzahl weißer Blutkörperchen. Daher fragte man sich, ob die Substanzen zur Behandlung von Blutkrebs eingesetzt werden können, was heutzutage tatsächlich ein Anwendungsgebiet dieser Substanzen ist [138]. Die Vinca Alkaloide werden in der klinischen Behandlung von Tumoren seit Ende der 1950er Jahre verwendet. Aufgrund des Erfolges dieser Wirkstoffe entstanden semisynthetische Derivate, die ähnlichen Erfolg in der klinischen Verwendung haben. Diese konnten zum Teil auch für die Behandlung solcher Tumore eingesetzt werden, für die die Naturstoffe keine Verwendung hatten. Auch Colchicin hat eine destabilisierende Wirkung auf MT. Bei Colchicin handelte es sich um einen pflanzlichen Wirkstoff, der zunächst aus der Pflanze *Colchicum autumnale* (Herbstzeitlose) gewonnen wurde und schon seit der Antike gegen Gicht verwendet wird. Diese Wirkung beruht hierbei u.a. auf der Hemmung der Anzahl der weißen Blutkörperchen, die zu den Entzündungserscheinungen bei der Krankheit führen. Es wurde ebenfalls versucht, Colchicin in der Krebstherapie zu verwenden, doch in klinischen Studien zeigte sich eine zu geringe therapeutische Breite, was zu erhöhten Nekroseraten führte [139,140]. Zu den MT stabilisierenden Substanzen gehört Taxol. Dieser Wirkstoff und seine Analoga werden in der Krebstherapie sehr erfolgreich eingesetzt. Der Wirkstoff wurde aus *Taxus brevifolia* (pazifische Eibe) gewonnen. Taxol und seine semisynthetischen Derivate werden vor allem in der Behandlung von Brustkrebs und Eierstockkrebs verwendet [141].

Es gibt drei gut charakterisierte Bindestellen von TBAs an Tubulin. Diese wurden nach den klassischen TBAs entweder als Vinca Alkaloid-Bindestelle, Colchicin-Bindestelle, oder Taxol-Bindestelle benannt. Die meisten übrigen TBAs binden ebenfalls an diesen drei gut charakterisierten Bindestellen [116,119,137]. Somit assoziieren MT-destabilisierende Substanzen zumeist an der Colchicin- oder Vinca Alkaloid-Bindestelle und Stabilisierer an die Taxol-Bindestelle.

Die Einteilung von TBAs in Stabilisierer und Destabilisierer ist hilfreich, doch sind ihre Wirkungen in niedrigeren und klinisch relevanten Konzentrationen gleich. Hierbei ändert sich die Polymermasse nicht, doch die MT-Dynamik wird durch kinetische Stabilisation inhibiert und die Mitose blockiert [137,142]. Abbildung 6 zeigt unter diesen Bedingungen schematisch die Bindestellen dieser Substanzen an MT. Hierbei werden Colchicin und Vinblastin am Plus-Ende der MT eingebaut, wobei Vinblastin durch seine Bindung an das β -Tubulin des eingebauten Dimers den Einbau neuer Dimere beeinflusst und Colchicin intradimer bindet. In höheren Konzentrationen führen beide Substanzen zu einem Verlust der lateralen Kontakte zwischen den Protofilamenten, was zu einer Depolymerisation der MT führt. Die Inhibition der MT-Dynamik durch Taxol bei geringen Konzentrationen beruht auf der Bindung an β -Tubulin im Lumen der MT. Höhere Konzentrationen des Wirkstoffes katalysieren die Bündelung der Protofilamente und somit die Tubulin-Polymerisation [141,142]. Vinblastin und Colchicin sind beide in der Lage, auch unpolymerisiertes $\alpha\beta$ -Tubulin mit hoher Affinität zu binden. Im Gegensatz dazu ist die Affinität von Taxol gegenüber gelöstem $\alpha\beta$ -Tubulin nur sehr gering.

MT gehören zu den am besten charakterisierten Zielen für die Krebstherapie [119,137,142]. Aufgrund des klinischen Erfolges von Substanzen, wie Taxol und den Vinca Alkaloiden, wird häufig argumentiert, dass MT das beste bisher identifizierte molekulare Ziel für die Bekämpfung von Krebs darstellen [143,144]. Diese Substanzen werden seit vielen Jahren zur Behandlung diverser Tumoren eingesetzt, oft in Kombination miteinander und mit anderen Zytostatika, wie cis-Platin (siehe 1.2.2). Jedoch ist die Synthese dieser strukturell komplexen Wirkstoffe aufwendig, kostspielig und die Substanzen sind nur für eine begrenzte Breite an Tumoren anwendbar. Insbesondere besitzen einige Tumorzellen eine angeborene oder erworbene Resistenz gegen diese Medikamente, was deren klinische Nutzbarkeit stark einschränkt [137,145]. Um diese Einschränkungen zu überwinden, gibt es große Bemühungen, neuartige gegen Tubulin gerichtete Medikamente zu entwickeln und zu identifizieren. Dieses wird hierdurch deutlich, dass im Zeitrahmen zwischen 2005 und 2007 mehr als 25% der klinischen Kandidaten, die Naturstoffe oder Naturstoff-Derivate darstellen, ihre Wirkung auf einer Inhibition der Tubulin-Dynamik

begründeten [146,147]. Aufgrund der validierten klinischen Nutzbarkeit der Vinca Alkaloide und der Taxol-Derivate gelten hierbei Liganden der Vinca Alkaloid-Seite oder der Taxol-Seite als besonders attraktiv. Es befinden sich auch einige Substanzen in der klinischen Evaluierung, die an die Colchicin-Stelle binden. Jedoch teilen diese Substanzen sehr häufig die negativen Eigenschaften von Colchicin, indem sie in hohem Maße zytotoxisch sind [141].

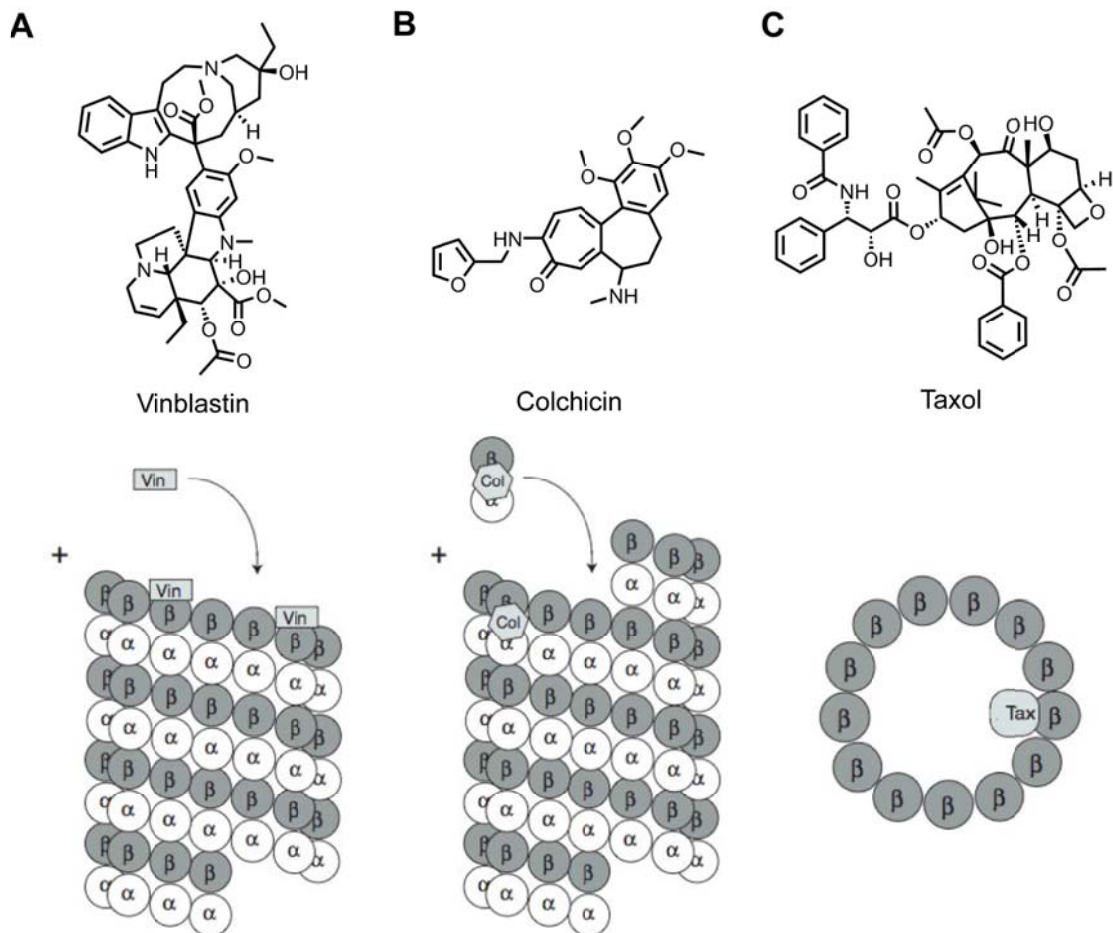


Abbildung 6. Strukturen und Bindestellen verschiedener TBAs. (verändert nach Risinger [141]) **A.** Vinblastin (Vin) bindet interdimer zwischen β -Tubulin und α -Tubulin in der Nähe der GTP-Bindestelle am Plus-Ende der MT. **B.** Colchicin (Col) bindet unpolymersiertes Tubulin intradimer zwischen α und β Tubulin in der Nähe der α Tubulin GTP-Bindestelle und wird dann in die MT eingebaut. **C.** Taxol (Tax) bindet β Tubulin in dem inneren Lumen der MT.

1.3.3 Aktinfilamente

Das Aktin-Zytoskelett ist in verschiedene zelluläre Prozesse involviert, wie der Formgebung der Zelle, der Zellmigration, dem intrazellulären Proteintransport und der Mitose [148,149]. Aktinfilamente bestehen aus zwei Strängen linearer Aktin-Monomere, die eine Helix bilden (siehe Abbildung 7). Der Durchmesser eines Filaments beträgt nur 7 nm, weshalb sie auch häufig Mikrofilamente genannt werden.

Das globuläre Aktin-Monomer wird G-Aktin genannt, während Aktinfilamente als F-Aktin bezeichnet werden.

Aktinfilamente besitzen ähnliche dynamische Eigenschaften wie die MT: wie diese besitzen Aktinfilamente ein Minus-Ende, an dem die Polymerisation startet und ein Plus-Ende. *In vitro* lässt sich die Assemblierung von G-Aktin zu F-Aktin in Abhängigkeit von der Zeit analog zu der Tubulin-Polymerisation mit einer sigmoidalen Kurve beschreiben. Hierbei bildet sich zunächst im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt ein Keim aus einigen Aktinmonomeren und die Aktinpolymerisation schreitet vom Minus- zum Plus-Ende vor. Die Assoziation von Aktinmonomeren ist hierbei ATP-getrieben. Sobald die kritische Konzentration von Aktinmonomeren erreicht ist, befindet sich die Assoziation am Plus-Ende mit der Dissoziation am Minus-Ende im Gleichgewicht und die Polymermasse bleibt gleich („Tretmühleneffekt“). Im zellulären Kontext wird die Aktin-Dynamik in hohem Maße von verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen reguliert. Neuere Studien legen ebenfalls nahe, dass die „dynamische Instabilität“ nicht nur auf die MT beschränkt ist, sondern ebenso bei den Aktinfilamenten eine Rolle spielen könnte [126].

Der Dynamik der Aktinfilamente kommt während der Mitose eine große Bedeutung zu. Die charakteristische Abrundung einer Zelle während der Mitose wird durch Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskelettes ermöglicht. Als entscheidender Bestandteil des kontraktiven Rings ist Aktin während der Zytokinese von großer Bedeutung (Abbildung 4). Auch ist es in der Teilung der Centrosomen in Vorbereitung auf die Mitose involviert [111]. Nicht nur sein Einfluss auf die Mitose macht Aktin zu einem interessanten Zielprotein in der Krebsforschung. So scheint das Aktin-Zytoskelett auch in nachfolgenden Schritten der Entwicklung von Tumorzellen involviert zu sein, da die Zellinvasion und Metastasierung eng mit der Aktin-vermittelten Zellmigration zusammenhängt [116,150]. Im zellulären Kontext wird die raumzeitliche Organisation des Aktin-Zytoskelett durch eine große Anzahl an Proteine reguliert [151]. Aus diesem Grund ist es hochinteressant, Substanzen zu identifizieren, die in der Lage sind das Aktin-Zytoskelett oder seine Regulatoren zu modulieren, um krebisrelevante Prozesse näher aufklären können. Diese Wirkstoffe könnten außerdem als Leitstrukturen für die Synthese potentieller pharmazeutischer dienen.

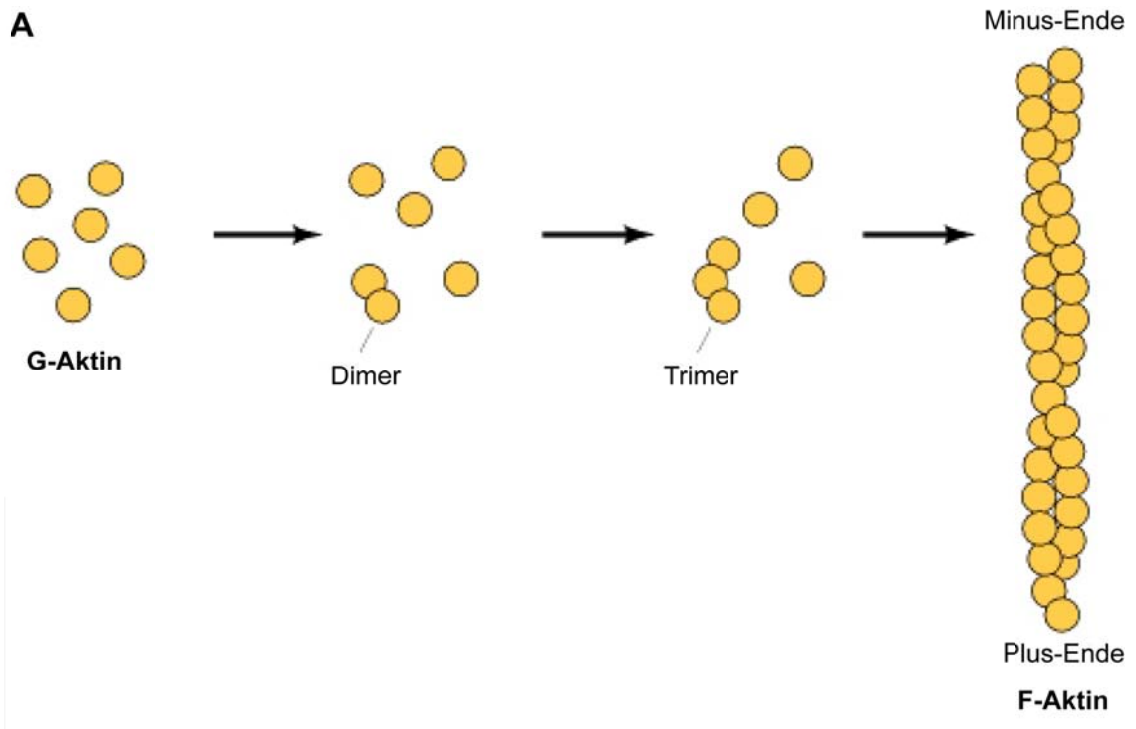


Abbildung 7. Assemblierung und Struktur von Aktinfilamenten. (verändert nach Cooper [152]) Aktin Monomere (G-Aktin) polymerisieren, um Aktinfilamente zu bilden (F-Aktin). Nach der Bildung von Trimeren (Keimbildung) wachsen diese durch das Hinzufügen von Monomeren an beiden Enden.

2. Ziel der Arbeit

Aufgrund der hohen Relevanz des Zellzyklus, der Mitose und der Dynamik von Bestandteilen des Zytoskelettes im Zusammenhang mit der Krebsforschung, sollten Substanzen identifiziert werden, die modulierend in diese Prozesse eingreifen. Mit deren Hilfe sollte entweder das Verständnis der molekularen Zusammenhänge dieser Prozesse erweitert oder Substanzen identifiziert werden, die aufgrund ihrer Bioaktivität, als Leitstrukturen Potential für die Entwicklung von pharmazeutischen Wirkstoffen besitzen.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Waldmann waren zu Beginn der Arbeit erste Voraussetzungen vorhanden mittels des *High Content Screenings* von Substanzbibliotheken, Wirkstoffe mit oben genannter Bioaktivität zu identifizieren. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, diese Systeme durch das Screening von Naturstoffen mit verschiedenartiger und bekannter Bioaktivität zu validieren.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten in der Folge mittels eines validierten *High Content Screening* Systems, bioaktive Substanzen der hauseigenen Substanzbibliothek identifiziert werden. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der näheren Charakterisierung der biologischen Wirkungsweisen der durch das Screening identifizierten Substanzen.

Durch die Herangehensweise des vorwärts gerichteten chemisch genetischen Ansatzes sollten schließlich Zielproteine bioaktiver Substanzen identifiziert werden, um deren zelluläre Effekte zu verstehen. Dieses beinhaltete die Validierung der Zielproteine und die nähere Aufklärung der molekularen Interaktion zwischen Substanz und Protein mittels eines breiten methodischen Spektrums. Ferner sollten Möglichkeiten der potentiellen Nutzung solcher Substanzen als Sonden zur Aufklärung biologischer Zusammenhänge oder als Leitstruktur für die Synthese potentieller Wirkstoffe mit klinischem Nutzen erarbeitet werden.

3. Material

3.1 Zelllinien

| | |
|---------------|--|
| MDCK-F3 | MDCK (Nierenepithelzellen aus dem Hund, engl. Madin-Darby canine kidney) Zellen transformiert mit onkogenem v-H-Ras Erhalten von Prof. Oliver Müller (FH Kaiserslautern, D) |
| BSC-1 | Nierenzellen von <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze) ATCC CCL-26 |
| HeLa | Humane Gebärmutterhalskrebs-Zellen ATCC CCL-2 |
| MCF-7 | Humane Brustkrebs-Zelllinie ATCC HTB-22 |
| PC-3 | Humane Prostatakrebs-Zelllinie ATCC CRL-1435 |
| HCT116 p53+/+ | Humane p53 positive Dickdarmkrebs-Zelllinie. Erhalten von Prof. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) |
| HCT116 p53-/- | Humane p53 negative Dickdarmkrebs-Zelllinie. Erhalten von Prof. Bert Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) |

3.2 Zellkulturmedien

| <u>Zelllinie</u> | <u>Medium</u> |
|----------------------|--|
| HeLa / BSC-1 / MCF-7 | 10% FCS 1x nicht-essenzielle Aminosäuren 1x Natriumpyruvat 50 U/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin- Streptomycin-Lösung in DMEM mit 4,5 g/l Glukose Kultivierung bei 5% CO ₂ |
| MDCK-F3 | 5 % FCS 1x nicht-essenzielle Aminosäuren 1x Natriumpyruvat 50 U/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin- |

| | |
|-------------------------------|--|
| | Streptomycin-Lösung in DMEM mit 4,5 g/l Glukose Kultivierung bei 7,5% CO ₂ |
| PC-3 | 10 % FCS 1x nicht-essenzielle Aminosäuren 1x Natriumpyruvat 50 U/ml bzw. 50 µg/ml Penicillin- Streptomycin-Lösung In RPMI 1640 Kultivierung bei 5% CO ₂ |
| HCT116 p53+/+ / HCT116 p53-/- | 10% FCS 2 mM Glutamin in McCoys 5A Kultivierung bei 5% CO ₂ |

3.3 Proteinstandards, Antikörper und Fluoreszenz-Marker

3.3.1 Proteinstandards

| <u>Produktname</u> | <u>Hersteller</u> |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Precision Plus Protein Kaleidoscope | BioRad, Hercules, USA |
| Precision Plus Protein Dual Color | BioRad, Hercules, USA |

3.3.2 Antikörper

| <u>Produktname</u> | <u>Hersteller (Bestellnummer)</u> |
|---|--|
| Maus α -tubulin FITC | Sigma-Aldrich, Steinheim, D (F2168) |
| Ratte Anti α -tubulin | ABD Serotec, Düsseldorf, D (MCA77G) |
| Ziege anti Ratte Alexa Fluor [®] 488 | Cell Signalling, Denver, USA (A-21210) |
| Kaninchen Anti α -tubulin | ABcam, Cambridge, UK (AB18251) |
| Ziege anti Kaninchen Alexa Fluor [®] 488 | Cell Signalling, Denver, USA (A-11034) |
| PARP Spaltprodukt (Asp214) Antikörper | Cell Signalling, Denver, USA (9457) |

Human-spezifisch, Fluorescein Konjugat

Kaninchen anti α -Tubulin E19-R Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz,
USA (sc-12462-R)

Ziege anti CAS-C20 Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz,
USA (sc-1708)

Ziege Anti Kaninchen IgG (H+L),
Peroxidase Conjugated Thermo Scientific, Waltham, USA (31460)

Esel anti Kaninchen IgG-HRP Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz,
USA (sc-2020)

3.3.3 Fluoreszenzmarker

Marker

Hersteller

Phalloidin-TRITC Sigma-Aldrich, Steinheim, D (P1951)

DAPI, Dilactat Sigma-Aldrich, Steinheim, D (D9564)

BIS-ANS Invitrogen, Darmstadt, D (B-153)

BODIPY-FL-Vinblastin Invitrogen, Darmstadt, D (V-12390)

Colchicin Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz,
USA (SC-203005)

Propidiumiodid Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz,
USA (SC-3541)

Annexin V-PE BD Pharmingen, Heidelberg, D (559763)

7-AAD BD Pharmingen, Heidelberg, D (559763)

3.4 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden Chemikalien der Firma Fluka (Neu-Ulm, D), Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (Steinheim, D), Riedel-de-Haen (Seelze,D), Merck (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D), oder Serva (Heidelberg, D) in jeweils höchster Reinheit verwendet

| <u>Reagenz</u> | <u>Hersteller</u> |
|---|--------------------------------|
| Aminosäuren, nicht-essentiell, 100x | GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Coelestin Blau | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Coomassie Brilliant Blau G-250 | Serva, Heidelberg, D |
| Cytochalasin D | Fluka, Neu-Ulm, D |
| Dimethylsulfoxide (DMSO) | Serva, Heidelberg, D |
| DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin PAA | GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe,D |
| Ethanol absolut | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| 37 % Formaldehyd-Lösung | Roth, Karlsruhe, D |
| Fötale Kälberserum (FCS) | GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D |
| McCoy's 5A-Medium ohne L-Glutamin | GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe,D |
| Methanol absolut | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Natriumpyruvat-Lösung (100 mM) | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Nocodazol | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung | Sigma Aldrich, Steinheim, D |
| Proteinaseinhibitorcocktail | Roche, Mannheim, D |

3. Material

| | |
|--|---------------------------------------|
| Propidiumiodid | Roche, Mannheim, D |
| RNase A | Roche, Mannheim, D |
| Rinderserum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| RPMI 1640 mit stabilisiertem Glutamin | PAA, Pasching, A |
| SlimFast Schoko | Allpharm Vertriebs GmbH, Messel, D |
| Staurosporin | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Super Signal West Pico Luminol Verstärker- Lösung | Pierce, Rockford, USA |
| Super Signal West Pico Luminol Peroxid Lösung | Pierce, Rockford, USA |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg, D |
| Tween [®] 20 | Serva, Heidelberg, D |
| Trypsin-EDTA 0,05 % | GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D |
| U0126 | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Vinblastin | Sigma-Aldrich, Steinheim, D |

3.5 Puffer und Lösungen

| <u>Puffer</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|---------------------|--|
| 5x SDS-Probenpuffer | 0,3125 M Tris-HCl (pH=6,8) 10% SDS 50% Glycerin 25% 2-Mercaptoethanol 0,3 g Bromphenolblau |

3. Material

| | |
|--------------------------|---|
| 4x Sammelgel-Puffer | 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) |
| 4x Trenngel-Puffer | 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) |
| Blotpuffer | 48 mM Tris-HCl (pH 9,2) 39 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % Methanol |
| Bradford-Lösung | 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml Ethanol (95 %) lösen 100 ml Phosphorsäure (85 %) zufügen ad 1 l H ₂ O Filtrieren |
| Coelestin Blau Lösung | 5 % Eisenammoniumalaun in 50 ml H ₂ O 0,25 g Coelestin Blau zugeben; 3 min kochen abkühlen lassen, filtrieren 7 ml Glycerin zugeben |
| Coomassie-Lösung | 0,1% Coomassie Brilliant Blau 50% Methanol 10% Essigsäure |
| Formaldehyd-Fixierpuffer | 100 mM K-Pipes pH 6,8 10 mM EGTA 1 mM MgCl ₂ 0,1 % Triton X-100 3,7 % Formaldehyd |
| Histopuffer | 2 % BSA in TBS-T |
| Lysispuffer | 50 mM PIPES (pH 7,4) 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA |

3. Material

| | |
|----------------|---|
| | 0,1% NP40 0,1% Triton X-100 0,1% Tween 20 |
| PBS | 10 mM Na ₂ HPO ₄ 140 mM NaCl 3 mM KCl pH 7,4 in H ₂ O |
| PI-Färbelösung | 2.5 µg/ml Propidiumiodid, 0.5 mg/ml RNase A 0,05% Triton X-100 in PBS. |
| TBS | 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl |
| TBS-T | 0,1 % Tween 20 in TBS |
| Tubulin-Puffer | 80 mM Na-PIPES pH 6.9 1 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA |

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Zellen wurden 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurde das Medium entfernt und es folgte eine Waschung mit PBS, um Mediumrückstände zu entfernen. Durch Inkubation der Zellen mit 2-4 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min, gefolgt durch leichtes Klopfen, konnten die adhären wachsenden Zellen abgelöst werden. Daraufhin wurde diese Zellsuspension in Zellmedium aufgenommen. Für eine weitere Passagierung der Zellen wurde eine bestimmte Menge der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe, D) bestimmt. Hierbei wurde das Deckgläschen durch vorsichtigen Druck auf die Zählkammer platziert. Eine korrekte Fixierung des Deckgläschens durch die Wirkung von Adhäsionskräften wurde durch das Erscheinen von Newton'schen Ringen angezeigt. Die Zellsuspension wurde in die Kammer pipettiert und die Zählung der Zellen erfolgte per Mikroskop. Die Zellen wurden 4 mal in den 16 äußeren Quadraten ausgezählt. Nach Mittelung der Werte konnte die Zellzahl durch Multiplikation mit dem Faktor 10⁴ (Zellen/ml) bestimmt werden.

4.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert,. Konfluente Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und in 20 ml Medium aufgenommen und vereinzelt. Nach Quantifizierung der Zellen wurde das Zellmedium durch Zentrifugation (5 Min bei 1500 rpm) von den Zellen getrennt. Das Zellsediment wurde in spezifisches Zellmedium ohne Selektionsantibiotika mit einem 10% DMSO-Zusatz resuspendiert. Hierbei richtete sich das Volumen des Zellmediums an die errechnete Gesamtzellzahl. Schließlich sollte die Konzentration an Zellen 5 x 10⁶ Zellen/ml betragen. Hiervon wurden 200 µl Aliquots in vorbereitete Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in der Folge in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierhilfe (Nalgene, Rochester, USA) platziert. Dadurch erfolgte innerhalb von 24 h bei -80°C eine langsame Reduktion der Temperatur von 1°C/min. Die Langzeitlagerung dieser Zellen wurde in flüssigem Stickstoff vollzogen.

4.1.4 Auftauen von Zellen

Nach Entnahme eines Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde dieses in ein Wasserbad bei 37°C platziert, um eine zügige Aufwärmung zu physiologischer Temperatur zu ermöglichen. Sofort wurde das Aliquot in eine mit erwärmtem Medium gefüllte Zellkulturflasche gegeben. Nach Inkubation der Zellen für 24 h wurde das DMSO enthaltende Kryomedium entfernt und das zelltyp-spezifische Kultur-Medium hinzugefügt.

4.1.5 Isotopenmarkierung von HeLa Zellen mittels SILAC

Die SILAC-Markierung des Proteoms von HeLa Zellen mit schweren Isotopen (*heavy*) und leichten Isotopen von Arginin und Lysin wurde mittels des DMEM-Flex Media Kits (Invitrogen, Karlsruhe, D) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zunächst wurden die konfluenten HeLa Zellen nach PBS-Waschung durch die Hinzugabe von Trypsin-EDTA-Lösung trypsinisiert. Nachfolgend wurden jeweils 5×10^4 HeLa Zellen in zwei Zellkulturschalen mit DMEM-Flex Medium und zusätzlichem L-Arginin $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ und L-Lysin $^{13}\text{C}_6$ für den *heavy*-Ansatz oder mit zusätzlichem isotopeleichten Arginin und Lysin für den *light*-Ansatz überführt. Nach 3 Tagen wurde dieses Medium erneuert. Die gesamte Inkubationszeit mit dem Medium für 6 Tage erlaubte aufgrund einer Teilungsrate von HeLa-Zellen um die 24h den praktisch kompletten Einbau der Aminosäuren in das Proteom der HeLa Zellen. Es folgte die Herstellung der Proteinextrakte mittels SILAC markierten HeLa Zellen (siehe 4.2.3) für die nachfolgende SILAC basierte Affinitätschromatografie (siehe 4.2.5)

4.1.6 Etablierung einer Taxol resistenten HeLa-Zelllinie

Es wurde ein Selektionsansatz gewählt, um die Anzucht einer Taxol resistenten HeLa-Zelllinie (*HeLa-Txl*) zu ermöglichen. Dazu wurden HeLa-Zellen in HeLa-Zellmedium bei 7,5% CO₂ und 37°C kultiviert. Es folgte für 72 h eine Behandlung mit Selektionsmedium 1, welches 50 nM Taxol enthielt. Die resistente Population wurde daraufhin für 4 Wochen in HeLa-Txl Selektionsmedium 2, behandelt und kultiviert. Hierbei wurde nach jeder Passage im Schnelltest die Vitalität der Zellen mittels des Trypan Blau-Tests (siehe 4.14) ermittelt. Bei jedem Test zeigte sich eine Überlebensrate von mindestens 80% der Zellen. Die auf diese Weise erhaltene HeLa-Txl Zelllinie wurde in HeLa-Txl Medium kultiviert.

4.1.7 Fixierung von Zellen

4.1.7.1 Formaldehyd-Fixierung

Die Fixierung von Zellen mit Formaldehyd wurde für Testansätze im 96- und 384-Lochplattenformat ebenso wie für auf Deckgläschen ausgesäte Zellen durchgeführt. Dieses geschah im Falle der gleichzeitigen Markierung von Aktinfilamenten, MT und DNA in den Zellen, da eine Methanol-Fixierung die Phalloidin-Bindungsstelle von F-Aktin zerstört und die Visualisierung durch Phalloidin-TRITC verhindert hätte [153,154]. Hierfür wurde das Zellmedium abgenommen und die Zellen für 20 min mit Formaldehyd-Fixierpuffer behandelt. Es folgte eine dreimalige Waschung mit TBS-T. Diese Schritte wurden im 96- und 384-Plattenformat mit Hilfe des Immuno™ Washers (Nunc, D) durchgeführt. Die Multiwellplatten und Deckgläschen wurden in TBS bei 4°C für die nachfolgende Färbung gelagert.

4.1.7.2 Methanol-Fixierung

Durch die Methanol-Fixierung wurde die Bildqualität bei der mikroskopischen Analyse der MTs optimiert. Nach Entfernen des Zellmediums von den Deckgläschen wurde 100% eiskaltes Methanol hinzugefügt und die Zellen für 10 min bei -20°C fixiert. Es folgte eine dreifache Waschung mit TBS-T. Diese Schritte wurden im 96- und 384-Plattenformat mit Hilfe des Immuno™ Washers (Nunc, D) durchgeführt. Die Lagerung der Deckgläschen erfolgte bis zur Anfärbung in TBS bei 4°C.

4.1.7.3 Ethanol-Fixierung für die FACS-Analysen

Als Vorbereitung für die Propidiumiodid-Anfärbung der zellulären DNA für die FACS-Analysen (siehe 4.1.11) wurden die Zellen mit Ethanol in ein 15 ml Röhrchen überführt, um mitotische und apoptotische Zellen nicht zu verwerfen. Die Ablösung der Zellen von der Lochplatte geschah durch Trypsin/EDTA-Lösung für 5 Minuten. Danach erfolgte eine Waschung der Zellen mit PBS sowie die Überführung der Suspension in das Röhrchen. Danach wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren. Das Sediment wurde in 1 ml PBS vollständig resuspendiert. Unter vorsichtigem Schütteln wurden 2,5 ml 100% eiskaltes Ethanol hinzugefügt. Die auf diese Weise in ca. 70% EtOH fixierten Zellen waren für mehrere Monate bei einer Aufbewahrung bei -20°C haltbar und wurden am Tag der Messungen mit Propidiumiodid angefärbt.

4.1.8 Färbungen zellulärer Bestandteile

4.1.8.1 Fluoreszenzfärbung des Zytoskelettes und der DNA

Die Markierung der Aktinfilamente erfolgte standardmäßig mit Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate (TRITC) gekoppelten Phalloidin und die DNA wurde mit dem DNA-Interkalator 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Die Markierung von α Tubulin wurde auf zwei verschiedene Methoden durchgeführt: a) direkte Detektion über fluoreszenzmarkierten Antikörper, b) indirekte Detektion über Sekundärantikörpersystem.

Um unspezifische Bindestellen abzusättigen, wurden die fixierten Zellen für 1h mit 2% BSA enthaltenden Histopuffer inkubiert. Nach dem Entfernen des Puffers wurden die Zellstrukturen mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe markiert: Bei a) erfolgte die Färbung mit DAPI, anti α -Tubulin-FITC-Antikörper und Phalloidin-TRITC in Histopuffer für 1h in einem Schritt. Für eine indirekte Detektion von α -Tubulin nach b) erfolgte zunächst das Hinzufügen des α -Tubulin Antikörpers in Histopuffer für 1h. Daraufhin wurden DAPI, Phalloidin-TRITC und der entsprechende Alexa-Fluor[®] Sekundärantikörper für die α -Tubulin-Detektion für 1h in Histopuffer zu den Zellen hinzugefügt. Die einzelnen Verdünnungen der Fluoreszenzmarker sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Inkubation mit den Fluoreszenz-markierten Proben wurde stets im Dunkeln durchgeführt. Nach einer dreifachen Waschung mit TBS-T wurden die Proben bei 4°C in TBS gelagert.

Tabelle 1. Verdünnungen der Fluoreszenzmarker

| Fluoreszenzmarker | Verdünnung |
|--|------------|
| Phalloidin-TRITC | 1:1000 |
| DAPI | 1:10000 |
| Ratte anti α -tubulin-FITC | 1:500 |
| Ratte anti α -tubulin | 1:2000 |
| Kaninchen anti α -tubulin | 1:300 |
| Ziege anti Ratte AlexaFluor 488 [®] | 1:500 |
| Ziege anti Kaninchen AlexaFluor 488 [®] | 1:500 |

4.1.8.2 Coelestin Blau-Färbung

Coelestin-Blau färbt Zellen unspezifisch, wodurch sich das Kontrastverhältnis für eine mikroskopische Analyse der Zellmorphologie verbessern lässt. Die Coelestin-Blau-Lösung wurde hergestellt, indem eine Lösung aus 5% Ammonium-Eisensulfat-Dodecahydrid (Ammonium-Eisen-Alaun) und 0,25 g Coelestin Blau für 5 Minuten unter Rühren zum Kochen gebracht wurden. Das Gemisch wurde daraufhin filtriert und es wurde 7% Glycerol hinzugefügt. Auf Mehrloch-Platten fixierte MDCK-F3-Zellen wurden für 2 min mit der Färbelösung inkubiert. Durch eine fünfminütige doppelte Waschung mit 70% EtOH wurden die Zellen bis zum gewünschten Grad entfärbt. Nach einer weiteren Waschung der Zellen mit TBS-T erfolgte die Lagerung der Proben in TBS bei 4°C.

4.1.8.3 Fluoreszenzfärbung von PARP1

Für mikroskopische Untersuchungen zur Apoptose wurde zelluläres PARP1 Protein [155-157] fluoreszenzmarkiert. Nach Fixierung der Zellen mit Formaldehyd wurden die Testansätze zunächst für 1h mit 2% Histopuffer zur Blockierung unspezifischer Bindestellen inkubiert. Zur Anfärbung von PARP1 in Zellen wurde ein Fluorescein gekoppelter Antikörper verwendet. Der Antikörper wurde 1:100 in Histopuffer verdünnt und mit den Zellen über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer doppelten Waschung für jeweils 5 min mit TBS-T erfolgte die Lagerung der Ansätze in TBS bei 4°C.

4.1.9 Phänotypischer Screen in BSC-1 und HeLa Zellen

Zur Identifikation potentieller antimittotischer oder Zytoskelett modulierender Substanzen mittels eines phänotypischen Screens wurden mit einer Ausnahme BSC-1 Zellen verwendet. Im Screening Format von 96-Lochplatten (96 WELL, PS, F-Boden (Kaminform), µCLEAR, High Binding; 655097; Greiner, Solingen, D) wurde pro Kavität 200 µl Zellsuspension appliziert. Bei der Verwendung von 384-Lochplatten (384WL, FB,BLK/CLR Thick BTM; 3985; Corning, Schiphol-Rijk, NL) waren es 50 µl. Tabelle 2 zeigt die hierfür verwendeten Zellzahlen der jeweiligen Zelllinien.

Tabelle 2. Verwendete Zellzahlen des BSC-1 / HeLa Zytoskelett Screens

| Zelllinie | 96 Lochplatte (Zellen / Kavität) | 384 Lochplatte (Zellen / Kavität) |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| BSC-1 | 3000 | 700 |
| HeLa | 8000 | X |

Die Zellen wurden in das jeweilige Plattenformat ausgesät und 24 Stunden kultiviert. Es folgte die Applikation der Testsubstanzen, wobei jede Substanz inklusive der Kontrollen Nocodazol, Cytochalasin und DMSO in Vierfachbestimmung auf die Platte appliziert wurde. Die Applikation der Substanzen in 384-Lochplatten geschah mit Hilfe des Pipettierroboters (siehe 4.3). Im Gegensatz dazu verlief die Substanzapplikation im 96-Lochplattenformat manuell. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 18-20 h mit den Testsubstanzen inkubiert und danach mit Formaldehyd fixiert (siehe 4.1.7.1). Bestandteile des Zytoskelettes und die DNA wurden für die Mikroskopie visualisiert (siehe 4.1.8.1). Die mikroskopische Auswertung erfolgte auf mit dem automatisierten Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss) (siehe 4.1.11.)

4.1.10 MDCK-F3 Rücktransformationsassay

Dieser Assay wurde im Screening-Format auf 96 Lochplatten (96 WELL, PS, F-Boden (Kaminform), μ CLEAR, High Binding; 655097; Greiner, Solingen, D) und 384-Lochplatten (384WL, FB, BLK/CLR, Corning CellBIND surface; 3683; Corning, Schiphol-Rijk, NL)[®] durchgeführt. Pro Kavität wurden in einer 96-Lochplatte 3×10^3 Zellen in 200 μ l Medium bzw. in einer 384-Lochplatte 700 Zellen in 50 μ l Medium ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte die Applikation der Testsubstanzen, der Positivkontrolle U0126 (20 μ M) sowie der Negativkontrolle DMSO. Jede Testsubstanz wurde in Vierfachbestimmung auf die Mikrotiterplatte appliziert. Die Applikation der Substanzen in 384-Lochplatten geschah mit Hilfe des Pipettierroboters (siehe 4.2.13). In 96-Lochplatten wurden die Substanzen hingegen manuell appliziert. Die Zellen wurden daraufhin für 20 h bei 37°C und 7,5 % CO₂ inkubiert, anschließend mit Formaldehyd fixiert (siehe 4.1.7.1) und mit Coelestin-Blau-Färbung visualisiert (siehe 4.1.8.2). Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem automatisierten Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss) (siehe 4.1.11).

4.1.11 Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie auf Mikrotiterplatten

Die Aufnahme der Bilddaten für zelluläre Testsysteme im 96- und 384-Lochplattenformat wurden mit dem automatisierten Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Jena) in Verbindung mit der Software Metamorph (Molecular Devices, Downingtown, USA) durchgeführt. Die Aufnahmen der Bilder erfolgten mit einer CoolSnap ES Kamera (Roper Scientific Photometrics, Tucson, USA). Das automatisierte System wurde von der Firma Visitron Systems GmbH (Puchheim, Deutschland) bezogen. Das System erlaubt die automatisierte Aufnahme von Bildern in verschiedenen Mikrotiterplatten-Formaten zu unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen. Als Grundeinstellung für alle Anwendungen wurde in der

MetaMorph Software das Programm „SaschaMTAssayabsviertes“ verwendet. Zusammenfassend konnte dieses Programm für die automatische Aufnahme der Bilddaten des BSC-1 Phänotyp-Assays im 384-Lochplattenformat verwendet werden. Durch einfache Variation des Programmes war eine Anpassung auf jedes Plattenformat sowohl für die Fluoreszenzmikroskopie als auch für die Phasenkontrastmikroskopie im Zuge des MDCK-F3 Phänotyp-Assays möglich. Die Bilddaten zur Bestimmung der PARP1-Aktivität wurden manuell aufgenommen.

4.1.12 Durchflusszytometrische Ermittlung des DNA-Gehalts

Um die Wirkung von Substanzen auf den eukaryotischen Zellzyklus zu ermitteln, wurden FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)- Analysen durchgeführt. Für diese Experimente wurden diverse Zelllinien benutzt und jeweils 2×10^5 Zellen in jede Kavität einer 12-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Testsubstanzen einschließlich der Positivkontrolle Nocodazol und der Negativkontrolle DMSO appliziert. Eine Kavität pro Ansatz wurde nicht behandelt und stellte im späteren experimentellen Verlauf die Referenzprobe. Nach 20 h erfolgte die Ablösung der DMSO Zellen von der 12-Lochplatte durch Trypsinisierung. Nach anschließender Ethanolfixierung (siehe 4.1.7.3) erfolgte die Propidiumiodid (PI)-Färbung der Zellen. Der Fluoreszenzfarbstoff PI interkaliert in der DNA [158]. Aufgrund der Fluoreszenzintensität pro Zelle können Rückschlüsse auf ihren DNA-Gehalt gezogen werden. Nach Vorbereitung der RNase A-haltigen PI-Färbelösung wurden die in 70% EtOH fixierten und gelagerten Zellen nach Resuspension bei 1500 rpm für 5 Minuten vollständig vom EtOH getrennt. Es folgte das Hinzufügen der Färbelösung zu den Proben. Hierbei wurde die unbehandelte Referenzprobe nicht gefärbt, sondern ausschließlich mit 0,05% Triton-X-100 in PBS versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei RT im Dunkeln wurden 3 ml PBS hinzugefügt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Nach Entfernung der verdünnten Färbelösung wurde das Zellsediment in 500 µl PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen für die Zellzyklus-Analyse überführt. Es wurden 10.000 Zellen pro Probe im BD LSRII analyzer (BD Bioscience, Heidelberg, D) anhand der Intensität ihrer PI-Färbung sortiert und mit der Software BD FACS Diva v5.0.3 (BD Bioscience, Heidelberg, D) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo v. 7.2.4 (Tree Star Inc., Ashland, USA).

4.1.13 Durchflusszytometrische Ermittlung der Apoptose

Zur Ermittlung einer etwaig eingeleiteten apoptotischen Zellantwort wurde die in apoptotischen Zellen aufgehobene Membran-Asymmetrie ausgenutzt. Das ausschließlich in apoptotischen Zellen an der Außenseite der Plasmamembran

vorkommende Phosphatidylserin (PS) kann durch die Bindung an das Protein Annexin V detektiert werden (Abbildung 8).

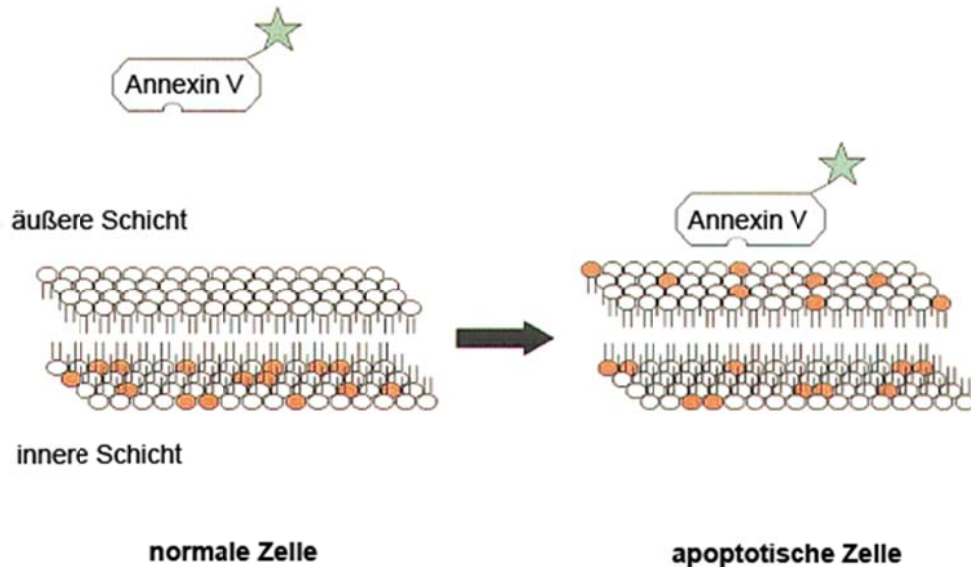


Abbildung 8: Die Bindung von Annexin V an die eukaryotische Zellmembran als Marker für die Apoptose (verändert nach van Engeland et al. [159]). Dargestellt ist die Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran, wobei PS braun ist.

Pro Testansatz wurden 2×10^5 HeLa Zellen in 1 ml Zellmedium in die Vertiefung einer 12 Lochplatte ausgesät. Nach 24h erfolgte die Applikation der Testsubstanzen. Hierbei wurde der Kinase-Inhibitor Staurosporin in einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ als Positivkontrolle verwendet [160,161]. Dabei dienten mit DMSO behandelte Zellen als Negativkontrolle. Nach 20h Inkubation wurden die Proben prozessiert. Nach Entnahme des Zellmediums und einmaliger Waschung mit PBS wurden die Zellen der Testansätze durch Hinzugabe von $200 \mu\text{l}$ Trypsin/EDTA-Lösung von dem Boden der 12-Lochplatte abgelöst. Die Zellen wurden zur Unterscheidung der Apoptose-Stadien mit Annexin V PE (Annexin-Phycoerithrin) und 7-AAD gefärbt. Hierfür wurde das PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, Heidelberg, D) verwendet und die Proben exakt nach Herstellerangaben für die zytometrische Analyse vorbereitet. Durchflusszytometrisch wurden 10.000 Zellen pro Probe im BD LSRII analyzer (BD Bioscience, Heidelberg, D) anhand der Intensität ihrer Annexin-PE und 7-AAD-Färbung sortiert und mit der Software BD FACS Diva v5.0.3 (BD Bioscience, Heidelberg, D) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo v. 7.2.4 (Tree Star Inc., Ashland, USA). Zur quantitativen Abgrenzung wurden dort die Quadranten der Tochterpopulationen Annexin-PE bzw. 7-AAD gefärbter Zellen definiert, wodurch die relative quantitative Ermittlung von früh apoptotischen zu spät apoptotischen oder gesunden Zellen möglich war.

4.1.14 Ermittlung der Zellproliferation mittels WST-1 Reagenz

Mittels des WST-1-Zellproliferationstests wurde die Proliferationsrate eukaryotischer Zellen bestimmt. Für den WST-1 Test wurden die verwendeten Zellen auf durchsichtigen 96-Lochplatten in 100 µl Zellmedium ausgesät, wobei zur Bestimmung eines Hintergrundwertes vier Kavitäten ausschließlich mit Zellmedium gefüllt wurden. Das Zellmedium wurde nach Ablauf von 24h entfernt und die Testsubstanzen ebenso wie ein Kontrollansatz mit DMSO vierfach in 100 µl Zellmedium appliziert. Die für die jeweiligen Tests ausgesäten Zellzahlen und Inkubationsdauern mit den Testsubstanzen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3. Die Bedingungen für die WST-1 Proliferationstests in den jeweiligen Studien. Die ausgesäte Zellzahl orientierte sich primär an der Inkubationsdauer mit den Testsubstanzen

| Zelllinie | Zweck des Tests | Dauer der Inkubation | Anzahl der eingesetzten Zellen pro Vertiefung |
|-----------|--|----------------------|---|
| HeLa | Untersuchung von Coreanosid F1 und Maistemonin | 24h | 20.000 |
| HeLa | Untersuchung von Podoverin A | 48h | 10.000 |
| HeLa | Untersuchung von Tubulexin A | 72h | 1.000 |
| HeLa-Txl | Untersuchung von Tubulexin A | 72h | 1.000 |

Nach der Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen wurden 10 µl des WST-1 Reagenzes zu den Ansätzen hinzugegeben und diese für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde im Plattenlesegerät bei 450 nm ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2000 (MS Excel 2000, Microsoft Corp., Seattle, USA) und OriginLabs Origin v. 7.0 (Northampton, USA). Von den gemittelten Werten wurde der Mittelwert der Leerprobe abgezogen. Die Messwerte des Kontrollansatzes mit DMSO wurden auf den Wert 1 normalisiert. Die Werte der

Messproben wurden zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt und beschreiben somit ein Vielfaches des DMSO-Wertes.

4.1.15 Bestimmung der Zellvitalität und –proliferation mit Trypan Blau

Die Trypan Blau-Färbung wurde verwendet, um die Vitalität von Zellen eines Testansatzes zu quantifizieren. Der Farbstoff Trypan Blau ist nicht zellpermeabel, somit werden vitale und früh apoptotische Zellen nicht gefärbt. 10^5 HeLa Zellen wurden pro Kavität in 2 ml Medium auf 12 Lochplatten ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen mit der Testsubstanz oder DMSO in einer Vierfachbestimmung jeweils für weitere 24h inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen von der Oberfläche der 12 Lochplatte durch Trypsinisierung abgelöst und in 1 ml PBS überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei $100 \times g$ erfolgte die Sedimentierung der Zellen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml PBS resuspendiert. 400 μ l dieser Suspension wurden im Verhältnis 1:1 mit 0,4% Trypan Blau (Invitrogen, Karlsruhe, D) für 3 bis 5 min inkubiert. Danach folgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie auch der Anzahl der Trypan Blau negativen Zellen mit einer Neubauer Zählkammer. Die Gesamtzellzahl und Vitalität der mit DMSO behandelten Zellen wurde jeweils auf den Wert 1 normalisiert. Hierzu wurden die entsprechenden Werte der Messprobe ins Verhältnis gesetzt. Somit ergab die relative Menge der gesamten Zellen einer Messprobe in Bezug auf DMSO behandelten Zellen die Proliferationsrate, wohingegen die relative Zahl ungefärbter Zellen den Einfluss der Substanz auf die Vitalität der Zellen anzeigte.

4.1.16 Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität

Zur Bestimmung der Menge apoptotischer Zellen eines Testansatzes wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 bestimmt. Das ApoONE® Homogenous Caspase 3/7 System (Promega, Mannheim D) erlaubt die Bestimmung von Caspase 3- und Caspase 7-Aktivitäten. Dieses System beinhaltet einen Puffer, der eine effiziente Permeabilisierung der Zellen und optimale Bedingungen für die Enzymaktivität ermöglicht. Rhodamin 110, *bis*-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-asparaginsäureamid; Z-DEVD-R110) dient hierbei als profluoreszentes Peptidsubstrat. Die Caspasen spalten das DEVD Peptid von Rhodamin 110 ab und erhöhen die Fluoreszenz des Rhodamin 110 Restes bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 520 nm. Dabei verhalten sich die Aktivitäten der Caspasen direkt proportional zum Anstieg der Fluoreszenzintensität. In diesem Testsystem wurden 10^4 HeLa Zellen in 100 μ l Zellmedium auf eine schwarze 96-Lochplatte mit durchsichtigem Boden (96 WELL, PS, F-Boden (Kaminform), μ CLEAR, High Binding; 655097; Greiner, Solingen, D) ausgesät. In vier

Vertiefungen der Platte wurden zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz nur 100 μ l Medium ohne Zellen pipettiert. Nach 24 h erfolgte die Applikation der Testsubstanzen in Vierfachbestimmung. Als Kontrollsubstanzen wurden DMSO und der bekannte Kinase Inhibitor Staurosporin [160,161] verwendet. 24 h später wurden 100 μ l vorbereitetes Substrat pro Vertiefung nach Angaben des Herstellers appliziert und die Platte für 2h im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Plattenlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emission bei 520 nm. Nachdem die gemittelten Werte des Kontrollansatzes mit DMSO auf den Wert 1 normalisiert wurden, konnten die Fluoreszenzwerte der Messproben zu diesem Wert ins Verhältnis gesetzt werden. Somit beschreiben die Werte ein Vielfaches des DMSO-Wertes.

4.1.17 Nachweis des PARP1 Spaltproduktes

Für die Detektion von gespaltenen PARP1 als Apoptosemarker wurden pro Testansatz 10^5 HeLa Zellen in 1 ml Zellmedium in die Kavität einer durchsichtigen 24-Lochplatte überführt. Nach 24 h erfolgte die Applikation der Testsubstanzen und der Kontrollsubstanzen DMSO und Staurosporin (1 μ M). Nach weiteren 24h erfolgte die Fixierung der Zellen mit Formaldehyd (siehe 4.1.7.1) und die mikroskopische Detektion des PARP1-Spaltproduktes (siehe 4.1.8.3). Die mikroskopische Auswertung erfolgte manuell mit dem Zeiss Axiovert M200-Mikroskop (4.1.11). Hierbei wurden Phasekontrastaufnahmen der Zellen den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen PARP1 Spaltprodukt markierter Zellen gegenübergestellt, um das Verhältnis der Gesamtzellzahl zu der Zahl apoptotischer Zellen zu visualisieren.

4.1.18 Mikrotubuli Repolymerisation in BSC-1 Zellen

Der Boden einer Gewebekulturschale (15 cm Durchmesser, Becton Dickinson, Heidelberg, D) wurde komplett mit Deckgläschen (13 mm Durchmesser, Sarstedt, Nümbrecht, D) bedeckt. Hierauf wurden 9×10^4 BSC-1 Zellen in 6 ml Medium ausgesät für 24 h im Brutschrank inkubiert. Es folgte die Applikation der Testsubstanzen für 20 h, wobei ein weiterer Ansatz mit DMSO behandelt wurde. Die Gewebekulturschalen wurden daraufhin für 30-60 min bei ca. 4°C auf Eis inkubiert, um das MT-Zytoskelett vollständig zu depolymerisieren. Die Repolymerisation der MT erfolgte bei 37°C für verschiedene Zeitspannen. Pro Zeitpunkt wurde ein Deckgläschen rasch aus der Gewebekulturschale entnommen und zur Fixierung in eine mit eiskaltem Methanol gefüllte 24-Lochplatte überführt. Als Kontrolle vollständiger MT-Depolymerisation wurde ein Deckgläschen pro Ansatz direkt nach Inkubation auf Eis fixiert. Nach Fixierung der Zellen wurden DNA und α Tubulin für die Fluoreszenzmikroskopie angefärbt. Die Deckgläschen wurden mit Aqua

Poly/Mount (Polysciences, Warrington, USA) auf Objektträgern (76/26 geschliffen, Diagonal, Münster, D) fixiert und für 24 h getrocknet. Zur mikroskopischen Auswertung wurde das Axiovert Observer Z1 Mikroskop (Zeiss, Jena, D) verwendet.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 p53/MDM2 enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Zur Etablierung eines Testsystems für die Identifikation möglicher Inhibitoren der p53/MDM2 Proteininteraktion wurde ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) etabliert. Hierfür notwendige Proteine und Chemikalien waren in einem Kit erhältlich (ImmunoSet™ p53/MDM2 complex ELISA development set, Assay Designs, San Diego, USA). Das Prinzip dieses Tests ist in nachfolgender Abbildung 9 dargestellt.

Die Messung einer Standardreihe wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Die Testung der Wirkstoffe erfolgte, indem zunächst der p53 Antikörper über Nacht auf eine 96-Lochplatte (96-well high-binding polystyrene microtiter plate, Assay Designs, San Diego, USA) gebunden wurde. Nach der Präinkubation von 0,32 µg/ml MDM2 mit den Testsubstanzen bei RT für 30 min wurde der vorgeformte Komplex von p53 (1µg/ml) und MDM2 (0,32 µg/ml) im für 1 h bei RT gebildet. Es folgte die Verdünnung des Komplexes auf die in der Standardkurve ermittelte optimale p53-Konzentration von 12,5 ng/µl und die Hinzugabe der Testsubstanzen in Vierfachbestimmung. Pro Ansatz wurden jeweils 100 µl in eine Kavität der 96-Lochplatte überführt. Die Detektion des Komplexes wurde nach Herstellerangaben wie hier zusammenfassend beschrieben durchgeführt: Durch Hinzufügen des biotinylierten MDM2-Antikörpers zur Detektion des gebundenen Komplexes erfolgte die Bindung einer Streptavidin-assoziierten Peroxidase, welche die Umsetzung des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Substrates (Assay Designs, San Diego, USA) ermöglichte. Die Reaktion wurde mit 1N HCl abgestoppt woraufhin die Ermittlung der Absorption bei 450 nm mit dem Plattenleser erfolgte.

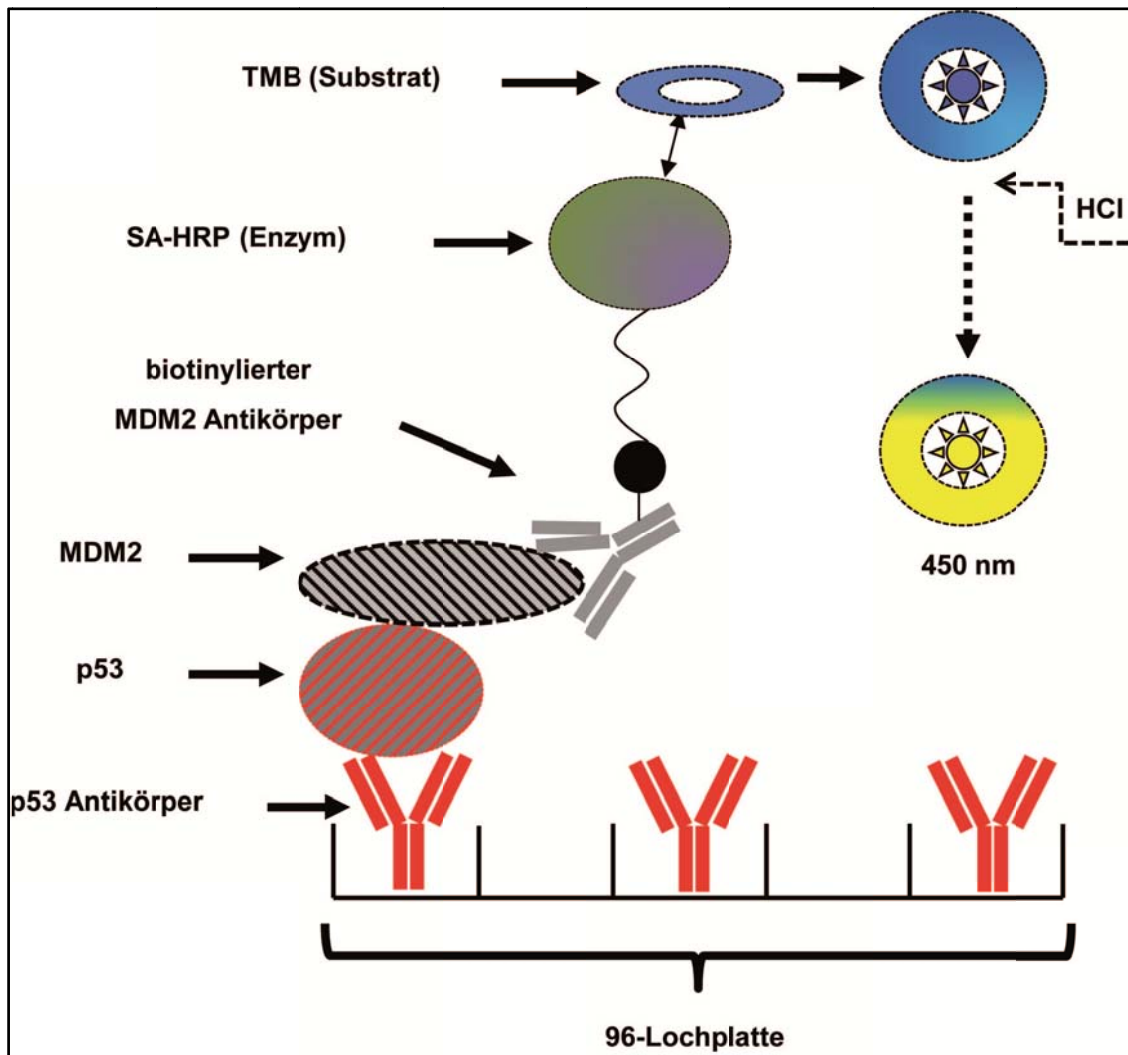


Abbildung 9: Prinzip des ELISA-Assays. Der p53 Antikörper wird auf einer 96-Lochplatte immobilisiert. Nach Bindung des unter Anwesenheit der Testsubstanzen oder DMSO gebildeten p53/MDM2-Proteinkomplexes erfolgt die Detektion mittels eines biotinylierten MDM2 Antikörpers, an dem eine Streptavidin-assoziierte Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP) bindet. Dieses Enzym setzt 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Reaktionsprodukt um. Hinzugabe von HCl stoppt die Reaktion und setzt das Produkt in einen stabilen Komplex um, der bei 450 nm detektiert ist. Somit ist eine Quantifizierung des p53/MDM2-Komplexes möglich.

4.2.2 *In vitro* Tubulin-Polymerisationsassay

Zur Testung einer direkten modulierenden Wirkung von Testsubstanzen auf die $\alpha\beta$ Tubulin-Polymerisation wurde ein *in vitro* Tubulin-Polymerisationsassay durchgeführt. Unter geeigneten Pufferbedingungen lässt sich nach Zugabe von GTP die Polymerisationsrate durch eine Trübungsmessung bei 340 nm zeitabhängig bestimmen [162]. Dafür wurden zwei leicht unterschiedliche Methoden angewandt:

Methode 1 (Arbeitsgruppe Prof. Thomas Mayer, Universität Konstanz)

Tubulin wurde aus Schweinehirn, wie von Castoldi & Popov beschrieben isoliert [163], wobei ein zusätzlicher dritter Polymerisations /

Depolymerisationszyklus durchgeführt wurde. Die *in vitro* Tubulin-Polymerisation wurde in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen (6,25 bis 50 μM) oder DMSO und Nocodazol als Kontrollen ermittelt. Hierfür wurden 10 μM Tubulin und die Substanzen mit 0,8 μM Glutamat und 0,1 mM MgCl_2 bei 30°C für 15 min inkubiert. Die Polymerisation wurde durch die Hinzugabe von 0,4 mM GTP zu einem Gesamtansatz von 150 μl induziert. Die Absorptionsmessung in Quarzküvetten (105.200; Hellma, Müllheim, D) erfolgte bei 340 nm in dem Cary 100Bio spectrometer, (Varian, Darmstadt Germany). Das Signal wurde alle 24 s detektiert. Die Auswertung der Messung erfolgte in grafischer Form, indem die die Absorptionzunahme gegen die Zeit aufgetragen wurde.

Methode 2:

Aus Schweinehirn aufgereinigtes, lyophilisiertes Tubulin (Cytoskeleton, Denver, USA) wurde in Tubulin-Puffer zu einer 100 μM Lösung resuspendiert. Aliquots wurden schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Der Polymerisationsansatz wurde bei 4°C angesetzt und enthielt 10 μM Tubulin, 1mM MgCl_2 und 0,8 M Glutamat in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen. Die Kontrollansätze enthielten DMSO oder 0,5 μM Nocodazol. Dieser Ansatz wurde nach Banerjee et al. für 20 min bei 30°C inkubiert [164]. Die Messproben wurden in Kavitäten einer durchsichtigen 96-Lochplatte (Microplatte, 96 Well, Half Area, Transparent, Fester Boden, Greiner, Solingen, D) überführt. Daraufhin wurden die Proben bei 4°C für 5 min abgekühlt, was nach der folgenden Hinzugabe von 0,5 mM GTP den Start der Polymerisation verlangsamte. Die Trübungsmessung wurde bei 340 nm im Plattenleser bei 30°C durchgeführt. Es wurde für 60 min gemessen, wobei alle 30 s ein neuer Messpunkt aufgenommen wurde. Die Auswertung erfolgte in graphischer Form bei Auftragung der Absorption bei 340 nm gegen die Zeit.

4.2.3 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden HeLa Zellen und mittels SILAC markierte HeLa Zellen ausgesät. Nach dem Erreichen von 80%iger Konfluenz wurden die Zellen nach der Waschung mit PBS durch Trypsin-EDTA von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Nach der Aufnahme der Zellen in 20 ml Medium wurde die Zellsuspension in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation für 5 min bei 100 g sedimentiert. Das Sediment wurde zweimal mit PBS gewaschen und es

erfolgte die Hinzugabe von 1 ml Lysispuffer sowie das Überführen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Die Zelllyse erfolgte bei 4°C unter gelegentlichem und vorsichtigem Schütteln. Danach wurde 20 min bei 15.000 g zur Abtrennung der nicht löslichen Zellfragmente von den im Überstand enthaltenen Proteinen zentrifugiert. Die Lagerung des Proteinextrakts erfolgte bis zur Verwendung bei -20°C, wobei ein Aliquot für die nachfolgende Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet wurde (siehe 4.2.4)

4.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zunächst wurde eine Eichgerade mit Hilfe einer BSA-Konzentrationsreihe erstellt. Zu der Bradford-Lösung wurden die Proteinlösung pipettiert. Die Proben wurden dreimal invertiert und ruhten für 10 min bei RT. Daraufhin wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenzprobe gemessen. Die den Extinktionswerten entsprechenden Proteinkonzentrationen wurden mithilfe der bestimmten Eichgeraden berechnet.

4.2.5 Affinitätsaufreinigung potentieller Zielproteine mittels biotinylierter Derivate

0,5 ml (4 mg/ml) einer Suspension von magnetischen Streptavidinpartikel (streptavidin magnetic beads, S1420S, New England Biolabs, Ipswich, USA) wurden mit 0,5 ml einer 10 µM Lösung der biotinylierten Testsubstanz in PBS für 30 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen des PBS erfolgte eine Inkubation für 30 min mit 0,5 ml einer in PBS gelösten 10 µM Lösung der biotinylierten Substanz, worauf sich eine zweimalige Waschung mit je 0,5 ml PBS anschloss.

Die Affinitätsaufreinigung geschah zur Identifikation (siehe 4.2.5.1) und Validierung (siehe 4.2.5.2) potentieller Zielproteine unter Verwendung von Hela Proteinextrakten (20 µg) bei 4°C für 1 h.

4.2.5.1 SILAC basierte komparative Affinitätsaufreinigung

Es wurden zwei Messreihen bestehend aus jeweils zwei Experimenten durchgeführt. Hierfür wurden SILAC markierte Proteinextrakte verwendet (siehe 4.1.5 und 4.2.3) verwendet. In der ersten Messreihe wurde die Affinitätssonde **1** des aktiven THPs Tubulexin A mit *heavy* markiertem Proteinextrakt und die inaktive Molekülsonde **2** mit *light* Proteinextrakt inkubiert. Diese Kombination wurde in der zweiten Messreihe umgekehrt: Hier wurde Sonde **1** mit *light* und Sonde **2** mit *heavy* Proteinextrakt behandelt. Danach folgte eine zweimalige Waschung mit 75 mM MgCl₂ zugesetztem Lysispuffer (ohne 2-Mercapto-EtOH) und eine doppelte Waschung mit PBS. Diese Schritte wurden jeweils für 10 min bei 4°C durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden nach der Hinzugabe von 5x SDS Probenpuffer bei 95°C für 10 min durch

Kochen von den Streptavidinpartikeln abgelöst. Zur nachfolgenden relativen Quantifizierung wurden jeweils 15 µl der *heavy* und *light* Proteinproben vereinigt. Die weitere Prozessierung erfolgte, wie in den Kapiteln 4.2.6 und 4.2.7 beschrieben.

4.2.5.2 Validierung der potentieller Zielproteine mittels Immunodetektion

Zur Validierung der Bindung biotinylierter Substanz an ein Zielprotein wurde sowohl für die aktive Sonde **1** als auch für das inaktive Kontrollmolekül **2** HeLa Proteinextrakt verwendet.

Nach der Inkubation mit dem Proteinextrakt erfolgte eine zweimalige Waschung mit 75 mM MgCl₂-haltigem Lysispuffer (ohne 2-Mercapto-EtOH) und eine anschließende doppelte Waschung mit PBS. Diese Schritte wurden jeweils für 10 min bei 4°C durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden mit 5x SDS-Probenpuffer für bei 95°C und 10 min von den Streptavidinpartikeln für die anschließende SDS-Gelelektrophorese (siehe 4.2.6) durch Erhitzung bei 95°C abgelöst.

4.2.6 SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Es wurden 20 µl der in SDS-Probenpuffer gelösten Proteinproben nach Laemmli [165] auf ein diskontinuierliches Gelsystem bestehend aus 6% Sammelgel und 12,5% Trenngel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25 mA in vertikalen Gelkammern der Firma BioRad. Sie wurde gestoppt, sobald das Bromphenolblau des Probenpuffers durch das Gel gewandert war. Im weiteren Prozess wurde das Gel entweder für die Immunodetektion von Proteinen weiterverwendet (siehe 4.2.8) oder zur Visualisierung der Proteine für 60 min bei RT mit Coomassie gefärbt. In diesem Fall schloss sich nach der Coomassie Färbung die Entfärbung mittels Wasser für mehrere Stunden an, so dass der tryptische Verdau der Peptide und die relative Quantifizierung der Proteine durchgeführt werden konnte (siehe 4.2.7).

4.2.7 Identifikation und relative Quantifizierung nano-LC MS/MS

Um die Proteine aus der SILAC basierten komparativen Affinitätsaufreinigung identifizieren zu können, wurde ein tryptischer Verdau durchgeführt. Als Vorbereitung für die Nano-LC-MS/MS wurden die Proteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Coomassie Färbung visualisiert (siehe 4.2.6). Anschließend wurden die Gelbanden in 8 bis 10 gleich große Teile geschnitten. Jedes Teil wurde weiter in 1-2 mm große Stücke zerkleinert. Die Gelbruchstücke eines Abschnitts wurden für 30 min in 200 µl Waschlösung 1 bei 37°C geschüttelt. Diese wurde durch Waschlösung 2 ersetzt, woraufhin die Proben für

weitere 15 min bei 37°C geschüttelt wurden. Anschließend konnte die Waschlösung entfernt und durch 100 µl Reduktionslösung ersetzt werden. Nach einer weiteren Inkubation dieses Reduktionsansatzes unter Schütteln bei 37°C für 45 min schloss sich die Alkylierung durch Hinzugabe von 100 µl Alkylierungslösung an. Hierfür wurden die Proben für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Alkylierungslösung wurde nochmals zweimal für je 15 min mit 200 µl Waschlösung 2 gewaschen. Daraufhin wurde die Lösung entfernt, 50 µl Acetonitril zugegeben und die Gelstücke für 10 min entwässert. Nach Verwerfung des Acetonitrils wurden die Gelstücke im Abzug für 5 bis 10 min getrocknet. Anschließend wurde 10 bis 15 µl Verdaupuffer zugeben und die Gelstücke für 15 min bei Raumtemperatur quellen gelassen. Danach wurde nochmals 20 µl Verdaupuffer (ohne Trypsin) hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Gelstücke bei 0 °C in einem Ultraschallbad für 30 min inkubiert und danach der Überstand abgenommen. Zur Entwässerung wurden 30 µl Acetonitril auf die Gelstücke gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation wurde der neue Überstand mit dem alten vereinigt. Die Lösungen wurden im Vakuum eingeeengt und in 15 µl 0.1 % TFA aufgenommen, worauf die Nano-LC-MS/MS Messung folgte.

Die Identifikation der gebundenen Proteine anhand der MS/MS Spektren erfolgte durch einen Vergleich mit der IPI_human_3.52 decoy Datenbank durch Suche mit dem Programm Mascot (<http://www.matrixscience.com>) einschließlich des MOWSE (*molecular weight search*) Algorithmus' [166], wobei eine Fehlertoleranz von 1% zugelassen wurde. Die relative Quantifizierung gebundener Proteine wurde durch das Programm MaxQuant v.1.0.13.13 ermöglicht [167]. Wie in Kap. 4.2.5a beschrieben, wurden zwei Messfolgen der SILAC basierten komparativen Affinitätschromatographie durchgeführt. In dem Fall, dass der *pulldown* der Tubulexin A Affinitätssonde **1** mit *heavy* Proteinextrakt durchgeführt und die Affinitätssonde **2** mit *light* Extrakt inkubiert wurde, mussten potentielle Zielproteine von Tubulexin A eine 1,3-fach erhöhte relative Signalintensität der MS/MS Spektren *heavy* zu *light* markierter Proteine besitzen. Im umgekehrten Fall betrug dieser Wert 0,7. In beiden Fällen sollten zumindest zwei Peptidsequenzen eines potentiellen Zielproteins quantifiziert worden sein.

4.2.8 Immunodetektion nach Affinitätsaufreinigung

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine wurden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen und die zu untersuchenden Proteine anschließend über spezifische Antikörper nachgewiesen. Für den Transfer der Proteine nach dem Halb-Trocken Blotverfahren wurde zunächst die PVDF-Membran in Größe des Gels mit Methanol aktiviert und daraufhin zusammen mit vier Stücken Filterpapier und dem Gel

für 10 min in Blot-Puffer getränkt. Das „Blotsandwich“ bestand aus zwei Stücken Whatman Papier auf der Anodenplatte, worauf nachfolgend das Gel sowie die PVDF-Membran und wiederum zwei Stücke Whatman Papier platziert wurden. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Spannung von 20 V für 45 min. Zu Beginn der Immunodetektion wurden zunächst unspezifische Bindestellen mit 2% Slim Fast Schoko in TBS-T-Puffer abgesättigt. Zur Detektion von α Tubulin wurde der anti α -Tubulin E19-R-Antikörper aus dem Kaninchen in der Verdünnung von 1:5000 und für die Detektion des Proteins CAS der anti CAS-C20-Antikörper aus Ziege in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Die Inkubation der Membran mit den Antikörpern erfolgte bei für 1h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für 5 min wurden gebundene Antikörper über einen entsprechenden sekundären Antikörper, gekoppelt an einer gekoppelten Meerrettichperoxidase, in der Verdünnung 1:10.000 in TBST detektiert. Es folgte eine weitere dreifache Waschung der Membran für 5 min mit TBS-T. Als Substratlösung wurden 1 ml des Super Signal West Pico Systems (Thermo Scientific, Waltham, USA) genutzt. Nach einminütiger Inkubation konnten die gebundenen Antikörper durch die Entwicklung und Fixierung eines für eine geeignete Zeit auf die Membran gelegten Röntgenfilmes durch Schwärzung nachgewiesen werden.

4.2.9 Konformationsanalyse von Tubulin mittels Tryptophan Fluoreszenz

Die Tryptophan Fluoreszenz wurde als ein Monitor etwaiger lokaler Konformationsänderungen von $\alpha\beta$ Tubulin verwendet. Tryptophan fluoresziert, wenn es bei 280 nm angeregt wird und sein Emissionsmaximum liegt, abhängig von der Polarität der Umgebung, zwischen 308 und 355 nm [168]. Zur Testung eventueller Substanz induzierter Konformationsänderungen von Tubulin wurde die Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan mittels Fluoreszenzspektrometrie beobachtet. Pro Ansatz wurde 4 μ M $\alpha\beta$ Tubulin in 200 μ l Tubulin Puffer zusammen mit der Testsubstanz in einer Quarzküvette für 30 min inkubiert. Ein Ansatz mit DMSO und $\alpha\beta$ Tubulin diente dabei als Negativkontrolle, während 10 μ M Nocodazol als Positivkontrolle für eine Konforamtionsänderung genutzt wurde. Tryptophan wurde bei 280 nm angeregt, während die Emission kontinuierlich in Abständen von 2 nm zwischen 300 und 400 nm im Fluoreszenzspektrometer (Perkin Elmer LS50B, Hamburg, D) aufgenommen wurde.

4.2.10 Konformationsanalyse von Tubulin mittels BIS-ANS Fluoreszenz

BIS-ANS (4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonsäure) (Abbildung 10) wurde als Probe für die Konformationsanalyse von $\alpha\beta$ Tubulin verwendet. Das amphiphile BIS-

ANS bindet nicht kovalent an hydrophobe Proteinsegmente, bevorzugt in der Nähe von positiven Ladungen [169]. Eine etwaige Konformationsänderung von Proteine verstärkt oder verringert die BIS-ANS Fluoreszenz.

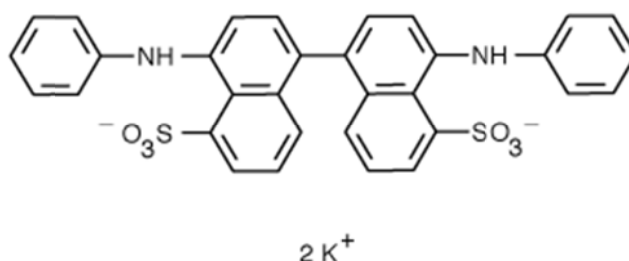


Abbildung 10: Die chemische Strukturformel von BIS-ANS.

2 μM $\alpha\beta$ Tubulin-Puffer wurden mit 25 μM BIS-ANS bei RT für 45 min inkubiert. Es folgte die Zugabe der Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen oder DMSO und Nocodazol als Kontrolle. Nach Inkubation in schwarzen 96-Lochplatten für 10 min wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 430 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm im Plattenlesegerät ermittelt. Die Werte des DMSO Kontrollansatzes wurden auf den Wert 1 normalisiert und die übrigen Messwerte hierzu in Beziehung gesetzt.

4.2.11 Colchicin Kompetitionsassay

Zur Testung der Bindung von Substanzen an die Colchicin-Bindestelle von $\alpha\beta$ Tubulin wurde ein kompetitiver Ansatz mit Colchicin gewählt. Hierfür wurden 5 μM $\alpha\beta$ Tubulin in Tubulin-Puffer mit 50 μM Colchicin für 30 min bei RT präinkubiert. Es folgte die Applikation der Testsubstanzen für 30 min, wobei als Kontrollansätze DMSO und Nocodazol verwendet wurden. Die Fluoreszenzmessung des Colchicin- $\alpha\beta$ Tubulin Komplexes erfolgte im Plattenleser bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 435 nm [170]. Die Messwerte des Kontrollansatzes mit DMSO wurden auf den Wert 1 normalisiert. Zu diesem Wert wurden die Fluoreszenzwerte der Messproben ins Verhältnis gesetzt, welche somit ein Vielfaches des DMSO-Wertes beschreiben.

4.2.12 BODIPY-FL-Vinblastin Kompetitionsassay

Zur Testung der Bindung von Substanzen an die Vinblastin Bindestelle von $\alpha\beta$ Tubulin wurde ein kompetitiver Ansatz mit fluoreszent markiertem BODIPY-FL-Vinblastin (Invitrogen, Karlsruhe, D) gewählt. Hierfür wurden 2 μM $\alpha\beta$ Tubulin in Tubulin-Puffer mit 2 μM BODIPY-FL-Vinblastin für 30 min bei RT präinkubiert. Es

folgte die Applikation der Testsubstanzen für 30 min, wobei als Kontrollansätze DMSO und Vinblastin verwendet wurden. Die Fluoreszenzanregung des BODIPY-FL-Vinblastin- $\alpha\beta$ -Tubulin Komplexes erfolgte im Plattenleser bei einer Wellenlänge von 480 nm, während die Emission bei 515 nm Wellenlänge detektiert wurde. Die Messwerte des Kontrollansatzes mit DMSO wurden auf den Wert 1 normalisiert und die Fluoreszenzwerte der Messproben zu diesen ins Verhältnis gesetzt und beschreiben somit ein Vielfaches des DMSO-Wertes. Es wurde eine sigmoidale Ausgleichsgerade auf die Messwerte zur Bestimmung der EC50 Werte gelegt.

4.2.13 Bestimmung der GTPase-Aktivität von Tubulin

Mittels eines *Malachite Green Phosphate Assay Kits* (Bioessay Systems) wurde die Freisetzung von freiem Phosphat aus GTP und somit die GTPase-Aktivität von $\alpha\beta$ Tubulin bestimmt. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Der Ansatz wurde für ein 96-Lochplattenformat vorbereitet. Zunächst wurden 5 μ M $\alpha\beta$ Tubulin in Tubulin-Puffer gemischt und verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen hinzugefügt. Hierbei dienten Vinblastin, Nocodazol und DMSO als Kontrolle. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Hinzugabe von 100 μ M GTP. Nach weiteren 20 min wurde die GTPase Reaktion von $\alpha\beta$ Tubulin durch 1 M Perchlorsäure gestoppt. Es folgte die Überführung von 80 μ l des Testansatzes in eine 96-Lochplatte und daraufhin die Applikation von 20 μ l des vorbereiteten Malachit Grün-Reagenzes. Die 96-Lochplatte wurde im Dunkeln für 30 min bei RT für die Entwicklung der Farbreaktion inkubiert. Daraufhin wurde die Messung der Absorption bei 620 nm im Plattenlesegerät durchgeführt. Die Messwerte des Kontrollansatzes mit DMSO wurden auf den Wert 1 normalisiert. Die Absorptionswerte der Messproben wurden zu diesen ins Verhältnis gesetzt und beschreiben somit ein Vielfaches des DMSO-Wertes.

4.3 Verwendung des Pipettierroboters Sciclone ALH500

Beim zellulären Screening der Wirkung von Testsubstanzen auf den Phänotyp von BSC-1 oder MDCK-F3 Zellen im 384-Lochplattenformat wurden die Testsubstanzen durch den Pipettierroboter Sciclone ALH500 (Caliper Life Sciences GmbH, Rüsselsheim, D) auf Zell-behandelten Mikrotiterplatten appliziert. Hierbei wurde das von Dr. Sascha Menninger erstellte Programm „CellScreen384WP_SM.ptc“ verwendet [171]. Zusammenfassend wurden 10 mM in DMSO gelöste Testsubstanzen auf 384-Lochplatten in Zellmedium vorverdünnt. Diese Substanzen wurden schließlich in einer Endkonzentration von 30 μ M zur Vierfachbestimmung auf

vier verschiedene 384-Lochplatten appliziert (Abbildung 11). Die Applikation der Positivkontrollen der jeweiligen Testsysteme erfolgte hingegen manuell.

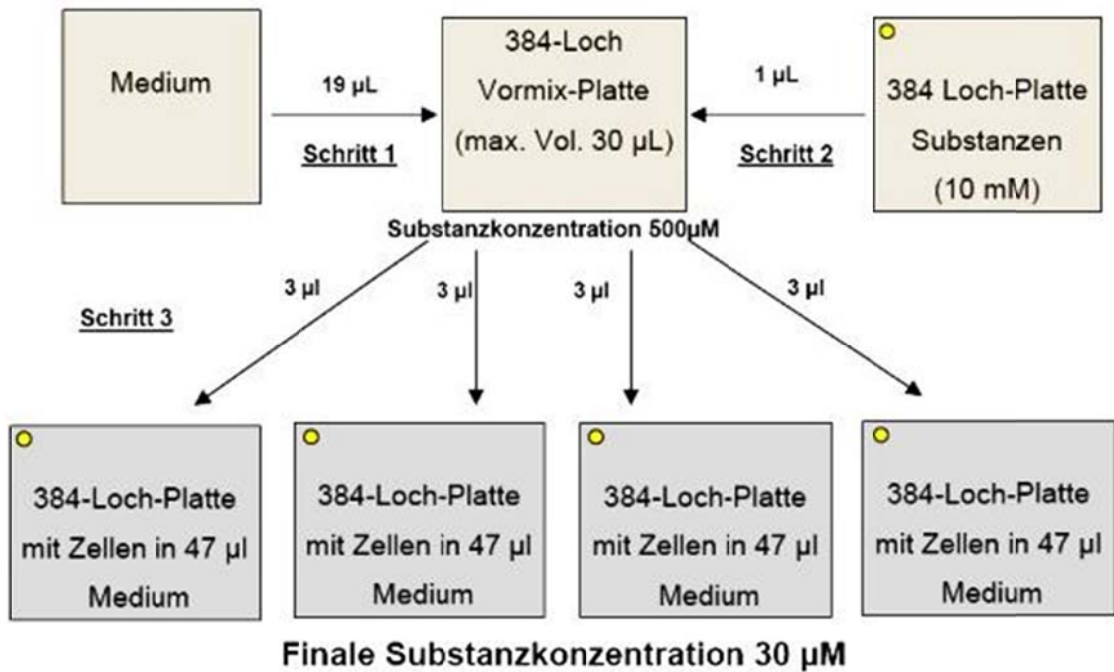


Abbildung 11. Pipettierplan unter Verwendung des Pipettierrobotors Sciclone ALH500 (entnommen aus Menninger [171]).

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchung einer Naturstoff-Substanzbibliothek mittels zellbasierter Assays

Die in der Abteilung etablierten *High Content Screening* Systeme sollten für spätere Untersuchungen Naturstoff-basierter Substanzbibliotheken validiert werden. Zu diesem Zweck stand eine Substanzbibliothek aus 1500 strukturell diversen Naturstoffen von der Firma InterMed Discovery (Dortmund) zur Verfügung. Hierin enthalten waren Wirkstoffe mit bekannter zellulärer Aktivität. Eine Identifikation dieser Substanzen mittels der Screens würde somit zur Validierung der Testsysteme führen. Die Substanzbibliothek enthielt außerdem Substanzen mit unbekannter zellulärer Aktivität. Nach der Identifikation solcher Moleküle mittels der Screens sollten Folgeuntersuchungen deren Bioaktivität näher charakterisieren, um ihr Potential als Leitstrukturen für die Synthese Naturstoff-basierter Substanzbibliotheken abschätzen zu können.

5.1.1 High Content Screening

In der Arbeitsgruppe wurden zwei *High Content Screens* etabliert: der BSC-1 Phänotyp-Assay und der MDCK-F3 Phänotyp-Assay [171]. Um das Potential dieser beiden Ansätze in der Identifikation interessanter Wirkstoffe zu evaluieren, wurden sie parallel für das Screening der Substanzbibliothek verwendet. Dieser doppelte Ansatz ermöglichte außerdem, eine große Spannbreite biologischer Aktivitäten der Naturstoffe aufzudecken.

Mittels des BSC-1 Phänotyp-Assays sollten etwaige Modulatoren des eukaryotischen Zytoskelettes und der Mitose identifiziert werden. Die für den BSC-1 Phänotyp-Assay verwendeten BSC-1 Zellen aus der Niere der Grünen Meerkatze sind durch ein ausgeprägtes Zytoskelett gekennzeichnet. Mehrere Studien zeigten bereits, dass diese Zellen sowohl ein herausragendes System zur Identifikation chemischer Modulatoren des Aktin- und MT-Zytoskelettes als auch der Mitose sind [54,172-174]. Der MDCK-F3 Phänotyp-Assay wurde zur Identifikation etwaiger Inhibitoren Ras-abhängiger Signalwege genutzt. Die mit dem viralen H-Ras-Onkogen stabil transfizierte Zelllinie MDCK-F3 besitzt eine von dem MDCK Wildtyp unterschiedliche Zellmorphologie. MDCK-F3 Zellen wachsen mesenchymal mit wenigen Zellkontakten, während MDCK Zellen eine epitheliale Zellmorphologie aufweisen. Aufgrund dieses charakteristisch unterschiedlichen Phänotyps eignen sich MDCK-F3 Zellen als System zur mikroskopischen Identifikation von potentiellen Inhibitoren des Ras/MAPK-Signalweges [175-178]. Inhibitoren des Ras/MAPK- Signalweges, wie der

MEK-Inhibitor U0126 [179] revertieren den Phänotyp transformierter MDCK-F3 Zellen durch Kompensation der aktivierenden Wirkung des HRas-Onkogens. Der hierdurch resultierende phänotypische Effekt bei dem die Zellen einen Übergang von mesenchymaler zu epithelialer Morphologie eingehen, ist als Rücktransformation zu bezeichnen. Als ein Charakteristikum vieler *High Content Screens* geben beide Ansätze Informationen über weitere morphologische Veränderungen der Zellen, die mit Zytotoxizität oder Apoptose in Verbindung gebracht werden können. Abbildung 12 zeigt zusammenfassend den Testansatz für das Screening der Naturstoff-Substanzbibliothek durch einen Vergleich der beiden *High Content Screening* Systeme. Hier wird die Stärke dieses Ansatzes deutlich, indem die Offenlegung etwaiger Wirkungen von Testsubstanzen auf mehrere biologische Parameter parallel ermöglicht werden kann.

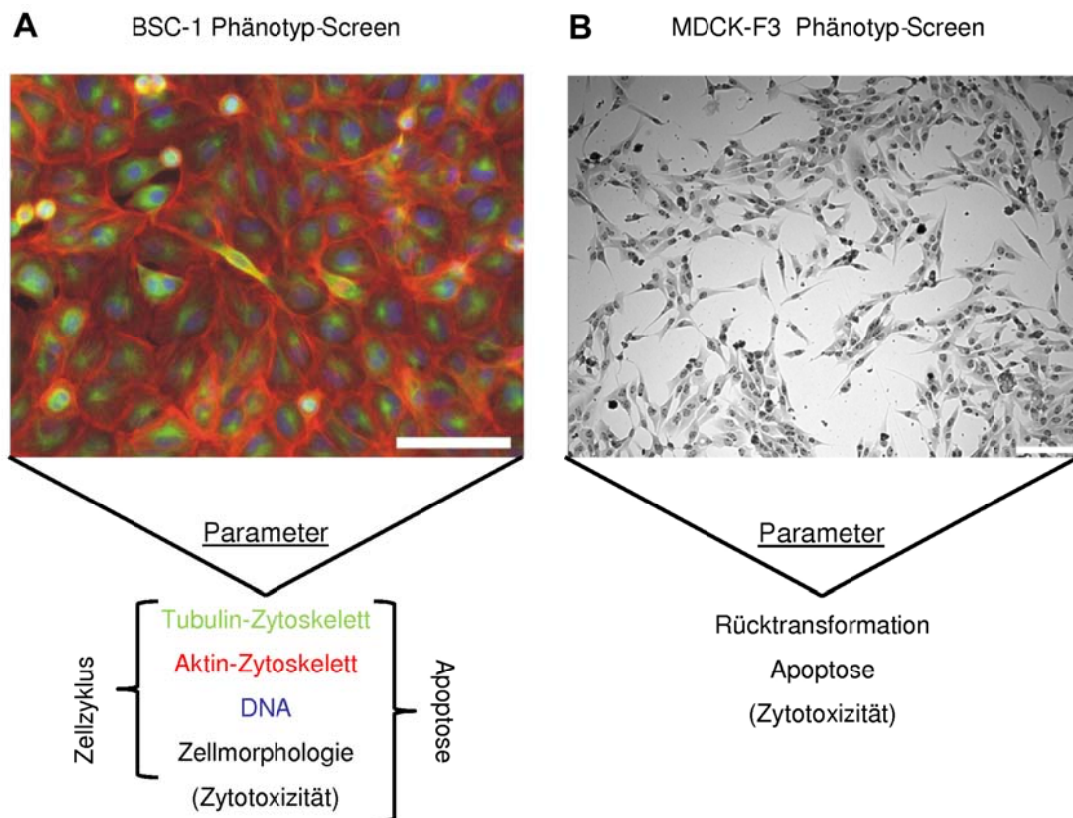


Abbildung 12. Die Test-Parameter der *High Content Screening*-Systeme im Vergleich. **A.** BSC-1 Phänotyp-Assay. Nach der Substanzapplikation können mehrere zelluläre Test-Parameter untersucht werden, wie Veränderungen der histochemisch gefärbten Bestandteile des Zytoskeletts. **B.** Der MDCK-F3 Phänotyp-Assay kann zur Identifikation von Wirkstoffen benutzt werden, die eine Rücktransformation induzieren und somit in den Ras-Signalweg eingreifen. **A.** und **B.** Morphologische Veränderungen können Hinweise über eine mögliche Induktion von Zellzyklusarrest oder Apoptose geben.

Die beiden Testsysteme wurden zur Untersuchung der 1500 Naturstoffe im Screening-Format auf 384-Lochplatten durchgeführt. Die Zellen wurden hierbei mit 30

μM der Naturstoffe und den Kontrollsubstanzen behandelt. Für den BSC-1 Zytoskelett Screen wurde als Referenz für antimittotische Substanzen Nocodazol verwendet [179]. Cytochalasin B diente als Referenz für Agenzien, die den Aufbau der Aktinfasern stören. [180,181]. Im Testansatz der MDCK-F3 Zellen wurden 20 μM des MEK-Inhibitors U0126 als Positivkontrolle eingesetzt. Die Bilddaten der MDCK-F3 und BSC-1 Zellen wurden durch automatische Mikroskopie aufgenommen und daraufhin analysiert. Hierbei wurden etwaige Effekte den in Abbildung 12 beschriebenen Parametern zugeordnet. In einer vergleichenden Analyse wurde die Anzahl der aktiven Substanzen der beiden Screening-Systeme gegenübergestellt (Abbildung 13). Den Effekten von 34 Verbindungen konnte hier eine Veränderung der Testparameter Aktin, Tubulin, DNA oder Zellmorphologie zugeordnet werden. 11 Wirkstoffe verursachten apoptotische Phänotypen in MDCK-F3 Zellen, wobei keine epitheliale Morphologie beobachtet wurde. Somit induzierte keine Testsubstanz eine Rücktransformation. Aktivität in beiden Testsystemen zeigten 4 Wirkstoffe. Alle Naturstoffe, die phänotypische Veränderungen verursachten, wurden einer intensiven Literatursuche unterzogen und im Falle bereits beschriebener biologischer Phänotypen nicht weiterführend untersucht. Zytotoxische Substanzen wurden im späteren Verlauf bei geringeren Konzentrationen getestet.

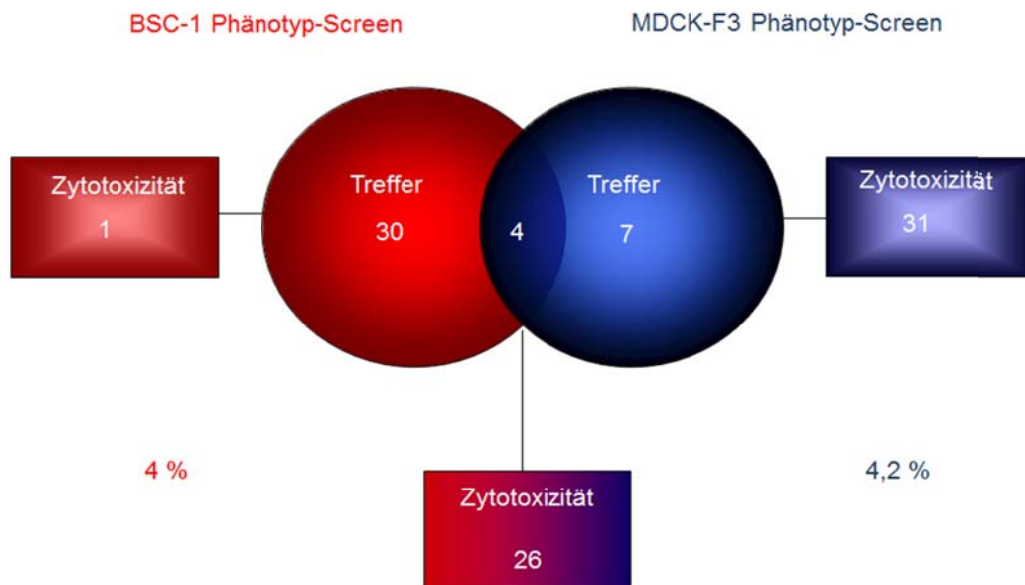


Abbildung 13. Die Ergebnisse der beiden High Content Screening-Systeme im Vergleich Es wurden 1500 Naturstoffe getestet. Angegeben sind absolute und relative Trefferzahlen; zytotoxische Treffer sind gesondert dargestellt.

5.1.1.1 Identifikation bekannter Tubulin-Modulatoren

Zu den identifizierten und in der Literatur ausführlich charakterisierten Substanzen mit bekannter Bioaktivität gehörten verschiedene Inhibitoren der MT-Dynamik. Diese Gruppe bestand aus mehreren Analoga von Podophyllotoxin [182], Chelidonin [183] und Taxol [184]. Diese Wirkstoffe verursachten eine stark modulierende Wirkung auf das MT-Zytoskelett von BSC-1 Zellen, während die Aktinfilamente unbeeinflusst blieben. Im Falle der depolymerisierenden Agentien Podophyllotoxin und Chelidonin führten diese Effekte zu einem sehr ähnlichen Phänotyp wie nach der Behandlung mit 0,5 μM Nocodazol, was am Beispiel von Podophyllotoxin in Abbildung 14 dargestellt wird.

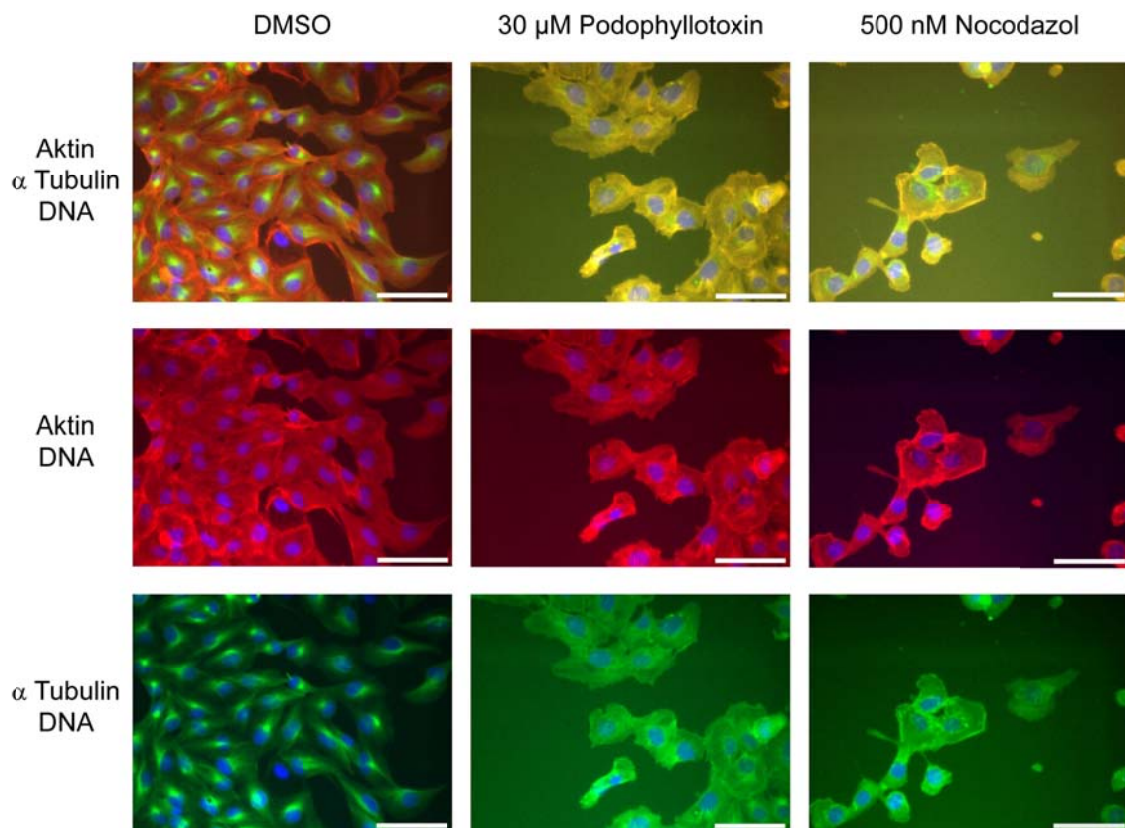


Abbildung 14: Der Effekt der Podophyllotoxin-Analoga auf das Zytoskelett von BSC-1 Zellen. BSC-1 Zellen wurden für 20 h mit Podophyllotoxin, DMSO oder Nocodazol behandelt. Aktinfilamente (rot; TRITC-Phalloidin), α Tubulin (grün; anti- α -tubulin-FITC) und DNA (blau; DAPI) wurden histochemisch visualisiert. Maßstabbalken 50 μm .

5.1.1.2 Identifikation bekannter Apoptose-Induktoren

Apoptotische Phänotypen zeigten sich nach Behandlung von MDCK-F3 Zellen und BSC-1 Zellen mit Cucurbitacin B-Analoga (Abbildung 15). In MDCK-F3 Zellen führte dies zu einer leichten Abrundung der Zellen. Dieser Effekt war nicht vergleichbar mit dem Phänotyp, der durch U0126 verursacht wurde. In BSC-1 Zellen waren Anzeichen

einer gestörten Mitose und einer eingeleiteten Apoptose erkennbar. Hier verursachte Cucurbitacin B das Auftreten von Membranbläschen von abgerundeten wahrscheinlich mitotischen Zellen. Außerdem zeigte sich eine Morphologie des Zellkerns, die eine DNA-Fragmentierung nahelegte. Diese Effekte gingen mit den in der Literatur geschilderten Beobachtungen einher [185-187]. Rotenon, welches neben seiner Aktivität als Atmungsketteninhibitor bekanntermaßen auch Apoptose induziert [188], und Flavonoide, ebenfalls bekannt für ihre Apoptose-aktivierende Eigenschaft [189], führten ebenfalls zu Phänotypen, die mit der Induktion von Apoptose korrelierten.

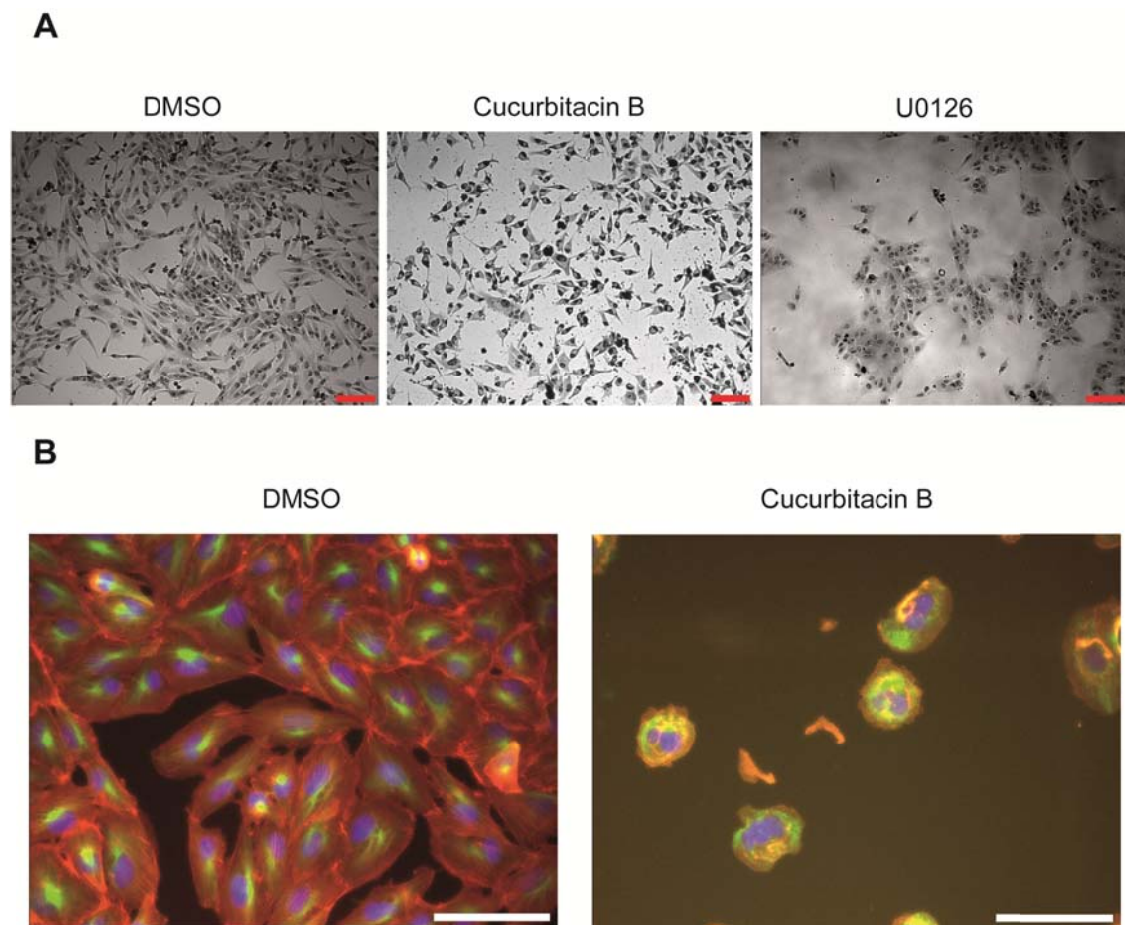


Abbildung 15: Der Effekt von Cucurbitacin B auf den Phänotyp von MDCK-F3 und BSC-1 Zellen.

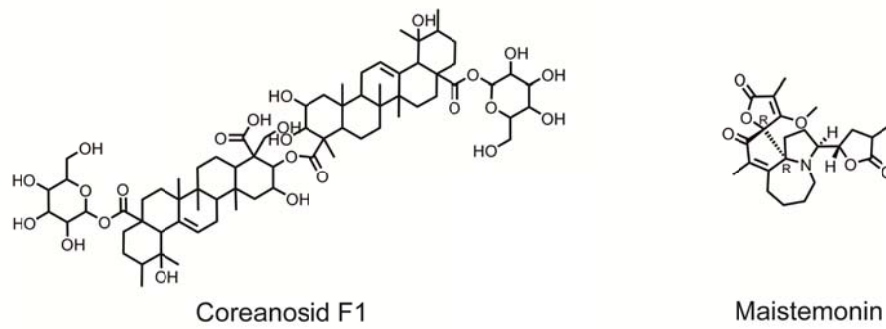
A. Der Effekt von Cucurbitacin B auf den Phänotyp von MDCK-F3 Zellen. MDCK-F3 Zellen wurden für 20h mit dem Wirkstoff oder U0126 bzw. DMSO als Kontrollen inkubiert. Nach Färbung der Zellen mit Coelestin Blau wurde die induzierte Zellmorphologie mit der DMSO-Kontrolle und U0126 verglichen. Maßstabballen. 100 μm **B.** Die Wirkung von Cucurbitacin B auf den Phänotyp von BSC-1 Zellen nach Behandlung mit Cucurbitacin B für 20 h. Aktinfilamente (rot; TRITC-Phalloidin), α Tubulin (grün; anti- α -tubulin-FITC) und DNA (blau; DAPI) wurden histochemisch visualisiert. Maßstabballen: 50 μm

5.1.1.3 Identifikation unbeschriebener Modulatoren des Zytoskeletts

Die Naturstoffe Coreanosid F1 und Maistemomin modulierten das Zytoskelett von BSC-1 Zellen (Abbildung 16; gezeigt für Coreanosid F1). Die Visualisierung von F-

Aktin zeigte starke Effekte auf das Aktin-Zytoskelett, die im Vergleich zu einer Behandlung der BSC-1 Zellen mit Cytochalasin B andersartig waren, einem Inhibitor der Aktinpolymerisation. Die mehrkernigen Zellen nach der Behandlung von BSC-1 Zellen mit Cytochalasin B sind durch die interferierende Wirkung auf die Ausbildung des kontraktiven Ringes während der Zytokinese zu erklären (siehe Abbildung 4). Im Gegensatz dazu schienen sich durch Coreanosid F1 und Maistemonin Aktin-Aggregate in der perinuklearen Region gebildet zu haben, wobei mehrkernige Zellen nicht beobachtet wurden. Die Parallelfärbung der MT legte zum Teil einen ähnlichen Effekt auf das MT-Zytoskelett nahe. Um die Wirkung der beiden Naturstoffe auf das Zytoskelett näher zu charakterisieren, wurden im späteren Verlauf weitere Studien durchgeführt (siehe 5.1.2).

A



B

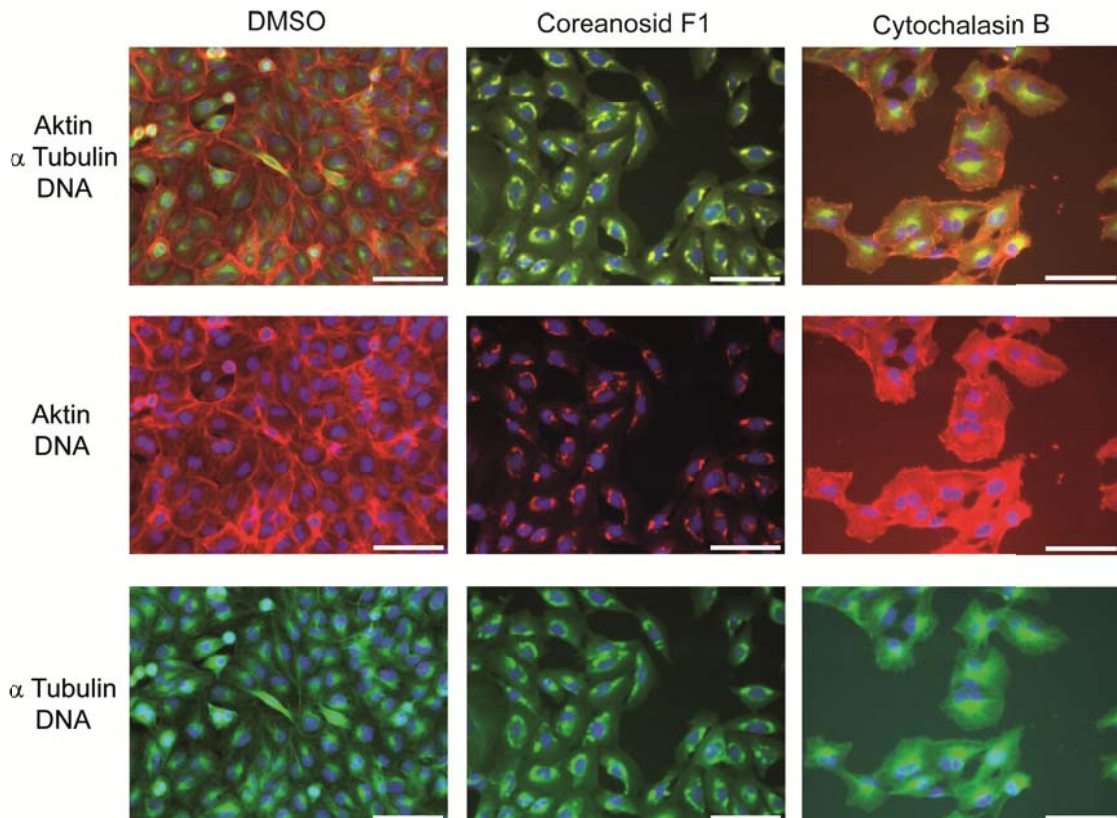


Abbildung 16. Coreanosid F1 und Maistemonin induzieren Veränderungen des BSC-1 Zytoskeletts. **A.** Strukturen der Naturstoffe Coreanosid F1 und Maistemonin. **B.** Der Effekt von Coreanosid F1 auf den Phänotyp von BSC-1 Zellen. Nach 20 stündiger Behandlung der Zellen mit den Wirkstoffen wurden Aktinfilamente (rot; TRITC-Phalloidin), α Tubulin (grün; anti- α -Tubulin-FITC) und DNA (blau; DAPI) histochemisch visualisiert. Maßstab Balken: 50 μ m

Die zytotoxischen Substanzen (Abbildung 13) wurden in den jeweiligen Testsystemen noch einmal bei niedrigeren Konzentrationen von 10 μ M und 3 μ M getestet. Durch ihre Zytotoxizität bei 30 μ M waren diese Substanzen besonders interessant, da solche Substanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei niedriger Konzentration Bioaktivität aufweisen. Mögliche Wirkungen wären hierbei antiproliferative Eigenschaften und mögliche Mitose- und Apoptose-regulierende Effekte. Die Tests wurden von Frau B.Sc. Bettina Stanitzki im 96-Lochplattenformat durchgeführt und führten zur Identifikation von Podoverin A. 10 μ M des Naturstoffes induzierten den gleichen Phänotyp wie 1 μ M Nocodazol und sogar eine Konzentration von 3 μ M führte zu starken Effekten (Abbildung 17). Es war eine große Anzahl abgerundeter Zellen mit einem bipolaren Spindelapparat zu erkennen. Daher schienen diese Zellen in der Metaphase der Mitose arretiert zu sein. Das Auftreten von Membranbläschen zeigte weiterhin Zellmorphologie, die mit Apoptose-Induktion in Verbindung gebracht werden kann. Eine antimitotische und MT-Dynamik inhibierende Wirkung von Podoverin A wurde bisher nicht beschrieben, weshalb weitere Studien mit diesem Wirkstoff durchgeführt wurden (siehe 5.1.3).

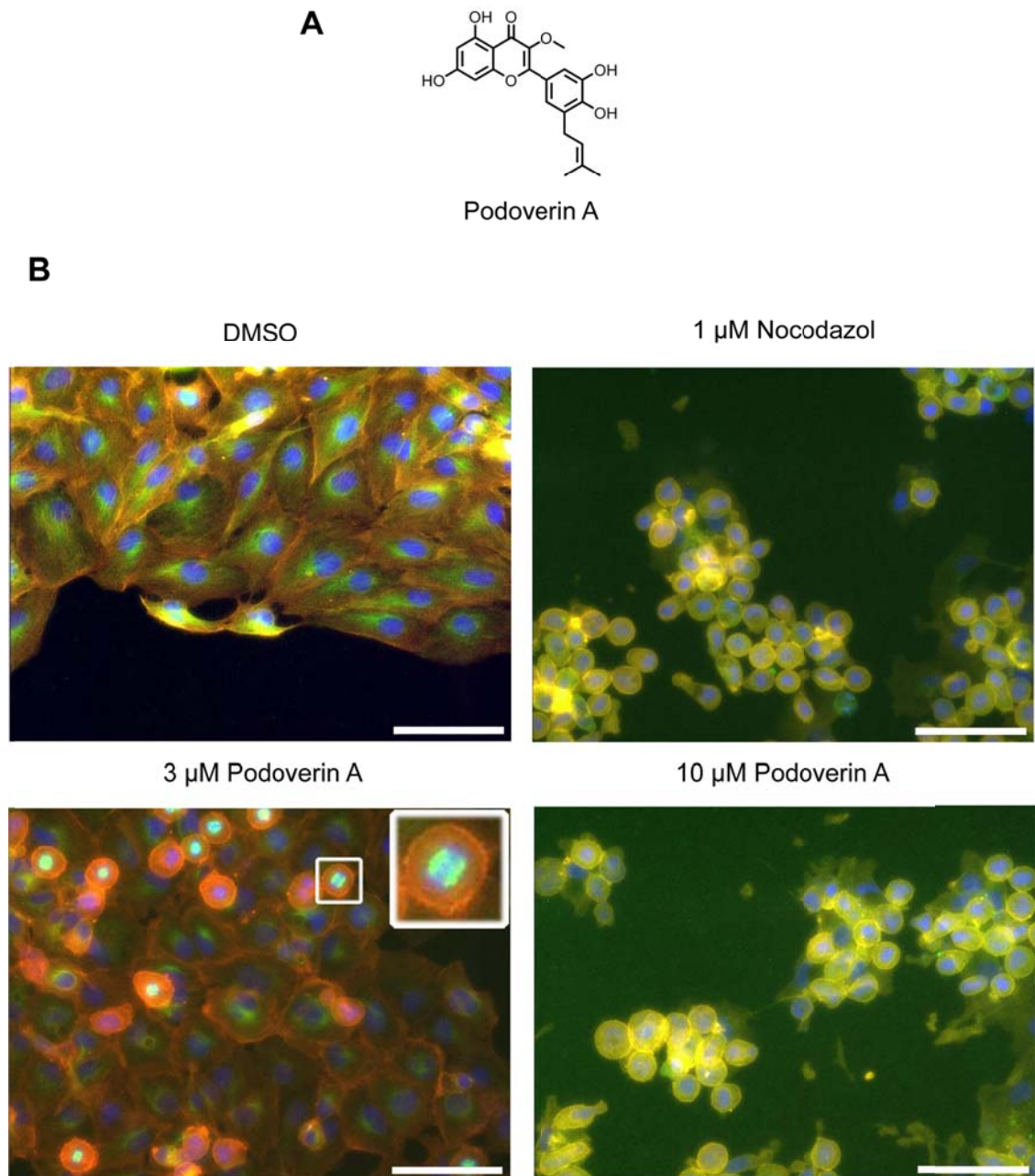


Abbildung 17. Der Effekt von Podoverin A auf den Phänotyp von BSC-1 Zellen A. Die chemische Struktur von Podoverin A. **B.** Der Effekt von Podoverin A auf den Phänotyp von BSC-1 Zellen. BSC-1 Zellen wurden für 20 h mit 3 μ M und 10 μ M Podoverin A, 1 μ M Nocodazol oder DMSO behandelt. Aktinfilamente (rot; TRITC-Phalloidin), α Tubulin (grün; anti- α -Tubulin-FITC) und DNA (blau; DAPI) wurden histochemisch visualisiert. 3 μ M Podoverin A: Der vergrößerte Ausschnitt zeigt eine abgerundete Zelle in der Metaphase der Mitose mit dipolarem Spindelapparat und apoptotischen Membranbläschen. Maßstab Balken: 50 μ m

5.1.2 Charakterisierung der Wirkung von Maistemolin und Coreanosid F1 auf das Zytoskelett

Die nicht eindeutigen Ergebnisse des BSC-1 Phänotyp-Screens zur Wirkung von Maistemolin und Coreanosid F1 (siehe Abbildung 16), sollten näher untersucht werden. Zur weiteren Untersuchung der zellulären Wirkung dieser Substanzen auf

das eukaryotische Zytoskelett musste daher die Wirkung auf die Aktinfilamente und die MT differenziert betrachtet werden. Nach Behandlung von BSC-1 Zellen mit beiden Substanzen im 96-Lochplattenformat wurden entweder F-Aktin und DNA oder α Tubulin und DNA histochemisch markiert, um eine mögliche Überlagerung der Fluoreszenzmarker zu verhindern. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung zeigten, dass Maistemonin und Coreanosid F1 deregulierend auf das Aktin-Zytoskelett in BSC-1 Zellen wirkten (Abbildung 18A; gezeigt für Coreanosid F1). Hingegen blieb die zelluläre Organisation der MT jeweils unbeeinflusst. Es bildeten sich ringartige Aggregate von Aktin in der perinukleären Region bei einer Behandlung von BSC-1 Zellen mit beiden Wirkstoffen in einer Konzentration von 30 μ M. Zur Untersuchung, ob dieser Effekt Zelltyp-spezifisch ist, folgte eine Analyse in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden hierfür auf 96 Lochplatten ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Substanzen behandelt. Nach Fluoreszenzmarkierung von F-Aktin zeigten sich in der mikroskopischen Analyse für beide Wirkstoffe starke Effekte in HeLa Zellen. In ihrer Qualität und Ausprägung waren sie stark vergleichbar zu den in BSC-1 Zellen beschriebenen Effekten (Abbildung 18B)

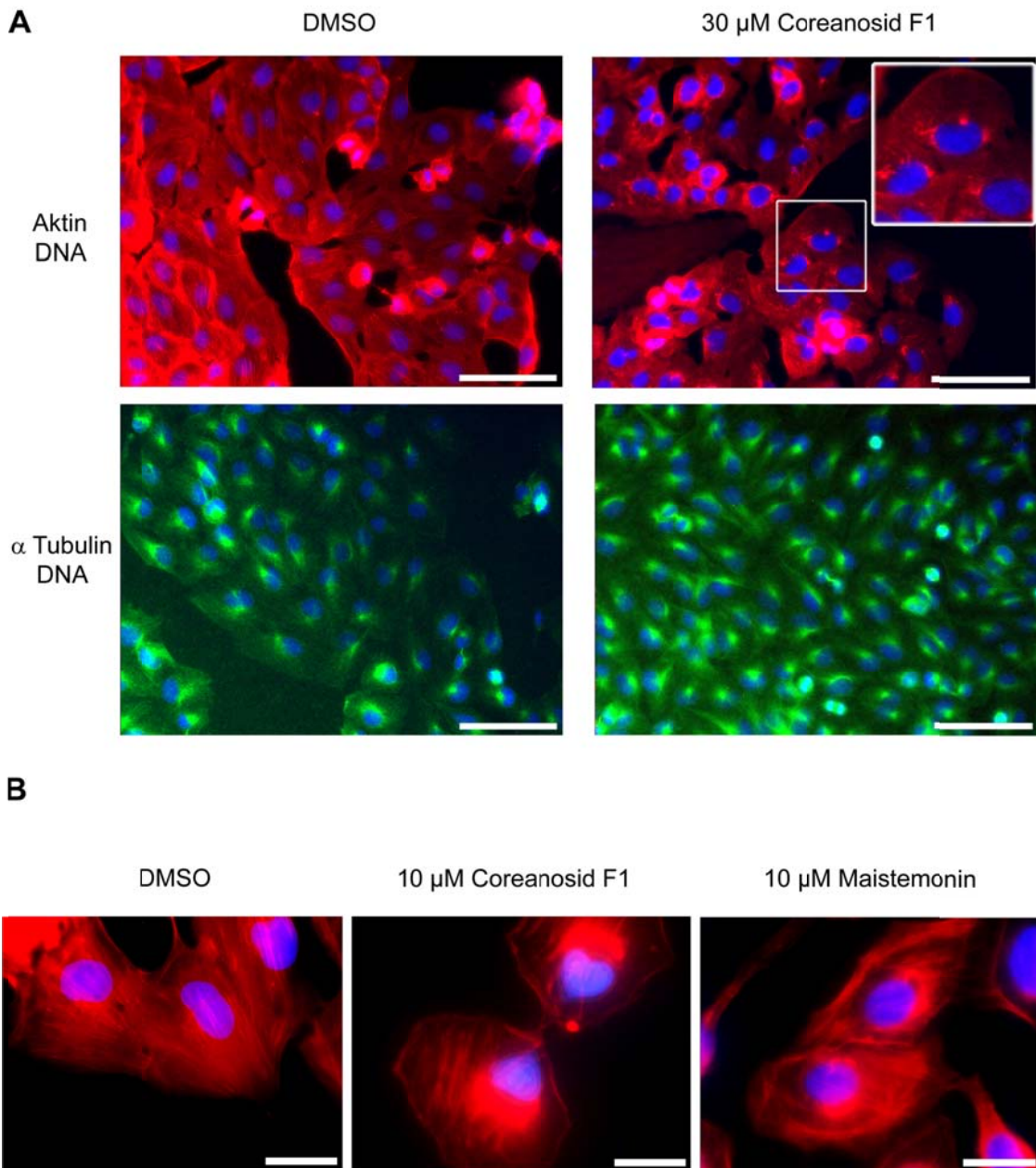


Abbildung 18. Der Effekt von Coreanosid F1 und Maistemonin auf das Aktin-Zytoskelett A. BSC-1 Zellen wurden für 20 h mit 30 μM Coreanosid F1 oder DMSO behandelt. Aktinfilamente (rot; TRITC-Phalloidin), α -Tubulin (grün; anti- α -Tubulin-FITC) und DNA (blau; DAPI) wurden histochemisch visualisiert. 30 μM Coreanosid F führte zu einer Aggregation von Aktin in der perinukleären Gegend (siehe Ausschnittsvergrößerung). Maßstabbalken: 50 μm B. HeLa Zellen wurden für 20 h mit 10 μM Coreanosid, 10 μM Maistemonin oder DMSO behandelt. Aktinfilamente (rot; TRITC-Phalloidin), α Tubulin (grün; anti- α -Tubulin-FITC) und DNA (blau; DAPI) wurden histochemisch visualisiert. Maßstabbalken: 20 μm .

Niedermolekulare Inhibitoren der zellulären Aktin-Dynamik, wie Cytochalasin B und Jaspamide, wirken inhibierend auf die Proliferation [190,191]. Daher wurden Maistemonin und Coreanosid F1 auf einen antiproliferativen Effekt in HeLa Zellen untersucht. Die HeLa Zellen wurden hierfür mit beiden Substanzen für 24h inkubiert, worauf sich ein WST-1 Proliferationstest anschloss. Beide Substanzen hatten hierbei

keinen Einfluss auf die Proliferationsrate bis zu einer Konzentration von 30 μM (siehe Abbildung 19).

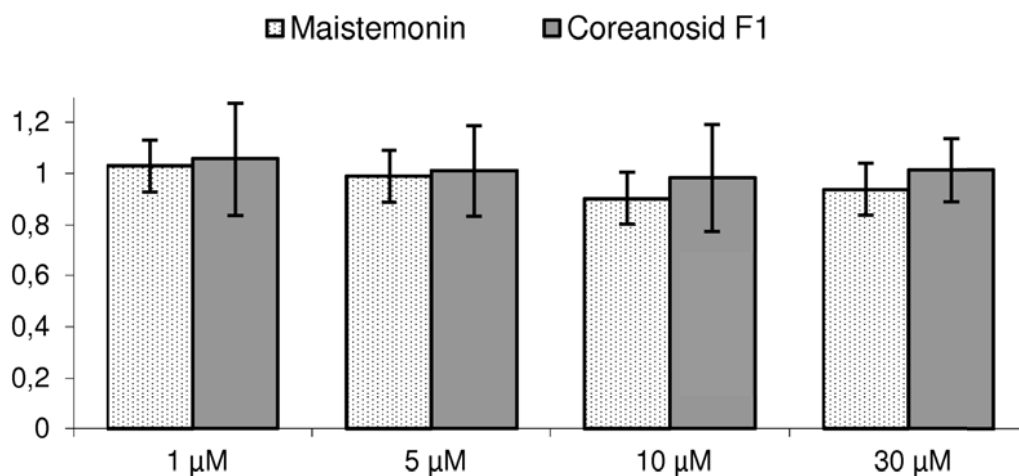


Abbildung 19. Der Einfluss von Maistemonin und Coreanosid F1 auf die Proliferation von HeLa-Zellen. Gezeigt sind die Durchschnittswerte einer Vierfachbestimmung mit Standardabweichungen. Die Ergebnisse der Proliferationswerte eines mit DMSO behandelten Kontrollansatzes wurden auf den Wert 1 normalisiert.

5.1.3 Die Wirkung von Podoverin A auf die Mikrotubuli und den Zellzyklus

Aufgrund des starken Einflusses von Podoverin A auf den Phänotyp der BSC-1 Zellen wurde in der Literatur nach Wirkstoffen mit verwandtem Strukturmotiv und ähnlichen biologischen Effekten gesucht. Hierbei fiel die semisynthetische Verbindung Icaritin als eine Substanz auf, welche inhibitorisch auf den Zellzyklus wirkt und Apoptose induziert [192,193]. Podoverin A und Icaritin teilen ein strukturelles Grundgerüst (siehe Abbildung 20).

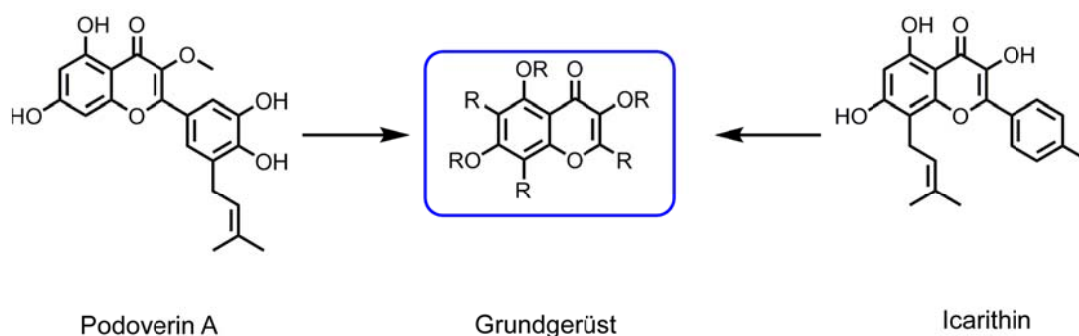


Abbildung 20. Podoverin A und Icaritin teilen ein Grundgerüst der chemischen Struktur

Es wurde mit Hilfe von Dr. Wolfram Wilk eine kleine Substanzbibliothek aus 47 Substanzen ausgewählt, die das Leitmotiv teilen. Diese wurden mit dem BSC-1

5. Ergebnisse

Phänotyp-Assay auf eine mögliche Bioaktivität getestet. Jedoch führte keine dieser Substanzen zu phänotypischen Veränderungen der BSC-1 Zellen.

Die phänotypischen Veränderungen von BSC-1 Zellen durch Podoverin A deuteten auf eine Nocodazol-ähnliche inhibitorische Wirkung auf den Zellzyklus hin. Um daher den Einfluss von Podoverin A auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden diverse Zelllinien mit dem Wirkstoff behandelt. Die nachfolgende Färbung der Zellen mit Propidiumiodid ermöglichte die durchflusszytometrische Quantifizierung des DNA-Gehalts. Hierbei führten 5 μM des Wirkstoffes zu einem praktisch kompletten mitotischen Arrest der untersuchten Zelllinien in der G2/M-Phase (siehe Tabelle 4; Abbildung 21). Diese Wirkung war vergleichbar mit einer zellulären Behandlung mit 1 μM Nocodazol.

Tabelle 4. Analyse des Zellzyklus eukaryotischer Zelllinien nach Behandlung mit Podoverin A. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellpopulation in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. DMSO zeigt die Normalverteilung an und 1 μM Nocodazol dient als die Positivkontrolle für G2/M-Arrest. 2n = einfacher Chromosomensatz, der jeweiligen Zelllinie.

| | < 2n | G1 (2n) | G2/M (4n) | > 4n | Zelllinie |
|-----------------------------|------|---------|-----------|------|-----------|
| DMSO | 3.8 | 57.8 | 24.3 | 13.0 | HeLa |
| 1 μM Nocodazol | 14.1 | 3.3 | 66.2 | 15.7 | |
| 5 μM Podoverin A | 14.6 | 5.0 | 59.0 | 19.8 | |
| DMSO | 0.9 | 37.4 | 39.3 | 22.2 | MCF-7 |
| 1 μM Nocodazol | 1.5 | 4.5 | 63.6 | 30.2 | |
| 5 μM Podoverin A | 2.9 | 5.4 | 66.1 | 25.3 | |
| DMSO | 1.0 | 40.0 | 34.8 | 24.0 | PC-3 |
| 1 μM Nocodazol | 1.7 | 4.3 | 63.9 | 27.8 | |
| 5 μM Podoverin A | 3.1 | 6.7 | 65.0 | 25.8 | |

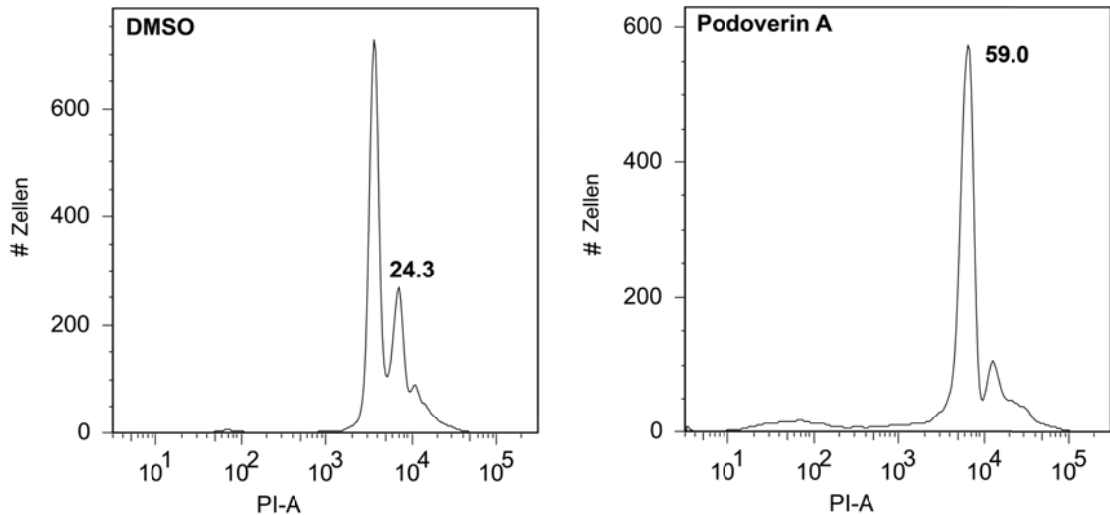


Abbildung 21. Analyse des Zellzyklus von HeLa Zellen nach Behandlung mit 5 μ M Podoverin A und DNA-Färbung mit Propidiumiodid (PI). Gezeigt ist die Auftragung der Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität von PI (PI-A). In dem Histogramm der DMSO-Kontrolle sind klar zwei Maxima zu erkennen. Das erste Maximum zeigt hierbei die Nummer an Zellen in der G1-Phase, während das zweite Maximum die Anzahl der mitotischen Zellen mit prozentualer Angabe gemessen an der Gesamtzellzahl beschreibt.

Eine Störung der MT-Dynamik kann als Erklärung für einen zellulären G2/M Arrest dienen (siehe 1.3.1). Zur Untersuchung, ob Podoverin A mit der zellulären MT-Dynamik interferiert, wurde daher der Effekt der Substanz auf die MT-Repolymerisation in Zellen untersucht. Nach der Behandlung von BSC-1 Zellen mit 5 μ M Podoverin A oder DMSO und Depolymerisation der MT durch Kältebehandlung wurde die Repolymerisation des zellulären MT-Zytoskeletts fluoreszenzmikroskopisch in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. Die MT-Repolymerisation, beginnend am MTOC, wurde im DMSO-Kontrollansatz bereits nach einer Minute beobachtet, und das MT-Zytoskelett war nach 5 min praktisch komplett ausgebildet. Hingegen führte die Behandlung von BSC-1 Zellen mit Podoverin A zu einer äußerst starken Inhibition dieses Prozesses. Eine gerichtete Repolymerisation war hier nicht zu beobachten und es bildeten sich nur sehr vereinzelt diffuse MT-Strukturen (Abbildung 22).

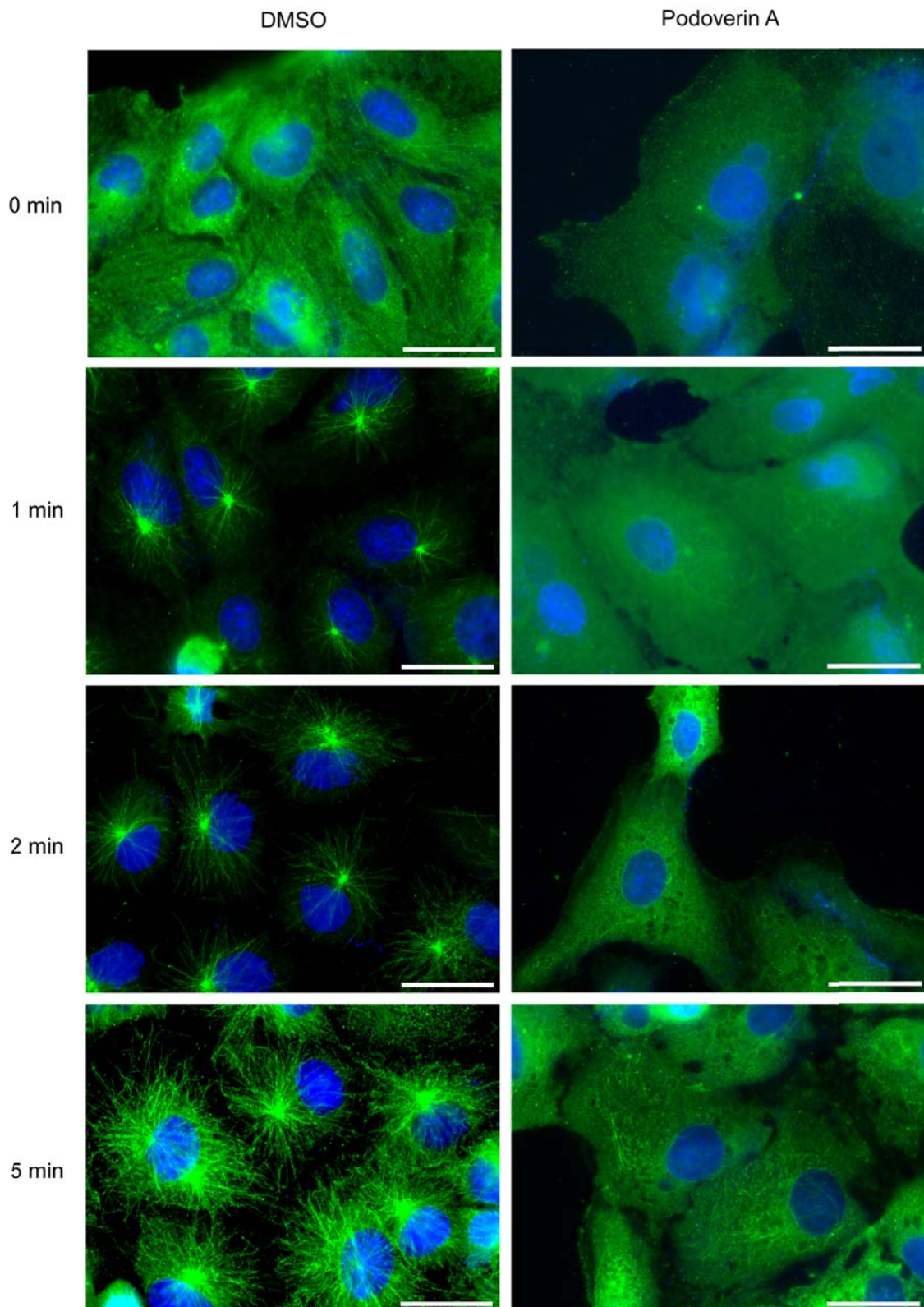


Abbildung 22. MT-Repolymerisation nach Kältebehandlung. BSC-1 Zellen wurden für 20 h mit 5 μM Podoverin A oder DMSO als Kontrolle behandelt. Die Repolymerisation des MT-Netzwerkes wurde nach Wiedererwärmung der Zellen für die angegebenen Zeitpunkte, Methanol-Fixierung und Färbung der Zellen mit α -Tubulin spezifischem Antikörper (grün, Anti- α -Tubulin Primärantikörper und Sekundärantikörper Alexa Fluor[®] 488) fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. DAPI (blau) wurde verwendet, um die DNA zu visualisieren. Maßstab Balken: 20 μm .

5. Ergebnisse

Aufgrund der inhibitorischen Wirkung von Podoverin A auf das Fortschreiten des Zellzyklus wurde der Effekt des Wirkstoffes auf die Proliferation von HeLa Zellen getestet. Nach Behandlung von HeLa Zellen für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von Podoverin A wurde ein WST-1-Proliferationstest durchgeführt. Bereits 1 μM Podoverin A führte zu einer dramatischen Inhibition der Proliferation. Im Vergleich zu DMSO reduzierte sich die Gesamtzellzahl auf weniger als 40%. Der maximale Effekt schien bei 10 μM mit einem Wert von 20% Gesamtzellzahl im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen erreicht worden sein (Abbildung 23).

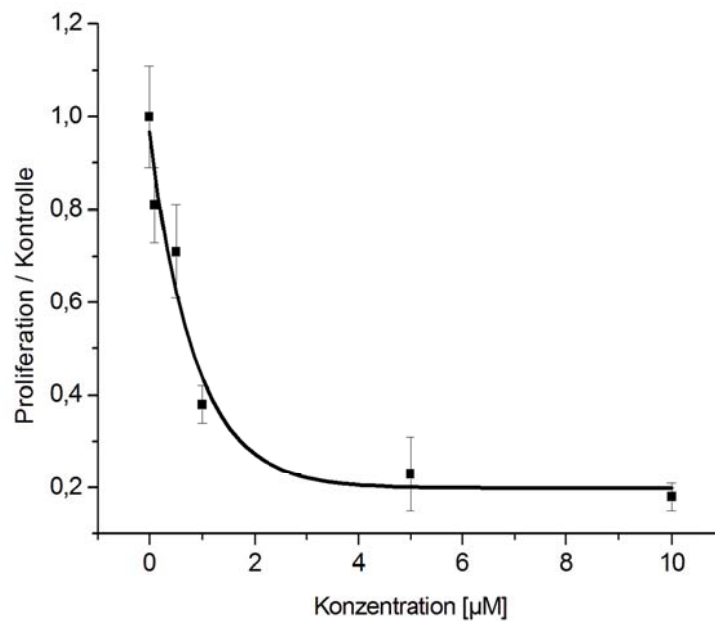


Abbildung 23: WST-1 Proliferationstest von HeLa Zellen nach Behandlung mit Podoverin A. HeLa Zellen wurden auf 96 Lochplatten ausgesät und mit DMSO sowie verschiedenen Konzentrationen von Podoverin A für 48h behandelt. Nach Zugabe des Farbstoffes WST-1 wurde die Absorption der Proben bei 450 nm ermittelt und die Werte der Ansätze mit Podoverin A auf die DMSO-Werte normiert.

5.2 Biologische Charakterisierung von Spirooxindolen

Spirooxindole bilden eine Klasse von Verbindungen mit interessanter und vielfältiger biologischer Aktivität [194]. Dieses gilt für die Naturstoffe ebenso wie für die Derivate synthetisierter Verbindungen. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Wirkung von Substanzen, die die Dynamik der $\alpha\beta$ Tubulin-Polymerisation inhibieren und zu einem mitotischen G2/M-Arrest in mehreren eukaryotischen Zelllinien führen, z.B. Spirotryprostatin B (Abbildung 24) [195-197]. Außerdem sind einige synthetische Derivate wie Substanz **p53 A** (Abbildung 24) als Inhibitoren der p53/MDM2-Interaktion charakterisiert worden (siehe 1.2.1 und 1.2.2) [102].

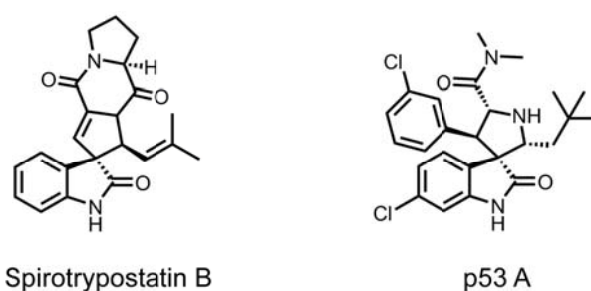


Abbildung 24. Beispiele bioaktiver Spirooxindole.

Aufgrund der bekannten inhibitorischen Wirkung der Spirooxindole auf den eukaryotischen Zellzyklus wurden 39 von Dr. Andrey Antonchick synthetisierte Spirooxindole auf ihre mögliche Bioaktivität getestet.

Der BSC-1 Phänotyp-Assay (siehe 5.1.1) wurde als validierter Startpunkt gewählt, um mehrere Verbindungen zügig zu testen und die Frage zu beantworten, ob in dieser Substanzbibliothek etwaige Inhibitoren des Zellzyklus enthalten sind. Die BSC-1 Zellen wurden mit 30 μM der Testsubstanzen und 1 μM Nocodazol als Positivkontrolle inkubiert. Nach fluoreszenzmikroskopischer Analyse der Bilddaten führte unter den untersuchten 39 Verbindungen ausschließlich die Substanz **6k** zu einem veränderten BSC-1 Phänotyp (Abbildung 25A). Hierbei waren viele Zellen abgerundet und die DNA lag in kondensierter Form vor (Abbildung 25B). Dieser Effekt ließ sich mit einem eventuell induzierten mitotischen Arrest und Apoptose korrelieren und war somit für weitere Untersuchungen als sehr interessant zu bewerten.

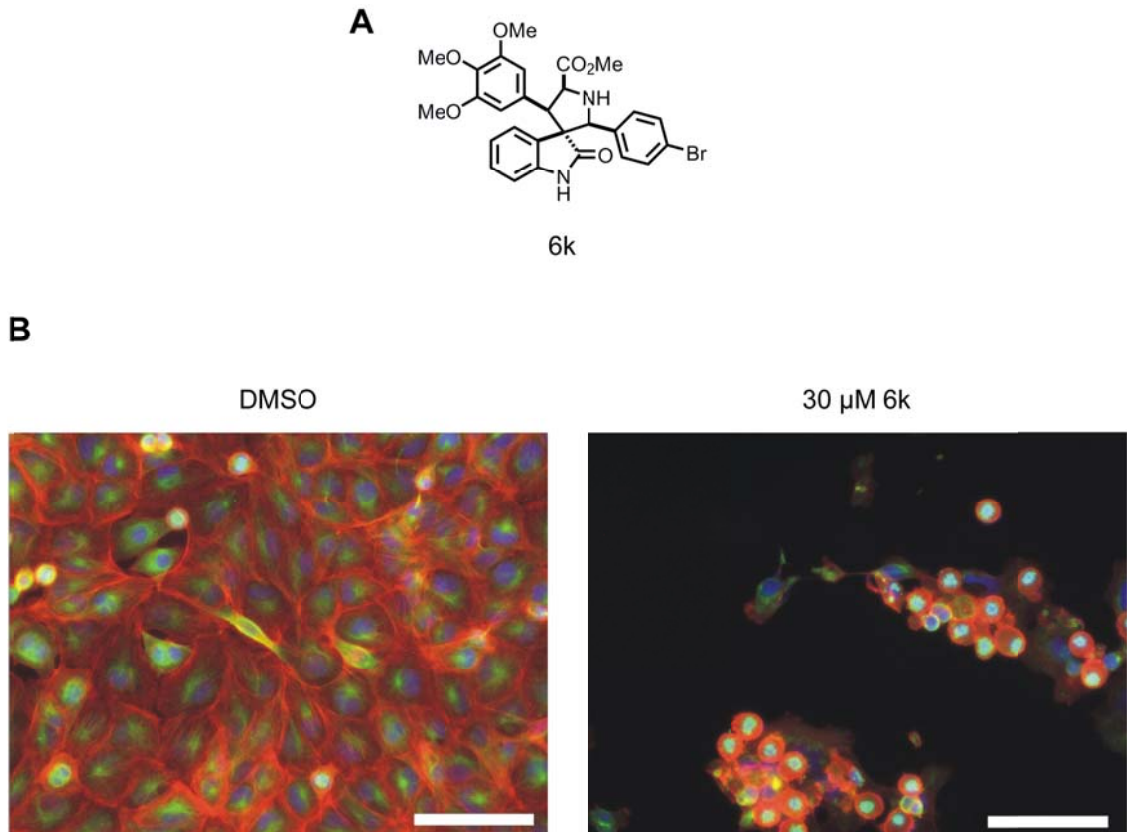


Abbildung 25 Der Effekt von 6k auf den Phänotyp von BSC-1 Zellen. **A.** Die chemische Struktur von 6k. **B.** Die Identifikation von 6k durch High Content Screening in BSC-1 Zellen. BSC-1 Zellen wurden mit 6k oder DMSO für 20 h behandelt. Aktinfilamente (rot; TRITC-Phalloidin), α Tubulin (grün; anti- α -tubulin-FITC) und DNA (blau; DAPI) wurden histochemisch visualisiert. Maßstab Balken: 50 μ m

Das Racemat 6k wurde von Dr. Andrey Antonchick in seine Enantiomere **(+)-6k** und **(-)-6k** aufgetrennt, um deren biologische Eigenschaften in der Folge unabhängig voneinander charakterisieren zu können.

5.2.1 Der Einfluss von 6k auf den eukaryotischen Zellzyklus

Zur Bestätigung des antimitotischen Effektes von 6k wurden diverse Zelllinien mit den Enantiomeren **(-)-6k** und **(+)-6k** und Nocodazol oder DMSO als Kontrollen behandelt und der DNA-Gehalt der Zellen mittels FACS bestimmt. 10 μ M des Wirkstoffes **(-)-6k** induzierten einen praktisch vollständigen G2/M Arrest in allen untersuchten Zelllinien, der vergleichbar mit dem Effekt von 1 μ M Nocodazol war. Hingegen wies **(+)-6k** keine Aktivität auf, wie der Vergleich mit der Negativkontrolle DMSO zeigte (Tabelle 5). Des Weiteren fiel ein erhöhter prozentualer Anteil an Zellen mit fragmentierter DNA (<2n) nach Behandlung mit **(-)-6k** in den untersuchten Zelllinien auf, was den Eindruck einer induzierten Apoptose verstärkte. Insbesondere in HeLa-Zellen wies **(-)-6k** große Effektivität auf. Hier reichten 2 μ M des Wirkstoffes aus, um eine signifikante Anzahl an Zellen in der G2/M-Phase anzuhalten (Abbildung 26). Bemerkenswert war außerdem, dass **(-)-6k** sowohl zu einem G2/M-Arrest in p53 exprimierenden HCT-116

5. Ergebnisse

p53+/+ Zellen, als auch in den p53 negativen HCT-116 p53-/- Zellen führte, was einen p53-unabhängigen Effekt der Substanz als wahrscheinlich erschienen ließ.

Tabelle 5. Analyse des Zellzyklus eukaryotischer Zelllinien nach Behandlung mit den Enantiomeren (-)-6k und (+)-6k. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellpopulation in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. DMSO zeigt die Normalverteilung an und 1 µM Nocodazol bildet die Positivkontrolle für einen G2/M-Arrest; 2n = einfacher Chromosomensatz, der jeweiligen Zelllinie.

| | < 2n | G1 (2n) | G2/M (4n) | > 4n | Zelllinie |
|----------------|------|---------|-----------|------|---------------|
| DMSO | 0,8 | 23,9 | 29,6 | 46,9 | HCT116 p53+/+ |
| 1 µM Nocodazol | 1,8 | 4,3 | 56,2 | 35,1 | |
| 10 µM (-)-6k | 3,8 | 7,7 | 58,4 | 30,1 | |
| 10 µM (+)-6k | 0,7 | 22,8 | 30,8 | 46,6 | |
| DMSO | 1,0 | 35,5 | 38,8 | 25,0 | HCT116 p53-/- |
| 1 µM Nocodazol | 2,0 | 5,8 | 53,5 | 38,9 | |
| 10 µM (-)-6k | 9,4 | 5,5 | 49,6 | 34,9 | |
| 10 µM (+)-6k | 1,0 | 35,9 | 37,8 | 25,6 | |
| DMSO | 0,6 | 49,2 | 28,0 | 22,5 | BSC-1 |
| 1 µM Nocodazol | 3,2 | 8,7 | 65,7 | 22,3 | |
| 10 µM (-)-6k | 14,7 | 8,8 | 53,0 | 22,3 | |
| 10 µM (+)-6k | 0,7 | 51,8 | 28,6 | 19,4 | |
| DMSO | 1,4 | 37,1 | 28,3 | 32,5 | HeLa |
| 1 µM Nocodazol | 2,0 | 2,5 | 63,0 | 32,5 | |
| 10 µM (-)-6k | 2,7 | 6,0 | 60,0 | 31,1 | |
| 10 µM (+)-6k | 1,7 | 34,6 | 28,4 | 32,0 | |

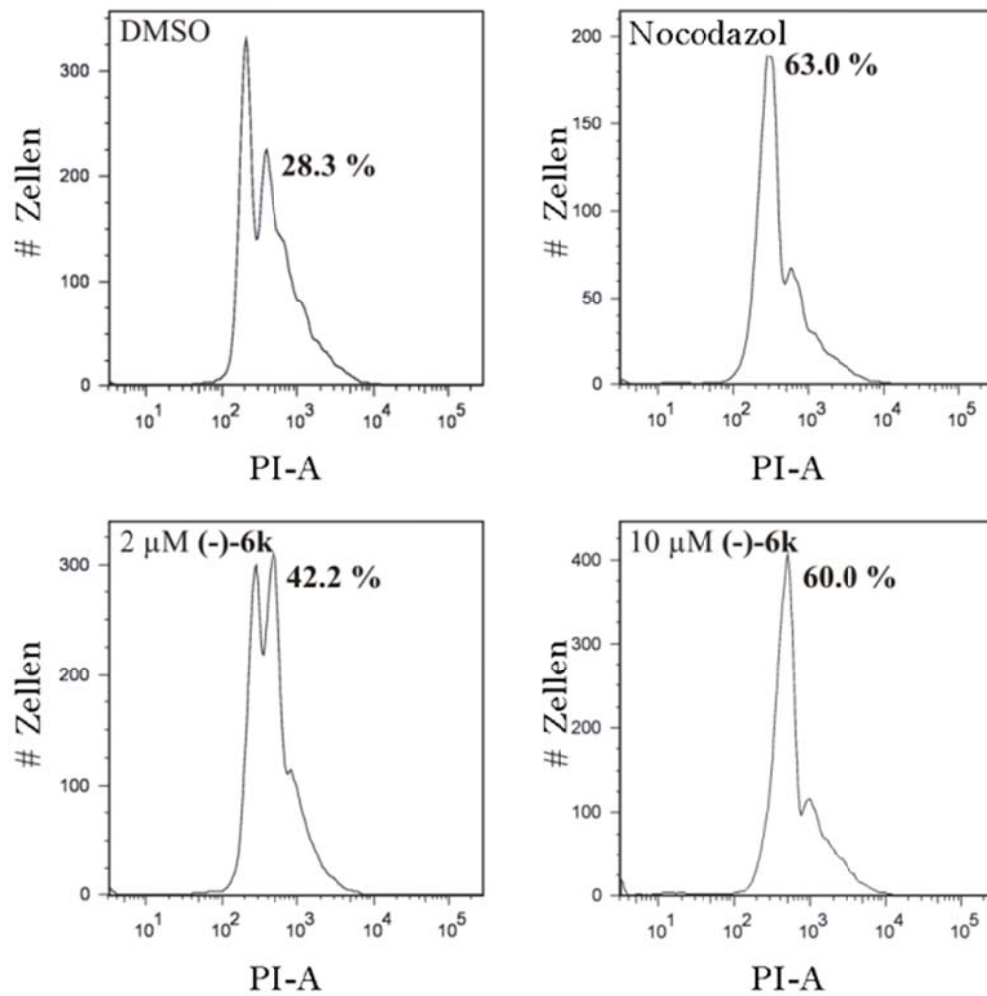


Abbildung 26. FACS-Analyse des Zellzyklus von HeLa Zellen nach Behandlung mit Enantiomer (-)-6k und DNA-Färbung mit Propidiumiodid (PI). Gezeigt ist die Auftragung der Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität von PI (PI-A). In dem Histogramm der Negativkontrolle sind zwei Maxima zu erkennen. Die erste Spitze zeigt hierbei die Anzahl an Zellen in der G1-Phase, während das zweite Maximum die Anzahl der mitotischen Zellen mit prozentualer Angabe gemessen an der Gesamtzellzahl beschreibt. Nocodazol wurde als Positivkontrolle für G2/M-Arrest verwendet.

5.2.2 Die Wirkung von 6k auf die p53/MDM2-Interaktion

Um zu testen, ob (+)-6k und (-)-6k die Wirkung bekannter bioaktiver Spirooxindole teilen, indem sie die p53/MDM2-Proteininteraktion inhibieren, wurde ein ELISA-Testsystem etabliert. Zunächst wurde eine Standardreihe mit verschiedenen Konzentrationen des p53/MDM2-Komplexes gemessen, um die optimale Konzentration für die Testung der Substanzen zu ermitteln. Nach der Bildung des p53/MDM2-Proteinkomplexes aus 1 μ g/ml p53 und 0,33 μ g/ml MDM2 wurden die verschiedenen Verdünnungen der Standardreihe angesetzt. Es folgte die Detektion des Proteinkomplexes mittels des ELISA-Systems bei 450 nm. Bis zu einer

Konzentration von 50 ng/ml p53 war eine konzentrationsabhängige Zunahme der des Komplexes detektierbar (Abbildung 27).

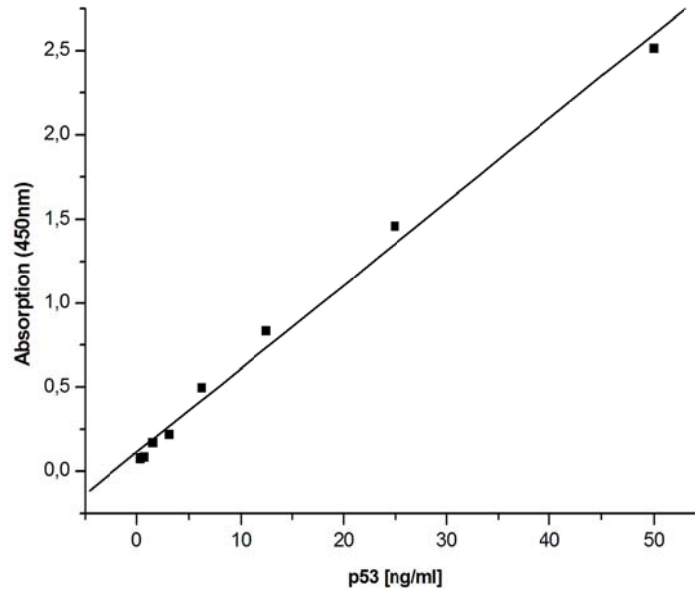


Abbildung 27. Standardgerade des p53/MDM2-Komplexes.

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Konzentration von 12,5 ng/ml p53 als ökonomisch sinnvoll erachtet. Unter diesen Bedingungen wurde das inhibitorische Potential von **(+)-6k** und **-(-6k)** auf die Komplexbildung von p53 und MDM2 im Vergleich zu DMSO untersucht. Hierzu wurde zunächst der Proteinkomplex gebildet und daraufhin die Testsubstanzen hinzugefügt. Die bekannten Inhibitoren der p53/MDM2-Proteininteraktion Nutlin-3 [106] und Verbindung **p53 A** (Abbildung 24) fungierten als Positivkontrollen. Abbildung 28 zeigt, dass sowohl Nutlin-3 als auch Substanz **p53 A** zu einer starken Abnahme der p53/MDM2 Interaktion führten. Durch die Bestätigung der beiden p53/MDM2-Inhibitoren durch das ELISA-System war dieser Testansatz als etabliert zu bewerten. Jedoch führten weder Verbindung **(+)-6k** noch **(-)-6k** zu einer signifikanten Veränderung der Komplexbildung. Nachdem bereits die Analysen des Zellzyklus von p53-positiven und p53-negativen HCT-116 Zellen einen p53-unabhängigen Effekt von **(-)-6k** nahelegten (Tabelle 5), bestätigten die Ergebnisse des ELISA-Systems schließlich, dass die zelluläre Wirkung von **(-)-6k** nicht durch eine Inhibition des p53/MDM2 Komplexes erklärbar war.

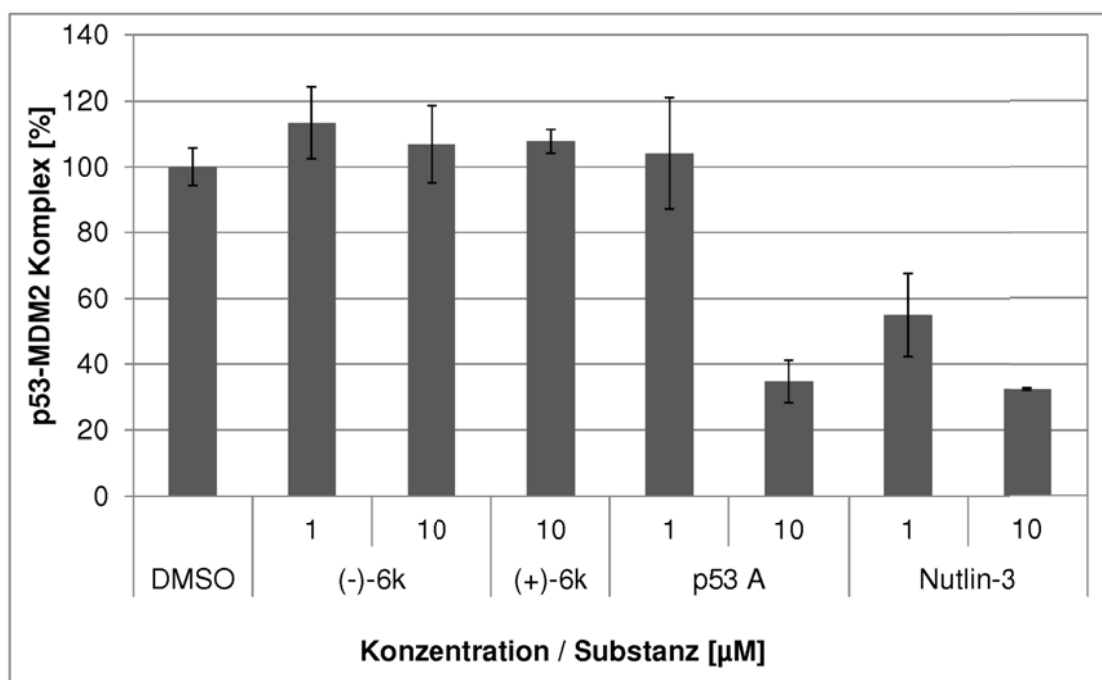


Abbildung 28 Effekt von (+)-6k und (-)-6k auf die p53/MDM2-Komplexbildung. Dargestellt ist der Einfluss der Testsubstanzen (1 μM und 10 μM) auf die p53/MDM2-Komplexbildung in Prozent mit Standardabweichung im Vergleich zu einem mit DMSO behandelten Kontrollansatz (n=4). Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Messungen.

5.2.3 Studien zur Wirkung von 6k auf Mikrotubuli und Mitose

Um eventuelle Anomalitäten des MT-Zytoskelettes nach Behandlung mit **6k** zu untersuchen, wurden fluoreszenzmikroskopische Studien mit BSC-1 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden BSC-1 Zellen mit den Verbindungen **(-)-6k** und **(+)-6k** für 20 Stunden inkubiert und MT und DNA durch Immunfluoreszenz visualisiert. Die mikroskopische Auswertung zeigte eine klare Veränderung des MT-Zytoskelettes von BSC-1 Zellen nach Behandlung mit 10 μM **(-)-6k**. (Abbildung 29). Insgesamt wies das MT-Zytoskelett eine geringere Ausprägung auf. Die wenigen MT waren unorganisiert verteilt, und eine typisch radiale Ausrichtung vom Zellkern zur Zellperipherie wie bei mit DMSO behandelten Zellen war nicht erkennbar. Auffällig war außerdem die uneinheitliche Morphologie des Zellkerns vieler Zellen, was auf eine mögliche chromosomale Fehlverteilung hindeutete. Die beschriebenen Auswirkungen in BSC-1 Zellen waren bereits in geringerem Ausmaß nach Behandlung mit 2 μM **(-)-6k** erkennbar. Hingegen führte die Verbindung **(+)-6k** zu keinerlei derartigen Effekte.

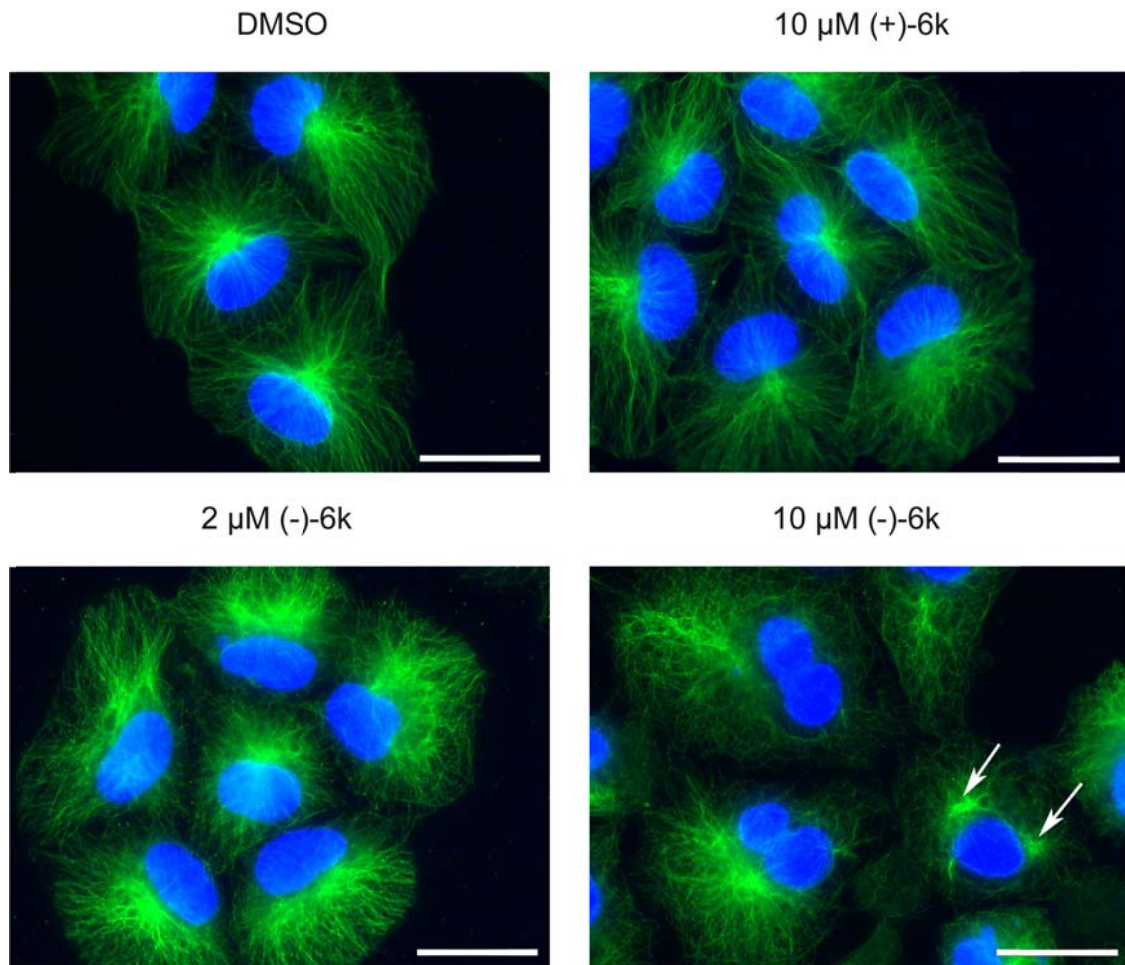


Abbildung 29 Die Wirkung von (+)-6k und (-)-6k. auf das MT-Zytoskelett. BSC-1 Zellen wurden für 20 h mit (+)-6k und (-)-6k behandelt. Das MT-Zytoskelett (grün, Anti- α -Tubulin Primärantikörper und Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488) und die DNA (blau, DAPI) wurden visualisiert. Die Pfeile weisen auf 2 MTOCs. Maßstabbalken: 20 μ m.

Aufgrund der starken Wirkung von (-)-6k auf die Ausprägung und Organisation des MT-Zytoskelettes in Verbindung mit dem von der Substanz induzierten G2/M-Zellzyklusarrest stellte sich die Frage, ob die Substanz als ein direkter Modulator der $\alpha\beta$ -Tubulin-Polymerisation wirkt. Verbindung 6k wurde daher in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas U. Mayer (Universität Konstanz) in einem *in vitro*-Tubulin-Polymerisationsassay untersucht [162] (Abbildung 30). Während 1 μ M Nocodazol die Polymerisation von $\alpha\beta$ -Tubulin signifikant verringerte, führten diverse Konzentrationen von 6k bis zu 50 μ M zu keiner Veränderung der Tubulin-Polymerisation.

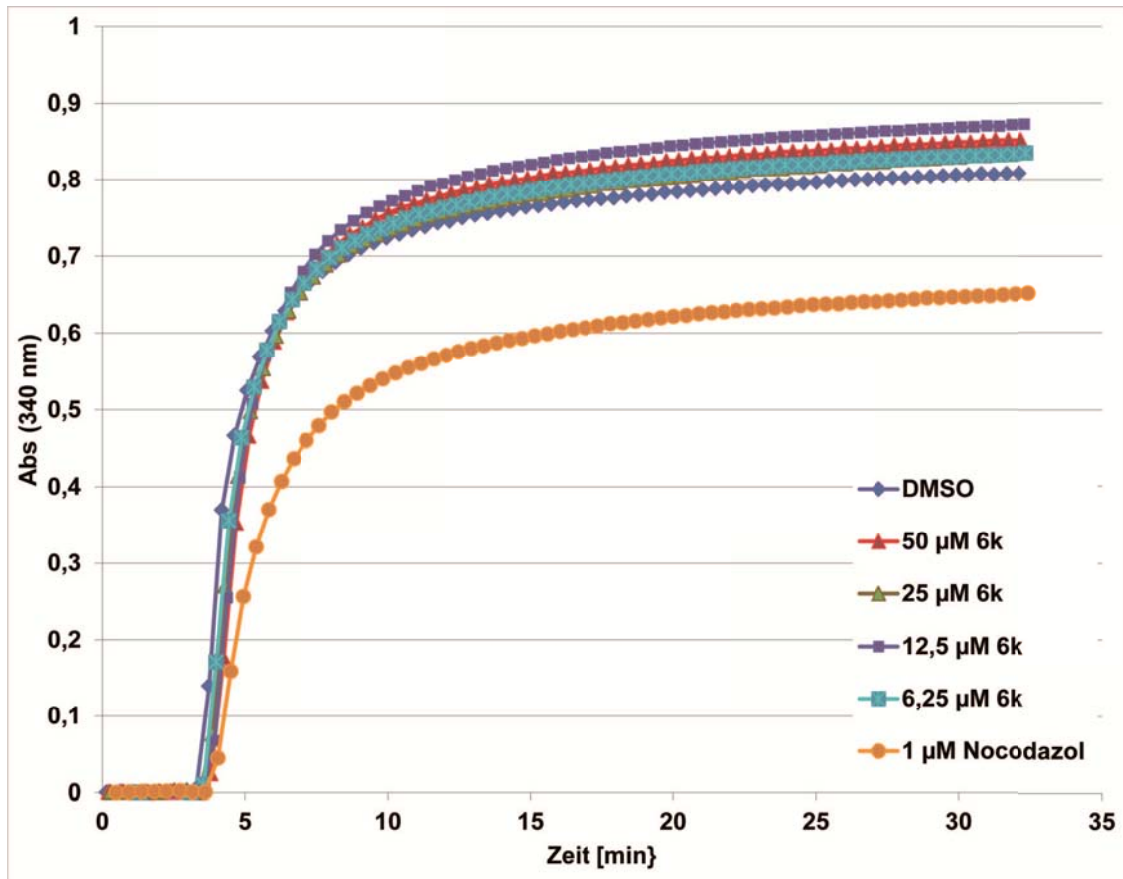


Abbildung 30 Einfluss von 6k auf die *in vitro* Tubulin-Polymerisation. Aus Schweinehirn isoliertes $\alpha\beta$ Tubulin wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von 6k oder DMSO und Nocodazol als Kontrolle bei 30°C nach Zugabe von GTP und Glutamat polymerisiert. Die zeitabhängige Polymerisation wurde bei 340 nm gemessen.

Um zu testen, ob **(-)-6k** im zellulären Kontext als ein Modulator der MT-Dynamik wirkt, wurden BSC-1 Zellen mit **(-)-6k** behandelt und der Einfluss des Wirkstoffes auf die MT-Repolymerisation in Zellen nach Kältebehandlung fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Hierfür wurden BSC-1 Zellen mit den beiden Enantiomeren von **6k** und DMSO als Referenz behandelt. Die am MTOC beginnende Repolymerisation der MT wurde in mit DMSO und mit **(+)-6k** behandelten Zellen bereits nach einer Minute beobachtet, und das MT-Zytoskelett war nach 10 min praktisch komplett wiederhergestellt. (Abbildung 31 und Abbildung 55, siehe Anhang). Behandlung der Zellen mit **-(-6k)** hingegen führte zu einer Modulation dieses Prozesses auf zwei Ebenen. So ging die Repolymerisation von mehreren Stellen aus (räumliche Modulation) und sie war stark verzögert (zeitliche Modulation). Erst nach 15 min war ein unorganisiertes MT-Netzwerk ausgebildet. Des Weiteren fiel eine vermehrte Anzahl mehrkerniger Zellen auf.

Diese Ergebnisse zeigten eine durch **(-)-6k** hervorgerufene dramatisch gestörte Organisation der Tubulin-Polymerisation in Zellen. Zur Untersuchung, inwiefern die

fehlerhafte MT-Organisation den mitotischen Spindelapparat beeinflusst, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas U. Mayer der Phänotyp mit **(-)-6k** behandelte HeLa-L-Zellen während der Mitose studiert. Nach der Inkubation der Zellen mit beiden Enantiomeren erfolgte die Visualisierung von DNA und MT für die mikroskopische Auswertung. In den mit DMSO und **(+)-6k** behandelten HeLa-L Zellen waren in den verschiedenen mitotischen Phasen klare bipolare Spindeln erkennbar und die Zellteilung verlief ordnungsgemäß. Hingegen bewirkten 7,5 µM des Wirkstoffes **(-)-6k** eine Arretierung mehrerer Zellen in der Prometaphase der Mitose. Aufgrund der Bildung multipolarer Spindeln war die Organisation des Spindelapparates hierbei hochgradig gestört. In diesem Prozess kam es vermutlich zu einer chromosomalen Fehlverteilung.

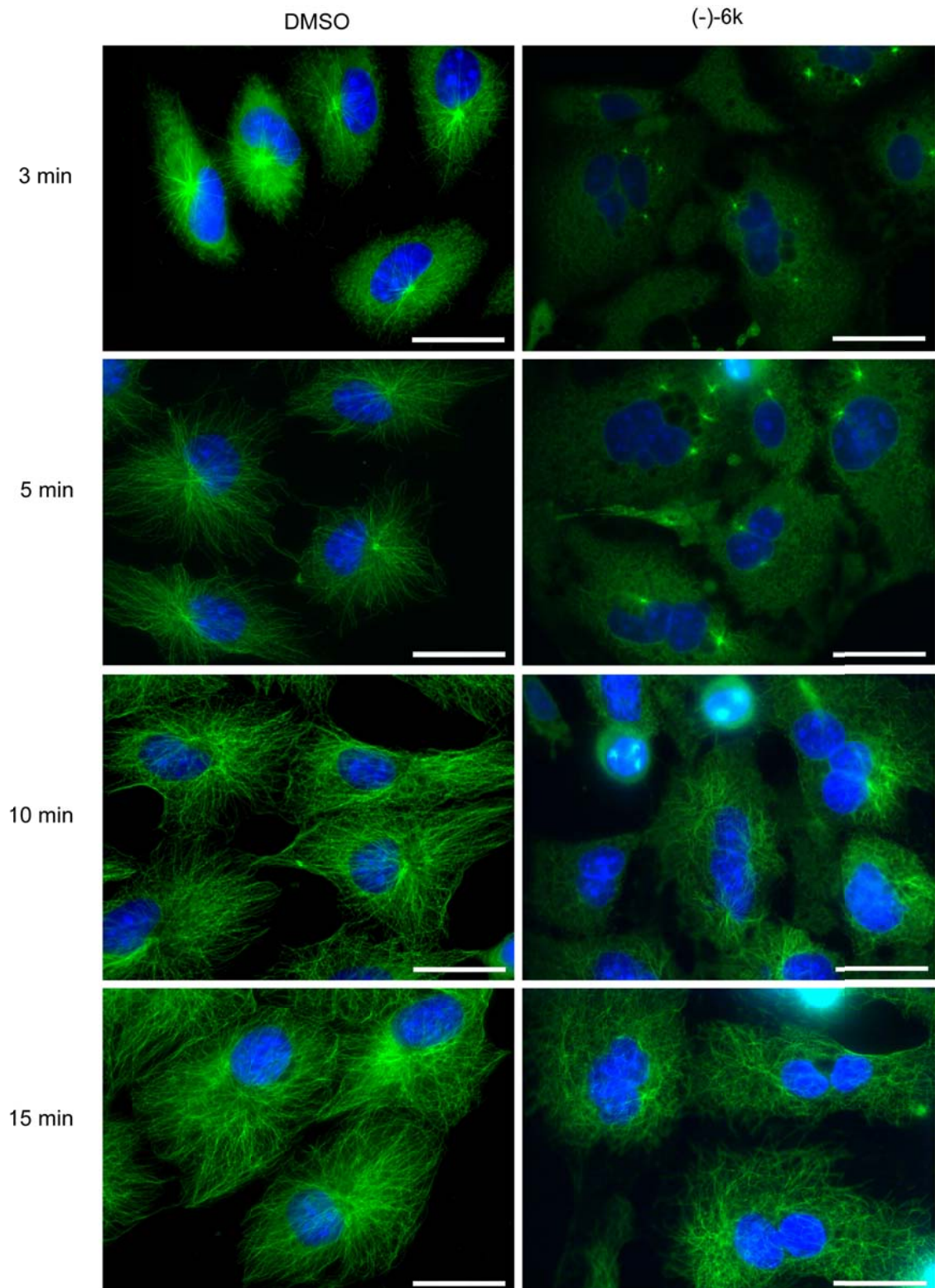


Abbildung 31: MT-Repolymerisation nach Kältebehandlung in BSC-1 Zellen. BSC-1 Zellen wurden für 20 Stunden mit (-)-6k oder DMSO als Kontrolle behandelt. Die Repolymerisation des MT-Netzwerkes wurde nach Wiedererwärmung der Zellen für die angegebenen Zeitpunkte, Methanol-Fixierung und Färbung der Zellen mit α -Tubulin spezifischem Antikörper (grün; anti- α -Tubulin Primärantikörper und Sekundärantikörper Alexa Fluor[®] 488) fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. DAPI (blau) wurde verwendet, um die DNA zu visualisieren. Maßstabbalken: 20 μ m.

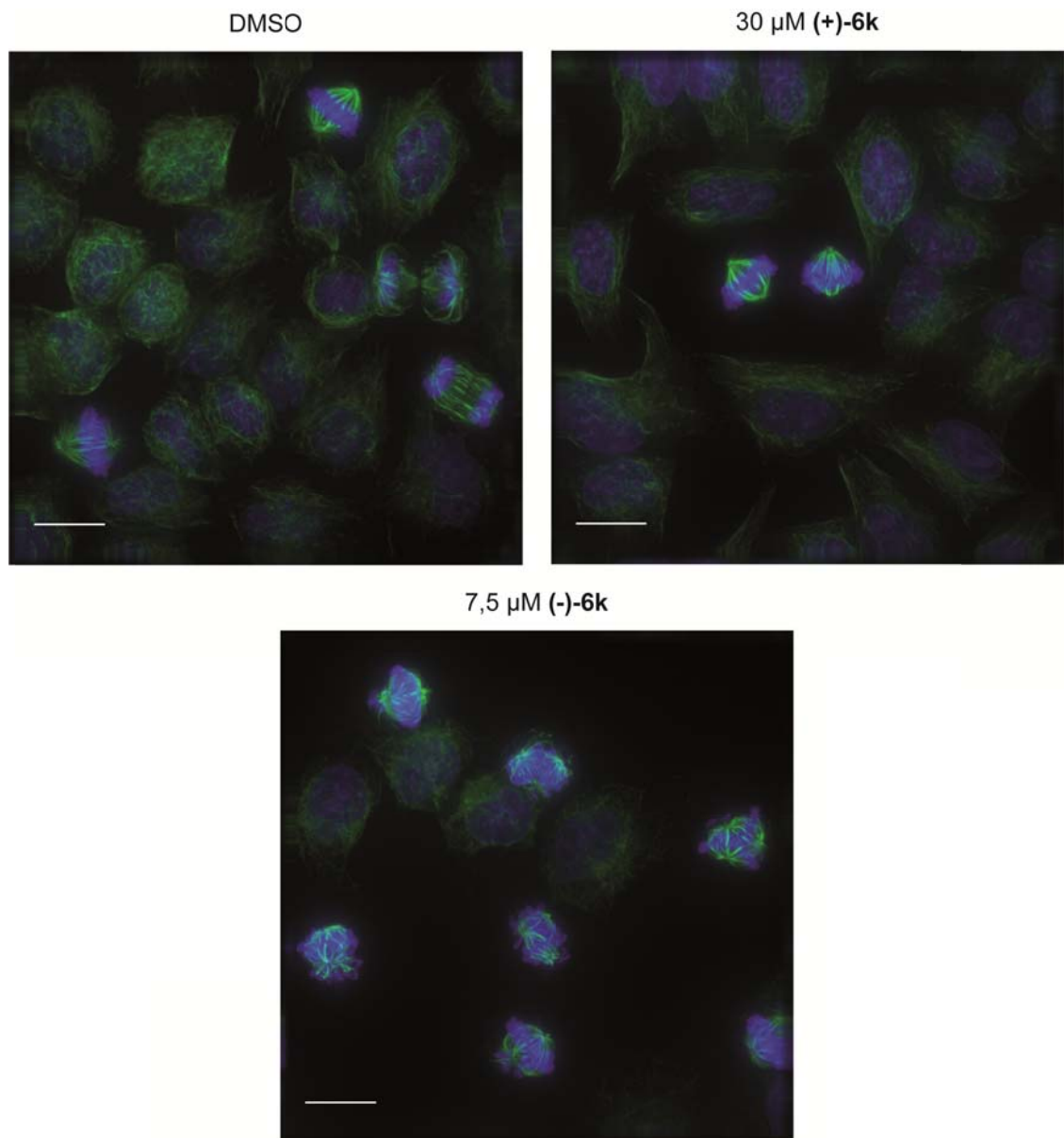


Abbildung 32: Der Phänotyp von HeLa-L Zellen nach Behandlung mit (+)-6k und (-)-6k. HeLa-L Zellen wurden für 20 h mit den Testsubstanzen und DMSO inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit Formaldehyd erfolgte die Anfärbung von Tubulin (grün, anti- α -Tubulin Primärantikörper und Alexa Fluor[®] 488 Sekundärantikörper) und der DNA (blau, DAPI). Die Pfeile zeigen eine Fehlanordnung der Chromosomen während der Mitose. Maßstab Balken: 20 μ m.

5.3 Untersuchung einer Tetrahydropyran-Substanzbibliothek

Tetrahydropyrane (THP) bilden ein Strukturmotiv, welches sich in einer großen Anzahl von bioaktiven Naturstoffen wiederfindet. Die Wirkungen dieser Substanzen umfassen unter anderem eine starke Aktivität gegenüber Tumorzellen im nanomolaren Bereich wie bei Phorboxazol A und B [198]. Auch strukturell weniger komplexe bioaktive Naturstoffe besitzen das THP-Gerüst. So wirkt der Naturstoff Centrolobin antibiotisch gegen den intrazellulären Parasiten *Leishmania amazonensis* im nanomolaren Bereich (GI₅₀ = 77 nM) [199] und bildet die Grundstruktur für weitere auf dieser Struktur aufbauende bioaktive Naturstoffe der Tetrahydropyrane.

Von Dr. Tobias Voigt wurde eine Substanzbibliothek bestehend aus 150 THPs synthetisiert. Die Grundstruktur dieser Substanzen leitete sich von der Struktur des Wirkstoffes Centrolobin ab. Biologische Studien sollten nun zur Identifikation etwaiger antimittotischer Substanzen führen.

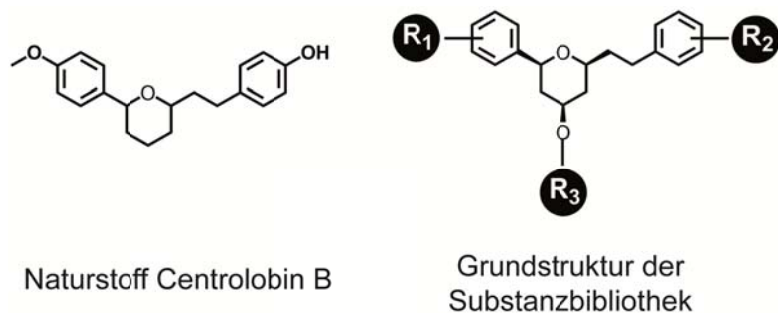


Abbildung 33. Struktur von Centrolobin B und die Grundstruktur der Naturstoff-basierten Substanzbibliothek.

5.3.1 Die Identifikation von Tubulexin A

7 repräsentative Tetrahydropyrane aus der Substanzbibliothek wurden auf etwaige Wirkungen auf den Phänotyp von HeLa Zellen getestet. Hierbei lag der Fokus auf der Identifikation von Substanzen, welche durch eine veränderte Zellmorphologie eine Interferenz mit dem Zytoskelett oder der Mitose suggerierte. HeLa Zellen wurden mit 10 µM der Testsubstanzen behandelt, und eine Immunfluoreszenzanfärbung des Zytoskelettes und der DNA sollte Aufschluss über eine mögliche Veränderung des Phänotyps geben. Der Ansatz war somit der gleiche, wie für den BSC-1 Phänotyp-Screen beschrieben (siehe 5.1.1). Von den 7 getesteten Substanzen führte ausschließlich die Substanz Tubulexin A zu einer Veränderung des HeLa Phänotyps (Abbildung 34). Im Gegensatz zu mit DMSO behandelten Zellen waren nach Behandlung mit 10 µM Tubulexin A die meisten Zellen abgerundet. Bei näherer Beobachtung dieser Zellen waren bipolare Spindeln erkennbar. Diese Ergebnisse erbrachten starke Hinweise, dass Tubulexin A zu einem mitotischen Arrest von HeLa

Zellen führt. Außerdem waren in diesen Zellen Membranbläschen erkennbar, was sich mit der Induktion einer eventuellen Apoptose korrelieren ließ [200].

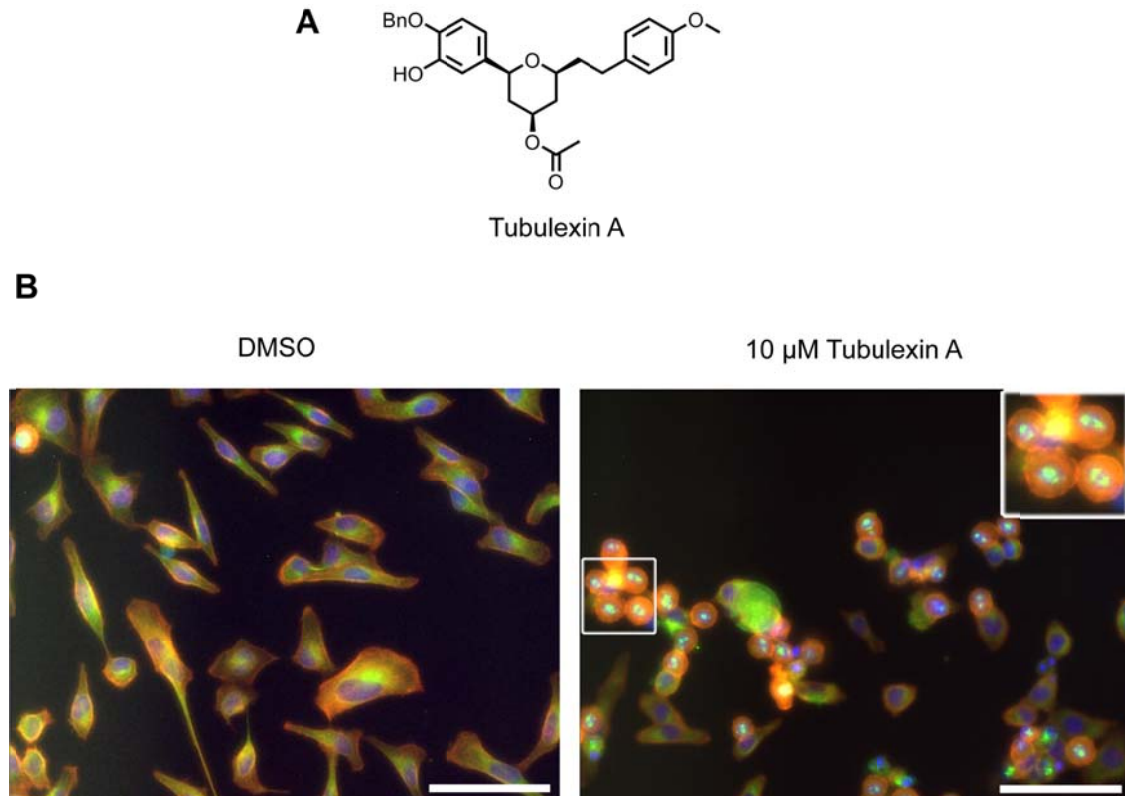


Abbildung 34. Der Effekt von Tubulexin A auf den Phänotyp von HeLa Zellen. **A.** Die chemische Struktur von Tubulexin A. **B.** Der Phänotyp von HeLa Zellen nach Behandlung mit 10 μ M Tubulexin A. HeLa Zellen wurden mit 10 μ M Tubulexin A oder DMSO für 20 h behandelt. Aktinfilamente (rot; TRITC-Phalloidin), α -Tubulin (grün; anti- α -tubulin-FITC) und DNA (blau; DAPI) wurden histochemisch visualisiert. Die Vergrößerung eines Ausschnittes zeigt abgerundete mitotische Zellen mit bipolaren Spindelapparaten und apoptotischen Membranbläschen. Maßstab Balken: 50 μ m.

5.3.2 Die zellulären Effekte von Tubulexin A

Zur Bestätigung des antimittotischen Effektes von Tubulexin A wurden diverse Zelllinien mit Tubulexin A und Nocodazol oder DMSO als Kontrollen behandelt und der DNA-Gehalt der Zellen mittels FACS bestimmt. 10 μ M des Wirkstoffs Tubulexin A induzierten einen praktisch vollständigen G2/M-Arrest in HeLa, BSC-1 und MCF-7 Zellen, der vergleichbar mit der Wirkung von 1 μ M Nocodazol war (Tabelle 5). Die Verteilung der PC-3 Zellen innerhalb der Zellzyklusphasen änderte sich ebenfalls. Hier schien eine Behandlung mit 10 μ M Tubulexin A zu einer relativen Erhöhung der Zellpopulation mit polyploider DNA ($>4n$) zu führen. Diese Wirkung wurde hier ebenso nach Nocodazol-Behandlung beobachtet. Außerdem zeigten die Analysen der verschiedenen Zelllinien einen erhöhten Anteil an toten, möglicherweise apoptotischen Zellen mit fragmentierter DNA nach Tubulexin A Behandlung ($<2n$). Die

5. Ergebnisse

höchste Aktivität wies Tubulexin A in HeLa Zellen auf. Es reichten 2 μM des Wirkstoffes aus, um eine signifikante relative Anzahl an Zellen in der G2/M-Phase zu arretieren (Abbildung 35).

Tabelle 6. Analyse des Zellzyklus nach Behandlung mit Tubulexin A. Dargestellt sind die prozentualen Anteile an Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. DMSO zeigt die Normalverteilung an und 1 μM Nocodazol bildet die Positivkontrolle für G2/M-Arrest; 2n=einfacher Chromosomensatz, der jeweiligen Zelllinie.

| | < 2n | G1 (2n) | G2/M (4n) | > 4n | Zelllinie |
|------------------------------|------|---------|-----------|------|-----------|
| DMSO | 3,8 | 57,8 | 24,3 | 13,0 | HeLa |
| 1 μM Nocodazol | 14,1 | 3,3 | 66,2 | 15,7 | |
| 2 μM Tubulexin A | 10,1 | 41,1 | 35,9 | 11,7 | |
| 10 μM Tubulexin A | 14,8 | 7,2 | 60,0 | 16,3 | |
| DMSO | 0,6 | 49,2 | 28,0 | 22,5 | BSC-1 |
| 1 μM Nocodazol | 3,2 | 8,7 | 65,7 | 22,3 | |
| 2 μM Tubulexin A | 0,5 | 55,3 | 25,3 | 17,9 | |
| 10 μM Tubulexin A | 16,3 | 3,4 | 65,1 | 15,3 | |
| DMSO | 0,1 | 32,3 | 43,6 | 24,2 | PC-3 |
| 1 μM Nocodazol | 1,0 | 7,0 | 46,5 | 45,5 | |
| 2 μM Tubulexin A | 0,4 | 26,1 | 37,0 | 36,5 | |
| 10 μM Tubulexin A | 2,2 | 11,1 | 43,6 | 42,7 | |
| DMSO | 0,9 | 37,4 | 39,3 | 22,2 | MCF-7 |
| 1 μM Nocodazol | 1,5 | 4,5 | 63,6 | 30,2 | |
| 2 μM Tubulexin A | 1,5 | 35,8 | 37,5 | 25,3 | |
| 10 μM Tubulexin A | 7,0 | 10,5 | 60,1 | 22,5 | |

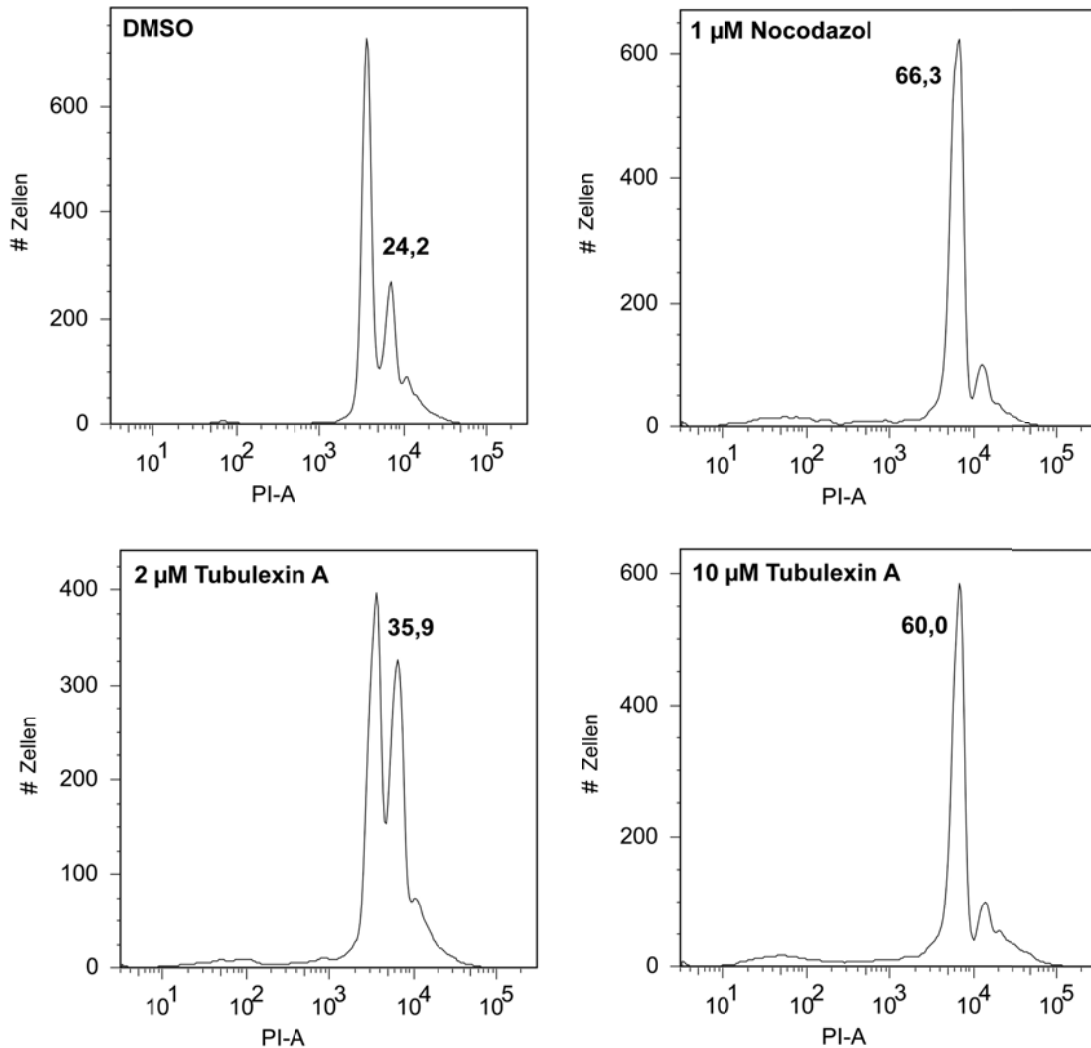


Abbildung 35: FACS-Analyse des Zellzyklus von HeLa Zellen nach Behandlung mit Tubulexin A und DNA-Färbung mit Propidiumiodid (PI). Gezeigt ist die Auftragung der Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität von PI. In dem Histogramm der DMSO-Kontrolle sind klar zwei Maxima zu erkennen. Das erste Maximum zeigt hierbei die Nummer an Zellen in der G1-Phase, während das zweite Maximum die Anzahl der mitotischen Zellen mit prozentualer Angabe gemessen an der Gesamtzellzahl beschreibt.

In der Folge sollte der durch den HeLa Phänotyp und die FACS-Analysen erhaltene Eindruck der Apoptose-Induktion von Tubulexin A bestätigt werden. Die Caspasen 3 und 7 werden im Zuge der Apoptose aktiviert und dienen als Marker für eine apoptotische Zellantwort [156,201-203]. Mittels eines Testsystems kann deren Aktivität detektiert werden. Für diesen Test wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Tubulexin A behandelt und Staurosporin [160,161] diente als Positivkontrolle. Im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen zeigte sich hierbei im gewählten Messbereich ein linearer konzentrationsabhängiger Anstieg der Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 (Abbildung 36). Eine gesteigerte Aktivität zeigte sich

bereits nach Behandlung mit 2,5 μM Tubulexin A, und eine Konzentration von 10 μM Tubulexin A führte zu einem ca. 3,5 fachen Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität in HeLa Zellen.

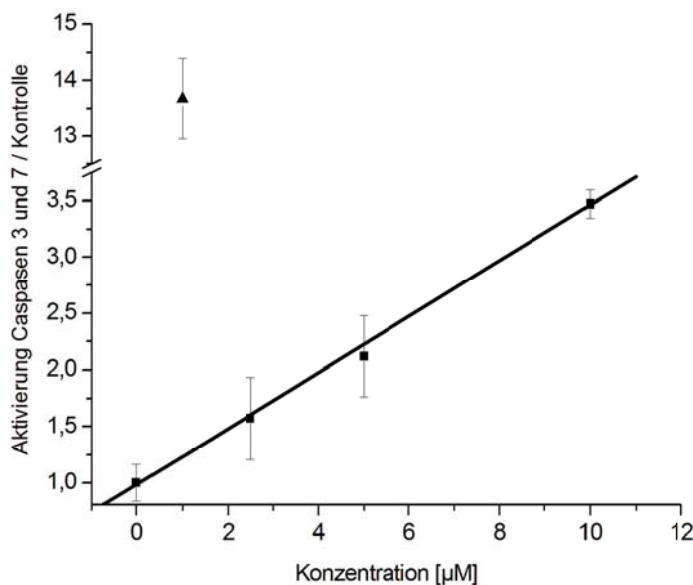


Abbildung 36: Analyse der Aktivität der Caspasen 3 und 7 nach Behandlung mit Tubulexin A. HeLa Zellen wurden für 24 h mit 2,5 μM , 5 μM und 10 μM Tubulexin A (■), 1 μM Staurosporin (▲) oder DMSO behandelt. Die Detektion der Caspase 3/7 Aktivität erfolgte durch das ApoONE® Homogenous Caspase 3/7 System fluorometrisch (Ex/Em 485/535 nm). Nach Normalisierung der Fluoreszenzwerte der DMSO-Kontrolle auf den Wert 1 wurden die Werte der Messproben hierzu ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Messungen und als Durchschnittswerte einer Dreifachbestimmung \pm SD mit einer Ausgleichsgerade angegeben.

Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 zeigte starke Anzeichen einer apoptotischen Antwort der HeLa Zellen auf eine Behandlung mit Tubulexin A. Das nukleare Protein PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) ist eines der zellulären Hauptsubstrate der Caspase 3 [156,202]. Im Zuge einer apoptotischen Zellantwort wird PARP von der Caspase 3 in seine aminoterminal DNA-bindende Domäne und seine carboxyterminale katalytische Domäne gespalten, wodurch der Abbau zellulärer Bestandteile eingeleitet wird [155,156]. Gespaltenes PARP dient somit als ein Markerprotein für apoptotische Zellen [157].

Zur weiteren Bestätigung der von Tubulexin A induzierten Apoptose wurde daher das carboxyterminale Spaltprodukt von PARP nach Behandlung von HeLa Zellen mit Tubulexin A durch einen spezifischen FITC-markierten Antikörper detektiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte, dass die Behandlung von HeLa Zellen mit der Positivkontrolle 1 μM Staurosporin [160,161] zu einer maximalen PARP-

5. Ergebnisse

Aktivität führte, da der Apoptose-Marker praktisch in jeder Zelle detektiert werden konnte (Abbildung 37). Ebenso führten 10 μM des Wirkstoffes Tubulexin A im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle zu einem erhöhten Vorkommen des PARP-Spaltproduktes. Aufgrund des beschriebenen, direkten Zusammenhanges zwischen Caspase 3-Aktivität und zellulärer PARP-Spaltung konnte durch diesen Nachweis indirekt die erhöhte Aktivität der Caspasen 3 und 7 (siehe Abbildung 36) bestätigt werden.

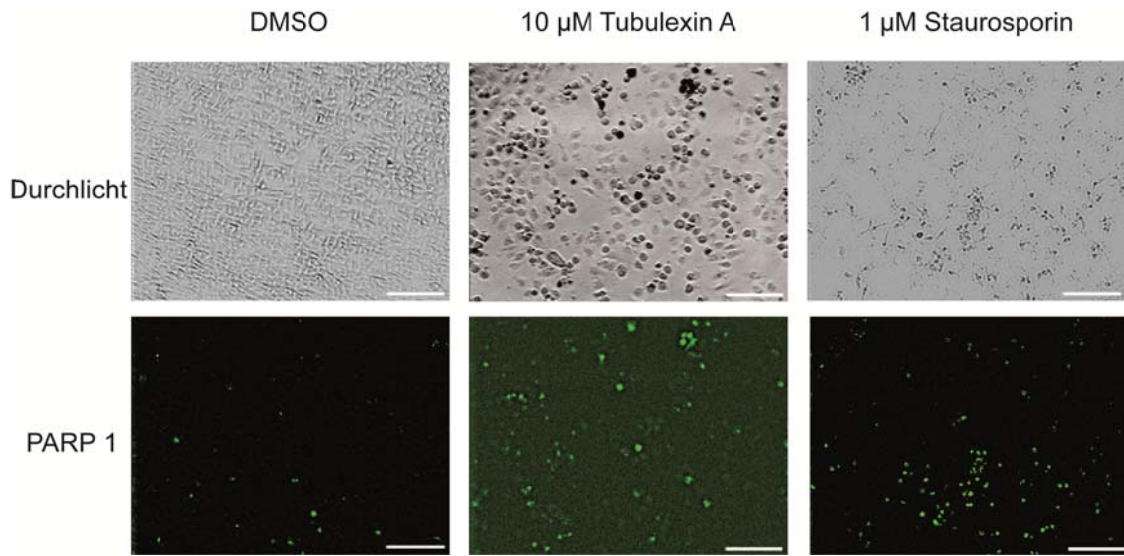


Abbildung 37. Immunfluoreszenz-Analyse der PARP-Spaltung in HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden für 24h mit DMSO, 10 μM Tubulexin A oder 1 μM Staurosporin behandelt, fixiert und gefärbt. Gegenübergestellt sind Phasenkontrastaufnahmen der Zellen mit Fluoreszenzaufnahmen eines FITC-gekoppelten, PARP-Spaltprodukt spezifischen Antikörper. Maßstabbalken: 100 μM

Aufgrund des Verlustes der Membran-Asymmetrie während der Apoptose kann Phosphatidylserin (PS) in apoptotischen Zellen auch an der äußeren Schicht der Plasmamembran detektiert werden [204,205]. Das Protein Annexin V [206,207] bindet PS mit hoher Affinität und kann die Zellmembran nicht passieren [208]. Demzufolge werden nur apoptotische Zellen von Annexin V gebunden. In Kombination mit einem fluoreszierendem zellimpermeablem DNA-Interkalator wie 7-AAD, der ausschließlich in Zellen mit einer geschädigten Zellmembran eindringt, wie es der Fall bei einer Nekrose oder späten Apoptose ist, kann das Verhältnis früh-apoptotischer zu spät-apoptotischer oder nekrotischer Zellen bestimmt werden [206-210]. Daher wurden HeLa Zellen für 16 Stunden mit 10 μM Tubulexin A und DMSO oder 0,5 μM Staurosporin als Kontrolle behandelt, mit PE-Annexin V und 7-AAD angefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Die Analyse der mit Staurosporin behandelten Zellen ergab eine starke relative Erhöhung früh-apoptotischer (T2) und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen (T4) (Abbildung 37). Auch nach Behandlung von

5. Ergebnisse

HeLa Zellen mit 10 μM Tubulexin A zeigte sich eine relative Erhöhung der früh-apoptischen Zellpopulation (T2). Ebenso vergrößerte sich die relative Anzahl der T4 Zellfraktion und somit die Anzahl spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen.

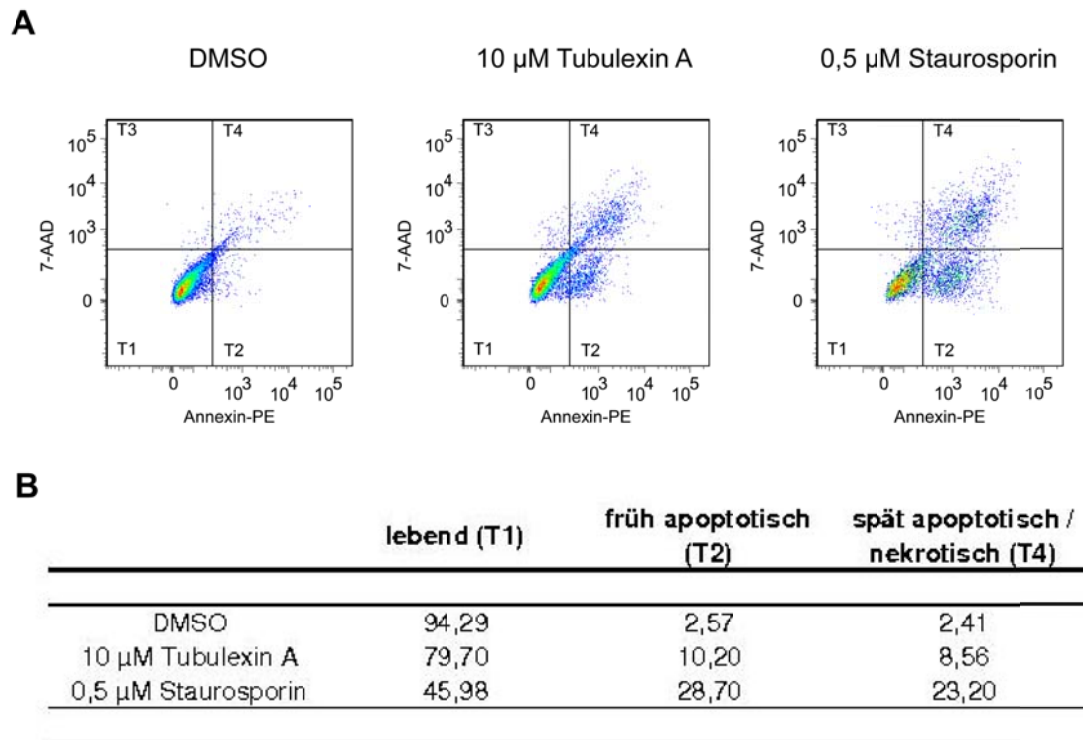


Abbildung 38. Die Wirkung von Tubulexin A auf die zelluläre Annexin V und 7-AAD Bindung A. HeLa Zellen wurden für 16h mit 10 μM Tubulexin A oder DMSO und 0,5 μM Staurosporin als Kontrollen behandelt. Nach Fluoreszenzfärbung mittels PE-Annexin und 7-AAD erfolgte die Sortierung der Zellen mittels FACS. In der Analyse wurden anhand der Färbung der Zellen den Tochterpopulationen T1 bis T4 zugeordnet B. Relative Quantifizierung von lebenden (T1), früh apoptotischen (T2) und spät-apoptotischen (T4) Zellen.

Um eine eventuell von Tubulexin A induzierte Nekrose weiter auszuschließen, wurde die Membranintegrität der HeLa Zellen untersucht. Der Farbstoff Trypan Blau wird ausschließlich von Zellen mit einer beschädigten Membran aufgenommen, wie sie in nekrotischen und spät-apoptotischen Zellen vorkommt [209] und diente als Werkzeug für die Bestimmung der Vitalität von HeLa Zellen. Hierfür wurden HeLa Zellen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Tubulexin A oder DMSO behandelt und nach der Färbung mit Trypan-Blau die Anzahl gefärbter Zellen der Gesamtzellpopulation gegenübergestellt. Bei einer Behandlung von HeLa Zellen mit 30 μM Tubulexin A zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der Proliferationsrate auf weniger als 50% im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (Abbildung 39). Die Vitalität der Zellen sank hierbei nur auf einen Wert von etwa 90%, was zeigte, dass Tubulexin A zu keiner bedeutenden Erhöhung der Nekroserate führte.

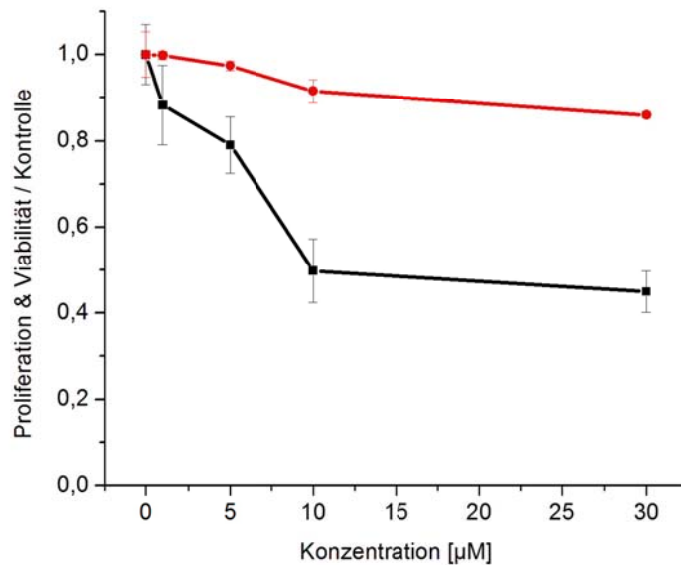


Abbildung 39: Der Einfluss von Tubulexin A auf die Proliferation und Zellviabilität. HeLa Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Tubulexin A oder DMSO behandelt. Viabilität (rot) und Proliferation (schwarz) wurden auf der Basis von Trypan Blau Färbung bestimmt und in Bezug zu DMSO behandelten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Messungen und als Durchschnittswerte einer Dreifachbestimmung \pm SD angegeben.

Die vorstehend beschriebenden Ergebnisse zeigten eine antimitotische und apoptotische Wirkung von Tubulexin A. Da die Aktinfilamente und MT wichtige Funktionen innerhalb der Mitose übernehmen und deren fehlerhafte Funktionen zu mitotischem Arrest und Apoptose führen [111,119] (siehe 1.3), wurde die Wirkung von Tubulexin A auf diese Bestandteile des Zytoskelettes fluoreszenzmikroskopisch an behandelten BSC-Zellen näher untersucht. Zur parallelen Visualisierung von F-Aktin, Tubulin und DNA wurden BSC-1 Zellen zunächst mit DMSO oder 5 μ M Tubulexin A behandelt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte eine durch Tubulexin A herbeigeführte starke Modulation des MT-Zytoskelettes, während der Wirkstoff keinerlei Einfluss auf die Aktinfilamente ausübte (Abbildung 40A). Um die Veränderungen des MT-Zytoskelettes besser darstellen zu können, wurden in der Folge ausschließlich MT und DNA von BSC-1 Zellen nach Behandlung mit Tubulexin A visualisiert, was eine qualitative Verbesserung der erhaltenen Bilddaten ermöglichte. Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Wirkung von Tubulexin A auf das MT-Netzwerk (Abbildung 40B). im Gegensatz zu mit DMSO behandelten Zellen hatte der Wirkstoff schon bei 2 μ M einen Einfluss auf das MT-Netzwerk der BSC-1 Zellen. Bei höheren Konzentrationen von 5 und 10 μ M verursachte Tubulexin A sowohl eine klare Reduktion der Quantität an MT als auch die Auflösung der Organisation des MT-Zytoskeletts. Dieses führte zu einer diffusen Verteilung der

wenigen MT. Außerdem zeigten sich insbesondere bei Konzentrationen von 10 μM starke Anomalien der Morphologie des Zellkerns, da eine Beschädigung seiner Einheitlichkeit und das vermehrte Auftreten mehrkerniger Zellen beobachtet werden konnte.

Zur Untersuchung, ob Tubulexin A mit der zellulären MT-Dynamik interferiert, wurde ein MT-Repolymerisationstest in BSC-1 Zellen durchgeführt. Nach der Behandlung von BSC-1 Zellen mit 10 μM Tubulexin A oder DMSO und Depolymerisation der MT durch Kältebehandlung wurde die Repolymerisation des MT-Zytoskelettes fluoreszenzmikroskopisch in Abhängigkeit von der Zeit analysiert. Die am MTOC startende MT-Repolymerisation wurde im DMSO-Kontrollansatz bereits nach einer Minute beobachtet, und das MT-Zytoskelett war nach 10 min praktisch vollständig wiederhergestellt. Hingegen führte die Behandlung von BSC-1 Zellen mit 10 μM Tubulexin A zu einer kompletten Inhibition der MT-Repolymerisation im gleichen Zeitraum.

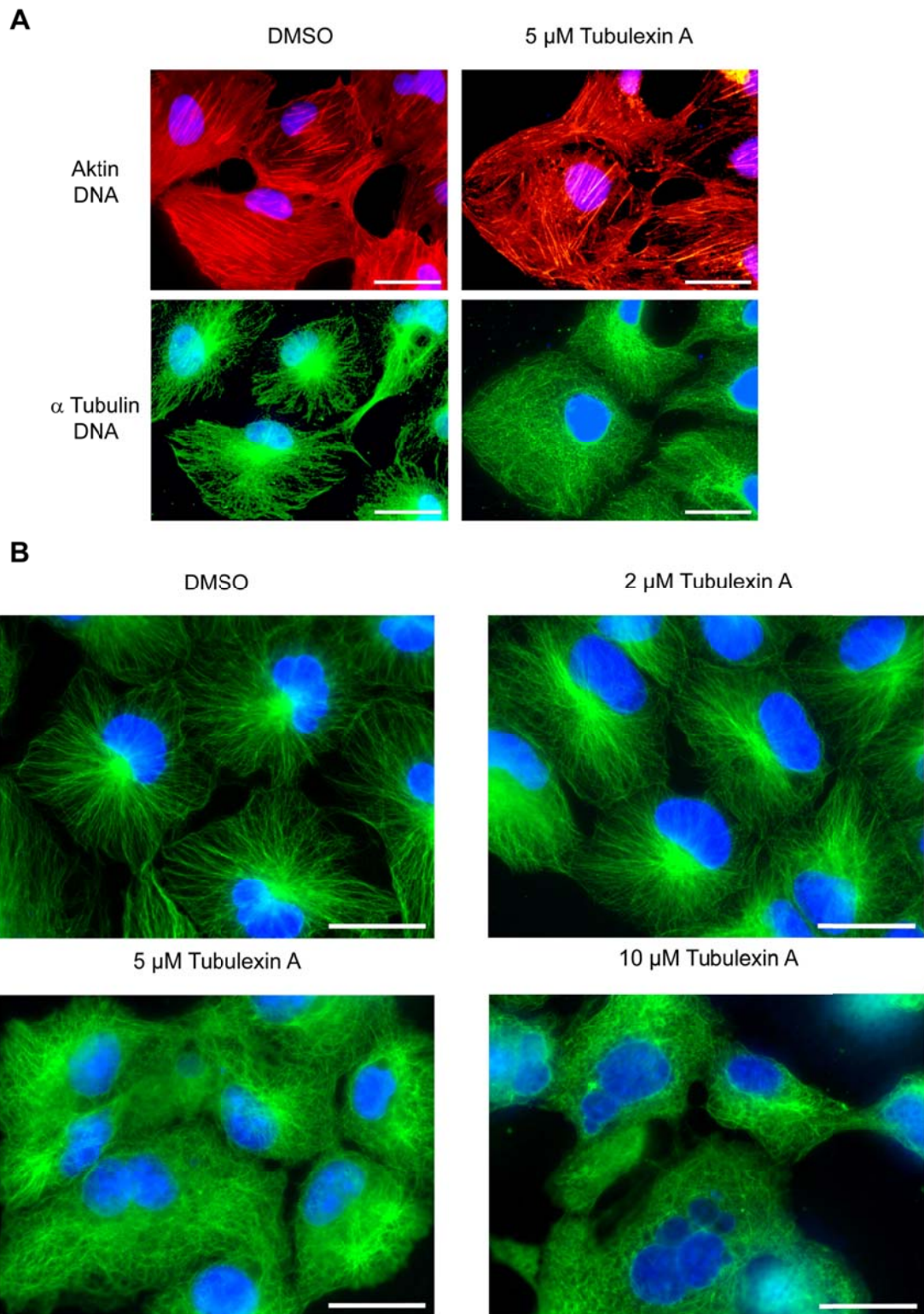


Abbildung 40: Das Zytoskelett von BSC-1 Zellen nach Behandlung mit Tubulexin A. **A.** BSC-1 Zellen wurden 20 h mit 5 μ M Tubulexin A oder DMSO als Kontrolle behandelt. Nach Formaldehyd-Fixierung wurde das MT-Zytoskelett (grün; anti- α -Tubulin Primärantikörper und Sekundärantikörper Alexa Fluor[®] 488), Aktinfilamente (rot; Phalloidin-TRITC) und die DNA (blau; DAPI) visualisiert. Maßstabbalken: 20 μ m. **B.** BSC-1 Zellen wurden 20 h mit 2, 5, 10 μ M Tubulexin A oder DMSO als Kontrolle behandelt. Nach Methanol-Fixierung wurde das MT-Zytoskelett (grün; anti- α -Tubulin Primärantikörper und Sekundärantikörper Alexa Fluor 488[®]), und die DNA (blau; DAPI) visualisiert. Maßstabbalken: 20 μ m.

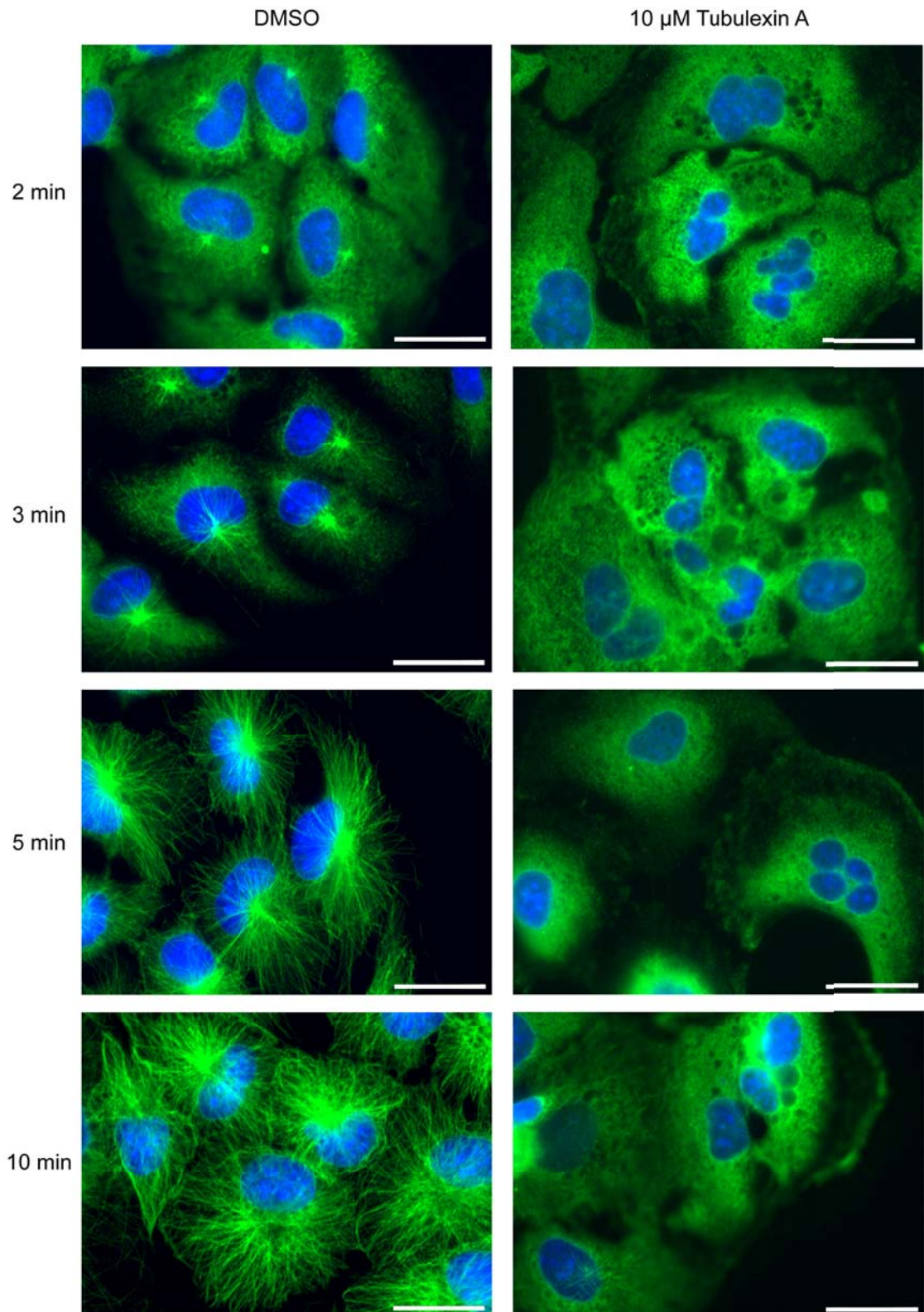
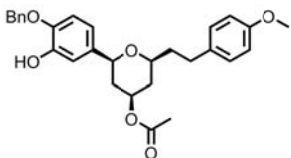
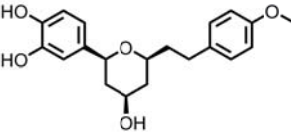
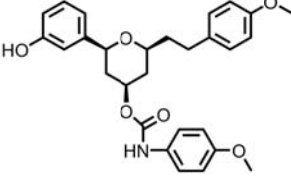


Abbildung 41. MT-Repolymerisation nach Kältebehandlung. BSC-1 Zellen wurden 20 Stunden mit Tubulexin A oder DMSO als Kontrolle behandelt. Die Repolymerisation des MT-Netzwerkes wurde nach Wiedererwärmung der Zellen für die angegebenen Zeitpunkte, Methanol-Fixierung und Färbung der Zellen mit α -Tubulin spezifischem Antikörper (grün; anti- α -Tubulin Primärantikörper und Sekundärantikörper Alexa Fluor 488[®]) fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. DAPI (blau) wurde verwendet, um die DNA zu visualisieren. Maßstabbalken: 20 μ m.

5.3.3 Die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Tetrahydropyrane

Die aus 150 THP bestehende Substanzbibliothek wurde mittels des BSC-1 Phänotyp-Screens zur Identifikation etwaiger weiterer potentiell antimitotischer Substanzen getestet, um in der Folge eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) aufzustellen. Diese im Rahmen der Masterarbeit von Sabrina Bergmann durchgeführten Studien führten zur Identifikation von Tubulexin B und C, deren antimitotischer Phänotyp stark dem von Tubulexin A ähnelte. Im weiteren Verlauf konnte durch die Testung dieser Substanzen in den für die Wirkung von Tubulexin A relevanten zellbasierten Tests gezeigt werden, dass das Wirkprinzip dieser Wirkstoffe mit dem von Tubulexin A übereinstimmt, wobei Tubulexin A insgesamt am potentesten war (Tabelle 7).

Tabelle 7. Vergleich der zellulären Effekte von Tubulexin A, B und C.

| Substanz | Phänotyp BSC-1 [μM] ^[a] | MT- Repolymerisation BSC-1 [μM] ^[b] | Zellzyklus- Arrest [μM] ^[c] | Apoptose [μM] ^[d] |
|---|---|---|---|--|
|  Tubulexin A | 2-5 | 10 +++ | 10 | 5 |
|  Tubulexin B | 3 | 10 ++ | 10 | 10 |
|  Tubulexin C | 10 | 10 ++ | 10 | 10 |

[a] niedrigste Konzentration, bei der BSC-1 Zellen Abnormitäten des MT-Zytoskelettes aufwiesen. **[b]** Konzentration, bei der die MT-Repolymerisation in BSC-1 Zellen nach Kältebehandlung komplett (+++) oder stark (++) inhibiert war. **[c]** Konzentration, bei der praktisch ein kompletter G2/M-Zellzyklusarrest in HeLa Zellen zu beobachten war. **[d]** Konzentration, bei der die Apoptoserate von HeLa Zellen, ermittelt durch Caspase 3/7-Aktivität, mindestens 2fach erhöht war.

Die SAR-Analyse dieser Daten zeigte, dass die drei bioaktiven THPs sowohl an R₂ an para-Position des Phenylringes eine Methoxygruppe als auch in meta-Position des

Phenylsubstituenten an R_1 einen Hydroxylsubstituenten gemeinsam hatten (siehe Abbildung 42) Eine Methylierung dieser OH-Gruppe führte zu Verlust der Bioaktivität (siehe Anhang Tabelle 1; Einträge 1 und 8-12). In para-Position an R_1 waren verschiedene Substituenten möglich (H, OH, OBzl), wobei der Benzylether von Tubulexin A für seine erhöhte Bioaktivität verantwortlich zu sein scheint. Bei dem Substituenten R_3 waren große Variationen wie einen Alkohol, Ester oder Urethan möglich.

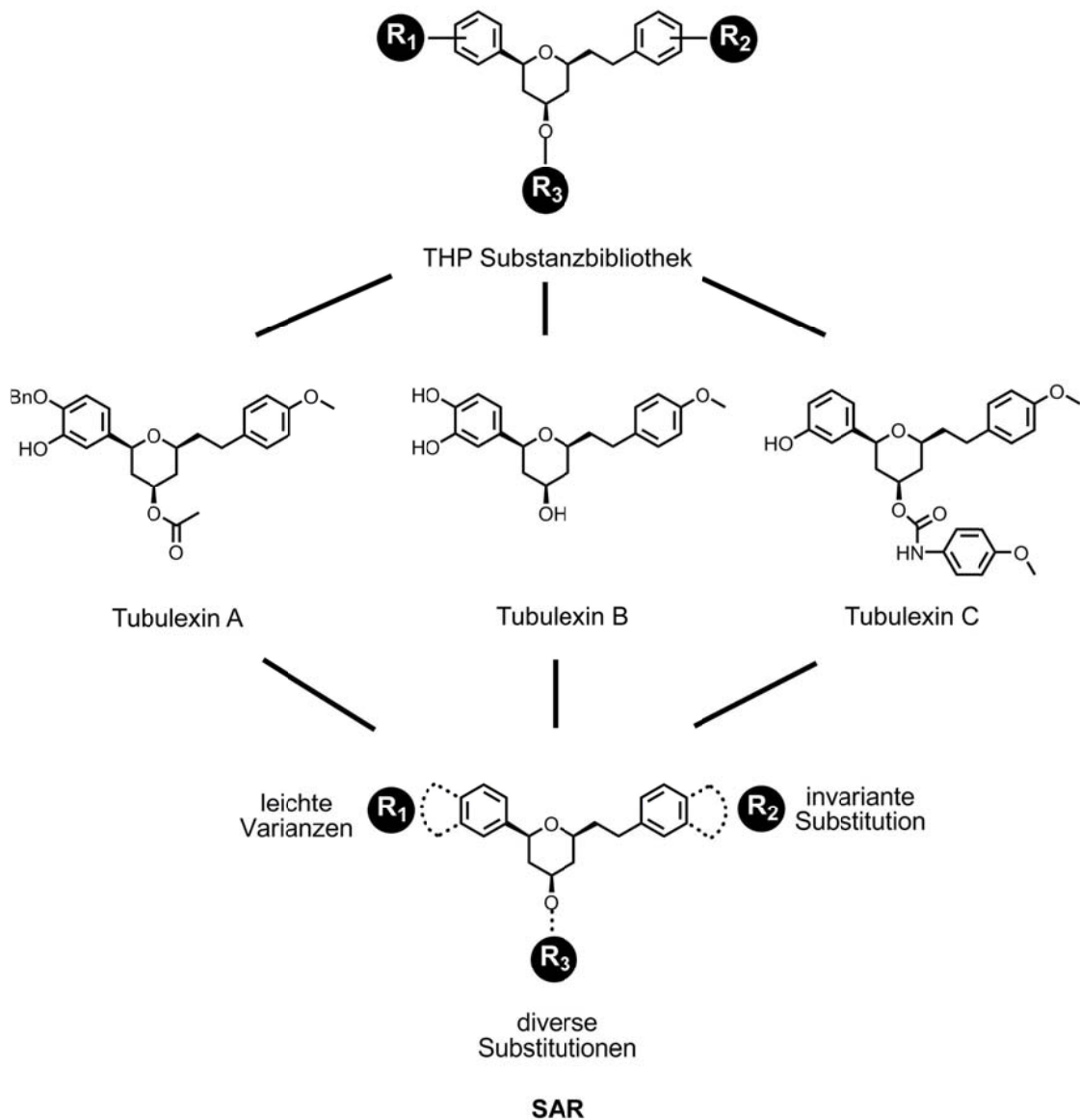


Abbildung 42. SAR der THPs. Während der R_1 -Substituent leicht zwischen den drei Tubulexinen variiert, besitzen alle drei bioaktiven THPs an para-Position als R_2 einen Methoxy-Substituenten. Als R_3 hingegen sind diverse Substitutionen ohne Aktivitätsverlust möglich,

5.3.4 Identifikation der Zielproteine der Tubulexine durch Chemische Proteomik

Zur Identifikation potentieller Zielproteine der Tubulexine wurde unter Verwendung des bioaktivsten Wirkstoffes Tubulexin A und eines inaktiven THP-Derivats der Substanzbibliothek (siehe Tabelle 8; TV_AMS) eine SILAC basierte komparative Affinitätsaufreinigung durchgeführt. Die Synthese der hierfür benötigten Affinitätssonden erfolgte aufgrund der Ergebnisse der SAR-Analyse. Demnach schien eine Substitution an R₃ möglich, weshalb für beide Substanzen an dieser Stelle die Kopplung mit einem Polyethylenglycol (PEG)-Biotin Linker erfolgte. Die auf diese Weise synthetisierten Affinitätssonden **1** und **2** wurden von Dr. Hugo Lachance hergestellt. Sonde **1** zeigte in allen relevanten zellulären Testsystemen stark vergleichbare Bioaktivität zu Tubulexin A, während **2** inaktiv war (Tabelle 8).

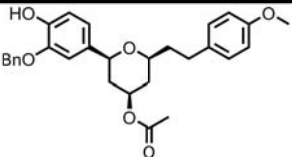
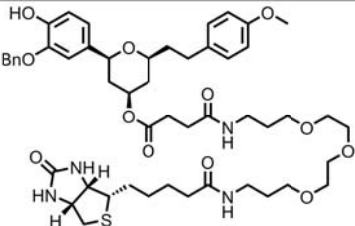
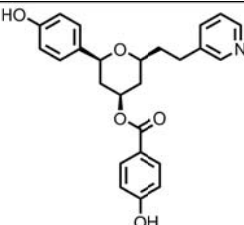
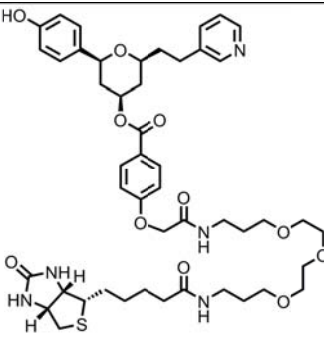
Die SILAC-Markierung der HeLa Zellen wurde für die Aminosäuren Arginin und Lysin durchgeführt. Für die SILAC Markierung wurden HeLa Zellen für 6 Tage mit L-Arginin ¹³C₆, ¹⁵N₄ und L-Lysin ¹³C₆ zum Einbau der AS in das HeLa Proteom inkubiert. Nach der Herstellung von Proteinextrakten, Trypsin-Verdau der Proteine und massenspektrometrischer Analyse konnte der erfolgreiche Einbau der Aminosäuren Arginin ¹³C₆, ¹⁵N₄ und Lysin ¹³C₆ zu ca. 98% in das HeLa Proteom bestätigt werden (persönliche Mitteilung von Frau Dr. Petra Janning). Parallel hierzu wurde unter Verwendung von normalem Arginin und Lysin ein weiterer Proteinextrakt hergestellt. Die SILAC markierten (*heavy*) und die unmarkierten (*light*) Proteinextrakte wurden für die nachfolgende Affinitätsaufreinigung der Bindungsproteine von Tubulexin A verwendet.

Für die Affinitätsaufreinigung wurden die Affinitätssonden **1** und **2** an magnetischen Streptavidin-Partikeln immobilisiert und entweder mit *heavy* oder *light* Proteinextrakt inkubiert. Hierbei wurden zwei doppelte Messfolgen durchgeführt (siehe 4.2.5.1). Die Proteine wurden daraufhin durch Erhitzen in SDS-Probenpuffer bei 95°C für 10 min von den Streptavidinpartikeln getrennt, woraufhin die gebundenen Proteine beider Lysate vereinigt wurden. Daraufhin erfolgte die Trennung der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese und ihre Visualisierung nach Coomassie-Färbung. Die Analyse und Auswertung der Proben erfolgte über tryptischen Verdau mittels Nano-LC-MS/MS. Die Datenbanksuche wurde mittels Mascot durchgeführt. Hierbei ermöglichte das Programm MaxQuant eine relative Quantifizierung der SILAC markierten Peptide im Verhältnis zu nicht markierten Peptiden [167]. Wurde ein Protein nach Bindung an die Tubulexin A-Sonde **1** in signifikant höherem Maße im Vergleich zu der inaktiven Molekülsonde **2** quantifiziert (siehe 4.2.7), handelte es sich um ein potentielles

5. Ergebnisse

Zielprotein. Die Ergebnisse der durch diese Methode identifizierten Zielproteine sind in (Tabelle 9) dargestellt.

Tabelle 8. Aktivität der Affinitätssonden in relevanten zellbasierten Testsystemen. Die Daten für Tubulexin A und TV_AMS werden zum Vergleich gezeigt.

| Substanz | Phänotyp in BSC-1 Zellen [μM] ^[a] | MT-Repolymerisation [μM] ^[b] | G2/M Zellzyklus-Arrest [μM] ^[c] |
|---|--|---|--|
|  <p>Tubulexin A</p> | 2-5 | 10 | 10 |
|  <p>1</p> | 5 | 10 | 10 |
|  <p>TV_AMS</p> | Inaktiv | Inaktiv | inaktiv |
|  <p>2</p> | inaktiv | Inaktiv | inaktiv |

[a] niedrigste Konzentration, bei der BSC-1 Zellen Anomalitäten des MT-Zytoskelettes zeigten. [b] Konzentration, bei der die MT-Repolymerisation in BSC-1 Zellen nach Kältebehandlung stark inhibiert war. [c] Konzentration, die zu einem kompletten G2/M Arrest in HeLa Zellen führte (im Vergleich zu 1 μM Nocodazol).

5. Ergebnisse

Tabelle 9. Zusammenfassung der mittels SILAC basierter RP-LC-MS/MS-identifizierten potentiellen Interaktionspartner des Tubulexin A Analogons 1. In Grau sind Proteine dargestellt, die in allen 4 Experimenten identifiziert wurden und in Schwarz Proteine, die in 3 von 4 Experimenten gefunden wurden.

| Protein | Funktion |
|--|--|
| DnaJ protein homolog 2 | Co-Chaperon von Hsc70, Rolle im Proteinimport in Mitochondrien [211,212] |
| Leucine-rich repeat- containing protein 59 | unbekannt |
| Exportin-2; CAS, CSE1L | Nukleärer Export Rezeptor für Importin-alpha, interagiert mit MT und mitotischen Spindeln |
| Alpha-tubulin 6 | Isoform der α Einheit des $\alpha\beta$ Tubulin Dimers |
| Alpha-tubulin 1 | Isoform der α Einheit des $\alpha\beta$ Tubulin Dimers |
| Tubulin beta 1 | Isoform der β Einheit des $\alpha\beta$ Tubulin Dimers |
| Tubulin beta 2 | Isoform der β Einheit des $\alpha\beta$ Tubulin Dimers |
| Nucleostemin | Einfluss auf die Proliferationskapazität von Stammzellen, potentiell wichtige Funktion in der Tumorigenese [213,214] |
| APMCF1 | Untereinheit des SRP (signal recognition particle) Rezeptors und somit eine Funktion im Proteintransport [215-217] |

Wie Tabelle 9 zeigt, war die Identifikation vierer α - und β -Tubulin Proteine sehr auffällig, wobei sowohl α - als auch β -Tubulin in allen 4 Experimenten identifiziert wurden. Die Identifikation von $\alpha\beta$ -Tubulin als potentielles Zielprotein war im Zusammenhang mit den zellulären Wirkungen von Tubulexin A und der Rolle der MT während der Mitose als höchst interessant zu bewerten (siehe 1.3, 6.3.1 und 6.3.2.3). Des Weiteren wurde das in 4 Versuchen identifizierte Protein CAS (*cellular apoptosis*

susceptibility protein) als potentielles Zielprotein bewertet, welches als MAP mit Funktionen in der Mitose und der MT-Dynamik in Verbindung gebracht wurde (siehe 6.3.2.3).

Eine Möglichkeit der Validierung der Zielproteine stellt die Immunodetektion nach der Western-Blot-Methode dar [177,218]. Zur Validisierung von α -Tubulin und CAS wurde daher eine Affinitätsaufreinigung der 1- und 2- bindenden Proteine unter Verwendung von HeLa-Proteinextrakt durchgeführt. Im Anschluss wurden die gebundenen Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt. In den Immunoblot-Analysen zeigte sich, dass CAS mit der Affinitätssonde 1 aber nicht mit 2 isoliert werden konnte (Abbildung 43 A). Die Analysen ergaben außerdem, dass 1 α -Tubulin weitaus effektiver als 2 isolierte (Abbildung 43 B). Somit konnten die Ergebnisse der SILAC basierten Affinitätschromatographie für die interessanten Zielproteine bestätigt werden.

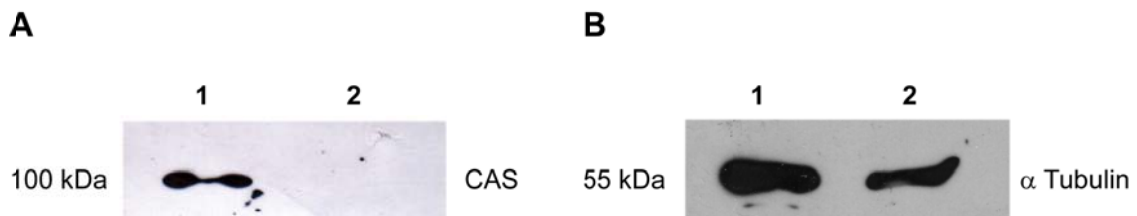


Abbildung 43. A. Immunodetektion der potentiellen Zielproteine nach Affinitätsaufreinigung. A und B. Die Affinitätssonden 1 und 2 wurden auf Straptavidinpartikeln immobilisiert und mit HeLa-Proteinextrakt für die Affinitätsaufreinigung der Zielproteine inkubiert. Die isolierten Zielproteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt und darauf einem Immunoblot unterzogen. **A.** Nachweis von CAS mittels CAS spezifischen Antikörpers. **B.** α -Tubulin Immunoblot mittels α -Tubulin spezifischen Antikörpers.

5.3.5 Validierung von $\alpha\beta$ -Tubulin als direktes Zielprotein

Die bestätigte Isolierung der Proteine CAS und α -Tubulin aus dem HeLa Proteinextrakt zeigte, dass eine Bindung dieser Proteine durch Tubulexin A wahrscheinlich war. Aufgrund der Möglichkeit, dass CAS in seiner Funktion als MAP (siehe 6.3.2.3) nicht direkt, sondern in einem Komplex mit $\alpha\beta$ -Tubulin isoliert wurde, sollten proteinbiochemische Tests aufklären, ob Tubulin das direkte molekulare Ziel von Tubulexin A ist. Daher wurde für die folgenden Studien aus Schweinehirn isoliertes Tubulin ohne gebundene MAPs wie CAS verwendet.

Um zu überprüfen, ob Tubulexin A als direkter Modulator der Tubulin-Polymerisation wirkt, wurde die *in vitro* Polymerisation von $\alpha\beta$ -Tubulin in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Tubulexin A untersucht [162]. Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige, inhibitorische Wirkung der Testsubstanz auf die Tubulin-

Polymerisation (Abbildung 44). Somit wurde Tubulin als direktes Zielprotein von Tubulexin A validiert.

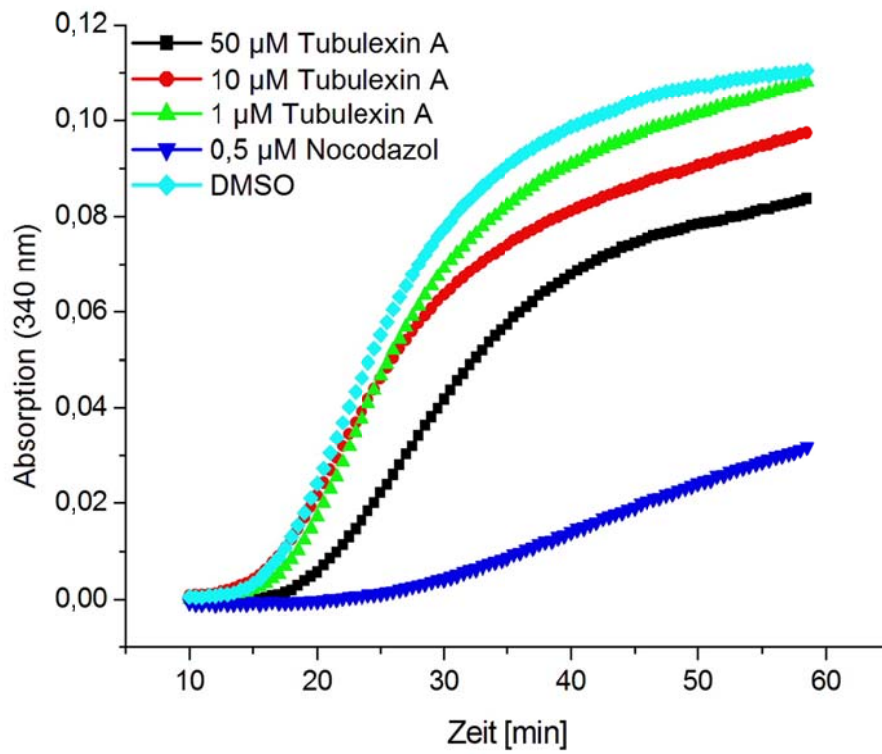


Abbildung 44. Einfluss von Tubulexin A auf die *in vitro* Tubulin-Polymerisation. $\alpha\beta$ -Tubulin wurde in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Tubulexin A oder DMSO und Nocodazol als Kontrolle bei 30°C nach Zugabe von GTP polymerisiert. Die Polymerisation wurde bei 340 nm detektiert. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Messungen.

Um zu untersuchen, ob die Bildung des Tubulin-Tubulexin A-Komplexes zu einer Konformationsänderung von $\alpha\beta$ Tubulin führt, wurden zwei parallele Ansätze gewählt. Im ersten Ansatz sollte eine mögliche Veränderung der lokalen Konformation von $\alpha\beta$ -Tubulin durch die relative Veränderung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bestimmt werden [219]. Dieses ist möglich, da $\alpha\beta$ -Tubulin mit 4 Tryptophanresten pro Untereinheit insgesamt acht Tryptophane besitzt [220,221]. Zu diesem Zweck wurde nach Bildung des $\alpha\beta$ -Tubulin-Tubulexin A-Komplexes ein spektralphotometrischer Scan der Fluoreszenzintensität zwischen 300 und 400 nm Emissionswellenlänge durchgeführt. Als Kontrolle wurde in diesem Wellenlängenbereich die Fluoreszenzintensität des $\alpha\beta$ -Tubulin-Nocodazol-Komplexes bestimmt [222]. Ein Ansatz mit DMSO diente als Negativkontrolle. Während Nocodazol sowohl zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums, als auch zu einer Abnahme der Gesamtfluoreszenz führte, zeigte der $\alpha\beta$ -Tubulin-Tubulexin A-Komplex keine

derartigen Veränderungen der Tryptophan-Fluoreszenz an (Abbildung 45A). In dem zweiten Ansatz diente das fluoreszierende BIS-ANS als Marker für Konformationsänderungen des Tubulin-Dimers. BIS-ANS wird häufig zur Untersuchung etwaiger Konformationsänderungen von Proteinen verwendet [169,223,224]. Hierbei stehen die fluoreszierenden Eigenschaften des Moleküls im Vordergrund. Während wässriges Medium die Fluoreszenzintensität des Moleküls verringert, führt die Bindung an ein Protein abhängig von dem Faltungsgrad zu einer Fluoreszenzintensitäts-Erhöhung. Unter anderem konnte auch für $\alpha\beta$ Tubulin gezeigt werden, dass eine Bindung von BIS-ANS zu einer starken Fluoreszenzintensitäts-Erhöhung führt [225]. BIS-ANS besitzt sowohl eine hochaffine Bindestelle für $\alpha\beta$ Tubulin, die weder mit der Vinca Alkaloid Seite noch mit der Colchicin Seite überlappt, als auch diverse niedrig affine Bindungsstellen [226-228]. Um zu testen, ob Tubulexin A zu einer Fluoreszenzänderung des $\alpha\beta$ Tubulin-BIS-ANS Komplexes führt, wurde der Komplex mit Tubulexin A inkubiert, wobei eine etwaige Fluoreszenzänderung eine Konformationsänderung anzeigte. Im Gegensatz zu Nocodazol, bei dem eine klare Abnahme der BIS-ANS Fluoreszenz sichtbar war, war für Tubulexin A keine Fluoreszenzänderung detektierbar. Dies bedeutet, dass auch durch diesen Ansatz keine Konformationsänderung von $\alpha\beta$ Tubulin durch die Komplexbildung mit Tubulexin A nachgewiesen werden konnte (Abbildung 45B).

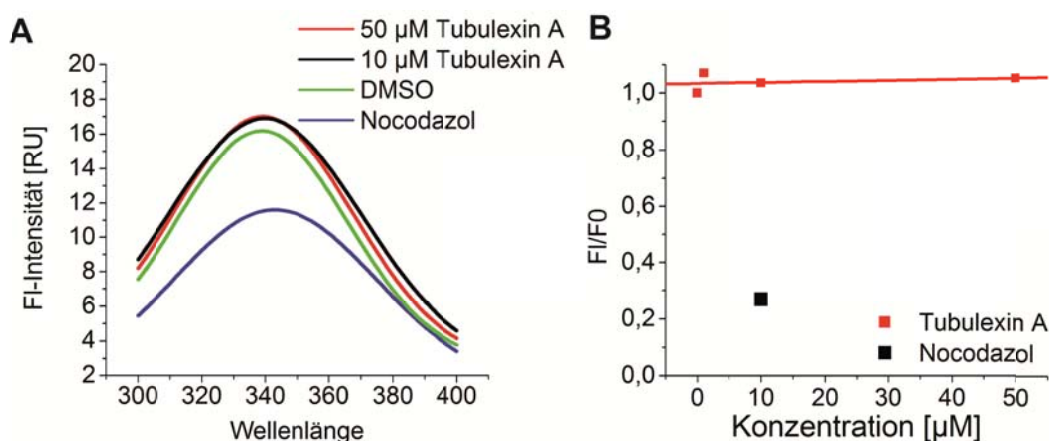


Abbildung 45 Konformationsanalyse des $\alpha\beta$ Tubulin-Tubulexin A Komplexes. **A.** Die Wirkung von Tubulexin A auf die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz; 4 μ M Tubulin wurde mit 10, 50 μ M Tubulexin A oder 10 μ M Nocodazol und DMSO als Kontrolle für 30 min zur Komplexbildung inkubiert. Die Tryptophan-Fluoreszenz wurde bei 280 nm angeregt und das Emissionsspektrum zwischen 300-400 nm aufgenommen. **B** Der Effekt von Tubulexin A auf die BIS-ANS Fluoreszenz; 2 μ M Tubulin wurden mit BIS-ANS und verschiedenen Konzentrationen von Tubulexin A oder DMSO und Nocodazol als Kontrolle für 45 min bei RT inkubiert. Nach Messung der BIS-ANS Fluoreszenz (Ex/Em 430 nm/490 nm) wurden die Messwerte auf die Fluoreszenzintensität des DMSO-Tubulin Ansatzes normalisiert. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Zur Identifikation der Bindestelle von Tubulexin A an $\alpha\beta$ Tubulin wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt. Um eine etwaige Bindung an die Colchicin-Bindestelle aufzuklären, wurde ein kompetitiver Ansatz mit Colchicin gewählt. Die Eigenfluoreszenz von Colchicin erhöht sich nach seiner Assoziation mit $\alpha\beta$ Tubulin, also führt eine Dissoziation von $\alpha\beta$ -Tubulin aufgrund der Bindung eines anderen Liganden an die Colchicin-Bindestelle zu einer Verringerung der Fluoreszenz-Intensität [170]. Dieses etablierte Prinzip wird häufig für die Identifikation von Liganden der Colchicin-Bindestelle verwendet [229-233]. Daher erfolgte nach der Bildung des Tubulin-Colchicin Komplexes die Zugabe verschiedener Konzentrationen von Tubulexin A, wobei Nocodazol als bekannter Ligand der Colchicin-Bindestelle als Kontrolle eingesetzt wurde [136]. Während Nocodazol zu einer drastischen Erniedrigung der Fluoreszenz führte, hatte Tubulexin A bis zu einer Konzentration von 100 μM keinen derartigen Effekt, wodurch eine Bindung des Wirkstoffes an die Colchicin-Bindestelle ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 46A).

Zur Untersuchung, ob die Tubulexin A an die Vinca Alkaloid-Bindestelle von $\alpha\beta$ Tubulin bindet, konnte ein fluoreszentes Analogon von Vinblastin (BODIPY-FL-Vinblastin) verwendet werden. Frühere Studien zeigten dessen Fluoreszenzerhöhung nach Bindung an $\alpha\beta$ Tubulin und auch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Konkurrenz mit Vinblastin [234]. BODIPY-FL-Vinblastin wird häufig bei der Identifikation etwaiger Liganden der Vinca Alkaloid-Bindestelle verwendet [164,229,233,235,236]. Nach der Bildung des BODIPY-FL-Vinblastin- $\alpha\beta$ -Tubulin-Komplexes wurden verschiedene Konzentrationen von Tubulexin A, B, C oder Vinblastin als Kontrolle hinzugefügt, woraufhin eine eventuelle Konkurrenz mit BODIPY-FL-Vinblastin durch Bestimmung seiner Fluoreszenzänderung ermittelt wurde. Vinblastin und Tubulexin A führten zu einer konzentrationsabhängigen und ähnlich starken Konkurrenz (Abbildung 46B). Die EC_{50} Werte von Vinblastin ($2.95 \pm 0.63 \mu\text{M}$) und Tubulexin A ($2.67 \pm 0.70 \mu\text{M}$) zeigten unter den gewählten Bedingungen eine stöchiometrische Konkurrenz mit BODIPY-FL-Vinblastin an. Die EC_{50} Werte der ebenfalls getesteten Wirkstoffe Tubulexin B (4.66 ± 1.12) und C (4.92 ± 1.42) waren im Vergleich wenig höher.

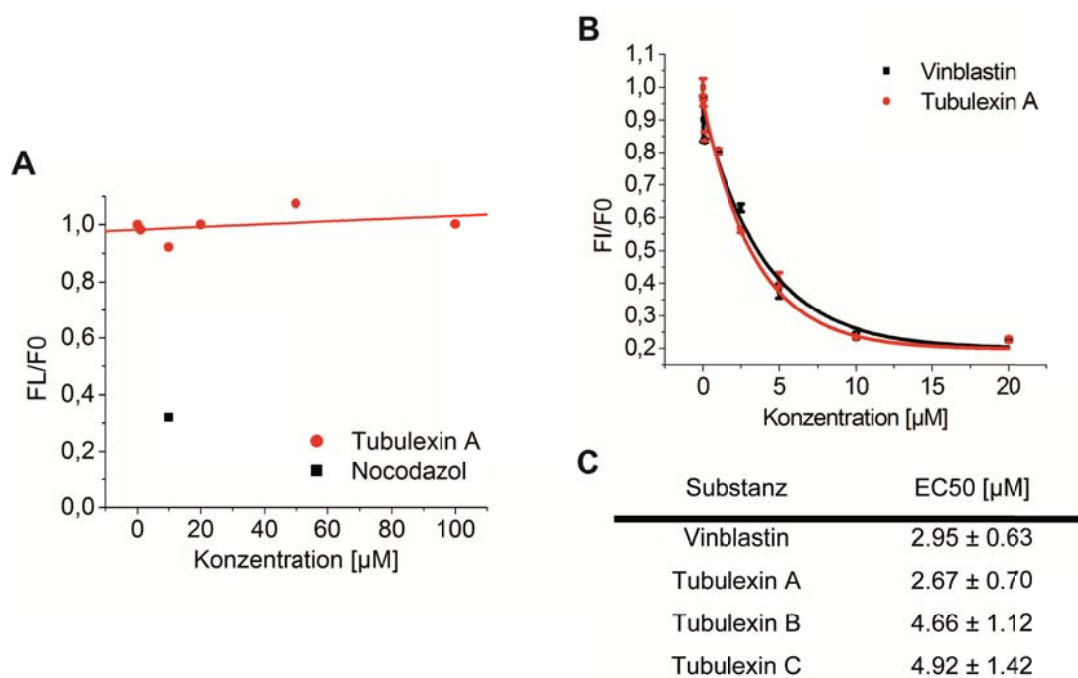


Abbildung 46. Identifikation der Bindestelle der Tubulexine durch Kompetitionsansätze. A. Colchicin Kompetitionsassay. 5 μM $\alpha\beta$ Tubulin wurden mit 50 μM Colchicin für 20 min inkubiert. Verschiedene Konzentrationen von Tubulexin A und 10 μM Nocodazol oder DMSO wurden hinzugefügt. Entfernung von Colchicin von seiner Colchicin-Bindestelle wurde durch eine Verringerung seiner Fluoreszenz (Ex/Em 365/435 nm) bestimmt. Die Werte wurden auf die Fluoreszenz des DMSO Kontrollansatzes normalisiert und sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen. **B.** BODIPY-FL-Vinblastin-Kompetitionsassay. 2,5 μM $\alpha\beta$ Tubulin wurden für 20 min mit 2,5 μM BODIPY-FL-Vinblastin inkubiert. Daraufhin wurden Tubulexin A oder Vinblastin und DMSO als Kontrolle hinzugefügt. Entfernung von BODIPY-FL-Vinblastin von seiner Vinca Alkaloid-Bindestelle wurde durch eine Verringerung seiner Fluoreszenz (Ex/Em 470/514 nm) bestimmt. Die Werte wurden auf die Fluoreszenz des DMSO Kontrollansatzes normalisiert und sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen und sind gezeigt als Dreifachbestimmung \pm SD mit sigmoidaler Ausgleichskurve. **C.** Die EC50 Werte für Tubulexin A, B und C im Vergleich zu Vinblastin wurden mittels BODIPY-FL-Vinblastin Kompetitionsanalyse ermittelt.

Viele Inhibitoren der Tubulin-Dynamik modulieren die GTPase-Aktivität von Tubulin [237] Um zu testen, ob Tubulexin A die GTPase-Aktivität von Tubulin beeinflusst, wurde mittels eines Malachit-Grün Assays die Freisetzung von Phosphat nach Inkubation von Tubulin mit Tubulexin A bestimmt. Hierbei diente Nocodazol als Kontrolle einer Substanz, die zu einer Erhöhung der GTPase-Aktivität von Tubulin führt [238]. Es wurde der Effekt der beiden an die Vinca Alkaloid-Bindestelle von Tubulin bindenden Substanzen Vinblastin und Tubulexin A verglichen. Während die GTPase-Aktivität von $\alpha\beta$ -Tubulin sich konzentrationsabhängig durch Nocodazol erhöhte, führten weder Vinblastin noch Tubulexin A unter den gewählten Bedingungen zu einer Modulation der GTPase-Aktivität von Tubulin (Abbildung 47).

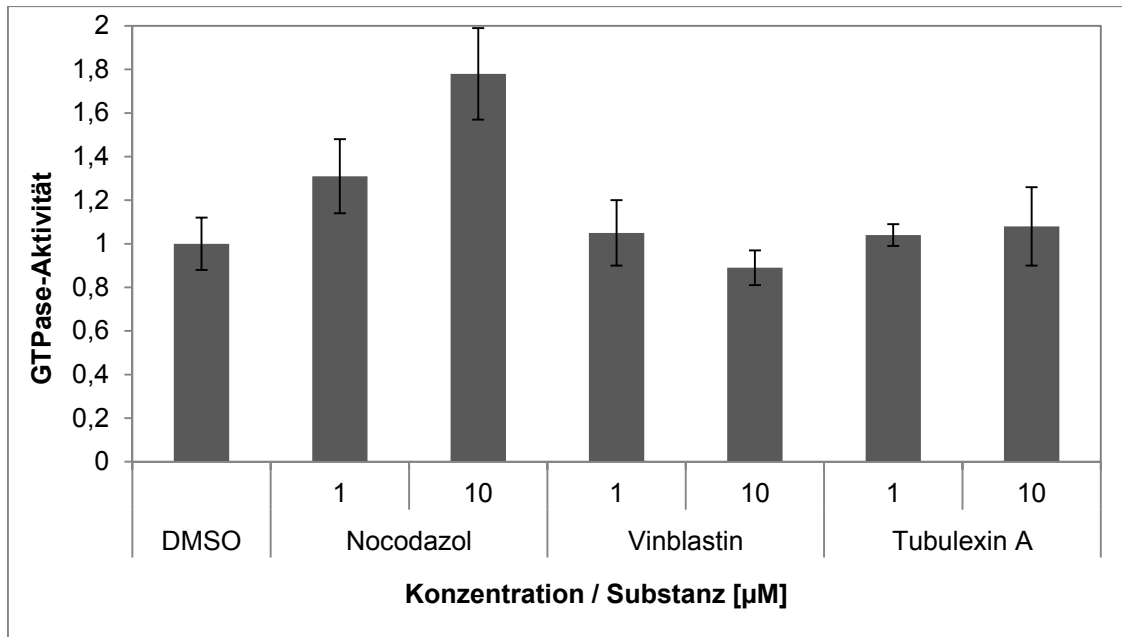


Abbildung 47. Bestimmung der GTPase-Aktivität von Tubulin nach Behandlung mit Tubulexin A. 5 µM Tubulin wurden in Gegenwart von Tubulexin A, Vinblastin oder DMSO und Nocodazol als Kontrolle für 30 min inkubiert. Nach 20 min Inkubation mit GTP wurde freigesetztes Phosphat und somit die GTPase-Aktivität von Tubulin mittels des Malachit Grün Assays bei einer Absorption von 620 nm bestimmt. Die Messwerte wurden auf die Absorption des DMSO-Kontrollansatzes normalisiert. Angegeben sind die Durchschnittswerte einer Dreifachbestimmung \pm SD. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen.

5.3.6 Die Wirkung von Tubulexin A auf Taxol-resistente HeLa Zellen

Aufgrund der Limitationen des Wirkstoffes Taxol als Krebsmedikament in der klinischen Anwendung durch zelluläre Resistenzmechanismen (siehe 1.3.2) war es interessant, die Wirkung von Tubulexin A auf Taxol-resistente Zellen zu testen. Hierfür wurde zunächst eine Taxol resistente HeLa-Zelllinie etabliert. Dieses geschah durch Exposition von HeLa Zellen über mehrere Wochen mit Taxol und Selektion und Kultivierung der resistenten Zellpopulation [239,240]. Hierdurch wurde die Zelllinie HeLa-Txl erhalten. Um die Resistenz der HeLa-Txl Zellen gegenüber Taxol zu ermitteln, wurden HeLa und HeLa-Txl Zellen für 72h mit dem Medikament behandelt und daraufhin die jeweilige Inhibition der Proliferationsrate mittels eines WST-1 Proliferationstests bestimmt. Nach Bestimmung des IC_{50} -Wertes für HeLa (5,1 \pm 0,7 nM) und HeLa-Txl Zellen (47,1 \pm 9,9 nM) zeigte sich mit dem Resistenzfaktor von 9,24 eine fast 10fach erhöhte Resistenz der HeLa-Txl Zellen gegenüber Taxol und somit eine erfolgreiche Etablierung der Zelllinie (Abbildung 48 A und C). Im Vergleich zu der Wirkung von Taxol auf die beiden Zelllinien wurde der antiproliferative Effekt von Tubulexin A auf die HeLa-Txl Zelllinie im Vergleich zu HeLa Zellen quantifiziert. Hier zeigte sich, dass der IC_{50} -Wert für von Tubulexin A in beiden Zelllinien bei etwa 2 µM lag (Abbildung 48B und C). Diese gleichbleibende Aktivität drückte sich auch in

dem ermittelten Resistenzfaktor von 1,15 aus, der zeigte, dass die Resistenz der HeLa-Txl Zellen gegenüber Tubulexin A praktisch nicht vorhanden war.

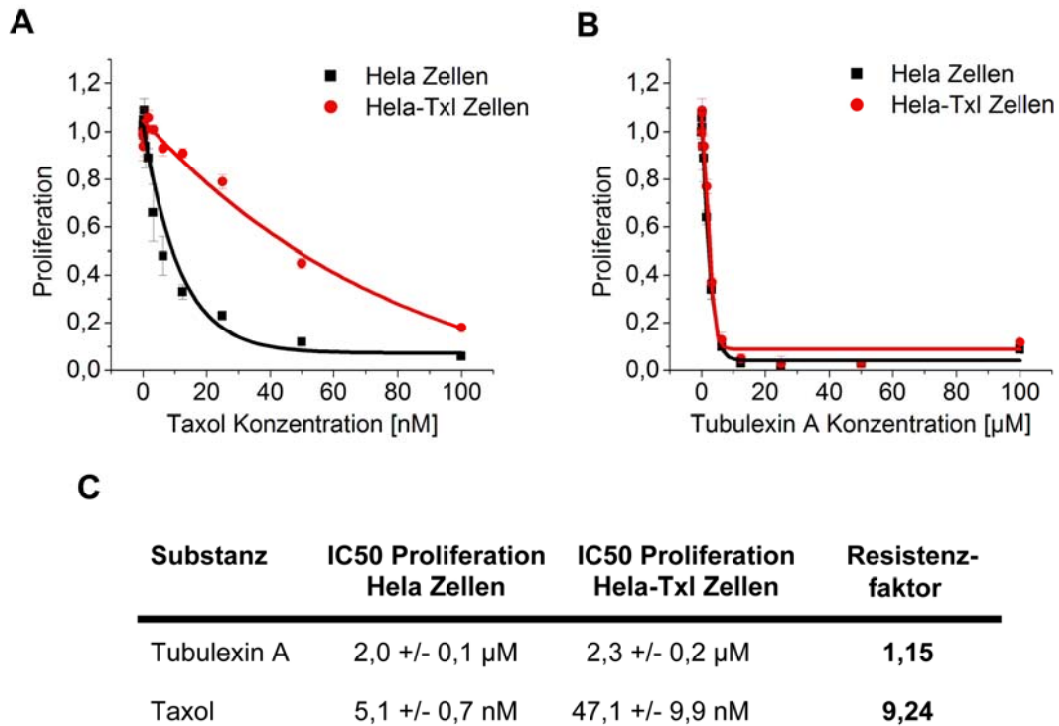


Abbildung 48. Der Effekt Tubulexin A auf die Proliferation von Taxol resistenten HeLa Zellen. Proliferation von HeLa Zellen (schwarz) oder Taxol resistenten HeLa Zellen (rot; HeLa-Txl) nach der Behandlung mit Taxol (**A**) oder Tubulexin A (**B**). Beide Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Taxol, Tubulexin A oder DMSO als Kontrolle für 72h behandelt und die Proliferation mittels eines WST-1 Proliferationsassays bestimmt. Die Messwerte wurden auf die Absorption des DMSO-Kontrollansatzes normalisiert, sind repräsentativ für drei unabhängige Messungen und als Durchschnittswerte einer Vierfachbestimmung \pm SD mit sigmoidaler Ausgleichskurve angegeben. **C.** Der Resistenzfaktor wurde nach? Division der IC50 Werte der HeLa-Txl Zellen durch den IC50 der HeLa Zellen erhalten.

6. Diskussion

6.1 Untersuchung einer Naturstoff-Substanzbibliothek

Im Rahmen der Dissertation sollte mittels einer Bibliothek aus Naturstoffen, die in der Abteilung vorhandenen *High Content Screens* validiert werden, um diese für eine mögliche Verwendung in Folgestudien zur Untersuchung Naturstoff-basierter Substanzbibliotheken einzusetzen. Diesbezüglich konnte der BSC-1 Phänotyp-Screen als besonders vielversprechend gewertet werden (siehe 6.1.1). Des Weiteren sollten eventuell in der Literatur unbeschriebene Wirkstoffe identifiziert und die biologische Wirkung charakterisiert werden, um potentielle Leitstrukturen für die Synthese von Substanzbibliotheken zu erhalten. Mit Podoverin A, Maistemonin und Coreanosid F1 konnten anhand des BSC-1 Phänotyp-Assays solche Substanzen identifiziert werden (siehe 6.1.2).

6.1.1 Validierung und Bewertung der High Content Screens

Das *High Content Screening* der Naturstoffbibliothek führte zur Validierung der verwendeten Screens. Hierbei zeigte besonders der BSC-1 Phänotyp-Assay großes Potential, Wirkstoffe mit interessanter Bioaktivität zu identifizieren. So konnten sowohl diverse in der Literatur beschriebene Substanzen, die modulierend auf Bestandteile des Zytoskelettes und der Mitose wirken, als auch Apoptose-induzierende Substanzen identifiziert werden. Die Identifikation der Wirkstoffe Podophyllotoxin, Taxol und Chelidonin zeigte die Stärke des Testsystems, indem bekannte Mitoseregulierende Substanzen aufgefunden werden konnten. Außerdem konnten mit Cucurbitacin B, Flavonoiden und Rotenon Moleküle identifiziert werden, die unter den gewählten Bedingungen sowohl im MDCK-F3 Phänotyp-Assay, als auch im BSC-1 Phänotyp-Assay morphologische Anzeichen der Apoptose aufwiesen. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde der BSC-1 Phänotyp-Screen als validiertes System in Folgestudien als Startpunkt für die Identifikation zellulär aktiver Substanzen mittels des vorwärts gerichteten chemisch genetischen Ansatzes bewertet.

Jedoch konnte mittels des MDCK-F3 Phänotyp-Screens innerhalb der Substanzbibliothek keine Substanz identifiziert werden, deren Wirkung eine Rücktransformation von MDCK-F3 Zellen und somit eine potentielle Inhibition der HRas abhängigen Signalwege vorschlug. Der Grund hierfür könnten die gewählten Bedingungen des Testansatzes sein. Hierbei könnte die für dieses Testsystem vergleichsweise niedrige Konzentration der Testsubstanzen von 30 μM verantwortlich sein. So induzieren andere mittels dieses Testsystems identifizierte bekannte

Modulatoren des Ras/MAPK Signalweges, wie Melophlin A und Palmostatin B, eine Rücktransformation nur bei höheren Konzentrationen [175,177]. In anderen Systemen weisen diese Substanzen eine vergleichsweise hohe Potenz auf. Ebenso ist es möglich, dass die genutzte Substanzbibliothek keine Inhibitoren Ras-abhängiger Signalwege enthielt. So identifizierten Stockwell et al. mit einem eleganten zellbasierten Ansatz, ausgehend von dem sogenannten synthetisch letalen Screening, die Substanz Erastin als einen Wirkstoff, der selektiv in durch onkogenes Ras transformierten Zellen den Zelltod auslöste [241,242]. Die in dieser Studie untersuchte Substanzbibliothek war mit 24.000 Substanzen weitaus größer als die der hier verwendeten 1500 Naturstoffe und somit auch die Wahrscheinlichkeit, solche Inhibitoren zu identifizieren.

Eine Herausforderung bei der Anwendung des MDCK-F3 Phänotyp-Screens stellt die reine Fokussierung auf morphologische Veränderungen der MDCK-F3 Zellen dar. Diese sind häufig schwierig zu interpretieren. So kommt es im Zuge einer Rücktransformation aufgrund der erhöhten Expression von E-Cadherin zum Übergang von einem mesenchymalen zum epithelialen Phänotyp und zu vermehrten Zell-Zellkontakten. Folglich besitzt die Morphologie solcher runder Zellen gewisse Ähnlichkeiten zu mitotischen Zellen. Aufgrund dessen können häufig Fehl-Interpretationen die Folge sein [171].

Aus den genannten Überlegungen gehen folgende Schlüsse für die zukünftige Identifikation von Substanzen, die eine Rücktransformation verursachen, hervor: a) Es sollte überlegt werden, die Startkonzentration der zu testenden Verbindungen zu erhöhen b) Der Screen sollte zur Identifikation neuer Leitstrukturen entweder für die Untersuchung relativ großer Substanzbibliotheken oder für eine fokussierte auf Leitstrukturen basierte kleine Substanzbibliothek angewandt werden. c) Um die morphologischen Veränderungen klar zu belegen, sollte eine Bestimmung der E-Cadherin Expression mittels Immunfärbung in den Screen implementiert werden.

Die beschriebenen Optimierungen wären wünschenswert, denn eine veränderte Aktivität Ras abhängiger Signalwege wird neben einer deregulierten Proliferation, auch mit der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen in Verbindung gebracht und ist somit von hoher Relevanz für die Krebsforschung [243]. Im Prinzip hat der MDCK-F3 Phänotyp-Assay großes Potential für die Identifikation etwaiger Substanzen, die als Sonden zur Untersuchung Ras vermittelter, biologischer Prozesse eingesetzt werden können oder als Leitstrukturen potentieller Wirkstoffe verwendet werden können.

Demnach ist festzustellen, dass der MDCK-F3 Phänotyp-Assay relativ kritisch bewertet wurde. Da eine weitgehende Optimierung dieses Systems nicht Ziel dieser

Arbeit war, wurde der BSC-1 Assay und dessen Prinzipien als gut validierter Startpunkt für den vorwärts gerichteten chemisch genetischen Ansatz in der Untersuchung BIOS-basierter Substanzbibliotheken betrachtet.

6.1.2 Die Identifikation von Naturstoffen mit unbeschriebener Bioaktivität

Der Screen mittels des BSC-1 Phänotyp-Assays führte zur Identifikation dreier Substanzen, deren beobachtete Bioaktivitäten in der Literatur nicht beschrieben waren. Diese wurden deshalb näher charakterisiert. Daher werden die Effekte von Podoverin A, Maistemonin und Coreanosid F1 in der Folge untersucht.

6.1.2.1 Die zelluläre Wirkung von Podoverin A.

Die zellulären Effekte von Podoverin A beinhalten eine erhöhte Anzahl mitotischer BSC-1 Zellen, die Induktion eines G2/M Arrests in diversen Zelllinien, die Inhibition der MT-Repolymerisation in BSC-1 Zellen und einen stark antiproliferativen Effekt in HeLa Zellen. Somit ist eine Wirkung dieser Substanz auf die $\alpha\beta$ -Tubulin-Dynamik wahrscheinlich. Dieses war als besonders interessant zu bewerten, da der Wirkstoff bisher ausschließlich für seine entzündungshemmenden Eigenschaften bekannt war [244]. Die negativen Bioaktivitätstests der, zusammen mit Dr. Wolfram Wilk selektierten, strukturverwandten Wirkstoffe in dem BSC-1 Phänotyp-Assay legten außerdem eine große Spezifität der Podoverin A-Struktur gegenüber seinem molekularen Ziel nahe.

Dass Podoverin A aus der Pflanze *Podophyllum versipelle* gewonnen wurde, in der eine große Menge des TBAs Podophyllotoxin und seiner Derivate vorhanden ist wurde kritisch bewertet [244,245]. Es war denkbar, dass Verunreinigungen der Podoverin A-Probe die beobachteten biologischen Effekte induzierten, denn diverse bioaktive Podophyllotoxin-Derivate wurden mittels des BSC-1 Phänotyp-Screens der Naturstoff-Substanzbibliothek mit ähnlicher Wirkung identifiziert. Daher wurde die Podoverin A-Substanzprobe mittels massenspektrometrischer Analyse auf das Vorkommen dieser Podophyllotoxin-Derivate untersucht. Hierbei konnten jedoch keine Verunreinigungen der Podoverin A-Substanzprobe durch die in Abbildung 49 dargestellten Substanzen festgestellt werden (persönliche Mitteilung von Dr. Wolfram Wilk).

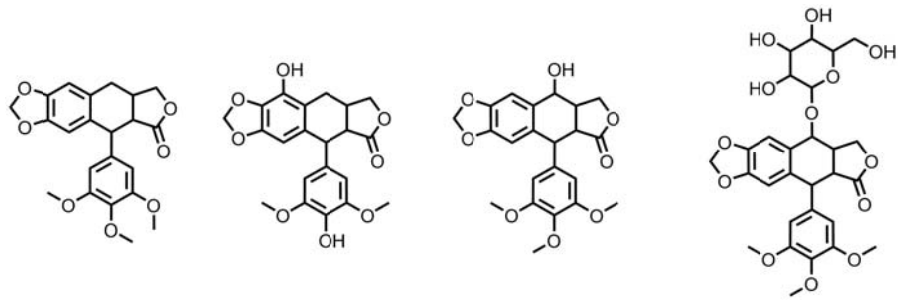


Abbildung 49. Von Podophyllotoxin abgeleitete Strukturen. Die dargestellten Derivate waren in der Naturstoff-Substanzbibliothek enthalten.

Die hier durchgeführten Studien legen nahe, dass mögliche Bindungsproteine des Wirkstoffes mit der $\alpha\beta$ -Tubulin Dynamik in Verbindung gebracht werden können. Weitere Studien sollten sich mit der Identifikation der Zielproteine von Podoverin A beschäftigen. Um eine etwaige direkt modulierende Wirkung von Podoverin A auf die $\alpha\beta$ -Tubulin Dynamik zu ermitteln, sollte daher der Einfluss der Substanz auf die *in vitro*-Tubulin-Polymerisation untersucht werden. Wie die Ergebnisse des zellulären MT-Repolymerisationsassay vorschlagen, wäre eher eine inhibitorische als eine aktivierende Wirkung auf die *in vitro*-Tubulin-Polymerisation denkbar. Ist dies der Fall, sollten sich Folgeuntersuchungen anschließen, mit dem Ziel die $\alpha\beta$ -Tubulin-Bindestelle von Podoverin A zu identifizieren. Ein vielversprechender Ansatz hierfür wären Konkurrenzexperimente mit Wirkstoffen, deren Tubulin-Bindestelle bekannt ist, wie Colchicin und Vinblastin.

6.1.2.2 Die zelluläre Wirkungen von Maistemoin und Coreanosid F1

Die Identifikation der Naturstoffe Maistemoin und Coreanosid F1 im BSC-1 Phänotyp-Assay war als interessant zu bewerten, da die beobachteten Effekte nicht in der Literatur beschrieben waren. Aufgrund der gleichen induzierten Effekte der beiden Substanzen werden diese gemeinsam diskutiert. Der Naturstoff Maistemoin wurde ursprünglich aus den Wurzeln der Pflanze *Stemona Mairei* isoliert und zeigte eine starke antitussive Wirkung im Tiermodell [246]. Tatsächlich werden Pflanzen aus der *Stemona*-Familie in der traditionellen fernöstlichen Medizin verwendet, hauptsächlich bei der Behandlung von Keuchhusten und Tuberkulose [247]. Dort werden sie des Weiteren als Insektizide und bei der Wurmkur eingesetzt. Die Substanz Coreanosid F1 wurde aus den Blättern der Pflanze *Rubus Coreanus* isoliert [248]. Diverse Naturstoffe aus Pflanzen der Gattung *Rubus* haben großes Potential als Wirkstoffe in einem großen Applikations-Feld, wie z.B. Krebs, bakterielle Infektionen und Entzündungen [249].

Die Wirkung der Substanzen in BSC-1 und HeLa Zellen führte zu einer perinuklearen Aggregation von Aktinfilamenten. Dieser Phänotyp war in beiden Fällen bei 5 μM sichtbar. Überraschenderweise führten diese Effekte innerhalb von 24 h jedoch nicht zu einer Inhibition der Proliferation, wie der WST-1 Proliferationsassay zeigte. Somit konnte eine eventuelle Induktion von G2/M- oder G1-Zellzyklusarrest, welche für viele Modulatoren der Aktin-Dynamik typisch ist, für beide Testsubstanzen bis zu der höchsten getesteten Konzentration von 30 μM ausgeschlossen werden [111]. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass höhere Konzentrationen der Substanzen zu derartigen Effekten führen würden, falls die Potenz der Testsubstanzen relativ gering ist. Substanzen, die die Aktin-Dynamik beeinflussen, können analog zu TBAs in F-Aktin destabilisierende und F-Aktin stabilisierende Substanzen eingeteilt werden [250,251]. Daher stellt sich die Frage, zu welcher Klasse die untersuchten Naturstoffe möglicherweise gehören. Die biochemischen Eigenschaften des in den mikroskopischen Untersuchungen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes Phalloidin-TRITC könnten hierüber Auskunft geben. So visualisiert dieser Marker sehr effektiv filamentöses Aktin, während G-Aktin praktisch nicht von Phalloidin gebunden wird [252]. Die Aktin-Aggregation in den durchgeführten Studien legen somit eine F-Aktin stabilisierende Wirkung von Maistemonin und Coreanosid F1 nahe. Würde dies bestätigt, müsste geklärt werden, ob es sich bei dem Wirkmechanismus dieser Substanzen um eine direkte oder indirekte Inhibition der Aktin-Dynamik handelt. Eine direkte durch die Testsubstanzen induzierte Inhibition der Aktin-Dynamik wäre überraschend, da bisher identifizierte F-Aktin stabilisierende Substanzen üblicherweise komplizierte Ringstrukturen bilden. Beispiele hierfür sind neben Phalloidin auch Jasplakinolid, Dolastatin 11, Hectochlorin und Dolicolid [253]. Ebenso ist es möglich, dass die Substanzen als Modulatoren von Proteinen innerhalb von Prozessen wirken, welche die zelluläre Aktin-Dynamik regulieren. Hierbei wäre auf der einen Seite eine Vielzahl an Aktin bindenden Proteinen als Zielproteine möglich. Auf der anderen Seite sind auch molekulare Ziele innerhalb von Signalwegen, die abhängig von den Kinasen Rho, CDC42 und Rac Umstrukturierungen und Polymerisation der Aktinfilamente kontrollieren. [254-260].

Gegen eine generelle Wirkung der beiden Naturstoffe auf die Aktin-Dynamik spricht die relativ unveränderte Organisation des Aktin-Zytoskelettes außerhalb der perinuklearen Gegend. Interessanterweise konnten kürzlich veröffentlichte Studien von Khatau et al. die Existenz einer perinukleären Aktinkappe nachweisen, die aus kontraktile Aktinfilamenten mit phosphoryliertem Myosin bestehen [261]. Von den Autoren dieser Studie wurde vorgeschlagen, dass die Funktion dieser Kappe in der Formgebung des Zellkerns liegt und von der Aktin-Assemblierung abhängt. Die

Regulation der Organisation der Aktin-Kappe scheint der an der Kernmembran lokalisierte LINC (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*)-Komplex zu übernehmen, welcher das Nukleoskelett mit dem Zytoskelett verbindet [261-263]. Die mit dem Nukleoskelett verbundene Aktin Kappe wird spezifisch durch Inhibition der Aktomyosin-Kontraktilität und Zerstörung der LINC-Komplexe desorganisiert, also unabhängig von dem basalen Aktin-Zytoskelett. Khatau et al. schlossen des Weiteren, dass verschiedene Signalwege die Regulation der basalen Aktinfilamente und der Filamente der Aktin-Kappe übernehmen [261]. Die Organisation der Aktin-Kappe und ihre Funktion der nukleären Morphologiegebung sind in Zellen gestört, die schnell altern (Progerie) und im Laufe der Muskeldystrophie. Eine Wirkung der Naturstoffe Maistemonin und Coreanosid F1 auf diese zelluläre Aktin-Strukturen wäre höchst bedeutsam, da hierdurch das Verständnis der Funktionen der perinukleären Aktin-Kappe erweitert und durch die Substanzen Gründe für eine mögliche Fehlregulation aufgeklärt werden könnten. Mögliche Zielproteine der Substanzen könnten demnach innerhalb der Regulationsmechanismen der Aktin-Kappe liegen. In weiteren Studien mit den beiden Wirkstoffen sollten geprüft werden, ob es sich bei dem beobachteten Effekt tatsächlich um eine Modulation dieser Aktin Kappe handelt. Hierfür wären konfokale mikroskopische Studien hilfreich, die eine Fokussierung innerhalb der vertikalen Z-Achse einer Zelle ermöglichen. Dieses würde zur Visualisierung einer etwaigen Aktin-Kappe „oberhalb“ des basalen Aktins führen (Abbildung 50).

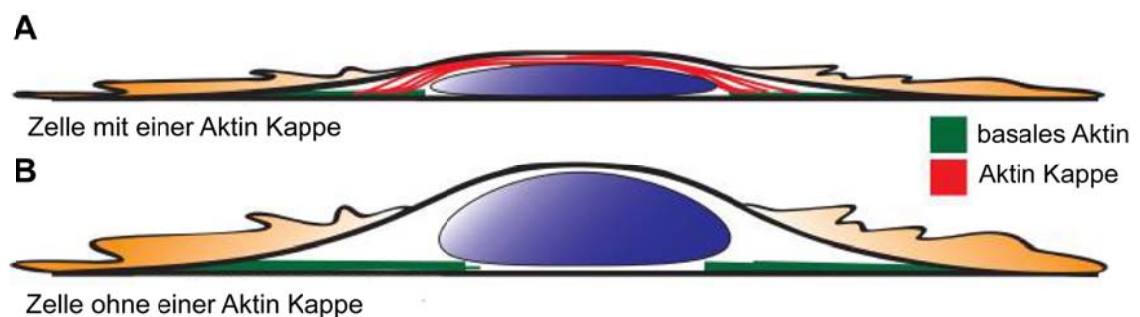


Abbildung 50. Schema der Aktinfilament Architektur der basalen und apikalen Oberfläche einer adhärennten Zelle (verändert nach Khatau et al. [261]. **A.** Apikale Aktinfasern (rot) wickeln sich um die apikale äußere Oberfläche des Zellkerns (blau), wodurch sie die perinukleäre Aktin Kappe formen. **B.** Entweder der Schwund von nukleärem Lamin A/C, die Zerstörung der LINC Komplexe, die F-Aktin Disassemblierung oder die Inhibition der Aktomyosin Kontraktilität zerstört die Organisation der Aktin Kappe und ihrer Zellkern formierenden Funktion.

Somit konnten mit Podoverin A, Maistemonin und Coreanosid F1 interessante Wirkstoffe identifiziert werden, die als Leitstrukturen für BIOS dienen könnten und

großes Potential für weitere biologische Untersuchungen mit dem Ziel der Identifikation der bindenden Proteine dieser Substanzen versprechen.

6.2 Biologische Charakterisierung einer Spirooxindol Substanzbibliothek

Nach der Validierung des BSC-1 Phänotyp-Assays konnte dieser routinemäßig für die Testung hauseigener Naturstoff-basierter Substanzbibliotheken verwendet werden. Nach der Testung einer Bibliothek bestehend aus 39 Spirooxindolen mittels des BSC-1 Phänotyp-Screens erfolgte die Identifikation der Substanz **6k** als vielversprechende Verbindung mit potentiell antimitotischen Eigenschaften.

6.2.1 Bewertung der biologischen Effekte von (-)-**6k**

Die Substanz **6k** induzierte in dem BSC-1 Phänotyp-Screen eine für antimitotische Substanzen charakteristische Abrundung der BSC-1 Zellen [110]. Die antimitotische Wirkung konnte durch die Analyse des DNA-Gehaltes der BSC-1 Zellen und weiterer Zelllinien mittels FACS bestätigt werden. Diese Studien zeigten eine Induktion von G2/M Arrest durch die zelluläre Behandlung mit **6k**. Die erhöhte Anzahl von Zellen mit reduziertem Chromosomensatz legte eine Apoptose-Induktion durch **6k** nahe. Die parallele Untersuchung p53 positiver und negativer HCT-116-Zellen zeigte, dass **6k** einen p53-unabhängigen G2/M Arrest induzierte. Fluoreszenzmikroskopische Studien zur Untersuchung etwaiger Veränderungen des in dem mitotischen Prozess essentiellen MT-Zytoskelettes zeigten sehr klar eine diffuse Organisation der MT. Nachdem der Effekt von **6k** auf die *in vitro* Tubulin-Polymerisation von der Arbeitsgruppe von Prof. Mayer untersucht wurde, wurde eine direkte modulierende Wirkung von **6k** auf die $\alpha\beta$ Tubulin-Dynamik als sehr unwahrscheinlich betrachtet. Bemerkenswert war jedoch im zellulären Kontext von BSC-1 Zellen neben einer zeitlichen Inhibition der MT-Repolymerisation auch ein Verlust der räumlichen Organisation der MT. Hier ging die MT-Repolymerisation nicht nur von einem MTOC, sondern von mehreren Ausgangspunkten innerhalb der Zellen aus. Außerdem war eine erhöhte Anzahl mehrkerniger Zellen zu beobachten. Analog zu dem Verlust der räumlichen Organisation durch das MTOC in den untersuchten BSC-1 Zellen wiesen mitotische HeLa-L Zellen nach **6k**-Behandlung multipolare Mitosespindeln auf. Aus diesem Grund waren die Zellen in der Prometaphase arretiert und es gab Anzeichen einer chromosomalen Fehlverteilung. Diese beschriebenen Effekte von **6k** waren enantiomerspezifisch, da nur (-)-**6k** in den erwähnten Testsystemen aktiv war, während das Enantiomer (+)-**6k** bei den untersuchten Konzentrationen keinen Effekt auslöste. Diese Wirkungen legen eine große Spezifität der Interaktion von (-)-**6k** für sein molekulares Ziel nahe.

Zusammenfassend beruht demnach die biologische Wirkung von **(-)-6k** auf einer Interferenz mit der zellulären $\alpha\beta$ Tubulin Dynamik sowie insbesondere mit der räumlichen Organisation des MT-Zytoskelettes. Dieses zeigten die multiplen MT-Nukleationsstellen während der MT-Repolymerisation in BSC-1 Zellen und der multipolare Spindelapparat von HeLa-L Zellen. Somit scheint die Substanz eine Funktionsstörung des MTOCs zu verursachen, was zu einer multipolaren Mitose führt [264,265]. Hierbei wäre sowohl eine Centrosomen-Multiplikation, als auch eine Teilung centrosomaler Komponenten denkbar, die weitere Ursprungsorte der MT ausbilden könnten [119]. Aufgrund der multipolaren Mitose kommt es im weiteren Verlauf der Wirkung von **(-)-6k** zu einer Aktivierung des Spindelkontrollpunktes und einem mitotischen Arrest. Daraufhin wird entweder Apoptose induziert oder es aufgrund fehlerhafter Mitose eine erhöhte Anzahl mehrkerniger Zellen gebildet [119,266]. Eine derartige Modulation der räumlichen MT-Organisation und multipolarer Mitose durch Spirooxindol Naturstoffe war bisher unbeschrieben.

Somit führte die Identifikation des Spirooxindols **(-)-6k** zu einer weiteren Validierung des BIOS-Prinzips. Die Studie zeigte, dass auf der Grundlage evolutionär prävalidierter und bioaktiver Naturstoffe synthetisierte Naturstoff-basierte Substanzbibliotheken eine reiche Quelle an Substanzen mit unerwarteter Bioaktivität darstellen können.

6.2.2 Bewertung des p53-unabhängigen biologischen Effekts von 6k

Die Attraktivität, die Interaktion zwischen p53 und MDM2 zu inhibieren, ist in der bereits erwähnten Rolle dieser Proteine in der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose zu begründen. Die Identifikation der Nutline als MDM2-Binder zeigte, dass die Nutzung niedermolekularer Verbindungen für die Inhibition der MDM2/p53 Wechselwirkung möglich ist [105,106]. Aufgrund des großen klinischen Potentials einer spezifischen Inhibition der p53/MDM2-Interaktion beschäftigen sich zahlreiche Studien mit der Identifikation weiterer Wirkstoffe mit höherer Potenz. Hierbei zeigten Substanzen aus der Klasse der Spirooxindole hohe Bindungsaffinität zu MDM2 und starke zelluläre Aktivitäten in p53 exprimierenden Zellen [102,103,105,267]. Aus diesem Grund war es möglich, dass die in dieser Arbeit identifizierte Substanz **6k** ihre Bioaktivität durch eine Inhibition dieser Protein-Proteininteraktion begründete. Wie jedoch die Ergebnisse des p53/MDM2 ELISA-Tests zeigten, wirken diese Substanzen nicht nach diesem Mechanismus. Dieser Effekt untermauerte die vorherigen Eindrücke eines p53 unabhängigen Effekts von **6k**, der durch den gleichermaßen in HCT116 p53+/+ und HCT116 p53-/- Zellen induzierten G2/M Arrest erhalten wurde.

Spirooxindole, wie die in dem p53/MDM2 ELISA-Test als Kontrolle verwendete Substanz **p53A**, scheinen nach molekularen Modellen von Shangary et al. MDM2 auf solche Weise zu binden, dass sie einen Teil der Struktur des Proteins p53 imitieren und dessen Bindung an MDM2 inhibieren [105,106]. Die Stereochemie der Substanz **6k** ist jedoch andersartig als die von **p53A**, weshalb **6k** vermutlich nicht in der Lage ist, MDM2 effektiv zu binden und daher in den erwähnten Testsystemen inaktiv war. Zur Identifikation von spezifischen p53/MDM2-Inhibitoren sollte daher eine zukünftige Synthese die Stereochemie berücksichtigen. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte p53/MDM2-ELISA System kann potentiell als Screen eines rückwärtsgerichteten chemisch genetischen Ansatzes zur Identifikation solcher Substanzen verwendet werden. Eine erfolgreiche Etablierung dieses Systems konnte durch die Validierung der bekannten p53/MDM2-Inhibitoren Nutlin-3 und p53A gezeigt werden.

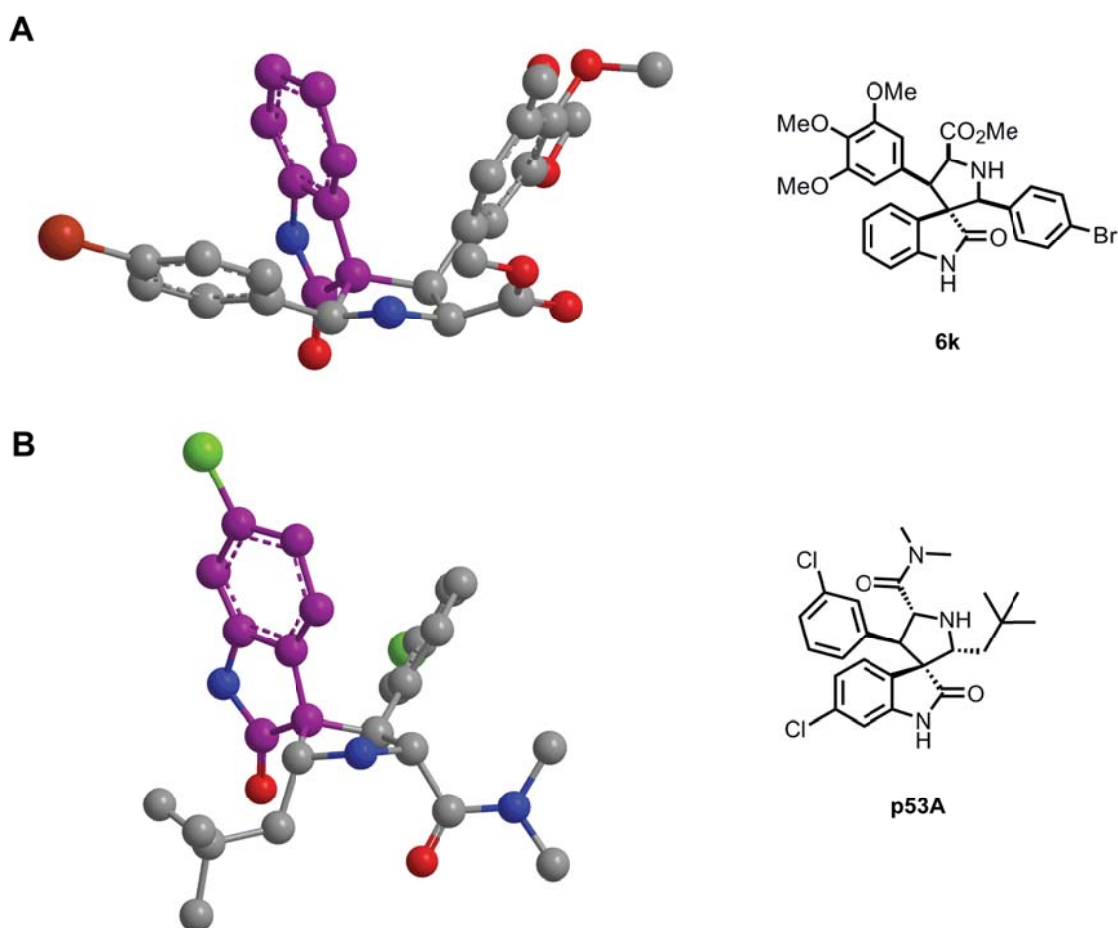


Abbildung 51. Dreidimensionale Strukturen der in dem p53/MDM2 ELISA Assay untersuchten Spirooxindole (verändert nach Antonchick et al. [172]) **A.** 3D Struktur von **6k**. **B.** 3D Struktur des bekannten MDM2/p53 Inhibitors **p53A**. Bei **6k** zeigen die vier Substituenten zu einer Seite des Pyrrolidinrings, während bei **p53A** die Substituenten an C2 und C5 sich zu der entgegengesetzten Seite des Ringes orientieren.

6.2.3 Mögliche Zielproteine von (-)-6k

Auf der Grundlage der diskutierten Effekte von **6k** sollen nachfolgend seine möglichen Zielproteine besprochen werden. Trotz des nicht vorhandenen Effektes von **6k** auf die *in vitro* Tubulin-Polymerisation stellt $\alpha\beta$ Tubulin aus folgenden Gründen ein potentielles Zielprotein dar. Wie **6k** kann auch die Wirkung anderer TBAs zu einer Interferenz mit der räumlichen MT-Organisation führen. So kann ihre Wirkung indirekt zelluläre Anomalitäten der MTOCs (Centrosomen) verursachen. Nach zellulärer Behandlung mit Colchicin oder Vinblastin werden häufig mehrfache MTOCs beobachtet, außerdem führt zelluläre Behandlung mit Taxotere, einem Derivat des Taxols, zur Dissoziation centrosomaler Komponenten [268-270]. Als Konsequenz eines hierdurch verursachten multipolaren Spindelapparates können mehrkernige Zellen die Folge sein [119,271-273]. Im Zusammenhang mit dem Effekt von (-)-**6k** ist die Wirkung der Noscainoid-TBAs sehr interessant. Diese Substanzen verändern wie (-)-**6k** nicht die *in vitro* MT-Polymermasse, sondern induzieren einen G2/M Arrest und Apoptose durch Centrosomen Amplifikation und multipolare Mitose [274-276].

Mögliche Zielproteine von (-)-**6k** könnten außerdem in direktem Zusammenhang mit den Centrosomen stehen, wodurch indirekt die zelluläre Inhibition der MT-Dynamik und der nicht vorhandene Effekt auf die *in vitro* Tubulin-Polymerisation erklärbar wäre. So ist es z.B. denkbar, dass das molekulare Ziel der Substanz ein Bestandteil des Centrosoms ist. Ebenso sind solche Proteine potentielle Ziele, die innerhalb des Reifungsprozesses des Centrosoms oder im Prozess der Centrosomen-Duplikation involviert sind. Daher soll die Biologie der Centrosomen näher erläutert werden. Das Centrosom besteht aus einem Centriolenpaar und dem PCM (pericentrioläres Material) (Abbildung 52 A). Nur die sog. Mutter-Zentriole besitzt distale Anhänge, welche wahrscheinlich für die Verankerung der MT wichtig sind [277]. Die Proteinzusammensetzung des PCMs ist dynamisch. Hierbei handelt es sich um Aggregate vieler verschiedener Proteine, bei denen einige, wie γ Tubulin, dort permanent vorkommen. Andere Proteine lokalisierten dort spezifisch abhängig von der Phase des Zellzyklus [278]. Neben der Verankerung der MT ist die MT-Keimbildung ein wichtiger centrosomaler Prozess. Diese wird durch den aus γ Tubulin und anderen Proteinen bestehenden γ Tubulin Ring like Complex (γ TURC) ermöglicht. Die Verankerung und Keimbildung der MT scheinen voneinander unabhängige Prozesse darzustellen (Abbildung 52B) [278,279]. Daher könnte spekuliert werden, dass (-)-**6k** auf Proteine wirkt, die entweder die Verankerungs- oder Keimbildungsfunktion des MTOCs stören. Aufgrund der wichtigen Funktion von γ -Tubulin in der Keimbildungsfunktion ist dieses Protein ein mögliches Zielprotein von **6k**. Weitere mögliche Zielproteine könnten in der Regulation des Centrosomenzyklus

involviert sein (Abbildung 52C) [278,280]. In diesem analog zu dem Zellzyklus benannten Prozess erfährt das Centrosom einen Reifeprozess, um schließlich den bipolaren mitotischen Spindelapparat ausbilden zu können. Zunächst wird in der S-Phase das vorhandene Centrosom durch den als Schlüsselinitiator fungierendem CDK2/Cyclin E Komplex dupliziert. Nach der Centrosomen-Reifung in der G2 Phase erfolgt die Centrosomen-Teilung. Die beiden gereiften Centrosomen bilden die beiden Pole des bipolaren Spindelapparates während der Mitose. Nach der Zytokinese besitzt jede Tochterzelle wieder ein Centrosom. Der Centrosomenzyklus ist durch das komplexe Zusammenspiel diverser Kinasen, Phosphatasen und Tumorsuppressoren reguliert. In Abbildung 52C sind einige dieser Proteine dargestellt. Veränderungen in der Regulation des Centrosomenzyklus können zu schwerwiegenden Fehlern wie einer mehrfachen Centrosomen-Duplikation und nicht vollzogene Teilung von Centrosomenbestandteilen führen. Resultierende mögliche Folgen sind multipolare Mitose, Fehler in der Chromosomenteilung und Aneuploidie. Diese Effekte stehen in direktem Zusammenhang mit den für **(-)-6k** beobachteten, zellulären Wirkungen. Daher sind mögliche Zielproteine dieser Substanz möglicherweise unter den Centrosomen regulierenden Proteinen sowie deren nachgeschalteten Proteinen zu finden.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der Eingrenzung der hier dargestellten möglichen Zielproteine um spekulative Überlegungen. Für die Identifikation des molekularen Ziels von **6k** sollten daher weitere Untersuchungen folgen. Ein Ansatzpunkt wäre eine reduktionistische Herangehensweise, die auf Grundlage der erwähnten räumlichen Regulationsmechanismen der Tubulin-Polymerisation erfolgen kann. So könnten die Centrosomen und ihre Bestandteile nach Behandlung mit **(-)-6k** fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Davon unabhängig sollte ein genereller Ansatzpunkt wie die Affinitätschromatographie verwendet werden. Hilfreich wären SAR-Analysen der Spirooxindole. Auf Grundlage solcher Daten könnte die geeignete Position für eine chemische Modifikation der Wirkstoffstruktur ermittelt werden, die eine Immobilisierung der Substanz und Bindung potentieller Zielproteine ermöglicht. Aufgrund der biologischen Evaluierung der sehr fokussierten Substanzbibliothek von 39 Spirooxindolen mit einer aktiven Substanz war die Erhebung solcher Daten im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Daher sollten weitere Spirooxindole auf Grundlage der Leitstruktur von **(-)-6k** synthetisiert und biologisch evaluiert werden. Solche Daten können außerdem hilfreich für die Synthese von Spirooxindolen mit höherer Wirksamkeit als **(-)-6k** dienen. Mit dem bioaktiven Enantiomer **(-)-6k** und dem inaktiven Enantiomer **(+)-6k** sind Substanzen vorhanden, die sich nach Identifikation der geeigneten Position für eine chemische Modifikation hervorragend für die

Synthese von Affinitätssonden und einen komparativen affinitätschromatographischen Ansatz eignen.

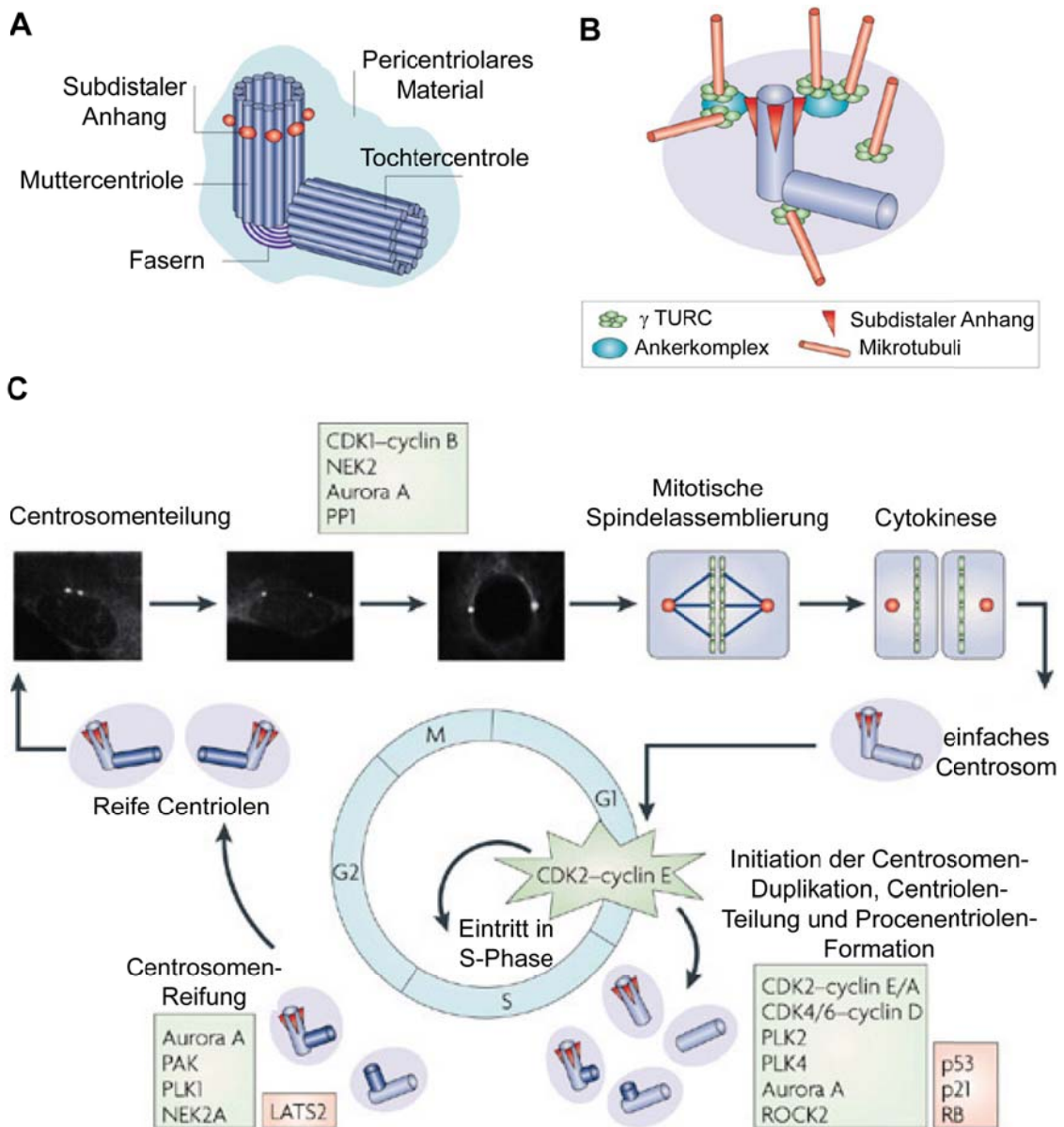


Abbildung 52. Struktur und Funktion des Centrosoms und Regulation des Centrosomenzyklus' (verändert nach Fukasawa [278]). **A.** Das Centrosom besteht aus einer Muttercentriole mit subdistalem Anhang und einer Tochtercentriole eingebettet ins pericentriolare Material. **B.** Mögliches Modell, bei dem die Verankerung der MT über den Ankerkomplex und den subdistalen Anhang erfolgt. Die Keimbildung wird durch den γ TuRC-Komplex ermöglicht. **C.** Der CDK2-Cyclin E-Komplex ist der Schlüsselinitiator des Centrosomenzyklus. Viele Proto-Onkogene (grün umrandet) und Tumorsuppressoren (rot umrandet) besitzen wichtige Funktionen im Centrosomenzyklus.

6.3 Die Tubulexine

Aus dem *High Content Screen* einer Kollektion von THPs zur Auffindung potentieller antimittotischer Substanzen wurde Tubulexin A identifiziert. Aufgrund des höchst interessanten zellulären Aktivitätsprofils des Wirkstoffs und seiner im Vergleich zu den später identifizierten Tubulexinen B und C höher bemessenen Bioaktivität wurde ein biotinyliertes Analogon von Tubulexin A zur Identifikation des Zielproteins der Tubulexine mittels einer SILAC-basierten komparativen Affinitätsaufreinigung verwendet. Durch proteinbiochemische Tests wurden die Zielproteine validiert und die Bindung näher charakterisiert. Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurden weiterführende Überlegungen zur zellulären Wirkungsweise der Tubulexine angestellt und das Potential der Tubulexine als Ansatzpunkte für die Synthese potentiell klinisch interessanter Substanzen bewertet.

6.3.1 Die zellulären Effekte der Tubulexine und ihre Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR)

Nach der Identifikation von Tubulexin A mittels des HeLa Phänotyp-Screens als einen potentiellen Induktor mitotischen Arrests und der Apoptose erfolgte zunächst die Bestätigung dieser Befunde durch weitere Untersuchungen. Hierbei konnte der G2/M Arrest durch die Analyse des DNA-Gehaltes der HeLa Zellen klar belegt werden [110,281]. In dieser Zelllinie zeigte Tubulexin A die höchste Aktivität, da bei einer Konzentration von 2 μM eine erhöhte Zellzahl in G2/M arretiert war. Doch wurde auch in anderen untersuchten Zelllinien ein G2/M-Arrest beobachtet, wobei in BSC-1, MCF-7 und HeLa Zellen der Arrest bei einer Konzentration von 10 μM maximal und vergleichbar mit dem Einfluss von 1 μM Nocodazol war. Die eindeutige Bestätigung einer durch Tubulexin A eingeleiteten Apoptose wurde durch das Vorhandensein mehrerer Apoptose-spezifischer Marker in HeLa Zellen erhalten, da eine erhöhte Caspase 3/7-Aktivität, erhöhtes PARP-1-Vorkommen und die Exposition von Phosphatidylserin an der äußeren Plasmamembran nachgewiesen werden konnte [282]. Des Weiteren konnte durch Farbstoff-Ausschlussmethoden unter Verwendung von Trypan Blau und 7-AAD gezeigt werden, dass der antiproliferative Effekt bis zu der höchsten untersuchten Konzentration von 30 μM Tubulexin A nicht mit einer Erhöhung der Nekroserate erklärt werden konnte. Daraus konnte geschlossen werden, dass der antiproliferative Effekt von Tubulexin A auf die Induktion von G2/M Arrest und Apoptose zurückzuführen ist. Dennoch gab es in den Versuchen eine geringe Fraktion Trypan Blau- und 7-AAD gefärbter Zellen. Hierbei handelte es sich jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit um spät-apoptotische Zellen, da es in diesem Stadium schließlich zu einem Verlust der Membranintegrität kommt und somit die

zelluläre Aufnahme der Farbstoffe ermöglicht wird [283]. Im Falle einer nekrotischen Wirkung wären daher diese Zellanteile größer ausgefallen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Tubulexin A wesentlich Nekrose auslöst. Da Nekrose zu einer porösen Plasmamembran führt, können toxische zelluläre Intermediate in die Zellumgebung freigesetzt werden und sowohl Entzündungsreaktionen des umgebenden Gewebes, als auch eine Autoimmunantwort die Folge sein [284,285]. Eine nekrotische Nebenwirkung ist ein Grund, weshalb z.B. Colchicin nicht als Krebsmedikament zugelassen wurde [286].

Bei den niedrig mikromolaren Konzentrationen, bei denen Tubulexin A einen Zellzyklusarrest und Apoptose induzierte, konnte dessen modulierende Wirkung auf das MT-Zytoskelett gezeigt werden, während die Organisation der zellulären Aktinfilamente unbeeinflusst blieb. Eine Interferenz mit der zellulären $\alpha\beta$ -Tubulin-Dynamik wurde durch die äußerst stark inhibierende Wirkung von Tubulexin A auf die zelluläre MT-Repolymerisation kältebehandelter BSC-1 Zellen demonstriert. Außerdem zeigten die mikroskopischen Studien eine stark veränderte Morphologie des Zellkerns und ein erhöhtes Vorkommen mehrkerniger Zellen, welches als ein starkes Anzeichen einer gestörten chromosomalen Fehlverteilung gewertet werden kann. Zusammenfassend deuteten die zellulären Studien im starken Maße auf eine Interferenz mit der $\alpha\beta$ Tubulin-Dynamik hin als deren Folge der ermittelte G2/M-Arrest und im weiteren Verlauf Apoptose induziert wird oder mehrkernige Zellen entstehen [119].

Mittels des BSC-1 Phänotyp-Screens der aus 150 THPs bestehenden Substanzbibliothek konnten außerdem Tubulexin B und C als Substanzen mit gleichem Wirkprinzip wie Tubulexin A identifiziert werden und somit Informationen über die SAR der Tubulexine erhalten werden. Diese Ergebnisse waren sowohl für die Synthese einer Affinitätssonde von Tubulexin A, welche für die nachfolgende SILAC basierte Affinitätschromatographie verwendet wurde, als auch für eine mögliche zukünftige Synthese Tubulexin basierter Substanzbibliotheken sehr hilfreich.

6.3.2 Die SILAC basierte Affinitätschromatographie

Als Methode zur Identifikation potentieller Zielproteine von Tubulexin A wurde eine SILAC basierte komparative Affinitätschromatographie gewählt, da die relative Quantifizierung potentieller Zielproteine gegenüber der klassischen komparativen Affinitätschromatografie diverse Vorteile besitzt.

6.3.2.1 Die Affinitätssonden

Zunächst wurde der Wirkstoff Tubulexin A, ebenso wie eine strukturell möglichst ähnliche inaktive Substanz, mit einem Linker-Substituenten zur Immobilisierung an eine Streptavidin-Matrix chemisch modifiziert werden. Das THP TV_AMS, welches in allen relevanten zellbasierten Testsystemen inaktiv war, wurde als Vorlage für die Synthese der potentiell inaktiven Molekülsonde verwendet. Der Linker sollte einerseits lang genug sein, um sterische Behinderungen der Wirkstoff-Zielprotein-Interaktion zu vermeiden und andererseits keine zu hohe Hydrophobizität aufweisen, da diese zu einer Auto-Aggregation und einer Erhöhung der Bindung unspezifischer Proteine hätte führen können [287]. In jüngster Zeit wurden unterschiedliche Linker-Systeme entwickelt, die solche Eigenschaften besitzen. Die in verschiedenen Längen kommerziell erhältlichen Polmethylenglycol- oder Polyethylenglycol (PEG)-Linker kommen hierbei sehr häufig zum Einsatz, wobei die PEG-Konjugate bessere physikalische Eigenschaften besitzen und in vielen Fällen die Bindung unspezifisch bindender Proteine reduzieren. [59,288]. In der Tat handelt es sich bei dem PEG-Biotin-Linker um die insgesamt am häufigsten gewählte Linker-Alternative, weshalb sie auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde [58]. Ein weiterer, wichtiger Punkt in der Synthese der Affinitätssonde ist die regioselektive Anknüpfung des Linkers ohne nachhaltigem Verlust der Aktivität des Wirkstoffes [60]. Hierfür sind die Ergebnisse von SAR-Studien sehr hilfreich [177,289,290]. Die für die THP-Substanzbibliothek durchgeführte SAR-Studie ließ schließen, dass R3 der THPs sehr verschiedenartig substituiert werden kann. Die Synthese der Affinitätssonde **1** wurde über eine Esterbindung der PEG-Biotin-Einheit zum Sauerstoff-Substituenten an R3 von Tubulexin A vorgenommen. Für die TV_AMS Affinitätssonde **2** wurde die PEG-Biotin-Einheit über eine Ether-Bindung mit dem R3-Phenolsubstituenten an C2 des THP-Kerns eingefügt. Eine zusätzliche Veresterung hätte, aufgrund der möglichen Hydrolyse des Phenylesters durch die im zellulären Proteinextrakt vorkommenden Esterasen, möglicherweise zu einem zu Stabilitätsverlust der Sonde geführt (persönliche Mitteilung von Dr. Hugo Lachance). Die unveränderte zelluläre Aktivität der Tubulexin A-Affinitätssonde in den relevanten zellbasierten Assays zeigte, dass eine derartige Substitution möglich ist. Somit konnte die Affinitätssonde **1** zur Identifikation potentieller Zielproteine von Tubulexin A eingesetzt werden.

6.3.2.2 Bewertung der SILAC basierten Affinitätschromatographie

Nach der erfolgreichen Markierung der HeLa-Zellen mittels SILAC konnte für die geplante komparative Affinitätschromatographie auf in der Abteilung bereits etablierte und erfolgreich angewandte Protokolle zurückgegriffen werden [291,292]. Im

Anschluß an die Affinitätschromatographie wurden die von den Affinitätssonden **1** und **2** spezifisch gebundenen, unterschiedlich markierten Proteine zur relativen Quantifizierung vereinigt. Vor dem Trypsin-Verdau der Proteine und der massenspektrometrischen Analyse wurden diese über eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in mehreren Fraktionen prozessiert. Eine Analyse der gesamten Fraktion gebundener Proteine hätte selbst die maschinelle Tandem MS/MS-Analyse wahrscheinlich überfordert [293,294]. Die Konsequenz wäre, dass nur eine geringe Fraktion gebundener Peptide detektiert würde, wodurch potentielle Zielproteine möglicherweise nicht erkannt und im Hinblick auf den quantitativen SILAC Einsatz nicht korrekt quantifiziert worden wären.

Die Identifikation und Quantifizierung gebundener Peptide aufgrund der MS/MS Peptidfragmente wurde durch eine kombinatorische Verwendung der Mascot- und MaxQuant-Software ermöglicht [295]. Während die auf einem Wahrscheinlichkeits-Algorithmus beruhende Mascot-Software in der Abteilung generell für die Identifikation potentieller Zielproteine in der komparativen Affinitätschromatographie eingesetzt wurde [291,292], war die alleinige Nutzung dieses Programms für den quantitativen proteomischen Ansatz schwer möglich. Wie Pilotstudien zur Evaluierung des Potentials von MaxQuant für SILAC zeigten, führt die Verwendung der MaxQuant Software zu einer drastischen Steigerung identifizierter *heavy/light* SILAC Peptidpaare von durchschnittlich 10-20% zu 73% und außerdem zu einer 6-fachen Erhöhung der Massengenauigkeit identifizierter Peptide [167]. Somit stellte diese bioinformatische Plattform zur Auswertung der chemisch proteomischen Daten ein sehr wertvolles Werkzeug dar.

Aufgrund des ersten Einsatzes der SILAC-basierten Affinitätschromatografie zur Identifikation potentieller Zielproteine einer Substanz in der Abteilung gab es keine Erfahrungswerte, auf welche in der Daten-Auswertung der Peptidfragmente zurückgegriffen werden konnte. Daher mussten beliebige Schwellenwerte für die Unterscheidung spezifischer Zielproteine und unspezifischer Bindungsproteine von Tubulexin A gesetzt werden. Im Falle eines *pulldown* mit der Tubulexin-Sonde **1** mit *heavy* Extrakt und der Kontroll-Sonde **2** mit *light* Proteinextrakt sollte die relative Signalintensität zwischen identifizierten *heavy* und *light* Peptiden größer als 1,3 sein. Im umgekehrten Fall, d.h. bei der Inkubation von **1** mit *light* Proteinextrakt sollte dieser Wert kleiner als 0,7 sein. Außerdem sollten pro Versuch mindestens zwei Peptidsequenzen eines Proteins identifiziert und insgesamt in mindestens 3 von 4 Versuchen quantifiziert worden sein. Diese Kriterien erwiesen sich als passende Kriterien. So wurde eine auffällig geringe Gesamtanzahl von nur 9 potentiellen Zielproteinen identifiziert. Hingegen wurden in vorherigen, in der Abteilung

durchgeführten komparativer Affinitätsstudien zur Identifikation potentieller Zielproteine von Testsubstanzen, eine Vielzahl potentieller Zielproteine identifiziert [291,292,296]. Aufgrund der Übernahme der Protokolle zur Affinitätsaufreinigung sind die Gründe der in dieser Arbeit stark reduzierten Proteinanzahl außerhalb des *pulldowns* zu suchen. So scheinen die Parameter und die veränderte bioinformatische Analyse *per se* sehr gut gewählt worden zu sein. Außerdem könnte die Affinitätssonde von Tubulexin A eine vergleichsweise hohe Selektivität gegenüber seinen potentiellen Zielproteinen aufweisen.

Die identifizierten potentiellen Zielproteine und ihre biologischen Funktionen im Zusammenhang mit der THP-Studie werden detailliert im nachfolgenden Abschnitt dargestellt. Im technischen Zusammenhang mit dem verwendeten quantitativen proteomischen Ansatz ist die Identifikation von $\alpha\beta$ -Tubulin als sehr interessant zu bewerten. Bei Tubulin handelt es sich um ein sehr hoch exprimiertes Protein. In Relation zu der gesamten zellulären Proteinmenge beträgt der Anteil von Tubulin in HeLa Zellen 4,3% [297,298]. Wie die Immundetektion von α -Tubulin nach Affinitätsaufreinigung zeigte, bindet auch die Affinitätssonde **2** der in den zellulären Testsystemen verwendeten, inaktiven Substanz TV_AMS an Tubulin. Aufgrund des hohen Vorkommens von Tubulin ist unspezifische Bindung von **2** nicht ausgeschlossen. Mit einem klassisch komparativen Ansatz, wäre die Identifikation von Tubulin als mögliches Zielprotein daher höchstwahrscheinlich durch die Bindung der inaktiven Molekülsonde maskiert worden. Somit zeigte die praktische Anwendung des quantitativ proteomischen Ansatzes im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Bestätigung seines Potentials für die Identifikation Wirkstoff spezifischer Proteinziele. Dieses konnte am Beispiel des hochexprimierten und daher zu unspezifischer Interaktion neigenden Proteins Tubulin gezeigt werden [60,61,290,299].

6.3.2.3 Die potentiellen Zielproteine von Tubulexin A

Als potentielle Zielproteine von Tubulexin A wurden auf Grundlage der genannten Kriterien α - und β -Tubulin bewertet. Die Identifikation von $\alpha\beta$ -Tubulin schlug vor, dass Tubulexin A aufgrund einer direkten Bindung mit der Dynamik von $\alpha\beta$ Tubulin interferiert, was die zellulären Wirkungen von Tubulexin A erklären würde [119].

Eine Zelle kann diverse Isoformen von Tubulin exprimieren. Es wurden jeweils zwei Isoformen von α -Tubulin und β -Tubulin als potentielle Zielproteine von Tubulexin A identifiziert. Sowohl die α -Tubulin-, als auch die β -Tubulin-Isoformen besitzen untereinander eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit. Ein Sequenzvergleich mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) zeigt eine 96% ige Sequenzidentität von α -Tubulin-6 und α -Tubulin-1 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>). Auch die

beiden β -Tubulin-Isoformen besitzen mit einem Wert von 97% eine große Sequenzidentität. Aufgrund des verwendeten Wahrscheinlichkeitsalgorithmus in der bioinformatischen Analyse kann die Isoform-spezifische Identifikation von $\alpha\beta$ -Tubulin nicht als gesichert angenommen werden und durchaus auf Artefakte der bioinformatischen Analyse beruhen. Hingegen besitzen α - und β -Tubuline nur 40% Sequenzidentität, weshalb die Isolation der beiden Proteine als sehr gesichert erachtet werden kann [300].

Ferner war das Proteins CAS als potentielles Zielprotein von Bedeutung, da es durch seine Assoziation mit MT und dem mitotischem Spindelapparat mit MT in Verbindung gebracht wurde, weshalb für das Protein eine potentielle Rolle in der Zellteilung vorgeschlagen wurde [301]. Kürzlich lieferten weitere Studien nähere Informationen über CAS und seine biologischen Effekte, die im Zusammenhang mit seiner Funktion als MAP stehen. Diese Studien zeigten, dass eine erhöhte CAS-Expression zu einer verstärkten Assoziation von α - und β -Tubulin sowie zu einer verstärkten Tubulin-Assemblierung führt [302]. Somit scheint CAS die Tubulin-Dynamik zu beeinflussen, indem es MT stabilisierend wirkt. Dieses wurde durch die CAS vermittelte Inhibition der Phosphorylierung von α - und β -Tubulin erklärt an Tyrosinen erklärt, einer posttranslationalen Modifikation, die wichtig für die $\alpha\beta$ -Tubulin-Polymerisation ist [302,303]. CAS ist in diversen Krebszellen überexprimiert. Außerdem zeigen die Ergebnisse verschiedener Studien, dass CAS in der Regulation der Proliferation, Apoptose und Metastasierung von Krebszellen involviert ist [304-307]. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist besonders erwähnenswert, dass ein *knockdown* von CAS in HeLa Zellen zu einem G2/M-Zellzyklusarrest und zu Zell-Phänotypen führt, die mit chromosomaler Fehlverteilung in Verbindung gebracht werden können [307,308]. Aufgrund der zellulären Wirkungen von Tubulexin A könnte CAS somit ein spezifisches Zielprotein der Substanz darstellen.

Zusätzlich sei noch erwähnt, dass die zelluläre Lokalisation von CAS zwar hauptsächlich auf die MT im Zytosol beschränkt ist, jedoch kommt es auch im Nukleus vor (Abbildung 53A). Im Zellkern ist CAS, welches in diesem Zusammenhang als Exportin-2 bezeichnet wird, ein nukleärer Export-Faktor, indem es das Protein Importin α in das Zytoplasma exportiert [307]. Die Funktion von Importin α besteht wiederum darin, zusammen mit Importin β solche Proteine in den Zellkern zu transportieren, die dort wirken, u.a. Transkriptionsfaktoren wie p53. Im Zellkern wird Ran-GTP von diesem aus $\alpha\beta$ Importin und dem für den Kernimport vorgesehen Protein bestehenden Komplex gebunden. Hierdurch wird der Proteinkomplex aufgelöst. Nach GTP-Hydrolyse mit Hilfe des Nukleotidaustauschfaktors RCC1 vermittelt CAS

schließlich den Export von Importin α aus dem Zellkern, wo Importin α schließlich weitere Proteine für den Kernimport binden kann (Abbildung 53B).

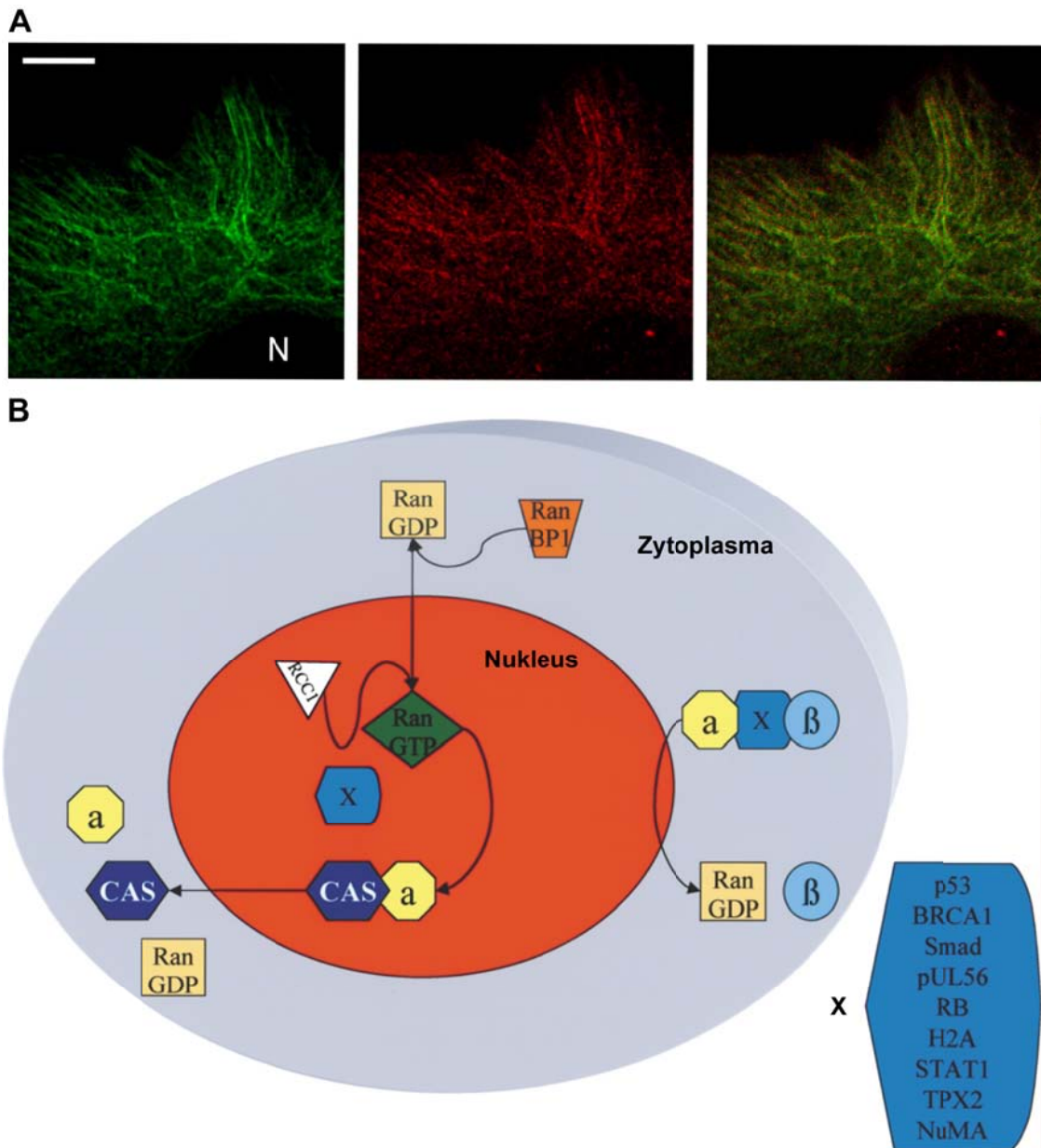


Abbildung 53. Die zelluläre Lokalisation von CAS. A. Fluoreszenzmikroskopische Bilder von CAS überexprimierenden MCF-7 Zellen zeigen eine Kolo­kalisierung von MT (grün) und CAS (rot). Eine CAS-Fraktion befindet sich im Zellkern (N). Maßstab­balken 10 μm (entnommen aus Tai et al. [302]). B. Schema der nuklearen Exportfunktion von CAS aus dem Zellkern. X= Proteine für den Kernimport; α/β = Importin α/β (verändert nach Behrens et al. [307]).

Mittels Immunodetektion von α -Tubulin und CAS nach komparativer Affinitätschromatographie konnten die potentiellen Zielproteine und ihre erhöhte Isolierung durch die Tubulexin A Affinitätssonde bestätigt werden. Die übrigen, mittels der SILAC-basierten Affinitätschromatographie identifizierten Zielproteine von Tubulexin A wurden nicht näher untersucht, da ihre biologischen Funktionen nicht in

einen direkten Zusammenhang mit der ermittelten zellulären Aktivität von Tubulexin A gebracht werden konnten.

6.3.3 *In vitro* Studien zur Validierung der Zielproteine $\alpha\beta$ -Tubulin

Nach der Identifikation von $\alpha\beta$ -Tubulin als potentielle Zielproteine der Tubulexine mittels SILAC basierter Affinitätschromatographie konnte durch die inhibitorische Wirkung von Tubulexin A auf die *in vitro* Tubulin-Polymerisation eine MAP- und somit auch eine CAS-unabhängige Wirkung von Tubulexin A auf die $\alpha\beta$ -Tubulin-Dynamik dargestellt werden. Die Inhibition der *in vitro* Tubulin-Polymerisation stand in sehr gutem Einklang mit den zellulären Effekten von Tubulexin A. Dies galt insbesondere für die Inhibition der MT-Repolymerisation in BSC-1 Zellen. Somit konnte $\alpha\beta$ -Tubulin als Zielprotein von Tubulexin A validiert und die zelluläre Aktivität von Tubulexin A ausreichend mit einer Inhibition der Tubulin-Dynamik erklärt werden [119]. Im Gegensatz zu Nocodazol führte Tubulexin A jedoch nicht zu einer kompletten Inhibition der *in vitro* Tubulin-Polymerisation.

Durch die Inhibition der $\alpha\beta$ -Tubulin-Polymerisation konnte Tubulexin A in die Gruppe der MT-destabilisierenden Substanzen eingeordnet werden. Daher wurde von der Untersuchung einer etwaigen Bindung von Tubulexin A an die Taxol-Bindestelle, an der gewöhnlich die MT-stabilisierenden Substanzen binden, abgesehen. Hingegen wurde eine Bindung von Tubulexin A entweder an die Colchicin-Bindestelle oder die Vinca Alkaloid-Bindestelle als wahrscheinlich erachtet. Durch Wettbewerbs-Experimente konnte dargestellt werden, dass Tubulexin A mit BODIPY-FL-Vinblastin um die Vinca Alkaloid-Bindestelle $\alpha\beta$ -Tubulins unter den gewählten Bedingungen stöchiometrisch konkurriert und zwar ähnlich stark wie Vinblastin. Hingegen war eine Konkurrenz mit Colchicin nicht vorhanden. Somit konnte gezeigt werden, dass Tubulexin A an die Vinca Alkaloid-Bindestelle von $\alpha\beta$ -Tubulin bindet.

Mittels der Bestimmung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz und der Bindung von BIS-ANS an $\alpha\beta$ -Tubulin wurde ein möglicher Einfluss von Tubulexin A auf die $\alpha\beta$ -Tubulin-Konformation untersucht. Diese Methoden werden häufig in der Untersuchung von TBAs angewandt werden [231,233,275,309]. Es konnte jedoch keine veränderte Tubulin-Konformation durch die Tubulexin A-Bindung festgestellt werden. Somit erscheint es möglich, dass die Konformation von $\alpha\beta$ -Tubulin durch die Bindung von Tubulexin A nur im geringen Maße oder gar nicht beeinflusst wird. Jedoch besitzen beide Methoden Nachteile, weshalb die Ergebnisse nicht überbewertet werden sollten. So wird der Tryptophanfluorophor nur durch Veränderungen der Polarität in seiner direkten Umgebung beeinflusst [168,310]. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Bindung von Tubulexin A nicht in unmittelbarer

Nähe von einem der acht in $\alpha\beta$ -Tubulin vorkommenden Tryptophanreste stattfindet. Bei der Bestimmung der BIS-ANS Fluoreszenz hingegen handelte es sich um eine indirekte Methode, Konformationsänderungen von $\alpha\beta$ -Tubulin festzustellen. Hierbei ist besonders zu beachten, dass durch die Bindung von BIS-ANS selbst die Konformation von Proteinen beeinflusst werden kann, was auch speziell für $\alpha\beta$ Tubulin vorgeschlagen wurde [311]. Somit ist es möglich, dass durch die Bindung von BIS-ANS die Konformation von $\alpha\beta$ -Tubulin insofern verändert wird, dass eine Modulation der $\alpha\beta$ Tubulin-Bindestelle von Tubulexin A verursacht wird und somit die Bindung von Tubulexin A gestört ist. Aufgrund der Ergebnisse in Zusammenhang mit der kritischen Betrachtung der gewählten Methoden sollte zukünftig für die Konformationsanalyse von $\alpha\beta$ -Tubulin alternative Testsysteme gewählt werden. Eine mögliche sensitive Methode wäre die Untersuchung von Veränderungen in der Sekundärstruktur von $\alpha\beta$ -Tubulin durch CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie [312,313].

Sowohl Vinblastin als auch Tubulexin A hatten im Gegensatz zu Nocodazol keinen modulierenden Effekt auf die GTPase-Aktivität von $\alpha\beta$ Tubulin. Viele Liganden der Vinca Bindestelle von $\alpha\beta$ -Tubulin wie der Peptidligand Phomopsin A sind starke Inhibitoren der GTPase-Aktivität von nicht-polymerisiertem $\alpha\beta$ -Tubulin [314,315]. Jedoch tritt dieser Effekt für Vinblastin nur in äußerst geringem Maße auf, was die Ergebnisse des wahrscheinlich nicht ausreichend sensitiven Malachit-Grün Tests erklären könnte. Interessanterweise konnte zudem für Tubulexin A keine veränderte GTPase-Aktivität ermittelt werden, was eine ähnliche Bindung beider Substanzen an die Vinca Bindestelle möglich erscheinen lässt. Cormier et al. analysierten in einem Vergleich die Kokristallstrukturen von $\alpha\beta$ -Tubulin mit Vinblastin und $\alpha\beta$ -Tubulin mit Phomopsin A [316,317]. Aufgrund des starken Kontakts von Phomopsin A mit der Aminosäure Tyr β 224, im Gegensatz zu Vinblastin, kamen sie zu dem Schluss, dass diese Aminosäure für die GTPase-Aktivität von $\alpha\beta$ -Tubulin entscheidend sein muss. Es ist spekulativ, ob eine mangelnde Interaktion von Tubulexin A mit Tyr β 224 den Grund für die nicht veränderte GTPase-Aktivität von $\alpha\beta$ -Tubulin darstellt. Innerhalb zukünftiger Untersuchungen Tubulexin A betreffend könnte seine molekulare Interaktion mit der Vinca Alkaloid-Bindestelle von $\alpha\beta$ -Tubulin aufgeklärt werden. Solche Studien könnten zu einem durchdringenden Verständnis der molekularen Wirkung der Tubulexine führen. Dieses beinhaltet die Durchführung intensiver strukturanalytischer Studien.

6.3.4 Überlegungen zur Wirkung von Tubulexin A auf die Tubulin-Dynamik und die mögliche Involvierung von CAS

Im Gegensatz zu den zellulären Untersuchungen, bei denen die bioaktivste Verbindung Tubulexin A einen äußerst starken Effekt auf die MT-Repolymerisation hatte, war der *in vitro* Effekt auf die $\alpha\beta$ -Tubulin-Polymerisation geringer ausgeprägt. Nachfolgend sollen diesbezüglich mögliche Gründe diskutiert werden.

Ein Teil der inhibitorischen Wirkung auf die MT-Assemblierung scheinen viele Liganden der Vinca Alkaloid-Bindestelle durch die Aggregation von $\alpha\beta$ -Tubulin zu parakristallinen Strukturen zu begründen. Diese bilden sich aus Substanz induzierten, ringartigen Assemblierungen nichtmikrotubularer $\alpha\beta$ -Tubulin-Polymere [315-319]. So führt z.B. die interdimeräre Stabilisierung zweier $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimere durch Interaktion von Vinblastin mit β_1 -Tubulin und α_2 -Tubulin zur Bildung ringförmiger Aggregate [317,320]. Folglich könnte Tubulexin A als Ligand der Vinca Alkaloid-Bindestelle ähnliche Effekte besitzen. Die parakristallinen Strukturen könnten demnach möglicherweise zu einer Interferenz mit dem turbidometrischen *in vitro* Tubulin-Polymerisations Ansatz geführt und den depolymerisierenden Effekt von Tubulexin A bis zu einem gewissen Grad maskiert haben [321]. Dieses könnte als Erklärung für die im Vergleich zu Nocodazol relativ gering ausgeprägte Inhibition der *in vitro* Polymerisation dienen. Eine Induktion nichtmikrotubularer $\alpha\beta$ Tubulin Polymere durch die Tubulexine könnte etwa mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden [322,323].

Außerdem ist es möglich, dass das durch die SILAC basierte Affinitätschromatographie identifizierte MAP Protein CAS eine Rolle in der zellulären Aktivität von Tubulexin A spielt. Auch in diesem Zusammenhang ist die Bindung der Tubulexine an die Vinca Alkaloid Stelle interessant. Es konnte gezeigt werden, dass eine zelluläre Behandlung mit Vincristin, einem weiteren Liganden dieser Bindestelle, zu einer Dissoziation von MT-gebundenem CAS führt [301]. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine Konkurrenz von Vincristin und CAS und somit eine Überschneidung der Vinca Alkaloid-Bindestelle mit der $\alpha\beta$ -Tubulin-Bindestelle von CAS sein. Ein Bezug zu der physiologischen Relevanz des Proteins CAS auf die Wirkung von Tubulexin A sollte näher untersucht werden. Möglich wäre eine Bindung von Tubulexin A sowohl an $\alpha\beta$ -Tubulin als auch an CAS und eine polypharmakologische Wirkung durch Bindung beider Proteine. Dies könnte u.a. einen synergetisch inhibitorischen Effekt auf die $\alpha\beta$ Tubulin-Polymerisation bedeuten. Dieses wäre unerwartet, da die Wirkung von CAS bisher mit einer aktivierenden Wirkung auf die $\alpha\beta$ -Tubulin-Polymerisation in Verbindung gebracht wurde. Ein solcher

etwaiger dualer Wirkmechanismus der Tubulexine würde als einzigartig für TBAs gelten. Außerdem wäre eine physiologisch relevante Bindung von Tubulexin A an CAS sehr bedeutungsvoll, da die biologischen Funktionen dieses Protein zu einem möglichen Zielprotein für die Krebstherapie machen.

6.3.5 Das Potential der Tubulexine als Leitstrukturen für TBAs

Der Wirkstoff Taxol gilt als das erfolgreichste Krebsmedikament überhaupt, denn die Umsätze mit dieser Substanz und ihren Derivaten übersteigen 3 Milliarden US-Dollar jährlich [324]. Leider besitzt der Wirkstoff ebenso wie andere derzeit klinisch angewandte TBAs - wie die Vinca Alkaloide - nennenswerte Einschränkungen. So ist der geographische Verbreitungsgrad der Erzeuger-Pflanze *Taxus brevifolia* und folglich die Bioverfügbarkeit von Taxol gering. Verschiedene etablierte Totalsynthesen dieses strukturell komplexen Wirkstoffes erwiesen sich als zu kostspielig für die industrielle Anwendung. Daher hängt die Produktion von Taxol und seiner Derivate von der Semisynthese aus Naturstoff-Vorgängersubstanzen ab, hierbei sind die Wirkstoff-Ausbeuten relativ gering [324,325]. Im Gegensatz dazu sind die in dieser Arbeit identifizierten und durch Dr. Tobias Voigt synthetisierten Tubulexine aufgrund ihrer im Vergleich zu Taxol und anderen TBAs relativ einfachen Struktur chemisch zugänglich und durch kombinatorische Synthese leicht derivatisierbar.

Ein weiteres Problem in der klinischen Anwendung ist die Entstehung von zellulären Resistenzmechanismen gegenüber dem Wirkstoff. Daher wurde eine Taxol resistente HeLa Zelllinie etabliert und nachfolgende die Wirkung von Taxol und Tubulexin A auf diese HeLa-Txl Zelllinie bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine erfolgreiche Etablierung der HeLa-Txl Zelllinie, da eine fast 10fach erhöhte Resistenz gegenüber Taxol erreicht wurde. Diese Resistenz kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden, da unterschiedliche Mechanismen einer Zelle Taxol-Resistenz ausbilden [137,144,326]. Diese können in 5 Kategorien eingeteilt werden und ihre Wirkung an verschiedenen Schritten der TBA Wirkkaskade entfalten. Abbildung 54 zeigt eine Zusammenfassung dieser Resistenzmechanismen. Es wäre durchaus wissenswert, in Folgestudien den Resistenzmechanismus der HeLa-Txl Zelllinie zu ermitteln. Häufig steht der Resistenzmechanismus sowohl gegenüber Taxol als auch den Vinca Alkaloiden in Verbindung mit der erhöhten Expression der β III Tubulin-Isoform (siehe Abbildung 54E), weshalb ein Ansatzpunkt hierfür eine Protein-Analyse der in dieser Zelllinie exprimierten Tubulin-Isoformen sein könnte [327]. Aufgrund der Etablierung der Zelllinie durch Selektion einer resistenten Zellpopulation anstatt eines resistenten Klons ist es möglich, dass mehrere Resistenzfaktoren eine Rolle spielen. Interessanterweise war die Aktivität von Tubulexin A in der HeLa-Txl Zelllinie nicht

negativ beeinflusst, sondern ähnlich ausgeprägt wie in HeLa Zellen. Somit ist der Resistenzmechanismus der HeLa-Txl Zelllinie unwirksam gegenüber dem Wirkstoff, was Tubulexin A zu einem attraktiven Startpunkt für die Synthese Tubulexin A-basierter Substanzbibliotheken macht. In diesem Zusammenhang wäre außerdem wissenswert, ob die Bioaktivität der Tubulexine als Liganden der Vinca Alkaloid-Bindestelle von den Resistenzmechanismen Vinca Alkaloid-resistenter Zellen unbeeinflusst bleibt. Hierfür könnte in Analogie zu der HeLa-Txl Zelllinie eine Vinblastin resistente HeLa Zelllinie etabliert und die antiproliferative Wirkung von Vinblastin und den Tubulexinen auf diese Zellen untersucht werden.

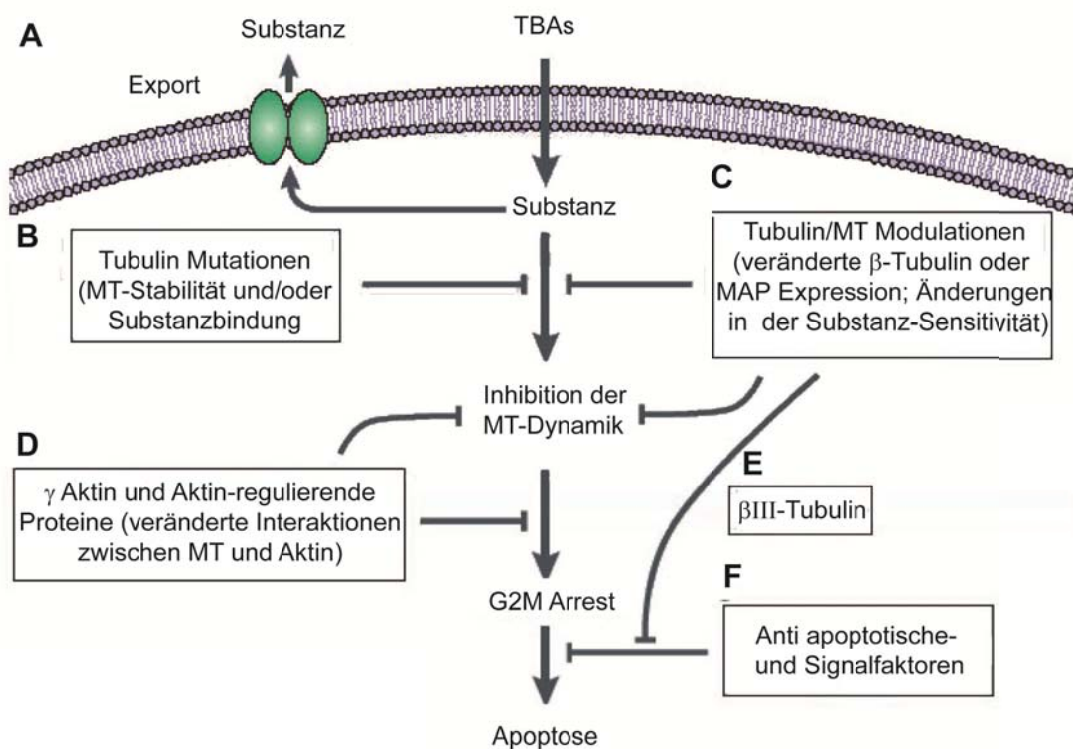


Abbildung 54. Zelluläre Resistenzmechanismen gegen TBAs. (verändert nach [326] **A.** Verringerte zelluläre Substanz-Akkumulation durch die Überexpression membrangebundener Substanz Exportproteine wie das P-glycoprotein. **B.** Eine direkte Änderung im Zielprotein der Substanz durch Mutation **C.** Veränderte Expression von Tubulin Isotypen MAP-Expression, welche die Effizienz einer Substanz reduziert. **D.** MT-Modulationen, verursacht durch die Interaktion mit oder Regulation durch anderen Komponenten des Zytoskelettes wie γ Aktin oder Aktin regulierenden Proteinen, welche die antimittotische und apoptotische Wirkung von TBAs beeinflussen. **E** Eine erhöhte Expression der β III Tubulin-Isoform **F.** Defekte in apoptotischen Signalwegen.

In der HeLa-Txl Zelllinie reduzierte sich die Aktivität des im nanomolaren Bereich wirksamen Taxols. Dennoch zeigte Taxol in dieser Zelllinie im Vergleich zu Tubulexin

A deutlich stärkere Wirkung. Die SAR-Studien der Tubulexine zeigen mögliche Ansatzpunkte für die Verbesserung der zellulären Potenz der Tubulexine. Demnach scheint vor allem die para-Position an R2 der THP Struktur für die veränderte Aktivität der Tubulexine verantwortlich zu sein. Demnach eignet sich diese Stelle potentiell für eine Derivatisierung zur Synthese weiterer Tubulexine mit höherer Wirksamkeit. Außerdem wäre es interessant zu erfahren, inwieweit solche Derivatisierungen der Tubulexine im Falle eines dualen Wirkmechanismus auf $\alpha\beta$ Tubulin und CAS (siehe 6.3.4) mögliche Selektivitäten der Substanzen gegenüber diesen Proteinen verändern.

7. Zusammenfassung

Der Zellzyklus und die Mitose werden durch ein komplexes Netzwerk von Proteinen reguliert und angetrieben. Fehler in diesen Prozessen können zu einer deregulierten Proliferation und folglich zur Entstehung von Krebszellen führen. Bestandteile des Zytoskeletts sind nicht nur von entscheidender Bedeutung während der Mitose sondern auch in nachfolgenden Prozessen der Krebsentstehung. Chemische Substanzen, die modulierend auf den Zellzyklus, die Mitose und Bestandteile des Zytoskelettes wirken können, sind daher von großem Interesse in der Krebstherapie. Ein Ziel dieser Arbeit war die Validierung und Bewertung in der Abteilung vorhandener *High Content Screens* zur Identifikation solcher Substanzen innerhalb Naturstoff-basierter Substanzbibliotheken. Daher wurde in einem Pilotprojekt ein paralleler Screen von 1500 Naturstoffen mittels des MDCK-F3- und des BSC-1 Phänotyp-Screens durchgeführt. Die Identifikation mehrerer bekannter Naturstoffe mit antimittotischer und Zytoskelett-modulierender Wirkung zeigte hierbei eine besondere Eignung des BSC-1 Phänotyp-Screens.

Ein weiteres Ziel war die nähere Charakterisierung der biologischen Wirkung von, durch das *High Content Screening* identifizierten Substanzen. Mit Podoverin A, Maistemonin und Coreanosid F1 konnten mittels des BSC-1 Phänotyp-Screens innerhalb der Naturstoff-Substanzbibliothek unbeschriebene Bioaktivitäten dieser Substanzen erkannt werden. Nachfolgend konnte Podoverin A als antimittotische Substanz mit inhibitorischer Wirkung auf die zelluläre MT-Dynamik charakterisiert werden. Die Naturstoffe Maistemonin und Coreanosid F1 hingegen führten zu Modulationen der zellulären Aktinfilament-Organisation. Maistemonin, Coreanosid F1 und Podoverin A stellen daher interessante Leitstrukturen für die Synthese Naturstoff-basierter Substanzbibliotheken dar.

Mittels des BSC-1 Phänotyp-Screens wurde daraufhin eine von Dr. Andrey Antonchick synthetisierte Naturstoff-basierte Substanzbibliothek aus 39 Spirooxindolen getestet. Die potentiell antimittotische Wirkung der hierdurch identifizierten Substanz **(-)-6k** konnte im weiteren Verlauf bestätigt werden. Neben einer Induktion von G2/M-Zellzyklusarrest führte die Substanz zu einer Inhibition der zellulären MT-Dynamik, wobei insbesondere eine Modulation der räumlichen Organisation des MT-Zytoskelettes auffallend war. Hierbei waren multiple MTOCs in BSC-1 Zellen und analog hierzu eine multipolare Mitose in HeLa-L Zellen erkennbar. Trotz der bekannten, inhibitorischen Wirkung des Spirooxindols Spirotrypostatin auf die $\alpha\beta$ -Tubulin-Dynamik war die Wirkung von **(-)-6k** andersartig. Anhand eines

etablierten ELISA Assays konnte außerdem eine für gewisse Spirooxindole typische, inhibitorische Wirkung der Substanz auf die p53/MDM2 Proteininteraktion ausgeschlossen werden. Somit ist für die Substanz **(-)-6k** ein vorher unbeschriebenes Wirkprinzip der Spirooxindole als sehr wahrscheinlich. Die Identifikation des Zielproteins bietet einen interessanten Einstieg für weitere Untersuchungen zu dem Wirkstoff **(-)-6k**.

Mittels des *High Content Screenings* einer, aus 150 THPs bestehenden Substanzbibliothek wurden Tubulexin A, B und C als antimittotische Substanzen identifiziert. Die zelluläre Untersuchung dieser Substanzen zeigte eine Induktion von G2/M-Arrest und Apoptose im niedrig mikromolaren Bereich. Außerdem inhibierten die Substanzen die MT-Repolymerisation kältebehandelter BSC-1 Zellen. Die Studien zeigten somit ein gemeinsames Wirkprinzip der Tubulexine. Zur Identifikation des Zielproteins des bioaktivsten Derivates Tubulexin A wurde ein quantitativer, proteomischer Ansatz mittels SILAC basierter komparativer Affinitätschromatographie verwendet. Anhand dieses Ansatzes wurden, unter Berücksichtigung der zellulären Studien, $\alpha\beta$ -Tubulin und CAS als potentielle Zielproteine identifiziert. Die Isolierung durch die Tubulexin A Affinitätssonde konnte durch Immunodetektion bestätigt werden. Nachfolgend konnte die spezifische und physiologisch relevante Bindung von Tubulexin A an $\alpha\beta$ Tubulin durch die inhibitorische Wirkung der Substanz auf die *in vitro* Tubulin-Polymerisation validiert werden. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass der zelluläre Effekt von Tubulexin A unabhängig von CAS erklärbar ist. Des Weiteren ist gezeigt worden, dass Tubulexin A ein potenter Ligand der Vinca Alkaloid-Bindestelle von $\alpha\beta$ Tubulin ist: Unter den gewählten Bedingungen war dessen stöchiometrische Bindung an das Protein mit derer von Vinblastin vergleichbar.

Die physiologische Wirkung von Tubulexin A betreffend ist neben einer spezifischen Bindung von $\alpha\beta$ -Tubulin ein synergetischer Wirkmechanismus mit dem Protein CAS denkbar. Die Untersuchung eines solchen etwaigen Mechanismus bietet einen attraktiven Ausgangspunkt für weitere Studien. Aufgrund ihrer interessanten Bioaktivität, chemischen Zugänglichkeit, unverminderten Wirkung gegenüber Taxol resistente Zellen und einer möglichen synergetischen Wirkung auf $\alpha\beta$ -Tubulin und CAS stellen die Tubulexine interessante Leitmotive für die Synthese Tubulexin-basierter Substanzbibliotheken dar. Es ist wahrscheinlich, dass hierdurch Substanzen mit größerer Potenz und erhöhter Selektivität gegenüber den Zielproteinen erhalten werden können.

8. Anhang

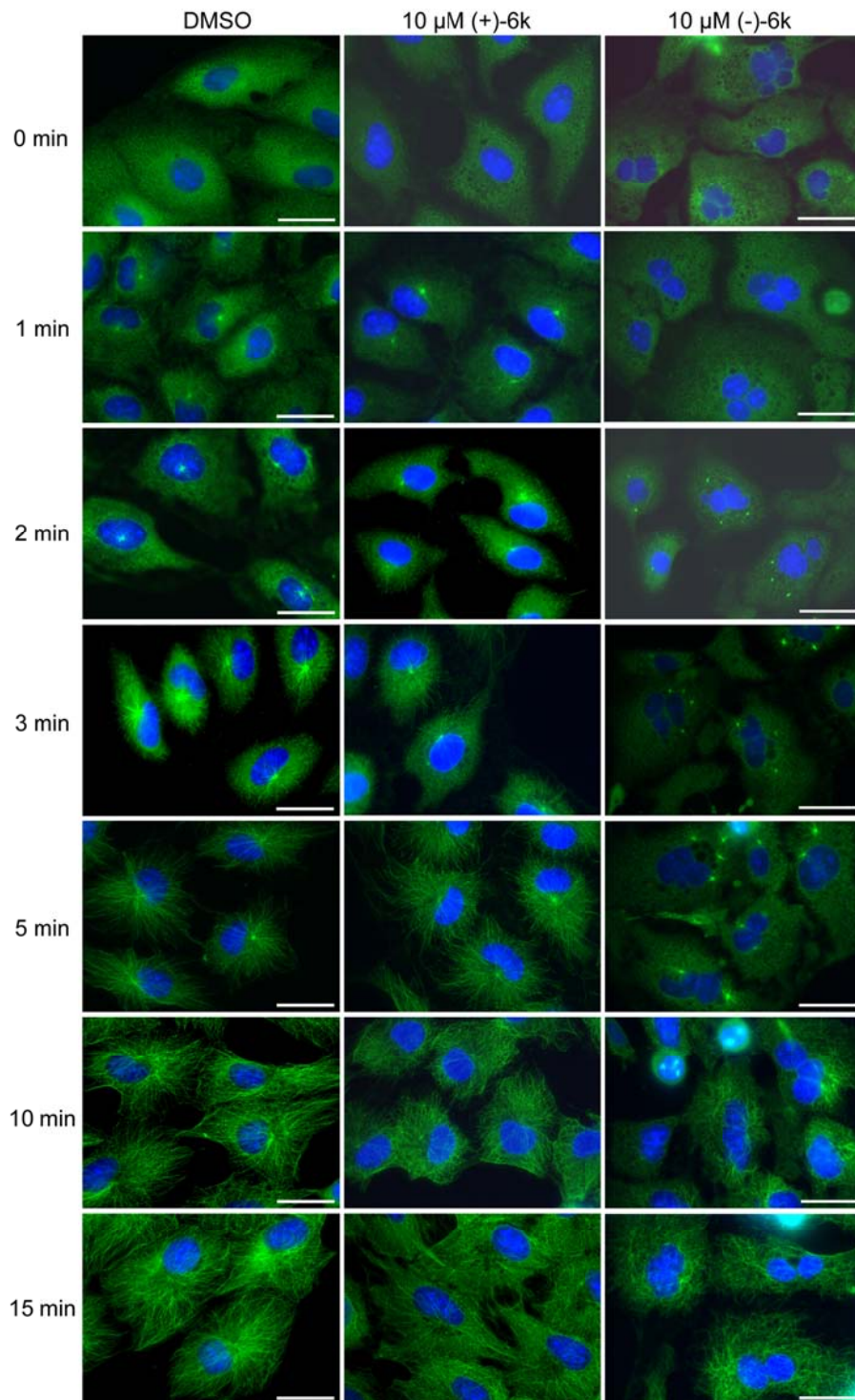
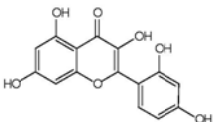
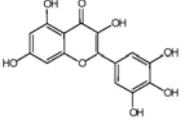
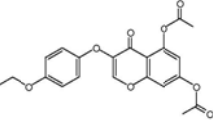
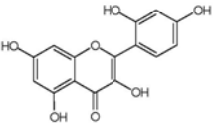
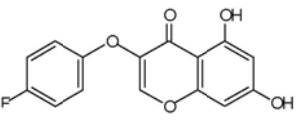
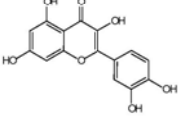
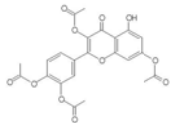
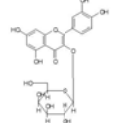
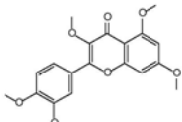
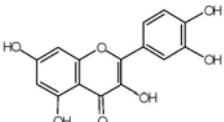
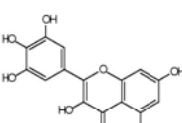
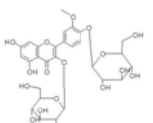
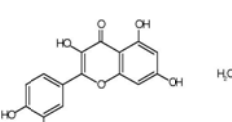
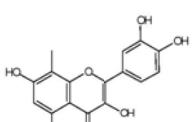
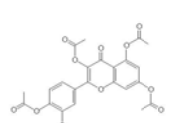
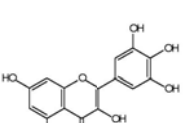


Abbildung 55. Wirkung von (+)-6k und (-)-6k auf die MT-Repolymerisation nach Kältebehandlung. BSC-1 Zellen wurden für 20 Stunden mit (+)-6k, (-)-6k oder DMSO als Kontrolle behandelt. Die Repolymerisation des MT-Netzwerkes wurde nach Wiedererwärmung der Zellen für die angegebenen Zeitpunkte, Methanol-Fixierung und Färbung der Zellen mit α Tubulin spezifischem Antikörper (grün, anti- α -Tubulin Primärantikörper und Sekundärantikörper Alexa Fluor[®] 488) fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. DAPI (blau) wurde verwendet, um die DNA zu visualisieren. Maßstabballen: 20 μ m.

8. Anhang

Tabelle 10. Derivate der von Podoverin A und Icarithin abgeleiteten Substanzbibliothek. Die dargestellten Substanzen wurden mittels des BSC-1 Phänotyp-Assays auf potentiell antimittotische Wirkungen untersucht.

| Laborcode | Struktur | Laborcode | Struktur |
|--------------------|---|--------------------|---|
| ChemDivR092-0051-1 |  | Sigma_M6760-1 |  |
| IBS_STOCK1N-00030- |  | Sigma_M4008-1 |  |
| IBS_STOCK1N-00199- |  | Sigma_Q0125-1 |  |
| IBS_STOCK1N-00292- |  | ChemDiv0407-0014-1 |  |
| IBS_STOCK1N-00418- |  | ChemDiv0407-0052-1 |  |
| IBS_STOCK1N-00524- |  | ChemDivN008-0009-1 |  |
| IBS_STOCK1N-04222- |  | ChemDivN025-0038-1 |  |
| IBS_STOCK1N-08201- |  | ChemDivN027-0001-1 |  |

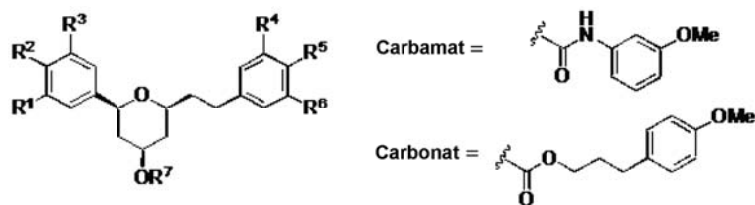
8. Anhang

| Laborcode | Struktur | Laborcode | Struktur |
|-------------------|----------|--------------|----------|
| IBS_STOCK1N-31498 | | IMD-006763-1 | |
| IBS_STOCK1S-58565 | | IMD-008892-1 | |
| IMD-008527-1 | | IMD-009256-1 | |
| IMD-008884-1 | | IMD-009608-1 | |
| IMD-009063-1 | | IMD-009626-1 | |
| IMD-009064-1 | | IMD-009929-1 | |
| IMD-009069-1 | | IMD-010339-1 | |
| IMD-008610-1 | | IMD-010287-1 | |

8. Anhang

| Laborcode | Struktur | Laborcode | Struktur |
|--------------------|----------|--------------|----------|
| MIC300538-1 | | IMD-011299-1 | |
| MIC1504003-1 | | IMD-011398-1 | |
| MIC1600075-1 | | IMD-002598-1 | |
| MIC310031-1 | | IMD-002879-1 | |
| MIC1502259-1 | | IMD-002759-1 | |
| ChemDivN043-0002-1 | | IMD-003559-1 | |
| ChemDivN043-0002-2 | | IMD-003997-1 | |

Tabelle 11. Die Derivate der getesteten THP-Substanzbibliothek



| Nummer | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | R ⁶ | R ⁷ |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | OMe | OH | H | H | OMe | H | Ac |
| 2 | H | OH | H | OMe | OMe | H | Ac |
| 3 | H | OH | H | OMe | OMe | OMe | Ac |
| 4 | H | OH | H | H | F | H | Ac |
| 5 | H | OH | H | | 3-pyridyl | | Ac |
| 6 | H | OH | H | | 2-thienyl | | Ac |
| 7 | H | OH | H | H | OMe | H | Ac |
| 8 | OMe | OH | H | -OCH ₂ O- | | H | Ac |
| 9 | OMe | OH | H | OMe | OMe | H | Ac |
| 10 | OMe | OH | H | OMe | OMe | OMe | Ac |
| 11 | OMe | OH | H | H | F | H | Ac |
| 12 | OMe | OH | H | | 3-pyridyl | | Ac |
| 13 | OH | OBzl | H | H | OMe | H | Ac |
| 14 | OH | OBzl | H | H | Cl | H | Ac |
| 15 | Br | OH | OMe | H | OMe | H | Ac |
| 16 | Br | OH | OMe | -OCH ₂ O- | | H | Ac |
| 17 | Br | OH | OMe | OMe | OH | H | Ac |
| 18 | Br | OH | OMe | OMe | OMe | H | Ac |
| 19 | Br | OH | OMe | OMe | OMe | OMe | Ac |
| 20 | Br | OH | OMe | H | F | H | Ac |
| 21 | Br | OH | OMe | H | Cl | H | Ac |
| 22 | Br | OH | OMe | | 3-pyridyl | | Ac |
| 23 | Br | OH | OMe | | 2-thienyl | | Ac |
| 24 | F | OH | F | H | OMe | H | Ac |
| 25 | F | OH | F | -OCH ₂ O- | | H | Ac |
| 26 | F | OH | F | OMe | OMe | H | Ac |

8. Anhang

| Nummer | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | R ⁶ | R ⁷ |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|
| 27 | F | OH | F | OMe | OMe | OMe | Ac |
| 28 | F | OH | F | H | F | H | Ac |
| 29 | F | OH | F | H | Cl | H | Ac |
| 30 | F | OH | F | | 3-pyridyl | | Ac |
| 31 | Cl | OH | H | H | OMe | H | Ac |
| 32 | Cl | OH | H | | -OCH ₂ O- | H | Ac |
| 33 | Cl | OH | H | OMe | OMe | H | Ac |
| 34 | Cl | OH | H | OMe | OMe | OMe | Ac |
| 35 | Cl | OH | H | H | F | H | Ac |
| 36 | Cl | OH | H | H | Cl | H | Ac |
| 37 | Cl | OH | H | | 3-pyridyl | | Ac |
| 38 | Cl | OH | H | | 2-thienyl | | Ac |
| 39 | Cl | OH | Cl | H | OMe | H | Ac |
| 40 | Cl | OH | Cl | H | OH | H | Ac |
| 41 | Cl | OH | Cl | OH | OH | H | Ac |
| 42 | Cl | OH | Cl | OMe | OMe | H | Ac |
| 43 | Cl | OH | Cl | H | F | H | Ac |
| 44 | Cl | OH | Cl | H | Cl | H | Ac |
| 45 | OH | H | H | H | OMe | H | Ac |
| 46 | OH | H | H | | -OCH ₂ O- | H | Ac |
| 47 | OH | H | H | H | OH | H | Ac |
| 48 | OH | H | H | OMe | OH | H | Ac |
| 49 | OH | H | H | OMe | OMe | H | Ac |
| 50 | OH | H | H | OMe | OMe | H | Ac |
| 51 | OH | H | H | OMe | OMe | OMe | Ac |
| 52 | OH | H | H | H | F | H | Ac |
| 53 | OH | H | H | H | Cl | H | Ac |
| 54 | OH | H | H | | 3-pyridyl | | Ac |
| 55 | H | OH | H | | -OCH ₂ O- | H | H |
| 56 | H | OH | H | OMe | OMe | OMe | H |
| 57 | H | OH | H | H | F | H | H |
| 58 | OMe | OH | H | | -OCH ₂ O- | H | H |
| 59 | OMe | OH | H | OMe | OMe | OMe | H |
| 60 | OMe | OH | H | H | F | H | H |
| 61 | OMe | OH | H | H | Cl | H | H |
| 62 | OMe | OH | H | | 3-pyridyl | | H |
| 63 | OH | OBzl | H | | -OCH ₂ O- | H | H |
| 64 | OH | OBzl | H | OMe | OMe | H | H |
| 65 | OH | OBzl | H | OMe | OMe | OMe | H |

8. Anhang

| Nummer | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | R ⁶ | R ⁷ |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|
| 66 | OH | OBzl | H | | 3-pyridyl | | H |
| 67 | Br | OH | OMe | H | OMe | H | H |
| 68 | Br | OH | OMe | | -OCH ₂ O- | H | H |
| 69 | Br | OH | OMe | OMe | OMe | H | H |
| 70 | Br | OH | OMe | OMe | OMe | OMe | H |
| 71 | Br | OH | OMe | H | F | H | H |
| 72 | Br | OH | OMe | | 3-pyridyl | | H |
| 73 | F | OH | F | H | OMe | H | H |
| 74 | F | OH | F | | -OCH ₂ O- | H | H |
| 75 | F | OH | F | H | OH | H | H |
| 76 | F | OH | F | OMe | OMe | H | H |
| 77 | F | OH | F | OMe | OMe | OMe | H |
| 78 | F | OH | F | H | F | H | H |
| 79 | Cl | OH | H | H | OMe | H | H |
| 80 | Cl | OH | H | | -OCH ₂ O- | H | H |
| 81 | Cl | OH | H | H | OH | H | H |
| 82 | Cl | OH | H | OMe | OMe | H | H |
| 83 | Cl | OH | H | H | F | H | H |
| 84 | Cl | OH | H | | 3-pyridyl | | H |
| 85 | Cl | OH | Cl | H | OMe | H | H |
| 86 | Cl | OH | Cl | | -OCH ₂ O- | H | H |
| 87 | Cl | OH | Cl | H | OH | H | H |
| 88 | Cl | OH | Cl | OMe | OH | H | H |
| 89 | Cl | OH | Cl | OMe | OMe | H | H |
| 90 | Cl | OH | Cl | OMe | OMe | OMe | H |
| 91 | Cl | OH | Cl | H | F | H | H |
| 92 | OH | H | H | H | OMe | H | H |
| 93 | OH | H | H | | -OCH ₂ O- | H | H |
| 94 | OH | H | H | H | OH | H | H |
| 95 | OH | H | H | OMe | OH | H | H |
| 96 | OH | H | H | OMe | OMe | H | H |
| 97 | OH | H | H | OMe | OMe | H | H |
| 98 | OH | H | H | OMe | OMe | OMe | H |
| 99 | OH | H | H | H | F | H | H |
| 100 | H | OH | H | OMe | OH | H | Carbamat |
| 101 | H | OH | H | OMe | OMe | H | Carbamat |
| 102 | OMe | OH | H | | -OCH ₂ O- | H | Carbamat |
| 103 | OMe | OH | H | OH | OH | H | Carbamat |

8. Anhang

| Nummer | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | R ⁶ | R ⁷ |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| 105 | Br | OH | OMe | H | OMe | H | Carbamat |
| 106 | Br | OH | OMe | H | OH | H | Carbamat |
| 107 | F | OH | F | OMe | OH | H | Carbamat |
| 108 | Cl | OH | H | OMe | OH | H | Carbamat |
| 109 | Cl | OH | Cl | -OCH ₂ O- | | H | Carbamat |
| 110 | Cl | OH | Cl | H | F | H | Carbamat |
| 111 | OH | H | H | H | OMe | H | Carbamat |
| 112 | OH | H | H | OMe | OH | H | Carbamat |
| 113 | OH | H | H | OMe | OMe | H | Carbamat |
| 114 | H | OH | H | H | OMe | H | Carbonat |
| 115 | H | OH | H | OMe | OMe | H | Carbonat |
| 116 | H | OH | H | H | Cl | H | Carbonat |
| 117 | H | OH | H | | 3-pyridyl | | Carbonat |
| 118 | OMe | OH | H | H | OMe | H | Carbonat |
| 119 | OMe | OH | H | H | OH | H | Carbonat |
| 120 | OMe | OH | H | OMe | OH | H | Carbonat |
| 121 | OMe | OH | H | OMe | OMe | H | Carbonat |
| 122 | OMe | OH | H | H | F | H | Carbonat |
| 123 | OH | OBzl | H | | 3-pyridyl | | Carbonat |
| 124 | OH | OH | H | OMe | OH | H | Carbonat |
| 125 | OH | OH | H | H | Cl | H | Carbonat |
| 126 | Br | OH | OMe | H | OMe | H | Carbonat |
| 127 | Br | OH | OMe | -OCH ₂ O- | | H | Carbonat |
| 128 | Br | OH | OMe | H | OH | H | Carbonat |
| 129 | Br | OH | OMe | OMe | OH | H | Carbonat |
| 130 | Br | OH | OMe | OH | OH | H | Carbonat |
| 131 | Br | OH | OMe | OMe | OMe | H | Carbonat |
| 132 | Br | OH | OMe | H | F | H | Carbonat |
| 133 | F | OH | F | H | OMe | H | Carbonat |
| 134 | F | OH | F | H | OH | H | Carbonat |
| 135 | F | OH | F | OMe | OH | H | Carbonat |
| 136 | F | OH | F | H | Cl | H | Carbonat |
| 137 | Cl | OH | H | H | OMe | H | Carbonat |
| 138 | Cl | OH | H | H | OH | H | Carbonat |
| 139 | Cl | OH | H | OMe | OH | H | Carbonat |
| 140 | Cl | OH | H | OH | OH | H | Carbonat |
| 141 | Cl | OH | H | OMe | OMe | H | Carbonat |
| 142 | Cl | OH | H | H | Cl | H | Carbonat |

8. Anhang

| Nummer | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | R ⁵ | R ⁶ | R ⁷ |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|
| 143 | Cl | OH | H | | 3-pyridyl | | Carbonat |
| 144 | OH | H | H | | -OCH ₂ O- | H | Carbonat |
| 145 | OH | H | H | H | OH | H | Carbonat |
| 146 | OH | H | H | OMe | OH | H | Carbonat |
| 147 | OH | H | H | OH | OH | H | Carbonat |
| 148 | OH | H | H | OMe | OMe | H | Carbonat |
| 149 | OH | H | H | H | Cl | H | Carbonat |
| 150 | OH | H | H | | 3-pyridyl | | Carbonat |

8.1 Eigene Publikationen

Sieber JJ, Willig KI, Kutzner C, Gerding-Reimers C, Harke B, Donnert G, Rammner B, Eggeling C, Hell SW, Grubmüller H, et al.:

Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster.

Science 2007, **317**:1072-1076.

Antonchick AP, Gerding-Reimers C, Catarinella M, Schürmann M, Preut H, Ziegler S, Rauh D, Waldmann H:

Highly enantioselective synthesis and cellular evaluation of spirooxindoles inspired by natural products. *Nature Chemistry* 2010, **2**:735-740.

Hedberg C, Dekker F.J. Rusch M, Renner S, Wetzel S, Vartak N, Gerding-Reimers C, Bon R, Bastiaens PI, Waldmann H:

Development of Highly Potent Inhibitors of the Ras-Targeting Human Acyl Protein Thioesterases Based on Substrate Similarity Design. (In Begutachtung)

Réka Tóth R, Deeks MJ, Menninger S, Gerding-Reimers C, Kaiser M, Hübel K, Nougalli-Tonaco I, Hussey PJ, Herbert Waldmann H, Coupland G:

The natural product prieurianin suppresses ADF/cofilin-mediated actin dynamics impairing circadian clock regulation of Arabidopsis. (In Vorbereitung)

Gerding-Reimers C, Voigt T, Tran T, Bergmann S, Lachance H, Brockmeyer A, Janning P, Ziegler S, Waldmann H:

Biology-oriented Synthesis of a natural product-inspired tetrahydropyran collection yields a novel class of mitosis modulators targeting tubulin and CSE1L. (In Vorbereitung)

9. Literaturverzeichnis

1. Schwann T: **Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen** In *Klassische Schriften zur Zellenlehre*; 2003. Edited by Jahn I. Frankfurt am Main: Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutschland GmbH; 1839.
2. Watson JD, Crick FH: **Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid.** *Nature* 1953, **171**:737-738.
3. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** *Nature* 2001, **409**:860-921.
4. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al.: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**:1304-1351.
5. Human Genome Sequencing C: **Finishing the euchromatic sequence of the human genome.** *Nature* 2004, **431**:931-945.
6. Goff SA, Ricke D, Lan T-H, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, et al.: **A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica).** *Science* 2002, **296**:92-100.
7. Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK-S, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, et al.: **A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica).** *Science* 2002, **296**:79-92.
8. Koonin EV, Wolf YI, Karev GP: **The structure of the protein universe and genome evolution.** *Nature* 2002, **420**:218-223.
9. Martin DB, Nelson PS: **From genomics to proteomics: techniques and applications in cancer research.** *Trends in Cell Biology* 2001, **11**:S60-S65.
10. Darvas F, Dorman G, Krajcsi P, Puskas LG, Kovari Z, Lorincz Z, Urge L: **Recent advances in chemical genomics.** *Curr Med Chem* 2004, **11**:3119-3145.
11. Schreiber SL: **Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry.** *Bioorg Med Chem* 1998, **6**:1127-1152.
12. Mitchison TJ: **Towards a pharmacological genetics.** *Chem Biol* 1994, **1**:3-6.
13. Blackwell HE, Zhao Y: **Chemical genetic approaches to plant biology.** *Plant Physiol* 2003, **133**:448-455.
14. Hubel K, Lessmann T, Waldmann H: **Chemical biology--identification of small molecule modulators of cellular activity by natural product inspired synthesis.** *Chem Soc Rev* 2008, **37**:1361-1374.
15. Spring DR: **Chemical genetics to chemical genomics: small molecules offer big insights.** *Chemical Society Reviews* 2005, **34**:472-482.
16. Stockwell BR: **Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function.** *Nat Rev Genet* 2000, **1**:116-125.
17. Kawasumi M, Nghiem P: **Chemical Genetics: Elucidating Biological Systems with Small-Molecule Compounds.** *J Invest Dermatol* 2007, **127**:1577-1584.
18. Walsh DP, Chang YT: **Chemical genetics.** *Chem Rev* 2006, **106**:2476-2530.
19. Stockwell BR: **Exploring biology with small organic molecules.** *Nature* 2004, **432**:846-854.
20. Lehar J, Stockwell BR, Giaever G, Nislow C: **Combination chemical genetics.** *Nat Chem Biol* 2008, **4**:674-681.
21. Burdine L, Kodadek T: **Target Identification in Chemical Genetics: The (Often) Missing Link.** *Chemistry & Biology* 2004, **11**:593-597.
22. Bohacek RS, McMartin C, Guida WC: **The art and practice of structure-based drug design: a molecular modeling perspective.** *Med Res Rev* 1996, **16**:3-50.
23. Dobson CM: **Chemical space and biology.** *Nature* 2004, **432**:824-828.

24. Lipinski C, Hopkins A: **Navigating chemical space for biology and medicine.** *Nature* 2004, **432**:855-861.
25. Newman DJ: **Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?** *J Med Chem* 2008, **51**:2589-2599.
26. Weissman KJ, Leadlay PF: **Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**:925-936.
27. Henkel T, Brunne RM, Müller H, Reichel F: **Statistical Investigation into the Structural Complementarity of Natural Products and Synthetic Compounds.** *Angewandte Chemie International Edition* 1999, **38**:643-647.
28. Koehn FE, Carter GT: **The evolving role of natural products in drug discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 2005, **4**:206-220.
29. Li D, Kerns EH, Carter GT: **Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design.** *Current Pharmaceutical Design* 2009, **15**:2184-2194.
30. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ: **Impact of natural products on developing new anti-cancer agents.** *Chem Rev* 2009, **109**:3012-3043.
31. Schreiber SL: **Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery.** *Science* 2000, **287**:1964-1969.
32. Kaiser M, Wetzel S, Kumar K, Waldmann H: **Biology-inspired synthesis of compound libraries.** *Cell Mol Life Sci* 2008, **65**:1186-1201.
33. Kim YK, Arai MA, Arai T, Lamenza JO, Dean EF, 3rd, Patterson N, Clemons PA, Schreiber SL: **Relationship of stereochemical and skeletal diversity of small molecules to cellular measurement space.** *J Am Chem Soc* 2004, **126**:14740-14745.
34. Noren-Muller A, Reis-Correa I, Jr., Prinz H, Rosenbaum C, Saxena K, Schwalbe HJ, Vestweber D, Cagna G, Schunk S, Schwarz O, et al.: **Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:10606-10611.
35. Renner S, van Otterlo WA, Dominguez Seoane M, Mocklinghoff S, Hofmann B, Wetzel S, Schuffenhauer A, Ertl P, Oprea TI, Steinhilber D, et al.: **Bioactivity-guided mapping and navigation of chemical space.** *Nat Chem Biol* 2009, **5**:585-592.
36. Wetzel S, Klein K, Renner S, Rauh D, Oprea TI, Mutzel P, Waldmann H: **Interactive exploration of chemical space with Scaffold Hunter.** *Nat Chem Biol* 2009, **5**:581-583.
37. Wilk W, Zimmermann TJ, Kaiser M, Waldmann H: **Principles, implementation, and application of biology-oriented synthesis (BIOS).** *Biol Chem* 2010, **391**:491-497.
38. Koch MA, Schuffenhauer A, Scheck M, Wetzel S, Casaulta M, Odermatt A, Ertl P, Waldmann H: **Charting biologically relevant chemical space: a structural classification of natural products (SCONP).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:17272-17277.
39. Koch MA, Wittenberg LO, Basu S, Jeyaraj DA, Gourzoulidou E, Reinecke K, Odermatt A, Waldmann H: **Compound library development guided by protein structure similarity clustering and natural product structure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:16721-16726.
40. An W, Tolliday N: **Cell-Based Assays for High-Throughput Screening.** *Molecular Biotechnology* 2010, **45**:180-186.
41. **Forecasting Roles of Combinatorial Chemistry in the Age of Genomically Derived Drug Discovery Targets.** *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2000, **3**:421-436.
42. An WF, Tolliday NJ: **Introduction: cell-based assays for high-throughput screening.** *Methods Mol Biol* 2009, **486**:1-12.
43. Stockwell BR, Haggarty SJ, Schreiber SL: **High-throughput screening of small molecules in miniaturized mammalian cell-based assays involving post-translational modifications.** *Chem Biol* 1999, **6**:71-83.

44. Barros MP, Bechara EJH: **Bioluminescence as a Possible Auxiliary Oxygen Detoxifying Mechanism in Elaterid Larvae.** *Free Radical Biology and Medicine* 1998, **24**:767-777.
45. Mahapatra A: **Screening for Success.** *ACS Chemical Biology* 2008, **3**:449-450.
46. Auld DS, Thorne N, Nguyen DT, Inglese J: **A specific mechanism for nonspecific activation in reporter-gene assays.** *ACS Chem Biol* 2008, **3**:463-470.
47. Zanella F, Lorens JB, Link W: **High content screening: seeing is believing.** *Trends in Biotechnology* 2010, **28**:237-245.
48. Mitchison TJ: **Small-Molecule Screening and Profiling by Using Automated Microscopy.** *Chembiochem* 2005, **6**:33-39.
49. Haney SA, LaPan P, Pan J, Zhang J: **High-content screening moves to the front of the line.** *Drug Discovery Today* 2006, **11**:889-894.
50. Abraham VC, Taylor DL, Haskins JR: **High content screening applied to large-scale cell biology.** *Trends Biotechnol* 2004, **22**:15-22.
51. Sklar LA, Carter MB, Edwards BS: **Flow cytometry for drug discovery, receptor pharmacology and high-throughput screening.** *Curr Opin Pharmacol* 2007, **7**:527-534.
52. Edwards BS, Young SM, Ivnitsky-Steele I, Ye RD, Prossnitz ER, Sklar LA: **High-content screening: flow cytometry analysis.** *Methods Mol Biol* 2009, **486**:151-165.
53. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M: **Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system.** *Nat Rev Immunol* 2004, **4**:648-655.
54. Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ: **Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen.** *Science* 1999, **286**:971-974.
55. Cuatrecasas P: **Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972, **69**:1277-1281.
56. Swaney DL, Wenger CD, Coon JJ: **Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics.** *J Proteome Res* 2010, **9**:1323-1329.
57. Wang B, Malik R, Nigg EA, Korner R: **Evaluation of the low-specificity protease elastase for large-scale phosphoproteome analysis.** *Anal Chem* 2008, **80**:9526-9533.
58. Terstappen GC, Schlupen C, Raggiaschi R, Gaviraghi G: **Target deconvolution strategies in drug discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 2007, **6**:891-903.
59. Sato S, Murata A, Shirakawa T, Uesugi M: **Biochemical Target Isolation for Novices: Affinity-Based Strategies.** *Chemistry & Biology* 2010, **17**:616-623.
60. Rix U, Superti-Furga G: **Target profiling of small molecules by chemical proteomics.** *Nat Chem Biol* 2009, **5**:616-624.
61. Ong S-E, Schenone M, Margolin AA, Li X, Do K, Doud MK, Mani DR, Kuai L, Wang X, Wood JL, et al.: **Identifying the proteins to which small-molecule probes and drugs bind in cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**:4617-4622.
62. Katayama H, Oda Y: **Chemical proteomics for drug discovery based on compound-immobilized affinity chromatography.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, **855**:21-27.
63. Oda Y, Owa T, Sato T, Boucher B, Daniels S, Yamanaka H, Shinohara Y, Yokoi A, Kuromitsu J, Nagasu T: **Quantitative chemical proteomics for identifying candidate drug targets.** *Anal Chem* 2003, **75**:2159-2165.
64. Ong SE, Mann M: **A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC).** *Nature Protocols* 2006, **1**:2650-2660.
65. Ong S-E, Blagojev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M: **Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a**

- Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2002, **1**:376-386.
66. Phanstiel D, Unwin R, McAlister GC, Coon JJ: **Peptide quantification using 8-plex isobaric tags and electron transfer dissociation tandem mass spectrometry.** *Anal Chem* 2009, **81**:1693-1698.
67. Choe L, D'Ascenzo M, Relkin NR, Pappin D, Ross P, Williamson B, Guertin S, Pribil P, Lee KH: **8-plex quantitation of changes in cerebrospinal fluid protein expression in subjects undergoing intravenous immunoglobulin treatment for Alzheimer's disease.** *Proteomics* 2007, **7**:3651-3660.
68. Giaever G, Flaherty P, Kumm J, Proctor M, Nislow C, Jaramillo DF, Chu AM, Jordan MI, Arkin AP, Davis RW: **Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:793-798.
69. Geuijen CA, Bijl N, Smit RC, Cox F, Throsby M, Visser TJ, Jongeneelen MA, Bakker AB, Kruisbeek AM, Goudsmit J, et al.: **A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry.** *Eur J Cancer* 2005, **41**:178-187.
70. Tochtrop GP, King RW: **Target Identification Strategies in Chemical Genetics.** *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2004, **7**:677-688.
71. Mohri H: **Amino-acid composition of "Tubulin" constituting microtubules of sperm flagella.** *Nature* 1968, **217**:1053-1054.
72. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: **Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol.** *Nature* 1979, **277**:665-667.
73. Hartwell LH, Weinert TA: **Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.** *Science* 1989, **246**:629-634.
74. Rhind N, Russell P: **Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds.** *Curr Biol* 2000, **10**:R908-911.
75. May KM, Hardwick KG: **The spindle checkpoint.** *J Cell Sci* 2006, **119**:4139-4142.
76. Gali-Muhtasib H, Bakkar N: **Modulating cell cycle: current applications and prospects for future drug development.** *Curr Cancer Drug Targets* 2002, **2**:309-336.
77. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW: **How proteolysis drives the cell cycle.** *Science* 1996, **274**:1652-1659.
78. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M: **NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:2690-2698.
79. Sigal A, Rotter V: **Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome.** *Cancer Res* 2000, **60**:6788-6793.
80. Levine AJ: **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** *Cell* 1997, **88**:323-331.
81. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M: **Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.** *Nature* 1997, **387**:296-299.
82. Honda R, Tanaka H, Yasuda H: **Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53.** *FEBS Letters* 1997, **420**:25-27.
83. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH: **Regulation of p53 stability by Mdm2.** *Nature* 1997, **387**:299-303.
84. Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B: **Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53.** *Nature* 1993, **362**:857-860.
85. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR: **p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:8493-8497.
86. Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M: **Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53.** *Oncogene* 1995, **10**:109-115.
87. Garcia Mea: **Global Cancer Facts and Figures 2007.** ACS 2007.

88. Evan GI, Vousden KH: **Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.** *Nature* 2001, **411**:342-348.
89. Malumbres M, Barbacid M: **Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**:153-166.
90. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA: **The cancer genome.** *Nature* 2009, **458**:719-724.
91. Dobashi Y, Takehana T, Ooi A: **Perspectives on cancer therapy: cell cycle blockers and perturbators.** *Curr Med Chem* 2003, **10**:2549-2558.
92. Johansson M, Persson JL: **Cancer therapy: targeting cell cycle regulators.** *Anticancer Agents Med Chem* 2008, **8**:723-731.
93. Lapenna S, Giordano A: **Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer.** *Nat Rev Drug Discov* 2009, **8**:547-566.
94. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: **The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** *Cell Prolif* 2003, **36**:131-149.
95. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF: **RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**:355-366.
96. Massague J: **G1 cell-cycle control and cancer.** *Nature* 2004, **432**:298-306.
97. Hainaut P, Hollstein M: **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.** *Advances in Cancer Research, Vol 96* 2000, **77**:81-137.
98. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J: **The MDM2 gene amplification database.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:3453-3459.
99. Deep G, Agarwal R: **New combination therapies with cell-cycle agents.** *Curr Opin Investig Drugs* 2008, **9**:591-604.
100. Schwartz GK, Shah MA: **Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy.** *Journal of Clinical Oncology* 2005, **23**:9408-9421.
101. Dekker FJ, Rocks O, Vartak N, Menninger S, Hedberg C, Balamurugan R, Wetzel S, Renner S, Gerauer M, Scholermann B, et al.: **Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling.** *Nat Chem Biol* 2010, **6**:449-456.
102. Ding K, Lu Y, Nikolovska-Coleska Z, Qiu S, Ding Y, Gao W, Stuckey J, Krajewski K, Roller PP, Tomita Y, et al.: **Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors.** *J Am Chem Soc* 2005, **127**:10130-10131.
103. Ding K, Lu Y, Nikolovska-Coleska Z, Wang G, Qiu S, Shangary S, Gao W, Qin D, Stuckey J, Krajewski K, et al.: **Structure-based design of spiro-oxindoles as potent, specific small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction.** *J Med Chem* 2006, **49**:3432-3435.
104. Miyachi M, Kakazu N, Yagyu S, Katsumi Y, Tsubai-Shimizu S, Kikuchi K, Tsuchiya K, Iehara T, Hosoi H: **Restoration of p53 Pathway by Nutlin-3 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Rhabdomyosarcoma Cells.** *Clinical Cancer Research* 2009, **15**:4077-4084.
105. Shangary S, Qin D, McEachern D, Liu M, Miller RS, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Ding K, Wang G, Chen J, et al.: **Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:3933-3938.
106. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, et al.: **In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2.** *Science* 2004, **303**:844-848.
107. Wang D, Lippard SJ: **Cellular processing of platinum anticancer drugs.** *Nat Rev Drug Discov* 2005, **4**:307-320.
108. Siddik ZH: **Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.** *Oncogene* 2003, **22**:7265-7279.
109. Teicher BA: **Newer cytotoxic agents: attacking cancer broadly.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:1610-1617.
110. Sheetz MP: **Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:392-396.

111. Heng Y-W, Koh C-G: **Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2010, **42**:1622-1633.
112. Doxsey SJ: **Centrosomes as command centres for cellular control.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:E105-108.
113. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Ed): **Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition** New York: Garland Science; 2002.
114. Glotzer M: **The molecular requirements for cytokinesis.** *Science* 2005, **307**:1735-1739.
115. Pines J, Rieder CL: **Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:E3-6.
116. Usui T: **Actin- and microtubule-targeting bioprobes: Their binding sites and inhibitory mechanisms.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2007, **71**:300-308.
117. Wade RH: **On and around microtubules: an overview.** *Mol Biotechnol* 2009, **43**:177-191.
118. Verhey KJ, Gaertig J: **The tubulin code.** *Cell Cycle* 2007, **6**:2152-2160.
119. Jordan MA, Kamath K: **How do microtubule-targeted drugs work? An overview.** *Curr Cancer Drug Targets* 2007, **7**:730-742.
120. Desai A, Mitchison TJ: **Microtubule polymerization dynamics.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, **13**:83-117.
121. Nogales E, Wolf SG, Downing KH: **Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography.** *Nature* 1998, **391**:199-203.
122. Singh P, Rathinasamy K, Mohan R, Panda D: **Microtubule assembly dynamics: An attractive target for anticancer drugs.** *IUBMB Life* 2008, **60**:368-375.
123. Job D, Valiron O, Oakley B: **Microtubule nucleation.** *Current Opinion in Cell Biology* 2003, **15**:111-117.
124. Margolis RL, Wilson L, Keifer BI: **Mitotic mechanism based on intrinsic microtubule behaviour.** *Nature* 1978, **272**:450-452.
125. Panda D, Miller HP, Wilson L: **Rapid treadmilling of brain microtubules free of microtubule-associated proteins in vitro and its suppression by tau.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:12459-12464.
126. Kueh HY, Mitchison TJ: **Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics.** *Science* 2009, **325**:960-963.
127. Mitchison T, Kirschner M: **Dynamic instability of microtubule growth.** *Nature* 1984, **312**:237-242.
128. Kline-Smith SL, Walczak CE: **Mitotic Spindle Assembly and Chromosome Segregation: Refocusing on Microtubule Dynamics.** *Molecular Cell* 2004, **15**:317-327.
129. Walczak CE, Shaw SL: **A MAP for Bundling Microtubules.** *Cell* 2010, **142**:364-367.
130. Sauer G, Korner R, Hanisch A, Ries A, Nigg EA, Sillje HH: **Proteome analysis of the human mitotic spindle.** *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**:35-43.
131. Luders J, Stearns T: **Microtubule-organizing centres: a re-evaluation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:161-167.
132. Martin MA, Osmani SA, Oakley BR: **The role of gamma-tubulin in mitotic spindle formation and cell cycle progression in *Aspergillus nidulans*.** *J Cell Sci* 1997, **110 (Pt 5)**:623-633.
133. Oakley BR, Oakley CE, Yoon Y, Jung MK: **[gamma]-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*.** *Cell* 1990, **61**:1289-1301.
134. Garner EC, Campbell CS, Mullins RD: **Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog.** *Science* 2004, **306**:1021-1025.
135. Jordan MA: **Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin.** *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002, **2**:1-17.

136. Downing KH: **STRUCTURAL BASIS FOR THE INTERACTION OF TUBULIN WITH PROTEINS AND DRUGS THAT AFFECT MICROTUBULE DYNAMICS**¹. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2000, **16**:89-111.
137. Perez EA: **Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance**. *Mol Cancer Ther* 2009, **8**:2086-2095.
138. Noble RL, Beer CT, Cutts JH: **Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea**. *Ann N Y Acad Sci* 1958, **76**:882-894.
139. Pasquier E, Kavallaris M: **Microtubules: a dynamic target in cancer therapy**. *IUBMB Life* 2008, **60**:165-170.
140. Nathaniel EJ, Friedman NB, Rychuk H: **Electron microscopic observations on cells of Harding-Passey melanoma following colchicine administration**. *Cancer Res* 1968, **28**:1031-1040.
141. Risinger AL, Giles FJ, Mooberry SL: **Microtubule dynamics as a target in oncology**. *Cancer Treat Rev* 2009, **35**:255-261.
142. Jordan MA, Wilson L: **Microtubules as a target for anticancer drugs**. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:253-265.
143. Giannakakou P, Sackett D, Fojo T: **Tubulin/Microtubules: Still a Promising Target for New Chemotherapeutic Agents**. *Journal of the National Cancer Institute* 2000, **92**:182-183.
144. Jordan MA, Wilson L: **Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy**. *Current Opinion in Cell Biology* 1998, **10**:123-130.
145. Agarwal R, Kaye SB: **Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy**. *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:502-516.
146. Kingston DG: **Tubulin-interactive natural products as anticancer agents**. *J Nat Prod* 2009, **72**:507-515.
147. Butler MS: **Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials**. *Natural Product Reports* 2008, **25**:475-516.
148. Tanaka J, Blain JC, Allingham JS: **Actin-binding toxin "tail" wags the dog**. *Chem Biol* 2008, **15**:205-207.
149. Stamnes M: **Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport**. *Current Opinion in Cell Biology* 2002, **14**:428-433.
150. Yamaguchi H, Condeelis J: **Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion**. *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**:642-652.
151. Uribe R, Jay D: **A review of actin binding proteins: new perspectives**. *Molecular Biology Reports* 2009, **36**:121-125.
152. Cooper GM (Ed): *The Cell, A Molecular Approach, 2nd edition* Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; 2000.
153. Otto JJ, Schroeder TE: **Association of actin and myosin in the contractile ring**. *Ann N Y Acad Sci* 1990, **582**:179-184.
154. Wheatley SP, Wang Y-I: **Chapter 18 Indirect Immunofluorescence Microscopy in Cultured Cells**. In *Methods in Cell Biology*. Edited by Jennie PM, David B: Academic Press; 1998:313-332. vol Volume 57.]
155. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC: **Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE**. *Nature* 1994, **371**:346-347.
156. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al.: **Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis**. *Nature* 1995, **376**:37-43.
157. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM: **Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant**. *J Biol Chem* 1998, **273**:33533-33539.

158. Prosperi E, Giangare MC, Bottiroli G: **Nuclease-induced DNA structural changes assessed by flow cytometry with the intercalating dye propidium iodide.** *Cytometry* 1991, **12**:323-329.
159. van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM: **Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.** *Cytometry* 1998, **31**:1-9.
160. Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y: **Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine.** *Exp Cell Res* 1994, **211**:314-321.
161. Jacobsen MD, Weil M, Raff MC: **Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death.** *J Cell Biol* 1996, **133**:1041-1051.
162. Gaskin F, Cantor CR, Shelanski ML: **Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules.** *J Mol Biol* 1974, **89**:737-755.
163. Castoldi M, Popov AV: **Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer.** *Protein Expr Purif* 2003, **32**:83-88.
164. Banerjee M, Poddar A, Mitra G, Surolia A, Owa T, Bhattacharyya B: **Sulfonamide drugs binding to the colchicine site of tubulin: thermodynamic analysis of the drug-tubulin interactions by isothermal titration calorimetry.** *J Med Chem* 2005, **48**:547-555.
165. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
166. Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ: **Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting.** *Current Biology* 1993, **3**:327-332.
167. Cox J, Mann M: **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:1367-1372.
168. Vivian JT, Callis PR: **Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins.** *Biophysical Journal* 2001, **80**:2093-2109.
169. Rosen CG, Weber G: **Dimer formation from 1-amino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties.** *Biochemistry* 1969, **8**:3915-3920.
170. Bhattach.B, Wolff J: **Promotion of Fluorescence Upon Binding of Colchicine to Tubulin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1974, **71**:2627-2631.
171. Menninger S: *Etablierung zellulärer Testsysteme zur Identifikation von Molekülsonden für chemisch-genetische Untersuchungen.* Dissertation; TU Dortmund; Dortmund; 2009.
172. Antonchick AP, Gerding-Reimers C, Catarinella M, Schürmann M, Preut H, Ziegler S, Rauh D, Waldmann H: **Highly enantioselective synthesis and cellular evaluation of spirooxindoles inspired by natural products.** *Nat Chem* 2010, **2**:735-740.
173. Waldmann H, Hu TS, Renner S, Menninger S, Tannert R, Oda T, Arndt HD: **Total synthesis of chondramide C and its binding mode to F-actin.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2008, **47**:6473-6477.
174. Lessmann T, Leuenberger MG, Menninger S, Lopez-Canet M, Muller O, Hummer S, Bormann J, Korn K, Fava E, Zerial M, et al.: **Natural product-derived modulators of cell cycle progression and viral entry by enantioselective oxa Diels-Alder reactions on the solid phase.** *Chem Biol* 2007, **14**:443-451.
175. Dekker FJ, Rocks O, Vartak N, Menninger S, Hedberg C, Balamurugan R, Wetzel S, Renner S, Gerauer M, Schölermann B, et al.: **Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling.** *Nat Chem Biol* 2010, **6**:449-456.

176. Karaguni IM, Herter P, Debruyne P, Chtarbova S, Kasprzyński A, Herbrand U, Ahmadian MR, Glusenkamp KH, Winde G, Mareel M, et al.: **The new sulindac derivative IND 12 reverses Ras-induced cell transformation.** *Cancer Res* 2002, **62**:1718-1723.
177. Knoth T, Warburg K, Katzka C, Rai A, Wolf A, Brockmeyer A, Janning P, Reubold TF, Eschenburg S, Manstein D, et al.: **The Ras Pathway Modulator Melophlin A Targets Dynamins.** *Angewandte Chemie* 2009, **121**:7376-7381.
178. Muller O, Gourzoulidou E, Carpintero M, Karaguni IM, Langerak A, Herrmann C, Moroy T, Klein-Hitpass L, Waldmann H: **Identification of potent Ras signaling inhibitors by pathway-selective phenotype-based screening.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2004, **43**:450-454.
179. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, et al.: **Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.** *J Biol Chem* 1998, **273**:18623-18632.
180. Sampath P, Pollard TD: **Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments.** *Biochemistry* 1991, **30**:1973-1980.
181. Rampal AL, Pinkofsky HB, Jung CY: **Structure of cytochalasins and cytochalasin B binding sites in human erythrocyte membranes.** *Biochemistry* 1980, **19**:679-683.
182. Prasad V, Chaudhuri AR, Curcio M, Tomita I, Mizuhashi F, Murata K, Luduena RF: **Podophyllotoxin and nocodazole counter the effect of IKP104 on tubulin decay.** *J Protein Chem* 1998, **17**:663-668.
183. Panzer A, Joubert AM, Bianchi PC, Hamel E, Seegers JC: **The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways.** *Eur J Cell Biol* 2001, **80**:111-118.
184. Schiff PB, Horwitz SB: **Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins.** *Biochemistry* 1981, **20**:3247-3252.
185. Haritunians T, Gueller S, Zhang L, Badr R, Yin D, Xing H, Fung MC, Koeffler HP: **Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells.** *Leuk Res* 2008, **32**:1366-1373.
186. Li Y, Wang R, Ma E, Deng Y, Wang X, Xiao J, Jing Y: **The induction of G2/M cell-cycle arrest and apoptosis by cucurbitacin E is associated with increased phosphorylation of eIF2alpha in leukemia cells.** *Anticancer Drugs* 2010, **21**:389-400.
187. Shi X, Franko B, Frantz C, Amin HM, Lai R: **JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells.** *Br J Haematol* 2006, **135**:26-32.
188. Matsunaga T, Kudo J, Takahashi K, Dohmen K, Hayashida K, Okamura S, Ishibashi H, Niho Y: **Rotenone, a mitochondrial NADH dehydrogenase inhibitor, induces cell surface expression of CD13 and CD38 and apoptosis in HL-60 cells.** *Leuk Lymphoma* 1996, **20**:487-494.
189. Lee W-R, Shen S-C, Lin H-Y, Hou W-C, Yang L-L, Chen Y-C: **Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca²⁺-dependent endonuclease.** *Biochemical Pharmacology* 2002, **63**:225-236.
190. Nakazawa H, Kitano K, Cioca D, Ishikawa M, Ueno M, Ishida F, Kiyosawa K: **Induction of Polyploidization by Jaspamide in HL-60 Cells.** *Acta Haematologica* 2000, **104**:65-71.
191. Selden SC, 3rd, Schwartz SM: **Cytochalasin B inhibition of endothelial proliferation at wound edges in vitro.** *J Cell Biol* 1979, **81**:348-354.

192. He J, Wang Y, Duan F, Jiang H, Chen MF, Tang SY: **Icaritin Induces Apoptosis of HepG2 Cells via the JNK1 Signaling Pathway Independent of the Estrogen Receptor.** *Planta Med* 2010.
193. Huang X, Zhu D, Lou Y: **A novel anticancer agent, icaritin, induced cell growth inhibition, G1 arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells.** *Eur J Pharmacol* 2007, **564**:26-36.
194. Galliford CV, Scheidt KA: **Pyrrolidinyloxy-spirooxindole natural products as inspirations for the development of potential therapeutic agents.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2007, **46**:8748-8758.
195. Kondoh M, Usui T, Mayumi T, Osada H: **Effects of tryprostatin derivatives on microtubule assembly in vitro and in situ.** *J Antibiot (Tokyo)* 1998, **51**:801-804.
196. Cui CB, Kakeya H, Osada H: **Novel mammalian cell cycle inhibitors, spirotryprostatins A and B, produced by *Aspergillus fumigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase.** *Tetrahedron* 1996, **52**:12651-12666.
197. Cui CB, Kakeya H, Osada H: **Spirotryprostatin B, a novel mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*.** *J Antibiot (Tokyo)* 1996, **49**:832-835.
198. Searle PA, Molinski TF: **Phorboxazoles A and B: potent cytostatic macrolides from marine sponge *Phorbas* species.** *Journal of the American Chemical Society* 1995, **117**:8126-8131.
199. Araujo CAC, Alegrio LV, Leon LL: **Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*.** *Phytochemistry* 1998, **49**:751-754.
200. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF: **Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:339-345.
201. Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, et al.: **In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:7464-7469.
202. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM: **Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase.** *Cell* 1995, **81**:801-809.
203. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al.: **A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.** *Nature* 1992, **356**:768-774.
204. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: **Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.** *J Immunol* 1992, **148**:2207-2216.
205. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P: **Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes.** *J Exp Med* 1995, **182**:1597-1601.
206. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH: **Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry.** *Biochim Biophys Acta* 1992, **1133**:275-285.
207. Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D: **Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro.** *Blood* 1995, **85**:532-540.

208. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: **A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.** *J Immunol Methods* 1995, **184**:39-51.
209. Paddenberg R, Wulf S, Weber A, Heimann P, Beck LA, Mannherz HG: **Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases.** *European Journal of Cell Biology* 1996, **71**:105-119.
210. Wadkins RM, Jovin TM: **Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA.** *Biochemistry* 1991, **30**:9469-9478.
211. Terada K, Mori M: **Human DnaJ Homologs dj2 and dj3, and bag-1 Are Positive Cochaperones of hsc70.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**:24728-24734.
212. Kanazawa M, Terada K, Kato S, Mori M: **HSDJ, a Human Homolog of DnaJ, Is Farnesylated and Is Involved in Protein Import into Mitochondria.** *Journal of Biochemistry* 1997, **121**:890-895.
213. Han C, Zhang X, Xu W, Wang W, Qian H, Chen Y: **Cloning of the nucleostemin gene and its function in transforming human embryonic bone marrow mesenchymal stem cells into F6 tumor cells.** *Int J Mol Med* 2005, **16**:205-213.
214. Tsai RY, McKay RD: **A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells.** *Genes Dev* 2002, **16**:2991-3003.
215. Walter P, Blobel G: **Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes.** *J Cell Biol* 1981, **91**:557-561.
216. Walter P, Blobel G: **Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein.** *J Cell Biol* 1981, **91**:551-556.
217. Walter P, Ibrahimi I, Blobel G: **Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein.** *J Cell Biol* 1981, **91**:545-550.
218. George O, Bryant BK, Chinnasamy R, Corona C, Arterburn JB, Shuster CB: **Bisphenol A directly targets tubulin to disrupt spindle organization in embryonic and somatic cells.** *ACS Chem Biol* 2008, **3**:167-179.
219. Alston RW, Lasagna M, Grimsley GR, Scholtz JM, Reinhart GD, Pace CN: **Peptide sequence and conformation strongly influence tryptophan fluorescence.** *Biophys J* 2008, **94**:2280-2287.
220. Ponstingl H, Krauhs E, Little M, Kempf T: **Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**:2757-2761.
221. Krauhs E, Little M, Kempf T, Hofer-Warbinek R, Ade W, Ponstingl H: **Complete amino acid sequence of beta-tubulin from porcine brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**:4156-4160.
222. Xu K, Schwarz PM, Ludueña RF: **Interaction of nocodazole with tubulin isotypes.** *Drug Development Research* 2002, **55**:91-96.
223. Cordeiro Y, Lima LMTR, Gomes MPB, Foguel D, Silva JL: **Modulation of Prion Protein Oligomerization, Aggregation, and β -sheet Conversion by 4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS).** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**:5346-5352.
224. Silva JL, Silveira CF, Correia Junior A, Pontes L: **Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of arc repressor.** *J Mol Biol* 1992, **223**:545-555.

225. Bhattacharyya B, Wolff J: **The interaction of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate with tubulin: A site independent of the colchicine-binding site.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1975, **167**:264-269.
226. Ward LD, Timasheff SN: **Cooperative multiple binding of bisANS and daunomycin to tubulin.** *Biochemistry* 1994, **33**:11891-11899.
227. Prasad AR, Luduena RF, Horowitz PM: **Bis(8-anilinonaphthalene-1-sulfonate) as a probe for tubulin decay.** *Biochemistry* 1986, **25**:739-742.
228. Horowitz P, Prasad V, Luduena RF: **Bis(1,8-anilinonaphthalenesulfonate). A novel and potent inhibitor of microtubule assembly.** *J Biol Chem* 1984, **259**:14647-14650.
229. Zhang Z, Meng T, Yang N, Wang W, Xiong B, Chen Y, Ma L, Shen J, Miao ZH, Ding J: **MT119, a new planar-structured compound, targets the colchicine site of tubulin arresting mitosis and inhibiting tumor cell proliferation.** *International Journal of Cancer* 2010:n/a-n/a.
230. Mukherjee S, Acharya BR, Bhattacharyya B, Chakrabarti G: **Genistein Arrests Cell Cycle Progression of A549 Cells at the G2/M Phase and Depolymerizes Interphase Microtubules through Binding to a Unique Site of Tubulin.** *Biochemistry* 2010, **49**:1702-1712.
231. Zhang C, Yang N, Yang C-h, Ding H-s, Luo C, Zhang Y, Wu M-j, Zhang X-w, Shen X, Jiang H-l, et al.: **S9, a Novel Anticancer Agent, Exerts Its Anti-Proliferative Activity by Interfering with Both PI3K-Akt-mTOR Signaling and Microtubule Cytoskeleton.** *PLoS One* 2009, **4**:e4881.
232. Ren X, Dai M, Lin LP, Li PK, Ding J: **Anti-angiogenic and vascular disrupting effects of C9, a new microtubule-depolymerizing agent.** *British Journal of Pharmacology* 2009, **156**:1228-1238.
233. Gupta K, Bishop J, Peck A, Brown J, Wilson L, Panda D: **Antimitotic Antifungal Compound Benomyl Inhibits Brain Microtubule Polymerization and Dynamics and Cancer Cell Proliferation at Mitosis, by Binding to a Novel Site in Tubulin†.** *Biochemistry* 2004, **43**:6645-6655.
234. Chatterjee SK, Laffray J, Patel P, Ravindra R, Qin Y, Kuehne ME, Bane SL: **Interaction of Tubulin with a New Fluorescent Analogue of Vinblastine†,‡.** *Biochemistry* 2002, **41**:14010-14018.
235. Mohan R, Rastogi N, Namboothiri INN, Mobin SM, Panda D: **Synthesis and evaluation of [alpha]-hydroxymethylated conjugated nitroalkenes for their anticancer activity: Inhibition of cell proliferation by targeting microtubules.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006, **14**:8073-8085.
236. Gururaja TL, Goff D, Kinoshita T, Goldstein E, Yung S, McLaughlin J, Pali E, Huang JI, Singh R, Daniel-Issakani S, et al.: **R-253 disrupts microtubule networks in multiple tumor cell lines.** *Clinical Cancer Research* 2006, **12**:3831-3842.
237. David-Pfeuty T, Simon C, Pantaloni D: **Effect of antimitotic drugs on tubulin GTPase activity and self-assembly.** *J Biol Chem* 1979, **254**:11696-11702.
238. Mejillano MR, Shivanna BD, Himes RH: **Studies on the Nocodazole-Induced GTPase Activity of Tubulin.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1996, **336**:130-138.
239. Yang YC, Hsu YT, Wu CC, Chen HT, Chang MS: **Silencing of astrin induces the p53-dependent apoptosis by suppression of HPV18 E6 expression and sensitizes cells to paclitaxel treatment in HeLa cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **343**:428-434.
240. Takara K, Obata Y, Yoshikawa E, Kitada N, Sakaeda T, Ohnishi N, Yokoyama T: **Molecular changes to HeLa cells on continuous exposure to cisplatin or paclitaxel.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2006, **58**:785-793.
241. Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, Fridman DJ, Wolpaw AJ, Smukste I, Peltier JM, Boniface JJ, et al.: **RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels.** *Nature* 2007, **447**:865-869.

242. Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR: **Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells.** *Cancer Cell* 2003, **3**:285-296.
243. Campbell PM, Der CJ: **Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis.** *Seminars in Cancer Biology* 2004, **14**:105-114.
244. Arens H, Ulbrich B, Fischer H, Parnham MJ, Romer A: **Novel antiinflammatory flavonoids from Podophyllum versipelle cell culture.** *Planta Med* 1986:468-473.
245. Broomhead AJ, Dewick PM: **Tumour-inhibitory aryltetralin lignans in Podophyllum versipelle, Diphylla cymosa and Diphylla grayi.** *Phytochemistry* 1990, **29**:3831-3837.
246. Yang XZ, Zhu JY, Tang CP, Ke CQ, Lin G, Cheng TY, Rudd JA, Ye Y: **Alkaloids from roots of Stemona sessilifolia and their antitussive activities.** *Planta Med* 2009, **75**:174-177.
247. Chen ZH, Zhang YQ, Chen ZM, Tu YQ, Zhang FM: **Total synthesis of (+/-)-maistemone and (+/-)-stemamide.** *Chem Commun (Camb)* 2010.
248. Ohtani K, Miyajima C, Takahashi T, Kasai R, Tanaka O, Hahn D-R, Naruhashi N: **A dimeric triterpene-glycoside from Rubus coreanus.** *Phytochemistry* 1990, **29**:3275-3280.
249. Patel AV, Rojas-Vera J, Dacke CG: **Therapeutic constituents and actions of Rubus species.** *Curr Med Chem* 2004, **11**:1501-1512.
250. Usui T, Kazami S, Dohmae N, Mashimo Y, Kondo H, Tsuda M, Terasaki AG, Ohashi K, Kobayashi Ji, Osada H: **Amphidinolide H, a Potent Cytotoxic Macrolide, Covalently Binds on Actin Subdomain 4 and Stabilizes Actin Filament.** *Chemistry & Biology* 2004, **11**:1269-1277.
251. **Small-Molecule Inhibitors of Actin Dynamics and Cell Motility.** *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2003, **3**:593-616.
252. Estes JE, Selden LA, Gershman LC: **Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin.** *Biochemistry* 1981, **20**:708-712.
253. Allingham J, Klenchin V, Rayment I: **Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006, **63**:2119-2134.
254. Jiang P, Enomoto A, Takahashi M: **Cell biology of the movement of breast cancer cells: Intracellular signalling and the actin cytoskeleton.** *Cancer Letters* 2009, **284**:122-130.
255. Berken A, Wittinghofer A: **Structure and function of Rho-type molecular switches in plants.** *Plant Physiology and Biochemistry* 2008, **46**:380-393.
256. Begum R, Nur EKMS, Zaman MA: **The role of Rho GTPases in the regulation of the rearrangement of actin cytoskeleton and cell movement.** *Exp Mol Med* 2004, **36**:358-366.
257. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ: **Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments.** *Physiol. Rev.* 2003, **83**:433-473.
258. Hall A, Nobes CD: **Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000, **355**:965-970.
259. Chen H, Bernstein BW, Bamburg JR: **Regulating actin-filament dynamics in vivo.** *Trends in Biochemical Sciences* 2000, **25**:19-23.
260. Hall A: **Rho GTPases and the actin cytoskeleton.** *Science* 1998, **279**:509-514.
261. Khatau SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson PJ, Patel MS, Stewart CL, Searson PC, Hodzic D, Wirtz D: **A perinuclear actin cap regulates nuclear shape.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:19017-19022.
262. Stewart CL, Roux KJ, Burke B: **Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach.** *Science* 2007, **318**:1408-1412.

263. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D: **Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex.** *J Cell Biol* 2006, **172**:41-53.
264. Nigg EA, Raff JW: **Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease.** *Cell* 2009, **139**:663-678.
265. Saunders W: **Centrosomal amplification and spindle multipolarity in cancer cells.** *Semin Cancer Biol* 2005, **15**:25-32.
266. **Induction of multinucleated cells in V79 Chinese hamster cells exposed to dimethylarsinic acid, a methylated derivative of inorganic arsenics: mechanism associated with the formation of aberrant mitotic spindles.** *Toxicology in Vitro* 1999, **13**:11-25.
267. Dudkina AS, Lindsley CW: **Small molecule protein-protein inhibitors for the p53-MDM2 interaction.** *Curr Top Med Chem* 2007, **7**:952-960.
268. Brooks RF, Richmond FN: **Microtubule-organizing centres during the cell cycle of 3T3 cells.** *J Cell Sci* 1983, **61**:231-245.
269. Watt FM, Harris H: **Microtubule-organizing centres in mammalian cells in culture.** *J Cell Sci* 1980, **44**:103-121.
270. Paoletti A, Giocanti N, Favaudon V, Bornens M: **Pulse treatment of interphasic HeLa cells with nanomolar doses of docetaxel affects centrosome organization and leads to catastrophic exit of mitosis.** *J Cell Sci* 1997, **110** (Pt 19):2403-2415.
271. Keryer G, Ris H, Borisy GG: **Centriole distribution during tripolar mitosis in Chinese hamster ovary cells.** *J Cell Biol* 1984, **98**:2222-2229.
272. Zuckerberg C, Solari AJ: **Centriolar changes induced by vinblastine sulphate in the seminiferous epithelium of the mouse.** *Exp Cell Res* 1973, **76**:470-475.
273. Hut HM, Lemstra W, Blaauw EH, Van Cappellen GW, Kampinga HH, Sibon OC: **Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis.** *Mol Biol Cell* 2003, **14**:1993-2004.
274. Ye K, Ke Y, Keshava N, Shanks J, Kapp JA, Tekmal RR, Petros J, Joshi HC: **Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:1601-1606.
275. Zhou J, Gupta K, Aggarwal S, Aneja R, Chandra R, Panda D, Joshi HC: **Brominated derivatives of noscapine are potent microtubule-interfering agents that perturb mitosis and inhibit cell proliferation.** *Mol Pharmacol* 2003, **63**:799-807.
276. Karna P, Rida PC, Pannu V, Gupta KK, Dalton WB, Joshi H, Yang VW, Zhou J, Aneja R: **A novel microtubule-modulating noscapinoid triggers apoptosis by inducing spindle multipolarity via centrosome amplification and declustering.** *Cell Death Differ* 2010.
277. Bornens M: **Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**:25-34.
278. Fukasawa K: **Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:911-924.
279. Delgehyr N, Sillibourne J, Bornens M: **Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function.** *J. Cell Sci.* 2005, **118**:1565-1575.
280. Lukasiewicz KB, Lingle WL: **Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle.** *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2009, **50**:602-619.
281. Rabinovitch PS: **DNA content histogram and cell-cycle analysis.** *Methods Cell Biol* 1994, **41**:263-296.
282. Holdenrieder S, Stieber P: **Apoptotic markers in cancer.** *Clinical Biochemistry* 2004, **37**:605-617.

283. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M: **THE MITOCHONDRIAL DEATH/LIFE REGULATOR IN APOPTOSIS AND NECROSIS**. *Annual Review of Physiology* 1998, **60**:619-642.
284. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P: **Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis**. *Methods* 2008, **44**:205-221.
285. Han SI, Kim YS, Kim TH: **Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions**. *Bmb Reports* 2008, **41**:1-10.
286. Seed L, Slaughter D, Limarzi L: **Effect of colchicine on human carcinoma Surgery** 1940, **7**:696-709.
287. 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**. *Biotechnol J* 2007, **2**:68-75.
288. Sato S, Kwon Y, Kamisuki S, Srivastava N, Mao Q, Kawazoe Y, Uesugi M: **Polyproline-rod approach to isolating protein targets of bioactive small molecules: isolation of a new target of indomethacin**. *J Am Chem Soc* 2007, **129**:873-880.
289. Vasko RC, Rodriguez RA, Cunningham CN, Ardi VC, Agard DA, McAlpine SR: **Mechanistic Studies of Sansalvamide A-Amide: An Allosteric Modulator of Hsp90**. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2010, **1**:4-8.
290. Lomenick B, Olsen RW, Huang J: **Identification of Direct Protein Targets of Small Molecules**. *ACS Chemical Biology* 2010:null-null.
291. Knoth T: **Synthese einer Kollektion von 3-Acyltetramsäuren und Identifizierung der Zielproteine von Melophlin A [Dissertation]**. Dortmund: FH Dortmund: 2009.
292. Ellinger B: **Etablierung von Testverfahren zur Evaluation niedermolekularer Modulatoren des Wnt-Signalwegs und anderer biologischer Prozesse**. Dortmund: FH Dortmund: 2010.
293. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B: **Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review**. *Anal Bioanal Chem* 2007, **389**:1017-1031.
294. Aebersold R, Mann M: **Mass spectrometry-based proteomics**. *Nature* 2003, **422**:198-207.
295. Cox J, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen JV, Mann M: **A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics**. *Nat. Protocols* 2009, **4**:698-705.
296. Pendzialek D: **Untersuchungen zur Rolle von Acyl Protein Thioesterase (APT1) bei der Acylierung von Ras-Isoformen**. Dortmund: FH Dortmund: 2007.
297. Bulinski JC, Morgan JL, Borisy GG, Spooner BS: **Comparison of methods for tubulin quantitation in HeLa cell and brain tissue extracts**. *Analytical Biochemistry* 1980, **104**:432-439.
298. Bulinski JC, Borisy GG: **Self-assembly of microtubules in extracts of cultured HeLa cells and the identification of HeLa microtubule-associated proteins**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**:293-297.
299. Chan JNY, Nislow C, Emili A: **Recent advances and method development for drug target identification**. *Trends in Pharmacological Sciences* 2010, **31**:82-88.
300. Luduena RF: **Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications**. *Int Rev Cytol* 1998, **178**:207-275.
301. Scherf U, Pastan I, Willingham MC, Brinkmann U: **The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:2670-2674.
302. Tai CJ, Shen SC, Lee WR, Liao CF, Deng WP, Chiou HY, Hsieh CI, Tung JN, Chen CS, Chiou JF, et al.: **Increased cellular apoptosis susceptibility**

- (CSE1L/CAS) protein expression promotes protrusion extension and enhances migration of MCF-7 breast cancer cells.** *Exp Cell Res* 2010, **316**:2969-2981.
303. Wandosell F, Serrano L, Avila J: **Phosphorylation of Alpha-Tubulin Carboxyl-Terminal Tyrosine Prevents Its Incorporation into Microtubules.** *Journal of Biological Chemistry* 1987, **262**:8268-8273.
304. Liao CF, Luo SF, Tsai CSS, Tsao TY, Chen SL, Jiang MC: **CAS Enhances Chemotherapeutic Drug-Induced p53 Accumulation and Apoptosis: Use of CAS for High-Sensitivity Anticancer Drug Screening.** *Toxicology Mechanisms and Methods* 2008, **18**:771-776.
305. Liao CF, Luo SF, Shen TY, Lin CH, Chien JT, Du SY, Jiang MC: **CSE1L/CAS, a microtubule-associated protein, inhibits taxol (paclitaxel)-induced apoptosis but enhances cancer cell apoptosis induced by various chemotherapeutic drugs.** *Bmb Reports* 2008, **41**:210-216.
306. Jiang MC, Luo SF, Li LT, Lin CC, Du SY, Lin CY, Hsu YW, Liao CF: **Synergic CSE1L/CAS, TNFR-1, and p53 apoptotic pathways in combined interferon-gamma/adriamycin-induced apoptosis of Hep G2 hepatoma cells (vol 26, pg 91, 2007).** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2007, **26**:162-162.
307. Behrens P, Brinkmann U, Wellmann A: **CSE1L/CAS: Its role in proliferation and apoptosis.** *Apoptosis* 2003, **8**:39-44.
308. Ogryzko VV, Brinkmann E, Howard BH, Pastan I, Brinkmann U: **Antisense inhibition of CAS, the human homologue of the yeast chromosome segregation gene CSE1, interferes with mitosis in HeLa cells.** *Biochemistry* 1997, **36**:9493-9500.
309. Zhang Z, Meng T, Yang N, Wang W, Xiong B, Chen Y, Ma L, Shen J, Miao Z-H, Ding J: **MT119, a new planar-structured compound, targets the colchicine site of tubulin arresting mitosis and inhibiting tumor cell proliferation.** *International Journal of Cancer* 2010:n/a-n/a.
310. **Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals.** Edited by Jiskoot W. CD: American Association of Pharmaceutical Scientists; 2005.
311. Shi L, Palleros DR, Fink AL: **Protein conformational changes induced by 1,1'-bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): preferential binding to the molten globule of DnaK.** *Biochemistry* 1994, **33**:7536-7546.
312. Whitmore L, Wallace BA: **Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases.** *Biopolymers* 2008, **89**:392-400.
313. Greenfield NJ: **Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure.** *Nat. Protocols* 2007, **1**:2876-2890.
314. Hamel E: **Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: Maytansine, rhizoxin, phomopsin a, dolastatins 10 and 15 and halichondrin B.** *Pharmacology & Therapeutics* 1992, **55**:31-51.
315. Bai RL, Pettit GR, Hamel E: **Binding of dolastatin 10 to tubulin at a distinct site for peptide antimitotic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites.** *J Biol Chem* 1990, **265**:17141-17149.
316. Cormier A, Marchand M, Ravelli RB, Knossow M, Gigant B: **Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands.** *EMBO Rep* 2008, **9**:1101-1106.
317. Gigant B, Wang C, Ravelli RB, Roussi F, Steinmetz MO, Curmi PA, Sobel A, Knossow M: **Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine.** *Nature* 2005, **435**:519-522.
318. Sackett DL: **Vinca site agents induce structural changes in tubulin different from and antagonistic to changes induced by colchicine site agents.** *Biochemistry* 1995, **34**:7010-7019.
319. Gupta S, Bhattacharyya B: **Antimicrotubular drugs binding to vinca domain of tubulin.** *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003, **253**:41-47.

320. Haskins KM, Donoso JA, Himes RH: **Spirals and paracrystals induced by Vinca alkaloids: evidence that microtubule-associated proteins act as polycations.** *J Cell Sci* 1981, **47**:237-247.
321. Cormier A, Knossow M, Wang C, Gigant B: **The Binding of Vinca Domain Agents to Tubulin: Structural and Biochemical Studies.** In *Methods in Cell Biology*. Edited by Leslie W, John JC: Academic Press; 2010:373-390. vol Volume 95.]
322. Amos LA, Jubb JS, Henderson R, Vigers G: **Arrangement of protofilaments in two forms of tubulin crystal induced by vinblastine.** *J Mol Biol* 1984, **178**:711-729.
323. Fujiwara K, Tilney LG: **Substructural analysis of the microtubule and its polymorphic forms.** *Ann N Y Acad Sci* 1975, **253**:27-50.
324. Croteau R, Ketchum RE, Long RM, Kaspera R, Wildung MR: **Taxol biosynthesis and molecular genetics.** *Phytochem Rev* 2006, **5**:75-97.
325. Tabata H: **Paclitaxel production by plant-cell-culture technology.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004, **87**:1-23.
326. Kavallaris M: **Microtubules and resistance to tubulin-binding agents.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**:194-204.
327. Verdier-Pinard P, Pasquier E, Xiao H, Burd B, Villard C, Lafitte D, Miller LM, Angeletti RH, Horwitz SB, Braguer D: **Tubulin proteomics: towards breaking the code.** *Anal Biochem* 2009, **384**:197-206.

10. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| γ TURC | gamma-tubulin ring complex |
| 3D | dreidimensional |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BIS-ANS | 4,4'-Bis (1-anilinonaphthalene 8-sulfonate) |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BODIPY-FL | Boron-dipyrromethene-fluorescein like |
| BSA | Rinderserumalbuminbovine serum albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CDK | cyclin dependent kinase |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbeccos modified eagle's medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiotreitol |
| EC50 | effective concentration 50% |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycoltetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| ESI | Electrospray-Ionisation |
| Ex/Em | excitation/emission |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GI50 | growth inhibitory concentration 50% |
| GTP | Guanosintriphosphat |

| | |
|--------|---|
| h | <i>hours</i> (Stunden) |
| HRP | horseradish peroxidase |
| IC50 | inhibitory concentration 50% |
| ICAT | Isotope-coded affinity tag |
| ITRAQ | Isobaric tag for relative and absolute quantitation |
| LC | liquid chromatography |
| LINC | linker of nucleoskeleton and Zytoskeleton |
| mA | Milliamper |
| MAP | Mikrotubuli assoziiertes Protein |
| MDM2 | murine double minute 2 |
| min | Minuten |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| MS | Massenspektrometrie |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie |
| MT | Mikrotubuli |
| MTOC | Mikrotubuli organisierendes Zentrum |
| nm | Nanometer |
| PCM | pericentriolares Material |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PI | Propidiumiodid |
| PIPES | Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) |
| PS | Phosphahtidylserin |
| PSSC | protein structure similarity clustering |
| RNA | ribonucleic acid |
| rpm | revolutions per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunden |
| SA-HRP | streptavidin horseradish peroxidase |
| SAR | structure activity relationship |

10. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| SCONP | structural classification of natural products |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| SILAC | Stable isotope labelling of amino acids in cell culture |
| siRNA | short interfering ribonucleic acid |
| sog. | sogenannt |
| | |
| TBA | Tubulin bindendes Agenz |
| TFA | Trifluoroacetic acid |
| THP | Tetrahydropyran |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TRITC | Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat |
| | |
| WST | Water soluble tetrazolium |
| | |
| z.B. | zum Beispiel |

Aminosäuren werden in der üblichen Weise durch den Dreibuchstaben-Code abgekürzt (vgl. IUPAC-IUB Comission of Biochemical Nomenclature, Pure Appl.Chem. 1982, 54, 1517 und 1525).

11. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen und insbesondere für die Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit. Bei Prof. Dr. Roger Goody möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Ebenso danke ich dem Drittprüfer Dr. Leif Dehmelt.

Ein großer Dank gilt der exzellenten Betreuung von Frau Dr. Slava Ziegler, ihrer fundierten fachlichen Ratschläge, hilfreicher Diskussionen und ihrer ständigen Hilfsbereitschaft. Ich danke Frau Dr. Slava Ziegler ebenfalls für die Ermöglichung einer eigenständigen Arbeitsweise und für die schnelle Durchsicht dieser Arbeit.

Für die Betreuung in der Anfangsphase meiner Dissertation und die Aufnahme in die Biologengruppe danke ich Dr. Katja Hübel.

Ein großer Dank gilt meinen Projektpartnern, die maßgeblich zu dem Gelingen der Studien beigetragen haben. Hierbei sind insbesondere Dr. Hugo Lachance, Dr. Andrey Antonchick und Dr. Tobias Voigt zu erwähnen, deren Arbeiten die chemischen Materialien bereitstellten. Für die erfolgreichen Arbeiten rund um die SILAC basierte Affinitätschromatografie danke ich Beate Schölermann, A. Brockmeyer und Dr. Petra Janning. Sabrina Bergmann danke ich für die Hilfe bei der Untersuchung der Tetrahydropyran-Substanzbibliothek.

Ich danke allen, die zu einem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. So danke ich Herrn Dr. Sascha Menninger für die technische Einführung in das zellbasierte Screening. Herrn Dr. Hugo Lachance danke ich für die Hilfe bei chemischen Fragestellungen und der Datenbanksuche von Strukturen. Außerdem danke ich Dr. Wolfram Wilk, Dr. Gemma Triola, Anouk Stigter, Gaby Beetz und Dr. Christiana Stute für ihre Hilfsbereitschaft. Für die Unterstützung bei labortechnischen Fragestellungen danke ich der Biologentruppe der Abteilung.

Für eine produktive und entspannte Büroatmosphäre auf kleinem Raum danke ich Dr. Dirk Weinrich, Kristina Görmer, Verena Pries, Dr. Slava Ziegler und Heiko Dückert.

11. Danksagung

In diesem interessanten Lebensabschnitt sind mir einige Leute besonders ans Herz gewachsen. Hierfür und für gemeinsame Unternehmungen, die für die nötige Ablenkung sorgten, danke ich besonders Dr. Robin Bon, Dr. Jerome Clerc, Anouk Stigter und Eulashini Chuntharpursat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre ständige moralische Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Eva-Maria Sprehe, es ist schön, dass es dich gibt und ich danke dir für die Unterstützung und Kraft die du mir gibst.

12. Eidesstattliche Erklärung

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

Dortmund, 28.02.2011

Claas Gerding-Reimers