

Identifizierung chemischer Transportinhibitoren zur Modulation (patho)biologischer Genprodukte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
,Doktor der Naturwissenschaften'

am Fachbereich Biologie der
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT
in Mainz

vorgelegt von Verena Fetz
geboren am 19.02.1981 in Koblenz

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	17
1.1	Zelluläre Transportprozesse	18
1.2	Transport über die Kernmembran	19
1.3	Struktur und Zusammensetzung der Kernporen	20
1.3.1	Nukleo-zytoplasmatischer Transportzyklus	22
1.3.2	Mechanismus der Kernporen-Passage	24
1.3.3	Karyopherin-Familie der Transport-Rezeptoren	26
1.3.4	Nukleärer Export-Rezeptor Crm1	28
1.3.5	Import-Rezeptoren	30
1.3.6	Transport-Signale	31
1.3.7	Transport von mRNA	34
1.3.8	Regulation des Transports	35
1.4	Inhibitoren des Export-Rezeptors Crm1	36
1.4.1	Leptomycin B	37
1.4.2	Weitere Naturstoffe	37
1.4.3	<i>Small-Molecule</i> Inhibitoren	38
1.5	Krebs	40
1.5.1	Transport in Krebszellen	42
1.6	Survivin	43
1.6.1	Export von Survivin aus dem Zellkern	44
1.6.2	Survivin in Krebszellen und als Therapietarget	44
1.7	Apoptose	45
1.8	Mitose und Zellzyklus	48
1.9	HIV-1 Rev und DDX3	49
1.10	Nukleo-Zytoplasmatischer Transport als therapeutischer Angriffspunkt	52
1.11	Transport-Biosensor-System	52
1.12	Hochdurchsatzanalyse, Hits und Leads	53
1.13	ChemBioNet-Bibliothek	55
1.14	Zielsetzung	57
2	Material und Methoden	59
2.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	59
2.1.1	Plasmide	64
2.1.2	Bakterienstämme	68
2.1.3	Oligonukleotide	69
2.1.4	Zelllinien	70
2.1.5	Programme/Computergestützte Analysen	70
2.2	Arbeiten mit DNA und RNA	71
2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	71
2.2.2	Transformation	71

2.2.3	Kryokonservierung von Bakterien.....	71
2.2.4	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	71
2.2.5	DNA-Restriktion	72
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	72
2.2.7	Extraktion von DNA-Fragmenten/Aufreinigung von Restriktionen	73
2.2.8	Dephosphorylierung der 5'Enden	73
2.2.9	Auffüllen überstehender 5'Enden	73
2.2.10	<i>Oligo-Annealing</i>	73
2.2.11	DNA Ligation.....	74
2.2.12	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	74
2.2.13	Primerdesign.....	75
2.2.14	DNA-Amplifikation mittels PCR	75
2.2.15	<i>Splice overlap extension</i> -PCR.....	76
2.2.16	Sequenz-Analyse.....	76
2.2.17	Extraktion von RNA aus Zellen.....	77
2.2.18	Reverse Transkription.....	77
2.2.19	Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	78
2.3	Arbeiten mit Proteinen	78
2.3.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	78
2.3.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	79
2.3.3	Proteinquantifizierung nach Bradford	79
2.3.4	SDS-Page und Western Blot.....	80
2.3.5	<i>In vitro</i> -Translation	82
2.3.6	Pulldown-Assay	82
2.4	Arbeiten mit Säugerzellen	83
2.4.1	Kultivierung von Säugerzellen	83
2.4.2	Kryokonservierung und Auftauen	83
2.4.3	Transfektion	83
2.4.4	Transduktion	84
2.4.5	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren	85
2.4.6	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	85
2.4.7	Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen	85
2.4.8	Herstellung von in Paraffin eingebetteten Zellpellets	85
2.4.9	Zellviabilitäts-Assays	86
2.4.10	Durchflusszytometrie	87
2.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	89
2.6	Mikroinjektion.....	90
2.7	Hochdurchsatz Fluoreszenzmikroskopie.....	91
2.7.1	ArrayScanVTI®-HCS Reader	91
2.7.2	Poly-L-Lysin Beschichtung von 384well-Platten.....	91
2.7.3	Substanzbibliothek und Transfer	92

2.7.4	Zeitlicher Ablauf	92
2.7.5	Auswertung	92
2.8	Hochdurchsatzanalyse von Pilzextrakten.....	94
2.9	Intraperitoneale Injektion von Nacktmäusen	94
2.10	Statistische Analyse.....	95
3	Ergebnisse	97
3.1	Bedeutung des molekularen Botenstoffs Stickstoffmonoxid (NO) für die Modulation des Apoptose-Inhibitor Proteins Survivin	97
3.2	Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Bibliothek mit dem RevNES-Biosensor	99
3.2.1	Herstellung einer stabilen RevNES-Biosensor-Zelllinie	99
3.2.2	Etablierung der Zellfixierung für die Hochdurchsatzanalyse	100
3.2.3	Umsetzen auf 384well-Format und Test der <i>Molecular Translocation-Bioapplication</i>	101
3.2.4	Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Bibliothek mit dem RevNES-Biosensor	103
3.2.5	<i>Rescreen</i> der potentiellen <i>Hits</i>	106
3.2.6	Bestätigung der <i>Hits</i>	107
3.3	Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Bibliothek mit dem SurvivinNES-Biosensor	109
3.3.1	Herstellung einer stabilen SurvivinNES-Biosensor-Zelllinie (HeLa _{SurvNES})	109
3.3.2	Vortest für die Hochdurchsatzanalyse am FMP Berlin.....	109
3.3.3	Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Bibliothek mit dem SurvivinNES-Biosensor	110
3.3.4	<i>Rescreen</i> der potentiellen <i>Hits</i>	111
3.4	Vergleich der RevNES- und SurvivinNES-Biosensoren.....	112
3.5	Charakterisierung der neuen Exportinhibitoren.....	113
3.5.1	Stabilität des RevNES-Biosensors nach Behandlung mit Exportinhibitoren	114
3.5.2	LC-MS-Analyse der in DMSO gelösten Exportinhibitoren (FMP, Berlin)	114
3.5.3	Lipophilität der Exportinhibitoren	115
3.5.4	Inhibitionskinetiken der neuen Exportinhibitoren.....	117
3.5.5	Lokalisation des SurvivinNES-Biosensors in HeLa-Zellen	117
3.5.6	Lokalisation von E1B-GFP in HeLa-Zellen.....	119
3.5.7	Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitorwirkung.....	119
3.5.8	Bestätigung der Inhibition in anderen Zelllinien.....	121
3.5.9	Effekte der Substanzen auf die Viabilität.....	122
3.5.10	Toxizität der Substanzen im Mausmodell.....	125
3.5.11	Induktion der Apoptose durch C3 und C5	126
3.5.12	Kombinationsbehandlung mit Imatinib.....	127
3.5.13	Kombination der Inhibitoren mit Radiotherapie	128
3.5.14	Effekte der Substanzen auf den Zellzyklus	129
3.5.15	Effekte von C3 und C5 auf die Lokalisation von Survivin in der Mitose	131
3.5.16	Mikroinjektion von GST-Rev/SurvivinNES-GFP	132
3.5.17	<i>In vitro</i> -Bindungsstudien mittels Pulldown.....	133
3.5.18	Stabilität der Exportinhibitoren.....	135
3.5.19	Viabilität nach Präinkubation von C3 und C5	136

3.5.20	Stabilität der Inhibition nach Entfernung der Exportinhibitoren	137
3.5.21	Einfluss der Exportinhibitoren auf die Interaktion von HIV1-Rev und Crm1.....	139
3.5.22	Effekte der Exportinhibitoren auf die Replikation von HIV-1	142
3.5.23	Einfluss von C3 und C5 auf die Expression von Crm1.....	144
3.6	Suche nach zu C3 und C5 homologen Substanzen.....	145
3.7	Exportinhibitoren aus Pilzextrakten	149
3.7.1	Hochdurchsatzanalyse der Pilzextrakte	149
3.7.2	Charakterisierung des Inhibitors	152
3.7.3	FR96001M und SurvivinNES-Biosensor	154
3.7.4	<i>In vitro</i> -Bindungsstudien mittels Pulldown	155
3.7.5	Aktivität von FR96001M ist gegen Crm1 _{Cys528} gerichtet.	156
3.7.6	Durch FR96001M vermittelte Zytotoxizität und Induktion der Apoptose	157
3.7.7	Aktivität von FR96001M in murinen Zellen.....	160
3.8	Erstellen eines bidirektionalen Vektors zur simultanen Expression zweier Biosensoren ...	161
3.8.1	Generierung des bidirektionalen Vektors durch molekulare Klonierung	162
3.8.2	Stabile Expression zweier Biosensoren	163
3.8.3	Verwendung von H2B-BFP als Zellkern-Marker	165
3.9	Untersuchungen der Lokalisation und Interaktion von DDX3	166
4	Diskussion	173
4.1	Translokations-Biosensoren in der Hochdurchsatzanalyse	173
4.1.1	Vergleich der verwendeten Biosensoren.....	174
4.1.2	Vergleich der beiden Hochdurchsatzanalysen	175
4.2	Charakterisierung der neuen Exportinhibitoren.....	176
4.2.1	Vergleich der Substanzen hinsichtlich der vermittelten Inhibition	177
4.2.2	Zytotoxizität und Apoptose	179
4.2.3	Zellzyklus und Mitose	182
4.2.4	<i>In vitro</i> -Aktivität der neuen Exportinhibitoren.....	183
4.2.5	Stabilität von C3 und C5	184
4.2.6	Einfluss auf die Interaktion von Rev mit Crm1	185
4.3	Bestimmung essentieller Strukturen von C3 und C5.....	187
4.4	Crm1-Inhibitoren in der Therapeutikaentwicklung.....	188
4.5	Werkzeuge für die Untersuchung des Exportmechanismus	189
4.6	Neuer Exportinhibitor isoliert aus einem Pilzextrakt	189
4.7	Bidirektionale Vektoren zur Verwendung in der Hochdurchsatzanalyse.....	192
4.8	Interaktion von DDX3 mit HIV-1 Rev	194
4.9	Zusammenfassung	197
5	Referenzen	199
5.1	Eigene Veröffentlichungen	212
6	Anhang	217

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	Schematische Darstellung des Zellkerns mit Übergang in das ER	19
Abb. 2.	Nach Aktivierung werden nukleäre Rezeptoren in den Zellkern importiert.....	20
Abb. 3.	Schematischer Aufbau der Kernpore.....	21
Abb. 4.	Schematischer Aufbau der Kernpore und Lokalisation der Nups.....	22
Abb. 5.	Nukleo-zytoplasmatischer Transport-Zyklus über Importine und Exportine	24
Abb. 6.	3D-Struktur des Export-Rezeptors Crm1 mit RanGTP	29
Abb. 7.	Vergleich zwischen dem Sequenz- und dem Struktur-basierten Alignment des RevNES und des Snurportin1 N-terminus	33
Abb. 8.	Export verschiedener RNA-Klassen aus dem Zellkern.....	35
Abb. 9.	Michael-Addition von LMB an das Cystein ₅₂₈ von Crm1.....	37
Abb. 10.	Inhibitoren von Crm1	39
Abb. 11.	Kennzeichen von Krebszellen	41
Abb. 12.	Tumorigenes Potential von Krebszellen	42
Abb. 13.	Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg.....	47
Abb. 14.	Zellzyklus und Mitose	48
Abb. 15.	Bedeutung des HIV-1 Rev-Proteins für den Export viraler RNA	50
Abb. 16.	Schematische Darstellung von DDX3	51
Abb. 17.	Modularer Aufbau des Transport-Biosensors und dessen Lokalisation in HeLa-Zellen ...	53
Abb. 18.	Schematischer Ablauf einer Therapeutikum-Entwicklung	54
Abb. 19.	Vektorkarte pGEX-GFP und schematischer Aufbau des Fusionsproteins.....	64
Abb. 20.	Vektorkarte pC3DNA3.1-GFP	65
Abb. 21.	Vektorkarte pBI-EGFP-Insu mit Insulator-Sequenzen.....	66
Abb. 22.	Vektorkarte pINCO	67
Abb. 23.	Verwendete Molekulargewichtstandards.....	72
Abb. 24.	Schematischer Ablauf einer SOE-PCR	76
Abb. 25.	Schematische Verteilung der Zellzyklusphasen.....	89
Abb. 26.	Energieniveaus bei der Anregung/Emission von Fluoreszenzfarbstoffen und zur Mikroskopie verwendete Fluoreszenzfarbstoffe/Proteine	90
Abb. 27.	Lokalisation der Masken bei der Analyse mit dem ‚ <i>Molecular translocation assay</i> ‘.....	93
Abb. 28.	Schematische Darstellung der Berechnung des Z'-Faktors	94
Abb. 29.	Modell zur Regulation von Survivin in Tumorzellen	98
Abb. 30.	Expression des RevNES-Biosensors in unterschiedlichen Zelllinien.....	99
Abb. 31.	Sortierung von GFP-positiven A431 _{RevNES} -Zellen	100
Abb. 32.	Vergleich der Zellmorphologie nach den unterschiedlichen Fixierungsprozeduren.....	101
Abb. 33.	Signal des RevNES-Biosensors in PBS und DMEM/PFA.....	101
Abb. 34.	Aufnahmen der A431 _{RevNES} -Zellen mit dem ArrayScanVTI®	102
Abb. 35.	Differenz von nukleärer und zytoplasmatischer GFP-Intensität in Abhängigkeit von der Zelldichte.....	103
Abb. 36.	Vergleich verschiedener Parameter der Kontroll-wells einer Platte	104

Abb. 37.	Übersicht über die Stabilität des Assays im Verlauf der Hochdurchsatzanalyse	104
Abb. 38.	Beispiele autofluoreszenter und zytotoxischer Substanzen	105
Abb. 39.	Gruppierung der getesteten Substanzen in Abhängigkeit der ermittelten Werte für MeanRing und MeanCirc	106
Abb. 40.	Zytoplasmatische versus nukleäre Fluoreszenz des RevNES-Biosensors nach Inkubation mit den Substanzen aus dem <i>Rescreen</i>	107
Abb. 41.	Die <i>Hit</i> -Substanzen zeigen eine deutliche Erhöhung der MeanCirc-RingDifferenz im Vergleich zur Negativkontrolle	107
Abb. 42.	Die neuen Exportinhibitoren erwirken zu unterschiedlichen Effizienzen eine Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern	108
Abb. 43.	Sortierung von GFP-positiven HeLa-SurvivinNES-Biosensor-Zellen	109
Abb. 44.	Vortest der HeLa _{SurvNES} -Zellen auf dem ArrayScanVTI®	110
Abb. 45.	Kontrollen und Beispiel-Werte einer Platte der SurvivinNES-Hochdurchsatzanalyse	110
Abb. 46.	Auswertung des SurvivinNES-Rescreens nach fünf- und 24-stündiger Inkubation	111
Abb. 47.	Vergleich der RevNES- und SurvivinNES-Biosensoren	112
Abb. 48.	Lokalisation des RevNES-Biosensors an der Kernmembran	113
Abb. 49.	Integrität des RevNES-Biosensors nach Inkubation mit den Exportinhibitoren	114
Abb. 50.	Vergleich der Inhibitionskinetiken der neuen Exportinhibitoren	117
Abb. 51.	Exportinhibition des SurvivinNES-Biosensors	118
Abb. 52.	Die neuen Inhibitoren hemmen den Export von Survivin-GFP	118
Abb. 53.	Effekt der neuen Inhibitoren auf die Lokalisation von E1B-GFP	119
Abb. 54.	Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition	120
Abb. 55.	Exportinhibitoren sind auch in anderen den RevNES-Biosensor exprimierenden Zelllinien wirksam	121
Abb. 56.	C3 und C5 sind auch in murinen Zellen aktiv	122
Abb. 57.	Bestimmung des IC ₅₀ der Exportinhibitoren	123
Abb. 58.	Kurzzeiteffekte der Exportinhibitoren auf die Viabilität von HeLa-Zellen	124
Abb. 59.	Viabilität verschiedener Tumorzelllinien nach Inkubation mit C3 oder C5	124
Abb. 60.	Einfluss von C3 und C5 auf die Viabilität von Fibroblasten	125
Abb. 61.	Körpergewicht der Nacktmäuse nach intraperitonealer Injektion von C3 und C5	125
Abb. 62.	Detektion der Caspase 3- und PARP-Fragmente zum Nachweis der C3- und C5- vermittelten Apoptose	126
Abb. 63.	Einfluss der Inhibitoren auf die p53-Expression	127
Abb. 64.	Kombinationsbehandlung der Exportinhibitoren mit Imatinib	128
Abb. 65.	Viabilität nach Inkubation mit C3 oder C5 und radioaktiver Bestrahlung	129
Abb. 66.	Effekte von C3 und C5 auf den Zellzyklus	130
Abb. 67.	Vergleich der Verteilung der Zellzyklusphasen gemessen mit dem FACS Calibur oder dem ArrayScanVTI®	131
Abb. 68.	Die Lokalisation von Survivin-GFP in mitotischen Zellen wird durch C3 und C5 nicht beeinflusst	132

Abb. 69.	C3 und C5 verzögern den Export von in den Zellkern mikroinjiziertem GST-RevNES-GFP und GST-SurvivinNES-GFP	133
Abb. 70.	Pulldown von Crm1-HA oder Crm1 _{C528S} -HA mit Rev- oder SurvivinNES.....	134
Abb. 71.	Pulldown von Crm1-HA mit Rev-/oder SurvivinNES in unterschiedlichen Bindepuffern.	135
Abb. 72.	Aktivität der in wässriger Lösung vorinkubierten Exportinhibitoren.....	136
Abb. 73.	Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit präinkubiertem C3 oder C5.....	137
Abb. 74.	Stabilität der Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern nach Entnahme der Exportinhibitoren	138
Abb. 75.	Die Kolokalisation von Crm1-GFP und Rev-BFP wird durch Inkubation mit den Exportinhibitoren aufgehoben	140
Abb. 76.	Rev14-GFP akkumuliert nach Inkubation mit den Exportinhibitoren im Zellkern	141
Abb. 77.	Der Export von Rev-GFP wird nach Inkubation mit den Exportinhibitoren und ActD inhibiert.....	142
Abb. 78.	Effekt von C3 und C5 auf die RT-Aktivität und den viralen Titer von HIV-1.....	143
Abb. 79.	Effekte von C3 und C5 auf die Rev-abhängige Expression von p55 Gag und p24 CA ..	144
Abb. 80.	Die Expression von Crm1 ist nach Inkubation mit C3 und C5 unverändert	145
Abb. 81.	Zu C3 und C5 homologe Substanzen	146
Abb. 82.	Intrazelluläre Lokalisation von Survivin-GFP nach Inkubation mit C3, 24 und 28	147
Abb. 83.	C24 und C28 weisen einen zu C3 ähnlichen IC ₅₀ -Wert auf	148
Abb. 84.	Hochdurchsatzanalyse von Pilzextrakten hinsichtlich einer Export-inhibitorischen Wirkung	149
Abb. 85.	Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern nach Inkubation mit ausgewählten Pilzextrakten.....	150
Abb. 86.	Analyse der Fraktionen des <i>Cyphellopsis anomala</i> -Extrakts hinsichtlich einer Export-inhibitorischen Wirkung	150
Abb. 87.	Die Extrakt-Fractionen C12 und D12 inhibieren den Export des RevNES-Biosensors ..	151
Abb. 88.	Analyse der Subfraktionen der Fraktionen C12 und D12 hinsichtlich einer Export-inhibitorischen Wirkung	151
Abb. 89.	Die Subfraktionen D2 und D3 inhibieren den Export des RevNES-Biosensors.....	152
Abb. 90.	Kinetik der durch FR96001M vermittelten Exportinhibition	153
Abb. 91.	Eine Präinkubation von FR96001M in wässrigem Medium hatte keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität.....	153
Abb. 92.	Nach Entnahme von FR96001M aus dem Zellmedium wird die Inhibition des Exports schnell aufgehoben	154
Abb. 93.	FR96001M inhibiert den Export des SurvivinNES-Biosensors	155
Abb. 94.	Pulldown von Crm1-HA oder Crm1 _{C528S} -HA mit Rev- oder SurvivinNES mit FR96001M	156
Abb. 95.	Die Kolokalisation von Crm1-GFP und Rev-BFP wird durch Inkubation mit FR96001M aufgehoben	157
Abb. 96.	Induktion der Apoptose und Zytotoxizität von FR96001M.....	158
Abb. 97.	Ergebnisse des LIVE/DEAD®-Viability/Cytotoxicity-Assays nach Inkubation mit FR96001M	159

Abb. 98.	FR96001M ist auch in murinen Zellen aktiv	160
Abb. 99.	Unterschiedlich fluoreszierende Biosensoren	161
Abb. 100.	Expression zweier Biosensoren mit dem Vektor pBI.....	162
Abb. 101.	Sortierung der mit pBI-R _{Ch} S _{GFP} transfizierten HtTA-Zellen.....	164
Abb. 102.	Test der HtTA_R _{Ch} S _{GFP} -Zellen zur Verwendung in der Hochdurchsatzanalyse	165
Abb. 103.	Die bidirektionale Expression des GFP-RevNES-Biosensors und H2B-BFP ist positionsunabhängig	166
Abb. 104.	Lokalisation von DDX3 und den DDX3-Deletionsmutanten	168
Abb. 105.	Aminosäuresequenz des DDX3-Proteins	169
Abb. 106.	Endogenes DDX3 lokalisiert im Zytoplasma der Zelle und das DDX3-NES vermittelt einen schnellen Export aus dem Zellkern.....	170
Abb. 107.	Interaktion von DDX3-Mutanten mit HIV-1 Rev.....	171
Abb. 108.	Chiralitätszentren in C5.....	172

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.	Nicht-vesikuläre Protein-Transportsysteme der Zelle (Schnell <i>et al.</i> 2003).....	18
Tab. 2.	Übersicht über die Mitglieder der Karyopherin-Familie mit ihrer jeweiligen Transport-Fracht. Nach (Mingot <i>et al.</i> 2001; Fried <i>et al.</i> 2003; Mingot <i>et al.</i> 2004; Kutay <i>et al.</i> 2005; Pemberton <i>et al.</i> 2005).	27
Tab. 3.	Weitere Transport-Rezeptoren ohne Zugehörigkeit zur KAP-Familie	27
Tab. 4.	RNA-Fracht und spezifische Adapter-Proteine (Hutten <i>et al.</i> 2007)	29
Tab. 5.	Beispiele viraler und vertebraten NES im Vergleich zur Konsensussequenz	32
Tab. 6.	Regulationsmechanismen des nukleo-zytoplasmatischen Transports. Nach (Terry <i>et al.</i> 2007)	36
Tab. 7.	Proteine, deren intrazelluläre Lokalisation in Krebszellen im Vergleich zu Normalgewebe verändert sein kann. Verändert nach (Kau <i>et al.</i> 2004).....	43
Tab. 8.	Therapeutische Strategien gegen Survivin. Nach (Doolittle 2010).....	45
Tab. 9.	Geräte	59
Tab. 10.	Chemikalien	60
Tab. 11.	Verbrauchsmaterialien.....	61
Tab. 12.	Material Zellkultur	62
Tab. 13.	Puffer und Lösungen	62
Tab. 14.	Antikörper	63
Tab. 15.	Plasmide	68
Tab. 16.	Bakterienstämme und deren Genotypen.....	68
Tab. 17.	Oligonukleotide	69
Tab. 18.	Zelllinien.....	70
Tab. 19.	Programme	70
Tab. 20.	Programme <i>Real Time</i> -PCR.....	78
Tab. 21.	Zusammensetzung Sammel- und Trenngelpuffer	80
Tab. 22.	Konfiguration des FACS-Calibur	87
Tab. 23.	Richtlinien zur Interpretation des Z'-Faktors.....	94
Tab. 24.	Handhabungszeiten pro Platte während der Hochdurchsatzanalyse	103
Tab. 25.	<i>Hit</i> -Substanzen der RevNES-Hochdurchsatzanalyse	108
Tab. 26.	LC-MS-Analyse der Exportinhibitoren	115
Tab. 27.	Charakteristika der Exportinhibitoren nach ChemSpider	115
Tab. 28.	Strukturformeln und IUPAC-Namen der Exportinhibitoren.....	116

Abkürzungsverzeichnis

~	etwa
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
3D	dreidimensional
Abb	Abbildung
Abl	<i>Abelson murine leukemia</i>
ACA	1'S-1'-acetoxychavicol acetate
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
ALY	Synonym für THO Komplex 4
Amp	Ampicillin
APAF1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>aqua dest</i>	Aqua destillata
As	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>
BAK	<i>BH antagonist or killer</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCLXL	<i>BCL-extra large</i>
Bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BFP	<i>blue fluorescent protein</i>
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BIM	<i>BCL2-interacting mediator of cell death</i>
BIR	<i>baculoviral IAP repeat</i>
BIRC	<i>baculoviral IAP repeat containing</i>
bit	<i>binary digit</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw	beziehungsweise
CAS	<i>cellular apoptosis susceptibility</i>
CBC	<i>cap binding complex</i>
CBP	<i>cap binding protein</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CCR5	<i>CC-motiv-chemokin-rezeptor 5</i>
CD34	<i>CD34 molecule</i>
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>

Cdc	<i>cell division cycle</i>
Cdk	<i>cyclin dependent kinases</i>
Chl	Chloramphenicol
CML	<i>chronic myelogenous leukemia</i>
CMV	Cytomegalovirus
CP	<i>crossing point</i>
CPC	<i>chromosomal passenger complex</i>
Crm1	<i>chromosome region maintenance1</i>
CSC	<i>cancer stem cell</i>
CTE	C-terminales Element
CXCR4	<i>CXC-motiv-chemokinrezeptor 4</i>
Cys	Cystein
Cytc	Cytochrom c
d.h.	das heißt
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
Dbp5	Synonym für DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box <i>polypeptide 19B</i>
DDX3	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked</i>
dGTP	Deoxy-Guanosintriphosphat
DIABLO	<i>IAP-binding mitochondrial protein</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMPK	<i>drug-metabolism/pharmacokinetic</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxy-Nukleosidtriphosphat
Dox	Doxizyklin
DR5	<i>death receptor 5</i>
DRAQ5	<i>deep red flurorescing anthraquinone Nr. 5</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1B	virales Protein
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EBNA1	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
EJC	<i>exon junction complex</i>
Env	<i>envelope</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	et alii/aliae, und andere
EthD-1	Ethidium-Homodimer-1
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated DEATH domain protein</i>
FAS/CD95	<i>TNF receptor superfamily member</i>
FasL	<i>Fatty acid synthetase ligand</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>

FG	Phenylalanin-Glycin
FLIP	<i>FLICE inhibitory protein</i>
Fos	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FSC	<i>forward scatter channel</i>
g	Gramm
G	Gap
Gag	<i>group-specific antigen</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Gluthation S Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray, Einheit radioaktiver Strahlung
h	Stunde
H	Wasserstoffatom
H2B	Histon 2B
H ₂ O	Wasser
HCS	<i>high content screening</i>
HCV	HepatitisC-Virus
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
HDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hnRNP	heterogenes nukleäres RNP
hPa	Hektopascal
HTS	<i>high throughput screening</i>
hUbc8	<i>human ubiquitinating conjugating enzyme 9</i>
HuR	<i>human antigen R</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IBB	<i>Importin-β binding</i>
IκB	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B</i>
INCENP	<i>inner centromere protein antigens 135/155kDa</i>
INI1	<i>Integrase interactor 1</i>
INM	<i>inner nuclear membrane</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JAZ	<i>just another zinc finger protein</i>
k	tausend
Kan	Kanamycin
Kaps	Mitglieder der Karyopherin-Familie
kDa	Kilodalton
KNS	<i>hnRNP K nuclear shuttling</i>
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth/Luria Bertani</i>
LBD	<i>ligand-binding domain</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>

LEF1	<i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LMA	Leptomycin A
LMB	Leptomycin B
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	<i>mitose</i>
MAPKAP	<i>mitogen-activated protein kinase associated protein</i>
MAPKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mCh	<i>mCherry</i>
MCL1	<i>myeloid leukaemia cell differentiation 1</i>
MDa	Megadalton
MDM2	<i>mouse double minute 2</i>
mg	Milligramm
MGN	<i>magi-nashi homolog B</i>
min	Minute
miRNA	mikro RNA
MK2	MAPK-aktivierte Protein Kinase 2
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Magermilchpulver
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTS	<i>mitochondrial targeting signal</i>
NE	Nukleärer Envelope
NEAA	<i>non essential aminoacids</i>
Nef	<i>negative-regulation factor</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
Nf- κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMD3	<i>NMD3 homolog (S. cerevisiae)</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
NTF2	nukleärer Transport-Faktor 2
Nups	Nukleoporeine
NXF	<i>nuclear RNA export factor</i>
OD	Optische Dichte
ONM	<i>outer nuclear membrane</i>
p27	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
p50RhoGAP	<i>Rho GTPase activating protein 1</i>
p53	Tumorsuppressor p53
Pap1	<i>PDGFA associated protein 1</i>
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
Pax	<i>paired box</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCK1	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
Pex	<i>peroxisomal biogenesis factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i> , negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PHAX	<i>phosphorylated adaptor for RNA export</i>
pol	Polymerase
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTS	Peroxisomales <i>targeting</i> Signal
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i>
RanBP3	Ran Binde Protein 3
RanGEF	<i>Ran guanine nucleotide exchange factor</i>
RAT	Ratjadon
RBM8	<i>RNA-binding motif protein 8</i>
RCC1	<i>regulator of chromosome condensation 1</i>
Rev	<i>regulator of viral Expression</i>
Rex	<i>post-transcriptional regulator</i>
RIPA	<i>Radio Immuno Precipitation Assay</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpL12	ribosomales Protein L12
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro minute
RRE	<i>Rev response element</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTC	<i>reverse transcription complex</i>
rtTA	reverser Tetrazyklin-Transaktivator
S	Synthese
s	Sekunde
s.	siehe
SAR	<i>structure-activity-relationships</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SecA	Bestandteil der bakteriellen SecYEG-Translokase
Smac	<i>second mitochondrial activator of caspase</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear RNP</i>
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOE	<i>splice overlap extension</i>
SR	Serin Arginin
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SSC	<i>side scatter channel</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab	Tabelle

TAP	Transporter 1
tat	<i>trans-activator of transcription</i>
TBJap	<i>transformation buffer japanese</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tim	<i>translocase of inner mitochondrial membrane</i>
TNFR1	<i>TNF Rezeptor 1</i>
Tom	<i>translocase of outer mitochondrial membrane</i>
TRADD	<i>TNFR1-associated DEATH domain protein</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRE	Tetrazyklin-responsives Element
TREX	<i>transcription export complex</i>
tRNA	Transfer-RNA
tTA	Tetrazyklin-Transaktivator
U snRNA	<i>U-rich snRNA</i>
u.a.	unter anderem
UbcM2	<i>ubiquitin conjugating enzyme M2</i>
UV	ultra-violett
vif	<i>viral infectivity</i>
Vol	Volumen
vpr	virales Protein R
vpu	virales Protein U
X-Gal	5-Brom-4-chlorindol-3-yl-beta-D-galactopyranosid
XIAP	<i>X-chromosome linked IAP</i>
z.B.	zum Beispiel
Δ	delta
λ_{em}	Emissionswellenlänge (<i>emission</i>)
λ_{ex}	Anregungswellenlänge (<i>excitation</i>)

1 Einleitung

Im Verlauf der Evolution traten vor etwa 2,7 Milliarden Jahren die ersten eukaryotischen Zellen auf (Cooper 2000). Nach heutigem Stand der Endosymbiontentheorie sind die Eukaryoten durch die Symbiose verschiedener prokaryotischer Zellen entstanden (Sagan 1967). Die hierdurch erlangte Kompartimentierung in die verschiedenen Zellorganellen wie Zellkern, Mitochondrien, ER, Golgi, Lysosomen und Peroxysomen und der somit höhere Organisationsgrad schuf die Grundlage für die Entwicklung mehrzelliger Lebewesen. Im Gegensatz zu Prokaryoten ist das genetische Material eukaryotischer Zellen im Kompartiment des Zellkerns vom Zytoplasma separiert. Diese höhere Komplexität bringt aber auch einen höheren Aufwand der Regulation mit sich, da die Umsetzung der genetischen Information und die Reaktion auf äußere Einflüsse einen regen Austausch über die Kernmembran verlangt. Dabei unterliegt der Transport einer stringenten Regulation, wodurch vielfältige Ansatzpunkte zur Modulation durch Fremdstoffe gegeben sind. Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnten die molekularen Grundlagen dieses Transportprozesses noch immer nicht vollkommen entschlüsselt werden. Neben unterschiedlichen molekularbiologischen Analysemethoden kann auch die Entdeckung von Hemmstoffen unterschiedlicher Transportfaktoren zu einem besseren mechanistischen Verständnis beitragen. Neben einer derartigen Verwendung als molekulare Werkzeuge wäre zudem im Fall von Krankheitsbildern, welchen eine Störung bestimmter Transportvorgänge zugrunde liegt, eine Weiterentwicklung dieser Substanzen zu therapeutischen Zwecken denkbar.

1.1 Zelluläre Transportprozesse

Eukaryotische Zellen sind durch Zellmembranen, bestehend aus einer Lipid(doppel)schicht, in unterschiedliche Reaktionskompartimente unterteilt. Diese Kompartimentierung war die Grundlage für die Höherentwicklung der Eukaryoten und ermöglicht den gleichzeitigen Ablauf komplexer zellulärer Reaktionen, die unterschiedliche physiologische Bedingungen (pH) benötigen oder deren zytotoxische Intermediate gesondert gespeichert werden müssen. In den Mitochondrien wird die Kompartimentmembran zur Bildung eines elektrochemischen Gradienten genutzt, um so ATP herzustellen (Cooper 2000). Die Membranen stellen eine selektive Barriere zwischen den wässrigen Kompartimenten dar, und jedes Organell besitzt spezielle Mechanismen für den Austausch von Makromolekülen mit dem Zytoplasma (Suntharalingam *et al.* 2003). Obwohl die Transportsysteme der Kompartimente grundverschieden sind, kann man sie mit der Signal-Hypothese von Blobel (Blobel *et al.* 1975) grundsätzlich zusammenfassend beschreiben. Nach dieser enthalten Proteine Organell-spezifische Signalsequenzen, die von selektiven Rezeptoren erkannt werden. Diese Rezeptoren sind Teil von oligomeren Translokons, die den Protein-Transport über die jeweilige Membran vermitteln (Walter *et al.* 1986; Schnell *et al.* 2003). Eine Übersicht über die Transportsysteme der eukaryotischen Zelle gibt Tabelle 1.

Tab. 1. Nicht-vesikuläre Protein-Transportsysteme der Zelle (Schnell *et al.* 2003)

Translokon	Organell	Treibende Kraft	Signal	Transport-Fracht
Tom/Tim (23/22)	Mitochondrien (äußere/innere Membran)	ATP, H ⁺	N-terminale Präsequenz/ <i>mitochondrial targeting signal</i> (MTS)/Multiple interne Signale	Tom: ungefaltete Proteine mit leichter Sekundärstruktur Tim: Matrixproteine, Proteine der inneren Membran
PEX System	Peroxisom	ATP	<i>peroxysomal targeting signal</i> (PTS)	Proteine
Sec61 System	ER	ATP (SecA), GTP (SRP), Membranpotential	N-terminale/ Interne Signalsequenzen	Proteine
Exportine/ TAP-NXF/ Importine mit Kernporen	Nukleus	GTP	Nukleäres Lokalisations-Signal (NLS)/Nukleäres Export-Signal (NES)	Proteine, RNA

1.2 Transport über die Kernmembran

Der Zellkern ist durch die Kernmembran, auch als nukleärer Envelope (NE) bezeichnet, vom Zytoplasma getrennt. Stoffaustausch kann nur durch die darin eingebetteten nukleären Kernporen (*nuclear pore complex*, NPC) erfolgen. Der NE besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran, wobei die äußere in das ER übergeht und mit Ribosomen besetzt ist. Beide Membranen gehen an den Kernporen ineinander über. Zwischen den Membranen befindet sich der perinukleäre Raum, der mit dem Lumen des rauhen ERs in Verbindung steht (s. Abb.1). Die innere Membran ist mit der nukleären Lamina verbunden, einem Verbund aus Lamin-Polymeren und Lamin-Bindeproteinen, an der die Chromosomen während der Interphase verankert sind (Cooper 2000; Gruenbaum *et al.* 2005).

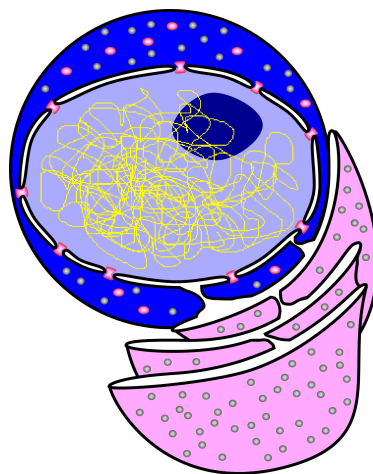


Abb. 1. Schematische Darstellung des Zellkerns mit Übergang in das ER

Der Zellkern (blau) ist durch den NE vom Zytoplasma separiert. Gebildet wird der NE aus zwei unterschiedlichen Membranen, wobei die äußere in das ER übergeht und mit Ribosomen (grau) besetzt ist. Einziger Transportweg in den Nukleus sind die nukleären Kernporen (pink). Im Nukleus ist schematisch die genomische Interphase-DNA (gelb) sowie der Nukleolus (dunkelblau) dargestellt. Der perinukleäre Raum geht in das Lumen des ER (weiß) über.

Die NPCs sind die einzige Verbindung zwischen dem genetischen Material im Zellkern und dem Protein-Syntheseapparat im Zytoplasma. Alle reifen mRNAs werden über diese exportiert, und alle Gen-regulatorischen Proteine werden durch sie transportiert. Import und Export sind aktiv gesteuerte Prozesse, allerdings können anorganische Moleküle und Metabolite aufgrund ihrer geringen Größe die Kernporen passiv durch Diffusion durchqueren (Peters 2009). Ein Beispiel für Transport über die Kernmembran mit biologischer sowie klinischer Relevanz ist mit den nukleären Rezeptoren in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren gegeben (Stauber *et al.* 2011). Nach Ligandenbindung wird deren Translokation in den Zellkern induziert, wo sie genetische Programme aktivieren können. Eine Beeinflussung der nukleären Rezeptoren durch chemische Inhibitoren kann somit die Expression deren Zielgene manipulieren (s. Abb.2).

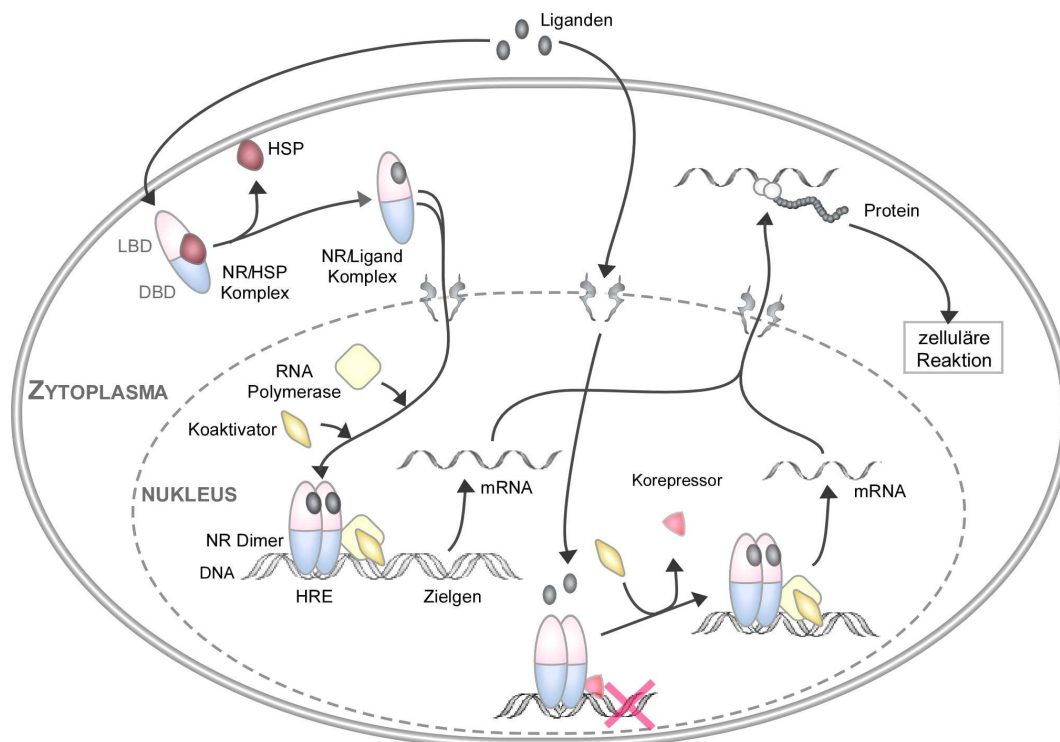


Abb. 2. Nach Aktivierung werden nukleäre Rezeptoren in den Zellkern importiert

Das Modell veranschaulicht die beiden Haupt-Wege der Aktivierung von nukleären Rezeptoren (NR). Liganden diffundieren durch die Zellmembran und binden an zytoplasmatisch oder nukleär vorliegende NR. Ligandenbindung an zytoplasmatische NR induziert Konformationsänderungen, die zur Dissoziation von den *heat shock* Proteinen (HSP) führt und somit die Rezeptordimerisierung ermöglicht. Die aktiven Rezeptordimere werden in den Zellkern importiert und binden an die Hormon-responsiven Elemente (HRE) ihrer Ziel-Promotoren. Andere NR liegen konstitutiv im Zellkern vor und sind durch Komplexierung mit Korepressoren inaktiviert. Nach Ligandenbindung erfolgt wiederum eine Konformationsänderung, die zur Rekrutierung von Koaktivatoren und schließlich zur Aktivierung der Transkription der Zielgene führt. LBD- *ligand-binding domain*, DBD- *DNA-binding domain*. Entnommen aus (Stauber *et al.* 2011).

1.3 Struktur und Zusammensetzung der Kernporen

Kernporen sind makromolekulare Komplexe mit einem Molekulargewicht von ~60-125MDa (Cronshaw *et al.* 2002). Ihr Durchmesser beträgt ~125nm, und ihre Höhe ~70nm. Im Inneren befindet sich ein zentraler Kanal, durch den der Stoffaustausch erfolgt (Vasu *et al.* 2001; Suntharalingam *et al.* 2003). Dieser stellt für Moleküle größer als 40kDa eine selektive Barriere dar (Weis 2003; Rabut *et al.* 2004). Der maximale Durchmesser eines zu transportierenden Moleküls kann 39nm betragen (Pante *et al.* 2002). Pro Sekunde können 1000 Translokationen durch eine Kernpore stattfinden, woraus eine Transportkapazität von ~100MDa pro Sekunde resultiert (D'Angelo *et al.* 2008).

NPCs sind aus zwei funktionellen Einheiten aufgebaut: die zentrale Struktur in der Ebene des NE, und die peripheren Strukturen, welche in das Nukleoplasma oder das Zytoplasma hineinragen (s. Abb.3). Die Einheiten werden von den Nukleoporinen (Nups) gebildet, einer Proteinfamilie mit ~30 bekannten Mitgliedern (Rout *et al.* 2000; Cronshaw *et al.* 2002).

Kernporen zeigen eine achtfache Symmetrie, entsprechend liegt jedes Nup achtfach vor (D'Angelo *et al.* 2008).

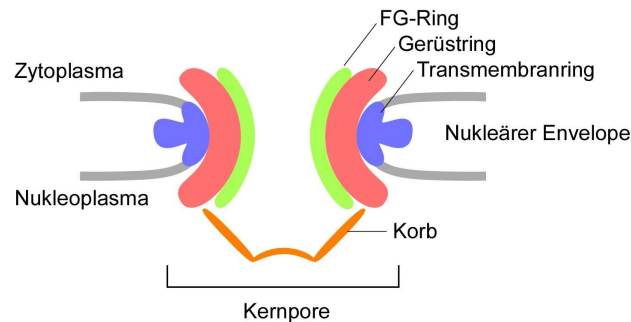


Abb. 3. Schematischer Aufbau der Kernpore

Die Kernporen sind aus drei Ringen, bestehend aus Nup-Proteinen, aufgebaut, welche sich um den zentralen Kanal gruppieren. Der zentrale Kanal ist umgeben von dem FG-Ring, gefolgt von dem Gerüstring. Der Transmembranring verankert die Kernpore in der Kernmembran. Der Korb ragt in das Nukleoplasma hinein (Peters 2009).

Aufgrund ihrer Lokalisation in der Kernpore können Nup-Proteine in vier Klassen eingeteilt werden (s. Abb.4). Diese sind Transmembran- (Transmembranring), Kerngerüst- (innerer und äußerer Ring), Linker- und FG-Nups (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010). Dabei weisen die Nups des Transmembranrings eine Cadherin-ähnliche Faltung und transmembranhelikale Struktur, die Nups des Gerüstrings eine β -Propeller- und/oder α -Solenoid-Struktur und die Nups des FG-Rings coiled-coil-Motive, RNA-Binde-Motive und FG-Wiederholungen auf (Peters 2009). FG-Domänen sind weitestgehend ungefaltet und für die Interaktion mit den Transportrezeptoren verantwortlich (D'Angelo *et al.* 2008).

Auf der nukleären Seite der Kernpore befindet sich der nukleäre Korb, über den eine Anbindung des Transports an die mRNA-Biogenese und die Genom-Instandhaltungs-Prozesse gewährleistet ist. Die gegenüberliegende Seite der Kernpore trägt in das Zytoplasma ragende Filamente, die Export-Fracht zum Protein-Syntheseapparat leiten und als Ansatzstelle für den Import dienen (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010).

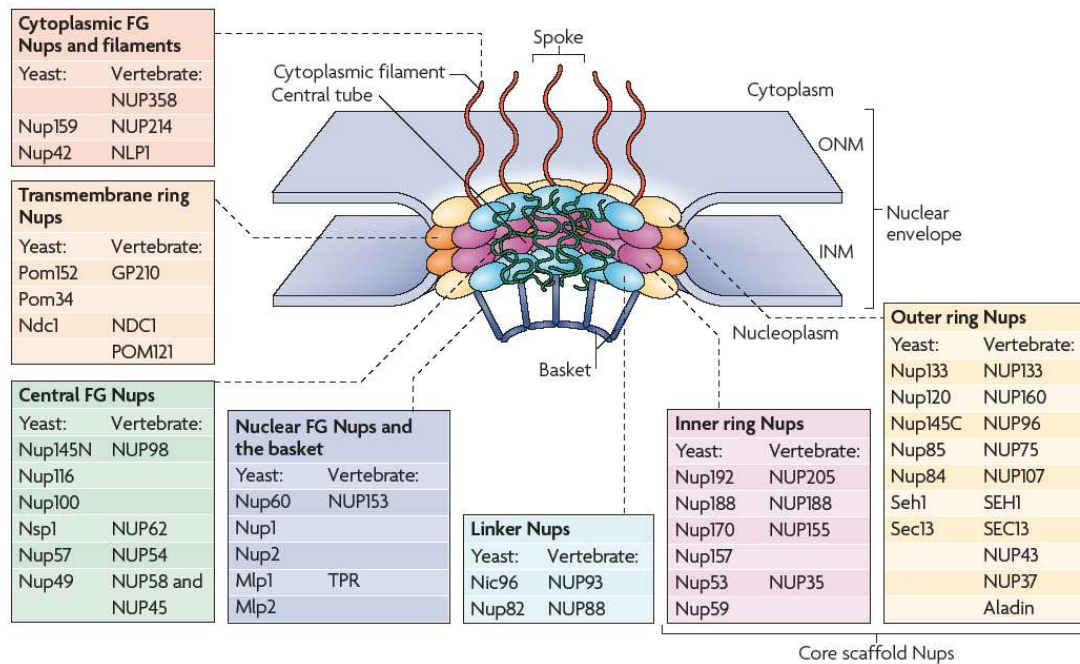


Abb. 4. Schematischer Aufbau der Kernpore und Lokalisation der Nups

Kernporen sind der einzige Transportweg durch den NE, welcher aus der äußeren (ONM, *outer nuclear membrane*) und der inneren (INM, *inner nuclear membrane*) nukleären Membran besteht. Die Kernporen sind aus Proteinen der Nucleoporin-Familie (Nup) zusammengesetzt. Die Abbildung verdeutlicht die Lokalisation der verschiedenen Nups in den unterschiedlichen Strukturen des NPC. Entnommen aus (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010).

Die Kernporen müssen nach der Mitose und während der Interphase, in Vorbereitung auf die nächste Zellteilung, neu assembliert werden. Nach der Mitose werden sie dabei aus verbliebenen Subkomplexen wiederaufgebaut. Wie die korrekte Struktur der Kernporen in der Interphase aufrechterhalten wird, ist bislang nicht bekannt (D'Angelo *et al.* 2008). Die Gerüstproteine (Nup107/160) sind sehr stabil, und in nicht mehr teilungsaktiven Zellen konnte ein Alters-abhängiger Verlust der Größenselektivität nachgewiesen werden (D'Angelo *et al.* 2009). Mittels FRET-Messungen wurde die Verbleibzeit verschiedener Nups an der Kernpore in Abhängigkeit von Funktion und Lage des Nups als nur wenige Sekunden bis über 70 Stunden dauernd gemessen (D'Angelo *et al.* 2008).

1.3.1 Nukleo-zytoplasmatischer Transportzyklus

Transport erfolgt mit Hilfe löslicher Transportfaktoren (Transportrezeptoren), die auch entgegen einem Konzentrationsgradienten zwischen Zellkern und Zytoplasma wandern (Bednenko *et al.* 2003). Manche Moleküle, die aufgrund ihrer Größe frei in den Zellkern diffundieren könnten, werden oftmals aktiv und selektiv transportiert. Für Proteine mit einem Molekulargewicht oberhalb von 40kDa ist der aktive Transport essentiell für den Durchtritt durch die Kernporen. Der Transport der meisten Proteine und einiger RNAs (tRNA, U snRNA, miRNA, rRNA, wenige mRNAs) wird durch Proteine der Karyopherin-Familie vermittelt. Nukleärer Export von mRNA hingegen wird durch TAP/NXF1 und RNA-

gebundene Adapter-Proteine vermittelt (Cullen 2003; Hutten *et al.* 2007). Die 20 Mitglieder der Karyopherine gehören zur Superfamilie der Importin- β -verwandten Proteine (Mosammaparast *et al.* 2004) und stehen einer vielfachen Menge zu transportierender Moleküle gegenüber. Karyopherine werden in Abhängigkeit von der von ihnen vermittelten Transportrichtung auch als Importine oder Exportine bezeichnet. Allen ist gemein, dass sie direkt mit dem zu transportierenden Molekül interagieren, obwohl oftmals zusätzliche Adapterproteine genutzt werden. Die meisten Rezeptoren binden und transportieren eine oder wenige strukturell verwandte Moleküle. Im Gegensatz dazu stehen der Importin- α/β Import-Rezeptor und Crm1 (*Chromosome region maintenance*)/Exportin1 Export-Rezeptor, die beide viele verschiedene Proteine und Ribonukleoproteine in Abhängigkeit von einer auf den Proteinen vorliegenden Erkennungssequenz transportieren (Gorlich *et al.* 1999). Importine binden an nukleäre Lokalisations-Signale (NLS, positiv geladene Aminosäuren), Exportine an nukleäre Export-Signale (NES, Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten) (Nigg 1997). Die Transport-Komplexe gelangen durch transiente und schwache Wechselwirkungen des Transport-Rezeptors mit den FG-Wiederholungen einiger Nukleoporine durch die Kernpore (Pemberton *et al.* 2005). Die treibende Kraft des aktiven nukleären Transports ist der RanGTP-Gradient (Ran-ras-related nuclear protein) zwischen Nukleus und Zytoplasma. Dabei liegt im Zytoplasma RanGDP und im Zellkern RanGTP angereichert vor. Diese ungleiche Verteilung entsteht durch das RanGTPase-aktivierende Protein1 (RanGAP) an der zytoplasmatischen Seite des NPC und den chromatingebundenen *Ran guanine nucleotide exchange factor* (RanGEF/RCC1 -*regulator of chromosome condensation 1*) im Nukleus. Exportine binden kooperativ RanGTP sowie die zu transportierenden Proteine im Zellkern. Im Zytoplasma wird RanGTP durch RanGAP zu RanGDP unter gleichzeitiger Freisetzung der Transportfracht hydrolisiert. RanGDP wird durch den nukleären Transport-Faktor 2 (NTF2) in den Zellkern reimportiert und dort durch RanGEF wieder zu RanGTP konvertiert. Die Bindung von RanGTP an Importine führt zur Freisetzung der Transportfracht im Nukleus (s. Abb.5). Importine werden durch den für sie spezifischen *cellular apoptosis susceptibility* (CAS)-Export-Rezeptor zurück in das Zytoplasma transportiert (Gorlich *et al.* 1999; Pemberton *et al.* 2005; Koyama *et al.* 2010).

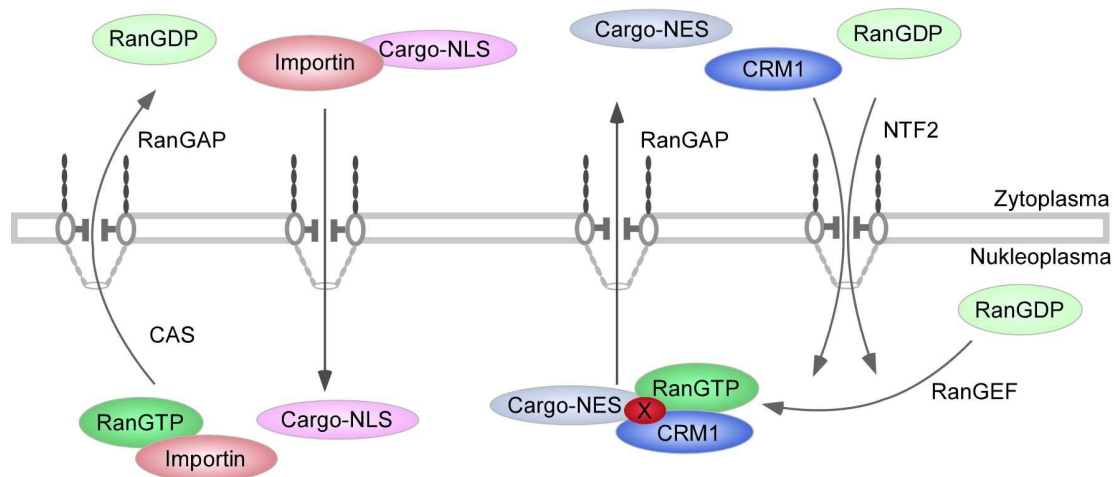


Abb. 5. Nukleo-zytoplasmatischer Transport-Zyklus über Importine und Exportine

NLS-tragende Proteine werden durch den Importin- α/β Import-Rezeptor in den Zellkern transportiert. Der Importin-NLS-Protein-Komplex dissoziiert nach Bindung von RanGTP. Der Export-Rezeptor CAS transportiert das Importin zurück in das Zytoplasma. Die durch RanGAP getriebene Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP führt zur Freisetzung des Importins von CAS. NES-tragende Proteine binden in Abhängigkeit von RanGTP an den Export-Rezeptor Crm1 und werden durch die Kernporen in das Zytoplasma transportiert. Die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP treibt dabei wiederum die Auflösung dieses Transportkomplexes an. Crm1 gelangt durch seine Interaktion mit den Nukleoporinen zurück in den Zellkern. RanGDP wird durch NTF2 zurück in den Nukleus transportiert und durch RanGEF zu RanGTP konvertiert. Möglicherweise sind weitere NES-spezifische Kofaktoren am Prozess des nukleären Exports beteiligt. Entnommen aus (Fetz *et al.* 2009).

1.3.2 Mechanismus der Kernporen-Passage

Im zentralen Kanal der Kernpore sind verschiedene, meist ungefaltete FG-Nups anzutreffen, die durch Regionen mit multiplen Wiederholungen der Aminosäuren Phenylalanin und Glycin (FG) zu ihrem Namen kommen. Diese bis zu 50 FG-Wiederholungen sind durch hydrophile Aminosäuresequenzen voneinander getrennt (Denning *et al.* 2007). Die vielen FG-Nups im zentralen Kanal bieten eine kontinuierliche Interaktionsfläche für Transportkomplexe, die durch die Kernpore wandern. Der genaue Mechanismus des Transports durch die Kernporen ist noch immer nicht eindeutig aufgeklärt. Mittlerweile besteht jedoch ein genereller Konsens darin, dass die FG-Nups den Eintritt nicht-spezifischer Proteine unterbinden und den Transport spezifischer Proteine durch die Kernpore vermitteln (Strambio-De-Castillia *et al.* 2010). Kern der Debatte ist die Frage, ob die Permeabilitätsbarriere energetischer oder physikalischer Natur ist. Die prominentesten Modelle des Mechanismus der Kernporen-Passage sind in D'Angelo und Hetzer *et al.* und Peters *et al.* (D'Angelo *et al.* 2008; Peters 2009) zusammengefasst.

Das Virtual Gate-Modell geht davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Molekül den Entropieverlust überwindet und in einen begrenzten nicht-bindende Nukleoporine enthaltenen Raum eintritt, abnimmt, je größer das Molekül ist. Transportrezeptoren übergehen den Entropieverlust durch die Bindung an die FG-Wiederholungen. Dieses Modell

geht also von einer energetischen Barriere aus, die die Kernporen-Durchlässigkeit kontrolliert.

Bei dem Brownian Affinity Gating-Modell wird vorgeschlagen, dass die filamentösen FG-Nups durch thermische Bewegung nicht-bindende Proteine vom Eintritt in den zentralen Kanal abhalten. Für FG-Sequenzen bindende Moleküle steigt somit die Wahrscheinlichkeit, in den zentralen Kanal zu gelangen. Voraussetzung ist eine nicht zu starke Bindung, welche dementsprechend schnell reversibel ist.

Das Selective Phase-Modell geht davon aus, dass das Lumen des zentralen Kanals einen sogenannten *central plug* enthält, ein aus FG-Nups gebildetes Netzwerk. In diesem haben Transport-Rezeptoren eine höhere Löslichkeit und können abhängig davon schneller durch den zentralen Kanal diffundieren. Das Netzwerk der FG-Nups, gebildet aus hydrophoben Interaktionen, funktioniert somit als molekulares Sieb und verhindert das Eindringen zytoplasmatischer Proteine. Transportrezeptoren können durch Interaktion mit den FG-Nups deren schwache hydrophobe Wechselwirkung auflösen und so die Permeabilitätsbarriere durchlässig machen (D'Angelo *et al.* 2008). Eine Erweiterung des *Selective Phase-Modells* ist das Hydrogel-Modell, bei dem von einem dreidimensionalen Netzwerk der FG-Wiederholungen, basierend auf deren hydrophober Interaktion, ausgegangen wird. Dieses sogenannte Hydrogel unterbindet den Durchtritt von Makromolekülen, deren Größe die vorliegende ‚Maschenweite‘ übersteigt. Liegt die Größe eines Transport-Komplexes ebenfalls oberhalb dieser Grenze, so müssen die Maschen für den Durchtritt kurzzeitig aufbrechen. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass FG-Nups Hydrogele ausbilden, die selektiv den Influx von Transport-Faktoren erlauben (Frey *et al.* 2009).

Das Reversible FG domain collapse-Modell geht von einer Bürsten-ähnlichen Struktur der FG-Domänen aus, die in den Bereich um die Kernpore ‚ausstrahlen‘. Dieser Bereich bildet eine entropische Barriere für nicht-bindende Moleküle. Bei Bindung eines Transport-Rezeptors kommt es zum Kollaps der beteiligten FG-Domänen, wobei der Transport-Rezeptor in den zentralen Kanal gezogen wird. Darin bewegt sich dieser durch wiederholtes Herstellen und Auflösen von Bindungen fort, bis er das andere Kompartiment erreicht.

Bei dem Reduction of dimensionality-Modell wird angenommen, dass die FG-Domänen eine zusammenhängende Schicht auf der Oberfläche des zentralen Kanals und auf den Filamenten bilden. Dieses Netzwerk aus flexiblen, hydrophilen Peptidketten lässt einen 10nm Spalt frei, durch den Moleküle, die klein genug sind, hindurch diffundieren können. Transport-Rezeptoren binden an die FG-Domänen auf den Filamenten oder dem Anfang des Kanals. Diese Bindung besteht aus vielen hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den FG-Domänen und Bindestellen auf den Rezeptoren und führt zu einer stabilen Bindung mit einer zugleich hohen Mobilität auf der FG-Domänen-Schicht. Die Rezeptoren können sich dann auf der FG-Oberfläche durch einen zweidimensionalen Gang bewegen. Gelangen sie

an ein Ende des zentralen Kanals, so treffen sie entweder eine hohe Konzentration an RanGTP (Nukleus) oder RanBP und RanGAP (Zytoplasma) an, die wiederum eine Freisetzung der Transportkomplexe von der FG-Schicht erwirken.

Das Spaghetti Oil-Modell geht davon aus, dass die Kernpore mit den langen FG-Wiederholungen gefüllt ist. Diese sind in ständiger Bewegung und können von den Transportrezeptoren in eine Richtung gezogen werden. Die Rezeptoren wandern entlang der flexiblen FG-, 'Spaghetti', was über schwache Wechselwirkungen durch ständiges Binden und Lösen vermittelt wird. Dieser kontinuierliche Zyklus bewirkt eine unterstützte Diffusion, durch die der Rezeptor die Kernpore passieren kann.

1.3.3 Karyopherin-Familie der Transport-Rezeptoren

Die Mitglieder der Karyopherin-Familie (Kaps, s. Tab.2) zeichnen sich aus, dass sie die RanGTPase (über ihren C-terminus), FG-Nups und spezifische Transport-Proteine mit oder ohne Hilfe von Adapterproteinen binden können (Madrid *et al.* 2006). Typischerweise enthalten diese Proteine mehrere tandemartig angeordnete HEAT-repeats, die jeweils zwei antiparallele Helices ausbilden. Sie verfügen über einen sauren isoelektrischen Punkt und haben ein Molekulargewicht von 90-145kDa (Fried *et al.* 2003). In Säugetieren werden Karyopherine in Abhängigkeit von der vermittelten Transportrichtung als Importine oder Exportine bezeichnet. Die Affinität der Transportrezeptoren wird durch ihre Liganden moduliert. So verstärkt zum Beispiel die Bindung eines NLS-tragenden Proteins die Bindeaffinität des Importins an FG-Wiederholungen, wohingegen die Bindung von RanGTP diese Affinität stark reduziert (Peters 2009).

Tab. 2. Übersicht über die Mitglieder der Karyopherin-Familie mit ihrer jeweiligen Transport-Fracht. Nach (Mingot *et al.* 2001; Fried *et al.* 2003; Mingot *et al.* 2004; Kutay *et al.* 2005; Pemberton *et al.* 2005).

Exportin	Transport-Fracht
Crm1	Proteine mit NES, Snurportin1
CAS	Importin- α
Exportin-t	tRNAs
Exportin 4	eIF5A
Exportin 5	pre miRNAs, tRNAs, minihelix RNAs eEF1A, JAZ
Exportin 6	Profilin Actin
Exportin 7	p50RhoGAP, 14-3-3 sigma, eIF4A1, Vps35/26/29
Importin 13	eIF1A
Importin	Transport-Fracht
Importin- β 1	Proteine mit basischem NLS über Karyopherin α , UsnRNPs über Snurportin1
Karyopherin- β 2	hnRNPA1, Histone, Ribosomale Proteine
Transportin SR1	SR Proteine
Transportin SR2	HuR, SR Proteine mit phosphorylierten RS Domänen
Importin 4	Histone, Ribosomale Proteine
Importin 5	Histone, Ribosomale Proteine
Importin 9	Histone, Ribosomale Proteine
Importin 7	HIV RTC, Glukokortikoid Rezeptor, Ribosomale Proteine
Importin 8	SRP19
Importin 11	UbcM2, rpL12
Importin 13	hUbc9, RBM8 – MGN Komplex, Pax6, Y14, eIF1A
Nicht charakterisiert	Transport-Fracht
RanBP6	?
RanBP16	?
RanBP17	?
RanBP20	?

Es existieren wenige bekannte Transport-Rezeptoren, die nicht zur Karyopherin-Familie gehören (s. Tab.3). Diese vermitteln die Kernporenpassage ebenfalls durch Interaktion mit den FG-Nups (Holaska *et al.* 2001; Bayliss *et al.* 2002). β -Catenin beispielsweise vermittelt seinen Import in den Zellkern selbstständig durch direkte Interaktion mit den FG-Nups (Fagotto *et al.* 1998).

Tab. 3. Weitere Transport-Rezeptoren ohne Zugehörigkeit zur KAP-Familie

Rezeptor	Transport-Fracht
NTF2	RanGDP
Calreticulin	Glukokortikoidrezeptor
β -Catenin	β -Catenin

Adapterproteine können die Bindung eines zu transportierenden Proteins an einen Transport-Rezeptor vermitteln. Snurportin1 fungiert z.B. als ein Adapterprotein für Importin- β , indem es die tri-methylierte Cap-Struktur von U-rich small nuclear RNAs (U snRNAs) bindet. Für die meisten Import-Substrate mit einem klassischen NLS dient Importin- α als Adapter zur Bindung an Importin- β (Fried *et al.* 2003). Ein viraler Export-Adapter ist das HIV-1 Rev-

Protein, über das ungespleißte oder einfach gespleißte virale mRNA an Crm1 gebunden und ins Zytoplasma exportiert wird (siehe 1.8).

1.3.4 Nukleärer Export-Rezeptor Crm1

Der Export-Rezeptor Crm1 (*chromosome region maintenance*, 123kDa) gehört zur Familie der Importin- β -verwandten Transport-Rezeptoren. Identifiziert wurde Crm1 in *Schizosaccharomyces pombe* als ein in die Aufrechterhaltung der Chromosomen-Struktur involviertes Gen (Adachi *et al.* 1989). Das 1071 Aminosäuren lange Crm1-Protein besteht aus 21 antiparallel angeordneten *heat-repeats*. In der Gesamtstruktur gleicht Crm1 einem verdrehten ringförmigen Körper, in dessen Zentrum RanGTP gebunden und so die Ringschließung durch vier Kontakte mit Crm1 stabilisiert wird (s. Abb.6). Eine Bindung von RanGDP ist aufgrund sterischer Konflikte nicht möglich (Monecke *et al.* 2009). Zu transportierende Proteine werden an der Außenseite gebunden, wodurch auch der Transport der größeren ribosomalen Untereinheiten möglich ist (Petosa *et al.* 2004; Dong *et al.* 2009; Monecke *et al.* 2009; Guttler *et al.* 2010). Es wird vermutet, dass Crm1 im Zytoplasma in einer relaxierten und im Kern in einer gespannten Konformation vorliegt. Dabei hat die zytoplasmatische Konformation nur eine geringe Affinität zu RanGTP und der Transportfracht. Im Kern wird die gespannte Konformation durch Bindung von RanGTP oder der Transportfracht stabilisiert und erlaubt eine höher affine Bindung des jeweils anderen Liganden (Monecke *et al.* 2009).

Bisher wurde aufgrund von Mutationsanalysen vermutet, dass die hydrophobe Spalte von Crm1 als generelle Bindestelle für Exportsignale fungiert (Dong *et al.* 2009) und sich hier zudem auch die Angriffsstelle des generellen Crm1-Inhibitors Leptomycin B (LMB) befindet (Koyama *et al.* 2010). Guttler *et al.* konnten in der Tat zeigen, dass diese Annahme zutrifft, wobei insgesamt fünf Φ -Bindestellen zur Verfügung stehen. Im gespannten Zustand weist die hydrophobe Spalte eine starre Konformation auf, der sich die unterschiedlichen NES anpassen müssen (Guttler *et al.* 2010).

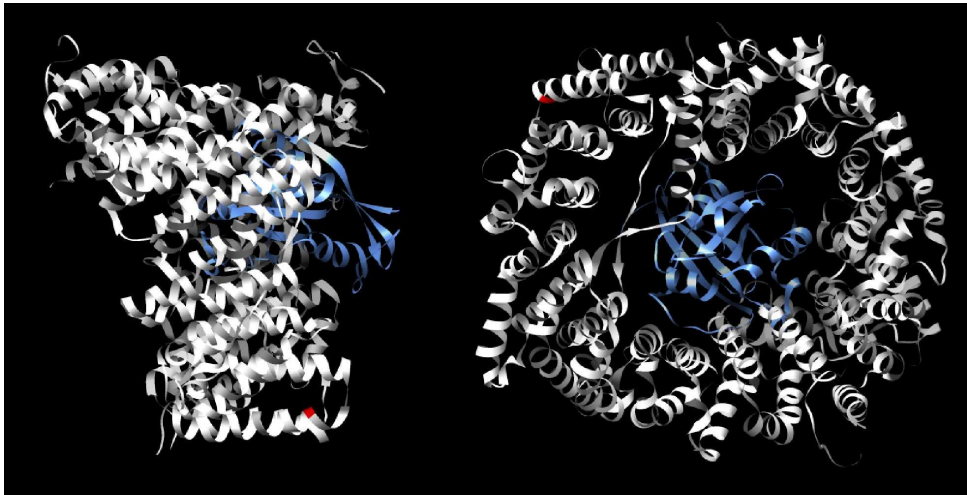


Abb. 6. 3D-Struktur des Export-Rezeptors Crm1 mit RanGTP

Darstellung der 3D-Struktur des Export-Rezeptors Crm1 (hellgrau) in Verbindung mit RanGTP (blau). Verwendet wurden die Strukturdaten 3NC1 von www.rcsb.org/pdb/. Das Cystein₅₂₈ ist rot hervorgehoben und markiert die Lage der hydrophoben Spalte.

Crm1 transportiert verschiedene RNAs und Proteine durch den NPC (Gorlich *et al.* 1999). Bis 2003 wurden 75 Proteine identifiziert, die über ein NES verfügen, also eine Bindung mit Crm1 eingehen können (la Cour *et al.* 2003), wobei die Zahl der NES-tragenden Proteine ständig steigt. Diese Bindung ist generell von niedriger Affinität, was die Freisetzung des Proteins aus dem Transport-Komplex sowie die Freisetzung von den Nukleoporinen unterstützt (Askjaer *et al.* 1999; Paraskeva *et al.* 1999; Kutay *et al.* 2005). Da Crm1 nur NES-tragende Proteine exportiert, müssen RNAs, die diesen Exportweg nutzen, über Adapter-Proteine an den Transportkomplex gebunden werden (s. Tab.4).

Tab. 4. RNA-Fracht und spezifische Adapter-Proteine (Hutten *et al.* 2007)

RNA Cargo	NES-Adapter-Protein
5s rRNA	TFIIIA
60s rRNP	NMD3
40s rRNP	?
U snRNA	PHAX
HIV-1 RRE transcript	HIV-1 Rev
HTLV transcript	Rex
c-Fos mRNA	HuR
cyclin D1 mRNA	eIF4E
CD83 mRNA	HuR

Bisher sind zwei Proteine bekannt, die überdurchschnittlich stark an Crm1 binden: NMD3 und Snurportin1, letzteres nutzt Crm1 zum Rücktransport aus dem Zellkern. Dabei erfolgt die Bindung zwischen Snurportin1 und Crm1 über ein N-terminales NES sowie eine C-terminale Region mit basischer Oberfläche. Die Bindung zwischen Snurportin1 und Crm1 wird durch Mutationen innerhalb der C-terminalen Region abgeschwächt. Ein weiterer Hinweis auf multipartite, also mehrere Transportsignale tragende, Crm1-Substrate ist das HIV-1 Rev, welches im Ganzen effektiver exportiert wird als sein NES allein (Paraskeva *et al.* 1999;

Dong *et al.* 2009). NMD3 enthält ein typisches NES, die für die starke Interaktion verantwortliche Domäne ist jedoch noch nicht bekannt (Thomas *et al.* 2003). Die Bildung des Export-Komplexes ist der limitierende Schritt des Transportvorgangs (Kehlenbach *et al.* 2001; Hutten *et al.* 2007), wobei Crm1 NES-tragende Proteine und RanGTP in einer kooperativen Weise bindet (Fornerod *et al.* 1997; Kutay *et al.* 2005). Kofaktor für die Bildung des Export-Komplexes ist das Ran-Bindeprotein 3 (RanBP3), welches Crm1 in der Nähe von RanGEF lokalisiert und zudem die Aktivität des RanGEF erhöht. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Konzentration von RanGTP in unmittelbarer Nähe von Crm1, was die Bildung der Export-Komplexe begünstigt (Englmeier *et al.* 2001; Lindsay *et al.* 2001; Nemergut *et al.* 2002; Hutten *et al.* 2007). Auch Nup98 kann als weiterer Kofaktor fungieren, indem es über seine N-terminalen FG-Wiederholungen in einer RanGTP-abhängigen Weise mit Crm1 interagiert (Oka *et al.* 2010). Es wird vermutet, dass Kofaktoren an der Erkennung der NES durch Crm1 beteiligt sind, da auch NES mit geringer Affinität zu Crm1 effektiv transportiert werden. Crm1 vermittelt weiterhin den konstitutiven Export von Aktin (Wada *et al.* 1998).

Nicht-Export-Funktionen von Crm1

Wie es auch schon der Name *chromosome region maintenance* vermuten lässt, führt Crm1 noch weitere Funktionen in der Zelle aus. So lokalisiert Crm1 während der Mitose an den Kinetochoren, was eine Rolle als mitotischer Effektor von RanGTP vermuten lässt (Arnaoutov *et al.* 2005). Zudem lokalisiert Crm1 in der Mitose an den Zentrosomen (Wang *et al.* 2005). Behandlung mit LMB führt zur Bildung von multipolaren Spindeln und ungleicher Chromosomenverteilung (Forgues *et al.* 2003; Knauer *et al.* 2006). Crm1 ist auch für die Verankerung von Nup358 an den Spindeln und Kinetochoren verantwortlich (D'Angelo *et al.* 2008). Dies impliziert, dass Crm1 an der Koordination regulatorischer wie struktureller Prozesse während der Mitose beteiligt ist (Dasso 2005; Wang *et al.* 2005; Hutten *et al.* 2007).

1.3.5 Import-Rezeptoren

Import in den Zellkern kann über Importin- α - β 1-Heterodimere, aber auch durch Importin- β allein vermittelt werden. Im ersteren Fall ist Importin- α für die Bindung des NLS zuständig. Die drei humanen Importin- α -Isoformen binden dann über ihre IBB-Domäne (*Importin- β binding domain*) an Importin- β 1. Die Anzahl unterschiedlicher Importin- α -Isoformen lässt eine Spezialisierung auf bestimmte NLS/Transportproteine vermuten (Kohler *et al.* 1999; Jans *et al.* 2000; Fried *et al.* 2003). Importin- β -Isoformen können Proteine mit längeren Sequenzen basischer Aminosäuren, wie zum Beispiel ribosomale Proteine, auch direkt binden. Von den 12 verschiedenen Importin- β -Homologen verfügt jedes über eine spezifische Affinität für bestimmte Klassen von Proteinen (Jans *et al.* 2000). Weiterhin ist die Bildung anderer

Heterodimere wie des Importin- β /Importin7-Komplexes für den Import des Histons H1 möglich.

Eine Bindung an die NPC und die Kernporenpassage wird immer von Importin- β durch transiente Wechselwirkungen mit den Nups vermittelt. Die Freisetzung der Importin-Transportfracht erfolgt nach Bindung von RanGTP im Zellkern (Poon *et al.* 2005).

1.3.6 Transport-Signale

Transport-Signale sind kurze Aminosäuresequenzen, die von den verschiedenen Transport-Rezeptoren gebunden werden. Durch inter- oder intramolekulare Maskierung, wie z.B. posttranslationale Modifikationen, Proteininteraktionen usw., kann die Aktivität der Signale reguliert werden. Ebenso kann die Signal-Erkennung durch Phosphorylierung des zu transportierenden Proteins sowie der Rezeptor-Bindestelle beeinflusst werden (Jans *et al.* 2000; Poon *et al.* 2005).

1.3.6.1 Import-Signale

Klassische nukleäre Lokalisations-Signale (NLS) bestehen aus einem oder zwei Clustern basischer Aminosäuren. Beispiele hierfür sind das klassische basische NLS, auch monopartites NLS genannt, wie das SV40 Large T Antigen–NLS (PKKKRKV) oder das zweiteilige, sogenannte bipartite NLS von Nukleoplasmin (KRPAAIKKAGQAKKKK) (Gorlich *et al.* 1996). Klassischerweise ist das bipartite NLS beschrieben als zwei Sequenzen basischer Aminosäuren getrennt von einer 10-12 Aminosäuren langen Linker-Region (Robbins *et al.* 1991). In neueren Studien wurden bipartite NLS mit einer Linker-Region von bis zu 29 Aminosäuren nachgewiesen (Lange *et al.* 2010). Monopartite NLS binden in der Hauptbindestelle an Importin- α . Bipartite NLS binden mit den N-terminal liegenden basischen Aminosäuren an die Nebenbindestelle von Importin- α und mit den auf den Linker folgenden basischen Aminosäuren an die Hauptbindestelle (Conti *et al.* 1998). Die Region zwischen Neben- und Hauptbindestelle von Importin- α kann mit dem Linker des NLS interagieren (Fontes *et al.* 2003). Die NLS werden von Importin- α aufgrund ihrer Ladung und hydrophober Wechselwirkung gebunden (Fried *et al.* 2003). Eine Besonderheit des SV40 Large T Antigen–NLS ist dabei, dass es an alle humanen Importin- α -Isoformen binden kann. NLS, welche von Importin- β direkt gebunden werden, sind schwerer zu definieren. Es wurden verschiedene längere NLS gefunden, was auch vermuten lässt, dass die 3D-Struktur dabei eine Rolle spielt (Rosenblum *et al.* 1998; Pemberton *et al.* 2005).

1.3.6.2 Export-Signale

Nukleäre Export-Signale (NES) sind etwa 10 Aminosäure lange Sequenzen mit einem hohen Anteil hydrophober Reste, vornehmlich Leuzin, aber auch Isoleuzin, Valin, Methionin oder

Phenylalanin (s. Tab.5). Leuzin-Reste im C-terminalen Bereich des NES wurden als entscheidend für deren Funktion beschrieben (Wen *et al.* 1995; la Cour *et al.* 2003). Weitestgehend entsprechen die NES der folgenden Konsensussequenz

$\Phi^1 - X_{(2-3)} - \Phi^2 - X_{(2-3)} - \Phi^3 - X - \Phi^4$ ($\Phi = K, V, I, F, M$; $X_{(n)}$ = jede As, n= Anzahl der As) (Bogerd *et al.* 1996; Henderson *et al.* 2000; Fornerod *et al.* 2002; la Cour *et al.* 2004). Diese ist jedoch so weit gefasst, dass die meisten Helix-enthaltenden Proteine damit erfasst werden (Engelsma *et al.* 2004; Dong *et al.* 2009).

Tab. 5. Beispiele viraler und vertebraten NES im Vergleich zur Konsensussequenz (Heger *et al.* 2001; Knauer *et al.* 2007)

Protein	NES-Sequenz
HIV-1 Rev	LPP-LER-LTL
HTLV-1 Rex	LSAQLYSSLSLD
Minute Virus of Mice NS2	MTKKF-GTLTI
Protein Kinase Inhibitor (PKI)	LALKLAGLDIG
Adenovirus Typ 5 E1B-55K	LYPELRRILTI
Tumor Suppressor Protein p53	MFRELNEALELK
MAP Kinase Kinase (MAPKK)	LQKKL-EELEL
Mouse Double Minute 2 (MDM2)	ISLSFDES LAL
Cyclin B1	LCQAF-SDVIL
Transkriptions Faktor III A (TFIIIA)	LPV-LEN-LTL
Signal transducer and activator of transcription (STAT1)	LAAEF-RHLQL
Survivin	VKKQF-EELTL
Consensus	$\Phi X X X \Phi X X X \Phi X \Phi$

Es wurden des Weiteren verschiedene NES identifiziert, die deutlich von dieser postulierten Sequenz abweichen (Fornerod *et al.* 2002). Generell weisen NES eine niedrige Affinität zu Crm1 auf, um eine effiziente Freisetzung nach dem Export von Crm1 und Nup358 zu gewährleisten (Askjaer *et al.* 1999; Engelsma *et al.* 2004; Kutay *et al.* 2005) und um eine Bindung an Ran-freies, zytoplasmatisches Crm1 zu verhindern (Guttler *et al.* 2010). Andere Exportine wie Exp-t und CAS binden deutlich stärker an die zu transportierenden Proteine (Kutay *et al.* 1997; Kutay *et al.* 1998). Bei der Suche nach einem möglichst effizienten NES zeigte sich, dass die NES-Bindung an Crm1 zunehmend von RanGTP unabhängig wurde, es aber aufgrund der Akkumulation an Nup358 zu keinem effizienten Export mehr kam (Engelsma *et al.* 2004). Bei der gleichzeitigen Expression zweier NES-tragender Proteine konnte eine Konkurrenz um die Bindung an Crm1 gezeigt werden, wodurch sich der Export des NES mit der schwächeren Affinität zu Crm1 weiter verlangsamt (Heger *et al.* 2001). Mit Strukturdaten zu Crm1-RanGTP-NES-Komplexen wurde die NES-Konsensus-Sequenz weiter charakterisiert, wobei sich zeigte, dass die verschiedenen NES in α -helikaler, α -helikal-ähnlicher Konformation oder mit gestrecktem Aminosäure-Rückgrad in der

hydrophoben Spalte von Crm1 die fünf Φ -Bindestellen belegen. Durch die Existenz der Strukturdaten erhöht sich die Komplexität des Sequenz- und Struktur-basierten NES-Alignments (s. Abb.7). Mit der fünften Position Φ^0 wird der strukturbasierte Konsensus für das PKI-NES, einem NES-Vertreter mit der typischsten Verteilung der hydrophoben Reste, zu $\Phi^0\text{xx}\Phi^1\text{xxx}\Phi^2\text{xx}\Phi^3\text{x}\Phi^4$. Für das RevNES ergibt sich $\Phi^0\Phi^{1\text{PRO}}\text{x}\Phi^2\text{xx}\Phi^3\text{x}\Phi^4$, wobei das Prolin, welches sich generell nicht in α -helikale Konformationen einfügt, selbst als Φ^1 dient. Saure Aminosäuren um Φ^0 unterstützen durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Lys522 und Lys560 von Crm1 die Positionierung des NES in der hydrophoben Spalte. Die Erkennung vielfältiger NES wird durch unterschiedliche Aspekte ermöglicht: 1. einzelne Φ sind verzichtbar, vorausgesetzt die anderen sind annähernd optimal belegt, 2. Φ -Bindestellen auf Crm1 akzeptieren verschiedene hydrophobe Aminosäuren und 3. können sich zwischen Φ^2 und Φ^3 zwei oder drei Aminosäuren befinden (Guttler *et al.* 2010).

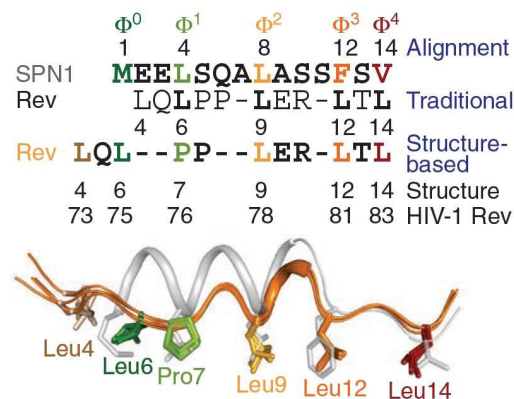


Abb. 7. Vergleich zwischen dem Sequenz- und dem Struktur-basierten Alignment des RevNES und des Snurportin1 N-terminus

Die Φ -Aminosäuren werden in Sequenz- und Struktur-basiertem Alignment von RevNES und SPN1 unterschiedlich zugewiesen. Nach dem sequenzbasierten Konsensus ergibt sich für das RevNES ein Konsensus von $\Phi^1\text{xx}\Phi^2\text{xx}\Phi^3\text{x}\Phi^4$, wohingegen der strukturbasierte Konsensus $\Phi^0\Phi^{1\text{PRO}}\text{x}\Phi^2\text{xx}\Phi^3\text{x}\Phi^4$ lautet. Entnommen aus (Guttler *et al.* 2010).

NES müssen N- oder C-terminal oder in flankierenden Regionen liegen, da eine Lokalisation im hydrophoben Proteinkern, wie beim Beispiel der Abl-Tyrosinkinase, die Aktivität eines NES unterbinden kann (Guttler *et al.* 2010). Die NES-Aktivität kann im heterologen Kontext durch Mikroinjektion von GST-NES-GFP-Fusionsproteinen in den Zellkern eukaryotischer Zellen untersucht werden. In Abhängigkeit von ihrer Sequenz werden die verschiedenen NES mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit exportiert, was auch zu der Hypothese der Notwendigkeit NES-spezifischer Kofaktoren führte (Heger *et al.* 2001).

1.3.6.3 Shuttling Signale

M9-Domäne

Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein (hnRNP) A1 enthält C-terminal eine 38 Aminosäuren lange M9-Domäne, welche sowohl den Kern-Import als auch -Export

gewährleistet (Michael *et al.* 1995; Siomi *et al.* 1995). Import in den Zellkern wird über die M9-Domäne durch Interaktion mit dem, entfernt mit Importin- β verwandten, Transportin-Rezeptor vermittelt (Nakielny *et al.* 1996; Pollard *et al.* 1996). Die hnRNPs sind beim Transport durch die Kernpore stets an mRNA gebunden. Da der Export mit dem M9-Signal nicht sensitiv gegenüber Behandlung mit LMB ist, wird er nicht durch Crm1 vermittelt (Henderson *et al.* 2000). Ein weiteres Beispiel für ein M9-Domäne enthaltendes Protein ist das Nup153 (Nakielny *et al.* 1999).

KNS-Domäne

Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP K) besitzt neben einem klassischen bipartiten NLS eine 38 Aminosäuren lange sogenannte *hnRNP K nuclear shuttling* (KNS)-Domäne. Die KNS-Domäne vermittelt in Abhängigkeit von der RNA-Polymerase II-Aktivität den nukleären Import des Proteins. Darüber hinaus vermittelt die KNS-Domäne, ebenso wie die M9-Domäne, auch dessen nukleären Export. Der Transportmechanismus selbst wurde bislang noch nicht aufgeklärt, ist aber nicht sensitiv gegenüber Behandlung mit LMB und gilt daher ebenfalls als Crm1-unabhängig (Michael *et al.* 1997; Henderson *et al.* 2000; Chan *et al.* 2008).

HNS Signal

Der bidirektionale Transport des *Hu antigen R* (HuR, auch *embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila like 1*, ELAVL1)-RNA-Bindeproteins wird durch die basische Sequenz der *hinge region* vermittelt (Fan *et al.* 1998). Wie hnRNP A1 und hnRNP K bindet HuR an zelluläre RNAs und ist wahrscheinlich an deren Export-Regulation beteiligt (Henderson *et al.* 2000).

RS-Domäne

Aus der Familie der Serin- und Arginin-reichen RNA-Bindeproteine (SR-Proteine) werden nur die Mitglieder SF2/ASF, SRp20 und 9G8 kontinuierlich über die nukleäre Membran transportiert. Grundlage hierfür ist die C-terminale RS-Domäne aus alternierenden Serin und Arginin-Resten (Caceres *et al.* 1998; Cazalla *et al.* 2002).

1.3.7 Transport von mRNA

Verschiedene RNA-Klassen werden über unterschiedliche Transportrezeptoren aus dem Zellkern transportiert (s. Abb.8). Der für den Export der großen Gruppe der mRNAs verantwortliche Rezeptor gehört dabei als einziger nicht zur Gruppe der Karyopherine. Zudem ist der Export von mRNA unabhängig vom GTP-Gradienten. Nukleärer Export ist an die Prozessierung der mRNAs und Bildung des mRNP-Komplexes gekoppelt, so dass unfertige, nicht gespleißte RNAs im Zellkern verbleiben. Nach Anfügen des 5'Caps bindet der *cap binding complex* (CBC) an die RNA. Im nächsten Schritt erfolgt das Spleißen und die anschließende Bindung des *exon junction complex* (EJC). *Capping* und Spleißen sind Voraussetzungen für die Bindung des *transcription export complex* (TREX), welcher unter

anderem aus dem THO-Komplex und den RNA-Helikasen UAP56 und ALY besteht. Letzter Schritt ist die *3'end cleavage* und die Polyadenylierung. Das Nxf1/TAP-Nxt1/p65-Heterodimer wird durch ALY an das mRNP rekrutiert und vermittelt über Interaktionen mit den FG-Nups die Translokation durch die Kernpore. Der Export-Kofaktor p15 bindet an die NTF2-like Domäne von TAP/NXF1 und wird für den Export von RNAs benötigt, welche nicht über eine CTE-Domäne verfügen (Fried *et al.* 2003). Wie viele Rezeptoren für den Export einer RNA benötigt werden, ist bislang unklar. Direktionalität wird vermutlich über die RNA-Helikase Dbp5 und den Exportfaktor Gle1 vermittelt, die beide an der zytoplasmatischen Seite der Kernporen mit dem mRNP assoziieren. Die Umwandlung von Dbp5-ATP zu Dbp5-ADP und die damit verbundene Konformationsänderung erwirken die Freisetzung der für den Transport benötigten Proteine vom mRNP (Kohler *et al.* 2007; Carmody *et al.* 2009).

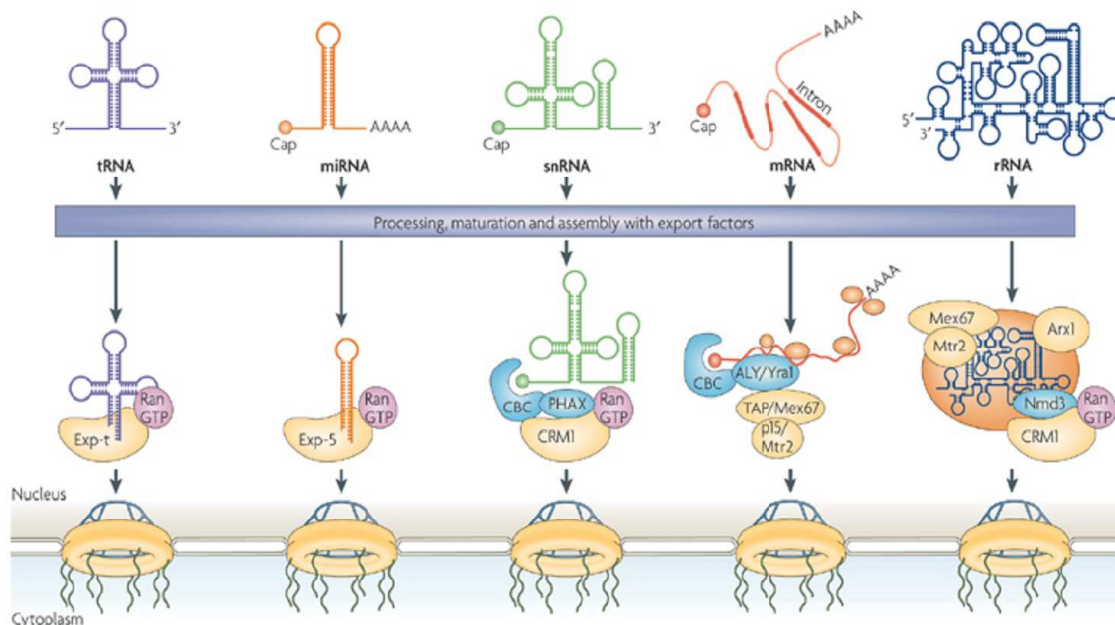


Abb. 8. Export verschiedener RNA-Klassen aus dem Zellkern

Die verschiedenen RNAs werden von unterschiedlichen Transportrezeptoren aus dem Zellkern exportiert. Im Fall von snRNA, mRNA und rRNA sind hierzu weitere Adapterproteine nötig. Entnommen aus (Kohler *et al.* 2007).

1.3.8 Regulation des Transports

Der Transport in den Zellkern kann durch die unterschiedlichsten zellulären Signale wie Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zellzyklus-Signale, Entwicklungssignale und Stressfaktoren reguliert werden. Auch der Expressionsstatus der einzelnen Transport-Komponenten kann hierbei eine Rolle spielen (Poon *et al.* 2005). Aufgrund der unterschiedlichen Affinität verschiedener Nups für die unterschiedlichen Transportrezeptoren sind Änderungen im Verhältnis der Expression verschiedener Nups zueinander für deren

Transportrate ausschlaggebend (Allen *et al.* 2001; Poon *et al.* 2005). Konformationsänderungen können zur inter- oder intramolekularen Maskierung und damit zur (De-)Aktivierung von Translokations-Signalen führen. Posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung können die Bindung von heterologen Proteinen erwirken, die die Translokations-Signale verdecken oder das Protein an seinem Platz verankern. Weiterhin kann z.B. der Phosphorylierungsstatus die Affinität des Proteins zu seinem Transport-Rezeptor modulieren und so zu einer erhöhten oder erniedrigten Transportrate führen (Benzeno *et al.* 2006; Sasaki *et al.* 2006). In postmitotischen Zellen kann es zu einem teilweisen Verlust der Nukleoporene, die für die Diffusionsbarriere zuständig sind, kommen. Diese gealterten Kernporen erlauben dann die passive Diffusion von Molekülen mit einer Größe bis zu ~60kDa (D'Angelo *et al.* 2009). Beispiele für die Regulation des Transports bestimmter Proteine sind in Poon *et al.* (Poon *et al.* 2005) aufgeführt. Eine Übersicht über die verschiedenen Regulationsmechanismen des nukleo-zytoplasmatischen Transports gibt Tabelle 6.

Tab. 6. Regulationsmechanismen des nukleo-zytoplasmatischen Transports. Nach (Terry *et al.* 2007)

Ansatzpunkt	Mechanismus	Art der Regulation
NPC	Durchlässigkeit	NPC-Ausdehnung
		Nup-Lokalisation in der Zelle und am NPC
	Expression und Stabilität	Nup-Expression
		Nup-Degradation
Transport-Rezeptor	Expression	Kompetition um Nup-Bindestellen
		Kap β - und Kap α -Expression/-Induktion
	Bindung	Inhibition des mRNA Export-Faktors
		Kap β - und Kap α -Bindung
Transport-Fracht	Inter-/Intramolekulare Interaktionen	NLS-/NES-Maskierung (z.B. p65-p50 NLS)
		Homo-/Heterodimerisierung (z.B. p53)
	Posttranskriptionelle Modifikationen	mRNA-Spleißen/-Reifung (Export nur als reife mRNA im mRNP)
		tRNA-Reifung
		cis-aktive RNA-Sequenzen
		- Element in 3'UTR bindet über eIF4E an mNxf1 (z.B. MSF und mCAT 2 mRNA)
		- CTE bindet mNxf1 (z.B. TypD retrovirale Transkripte)
	Posttranslationale Modifikationen	Reifung der ribosomalen Untereinheiten
		Phosphorylierung (z.B. CyclinB1)
		Methylierung (z.B. RNA Helikase A)
		Ubiquitinierung (z.B. PTEN)
		Poly(ADP-ribosyl)ierung (z.B. p53)

1.4 Inhibitoren des Export-Rezeptors Crm1

Bislang sind verschiedene, gegen Crm1 gerichtete Inhibitoren bekannt. Bei diesen handelt es sich teils um Naturstoffe, die von bestimmten Bakterienstämmen oder Pflanzen produziert werden, oder um synthetisch hergestellte Substanzen. Vorteil von Naturstoffen kann die einfache Herstellung durch Isolation aus den Produzenten sein, im Vergleich zur möglicherweise aufwendigen Synthese von synthetischen Substanzen. In Abbildung 10 sind

die bislang bekannten Inhibitoren von Crm1, geordnet nach Naturstoffen oder synthetisch hergestellten Substanzen, aufgeführt.

1.4.1 Leptomycin B

Leptomycin B (LMB) ist ein aus *Streptomyces sp.* isoliertes Antibiotikum (Hamamoto *et al.* 1983) mit fungizider und antitumoraler Aktivität, und auf molekularer Ebene der bekannteste Inhibitor von Crm1. Das LMB-Molekül besteht aus einer ungesättigten, verzweigten Fettsäurekette mit einem terminalen Lakton-Ring und hat ein Molekulargewicht von 540,7g/mol. Infolge der LMB-Behandlung kommt es zur Alkylierung von Crm1 an Cys₅₂₈ (Kudo *et al.* 1998; Kudo *et al.* 1999) und somit zur irreversiblen Inhibition der NES-Bindung (s. Abb.9). LMB zeigt eine hohe zytotoxische Wirksamkeit in eukaryotischen Zellen und ist im niedrig nanomolaren Bereich aktiv.

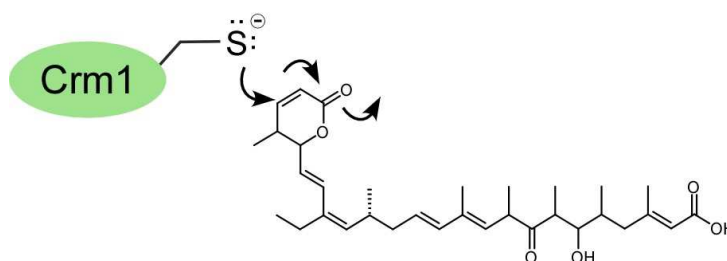


Abb. 9. Michael-Addition von LMB an das Cystein₅₂₈ von Crm1

Struktur von Leptomycin B und schematische Darstellung der Michael-Addition an das Cystein₅₂₈ von Crm1 (Kau *et al.* 2004)

Es wurde bereits für viele Proteine nach Behandlung mit LMB eine Akkumulation im Zellkern beschrieben. Aufgeführt in Lain *et al.* sind p53, HDM2, MAPKAP-kinase 2, c-Abl, p27, Cyclin B1, Cdc25, IκB, Pap1, eIF5A und Aktin (Lain *et al.* 1999). Aufgrund seiner hohen zytotoxischen Aktivität gegen verschiedene Krebszelllinien *in vitro* wurde die Verwendung von LMB als Tumorthapeutikum in einer klinischen Phase-I-Studie getestet. Wegen der hohen Nebenwirkungen wurden aber keine weiterführenden Studien durchgeführt (Newlands *et al.* 1996). Im Kontext von chronisch myeloischer Leukämie (CML, *chronic myelogenous leukemia*) wurde *in vitro* durch Kombinationsbehandlung von LMB mit Imatinib eine Akkumulation des BCR-ABL-Onkogens im Zellkern hervorgerufen, wodurch effizient das apoptotische Programm ausgelöst wurde (Vigneri *et al.* 2001).

1.4.2 Weitere Naturstoffe

Die Familie der Leptomycine wurde nach dem zuerst entdeckten Mitglied Leptomycin B benannt. Weitere Mitglieder sind Leptomycin A, Callystatin A, Ratjadon, Kazusamycin, Anguinomycin, Leptofuranin und Leptostatin (Kalesse 2002). Leptomycin A (LMA) ist wie LMB ein aus *Streptomyces sp.* isoliertes Antibiotikum (Hamamoto *et al.* 1983) mit einem Molekulargewicht von 526,7g/mol. LMA ist aufgrund der geringen Verfügbarkeit und des

hohen Preises weniger gut untersucht. Ein weiterer Inhibitor von Crm1 ist das Antibiotikum Ratjadon A (RAT A, 456,6 g/mol), welches aus *Sorangium cellulosum* isoliert wurde (Gerth *et al.* 1995). Andere Mitglieder der Ratjadon-Familie (RAT B/C/D) verfügen ebenfalls über die Fähigkeit, Crm1-abhängigen nukleären Export zu inhibieren (Kalesse *et al.* 2001; Koster *et al.* 2003). Dabei kommt es genau wie bei LMB zur Modifikation des Cys₅₂₈-Restes (Koster *et al.* 2003; Meissner *et al.* 2004). Auch für Callystatin A (Kobayashi 1997) aus *Callyspongia truncata*, Kazusamycin A und B aus *Streptomyces sp.* (Wolff *et al.* 1997), Anguinomycin C aus *Streptomyces sp.* (Hayakawa *et al.* 1995; Bonazzi *et al.* 2007), 1'S-1'-acetoxychavicol acetate (ACA) aus *Alpinia galanga* (Ye *et al.* 2006) und Valtrat aus *Valerianae Radix* (Murakami *et al.* 2002) wurde eine inhibitorische Aktivität auf den Crm1-abhängigen Export nachgewiesen.

1.4.3 *Small-Molecule* Inhibitoren

Als *small-molecules* werden synthetisch hergestellte Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht bezeichnet. Bei einer Hochdurchsatzanalyse zur Suche von Anti-HIV-1 Rev-Inhibitoren wurde von Daelemans *et al.* die Substanz PKF050-638 identifiziert (Daelemans *et al.* 2002). PKF050-638 inhibiert Crm1-abhängigen Export reversibel und ist im mikromolaren Bereich aktiv. Die Inhibition verläuft über eine Michael-Addition des α,β -ungesättigten Ketons an das Cystein₅₂₈ von Crm1. Ausgehend von dieser Leitstruktur wurde eine Serie ähnlicher Substanzen generiert, um die Beziehungen von Substanz-Struktur und Inhibitor-Aktivität weiter aufzuschlüsseln (Van Neck *et al.* 2008). Aus dieser Untersuchung ging hervor, dass die Michael-Addition an das Cystein₅₂₈ von Crm1 nicht alleine für die vermittelte Inhibition ausschlaggebend ist. Alle aktiven Substanzen besaßen eine ungesättigte Carbonylgruppe, wobei das cis-Enantiomer generell aktiver war als das trans-Enantiomer. Weiterhin wurde die Position der Carbonylgruppe und das Vorhandensein des Phenylrings als ausschlaggebend für die Aktivität der Substanz beschrieben (Van Neck *et al.* 2008). Als Resultat einer Hochdurchsatzanalyse nach Inhibitoren, die den nukleären Export von HDAC5 inhibieren, wurde ein weiterer Crm1-Inhibitor gefunden, von welchem anschließend auch weitere Derivate synthetisiert werden konnten (Monovich *et al.* 2009). Die Aktivität dieser als *compounds* 3-5 bezeichneten Substanzen liegt in der ungesättigten Carbonyl-Gruppe, wie auch bei LMB und anderen synthetischen Crm1-Inhibitoren, begründet. Die Substanzen sind im niedrigen nanomolaren Bereich (2/7/100nM) aktiv.

Naturstoffe

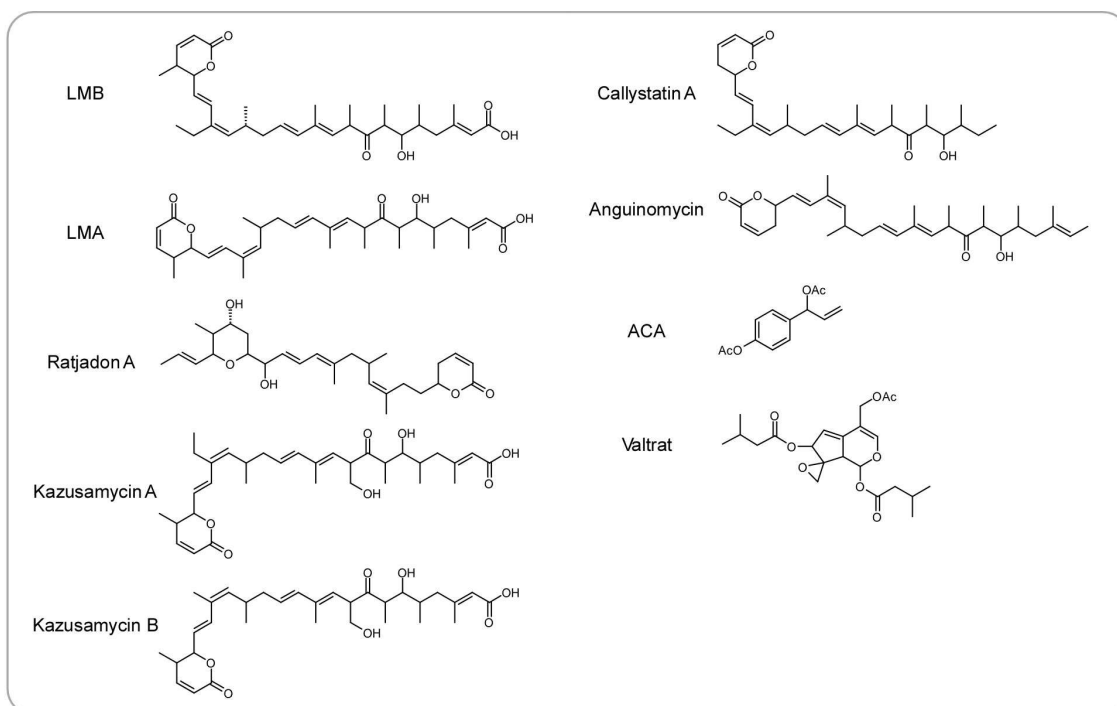
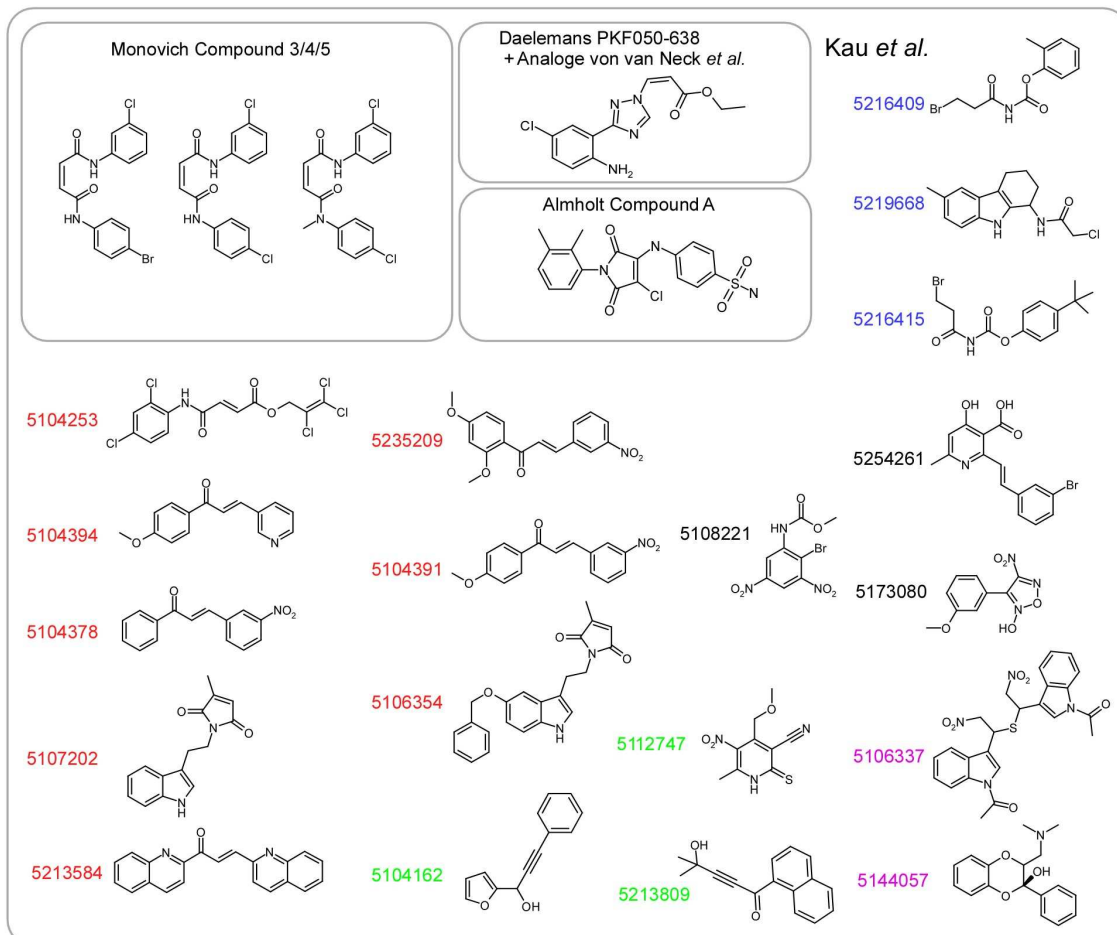

 synthetisch hergestellte
small molecules


Abb. 10. Inhibitoren von Crm1

Neben Vertretern aus der Klasse der Naturstoffe finden sich auch viele synthetisch hergestellte *small molecules* unter den bekannten Crm1-Inhibitoren.

Als Nebenprodukt einer Hochdurchsatzanalyse für nukleäre Exportinhibitoren des FOXO1-Transkriptionsfaktors wurden von Kau *et al.* neben Substanzen, welche spezifisch den PI3K/Akt/FOXO1-Signalweg inhibieren, auch 19 generelle Transport-Inhibitoren gefunden. Acht dieser in Abb.10 rot dargestellten Substanzen enthalten eine ungesättigte Keton- oder Amidgruppe, welche möglicherweise die Michael-Addition an Crm1-Cys₅₂₈ vermitteln kann. Als weitere Möglichkeiten der Modifikation von Crm1-Cys₅₂₈ wäre ein nukleophiler Angriff durch eine Sulfhydryl-Gruppe mit einer Halogen-Abgangsgruppe (Substanzen in Abb.10 blau markiert), oder durch Dreifachbindung (Substanzen in Abb.10 grün markiert), oder durch Aktivität nach Rearrangement (Substanzen in Abb.10 pink markiert) denkbar (Kau *et al.* 2003). Bei einer Hochdurchsatzanalyse nach Inhibitoren des aktivierungs-abhängigen nukleären Exports der MAPK-aktivierten Protein Kinase 2 (MK2) wurde von Almholt *et al.* der als Compound A bezeichnete irreversible Inhibitor von Crm1 beschrieben. Dieser besitzt im Vergleich zu LMB allerdings ein 1000fach niedrigeres inhibitorisches Potential (Almholt *et al.* 2004). Es wurde laut Veröffentlichung eine ganze Gruppe (*class3*) Crm1-spezifischer Transport-Inhibitoren gefunden, deren Strukturformeln jedoch nicht publiziert sind.

1.5 Krebs

Die Bezeichnung Krebs wurde um 400 v.Chr. von Hippokrates geprägt, der die Ähnlichkeit des Geschwürs mit dem Krebskörper verglich. Als Tumor oder Neoplasie wird in der Medizin die Neubildung von Gewebe bezeichnet. Krebs bezeichnet dabei immer die Bildung von bösartigem Gewebe bzw. einen bösartigen Tumor. Ein Tumor kann mit einem anormalen Organ verglichen werden, dessen Bildung durch Krebszellen ausgelöst wurde, welche durch angereicherte Mutationen die Fähigkeit zur ungehemmten Vermehrung erlangt haben (Reya *et al.* 2001). Krebs ist mit weltweit 7,8 Millionen Todesfällen (WHO 2008, World Health Organisation) eine der Haupt-Todesursachen. 2006 erkrankten in Deutschland 426.800 Menschen an Krebs, 210.930 starben in diesem Jahr an der Krankheit (GEKID, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.). Krebszellen zeichnen sich durch verschiedene erworbene Eigenschaften aus, die von Hanahan *et al.* (Hanahan *et al.* 2000) zusammengestellt und aktuell erweitert wurden (Hanahan *et al.* 2011), (s. Abb.11).

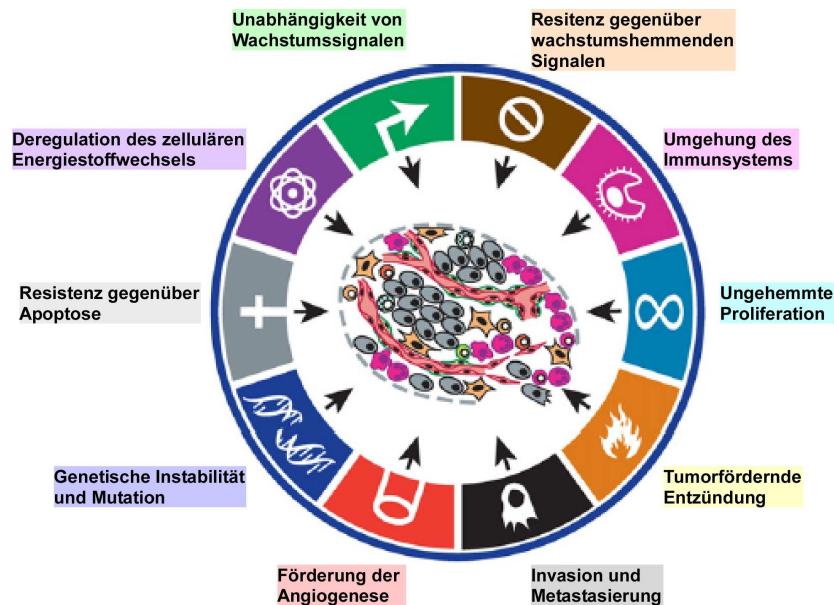


Abb. 11. Kennzeichen von Krebszellen

Kennzeichen von Krebs sind ungehemmtes Wachstum, die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, die Wirkungslosigkeit von Wachstumshemmern, Invasion und Metastasierung, Angiogenese und die Resistenz gegenüber Apoptose. Kürzlich vervollständigt wurde die Liste der Kennzeichen durch die Deregulation des Energiestoffwechsels der Tumorzellen und die Verhinderung ihrer Zerstörung durch Immunzellen. Charakteristisch sind die genetische Instabilität und Mutationen sowie die tumorförderliche Entzündung. Verändert nach (Hanahan *et al.* 2011).

Krebszellen weisen eine ungehemmte, übermäßige Proliferationsrate auf. Apoptose wird in den Krebszellen z.B. durch den Verlust der p53-Funktion umgangen (Junttila *et al.* 2009). Aufgrund der hohen Teilungsaktivität und des somit erhöhten Nähr- und Sauerstoffbedarfs wird Angiogenese induziert (Hanahan *et al.* 1996). Durchbrechen Krebszellen die natürlichen Gewebearrrieren, wird der Tumor als invasiv bezeichnet. Gelangen Krebszellen in die Blutbahn und siedeln sich an anderer Stelle an, so spricht man von Metastasen. Zur Krebsentstehung gibt es verschiedene Hypothesen (s. Abb.12). Klassischerweise wird von einer Anreicherung von Mutationen über einen längeren Zeitraum ausgegangen, die schließlich zur Transformation einer normalen Zelle in eine Krebszelle führt. Alle Zellen des gebildeten Tumors hätten hier das gleiche Potential zur Tumorbildung (Vogelstein *et al.* 1988). Das neuere Modell der Krebs-Stammzell-Hypothese geht davon aus, dass nur Zellen mit der Fähigkeit der uneingeschränkten Selbsterneuerung zur Tumorbildung fähig sind. Diese werden als Krebsstammzellen bezeichnet und könnten aus Stammzellen oder aus Progenitorzellen, die die uneingeschränkte Teilungsfähigkeit wiedererlangt haben, hervorgegangen sein. Aus diesen Zellen gehen die differenzierten Zelltypen hervor, die in den Tumoren vorliegen, wobei nur die dort noch vorhandenen Stammzellen weiterhin tumorbildendes Potential besitzen (Reya *et al.* 2001; Tan *et al.* 2006; Shipitsin *et al.* 2008).

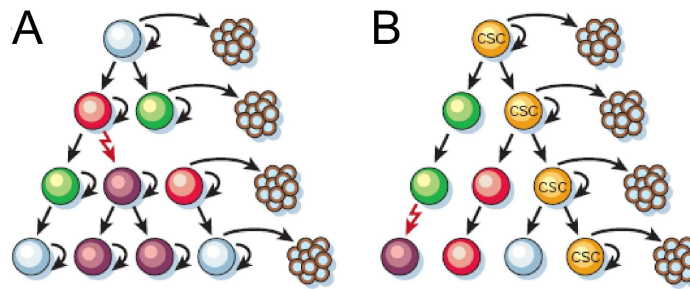


Abb. 12. Tumorigenes Potential von Krebszellen

Krebszellen entstehen durch Akkumulation von Mutationen. Nach dem ursprünglichen Modell der Krebsentstehung besitzt die Krebszelle selbst und auch alle Tochterzellen das gleiche tumorogene Potential (A). Bei dem Krebs-Stammzellmodell wird davon ausgegangen, dass nur die transformierten Krebs-Stammzellen tumorigenes Potential besitzen, nicht aber deren Progenitor-Zellen (B). Verändert nach (Reya *et al.* 2001). CSC – *Cancer Stem Cell*.

Ursache für das Auftreten von Mutationen, die letztendlich zur Entstehung von Krebs führen, ist die Exposition mit Kanzerogenen. Dies können Chemikalien, wie sie z.B. im Zigarettenrauch enthalten sind, zusammen mit übermäßigem Alkoholkonsum der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren (Leemans *et al.* 2011), ionisierende oder ultraviolette Strahlung sein. Zudem können Viren und Bakterien kanzerogene Wirkungen haben (National Cancer Institute from NHI, (zur Hausen 2000).

Bei der klassischen Krebstherapie erfolgt eine Behandlung mit Zytostatika, wie z.B. Cisplatin, welches eine Quervernetzung von DNA-Strängen bewirkt (Rosenberg *et al.* 1969), kombiniert mit radioaktiver Bestrahlung des Tumors. Dabei kommt es zum bevorzugten Absterben der im Vergleich zu den meisten adulten Normalgeweben proliferativ sehr aktiven Krebszellen. Aufgrund der stark zytotoxischen Wirkung auf Krebszellen sowie auf gesunde proliferativ aktive Zellen geht diese Therapie mit starken Nebenwirkungen einher. Bei der gezielten Krebstherapie werden spezifisch Krebsproteine oder Rezeptoren durch *small molecule*-Inhibitoren wie Imatinib (Druker *et al.* 1996) oder durch monoklonale Antikörper wie Trastuzumab (Ferrara *et al.* 2004) inhibiert. *Small-molecule*-Inhibitoren binden spezifisch an ein Protein, z.B. die ATP-Bindestelle einer Kinase, und hemmen im optimalen Fall ausschließlich dessen Aktivität. Monoklonale Antikörper sind gegen Rezeptoren an der Zelloberfläche oder extrazellulär zirkulierende Signalstoffe gerichtet, die für die Signal-Weiterleitung in für die Progression des Tumors wichtigen Stoffwechselwegen benötigt werden. Intensive Forschung wird zudem auf dem Feld der RNAi basierten Therapien betrieben, wobei derzeit der Transfer in die Zielzellen noch problematisch ist (Pecot *et al.* 2011).

1.5.1 Transport in Krebszellen

In Krebszellen kann es u.a. auch durch veränderte Expression von an der Transportmaschinerie beteiligten Elementen zu einer veränderten Lokalisation von Proteinen

kommen. So ist in verschiedenen Krebszelllinien der *cellular apoptosis susceptibility* (CAS) Faktor verstärkt exprimiert, was zu einer Anreicherung der Importin- α -abhängigen Transkriptionsfaktoren im Zellkern führt (Kau *et al.* 2004). Die zytoplasmatische Lokalisation des Tumorsuppressorfaktors p53 wird durch eine unvollständige Variante des Importin- α verursacht (Kim *et al.* 2000). Einige Proteine, deren Lokalisation in Krebszellen verändert vorliegt, sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7. Proteine, deren intrazelluläre Lokalisation in Krebszellen im Vergleich zu Normalgewebe verändert sein kann. Verändert nach (Kau *et al.* 2004)

Protein	Lokalisation Normalgewebe	Lokalisation Krebszelle	Resultierender Effekt	Beschriebene Krebsart
Nf- κ B	Zytoplasma	Kern	Inhibition der Apoptose	C-ALL, Hodgkin Lymphom, Brust, Ovarial-, Kolon-, Pankreas- und Schilddrüsenkarzinome
FOXO	Kern	Zytoplasma	Arrest des Zellzyklus, Transkriptionsstop proapoptotischer Gene	Nieren und Kolonkarzinom, Glioblastoma multiforme
p27	Kern	Zytoplasma	Aktivierung von E2F1, Progression des Zellzyklus	Oesophagus-, Schilddrüsen-, Kolon- and Brustkarzinome
p53	Kern	Zytoplasma	Keine DNA-Reparatur Antwort	Inflammatorisches Mammakarzinom, Neuro-/Retinoblastom, Kolorektal- und Ovarialkarzinome
INI1	Kern	Zytoplasma	Aktivierung von CyclinD und E2F Targets	Bösartige und untypische teratoide Rhabdoidtumore
β -Catenin	Zytoplasma	Kern	Bindung und Aktivierung von LEF1	Kolorektales Karzinom

1.6 Survivin

Aufgrund seiner N-terminalen *baculoviral IAP repeat* (BIR)-Domäne gehört Survivin, als kleinstes Mitglied mit einer Größe von 16,5kDa, zur Gruppe der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP)-Familie (Ambrosini *et al.* 1997). Es sind bislang vier Splice-Varianten der Survivin-mRNA bekannt (Li 2005). Das Survivin-Protein liegt in Lösung als Homodimer vor (Sun *et al.* 2005). Apoptose wird dadurch verhindert, dass zum einen die Aktivierung von Caspase 3 und 7 (LaCasse *et al.* 1998) und zum anderen die Freisetzung von Smac/DIABLO von den Mitochondrien unterbunden wird (Ceballos-Cancino *et al.* 2007). Survivin wird in proliferierenden Zellen, während der Entwicklung wie auch in Primärtumoren, Metastasen und den meisten Krebszelllinien vermehrt hergestellt (Adida *et al.* 1998; Islam *et al.* 2000; Altieri 2001), wobei es in letzteren eine essentielle Rolle bei der Resistenz gegenüber Chemotherapie und ionisierender Strahlung spielt (Altieri, 2008; Stauber *et al.*, 2007). Die wenigen Ausnahmen ausdifferenzierter Gewebe, welche eine Expression von

Survivin zeigen, sind in (Fukuda *et al.* 2006) aufgelistet. Dazu gehören CD34⁺-Stammzellen sowie Endothelzellen während der Angiogenese (Stauber *et al.* 2007). Weiterhin ist Survivin Mitglied des *chromosomal passenger complex* (CPC, mit Aurora-B kinase, Borealin und INCENP) und darüber an der korrekten Verteilung der Chromosomen während der Mitose beteiligt (Lens *et al.* 2006). Übereinstimmend damit ist die höchste Expression von Survivin während der G2/M Phase des Zellzyklus nachweisbar (Altieri 2003).

1.6.1 Export von Survivin aus dem Zellkern

Im Gegensatz zu seinem niedrigen Molekulargewicht von 16,5kDa, welches eigentlich freien Transport durch passive Diffusion erlauben würde, ist die intrazelluläre Lokalisation von Survivin aktiv reguliert (Rodriguez *et al.* 2002). Da kein nukleäres Lokalisationssignal in der Sequenz von Survivin gefunden werden konnte, erfolgt die Aufnahme in den Zellkern vermutlich durch passive Diffusion (Colnaghi *et al.* 2006; Knauer *et al.* 2006). Der Export aus dem Zellkern wird hingegen durch die Präsenz eines Leuzin-reichen nukleären Exportsignals vermittelt. Dieses konnte auf die Aminosäuren 89-99 des Survivin-Proteins, welche mit dem Exportrezeptor Crm1 interagieren, eingegrenzt werden (Knauer *et al.* 2007). Dementsprechend ist die Lokalisation von Survivin sensitiv gegenüber einer Behandlung mit dem Exportinhibitor Leptomycin B. Es konnte gezeigt werden, dass der Export von Survivin aus dem Zellkern Grundlage für eine effiziente Inhibition der Apoptose ist (Colnaghi *et al.* 2006; Knauer *et al.* 2007). Die Interaktion von Survivin mit Crm1 scheint zudem für die korrekte Lokalisation des chromosomalen Passenger-Komplexes an den Zentromeren verantwortlich zu sein (Stauber *et al.* 2007).

1.6.2 Survivin in Krebszellen und als Therapietarget

Im Gegensatz zur Abwesenheit von Survivin in ausdifferenzierten Geweben liegt in nahezu allen Tumortypen eine Reexpression vor (Islam *et al.* 2000; Altieri 2001). Das vermehrte Vorhandensein von IAPs in Krebszellen verhindert den Eintritt in die physiologisch programmierte Apoptose (Hunter *et al.* 2007). Eine erhöhte Expression von Survivin korreliert in der Tat mit einer schlechteren Prognose, geringerem Behandlungserfolg der Patienten (Chemo- und Strahlenresistenz), was auf molekularer Ebene mit verminderter Apoptose der Tumorzellen einhergeht (Duffy *et al.* 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Survivin und Crm1 Voraussetzung für ein effizientes Tumorwachstum *in vivo* ist (Stauber *et al.* 2006). Des Weiteren besitzen Tumore mit einer vermehrt nukleären Lokalisation von Survivin eine bessere Prognose im Vergleich zu solchen mit einer vermehrt zytoplasmatischen Lokalisation (Colnaghi *et al.* 2006; Knauer *et al.* 2007).

Da Survivin, im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der IAP-Familie, in den meisten Tumoren stark überexprimiert wird, stellt es ein relevantes Therapietarget dar (Altieri, 2008; Stauber *et*

al., 2007). Für eine Vielzahl von Neoplasien wurde Survivin als prognostischer Marker für die Tumorprogression und verkürzte Überlebenszeit beschrieben (Altieri, 2008; Engels *et al.*, 2007; Stauber *et al.*, 2007). Frühere Ansätze, Survivin als Therapietarget zu nutzen, waren die Verwendung von *antisense*-Oligonukleotiden (Ambrosini *et al.* 1998; Olie *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2001; Shankar *et al.* 2001), transkriptionelle und translatorische Repressoren, Immuntherapie (Altieri 2006) und adenovirale Expression von dominant-negativen Survivin Mutanten (T34A, C84A) (Mesri *et al.* 2001). Eine Übersicht über die unterschiedlichen Therapieansätze ist in (Fukuda *et al.* 2006; LaCasse *et al.* 2008; Doolittle *et al.* 2010) zu finden, siehe auch Tabelle 8.

Tab. 8. Therapeutische Strategien gegen Survivin. Nach (Doolittle 2010)

Inhibition	Inhibitor	Beispiele	Referenz
über den Survivin-Promotor gesteuerte Gene	Expression eines therapeutischen Gens	Surv.CRA, surDN, BikDD	(Kamizono <i>et al.</i> 2005; Li <i>et al.</i> 2006; Sher <i>et al.</i> 2009)
der Transkription	<i>small molecule</i> – Repressoren die an Promotor binden	YM-155, EM-1421	(Lopez <i>et al.</i> 2007; Nakahara <i>et al.</i> 2007)
der Translation	<i>Antisense</i> -Oligonukleotide	LY2181308, SPC-3042	(Hansen <i>et al.</i> 2008; Rodel <i>et al.</i> 2008)
	Hammerhead-Ribozym	RZ-1, RZ-2	(Choi <i>et al.</i> 2003)
	siRNA		(Carvalho <i>et al.</i> 2003)
auf Protein-Ebene	dominant negative Mutanten	T34A, C84A, surDN	(Li <i>et al.</i> 1998; O'Connor <i>et al.</i> 2000)
	HSP90 Inhibitoren	Shepherdin, AICAR	(Gyurkocza <i>et al.</i> 2006; Meli <i>et al.</i> 2006)
	CDK-Inhibitoren	Flavopiridol, puvalanol A, NU6140	(Pennati <i>et al.</i> 2005; Miyashita <i>et al.</i> 2006; Iizuka <i>et al.</i> 2008)

Dabei wurde ein Ansteigen der Apoptose-Rate, ein vermindertes Zellwachstum sowie eine Tumorsensibilisierung gegenüber Chemo- und Radiotherapie beschrieben (Altieri, 2008; Stauber *et al.*, 2007). In Wendt *et al.* (Wendt *et al.* 2007) ist eine weitere Bindestelle im Bereich der Dimerisierungsdomäne auf Survivin beschrieben worden, die für *small molecules* zugänglich ist und zur Inhibition genutzt werden könnte.

1.7 Apoptose

Apoptose ist der programmierte Tod einer Zelle. Dieser kann über zwei Wege, durch den intrinsischen/mitochondrialen oder den extrinsischen/Rezeptor-vermittelten, initiiert werden (s. Abb.13). Beide Wege der Initiationsphase der Apoptose führen schließlich zur Aktivierung von Effektor-Caspasen, welche zelluläre Proteine selektiv hinter einem Aspartat schneiden (Salvesen *et al.* 2004; Vucic *et al.* 2011). Folgen dieser proteolytischen Aktivität sind neben dem so eingeleiteten Abbau der Proteine auch eine Kondensation des Chromatins, die Fragmentierung der DNA, ein Schrumpfen der Zelle sowie Abschnürungen der Zellmembran.

Phagozyten können so anschließend die zellulären Trümmer beseitigen (Kerr *et al.* 1972; Taylor *et al.* 2008). Der intrinsische Signalweg kann durch Bestrahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren oder die Gabe von Chemotherapeutika aktiviert werden. Die Proteine *BH3-interacting domain death agonist* (BID), *BCL2 associated agonist of cell death* (BAD), *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) oder *BCL2-interacting mediator of cell death* (BIM) wirken dann den anti-apoptotischen Proteinen *B-cell lymphoma 2* (BCL2), *BCL-extra large* (BCLXL) und *myeloid leukaemia cell differentiation 1* (MCL1) entgegen, wodurch diese ihre hemmende Wirkung auf *BCL2-associated X protein* (BAX) und *BH antagonist or killer* (BAK) verlieren (Kaufmann *et al.* 2003; Youle *et al.* 2008). Aktiviertes BAX oder BAK oligomerisiert und integriert in die äußere mitochondriale Membran, wodurch es zur Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) und *second mitochondrial activator of caspase* (SMAC/DIABLO) kommt. Cyt c bindet an *apoptotic protease-activating factor 1* (APAF1), was wiederum dessen Oligomerisierung bewirkt und schließlich zur Bildung des Apoptosom-Komplexes führt (Tait *et al.* 2010). Das Apoptosom rekrutiert die Initiator-Caspase 9, welche dort durch Dimerisierung aktiviert wird (Acehan *et al.* 2002). Caspase 9 wiederum schneidet und aktiviert Caspase 3 und 7, was schließlich zum weiteren Ablauf des apoptotischen Programms führt. Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Liganden wie dem *Fas ligand* (FasL) und *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) an die extrazellulären Domänen von Transmembranrezeptoren wie dem *TNF receptor superfamily member 6* (CD95/FAS), dem *death receptor 5* (DR5) oder dem *TNF Receptor 1* (TNFR1) ausgelöst. Nach Ligandenbindung aggregieren die Rezeptoren zu sogenannten *death inducing signaling complex* (DISC)-Komplexen. In Folge dessen rekrutierte Adapter-Proteine wie *Fas-associated DEATH domain protein* (FADD) (*TNFR1-associated DEATH domain protein* (TRADD) bei TNFR1) rekrutieren ihrerseits die Initiator-Caspase 8, welche weiterhin durch Dimerisierung aktiviert wird (Ashkenazi *et al.* 1998; Guicciardi *et al.* 2009) und die Effektor-Caspasen 3 und 7, was wiederum im weiteren Ablauf des apoptotischen Programms endet. Extrinsischer und intrinsischer Weg sind nicht völlig voneinander getrennt, da beispielsweise Caspase 8 auch BID schneiden kann, welches zu den Mitochondrien transloziert und dort zur Freisetzung von Cyt c und SMAC führt (Strasser *et al.* 2009). Anti-apoptotische Proteine wirken dem Ablauf der Apoptose entgegen. Hinsichtlich des intrinsischen Wegs bewahren BCL2, BCLXL und MCL1 die Integrität der mitochondrialen Membran (Youle *et al.* 2008). Eine Inhibition der Caspase 8 im extrinsischen Weg ist durch *FLICE inhibitory protein* (FLIP) möglich (Tschopp *et al.* 1998). Mitglieder der *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP)-Familie können Apoptose auf Ebene der Caspase-Aktivierung inhibieren. *X-chromosome linked IAP* (XIAP/BIRC4) kann zum Beispiel die Caspasen 3, 7 und 9 direkt binden und inhibieren (Salvesen *et al.* 2002). Zu dieser Gruppe zählt auch Survivin (BIRC5, *baculoviral IAP repeat containing*) für welches beschrieben wurde, dass es die Aktivierung von Caspase 3 und 7 zu

verhindern vermag. Einfluss auf die Apoptose haben auch viele andere Proteine, wie z.B. die Transkriptionsfaktoren p53 und Nf- κ B, welche die Expression von apoptotischen Modulatoren regulieren oder auch Kinasen und Acetyl-Transferasen, welche auf post-translationaler Ebene modulatorisch aktiv sind (Declercq *et al.* 2009; Vousden *et al.* 2009). Eins der Substrate von Caspase 3 ist die *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP), die ein Teil des *base excision repair*-Mechanismus ist und verschiedene nukleäre Proteine durch poly-ADP-Ribosylierung modifiziert (Boulares *et al.* 1999). Durch Caspase 3-Aktivität wird das aktive Zentrum der PARP von der DNA-Bindedomäne getrennt, wodurch diese nicht mehr von DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert werden kann.

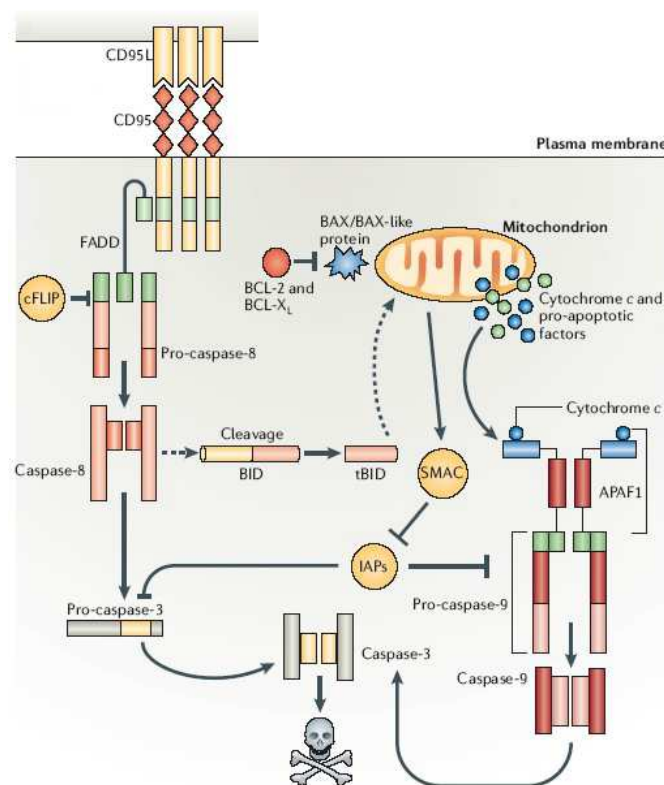


Abb. 13. Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg

Innerhalb des extrinsischen oder auch Todesrezeptor-Signalwegs kommt es nach Liganden-Bindung an Transmembranrezeptoren wie z.B. CD95 zur Aktivierung der Initiator-Caspase 8. Dies führt zur Aktivierung der Effektor-Caspase 3 und dem Ablauf des apoptotischen Programms. Beim intrinsischen Weg werden pro-apoptotische Proteine (z.B. BID, BAD) aktiviert, welche dann die Wirkung anti-apoptotischer Proteine wie BCL2 neutralisieren, wodurch es zur Aktivierung von BAX und BAX-ähnlichen Proteinen kommt. Aktiviertes BAX ermöglicht die Freisetzung von Cytc und SMAC aus der äußeren Mitochondrien-Membran, wodurch es zur Dimerisierung von APAF1 und der Aktivierung von Caspase 9 kommt. Diese aktiviert ebenfalls die Caspase 3 und dadurch den weiteren Ablauf des apoptotischen Programms. SMAC begünstigt dies weiterhin durch Inhibition der der Apoptose entgegenwirkenden IAP-Proteine, die ihrerseits die Caspasen 3 und 9 inhibieren können. Kommunikation zwischen beiden Signalwegen besteht in der Form von BID, welches in der von Caspase 8 geschnittenen Form zu den Mitochondrien transloziert und dort die Freisetzung von Cytc und SMAC unterstützt. Eine Inhibition der Apoptose ist zudem durch FLIP möglich, welches Caspase 8 zu inhibieren vermag. Entnommen aus (Hotchkiss *et al.* 2006).

1.8 Mitose und Zellzyklus

Der Zellzyklus ist einer der am besten untersuchten biologischen Prozesse, welcher auch besonders hinsichtlich Wachstum und Entwicklung sowie seiner darin begründeten Rolle in verschiedenen Krankheiten von Interesse ist (Harper *et al.* 2005). In Verlauf des Zellzyklus durchschreiten eukaryotische Zellen spezifische Phasen. In der Gap (G)₁-Phase bereitet sich die Zelle auf die Verdopplung ihres genetischen Materials vor. Im Verlauf der Synthese (S)-Phase wird dieses repliziert, woraus G₂-Phase-Zellen hervorgehen, die über einen doppelten Chromosomensatz verfügen und sich auf die Mitose vorbereiten. Die S-, G₁- und G₂-Phase werden auch unter dem Begriff Interphase zusammengefasst. Wenn die Proliferationsbedingungen ungünstig sind, können Zellen aus der G₁-Phase in eine Ruhephase, der sogenannten G₀-Phase, eintreten. In der Mitose (M)-Phase kommt es schließlich zur geordneten Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen. Die Mitose wird in die Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt und endet mit der Zellteilung, auch Zytokinese genannt (s. Abb.14).

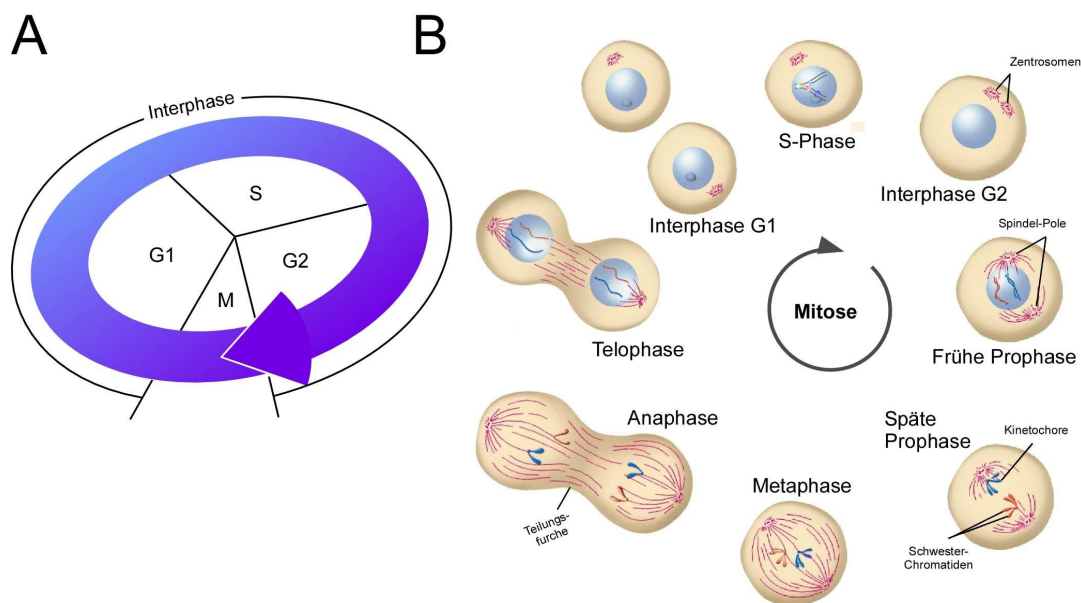


Abb. 14. Zellzyklus und Mitose

Der eukaryotische Zellzyklus besteht aus der Interphase, unterteilt in *Gap* (G)₁-, Synthese (S)- und G₂-Phase, und der Mitose (M-Phase) (A). In der Mitose wird die DNA gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Während der Prophase kommt es zur Kondensation des Chromatins, des Auseinanderwanderns der Zentrosomen und der Auflösung der Kernmembran. Im Verlauf der Metaphase werden die Chromosomen über die Kinetochore an Mikrotubuli gebunden und in der Metaphase-Platte angeordnet. In der Anaphase werden die Schwesterchromatiden voneinander getrennt und zu den entgegengesetzt liegenden Polen gezogen. Hiernach kommt es zur Bildung der Teilungsfurche und der Abschnürung der Tochterzellen welche in der Telophase bereits weit fortgeschritten ist. Mit der endgültigen Teilung der Zellen in der Zytokinese erfolgt schließlich die Dekondensation des Chromatins und die Neubildung der Kernmembran. Verändert nach (Lodish 2000).

In der Prophase kondensiert das Chromatin, die Zentrosomen entfernen sich voneinander und die Kernmembran löst sich auf. Von den Zentrosomen aus bilden sich Mikrotubuli bis zu

den Zentromeren der Chromosomen und binden dort an die Kinetochore. Die so gebundenen Chromosomen werden in der Metaphase in einer Ebene, auch Metaphase-Platte genannt, angeordnet. In der folgenden Anaphase werden die Schwesterchromatiden getrennt und durch die Kinetochor-Mikrotubuli zu den entgegengesetzten Spindelpolen gezogen. Gleichzeitig verlängern sich die Polfasern, und die Pole entfernen sich voneinander. Es beginnt die Bildung der Teilungsfurche, an welcher die Abschnürung der Tochterzellen erfolgt. In der Telophase ist dieser Vorgang bereits weit fortgeschritten, es erfolgt die Dekondensation des Chromatins und parallel bildet sich wieder eine Kernmembran. Der Ablauf des Zellzyklus unterliegt einem Regulationssystem, welches den Eintritt von Zellen mit unvollständig repliziertem genetischen Material in die Mitose oder unter ungünstigen Bedingungen in die S-Phase verhindert. Dies wird über G1, G1/S, S und G2/M-Phase-spezifische *cyclin dependent kinases* (CDK) sichergestellt, die durch Zellzyklus-abhängig exprimierte Cycline aktiviert werden können (Satyanarayana *et al.* 2009).

1.9 HIV-1 Rev und DDX3

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) gehört zur Familie der Retroviren und ist Auslöser des *acquired immunodeficiency* Syndroms (AIDS). HIV-1 bindet über Oberflächen-präsentierte Glycoproteine hauptsächlich an Rezeptoren von Makrophagen (CCR5, CD4) oder CD4-positiven T-Zellen (CXCR4, CD4). Nach Fusion mit der Wirtszelle gelangen so das HIV-1 RNA-Genom sowie verschiedene virale Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase, Ribonuclease, Protease) in die Wirtszellen. Die einzelsträngige virale RNA wird revers transkribiert und mit Hilfe der Virus-eigenen Integrase als doppelsträngige DNA in das Genom der Wirtszelle integriert. Eine Transkription der proviralen DNA erfolgt mit Hilfe zellulärer Transkriptionsfaktoren. Die daraus resultierende Prä-mRNA wird gespleißt, aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert und dort die viralen regulatorischen Proteine Rev, Tat und Nef translatiert. Zur erfolgreichen Replikation von HIV-1 müssen auch ungespleißte und einfach oder mehrfach gespleißte Derivate des initialen proviralen Transkripts aus dem Zellkern exportiert werden. Diese kodieren für virale Verpackungsproteine, und das ungespleißte Transkript wird als HIV-1-Genom in die neuen Viruspartikel verpackt (Harris *et al.* 2000). Das HIV-1 Rev-Protein ermöglicht den Export unfertiger viraler mRNAs aus dem Zellkern (s. Abb.15) und unterstützt deren Translation im Zytoplasma (Cullen 2003). Im Normalfall werden unfertige Prä-mRNAs durch mRNA-prozessierende Faktoren im Zellkern zurückgehalten, um entweder komplett gespleißt oder degradiert zu werden (Luo *et al.* 1999; Stutz *et al.* 2000; Zhou *et al.* 2000). Der nukleäre Export von ungespleißter und einfach oder mehrfach gespleißter HIV-1-mRNA ist von einer *cis*-aktiven RNA-Sequenz, dem *Rev response element* (RRE), abhängig, welche spezifisch vom HIV-1 Rev-Protein gebunden

wird (Malim *et al.* 1989). Das HIV-1 Rev-Protein besteht aus zwei getrennten funktionellen Domänen. N-terminal wird die Bindung an das RRE, die Multimerisierung sowie die nukleäre Lokalisation des Proteins vermittelt. Der C-Terminus enthält ein Leuzin-reiches NES (75 LQLPPLERLTL 85 ; (Kjems *et al.* 2000; Hauber 2001), welches gemeinsam mit RanGTP über die Bindung an den Exportrezeptor Crm1 den Export des Rev-RNA-RNP Komplexes vermittelt.

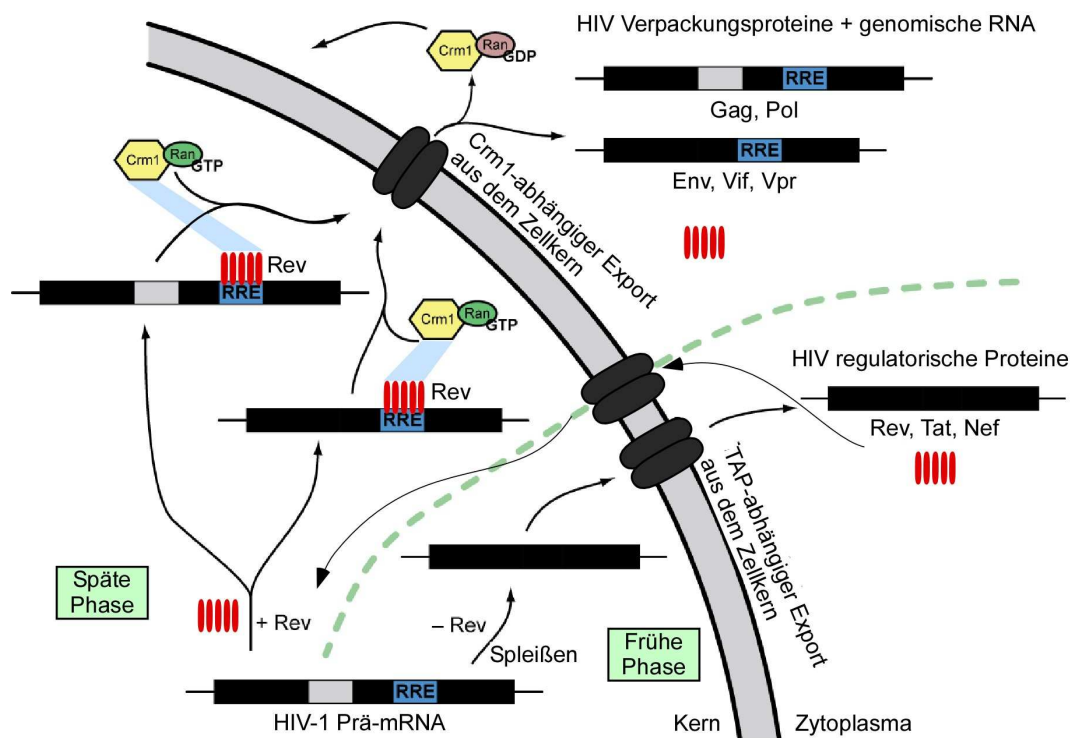


Abb. 15. Bedeutung des HIV-1 Rev-Proteins für den Export viraler RNA

Die nach der reversen Transkription integrierten viralen Sequenzen werden von der zellulären Transkriptionsmaschinerie transkribiert, und es entsteht das provirale Transkript (HIV-1 Prä-mRNA). In der frühen Phase der HIV-1-Replikation wird die vollständig gespleißte virale RNA in Abhängigkeit von TAP aus dem Kern exportiert, und es kommt zur Translation der regulatorischen Proteine Rev, Tat und Nef. In der späten Phase gewährleistet das HIV-1 Rev-Protein, nach Rücktransport in den Zellkern, den Crm1-abhängigen Export von ungespleißter und ein- bis mehrfach gespleißter HIV-1-RNA, von welcher unter anderem die viralen Verpackungsproteine Gag, Pol und Env sowie die akzessorischen Proteine Vif und Vpr translatiert werden. Verändert nach I. Vossman.

Ein essentieller zellulärer Kofaktor für den Export des aus Crm1, HIV-1 Rev und viraler RNA bestehenden Komplexes ist die RNA-Helikase DDX3 (*DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked*). Als Mitglied der DEAD-Box RNA Helikase-Familie enthält DDX3 alle neun typischen Sequenzmotive (s. Abb.16). Dazu gehören das ATP-Bindemotiv (Q/I/II), ein ATP-Hydrolysemotiv (III), mehrere RNA-Bindemotive (Ia/Ib/IV/V) sowie ein weiteres Motiv VI mit vermuteter Funktion in ATPase und RNA-Entwindungs-Aktivitäten (Rocak *et al.* 2004; Cordin *et al.* 2006; Hoggom *et al.* 2007). DEAD-Box Helikasen sind von der Transkription bis zum Abbau an allen die RNA betreffenden Prozessen beteiligt (Cordin *et al.* 2006).

DDX3 spielt eine Rolle bei der Protein-Translation, der Regulation der Transkription, als Tumorsuppressor, in der Kontrolle des Zellzyklus und wird darüberhinaus von HIV-1 und HCV zu deren Replikation benötigt. Es interagiert mit Spleißfaktoren und mRNPs. (Übersicht in (Schroder 2010)). Eine mittels *antisense*-RNA herbeigeführte Herabregulation der DDX3-Expression inhibiert die Replikation von HIV-1, was DDX3 zu einem interessanten Therapietarget hinsichtlich einer HIV-1 Infektion macht. Weiterhin vermag das virale *trans-activator of transcription*-Protein (Tat) die Expression von DDX3 zu steigern, d.h. das Virus sorgt selbst für einen effizienten Export seiner RNA (Yedavalli *et al.* 2004). Die Nukleotid-Bindestelle von DDX3 als Angriffspunkt für eine neue Klasse von HIV-1-Therapeutika ist Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen (Maga *et al.* 2008; Garbelli *et al.* 2011; Maga *et al.* 2011). Die Interaktion zwischen dem Kofaktor DDX3 und Crm1 erfolgt anscheinend nicht über das intrinsische DDX3-NES (As 9-21), sondern über eine im C-Terminus befindlichen Bereich (As 260-517). DDX3 ist widersprüchlicherweise als rein zytoplasmatisches oder sowie ebenfalls als im Kern lokalisiertes Protein beschrieben, welches mit Crm1 wie auch mit HIV1-Rev aus Zelllysaten immunpräzipitiert werden kann, wobei eine *in vitro*-Bindung von DDX3 an Rev bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte (Owsianka *et al.* 1999; Yedavalli *et al.* 2004). Die Behandlung mit dem Exportinhibitor LMB führt zu einer unvollständigen Anreicherung im Zellkern, was zusätzlich einen alternativen, Crm1-unabhängigen Exportweg für DDX3 suggeriert (Yedavalli *et al.* 2004; Lai *et al.* 2008).

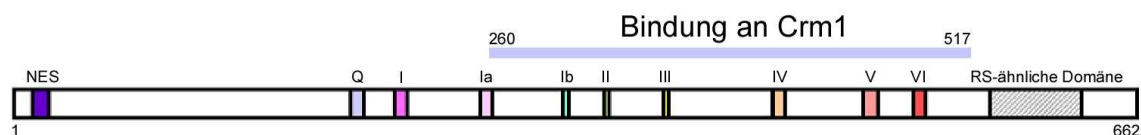


Abb. 16. Schematische Darstellung von DDX3

DDX3 enthält alle neun typischen Sequenzmotive der RNA Helikase-Familie (Q/II/Ia/Ib/III/IV/V/VI). Zusätzlich ist N-terminal ein NES vorhergesagt und im C-terminalen Bereich befindet sich eine RS-ähnliche Domäne. Der für die Bindung an Crm1 essentielle Bereich erstreckt sich von Aminosäure 260-517. Verändert nach (Owsianka *et al.* 1999; Cordin *et al.* 2006).

C-terminal enthält DDX3 von As 582 bis 632 eine an den Aminosäuren Arginin (R), Serin (S) und Glycin (G) reiche Domäne. Diese ähnelt den aus wiederholt oder verteilt liegenden SR-Dipeptid-Wiederholungen bestehenden Bereichen sogenannter SR-Proteine, welche hauptsächlich als Spleißfaktoren fungieren, und wird daher als RS-ähnliche-Domäne bezeichnet (Owsianka *et al.* 1999). RS-Domänen können die subzelluläre Lokalisation sowie den nukleo-zytoplasmatischen Transport von SR-Proteinen beeinflussen (Cazalla *et al.* 2002). Des Weiteren sind Arginin- und Glycin-reiche Proteinsequenzen in der Lage Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen zu vermitteln, wie auch die subzelluläre Lokalisation zu beeinflussen (Kavanagh *et al.* 2005). Die genauen Mechanismen des nukleo-

zytoplasmatischen Transports von DDX3, die Art der Interaktion mit Crm1 sowie deren physiologische Auswirkungen sind jedoch bisher noch nicht hinreichend bekannt (Schroder 2010). Ein verbessertes Verständnis der molekularen Funktionsweise von DDX3 könnte jedoch neue Ansatzpunkte für mögliche antivirale Therapien liefern.

1.10 Nukleo-Zytoplasmatischer Transport als therapeutischer Angriffspunkt

Crm1-abhängiger nukleo-zytoplasmatischer Transport stellt einen grundlegenden Mechanismus für das Überleben gesunder Zellen sowie von Krebszellen dar. Eine Nutzung als therapeutische Zielstruktur ist daher als eher schwierig zu anzusehen, es sei denn, eine ausschließliche Beeinflussung der Krebszellen und nicht der gesunden Zellen oder die spezifische Hemmung eines zu transportierenden Proteins wären gewährleistet. Einen Ansatzpunkt könnten daher spezifische zelluläre Kofaktoren bieten, die den Transport nur einzelner, ausgewählter Proteine modulieren. Es wäre weiterhin denkbar, Transport-Prozesse zur gezielten Gabe von Therapeutika auszunutzen, indem man diese beispielsweise an Transport-Signale koppelt und somit eine gezielte Wirkung in spezifischen Zellkompartimenten wie dem Zellkern erzielt (Kau *et al.* 2004; Faustino *et al.* 2007).

1.11 Transport-Biosensor-System

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein eigens in der Arbeitsgruppe entwickeltes Transport-Biosensor-System verwendet, um neue Inhibitoren des Crm1-abhängigen Exports aus dem Zellkern zu finden (s. Abb.17). Das System bietet die Möglichkeit, Protein- bzw. NES-spezifische Inhibitoren zu finden wie auch Inhibitoren, die gegen Crm1 gerichtet sind. Der Transport-Biosensor ist ein Fusionsprotein, welches sich aus einem NLS, der Gluthation-S-Transferase (GST), dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und einem NES zusammensetzt. Dieses Fusionsprotein wird nach Transfektion in eukaryotischen Zellen exprimiert und aufgrund der kodierten Transportsignale aktiv in den Zellkern importiert sowie exportiert. Der Einbau von GST in den Transport-Biosensor verhindert dessen passive Diffusion in der Zelle (Stauber *et al.* 2001). Die Fluoreszenzmarkierung mittels GFP ermöglicht die Visualisierung des Transport-Biosensors durch Fluoreszenzmikroskopie. Die Kombination der beiden Transportsignale wurde derart gewählt, dass das Protein im Grundzustand im Zytoplasma lokalisiert. Das ‚stärkere‘ NES bedingt diese Gleichgewichts-Lokalisation, obwohl der Transport-Biosensor weiterhin kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma wandert. Durch Zugabe des Crm1-Inhibitors LMB kommt es zu einer Inhibition des Exports, und das NLS vermittelt die Akkumulation des Transport-Biosensors im Zellkern.

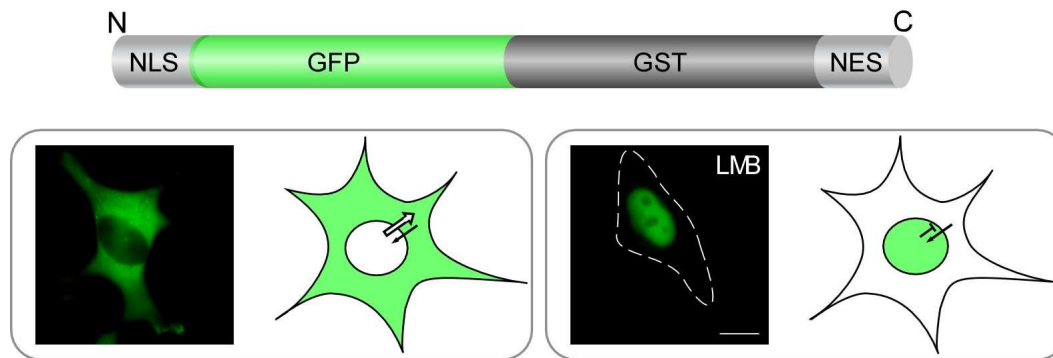


Abb. 17. Modularer Aufbau des Transport-Biosensors und dessen Lokalisation in HeLa-Zellen

Der Transport-Biosensor ist ein modular aufgebautes Fusionsprotein, bestehend aus NLS, GFP, GST und einem im Vergleich zum NLS ‚stärkeren‘ NES. Nach Transfektion in HeLa-Zellen lokalisiert der Transport-Biosensor im Zytoplasma, wird aber ständig in den Zellkern importiert und exportiert. Nach Inkubation mit dem Crm1-Inhibitor LMB und Hemmung des aktiven Exports akkumuliert der Transport-Biosensor über das intrinsische NLS im Zellkern. Maßstabsbalken, 10µm.

Die Lokalisation des Transport-Biosensors ist nicht Zelltyp-spezifisch, wird nicht durch Fixierung beeinflusst und lässt sich robust detektieren. Daher eignet sich dieses System hervorragend für die Anwendung in Hochdurchsatz-Analysen (Knauer *et al.* 2005). Der Kombination von NLS und NES liegen im Vorfeld durchgeführte Klassifikationsstudien zur kinetischen Einteilung unterschiedlicher Transportsignale zugrunde (Heger *et al.* 2001). Für den RevNES-Biosensor wurde das SV40 large T-antigen-NLS mit dem HIV-1 RevNES kombiniert. Der SurvivinNES-Biosensor enthält das AP5-NLS mit dem SurvivinNES. Die Verwendung des jeweiligen NES in Kombination mit NLS-GFP-GST anstatt von Volllänge-Proteinen umgeht deren oftmals zytotoxische Effekte. Der Vorteil von Lebendzell-basierten Systemen ist die Untersuchung im komplexen Umfeld der zellulären Stoffwechselprozesse. Somit bietet das Transport-Biosensor-System die Möglichkeit, Inhibitoren des nukleären Exports direkt in lebenden Zellen zu testen, und erlaubt auch die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Inhibition sowie die gleichzeitige Kontrolle auf zytotoxische Effekte. Das Transport-Biosensor-System eignet sich zur Verwendung in der Hochdurchsatzanalyse, wie es bereits mit 96well-Platten demonstriert werden konnte (Knauer *et al.* 2005).

1.12 Hochdurchsatzanalyse, Hits und Leads

Zur zeitlich effektiven Untersuchung einer hohen Anzahl von Substanzen hinsichtlich ihrer Aktivität in einem bestimmten Assay werden sogenannte Hochdurchsatzanalysen, auch als *high throughput screening* (HTS) bezeichnet, durchgeführt. Die Substanzen liegen dabei in Arrayform, also in 96/384 oder 1536well-Platten, in einer sogenannten Substanz-Bibliothek vor und werden beim HTS meist in einem *in vitro*-Assay ebenfalls in Arrayform getestet (Bleicher *et al.* 2003). *High content screening* (HCS) wurde erst durch die Automatisierung

der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht. Definiert ist HCS als die Automatisierung von ‚hoch-gehaltigen‘ zellbiologischen Untersuchungen von Zellproben, die in einer Arrayform vorliegen. Dazu gehört das experimentelle Design, die Probenvorbereitung, die Bildaufnahme und Archivierung, die Bildprozessierung und Analyse sowie die Gewinnung von zellbasiertem Wissen. Grundlegend ist dabei die Integration eines automatisierten Mikroskops mit einer computergesteuerten Software, die zur Auswertung numerische Daten aus den Mikroskopbildern generiert (Abraham *et al.* 2004). Ein passender funktioneller Assay, welcher ein stabiles Signal mit geringem Hintergrund und hoher Reproduzierbarkeit gibt, ist dabei essentiell für eine erfolgreiche Hochdurchsatzanalyse. Ein solcher Assay wird auch als robust bezeichnet (Pepperkok *et al.* 2006; Knauer *et al.* 2011). In der Pharmaforschung werden Hochdurchsatzanalysen zur Identifizierung neuer Substanzen herangezogen, welche dann als Ansatz zur Entwicklung neuer Medikamente dienen (s. Abb.18). Dabei wird zunächst in der Grundlagenforschung eine Zielstruktur bestimmt. Diese muss therapierbar (*druggable*) sein, was bedeutet, dass eine gezielte Modulation durch eine Fremdsubstanz möglich ist (Bleicher *et al.* 2003). Im Fall der Entwicklung eines Krebstherapeutikums sollte sich die Zielstruktur nur in den Krebszellen befinden und nicht in normalen Zellen. Beim HTS/HCS werden *Hits* bestimmt, die eine Aktivität in dem verwendeten Assay zeigen. Aktive *Hits* werden evaluiert und gehen als Leitstrukturen (*Leads*) in die weitere Entwicklung ein. Nicht alle *Hits* bieten sich dabei als Leitstrukturen an, die neben der eigentlichen Aktivität, in Hinblick auf die Applikation, positive biophysikalische Eigenschaften mit sich bringen sollten (*activity and drug-metabolism/pharmacokinetic* (DMPK) Profil) (Alanine *et al.* 2003). Die auf Aktivität und Verträglichkeit optimierte Substanz wird in präklinischen Tests schließlich Toxizitätsstudien unterzogen, wozu die Bestimmung des *structure-activity-relationships* (SAR) und die Bestimmung der Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion (ADME) im Organismus gehören. Erfolgreiche Substanzen gehen dann in die klinische Testung ein (Bleicher *et al.* 2003).



Abb. 18. Schematischer Ablauf einer Therapeutikum-Entwicklung

Verlauf der Therapeutikum-Entwicklung von der Identifizierung der Zielstruktur über die Hochdurchsatzanalyse zur Leitstruktur und zu Toxizitätsstudien bis hin zu klinischen Tests.

Hits oder *Lead*-Strukturen können auch durch rein computerbasierte und zunächst nicht validierte *in silico*-Hochdurchsatzanalysen oder gezieltem Moleküldesign gefunden werden.

Extrakte aus Naturstoffen, die eine Mischung vieler Substanzen enthalten, können auch als Quelle für neue *Hits* oder *Lead*-Strukturen genutzt werden.

1.13 ChemBioNet-Bibliothek

Die ChemBioNet-Bibliothek des ChemBioNet-Netzwerks für akademische Forschung in der chemischen Biologie ist eine ‚Mehrzweck‘-Bibliothek, um akademischen Nutzern einen kostenbegrenzten Zugang zur Suche nach chemischen Strukturen für unterschiedliche Zielstrukturen zu erlauben (Lisurek *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu gibt es sogenannte fokussierte Bibliotheken, die im Hinblick auf die untersuchte Zielstruktur, z.B. eine Protein-Familie, zusammengestellt wurden, was aber im Gegenzug auch deren Nutzbarkeit einschränkt. Die ChemBioNet-Bibliothek besteht aus 16.671 Substanzen, die nach den Lipinski-Regeln (*‚Rule of five‘*) zusammengestellt wurden. Die Regeln wurden ursprünglich erstellt, um aus primären *Hits* einer Hochdurchsatzanalyse solche zu entfernen, die keine *drug-likeness* besitzen. *Drug-likeness* bedeutet, dass die Substanz sich zur Weiterentwicklung zum Therapeutikum eignet und neben der primären Aktivität gegen die Zielstruktur auch zur *in vivo*-Absorption/Penetration benötigte Eigenschaften mit sich bringt. Nach den *‚Rule of five‘* sollte eine Substanz weniger als 5 Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren, ein Molekulargewicht unter 500g/mol, einen logP (Partitionskoeffizient, Maß für die Lipophilie) unter 5 und nicht mehr als 10 Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptoren besitzen, um schlechte Absorption/Penetration zu vermeiden (Lipinski *et al.* 1997; Lipinski *et al.* 2004). Die Regeln wurden zur Erstellung der ChemBioNet-Substanzbibliothek angewendet, um einen hohen Anteil von wahrscheinlich bioaktiven Substanzen zu erhalten, die biologische Membranen passieren können. Dies ist grundlegend für eine Verwendung in zellulären Assays. Das durchschnittliche Molekulargewicht der ChemBioNet-Substanzen beträgt 388g/mol, und 80% davon sind durch ein Molekulargewicht zwischen 300 und 500g/mol charakterisiert. Keine Substanz verfügt über mehr als fünf Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren und akzeptiert mehr als zehn Wasserstoffbrückenbindungen. Weniger als 90% der Substanzen verfügen über mehr als zehn rotationsfähige Bindungen. Es wurde auf eine möglichst ausgeglichene Abdeckung des ‚chemischen Raumes‘ und somit eine hohe chemische Diversität geachtet (Lisurek *et al.* 2010).

1.14 Zielsetzung

Die Kompartimentierung eukaryotischer Zellen in Zellkern und Zytoplasma erlaubt den Ablauf spezialisierter biochemischer Reaktionen, welche auch die Grundlage für deren höhere Entwicklung darstellen. Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnten die molekularen Grundlagen der Kern-Zytoplasma-Transportprozesse noch immer nicht vollkommen entschlüsselt werden.

Neben unterschiedlichen molekularbiologischen Analysemethoden stellt die Identifizierung chemischer Inhibitoren zur Entschlüsselung dieser Prozesse einen zentralen Ansatz des Forschungsfeldes der „chemischen Biologie“ dar. Neben einem verbesserten mechanistischen Verständnis von Transportvorgängen könnten Transportinhibitoren die gezielte Lokalisation und damit eine funktionelle Regulation (patho)biologischer Genprodukte erlauben. Somit ist auch eine mögliche Weiterentwicklung derartiger Hemmstoffe zu therapeutischen Zwecken denkbar.

Um die Erforschung solcher Ansätze im Sinne der „chemischen Biomedizin“ voranzutreiben, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Projektziele bearbeitet werden:

1. Entwicklung und Anwendung zell-basierter Biosensoren, welche die systematische Identifizierung chemischer Transportmodulatoren für (patho)biologische Genprodukte erlaubt.
2. Aufbau einer Mikroskopie-basierten Hochdurchsatzanalyse-Plattform.
3. Anwendung der Technologie zur Durchmusterung chemischer Bibliotheken.
4. Identifizierung sowie chemisch-/biologische Charakterisierung identifizierter Transportmodulatoren.

Ausgehend vom aktuellen Kenntnisstand sowie von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe sollten dabei vor allem das krebsrelevante zytoprotektive Protein Survivin sowie die virologisch hochrelevanten Proteine DDX3 und HIV-1 Rev bearbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 9. Geräte

Geräte	Hersteller/Vertrieb
Agarosegelsystem: PerfectBlue horizontales Minigelsystem S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Böblingen
Autoklav 5050 ELV	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Bestrahlungsgeräte: Typ CDCK 4905 gammaCell 2000	GE Healthcare, München Molsgaard Medical, Dänemark
Brutschrank Bakterien INE500	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Brutschrank Zellkultur HERAcell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Drehrad für 1,5ml Reaktionsgefäße Stuart SB2	Barloworld Scientific Ltd., Stone UK
Einfrierhilfe Nalgene Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eismaschine AF 100	Scotsman, Mailand, Italien
Elektronische Mehrkanal-Dispenser-Pipetten, Research Pro	Eppendorf, Hamburg
Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR	Cawo, Schrobenhausen
Expositionskassette	Cawo, Schrobenhausen
Flaschenaufsatz-Dispenser Ceramus-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Fluoreszenzmikroskop Hochdurchsatz, ArrayScanVTI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop invers, Axiovert 200M mit Colibri system (365/470/530/590nm)/Halogenlampe HXP 120/AxiocamMRm/ Powershot A640 Objektive: EC Plan Neofluar 40x/0.75 A Plan 5x/0.12 LD Plan Neofluar 20x/0.4 EC Plan Neofluar 100x/1.3 oil EC Plan Neofluar 40x/1.3 oil Plan Apochromat 63x/1.4 oil Filtersätze: 38/43/46/49/62HE aufgerüstet mit dem Mikromanipulationssystem AIS2: - elektronische Steuerung Objekttisch: SM-5 - Druckluftregler für Mikroinjektion FemtoJet - Inkubationskammer - motorisierter Objekttisch	Carl Zeiss, Jena Canon, Neu-Isenburg Carl Zeiss, Jena Luigs&Neumann, Ratingen Eppendorf, Hamburg EMBL, Heidelberg Luigs&Neumann, Ratingen
Fluoreszenzmikroskop invers, Eclipse TE200	Nikon GmbH, Düsseldorf
Fluoreszenz Messgerät, Fluoroscant Ascent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geldokumentation Multi Genius	Syngene, Cambridge, UK
Gelgießschiene PerfectBlue Mini S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Heiz- und Kühlblock für Eppis, Thermomixer comfort/5436	Eppendorf AG, Hamburg
Heizplatte Zellkultur – Hotplate, VWR600	VWR International GmbH, Darmstadt
Inkubationsschüttler WS10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Koloniezählgerät – ColonyCounter	Oxford Optronix, Oxford, UK
Gefrierschrank –20°C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe Siemens, München
Kühl-/Gefrier-Kombination	Liebherr Holding GmbH, Biberach
Kühlzentrifuge Eppis 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge Falcons Multifuge IL-R Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Laborschüttler und Inkubationsschüttelschrank Certomat	Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop, invers TMS (5x/10x/20x/40x)	Nikon GmbH, Düsseldorf
Lumineszenz Messgerät, Luminoscan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer Ikamag RCT	Ika, Staufen
Magnetrührer Speedsafe HI 180 C-2	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Micropipette Puller Modell P-97	Sutter Instrument Co., USA
Mikrowellenherd M730	Philips Deutschland GmbH, Hamburg
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
PCR-Cycler T-personal	Biometra, Göttingen

pH-Meter MP200	Mettler-Toledo GmbH, Steinbach
Photometer: Biophotometer Nano-Drop 2000	Eppendorf AG, Hamburg Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten Pipetman	Gilson Inc, Middleton, USA
Pipetten, elektronisch, Mehrkanal Research Pro	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Polyprep Säulen	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Proteingelelektrophoreseapparatur, Mini Protean II	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Rollerschüttler Stuart SRT6	Keison, Chelmsford, UK
Rotationsschüttler Rocky 3D	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Schüttelinkubator K2 260 basic	IKA, Staufen
Sonifizierer Sonoplus mini20/HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spannungsgerät Western Blot: Power Pac 200/Universal	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Spannungsgerät DNA Elektrophorese: EV 222	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spannungsgerät Protein Elektrophorese: EV231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spülmaschine Professional G7883CD	Miele, Gütersloh
Sterilbank Hera Safe	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Stickstofftank Arpege 170	German-Cryo, Jüchen
Tank-Elektroblotter PerfectBlue Web S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tiefkühlagergerät HFU, Hera freeze	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tisch-Zentrifuge, Micro Centrifuge	CARL ROTH GmbH + CO. KG, Karlsruhe
Ultrazentrifuge Avanti J-20	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UV Tisch TFX-35M	Biometra, Göttingen
UVC-Strahler Spot 30 Zubehör Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuum Zentrifuge DNA plus	Heto-Holten A/S, Allerød, Denmark
Vakuum-Apperatur Plasmid Präparation	Qiagen GmbH, Hilden
Vortexer VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage – Feinwaage ABT 120-5DM	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Waage PCB	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Wasserbad Bakterien: LKB 2019 multiheat	Pharmacia, Bromma, Schweden
Wasserbad Zellkultur: Polystat cc3	Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg
Zellzähler Casy I – Modell TT Schärfe Systems	Innovatis AG, Reutlingen
Zentrifuge Eppis – pico 17 Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tab. 10. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
Acrylamid Rotiphorese Lösung 40%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
AlamarBlue Cell Viability Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	AppliChem GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol, Riedel de Haen	Honeywell Specialty Chemicals GmbH, Seelze
Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside (X-Gal)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau (BPB)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloramphenicol (Chl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Complete, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
dGTP (Verwendung im Pulldown)	PEQLAB Biotechnologie GmbH Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DNase	Qiagen, Hilden
DNA Marker 2-log/1kb/100bp	New England BioLabs, Ipswich, USA
Doxizykin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DRAQ5	Axxora Deutschland GmbH, Lörrach
ECL plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt

Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol vergällt mit 1% MEK	AppliChem GmbH, Darmstadt
Formalin Lösung 4%(w/v)	JT Baker, Deventer, Niederlande
Giemsa	Merck, Darmstadt
Glutathion Sepharose 4B Beads	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Glycerin 87% zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hoechst (Bisbenzimid) H33342 H33258 Riedel de Haen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München Honeywell Specialty Chemicals GmbH, Seelze
Imatinib (Gleevec)	Novartis, Basel, Schweiz
Isopropanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid IPTG	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kanamycin (Kan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LeptomycinB (LMB)	Axxora Deutschland GmbH, Lörrach
Magermilch-Pulver (MMP)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NP-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PFA 4% in PBS	USB, Cleveland, USA
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PonceauS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Protein Marker PageRuler Prestained Protein Ladder +	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trizol	Invitrogen, Darmstadt
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tab. 11. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller/Vertrieb
Agarplatten	Greiner Bio-one, Frickenhausen
AGFA G153 Entwickler	AGFA Graphics, Düsseldorf
AGFA G354 Fixierer	AGFA Graphics, Düsseldorf
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Dialyse-Schlauch SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmal Wägeschalen	Neolab, Heidelberg
Einmalspritzen	Codan Medical, Rodby, Dänemark
FACS-Filter	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
FACS-Röhrchen (5ml Polystyrene round bottom tube)	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Falcons (15/50ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Filterspitzen	Ratiolab, Dreieich
Gewebekulturplatten (96/6well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Glas-Kapillaren Mikroinjektion: borosilicate glass capillaries, GC120TF-10, #30-0050, 1,2mm O.D x 0,94mm I.D.	Harvard Apparatus Ltd, Holliston, USA
Handschuhe MaiMed Sensitiv Safeskin Nitrile	Maimed, Neuenkirchen Kimberly Clark, Koblenz
Immersionsöl Immersol 518F	Carl Zeiss, Jena

Kryoröhrchen Nalgene	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Medical X-Ray Film Fuji Super RX	Fischer – Solutions, Medical Imaging, München
Mikroskopieschälchen	Mattek Corporation, USA
Parafilm M	VWR, Darmstadt
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
PCR Reaktionsgefäße	Biozym Scientific, Hess.Oldendorf
Pipetten (2ml)	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Pipetten (5/10/25ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Greiner Bio-one, Frickenhausen
Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membran	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Reaktionsgefäße (Eppi)	Greiner Bio-one, Frickenhausen Ratiolab, Dreieich
Rotilabo Blotting Papier	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Sterilfilter Millex	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
UV Küvette micro	Brand, Wertheim
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (µclear TC)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien

Tab. 12. Material Zellkultur

Material	Hersteller/Vertrieb
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco (Invitrogen, Darmstadt)
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Darmstadt
Penicillin Streptomycin (Pen Strep)	Gibco (Invitrogen, Darmstadt)
L-Glutamin 200mM	Gibco (Invitrogen, Darmstadt)
Foetal Bovine Serum	Gibco (Invitrogen, Darmstadt)
Geneticin G 418-BC (50mg/ml)	BiochromAG, Berlin
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) 1M	Gibco (Invitrogen, Darmstadt)
Natriumbicarbonat 7,5%	PAA Laboratories, Pasching Österreich
Calciumchloride 2M	Eppendorf, Hamburg
MEM Non Essential Aminoacids (NEAA)	Gibco (Invitrogen, Darmstadt)
Puromycin	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tab. 13. Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
6x Ladepuffer DNA	Bromphenolblau 0,25% v/v Xylencyanol 0,25% v/v Glycerinl 50% w/v EDTA 100mM
Coomassie Entfärbelösung	200ml Methanol 100ml Essigsäure 700ml H ₂ O
Coomassie Lösung	0.2% Coomassie G250 10% Essigsäure 40% Methanol 49,8% H ₂ O
LB-Amp Agarplatten	LB Agar mit 100µg/ml Ampicillin
LB-Amp Medium	LB Medium mit 100µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Chl Agarplatten	LB Agar mit 100µg/ml Ampicillin und 34µg/ml Chloramphenicol
LB-Amp-Chl Medium	LB Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 34µg/ml Chloramphenicol
LB-Kan Agarplatten	LB Agar mit 50µg/ml Kanamycin
LB-Kan Medium	LB Medium mit 50µg/ml Kanamycin
PBS	4.3mM Na ₂ HPO ₄ 1.4mM KH ₂ PO ₄ 137mM NaCl 2.7mM KCl, pH 7,4

Ponceau S Lösung	1g Ponceau S 50ml Essigsäure ad 1l H ₂ O
RIPA (<i>Radio Immuno Precipitation Assay</i>)-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 7,4 150mM NaCl 0,1% SDS 1mM EDTA 1% Natriumdeoxycholat 1% Triton X-100 1x complete protease inhibitor
SDS Gelelektrophorese Puffer 10x	60g Tris 288g Glycin 20g SDS ad 2l
SDS Ladepuffer 6x	3.5ml 1M Tris/HCl pH 6,8 3ml β -Mercaptoethanol 1g SDS 3ml Glycerol 200 μ l 1% (w/v) Bromophenolblau 10ml H ₂ O
SOB-Medium	2% Pepton 0,5% Bacto Yeast Extrakt 0,1M NaCl 0,01M MgCl ₂ oder MgSO ₄
TAE 50x	Tris 2,0M NaAc 1,0M EDTA 50mM, pH 8,0
TBjap (<i>Transformation buffer japanese</i>)	Pipes 10mM CaCl ₂ 15mM KCl 250mM pH auf 6,7 einstellen MnCl ₂ 55mM, sterilfiltrieren
Wet Blot 10x Premix	30g Tris 144g Glycin ad 1l
Wet Blot 1x	100ml 10x Premix 200ml Methanol 700ml H ₂ O

Tab. 14. Antikörper

Antikörper	Wirt	Anwendung	Blockierung	Bande (kDa)	Detektion	Hersteller
Crm1 (sc-7825)	Ziege	1:1000, üN 4°C	Rotiblock	113	ECL +	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
GFP (sc-8334)	Hase	1:5000, üN 4°C/1h RT	5% MMP in PBS	27	ECL	
HA (MMS-101R)	Maus	1:1000, üN 4°C	5% MMP in PBS	9	ECL +	Covance, München
<i>cleaved</i> -Caspase 3 (9661)	Hase	1:2000, üN 4°C	5% MMP in TBS	17/19 (35)	ECL +	Cell Signaling Inc., Danvers, MA, USA
Aktin (A2066)	Hase	1:5000, üN 4°C/1h RT	5% MMP in PBS	42	ECL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PARP (556362)	Maus	1:1500, üN 4°C	5% MMP in PBS	113/89	ECL +	BD Pharmingen, Heidelberg
p53 (sc-263)	Maus	1:2000, 1h RT	5% MMP in PBS	43	ECL	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Survivin (NB500-205)	Maus	1:2000, üN 4°C	5% MMP in PBS	16	ECL	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
DDX3 (A300-475A)	Hase	1:5000, üN 4°C	5% MMP in PBS	73	ECL +	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA
MausIgG-HRP (sc-2005)	Ziege	1:5000, 1h RT	Sekundär-Antikörper			Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
HaselIgG-HRP (sc-2004)	Ziege	1:5000, 1h RT				

MMP-Magermilchpulver

2.1.1 Plasmide

2.1.1.1 Prokaryotischer Expressionsvektor pGEX-GFP

Zur Expression rekombinanter Proteine in Bakterien wurde der von Rosorius *et al.* modifizierte Vektor pGEX (Rosorius *et al.* 1999), ursprünglich pGEX-3X von Pharmacia Biotech (Freiburg) heute von GE healthcare (Freiburg), verwendet. (s. Abb.19). Ausgehend von dem Tac-Promotor werden in *E.coli* Fusionsproteine exprimiert, die N-terminal hinter die Gluthation-S-Transferase (GST) und C-terminal vor das grün fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert sind.

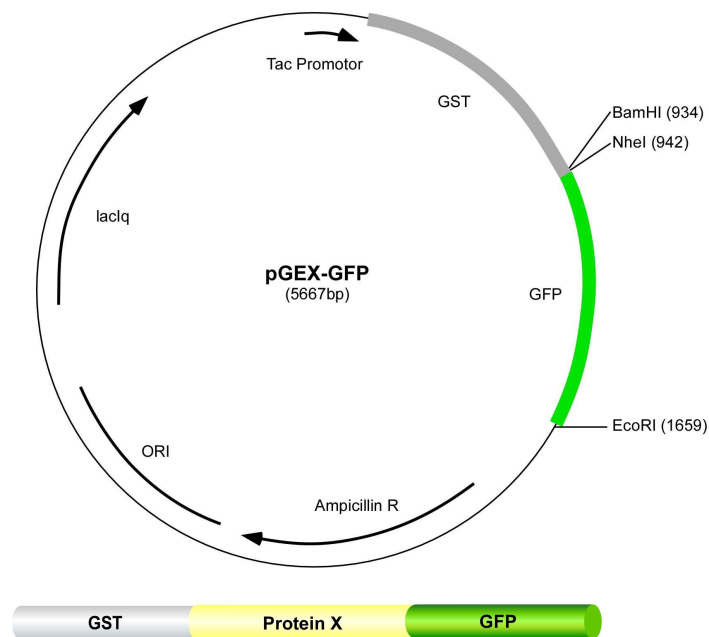


Abb. 19. Vektorkarte pGEX-GFP und schematischer Aufbau des Fusionsproteins

Vektorkarte des pGEX-GFP-Vektors mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen, Ampicillin-Resistenzgen und dem lacIq-Leserahmen. Die prokaryotische Expression eines zwischen GST und GFP integrierten Gens wird durch den Tac-Promotor reguliert. Darunter ist schematisch das exprimierte Protein gezeigt. GST- Gluthation-S-Transferase (26kDa), Protein X – beliebiges Protein, GFP – grün fluoreszierendes Protein (27kDa).

Die Expression ist in jedem *E.coli*-Wirt möglich, da das Plasmid ebenfalls für den lacIq-Repressor kodiert. Somit ist der Tac-Promotor durch Zugabe von IPTG aktivierbar. Weiterhin ist die Möglichkeit der Abspaltung des GST durch Zugabe von Factor Xa (GE healthcare, Freiburg) gegeben. Eine Selektion in *E.coli* ist durch Zugabe von Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml möglich. Die gewünschten codierenden Sequenzen wurden über die 5' BamHI- und 3' NheI-Schnittstellen eingefügt. Um den richtigen Leserahmen zu erhalten muss vor dem Startcodon das AC-Dinukleotid im Primer integriert werden.

2.1.1.2 Eukaryotische Expressionsvektoren pC3DNA3.1-GFP und pBI-EGFP-Insu

Der pC3DNA3.1-GFP-Vektor wurde zur Expression, ausgehend von dem humanen Cytomegalovirus *immediate-early* (CMV) Promotor, von GFP-Fusionsproteinen in

eukaryotischen Zellen verwendet (s. Abb.20). In den nach Rosorius *et al.* modifizierten Vektor (Rosorius *et al.* 1999) wurden die kodierenden Sequenzen über die 5' BamHI- und 3' NheI-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die Selektion in *E.coli* ist über die kodierte Ampicillin-Resistenz (100µg/ml Endkonzentration) und in eukaryotischen Zellen über die Neomycin-Resistenz (Geneticin G-418, 0,4mg/ml Endkonzentration) möglich.

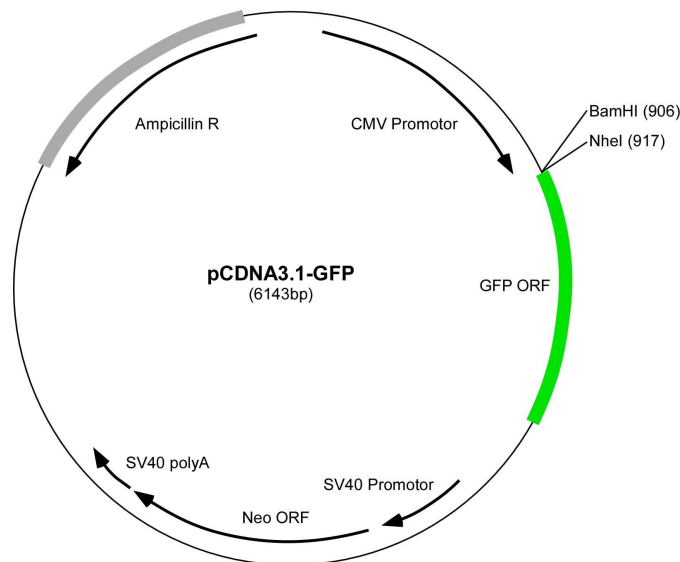


Abb. 20. Vektorkarte pC3DNA3.1-GFP

Vektorkarte des pC3DNA3.1-GFP Vektors mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen, Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgenen. Die eukaryotische Expression eines Gens in N-terminaler Fusion zu GFP wird durch den CMV-Promotor reguliert.

Zur bidirektionalen Expression ausgehend von zwei minimalen CMV-Promotoren wurde der Vektor pBI-EGFP (Clontech, Ludwigshafen) in der von PD Dr. E. Bockamp (ZMG, Institut für Toxikologie, Mainz) veränderten Version (pBI-EGFP-Insu) verwendet (s. Abb.21). Das veränderte Plasmid enthält zusätzlich zwei 800bp lange Insulator-Sequenzen, die dem 3'-Bereich der humanen β -Globingen-Domäne entsprechen. Dieser Sequenzbereich ist DNaseI-hypersensitiv und weist viele Topoisomerase II-Bindestellen auf (Fleenor *et al.* 1993; Fukumura *et al.* 1998; Trost *et al.* 2005). Im Ausgangszustand verfügt das Plasmid über einen offenen Leserahmen für EGFP und ein von PD Dr. E. Bockamp eingesetztes Protein. Die Klonierung in diesen Vektor erfolgte mit den Enzymkombinationen NotI/SalI und MluI/AvrII. Die eukaryotische Expression von pBI unterliegt beiderseits einem Tetrazyklin-responsiven Element (TRE), welches 5' vor den minimalen Promotoren liegt. An dieses TRE bindet das Tetrazyklin-Transaktivator-Protein (tTA) im Tet-Off-System oder das reverse Tetrazyklin-Transaktivator-Protein (rtTA) im Tet-On-System. Bei Zugabe von Tetrazyklin oder verwandten Derivaten wird im Tet-Off-System die Expression ausgeschaltet, weil Dox-gebundenes tTA nicht mehr am TRE binden kann, und im Tet-On-System wird die Expression gestartet, weil erst Dox-gebundenes rtTA an das TRE binden kann. Die pBI-Vektorkonstrukte wurden in Zelllinien transfiziert, die stabil tTA (HtTA-Zellen) oder rtTA

(HRL9-Zellen) exprimieren. Die Expression wurde durch Zugabe von Doxizylin in einer Konzentration von 2µg/ml kontrolliert.

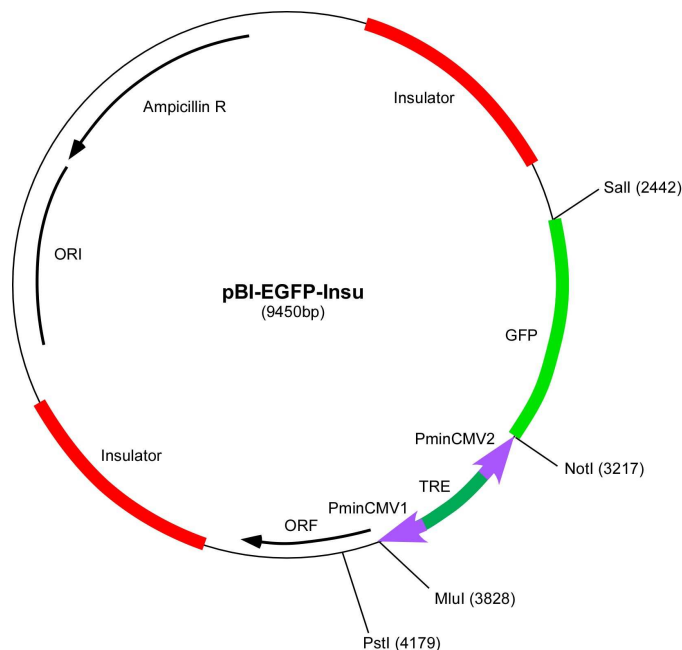


Abb. 21. Vektorkarte pBI-EGFP-Insu mit Insulator-Sequenzen

Für die Klonierung zur bidirektionalen Expression in eukaryotischen Zellen wurde der Vektor pBI-EGFP-Insu verwendet. In Rot sind die Insulator-Elemente, in Grün das TRE und in Lila die beiden minimalen CMV-Promotoren markiert.

2.1.1.3 Vektor zur retroviralen Transduktion eukaryotischer Zellen

Zur Herstellung rekombinanter Retroviren wurde der modifizierte Vektor pINCO (Grignani *et al.* 1998) verwendet (s. Abb.22). Dieser verfügt über das Puromycin-Resistenz-Gen unter der Kontrolle des PCK1-Promotors, den EBV-*origin of replication*, das EBNA1-Gen zur Replikation als Episom in einer Kopienzahl von 5-20 Plasmiden pro Zelle und eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in *E.coli*. Zwischen den Moloney-LTRs (*long terminal repeats*) liegt die ψ -Sequenz (Verpackungssignal für die Produktion von Viren) und ein CMV-Promotor, der die Expression des GFP kontrolliert. Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurde die CMV-GFP-Sequenz mit EcoRI/NotI entfernt und durch die Sequenz des Translokations-Biosensors ersetzt.

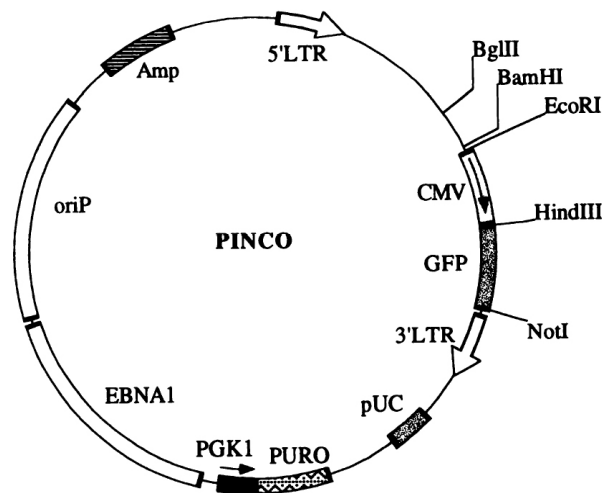


Abb. 22. Vektorkarte pINCO

Integrate wurden in den pINCO-Vektor anstelle der CMV-GFP-Sequenz zwischen den beiden LTRs eingesetzt. Die mit diesem Konstrukt hergestellten Retroviren übertragen bei der Transduktion von Zellen nur die Sequenz von 5' LTR bis 3' LTR. Vektorgraphik entnommen aus (Grignani *et al.* 1998).

2.1.1.4 Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy

Der Vektor pGEM[®]-T Easy von Promega (Madison, USA) wurde als Zwischenvektor bei der Klonierung genutzt. PCR-Produkte, die mit Taq-Polymerasen hergestellt werden, verfügen an den 3' Enden über Adenin Überhänge, die zur direkten Ligation in den Vektor genutzt werden können. Polymerasen mit *proofreading*-Aktivität (z.B. *Pfu*, *Pwo*) generieren PCR-Produkte mit glatten Enden, die vor der Ligation zunächst dem *A-tailing* unterzogen werden müssen. PCR-Produkte der verwendeten Kits von Roche (Mannheim) konnten alle direkt zur Ligation in den pGEM[®]-T Easy verwendet werden. Die Selektion in *E.coli* ist durch Zugabe von Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml möglich. Weiterhin bietet der Vektor die Möglichkeit der Blau-Weiß-Selektion. Bei Verwendung von LB-Amp-Agarplatten, die 0,5mM IPTG und 80µg/ml X-Gal enthalten, können Klone mit einem Integrat-enthaltenden pGEM-Vektor über eine weiße Färbung der Kolonie identifiziert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide sind in Tab.15 aufgeführt.

Tab. 15. Plasmide

Name	Herkunft
Prokaryotische Expressionsvektoren	
pGEX-RevNES-GFP	diese Arbeit
pGEX-RevNESM10-GFP	diese Arbeit
pGEX-HIV-1 Rev-GFP	diese Arbeit
pGEX-SurvivinNES-GFP	(Stauber <i>et al.</i> 2006)
pGEX-RanQ96L	diese Arbeit
Eukaryotische Expressionsvektoren	
pC3-Crm1-GFP	diese Arbeit
pC3-Crm1 _{C528S} -GFP	diese Arbeit
pC3-Crm1-HA (/Myc)	diese Arbeit
pC3-Crm1 _{C528S} -HA	diese Arbeit
pC3-HIV-1 Rev-BFP/GFP	diese Arbeit
pC3-SV40NLS-GST-GFP-RevNES	(Knauer <i>et al.</i> 2005)
pC3-AP5NLS-GST-GFP-SurvNES	(Knauer <i>et al.</i> 2005)
pC3-SV40NLS-GST-mCherry-RevNES	diese Arbeit
pC3-SV40NLS-GST-BFP-RevNES	diese Arbeit
pC3-AP5NLS-GST-mCherry-SurvNES	diese Arbeit
pC3-AP5NLS-GST-BFP-SurvNES	diese Arbeit
pC3-DDX3-GFP	diese Arbeit
pC3-DDX3 Δ NES1-GFP	diese Arbeit
pC3-DDX3Nterm-GFP (-HA/-Myc/-Stop)	diese Arbeit
pC3-DDX3Cterm-GFP (HA)	diese Arbeit
pC3-DDX3Cterm _{long} -GFP	diese Arbeit
pC3-DDX3Cterm1 st half-GFP	diese Arbeit
pC3-DDX3Cterm2 nd half-GFP	diese Arbeit
pC3-DDX3Nterm Δ NES1-GFP	diese Arbeit
pC3 E1B GFP	(Kzhyshkowska <i>et al.</i> 2001)
pBI-R _{Ch} S _{GFP}	diese Arbeit
pBI-S _{GFP} R _{Ch}	diese Arbeit
pBI-S _{GFP} H2B _{BFP}	diese Arbeit
pBI-H2B _{BFP} S _{GFP}	diese Arbeit
pBsRev14-16F25	(Stauber <i>et al.</i> 1998)
pBABE-Puro	Addgene (Cambridge, MA, USA)
Vektoren zur retroviralen Transduktion	
pINCO-SurvivinNESsensor	diese Arbeit
pINCO-RevNESsensor	diese Arbeit

2.1.2 Bakterienstämme

Tab. 16. Bakterienstämme und deren Genotypen

Bakterienstamm	Genotyp
<u><i>E. coli</i> Top10</u>	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG
<u><i>E. coli</i> BL21</u>	B F ⁻ dcm ompT hsdS (rB ⁻ mB ⁻) gal (DE3) 2
<u><i>E. coli</i> RosettaTM 2(DE3) SinglesTM Competent Cells</u> (Merck, Darmstadt)	F ⁻ ompT hsdS _B (rB ⁻ mB ⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam ^R)

2.1.3 Oligonukleotide

Tab. 17. Oligonukleotide

Name	Nr	Sequenz	Verwendung
Sequenzierprimer			
PC3 ⁺ SEQU	462	CAACTAGAAGGCACAGTCGAG	3', pC3 von 3' in Integrat
PC3-F-SEQU	479	GGAGGCTATATAAGCAGAGCTC	5', pC3 von 5' in Integrat
GST3 ⁺ SEQU	485	GCCTTTGCAGGGCTGGCAAG	5', Ende GST Richtung 3'
GFP5 ⁺ SEQU-NEW	511	GTGGCATCGCCCTCGCCCTC	3', Anfang GFP Richtung 5'
GFP3 ⁺ SEQU-NEW	512	GTGCTGCTGCCGACCAACCAC	5', Ende GFP Richtung 3'
P5 GST SEQ500	1642	GCATTTGTATGAGCGCGATG	5', Anfang GST Richtung 3'
seq_3ddx3short	1878	TTTGAGGTAGAGCCAACCTCTTCC	3', in DDX3 Richtung 5'
seq_5ddx3short	1879	TTTGACTTGATGGCTTTGTGCC	5', in DDX3 Richtung 3'
Crm1 seq for	2148	GTCTCTCTGAAGTGCCTCACTGAG	5', in Crm1 Richtung 3'
Crm1 seq rev	2149	CAGCGACCATCTGTGGATCATTGGATCG	3', in Crm1 Richtung 5'
pBI seq I	2288	GCGTCGAGTGAAGACGAAAGG	3', pBI Rückgrat
pBI seqII	2294	TGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA	5', pBI von 3' in Integrat2
Seq GST nach 5'	2399	GCACAAGGCCCTTAATTTTCC	3', GST nach 5'
SEQ PINCO 5'	2417	CCCGGGGGTGGACCATCC	5', pINCO von 5' in Integrat
SEQ PINCO 3'	2418	GGTGGGGTCTTTTCAATCCCC	3', pINCO von 3' in Integrat
P5_SEQ_MCHERRY	1598	CACCATCGTGGAAACAGTACG	5', Ende mCherry Richtung 3'
P3_SEQ_MCHERRY	1599	CTCCATGTGCACCTGAAGC	3', Anfang mCherry Richtung 5'
Klonierungsprimer			
p5SOE_Rev_Bam-	1839	GATTAGTGAACGAATCCTTAGCACTTATC	5', SOE pC3_Rev_GFP
p3SOE_Rev_Bam-	1840	GATAAGTGCTAAGGATTCGTTCACTAATC	3', SOE pC3_Rev_GFP
p3_N_Revneu	1854	AAAGCTAGCTCCTGCACCATTTCTCTTAG	3', pC3_Rev_GFP
p3_E_Rev_Stopneu	1855	TTTGAATTCCTTAATTTCTTTAGTTCTCTGAC	3', pC3_Rev_GFP
p5_B_Rev_Nhe-	1936	TTTGGATCCACATGGCTAGGAGGAAAG	5', pC3_Rev_GFP
p3N_DDX3	1842	AAAGCTAGCGTTGCCCAACCACTCAACC	3', pC3_DDX3_GFP
p5_DDX3_Bam_neu	1994	TTTGGATCCACATGAGTCACGTCGCAGTG	5', pC3_DDX3_GFP
DDX3_NES1DEL (FOR)	1969	TTTGGATCCACATGAACCTCTCAGATAATCAGAGTG	5', pC3_DDX3ANES1_GFP
p5_DDX3_Bam_Cterm_long	1995	TTTGGATCCACATGGAAGAGGAAAGATTGGC	5', pC3_DDX3_Ctermlong_GFP
p3_Nhe_Cterm_1sthalf	2012	TTTGCTAGCGCCAAAGGTTTCTACACGTCCTGACGACCAATACG	3', pC3_DDX3_Cterm_1 st half_GFP
p5_Bam_Cterm_2ndhalf	2013	TTTGGATCCACATGATGTACATCGTATTGGTCGTACGGGACG	5', pC3_DDX3_Cterm_2 nd half_GFP
P5N_MCHERRY	1595	TTTGCTAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC	5', mCherry Insert Nhe/Kpn
P3K_MCHERRY	1597	TTTGGTACCTTTGTACAGCTCGTCCATGC	3', mCherry Insert Nhe/Kpn
OLIGO3STOPFORNHE	2085	CTAGCTGATTGATCGAGTTTTCGGCAAGG	5', Oligoannealing, Stopcodon in pC3
OLIGO3STOPPREVECO	2086	AATTCTTGGCCGAAAACCTCGATCAATCAG	3', Oligoannealing, Stopcodon in pC3
OLIGOMYCFORNHE	2087	CTAGCGAGCAGAACTTATCTCTGAAGAAGACCTATAAG	5', Oligoannealing, Myc-tag in pC3
OLIGOMYCREVECO	2088	AATTCTTATAGGTCTTCTCAGAGATAAGTTTCTGCTCG	3', Oligoannealing, Myc-tag in pC3
OLIGOHA_FORNHE	2089	CTAGCTATCCATACGACGTGCCAGACTACGCTTGAG	5', Oligoannealing, HA-tag in pC3
OLIGOHAAREVECO	2090	AATTCTCAAGCGTAGTCTGGCAGCTCGTATGGATAG	3', Oligoannealing, HA-tag in pC3
p5_Crm1_Bam	2131	AAAGGATCCCCATGCCAGCAATTATGACAATGTTAG	5', pC3_Crm1_GFP
p3_Crm1_Nhe	2132	TTTGCTAGCATCACATTTCTCTGGAATCTCATG	3', pC3_Crm1_GFP
p5SOE_Crm1_C528S	2285	CTATTAGGATTATCTGAACAGAGAAAG	5', SOE pC3_Crm1 _{C528S} _GFP
p3SOE_Crm1_C528S	2286	CTTTTCTGTTCAGATAATCCTAATAG	3', SOE pC3_Crm1 _{C528S} _GFP
p5_Mlul_Revsens	2275	TTTACGCGTACCATGCCACCTAAGAAAAAAGAAAGG	5', pBI_RevCherry1
p3AvrII_Revsens	2276	TTTCTAGGTTATCCAAGAGTAAGTCTCTCAAGCG	3', pBI_RevCherry1
invp3_NotI_Survsens	2287	aatGCGGCCGACCATGCCAAGAGGCGCTTATGAAG	3', pBI_SurvGFP2
invp5_SalI_Survsens	2278	AAAGTCGACCTAaAGGGTAAATCTTCAAACTGC	5', pBI_SurvGFP2
p5_Mlul_Surv_sens	2385	TTACGCGTACCATGCCAAGAGGCGCTTATGAAGAAAACCGG	5', pBI_SurvGFP1
p3_AvrII_Surv_sens	2386	TACCTAGGCTAAGGGTTAATCTTCAAACCTGCTTCTGACGCCGG	3', pBI_SurvGFP1
invp3_NotI_Revsens	2387	AATGCGGCCGACCATGCCACCTAAGAAAAAAGAAAGGTTGAAG	3', pBI_RevCherry2
invp5_SalI_Revsens	2388	AAGTCGACCTATCCAAGAGTCAGTCTCTCAAGCGGTGG	5', pBI_RevCherry2
for_RevNES_M10	2546	GATCCATGGGCTTACGTACCAACCGGACCTGAGACTTACTCTTGGAG	5', pC3_RevNESM10_GFP
rev_RevNES_M10	2547	CTAGCTCCAAGAGTAAGTCTCAGGTCGGTGGTAGCTGAAGGCCCATG	3', pC3_RevNESM10_GFP
for_RevNES	2554	GATCCATGGGCTTACGTACCAACCGGCTTACGAGACTTACTCTTGGAG	5', pC3_RevNES_GFP
rev_RevNES	2555	CTAGCTCCAAGAGTAAGTCTCTCAAGCGGTGGTAGCTGAAGGCCCATG	3', pC3_RevNES_GFP
for_RevNES_GEX	2556	GATCCACATGGGCTTACGTACCAACCGCTTACGAGACTTACTCTTGGAG	5', pGEX_GST_RevNES_GFP
rev_RevNES_GEX	2557	CTAGCTCCAAGAGTAAGTCTCTCAAGCGGTGGTAGCTGAAGGCCCATGTG	3', pGEX_GST_RevNES_GFP
for_RevNES_M10_GEX	2558	GATCCACATGGGCTTACGTACCAACCGGACCTGAGACTTACTCTTGGAG	5', pGEX_GST_RevNESM10_GFP
rev_RevNES_M10_GEX	2559	CTAGCTCCAAGAGTAAGTCTCAGGTCGGTGGTAGCTGAAGGCCCATGTG	3', pGEX_GST_RevNESM10_GFP
invp3_H2B_not	2619	AAAGCGGCCGACCATGCCAGAGCCAGCGAAGTCTGC	5', pBI_H2BBFP_2
invp5_H2B_sal	2620	TTTGTGACCTATTACTTGACAGCTCGTCCATGCCGTG	3', pBI_H2BBFP_2
p5_H2B_Mlul	2621	TTTACGCGTACCATGCCAGAGCCAGCGAAG	5', pBI_H2BBFP_1
p3_H2B_AvrII	2622	TTTCTAGGTTACTGTACAGCTCGTCCATGCCG	3', pBI_H2BBFP_1
RealTimePCR-Primer			
Crm1_for II	2552	GTAAACAAGCTGTTCAATTCATGC	5', Crm1
Crm1_rev II	2553	CAAAATTTTCATCAATAAATGGCATCACTTC	3', Crm1
HPOL2A_FOR	2133	GCACCAGTCCAATGACAT	5', hDNAPol2
HPOL2A_REV	2134	GTGCGGCTGCTTCCATAA	3', hDNAPol2

2.1.4 Zelllinien

Tab. 18. Zelllinien

Name	Beschreibung	Medium
HeLa	humane Zervikalkarzinomzellen	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
293T	humane embryonale Nierenzellen, Adenovirus immortalisiert	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
A431	humane epidermoide Karzinomzellen	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
HRL9	Derivat von HeLa-Zellen, exprimieren reversen Transaktivator rtTA	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
HtTA	Derivat von HeLa-Zellen, exprimieren Transaktivator tTA	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
FaDu	humane Kopf-Hals-Tumorzellen	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin, 1%NEAA, 1%HEPES, 0,15% Natriumbicarbonat
MDA-MB 231	humane Brust Karzinomzellen	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
RKO	humane Kolonkarzinomzellen	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
HCT116 wtp53	humane Kolonkarzinomzellen, wildtyp p53 Expression	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
K562	humane akute myelozytische Leukämie, BCR-ABLb3-a2 Fusionsgen	RPMI, 20%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
Kasumi	humane akute myeloische Leukämie AML1-ETO Fusionsgen	RPMI, 20%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
SupB15	humane prä-B-Zell Leukämia ALL Variante des BCR-ABLe1-a2 Fusionsgens	RPMI, 20%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
NMuMG (NM18)	murine epitheliale Zelllinie der Brustdrüse, Subklon NM 18	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin, 10µg/ml Insulin
Vero	epitheliale Zelllinie aus einer Affen-Niere	DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin
LS174T	humane Kolonkarzinomzellen	RPMI, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin

2.1.5 Programme/Computergestützte Analysen

Tab. 19. Programme

Programm	Referenz/Hersteller/Internetseite
AxioVision 4.7/4.6.2	Carl Zeiss, Jena
BioEdit	(Hall 1999), http://bioedit.software.informer.com/
BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Canvas 9.0.4	ACD Systems International Inc, Victoria, British Columbia, Canada
CompIC Inject v.5.0.1	Cellbiology Trading, Hamburg
EndNote X.0.2	Thomson Reuters, New York, USA
FileMaker Pro 8.5	FileMaker GmbH, Unterschleißheim
GeneCards	http://www.genecards.org/index.shtml
GeneConstructionKit V2.5.13	Textco Inc., West Lebanon, USA
Light Cycler Front v3.5.17 (Run v5.32, Data analysis v3.5.28, Graphworks v10.07)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Microsoft Office 2003/2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Oligonucleotide Properties Calculator	www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
PhotoShop5	Adobe Systems GmbH, München
ScanProsite-ExpASy Proteomics Server	http://expasy.org/tools/scanprosite/
vHCS Scan, vHCS View	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Arbeiten mit DNA und RNA

2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Bakterien müssen chemisch oder physikalisch vorbehandelt werden, um die Zellmembran für die Aufnahme von Makromolekülen zu permeabilisieren (Hanahan 1983). Ein Klon Top10, XL2 blue, BL21 oder Rosetta wurde in 10ml SOB-Medium über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator angezogen. Die Bakterienkultur wurde mit 200ml SOB-Medium aufgefüllt und bei RT weiter geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht war. Anschließend wurde die Kultur für 10min auf Eis inkubiert und dann für 10min bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80ml TBjap mit 2% DMSO resuspendiert und erneut für 10min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10min bei 4000rpm und 4°C) wurde das Pellet in 19ml TBjap mit 2% DMSO resuspendiert. Durch Zugabe von 1ml DMSO wurde die DMSO-Endkonzentration auf 7% eingestellt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die kompetenten Bakterien zu 100µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Nutzung wurden die kompetenten Bakterien bei –80°C gelagert.

2.2.2 Transformation

Transformation bezeichnet den Vorgang des Einbringens fremder DNA-Sequenzen in Bakterien. Diese Sequenzen liegen innerhalb von Plasmiden vor, die von den Bakterien ausgehend von spezifischen Promotoren repliziert werden können. Chemisch kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit einem Ligationsansatz oder 1µg Plasmid-DNA für 30min auf Eis inkubiert. Nach 30s Hitzeschock im 42°C Wasserbad wurde der Transformationsansatz für 1min auf Eis abgekühlt und auf LB-Agarplatten, die die zur Selektion benötigten Antibiotika enthielten, ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.2.3 Kryokonservierung von Bakterien

Zur dauerhaften Erhaltung können Bakterienklone bei –80°C gelagert werden. Hierfür wurden 10ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur bei 4600rpm für 5min zentrifugiert und das Pellet in 1ml sterilem Glycerin resuspendiert.

2.2.4 Plasmidpräparation aus Bakterien

Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden die Klone in LB-Medium mit den zur Selektion benötigten Antibiotika über Nacht kultiviert. Zur Überprüfung eines neu klonierten Plasmids wurden 5ml Kultur und zur Herstellung größerer Plasmid-Mengen 250ml Kultur angezogen. Zur Präparation von Plasmiden aus *E.coli* wurden die *Plasmid Mini* und *Maxi Kits* von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Bakterienkultur wurde bei 6000rpm für 5min zentrifugiert. Nach alkalischer Lyse der Zellen wurden die Plasmide unter Niedrig-Salz-

Bedingungen an die Silikamembran der Säulen gebunden und nach mehreren Waschschritten unter Hoch-Salz-Bedingungen eluiert. Bei der Maxi-Präparation erfolgte im Anschluss eine Isopropanol-Präzipitation. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

2.2.5 DNA-Restriktion

Restriktionsenzyme der Klasse II sind Endonukleasen, die doppelsträngige DNA an bestimmten Erkennungssequenzen spalten, und glatte DNA-Enden oder solche mit einem 3' oder 5' Überhang erzeugen. Plasmid-DNA wurde mit Enzymen der Firma New England BioLabs (Ipswich, USA) restringiert. Die DNA wurde mit dem vom Hersteller vorgegebenen Puffer versetzt und mit dem Enzym für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für eine Überprüfung neu generierter Klone wurden 1µg Plasmid-DNA mit 0,5µl Enzym in 10µl Gesamtvolumen angesetzt. Für die Präparation von Vektor-DNA für eine Ligation wurden 5µg DNA mit 2µl Enzym in 50µl Gesamtvolumen angesetzt.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA abhängig von deren Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA wandert aufgrund ihrer negativen Ladung im Agarosegel im elektrischen Feld zum positiven Pol. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte mit dem horizontalen Minigelsystem PerfectBlue S von der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen). Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde der Gehalt an Agarose in den Gelen variiert. Für ein 1%iges Gel (2%) wurden 1g Agarose (2g) mit 100ml 1xTAE Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml versetzt.

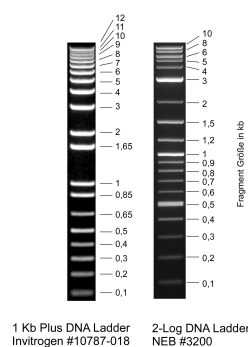


Abb. 23. Verwendete Molekulargewichtstandards

Banden der Molekulargewichtsstandards 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Darmstadt) und 2-Log DNA Ladder (New England BioLabs, Ipswich, USA).

Die DNA wurde vor dem Auftragen mit Ladepuffer vermischt und bei 80 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der DNA-Größe erfolgte über den Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard (s. Abb.23). Die Visualisierung erfolgte über Anregung des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids mit UV-Licht (260nm) und Aufnahme von

digitalen Bildern mit dem Geldokumentations-System Multi Genius von Syngene (Cambridge, UK). Banden spezifischer Größe z.B. bei einer Vektor-Präparation wurden über dem UV-Tisch ausgeschnitten.

2.2.7 Extraktion von DNA-Fragmenten/Aufreinigung von Restriktionen

Zur Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen oder zur Aufreinigung eines Restriktionsansatzes/Dephosphorylierungsansatzes von Salzen und Enzymresten wurde das QIAprep Spin Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Aufreinigung basiert auf dem Prinzip der DNA-Bindung an Silikamembranen unter Niedrig-Salz-Bedingungen und der Elution unter Hoch-Salz-Bedingungen. Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.8 Dephosphorylierung der 5'Enden

Um eine Re-Ligation des Zielvektors bei der Klonierung zu vermeiden, wurden dessen 5' Enden zuvor dephosphoryliert. Die lineare Vektor-DNA wurde mit dem benötigten Puffer und dem Enzym *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP, New England BioLabs, Ipswich, USA) für eine Stunde bei 37°C inkubiert, wobei nach 30min das Enzym erneut zugesetzt wurde. Alternativ wurde CIP dem Restriktionsansatz des Zielvektors zugesetzt, nachdem dieser schon für 30min inkubiert.

2.2.9 Auffüllen überstehender 5'Enden

Mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von New England BioLabs (Ipswich, USA) wurden bei Bedarf glatte Enden zur Klonierung hergestellt. Das aus proteolytischem Verdau entstandene Enzym kann DNA in 5' zu 3' Richtung auffüllen und verfügt zudem über eine 3' zu 5' Exonuklease Aktivität. Somit werden 5' überhängende Enden aufgefüllt und 3' überhängende Enden abgespalten. Die DNA wurde mit dem zugehörigen Puffer und 33µM dNTPs versetzt und mit dem Enzym für 15 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 20min bei 75°C deaktiviert, und die DNA aufgereinigt.

2.2.10 Oligo-Annealing

Zum Einfügen kurzer DNA-Fragmente in einen Vektor wurden die komplementären Oligonukleotide dieser Sequenz bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bestellt. Um eine direkte Integration in den enzymatisch aufgeschlossenen Ziel-Vektor zu gewährleisten, wurden die Oligonukleotide so entworfen, dass an den Enden des gewünschten Duplexes die richtigen Überhänge nach dem *Annealing* beider Einzelstränge entstehen. Zunächst wurden die Oligonukleotide phosphoryliert. Dazu wurden 1µl Oligonukleotid (100mM) mit 0,5µl 10mM dNTPs, 1µl 10xPuffer und 7µl *aqua dest* vermischt und mit 0,5µl des Enzyms T4-Polynukleotid-Kinase von New England BioLabs (Ipswich,

USA) versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die beiden Ansätze vereinigt und in ein Becherglas mit kochendem Wasser eingestellt. Wenn das Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden die entstandenen Oligonukleotid-Duplexe zur Ligation eingesetzt.

2.2.11 DNA Ligation

Zur Ligation von linearisierter Vektor- und Insert-DNA über glatte und auch überhängende Enden wurde das Takara *DNA Ligation Kit Ver.2.1* von Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Es wurden 5µl DNA, bei einem Verhältnis von 0,5:2 von Vektor- zu Insert-DNA, mit 5µl Takara-Premix versetzt. Die Ligations-Reaktion wurde für 2h bei 16°C unter leichtem Schütteln oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Der gesamte Ligations-Ansatz wurde zur Transformation von chemisch kompetenten Bakterien verwendet.

2.2.12 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von DNA und RNA lässt sich über die Absorption der Nukleobasen von UV-Licht der Wellenlänge 260nm bestimmen. Die Messungen wurden mit dem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) oder dem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Bei Verwendung des Biophotometers wurden die DNA-Proben je nach Bedarf verdünnt, um die Messung im Bereich einer $OD < 1$ durchführen zu können. Die Berechnung der Konzentration (c) erfolgte nach dem Lambert-Beer-Gesetz ($c = OD_{260nm} \cdot \epsilon$), wobei ϵ der molare Extinktionskoeffizient ist. Dieser ist wie folgt definiert: Eine OD_{260nm} von 1 entspricht 50ng/µl DNA bzw 40ng/µl RNA. Eine Überprüfung der Reinheit der Lösung ist über Bildung des Verhältnisses der Absorptionen bei 260nm und 280nm möglich. Die Absorption bei 280nm ist auf die aromatischen Aminosäuren von Proteinen zurückzuführen. Ein OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8 oder höher deutet auf eine reine DNA Lösung hin. Mit dem NanoDrop 2000 wurde jeweils 1µl der unverdünnten DNA-Lösung gemessen. Die Konzentration und die Reinheit wurden von der zugehörigen Software automatisch kalkuliert. Als Leerprobe wurde das Lösungsmittel verwendet, in dem die zu messenden (Deoxy-) Nukleinsäureproben vorlagen.

2.2.13 Primerdesign

Das Design neuer Primer erfolgte nach den folgenden Richtlinien:

- Länge der komplementären Sequenz um 18bp
- GC-Gehalt der Oligo-Deoxyribonukleotide um 50%
- Schmelztemperatur um 52-60°C
- keine einfache Di-Deoxyribonukleotid-Wiederholungen (z.B. TGTG)
- keine Purin-Folgen (z.B. AAAA)
- C oder G Di-Deoxyribonukleotid am 3' Ende des Primers

Für jeden Primer wurden Komplementarität mit sich selbst und mögliche *Hairpin*-Bildung mit Hilfe des Programms *OligoCalc* (*Oligonucleotide Properties Calculator*, www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) überprüft. Nach Möglichkeit wurden durch das Einbringen von stillen Mutationen in der DNA-Sequenz diese Eigenschaften verbessert. Sollten durch die Primer gezielt Restriktionsschnittstellen an die Enden eines DNA-Inserts einbracht werden, so wurde jeweils am 5' Ende ein AAA oder TTT Überhang angefügt, um die Zugänglichkeit für das Restriktionsenzym zu verbessern.

2.2.14 DNA-Amplifikation mittels PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach Mullis (Saiki *et al.* 1988) angewendet. Der zu amplifizierende Sequenz-Bereich wurde dabei, ausgehend von zwei flankierenden Primern, von der thermostabilen Taq-Polymerase unter Verwendung der zugesetzten Deoxynukleotide synthetisiert. In aufeinander folgenden Zyklen wurden die DNA-Doppelstränge zunächst bei 95°C denaturiert. Bei Abkühlen auf ~5°C unter Schmelztemperatur der Primer (*annealing* 52-65°C) lagerten sich diese an die zu ihnen komplementären Bereiche an. Ausgehend von den Primer-Enden wurde im nächsten Schritt von der Taq-Polymerase der komplementäre Strang synthetisiert. Bei der PCR wird DNA exponentiell amplifiziert, da mit jedem Zyklus mehr Matrizen zur Verfügung stehen. Zur Amplifikation von DNA bis zu einer Länge von 3kb wurde das *FastStart High Fidelity PCR System* (Roche, Mannheim) verwendet. DNA über 3kb wurde mit dem *Expand Long Template PCR System* (Roche, Mannheim) amplifiziert. Beide Anwendungen erfolgten nach Angaben des Herstellers in dem PCR-Gerät T-Personal (Biometra, Göttingen). Das verwendete Standard-PCR-Programm war:

95°C - 2min	
95°C - 30s	
52-65°C - 30s	} x 30-35
72°C - 30s-2min	
72°C - 2min	

2.2.15 Splice overlap extension-PCR

Die *splice overlap extension*-PCR (SOE-PCR) ist eine Methode zur *in vitro*-Mutagenese, bei der mittels PCR gezielte Punktmutationen in eine DNA-Sequenz eingefügt werden können (Horton *et al.* 1989). Im ersten Schritt wurden ausgehend von den Primern a/b und c/d die DNA-Sequenzen beiderseits der Mutationsstelle amplifiziert. Dabei enthielten die zueinander komplementären Primer b und c in ihrer Sequenz die Mutation, die im späteren Produkt vorhanden sein sollte. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt, und es wurde jeweils 1 µl davon als Matrize in der zweiten PCR eingesetzt. Hierbei wurden die Primer a/d zur Amplifikation der gesamten Sequenz verwendet. Das Produkt enthielt die gewünschte Punktmutation und wurde nach Restriktion der Enden zur Klonierung verwendet (s. Abb.24). Mit dieser Methode wurde die Crm1_{C528S}-Mutante erstellt.

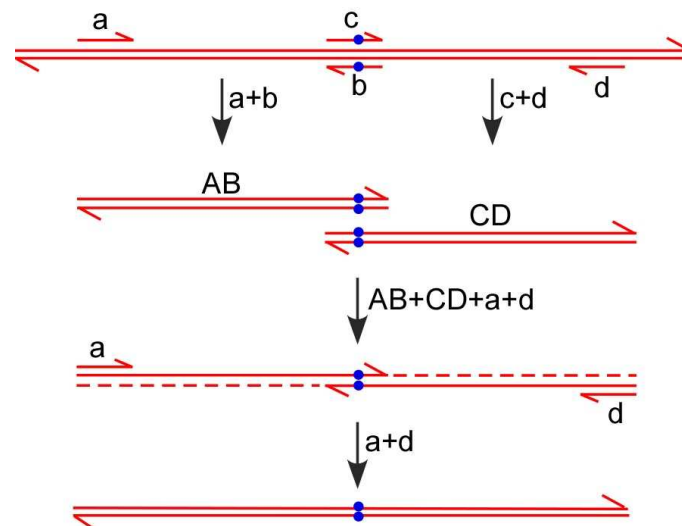


Abb. 24. Schematischer Ablauf einer SOE-PCR

Um gezielte Mutationen in eine DNA-Sequenz einzufügen, wurde die Methode der SOE-PCR verwendet. Hierbei wurden zunächst die Sequenzen beiderseits der Mutationsstelle amplifiziert, wobei die mittig liegenden Primer genau komplementär zueinander waren und die gewünschte Mutation, dargestellt als blauer Punkt, in ihrer Sequenz trugen. Nach Aufreinigung der beiden primären PCR-Produkte wurden diese als Template zur PCR nur mit den äußeren Primern eingesetzt. Das entstandene Produkt enthielt die gewünschte Punktmutation. Verändert nach (Horton *et al.* 1989).

2.2.16 Sequenz-Analyse

Die Sequenzier-Reaktion nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977) wurde von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt. Ausgehend von einem Primer erfolgt die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase bis zum Einbau eines Fluoreszenz-markierten Di-Deoxyribonukleotides, was zum Kettenabbruch führt. Dem Sequenzier-Ansatz wurden hierfür neben den normalen Deoxyribonukleotiden die vier Di-Deoxyribonukleotide mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung zugesetzt. Die unterschiedlich langen DNA-Stränge wurden anschließend mit dem ABI Prism 3730 Kapillarsequenzierer gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenzmarkierungen der ‚Synthesestücke‘ detektiert.

Zur Sequenzierung wurden 700ng DNA mit 10pmol Primer in 6µl Endvolumen versetzt. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit BioEdit V 7.0.9.0 (Hall 1999) ausgewertet und mit den virtuell vorliegenden Sequenzbereichen der entsprechenden Gene und Vektoren verglichen.

2.2.17 Extraktion von RNA aus Zellen

Zur Präparation von RNA aus Zellen wurde ein konfluent bewachsenes 6well oder eine 10cm-Schale verwendet. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen auf Eis gestellt, und es wurde 1ml Trizol pro $1 \cdot 10^7$ Zellen zugegeben. Unter regelmäßigem Schwenken wurde für 5-10min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde bei -80°C eingefroren oder direkt zur Präparation der RNA verwendet. Diese erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden). Der Trizol-Zellmischung wurde 1/5Vol Chloroform zugegeben und für 15s geschüttelt. Nach dreiminütiger Inkubation bei RT wurde die Probe zentrifugiert (12000 rpm, 4°C , 15min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 1Vol 70% Ethanol versetzt, welches unter Vortexen tropfenweise zugegeben wurde. Die RNA-Lösung wurde auf die RNeasy-Säulen gegeben. Nach Zentrifugation (8000rpm, 4°C , 30s) war die RNA an der Silica-Membran der Säule gebunden und das Lösungsmittel im Auffanggefäß. Die Säule wurde mit 350µl Puffer RW1 gewaschen (8000rpm, 4°C , 30s) und mit 80µl DNaseI Lösung (10µl DNaseI Stocklösung + 70µl RDD Puffer, *RNase free DNase Set*, Qiagen, Hilden) für 15min bei RT inkubiert. Die Säule wurde anschließend mit 350µl RW1 Puffer für 5min bei RT inkubiert und für 30s bei 8000rpm und 4°C zentrifugiert. Die RNA wurde zweimal mit 500µl Puffer RPE gewaschen (30s/2min, 8000/12000rpm, 4°C) und anschließend bei 12000rpm und 4°C für 1min getrocknet. Die Elution erfolgte mit 2x50µl DEPC- H_2O nach einminütiger Inkubationszeit bei RT und 8000rpm für 30s. Die Konzentrationsmessung erfolgte stets mit einer 1:100 verdünnten Probe.

2.2.18 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription von mRNA in cDNA wurde das *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Für eine Reaktion wurde 1µg RNA mit 1µl *anchor primer* und 2µl *random hexamer primer* in einem Endvolumen von 13µl für 10min bei 65°C inkubiert und anschließend direkt auf Eis überführt. Es wurden 4µl Reaktionspuffer mit 0,5µl RNase-Inhibitor, 2µl dNTP Mix und 0,5µl reverse Transkriptase vermischt und in dem PCR Gerät T-Personal (Biometra, Göttingen) dem 4kb-Programm unterzogen: 10min 25°C , 60min 50°C , 5min 85°C . Die Erststrangsynthese wurde bei -20°C gelagert.

2.2.19 Quantitative *Real Time*-PCR

Bei der quantitativen *Real Time*-PCR (qRT-PCR) wird in der exponentiellen Phase der PCR die Zunahme des Produkts durch Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green) in die DNA-Doppelstränge gemessen. Untersuchungen per *Real Time*-PCR wurden mit dem Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 0,5µl je Primer (10µM), 13µl *aqua dest*, 4µl Master Mix des LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR GreenI Kits (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und 2µl cDNA oder *aqua dest* vermischt und in die Kapillare gegeben. Bedienung und Bestimmung des CP-Wertes (*crossing point*/Schwellenwert) erfolgte mit der Light Cycler-Software. Der CP-Wert entspricht dem PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz der gebildeten DNA zum ersten Mal signifikant über dem Schwellenwert der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Dieser Wert gibt stellvertretend die Kopienzahl in der Probe wieder und wird gemeinhin zur Auswertung verwendet (Heid *et al.* 1996; Wong *et al.* 2005). Das relative Expressions-Verhältnis (Ratio, R) zwischen dem zu untersuchenden Gen (*target*) und dem Referenzgen (*ref*) wurde über folgende Gleichung errechnet:

$$R = \frac{2^{\Delta CP_{\text{target(control-sample)}}}}{2^{\Delta CP_{\text{ref(control-sample)}}}}$$

CP = *crossing point*/ Schwellenwert
target = Zielgen
ref = Referenzgen

Für die verwendeten Primer wurden die in Tabelle 20 aufgeführten PCR-Programme gefahren.

Tab. 20. Programme *Real Time*-PCR

Primer	Denaturierung	Amplifikation	Schmelzkurve
Crm1	95°C, 10min	95°C, 10s 60°C, 5s 72°C, 15s	95°C 65°C, 1min 95°C in 0,1% s
DNAPol2	95°C, 10min	95°C, 10s 60°C, 15s 72°C, 15s	95°C 65°C, 1min 95°C in 0,1% s

2.3 Arbeiten mit Proteinen

2.3.1 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Zur Herstellung rekombinant exprimierter Proteine wurden die gewünschten kodierenden Sequenzen in den von Rosorius *et al.* (Roriosius *et al.* 1999) modifizierten Vektor pGEX-3X, eingefügt und in *E.coli* BL21- oder RosettaTM2(DE3)-Zellen transformiert. Rosetta-Zellen enthalten ein zusätzliches Plasmid, welches für in *E.coli* selten vorkommende tRNAs codiert, wodurch die Expression eukaryotischer Proteine verstärkt wird. Beide Stämme enthalten die

T7 RNA-Polymerase unter Kontrolle eines lacUV5-Promotors, wodurch die Expression von Proteinen durch Gabe von IPTG induzierbar ist.

Zur Vorkultur wurde eine Kolonie in 50ml LB-Amp-Medium (BL21)/LB-Amp-Chl-Medium (Rosetta™2(DE3)) über Nacht bei RT auf dem Schüttler angezogen. Am nächsten Tag wurden 200ml LB-Amp-Medium/LB-Amp-Chl-Medium zugefügt und die OD₆₀₀ bestimmt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Proteinexpression durch Gabe von IPTG in einer finalen Konzentration von 0,2mM induziert. Nach 4-6 Stunden oder am nächsten Tag wurde die Kultur zentrifugiert (4°C, 20min, 3500rpm) und das Pellet entweder bei –20°C eingefroren oder direkt zur Gewinnung der GST-Fusionsproteine verwendet.

2.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Alle Arbeiten erfolgten stets auf Eis. Die Pellets aus 250ml Kultur wurden mit 10ml eiskaltem PBS Puffer mit 10µl DNaseI (Endkonzentration: 100µg/ml) und *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* resuspendiert und in ein 50ml Falcon überführt. Es wurden 26µl MnCl₂ (1M), 260µl MgCl₂ (1M) und eine Spatelspitze Lysozym zugegeben und für 15min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde dreimal für 10s sonifiziert und mit 1ml NaCl (5M) und 500µl 20% Triton X-100 in PBS versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer bei 14000rpm (30min, 4°C) pelletiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Falcon überführt. Es wurden 300µl Glutathion-Sepharose-Beads zugegeben und für 2h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden (3500rpm, 5min, 4°C) pelletiert, einmal mit 50ml 1% Triton X-100 in PBS und zweimal mit 50ml PBS gewaschen. Schließlich wurden die Beads in 5ml PBS resuspendiert und mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze in eine Polyprepsäule überführt. Nach dem Trockenlaufen der Säule wurde diese verschlossen und 1ml Elutionspuffer (150µl NaCl 5M, 250µl Tris 1M pH8, 4,6ml *aqua dest*, 0,023g Glutathion) zugesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation auf dem Schüttler bei RT wurde die Proteinlösung eluiert und in einen Dialyseschlauch (SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO von Thermo Fisher, Waltham, USA) gegeben. Nach 2-5h Dialyse in PBS wurde die Proteinlösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proteine wurden bei –80°C gelagert.

2.3.3 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinquantifizierung nach Bradford (Bradford 1976) basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 von 470 zu 595nm und der Zunahme des Extinktionskoeffizienten nach Komplexbildung mit den basischen Seitenketten der Proteine. Es wurden keine absoluten Konzentrationen bestimmt, sondern nur relative Konzentrationen, um Zell-Lysate in vergleichbarer Menge auftragen zu können.

Die BioRad Protein Assay (#500-0006)-Lösung wurde 1:5 mit *aqua dest* verdünnt. Es wurden 2-5µl Zell-Lysat mit 1ml verdünnter BioRad Protein Assay-Lösung versetzt und für 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595nm gegen einen Nullwert gemessen.

2.3.4 SDS-Page und Western Blot

Eine Auftrennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld ist nur möglich, wenn deren räumliche Struktur zerstört und die Eigenladungen demaskiert werden. Die Proteine wurden zunächst durch Aufkochen in SDS-Ladepuffer denaturiert. Das enthaltene β -Mercaptoethanol reduzierte dabei die Disulfidbrücken. Das im Gel und Elektrophoresepuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) hob nichtkovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken, hydrophobe Ww) auf und lagerte sich proportional zur Länge der Aminosäurekette an die Proteine an (~0,4g SDS/g Protein). Die dadurch entstandene einheitlich negative Ladung ließ die Proteine im elektrischen Feld, in Abhängigkeit ihrer Größe, zum positiven Pol wandern.

2.3.4.1 SDS-Proteingelelektrophorese und Western Blot

Für die Proteingelelektrophorese wurde das Mini Protean II System (BioRad, Hercules, CA, USA) verwendet. Die Spacer- und Glasplatten wurden gründlich mit Isopropanol gereinigt und in die Gelgieß-Apperatur eingespannt. Für ein Trenngel wurden 8ml Trenngelpuffer mit 80µl APS und 8µl TEMED vermischt. 7,5ml dieser Mischung wurden für ein 1,5mm dickes Gel zwischen die Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt. Für das Sammelgel wurden 5ml Sammelgelpuffer mit 50µl APS und 5µl TEMED vermischt und auf das Trenngel pipettiert. Der gewünschte Kamm wurde eingesetzt und nach vollständiger Polymerisation das Gel verwendet oder bei 4°C in mit Elektrophoresepuffer getränkten Tüchern für maximal 3Tage gelagert. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelpuffer sind in Tabelle 21 aufgelistet.

Tab. 21. Zusammensetzung Sammel- und Trenngelpuffer

	Sammelgel	Trenngel		
%igkeit des Gels	4%	10%	12%	16%
Acrylamid	6,7ml	16,5ml	19,8ml	26,4ml
Tris/HCl 0,5M pH 6,8	12,5ml	-	-	-
Tris/HCl 1,5M pH 8,9	-	12,5ml	12,5ml	12,5ml
10% SDS in <i>aqua dest</i>	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml
<i>aqua dest</i>	30,3ml	20,5ml	17,2ml	10,6ml

Protein-Proben wurden mit 5x oder 2x konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt, für 10min bei 95°C inkubiert und auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 50V im

Sammelgel und für 80V im Trenngel. Nach dem Lauf wurde das Gel aus den Glasplatten gelöst und für den Aufbau des Western Blots verwendet. Dieser wurde mit dem Tank-Elektroblotter PerfectBlue Web S (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Ausgehend von der schwarzen Seite der Blot-Kassette wurden eine Fasermatte, 2 Whatman-Papiere, das Gel, die PVDF-Membran, 2 Whatman-Papiere und eine Fasermatte gestapelt. Die PVDF-Membran wurde zuvor für eine Minute in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer geschwenkt. Die Whatman-Papiere wurden ebenfalls vor dem Zusammensetzen des Blots in Transferpuffer getränkt. Um Luftblasen zwischen Gel und Membran zu vermeiden, wurde mit einem Roller vorsichtig über den Stapel gestrichen. Der Blot wurde für 2h bei 100V mit maximal 0,3A oder über Nacht bei 30V durchgeführt.

2.3.4.2 Detektion von Protein-Banden mit Antikörpern und dem ECL-System

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1h auf dem 3D-Rollerinkubator bei RT in 5% Milchpulver in PBS oder TBS inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Bei Verwendung von Roti-Block als Lösungsmittel für den Antikörper wurde die Membran anschließend dreimal für 5min mit 0,1% Tween 20 in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte entweder in 5% Milchpulver in PBS oder TBS oder in Roti-Block über Nacht bei 4°C oder für 1-3h bei RT auf einem Schütteltisch. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 5min mit 0,1% Tween 20 in PBS/TBS gewaschen. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde in 5% Milchpulver in PBS/TBS verdünnt und für 1h bei RT auf dem Schütteltisch mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde 1x mit 0,1% Tween20 in PBS/TBS und 2x mit PBS/TBS gewaschen. Die Banden wurden mit dem ECL-System detektiert, bei dem ein Substrat der *horseradish peroxidase* (HRP) zugegeben wird, welches nach Oxidation durch die HRP ein chemilumineszentes Signal ergibt, das auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann. Für das ECL-System (GE Healthcare, Freiburg) wurden pro Membran 250µl Lösung I mit 250µl Lösung II vermischt und nach 1min auf die gut abgetropfte Membran gegeben. Bei Benutzung des ECL+-Systems (GE Healthcare, Freiburg) wurden 485,5µl Puffer mit 12,5µl Substrat vermischt, für 5min im Dunkeln inkubiert und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde zwischen zwei Lagen Klarsichtfolie gelegt, um ein trockenes Auflegen des Röntgenfilms zu gewährleisten. Die Entwicklungszeiten variierten je nach Signalstärke. Zur Entwicklung des belichteten Röntgenfilms wurde die Entwicklermaschine Cawomat 2000IR (Cawo, Schrobenehausen) verwendet.

2.3.4.3 Stripping

Zur Entfernung von Primär- und Sekundär-Antikörper der vorherigen Detektionsrunde wurde der Blot für 15min mit *Re-Blot Plus Strong*-Stripping-Lösung (Chemicon Hofheim; 1:10

verdünnt) auf dem 3D-Schüttler inkubiert und anschließend dreimal für 5min mit PBS gewaschen. Nach dem erneuten Blocken war die Membran für die Detektion eines anderen Antigens verwendbar.

2.3.4.4 PonceauS-Färbung des Western Blots

Die reversible Färbung des Western Blots mit PonceauS, welches reversibel positiv geladene Aminogruppen in Proteinen bindet, wurde bei Bedarf zur Kontrolle des Proteintransfers durchgeführt. Die Membran wurde bei RT 10min in PonceauS-Lösung geschwenkt. Nach Waschen in PBS wurden die Proteine auf der Membran sichtbar. Zur vollständigen Entfernung des PonceauS wurde die Membran mehrfach mit *aqua dest* gewaschen.

2.3.5 *In vitro*-Translation

Zur *in vitro*-Translation wurde der TNT T7 Quick Master Mix (Promega, Madison, USA) verwendet. Das Reticulozyten-Lysat wurde in der Hand aufgetaut und auf Eis gestellt. Es wurden 40µl davon mit 4µl 1mM Methionin, 2µg Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 50µl angesetzt. Nach Inkubation für 90min im 30°C Wasserbad wurde das Produkt aliquotiert und bei –80°C gelagert.

2.3.6 Pulldown-Assay

Für den Pulldown wurde zunächst rekombinantes Protein (GST-RevNES/SurvNES-GFP) wieder an Sepharose-Beads gebunden. Es wurden 100µl rekombinantes Protein mit 25µl Sepharose-Beads in PBS mit *complete EDTA-free protease inhibitor cocktail* für 30min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die dann proteintragenden Sepharose-Beads wurden zweimal mit 500µl PBS und einmal mit 500µl Bindepuffer gewaschen (3500rpm, 4°C, 1min). Für einen Pulldown-Ansatz wurden 25µl der beladenen Sepharose-Beads mit 20µl *in vitro*-translatiertem Crm1-HA/Crm1_{C538S}-HA, 5µl rekombinantes GST-RanQL in 500µl Bindepuffer für 4h oder 30min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Sepharose-Beads wurden dreimal mit 500µl Bindepuffer gewaschen (3500rpm, 4°C, 1min), wobei von dem Überstand nach der Inkubation 25µl für eine Kontrolle auf dem Gel aufgehoben wurde. Die Proteine wurden von den Beads durch Zugabe von 25µl 2x SDS-Ladepuffer und durch Aufkochen bei 95°C für 10min eluiert, auf ein 12% SDS-Gel geladen und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Kontrolle wurden auf jedem Gel 2µl *in vitro*-translatiertes Crm1-HA und 25µl des Überstands nach der Inkubation aufgetragen. Der Nachweis des von RevNES/SurvNES-GFP gebundenen Crm1-HA erfolgte mit dem HA-spezifischen Antikörper von Covance (HA.11, MMS-101R, Covance Inc., München). Die *Bead*-Beladung wurde anschließend mit dem GFP-Antikörper (sc-8334, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg) überprüft.

2.4 Arbeiten mit Säugerzellen

2.4.1 Kultivierung von Säugerzellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C mit 5% CO₂-Atmosphäre gehalten. Abhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen 2-3 Mal pro Woche passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und durch PBS ersetzt. Nach Entnahme des PBS wurde Trypsin zugegeben, so dass der Boden des Kulturbedeihnisses benetzt war. Die Inkubation auf der Heizplatte bei 37°C erfolgte, bis sich die Zellen von dem Untergrund abgelöst hatten. Die Zellen wurden verdünnt in neue Kulturgefäße ausgesät.

2.4.2 Kryokonservierung und Auftauen

Zur Konservierung können Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei –196°C aufbewahrt werden. Das Einfrieren von Zellen wurde nach Trypsinieren und Pelletieren in FCS mit 10% DMSO vorgenommen. Es wurde etwa eine kleine Zellkulturflasche in zwei Kryoröhrchen mit je 1,5ml Inhalt aufgeteilt und in die Einfrierhilfe eingestellt. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt oder vorübergehend bei –80°C gelagert. Bei der Auftauprozedur wurde die Zelllösung aus dem Kryoröhrchen mit 5ml Medium in ein Falcon überführt. Die Zellen wurden erneut pelletiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen, und dann in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

2.4.3 Transfektion

2.4.3.1 Lipofektion

Der Vorgang der Transfektion eukaryotischer Zellen von mittels Lipiden komplexierter DNA wird als Lipofektion benannt. Die Komplexbildung erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA und den kationischen Lipiden des Transfektions-Reagenz. Aufgrund der insgesamt positiven Ladung fusionieren die DNA-Lipidkomplexe mit der Zellmembran. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über Endozytose unter Beteiligung von Proteoglykan-Rezeptoren (Mounkes *et al.* 1998). Die zu transfizierenden Zellen wurden im 6well-Format oder in Mikroskopieschälchen am Vortag ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit 70- 90% konfluenten Zellen. Diese wurden mit PBS gewaschen und mit 2ml opti-MEM (Invitrogen, Darmstadt) versetzt. Für ein 6well bzw. ein Mikroskopieschälchen wurden 5µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Darmstadt) mit 120µl opti-MEM vermischt und für 5min bei RT inkubiert. 2µg DNA wurden in 125 µl opti-MEM aufgenommen und zur Lipofectamin-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde für 20min bei RT inkubiert und auf die Zellen getropft. Nach mindestens sechsstündiger Inkubation,

spätestens aber am nächsten Tag, wurde der Transfektionsansatz gegen normales Zellkulturmedium, gegebenenfalls mit Antibiotika zur Selektion, ersetzt.

2.4.3.2 Kationische Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Bei der Transfektion mit Hilfe des kationischen Polymers PEI kommt es zur Komplexbildung mit der negativ geladenen DNA (Boussif *et al.* 1995). Durch Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran gelangen die Komplexe durch Endozytose in die Zelle. Mittels PEI-Transfektion wurde die Expression neu klonierter Plasmide und die Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in eukaryotischen Zellen überprüft. 293T-Zellen wurden in 200µl Medium in 96well-Platten ausgesät und am selben oder nächsten Tag transfiziert. Pro well wurden 2,7µl PEI mit 15µl PBS sowie 7µl Plasmid DNA einer Mini-Präparation mit 15µl PBS angesetzt. Beide Ansätze wurden vermischt und auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde die Expression und die Lokalisation mit dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

2.4.4 Transduktion

Mit Hilfe von Retroviren können DNA-Integrate stabil in das Genom von Zellen eingebracht werden. Ausgehend von dem RNA-Genom des Virus wird DNA revers transkribiert und durch die virale Integrase in das Wirtszellgenom unspezifisch integriert. Man benötigt einen retroviralen Vektor, der das DNA-Integrat zwischen 5' und 3' LTR trägt. Ebenfalls muss die ψ -Region vorhanden sein, das Verpackungssignal für virale RNA. Die Virus-produzierende Zelle muss zusätzlich mit Plasmiden, die die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* tragen, ko-transfiziert werden. Dabei kodiert *gag* für Matrix- und Nukleokapsidproteine, *pol* für Protease, Reverse Transkriptase, Integrase und *env* für Hüllproteine.

2.4.4.1 Produktion der Viruspartikel

293T-Zellen wurden in einer 10cm-Schale mit 10ml Medium ausgesät. Bei einer Konfluenz von ~60% wurde dem Medium 25µM Chloroquine zugegeben. Ein Transfektionsansatz enthielt 7,5µg retroviralen Vektor, 12,5µg GAG POL M57, 1µg pGALV ENV M108, 50µl 2,5M CaCl₂ in 450µl *aqua dest.* Dieser wurde unter Vortexen und Sprudeln zu 500µl 2xHEPES gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz auf die Zellen getropft, ohne die schwach adherenten 293T-Zellen dabei abzulösen. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert. Alle 12 Stunden wurden die Viruspartikel geerntet und nach Sterilfiltration bei -80°C eingefroren. Die Transfektionseffizienz wurde vor dem Ernten der Viruspartikel im Fluoreszenzmikroskop überprüft.

2.4.4.2 Transduktion eukaryotischer Zellen

HeLa-Zellen wurden in 6well-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80% wurde das Medium abgesaugt und 2ml viraler Überstand auf die Zellen gegeben. Zusätzlich wurde

Polybrene in einer Endkonzentration von 1mg/ml zugesetzt und für 1h bei 1500rpm und 37°C zentrifugiert. Die Platte wurde mit ihrem Deckel dabei mit Parafilm fixiert. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert.

2.4.5 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

LMB (Axxora Deutschland GmbH, Lörrach) wurde in einer Konzentration von 10nM angewendet und in PBS vorverdünnt. *Hit*-Substanzen wurden bei ChemDiv (SanDiego, USA) bestellt und in einer Konzentration von 50mM in DMSO gelöst. Je nach Bedarf wurden sie in DMSO oder Medium weiter verdünnt.

2.4.6 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten für den Nachweis der *cleaved Caspase 3* wurden die Zellen trypsiniert und mit dem ursprünglichen Medium und PBS wieder aufgenommen. Ansonsten wurden die Zellen im Medium abgeschabt. Die gelösten Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei 2000rpm 4°C für 5min pelletiert. Je nach Pellet-Größe wurden > 50µl RIPA mod.-Puffer zugegeben. Durch Pipettieren wurde das Pellet resuspendiert und für 20min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (12.000rpm, 4°C, 20min) wurde der Überstand bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.4.7 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen

Zellen wurden in Mikroskopieschälchen (Mattek Corporation, USA) ausgesät und bei gewünschter Konfluenz mit 4% PFA in PBS für 20min fixiert. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die Zellen mit 0,1% TritonX in PBS für 5min permeabilisiert und wieder mit PBS gewaschen. Der Primär-Antikörper wurde in 1% BSA in PBS für 1h auf die Zellen gegeben. Nach Waschen mit PBS wurde der Fluoreszenz-markierte Sekundär-Antikörper in 1% BSA in PBS für 1h auf die Zellen gegeben. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Zellkerne mit Hoechst H33258 oder H33342 1µg/ml in PBS in einer 30-minütigen Inkubation gefärbt. Die Zellen wurden wiederum mit PBS gewaschen und in PBS bei 4°C aufbewahrt.

2.4.8 Herstellung von in Paraffin eingebetteten Zellpellets

Die Zellen wurden trypsiniert und in PBS gewaschen. Nach der anschließenden Zentrifugation wurden sie mit 4% Formalin in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert, welches am Folgetag gegen 1% Formalin in PBS ersetzt wurde. Die Zellen wurden bei 4°C bis zum Einbetten in Paraffin aufbewahrt.

2.4.9 Zellviabilitäts-Assays

2.4.9.1 CellTiter-GLO® Luminescent Cell Viability-Assay

Die Viabilitäts-Messung mit *CellTiter-GLO® Luminescent Cell Viability-Assay* basiert auf der Quantifizierung des ATP-Gehalts, eines Indikators für metabolisch aktive Zellen. Der ATP-Gehalt ist proportional zur Anzahl an Zellen und somit auch dem lumineszenten Signal. Dieses entsteht durch Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin durch die *Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase* in Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und molekularem Sauerstoff. Die Zellen werden bei dieser Messung zunächst lysiert, um das ATP freizusetzen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 96well-Platten ausgesät und je nach Versuchsansatz mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Messung wurde der CellTiter-GLO®-Puffer mit dem Substrat vermischt und in gleichem Volumen zu dem Zellmedium gegeben. Die Platte wurde für 2min auf dem Schüttler bei RT gestellt. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation bei RT wurden die Überstände in eine 96well-Platte aus weißem Plastik überführt und im Luminoscan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 1000ms *integration time* gemessen. Die Werte wurden in Excel kopiert und ausgewertet.

2.4.9.2 AlamarBlue®-Assay

Zur Messung der Viabilität von Zellen wurde auch der AlamarBlue®-Assay (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Dieser basiert auf der Umsetzung des zellgängigen Resazurins zu fluoreszierendem Resorufin. Die Umsetzung erfolgt durch reduzierende Reaktionen metabolisch aktiver Zellen. Somit stellt die entstehende Fluoreszenz ein quantitatives und proportionales Maß für die Zahl der Zellen dar. Die Fluoreszenz des Resorufins kann mit Wellenlängen von 540-570nm ($\lambda_{ex,max}$ 570nm) angeregt und bei 580-610nm ($\lambda_{em,max}$ 585nm) ausgelesen werden. Es ist ebenfalls möglich die Menge an entstandenem Resorufin durch Absorptionsmessung bei 570nm zu bestimmen. Von den Werten der Absorption bei 570nm muss der Wert einer Mediumkontrolle bei 600nm (Hintergrund) abgezogen werden. Die Auswertung der Fluoreszenz ist aber die sensitivere Methode. Da das AlamarBlue® nicht toxisch ist, können die Zellen mit neuem Medium versehen werden, um am nächsten Tag eine erneute Messung durchzuführen.

Die Zellen wurden in 96well-Platten ausgesät und je nach Versuchsansatz mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Zur Messung wurde 1/10 Vol AlamarBlue® in das Medium gegeben und für 2-4h im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Es wurden 8/10 des Zell-Überstands in eine 96well-Platte aus schwarzem Plastik mit durchsichtigem Boden (μ clear) überführt. Da Luftblasen die Messung stören, wurden diese mit einer Injektionsnadel entfernt. Die Platte wurde im Fluroscan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei

einer Anregungswellenlänge von 538nm und einer Emissionwellenlänge von 600nm gemessen. Die Werte wurden in Excel kopiert und ausgewertet.

2.4.9.3 LIVE/DEAD®-Viability/Cytotoxicity-Assay

Der LIVE/DEAD®-Viability/Cytotoxicity-Assay (Invitrogen, Darmstadt) ermöglicht die gleichzeitige fluoreszente Visualisierung von lebenden und toten Zellen. Dabei werden die intrazelluläre Esterase-Aktivität und die Integrität der Plasmamembran untersucht. Die nicht-fluoreszente Substanz Calcein AM wird von der Esterase in das grün fluoreszierende Calcein ($\lambda_{\text{ex}}=494\text{nm}/\lambda_{\text{em}}=517\text{nm}$) umgewandelt, welches in den lebenden Zellen verbleibt. Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) gelangt nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran und erfährt nach Bindung an die Nukleinsäuren eine Verstärkung seiner Fluoreszenz um das 40fache ($\lambda_{\text{ex}}=495\text{nm}/\lambda_{\text{em}}=635\text{nm}$). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden nach der gewünschten Behandlung mit PBS gewaschen und für 30min mit der Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne durch Inkubation mit Hoechst 33342 markiert. Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden je Ansatz mindestens 100 Zellen untersucht und aufgenommen.

2.4.10 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wird eine Zell-Suspension in einem Flüssigkeitsstrahl aufgetrennt, so dass zu einem Zeitpunkt immer nur eine Zelle im Laserstrahl gemessen werden kann. Die Streu-Eigenschaften der Zelle werden im *forward scatter channel* (FCS) und im *side scatter channel* (SSC) erfasst. Bei der Auftragung dieser Parameter in einem *Scatter Plot* können tote Zellen von den gesunden Zellen einer Population unterschieden und von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Weiterhin können mit den Detektoren (FL1-4) Fluoreszenzeigenschaften der Zellen erfasst werden. Anhand dieser können Zellen nach Transfektion mit einem Fluoreszenzmarker sortiert werden. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (*fluorescent activated cell sorting*, FACS) bezeichnet. Durch das Anlegen einer Ladung wird der Flüssigkeitsstrahl, in dem die Zellen aufgetrennt sind, in unterschiedliche Auffang-Behälter abgelenkt. Analysen wurden eigenständig mit dem FACS-Calibur (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) durchgeführt (s. Tab.22).

Tab. 22. Konfiguration des FACS-Calibur

Anregungs-Laser	Detektor	Emmissionsfilter	Fluorochrom
Blau (488nm)	SSC	488 (10)	SSC
	FL1	530 (30)	FITC, Alexa 488, GFP, YFP
	FL2	585 (42)	PI, Cy3, DsRed
	FL3	670 (LP)	7AAD, DRAQ5, PI
Rot (633nm)	FL4	661 (16)	Cy5, Alexa 647

Sortierungen mit dem FACS-Vantage (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) wurden von J. Altmaier/Dr. S. Schmitt (FACS facility Mainz) oder mit dem FACS-Aria (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) von M. Brkic (Flow Cytometry Core Facility, III. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt.

2.4.10.1 Zellzyklus-Analyse mit DRAQ5™

Die Zellzyklus-Analyse basiert auf der Färbeintensität der Zellen mit DRAQ5™ (Deep Red Fluorescing Anthraquinone Nr. 5, Axxora, Lörrach) proportional zu ihrem DNA-Gehalt. Der Farbstoff DRAQ5™ (1,5-bis[[2-(di-methylamino) ethyl]amino]-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione) interagiert mit der DNA durch Bindung an die *minor groove* und kann sowohl für lebende als auch fixierte Zellen verwendet werden. Optimale Anregungswellenlänge ist 647nm, die Emission kann über den Bereich von 665-800nm detektiert werden.

Für die Analyse wurden Zellen aus zwei 6wells trypsiniert und ihrem ursprünglichen Medium wieder aufgenommen. Die Zellen wurden pelletiert (1500rpm, 5min) und in 1ml PBS mit 4% PFA resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (1500rpm, 5min) wurden die Zellen in 5ml PBS aufgenommen und gefiltert (50µm Porengröße). Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (1500rpm, 5min), in 0,5ml PBS aufgenommen und mit 2µl DRAQ5™ versetzt, was einer Endkonzentration von 10µM entspricht. Nach Inkubation für 5min bei 37°C wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Analyse auf Eis gestellt.

Die Zell-Population wurde anhand der FSC- und SSC-Parameter in einem Scatter-Plot zentriert. Tote Zellen setzen sich in dieser Darstellung deutlich von den lebenden ab und können von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Bei der Auftragung von FL3-A (Fläche unter dem DRAQ5™-Fluoreszenzpeak) zu FL3-W (Weite des DRAQ5™-Fluoreszenzpeaks) in einem zweiten Scatter-Plot wurden Dubletten zusammenhängender Zellen ausgeschlossen. Zwei aneinander hängende Zellen weisen zwar die DNA-Menge von Zellen der G2-Phase auf, können aber aufgrund der längeren Durchtrittszeit durch den Detektor identifiziert werden. Zur Analyse der Zellzyklus-Verteilung wurden die Werte der FL3-A gegen die mit dem jeweiligen Wert gefundene Anzahl der Zellen aufgetragen (s. Abb.25). Aufnahme und Analyse wurden mit dem Programm CellQuest Pro (BD, Heidelberg) durchgeführt.

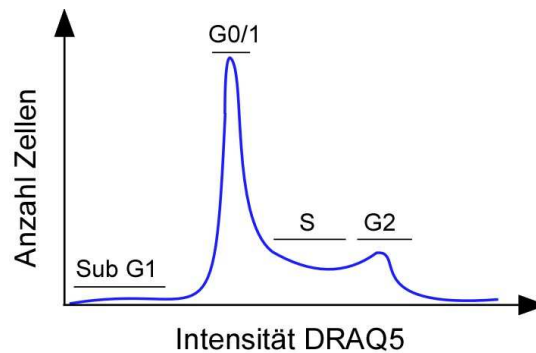


Abb. 25. Schematische Verteilung der Zellzyklusphasen

Bei der Auftragung der Intensität der DRAQ5TM-Färbung (FL3-A, Fläche des Intensitätspeaks) gegen die Anzahl der Zellen mit der jeweiligen Intensität ergibt sich bei gesunden Zellen oben gezeigtes Zellzyklusprofil. Der Hauptanteil der Population befindet sich in der G0/1-Phase des Zellzyklus. Bei etwa doppelter Intensität der DRAQ5TM-Färbung liegt der kleinere Peak der G2-Phase-Population. Hiervor liegen Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Der Sub G1-Phase sind apoptotische Zellen zuzuordnen.

2.4.10.2 Sortierung GFP-positiver Zellen

Die Zellen wurden nach Trypsinieren in Medium aufgenommen, zentrifugiert (1500rpm, 5min) und in PBS gewaschen. Abhängig von der Zellzahl wurden sie nach erneutem Waschen in PBS resuspendiert. Nach Filtern wurde die Zell-Suspension in FACS-Röhrchen gefüllt und auf Eis aufbewahrt. Als Auffangbehälter wurden 15ml Falcons mit 3ml FCS befüllt und für 3h bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Wie bei der Analyse wurde die Zellpopulation über die FSC/SSC-Auftragung charakterisiert. Von den lebenden Zellen wurden die GFP-positiven getrennt in die Auffangbehälter sortiert.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Detektion von Fluoreszenz-markierten Proteinen in der Zelle herangezogen. Vorteil der Fluoreszenz ist, dass das Signal einer geringen Anzahl von Molekülen deutlich detektiert werden kann, da die Wellenlängen des Anregungslichts, die nicht der Emission des Fluorophors entsprechen, komplett ausgeblendet werden. Im Gegensatz zu absorbierenden Farbstoffen ist ein fluoreszentes Signal deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden (Lichtman *et al.* 2005). Fluoreszenz entsteht, wenn ein durch Licht angeregtes Elektron (S_1/S_2 -Zustand) wieder in den Grundzustand (S_0) zurückkehrt und dabei Licht freisetzt (s. Abb.26). Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist dabei stets länger als die des anregenden Lichts. In dem verwendeten inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M konnten für die Anregung das Licht einer Halogenlampe oder einzelne Laser des Kolibrisystems mit den Wellenlängen 365/470/530/590nm verwendet werden. Das Anregungslicht der Halogenlampe wird durch den Anregungsfilter auf die gewünschte Wellenlänge begrenzt und trifft auf die Probe. Das emittierte Signal wird durch den

Emissionsfilter geleitet, der nur die Wellenlänge des jeweiligen fluoreszenten Signals passieren lässt.

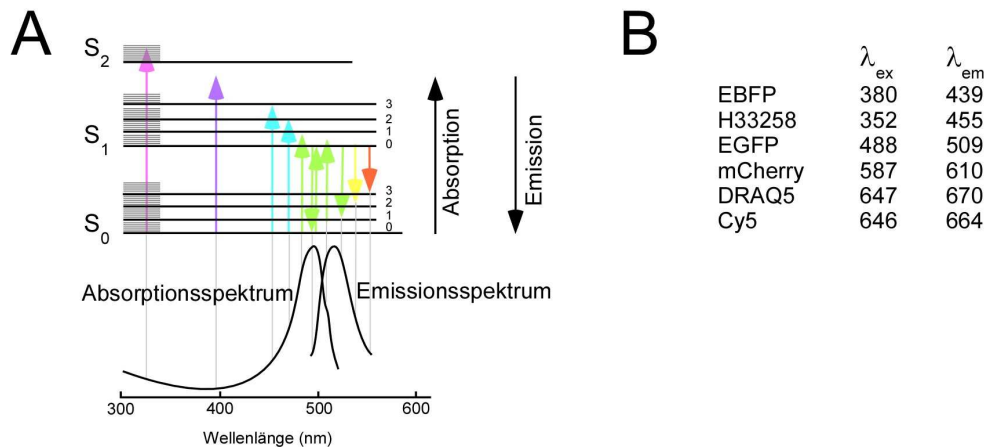


Abb. 26. Energieniveaus bei der Anregung/Emission von Fluoreszenzfarbstoffen und zur Mikroskopie verwendete Fluoreszenzfarbstoffe/Proteine

Schematische Darstellung der Energieniveaus von Elektronen. Ein Elektron gelangt durch Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge in einen höheren energetischen Zustand (S_1/S_2). Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird wiederum Licht (Fluoreszenz) abgegeben, welches im Vergleich zur Anregung eine längere Wellenlänge besitzt (A). Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bzw. fluoreszierenden Proteine mit optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen (B).

Die Untersuchung der Lokalisation von fluoreszenten Fusionsproteinen sowie Immunfluoreszenz-markierter Proteine wurde mit dem Axiovert 200M durchgeführt. Die Zellen wurden dazu in Mikrokopieschälchen (Mattek Corporation, USA) ausgesät und entweder mit Fluoreszenz-markierten Konstrukten transfiziert oder Immunfluoreszenz-markiert. Zur Überprüfung der Expression neu generierter Klone wurde das Nikon Eclipse TE200 verwendet. Hierfür wurden stets 293T-Zellen in 96well-Platten ausgesät und die Plasmid-DNA mit PEI transfiziert. Hochdurchsatz-Analysen wurden mit dem ArrayScanVTI[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür in 96well-Platten mit für die Mikroskopie geeignetem Boden ausgesät (Greiner µclear, Greiner, Frickenhausen).

2.6 Mikroinjektion

Die Methode der Mikroinjektion wurde zum Einbringen rekombinanter GFP-Fusionsproteine in den Kern von Vero-Zellen verwendet. Das Mikroinjektions-System AIS2 ist an dem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M angebracht und besteht aus einem motorisierten und elektronisch gesteuerten Objektisch mit einem Injektionsarm (Luigs&Neumann, Ratingen), einem Druckluftregler (FemtoJet, Eppendorf, Hamburg) und einer Inkubationskammer (EMBL, Heidelberg).

Die Zellen wurden in Mikrokopieschälchen (Mattek Corporation, USA) ausgesät. Vor jeder Injektion wurden frische Glas-Kapillaren (Harvard Apparatus Ltd., Holliston, USA) mit dem

Micropipette Puller P-97 (Sutter Instrument Co., USA, Programm 0) hergestellt. Diese wurden von der Rückseite mit Protein befüllt, welches durch Schleudern an die Spitze der Kapillare gebracht wurde. Nach Einsetzen der Kapillare in den Injektionsarm wurde dessen Spitze definiert, um dann bei Testinjektionen die ideale Injektionshöhe zu finden. Über den FemtoJet wurden Injektions-Druck (hPa) und -Dauer bei jeder Injektion angepasst. Nach der Injektion wurden die Zellen mit dem 40x Objektiv über den gewünschten Zeitraum mikroskopisch analysiert.

2.7 Hochdurchsatz Fluoreszenzmikroskopie

Um neue Inhibitoren des nukleären Exports mit Hilfe des zellulären Translokations-Biosensor-Systems zu identifizieren, sollte die ChemBioNet-Substanzbibliothek, die 17.000 Substanzen enthält, auf den Zellen getestet werden. Diese Hochdurchsatzanalyse wurde in der Screening Unit von Dr. v.Kries am FMP Berlin mit Hilfe von Christoph Erdmann durchgeführt.

2.7.1 ArrayScanVTI®-HCS Reader

Der ArrayScanVTI®-HCS-Reader ist ein automatisiertes Fluoreszenzmikroskop, speziell entwickelt für die Hochdurchsatzanalyse. Es beinhaltet einen optischen Apparat von Carl Zeiss, eine Weißlichtquelle, eine gekühlte 12bit CCD-Kamera sowie Programme zur automatischen Steuerung und Bildanalyse. Die Bildanalyse-Module (*BioApplications*) konvertieren Bilder in numerische Daten, woraus jegliche Information über die Lokalisation Fluoreszenz-markierter Proteine/fluoreszenter Farbstoffe sowie deren Intensität in den einzelnen Fluoreszenzkanälen erfasst werden kann. Eine Zelle wird zunächst durch eine Färbung des Zellkerns mit Hoechst 33342 als Objekt definiert. Über den Intensitätsunterschied zwischen Zellkern und Zytoplasma wird ein Schwellenwert definiert, über welchen eine Maske des Bereichs des Zellkerns generiert wird. Ausgehend davon können weitere Masken z.B. als Ring um den Zellkern erstellt werden, um dort fluoreszente Ereignisse zu bestimmen oder Intensitäten zu vergleichen.

2.7.2 Poly-L-Lysin Beschichtung von 384well-Platten

Es wurde 0,1% Poly-L-Lysin (P8920 Sigma) 1:10 in *aqua dest* verdünnt. Davon wurden 10µl je 384well mit dem BioTek µFill™ Dispenser gegeben. Nach Zentrifugation bei 14000rpm für 1min wurde jedes well zweifach mit *aqua dest* gewaschen unter Verwendung des BioTek ELx405 Select cw (BioTek, Winooski, Vermont, USA). Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Poly-L-Lysin-beschichtete Platten wurden nur für A431-Zellen verwendet.

2.7.3 Substanzbibliothek und Transfer

Die Substanzbibliothek wurde aus dem -20°C Gefrierschrank entnommen und zunächst bei 2000rpm für 1min zentrifugiert. Jede Platte wurde für 1min in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend erneut zentrifugiert. Mit dem Sciclone I/O (Caliper, Hopkinton, MA, USA) wurden $0,125\mu\text{l}$ der Substanzen in die einzelnen wells transferiert. Dabei wurden zunächst $0,125\mu\text{l}$ Substanz aufgenommen und dann aus den Ziel-wells jeweils $10\mu\text{l}$ Medium dazugesogen. Zur Durchmischung wurde nach Ablassen in die wells noch einmal etwas Medium aufgesogen und wieder abgelassen. Die Endkonzentration der Substanzen betrug $25\mu\text{M}$. Die Spitzen wurden in einem Ultraschallbad gereinigt und für den Transfer der gesamten Substanzbibliothek verwendet. Der Substanz-Transfer dauerte je 384well-Platte 5min.

2.7.4 Zeitlicher Ablauf

Es wurden pro 384well jeweils 9500 Zellen ausgesät. Dabei wurde auf gute Vereinzelung und Durchmischung geachtet. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen, und drei Stunden später wurde in jeder Platte eine Reihe mit LMB als Positivkontrolle versetzt. Nach weiteren zwei Stunden wurden die Zellen durch Zugabe von $50\mu\text{l}$ 4% PFA in PBS für 20min fixiert. Anschließend wurde jedes well dreifach mit $50\mu\text{l}$ PBS mit dem BioTek ELx405 Select cw (BioTek, Winooski, Vermont, USA) gewaschen. Zu den im well verbliebenen $40\mu\text{l}$ PBS wurde Hoechst 33342 (Sigma, St.Louis, MO; USA) in einer Konzentration von $25\mu\text{g/ml}$ gegeben. Die Platten wurden mit einer Folie verklebt und über Nacht mit dem ArrayScanVTI[®] ausgelesen. Dabei wurden die Platten mit dem TwisterII (Caliper, Hopkinton, MA, USA) in das Gerät eingestellt und entnommen. Es wurden von jedem well jeweils vier Felder in zwei Fluoreszenzkanälen (Hoechst und GFP) aufgenommen.

2.7.5 Auswertung

Zur Auswertung der GFP-Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern wurde der *„Molecular translocation assay V2“* der, dem ArrayScanVTI[®] zugehörigen, Software verwendet. Die Bilder wurden noch während der Aufnahme der restlichen Platten ausgewertet. Eine Zelle wurde anhand ihrer Kernfärbung im ersten Fluoreszenzkanal als Objekt identifiziert. Über einen Schwellenwert der Hoechst-Intensität wurde der Bereich des Zellkerns definiert und mit einer Maske markiert (Circ). Die Intensitätswerte des zweiten Fluoreszenzkanals (GFP) wurden in dieser nukleären Maske und in der, von der Software erstellten und sie umgebenden, zytoplasmatischen Maske (Ring) erfasst und zu einer Ratio (Circ/RingRatio) und Differenz (Circ-RingDiff) verrechnet (s. Abb.27). Bei der Auswertung wurden stets die Mittelwerte eines wells berücksichtigt (MeanCirc, MeanRing,

MeanCirc/RingRatio, MeanCirc-RingDiff). Bei der Auswertung der RevNES-Hochdurchsatzanalyse wurden die Werte für MeanCirc und MeanCirc/RingRatio von den Positiv und Negativ-Kontrollen jeder Platte gemittelt. Anschließend wurden interessante *wells* ausgewählt, wobei diese mindestens eine doppelt so hohe Intensität für MeanCirc oder eine zehnfach erhöhte Intensität für MeanCirc/RingRatio aufweisen mussten. Die Bilder aller so ausgewählten Substanzen wurden visuell auf das Vorliegen einer Translokation hin überprüft.

2.7.5.1 Unterschiede bei der Durchführung der Hochdurchsatzanalyse mit dem SurvivinNES-Biosensor

Hierbei wurde der ‚*Molecular translocation assay V3*‘ verwendet. Die *Hit*-Selektion erfolgte mit dem Programm *PipelinePilot* (Accelrys®, SanDiego, CA, USA). Mit dessen Hilfe wurden die Substanzen automatisch gelistet, die eine Erhöhung der MeanCirc-RingDiff um die zweifache Standardabweichung der jeweiligen Kontrollen zeigten. Als weitere Einschränkung wurde ein Minimum von 50 Zellen gesetzt, um zytotoxische Substanzen von der weiteren Analyse auszuschließen.

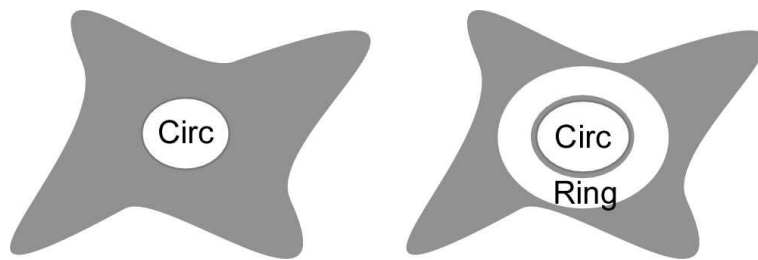


Abb. 27. Lokalisation der Masken bei der Analyse mit dem ‚*Molecular translocation assay*‘

Die Circ-Maske entspricht dem Zellkern und wird anhand der Hoechst-Intensität im ersten Fluoreszenzkanal definiert. Auf Bildern des zweiten Fluoreszenzkanals (GFP) wird abhängig von Circ eine Ring-Maske generiert, die diese umgibt. Es kann ein Abstand zwischen beiden Masken definiert werden, und es kann eine Mindest-Fluoreszenzintensität als Bedingung für die Ring-Maske gesetzt werden.

2.7.5.2 Berechnung des Z'-Faktors

Zur Überprüfung der Qualität der Hochdurchsatzanalyse wurde der Z'-Faktor der Kontrollen aller Platten berechnet. Hierbei wurden zunächst der Mittelwert und die Standardabweichung von den Positiv- (LMB = SD^+) und Negativkontrollen (DMSO = SD^-) berechnet. Die absolute Differenz zwischen beiden Mittelwerten stellte den dynamischen Bereich dar (R, s. Abb.28). Der Z'-Faktor wurde nach folgender Formel berechnet (Zhang *et al.* 1999):

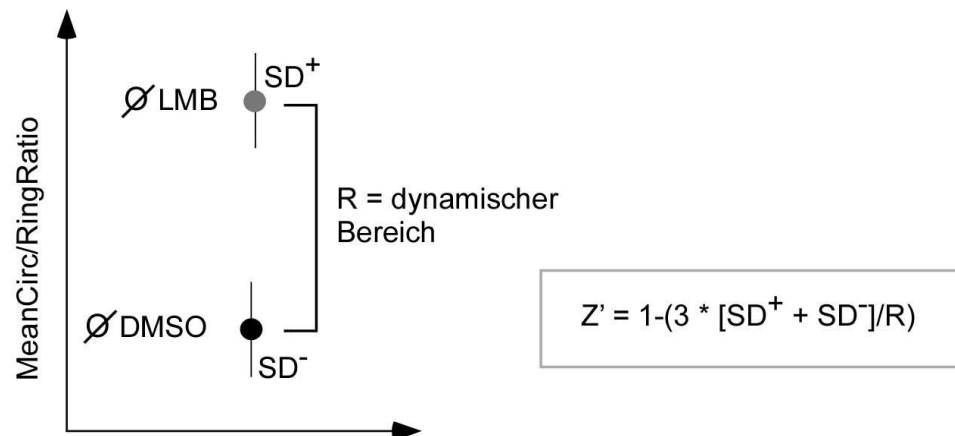


Abb. 28. Schematische Darstellung der Berechnung des Z'-Faktors

Die dreifache Summe der Standardabweichungen der Kontrollen wird durch den dynamischen Bereich (R) der Werte geteilt und von eins subtrahiert.

Richtlinien zur Interpretation des Z'-Faktors sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tab. 23. Richtlinien zur Interpretation des Z'-Faktors

Z'-Faktor	Interpretation
1	dynamischer Bereich geht gegen unendlich oder SD=0 --> Z' =1 unerreichbar, idealer Assay
0,5 – 1	exzellenter Assay, großer dynamischer Bereich
0 – 0,5	grenzwertiger Assay, enger dynamischer Bereich
> 0	Signal von + und - Kontrolle überlappt, Assay nicht zur Hochdurchsatzanalyse geeignet

2.8 Hochdurchsatzanalyse von Pilzextrakten

Getrocknete Extrakte von Pilzen wurden von PD Dr. E. Thines (TU Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt und lagen in 96well-Platten vor. Vor Verwendung wurden die bei –20°C gelagerten Pilzextrakte in 25µl DMSO aufgenommen und 1min bei RT geschüttelt. Für die Hochdurchsatzanalyse wurden die so gelösten Pilzextrakte 1:200 verdünnt auf HeLa_{RevNES}[–] Zellen (12000 Zellen pro 96well, Aussaat am Vortag) gegeben. Nach 5h wurden die Zellen mit 4% PFA in PBS fixiert und mit Hoechst 33342 (25mg/ml 1:1000) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem ArrayScanVTI®. Auf jeder Platte befanden sich in Spalte 1 jeweils vier DMSO-Negativkontrollen und LMB-Positivkontrollen (10nM).

2.9 Intraperitoneale Injektion von Nacktmäusen

Athymische Nacktmäuse (*nu/nu*) wurden jeden zweiten Tag mit 200µl C3 oder C5, jeweils 1mM konzentriert, intraperitoneal injiziert. Über den Verlauf des Versuchs wurde das Gewicht der Mäuse aufgezeichnet. Alle Arbeiten wurden von Dr. N. Habtemichael durchgeführt.

2.10 Statistische Analyse

Sind p-Werte angegeben, so wurden diese mit einem gepaarten Student'schen T-Test mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) kalkuliert. Dabei wurden p-Werte kleiner 0,05 mit *, kleiner 0,01 mit ** und kleiner 0,005 mit *** bewertet. Fehlerbalken sind immer aus der Standardabweichung der Messungen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Bedeutung des molekularen Botenstoffs Stickstoffmonoxid (NO) für die Modulation des Apoptose-Inhibitor Proteins Survivin

Trotz guter initialer Behandlungserfolge bei Krebserkrankungen entwickeln viele Patienten ein Rezidiv, und es treten Therapieresistenzen auf. Unverzichtbar für eine langfristige Verbesserung der Diagnose und der Heilungschancen der Patienten ist ein molekulares Verständnis der Mechanismen, welche zu diesen Komplikationen beitragen. In diesem Zusammenhang spielt der molekulare Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle (Fukumura *et al.*, 2006). Die genauen molekularen Mechanismen der Bedeutung von NO für Tumorerkrankungen ist jedoch noch unverstanden, da sowohl Tumor-inhibierende als auch Tumor-fördernde Wirkungen beschrieben wurden (Fukumura *et al.*, 2006). Im Rahmen der Arbeit wurden daher Untersuchungen zur Aufklärung derartiger molekularer Wirkmechanismen durchgeführt.

NO wird in den Zellen durch drei Isoformen der NO-Synthase (NOS), die endotheliale (eNOS), neuronale (nNOS) und induzierbare NOS (iNOS) aus L-Arginin gebildet (Fukumura *et al.* 2006). Im Gegensatz zu nicht-malignen Zellen, in welchen iNOS meist erst nach Zytokin-Induktion gebildet wird, sind in Krebszellen transkriptionelle und post-transkriptionelle Kontrollmechanismen der iNOS-Expression durch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege dereguliert (Fukumura *et al.* 2006). Als Schlüsselproteine wurden u.a. BCL2, p53 und Survivin diskutiert sowie eine direkte Inaktivierung von Caspasen durch S-Nitrosylierung vorgeschlagen (Brune, 2003; Fukumura *et al.*, 2006; Ridnour *et al.*, 2006).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass NO einen biphasischen Effekt auf das Überleben von Ovarialkarzinom- sowie Kopf-Hals-Krebszellen hat (Engels *et al.*, 2008; Fetz *et al.* 2009). So wurden durch hohe NO-Konzentrationen (im μM -Bereich) oder eine starke iNOS-Überexpression DNA-Schädigungen und Apoptose ausgelöst (Engels *et al.*, 2008; Fetz *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu zeigten immunhistologische Untersuchungen, dass iNOS in vielen Tumorentitäten moderat überexprimiert wird (Engels *et al.*, 2008; Fetz *et al.* 2009). Verschiedene Studien einschliesslich der eigenen Untersuchungen belegen ausserdem, dass die Expression von iNOS mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten korreliert, d.h. dem Tumor anscheinend einen Selektionsvorteil verschafft (Engels *et al.*, 2008; Fukumura *et al.*, 2006). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass die aberrante iNOS-Expression hauptsächlich für NO-vermittelte ‚Tumor-protective‘ Effekte, wie die Aktivierung anti-apoptotischer, aber auch angiogener Programme in Ovarial- sowie Kopf-Hals-Tumoren verantwortlich zu sein scheint (Engels *et al.*, 2008; Fetz *et al.* 2009). Obwohl die genauen molekularen Mechanismen auch für diese anti-apoptotische Wirkweise noch

nicht geklärt sind, konnten niedrigere NO-Konzentrationen (300-500nM) zelluläre Überlebensprogramme induzieren (Engels et al., 2008; Fetz et al. 2009). Die Arbeiten zeigen, dass die Expression von Survivin durch NO moduliert werden kann (Engels et al., 2008; Fukumura et al., 2006), wobei moderate NO-Konzentrationen eine Verstärkung, hohe NO-Konzentrationen dagegen eine transkriptionelle Verminderung zur Folge haben (Fetz et al. 2009). Zusammenfassend wurde folgendes Modell (s. Abb.29) zur Regulation von Survivin in Tumorzellen postuliert (Details siehe: (Engels et al. 2008; Fetz et al. 2009).

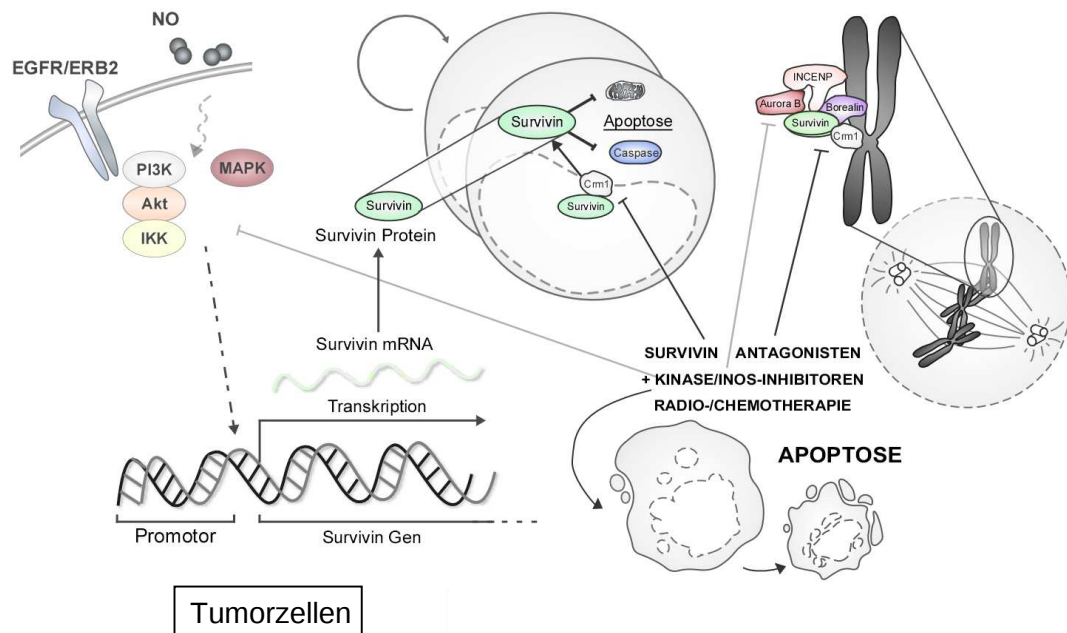


Abb. 29. Modell zur Regulation von Survivin in Tumorzellen

In Tumorzellen führt die Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktor- sowie NO-vermittelter Signaltransduktionswege zu einer erhöhten Expression/Stabilität von Survivin. Dessen Wechselwirkung mit dem Exportrezeptor Crm1 ist essentiell für dessen duale tumorfördernde Aktivität. In Interphase-Zellen erlaubt die Export-vermittelte zytoplasmatische Lokalisation von Survivin eine effiziente Inhibition der Apoptose-Maschinerie. Während der Mitose rekrutiert die Survivin-Crm1 Interaktion den zusätzlich aus der AuroraB-Kinase, Incenp und Borealin bestehenden chromosomalen Passenger-Complex (CPC) zu den Zentromeren und scheint somit auch die Teilung von Krebszellen mit aberrantem Chromosomensatz zu ermöglichen. Die Verhinderung der Survivin-Crm1 Wechselwirkung durch Survivin Antagonisten im Kombination mit iNOS- und Kinase-Inhibitoren könnte die Wirksamkeit der Chemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren verbessern.

3.2 Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Bibliothek mit dem RevNES-Biosensor

Die 17.000 Substanzen umfassende ChemBioNet-Bibliothek sollte für die Suche nach neuen spezifischen Exportinhibitoren mit den RevNES-Biosensor-exprimierenden Zellen getestet werden. Da die Substanzen in 384well-Platten vorlagen, sollten die Zellen ebenfalls in 384well-Platten ausgesät und mit ersteren inkubiert werden. Um den Mehraufwand einer frischen Transfektion der Zellen in den 384well-Platten zu umgehen, wurden zunächst den RevNES-Biosensor stabil exprimierende Zellen hergestellt.

3.2.1 Herstellung einer stabilen RevNES-Biosensor-Zelllinie

Zunächst wurden unterschiedlich schnell wachsende Zelllinien (A431, SW480, HtTA) mit dem RevNES-Biosensor (pC3-SV40NLS-GFP-GST-RevNES) transfiziert (s. Abb.30). Aufgrund des schnellen Wachstums, der guten Expressionsstärke und des deutlichen Umlagerungssignals nach Zugabe von LMB wurden A431-Zellen für das weitere Vorgehen ausgewählt.

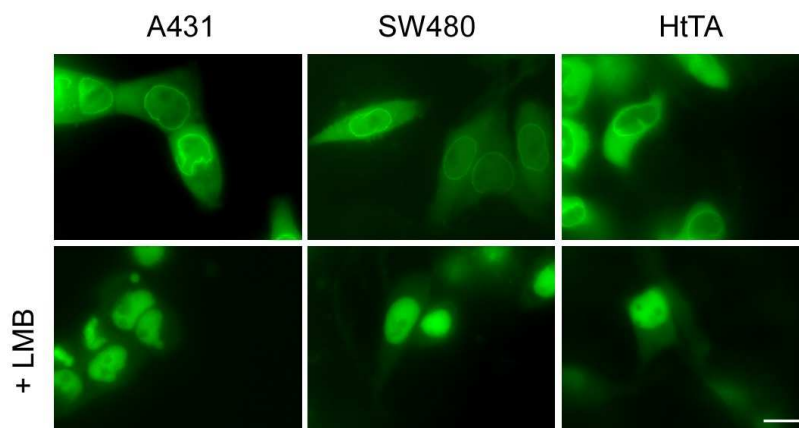


Abb. 30. Expression des RevNES-Biosensors in unterschiedlichen Zelllinien

Die Expression des RevNES-Biosensors wurde in verschiedenen Zelllinien getestet. A431-, SW480- und HtTA-Zellen wurden mit pC3-SV40NLS-GFP-GST-RevNES transfiziert, um eine Zelllinie für das weitere Vorgehen auszuwählen. Die obere Bildreihe zeigt unbehandelte Zellen, darunter sind mit LMB (10nM) behandelte Zellen gezeigt. Maßstabsbalken, 10µm.

Transient transfizierte A431-RevNES-Biosensor-Zellen (A431_{RevNES}) wurden durch Zugabe von G418 in das Wachstumsmedium auf Aufnahme des pC3-SV40NLS-GFP-GST-RevNES hin selektiert. Zwei Wochen nach der Transfektion wurden die GFP-positiven Zellen mit dem FACS-Vantage von Steffen Schmitt (FACS Facility, Mainz) sortiert (s. Abb.31). Etwa einen Monat später wurden die A431_{RevNES} erneut sortiert, um eine größtmögliche Anreicherung der GFP-positiven Zellen zu gewährleisten.

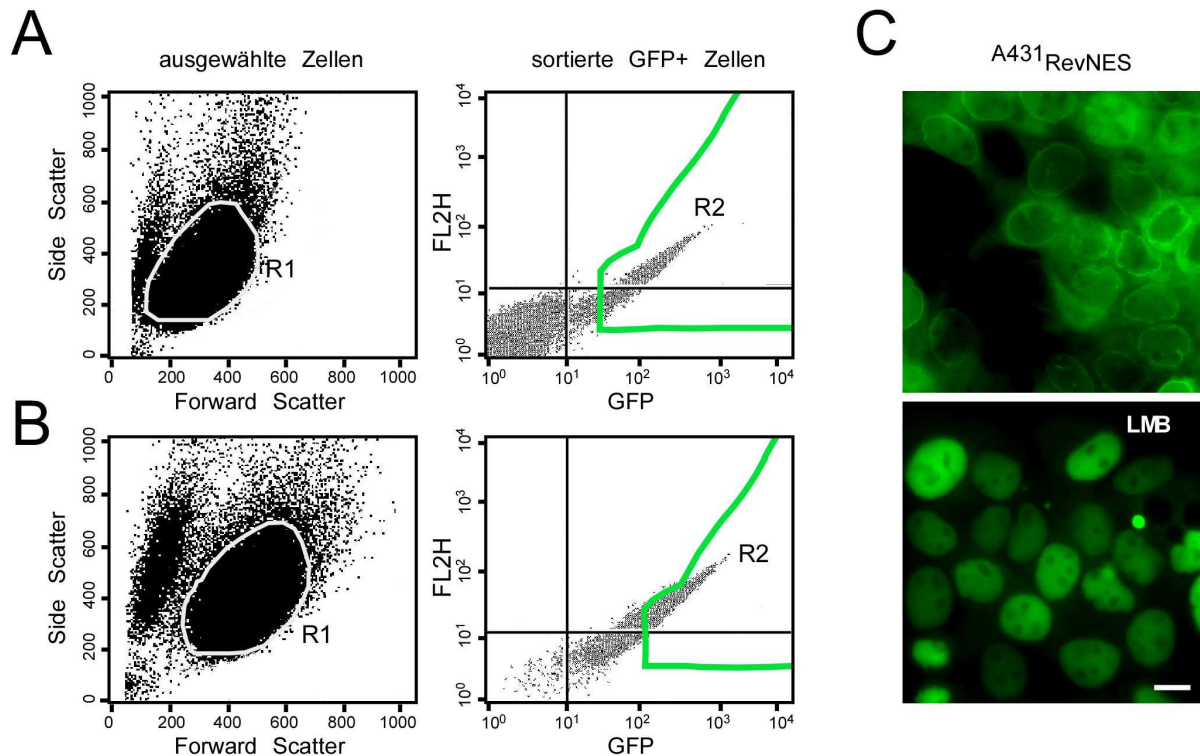


Abb. 31. Sortierung von GFP-positiven A431_{RevNES}-Zellen

Zweifach sortierte A431_{RevNES}-Zellen zeigen auch in der mikroskopischen Analyse eine starke Expression des RevNES-Biosensors, welcher nach LMB-Behandlung in den Zellkern umlagert. Transient transfizierte A431_{RevNES}-Zellen wurden auf eine hohe GFP-Expression hin sortiert (A). Etwa einen Monat danach wurden diese Zellen erneut auf eine hohe GFP-Expression hin sortiert, um eine möglichst reine, stark exprimierende Zellpopulation zu erhalten (B). Beispielbilder zweifach sortierter, unbehandelter und mit LMB behandelter (10nM, 2h) A431_{RevNES}-Zellen (C). Maßstabsbalken, 10µm.

Zur Vorbereitung auf die Hochdurchsatzanalyse sowie zur Langzeitlagerung wurden die A431_{RevNES}-Zellen in T-175cm² Kulturflaschen bis zur Konfluenz herangezogen und pro Flasche in drei Kryoröhrchen eingefroren. Pro konfluenter T-175cm²-Kulturflasche konnten 13 mit poly-L-Lysin beschichtete 384well-Platten mit 10.000 Zellen pro well ausgesät werden.

3.2.2 Etablierung der Zellfixierung für die Hochdurchsatzanalyse

Zur Auswertung der inhibitorischen Aktivität der Substanzen auf die Lokalisation des RevNES-Biosensors sollten die Zellen in den Platten fixiert und die Zellkerne mit Hoechst markiert werden. Um den Arbeitsaufwand pro Platte möglichst gering zu halten, wurde die Fixierungsprozedur optimiert. Standardmäßig werden Zellen vor der Fixierung mit PBS gewaschen, für 20min mit 4% PFA in PBS inkubiert und wieder mit PBS gewaschen. Für die Hochdurchsatzanalyse wurde die direkte Zugabe von 1Vol 4% PFA in PBS zum Zellmedium und somit eine finale Konzentration von 2% PFA zur Fixierung der Zellen getestet (s. Abb.32).

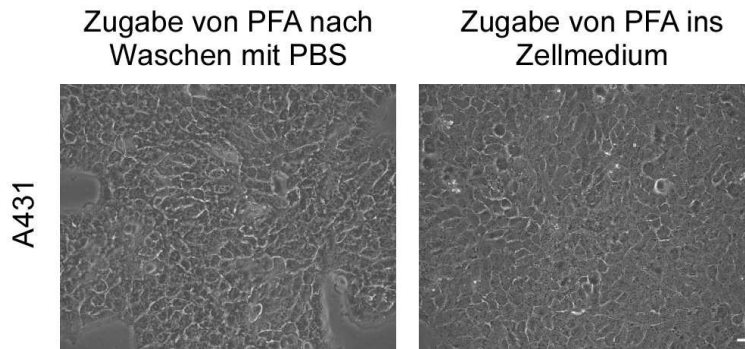


Abb. 32. Vergleich der Zellmorphologie nach den unterschiedlichen Fixierungsprozeduren

A431-Zellen wurden entweder mit PBS vor der Fixierung gewaschen und mit 4% PFA in PBS für 10min fixiert (links) oder direkt durch Zugabe von 1Vol 4% PFA in PBS ins Medium für 10min fixiert (rechts). Nach der direkten Zugabe in das Zellkulturmedium zeigte sich keine negative Beeinflussung der Zellmorphologie. Maßstabsbalken, 10µm.

Nach direkter Zugabe von 1Vol 4% PFA in PBS zum Zellkulturmedium und einer daraus resultierenden 2%igen PFA-Konzentration zur Fixierung war die Zellmorphologie im Vergleich zu der von mit 4% PFA in PBS fixierten Zellen unverändert. Zur weiteren Minimierung des Arbeitsaufwands pro Platte wurde die Fluoreszenzqualität von fixierten A431_{RevNES}-Zellen in PBS mit der in Medium(DMEM)/PFA verglichen (s. Abb.33).

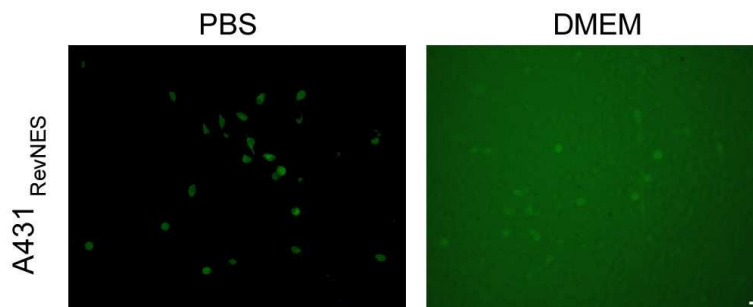


Abb. 33. Signal des RevNES-Biosensors in PBS und DMEM/PFA

A431_{RevNES}-Zellen wurden durch Zugabe von 1Vol 4%PFA in PBS ins Medium fixiert, welches durch PBS ersetzt (links) oder auf den Zellen belassen wurde (rechts). Maßstabsbalken, 10µm.

Wurden die Zellen in dem Medium/PFA-Gemisch belassen, so erschien die Fluoreszenzqualität bei der Betrachtung mit dem 10x Objektiv deutlich getrübt. Zudem ergaben sich Probleme mit der Hoechst-Färbung, wenn die Färbelösung direkt zu dem Medium/PFA-Gemisch gegeben wurde (Daten nicht gezeigt). Folglich sollten die fixierten Zellen während der Hochdurchsatzanalyse in PBS aufgenommen werden.

3.2.3 Umsetzen auf 384well-Format und Test der *Molecular Translocation-Bioapplication*

Das zelluläre RevNES-Biosensor-System wurde in einem Vortest in das 384well-Format gebracht. Alle Arbeiten wurden am FMP Berlin in der Screening Unit von Dr. J.P. von Kries mit der Hilfe von Christoph Erdmann durchgeführt. Stabile A431_{RevNES} wurden in unterschiedlichen Zellzahlen ($0,6/0,8/1 \cdot 10^4$) pro well in 50µl Medium ausgesät und am

nächsten Tag mit DMSO oder 10nM LMB inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1Vol 4% PFA in PBS fixiert, mit PBS gewaschen und nach Hoechst-Färbung der Zellkerne erneut mit PBS gewaschen. Mit dem ArrayScanVTI[®] wurden das Hoechst-Signal (Kanal1) sowie das GFP-Signal (Kanal2) aufgenommen (s. Abb.34). Zur automatischen Auswertung wurde die ‚Molecular Translocation BioApplication V2‘ verwendet. Hierbei wurden die Zellen zunächst über ihr Hoechst-Signal als Objekte definiert. Die Software generierte daraus eine nukleäre Maske, die dem Bereich des Zellkerns entspricht. Nicht-zelluläre Objekte wurden über ihre zu geringe Größe oder ihre zu geringe bzw. zu hohe Fluoreszenzintensität ausgeschlossen. Zur Untersuchung der intrazellulären GFP-Lokalisation generierte die Software um diese Kern-Maske eine Maske des zytoplasmatischen Bereichs. Diese wurde in ihrer Größe und durch Vorgabe einer Mindest-Intensität auf die Zellen angepasst. Da nach LMB-Gabe kaum mehr GFP-Signal im Zytoplasma vorhanden war, wurde nur ein minimaler Wert als Vorgabe der Mindest-Intensität gewählt.

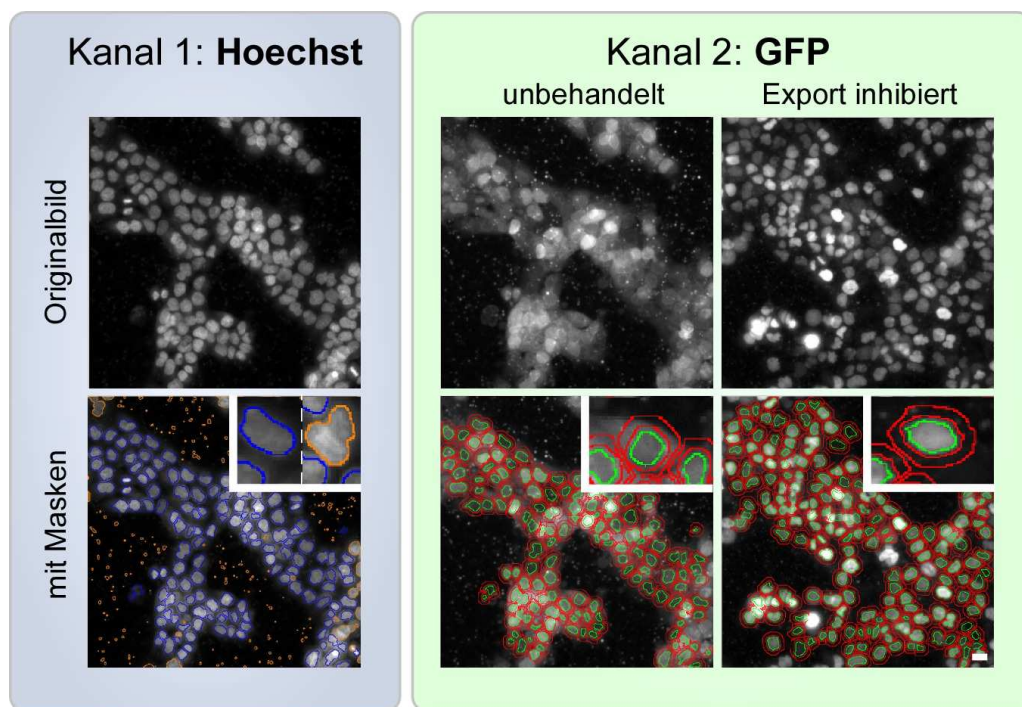


Abb. 34. Aufnahmen der A431_{RevNES}-Zellen mit dem ArrayScanVTI[®]

Hoechst- und GFP-Signal unbehandelter und mit LMB-behandelter A431_{RevNES}-Zellen. Oben sind die Originalaufnahmen gezeigt und darunter die von der Software generierten Masken zur Auswertung der Bildinformation. Zelluläre Objekte wurden über ihr Hoechst-Signal erkannt. Daraus definierte die Software den nukleären Bereich. Ausgehend davon wurde im Kanal 2 eine weitere Maske generiert, die zur Messung der zytoplasmatischen GFP-Intensität diente. Maßstabsbalken, 10µm.

Ein größtmöglicher Unterschied von DMSO- zu LMB-behandelten Zellen wurde in den *wells* mit der höchsten Zelldichte ($1 \cdot 10^4$) gefunden (s. Abb.35). Die Differenz der nukleären minus der zytoplasmatischen GFP-Intensität zeigte hier einen mehr als fünffachen Anstieg.

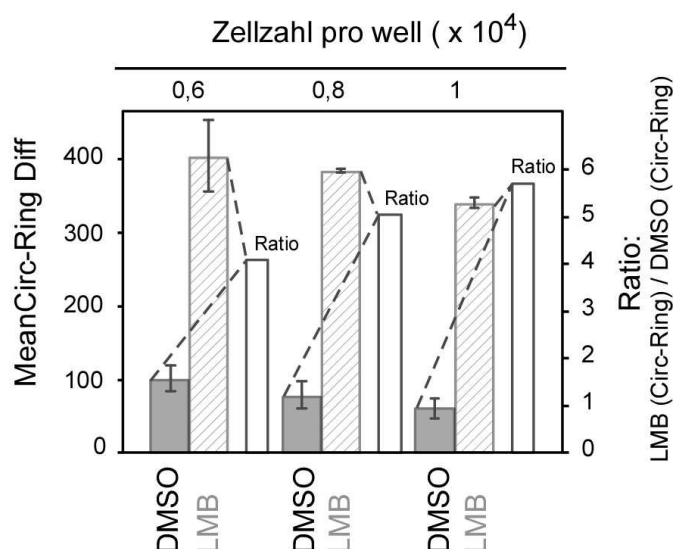


Abb. 35. Differenz von nukleärer und zytoplasmatischer GFP-Intensität in Abhängigkeit von der Zelldichte

Es wurden unterschiedliche Zellzahlen (6000/8000/10000) A431_{RevNES} in 384well-Platten ausgesät. Die Unterschiede der MeanCirc-RingDiff zwischen mit DMSO und LMB (10nM) behandelten Zellen wurden in einem relativen Wert (Ratio) dargestellt.

3.2.4 Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Bibliothek mit dem RevNES-Biosensor

Die Vorgehensweise der Plattenhandhabung während der Hochdurchsatzanalyse sowie der hierfür zu veranschlagende Zeitaufwand sind in Tab.24 zusammengefasst.

Tab. 24. Handhabungszeiten pro Platte während der Hochdurchsatzanalyse

	Vorgang	Gerät	Arbeitszeit je Platte	Inkubationszeit
Tag 1	Zellaussaat	elektronische Mehrkanalpipette	~ 10min	-
Tag 2	Substanz-Transfer	Sciclone I/O, Caliper	~ 5min	5h
	Fixierung (4%PFA)	elektronische Mehrkanalpipette	~ 2min	20min
	Waschen (PBS)	Biotek Elx405	~ 5min	-
	Hoechst-Färbung	elektronische Mehrkanalpipette	~ 2min	10min
	Waschen (PBS)	Biotek Elx405	~ 5min	-
	Versiegeln der Platten	manuell	< 1min	-
	Hochdurchsatzmikroskopie	ArrayscanVTI [®] mit TwisterII	> 1h	-

Mit Hilfe eines Handhabungsgeräts für Mikrotiterplatten (TwisterII) wurden die Platten in den ArrayScanVTI[®] eingestellt und entnommen, wodurch die mikroskopische Erfassung der Zellen über Nacht erfolgen konnte. Die Aufnahmezeit konnte sich bei Problemen mit dem Autofokus, z.B. in wells mit zytotoxischen Substanzen extrem verlängern. Je Platte entstand ein Datenvolumen von 1GB, woraus ein gesamtes Datenvolumen von über 48GB resultierte. Jede Platte enthielt eine Spalte mit DMSO- sowie eine Spalte mit LMB-behandelten Zellen als Negativ- bzw. Positivkontrolle.

Für die Kontrollen einer Platte der Hochdurchsatzanalyse sind die Unterschiede zwischen den gemessenen Parametern MeanCirc (Kern), MeanRing (Zytoplasma), MeanCirc-RingDiff

(Kern-Zytoplasma) und MeanCirc/RingRatio (Kern/Zytoplasma) in Abbildung 36 vergleichend dargestellt. Dabei handelt es sich stets um die gemessenen GFP-Intensitäten.

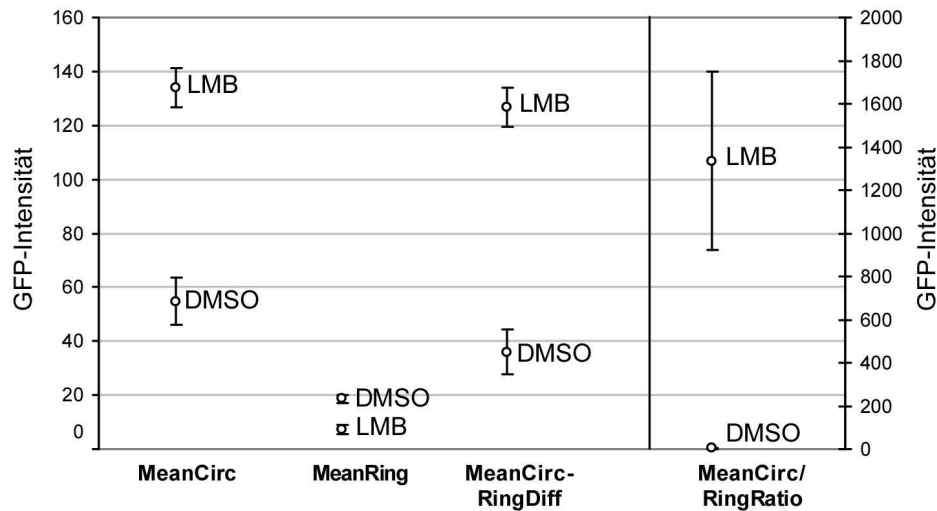


Abb. 36. Vergleich verschiedener Parameter der Kontroll-wells einer Platte

Vergleicht man die Mittelwerte der Kontrollen einer Platte der Hochdurchsatzanalyse in den unterschiedlichen Parametern MeanCirc, MeanRing, MeanCirc-RingDiff und MeanCirc/RingRatio, so zeigt letztere den stärksten Unterschied an. Fehlerbalken ergaben sich aus der Messung von 16 wells einer Platte.

Das Verwenden der Ratio aus Circ-GFP- und Ring-GFP-Intensität als Auswerteparameter zeigte den höchsten Unterschied zwischen DMSO- und LMB-Kontrollen an. Eine Darstellung der MeanCirc/RingRatio aller Platten der Hochdurchsatzanalyse ist in Abbildung 37 gezeigt. Schwankungen dieses Wertes zwischen den Platten können aus unterschiedlichen Belichtungszeiten resultieren, da für jede Platte in Abhängigkeit weniger, vorher festgelegter wells die Belichtungszeit automatisch definiert wurde.

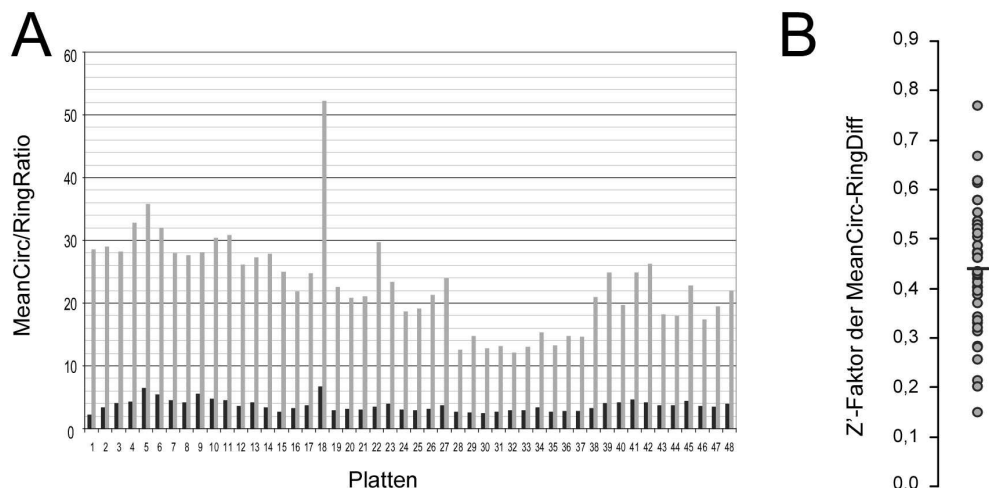


Abb. 37. Übersicht über die Stabilität des Assays im Verlauf der Hochdurchsatzanalyse

Trägt man die Werte der MeanCirc/RingRatio der Kontrollen aller Platten der Hochdurchsatzanalyse nebeneinander auf, so zeigt sich ein durchweg konstanter Unterschied zwischen Positiv- (LMB, grau) und Negativkontrolle (DMSO, schwarz) (A). Für die Kontrollen jeder Platte wurde der Z'-Faktor als Maß für die Qualität des Assays bestimmt. Der Mittelwert der errechneten Z'-Faktoren lag bei 0,41 (B).

Der Z'-Faktor dient in der Hochdurchsatzanalyse als Maß für die Qualität und Stabilität eines Assays und wird anhand der Werte der Kontroll-*wells* bestimmt. Für jede Platte der Hochdurchsatzanalyse wurde dieser aus den Mittelwerten der MeanCirc-RingDiff der Kontrollen berechnet. Der Mittelwert der Z'-Faktoren aller Platten der Hochdurchsatzanalyse lag bei 0,41, und lediglich zwei Platten wiesen einen Z'-Faktor von <0 auf.

Zur Auswahl der potentiellen *Hit*-Substanzen wurden die Werte MeanCirc/RingRatio und MeanCirc jeder Platte mit dem Programm Excel (Microsoft, Unterschleißheim) nach Werten durchsucht, die im Fall der MeanCirc/RingRatio mindestens eine 10fache Erhöhung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle zeigten oder im Fall der MeanCirc mindestens eine 2fache Erhöhung zeigten. Die Aufnahmen dieser *wells* wurden visuell inspiziert, um zytotoxische oder autofluoreszente Substanzen (s. Abb.38) auszusortieren, die von dem Programm nicht automatisch als solche erkannt werden konnten. Insgesamt wurden 1075 *wells* überprüft, was 6,4% der Substanzen der gesamten ChemBioNet-Bibliothek entspricht. Daraus wurden 120 Substanzen für das *Rescreening* ausgewählt, entsprechend 0,7% der ursprünglichen ChemBioNet-Bibliothek.

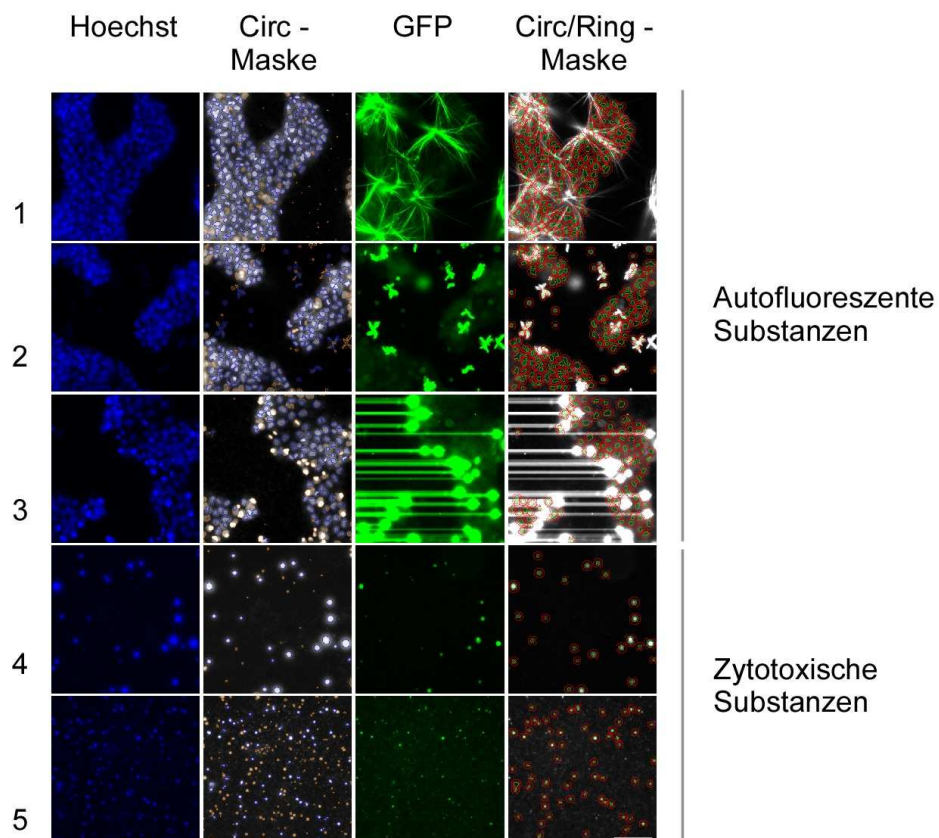


Abb. 38. Beispiele autofluoreszenter und zytotoxischer Substanzen

Gezeigt sind jeweils Aufnahmen des Hoechst-Signals, der darauf basierenden Circ-Maske, des GFP-Signals und die ausgehend von der Circ-Maske generierte Circ- und Ring-Maske des GFP-Kanals. Bildreihen 1 bis 3 zeigen Beispiele autofluoreszenter Substanzen und Bildreihe 4 und 5 zeigen Beispiele zytotoxischer Substanzen. 1 - Platte 31/J09; 2 – Platte 45/L22; 3 – Platte15/K13; 4 – Platte 46/I08; 5 – Platte 7/M14. Maßstabsbalken, 50µm.

Trägt man die zytoplasmatische gegen die nukleäre GFP-Intensität eines jeden *well*s einer Platte auf, so zeigt sich eine charakteristische Gruppierung der DMSO- und LMB-Kontrollen, der autofluoreszenten und der zytotoxischen Substanzen (s. Abb.39). Nicht-aktive Substanzen gruppieren um die DMSO-Kontrolle, potentielle *Hits* mit geringer Zytotoxizität gruppieren um die LMB-Kontrolle.

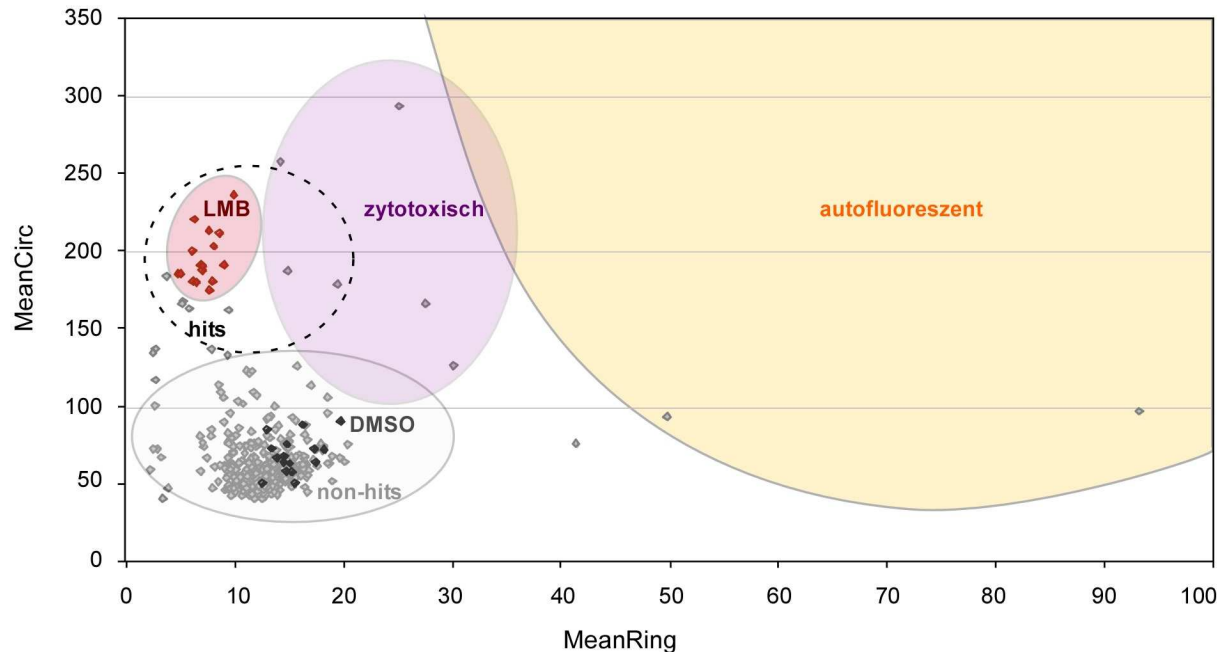


Abb. 39. Gruppierung der getesteten Substanzen in Abhängigkeit der ermittelten Werte für MeanRing und MeanCirc

Die Werte MeanRing und MeanCirc einer 384*well*-Platte der Hochdurchsatzanalyse sind exemplarisch gegeneinander aufgetragen. Diese Darstellung erlaubt eine Unterscheidung in charakteristische Substanz-Gruppen.

3.2.5 Rescreen der potentiellen *Hits*

Die 120 für den *Rescreen* ausgewählten Substanzen wurden in einer Konzentration von 25µM erneut auf A431_{RevNES}-Zellen getestet und mit dem ArrayScanVTI® ausgewertet. Bei Auftragung der nukleären gegen die zytoplasmatische GFP-Intensität (s. Abb.40) gruppieren die 120 Substanzen (blau) generell über der DMSO Kontrolle (grau). LMB (rot) mit dem stärksten nukleären GFP-Signal lag darüber. Ausgewählte *Hits* wurden in Hellblau markiert und lokalisieren bei dieser Auftragung links von der Hauptgruppe der getesteten Substanzen.

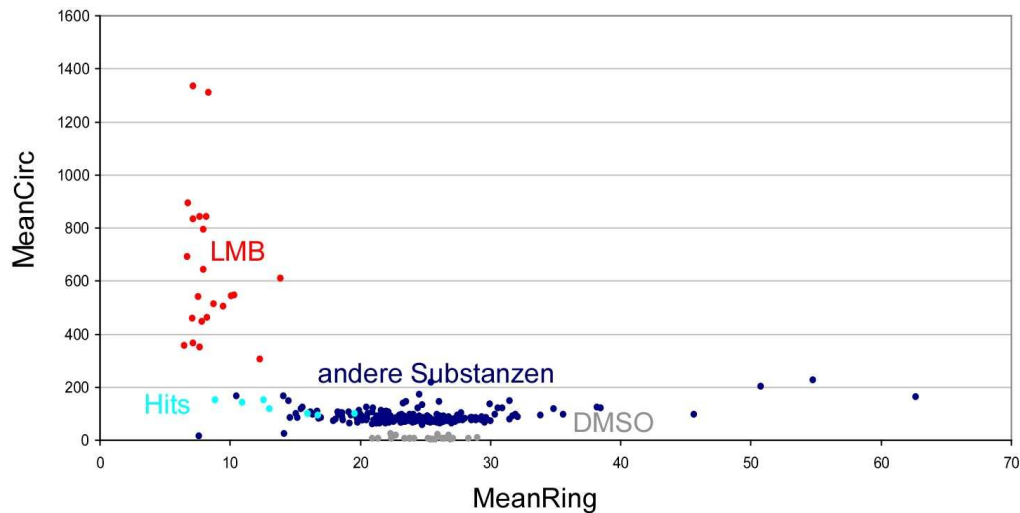


Abb. 40. Zytoplasmatische versus nukleäre Fluoreszenz des RevNES-Biosensors nach Inkubation mit den Substanzen aus dem Rescreen

Für jede getestete Substanz wurde jeweils die zytoplasmatische (MeanRing) gegen die nukleäre (MeanCirc) GFP-Intensität des RevNES-Biosensors aufgetragen. Werte der LMB-Positivkontrollen sind rot, die der DMSO-Negativkontrolle grau dargestellt. Die Gesamtheit der im Rescreen getesteten Substanzen ist blau dargestellt, wobei die ausgewählten *Hit*-Substanzen hellblau hervortreten.

Nach visueller Inspektion der Rescreen-Aufnahmen wurden 11 Substanzen, die eine deutliche Erhöhung der MeanCirc-RingDiff im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigten, zur weiteren Analyse ausgewählt (s. Abb.41).

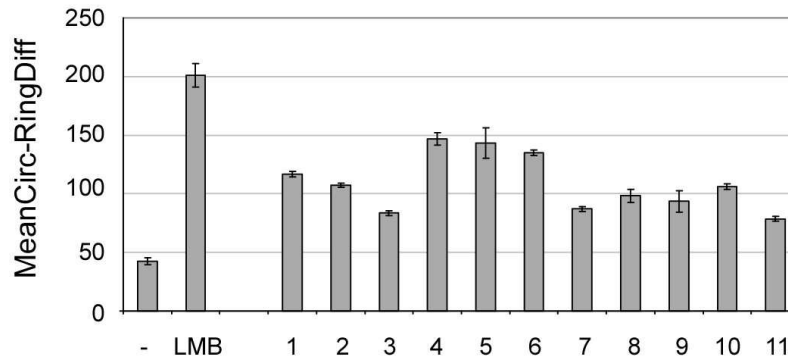


Abb. 41. Die *Hit*-Substanzen zeigen eine deutliche Erhöhung der MeanCirc-RingDifferenz im Vergleich zur Negativkontrolle

Die MeanCirc-RingDiff-Werte der zur weiteren Analyse ausgewählten *Hit*-Substanzen sind im Vergleich zur Negativkontrolle (-) deutlich erhöht. Fehlerbalken ergaben sich aus den Messungen zweier *wells*.

3.2.6 Bestätigung der Hits

Die elf Substanzen wurden bei ChemDiv (SanDiego, USA) in größerem Maßstab bestellt und in einer Konzentration von 25µM auf den RevNES-Biosensor transient exprimierenden HeLa-Zellen getestet. Dabei konnte für acht der elf *Hit*-Substanzen zu unterschiedlichen Effizienzen eine Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern verifiziert werden (s. Abb.42).

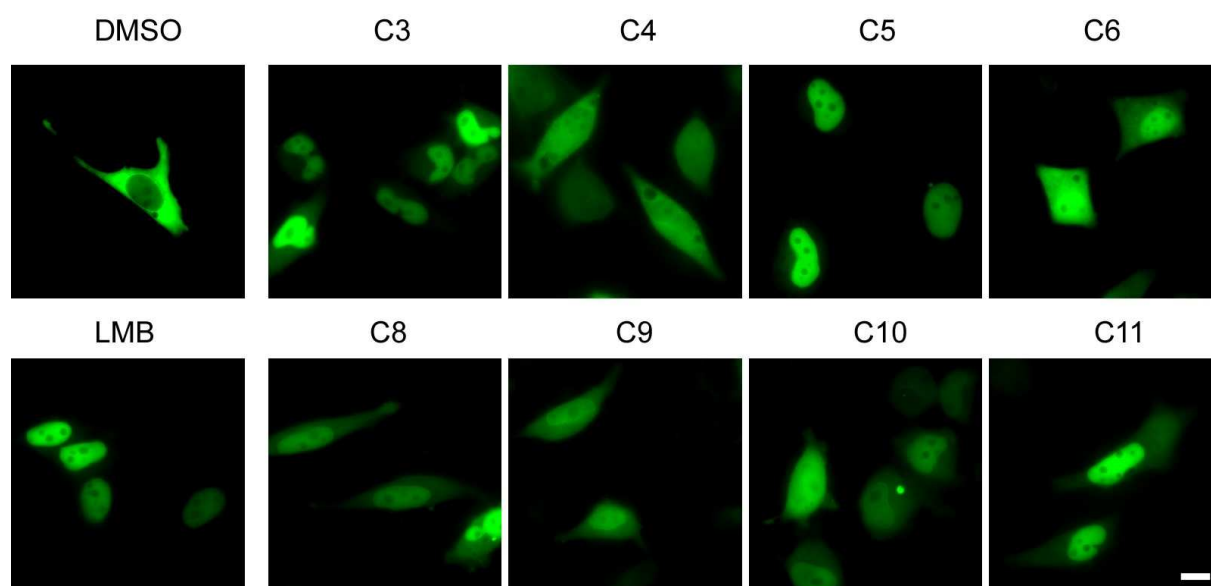


Abb. 42. Die neuen Exportinhibitoren erwirken zu unterschiedlichen Effizienzen eine Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern

HeLa-Zellen wurden mit dem RevNES-Biosensor transient transfiziert und mit den Exportinhibitoren in einer Konzentration von 25µM für 5h inkubiert. Hiernach konnte eine Akkumulation des RevNES-Biosensors zu unterschiedlichen Effizienzen mikroskopisch detektiert werden. Maßstabsbalken, 10µm.

Tabelle 25 gibt eine Übersicht über die Positionen der neuen Exportinhibitoren auf den Platten der ChemBioNet-Substanzbibliothek (Position Screen) sowie die zugehörigen Identifikationsnummern.

Tab. 25. Hit-Substanzen der RevNES-Hochdurchsatzanalyse

#	Position Screen (Platte/well)	Position Rescreen (well)	MeanCirc-RingDiff (LMB 200,9/DMSO 42,6)	ID_FMP	ID_ChemDiv	MW
3	7/G03	C4	135,2	26023	3448-1935	483,41
4	16/A12	F22	93,5	29329	K286-0355	558,70
5	25/J19	I18	78,6	32618	K906-0238	341,70
6	26/E19	I20	87,0	32965	6285-0301	452,90
8	30/H18	J10	83,5	34360	8013-1639	338,34
9	31/I11	J14	146,8	34601	8014-8960	366,73
10	33/O15	J18	143,3	35375	8017-7412	171,24
11	35/H05	J22	106,2	35912	C326-0050	526,55

3.3 Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Bibliothek mit dem SurvivinNES-Biosensor

3.3.1 Herstellung einer stabilen SurvivinNES-Biosensor-Zelllinie (HeLa_{SurvNES})

Zur Herstellung von HeLa-Zellen, die stabil den SurvivinNES-Biosensor exprimieren wurde die Methode der viralen Transduktion verwendet. Durch Transfektion von 293T-Zellen mit dem pINCO-Survivinsensor und den weiteren zur Virenproduktion benötigten Plasmiden (siehe 2.4.4.1) wurde die Produktion von Viruspartikeln initiiert. Diese wurden im nächsten Schritt auf HeLa-Zellen gegeben, wodurch es zu einer Infektion dieser Zellen und in Folge dessen einer stabilen Integration der Sequenz des SurvivinNES-Biosensors in das zelluläre Genom kam. Erfolgreich transduzierte Zellen wurden durch wiederholte Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung angereichert (s. Abb.43).

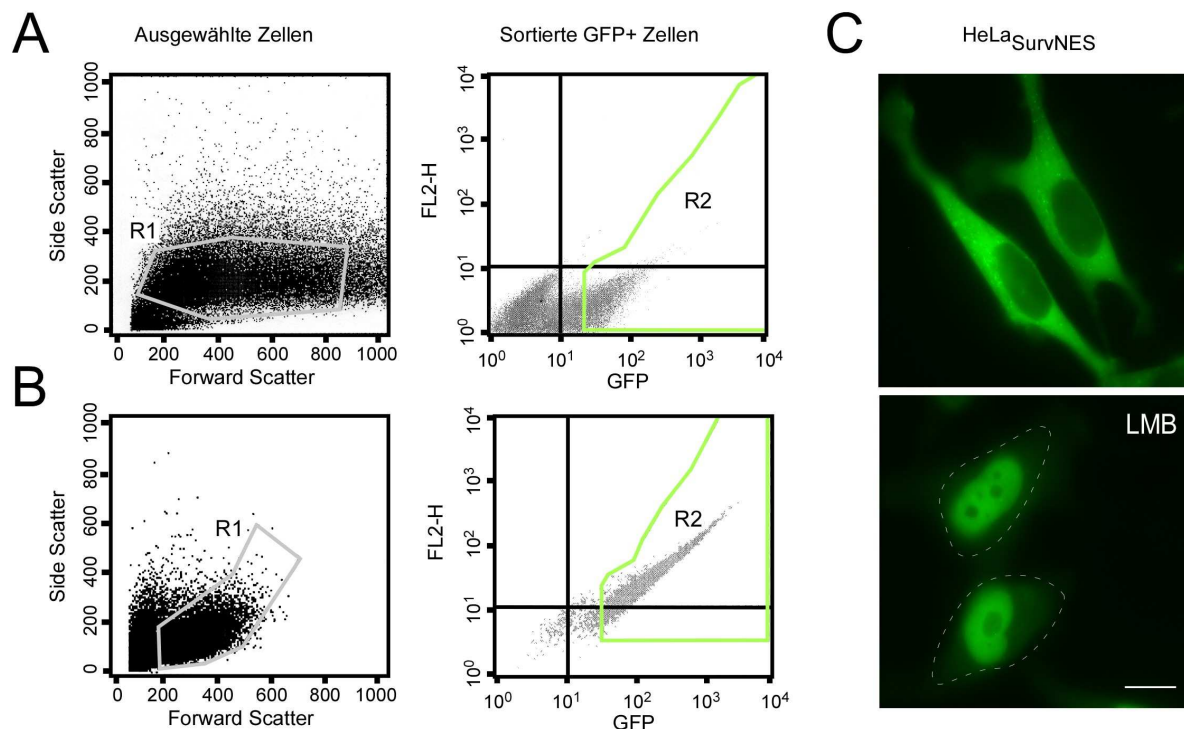


Abb. 43. Sortierung von GFP-positiven HeLa-SurvivinNES-Biosensor-Zellen

Mit dem SurvivinNES-Biosensor transduzierte HeLa-Zellen wurden auf hohe GFP-Expression hin sortiert. Einen Monat später wurden diese Zellen erneut nach gleichen Kriterien sortiert, um eine möglichst reine, stark exprimierende Zellpopulation zu erhalten (HeLa_{SurvNES}). Maßstabsbalken, 10µm.

3.3.2 Vortest für die Hochdurchsatzanalyse am FMP Berlin

Die stabilen HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden am FMP Berlin von Christoph Erdmann in 384well-Platten ausgesät und mit 10nM LMB für 2h behandelt. Mit Hilfe der ‚Molecular Translocation BioApplication V3‘ wurden die mit dem ArrayscanVTI[®] aufgenommenen Bilder ausgewertet (s. Abb.44). Es zeigte sich dabei ein deutlicher Unterschied in der MeanCirc/RingRatio für die DMSO- und die LMB-Kontrolle.

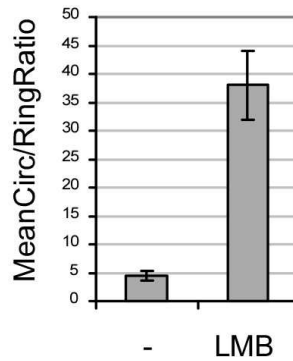


Abb. 44. Vortest der HeLa_{SurvNES}-Zellen auf dem ArrayScanVTI®

Vergleich der Mittelwerte dreier wells für die MeanCirc/RingRatio. Es zeigte sich ein mehr als fünffacher Unterschied zwischen unbehandelten und mit LMB behandelten Zellen.

3.3.3 Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Bibliothek mit dem SurvivinNES-Biosensor

Für die Hochdurchsatzanalyse der ChemBioNet-Substanzbibliothek mit dem SurvivinNES-Biosensor wurde verfahren wie mit dem RevNES-Biosensor. Lediglich die Inkubation mit den Substanzen wurde aufgrund der vergleichsweise langsameren Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors unter Export-Inhibition statt für fünf Stunden über Nacht durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der neueren Version der ‚Molecular Translocation BioApplication V3‘. Mittelwerte der MeanCirc-RingDiff-Werte der Kontrollen aller Platten zeigen die deutliche Trennung des Signals der DMSO- und LMB-behandelten wells an (s. Abb.45).

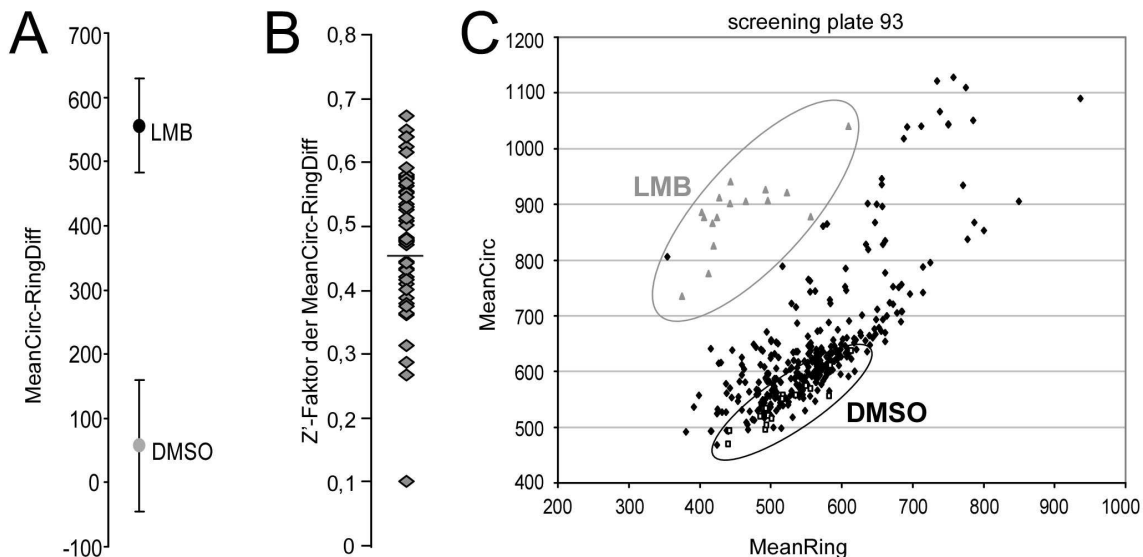


Abb. 45. Kontrollen und Beispiel-Werte einer Platte der SurvivinNES-Hochdurchsatzanalyse

Mittelwerte für Negativ (DMSO)- und Positiv (LMB)-Kontrollen der SurvivinNES-Hochdurchsatzanalyse von 48 Platten mit je 16 wells pro Kontrolle (A). Z'-Faktoren der Kontrollen der Platten der Hochdurchsatzanalyse mit einem Mittelwert von 0,45 (B). Gegenüberstellung der zytoplasmatischen (MeanRing) versus der nukleären (MeanCirc) GFP-Intensitäten einer Platte der Hochdurchsatzanalyse (C).

Es wurde wiederum der Z'-Faktor zur Überprüfung der Qualität des Assays berechnet, der einen Mittelwert aller Platten der Hochdurchsatzanalyse von 0,45 anzeigt. Die Auswahl der *Hit*-Substanzen erfolgte mit Hilfe des Programms Pipeline Pilot (Accelrys, SanDiego, CA, USA). Auswahlkriterium war eine Erhöhung der MeanCirc-RingDiff mindestens um die zweifache Standardabweichung der jeweiligen Kontrollen. Als weitere Einschränkung wurde das Vorhandensein von minimal 50 Zellen pro *well* gesetzt, um zytotoxische Substanzen von der weiteren Analyse auszuschließen.

3.3.4 Rescreen der potentiellen Hits

Die ausgewählten Substanzen wurden erneut auf HeLa_{SURVNES}-Zellen getestet (25µM). Dabei wurden die Zellen einer Platte für fünf Stunden inkubiert und die einer anderen für 24h (s. Abb.46). Die Bildaufnahme sowie -auswertung erfolgte mit Hilfe des ArrayScanVTI®.

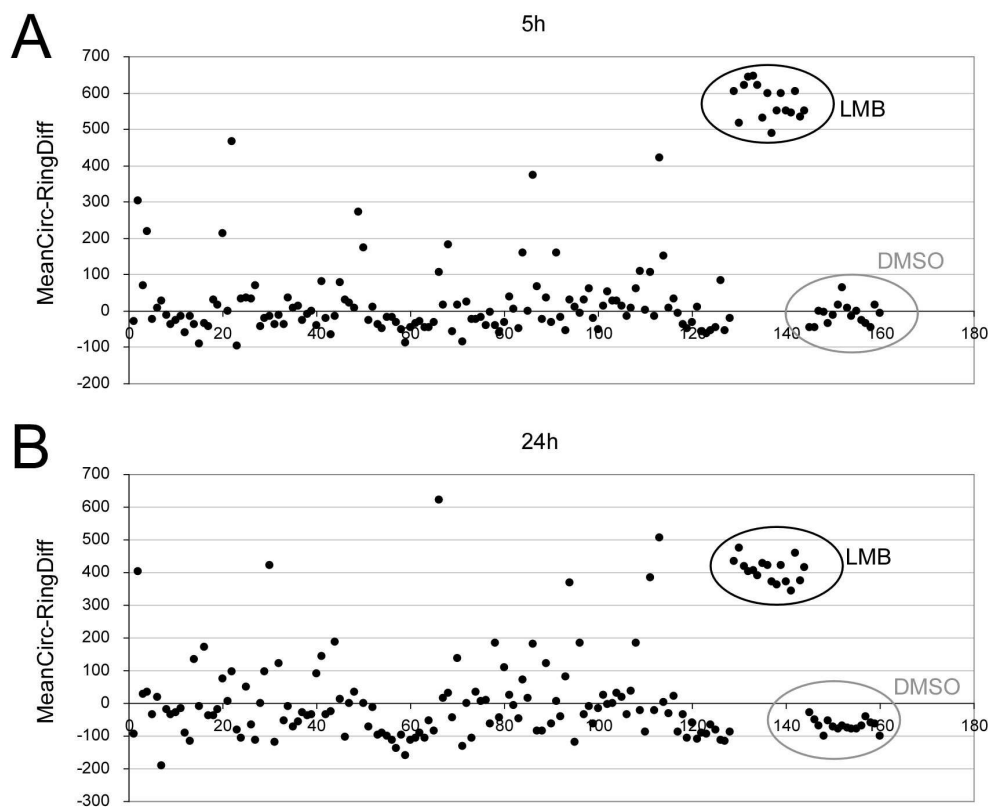


Abb. 46. Auswertung des SurvivinNES-Rescreens nach fünf- und 24-stündiger Inkubation
MeanCirc-RingDiff nach Inkubation der HeLa_{SURVNES}-Zellen mit den Substanzen des Rescreens für 5h (A) sowie nach 24h (B). Positiv-Kontrollen (LMB) und Negativ-Kontrollen (DMSO) sind markiert.

Die *wells* der Substanzen, die einen mindestens um die zweifache Standardabweichung der DMSO-Kontrolle erhöhten Wert der MeanCirc-RingDiff aufwiesen, wurden visuell inspiziert. Trotz des Ausschlusskriteriums einer Mindestzellzahl bei der Hochdurchsatzanalyse zeigten viele Substanzen im Rescreen ein deutlich zytotoxisches Verhalten. Bis auf eine Ausnahme gingen alle in obiger Abbildung vielversprechend erscheinenden *Hits* auf zytotoxische

Substanzen zurück. Mit dieser Hochdurchsatzanalyse wurde nur die bereits bekannte Substanz C5 wiedergefunden, jedoch keine neuen Inhibitoren.

3.4 Vergleich der RevNES- und SurvivinNES-Biosensoren

Die NES von HIV-1 Rev und Survivin unterscheiden sich in der durch sie vermittelten Kinetik des Proteinexports. Das RevNES gehört zur Gruppe der schnellen NES, wohingegen das SurvivinNES zur Gruppe der langsameren NES gehört. Um die Lokalisation der jeweiligen Biosensoren im Zytoplasma zu gewährleisten mussten unterschiedlich starke NLS integriert werden. Das RevNES wurde mit dem starken SV40-NLS kombiniert und das SurvivinNES mit dem schwächeren AP5-NLS. Bei einer Inhibition des Exports kommt es folglich durch die verschiedenen NLS zu einer unterschiedlich schnellen Akkumulation des Translokations-Biosensors im Zellkern. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen dem RevNES- und dem SurvivinNES-Biosensor wurden die Inhibitions-Kinetiken von HeLa_{RevNES}- und HeLa_{SurvivinNES}-Zellen nach Inkubation mit LMB mikroskopisch analysiert (s. Abb.47). Für den RevNES-Biosensor wurde nach 30min eine vollständige Akkumulation im Zellkern detektiert, wohingegen der SurvivinNES-Biosensor zu diesem Zeitpunkt noch vollständig im Zytoplasma vorlag. Erst nach einer vierstündigen Inkubation mit LMB lag der SurvivinNES-Biosensor deutlich akkumuliert im Zellkern vor.

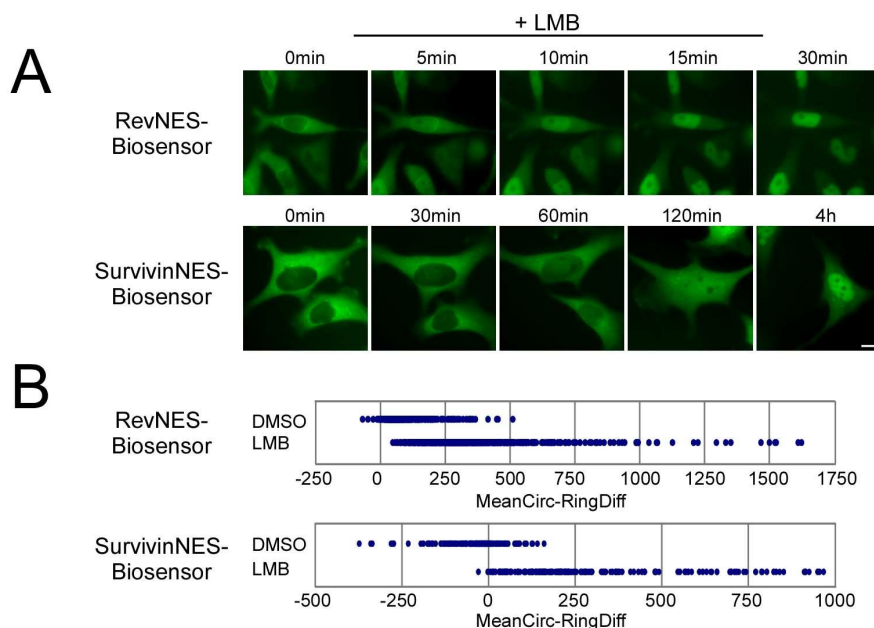


Abb. 47. Vergleich der RevNES- und SurvivinNES-Biosensoren

HeLa_{RevNES}- und HeLa_{SurvivinNES}-Zellen wurden mit LMB (2nM) inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten fluoreszenzmikroskopisch analysiert (A). Die Biosensor-Lokalisation in HeLa_{RevNES}- und HeLa_{SurvivinNES}-Zellen wurde nach fünfstündiger Inkubation mit LMB (10nM) mit dem ArrayScanVTI[®] unter Verwendung der „Molecular Translocation BioApplication V4“. ausgewertet. Die Ergebnisse der MeanCirc-RingDiff sind auf Einzelzellebene für jeweils mindestens 500 Zellen dargestellt (B). Maßstabsbalken, 10µm.

Die beiden Biosensoren wurden weiterhin anhand der Werte der MeanCirc-RingDiff des Grundzustands und unter Export-Inhibition verglichen (s. Abb.47B). Im Grundzustand wies die Population der HeLa_{RevNES}-Zellen eine MeanCirc-RingDiff von über null auf. Die Biosensor-Fluoreszenz war also im Zellkern etwas stärker als im Zytoplasma. Nach Inkubation mit LMB stieg die MeanCirc-RingDiff deutlich an. Für den SurvivinNES-Biosensor lag die MeanCirc-RingDiff im Grundzustand unter bzw. um null. Wiederum war die MeanCirc-RingDiff nach Inkubation mit LMB deutlich erhöht, jedoch weniger stark als bei dem RevNES-Biosensor. Zur Bestätigung der Lokalisation des RevNES-Biosensors an der Kernmembran wurden HeLa_{RevNES}-Zellen mit NPC-spezifischem Antikörper Immunfluoreszenz-markiert oder mit pC3-Crm1-mCherry transfiziert (s. Abb.48). Durch den NPC-spezifischen Antikörper wird die Kernmembran markiert. Bei der Übereinanderlegung mit dem Signal des RevNES-Biosensors zeigte sich eine deutliche Kolokalisation beider Signale an der Kernmembran. Diese war auch mit dem Signal des mCherry markierten Crm1 zu detektieren.

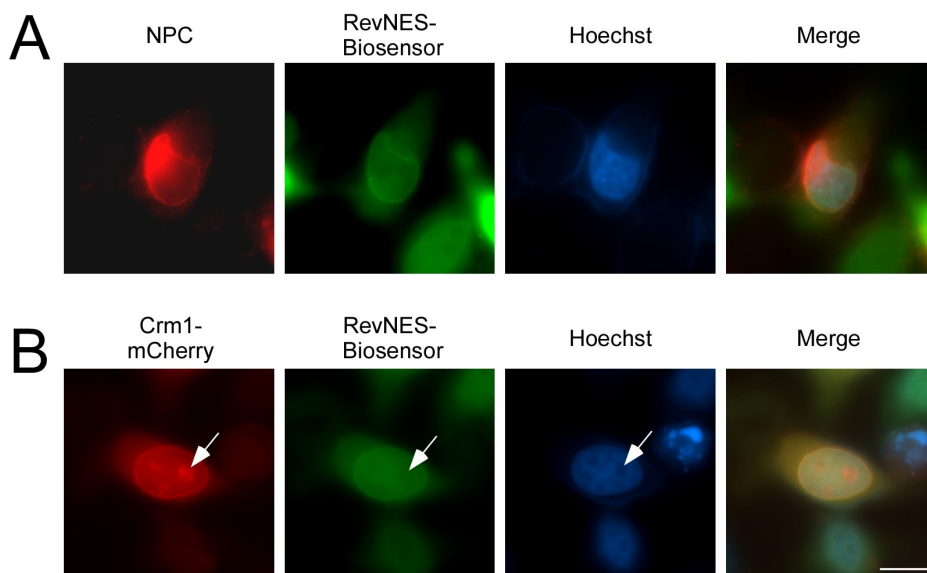


Abb. 48. Lokalisation des RevNES-Biosensors an der Kernmembran

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden mit dem NPC-spezifischen Antikörper Immunfluoreszenz-markiert (A) oder mit pC3-Crm1-mCherry transfiziert und mit Hoechst gefärbt (B). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnte eine Kolokalisation des RevNES-Biosensors mit dem Signal des NPC-spezifischen Antikörpers sowie mit Crm1-mCherry an der Kernmembran detektiert werden. Wie mit dem Pfeil markiert, konnte Crm1 zudem an den Nukleoli detektiert werden. Maßstabsbalken, 10µm.

3.5 Charakterisierung der neuen Exportinhibitoren

Die bestellten *Hit*-Substanzen wurden in einer Konzentration von 50mM in DMSO gelöst und für die zellulären Tests verwendet. Ab sofort sind die Substanzen als Exportinhibitor bezeichnet. C24 und C28 wurden in späteren Analysen als Homologe zu C3 gefunden und sind in Abhängigkeit davon nur teilweise in den Versuchen und Ergebnissen vertreten.

3.5.1 Stabilität des RevNES-Biosensors nach Behandlung mit Exportinhibitoren

Um zu überprüfen, ob die neuen Exportinhibitoren die Integrität des RevNES-Biosensors beeinträchtigen, wurden HeLa_{RevNES}-Zellen für fünf Stunden mit diesen inkubiert. Mittels Western Blot und GFP-spezifischem Antikörper wurde die Größe des RevNES-Biosensors untersucht (s. Abb.49).

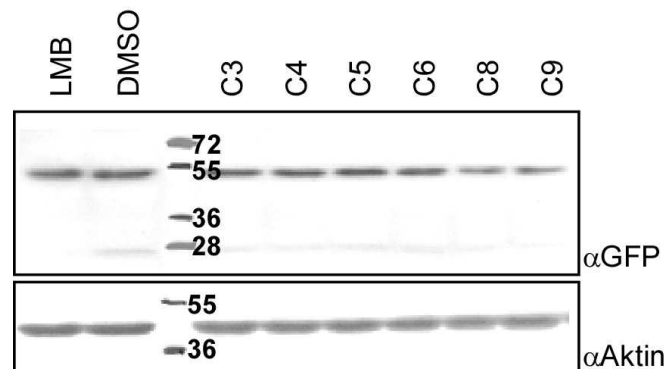


Abb. 49. Integrität des RevNES-Biosensors nach Inkubation mit den Exportinhibitoren

Durch eine fünfstündige Inkubation mit den Exportinhibitoren wurde die Integrität des Biosensors nicht negativ beeinflusst. Dies wurde durch die Detektion des RevNES-Biosensors mit dem GFP-spezifischen Antikörper gezeigt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Aktin.

Es konnte ein Signal mit dem GFP-spezifischen Antikörper auf Höhe des errechneten Molekulargewichts des RevNES-Biosensors (~55kDa) nach fünfstündiger Inkubation von HeLa_{RevNES}-Zellen mit den unterschiedlichen Exportinhibitoren detektiert werden, aber keine Produkte abweichenden Laufverhaltens. Somit haben die Exportinhibitoren keinen negativen Einfluss auf die Integrität des Biosensors.

3.5.2 LC-MS-Analyse der in DMSO gelösten Exportinhibitoren (FMP, Berlin)

Zur Überprüfung der von ChemDiv gelieferten Exportinhibitoren wurden diese von Dr. Michael Lisurek am FMP (Berlin) per *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS) analysiert. Die in DMSO gelösten Exportinhibitoren wiesen nur im Fall von C5 und C6 eine Reinheit von unter 90% auf (s. Tab.26). Die Strukturformeln konnten bei der Analyse alle bestätigt werden. Es wurde zudem eine weitere Messung nach zweistündiger Inkubation bei RT in der zur Messung verwendeten H₂O-Methanol-Lösung durchgeführt. Dabei zeigten alle Exportinhibitoren eine geringere Reinheit als bei der direkten Messung nach Aufnahme in H₂O-Methanol. Für C9 konnte mit dem LC-MS kein Signal erhalten werden.

Tab. 26. LC-MS-Analyse der Exportinhibitoren

Exportinhibitor	Reinheit DMSO stock (%)	verdünnt in H ₂ O-Methanol (1:1), 2h RT inkubiert (%)
3	95,3	85,9
4	92,6	60,9
5	82,9	n.d.
6	84,3	60
8	94,9	93,3
9	n.d.	n.d.
10	100	92,8
11	96,7	18,7

3.5.3 Lipophilität der Exportinhibitoren

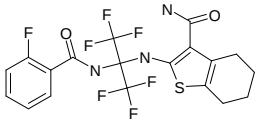
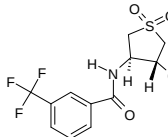
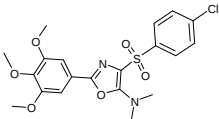
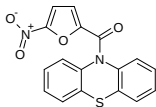
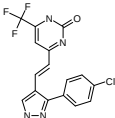
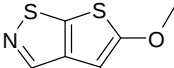
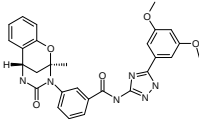
Die Lipophilität von Substanzen wird über den n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (P) beschrieben. Dieser wird gebräuchlich als logP dargestellt und beschreibt die Verteilung einer Substanz in den beiden Lösemittelphasen im Gleichgewichtszustand (Leo 1971). Werte größer Null verweisen auf hydrophobe Substanzen, die sich eher in der lipophilen Phase befinden, und Werte kleiner Null deuten auf hydrophile Substanzen, die sich in der wässrigen Phase befinden. Für alle Exportinhibitoren wurden die jeweiligen ID-Nummern der Internet-Seiten ChemSpider (<http://www.chemspider.com>) und PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen (s. Tab.27). Die vorhergesagten logP-Werte stammen von ChemSpider.

Tab. 27. Charakteristika der Exportinhibitoren nach ChemSpider

Exportinhibitor	PubChem ID	ChemSpider ID	logP(pH 7.4)	H-Brücken Akzeptor	H-Brücken Donor	Frei rotierende Bindungen	polare Oberfläche (Å²)
3	1716532	1364269	7,6	5	4	5	72,1
4	4400512	3601727	2,9	9	0	11	187,35
5	4072971	3288012	0,94	4	1	2	62,83
6	1303787	1093165	3,74	8	0	7	99,48
8	672140	585163	2,98	6	0	2	104,57
9	5742274	4674523	4,11	3	2	3	50,49
10	5300911	4461230	3,37	2	0	1	78,6
11	20851784	20250816	3,93	11	3	5	130,7
24	3644444	2878435	7,72	5	4	5	72,1
28	587195	510405	8,82	5	4	5	72,1

Tabelle 28 gibt eine Übersicht über die Strukturformeln, Molekulargewichte und IUPAC-Namen der neuen Exportinhibitoren.

Tab. 28. Strukturformeln und IUPAC-Namen der Exportinhibitoren

Exportinhibitor	Formel	Struktur	M [g/mol]	IUPAC-Name (nach Chempider)
3	$C_{19}H_{16}F_7N_3O_2S$		483,0851	2-({1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propan-2-yl}amino)-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carboxamide
5	$C_{12}H_{11}ClF_3NO_3S$		341,01	N-(4-chloro-1,1-dioxidotetrahydrothiophen-3-yl)-3-(trifluoromethyl)benzamide
6	$C_{20}H_{21}ClN_2O_6S$		452,9	4-[(4-chlorophenyl)sulfonyl]-N,N-dimethyl-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1,3-oxazol-5-amine
8	$C_{17}H_{10}N_2O_4S$		338,3	(5-nitrofuran-2-yl)(10H-phenothiazin-10-yl)methanone
9	$C_{16}H_{10}ClF_3N_4O$		366,7	4-[(E)-2-solethenyl]-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2(1H)-one
10	$C_6H_5NOS_2$		171,2	5-methoxythieno[3,2-d]isothiazole
11	$C_{28}H_{26}N_6O_5$		526,5	k.A.

3.5.4 Inhibitionskinetiken der neuen Exportinhibitoren

Die Exportinhibitoren wurden hinsichtlich der Kinetik untersucht, mit der sie den Export des RevNES-Biosensors zu inhibieren vermögen (s. Abb.50). Dazu wurden HeLa_{RevNES}-Zellen mit diesen in einer Konzentration von 25µM inkubiert. Nach 30min, 1h, 2h und 6h wurden die Zellen mikroskopisch analysiert. LMB wurde in einer Konzentration von 10nM als Vergleich mitgeführt.

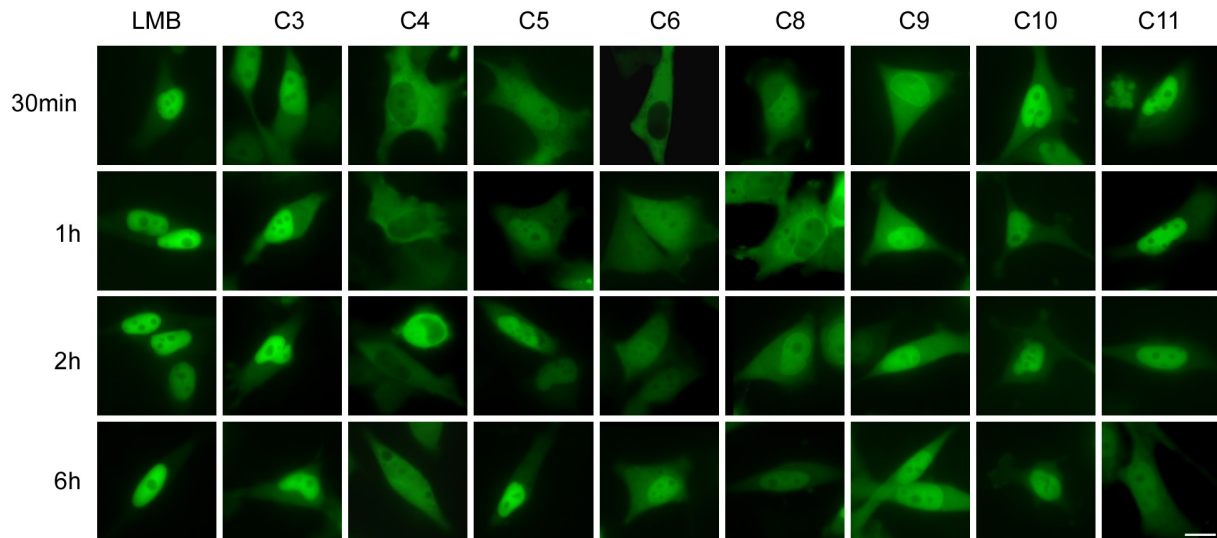


Abb. 50. Vergleich der Inhibitionskinetiken der neuen Exportinhibitoren

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden mit den Exportinhibitoren (25µM) inkubiert und zu den oben aufgeführten Zeitpunkten mikroskopisch analysiert. Schnelle Exportinhibitoren wie C3 und C11 erwirkten eine Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern bereits nach 1h bzw 30min, wohingegen andere hierfür bis zu 5h benötigten. Eine unvollständige Inhibition des Exports wurde im Fall von C4, C6, C8 und C9 detektiert. Maßstabsbalken, 10µm.

Die neuen Exportinhibitoren vermitteln die Exportinhibition des RevNES-Biosensors nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und in unterschiedlicher Effizienz. Nach 30-minütiger Inkubation mit C10 oder C11 war bereits eine vollständige Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern zu detektieren. Für C3 und C9 war dies erst nach einer zweistündigen Inkubation zu beobachten, wobei im Fall von C9 nur eine wesentlich schwächere Akkumulation detektiert werden konnte. Erst nach sechsständiger Behandlung mit C4, C5, C6 oder C8 konnte eine maximale Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern gefunden werden, wobei C4, C6 und C8 eine deutlich schwächere Anreicherung im Vergleich zu C3, C5 oder LMB zeigten.

3.5.5 Lokalisation des SurvivinNES-Biosensors in HeLa-Zellen

Alle getesteten Exportinhibitoren inhibieren auch den Export des SurvivinNES-Biosensors. HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden mit den Exportinhibitoren in einer Konzentration von 25µM inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert (s. Abb.51). Im

Vergleich zu dem RevNES-Biosensor benötigten die Exportinhibitoren eine längere Inkubationszeit, um den Export des SurvivinNES-Biosensors komplett zu hemmen. So benötigte C3 zum Beispiel mindestens 5h für eine vollständige Inhibition, bei C5 war diese erst nach 24h detektierbar. Für die Inhibitoren C3, C10 und C11 konnte nach 24-stündiger Inkubation der HeLa_{SurvNES}-Zellen keine Aktivität mehr gefunden werden.

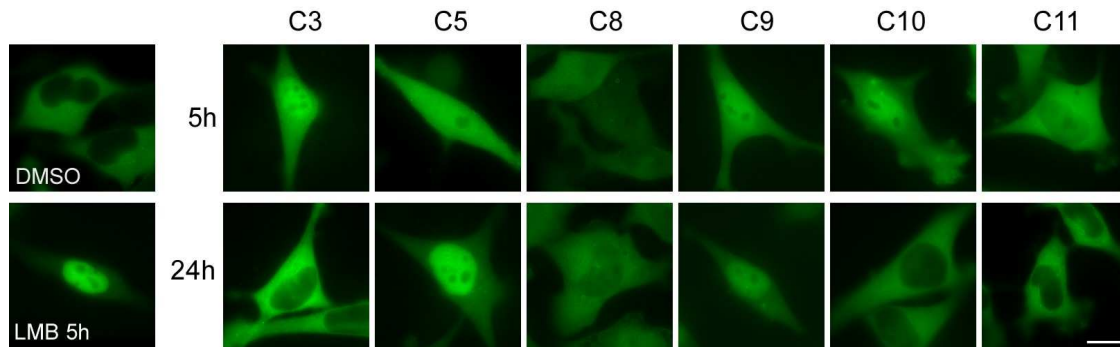


Abb. 51. Exportinhibition des SurvivinNES-Biosensors

HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden mit den neuen Exportinhibitoren (25 μ M) inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken, 10 μ m.

Weiterhin wurden A431-Zellen, die Survivin-GFP stabil exprimieren, mit den verschiedenen Exportinhibitoren in einer Konzentration von 25 μ M inkubiert (s. Abb.52). Der Export des Survivin-GFPs wird ebenso wie der des SurvivinNES-Biosensors von den neuen Exportinhibitoren gehemmt. Wie bereits mit dem SurvivinNES-Biosensor gefunden, bedarf es einer unterschiedlich langen Inkubationszeit bis zu einer maximalen Akkumulation des Survivin-GFPs im Zellkern.

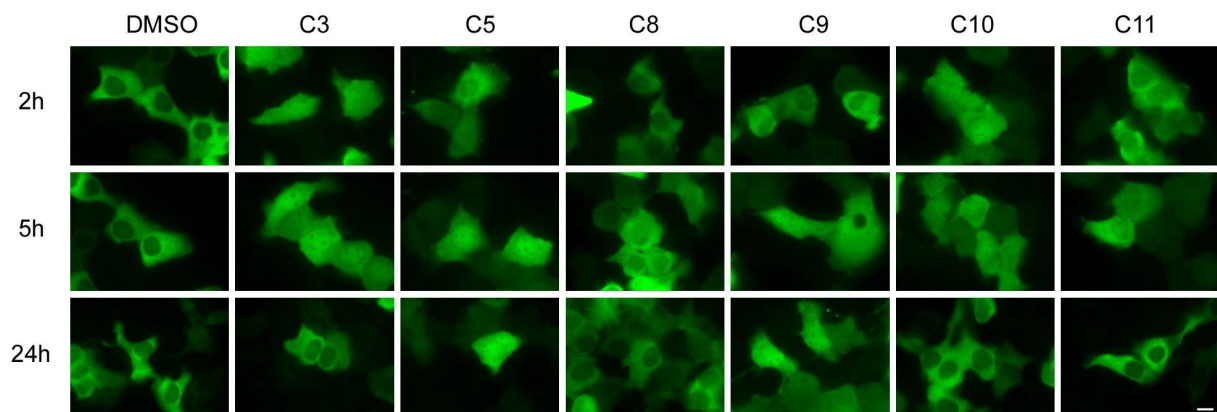


Abb. 52. Die neuen Inhibitoren hemmen den Export von Survivin-GFP

Survivin-GFP stabil exprimierende A431-Zellen wurden mit den Exportinhibitoren (25 μ M) inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken, 10 μ m.

3.5.6 Lokalisation von E1B-GFP in HeLa-Zellen

Das NES des viralen Proteins E1B gehört wie das HIV-1 RevNES zur Gruppe der schnellen Export-Signale. Um die Aktivität und das jeweilige kinetische Profil der neuen Inhibitoren hinsichtlich des Exports eines weiteren Proteins zu testen, wurde das E1B-Protein in Fusion an GFP verwendet. E1B-GFP transient exprimierende HeLa-Zellen wurden mit den Exportinhibitoren in einer Konzentration von 25µM inkubiert. Die mikroskopische Detektion erfolgte zu den in Abb.53 dargestellten Zeitpunkten.

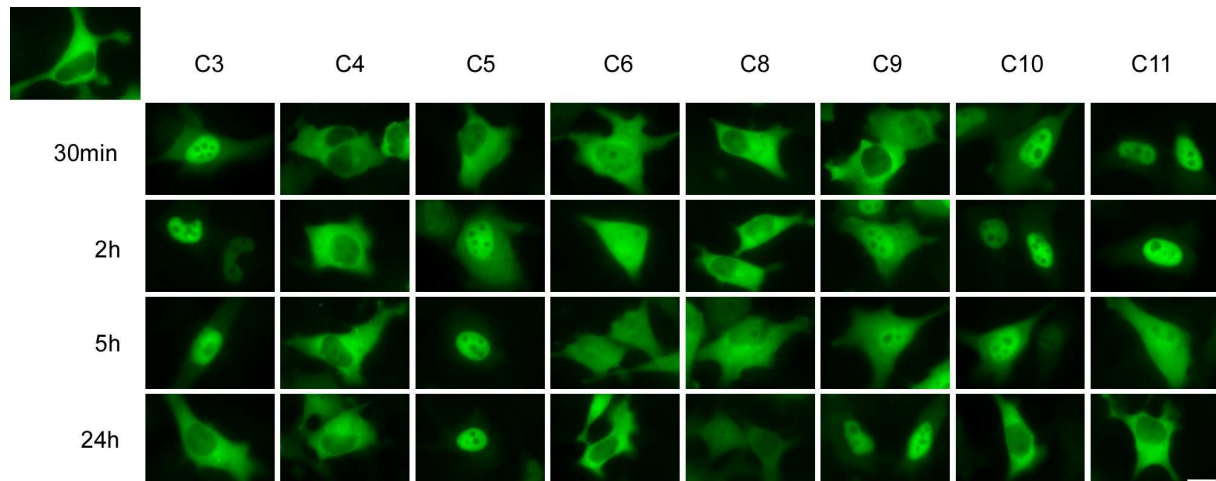


Abb. 53. Effekt der neuen Inhibitoren auf die Lokalisation von E1B-GFP

Der Export des E1B-GFPs bei transienter Expression in HeLa-Zellen wird durch die neuen Inhibitoren gehemmt. Nach Inkubation mit den Exportinhibitoren (25µM) konnte zu den untersuchten Zeitpunkten eine unterschiedlich starke Akkumulation des E1B-GFPs im Zellkern gefunden werden. Maßstabsbalken, 10µm.

Nach 30-minütiger Inkubation konnte für C10 und C11 bereits eine maximale Akkumulation des E1B-GFPs im Zellkern gefunden werden. Für C3 und C6 war dies nach 2h und für C5 nach 5h zu detektieren, wobei mit C6 keine vollständige Akkumulation erreicht werden konnte. Nur eine geringe Aktivität auf den Export des E1B-GFPs zeigten C4 und C8. Erst nach 24-stündiger Inkubation konnte mit C9 eine maximale Akkumulation detektiert werden. C5 und C9 waren die einzigen Exportinhibitoren, die nach 24-stündiger Inkubation noch eine Aktivität zeigten.

3.5.7 Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitorwirkung

HeLa_{RevNES}- und HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Exportinhibitoren für 2h bzw 5h inkubiert, um, ausgehend von der in der Hochdurchsatzanalyse verwendeten Konzentration von 25µM, deren inhibitorische Wirkung auch bei geringeren Konzentrationen zu untersuchen. Es wurden je Konzentration drei 96wells mit dem ArrayScanVTI[®] aufgenommen und mit der ‚Molecular Translocation BioApplication V4‘ ausgewertet. Für jeden Exportinhibitor nahm der

Wert der MeanCirc-RingDiff mit abnehmender Konzentration ab (s. Abb.54). In der rechten oberen Graphikecke ist jeweils der Biosensor in unbehandeltem Zustand gezeigt.

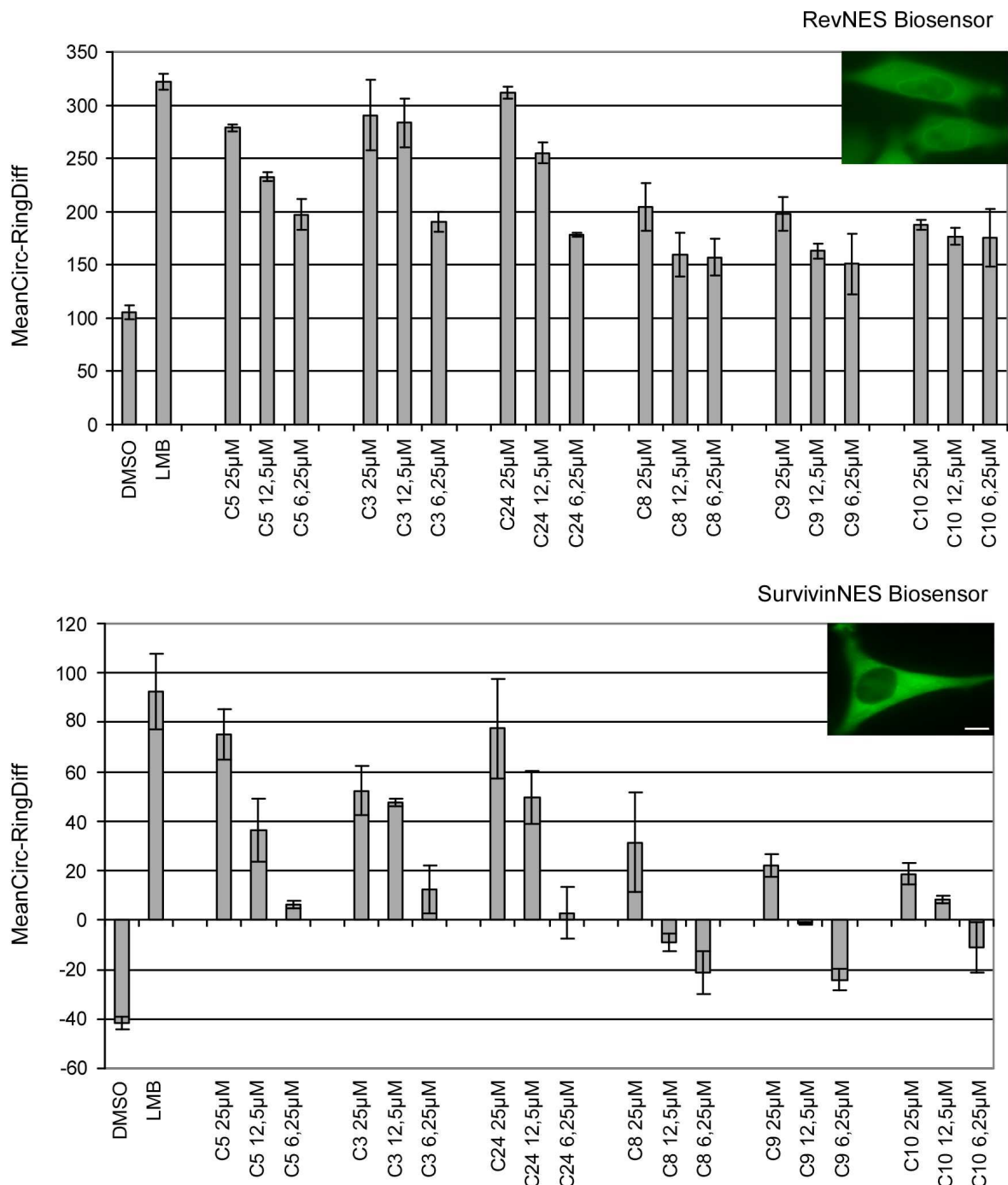


Abb. 54. Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition

Die von den Exportinhibitoren vermittelte Inhibition war abhängig von der eingesetzten Konzentration. Dargestellt sind die MeanCirc-RingDiff-Werte für den RevNES- und SurvivinNES-Biosensor nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der Exportinhibitoren. Für jeden Exportinhibitor konnte eine schwächere Inhibition mit verminderter Konzentration detektiert werden. Maßstabsbalken, 10 μ m. Gezeigt sind die Mittelwerte einer Dreifachmessung.

3.5.8 Bestätigung der Inhibition in anderen Zelllinien

Die Wirksamkeit der Exportinhibitoren sollte auch auf anderen Zelllinien, die den RevNES-Biosensor transient exprimieren, überprüft werden (s. Abb.55). Dazu wurden die humanen Tumorzelllinien FaDu (Kopf-Hals-Tumor), MDA-MB 231 (Brustkarzinom) und RKO (Kolonkarzinom) mit dem RevNES-Biosensor transfiziert und am nächsten Tag mit den Exportinhibitoren in einer Konzentration von 25µM inkubiert.

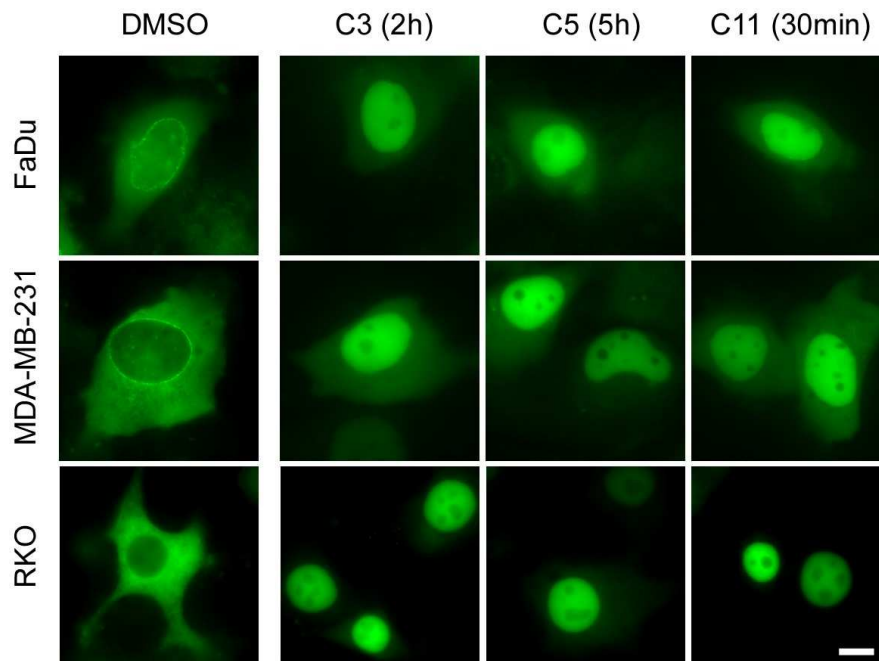


Abb. 55. Exportinhibitoren sind auch in anderen den RevNES-Biosensor exprimierenden Zelllinien wirksam

Die humanen Tumorzelllinien FaDu (Kopf-Hals-Tumor), MDA-MB 231 (Brustkarzinom) und RKO (Kolonkarzinom) wurden mit dem RevNES-Biosensor transfiziert und am nächsten Tag mit den Exportinhibitoren C3, C5 und C11 (25µM) inkubiert. In allen Zelllinien konnte nach den angegebenen Zeitpunkten eine Inhibition des Exports festgestellt werden. Maßstabsbalken, 10µm.

Im Vorfeld einer Zytotoxizitäts-Analyse der Inhibitoren im Mausmodell wurde die inhibitorische Aktivität von C3 und C5 in murinen Zellen (NM18) bestätigt (s. Abb.56). Hierfür wurden NM18-Zellen in Mikroskopieschälchen ausgesät und am Folgetag mit dem SurvivinNES-Biosensor transfiziert. Nach 24h erfolgte die Inkubation mit den Exportinhibitoren für 5h in einer Konzentration von 25 bzw 50µM (C5/C3). Beide zeigten eine deutliche inhibitorische Aktivität auf den Export des SurvivinNES-Biosensors in murinen Zellen.

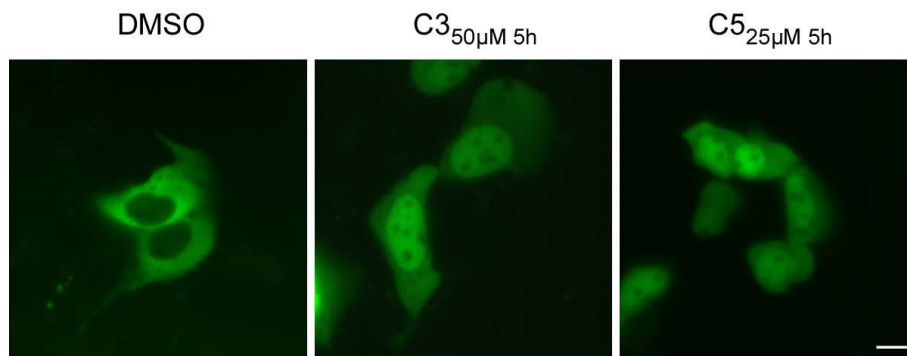


Abb. 56. C3 und C5 sind auch in murinen Zellen aktiv

NM18-Zellen wurden mit dem SurvivinNES-Biosensor transient transfiziert und am Folgetag mit 50 μ M C3 oder und 25 μ M C5 inkubiert. Bei der mikroskopischen Analyse zu den angegebenen Zeitpunkten konnte eine deutliche Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern und somit die Inhibition des Exports detektiert werden. Maßstabsbalken 10 μ M.

3.5.9 Effekte der Substanzen auf die Viabilität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der neuen Exportinhibitoren wurden HeLa-Zellen mit diesen in jeweils vier verschiedenen Konzentrationen für 72h inkubiert und die Viabilität mit dem CellTiterGLO[®]-Assay untersucht (s. Abb.57). Mit dem Programm SigmaPlot (Systat, Erkrath) wurde der IC₅₀-Wert bestimmt, der die Konzentration wiedergibt, bei der die Viabilität um 50% reduziert ist. Für C11 konnte kein IC₅₀ bestimmt werden, da nur eine geringe Menge der Substanz erhältlich war und die kommerzielle Neusynthese leider nicht erfolgreich verlief.

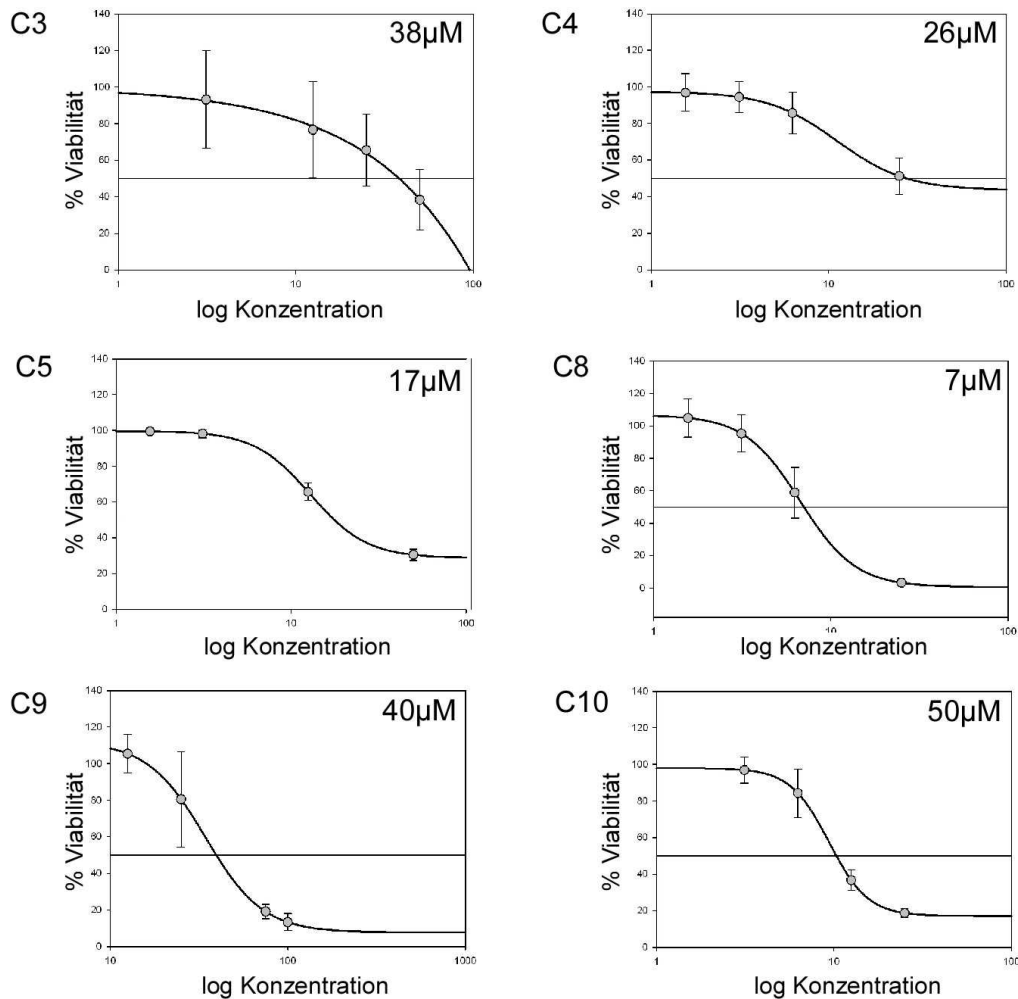


Abb. 57. Bestimmung des IC_{50} der Exportinhibitoren

Je Exportinhibitor wurden vier verschiedene Konzentrationen zur 72-stündigen Behandlung von HeLa-Zellen verwendet. Anschließend wurde der CellTiterGLO[®]-Assay zur Bestimmung der Viabilität durchgeführt. Mit Hilfe des Programms SigmaPlot (Systat, Erkrath) wurde der IC_{50} kalkuliert. Die Viabilitätswerte in % wurden gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Mittelwerte stammen von mindestens zwei Dreifachmessungen.

Kurzzeiteffekte auf die Viabilität von HeLa-Zellen nach fünf- bzw. 24-stündiger Inkubation mit den Substanzen in einer Konzentration von 25 μ M wurden ebenfalls mit dem CellTiterGLO[®]- und zudem mit dem AlamarBlue-Assay untersucht (s. Abb.58).

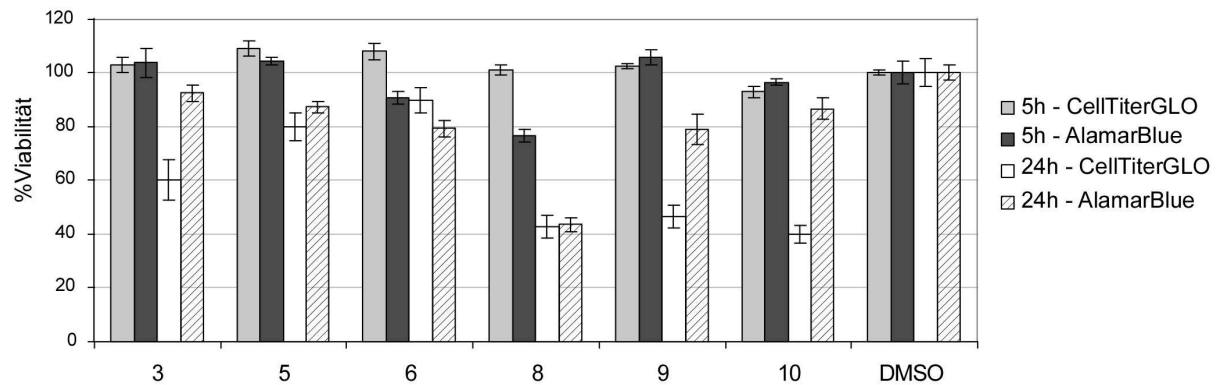


Abb. 58. Kurzzeiteffekte der Exportinhibitoren auf die Viabilität von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in einer 96well-Platte ausgesät und mit den Exportinhibitoren (25µM) für 5h oder 24h behandelt. Die Viabilität wurde mit dem CellTiterGLO®- und dem AlamarBlue-Assay bestimmt. Es sind jeweils Mittelwerte einer Dreifachmessung gezeigt.

In den meisten Fällen waren die Werte der Messung mit AlamarBlue- und CellTiterGLO®-Assay nahezu identisch. Nach 24-stündiger Behandlung mit C3, C9 und C10 zeigte die AlamarBlue-Messung allerdings eine deutlich höhere Viabilität an.

Die Viabilität verschiedener Tumorzelllinien wurde nach einer Inkubation mit C3/C5/DMSO in einer Konzentration von 100µM über den Zeitraum von 72h mit dem CellTiterGLO®-Assay untersucht (s. Abb.59).

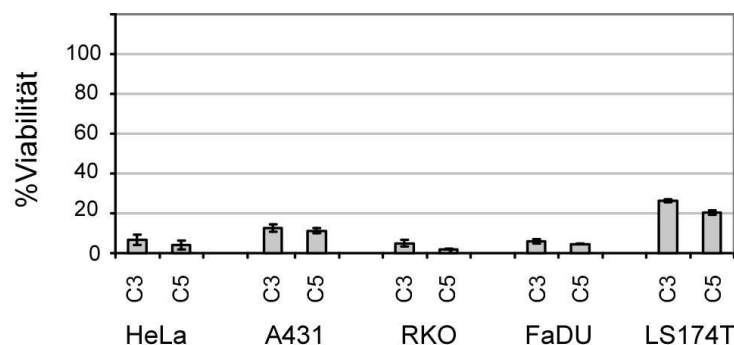


Abb. 59. Viabilität verschiedener Tumorzelllinien nach Inkubation mit C3 oder C5

CellTiterGLO®-Assay verschiedener Tumorzelllinien nach Behandlung mit 100µM C3/C5/DMSO für 72h. Die Viabilität ist im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollen dargestellt. Die Werte ergaben sich aus mindestens einer Dreifachmessung. HeLa – humane Zervikalkarzinomzellen, A431 – humane epidermoide Karzinomzellen, RKO – human Kolonkarzinomzellen, FaDu – humane Kopf-Hals-Tumorzellen, LS174T - human Kolonkarzinomzellen.

Es konnte eine deutlich zytotoxische Wirkung von C3 und C5 auf die Viabilität von Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Weiterhin wurden C3 und C5 hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Viabilität verschiedener Primärzelllinien untersucht (s. Abb.60). Hierfür wurden HTF-7-Zellen, Fibroblasten eines Glaukoms der Passage 7, zur Verfügung gestellt von Dr. L. Choritz, Fibroblasten eines Kopf-Hals-Tumors und Fibroblasten und zugehörige Tumorzelllinie (StauMa) eines Kopf-Hals-Tumors, beides isoliert von A. Schweitzer, verwendet.

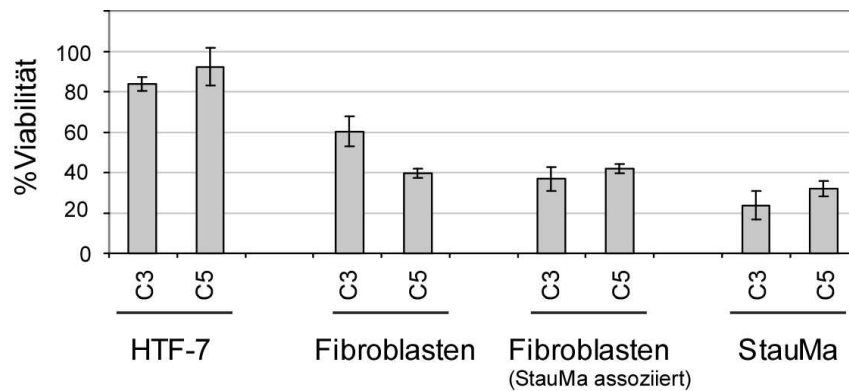


Abb. 60. Einfluss von C3 und C5 auf die Viabilität von Fibroblasten

Die primären Fibroblasten wurden mit 100µM C3 oder C5 für 72h bei täglicher Erneuerung inkubiert. Die Viabilität wurde mit dem CellTiterGLO®-Assay im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bestimmt. Es sind Mittelwerte einer Dreifachmessung gezeigt.

Die Viabilität der Glaukom-assoziierten Fibroblasten wurde durch die Behandlung mit 100µM C3 oder C5 kaum beeinflusst. Die beiden aus Kopf-Hals-Tumoren isolierten Fibroblasten waren hingegen in ihrer Viabilität deutlicher beeinträchtigt. Es zeigte sich kein eindeutiger Unterschied zwischen den StauMa-Tumorzellen und den zugehörigen Fibroblasten.

3.5.10 Toxizität der Substanzen im Mausmodell

Die Exportinhibitoren C3 und C5 sollten auch hinsichtlich ihrer Toxizität im Mausmodell getestet werden. Nacktmäuse wurden an drei Tagen mit C3 oder C5 in einer Konzentration von 1mM intraperitoneal injiziert. Das Körpergewicht wurde als Maß für das Wohlbefinden jeden zweiten Tag gemessen (s. Abb.61). Es konnte diesbezüglich kein negativer Effekt durch die Injektion der Inhibitoren festgestellt werden. Weiterhin wurden die Organe der Tiere *post mortem* auf Veränderungen hin inspiziert.

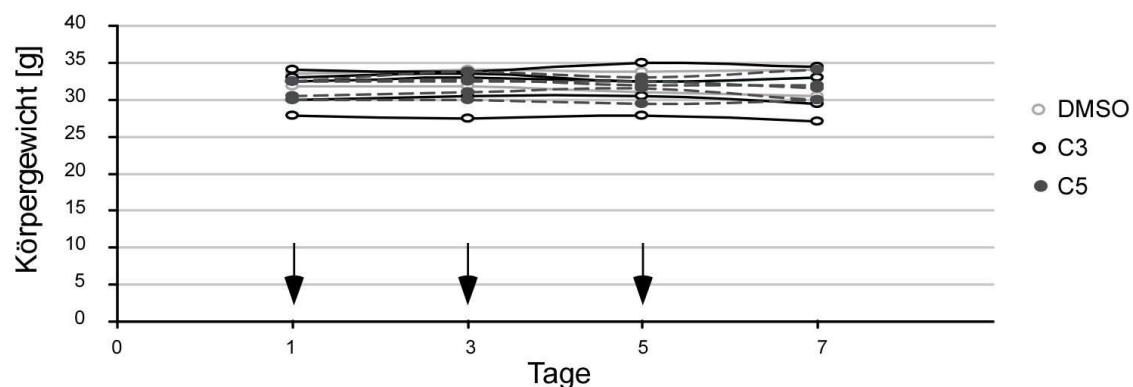


Abb. 61. Körpergewicht der Nacktmäuse nach intraperitonealer Injektion von C3 und C5

Nacktmäuse (nu/nu) wurden an drei Tagen mit 1mM C3 oder C5 intraperitoneal injiziert. Jeden zweiten Tag wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt. Pfeile kennzeichnen jeweils die Injektionszeitpunkte.

3.5.11 Induktion der Apoptose durch C3 und C5

Ob C3 und C5 den Ablauf der Apoptose initiieren können, wurde zunächst durch den Nachweis der Spaltprodukte der Proteine Caspase 3 und *poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP) kontrolliert. Im Verlauf des intrinsischen sowie extrinsischen Weges der Apoptose kommt es zur Aktivierung und somit zur proteolytischen Spaltung der Caspase 3, zu deren Substraten auch die PARP zählt. Für beide Proteine kann man im Falle der Apoptose die Banden der geschnittenen Fragmente detektieren. HeLa-Zellen wurden für 24/48/72h mit 25µM C3 oder C5 inkubiert. Auf dem Western Blot der entsprechenden Zelllysate wurden die Proteine *cleaved Caspase 3*, PARP und Aktin detektiert (s. Abb.62). Für C5 konnte bereits nach 48h ein deutlicher Anstieg der gespaltenen Form der Caspase 3 sowie eine fast vollständige Fragmentierung der PARP detektiert werden. Für C3 war nach 72-stündiger Inkubation lediglich ein schwacher Anstieg der gespaltenen Form der Caspase 3 und eine geringe Mengenzunahme des PARP-Fragments zu detektieren. Somit konnte C5 als stärkerer Auslöser der Apoptose identifiziert werden.

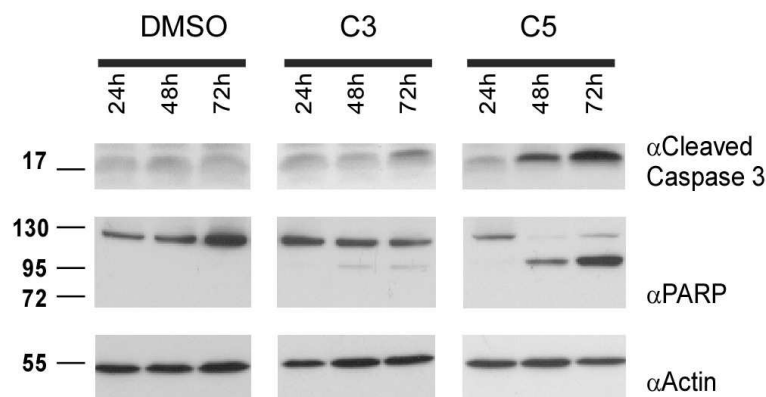


Abb. 62. Detektion der Caspase 3- und PARP-Fragmente zum Nachweis der C3- und C5-vermittelten Apoptose

HeLa-Zellen wurden für 24/48/72h mit 25µM C3 oder C5 inkubiert. Die Induktion der Apoptose wurde durch den Nachweis der Caspase 3- und PARP-Fragmente auf dem Western Blot visualisiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

Durch eine Aktivierung von p53 kann ebenfalls der Ablauf der Apoptose ausgelöst werden. Zur Bestimmung der p53-Expression wurden HeLa-Zellen in einer 96well-Platte ausgesät und mit C3, C5 (jeweils 25µM) oder LMB (10nM) inkubiert (s. Abb.63). Mit der Immunfluoreszenz-Färbung wurden zelluläres p53 markiert und die Zellkerne mit Hoechst gefärbt. Die Analyse der Intensität der p53-Markierung wurde mit dem ArrayScanVTI® und der ‚Target Activation Bioapplication V4‘ durchgeführt. Nach kontinuierlicher (24h) sowie kurzzeitiger Inkubation (5h mit anschließendem Mediumwechsel) mit LMB war ein deutlicher Anstieg der p53-Expression zu erkennen. C3 und C5 erwirkten hingegen keine Änderung der zellulären p53-Expression. Auch in einer parallel durchgeführten Western Blot-Analyse von

mit C3/C5 (25 μ M) oder LMB (10nM) für 24h inkubierten HCT116_{p53 wt}-Zellen konnte lediglich für LMB ein Anstieg der p53-Expression detektiert werden.

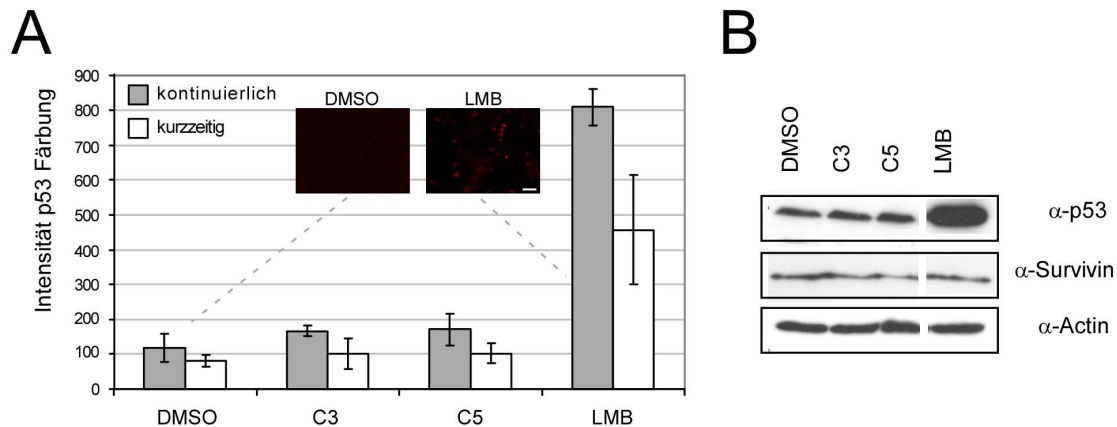


Abb. 63. Einfluss der Inhibitoren auf die p53-Expression

HCT-116_{p53wt}-Zellen wurden mit 25 μ M C3 oder C5 oder mit 10nM LMB für 24h (kontinuierlich) oder für 5h mit anschließender Erneuerung des Mediums (kurzzeitig) inkubiert. 24h nach Inkubationsstart wurden die Zellen fixiert, mit einem p53-spezifischen primären und einem Cy3-fluoreszierenden sekundären Antikörper markiert und mit Hoechst gefärbt. Die Intensität der p53-Färbung wurde mit dem ArrayScanVTI® und der 'Target Activation Bioapplication V4' gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte einer Dreifachmessung mit Einzelmessungen von mindestens 500 Zellen. Maßstabsbalken, 50 μ m. (A). Western Blot-Analyse von HCT-116_{p53wt}-Zellen nach Inkubation mit C3/C5 (25 μ M) oder LMB (10nM) für 24h. Die Expression von p53, jedoch nicht die von Survivin stieg nach Inkubation mit LMB stark an. Aktin diente als Ladekontrolle (B).

3.5.12 Kombinationsbehandlung mit Imatinib

Die Aktivität des für die chronisch myeloische Leukämie (CML) typischen BCR-ABL-Onkoproteins kann durch den Wirkstoff Imatinib, vermittelt über eine Blockade der ATP-Bindestelle, effektiv gehemmt werden. Zudem wird ein vermehrter Eintritt des BCR-ABLs in den Zellkern erwirkt. Mit einer Kombinationsbehandlung von Imatinib mit LMB konnte ein vollständiges und irreversibles Absterben der Krebszellen induziert werden, wobei der Effekt der im Einzelnen verwendeten Substanzen reversibel war (Vigneri *et al.* 2001). Da es sich bei der CML um eine liquide Tumorform handelt, wurden zur Untersuchung synergistischer Effekte der Exportinhibitoren C3 und C5 mit Imatinib die Suspensionszelllinien Kasumi, K562 und SupB15 verwendet (s. Abb.64). Diese wurden mit Imatinib und den Exportinhibitoren einzeln und in Kombination inkubiert und mittels AlamarBlue-Assay auf ihre Viabilität hin untersucht. Es wurden 0,1 $\cdot 10^6$ Kasumi-, 0,3 $\cdot 10^6$ K562- und 0,6 $\cdot 10^6$ SupB15-Zellen in einer 96well-Platte ausgesät. Am Tag der Aussaat und an den folgenden zwei Tagen wurden die Zellen mit den Substanzen versetzt. Nach einer insgesamt 72-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Messung der Viabilität.

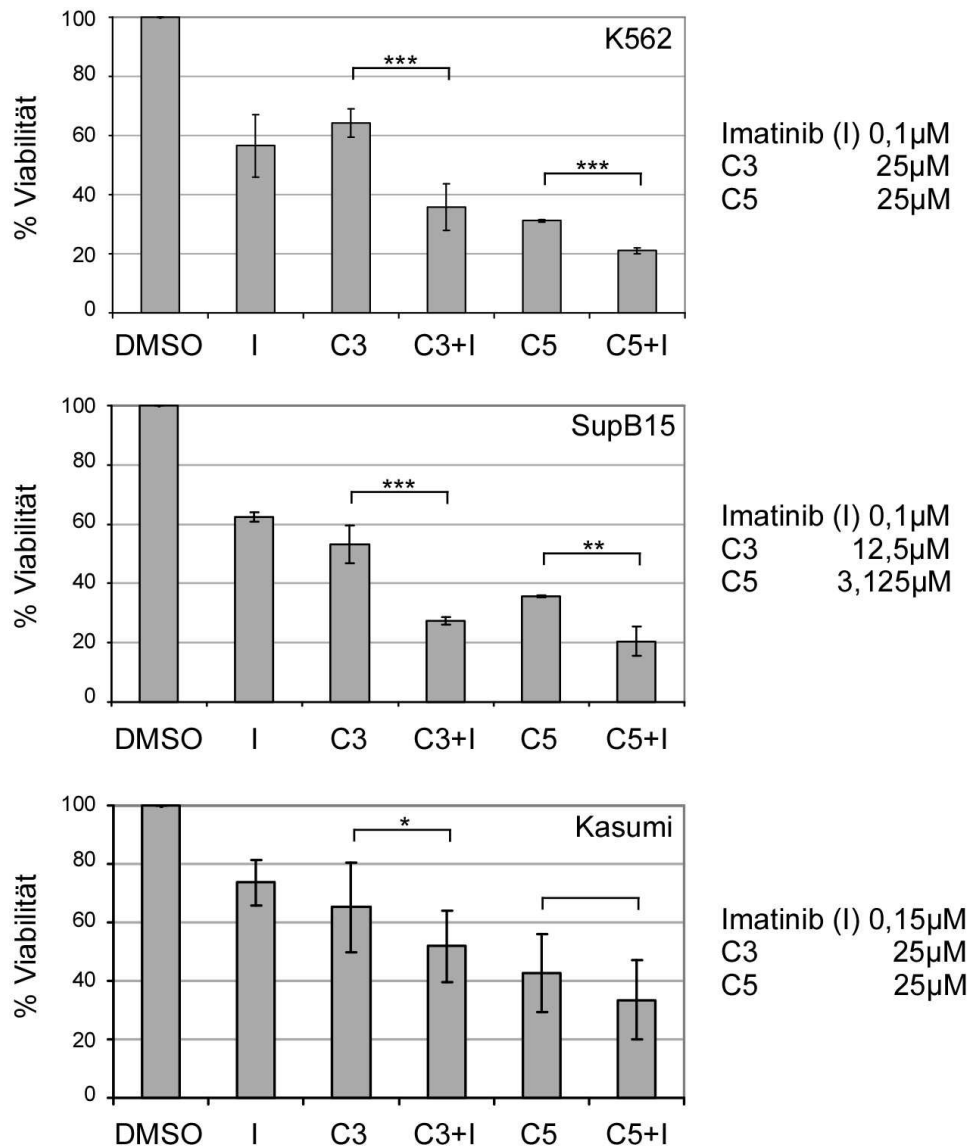


Abb. 64. Kombinationsbehandlung der Exportinhibitoren mit Imatinib

K562-, SupB15- und Kasumi-Zellen wurden mit Imatinib, C3 oder C5 und einer Kombination daraus in den oben angegebenen Konzentrationen für 72h inkubiert. Die Viabilität wurde mit dem AlamarBlue-Assay bestimmt und ist in % zur DMSO-Kontrolle angegeben. Die Werte ergaben sich aus dreifacher Wiederholung einer Dreifachmessung. Die Signifikanz der p-Werte ist angegeben.

3.5.13 Kombination der Inhibitoren mit Radiotherapie

Zur Untersuchung auf mögliche synergistische Effekte der Exportinhibitoren C3 und C5 mit Radiotherapie wurden FaDU- und HCT116_{p53wt}-Zellen zunächst mit den Exportinhibitoren in einer Konzentration von 25 oder 100µM inkubiert und mit 6Gy bestrahlt (s. Abb.65). Nach 72h wurde die Viabilität mit dem CellTiterGLO®-Assay gemessen. Es wurden jeweils 4000 Zellen pro 96well ausgesät und am Folgetag mit den Substanzen für zwei Stunden im Fall von C3 und für fünf Stunden im Fall von C5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bestrahlt und bis zur Auswertung im Brutschrank belassen.

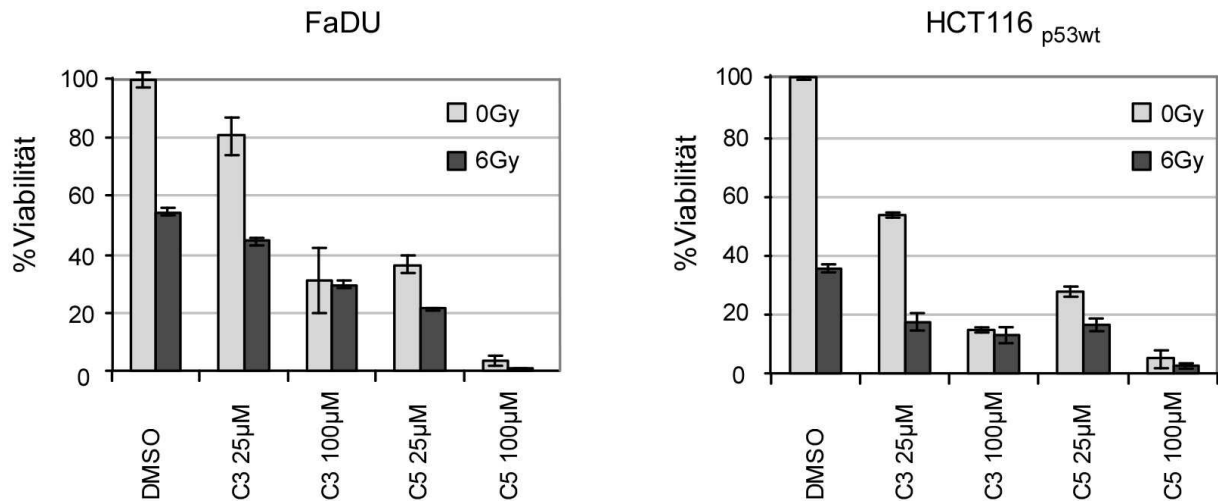


Abb. 65. Viabilität nach Inkubation mit C3 oder C5 und radioaktiver Bestrahlung

FaDu- oder HCT116_{p53wt}-Zellen wurden zu 4000 Zellen je 96well ausgesät und am Folgetag mit C3 für 2h oder C5 für 5h in den oben angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 6Gy bestrahlt und nach 72h die Viabilität mit dem CellTiterGLO®-Assay ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachmessung.

Durch die Bestrahlung war die Viabilität der Zellen erwartungsgemäß deutlich reduziert. Durch Behandlung mit C3 oder C5 konnte der Effekt der Bestrahlung weiter gesteigert werden.

3.5.14 Effekte der Substanzen auf den Zellzyklus

Crm1 ist an der Koordination von in der Mitose ablaufenden Prozessen beteiligt, und durch LMB kann eine Mißverteilung der Chromosomen ausgelöst werden. Daher sollte der Einfluss der Exportinhibitoren auf den Zellzyklus über eine Analyse des DNA-Gehalts untersucht werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen zu $0,4 \cdot 10^5$ Zellen je well in 6well-Platten ausgesät und über Nacht mit C3 und C5 in einer Konzentration von 25 oder 100µM inkubiert. Dabei war essentiell, dass die Zellen bis zur Messung nicht konfluent wurden, um ein unbeeinflusstes Fortschreiten des Zellzyklus zu gewährleisten. Die Zellen wurden mit DRAQ5 markiert und mit dem FACS Calibur (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht (s. Abb.66). Da die Inkubation mit einer Konzentration von 25µM keinerlei Auswirkungen auf die Verteilung der Zellzyklusphasen hatte, sind nur die Ergebnisse der Inkubation mit einer Konzentration von 100µM gezeigt.

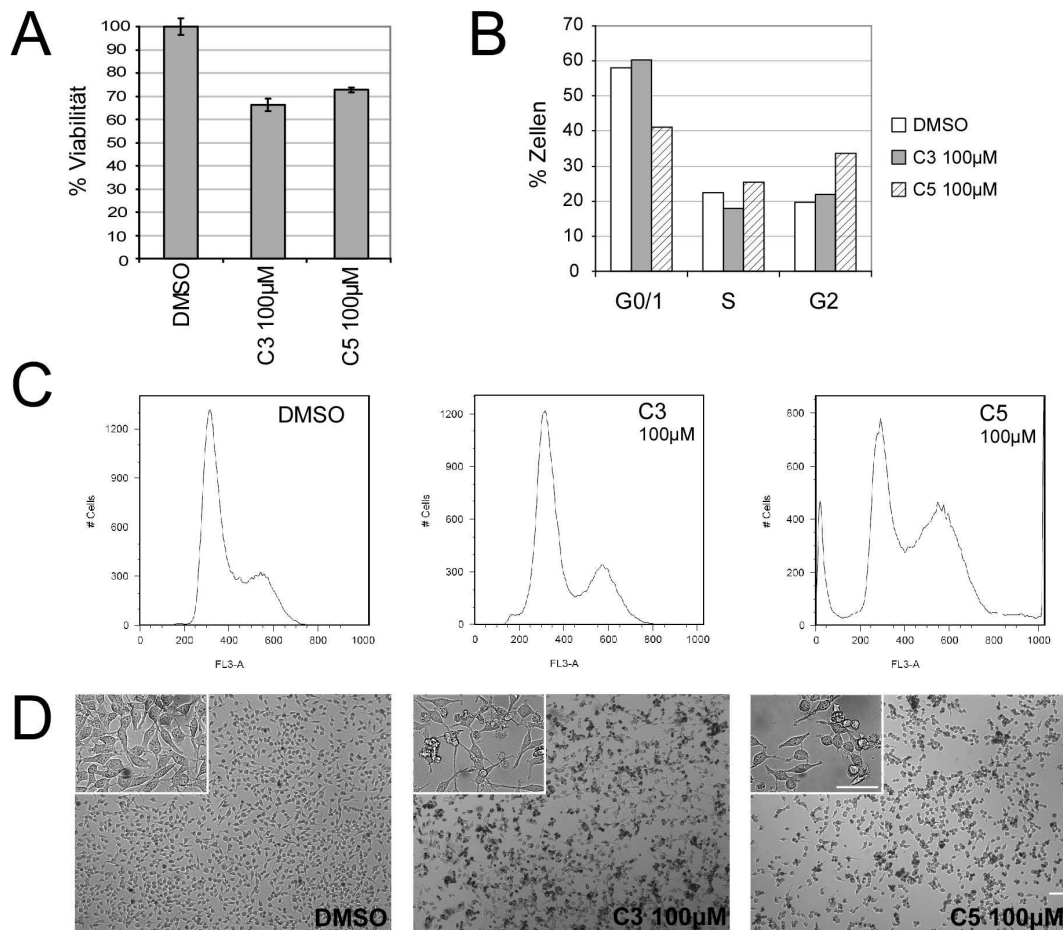


Abb. 66. Effekte von C3 und C5 auf den Zellzyklus

Die Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit 100µM C3 oder C5 für 24h wurde mit dem AlamarBlue-Assay gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte einer Dreifachmessung (A). Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen G0/1, S und G2 von HeLa-Zellen nach gleicher Behandlung (B). Zellzyklusprofile der zu (B) gehörigen Messung der HeLa-Zellen (C). Durchlichtaufnahmen der HeLa-Zellen vor der Messung der Zellzyklusprofile. Maßstabsbalken, 50µm (D).

Die Analyse der Verteilung der Zellzyklusphasen wurde zusätzlich mit dem ArrayScanVTI[®] durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-Zellen zu 6000 Zellen pro well in 96well-Platten ausgesät und am Folgetag mit den Substanzen inkubiert. Nach weiteren 24h wurden die Zellen fixiert und mit Hoechst markiert. Die Auswertung erfolgte mit der ‚Cell Cycle Analysis BioApplication V4‘. Hierbei werden zunächst die Zellkerne definiert, und schließlich wird deren Intensität zur Bestimmung der Zellzyklusphase genutzt. Die Ergebnisse einer simultanen Durchführung der Messung mit dem FACS Calibur und dem ArrayScanVTI[®] sind in Abb.67 vergleichend dargestellt.

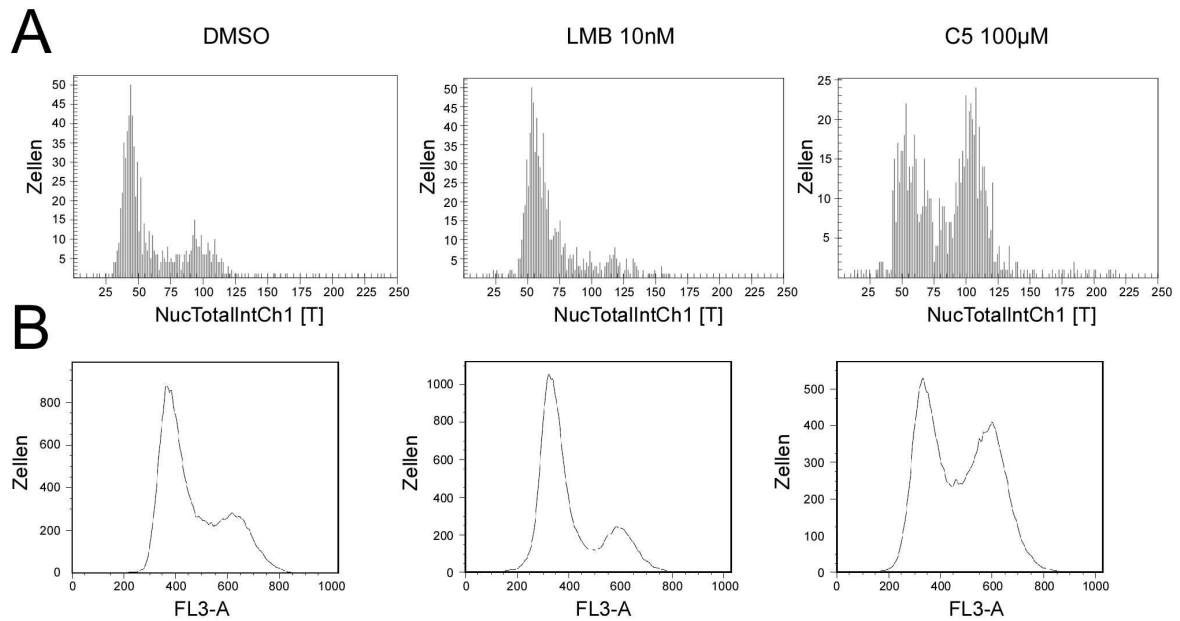


Abb. 67. Vergleich der Verteilung der Zellzyklusphasen gemessen mit dem FACS Calibur oder dem ArrayScanVTI®

Die mit dem ArrayScanVTI® gemessene Intensität der Hoechst-Färbung (NucTotalIntCh1) wurde gegen die Zellzahl, die die jeweilige Intensität zeigte, aufgetragen, woraus ein Profil der Verteilung Zellzyklusphasen sichtbar wurde (A). Im Vergleich dazu ist die mit dem FACS Calibur gemessene Intensität der DRAQ5-Färbung gegen die Fläche des DRAQ5-Fluoreszenzpeaks (FL3-A) aufgetragen (B).

Die Ergebnisse der simultanen Analyse mit dem FACS Calibur und dem ArrayScanVTI® zeigen eine gute Korrelation der jeweils ermittelten Verteilung der Zellzyklusphasen.

3.5.15 Effekte von C3 und C5 auf die Lokalisation von Survivin in der Mitose

Durch Behandlung mit LMB wird die Lokalisation von Survivin an den Zentromeren während der Mitose aufgehoben (Knauer *et al.* 2006). Daher wurden Survivin-GFP stabil exprimierende A431-Zellen mit den Exportinhibitoren in einer Konzentration von 25µM für 5h behandelt. Im Anschluss wurde die Lokalisation des Survivin-GFPs in mitotischen Zellen mikroskopisch analysiert (s. Abb.68). Es konnte diesbezüglich keine durch C3 und C5 verursachte Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen gefunden werden.

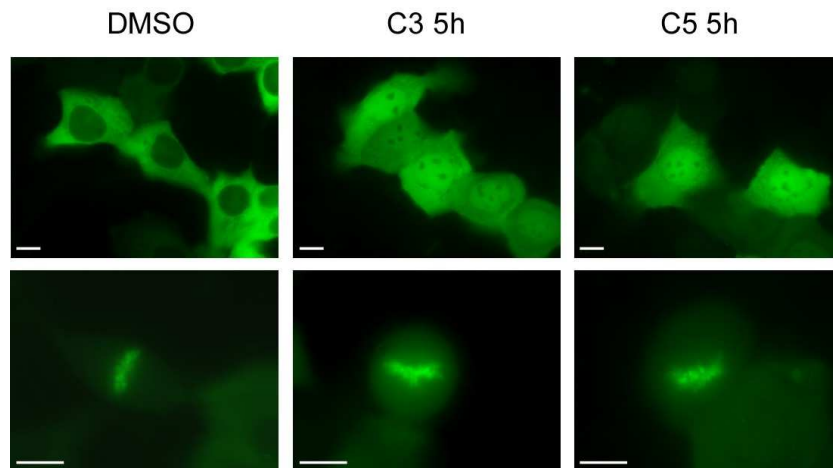


Abb. 68. Die Lokalisation von Survivin-GFP in mitotischen Zellen wird durch C3 und C5 nicht beeinflusst

A431-Zellen die stabil Survivin-GFP exprimieren wurden mit 25 μ M C3 oder C5 inkubiert und nach 5h mikroskopisch auf mitotische Zellen hin analysiert. Maßstabsbalken, 10 μ m.

3.5.16 Mikroinjektion von GST-Rev/SurvivinNES-GFP

Die inhibitorische Aktivität von C3 und C5 sollte weiterhin auf rekombinante NES-tragende Proteine getestet werden. Hierfür wurden die bakteriell exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteine GST-RevNES-GFP und GST-SurvivinNES-GFP in den Nukleus von Vero-Zellen injiziert. Für das GST-RevNES-GFP konnte nach Injektion in den Zellkern bereits nach 2min ein vollständiger Export ins Zytoplasma mikroskopisch detektiert werden. Eine Präinkubation der Zellen mit C3 oder C5 zu den in Abb.69 gezeigten Zeiten und Konzentrationen erwirkte eine deutliche Erhöhung der benötigten Zeit bis zum vollständigen Export auf über 60min. Im Gegensatz zu LMB war für C3 und C5 jedoch weiterhin ein Export des mikroinjizierten Proteins festzustellen. Der vollständige Export des GST-SurvivinNES-GFPs nach Mikroinjektion in den Zellkern konnte nach 30min mikroskopisch detektiert werden. Wiederum wurde die bis zum vollständigen Export benötigte Zeit durch eine Präinkubation der Zellen mit C3 und C5 zu den in Abb.69 angegebenen Zeitpunkten und Konzentrationen verlängert. Im Gegensatz zu LMB konnten C3 und C5 den Export jedoch nicht über den beobachteten Zeitraum vollständig inhibieren.

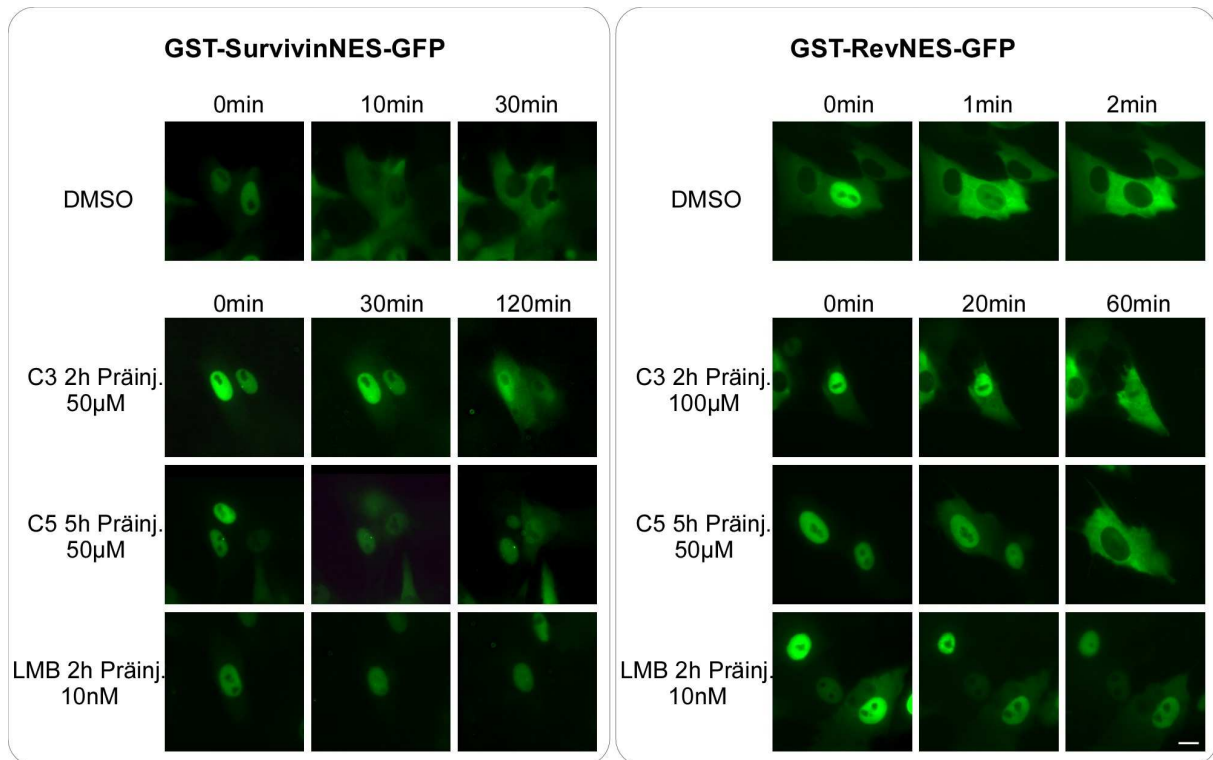


Abb. 69. C3 und C5 verzögern den Export von in den Zellkern mikroinjiziertem GST-RevNES-GFP und GST-SurvivinNES-GFP

Vero-Zellen wurden mit C3, C5 oder LMB zu den dargestellten Konzentrationen und Zeiten inkubiert. Hiernach wurde rekombinantes GST-RevNES-GFP oder GST-SurvivinNES-GFP in den Zellkern mikroinjiziert und dessen Lokalisation mikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken, 10µm. Präinj.= Prä Injektion.

3.5.17 *In vitro*-Bindungsstudien mittels Pulldown

In einem Pulldown-Versuch konnten Ohshima *et al.* zeigen, dass die Bindung von Crm1 und dem NS2NES durch LMB inhibiert werden kann (Ohshima *et al.* 1999). Daher sollte die Wirkung von C3 und C5 auf die Bindung des RevNES und des SurvivinNES an Crm1 in einer Pulldown-Analyse untersucht werden. Dazu wurden Crm1-HA und Crm1_{C528S}-HA per *in vitro*-Transkription und Translation hergestellt. Die Bindepartner GST-RevNES-GFP und GST-SurvivinNES-GFP sowie GST-RanQ₉₆L wurden mittels bakterieller Expression und Aufreinigung generiert. RanQ₉₆L ist eine mutante Form des Ran-Proteins, welches nicht mehr in der Lage ist GTP zu hydrolysieren (Bischoff *et al.* 1994). Durch dessen Bindung an Crm1 wird dieses in die gespannte Konformation mit höherer Bindeaffinität für die verschiedenen NES gebracht. Die Pulldown-Bindung wurde unter Zugabe von C3 oder C5 jeweils in einer Endkonzentration von 1mM oder LMB in einer Endkonzentration von 400nM durchgeführt. Dabei konnte die Konzentration der Substanzen nicht weiter erhöht werden, da diese teilweise schon der verwendeten Konzentration aus der Lösung ausgefallen waren. Weder C3 noch C5 konnten nach 30-minütiger Vorinkubation mit Crm1 und vierstündiger Pulldown-Reaktion die Bindung von SurvivinNES oder RevNES an Crm1-HA unterbinden

(s. Abb.70). LMB hingegen zeigte eine deutliche Inhibition der Bindung beider NES an Crm1-HA, jedoch nicht an Crm1_{C528S}-HA. Bei dieser mutanten Form des Crm1 ist das Cystein an Position 528 gegen ein Serin ersetzt wodurch dieses gegenüber LMB insensitiv wird und somit eine wichtige Kontrolle für die Pulldown-Analyse darstellt.

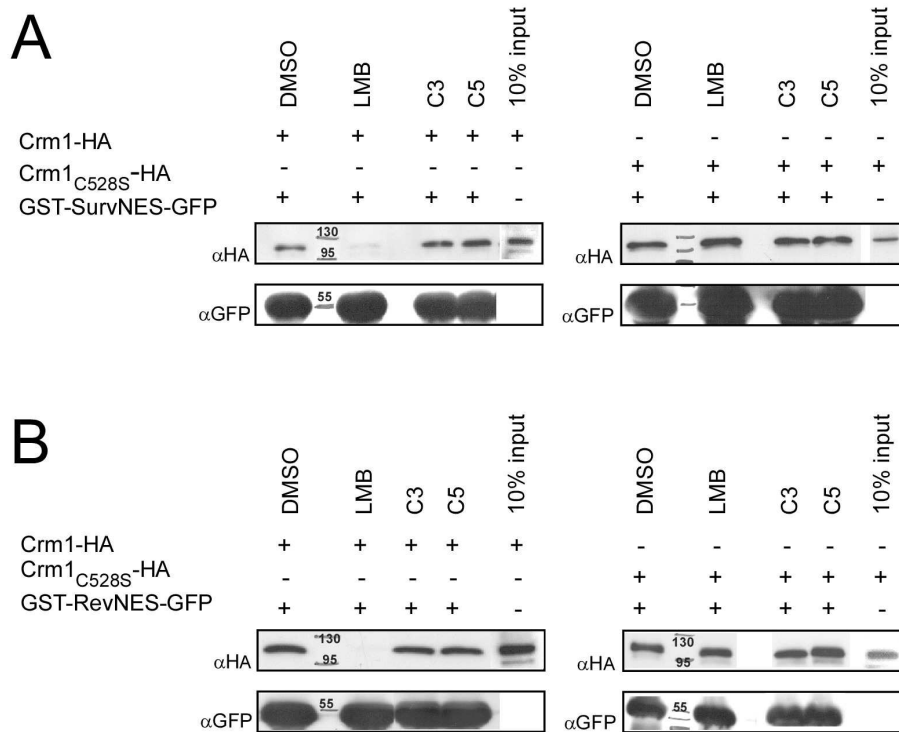


Abb. 70. Pulldown von Crm1-HA oder Crm1_{C528S}-HA mit Rev- oder SurvivinNES

In vitro-transkribiertes und translatiertes Crm1-HA oder Crm1_{C528S}-HA wurde mit bakteriell exprimiertem GST-RevNES-GFP oder GST-SurvivinNES-GFP und RanQ₉₆L inkubiert. Die Proteine wurden über das GST-tag aufgereinigt und mittels HA-Antikörper auf dem Western Blot detektiert. Crm1-HA oder Crm1_{C528S}-HA wurden mit C3 oder C5 (1mM) oder LMB (400nM) für 30min vorinkubiert, und die anschließende Pulldown-Bindung erfolgte für vier Stunden.

Um mögliche negative Auswirkungen des wässrige Bindepuffers auf die Aktivität von C3 und C5 auszuschließen, wurde eine Pulldown-Analyse mit einer lediglich 10-minütigen Vorinkubation der Inhibitoren C3 oder C5 (1mM) mit Crm1 und einer anschließenden 20-minütigen Pulldown-Reaktion durchgeführt. Zudem wurde der Wasser-Anteil des Bindepuffers gegen Zellkulturmedium (DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin) ersetzt um analog zu den Ergebnissen aus 3.3.18 die Aktivität der Inhibitoren zu erhalten (s. Abb.71). Es konnte weder bei der Pulldown-Reaktion mit verkürzter Inkubationszeit in wässrigem Medium noch bei Verwendung des mit Zellkulturmedium supplementierten Bindepuffers ein inhibitorischer Einfluss von C3 oder C5 auf die Bindung von Crm1-HA mit RevNES oder SurvivinNES detektiert werden.

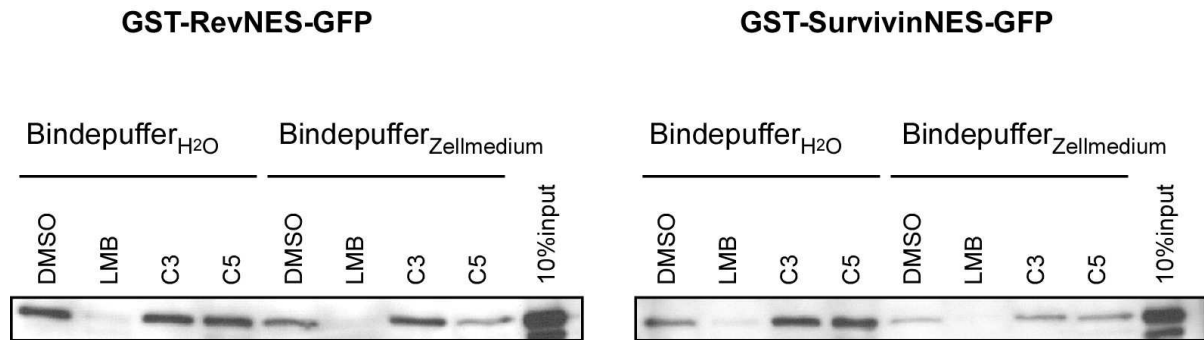


Abb. 71. Pulldown von Crm1-HA mit Rev-/oder SurvivinNES in unterschiedlichen Bindepuffern

Crm1-HA wurde mit 1mM C3/C5 oder mit 0,4µM LMB für 10min inkubiert und anschließend zu den an GST-beads gebundene GST-RevNES-GFP oder GST-SurvivinNES-GFP-Proteine gegeben. Die Reaktion erfolgte in Bindepuffer und alternativ in mit Zellmedium (DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin) supplementiertem Bindepuffer. Es konnte wiederum kein negativer Effekt der Inhibitoren auf die Bindung von Crm1-HA an RevNES oder SurvivinNES detektiert werden

3.5.18 Stabilität der Exportinhibitoren

Da die Substanzen C3 und C5 in der Pulldown-Analyse keine Aktivität zeigten, sollten sie auf ihre Stabilität in wässriger Lösung hin getestet werden. Hierfür wurden C3 und C5 in PBS oder Zellkulturmedium (DMEM, 10%FCS, 2mM Glutamin, 10µg/ml Streptomycin, 10U/ml Penicillin) für 2h bei 4°C oder 37°C vorinkubiert und HeLa_{SurvNES}-Zellen anschließend mit diesem Gemisch in einer finalen Konzentration von 25µM inkubiert (s. Abb.72). Eine Präinkubation von C3 mit PBS bei 4°C schwächt die vermittelte Inhibition des Exports, wohingegen diese nach Präinkubation bei 37°C komplett eliminiert war. Präinkubation in Zellkulturmedium bei 4°C hatte keine Auswirkung auf die Export-Inhibition, wohingegen nach Präinkubation bei 37°C wiederum keine Aktivität mehr festgestellt werden konnte. Für C5 konnte nach Präinkubation in PBS bei 37°C eine stärkere Abnahme der inhibitorischen Aktivität im Vergleich zu 4°C festgestellt werden. Präinkubation in Medium hatte keine Auswirkungen auf die inhibitorische Aktivität von C5.

HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden in einem weiteren Versuch in 96well-Platten ausgesät und mit den präinkubierten Substanzen behandelt. Dabei wurden 10µl der in einer Konzentration von 250µM vorinkubierten Substanzen zu 90µl Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Die Auswertung der Translokation erfolgte mit dem ArrayScanVTI® und der „Molecular Translocation Assay BioApplication V4“. Die MeanCirc-RingDiff-Werte bestätigten die Ergebnisse der vorherigen mikroskopischen Analyse.

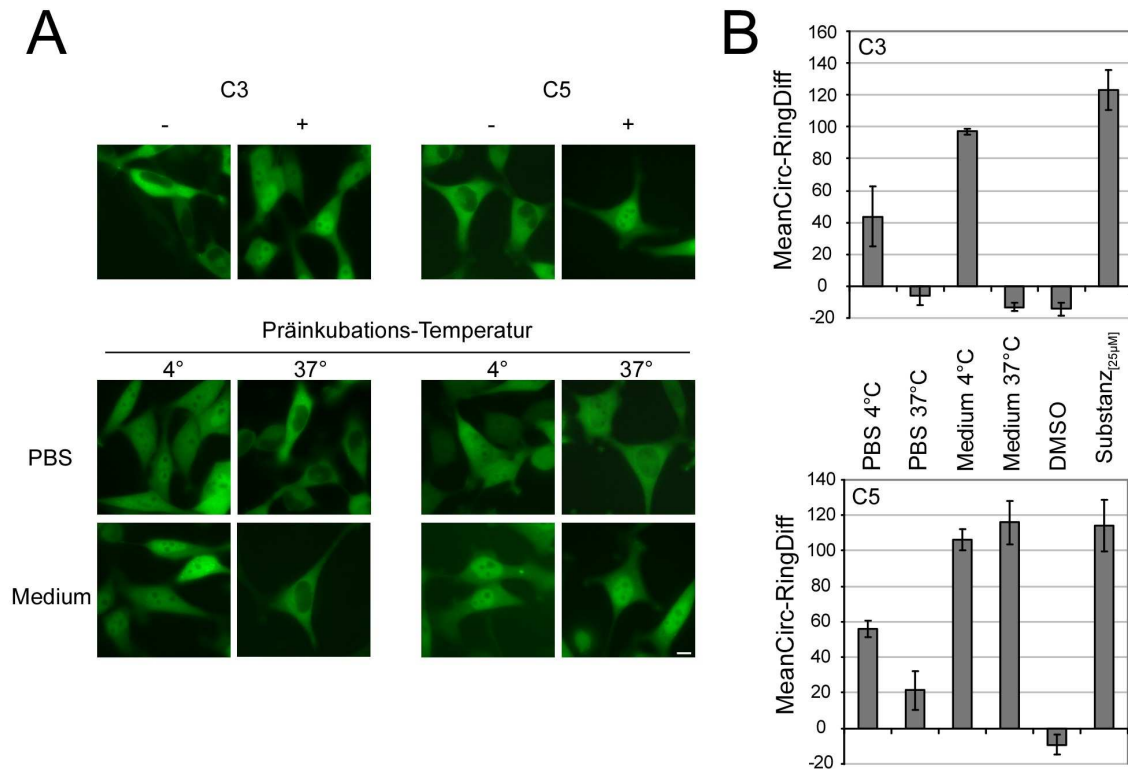


Abb. 72. Aktivität der in wässriger Lösung vorinkubierten Exportinhibitoren

C3 und C5 wurden in einer Konzentration von 100µM in 0,5ml PBS oder Zellkulturmedium bei 4°C oder 37°C für 2h inkubiert. HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden anschließend mit diesem Gemisch und zusätzlichen 1,5ml Zellkulturmedium inkubiert, was einer finalen Konzentration von 25µM entsprach. Nach weiteren 5h wurde die Lokalisation des SurvivinNES-Biosensors mikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken, 10µm. (A). HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden in einer 96well-Platte ausgesät und am Folgetag mit den für 2h vorinkubierten Exportinhibitoren inkubiert. Die Konzentration bei der Präinkubation war 250µM, und der Ansatz wurde 1:10 in Zellkulturmedium verdünnt zur Inkubation der Zellen verwendet. Nach fünf Stunden erfolgte die Auswertung mit dem ArrayScanVTI® und der ‚Molecular Translocation Assay BioApplication V4‘. Dargestellt sind Mittelwerte einer Dreifachmessung (B).

In Vortests mit dem ArrayScanVTI® konnte kein Unterschied zwischen ein- oder zweistündiger Vorinkubation der Exportinhibitoren gefunden werden. Weiterhin wurden gleiche Ergebnisse bei der Verwendung von PBS supplementiert mit 10% FCS und Zellkulturmedium erzielt.

3.5.19 Viabilität nach Präinkubation von C3 und C5

Um zu untersuchen, ob C3 durch die Präinkubation neben der inhibitorischen Aktivität auch seine Zytotoxizität verliert, wurden HeLa-Zellen mit 100µM C3 oder C5 behandelt (s. Abb.73). Dabei wurden C3 und C5 entweder frisch mit Medium vermischt, oder dieses Gemisch wurde zunächst bei 37°C für 2h inkubiert und erst dann auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch im Durchlicht untersucht, und im Anschluss die Viabilität sowohl mit dem CellTiterGLO®- als auch dem AlamarBlue-Assay bestimmt.

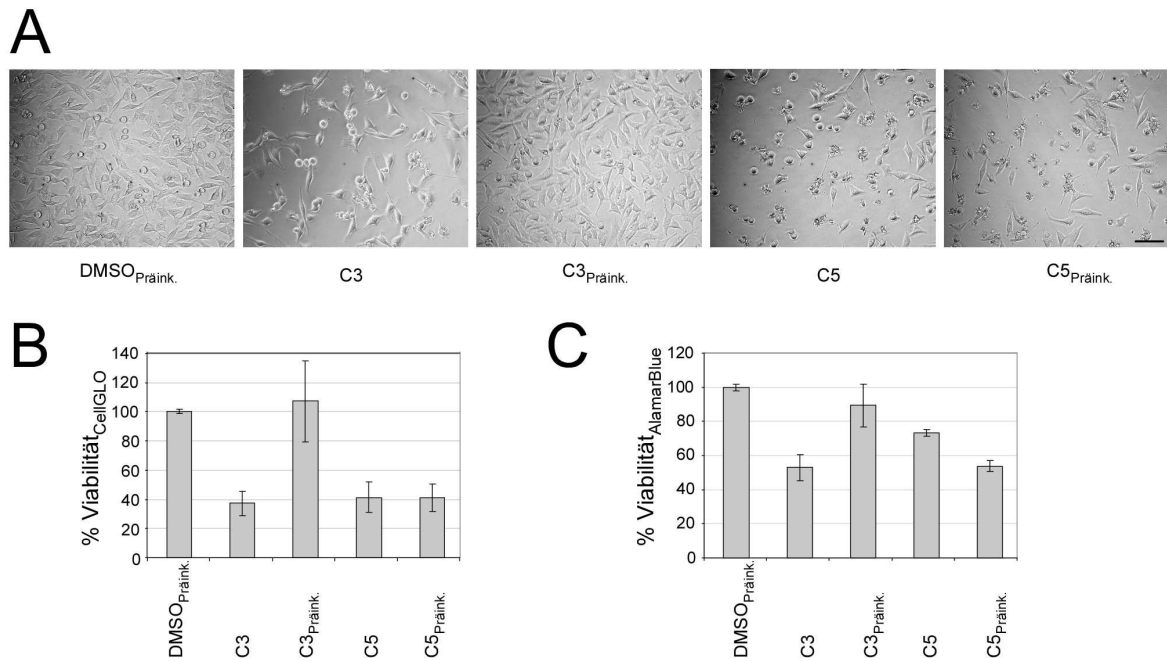


Abb. 73. Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit präinkubiertem C3 oder C5

HeLa-Zellen wurden mit einem Gemisch von Zellkulturmedium und C3 oder C5 (100 μ M) entweder direkt oder nach einer Präinkubation des Gemischs für 2h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nach 24h durch eine Aufnahme des Durchlicht-Bildes mikroskopisch erfasst. Maßstabsbalken, 50 μ m (A). Die Viabilität dieser Zellen wurde im Anschluss mit dem CellTiterGLO®-(B) und dem AlamarBlue-Assay (C) bestimmt. Dargestellt sind die Werte einer Dreifachmessung.

Die Viabilität reduzierte sich nach 24-stündiger Behandlung mit C3, C5 und präinkubiertem C5 deutlich. Präinkubiertes C3 hingegen zeigte diesbezüglich keinen negativen Effekt, wie es aus den Ergebnissen der Viabilitätsmessungen und den Durchlichtaufnahmen ersichtlich ist.

3.5.20 Stabilität der Inhibition nach Entfernung der Exportinhibitoren

Es sollte untersucht werden, ob die durch C3 und C5 verursachte Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern auch nach Entnahme des Substanz-enhaltenden Zellkulturmediums stabil bleibt. HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden in Mikroskopieschälchen ausgesät und mit C3 für 2h und C5 über Nacht inkubiert (s. Abb.74). Anschließend wurde das Exportinhibitor-enhaltende Zellkulturmedium ersetzt und die Lokalisation des SurvivinNES-Biosensors jede Folgestunde mikroskopisch erfasst. Nach ca. 10 Stunden war die Wirkung beider Exportinhibitoren fast komplett aufgehoben.

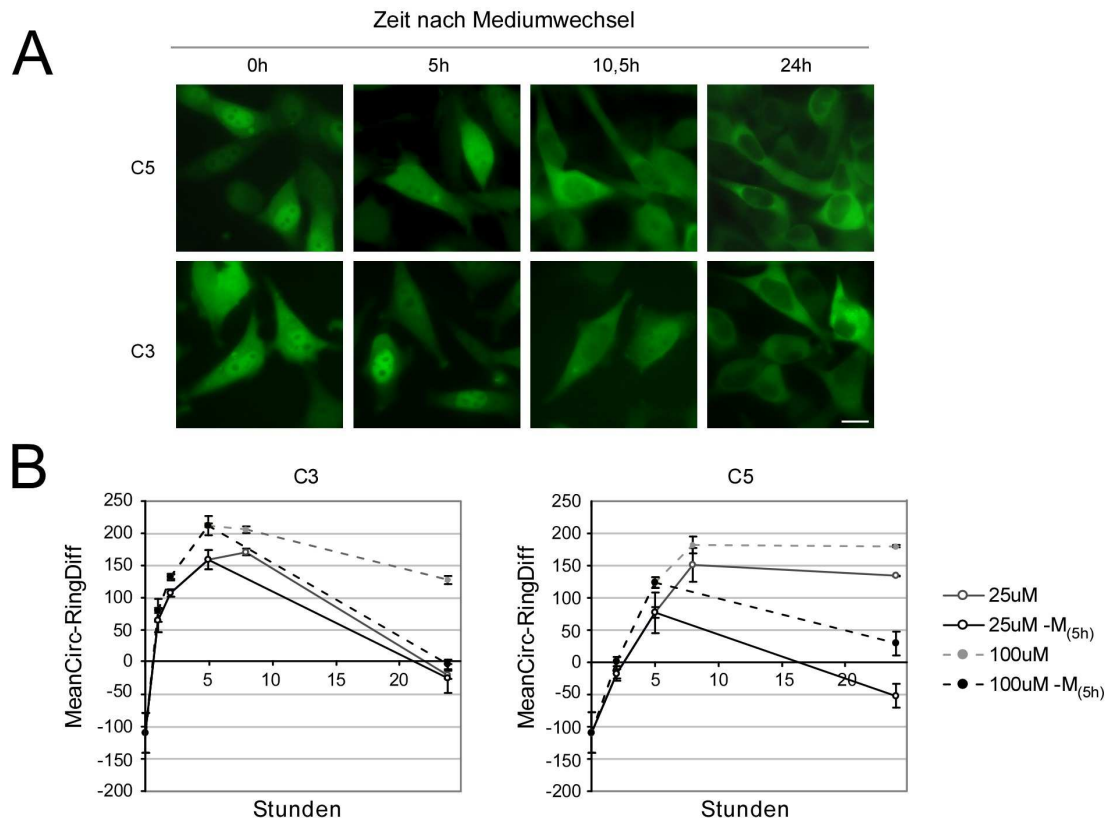


Abb. 74. Stabilität der Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern nach Entnahme der Exportinhibitoren

HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden mit C3 für 2h oder C5 über Nacht inkubiert und anschließend das Medium erneuert. Nach etwa 10 Stunden war die Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern fast vollständig aufgehoben. Maßstabsbalken, 10µm. (A). HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden in einer 96well-Platte ausgesät und mit C3 oder C5 in oben angegebenen Konzentrationen inkubiert. Für die Hälfte der Proben wurde das Medium nach 5h erneuert (-M). Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und mit dem ArrayScanVTI[®] und der ‚Molecular Translocation Assay BioApplication V4‘ ausgewertet. Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei wells mit jeweils mindestens 500 gemessenen Zellen (B).

Die Aufhebung der Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern nach Entnahme von C3 und C5 wurde auch mit der ArrayScanVTI[®]-Plattform untersucht. HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden in 96well-Platten ausgesät und mit C3 und C5 in einer Konzentration von 25 oder 100µM behandelt. Nach 5h wurde das Exportinhibitor-enthaltende Medium auf der Hälfte der Proben ersetzt. Die Lokalisation des SurvivinNES-Biosensors wurde zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Durch Entnahme von C3 aus dem Zellkulturmedium wurde diese Umkehrung der Lokalisation weder beschleunigt noch verlangsamt. Lediglich bei dauerhafter Inkubation mit C3 in einer Konzentration von 100µM war nach 24h noch eine Inhibition des Exports feststellbar. Für C5 resultierte eine Entnahme aus dem Zellkulturmedium hingegen in einer beschleunigten Abnahme der inhibitorischen Wirkung im Vergleich zur dauerhaften Inkubation. Nach Entnahme aus dem Zellkulturmedium wurde die inhibitorische Wirkung von C5 nach Anwendung in einer Konzentration von 25µM schneller aufgehoben als mit 100µM.

Die durch 25µM C5 vermittelte Inhibition war nach 5h, 8h und 24h schwächer ausgeprägt als bei entsprechender Inkubation mit 100µM.

3.5.21 Einfluss der Exportinhibitoren auf die Interaktion von HIV1-Rev und Crm1

Da mit den Biosensoren die NES der Proteine nur in isolierter Form untersucht werden, sollte geprüft werden, ob die Exportinhibitoren auch die Interaktion von Crm1 mit dem HIV1-Rev Protein (Rev) und somit das NES im Volllängecontext inhibieren können.

3.5.21.1 Kolokalisation von Rev und Crm1

HeLa-Zellen wurden mit pC3-Crm1-GFP und pC3-HIV-1-Rev-BFP transfiziert und am Folgetag mit C3, C5, C24 und LMB für die in Abb.75 angegebenen Zeiten inkubiert. Bei gleichzeitiger Transfektion von Crm1-GFP und Rev-BFP konnte eine Kolokalisation beider Proteine an den Nukleoli beobachtet werden. Nach Behandlung mit LMB (10nM) oder C3/C5/C24 (25µM) kam es zu einem deutlichen Rückgang der nukleolären Lokalisation von Crm1-GFP. Bei Kotransfektion mit der LMB-insensitiven Crm1_{C528S}-GFP Variante war die Kolokalisation mit Rev-BFP an den Nukleoli ebenso zu beobachten, doch blieb diese auch nach Inkubation mit LMB (10nM) oder mit C3/C5/C24 (25µM) bestehen. Die Inhibition der Kolokalisation konnte auch mit Crm1-GFP stabil exprimierenden RKO-Zellen, die mit pC3-HIV-1-Rev-BFP transfiziert und am Folgetag mit C5 (25µM) für fünf Stunden oder mit C3/C24 (25µM) für zwei Stunden inkubiert wurden, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

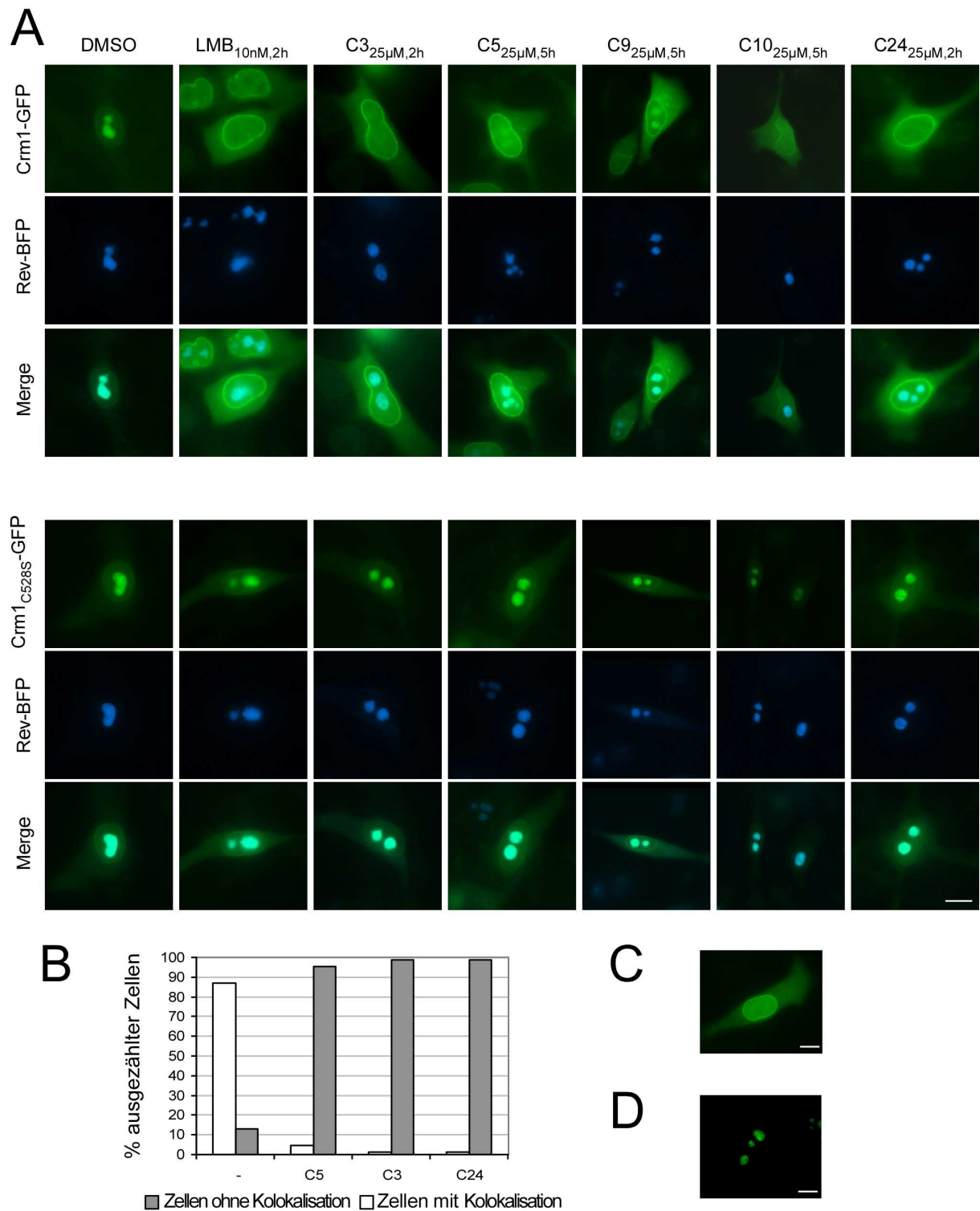


Abb. 75. Die Kolokalisation von Crm1-GFP und Rev-BFP wird durch Inkubation mit den Exportinhibitoren aufgehoben

Koexpression von Crm1-GFP oder Crm1^{C528S}-GFP mit Rev-BFP in HeLa-Zellen nach transienter Transfektion. Crm1-GFP und Rev-BFP kolokalisiert an den Nukleoli. Nach zweistündiger Inkubation mit LMB (10nM), C3/C24 (25μM) oder fünfstündiger Inkubation mit C5 (25μM) war diese Kolokalisation weit weniger stark ausgeprägt (A). Auszählung der Crm1-GFP und Rev-BFP exprimierenden HeLa-Zellen hinsichtlich der Kolokalisation beider Proteine an den Nukleoli. Es wurden jeweils mindestens 100 Zellen ausgezählt (B). Lokalisation von Crm1-GFP nach transienter Transfektion in HeLa-Zellen (C). Lokalisation von Rev-GFP nach transienter Transfektion in HeLa-Zellen (D). Maßstabsbalken, 10μm.

3.5.21.2 Lokalisation von Rev14

Rev14 ist eine mutante Variante des Rev, welche nicht mehr an die Nukleoli zu binden vermag und daher im Zytoplasma zu detektieren ist. HeLa-Zellen wurden mit pBsRev14-16F25 transfiziert (s. Abb.76). Am Folgetag wurden die Zellen mit LMB (10nM) oder den Exportinhibitoren C3 und C11 (25µM) für zwei Stunden oder mit C5 (25µM) für fünf Stunden inkubiert. Hiernach konnte eine Akkumulation des Rev14-GFPs im Zellkern detektiert werden.

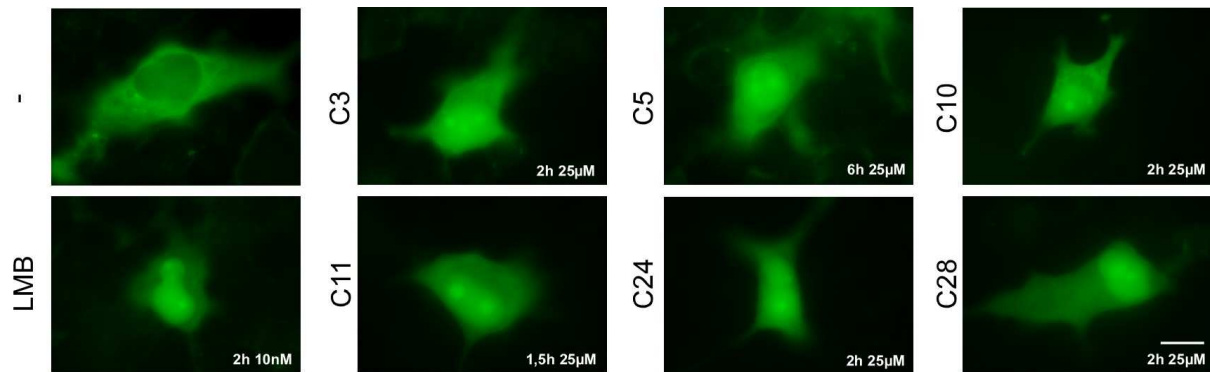


Abb. 76. Rev14-GFP akkumuliert nach Inkubation mit den Exportinhibitoren im Zellkern

HeLa-Zellen wurden mit pBsRev14-16F25 transient transfiziert und mit den Exportinhibitoren in einer Konzentration von 25µM inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten konnte eine Inhibition des Rev14-GFP-Exports beobachtet werden. Maßstabsbalken, 10µm.

3.5.21.3 Lokalisation von Rev nach Behandlung mit Actinomycin D

Da Rev an den Nukleoli lokalisiert, kann mikroskopisch nach Inkubation mit einem Exportinhibitor kein Unterschied zu unbehandelten Zellen detektiert werden. Actinomycin D (ActD) kann die Bindung von Rev an die nukleolären Strukturen ebenso wie die in Rev14 vorliegende Mutation verhindern und somit eine zytoplasmatische Lokalisation erzeugen. Inkubiert man Rev-GFP exprimierende Zellen mit einem Exportinhibitor unter anschließender Gabe von ActD, so kann man eine Akkumulation im Zellkern detektieren. HeLa-Zellen wurden mit pC3-Rev-GFP transfiziert und am Folgetag mit LMB (10nM) oder den Exportinhibitoren (25µM, C11 30min, C3/24 2h, C5 5h) inkubiert (s. Abb.77). Nach anschließender Gabe von ActD in einer Endkonzentration von 2µg/ml und einer weiteren zweistündigen Inkubation wurden die Zellen mikroskopisch analysiert. Eine Inkubation der Rev-GFP exprimierenden Zellen mit den Exportinhibitoren C3, C5, C11 und C24 und anschließender Gabe von ActD bewirkte eine Akkumulation des Rev-GFP im Zellkern.

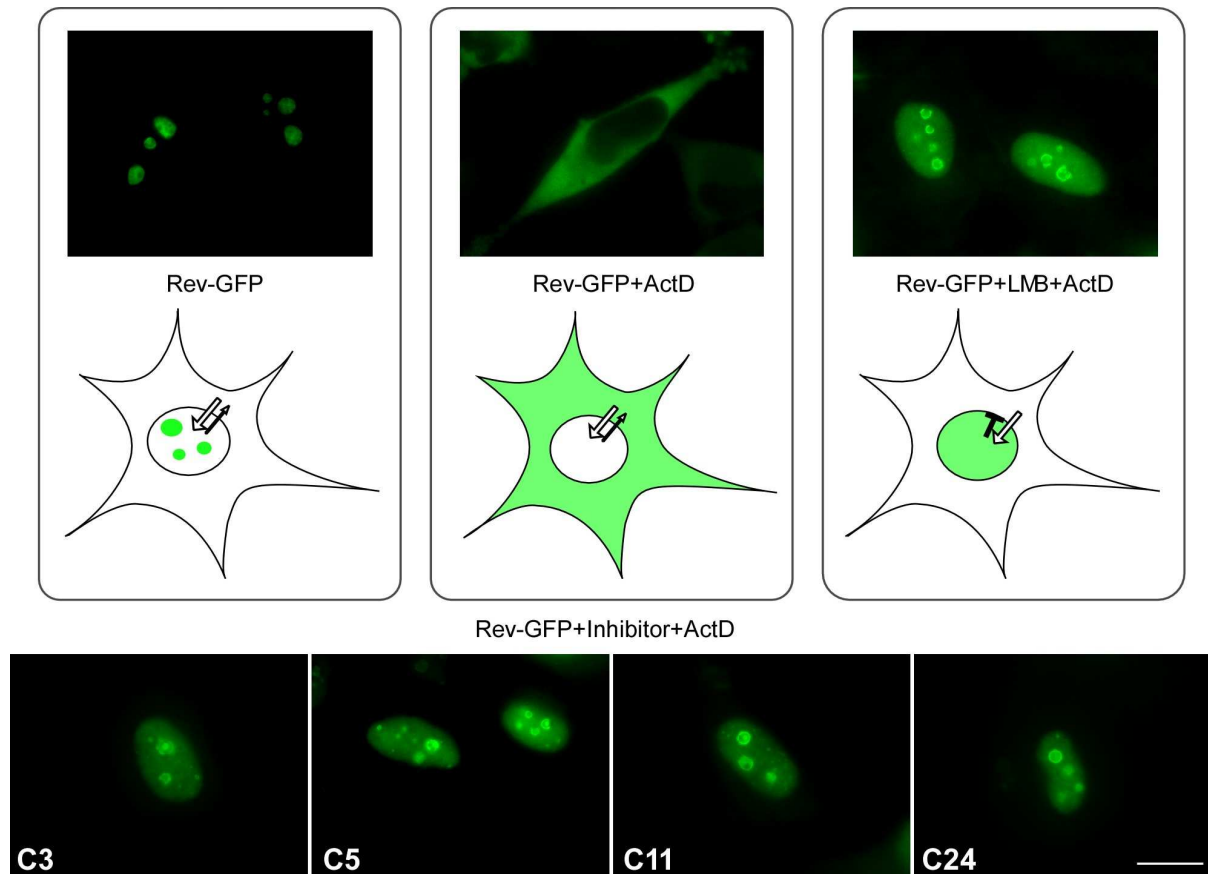


Abb. 77. Der Export von Rev-GFP wird nach Inkubation mit den Exportinhibitoren und ActD inhibiert

Die nukleoläre Lokalisation des Rev-GFP an den Nukleoli wurde durch zweistündige Inkubation mit ActD (2µg/ml) und der damit verbundenen Auflösung der nukleolären Strukturen in eine zytoplasmatische umgewandelt. Erfolgte vor Zugabe von ActD eine Inkubation mit LMB (10nM), so wurde eine nukleäre Akkumulation des Rev-GFPs beobachtet. Ebenso konnte nach einer 30-minütigen Inkubation mit C11 (25µM), einer zweistündigen Inkubation mit C3 oder C24 (25µM) oder einer fünfstündigen Inkubation mit C5 (25µM) eine Akkumulation des Rev-GFPs im Zellkern mikroskopisch detektiert werden. Maßstabsbalken, 10µm.

3.5.22 Effekte der Exportinhibitoren auf die Replikation von HIV-1

Die Wirkung der Exportinhibitoren C3 und C5 auf das HIV-1 Wildtypvirus (NL4-3, CXCR-4 *tropic strain*) wurde von Dr. Melanie Krämer (AG Münk, Clinic of Gastroenterology, Hepatology and Infectiology, Heinrich-Heine-University Düsseldorf) untersucht. Es wurden $2,5 \cdot 10^5$ Tzm-bl-Zellen mit wildtypischen HIV-1 (NL4-3, CXCR-4topic strain, 20000pg RT input virus) infiziert und 24h Post-Infektion mit C3 oder C5 inkubiert. Nach weiteren 24h wurden die RT-Aktivität mit Hilfe des *Lenti RT Activity Kits* (Cavidi, Uppsala, Schweden), der virale Titer anhand der Intensität eines Luciferase-Reporters (s. Abb.78) sowie die Rev-abhängige Expression der viralen Proteine p55 Gag und p24 CA mittels Western Blot bestimmt (s. Abb.79).

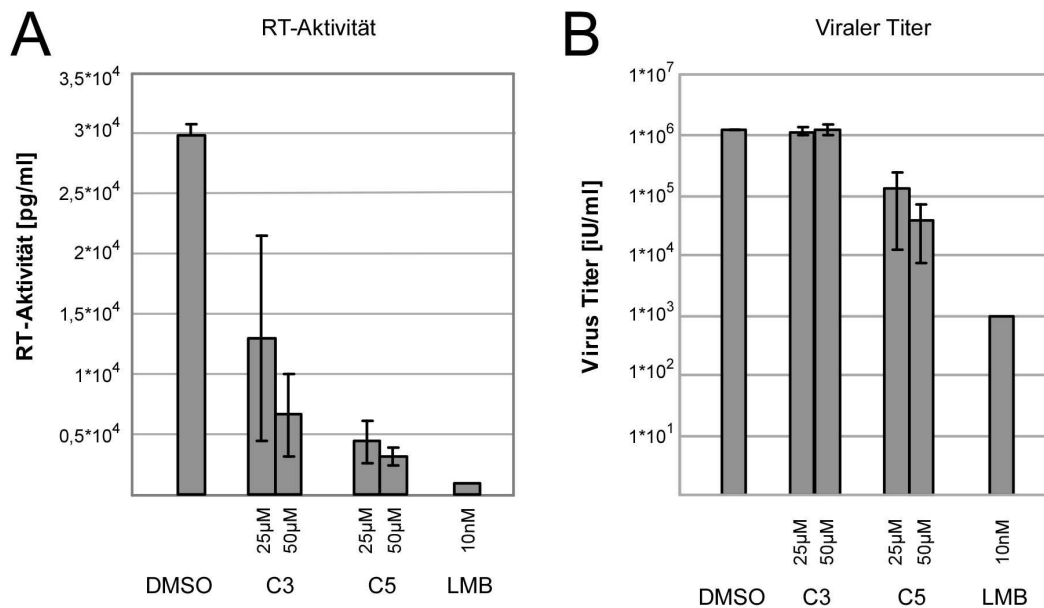


Abb. 78. Effekt von C3 und C5 auf die RT-Aktivität und den viralen Titer von HIV-1

C3 und C5 reduzierten die Aktivität der viralen reversen Transkriptase (RT) um das 2- bzw. 5-fache bei Inkubation mit 25µM und um das 7- bzw 10-fache bei Inkubation mit 50µM (A). Tzm-bl-Zellen wurden mit HIV-1-Viren infiziert, welche von Tzm-bl-Zellen nach Infektion unter gleichzeitiger Inkubation mit C3, C5 oder LMB hergestellt wurden. Maß für den viralen Titer war die Intensität der Luciferase, deren Expression in Abhängigkeit des HIV-1 Promotors erfolgte. Die Inkubation mit C5 in einer Konzentration von 25µM bzw. 50µM reduzierte den viralen Titer um das 10- bzw. 33-fache (B).

Die Behandlung mit C3 und C5 führte zu einer Reduktion der Aktivität der reversen Transkriptase (RT). Nach Inkubation mit 25µM C3 war die RT-Aktivität um das 2-fache und durch 25µM C5 um das 5-fache reduziert. Bei einer Konzentration von 50µM reduzierte sich die RT-Aktivität nach Inkubation mit C3 um das 7-fache und mit C5 um das 10-fache. Im Vergleich dazu wurde die RT-Aktivität durch 10nM LMB um das 36-fache reduziert. Ein Einfluss auf den viralen Titer konnte nur nach Inkubation mit 25µM bzw. 50µM C5 gefunden werden, wobei eine 10- bzw. 33-fache Reduktion beobachtet wurde. Deutlich stärker war die 1346-fache Reduktion des viralen Titers nach Inkubation mit 10nM LMB.

Die Rev-abhängige Expression der viralen Proteine p55 Gag und p24 CA in mit HIV-1 infizierten Tzm-bl-Zellen nach Inkubation mit C3 und C5 wurde in einer Western Blot-Analyse untersucht. Diese war in den Zellen als auch im viralen Überstand nach Inkubation mit C5 deutlich vermindert. Nach Inkubation mit C3 konnte lediglich eine verminderte Expression im viralen Überstand, jedoch nicht in den Zellen gefunden werden. Tzm-bl-Zellen sind Derivate der HeLa-Zellen, die den CD4-, CXCR4- und CCR5-Rezeptor exprimieren, sowie ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle des HIV-1-Promotors tragen. Die Beeinflussung der Viabilität von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit C3 und C5 wurde daher mit dem AlamarBlue-Assay überprüft. Dabei konnte nur eine geringe Verminderung der Viabilität festgestellt werden.

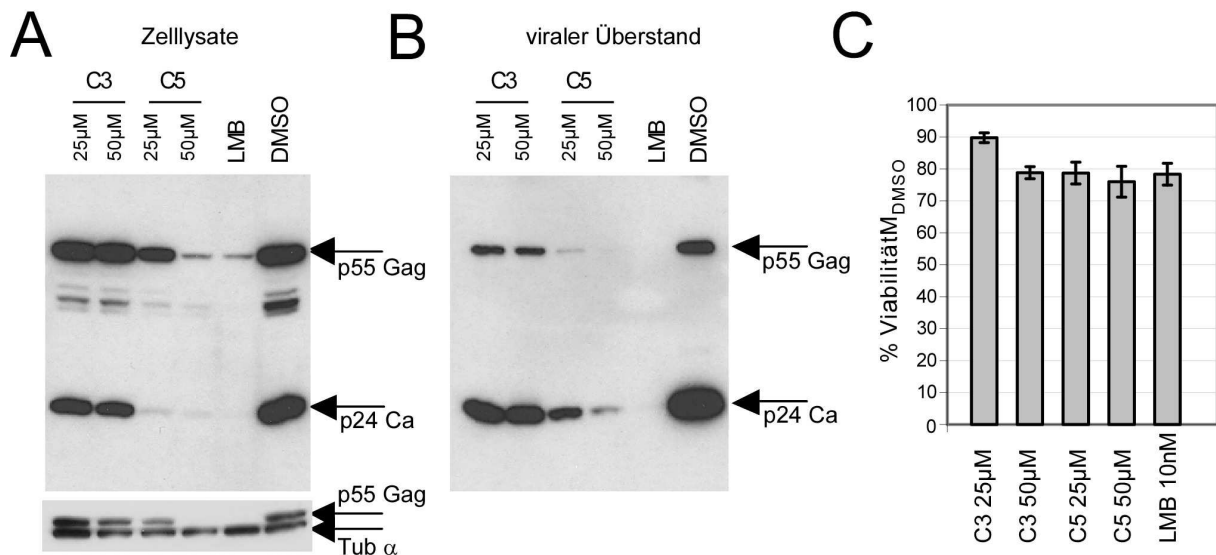


Abb. 79. Effekte von C3 und C5 auf die Rev-abhängige Expression von p55 Gag und p24 CA
C5 und LMB reduzierten die Rev-abhängige Expression von p55 Gag und p24 CA in den mit HIV-1 infizierten Tzm-bl-Zellen (A). Im viralen Überstand war die Expression von p55Gag und p24CA nach Inkubation mit C5 deutlich und mit C3 schwach vermindert (B). Bestimmung der Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit C3 und C5 mit Hilfe des AlamarBlue-Assays (C).

3.5.23 Einfluss von C3 und C5 auf die Expression von Crm1

Eine mögliche Reaktion der Zelle auf die Inhibition des Exports aus dem Zellkern könnte eine verstärkte Expression von Crm1 zur Kompensation der verminderten Export-Rate sein. Um die Auswirkungen von C3 auf die Expression von Crm1 zu untersuchen, wurde der zelluläre Gehalt an Crm1-RNA mittels *Real Time*-PCR untersucht (s. Abb.80A). Die RNA von HeLa- und MDA-MB 231-Zellen wurde nach 7-tägiger Inkubation mit C3 (25μM) oder DMSO isoliert. Dieses Vorgehen war mit C5 nicht möglich, da die Zellen eine solche Langzeitbehandlung nicht tolerierten. Die RNA wurde revers transkribiert und zur Analyse mit Crm1- und DNA-Pol2-spezifischen Primern mit dem Light Cycler® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eingesetzt. Die CP-Werte für die Crm1-Expression wurden mit denen der DNA-Pol2 verrechnet. Die DNA-Pol2 diente als sogenanntes Haushaltsgen, dessen konstante Expression als Referenz den Vergleich zweier RNA-Proben ermöglicht. Für die HeLa-Zellen zeigte sich eine Verringerung der Crm1-RNA um den Faktor 0,8, wohingegen für MDA-MB 231-Zellen eine Erhöhung um den Faktor 2,1 gefunden wurde.

Die Expression von Crm1 in HeLa- und MDA-MB 231-Zellen nach Inkubation mit C3, C5 (jeweils 25μM) und LMB (10nM) wurde mittels Western Blot analysiert (s. Abb.80B). Dabei konnte nach fünfstündiger Inkubation keine erhöhte Expression von Crm1 nachgewiesen werden. Nach 24-stündiger Inkubation konnte keine eindeutig verstärkte Expression von Crm1 nachgewiesen werden. Somit scheint die Zelle auf eine Inhibition des Exports nicht mit einer sofortigen Verstärkung der Expression von Crm1 zu reagieren.

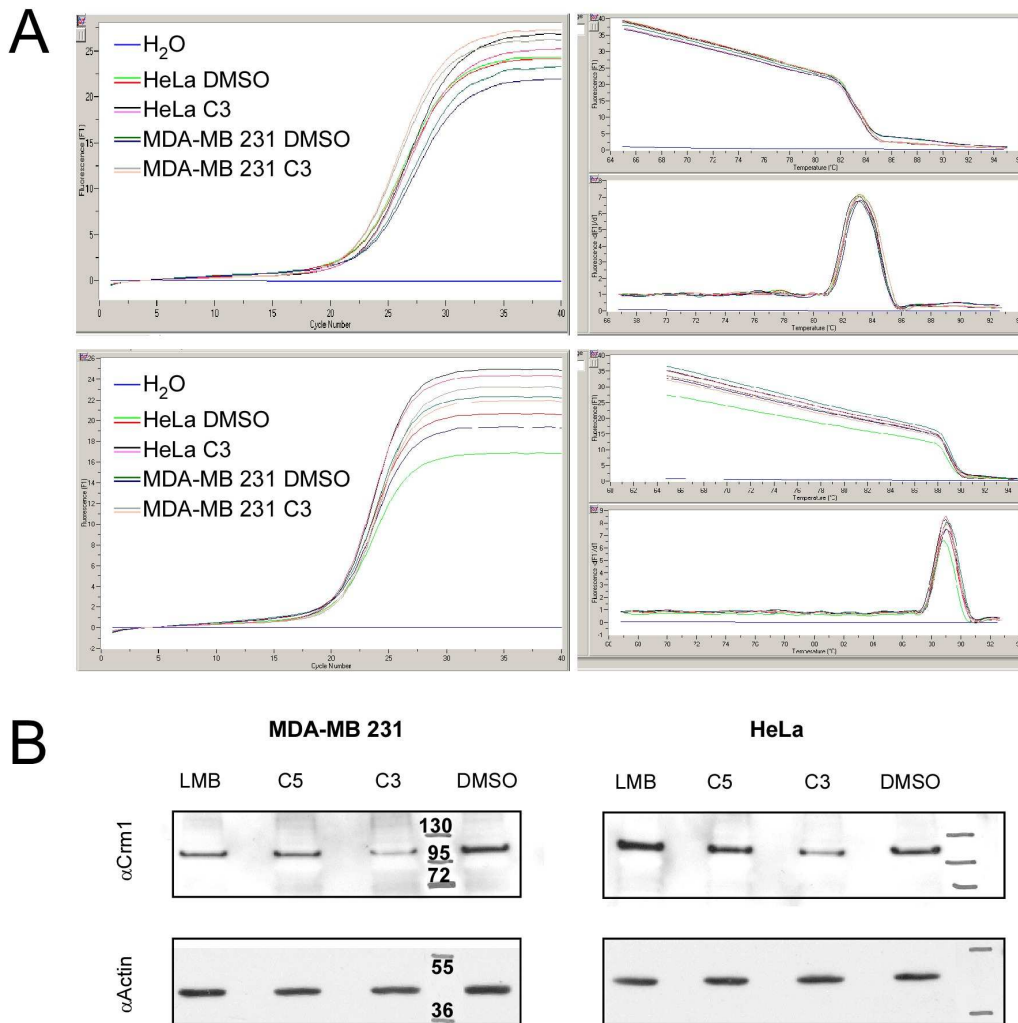


Abb. 80. Die Expression von Crm1 ist nach Inkubation mit C3 und C5 unverändert
RealTime PCR-Spektren der Analyse mit Crm1- (oben) und DNAPol2 (unten)-spezifischen Primern. Jeweils links sind die Spektren und rechts die Schmelzkurven mit Schmelzkurvenprofilen gezeigt. MDA-MB 231- und HeLa-Zellen wurden für 7 Tage mit DMSO oder C3 (25µm) inkubiert und deren RNA für die Analyse mittels *RealTime* PCR verwendet (A). Western Blot-Analyse mit Crm1- und Aktin-spezifischen Antikörpern von MDA-MB 231- und HeLa-Zellen nach fünfstündiger Inkubation mit C3 und C5 (25µM) oder LMB (10nM)(B).

3.6 Suche nach zu C3 und C5 homologen Substanzen

Zur Untersuchung der für die inhibitorische Funktion wichtigen strukturellen Einheiten von C3 und C5 sollten Homologe zu diesen gefunden und auf ihre Export-inhibierende Aktivität hin überprüft werden. Die Suche nach homologen Substanzen wurde von Dr. Michael Lisurek (FMP, Berlin) mit Hilfe eines selbst geschriebenen Algorithmus in dem Programm PipelinePilot (Accelrys®, SanDiego, CA, USA) durchgeführt. Homologe wurden auf Basis des Tanimoto-Ähnlichkeitskoeffizienten, der anhand der FCFP-4-Fingerprints berechnet wurde, bestimmt. Es wurden dabei etwa 10 Millionen Substanzen aus den Datenbanken von 39 verschiedenen Anbietern verglichen. Die hieraus bestimmten Homologen sind im Anhang

Abb. A-2 gezeigt. Zur effektiven Bestimmung der funktional wichtigen Gruppen wurde von Prof. Dr. T. Opatz (Institut für organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) eine Auswahl aus den gefundenen Homologen erstellt. Diese sind in Abb. A-2 im Anhang mit einem * markiert. HeLa_{RevNES}-Zellen wurden mit diesen Substanzen in einer Konzentration von 25µM inkubiert und nach 5h mikroskopisch analysiert (s. Abb.81). Bei den zu C3 homologen Substanzen zeigte lediglich H-15, im Folgenden C24 genannt, eine inhibitorische Wirkung auf den Crm1-abhängigen Export. Zur weiteren Eingrenzung wurden von Prof. Dr. T. Opatz erneut zwei Substanzen ausgewählt und auf HeLa_{RevNES}-Zellen getestet. Diese sind in oben erwähnter Abbildung mit ** markiert.

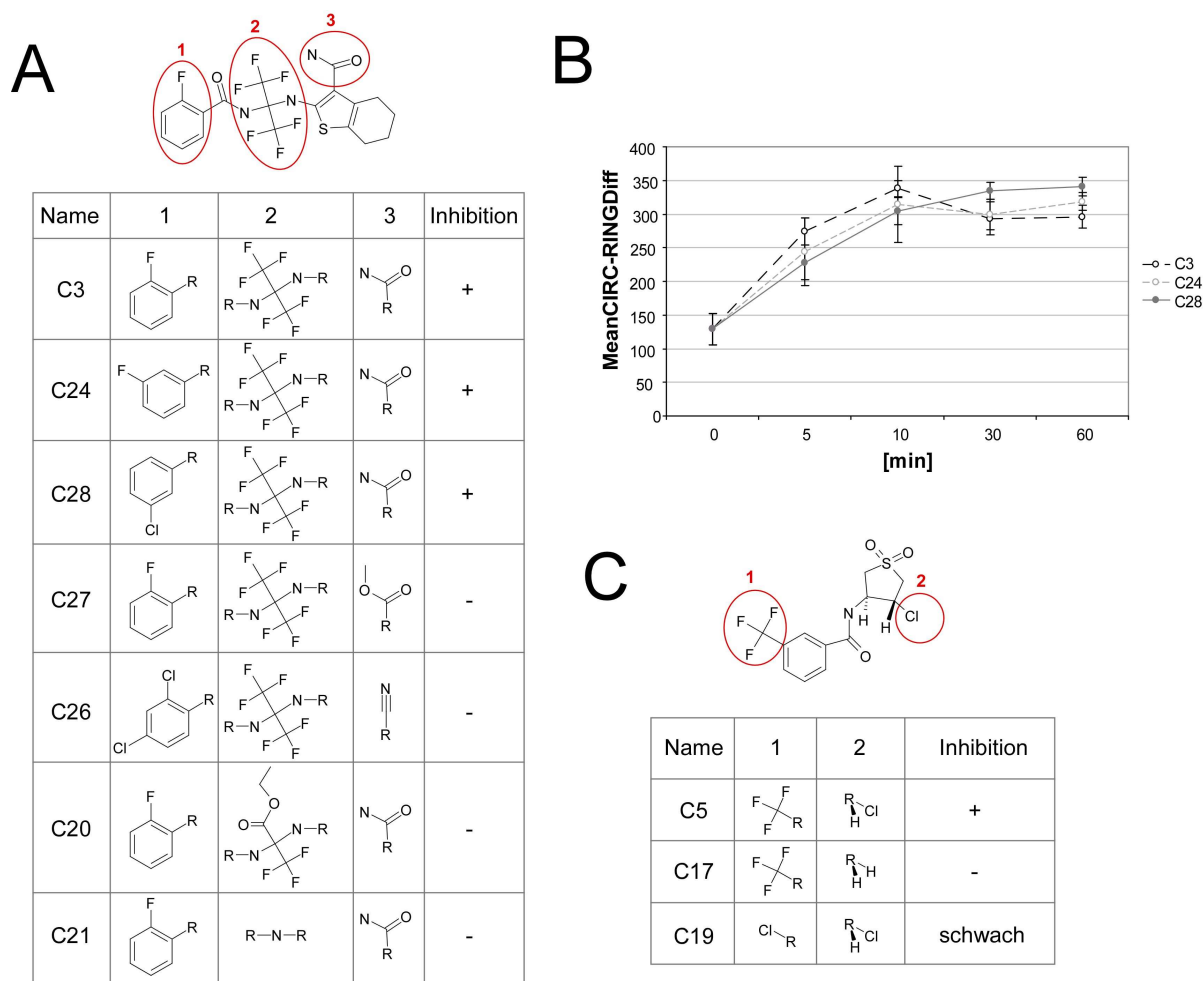


Abb. 81. Zu C3 und C5 homologe Substanzen

Die aufgrund ihrer Struktur zu C3 homologen Substanzen besitzen nicht alle eine Aktivität hinsichtlich der Inhibition des Exports des RevNES-Biosensors (A). HeLa_{RevNES}-Zellen wurden über die angegebene Zeiträume mit den Exportinhibitoren (25µM) inkubiert, anschließend fixiert und mit dem ArrayScanVTI[®] und der ‚Molecular Translocation BioApplication V4‘ analysiert. Die Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern erfolgte durch C3 sowie die zu C3 homologen Substanzen C24 und C28 mit gleicher Kinetik. Dargestellt sind Mittelwerte zweier Dreifachmessungen (B). Von den zu C5 homologen Substanzen zeigt nur C19 eine inhibitorische Aktivität, die aber im Vergleich zu C5 deutlich schwächer war (C).

Zum Vergleich der kinetischen Eigenschaften, mit denen die aktiven C3-Homologen C24 und C28 den Crm1-abhängigen Export inhibieren, wurden HeLa_{RevNES}-Zellen in 96well-Platten mit den Substanzen in einer Konzentration von 25µM inkubiert. Die Inkubation wurde durch Fixierung der Zellen zu den in Abb.81 angegebenen Zeitpunkten gestoppt und die MeanCirc-RingDiff mit dem ArrayScanVTI[®] und der ‚Molecular Translocation BioApplication V4‘ ausgewertet. Dabei zeigten C3, C24 und C28 jeweils gleiche kinetischen Eigenschaften bezüglich der Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern. Bei der fünfstündigen Inkubation von HeLa_{RevNES}-Zellen mit den zu C5 homologen Substanzen in einer Konzentration von 25µM konnte zunächst keine Aktivität festgestellt werden. Erst nach einer 24-stündigen Inkubation mit 100µM C19 wurde eine schwache inhibitorische Aktivität detektiert. Nach Inkubation von Survivin-GFP stabil exprimierenden A431-Zellen konnten für C3 und seine Homologen (C24 und C28) wiederum gleiche Inhibitionskinetiken gefunden werden (s. Abb.82). So akkumulierte Survivin-GFP nach Inkubation mit den drei Exportinhibitoren für 2h und 5h im Zellkern, wohingegen nach 24h wieder eine zytoplasmatische Lokalisation detektiert wurde.

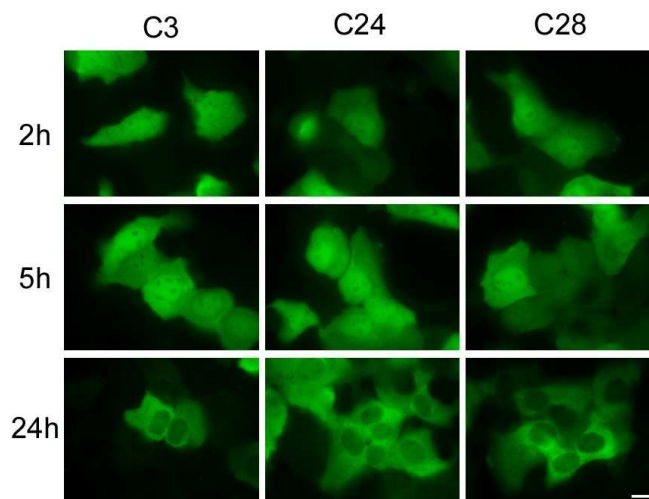


Abb. 82. Intrazelluläre Lokalisation von Survivin-GFP nach Inkubation mit C3, 24 und 28
A431 Survivin-GFP-Zellen wurden mit C3, C24 oder C28 (25µM) inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken, 10µm.

Der IC₅₀-Wert, als vergleichbares Maß der Zytotoxizität, wurde für C24 und C28 analog zu C3 bestimmt (siehe 3.3.9). C24 und C28 wiesen wie C3 einen IC₅₀ im mikromolaren Bereich auf (s. Abb.83).

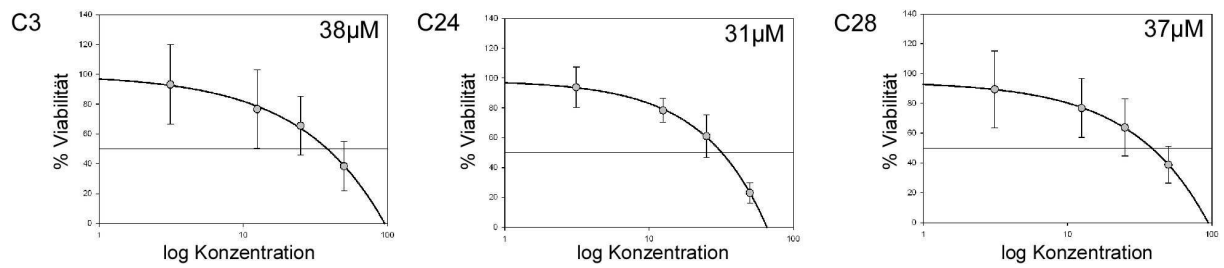


Abb. 83. C24 und C28 weisen einen zu C3 ähnlichen IC₅₀-Wert auf

Die IC₅₀-Werte von C24 und C28 wurden wie für C3 bestimmt. Die Viabilitätswerte (%) wurden gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Der daraus abgelesene IC₅₀ ist jeweils in der rechten oberen Ecke gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachmessung.

3.7 Exportinhibitoren aus Pilzextrakten

Chemische Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht (*small molecules*), die von biologischen Organismen hergestellt wurden, werden als Naturstoffe bezeichnet (Hubel *et al.* 2008). Aufgrund ihrer physiologischen Herkunft gelten sie als privilegierte Strukturen und stellen eine reiche Quelle für Leitstrukturen zur pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung dar (Breinbauer *et al.* 2002). In einem Pilzextrakt liegen eine Vielzahl an Naturstoffen vor, die bei einer Hochdurchsatzanalyse in einer einzigen Testreaktion auf eine inhibitorische Aktivität hin geprüft werden können. Zeigt ein Extrakt die Inhibition der untersuchten Zielstruktur an, so muß die aktive Substanz im Folgenden aus dem Gemisch identifiziert werden.

3.7.1 Hochdurchsatzanalyse der Pilzextrakte

Es wurden 186 Pilzextrakte, zur Verfügung gestellt von PD Dr. E. Thines (TU Kaiserslautern), auf HeLa_{RevNES}-Zellen in einer initialen Hochdurchsatzanalyse getestet. Analog zu der Hochdurchsatzanalyse mit der ChemBioNet-Bibliothek wurden HeLa_{RevNES}-Zellen in einer 96well-Platte mit den Extrakten inkubiert. Von den im Anschluss fixierten Zellen wurde die MeanCirc/RingRatio mit dem ArrayScanVTI® und der ‚Molecular Translocation BioApplication V4‘ analysiert (s. Abb.84). Nach fünfstündiger Inkubation konnte für einige Extrakte eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erhöhte MeanCirc/RingRatio detektiert werden.

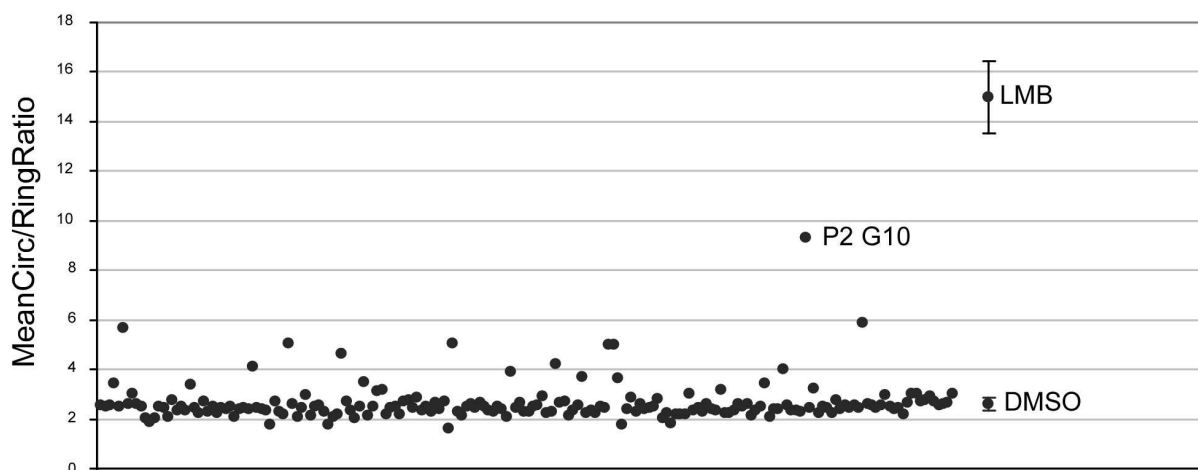


Abb. 84. Hochdurchsatzanalyse von Pilzextrakten hinsichtlich einer Export-inhibitorischen Wirkung

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden für 5h mit den 186 Pilzextrakten inkubiert und die MeanCirc/RingRatio mit dem ArrayScanVTI® und der ‚Molecular Translocation BioApplication V4‘ gemessen. Einige Extrakte zeigten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erhöhte Werte, wobei der Extrakt aus well G10 der Platte 2 besonders auffiel.

17 Extrakte mit einem um die doppelte Standardabweichung der DMSO-Kontrolle erhöhten Wert der MeanCirc/RingRatio wurden erneut auf in Mikroskopieschälchen ausgesäten HeLa_{RevNES}-Zellen getestet und mikroskopisch bei einer höheren Auflösung analysiert

(s. Abb.85). Dabei konnten 16 Extrakte aufgrund hoher Zytotoxizität oder geringer Inhibitionsleistung von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Einzig der Extrakt aus *well* G10 der Platte 2 zeigte eine deutliche Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern.

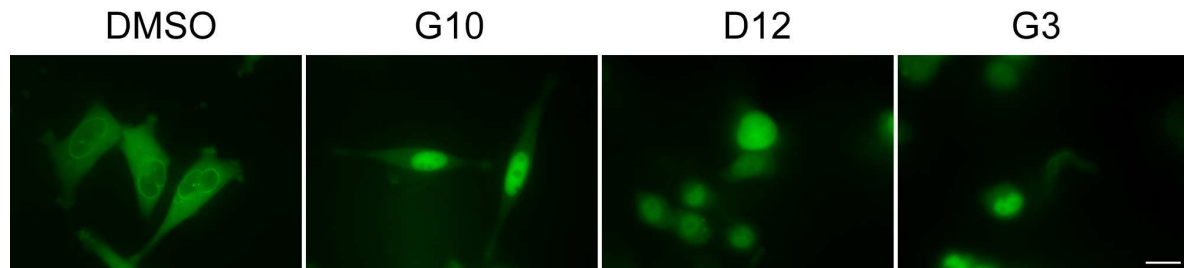


Abb. 85. Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern nach Inkubation mit ausgewählten Pilzextrakten

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden mit den Pilzextrakten in einer Verdünnung von 1:200 für fünf Stunden inkubiert. Eine klare inhibitorische Aktivität konnte nur bei dem Extrakt aus *well* G10 von Platte 2 detektiert werden. Einige als potentielle *Hits* untersuchte Extrakte zeigten eine starke zytotoxische Aktivität, die an den abgekugelten Zellen zu erkennen ist (D12,G3). Maßstabsbalken, 10µm.

Die komplexe Substanzmischung des Extrakts 08092 (*Cyphellopsis anomala*) aus *well* G10 der Platte 2 wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. E. Thines durch Fraktionierung weiter aufgetrennt. Die Extrakte der Fraktionierung wurden wiederum 1:200 verdünnt auf HeLa_{RevNES}-Zellen getestet und mit dem ArrayScanVTI[®] analysiert (s. Abb.86).

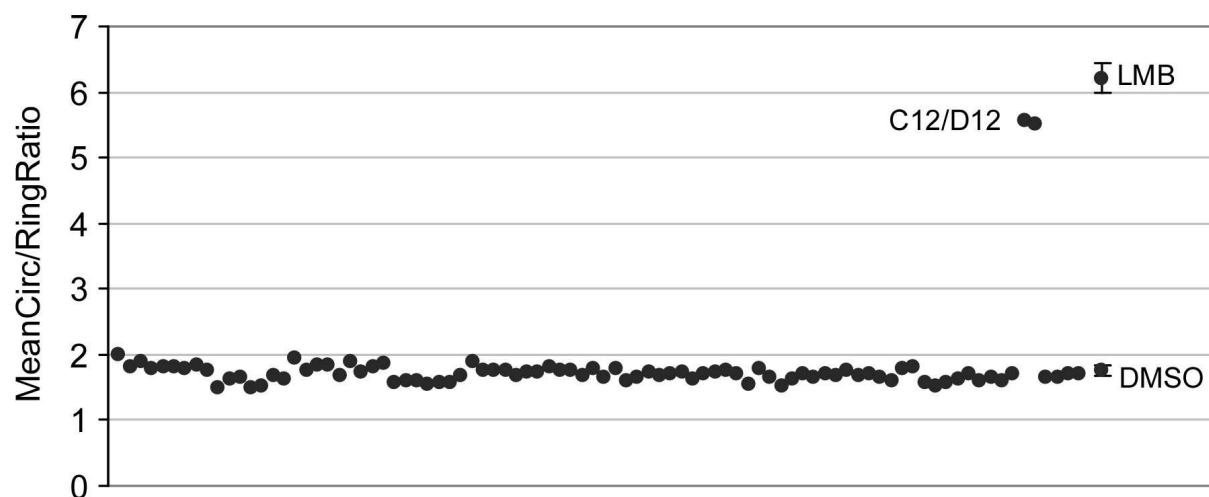


Abb. 86. Analyse der Fraktionen des *Cyphellopsis anomala*-Extrakts hinsichtlich einer Export-inhibitorischen Wirkung

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden für 5h mit den Fraktionen des Pilzextrakts 08092 inkubiert und die MeanCirc/RingRatio mit dem ArrayScanVTI[®] und der ‚Molecular Translocation BioApplication V4‘ analysiert. Einen zur DMSO-Negativkontrolle deutlich erhöhten Wert der MeanCirc/RingRatio zeigten die Fraktionen aus *well* C12 und D12.

Die Extrakt-Fractionen aus *well* C12 und D12 wurden zur Kontrolle in einer Verdünnung von 1:400 auf in Mikroskopieschälchen ausgesäte HeLa_{RevNES}-Zellen gegeben und mit einer größeren Auflösung mikroskopisch analysiert (s. Abb.87). Beide Fraktionen zeigten eine

deutliche Inhibition des Exports. Gleichzeitig konnte die Entstehung von Membran-Abschnürungen beobachtet werden, die in den Durchlichtbildern zu erkennen sind.

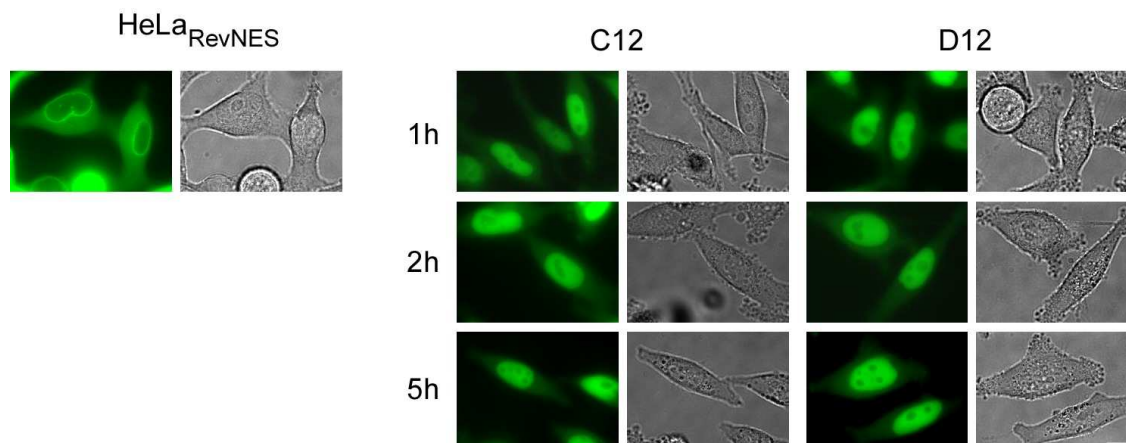


Abb. 87. Die Extrakt-Fractionen C12 und D12 inhibieren den Export des RevNES-Biosensors
HeLa_{RevNES}-Zellen wurden mit Fraktionen des Pilzextrakts 08092 in einer Verdünnung von 1:400 inkubiert. Eine klare inhibitorische Aktivität konnte bereits nach einer Stunde detektiert werden. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigten Abschnürungen von der zellulären Membran. Maßstabsbalken, 10µm.

Um die Export-inhibierende Substanz zu identifizieren, wurde der Extrakt 08092 um den Bereich der Fraktionen aus *well* C12 und D12 von der Arbeitsgruppe von PD Dr. E. Thines weiter aufgetrennt, da das Chromatogramm auf das Vorhandensein von insgesamt zwei in diesen Fraktionen enthaltenen Substanzen schließen ließ. Die so erhaltenen Subfraktionen wurden erneut auf HeLa_{RevNES}-Zellen getestet und mit dem ArrayScanVTI[®] analysiert (s. Abb.88).

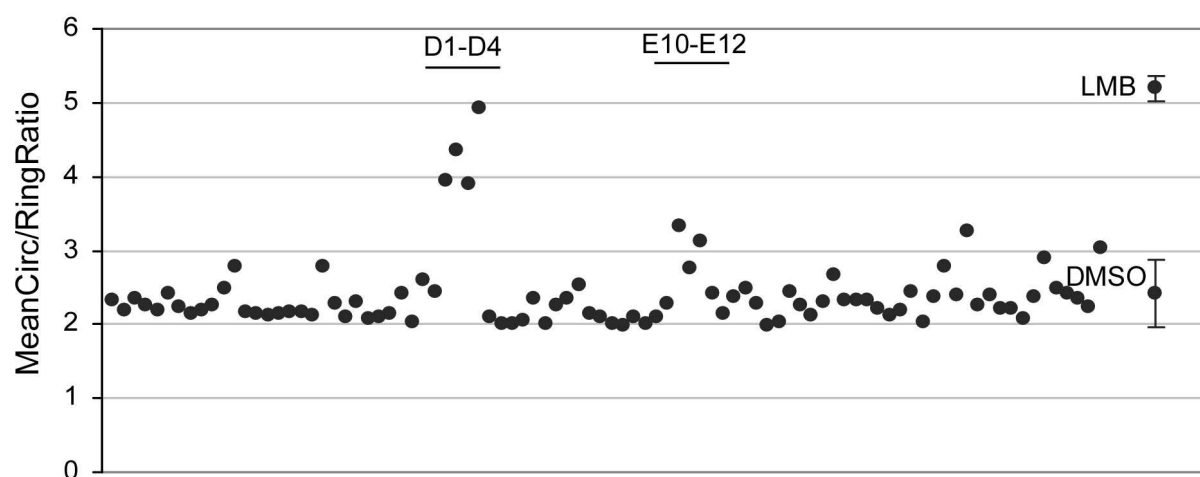


Abb. 88. Analyse der Subfraktionen der Fraktionen C12 und D12 hinsichtlich einer Export-inhibitorischen Wirkung

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden mit den 96 Subfraktionen der Fraktionen C12/D12 des Pilzextrakts 08092 für zwei Stunden inkubiert und mit dem ArrayScanVTI[®] und der 'Molecular Translocation BioApplication V4' analysiert. Die in den *wells* D1 bis D4 enthaltenen Subfraktionen wiesen einen, gegenüber der DMSO-Kontrolle deutlich erhöhten, Wert der MeanCirc/RingRatio auf. Für die *wells* E10 bis E12 war dieser lediglich gering erhöht.

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden im Weiteren mit den Subfraktionen D1-D4 und E10-E12 in einer Verdünnung von 1:800 inkubiert und hinsichtlich einer Aktivität auf die Inhibition des Exports mikroskopisch analysiert (s. Abb.89). Bereits nach 15min konnte für die Subfraktionen aus *well* D2 und D3 eine deutliche Inhibition des Exports detektiert werden, wohingegen die Fraktionen E10 bis E12 keine Aktivität zeigten.

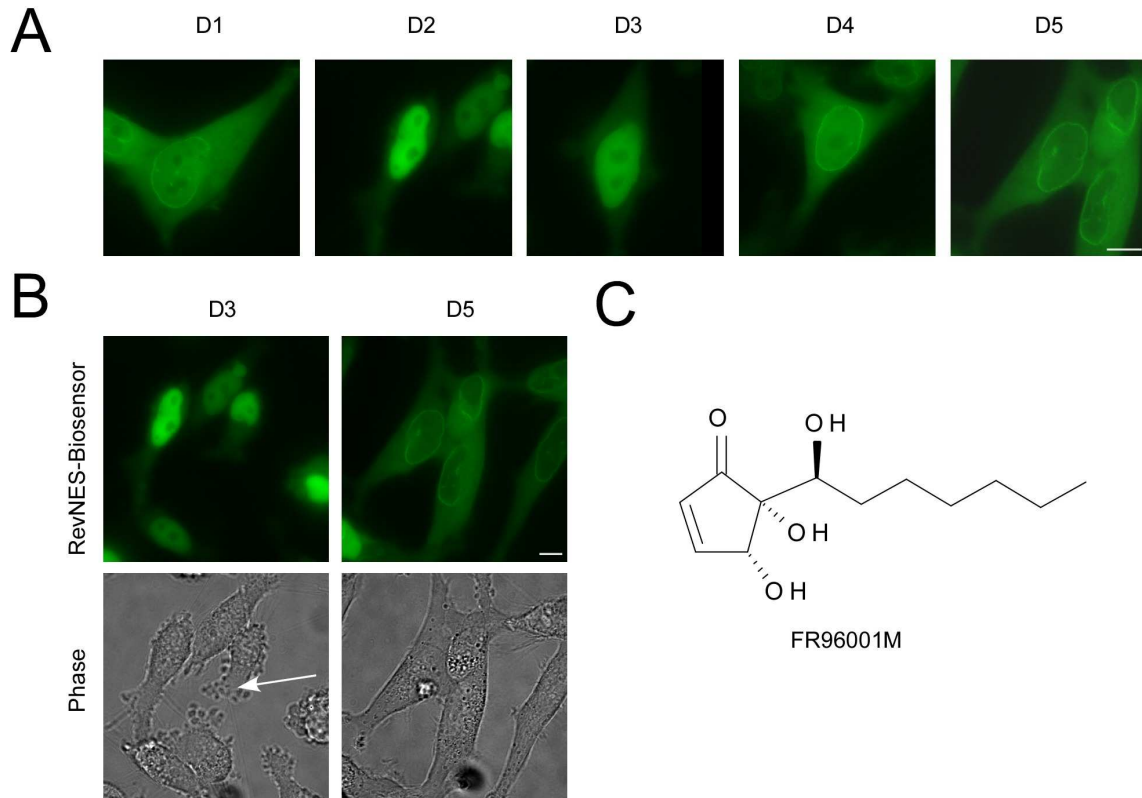


Abb. 89. Die Subfraktionen D2 und D3 inhibieren den Export des RevNES-Biosensors
HeLa_{RevNES}-Zellen wurden mit Subfraktionen D1 bis D5 in einer Verdünnung von 1:800 inkubiert. Eine klare inhibitorische Aktivität konnte bereits nach 15min bei den Subfraktionen D2 und D3 beobachtet werden (A). Inkubation mit Subfraktion D3 in einer Verdünnung von 1:800 führte zur Bildung von Membranabschnürungen (B). Strukturformel des identifizierten Inhibitors FR96001M. Das Molekulargewicht beträgt 228g/mol (C). Maßstabsbalken, 10µm.

3.7.2 Charakterisierung des Inhibitors

Die in den Subfraktionen D2 und D3 enthaltene Reinsubstanz FR96001M ((4R,5R)4,5-Dihydroxy-5-((1S) 1-hydroxy-heptyl)-cyclopent-2-enon) wurde von PD Dr. E. Thines zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt. Eine deutliche Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern konnte mit 25µM FR96001M bereits nach fünfminütiger Inkubation detektiert werden (s. Abb.90). Im Vergleich dazu konnte dies mit 12,5µM FR96001M erst nach 25min beobachtet werden. Somit lag eine Verlangsamung der Export-Inhibition mit verringerter Konzentration von FR96001M vor. Die Kinetik der Export-Inhibition wurde mit dem ArrayScanVTI® und der „Molecular Translocation BioApplication V4“ untersucht. HeLa_{RevNES}-Zellen wurden in eine 96well-Platte ausgesät, am Folgetag mit Hoechst 33342 für 30min inkubiert (10mg/ml, 1:100.000) und in die *live-cell chamber* eingestellt. Nach Justierung der automatisierten Aufnahme wurde mit der automatischen Pipettiereinheit das

Medium aus dem jeweiligen *well* entnommen und gegen PBS mit gleicher Konzentration Hoechst und 25µM FR96001M ersetzt. Die Lokalisation des RevNES-Biosensors wurde anhand der MeanCirc/RingRatio alle 2min analysiert.

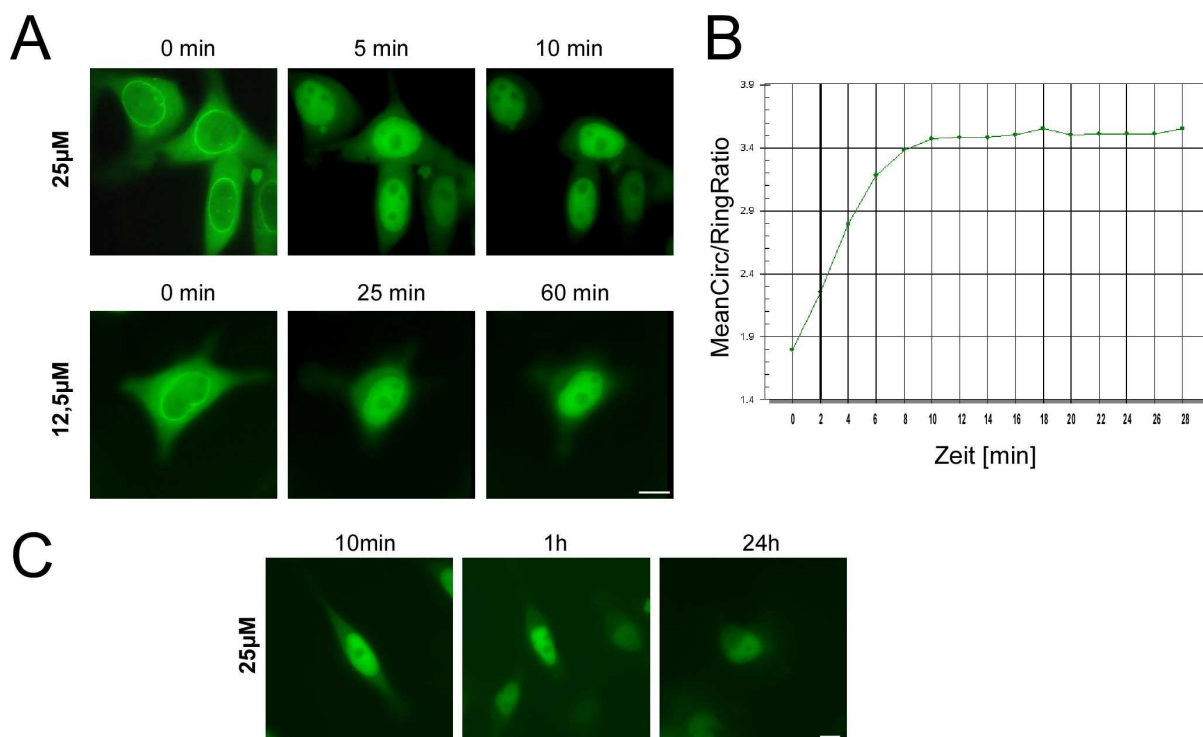


Abb. 90. Kinetik der durch FR96001M vermittelten Exportinhibition

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden mit 25 bzw. 12,5µM FR96001M inkubiert und nach den angegebenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert. Dabei konnte für die Behandlung mit der höheren Konzentration FR96001M eine schnellere Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern detektiert werden (A). Verlauf der MeanCirc/RingRatio als Indikator für die Export-Inhibition des RevNES-Biosensors bei Inkubation mit 25µM FR96001M. Eine maximale Inhibition war bereits nach 10min erreicht (B). Auch nach 24-stündiger Inkubation mit 25µM FR96001M war die Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern zu detektieren. (C). Maßstabsbalken, 10µm.

Die mikroskopische Analyse von HeLa_{RevNES}-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubationszeit mit FR96001M zeigte eine beständige Inhibition des Exports an. FR96001M blieb auch nach Präinkubation in PBS, PBS10%FCS und Medium bei 37°C unvermindert aktiv (s. Abb.91).

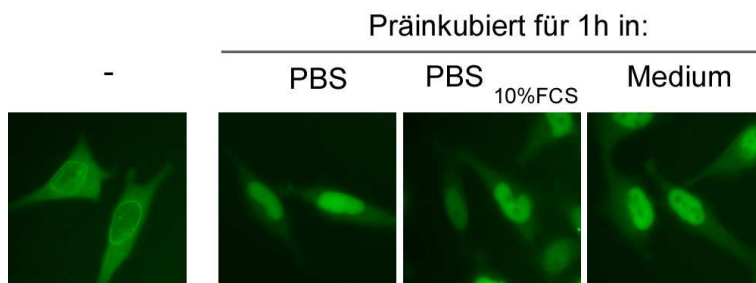


Abb. 91. Eine Präinkubation von FR96001M in wässrigem Medium hatte keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität

FR96001M wurde für 1h in 500µl PBS, PBS10%FCS oder Medium inkubiert und anschließend zu 1,5ml Medium auf HeLa_{RevNES} gegeben. Nach 1h wurden die Zellen mikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken, 10µm.

Entfernte man FR96001M nach fünfminütiger Inkubation von HeLa_{RevNES}-Zellen aus dem Zellmedium, so war nach weiteren 30min die Lokalisation des Grundzustands des RevNES-Biosensors wieder erreicht (s. Abb.92).

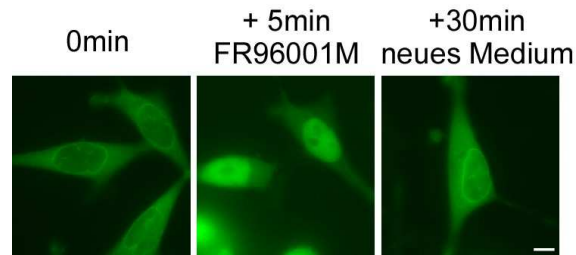


Abb. 92. Nach Entnahme von FR96001M aus dem Zellmedium wird die Inhibition des Exports schnell aufgehoben

HeLa_{RevNES}-Zellen wurden für 5min mit FR96001M inkubiert und die Inhibition des Exports mikroskopisch detektiert. Anschließend wurde das FR96001M-enhaltende Zellkulturmedium entnommen. Nach 30min keine Inhibition mehr feststellbar. Maßstabsbalken, 10µm.

3.7.3 FR96001M und SurvivinNES-Biosensor

Die inhibitorische Wirkung von FR96001M sollte auch mit dem SurvivinNES-Biosensor untersucht werden. Hierfür wurden HeLa_{SurvNES}-Zellen mit 25µM FR96001M inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert (s. Abb.93). Dabei konnte nach zweistündiger Inkubation eine deutliche Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern detektiert werden. Auch nach 24-stündiger Inkubation konnte diese Export-Inhibition detektiert werden. Die Kinetik der Inhibition wurde wie in Abb.90 für den RevNES-Biosensor gezeigt, mit dem ArrayScanVTI® und der „Molecular Translocation BioApplication V4“ untersucht. HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden hierfür in eine 96well-Platte ausgesät, am Folgetag mit Hoechst 33342 für 30min inkubiert (10mg/ml, 1:100.000) und in die *live-cell chamber* eingestellt. Nach Justierung der automatisierten Aufnahme wurde mit der automatischen Pipettiereinheit das Medium aus dem jeweiligen *well* entnommen und gegen PBS mit gleicher Konzentration Hoechst und 25µM FR96001M ersetzt. Die Lokalisation des SurvivinNES-Biosensors wurde alle 5min analysiert. Es zeigte sich eine beständige Zunahme der MeanCirc/RingRatio als Maß für eine zunehmende Inhibition des Exports. Über den untersuchten Zeitraum von 60min wurde keine maximale Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern erreicht, was an einer Plateau-Phase des Verlaufs der MeanCirc/RingRatio zu erkennen gewesen wäre. Somit bedarf es einer längeren Inkubationszeit als 1h mit 25µM FR96001M für eine vollständige Export-Inhibition.

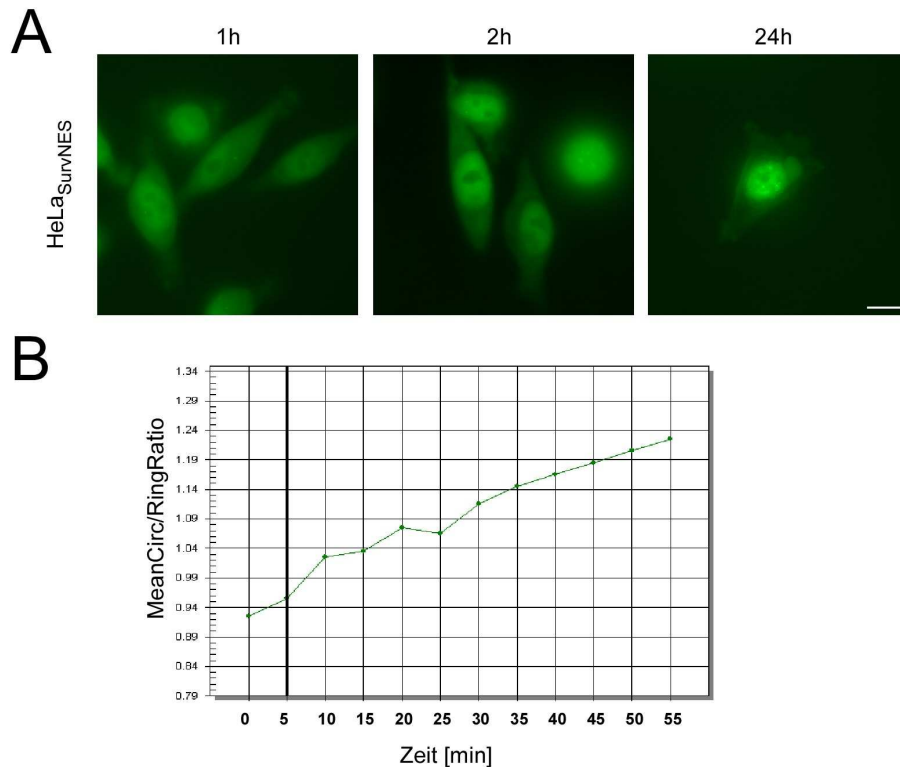


Abb. 93. FR96001M inhibiert den Export des SurvivinNES-Biosensors

HeLa_{SurvNES}-Zellen wurden mit 25µM FR96001M inkubiert und nach 1/2/24h mikroskopisch analysiert (A). Der Verlauf der MeanCirc/RingRatio zeigt die Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern in Abhängigkeit von der Inkubationszeit an. Eine maximale Inhibition war nach dem untersuchten Zeitraum von einer Stunde noch nicht erreicht (B). Maßstabsbalken, 10µm.

3.7.4 *In vitro*-Bindungsstudien mittels Pulldown

Zur Untersuchung, ob FR96001M die Bindung des RevNES und des SurvivinNES an Crm1 *in vitro* inhibieren kann, wurden analog zu 3.3.17 Pulldown-Analysen durchgeführt. Crm1-HA und Crm1_{C528S}-HA wurden per *in vitro*-Transkription und Translation hergestellt. Die Bindepartner GST-RevNES-GFP und GST-SurvivinNES-GFP, sowie GST-RanQ₉₆L wurden mittels bakterieller Expression und Aufreinigung generiert. Die Pulldown-Reaktionen wurden unter Zugabe von FR96001M in einer finalen Konzentration von 1mM oder LMB in einer finalen Konzentration von 400nM durchgeführt (s. Abb.94). Bei 30-minütiger Präinkubation und vierstündiger Pulldown-Reaktion unter Zugabe von FR96001M konnte wiederholt eine Verminderung der Bindung des GST-RevNES-GFP an Crm1-HA beobachtet werden. Dies konnte für die Bindung des GST-SurvivinNES-GFP nur in einer Durchführung beobachtet werden. Bei der Verwendung des GFP-spezifischen Antikörpers konnte in den mit FR96001M inkubierten Proben immer eine deutliche Anfärbung im Bereich höheren Molekulargewichts detektiert werden (s. Abb.94B).

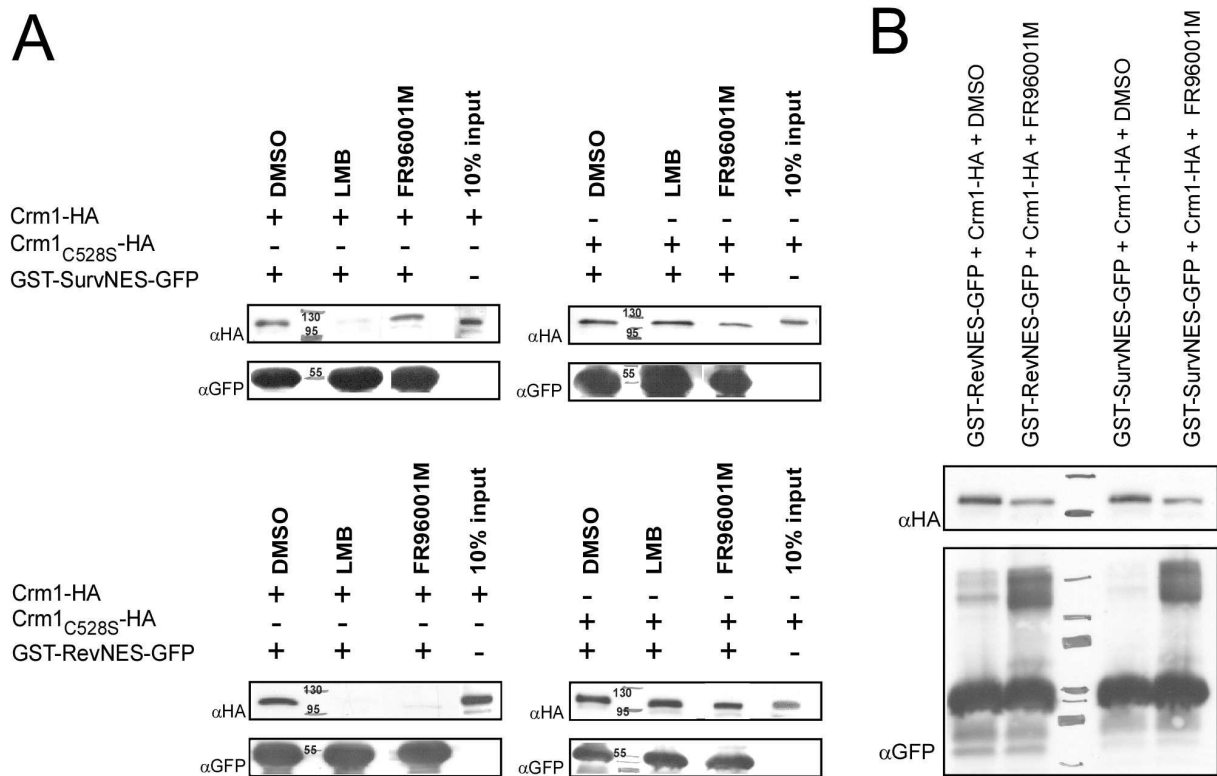


Abb. 94. Pulldown von Crm1-HA oder Crm1_{C528S}-HA mit Rev- oder SurvivinNES mit FR96001M

In vitro-transkribiertes und translatiertes Crm1-HA oder Crm1_{C528S}-HA wurde mit bakteriell exprimiertem GST-RevNES-GFP oder GST-SurvNES-GFP und GST-RanQ₉₆L inkubiert. Die Proteine wurden über das GST-tag aufgereinigt und auf dem Western Blot mittels HA-spezifischem Antikörper detektiert. Crm1-HA oder Crm1_{C528S}-HA wurden mit FR96001M (1mM) oder LMB (400nM) für 30min vorinkubiert (A+B). Eine Verminderung des detektierten Crm1-HA ist in (A) und (B) für das RevNES ersichtlich. Für das SurvivinNES konnte dies nur in der in (B) gezeigten Durchführung gefunden werden.

3.7.5 Aktivität von FR96001M ist gegen Crm1_{Cys528} gerichtet.

Ebenso wie für die Exportinhibitoren (siehe 3.3.21.1) wurde für FR96001M geprüft, ob es über eine Bindung an das Cystein₅₂₈ von Crm1 agiert. HeLa-Zellen wurden mit HIV-1 Rev-BFP und Crm1-GFP oder Crm1_{C528S}-GFP transfiziert und am Folgetag mit 25µM FR96001M für 2h inkubiert (s. Abb.95). Bei der mikroskopischen Analyse zeigte sich, dass die Kolokalisation von HIV-1 Rev-BFP mit Crm1-GFP aufgehoben war, wohingegen die von HIV-1 Rev-BFP mit Crm1_{C528S}-GFP insensitiv gegenüber einer Inkubation mit FR96001M war.

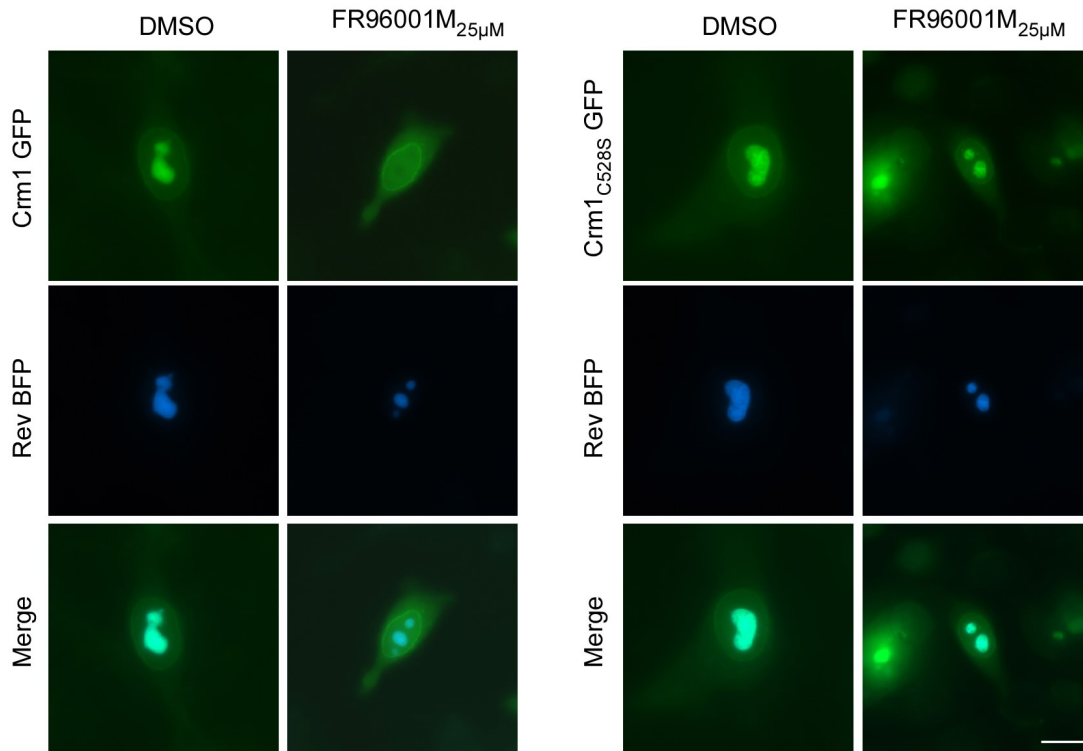


Abb. 95. Die Kolokalisation von Crm1-GFP und Rev-BFP wird durch Inkubation mit FR96001M aufgehoben

HeLa-Zellen wurden mit HIV-1 Rev-BFP und Crm1-GFP oder Crm1_{C528S}-GFP transfiziert und am Folgetag mit 25 μM FR96001M für 2h inkubiert. FR96001M inhibierte die Kolokalisation von HIV-1 Rev-BFP mit Crm1-GFP, zeigte jedoch keinen Effekt auf die von HIV-1 Rev-BFP mit Crm1_{C528S}-GFP. Maßstabsbalken, 10 μm.

3.7.6 Durch FR96001M vermittelte Zytotoxizität und Induktion der Apoptose

Um zu untersuchen, ob FR96001M die Zelle in die Apoptose leitet, wurden per Western Blot die Proteine Survivin, *cleaved* Caspase 3, PARP und Bim von HeLa-Zellen analysiert (s. Abb.96). Bei verminderter Viabilität wäre eine gesteigerte Expression von Survivin denkbar, welches das Überleben der Zelle mit seiner Funktion als *inhibitor of apoptosis* unterstützen könnte. Der Nachweis der Spaltprodukte der PARP und der Caspase 3 zeigen, wie in 3.3.11 beschrieben, den Ablauf der Apoptose an. Nach 24-stündiger Inkubation mit FR96001M konnten die Spaltprodukte der PARP nachgewiesen werden. Mit dem *cleaved* Caspase 3-spezifischen Antikörper wurde ein Signal auf Höhe von ca. 36 kDa detektiert, was der Größe der ungespaltenen Caspase 3 entspricht. Diese sollte nach Hersteller-Angaben eigentlich nicht von diesem Antikörper detektiert werden. Die Expression von Survivin blieb nach Inkubation mit FR96001M unverändert.

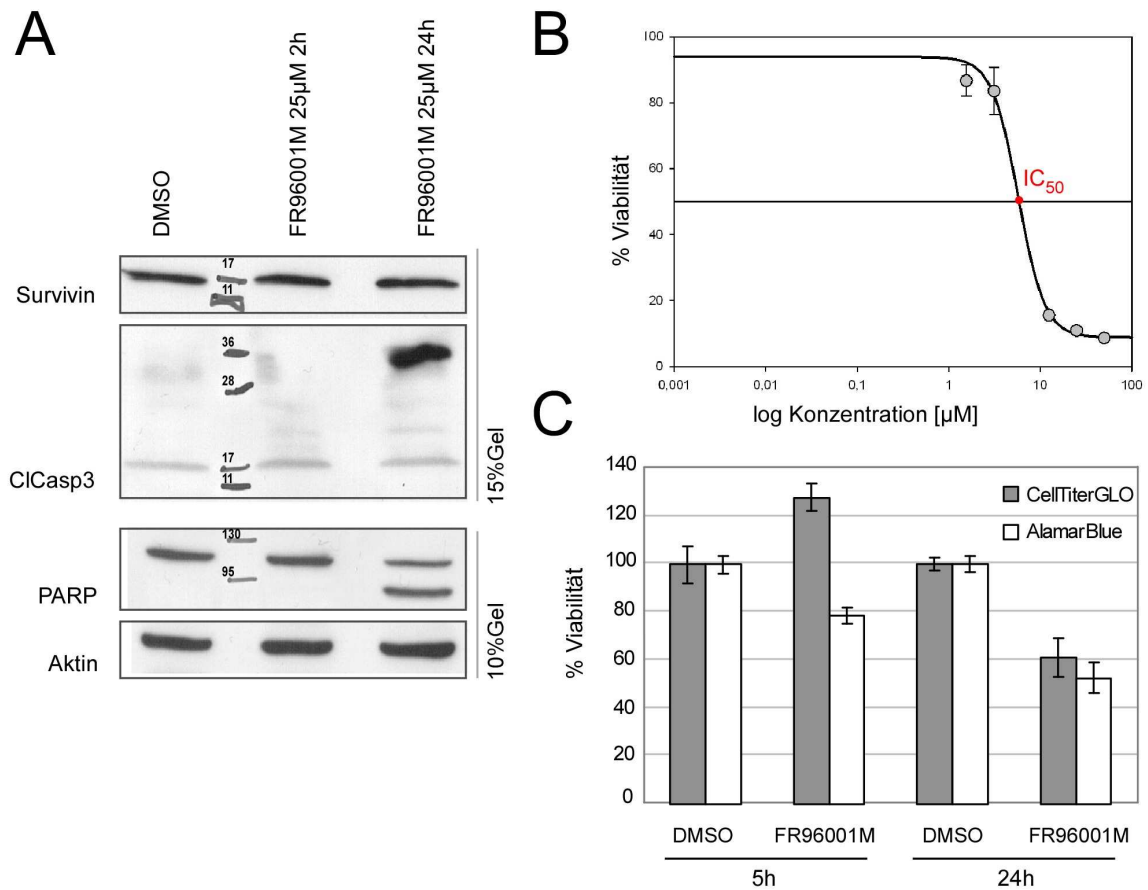


Abb. 96. Induktion der Apoptose und Zytotoxizität von FR96001M

HeLa-Zellen wurden für 2h oder 24h mit 25μM FR96001M inkubiert. Bei der anschließenden Western Blot-Analyse konnten Spaltprodukte der PARP als Nachweis der Apoptose detektiert werden. Mit dem *cleaved* Caspase 3-spezifischen Antikörper wurde nach 24-stündiger Inkubation mit FR96001M ein Protein mit einem Molekulargewicht von ~36kDa detektiert, welches auf die ungespaltene Caspase 3 zurückzuführen sein könnte. Die Expression von Survivin zeigte sich nach Inkubation mit FR96001M unverändert. Aktin diente als Ladekontrolle (A). Bestimmung des IC₅₀ und somit der Konzentration, die nach 72h die Viabilität der verwendeten HeLa-Zellen um 50% reduziert. Gezeigt sind Mittelwerte einer Dreifachmessung mit dem CellTiterGLO®-Assay (B). AlamarBlue- und CellTiterGLO®-Assay zur Messung der Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit 25μM FR96001M für 5h oder 24h. Es sind jeweils Mittelwerte einer Dreifachmessung gezeigt (C).

Der IC₅₀ gibt als vergleichbares Maß die Konzentration wieder, die nach 72-stündiger Inkubation die Viabilität der verwendeten HeLa-Zellen um 50% reduziert. Zur Bestimmung des IC₅₀ von FR96001M wurden HeLa-Zellen für 72h mit den in Abb.96B dargestellten Konzentrationen inkubiert und die Viabilität mit dem CellTiterGLO®-Assay ausgewertet. Der daraus errechnete IC₅₀-Wert liegt bei ca. 6μM. Weiterhin wurde die Viabilität von HeLa-Zellen nach Inkubation mit FR96001M für 5h und 24h mit dem CellTiterGLO®-Assay und dem AlamarBlue-Assay untersucht. Dabei zeigte sich nach fünfstündiger Inkubation eine leichte Abnahme der Viabilität bei Messung mit AlamarBlue und gegensätzlich dazu eine Zunahme bei Messung mit CellTiterGLO®. Nach 24-stündiger Inkubation war die mit beiden Assays gemessene Viabilität gleichermaßen deutlich reduziert (s.Abb.96C).

Die Zytotoxizität wurde auch mit dem LIVE/DEAD®-Viability/Cytotoxicity-Assay (Invitrogen, Darmstadt) untersucht. Dabei wird die Substanz Calcein AM von der zellulären Esterase in das grün fluoreszierende Calcein umgewandelt, welches in lebenden Zellen verbleibt. Der zweite Farbstoff Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) gelangt nur in die Zellen mit beschädigter Zellmembran und erfährt in diesen nach Bindung an die DNA eine Verstärkung seiner Fluoreszenz. HeLa-Zellen zeigten nach ein- bzw. fünfstündiger Inkubation mit 25µM FR96001M keine Beeinflussung der zellulären Esterase oder einen Verlust der Membranintegrität an (s. Abb.97).

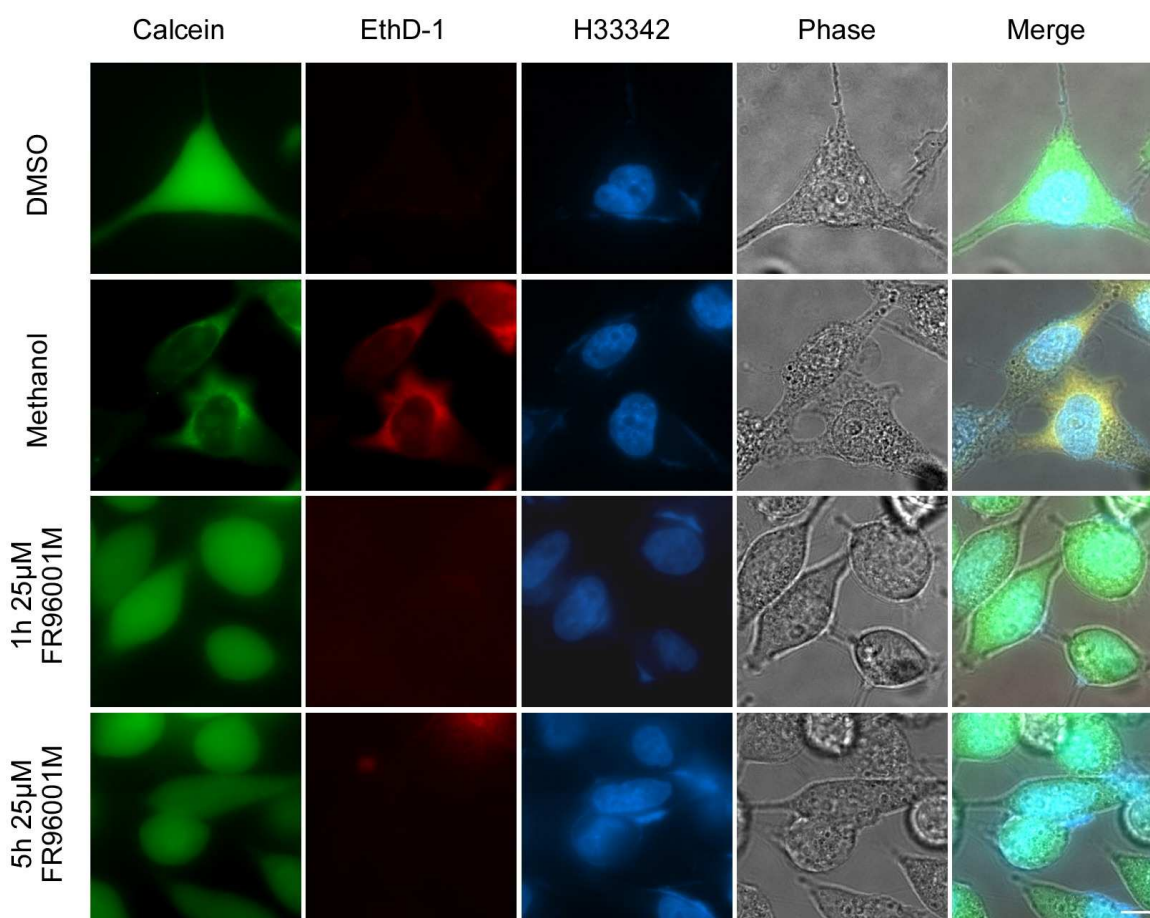


Abb. 97. Ergebnisse des LIVE/DEAD®-Viability/Cytotoxicity-Assays nach Inkubation mit FR96001M

HeLa-Zellen wurden nach ein- bzw. fünfstündiger Inkubation mit 25µM FR96001M im LIVE/DEAD®-Viability/Cytotoxicity-Assay analysiert. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen oder mit 70% Methanol fixierte Zellen. Die Calcein-Färbung gab die Aktivität der zellulären Esterase als Marker für Viabilität wieder, die in den mit FR96001M inkubierten Zellen nicht beeinträchtigt erschien. Die EthD-1-Färbung wies auf die beschädigte Zellmembranen toter Zellen hin, wie es am Beispiel der mit Methanol fixierten Zellen ersichtlich ist. Maßstabsbalken, 10µm.

3.7.7 Aktivität von FR96001M in murinen Zellen

Im Vorfeld eines Tierversuchs muss geklärt werden, ob die verwendete Substanz auch in dem Modellorganismus aktiv ist. In Hinblick auf Zytotoxizitäts-Analysen im Mausmodell wurde daher getestet, ob FR96001M auch in murinen Zellen den Export des SurvivinNES-Biosensors zu inhibieren vermag (s. Abb.98). Hierfür wurden NM18-Zellen transient mit dem SurvivinNES-Biosensor transfiziert und mit 25µM FR96001M für 5h inkubiert. Es konnte danach eine deutliche Akkumulation des SurvivinNES-Biosensors im Zellkern mikroskopisch detektiert werden, was auf die Aktivität von FR96001M in murinen Zellen schließen lässt.

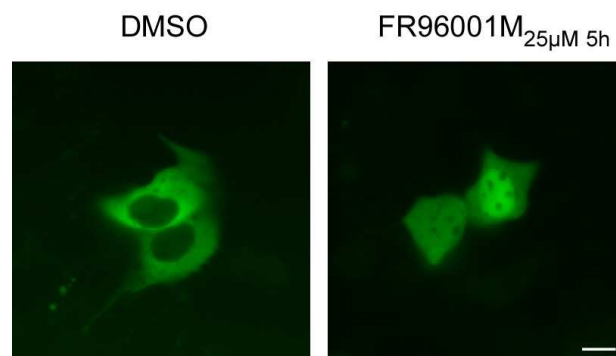


Abb. 98. FR96001M ist auch in murinen Zellen aktiv

NM18-Zellen wurden mit dem SurvivinNES-Biosensor transient transfiziert und am Folgetag mit 25µM FR96001M für 5h inkubiert. Es konnte eine deutliche Inhibition des Exports mikroskopisch detektiert werden. Maßstabsbalken 10µM.

3.8 Erstellen eines bidirektionalen Vektors zur simultanen Expression zweier Biosensoren

Ein erleichtertes Auffinden NES-spezifischer Exportinhibitoren wäre durch Zellen gewährleistet, die gleichzeitig zwei unterschiedlich Fluoreszenz-markierte NES-Biosensoren exprimieren. Um die simultane Nutzung zweier NES-Biosensoren zu ermöglichen, wurden zunächst unterschiedlich fluoreszierende Varianten der ursprünglich GFP-tragenden RevNES- und SurvivinNES-Biosensoren erstellt. Die Sequenz des GFPs wurde dabei gegen die von BFP oder mCherry über die KpnI-Schnittstelle ersetzt und das GST in einem zweiten Schritt wieder eingefügt. HeLa-Zellen wurden mit den so erhaltenen Biosensoren transfiziert und nach Inkubation mit DMSO oder 10nM LMB auf die Lokalisation des fluoreszierenden Biosensor-Proteins hin mikroskopisch analysiert (s. Abb.99).

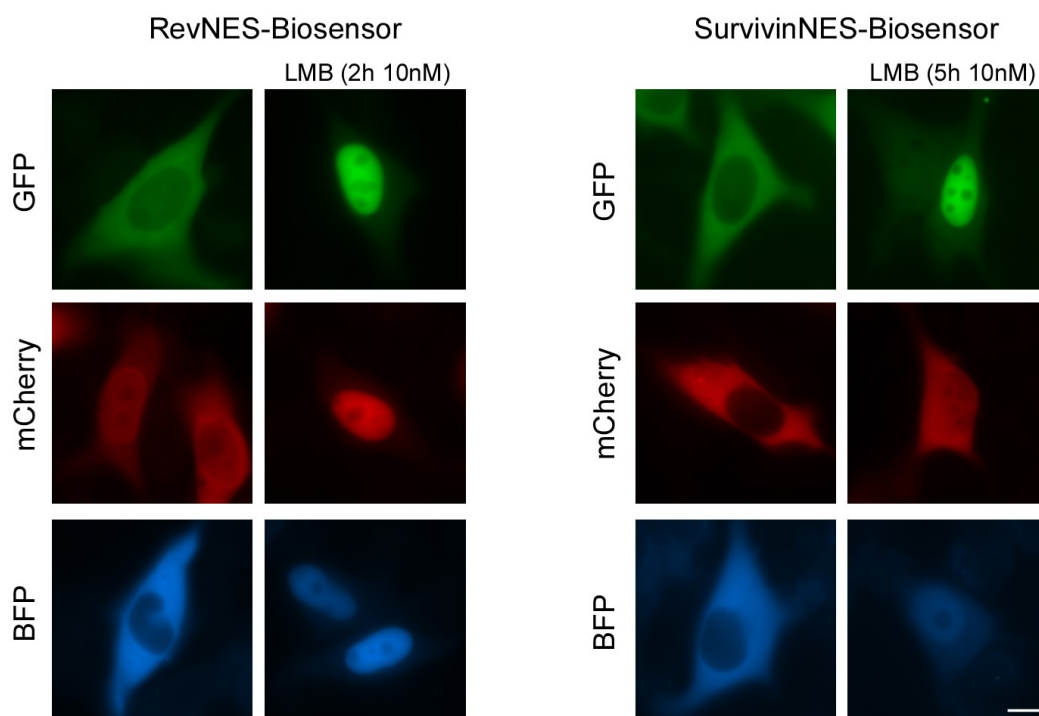


Abb. 99. Unterschiedlich fluoreszierende Biosensoren

HeLa-Zellen wurden mit den GFP/mCherry/BFP-Varianten des RevNES- bzw. des SurvivinNES-Biosensors transfiziert und am Folgetag mit DMSO oder 10nM LMB inkubiert. Details siehe Text. Maßstabsbalken, 10µm.

Bis auf die rot fluoreszierende mCherry-Variante des SurvivinNES-Biosensors akkumulierten alle Biosensoren nach Inkubation mit LMB im Zellkern. Für den RevNES-Biosensor in Kombination mit mCherry wurde im Grundzustand eine etwas stärkere Fluoreszenz im Zellkern als im Zytoplasma detektiert. Die Fluoreszenzintensität von BFP war deutlich geringer als die von GFP oder mCherry und war auch während der Fluoreszenzmikroskopie stärker von Bleichungseffekten betroffen. Für die Erstellung eines bidirektionalen Vektors wurden daher der GFP-SurvivinNES-Biosensor und der mCherry-RevNES-Biosensor ausgewählt.

3.8.1 Generierung des bidirektionalen Vektors durch molekulare Klonierung

Zur gleichzeitigen Expression zweier Biosensoren wurde der bidirektionale Vektor pBI verwendet. Die Expression unterliegt dabei der Kontrolle des Tetrazyklin-responsiven Elements (TRE) und erfolgt in Abhängigkeit des Tetrazyklin-Transaktivator-Proteins (tTA) im Tet-Off-System unter Entnahme von Doxizylin (Dox) oder in Abhängigkeit des reversen Tetrazyklin-Transaktivator-Proteins (rtTA) im Tet-On-System unter Gabe von Dox. Die zur Transfektion des pBI verwendeten HtTA- bzw. HRL9-Zellen exprimieren jeweils stabil tTA bzw. rtTA. Nach der Definition geeigneter Schnittstellen wurden die zu integrierenden Biosensoren mit spezifischen Primern amplifiziert und nacheinander in den Vektor einkloniert. Die Integrat-Stelle zwischen den MluI/AvrII Schnittstellen wurde als Position1 und die zwischen NotI/Sall als Position2 bezeichnet (s. Abb.100). Daraus abgeleitet wurde die Bezeichnung des pBI-Vektors mit dem mCherry-RevNES-Biosensor in Position1 und dem GFP-SurvivinNES-Biosensor in Position2 als pBI-R_{Ch}S_{GFP}.

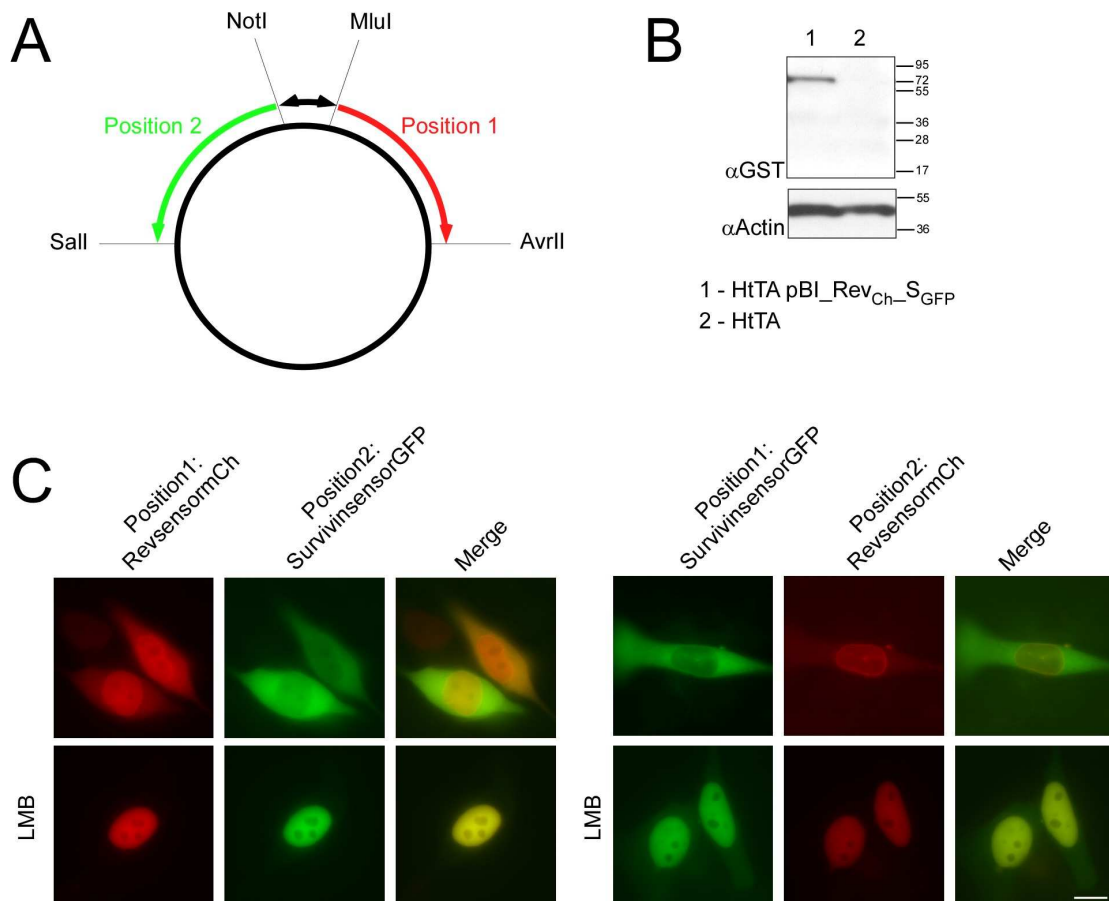


Abb. 100. Expression zweier Biosensoren mit dem Vektor pBI

Schema des pBI mit Schnittstellen und Benennung der Integrat-Positionen (A). HtTA-Zellen wurden mit dem pBI-R_{Ch}S_{GFP} transfiziert und ohne Doxizylin im Medium gehalten. Bei einer anschließend durchgeführten Western Blot-Analyse wurden beide Biosensoren durch den GST-spezifischen Antikörper detektiert (B). HRL9-Zellen wurden mit pBI-R_{Ch}S_{GFP} (links) oder pBI-S_{GFP}R_{Ch} (rechts) transfiziert und mit Dox kultiviert. Nach fünfstündiger Inkubation mit 10nM LMB konnte eine deutliche Akkumulation beider Biosensoren im Zellkern mikroskopisch detektiert werden (C). Maßstabsbalken, 10µm.

Nach transienter Transfektion von HtTA-Zellen mit pBI-R_{Ch}S_{GFP} und einer anschließenden Kultivierung ohne Dox wurde die Expression beider Sensoren per Western Blot-Analyse mit dem GST-spezifischen Antikörper überprüft. Das dabei detektierte Signal lag oberhalb der erwarteten 54kDa, was mit dem für dieses Molekulargewicht nicht optimalen Auftrennungsbereichs des verwendeten 16%igen SDS-Gels begründet werden kann. Um zu überprüfen, ob die Integrat-Positionen von pBI mit unterschiedlicher Effizienz exprimiert werden, wurde analog zu dem pBI-R_{Ch}S_{GFP} durch einen Austausch der Integrate der pBI-S_{GFP}R_{Ch} erstellt. HRL9-Zellen wurden mit pBI-R_{Ch}S_{GFP} oder pBI-S_{GFP}R_{Ch} transfiziert und mit Dox (2µg/ml) kultiviert. Die Lokalisation der fluoreszenten Proteine wurde vor sowie nach fünfstündiger Inkubation mit 10nM LMB mikroskopisch analysiert. Dabei konnten keine Unterschiede der Expressionsstärke in Abhängigkeit von den Integrat-Positionen des pBI festgestellt werden.

3.8.2 Stabile Expression zweier Biosensoren

Als nächstes sollte überprüft werden, ob sich bidirektional stabil exprimierende Zellen herstellen lassen. Hierzu wurden HtTA-Zellen (Tet-Off) mit pBI-R_{Ch}S_{GFP} und dem für das Puromycin-Resistenzgen kodierenden Plasmid pBABE-Puro kotransfiziert und in Medium ohne Doxizylin mit Puromycin kultiviert. Da sich bei der mikroskopischen Voranalyse zeigte, dass nicht alle Zellen beide Biosensoren gleichermaßen exprimieren, wurden diese eine Woche nach der Transfektion von M. Brkic (Flow Cytometry Core Facility, III. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz) mit dem FACS-Aria sortiert (s. Abb.101). Dabei konnten GFP-positive (Q4) als auch mCherry+GFP-positive Zellen (Q2) identifiziert werden. In Q1 wären ausschließlich mCherry-positive Zellen zu erwarten gewesen, welche dort aber nicht detektiert wurden. Die mCherry+GFP-positive Population wurde kultiviert und nach zwei Wochen erneut sortiert. Hiervon wurden sowohl die mCherry+GFP-positive (Q2) Population als auch die GFP-positive Population (Q4) kultiviert, um diese auf ihre Unterschiede hin mikroskopisch zu analysieren. Dabei wurde für die GFP-positive Population eine wie schon in Abb.100C detektierte Lokalisation des GFP-SurvivinNES- als auch des mCherry-RevNES-Biosensors gefunden. In den Zellen der GFP+mCherry-positiven Population wurde der mCherry-RevNES-Biosensor hingegen akkumuliert im Zellkern und der GFP-SurvivinNES-Biosensor in Zellkern und Zytoplasma gleichermaßen detektiert. Möglicherweise ist diese vom erwarteten Grundzustand abweichende Lokalisation mit der starken Expression beider Biosensoren zu begründen, wodurch es zu einer Übersättigung von Crm1 und somit auch des Biosensor-Exports gekommen sein könnte.

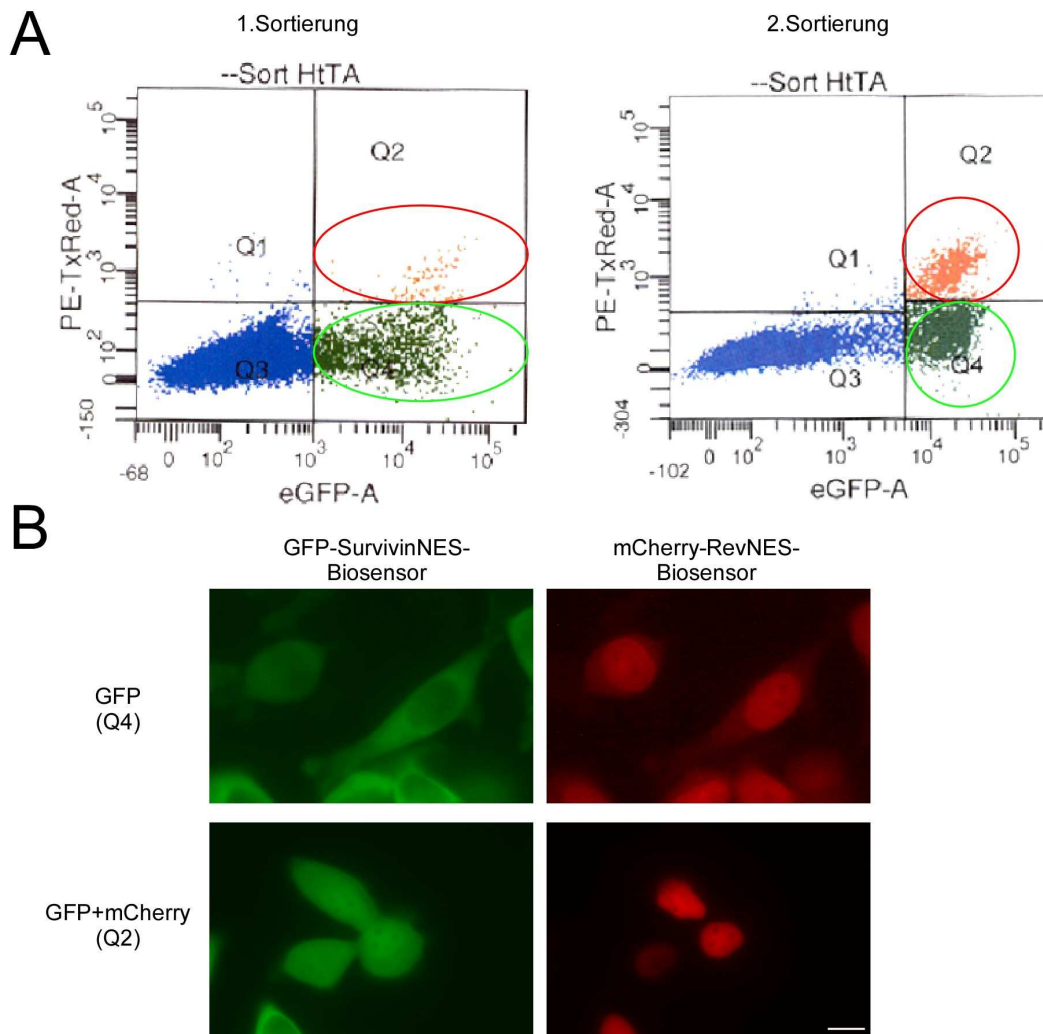


Abb. 101. Sortierung der mit pBI-R_{Ch}S_{GFP} transfizierten HtTA-Zellen

HtTA-Zellen wurden mit pBI-R_{Ch}S_{GFP} transfiziert und nach einer Woche die mCherry+GFP-Population (rot, Q2) per FACS sortiert. Nach Kultivierung der Zellen wurden diese nach zwei Wochen erneut in die mCherry+GFP- und die GFP-Population (grün, Q4) sortiert (A). Bei der mikroskopischen Analyse zeigten die Zellen der GFP-positiven Population für den GFP-SurvivinNES- als auch den mCherry-RevNES-Biosensor die in Abb.100C bereits beschriebene Lokalisation. In den Zellen der GFP+mCherry-positiven Population wurde der mCherry-RevNES-Biosensor akkumuliert im Zellkern detektiert. Der GFP-SurvivinNES-Biosensor wurde im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert (B). Maßstabsbalken, 10µm.

Die Q4-Population der 2.Sortierung wurde als HtTA_R_{Ch}S_{GFP} benannt und für die Verwendung in der Hochdurchsatzanalyse getestet. Hierfür wurden die HtTA_R_{Ch}S_{GFP} in 96well-Platten ausgesät und teils für 5h mit 10nM LMB inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit Hoechst markiert. Nach Aufnahme mit dem ArrayScanVTI[®] und Auswertung mit der ‚Molecular Translocation BioApplication V4‘ konnte ein deutlicher Unterschied in der Lokalisation beider Biosensoren im Vergleich von unbehandelten zu Export-inhibierten Zellen detektiert werden (s. Abb.102). Für den mCherry-RevNES-Biosensor fiel dieser jedoch deutlich geringer aus, da bereits im unbehandelten Zustand im Zellkern ein mCherry-Signal zu detektiert ist.

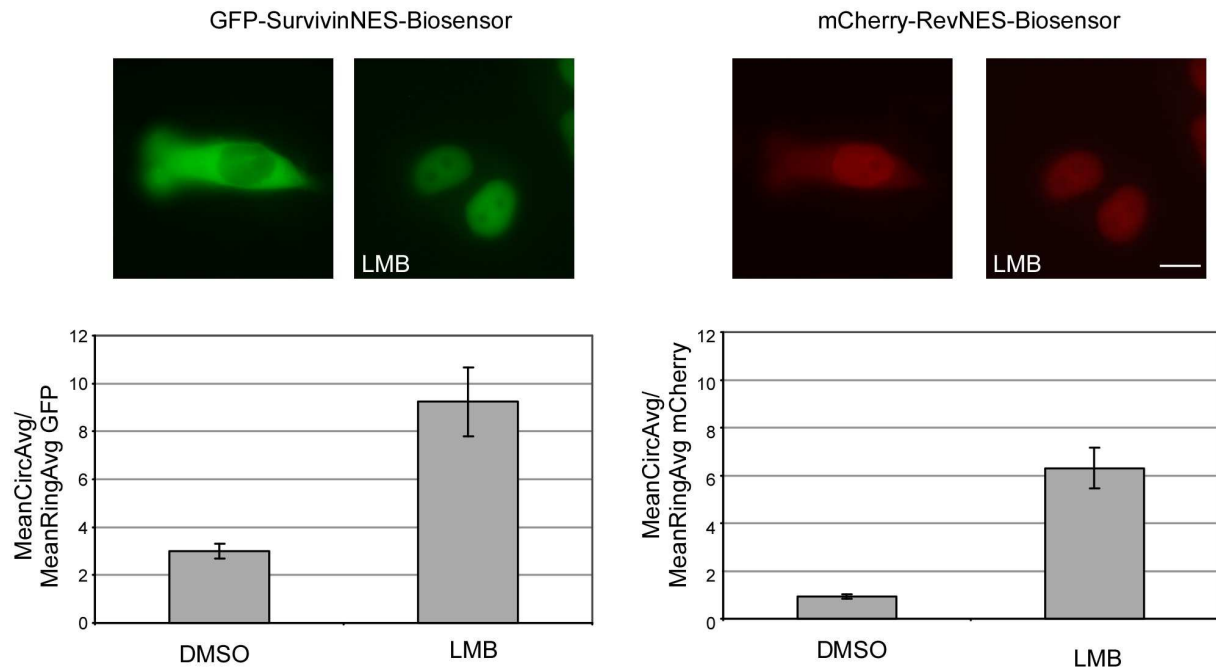


Abb. 102. Test der HtTA_RChS_{GFP}-Zellen zur Verwendung in der Hochdurchsatzanalyse
HtTA_RChS_{GFP}-Zellen wurden in 96well-Platten ausgesät und teils mit LMB (10nM, 5h) inkubiert. Die Zellen wurden mit dem ArrayScanVTI® und der ‚Molecular Translocation BioApplication V4‘ analysiert. Links sind die Werte der Division aus MeanCircAvg/MeanCircRingAvg des GFP-SurvivinNES-Biosensors dargestellt und rechts entsprechend die des mCherry-RevNES-Biosensors. Gezeigt sind Mittelwerte einer Dreifachmessung. Mit dem Axiovert200M erstellte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind zum Vergleich darüber gezeigt. Maßstabsbalken, 10µm.

3.8.3 Verwendung von H2B-BFP als Zellkern-Marker

Da die Kernfärbung mit Hoechst ein zeitaufwendiger Schritt im Verlauf der Hochdurchsatzanalyse ist, sollte die transiente Expression von H2B-BFP als Alternative zur Markierung des Zellkerns getestet werden. Die Sequenz des H2B-BFP wurde in beide Integrat-Stellen des pBI in Kombination mit dem GFP-SurvivinNES-Biosensor integriert. Die dabei erstellten Konstrukte pBI-H2B_{BFP}S_{GFP} und pBI-S_{GFP}H2B_{BFP} wurden in HRL9-Zellen transfiziert und die Lokalisation der fluoreszenten Proteine in unbehandeltem als auch in LMB (10nM, 5h) -behandeltem Zustand untersucht (s. Abb.103). Anhand der Fluoreszenz von H2B-BFP konnte mit beiden pBI-Varianten eine klare Definition des Zellkerns erzielt werden.

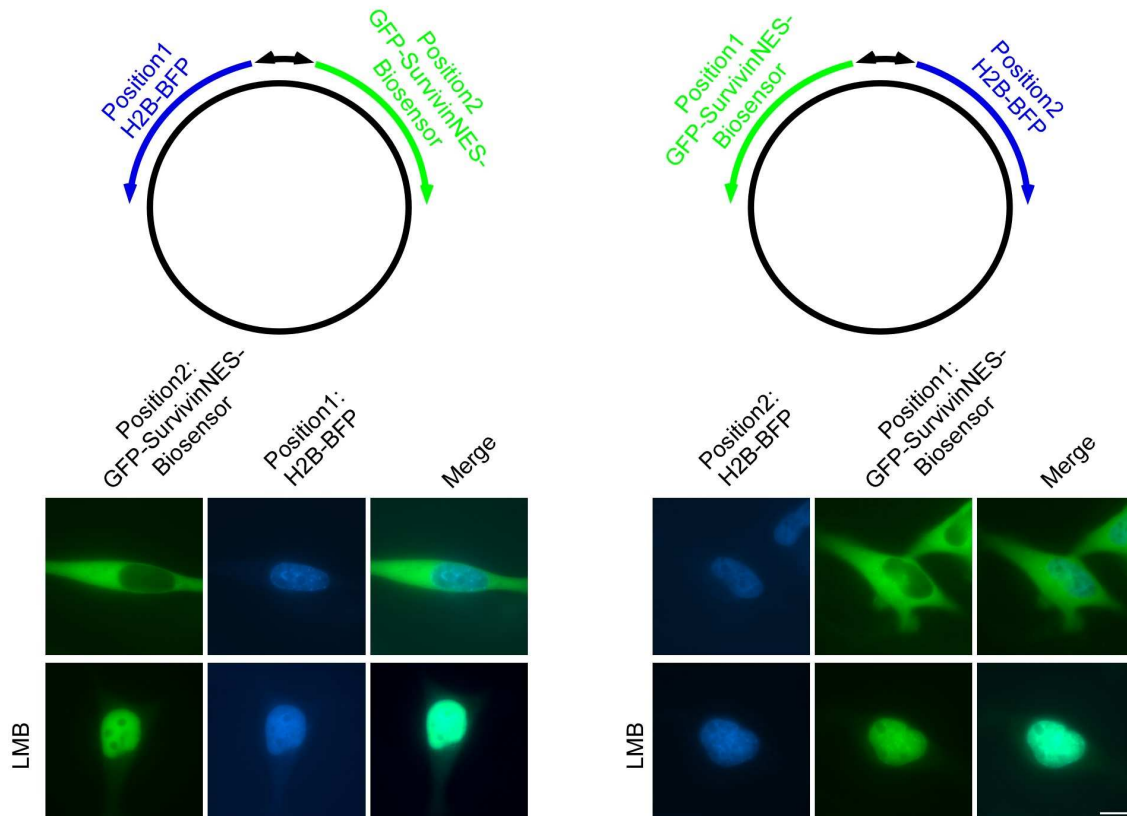


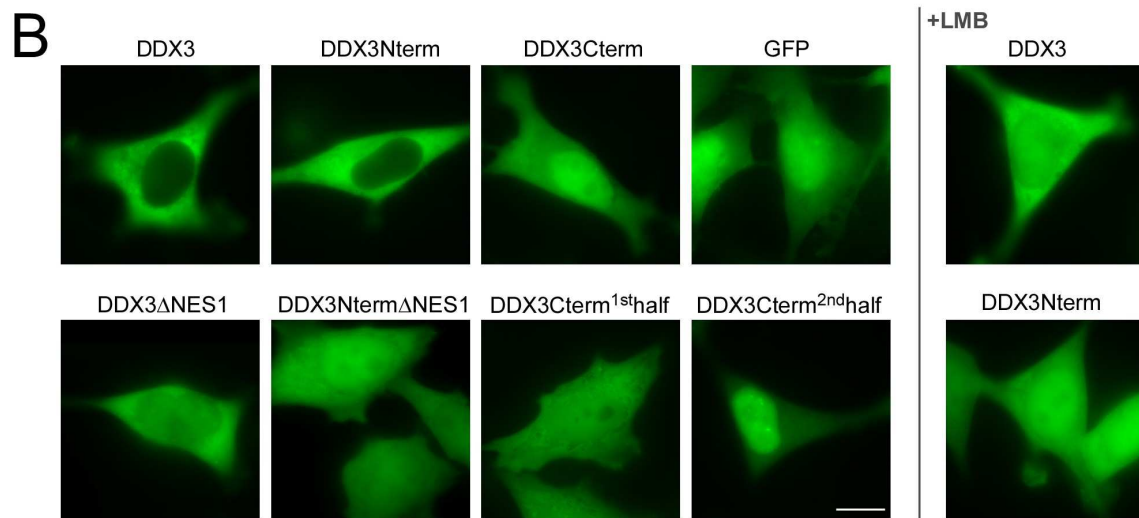
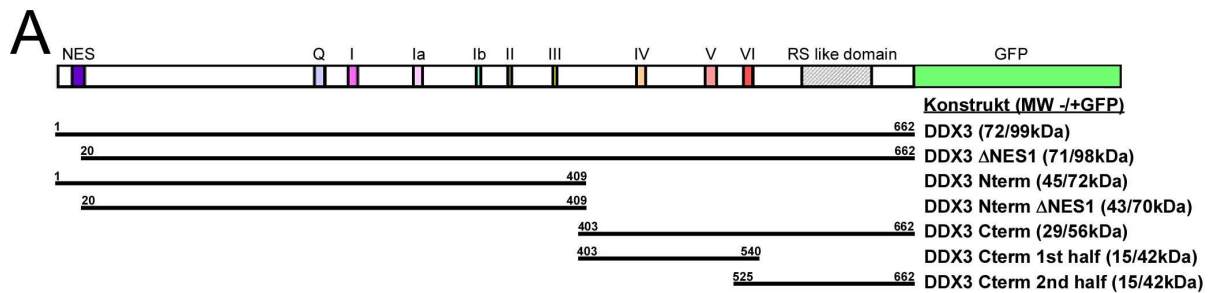
Abb. 103. Die bidirektionale Expression des GFP-RevNES-Biosensors und H2B-BFP ist positionsunabhängig

HRL9-Zellen wurden mit pBI-H2B_{BFP}S_{GFP} (links) oder pBI-S_{GFP}H2B_{BFP} (rechts) transfiziert. Die Lokalisation der fluoreszenten Proteine wurde sowohl in unbehandelten als auch mit LMB (10nM, 5h) behandelten Zellen mikroskopisch analysiert. H2B-BFP lokalisierte dabei ausschließlich im Zellkern. Maßstabsbalken, 10µm.

3.9 Untersuchungen der Lokalisation und Interaktion von DDX3

Im Verlauf des HIV-1-Lebenszyklus müssen unfertige virale mRNAs aus dem Zellkern transportiert werden (s. Kapitel 1.8). Das virale Protein HIV-1 Rev vermittelt den Export dieser RNA-Spezies über die Bindung an Crm1, unter der Beteiligung der Helikase DDX3 als essentieller zellulärer Kofaktor. DDX3 spielt daher eine wichtige Rolle bei der HIV-1-Infektion. Um die intrazelluläre Lokalisation von DDX3 zu untersuchen, wurden neben dem Volllängekonstrukt DDX3-GFP unterschiedliche Deletionsmutanten als GFP-Fusionen erstellt (s. Abb.104). Bei der Deletionsmutante DDX3 Δ NES1 handelt es sich um das Volllängekonstrukt ohne die Aminosäuren 1-20, die für das vorhergesagte NES kodieren. Nach Transfektion der Konstrukte in HeLa-Zellen wurde die Lokalisation der exprimierten Fusions-Proteine fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei konnten DDX3 und DDX3Nterm ausschließlich im Zytoplasma der Zellen detektiert werden. Eine annähernd gleichmäßige Verteilung in Zellkern und Zytoplasma wurde für DDX3 Δ NES1, DDX3Nterm Δ NES1 und DDX3Cterm^{1st}half gefunden, wobei für ersteres der Kern ein schwächeres Signal und für letztere ein etwas stärkeres Signal im Vergleich zum Zytoplasma

aufwies. Die C-terminalen Varianten Cterm und Cterm^{2nd} half waren ebenfalls in Zellkern und Zytoplasma zu finden, jeweils mit einer deutlich stärkeren Anreicherung im Zellkern. Lediglich die Lokalisation von DDX3 und DDX3Nterm war eindeutig sensitiv gegenüber einer Behandlung mit LMB (20nM, 5h).



C

Konstrukt	As	Lokalisation		LMB sensitiv
		Zytoplasma	Kern	
DDX3	1-662	++++	-	+
DDX3 Δ NES	20-662	+++	+	-
DDX3Nterm	1-409	++++	-	+
DDX3Nterm Δ NES	20-409	++	++	-
DDX3Cterm	403-662	+	+++	~
DDX3Cterm1sthalf	403-540	+++	+	~
DDX3Cterm2ndhalf	525-662	+	+++	-

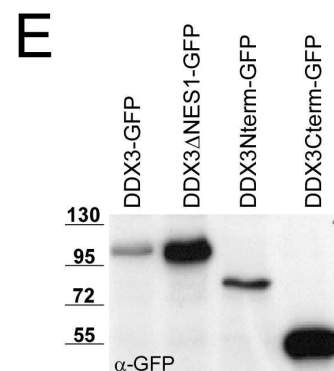
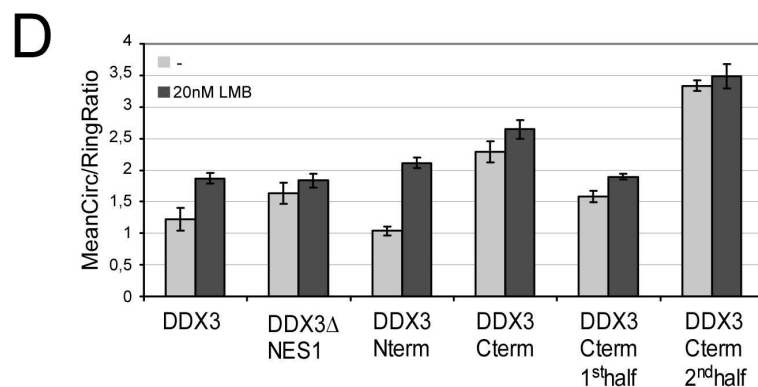


Abb. 104. Lokalisation von DDX3 und den DDX3-Deletionsmutanten

Schematische Darstellung des DDX3-Proteins und der verwendeten verkürzten Varianten als C-terminale GFP-Fusionen. Rechts ist jeweils das rechnerische Molekulargewicht des Proteins ohne und mit GFP aufgelistet (MW $\pm$ GFP, A). Lokalisation der DDX3-GFP Fusionsproteine in HeLa-Zellen. Nach fünfstündiger Inkubation mit 20nM LMB konnten DDX3 und DDX3Nterm auch im Zellkern detektiert werden (B). Übersicht der DDX3-Konstrukte und der jeweiligen Lokalisation nach Expression in HeLa-Zellen (C). Transient mit den DDX3-GFP-Konstrukten transfizierte HeLa-Zellen wurden mit Hilfe des ArrayScanVTI[®] und der *„Molecular Translocation BioApplication V4“* hinsichtlich der Verteilung des GFP-Signals in Zellkern und Zytoplasma analysiert. Nach fünfstündiger Inkubation mit LMB (20nM) konnte für DDX3 und DDX3Nterm eine eindeutige Anreicherung im Zellkern nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachmessung mit jeweils mindestens 500 Zellen (D). Exemplarisch wurden 293T-Zellen mit den DDX3-Konstrukten transfiziert, und die Expression mit dem GFP-spezifischen Antikörper überprüft (E). Maßstabsbalken, 10µm.

Um eine quantifizierbare und statistische Aussage über die Lokalisationsveränderung nach LMB-Behandlung treffen zu können, wurden die DDX3-GFP-Fusionsproteine transient exprimierende HeLa-Zellen in 96well-Platten gesät, mit 20nM LMB für fünf Stunden inkubiert und anschließend fixiert. Bei der Lokalisationsanalyse mit dem ArrayScanVTI[®] und der *„Molecular Translocation BioApplication V4“* zeigte sich die MeanCirc/RingRatio für DDX3 und DDX3Nterm nach Inkubation mit LMB, wie schon bei der visuellen Analyse, eindeutig erhöht (s. Abb.104D). Zur Überprüfung, ob die generierten Konstrukte auch in voller Länge exprimiert werden und auch stabil sind, wurde deren Expression exemplarisch mittels Western Blot unter Verwendung des GFP-spezifischen Antikörpers überprüft (s. Abb.104E). Die so für DDX3-GFP, DDX3ΔNES1-GFP und DDX3Nterm-GFP bestimmten Molekulargewichte waren im Vergleich zum theoretisch errechneten Wert leicht erhöht. Für DDX3Cterm-GFP konnte das erwartete Molekulargewicht von 56kDa bestätigt werden. Zur besseren Visualisierung der in den Mutanten vorliegenden Sequenzmotive von DDX3 ist in Abb.105 die gesamte Aminosäuresequenz dargestellt. Die Start- und Endpunkte der in den Mutanten vorliegenden Sequenzpositionen sind ebenfalls eingetragen.

1	9 10	20 21	MSHVAVENALGLDQQFAGLDLNSSDNQSGGSTASKGRYIPPHLRNRE	NES
			ATKGFYDKDSSGWSSSKDKDAYSSFGSRSDSRGKSSFFSDRGSGSR	
			GRFDDRGRSDYDGIGSRGDRSGFGKFERGGNSRWCDKSEDDWSK	
			PLPPSERLEQELFSGGNTGINFEKYDDIPVEATGNNCPPHIESFSDVEM	
			GEIIMGNIELTRYTRPTPVQKHAIPPIKEKRDLMACAQTGSGKTAFLPI	Q Motiv Motiv I
	259 260		LSQIYSDGPGEALRAMKENGGRYGRRKQYPISLVLAAPTRELAVQIYEEAR	Motiv Ia
		330 331	KFSYRSRVRPCVVYGGADIGQQIRDLERGCHLLVATPGRLVDMMERG	Motiv Ib
			KIGLDFCKYLVLEADRMMLDMGFEPQIRRIVEQDTMPPKGV RHTMMFS	Motiv II Motiv III
	402 403	409 410	ATFPKEIQMLARDFLDEYIFLAVGRVGSTSENITQKVVWVEESDKRSFL	
			LDLLNATGKDSLTLVVFVETKKGADSLEDFLYHEGYACTSIHGDRSQRD	Motiv IV
		516 517	524 525	
			REEALHQFRSGKSPILVATAVAARGLDISNVKHVINFDLPDIEEYVHRI	Motiv V Motiv VI
	540 541		GRTGRVGNLGLATSFFNERNINITKDLLDLLVEAKQEVPSWLENMAYE	
			HHYKGSSRGRSKSSRFSGGFGARDYRQSSGASSSSSFSSSRASSRS	RS-ähnliche-Domäne
		662	GGGHGSSRGFGGGGYGGFYNSDGYGGNYNSQGVDWWGN	

Abb. 105. Aminosäuresequenz des DDX3-Proteins

Die DDX3-Aminosäuresequenz enthält die neun typischen Sequenzmotive der DEAD-Box RNA Helikase-Familie. Die Aminosäuren, welche als Anfangs- und Endpositionen der generierten Deletionsmutanten herangezogen wurden, sind jeweils oberhalb der Sequenz aufgeführt.

Um auch in Zellen endogenes DDX3 nachweisen zu können, wurde der DDX3-spezifische Antikörper zunächst auf seine Eignung zum Einsatz in der Immunfluoreszenz-Markierung auf HeLa-Zellen, die transient DDX3-GFP exprimierten, getestet (s. Abb.106A). In der Tat konnte überexprimiertes DDX3-GFP auch durch den verwendeten Antikörper als zytoplasmatisch lokalisiertes Protein nachgewiesen werden. Die Lokalisation des Antikörper-Signals war dabei identisch zu dem Fluoreszenzsignal des DDX3-GFP. Nicht-transfizierte Zellen zeigten bei gleicher Belichtungszeit kein Signal. Auch das verkürzte DDX3Cterm-GFP konnte so gleichmäßig im Zellkern und Zytoplasma mikroskopisch detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Endogenes DDX3 konnte mit dem DDX3-spezifischen Antikörper ebenfalls im Zytoplasma von HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Dabei war die Fluoreszenzintensität deutlich geringer als bei der Immunfluoreszenz-Markierung der DDX3-GFP exprimierenden Zellen, verbunden mit einer längeren Belichtungszeit (s. Abb.106B).

Zur Untersuchung der Aktivität des DDX3-NES1 im heterologen Kontext wurde die Sequenz (¹⁰LGLDQQFAGLDL²¹) zur rekombinanten Expression von GST-DDX3-NES1-GFP in den pGEX Vektor integriert. Das aufgereinigte Protein wurde in den Zellkern von Vero-Zellen injiziert, und der Export zeitlich dokumentiert (s. Abb.106C). Bereits nach 7min war das rekombinante Protein vollständig ins Zytoplasma transloziert.

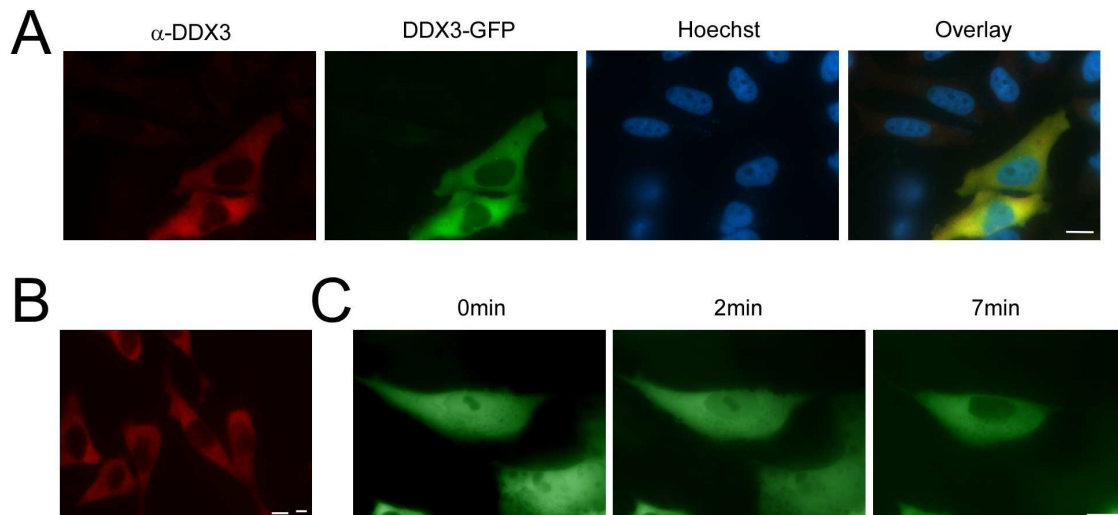


Abb. 106. Endogenes DDX3 lokalisiert im Zytoplasma der Zelle und das DDX3-NES vermittelt einen schnellen Export aus dem Zellkern

Immunfluoreszenz-Nachweis von DDX3-GFP in transient transfizierten HeLa-Zellen mit dem DDX3-spezifischen Antikörper in Kombination mit Hoechst (A) bzw. von endogenem DDX3 mit dem DDX3-spezifischen Antikörper in HeLa-Zellen (B). GST-DDX3NES-GFP wurde in den Zellkern von Vero-Zellen mikroinjiziert und dessen Lokalisation in der Zelle zu den angegebenen Zeiten mikroskopisch analysiert (C).

Da DDX3 einen essentiellen Kofaktor für den Export von HIV-1 Rev darstellt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die direkte Interaktion beider Proteine untersucht werden. Für die DDX3-Mutanten Nterm und Cterm wurde die Interaktion mit HIV-1 Rev durch Kotransfektion beider Proteine sowie biochemisch mittels Pulldown analysiert. Das HIV-1 Rev-Protein lokalisiert überwiegend an den Nukleoli der Zelle (siehe auch Kapitel 3.4.21.3). Im Fall einer Interaktion mit den zytoplasmatisch bis nukleär detektierbaren DDX3-Mutanten, sollten diese nun ebenfalls an den Nukleoli zu detektieren sein. 293T-Zellen wurden mit den Mutanten DDX3Nterm- und Cterm-GFP sowie HIV-1 RevM10-BFP kotransfiziert. RevM10 ist eine Mutante des Rev-Proteins, bei welcher eine Inaktivierung des Exportsignals zu einer ausschließlich nukleären Proteinlokalisierung führt (Stauber *et al.* 1998). Am Folgetag der Transfektion wurden jeweils mindestens 100 Zellen auf eine nukleoläre Lokalisation der DDX3Nterm/Cterm-GFP-Proteine hin fluoreszenzmikroskopisch untersucht (s. Abb.107A).

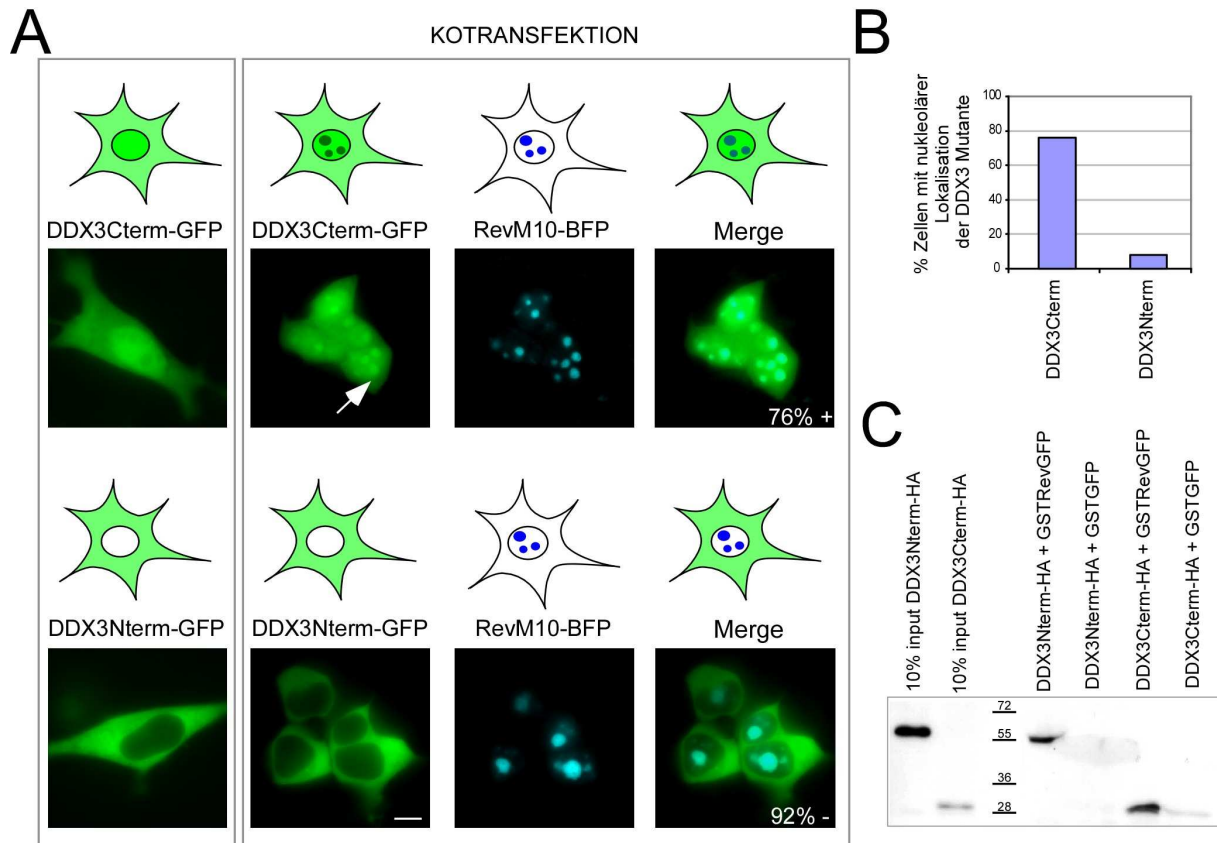


Abb. 107. Interaktion von DDX3-Mutanten mit HIV-1 Rev

293T-Zellen wurden mit DDX3Nterm-GFP oder DDX3Cterm-GFP und RevM10-BFP kotransfiziert. Bei der mikroskopischen Analyse konnte für 76% der Zellen ein nukleoläres Signal des DDX3Cterm-GFP-Proteins beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten 92% der DDX3Nterm-GFP exprimierenden Zellen kein nukleoläres Signal. Es wurden jeweils mindestens 100 Zellen ausgezählt. Maßstabsbalken, 10μm (A und B). Pulldown von *in vitro*-translatiertem DDX3Nterm-HA oder DDX3Cterm-HA mit rekombinant hergestelltem GST-HIV-1 Rev-GFP (B).

Dabei wurde in 76% der ausgezählten Zellen eine nukleoläre Lokalisation des DDX3Cterm-GFP-Signals detektiert. Eine derartige Lokalisation konnte in ausschließlich DDX3Cterm-GFP exprimierenden Zellen nicht beobachtet werden. Nach Kotransfektion von DDX3Nterm-GFP und HIV-1 RevM10-BFP zeigten 92% der untersuchten Zellen kein nukleoläres grün fluoreszierendes Signal bei der mikroskopischen Analyse. Somit scheint DDX3Cterm deutlich stärker mit HIV-1 RevM10 zu interagieren. In Pulldown-Experimenten konnte für *in vitro*-translatiertes DDX3Nterm-HA sowie DDX3Cterm-HA eine Interaktion mit rekombinant hergestelltem GST-HIV-1 Rev-GFP nachgewiesen werden (s. Abb.107B).

4 Diskussion

Zur Identifizierung neuer Exportinhibitoren wurde in der vorliegenden Arbeit das zelluläre Translokations-Biosensor-System verwendet. Die zelluläre Basis stellt bestimmte Bedingungen an die zu testenden Substanzen, da diese eine gewisse Löslichkeit, Membrangängigkeit und Stabilität besitzen müssen, um überhaupt in die Zelle aufgenommen zu werden. Eine identifizierte *Hit*-Substanz ist also per se in der komplexen zellulären Umgebung aktiv, ein deutlicher Vorteil im Vergleich zu Testsystemen, die auf *in vitro*-aufgereinigten Reaktionspartnern basieren. Zudem kann über die mikroskopische Auswertung direkt eine Aussage über die Zytotoxizität der getesteten Substanzen getroffen werden (Almholt *et al.* 2004).

4.1 Translokations-Biosensoren in der Hochdurchsatzanalyse

Zur Suche nach neuen, optimalerweise signalspezifischen Inhibitoren des Kernexports wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Hochdurchsatzanalysen durchgeführt. Die ChemBioNet-Substanzbibliothek wurde jeweils unter Verwendung von Zelllinien, die den RevNES- und den SurvivinNES-Biosensor stabil exprimieren, auf mögliche Exportinhibitoren hin durchsucht. Die Durchführung der Hochdurchsatzanalyse wurde durch Generierung der stabilen Zelllinien und verkürzte Fixierungsprozedur auf maximale Schnelligkeit und einfache Handhabung hin optimiert. Als problematisch erwiesen sich autofluoreszente oder zytotoxisch wirkende Substanzen, die bei der durchgeführten Analyse der MeanCirc-RingDiff oder MeanCir/RingRatio der GFP-Intensitäten in Zellkern und Zytoplasma ähnliche oder höhere Werte als die *Hit*-Substanzen aufwiesen. Derartig erhöhte Werte kamen bei zytotoxischen Substanzen durch das Abkugeln der Zellen zustande, wodurch ein Objekt mit hoher Fluoreszenzintensität im zentralen Bereich entsteht. Der zytoplasmatische Bereich geht dabei kaum noch über den Kern-Bereich hinaus. Aufgrund des minimalen Schwellenwertes für die zytoplasmatische GFP-Detektion ermittelte die Software somit bei der automatisierten Analyse die den Zellkern umgebende Fluoreszenzintensität des Hintergrunds als zytoplasmatische Fluoreszenz und verrechnete diese. Auch autofluoreszente Substanzen verhindern durch extreme Überstrahlung eine korrekte Erkennung der zellulären Objekte und die darauf basierende Analyse der Biosensor-Lokalisation. Daher musste nach der primären Hochdurchsatzanalyse eine visuelle Inspektion der *wells* mit jeweils hohen Werten in der MeanCirc-RingDiff oder MeanCir/RingRatio erfolgen, um zytotoxische und autofluoreszente Substanzen von der weiteren Analyse auszuschließen. Die Mittelwerte der Z'-Faktoren der Kontrollen beider Hochdurchsatzanalysen liegen mit 0,41 für den RevNES-Biosensor und 0,45 für den

SurvivinNES-Biosensor in einem optimalen Bereich, welcher für die Stabilität der durchgeführten Assays spricht. Schwankungen zwischen den Platten einer Hochdurchsatzanalyse sind vor allem durch die gewählte Option der automatischen Belichtungszeit bedingt. Dabei wird zunächst in zuvor festgelegten *wells* die Belichtungszeit bestimmt und für alle Aufnahmen der aktuellen Platte verwendet. Je nach Zellzahl und Zustand dieser *wells* kann dadurch die Belichtungszeit variieren, wodurch die Werte in der Auswertung deutlich differieren. Die Verwendung einer Belichtungszeit für alle Platten war nicht praktikabel, da die Platten unterschiedlich lange bis zur Aufnahme lagerten, wodurch sich Unterschiede in der Fluoreszenzintensität des Hoechst- sowie des GFP-Signals ergeben konnten. Da in der Bildanalyse die Erkennung z.B. der Zellkerne ebenfalls von gesetzten Intensitätswerten abhängt, würde die Verwendung einer fixen Belichtungszeit eine manuelle Aufarbeitung der Daten jeder Platte nach sich ziehen.

4.1.1 Vergleich der verwendeten Biosensoren

Da der SurvivinNES-Biosensor im Vergleich zum RevNES-Biosensor langsamer nach LMB-Behandlung im Zellkern akkumuliert, wurde bei dessen Verwendung in der Hochdurchsatzanalyse die Inkubation mit den ChemBioNet-Substanzen von 5h auf 24h ausgeweitet. Die Folge war eine erhöhte Anzahl an *wells*, in denen aufgrund der Zytotoxizität bei der längeren Inkubationszeit keine Zellen mehr gefunden werden konnten. Die Unterschiede in der Geschwindigkeit der LMB-vermittelten Exportinhibition ergeben sich aus den Affinitäten der Lokalisationssignale. Das starke SV40-NLS in Kombination mit dem RevNES erwirkt eine schnellere Akkumulation bei LMB-Behandlung als das schwächere AP5-NLS in Kombination mit dem SurvivinNES (Heger *et al.* 2001; Knauer *et al.* 2005). Der Unterschied in den Ausgangswerten der MeanCirc-RingDiff im Falle des RevNES- und des SurvivinNES-Biosensors geht auf die Verteilung des Fluoreszenzsignals im Grundzustand zurück. Bei dem SurvivinNES-Biosensor ist der Zellkern vollkommen frei von GFP-Fluoreszenz, wohingegen bei dem RevNES-Biosensor stets ein schwaches GFP-Signal im Kern detektierbar ist. Die Differenz der GFP-Intensitäten von Zellkern und Zytoplasma ergibt somit einen negativen Wert für den SurvivinNES-Biosensor und einen gering positiven Wert für den RevNES-Biosensor. Ein Vergleich der MeanCirc-RingDiff-Werte aller Zellen eines *wells* lässt diese Unterschiede bereits im Grundzustand gut erkennen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Biosensoren stellt das deutliche GFP-Signal des RevNES-Biosensors an der Kernmembran dar. In der Tat lässt sich in der Immunfluoreszenz-Färbung eine starke Kolo-kalisation des Biosensors sowohl mit dem NPC als auch dem Exportrezeptor Crm1 nachweisen. Dabei konnte Crm1, nicht jedoch der RevNES-Biosensor, zudem an den Nukleoli detektiert werden. Die Lokalisation in den Kern-Domänen *Cajal body* als auch den Crm1 *nucleolar bodies* (CNoBs) ist für Crm1 bereits

beschrieben (Boulon *et al.* 2004; Ernoult-Lange *et al.* 2009). Dabei sind die CNoBs meist mit Nukleoli assoziiert, was die unter anderem nukleoläre Lokalisation von Crm1-mCherry bestätigt.

Im Gegensatz zum RevNES-Biosensor lokalisiert der SurvivinNES-Biosensor nicht an der Kernmembran, was auf eine vergleichsweise schwächere Affinität zu Crm1 zurückzuführen sein könnte. Das SurvivinNES ist nicht wie das RevNES in die schnelle Gruppe der NES einzuordnen (Heger *et al.* 2001). Es ist anzunehmen, dass die verschiedenen NES-Gruppen unterschiedliche Affinitäten für die Bindung an Crm1 besitzen. Die virale Herkunft des RevNES könnte eine weitere Erklärung für dessen stärkere Affinität im Vergleich zu dem zellulären SurvivinNES sein. Das RevNES muss einen bevorzugten Export der viralen RNA und Proteine gewährleisten und hat sich möglicherweise evolutiv zu einer stärkeren Affinität hin entwickelt. Zelluläre NES verfügen generell über eine schwache Affinität zu Crm1, um eine effektive Freisetzung vom Transport-Komplex im Zytoplasma zu gewährleisten (Kutay *et al.* 2005). Zur Messung der *in vitro*-Bindungsaffinitäten der beiden NES an Crm1 könnte das Biacore-System verwendet werden. Dabei könnte über das Phänomen der Oberflächen-Plasmonresonanz die Bindungskonstante der Assoziation des Rev- und SurvivinNES mit Crm1 ermittelt werden.

4.1.2 Vergleich der beiden Hochdurchsatzanalysen

Nach fünfstündiger Inkubation mit den ChemBioNet-Substanzen konnten unter Verwendung des RevNES-Biosensors acht neue Inhibitoren des Crm1-abhängigen Exports gefunden werden. Mit dem SurvivinNES-Biosensor wurde nach 24-stündiger Inkubation lediglich ein bereits aus der RevNES-Hochdurchsatzanalyse bekannter Exportinhibitor identifiziert. Aufgrund der längeren Inkubationszeit fielen bei der SurvivinNES-Hochdurchsatzanalyse sehr viele Substanzen aufgrund hoher Zytotoxizität aus der Analyse heraus, welche eventuell bei kürzerer Inkubationszeit eine Exportinhibition gezeigt hätten. Die Wahl der Inkubationszeit hat einen großen Einfluss auf die Anzahl möglicher Inhibitoren. Ein schnell wirkender, aber nur kurzzeitig wirksamer Inhibitor, wie z.B. C11, könnte bei einer 24-stündigen Inkubation niemals gefunden werden. Natürlich grenzt auch die Wahl des Biosensors die Zahl an identifizierbaren Substanzen ein. Der Inhibitor C11 beispielsweise könnte mit dem langsam translozierenden SurvivinNES-Biosensor nach 30-minütiger Inkubation nicht als Inhibitor entdeckt werden, wie es bei Verwendung des RevNES-Biosensors möglich wäre.

In der Hochdurchsatzanalyse war die mittlere Intensität der GFP-Fluoreszenz der A431_{RevNES}-Zellen im Vergleich zu den HeLa_{SurvNES}-Zellen höher. Das Fluoreszenzsignal der HeLa_{SurvNES}-Zellen war insgesamt sehr niedrig und eher an der unteren Detektionsschwelle des Hochdurchsatzmikroskops anzusiedeln. Bei solch schwachen Fluoreszenzintensitäten

treten Störfaktorsignale des Hintergrunds deutlich stärker hervor, was sich negativ auf die Qualität der Auswertung auswirkt. Die A431_{RevNES}-Zellen zeigten zwar eine stärkere Fluoreszenzintensität, nachteilig erwies sich jedoch das Wachstumsverhalten der Zellen in engen Verbänden, was die Identifikation einzelner Objekte bei der Auswertung deutlich erschwerte.

Ein weiterer Unterschied beider Hochdurchsatzanalysen war die jeweils verwendete Substanzbibliothek. Bei dem RevNES-Biosensor wurde eine schon seit mehreren Jahren in Benutzung befindliche Bibliothek verwendet. In vielen *wells* waren Präzipitate der in DMSO gelösten Substanzen zu erkennen. Für den SurvivinNES-Biosensor wurde eine neuere Version der ChemBioNet-Substanzbibliothek verwendet. Das Problem der Präzipitatbildung bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel ist bekannt und kann durch Verwendung von Ko-Solventen, wie z.B. Glycerol, oder die Verwendung eines nicht-hygroskopischen Lösungsmittels umgangen werden. Durch die hygroskopischen Eigenschaften des DMSO kommt es bei den darin gelösten Substanzen mit längerer Lagerung zur vermehrten Wassereinlagerung, was eine Verminderung der Konzentration und im schlimmsten Falle eine Degradation der Substanz zur Folge hat (Rasmussen *et al.* 1968; Waybright *et al.* 2009). Daher wird für in DMSO gelöste Substanzen eine Lagerung unter Stickstoff-Atmosphäre bei unter -70°C empfohlen, um der Verdünnung der Konzentration durch Wassereinlagerung, der Präzipitation der Substanzen und deren Degradation entgegenzuwirken (Dawson *et al.* 2007). Möglicherweise waren die Substanzen der ‚älteren‘ Bibliothek aufgrund von Wassereinlagerung und Präzipitatbildung weniger potent und in ihrer Konzentration vermindert. Dies könnte die deutlich stärkere Zytotoxizität im Verlauf der Hochdurchsatzanalyse mit dem SurvivinNES-Biosensor und der ‚neueren‘ ChemBioNet-Bibliothek erklären. So ist anzunehmen, dass bei einer fünfstündigen Inkubation der neuen ChemBioNet-Bibliothek auf den HeLa_{SurvNES}-Zellen die bereits bekannten Inhibitoren wiedergefunden worden wären.

4.2 Charakterisierung der neuen Exportinhibitoren

Die ChemBioNet-Substanzbibliothek enthält chemische Substanzen mit repräsentativen Strukturen, um ein möglichst breites Spektrum des ‚chemischen Raumes‘ bioaktiver Substanzen im Rahmen einer Hochdurchsatzanalyse abzudecken (Lisurek *et al.* 2010). Folglich sind die gefundenen *Hit*-Substanzen eher als Ausgangspunkte anzusehen, die hinsichtlich ihrer Aktivität optimiert werden können.

Ein ähnliches Problem wie mit den beiden verwendeten Substanzbibliotheken stellten die Inhibitions-Unterschiede zwischen der Hochdurchsatzanalyse und Tests mit den nachbestellten Substanzen dar. Die in 4.1.2 erwähnten Präzipitationen der Substanzen der

ChemBioNet-Substanzbibliothek und die längere Lagerung in DMSO und die damit verbundenen Wassereinlagerungen könnten hierfür ursächlich sein. Letztere könnten auch die Ursache für leichte Abweichungen zwischen den einzelnen Experimenten sein, da die Substanzen stets bei -20°C in DMSO gelagert und für die Versuche jeweils aufgetaut wurden. Im Verlauf der Arbeit wurde sich auf zwei der acht initialen Exportinhibitoren, C3 und C5, konzentriert, die daraufhin in größerem Maßstab als Neusynthese bestellt wurden. Daher wurden einige Experimente nur mit diesen beiden Substanzen durchgeführt. C5 weist als einzige Substanz der neuen Exportinhibitoren Chiralitätszentren auf (s. Abb.108). Nach den Informationen der ChemBioNet-Substanzsammlung sollte das gezeigte Enantiomer vorliegen. Sollte jedoch ein racemisches Stoffgemisch vorliegen, so müsste das aktive Enantiomer noch bestimmt werden. Enantiomere unterscheiden sich generell in ihrer optischen Aktivität, welche mit Hilfe eines Polarimeters bestimmt werden kann. Sind keine Referenzwerte für die Enantiomere vorhanden, so müsste die Konformation mit Hilfe der Röntgen-Strukturanalyse untersucht werden.

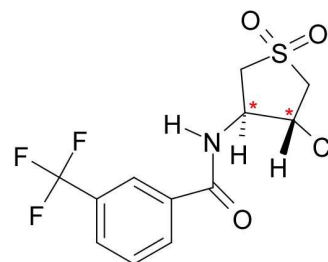


Abb.108: Chiralitätszentren in C5

Die beiden Chiralitätszentren sind in der Struktur mit * markiert.

4.2.1 Vergleich der Substanzen hinsichtlich der vermittelten Inhibition

Hinsichtlich der jeweils vermittelten Exportinhibition gibt es deutliche Unterschiede zwischen den neu identifizierten Inhibitoren. Der Vergleich von zwei- und sechsstündiger Behandlungsdauer von HeLa_{RevNES}-Zellen mit einer Inhibitor-Konzentration von $25\mu\text{M}$ zeigte ein unterschiedliches Ausmaß der Inhibition. Dabei führte die Inkubation mit C3, C5, C10 und C11 zu einer deutlichen Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern, wohingegen die durch C6, C8 und C9 vermittelte Inhibition etwas schwächer war. Die Behandlung mit C4 bewirkte lediglich eine gleichmäßige Verteilung des vormals zytoplasmatischen RevNES-Biosensors in der gesamten Zelle, was auf eine vergleichsweise schwach ausgeprägte Export-inhibitorische Aktivität hindeutet. Ob die unvollständige Inhibition möglicherweise auch auf mangelnde Zellgängigkeit oder tatsächlich auf eine geringe Affinität des Inhibitors zu seiner Zielstruktur zurückzuführen ist, bleibt offen. Durch eine Mikroinjektion der Inhibitoren in das Zytoplasma von Biosensor-Zellen könnte deren Export-inhibitorische Aktivität unabhängig von der jeweiligen Zellgängigkeit untersucht werden. Sollte C4 eine geringere Export-inhibitorische Aktivität aufgrund einer geringeren Affinität besitzen, so sollte durch eine Erhöhung der Konzentration eine stärkere Inhibition erreicht werden können. Deutliche Unterschiede zeigten sich auch in der Geschwindigkeit der vermittelten Exportinhibition. Der durch C11 vermittelte Effekt war am schnellsten, da hier bereits nach

30min eine deutliche Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern detektierbar war. Einen ähnlich schnellen Effekt vermittelten C3 und C10, für die auch bereits nach 30min eine Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern detektierbar war, wobei diese aber nach einer Stunde noch ausgesprägter erschien. Langsamere Exportinhibitoren wie C4, C5, C6, C8 und C9 benötigten über 2h, um ihr volles inhibitorisches Potential zu entwickeln. Möglicherweise gehen auch diese Unterschiede auf eine unterschiedliche Zellgängigkeit zurück, was wiederum in Mikroinjektions-Experimenten weiter untersucht werden könnte. Der Einfluss der Inhibitoren auf die Bindung von Crm1 mit den NES-Signalen könnte auch in zellfreien Test-Systemen wie dem Biacore-System unabhängig von einer Zellgängigkeit weiterführend charakterisiert werden. Es ist weiterhin denkbar, dass ein Inhibitor erst durch eine Metabolisierung aktiviert wird. In diesem Falle könnte man hypothetische Metabolisierungs-Produkte synthetisieren und auf ihre Export-inhibitorische Aktivität hin testen.

Die Stärke der Inhibition, die durch die Substanzen C3, C5, C8, C9, C10 und C24 vermittelt wurde, war deutlich konzentrationsabhängig. Die Exportinhibitoren unterscheiden sich weiterhin durch die Reversibilität respektive Irreversibilität der Inhibition, wie mittels Lokalisationsstudien mit einer Inkubationszeit von 24h auf HeLa_{SurvNES}-Zellen evident wurde. Hier war der inhibitorische Effekt der Substanzen C3, C8, C10 und C11 nach dieser Zeitspanne nicht mehr nachweisbar, wohingegen der SurvivinNES-Biosensor im Falle von C5 und C9 auch nach dieser langen Inkubationszeit noch deutlich im Zellkern akkumuliert vorlag. Die reversible Art der Inhibition könnte entweder auf eine geringe Stabilität im wässrigen Medium oder auf einen schnellen Abbau der Substanzen über den zellulären Stoffwechsel zurückzuführen sein. Die Stabilität kann durch eine Prä-Inkubation des Inhibitors in wässrigem Medium vor der Untersuchung des Export-inhibitorischen Effekts untersucht werden (siehe 4.2.5). Stoffwechsel-Produkte könnten mit Hilfe einer radioaktiven Markierung des Inhibitors und der Massenspektrometrie bestimmt werden.

Da die Exportinhibitoren sowohl den Export des RevNES- als auch des SurvivinNES-Biosensors sowie des E1B-Proteins inhibieren, handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um eine gänzlich Protein-spezifische Inhibition des Crm1-abhängigen Exports. Denkbar ist eine reversible Bindung in der NES-Bindetasche von Crm1 oder eine unspezifische Bindung an die NES der zu transportierenden Proteine. Da der RevNES-Biosensor im Vergleich zum SurvivinNES-Biosensor nach LMB- und Inhibitor-Behandlung jeweils schneller im Zellkern akkumuliert, ist der Zusammenhang zwischen der kinetischen Klasse des NES (Heger *et al.* 2001) und der Aktivität des Inhibitors gegeben. Aufgrund der unterschiedlichen Klassifizierung der NES wurde bislang das Vorhandensein NES-spezifischer Transport-Kofaktoren diskutiert. Nach den bisherigen Ergebnissen kann es durch die neuen Inhibitoren

nicht zu einer Hemmung von, soweit vorhanden, spezifischen Transport-Kofaktoren kommen. Denkbar wäre lediglich die Inhibition eines allgemeinen zellulären Kofaktors.

4.2.2 Zytotoxizität und Apoptose

In Hinblick auf eine mögliche therapeutische Entwicklung wurde die zytotoxische Wirkung der neuen Inhibitoren untersucht. Als Maß für die zellschädigende Wirkung wurde mit Hilfe des CellTiterGLO®-Assays der IC₅₀-Wert der Exportinhibitoren bestimmt. Dieser gibt die Konzentration wieder, bei der nach 72-stündiger Behandlung die Viabilität auf 50% reduziert war. Die IC₅₀-Werte aller Substanzen lagen bei dieser Messung im niedrigen mikromolaren Bereich. Es gab dabei keinen evidenten Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und der Effektivität der Exportinhibition, wie am Beispiel der Substanz C4 ersichtlich ist. Als Schwächster der identifizierten Inhibitoren hat C4 einen niedrigeren IC₅₀ als C3, zeigte aber bei Verwendung in einer Konzentration von 25µM eine deutlich abgeschwächte Inhibition. Beim Vergleich von LMB, dessen IC₅₀ sich im niedrigen nanomolaren Bereich bewegt, mit C3 und C5, jeweils mit einem IC₅₀ im unteren mikromolaren Bereich, stimmt der IC₅₀ hingegen mit der Konzentration, die den Kernexport effektiv zu inhibieren vermag, gut überein. Aufgrund der starken Wirkung von LMB auf den Export ist diese als Grund für dessen hohe Zytotoxizität anzunehmen. Für C4 legt das beobachtete Verhalten die Vermutung nahe, dass dessen zytotoxische Wirkung in einem anderen Stoffwechselweg als dem der reinen Inhibition des Kernexports begründet ist. Nach fünfstündiger Behandlung von HeLa-Zellen mit den Inhibitoren in einer Konzentration von 25µM konnten keine eindeutig negativen Effekte auf deren Viabilität gefunden werden. Die dabei detektierbare Exportinhibition ist somit sicher nicht durch zytotoxische Effekte der Substanzen bedingt. Nach entsprechender 24-stündiger Behandlung mit C8 war die Viabilität hingegen auf 50% reduziert. Dies entspricht der Erwartung nach dem deutlich niedrigeren IC₅₀ von C8 im Vergleich zu den anderen Exportinhibitoren. Für C3, C9 und C10 wurde mit dem CellTiterGLO®-Assay nach 24-stündiger Behandlung von HeLa-Zellen jeweils eine verringerte Viabilität nachgewiesen, nicht jedoch mit dem AlamarBlue-Assay. Die beiden Messungen basieren auf unterschiedlichen Parametern. Mit dem CellTiterGLO®-Assay wird zelluläres ATP nachgewiesen, wohingegen der AlamarBlue-Assay das reduzierende Potential und somit die metabolische Aktivität der Zellen anzeigt. Im frühen Verlauf der Apoptose kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Hiernach kann ATP in diesen Zellen nur noch über die Glykolyse produziert werden, wobei die Apoptose selbst auch ATP-abhängig ist (Tsujimoto 1997). Möglicherweise wird der zelluläre ATP-Gehalt im frühen Stadium der Apoptose schneller reduziert als die metabolische Aktivität, so dass nach Inkubation mit C3, C9 und C10 lediglich mit dem CellTiterGLO®-Assay eine reduzierte Viabilität detektierbar war. Die Behandlung von HeLa-Zellen mit den in dieser

Arbeit hauptsächlich untersuchten Exportinhibitoren C3 und C5 ist nach diesen Messungen für bis zu 24h in einer Konzentration von 25µM ohne deutliche zytotoxische Effekte möglich. Die direkte Zytotoxizität wurde durch Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit C3 und C5 in einer Konzentration von 100µM über 72h ersichtlich, wobei deren Viabilität auf 20% bis unter 10% reduziert war. Bei gleicher Behandlung primärer Fibroblasten fielen die zytotoxischen Effekte mit einer verbliebenen Viabilität von ca. 40% bis zu 80% deutlich geringer aus. Möglicherweise liegt dies in der geringeren Teilungs- und Stoffwechselaktivität der primären Zellen begründet. Die Zytotoxizität bei sich schnell teilenden Zellen könnte dadurch begründet sein, dass durch Hemmung des Crm1-Exportrezeptors alle NES-abhängigen Transportprozesse, darunter auch der Export der ribosomalen Bestandteile 5s rRNA und der 60s und 40s rRNP (Hutten *et al.* 2007), zum Erliegen kommen. Da Crm1 weiterhin vermutlich an der Koordination mitotischer Prozesse beteiligt ist (Dasso 2005; Wang *et al.* 2005; Knauer *et al.* 2006), ergibt sich für hoch-proliferative Zellen unter dessen Inhibition ein weiterer Nachteil. Die Toxizität der Inhibitoren wurde weiterhin im Mausmodell untersucht. Generell ist bei Verwendung von Versuchstieren im Vorfeld zu klären, ob das in diesem Falle murine Zielprotein durch den Inhibitor, der über eine humane Zielstruktur identifiziert wurde, ebenfalls gehemmt wird. Für den Fall, dass die Inhibitoren gegen Crm1 gerichtet sind, wurden die Aminosäuren von murinem und humanem Protein verglichen. Murines Crm1 unterscheidet sich von humanem Crm1 lediglich in 1,7% der Aminosäuren, wobei das essentielle Cystein in der NES-Bindestelle konserviert vorliegt. Es konnte gezeigt werden, dass C3 und C5 den Export des in murinen Zellen exprimierten SurvivinNES-Biosensors ebenfalls zu inhibieren vermögen. Daher ist von einer Funktionsfähigkeit der Substanzen C3 und C5 nach Injektion in die Maus auszugehen, unabhängig von einer Aktivität gegen Crm1 oder einen hypothetischen Kofaktor. C3 und C5 wurden durch intraperitoneale Injektion einer 1mM Lösung in Nacktmäuse auf ihre organismische Verträglichkeit hin getestet. Dabei ließen sich über Ermittlung des Körpergewichts und des allgemeinen Zustands keine negativen Einflüsse auf den Gesundheitszustand der Mäuse feststellen.

Neben der Zytotoxizität wurden die Inhibitoren auch auf eine Induktion der Apoptose hin getestet. Für C3 und C5 konnte diese nach mindestens 48-stündiger Behandlung mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Dabei wurde, jeweils für C5 deutlicher als für C3, eine Aktivierung der Caspase 3 durch Zerlegung in die aktiven Untereinheiten sowie die Spaltung des Caspase 3-Substrats PARP nachgewiesen. Sowohl die Aktivierung der Caspase 3 als auch die Fragmentierung der PARP sind Vorgänge, die während der Apoptose ablaufen (Boulares *et al.* 1999; Salvesen *et al.* 2004). Es kann bei diesem Nachweis nicht unterschieden werden, ob das apoptotische Programm durch den extrinsischen oder den intrinsischen Signalweg initiiert wurde. Die Aktivierung des

intrinsischen Wegs könnte anhand der Reaktion des Farbstoffs JC-1 geprüft werden, der nur in intakten Mitochondrien in Abhängigkeit von deren Membranpotential aggregiert (Salvioli *et al.* 1997). Durch einen für die gespaltene, und somit aktivierte, Caspase 8-spezifischen Antikörper könnte die Aktivierung des extrinsischen Wegs untersucht werden (Elmore 2007). Ein Protein, welches an der Apoptose-Induktion maßgeblich beteiligt ist, ist der p53-Tumorsuppressor. p53 kann über die Aktivierung verschiedener pro-apoptotischer Bcl-2 Proteine wie Bax, Puma, Noxa und Bid die apoptotische Kaskade einleiten (Fridman *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass C3 und C5 nach 24h-stündiger Behandlung mit einer Konzentration von 25µM, im Gegensatz zu LMB, die p53-Protein-Expression nicht erhöhen. Dies konnte sowohl in der Immunfluoreszenz als auch mittels Western Blot nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu LMB leiten C3 und C5 die Apoptose nicht über p53 ein. Dies konnte sowohl mittels Western Blot-Analyse als auch der Immunfluoreszenz-Färbung gezeigt werden. Bei der klassischen Krebstherapie kommt es durch die Behandlung mit Zytostatika wie z.B. Cisplatin zur Induktion des apoptotischen Programms (Henkels *et al.* 1997), wodurch die hoch teilungsaktiven Tumorzellen bevorzugt abgetötet werden. Derzeit werden zur Krebstherapie Wirkstoffkombinationen mit einem, im Vergleich zu Monotherapien, höheren Therapieerfolg eingesetzt (Kufe 2003). Für die Kombination des zur Behandlung der CML verwendeten BCR-ABL-spezifischen Inhibitors Imatinib mit dem Exportinhibitor LMB konnte *in vitro* bereits eine gesteigerte Apoptoserate der Tumorzellen nachgewiesen werden (Vigneri *et al.* 2001). Das von der Firma Novartis vertriebene Imatinib ist ein selektiver Inhibitor der BCR-ABL-Tyrosinkinase. Diese wird von einem Fusionsgen exprimiert, welches nach Translokation der Chromosomen 9 und 22 entsteht und an der Entstehung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) maßgeblich beteiligt ist (Buchdunger *et al.* 1996; Druker *et al.* 1996; Deininger *et al.* 2005). Imatinib inhibiert die Proliferation BCR-ABL positiver Zelllinien und löst in diesen die Apoptose aus. Für C3 und C5 konnte in drei Suspensionszelllinien ein synergistischer Effekt zur Behandlung mit Imatinib hinsichtlich der Verminderung der Viabilität nachgewiesen werden. In die gleiche Richtung zielt die Kombination von C3 oder C5 mit radioaktiver Bestrahlung, einer weiteren wichtigen Säule der Krebstherapie. Auch in diesem Fall konnte die Viabilität der behandelten Zellen durch die Kombinationsbehandlung weiter gesenkt werden. Neben der Radiotherapie würde es sich anbieten, langfristig erfolgreich eingesetzte Chemotherapeutika wie Cisplatin, 5-Fluorouracil, etc. in einer Kombinationsbehandlung mit den Exportinhibitoren hinsichtlich erhöhter Sensibilisierung gegenüber der Apoptose-Induktion zu überprüfen.

4.2.3 Zellzyklus und Mitose

Ein weiterer essentieller Prozess neben der Apoptose ist der Zellzyklus, dessen Regulation in Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen verändert ist. Der bereits im Vorfeld der Arbeit beschriebene Effekt von Ratjadon und LMB, welche beide gleichsam einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus erwirken (Kalesse 2002), konnte im Rahmen der durchgeführten Messungen für LMB bestätigt werden (Daten wurden nicht gezeigt). Dieser Effekt steht in kausalem Zusammenhang mit der Induktion der p53-Expression durch LMB, die auch in eigenen Versuchen bestätigt wurde. p53 stimuliert die Expression des *cyclin dependent kinase* (CdK) Inhibitors p21, der die Progression des Zellzyklus in die S-Phase reguliert (Lain *et al.* 1999). Dies erklärt eindeutig die Zunahme an Zellen der G1-Phase nach Behandlung mit LMB. Für die Substanzen C3 und C5 konnte nach Inkubation von HeLa-Zellen mit einer Konzentration von 25µM kein Effekt auf die Verteilung der Zellzyklus-Phasen gefunden werden. Die Erhöhung der Konzentration auf 100µM resultierte für C3 in einer leichten Abnahme der sich in der S-Phase befindlichen Zellen und für C5 in einer deutlichen Verschiebung des Verhältnisses von G1- zu G2-Phase Zellen. Die Verteilung der Zellzyklus-Phasen nach Inkubation mit 100µM C3 ähnelte der nach Inkubation mit LMB, welche allerdings mit einer noch deutlicheren Reduktion der S-Phase und G2-Phase assoziiert war. Da für C3 keine Induktion der p53-Expression nachgewiesen werden konnte, ist ein von p53 und p21 unabhängiger Effekt auf den Zellzyklus zu vermuten. Neben der Zunahme an G2-Phase-Zellen wurde für C5 zudem ein deutlicher Anstieg der Sub-G1-Fraktion, als Hinweis auf eine Zunahme der apoptotischen Zell-Population, ersichtlich. Die daraufhin untersuchte Viabilität der Zellen zeigte sich durch die entsprechende Behandlung mit C3 und C5 um 30% reduziert. Auch in der durchlichtmikroskopischen Analyse der Zellen konnte ein eindeutiger Einfluss beider Substanzen auf die Zellmorphologie bestätigt werden. Auch für C5 konnte die Induktion der p53-Expression nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Zunahme der G2-Population ist die Hemmung eines Zellzyklus-Regulators denkbar, der den Eintritt in die Mitose kontrolliert. Das NES-tragende Protein Survivin lokalisiert in der Mitose an den Centromeren der Chromosomen. Es wurde beschrieben, dass diese Lokalisation durch Behandlung mit LMB aufgelöst wird (Knauer *et al.* 2006), was für eine Behandlung mit C3 und C5 im Rahmen der durchgeführten Versuche allerdings nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf den im Vergleich zu LMB unterschiedlichen Wirkmechanismus dieser Substanzen. Durch LMB kommt es zu einer kovalenten Modifikation des für die Lokalisation der Zentromeren essentiellen Crm1 (Kudo *et al.* 1998; Wang *et al.* 2005). Sollten C3 und C5 nun gegen einen Kofaktor des Crm1-abhängigen Exports gerichtet sein, so wäre ein Einfluss auf die mitotische Lokalisation von Survivin an den Zentromeren von vornherein ausgeschlossen.

4.2.4 *In vitro*-Aktivität der neuen Exportinhibitoren

In Mikroinjektionsversuchen konnte die inhibitorische Aktivität der Substanzen C3 und C5 auch hinsichtlich rekombinanter NES-tragender Proteine bestätigt werden. Dabei konnte der Export des rekombinanten Proteins nach Injektion in den Zellkern von Vero-Zellen jedoch nicht wie durch LMB dauerhaft inhibiert, sondern lediglich stark verzögert werden. Erklärbar wäre dieses Phänomen über eine Kompetition, bei der das NES-Protein mit den Inhibitoren um die Bindung an Crm1 konkurriert. Im Fall von LMB erfolgt eine kovalente Modifikation des Crm1 (Kudo *et al.* 1998; Wang *et al.* 2005). Die Reversibilität der Exportinhibitoren (s. 4.2.5) lässt nun eine nichtkovalente Bindung an Crm1 vermuten, was eine beständige Konkurrenz mit dem NES-Protein um die Bindung an Crm1 zur Folge hätte. Dies könnte den schwachen Export der mikroinjizierten NES-Proteine erklären. Im Gegensatz zu den Biosensoren (Knauer *et al.* 2005) verfügt das mikroinjizierte NES-Protein nicht über ein NLS, welches diesem schwachen Export entgegenwirken könnte. Der beständige Import in den Zellkern könnte somit der Grund sein, weshalb die Exportinhibition des RevNES- oder SurvivinNES-Biosensors über einen längeren Zeitpunkt stabil aufrechterhalten werden kann, als dies für das mikroinjizierte Protein möglich ist. Das Fehlen eines NLS könnte auch die unvollständige Akkumulation des Survivin-GFPs im Zellkern nach einer Inhibition des Exports erklären, da diese lediglich von der Diffusion abhängt (Knauer *et al.* 2007). Nach diesem Szenario des verzögerten Exports würden die neuen Exportinhibitoren reversibel an Crm1 binden, was gut mit der im Vergleich zu LMB niedrigeren Toxizität korreliert.

In Pulldown-Experimenten waren im Gegensatz zu LMB weder C3 noch C5 in der Lage, die Bindung von RevNES- bzw. SurvivinNES-tragenden Proteinen an Crm1 zu unterbinden. Die Exportinhibitoren wurden für 30min bei 4°C mit dem *in vitro*-translatierten Crm1 inkubiert, bevor die vierstündige Pulldown-Reaktion bei 4°C durch Zugabe des an *beads* gebundenen NES-Proteins erfolgte. Im Anschluss an diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die inhibitorische Aktivität beider Inhibitoren nach zweistündiger Inkubation in PBS bei 4°C deutlich reduziert ist. Bei einer daraufhin durchgeführten Vorinkubation von Crm1 mit den Substanzen für 15min und anschließender Pulldown-Reaktion für 20min konnte dennoch kein inhibitorischer Effekt auf die Bindung des RevNES an Crm1 nachgewiesen werden. Auch bei einem Ersatz des Wasseranteils des zur Pulldown-Reaktion verwendeten Bindepuffers durch Zellkulturmedium konnte kein inhibitorischer Effekt von C3 und C5 detektiert werden. Dieses Ergebnis könnte nun eine mangelnde Stabilität der Substanzen für diesen Versuchsansatz vermuten lassen. Die eingesetzten Konzentrationen, welche jeweils 40fach höher waren als in den im Vorfeld durchgeführten zellbasierten Versuchen, hätten in jedem Fall eine Inhibition der Bindung erwarten lassen. Mit dem Pulldown-Versuch wurde erstmals die Bindung der NES-tragenden Proteine an Crm1 in einer von dem zellulären Milieu unabhängigen Umgebung untersucht. Da auch unter Bedingungen, unter denen die

Substanzen aktiv sein sollten, keine Verringerung dieser Bindung detektierbar war, könnte dies auf einen Kofaktor als wirkliche Zielstruktur der Inhibitoren deuten. Es sollte aber in Betracht gezogen werden, dass die Menge des zur Bindereaktion eingesetzten Crm1 möglicherweise zu hoch gewesen sein könnte. So wäre durch die Präinkubation des *in vitro*-translatierten Crm1-HA lediglich ein Anteil des Proteins inhibiert worden. Der Anteil an nicht inhibiertem Crm1 konnte weiter an die NES-Proteine binden. War die verbliebene Menge an nicht inhibiertem Crm1 noch ausreichend für eine sättigende Bindung aller NES-Proteine, so wäre mit diesem Versuchsaufbau kein inhibitorischer Effekt detektierbar gewesen. Weiterhin ist denkbar, dass die Konformation von *in vitro* translatiertem Crm1 keine Inhibition durch C3 und C5 zulässt.

4.2.5 Stabilität von C3 und C5

Um die Aktivität von C3 und C5 in wässriger Umgebung bewerten zu können, wurde die Stabilität der inhibitorischen Wirkung untersucht. Hierfür wurden die Substanzen in PBS oder Zellkultur-Medium präinkubiert und bei anschließender Behandlung von HeLa_{SurvNES}-Zellen getestet. Nach zweistündiger Inkubation von C3 mit PBS war dessen inhibitorische Aktivität deutlich reduziert. Der Verlust der inhibitorischen Aktivität war bei Präinkubation in PBS bei 4°C etwas geringer ausgeprägt und bei Präinkubation in Zellkultur-Medium bei 4°C nur minimal. Die geringere thermische Bewegung bei 4°C scheint das C3-Molekül zu konservieren. Für C5 konnte lediglich nach Präinkubation mit PBS ein Rückgang der inhibitorischen Aktivität, wiederum deutlicher bei 37°C im Vergleich zu 4°C, nachgewiesen werden. Präinkubation für 2h in Zellkultur-Medium zeigte keinen Effekt auf die inhibitorische Aktivität von C5. PBS ist im Vergleich zu Zellkultur-Medium eine stärker wasserhaltige Lösung. Die Inhibitor-Aktivität scheint sich folglich mit steigendem Wasseranteil einer Lösung zu verringern. Dabei ist unklar, ob es lediglich zum Verlust der Aktivität oder zu einem Zerfall der Substanz kommt. Hinsichtlich einer Reaktion mit Wasser ist z.B. eine Addition an die Ketogruppen denkbar, wodurch es zur Entstehung von Hydroxylgruppen kommen könnte. Sollten die Ketogruppen für die Funktion essentiell sein, so wäre ein Verlust der Aktivität die Folge. Prinzipiell ist wohl auch ein Zerfall der Inhibitor-Moleküle nach Reaktion der funktionellen Gruppen mit dem Lösungsmittel Wasser denkbar. Dieser könnte, sofern vorhanden, mit Hilfe der Massenspektrometrie oder der *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektrometrie untersucht werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss von Wasser auf die Stabilität der Inhibitor-Aktivität und sollten hinsichtlich deren Lagerung in DMSO beachtet werden. Durch die hygroskopischen Eigenschaften von DMSO (Rasmussen *et al.* 1968; Waybright *et al.* 2009) wird mit jeder Verwendung der gelösten und bei -20°C gelagerten Substanzen mehr Wasser eingelagert, wodurch diese nach den jetzigen Erkenntnissen deutlich an Aktivität verlieren können. Es empfiehlt sich daher eine

Aufbewahrung in kleinen Mengen bei möglichst geringer Temperatur (-80°C) und optimalerweise unter Stickstoffatmosphäre. Die Ergebnisse der Exportinhibition stehen in Einklang mit denen der Viabilitätsmessung nach Präinkubation. Präinkubiertes C5 wirkte sich negativ auf die Viabilität der behandelten Zellen aus, während präinkubiertes C3 keinerlei Auswirkungen zeigte. Folglich ist C5 in Lösung als stabileres Molekül anzusehen als C3, was auch die kürzere zeitliche Dauer der durch C3 vermittelten Exportinhibition erklären könnte. Folgte der Exportinhibition ein Medienwechsel, so unterschieden sich die beiden Substanzen in der Dauer bis zur Aufhebung der Inhibition nicht. In beiden Fällen war nach etwa 10 Stunden kein inhibitorischer Effekt mehr nachweisbar. Bei der dauerhaften Behandlung der Zellen blieb die verfügbare Menge intakter C5 folglich annähernd konstant, wohingegen es zu einer Abnahme der Menge intakter C3 kam. Dies erklärt die reversible bzw. irreversible Export-Inhibition, die nach einer 24-stündigen Behandlung mit C3 bzw. C5 beobachtet wurde. Die beiden Parameter Reversibilität und Stabilität können des Weiteren als Erklärung für die gute Verträglichkeit der Substanzen im Mausmodell herangezogen werden. Während die Applikation von LMB eine starke Toxizität in Mäusen zeigt (Mutka *et al.* 2009), war nach intraperitonealer Injektion beider Exportinhibitoren in sehr hoher Konzentration kein negativer Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere per Gewichtsmessung festzustellen. Hierbei ist anzumerken, dass die Exportinhibitoren erst direkt vor der Injektion mit PBS gemischt wurden, also bezugnehmend auf die zur Stabilitätsbestimmung durchgeführten Versuche noch im aktiven Zustand in den Körper der Maus gelangt sein sollten. Durch die geringe Stabilität der Inhibition in wässrigem Medium ist allerdings anzunehmen, dass in der Maus ein schneller Aktivitätsverlust der Substanzen erfolgte. Es ist unklar, welcher Anteil der intraperitoneal injizierten Substanzen in den systemischen Kreislauf der Maus gelangte. Generell werden körperfremde lipophile Substanzen im Organismus über den Leberzell-Metabolismus der Phasen I und II zu einer höheren Hydrophilität hin transformiert, um eine renale Ausscheidung zu ermöglichen (Guengerich 2006). Um die Wirkung der Inhibitoren im Mausmodell evaluieren zu können, müsste zunächst deren Aktivität durch chemische Modifikationen stabilisiert werden. Es ist zudem eine Formulation der Substanzen in einem Trägermittel wie Cremophor EL (BASF SE, Ludwigshafen) denkbar, welches Emulsionen nichtpolarer Stoffe in wässriger Umgebung zu stabilisieren vermag. Mit verbesserter Stabilität und optimierter Übertragung könnte dann im Weiteren der Effekt der Inhibitoren auf das Wachstum von Xenograft-Tumoren getestet werden.

4.2.6 Einfluss auf die Interaktion von Rev mit Crm1

Da mit den Biosensoren NES lediglich in einer isolierten Form vorliegen, wurde die Aktivität der Inhibitoren auf das HIV-1 Rev-Protein mittels verschiedener Versuchsansätze untersucht. Dabei konnte ein deutlich hemmender Effekt der Inhibitoren auf die Interaktion

des HIV-1 Rev-Proteins mit Crm1 detektiert werden. Rev lokalisiert, aufgrund seines *nucleolar-targeting signals* in der Arginin-reichen Region des Proteins, an den Nukleoli der Zelle (Kubota *et al.* 1989; D'Agostino *et al.* 1995), kann sich aber über seine Transportsignale zwischen Zellkern/Nukleolus und Zytoplasma bewegen (Kalland *et al.* 1994; Meyer *et al.* 1994; Richard *et al.* 1994). Es ist bekannt, dass eine Überexpression von Rev zu vergrößerten und deformierten Nukleoli führt, was bei Betrachtung der unbehandelten Rev-GFP-Transfektanten in mikroskopischen Analysen deutlich auffällt (Nosaka *et al.* 1993; Miyazaki *et al.* 1996). Für Crm1, auch in Fusion mit GFP, wurde eine deutliche Anreicherung an der nukleären Membran beschrieben, wobei einige Zellen auch diskrete Crm1-GFP-Foci im Zellkern zeigten (Boulon *et al.* 2004; Ernoult-Lange *et al.* 2009). Bei Kotransfektion von HIV-1 Rev-BFP mit Crm1-GFP zeigte sich eine deutliche Überlagerung beider Signale an den Nukleoli. Nach Zugabe von LMB oder C3, C24 oder C5 wurde diese deutlich vermindert. Daelemans *et al.* konnten die Interaktion von Crm1 mit HIV-1 Rev bereits mittels *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) zwischen diesen beiden Fusions-Proteinen nachweisen (Daelemans *et al.* 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Kolo-kalisation mit HIV-1 Rev-BFP an den Nukleoli für die Crm1_{C528S}-GFP-Mutante nachgewiesen werden. Diese war jedoch unbeeinflusst von einer Behandlung mit LMB aber auch mit den Exportinhibitoren. Dies lässt nun auf das Cystein₅₂₈ als Angriffsstelle der getesteten Substanzen schließen.

Nebenbei erwähnt zeigte sich in diesen Versuchen auch eine Abhängigkeit der Inhibitionsleistung von der Zelldichte, da in Bereichen höherer Dichte die Kolo-kalisation von Rezeptor und Signal-tragendem Protein deutlich seltener aufgehoben wurde.

Weiterhin vermittelten die Exportinhibitoren C3, C5, C10, C11, C24 und C28, ebenso wie LMB, eine Akkumulation der HIV-1 Rev14-Mutante im Zellkern. Rev14 ist eine zytoplasmatische Variante des HIV-1 Rev-Proteins, bei welcher die Mutation von ¹⁴RTV¹⁶ zu ¹⁴EED¹⁶ die Bindung an die Nukleoli verhindert (D'Agostino *et al.* 1995; Stauber *et al.* 1998). Da andererseits das intrinsische NLS des Proteins noch intakt ist, wird Rev14-GFP noch beständig in den Zellkern transportiert, ist aber aufgrund des im Vergleich zu dem NLS stärkeren NES ausschließlich im Zytoplasma zu detektieren. Eine Inhibition des Exports resultiert dann in einer nukleären Akkumulation des Proteins.

Wie bereits beschrieben, lokalisiert wildtypisches Rev-GFP hauptsächlich an den Nukleoli, es erfolgt jedoch eine ständige Wanderung zwischen Nukleus und Zytoplasma. Actinomycin D (ActD) erwirkt nach längerer Inkubationszeit eine Auflösung der Nukleoli, da es in niedrigen Konzentrationen die RNA-Synthese inhibiert (Schoepl 1964; Perry *et al.* 1970). Somit hemmt die Zugabe von ActD die Bindung des Rev-GFPs an die nukleolären Strukturen und vormals nukleoläres Rev-GFP transloziert, getrieben von seinem intrinsischen Exportsignal, ins Zytoplasma. Die resultierende zytoplasmatische Lokalisation

des Rev-GFPs entspricht somit der des Rev14-GFPs, wobei die nukleoläre Lokalisation entweder durch ActD oder durch eine interne Mutation unterbunden ist.

Erfolgt im Vorfeld der ActD-Behandlung eine Inhibition des Crm1-abhängigen nukleären Exports mit LMB, so kann eine Akkumulation des Rev-GFPs im Zellkern beobachtet werden. Auch eine Vorbehandlung mit den Exportinhibitoren C3, C5, C11 und C24 führte zu einer nukleären Akkumulation des HIV-1 Rev. Dabei waren die Nukleoli stets noch erkennbar, was auf die zu diesem Zeitpunkt relativ kurze ActD-Behandlung von 2h zurückzuführen ist, da am Folgetag keine nukleolären Strukturen mehr visualisierbar waren (Daten wurden nicht gezeigt). Diese Versuche belegen eindeutig, dass die identifizierten Inhibitoren die Bindung von HIV-1 Rev an Crm1 beeinflussen. Weiterhin weist die Unempfindlichkeit der Bindung von Crm1_{C528S}-GFP an HIV-1 Rev-BFP gegenüber einer Behandlung mit den Exportinhibitoren auf die Umgebung der Aminosäure Cystein₅₂₈ als Angriffsstelle von C3, C5, C11 und C24 hin.

4.3 Bestimmung essentieller Strukturen von C3 und C5

Die im Rahmen der Hochdurchsatzanalyse identifizierten Substanzen sind auf der Entwicklungsstufe eines primären *Hits* anzusiedeln. In der Therapeutika-Entwicklung wäre der nächste Schritt die Identifizierung der Leitstrukturen, die neben einer optimierten Aktivität über positive biophysikalische Eigenschaften verfügen sollten, um eine erfolgversprechende organismische Anwendung zu ermöglichen (Alanine *et al.* 2003; Bleicher *et al.* 2003). Weiterhin ist eine einfache Synthetisierbarkeit und eine geringe Anzahl an Freiheitsgraden erstrebenswert. Da eine Weiterentwicklung der Exportinhibitoren eigenständig nicht durchgeführt werden konnte, wurden von Dr. M. Lisurek (FMP, Berlin) homologe Substanzen bestimmt und nach Beratung durch Prof. T. Opatz (Institut für organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) eine Auswahl daraus bestellt. Diese wurden auf HeLa_{RevNES}-Zellen in einer Konzentration von 25µM hinsichtlich ihrer Exportaktivität getestet. Für die Substanz C3 erschließt sich aus der Aktivität der Homologen, dass die Amid-Gruppe (Position 3 Abb.80) essentiell für die Funktion des Moleküls ist. Durch Austausch gegen Nitril (C26) oder Ester (C27) verliert die Substanz jegliche Aktivität. Veränderungen der Halogenposition (Position 2) am Aromaten (C3/C24/C28) führen zu keiner Beeinträchtigung der Funktion. Der Austausch von Fluor oder Chlor gegen Brom könnte nach Einschätzung von Prof. T. Opatz die Substanz noch reaktiver machen. Die interne Hexafluor-Struktur (Position 2) stellt sich ebenfalls als für die Funktion essentiell dar, was durch den Vergleich mit C20 und C21 deutlich wird.

Für die Funktion von C5 stellte sich das Chlor an Position 2 als entscheidend heraus. Durch Substitution der Trifluor-Gruppe an Position 1 gegen Chlor verlor die Substanz deutlich an

Aktivität, weshalb sich die Modifikation des Aromaten für weitere Optimierung empfiehlt. Es konnten aus den untersuchten Homologen keine, im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen C3 und C5, aktiveren Strukturen identifiziert werden. Da nur kommerziell verfügbare Substanzen überprüft wurden, wäre eine gezielte Synthese verschiedener homologer Strukturen der nächste Schritt, um aktivere Substanzen zu finden.

4.4 Crm1-Inhibitoren in der Therapeutikaentwicklung

Die Untersuchung von LMB hinsichtlich einer möglichen Verwendung als Tumorthapeutikum wurde nach ersten klinischen Tests der Phase I aufgrund der enormen Nebenwirkungen abgebrochen (Newlands *et al.* 1996). Allerdings stellen die sogenannten ‚*novel export inhibitors*‘ (NEIs) eine Weiterentwicklung von LMB dar, die in einer höheren Dosis im Mausmodell toleriert werden (Mutka *et al.* 2009). Aktuelle Informationen zu klinischen Studien waren jedoch nicht verfügbar. Da Crm1 sowohl für das Überleben von gesunden Zellen wie auch von Krebszellen unabdingbar ist, müsste eine Behandlung mit derartigen Inhibitoren auf letztere beschränkt werden können. Im Rahmen einer Kombinationstherapie könnte sich allerdings die Verwendung reversibler Exportinhibitoren als nützlich erweisen, da sie zu gewünschten Zeitpunkten und bestimmten Zeitspannen während einer Therapie den Export von Proteinen aus dem Zellkern unterbinden. Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor p53. Dessen Lokalisation im aktivierten Zustand im Zellkern führt zu einem Anhalten des Zellzyklus und der Einleitung der Apoptose, was sich als additiver Effekt positiv auf die effiziente Eliminierung von Krebszellen mit wildtypischen p53 auswirken könnte (Kau *et al.* 2003). In den von Dr. M. Krämer (AG Münk, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Klinikum der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführten Versuchen konnte eindeutig ein negativer Effekt von C3 und C5 auf die Aktivität der reversen Transkriptase und für C5 zusätzlich ein inhibierender Effekt auf den viralen HIV-1-Titer nachgewiesen werden. Die neuen Inhibitoren zeigen zwar verglichen mit dem zur Kontrolle mitgeführten LMB eine geringere Aktivität, verdeutlichen jedoch generell die Möglichkeit des Eingreifens in den viralen Lebenszyklus durch Hemmung des Crm1-abhängigen Exports. Hinsichtlich einer möglichen therapeutischen Weiterentwicklung sind die neu identifizierten Exportinhibitoren auf der Stufe eines bestätigten *Hits* einzuordnen. Der nächste Schritt wäre eine Weiterentwicklung zu *Lead*-Strukturen, bei der zunächst *Hit*-Substanzen mit unerwünschten chemischen Gruppen aussortiert werden würden (Alanine *et al.* 2003). Innerhalb der ChemBioNet-Bibliothek sollten keine instabilen und reaktiven funktionellen Gruppen in den Substanzen vorliegen, da die Substanzauswahl hier nach dem momentanen Stand der Wissenschaft der medizinischen Chemie vorselektiert wurde (Lisurek *et al.* 2010). Der genaue Wirkmechanismus und somit der Zusammenhang

zwischen Struktur und Aktivität (SAR, siehe Einleitung) wäre im nächsten Schritt für die Strukturen genau aufzudecken, wobei für C3, C5 und C24 bereits gezeigt werden konnte, dass diese ihre Aktivität über das Cystein₅₂₈ von Crm1 entfalten. Die Strukturen müssten dann im weiteren Verlauf des Entwicklungsprozesses bezüglich einer guten Löslichkeit, einer moderaten Polarität, sowie einer hohen Aktivität optimiert werden, um eine gute Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion (ADME) sowie ein niedriges ADME-Toxizitäts-Profil im Organismus zu erhalten. Eine erfolgreiche Testung im Tiermodell würde dann einen Eintritt in klinische Phase1-Studien ermöglichen.

4.5 Werkzeuge für die Untersuchung des Exportmechanismus

Die neuen Exportinhibitoren zeigten bislang keine Protein-spezifische Inhibition des Exports, was durch Versuche mit verschiedenen NES und NES-tragenden Proteinen gezeigt werden konnte. Es bleibt offen, ob es für die verschiedenen NES-Gruppen, eingeteilt in Abhängigkeit ihrer Aktivität (Heger *et al.* 2001), auch unterschiedliche Kofaktoren gibt oder ob die unterschiedliche Aktivität nicht nur durch die Affinität zu Crm1 bestimmt wird. Mit den neuen Exportinhibitoren stehen nun neue Werkzeuge zur gezielten Modulation des Crm1-abhängigen Exports zur Verfügung. So kann eine beständige oder zeitlich terminierte Inhibition zur Untersuchung der Regulation und der (patho)physiologischen Relevanz des nukleo-zytoplasmatischen Transports genutzt werden. Im Vergleich zu dem irreversibel agierenden LMB stehen nun reversibel agierende Inhibitoren unterschiedlicher Aktivität und Kinetik zur Verfügung. Allerdings bleibt die mechanistische Aufklärung des genauen Bindepartners für die Untersuchung des Exports essentiell.

4.6 Neuer Exportinhibitor isoliert aus einem Pilzextrakt

Im Gegensatz zu synthetischen Substanzen, wie sie in der ChemBioNet-Bibliothek vorliegen, gelten Naturstoffe als privilegierte Strukturen in der Wirkstoffentwicklung (Breinbauer *et al.* 2002). Privilegiert daher, weil sie einer evolutiven Selektion unterlagen und zudem in physiologischer Umgebung aktiv sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Naturstoffe in Form von Pilzextrakten auf eine Export-inhibitorische Aktivität hin getestet. Diese enthielten eine nicht definierte Anzahl an Substanzen zu ebenso ungewissen Konzentrationsverhältnissen. Bei der Verwendung komplexer Substanzgemische in der Hochdurchsatzanalyse, wie sie z.B. in natürlichen Extrakten vorliegen, können mit einer geringeren Anzahl an Proben deutlich mehr Substanzen getestet werden, als es mit Einzelsubstanz-Bibliotheken möglich ist. Allerdings ergeben sich hieraus auch Nachteile der Testung von Substanzgemischen gegenüber der verwendeten Substanz-Bibliothek (ChemBioNet) mit lediglich einer Einzel-

Substanz pro *well* in bekannter Konzentration. Bei zu niedriger Konzentration einer möglicherweise Export-inhibierenden Substanz innerhalb eines Extrakts könnte diese möglicherweise nicht als Inhibitor identifiziert werden. Gleichfalls könnte eine zu hohe Konzentration einer zytotoxischen Substanz die Wirkung einer Export-inhibierenden Substanz im selben Extrakt unentdeckt lassen, wenn vor Abschluss der Analyse alle Zellen bereits abgestorben wären. Abhilfe könnte zumindest partiell die Überprüfung unterschiedlicher Konzentrationen der Pilzextrakte schaffen, zum Beispiel 1:100 und 1:1000 verdünnt, wodurch sich allerdings die Probenanzahl wieder deutlich erhöhen würde. Ebenfalls in der Natur der Sache liegt, dass bei erfolgreicher Identifizierung eines Extraktes mit Export-inhibierender Wirkung dieser im Folgenden chromatographisch in seine Einzelsubstanzen aufgetrennt werden muss, um die darin enthaltene(n) aktive(n) Substanz(en) in weiteren Hochdurchsatzanalysen der fraktionierten Extrakte zu bestimmen. Bei Verwendung des RevNES-Biosensors konnte ein neuer Exportinhibitor (FR96001M) aus dem Extrakt des Pilzes *Cyphellopsis anomala* bestimmt werden. *Cyphellopsis anomala* gehört zur Gruppe der Basidiomyceten. Bei einer Hochdurchsatzanalyse für Pilz-Metaboliten, die die Morphologie von Tumorzellen beeinflussen, zeigte der Extrakt von *Cyphellopsis anomala* eine deutliche Wirkung. Zudem konnte eine starke fungizide Aktivität nachgewiesen werden, die auf die Antibiotika Strobilurin A, D und F zurückzuführen war (Weber *et al.* 1990). Weiterhin konnte eine bakterizide Wirkung des Extrakts auf Gram-positive Bakterien nachgewiesen werden, für den die durch Dr. H.F. Rasser (Technische Universität Kaiserslautern) erstmals isolierte Substanz FR96001M ((4R,5R) 4,5-Dihydroxy-5-((1S) 1-hydroxy-heptyl)-cyclopent-2-enon) kausal verantwortlich ist. Neben der antibakteriellen Aktivität wurde für dieses Cyclopentenon-Derivat auch eine fungizide und für eukaryotische Zellen zytotoxische Wirkung beschrieben. FR96001M ist ein Sekundärmetabolit des genannten Pilzes und wurde aus Kulturfiltrat aufgereinigt. Welche biologische Funktion dieser Metabolit im Pilz ausübt, ist noch völlig unklar, wobei die Aktivität vermutlich auf eine unspezifische Reaktion von FR96001M mit SH-Gruppen zurückzuführen ist (Rasser 2001). FR96001M ist der schnellste der in dieser Arbeit beschriebenen neuen Inhibitoren des Kernexports. Eine nur zehnminütige Inkubation mit einer Konzentration von 25µM löste eine vollständige nukleäre Akkumulation des RevNES-Biosensors im Zellkern aus, im Falle des SurvivinNES-Biosensors genügten hierzu bei gleicher Konzentration zwei Stunden. Als weitere Besonderheit des Inhibitors ist die Geschwindigkeit der Reversibilität der Inhibition nach Erneuerung des Mediums zu nennen, welche bereits innerhalb 30min erreicht wurde. Bei dauerhafter Inkubation behielt FR96001M auch über eine Zeitspanne von 24h seine vollständige inhibitorische Aktivität. Da hier auch nach einstündiger Präinkubation in PBS, PBS_{10%FCS} oder Medium keine Beeinflussung der inhibitorischen Aktivität nachweisbar war, scheint es sich im direkten Vergleich zu C3 und C5, um eine verhältnismäßig stabile

Substanz zu handeln. Auch in zellfreien Bindungsstudien konnte durch FR96001M eine mäßige bis deutliche Reduktion der Bindung von SurvivinNES oder RevNES an Crm1 gezeigt werden. FR96001M bzw. seine Aktivität scheint somit in Lösung deutlich stabiler zu sein als die vorab identifizierten synthetischen Inhibitoren C3 und C5 und vermochte daher diese Interaktion zu inhibieren.

Nach Behandlung mit FR96001M bilden sich innerhalb kurzer Zeit Abschnürungen an der Zelloberfläche. Dass es sich hierbei noch nicht um apoptotische Effekte handelt, zeigte der mangelnde Nachweis von Caspase 3- und PARP-Spaltung in entsprechenden Zelllysaten. Nach 24-stündiger Inkubation konnte unter Verwendung des *cleaved* Caspase3-Antikörpers eine Bande bei etwa 36kDa detektiert werden, welche in etwa der Größe von Caspase3 mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 32kDa entspricht. Obwohl der Antikörper eigentlich nur das große Fragment der geschnittenen Caspase 3 erkennen sollte, könnte diese Bande auf eine verstärkte Expression von Caspase 3, als Ursache der Behandlung mit FR96001M, zurückzuführen sein. Auch der Nachweis der Spaltung des Caspase 3-Substrats PARP deutet auf eine Apoptose-Induktion nach Langzeitinkubation mit FR96001M hin. Das für die Apoptose typische Fragmentmuster der PARP deutet jedenfalls nicht auf die Beteiligung nekrotischer Prozesse hin, da in diesem Fall ein Hauptfragment von 50kDa im Western Blot detektiert werden sollte (Gobeil *et al.* 2001). Die Expression des Apoptose-inhibierenden Proteins Survivin sowie des pro-apoptotischen Proteins Bim wurde durch die Behandlung mit FR96001M in den durchgeführten Versuchen nicht beeinflusst. Somit wird die Apoptose in diesem Fall nicht durch eine veränderte Expression dieser Proteine induziert (Urbich *et al.* 2005; Blum *et al.* 2006). Als Maß für die Zytotoxizität wurde wiederum der IC_{50} herangezogen, der mit 6 μ M niedriger als die für C3 und C5 ermittelten Werte war. Da FR96001M eine stärkere inhibitorische Aktivität als C3 und C5 aufweist, ist hierdurch die vergleichsweise höhere Zytotoxizität zu erklären. Auch LMB hat einen deutlich niedrigeren IC_{50} ist aber auch ein vielfach potenterer Inhibitor. Ob FR96001M seine zytotoxische Wirkung noch über weitere zelluläre Signalwege entfaltet, müsste in weiterführenden Versuchen geklärt werden. Es könnte z.B. eine Analyse der Genexpression mit Hilfe der Affymetrix Chip-Technologie erfolgen. Bei der Bestimmung der Viabilität von HeLa-Zellen zeigte sich nach fünfstündiger Behandlung mit FR96001M (25 μ M) in der CellTiterGLO®-Messung eine geringfügige Verbesserung, im AlamarBlue-Test allerdings eine 20%ige Verminderung. Eine Langzeitbehandlung über 24h reduzierte die Zell-Viabilität in beiden Assays gleichermaßen auf etwa 60%. Beide Viabilitätstests basieren auf unterschiedlichen Messprinzipien, wie auch in 4.2.2 bereits beschrieben. Bei dem CellTiterGLO®-Assay wird der zelluläre ATP-Gehalt als Maß der Viabilität herangezogen, wohingegen der AlamarBlue-Assay das reduzierende Potential vitaler Zellen ausnutzt. Die Erhöhung der Viabilität nach kurzzeitiger Behandlung mit FR96001M konnte in mehreren Versuchsreihen bei Verwendung des CellTiterGLO®-

Assays bestätigt werden. Um auszuschließen, dass die Viabilitäts-steigernde Eigenschaft von FR96001M aufgrund einer Wechselwirkung mit dem CellTiterGLO®-Reagenz zustande kommt, wurde eine Messung von Zellkulturmedium mit und ohne FR96001M durchgeführt (Daten wurden nicht gezeigt). Dieser Kontrollversuch zeigte keine Veränderung des Messwerts, so dass dieser Effekt tatsächlich von den Zellen direkt ausgehen muss. Zur Absicherung sollte die Zunahme des ATP-Gehalts mit einer zweiten Methode wie z.B. der *high performance liquid chromatography* (HPLC) bestätigt werden (Anderson *et al.* 1976). Auch unter Verwendung des LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity-Assays konnte nach ein- bzw. fünfstündiger Behandlung mit FR96001M kein vermehrtes Zellsterben detektiert werden. Aus der Gesamtheit der durchgeführten Versuche lässt sich folgern, dass der rasche Export-inhibitorische Effekt von FR96001M nicht in der Induktion der Apoptose begründet ist. Auch wenn die Struktur von FR96001M keinem der aus der ChemBioNet-Substanzbibliothek identifizierten Exportinhibitoren gleicht, konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von FR96001M ebenso wie C3, C5 und C24 gegen das Cystein₅₂₈ von Crm1 gerichtet ist. Durch die vorliegende α , β -ungesättigte Carbonylgruppe könnte man, ähnlich wie bei LMB, eine Michael-Addition an dieses Cystein vermuten. Da diese Reaktion jedoch sehr schnell umkehrbar ist, kommt es wohl nicht zur Ausbildung kovalenter Bindungen, es sei denn das Endprodukt wäre dann sehr instabil. Nicht nur die physiologische Bedeutung von FR96001M für *Cyphellopsis anomala*, sondern ebenso die organismische DNA-Sequenz von Crm1 ist bislang nicht bekannt. Vermutlich unterscheidet sich diese hinlänglich von den Sequenzen des Säuger-Proteins. Möglich ist beispielsweise die Existenz einer Mutation an einer dem Cystein₅₂₈ des humanen Crm1 homologen Position, wodurch sich der Pilz einer Inhibition durch den eigenen Metaboliten FR96001M entziehen könnte. Dies müßte im Folgenden durch Sequenzanalysen des Pilzgenoms geklärt werden.

4.7 Bidirektionale Vektoren zur Verwendung in der Hochdurchsatzanalyse

Der Ergebnis-Gehalt könnte für jede Hochdurchsatzanalyse mit einem Translokations-Biosensor verdoppelt werden, wenn die verwendeten stabilen Zelllinien zwei unterschiedlich Fluoreszenz-markierte Biosensoren exprimieren würden. Neben dem doppelten Gehalt an Ergebnissen könnten zudem direkt solche Substanzen identifiziert werden, die spezifisch den Export von nur einem der Biosensoren inhibieren. Als Basis für diese Arbeiten wurde der bidirektionale Expressions-Vektor pBI verwendet. Zunächst wurde das GFP des RevNES- und SurvivinNES-Biosensors gegen BFP und mCherry ausgetauscht. Die entstandenen Biosensoren mCherry- und BFP-RevNES zeigten jeweils die typische Lokalisation an der Kernmembran und im Zytoplasma und akkumulierten nach Behandlung mit LMB nachweislich im Zellkern. Auch die entsprechenden SurvivinNES-Biosensoren zeigten im

Grundzustand die zu erwartende zytoplasmatische Lokalisation, allerdings akkumulierte der mCherry-SurvivinNES-Biosensor nach Behandlung mit LMB auch nach deutlich verlängerter Inkubationszeit nur unvollständig im Zellkern. BFP ist verglichen mit mCherry oder GFP durch eine schwächere Fluoreszenzintensität charakterisiert und zudem aufgrund der Anregung im UV-Bereich deutlich photoinstabiler (Shaner *et al.* 2005; Mena *et al.* 2006; Day *et al.* 2009). Zur Herstellung der bidirektionalen Vektoren wurden daher der mCherry-RevNES-Biosensor und der GFP-SurvivinNES-Biosensor jeweils in beide Positionen des pBI-Vektors integriert, wobei sich die Expressionsstärke als hiervon unabhängig herausstellte. Die pBI-Variante pBI-R_{Ch}S_{GFP} wurde schließlich zur Herstellung stabil exprimierender HtTa-Zellen herangezogen. Diese wurden auf der ArrayScanVTI®-Plattform hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für die Hochdurchsatzanalyse getestet. Dabei konnte ein deutlicher Unterschied in der Lokalisation beider Biosensoren im Vergleich von unbehandelten zu LMB-behandelten Zellen detektiert werden. Somit eignet sich die bidirektionale Expression zweier Biosensoren zur Verwendung in der Hochdurchsatzanalyse. Aufgrund der etwas schwächeren Fluoreszenzintensität des mCherry-Fusionsproteins, könnte das System über die Verwendung eines Fluoreszenzmarkers mit EGFP-ähnlicher Effizienz an dessen Stelle noch verbessert werden. Es sollte aber insgesamt auf ein moderates Level der Expression beider Translokationsbiosensoren geachtet werden, da generell eine Übersättigung der zellulären Crm1-Rezeptoren denkbar ist. Heger *et al.* konnten bereits die Konkurrenz verschiedener NES um die Bindung an Crm1 und in Folge davon eine Export-Verlangsamung des schwächeren NES nachweisen (Heger *et al.* 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde darüberhinaus die bidirektionale Expression eines Biosensors zusammen mit einem Zellkern-Marker etabliert. Dies könnte durch Ersetzen des Kernfärb-Schritts erhebliche Zeiteinsparungen, weniger Artefakte und Zellablösungen in der Hochdurchsatzanalyse ermöglichen. Hierzu wurden die fluoreszierende Histon-Variante H2B-BFP und der GFP-SurvivinNES-Biosensor jeweils in beide Integratstellen des pBI eingefügt und deren Expression nach Transfektion in HRL9-Zellen überprüft. Fluoreszenzmarkiertes H2B eignet sich nachweislich sehr gut für eine Kernmarkierung, da es den Bereich des Zellkerns sehr exakt wiedergibt (Kanda *et al.* 1998). Die Emissionsspektren von BFP und GFP sind ausreichend voneinander getrennt, so dass die Signale eindeutig unabhängig voneinander detektiert werden können (Heim *et al.* 1996). Allerdings erwies sich auch hier die Kopplung an BFP aufgrund dessen geringer Fluoreszenzintensität nicht als optimale Lösung. Über die Verwendung von mCherry oder anderen Fluoreszenzmarkern mit höherer Fluoreszenzintensität könnte eine Verbesserung der Anwendbarkeit in der Hochdurchsatzanalyse erreicht werden. Die Verwendbarkeit des H2B als Zellkernmarker in der bidirektionalen Expression konnte aber erfolgreich demonstriert werden. Die Markierung des Zellkerns durch H2B-BFP erlaubt zudem eine längere mikroskopische Detektion von

Lebendzellen, was bei Verwendung von Färbereagenzien wie Hoechst oftmals durch deren Zytotoxizität stark limitiert ist.

4.8 Interaktion von DDX3 mit HIV-1 Rev

Für den durch das RevNES-vermittelten Export von HIV-1 mRNA stellt das zelluläre DDX3-Protein einen essentiellen Kofaktor dar (Yedavalli *et al.* 2004). Um detaillierte Einblicke in die Regulation der Lokalisation von DDX3 zu gewinnen, sollten im Rahmen dieser Arbeit mögliche interne Transportsignale identifiziert und deren Auswirkung auf die biologische Funktion von DDX3 näher charakterisiert werden. Hierzu wurde die kodierende Sequenz von DDX3 komplett als auch in Teilstücken C-terminal mit GFP fusioniert in eukaryotischen Zellen exprimiert. DDX3 wurde einerseits als zytoplasmatisches Protein beschrieben (Yedavalli *et al.* 2004; Lai *et al.* 2008), was über Immunfluoreszenz-Mikroskopie sowie auch nach Expression des DDX3-GFP Fusionsproteins experimentell nachgewiesen wurde. Owsianka *et al.* hingegen wiesen DDX3 mit einem selbst hergestellten Antikörper hauptsächlich im Zellkern und lediglich zu einem geringen Teil im Zytoplasma nach (Owsianka *et al.* 1999). Die in eigenen Versuchen nachgewiesene zytoplasmatische Lokalisation von DDX3 sowie des DDX3 N-Terminus (DDX3Nterm) war sensitiv gegenüber einer Behandlung mit LMB. Die Zellen zeigten hiernach eine annähernde Gleichverteilung des jeweiligen GFP-Fusionsproteins in der gesamten Zelle, wobei die Fluoreszenz im Zellkern etwas schwächer ausgeprägt war. Dies steht im Einklang mit dem vorhergesagten Leuzin-reichen NES (As 9-21, (Yedavalli *et al.* 2004), dessen Aktivität folglich über die Interaktion mit Crm1 vermittelt wird (Nigg 1997). Die unvollständige Akkumulation von DDX3 im Zellkern nach Inkubation mit LMB ist möglicherweise auf einen weiteren Crm1-unabhängigen Export oder einen lediglich sehr schwachen Import zurückzuführen. Da die Bindung an Crm1 über die Aminosäuren 260-517 von DDX3 erfolgen soll (Yedavalli *et al.* 2004), könnte dies aber auch auf einen langsameren bzw. schwächeren NES-unabhängigen Export über Crm1 hindeuten. Da die LMB-Behandlung den RanGTP/GDP-Gradient (Kalab *et al.* 2002) nicht beeinflussen sollte, ist auch nicht von einer eingeschränkten Bewegung von Crm1 über die Kernmembran auszugehen. Die Lokalisation von DDX3 ohne das N-terminale NES (DDX3 Δ NES1) entspricht der des DDX3 nach Inkubation mit LMB. Bei der Expression des DDX3 N-Terminus ohne das NES (DDX3Nterm Δ NES1) ist die Kernakkumulation stärker ausgeprägt, was eine weitere Export-Determinante im C-terminalen Bereich des Proteins vermuten lässt. Das Molekulargewicht dieser Proteine lässt vermuten, dass lediglich das unfusionierte GFP frei in der Zelle diffundieren kann (Weis 2003; Rabut *et al.* 2004). Der C-Terminus des DDX3 (DDX3Cterm), über den die Bindung an Crm1 erfolgen soll (Yedavalli *et al.* 2004), wurde zur weiterführenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse nochmals

unterteilt. Die erste Hälfte des DDX3-C-Terminus (DDX3Cterm^{1st}half) liegt als GFP-Fusion gleichverteilt zwischen Zellkern und Zytoplasma in der Zelle vor, was auf die geringe Größe oder entsprechende Transportsignale zurückzuführen sein könnte. Die NES-unabhängige Bindung an Crm1 ist durchaus möglich, da ein Teil der hierfür als essentiell beschriebenen Aminosäuren (260-517) in dieser Mutante vorliegen (Yedavalli *et al.* 2004). Durch eine Vergrößerung des Fusionsproteins durch z.B. die Integration von GST könnte dabei die passive Diffusion sicher ausgeschlossen werden. Die zweite Hälfte des DDX3-C-Terminus (DDX3Cterm^{2nd}half) hingegen reichte sich deutlich im Kern an, möglicherweise bedingt durch die RS-ähnliche Domäne die analog zu RS-Domänen als NLS fungieren könnte (Kataoka *et al.* 1999). Die starke nukleäre Akkumulation dieser Deletionsmutante wird im Vergleich zur Lokalisation von DDX3Cterm besonders deutlich. Geht man nun von einem schwachen Export der ersten Hälfte des C-Terminus (DDX3Cterm^{1st}half) durch Crm1 und einem Import der zweiten Hälfte des C-Terminus (DDX3Cterm^{2nd}half) durch die RS-ähnliche Domäne aus, so erscheint die geringere Akkumulation des C-Terminus (DDX3Cterm) im Zellkern eine logische Folge daraus. 2008 beschrieben Lai *et al.* den Export von DDX3 über TAP, vermittelt durch den C-terminalen Bereich von DDX3 (As 536-661), wobei DDX3 aber für den RNA-Export als nicht essentiell beschrieben wurde (Lai *et al.* 2008). Da das entsprechende GFP-Fusionsprotein (DDX3Cterm^{2nd}half) jedoch verstärkt im Zellkern detektiert wurde, konnte dessen (TAP-vermittelter) Export zumindest im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht bestätigt werden. Geht man aber von einer ‚steady-state‘-Lokalisation aus, so ist ein TAP-vermittelter Export in Kombination mit einem vergleichsweise stärkeren durch die RS-ähnliche Domäne-vermittelten Import denkbar. Mit Hilfe der Mikroinjektionsanalyse könnte man die Transport-Eigenschaften der isolierten Signale dieser Proteine weiter analysieren. Zusammenfassend lassen nun die experimentellen Daten zur Lokalisation des NES-defizienten DDX3 (DDX3 Δ NES1) und der ersten Hälfte des DDX3-C-Terminus (DDX3Cterm^{1st}half) sowie deren Unempfindlichkeit gegenüber LMB auf das Vorhandensein einer weiteren Export-Determinante schließen. Hierauf weist auch die höhere LMB-Sensitivität des DDX3-N-Terminus im Vergleich zum Vollständigprotein hin. Die hierbei geringere Akkumulation des DDX3 im Zellkern kommt möglicherweise aufgrund eines Entgegenwirkens dieser C-terminalen Export-Determinante zustande. Allerdings wäre auch ein effizienterer Import des DDX3-N-Terminus denkbar. Die vornehmlich nukleäre Lokalisation der zweiten Hälfte des DDX3-C-Terminus (DDX3Cterm^{2nd}half) deutet auf eine, möglicherweise durch die RS-ähnliche Domäne vermittelte, aktive Import-Aktivität hin oder aber zumindest auf eine passive nukleäre Retention (Cazalla *et al.* 2002). Das bisher virtuell vorhergesagte NES des DDX3 konnte aufgrund der Sensitivität der diese Sequenz tragenden Proteine gegenüber LMB-Behandlung, wie auch schon von Yedavalli *et al.* gezeigt, bestätigt werden (Yedavalli *et al.* 2004). Durch Mikroinjektionsexperimente mit

rekombinantem GST-DDX3-NES-GFP-Substrat wurde die Aktivität auch im heterologen Kontext schließlich endgültig bestätigt. Aufgrund der äußerst schnell ablaufenden Translokation ins Zytoplasma von weniger als 10min nach Kerninjektion ist das DDX3NES1 in der Tat als schnelles NES zu klassifizieren (Heger *et al.* 2001). Verglichen mit dem von Güttler *et al.* postulierten NES-Konsensus besitzt das DDX3NES1 5 Φ -Aminosäuren, wobei die Positionen Φ_1 - Φ_5 optimal belegt sind (Güttler *et al.* 2010). Die Φ_0 -Aminosäure ist ebenfalls nahezu optimal belegt, wobei der Abstand zu Φ_1 statt aus idealerweise zwei lediglich aus einer Aminosäure gebildet wird. Somit steht auch die Sequenz in Einklang mit der überdurchschnittlich hohen Aktivität des DDX3NES1.

Da DDX3 einen essentiellen Kofaktor für den HIV-1 Rev-vermittelten Export von HIV-1 mRNA darstellt (Yedavalli *et al.* 2004), wurde des Weiteren die Interaktion dieser beiden Proteine anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen als auch mittels biochemischer Interaktionsstudien analysiert. Weder der N-Terminus von DDX3 (DDX3Nterm) noch der C-Terminus (DDX3Cterm) zeigten bei der Expression als GFP-Fusionsprotein eine nukleoläre Lokalisation. Bei der Kotransfektion mit HIV-1 Rev konnte hingegen für den C-Terminus eine veränderte Lokalisation detektiert werden. Das nun hinzugekommene nukleoläre Signal von DDX3Cterm war deckungsgleich mit dem Signal von HIV-1 Rev, was eine Bindung beider Proteine vermuten lässt. Diese Kolo-kalisation könnte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie weiter untersucht werden. Die im zellulären System nachgewiesene Interaktion mit HIV-1 Rev über den C-Terminus von DDX3 konnte in den biochemischen Interaktionsstudien allerdings nicht bestätigt werden, da hier für beide Mutanten eine Bindung an HIV-1 Rev nachgewiesen wurde. Möglicherweise konnte im zellulären Assay aufgrund des in der N-terminalen DDX3-Mutante vorhandenen NES keine Kolo-kalisation mit HIV-1 Rev detektiert werden. In dem Falle wäre der NES-vermittelte Export stärker als die Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Dies könnte des Weiteren durch Koexpression der NES-Deletionsmutante des DDX3 N-Terminus (DDX3Nterm Δ NES1) mit HIV-1 Rev überprüft werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demnach die direkte Interaktion des DDX3 mit dem HIV-1 Rev-Protein nachgewiesen werden. Die *in vitro*-Interaktion von DDX3 mit Crm1 wurde bereits beschrieben (Yedavalli *et al.* 2004). Aufgrund der direkten Interaktion beider Proteine und der Tatsache, das HIV-1 Rev über sein NES an Crm1 bindet (Kjems *et al.* 2000; Hauber 2001) und DDX3 über den Sequenzbereich von Aminosäure 260-571 (Yedavalli *et al.* 2004), ist eine Stabilisierung der HIV-1 Rev-Bindung an Crm1 durch DDX3 zu vermuten. Dies könnte durch eine Strukturaufklärung des ternären Komplexes aus DDX3, Crm1, HIV-1 Rev und viraler RNA bestätigt werden.

4.9 Zusammenfassung

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen und Makromolekülen unterliegt in eukaryotischen Zellen einer strengen Regulation. Insbesondere erlaubt die Kompartimentierung eukaryotischer Zellen in Zellkern und Zytoplasma den simultanen Ablauf räumlich getrennter biochemischer Reaktionen, und damit die unabhängige Regulation zellulärer Programme. Wie im Rahmen der Arbeit zusammengefasst, wird beispielsweise die Aktivität krebstherapeutisch relevanter Proteine, der so genannten nukleären Rezeptoren, maßgeblich durch Transportvorgänge reguliert (Stauber *et al.* 2010). Ebenso kann die Funktion des tumorrelevanten zytoprotektiven Proteins Survivin, nicht nur über dessen Expressionsinduktion durch den chemischen Botenstoff NO, sondern auch durch den aktiven Kerntransport maßgeblich beeinflusst werden (Engels *et al.* 2008; Fetz *et al.* 2009).

Da trotz intensiver Forschungsbemühungen bis dato die molekularen Details sowie die (patho)biologische Bedeutung von Kern-Zytoplasma-Transportprozessen noch immer nicht vollkommen verstanden sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein weiterer Fokus auf die Identifizierung von chemischen Transportinhibitoren gelegt. Das zu diesem Zweck entwickelte Translokations-Biosensor-System basiert auf der Kombination von autofluoreszierenden Proteinen sowie spezifisch ausgewählten Kernexport- und Kernimportsignalen (Fetz *et al.* 2009; Knauer *et al.* 2011). Damit konnte die Voraussetzung für eine systematische Identifizierung chemischer Transportmodulatoren (patho)biologischer Genprodukte geschaffen werden. Nach Etablierung geeigneter Zellmodelle, die effizient und stabil die Translokations-Biosensoren exprimieren, wurde die 17000 Substanzen umfassende Bibliothek der ChemBioNet-Initiative nach Kernexportinhibitoren mittels einer Fluoreszenzmikroskopie-basierten Hochdurchsatzanalyse-Plattform durchmustert. Nach Optimierung von Translokations-Algorithmen, welche eine zuverlässige automatisierte Erkennung von Zellkern und Zytoplasma erlauben, konnten acht neue niedermolekulare Kernexport-Inhibitoren identifiziert werden, die sich in der Stärke, der Geschwindigkeit sowie in der Beständigkeit der vermittelten Inhibition unterscheiden (Fetz *et al.* 2009). Die Aktivität der Inhibitoren konnte auf isolierten HIV-1 Rev- und Survivin-NES sowie auf den entsprechenden Volllängeproteinen mittels Mikroinjektionsexperimenten sowie durch umfassende *in vitro* und biochemische Methoden bestätigt werden. Zur Untersuchung der funktionellen Einheiten der Inhibitoren wurden homologe Substanzen auf Ihre Aktivität hin getestet. Dabei konnten für die Aktivität wichtige chemische Gruppen definiert werden. Alle Substanzen stellen neue Inhibitoren des Crm1-abhängigen Exports dar, und zeigen keine nachweisbare NES-Selektivität. Interessanterweise konnte jedoch eine zytotoxische und Apoptose-induzierende Wirkung auf verschiedene Krebszellarten festgestellt werden. Da diese Wirkung unabhängig vom p53-Status der Tumorzellen ist und die Inhibitoren C3 und

C5 signifikant weniger die Vitalität nicht-maligner humaner Zellen beeinträchtigen, wurden diese Substanzen als internationales Patent angemeldet (Stauber *et al.* 2010). Da der nukleäre Export besonders für Tumorzellen einen wichtigen Überlebenssignalweg darstellt, könnte dessen reversible Hemmung ausgenutzt werden, um besonders in Kombination mit gängigen Krebstherapien (Stauber *et al.* 2012) eine therapeutisch relevante Tumordinhibition zu erzeugen. Vor der Durchführung umfassender (prä)klinischer Studien, müssen jedoch die Bioverfügbarkeit sowie die Pharmakokinetik der Inhibitoren umfassend untersucht und optimiert werden.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der neuen Exportinhibitoren ist auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten zu sehen, da auch die Aktivität des essentiellen HIV-1 Rev-Proteins inhibiert wird. Zusätzlich konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass der zelluläre Kofaktor des Crm1-abhängigen Exports des HIV-1 Rev-Proteins, die RNA-Helikase DDX3, ein eigenes NES enthält. Der Nachweis einer direkten Interaktion des HIV-1 Rev- mit dem DDX3-Protein impliziert, dass multiple Angriffstellen für chemische Modulatoren hinsichtlich einer antiviralen Therapie gegeben sind.

Da die Vielfalt des chemischen Strukturraums es unmöglich macht diesen experimentell vollständig zu durchmustern, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Naturstoffe als viel versprechende Wirkstoffquelle untersucht. Naturstoffe gelten als privilegierte Strukturen, da sie durch die evolutionäre Selektion bereits auf deren Wirkung gegenüber Proteinen optimiert wurden. Eine einzigartige Quelle bioaktiver Substanzen stellen die aus Pilzen gewonnenen Extrakte des IBWF in Kaiserslautern dar. Um zukünftig umfassend bioaktive Substanzen aus diesen hochkomplexen Stoffgemischen experimentell identifizieren zu können, wurde eine Fluoreszenzmikroskopie-basierte Hochdurchsatzanalyse-Plattform am *Mainz Screening Center* (MSC) etabliert. Damit konnte bereits ein weiterer, bisher unbekannter Exportinhibitor aus *Cyphellopsis anomala* identifiziert werden. Neben einer Anwendung dieser Substanz als chemisches Werkzeug zur Aufklärung der Regulation von Transportvorgängen, stellt sich auch die evolutionsbiologische relevante Frage wie es dem Pilzproduzenten gelingt die Blockierung des eigenen Kernexports zu umgehen.

Weiterführende Projekte müssen sich neben der Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen der gefundenen Substanzen mit der Identifizierung spezifischer chemischer „Funktionseinheiten“ beschäftigen. Neben einem verbesserten mechanistischen Verständnis von Transportvorgängen stellen die erarbeiteten Transportinhibitoren Vorstufen zur Weiterentwicklung möglicher Wirkstoffe dar. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Technologie-Plattform und molekularen Werkzeuge stellen darüber hinaus eine wichtige Voraussetzung dar, um eine systematische Suche nach möglichen Wirkstoffen im Forschungsfeld der „Chemischen Biomedizin“ voranzutreiben.

5 Referenzen

- Abraham, V. C., Taylor, D. L., et al. (2004). "High content screening applied to large-scale cell biology." Trends Biotechnol **22**(1): 15-22.
- Acehan, D., Jiang, X., et al. (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." Mol Cell **9**(2): 423-32.
- Adachi, Y. and Yanagida, M. (1989). "Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery." J Cell Biol **108**(4): 1195-207.
- Adida, C., Crotty, P. L., et al. (1998). "Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation." Am J Pathol **152**(1): 43-9.
- Alanine, A., Nettekoven, M., et al. (2003). "Lead generation--enhancing the success of drug discovery by investing in the hit to lead process." Comb Chem High Throughput Screen **6**(1): 51-66.
- Allen, N. P., Huang, L., et al. (2001). "Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins." J Biol Chem **276**(31): 29268-74.
- Almholt, D. L., Loechel, F., et al. (2004). "Nuclear export inhibitors and kinase inhibitors identified using a MAPK-activated protein kinase 2 redistribution screen." Assay Drug Dev Technol **2**(1): 7-20.
- Altieri, D. C. (2001). "The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy." Trends Mol Med **7**(12): 542-7.
- Altieri, D. C. (2003). "Validating survivin as a cancer therapeutic target." Nat Rev Cancer **3**(1): 46-54.
- Altieri, D. C. (2006). "Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm." Mol Cancer Ther **5**(3): 478-82.
- Ambrosini, G., Adida, C., et al. (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat Med **3**(8): 917-21.
- Ambrosini, G., Adida, C., et al. (1998). "Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting." J Biol Chem **273**(18): 11177-82.
- Anderson, F. S. and Murphy, R. C. (1976). "Isocratic separation of some purine nucleotide, nucleoside, and base metabolites from biological extracts by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr **121**(2): 251-62.
- Arnautov, A., Azuma, Y., et al. (2005). "Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells." Nat Cell Biol **7**(6): 626-32.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-8.
- Askjaer, P., Bachi, A., et al. (1999). "RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase." Mol Cell Biol **19**(9): 6276-85.
- Bayliss, R., Leung, S. W., et al. (2002). "Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats." Embo J **21**(12): 2843-53.
- Bednenko, J., Cingolani, G., et al. (2003). "Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel." Traffic **4**(3): 127-35.
- Benzeno, S., Lu, F., et al. (2006). "Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1." Oncogene **25**(47): 6291-303.
- Bischoff, F. R., Klebe, C., et al. (1994). "RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2587-91.
- Bleicher, K. H., Bohm, H. J., et al. (2003). "Hit and lead generation: beyond high-throughput screening." Nat Rev Drug Discov **2**(5): 369-78.
- Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975). "Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma." J Cell Biol **67**(3): 835-51.

- Blum, R., Jacob-Hirsch, J., et al. (2006). "Suppression of survivin expression in glioblastoma cells by the Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid promotes caspase-dependent apoptosis." Mol Cancer Ther **5**(9): 2337-47.
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., et al. (1996). "Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay." Mol Cell Biol **16**(8): 4207-14.
- Bonazzi, S., Guttinger, S., et al. (2007). "Total synthesis, configuration, and biological evaluation of anguinomycin C." Angew Chem Int Ed Engl **46**(45): 8707-10.
- Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., et al. (1999). "Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells." J Biol Chem **274**(33): 22932-40.
- Boulon, S., Verheggen, C., et al. (2004). "PHAX and CRM1 are required sequentially to transport U3 snoRNA to nucleoli." Mol Cell **16**(5): 777-87.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., et al. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7297-301.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Breinbauer, R., Vetter, I. R., et al. (2002). "From protein domains to drug candidates-natural products as guiding principles in the design and synthesis of compound libraries." Angew Chem Int Ed Engl **41**(16): 2879-90.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., et al. (1996). "Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative." Cancer Res **56**(1): 100-4.
- Caceres, J. F., Sreaton, G. R., et al. (1998). "A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm." Genes Dev **12**(1): 55-66.
- Carmody, S. R. and Wentz, S. R. (2009). "mRNA nuclear export at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 12): 1933-7.
- Carvalho, A., Carmona, M., et al. (2003). "Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells." J Cell Sci **116**(Pt 14): 2987-98.
- Cazalla, D., Zhu, J., et al. (2002). "Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins." Mol Cell Biol **22**(19): 6871-82.
- Ceballos-Cancino, G., Espinosa, M., et al. (2007). "Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin." Oncogene **26**(54): 7569-75.
- Chan, J. Y., Huang, S. M., et al. (2008). "The transactivation domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overlaps its nuclear shuttling domain." Int J Biochem Cell Biol **40**(10): 2078-89.
- Choi, K. S., Lee, T. H., et al. (2003). "Ribozyme-mediated cleavage of the human survivin mRNA and inhibition of antiapoptotic function of survivin in MCF-7 cells." Cancer Gene Ther **10**(2): 87-95.
- Colnaghi, R., Connell, C. M., et al. (2006). "Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin." J Biol Chem **281**(44): 33450-6.
- Conti, E., Uy, M., et al. (1998). "Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha." Cell **94**(2): 193-204.
- Cooper, G. M. (2000). The Cell A Molecular Approach, second edition, Sinauer Associates Inc.
- Cordin, O., Banroques, J., et al. (2006). "The DEAD-box protein family of RNA helicases." Gene **367**: 17-37.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., et al. (2002). "Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex." J Cell Biol **158**(5): 915-27.
- Cullen, B. R. (2003). "Nuclear mRNA export: insights from virology." Trends Biochem Sci **28**(8): 419-24.
- Cullen, B. R. (2003). "Nuclear RNA export." J Cell Sci **116**(Pt 4): 587-97.

- D'Agostino, D. M., Ciminale, V., et al. (1995). "Intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: involvement of continued rRNA synthesis in nuclear retention." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(9): 1063-71.
- D'Angelo, M. A. and Hetzer, M. W. (2008). "Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes." *Trends Cell Biol* **18**(10): 456-66.
- D'Angelo, M. A., Raices, M., et al. (2009). "Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells." *Cell* **136**(2): 284-95.
- Daelemans, D., Afonina, E., et al. (2002). "A synthetic HIV-1 Rev inhibitor interfering with the CRM1-mediated nuclear export." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14440-5.
- Daelemans, D., Costes, S. V., et al. (2005). "Kinetic and molecular analysis of nuclear export factor CRM1 association with its cargo in vivo." *Mol Cell Biol* **25**(2): 728-39.
- Dasso, M. (2005). "Cell biology: new cog for a familiar machine." *Nature* **435**(7044): 899-900.
- Dawson, J., Donev, A. "Local Compound Storage: Practical and Statistical Implications." from www.spod-technology.com/pdf/astrazeneca_storagepodpaper_040407.pdf.
- Day, R. N. and Davidson, M. W. (2009). "The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging." *Chem Soc Rev* **38**(10): 2887-921.
- Declercq, W., Vanden Berghe, T., et al. (2009). "RIP kinases at the crossroads of cell death and survival." *Cell* **138**(2): 229-32.
- Deininger, M., Buchdunger, E., et al. (2005). "The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia." *Blood* **105**(7): 2640-53.
- Denning, D. P. and Rexach, M. F. (2007). "Rapid evolution exposes the boundaries of domain structure and function in natively unfolded FG nucleoporins." *Mol Cell Proteomics* **6**(2): 272-82.
- Dong, X., Biswas, A., et al. (2009). "Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1." *Nature* **458**(7242): 1136-41.
- Doolittle, H., Morel, A., et al. (2010). "Survivin-directed Anticancer Therapies - a Review of Pre-clinical Data and Early-phase Clinical Trials." *European Oncology* **6**(1): 10-4.
- Doolittle, H., Morel, A., Talbot, D. (2010). "Survivin-directed Anticancer Therapies - A Review of Pre-clinical Data and Early-phase Clinical Trials." *European Oncology* **6**(1): 10-14.
- Druker, B. J., Tamura, S., et al. (1996). "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells." *Nat Med* **2**(5): 561-6.
- Duffy, M. J., O'Donovan, N., et al. (2007). "Survivin: a promising tumor biomarker." *Cancer Lett* **249**(1): 49-60.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Engels, K., Knauer, S. K., et al. (2008). "NO signaling confers cytoprotectivity through the survivin network in ovarian carcinomas." *Cancer Res* **68**(13): 5159-66.
- Engelsma, D., Bernad, R., et al. (2004). "Supraphysiological nuclear export signals bind CRM1 independently of RanGTP and arrest at Nup358." *Embo J* **23**(18): 3643-52.
- Englmeier, L., Fornerod, M., et al. (2001). "RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates." *EMBO Rep* **2**(10): 926-32.
- Ernoul-Lange, M., Wilczynska, A., et al. (2009). "Nucleocytoplasmic traffic of CPEB1 and accumulation in Crm1 nucleolar bodies." *Mol Biol Cell* **20**(1): 176-87.
- Fagotto, F., Gluck, U., et al. (1998). "Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin." *Curr Biol* **8**(4): 181-90.
- Fan, X. C. and Steitz, J. A. (1998). "HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15293-8.
- Faustino, R. S., Nelson, T. J., et al. (2007). "Nuclear transport: target for therapy." *Clin Pharmacol Ther* **81**(6): 880-6.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., et al. (2004). "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer." *Nat Rev Drug Discov* **3**(5): 391-400.
- Fetz, V., Bier, C., et al. (2009). "Inducible NO synthase confers chemoresistance in head and neck cancer by modulating survivin." *Int J Cancer* **124**(9): 2033-41.

- Fetz, V., Knauer, S. K., et al. (2009). "Translocation Biosensors - Cellular System Integrators to Dissect CRM1-Dependent Nuclear Export by Chemicogenomics." Sensors **9**: 5423-5445.
- Fleenor, D. E. and Kaufman, R. E. (1993). "Characterization of the DNase I hypersensitive site 3' of the human beta globin gene domain." Blood **81**(10): 2781-90.
- Fontes, M. R., Teh, T., et al. (2003). "Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha." J Biol Chem **278**(30): 27981-7.
- Forgues, M., Difilippantonio, M. J., et al. (2003). "Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles." Mol Cell Biol **23**(15): 5282-92.
- Fornerod, M. and Ohno, M. (2002). "Exportin-mediated nuclear export of proteins and ribonucleoproteins." Results Probl Cell Differ **35**: 67-91.
- Fornerod, M., Ohno, M., et al. (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." Cell **90**(6): 1051-60.
- Frey, S. and Gorlich, D. (2009). "FG/FxFG as well as GLFG repeats form a selective permeability barrier with self-healing properties." Embo J **28**(17): 2554-67.
- Fridman, J. S. and Lowe, S. W. (2003). "Control of apoptosis by p53." Oncogene **22**(56): 9030-40.
- Fried, H. and Kutay, U. (2003). "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory." Cell Mol Life Sci **60**(8): 1659-88.
- Fukuda, S. and Pelus, L. M. (2006). "Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues." Mol Cancer Ther **5**(5): 1087-98.
- Fukumura, D., Kashiwagi, S., et al. (2006). "The role of nitric oxide in tumour progression." Nat Rev Cancer **6**(7): 521-34.
- Fukumura, D., Xavier, R., et al. (1998). "Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells." Cell **94**(6): 715-25.
- Garbelli, A., Radi, M., et al. (2011). "Targeting the Human DEAD-Box Polypeptide 3 (DDX3) RNA Helicase as a Novel Strategy to Inhibit Viral Replication." Curr Med Chem **18**(20): 3015-27.
- Gerth, K., Schummer, D., et al. (1995). "Ratjadon: a new antifungal compound from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria) production, physio-chemical and biological properties." J Antibiot (Tokyo) **48**(9): 973-6.
- Gobeil, S., Boucher, C. C., et al. (2001). "Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases." Cell Death Differ **8**(6): 588-94.
- Gorlich, D. and Kutay, U. (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 607-60.
- Gorlich, D. and Mattaj, I. W. (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-8.
- Grignani, F., Kinsella, T., et al. (1998). "High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein." Cancer Res **58**(1): 14-9.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., et al. (2005). "The nuclear lamina comes of age." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 21-31.
- Guengerich, F. P. (2006). "Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity." Aaps J **8**(1): E101-11.
- Guicciardi, M. E. and Gores, G. J. (2009). "Life and death by death receptors." Faseb J **23**(6): 1625-37.
- Guttler, T., Madl, T., et al. (2010). "NES consensus redefined by structures of PKI-type and Rev-type nuclear export signals bound to CRM1." Nat Struct Mol Biol.
- Gyurkocza, B., Plescia, J., et al. (2006). "Antileukemic activity of shepherdin and molecular diversity of hsp90 inhibitors." J Natl Cancer Inst **98**(15): 1068-77.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.

- Hamamoto, T., Gunji, S., et al. (1983). "Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization." J Antibiot (Tokyo) **36**(6): 639-45.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
- Hansen, J. B., Fisker, N., et al. (2008). "SPC3042: a proapoptotic survivin inhibitor." Mol Cancer Ther **7**(9): 2736-45.
- Harper, J. V. and Brooks, G. (2005). "The mammalian cell cycle: an overview." Methods Mol Biol **296**: 113-53.
- Harris, M. E. and Hope, T. J. (2000). "RNA export: insights from viral models." Essays Biochem **36**: 115-27.
- Hauber, J. (2001). "Nuclear export mediated by the Rev/Rex class of retroviral Trans-activator proteins." Curr Top Microbiol Immunol **259**: 55-76.
- Hayakawa, Y., Sohda, K. Y., et al. (1995). "Anguinomycins C and D, new antitumor antibiotics with selective cytotoxicity against transformed cells." J Antibiot (Tokyo) **48**(9): 954-61.
- Heger, P., Lohmaier, J., et al. (2001). "Qualitative highly divergent nuclear export signals can regulate export by the competition for transport cofactors in vivo." Traffic **2**(8): 544-55.
- Heid, C. A., Stevens, J., et al. (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-94.
- Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996). "Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer." Curr Biol **6**(2): 178-82.
- Henderson, B. R. and Eleftheriou, A. (2000). "A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals." Exp Cell Res **256**(1): 213-24.
- Henkels, K. M. and Turchi, J. J. (1997). "Induction of apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines." Cancer Res **57**(20): 4488-92.
- Hogbom, M., Collins, R., et al. (2007). "Crystal structure of conserved domains 1 and 2 of the human DEAD-box helicase DDX3X in complex with the mononucleotide AMP." J Mol Biol **372**(1): 150-9.
- Holaska, J. M., Black, B. E., et al. (2001). "Calreticulin Is a receptor for nuclear export." J Cell Biol **152**(1): 127-40.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., et al. (1989). "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension." Gene **77**(1): 61-8.
- Hotchkiss, R. S. and Nicholson, D. W. (2006). "Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis." Nat Rev Immunol **6**(11): 813-22.
- Hubel, K., Lessmann, T., et al. (2008). "Chemical biology--identification of small molecule modulators of cellular activity by natural product inspired synthesis." Chem Soc Rev **37**(7): 1361-74.
- Hunter, A. M., LaCasse, E. C., et al. (2007). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets." Apoptosis **12**(9): 1543-68.
- Hutten, S. and Kehlenbach, R. H. (2007). "CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond." Trends Cell Biol **17**(4): 193-201.
- Iizuka, D., Ogura, A., et al. (2008). "Purvalanol A induces apoptosis and downregulation of antiapoptotic proteins through abrogation of phosphorylation of JAK2/STAT3 and RNA polymerase II." Anticancer Drugs **19**(6): 565-72.
- Islam, A., Kageyama, H., et al. (2000). "Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B." Med Pediatr Oncol **35**(6): 550-3.

- Jans, D. A., Xiao, C. Y., et al. (2000). "Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport?" Bioessays **22**(6): 532-44.
- Jiang, X., Wilford, C., et al. (2001). "Participation of Survivin in mitotic and apoptotic activities of normal and tumor-derived cells." J Cell Biochem **83**(2): 342-54.
- Junttila, M. R. and Evan, G. I. (2009). "p53--a Jack of all trades but master of none." Nat Rev Cancer **9**(11): 821-9.
- Kalab, P., Weis, K., et al. (2002). "Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts." Science **295**(5564): 2452-6.
- Kalesse, M., Christmann, M., et al. (2001). "The chemistry and biology of ratjadone." Chembiochem **2**(9): 709-14.
- Kalesse, M., Christmann, M. (2002). "The Chemistry and Biology of the Leptomycin Family." Synthesis **8**: 981.
- Kalland, K. H., Szilvay, A. M., et al. (1994). "The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear compartments." Mol Cell Biol **14**(11): 7436-44.
- Kamizono, J., Nagano, S., et al. (2005). "Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus exhibits cancer-specific and efficient viral replication." Cancer Res **65**(12): 5284-91.
- Kanda, T., Sullivan, K. F., et al. (1998). "Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells." Curr Biol **8**(7): 377-85.
- Kataoka, N., Bachorik, J. L., et al. (1999). "Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins." J Cell Biol **145**(6): 1145-52.
- Kau, T. R., Schroeder, F., et al. (2003). "A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells." Cancer Cell **4**(6): 463-76.
- Kau, T. R. and Silver, P. A. (2003). "Nuclear transport as a target for cell growth." Drug Discov Today **8**(2): 78-85.
- Kau, T. R., Way, J. C., et al. (2004). "Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention." Nat Rev Cancer **4**(2): 106-17.
- Kaufmann, S. H. and Vaux, D. L. (2003). "Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance." Oncogene **22**(47): 7414-30.
- Kavanagh, S. J., Schulz, T. C., et al. (2005). "A family of RS domain proteins with novel subcellular localization and trafficking." Nucleic Acids Res **33**(4): 1309-22.
- Kehlenbach, R. H., Assheuer, R., et al. (2001). "Stimulation of nuclear export and inhibition of nuclear import by a Ran mutant deficient in binding to Ran-binding protein 1." J Biol Chem **276**(17): 14524-31.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kim, I. S., Kim, D. H., et al. (2000). "Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53." J Biol Chem **275**(30): 23139-45.
- Kjems, J. and Askjaer, P. (2000). "Rev protein and its cellular partners." Adv Pharmacol **48**: 251-98.
- Knauer, S. K., Bier, C., et al. (2006). "The Survivin-Crm1 interaction is essential for chromosomal passenger complex localization and function." EMBO Rep **7**(12): 1259-65.
- Knauer, S. K., Fetz, V., et al. (2011). "Bioassays to monitor Taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors." PLoS One **6**(5): e18253.
- Knauer, S. K., Kramer, O. H., et al. (2007). "Nuclear export is essential for the tumor-promoting activity of survivin." Faseb J **21**(1): 207-16.
- Knauer, S. K., Moodt, S., et al. (2005). "Translocation biosensors to study signal-specific nucleo-cytoplasmic transport, protease activity and protein-protein interactions." Traffic **6**(7): 594-606.
- Kobayashi, M., Higuchi, K., Murakami, N., Tajima, H., Aoki, S. (1997). "Callystatin A, a potent cytotoxic polyketide from the marine sponge, *Callyspongia truncata* " Tetrahedron Letters **38**(16): 2859-2862

- Kohler, A. and Hurt, E. (2007). "Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 761-73.
- Kohler, M., Speck, C., et al. (1999). "Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import." Mol Cell Biol **19**(11): 7782-91.
- Koster, M., Lykke-Andersen, S., et al. (2003). "Ratjadones inhibit nuclear export by blocking CRM1/exportin 1." Exp Cell Res **286**(2): 321-31.
- Koyama, M. and Matsuura, Y. (2010). "An allosteric mechanism to displace nuclear export cargo from CRM1 and RanGTP by RanBP1." Embo J **29**(12): 2002-13.
- Kubota, S., Siomi, H., et al. (1989). "Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein." Biochem Biophys Res Commun **162**(3): 963-70.
- Kudo, N., Matsumori, N., et al. (1999). "Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9112-7.
- Kudo, N., Wolff, B., et al. (1998). "Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1." Exp Cell Res **242**(2): 540-7.
- Kufe, D. W., Pollock, R.E., Weichselbaum R.R., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E. (2003). Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition, BC Decker Inc.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., et al. (1997). "Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor." Cell **90**(6): 1061-71.
- Kutay, U. and Guttinger, S. (2005). "Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak." Trends Cell Biol **15**(3): 121-4.
- Kutay, U., Lipowsky, G., et al. (1998). "Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor." Mol Cell **1**(3): 359-69.
- Kzhyshkowska, J., Schutt, H., et al. (2001). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG) box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1." Biochem J **358**(Pt 2): 305-14.
- la Cour, T., Gupta, R., et al. (2003). "NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals." Nucleic Acids Res **31**(1): 393-6.
- la Cour, T., Kiemer, L., et al. (2004). "Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals." Protein Eng Des Sel **17**(6): 527-36.
- LaCasse, E. C., Baird, S., et al. (1998). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer." Oncogene **17**(25): 3247-59.
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., et al. (2008). "IAP-targeted therapies for cancer." Oncogene **27**(48): 6252-75.
- Lai, M. C., Lee, Y. H., et al. (2008). "The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control." Mol Biol Cell **19**(9): 3847-58.
- Lain, S., Midgley, C., et al. (1999). "An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs." Exp Cell Res **248**(2): 457-72.
- Lain, S., Xirodimas, D., et al. (1999). "Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function." Exp Cell Res **253**(2): 315-24.
- Lange, A., McLane, L. M., et al. (2010). "Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal." Traffic **11**(3): 311-23.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., et al. (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **11**(1): 9-22.
- Lens, S. M., Vader, G., et al. (2006). "The case for Survivin as mitotic regulator." Curr Opin Cell Biol **18**(6): 616-22.
- Leo, A., Hansch, C., Elkins, D. (1971). "Partition coefficients and their uses." Chemical Reviews **71**(6).
- Li, B., Fan, J., et al. (2006). "Suppression of colorectal tumor growth by regulated survivin targeting." J Mol Med (Berl) **84**(12): 1077-86.
- Li, F. (2005). "Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis." Br J Cancer **92**(2): 212-6.

- Li, F., Ambrosini, G., et al. (1998). "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin." Nature **396**(6711): 580-4.
- Lichtman, J. W. and Conchello, J. A. (2005). "Fluorescence microscopy." Nat Methods **2**(12): 910-9.
- Lindsay, M. E., Holaska, J. M., et al. (2001). "Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export." J Cell Biol **153**(7): 1391-402.
- Lipinski, C. and Hopkins, A. (2004). "Navigating chemical space for biology and medicine." Nature **432**(7019): 855-61.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., et al. (1997). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Adv Drug Deliv Rev **23**(1-3): 3-25.
- Lisurek, M., Rupp, B., et al. (2010). "Design of chemical libraries with potentially bioactive molecules applying a maximum common substructure concept." Mol Divers **14**(2): 401-8.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). Molecular Cell Biology. New York, W.H. Freeman.
- Lopez, R. A., Goodman, A. B., et al. (2007). "The anticancer activity of the transcription inhibitor terameprocol (meso-tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid) formulated for systemic administration." Anticancer Drugs **18**(8): 933-9.
- Luo, M. J. and Reed, R. (1999). "Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14937-42.
- Madrid, A. S. and Weis, K. (2006). "Nuclear transport is becoming crystal clear." Chromosoma **115**(2): 98-109.
- Maga, G., Falchi, F., et al. (2008). "Pharmacophore modeling and molecular docking led to the discovery of inhibitors of human immunodeficiency virus-1 replication targeting the human cellular aspartic acid-glutamic acid-alanine-aspartic acid box polypeptide 3." J Med Chem **51**(21): 6635-8.
- Maga, G., Falchi, F., et al. (2011). "Toward the Discovery of Novel Anti-HIV Drugs. Second-Generation Inhibitors of the Cellular ATPase DDX3 with Improved Anti-HIV Activity: Synthesis, Structure-Activity Relationship Analysis, Cytotoxicity Studies, and Target Validation." ChemMedChem **6**(8): 1371-89.
- Malim, M. H., Hauber, J., et al. (1989). "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA." Nature **338**(6212): 254-7.
- Meissner, T., Krause, E., et al. (2004). "Ratjadone and leptomycin B block CRM1-dependent nuclear export by identical mechanisms." FEBS Lett **576**(1-2): 27-30.
- Meli, M., Pennati, M., et al. (2006). "Small-molecule targeting of heat shock protein 90 chaperone function: rational identification of a new anticancer lead." J Med Chem **49**(26): 7721-30.
- Mena, M. A., Treynor, T. P., et al. (2006). "Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library." Nat Biotechnol **24**(12): 1569-71.
- Mesri, M., Wall, N. R., et al. (2001). "Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus." J Clin Invest **108**(7): 981-90.
- Meyer, B. E. and Malim, M. H. (1994). "The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm." Genes Dev **8**(13): 1538-47.
- Michael, W. M., Choi, M., et al. (1995). "A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway." Cell **83**(3): 415-22.
- Michael, W. M., Eder, P. S., et al. (1997). "The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein." Embo J **16**(12): 3587-98.
- Mingot, J. M., Bohnsack, M. T., et al. (2004). "Exportin 7 defines a novel general nuclear export pathway." Embo J **23**(16): 3227-36.
- Mingot, J. M., Kostka, S., et al. (2001). "Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export." Embo J **20**(14): 3685-94.

- Miyashita, K., Shiraki, K., et al. (2006). "The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis." *Int J Mol Med* **18**(2): 249-56.
- Miyazaki, Y., Nosaka, T., et al. (1996). "The post-transcriptional regulator Rev of HIV: implications for its interaction with the nucleolar protein B23." *Biochimie* **78**(11-12): 1081-6.
- Monecke, T., Guttler, T., et al. (2009). "Crystal structure of the nuclear export receptor CRM1 in complex with Snurportin1 and RanGTP." *Science* **324**(5930): 1087-91.
- Monovich, L., Koch, K. A., et al. (2009). "Suppression of HDAC nuclear export and cardiomyocyte hypertrophy by novel irreversible inhibitors of CRM1." *Biochim Biophys Acta* **1789**(5): 422-31.
- Mosammaparast, N. and Pemberton, L. F. (2004). "Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators." *Trends Cell Biol* **14**(10): 547-56.
- Mounkes, L. C., Zhong, W., et al. (1998). "Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **273**(40): 26164-70.
- Murakami, N., Ye, Y., et al. (2002). "New Rev-transport inhibitor with anti-HIV activity from *Valerianae Radix*." *Bioorg Med Chem Lett* **12**(20): 2807-10.
- Mutka, S. C., Yang, W. Q., et al. (2009). "Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo." *Cancer Res* **69**(2): 510-7.
- Nakahara, T., Takeuchi, M., et al. (2007). "YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts." *Cancer Res* **67**(17): 8014-21.
- Nakielny, S., Shaikh, S., et al. (1999). "Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain." *Embo J* **18**(7): 1982-95.
- Nakielny, S., Siomi, M. C., et al. (1996). "Transportin: nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway." *Exp Cell Res* **229**(2): 261-6.
- Nemergut, M. E., Lindsay, M. E., et al. (2002). "Ran-binding protein 3 links Crm1 to the Ran guanine nucleotide exchange factor." *J Biol Chem* **277**(20): 17385-8.
- Newlands, E. S., Rustin, G. J., et al. (1996). "Phase I trial of elactocin." *Br J Cancer* **74**(4): 648-9.
- Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." *Nature* **386**(6627): 779-87.
- Nosaka, T., Takamatsu, T., et al. (1993). "Cytotoxic activity of rev protein of human immunodeficiency virus type 1 by nucleolar dysfunction." *Exp Cell Res* **209**(1): 89-102.
- O'Connor, D. S., Grossman, D., et al. (2000). "Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13103-7.
- Ohshima, T., Nakajima, T., et al. (1999). "CRM1 mediates nuclear export of nonstructural protein 2 from parvovirus minute virus of mice." *Biochem Biophys Res Commun* **264**(1): 144-50.
- Oka, M., Asally, M., et al. (2010). "The mobile FG nucleoporin Nup98 is a cofactor for Crm1-dependent protein export." *Mol Biol Cell* **21**(11): 1885-96.
- Olie, R. A., Simoes-Wust, A. P., et al. (2000). "A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy." *Cancer Res* **60**(11): 2805-9.
- Owsianka, A. M. and Patel, A. H. (1999). "Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3." *Virology* **257**(2): 330-40.
- Pante, N. and Kann, M. (2002). "Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm." *Mol Biol Cell* **13**(2): 425-34.
- Paraskeva, E., Izaurralde, E., et al. (1999). "CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm." *J Cell Biol* **145**(2): 255-64.
- Pecot, C. V., Calin, G. A., et al. (2011). "RNA interference in the clinic: challenges and future directions." *Nat Rev Cancer* **11**(1): 59-67.
- Pemberton, L. F. and Paschal, B. M. (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." *Traffic* **6**(3): 187-98.

- Pennati, M., Campbell, A. J., et al. (2005). "Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: a possible role for survivin down-regulation." *Mol Cancer Ther* **4**(9): 1328-37.
- Pepperkok, R. and Ellenberg, J. (2006). "High-throughput fluorescence microscopy for systems biology." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(9): 690-6.
- Perry, R. P. and Kelley, D. E. (1970). "Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species." *J Cell Physiol* **76**(2): 127-39.
- Peters, R. (2009). "Translocation through the nuclear pore: Kaps pave the way." *Bioessays* **31**(4): 466-77.
- Petosa, C., Schoehn, G., et al. (2004). "Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex." *Mol Cell* **16**(5): 761-75.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., et al. (1996). "A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway." *Cell* **86**(6): 985-94.
- Poon, I. K. and Jans, D. A. (2005). "Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation?" *Traffic* **6**(3): 173-86.
- Rabut, G., Doye, V., et al. (2004). "Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells." *Nat Cell Biol* **6**(11): 1114-21.
- Rasmussen, D. H. and MacKenzie, A. P. (1968). "Phase diagram for the system water-dimethylsulphoxide." *Nature* **220**(5174): 1315-7.
- Rasser, H. F. (2001). Neue antimikrobielle und weitere Sekundärmetabolite aus Submerskulturen von verschiedenen Basidiomyceten. Kaiserslautern, Technische Universität. Dr.
- Reya, T., Morrison, S. J., et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**(6859): 105-11.
- Richard, N., Iacampo, S., et al. (1994). "HIV-1 Rev is capable of shuttling between the nucleus and cytoplasm." *Virology* **204**(1): 123-31.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., et al. (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." *Cell* **64**(3): 615-23.
- Rocak, S. and Linder, P. (2004). "DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(3): 232-41.
- Rodel, F., Frey, B., et al. (2008). "Survivin antisense oligonucleotides effectively radiosensitize colorectal cancer cells in both tissue culture and murine xenograft models." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **71**(1): 247-55.
- Rodriguez, J. A., Span, S. W., et al. (2002). "CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin." *Exp Cell Res* **275**(1): 44-53.
- Rosenberg, B., VanCamp, L., et al. (1969). "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents." *Nature* **222**(5191): 385-6.
- Rosenblum, J. S., Pemberton, L. F., et al. (1998). "Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein." *J Cell Biol* **143**(4): 887-99.
- Rosorius, O., Heger, P., et al. (1999). "Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells." *Biotechniques* **27**(2): 350-5.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., et al. (2000). "The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism." *J Cell Biol* **148**(4): 635-51.
- Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." *J Theor Biol* **14**(3): 255-74.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Salvesen, G. S. and Abrams, J. M. (2004). "Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies." *Oncogene* **23**(16): 2774-84.
- Salvesen, G. S. and Duckett, C. S. (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6): 401-10.
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., et al. (1997). "JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis." *FEBS Lett* **411**(1): 77-82.

- Sanger, F., Nicklen, S., et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sasaki, T., Kojima, H., et al. (2006). "Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role." Mol Cell **24**(1): 63-75.
- Satyanarayana, A. and Kaldis, P. (2009). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." Oncogene **28**(33): 2925-39.
- Schnell, D. J. and Hebert, D. N. (2003). "Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes." Cell **112**(4): 491-505.
- Schoefl, G. I. (1964). "The Effect of Actinomycin D on the Fine Structure of the Nucleolus." J Ultrastruct Res **10**: 224-43.
- Schroder, M. (2010). "Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation." Biochem Pharmacol **79**(3): 297-306.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., et al. (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." Nat Methods **2**(12): 905-9.
- Shankar, S. L., Mani, S., et al. (2001). "Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways." J Neurochem **79**(2): 426-36.
- Sher, Y. P., Tzeng, T. F., et al. (2009). "Cancer targeted gene therapy of BikDD inhibits orthotopic lung cancer growth and improves long-term survival." Oncogene **28**(37): 3286-95.
- Shipitsin, M. and Polyak, K. (2008). "The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance." Lab Invest **88**(5): 459-63.
- Siomi, H. and Dreyfuss, G. (1995). "A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein." J Cell Biol **129**(3): 551-60.
- Stauber, R. H., Afonina, E., et al. (1998). "Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells." Virology **251**(1): 38-48.
- Stauber, R. H., Fetz, V., et al. (2010). Nuclear Export Inhibitors with Antitumoral Activity.
- Stauber, R. H., Knauer, S. K., et al. (2012). "Drug-induced head and neck cancer cell killing by downregulating EGFR and triggering BIM-induced apoptosis." Oncotarget **in press**.
- Stauber, R. H., Kratzer, F., et al. (2001). "Investigation of nucleo-cytoplasmic transport using UV-guided microinjection." J Cell Biochem **80**(3): 388-96.
- Stauber, R. H., Mann, W., et al. (2007). "Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential." Cancer Res **67**(13): 5999-6002.
- Stauber, R. H., Rabenhorst, U., et al. (2006). "Nucleocytoplasmic shuttling and the biological activity of mouse survivin are regulated by an active nuclear export signal." Traffic **7**(11): 1461-72.
- Stauber, R. H., Wunsch, D., et al. (2010). "An update on the pathobiological relevance of nuclear receptors for cancers of the head and neck." Histol Histopathol **25**(8): 1093-104.
- Stauber, R. H., Wunsch, D., et al. (2011). "An update on the pathobiological relevance of nuclear receptors for cancers of the head and neck." Histol Histopathol **25**(8): 1093-104.
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., et al. (2010). "The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(7): 490-501.
- Strasser, A., Jost, P. J., et al. (2009). "The many roles of FAS receptor signaling in the immune system." Immunity **30**(2): 180-92.
- Stutz, F., Bachi, A., et al. (2000). "REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export." Rna **6**(4): 638-50.
- Sun, C., Nettlesheim, D., et al. (2005). "Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo." Biochemistry **44**(1): 11-7.
- Suntharalingam, M. and Wente, S. R. (2003). "Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function." Dev Cell **4**(6): 775-89.

- Tait, S. W. and Green, D. R. (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-32.
- Tan, B. T., Park, C. Y., et al. (2006). "The cancer stem cell hypothesis: a work in progress." Lab Invest **86**(12): 1203-7.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., et al. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-41.
- Terry, L. J., Shows, E. B., et al. (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." Science **318**(5855): 1412-6.
- Thomas, F. and Kutay, U. (2003). "Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway." J Cell Sci **116**(Pt 12): 2409-19.
- Trost, T. M., Lausch, E. U., et al. (2005). "Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells." Cancer Res **65**(3): 840-9.
- Tschopp, J., Irmeler, M., et al. (1998). "Inhibition of fas death signals by FLIPs." Curr Opin Immunol **10**(5): 552-8.
- Tsujimoto, Y. (1997). "Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes." Cell Death Differ **4**(6): 429-34.
- Urbich, C., Knau, A., et al. (2005). "FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells." Faseb J **19**(8): 974-6.
- Van Neck, T., Pannecouque, C., et al. (2008). "Inhibition of the CRM1-mediated nucleocytoplasmic transport by N-azolylacrylates: structure-activity relationship and mechanism of action." Bioorg Med Chem **16**(21): 9487-97.
- Vasu, S. K. and Forbes, D. J. (2001). "Nuclear pores and nuclear assembly." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 363-75.
- Vigneri, P. and Wang, J. Y. (2001). "Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase." Nat Med **7**(2): 228-34.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med **319**(9): 525-32.
- Vousden, K. H. and Prives, C. (2009). "Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53." Cell **137**(3): 413-31.
- Vucic, D., Dixit, V. M., et al. (2011). "Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(7): 439-52.
- Wada, A., Fukuda, M., et al. (1998). "Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein." Embo J **17**(6): 1635-41.
- Walter, P. and Lingappa, V. R. (1986). "Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane." Annu Rev Cell Biol **2**: 499-516.
- Wang, W., Budhu, A., et al. (2005). "Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication." Nat Cell Biol **7**(8): 823-30.
- Waybright, T. J., Britt, J. R., et al. (2009). "Overcoming problems of compound storage in DMSO: solvent and process alternatives." J Biomol Screen **14**(6): 708-15.
- Weber, W., Anke, T., et al. (1990). "Strobilurin D and strobilurin F: two new cytostatic and antifungal (E)-beta-methoxyacrylate antibiotics from *Cyphellopsis anomala* (1)." Planta Med **56**(5): 446-50.
- Weis, K. (2003). "Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle." Cell **112**(4): 441-51.
- Wen, W., Meinkoth, J. L., et al. (1995). "Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus." Cell **82**(3): 463-73.
- Wendt, M. D., Sun, C., et al. (2007). "Discovery of a novel small molecule binding site of human survivin." Bioorg Med Chem Lett **17**(11): 3122-9.
- Wolff, B., Sanglier, J. J., et al. (1997). "Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA." Chem Biol **4**(2): 139-47.
- Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques **39**(1): 75-85.

- Ye, Y. and Li, B. (2006). "1'S-1'-acetoxychavicol acetate isolated from *Alpinia galanga* inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking Rev transport." J Gen Virol **87**(Pt 7): 2047-53.
- Yedavalli, V. S., Neuveut, C., et al. (2004). "Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function." Cell **119**(3): 381-92.
- Youle, R. J. and Strasser, A. (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 47-59.
- Zhang, J. H., Chung, T. D., et al. (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." J Biomol Screen **4**(2): 67-73.
- Zhou, Z., Luo, M. J., et al. (2000). "The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans." Nature **407**(6802): 401-5.
- zur Hausen, H. (2000). "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis." J Natl Cancer Inst **92**(9): 690-8.

5.1 Eigene Veröffentlichungen

Drug-induced head and neck cancer cell killing by downregulating EGFR and triggering BIM-induced apoptosis

Stauber, R.H., Knauer, S.K., Habtemichael, N., Bier, C., Unruhe, B., Weisheit, S., Spange, S., Nonnenmacher, F., Fetz, V., Ginter, T., Reichardt, S., Liebmann, C., Schneider, G., Krämer, O.H.

Oncotarget 2012 in press

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) are the sixth most common malignant neoplasm and more than 50% of patients succumb to this disease. HNSCCs are characterized by therapy resistance, which relies on the overexpression of anti-apoptotic proteins and on the aberrant regulation of the epidermal growth factor receptor (EGFR). As inherent and acquired resistance to therapy counteracts improvement of long-term survival, novel multi-targeting strategies triggering cancer cell death are urgently required. We investigated how induction of replicational stress by the ribonucleotide reductase inhibitor hydroxyurea (HU) combined with histone deacetylase inhibitors (HDACi) exerts anti-tumor activity. We treated HNSCC cell lines and freshly isolated tumor cells with HDACi, such as the clinically approved anti-epileptic drug valproic acid (VPA), in combination with HU. Our data demonstrate that at clinically achievable levels VPA/HU combinations efficiently block proliferation as well as clonogenic survival, and trigger apoptosis of HNSCC cells. In the presence of VPA/HU, such tumor cells increase expression of the pro-apoptotic BCL-2 family protein BIM, independent of wild-type p53 signaling and in the absence of increased expression of the p53 targets PUMA and BAX. The pro-apoptotic activity of BIM in HNSCCs was found critical for tumor cell death; ectopic overexpression of BIM induced HNSCC apoptosis and RNAi-mediated depletion of BIM protected HNSCC cells from VPA/HU. Also, significantly elevated BIM levels ($p < 0.01$) were detectable in the apoptotic tumor centers versus proliferating tumor margins in HNSCC patients ($n = 31$), underlining BIM's clinical relevance. Importantly, VPA/HU treatment additionally reduces expression and cell surface localization of EGFR. Accordingly, in a xenograft mouse model, VPA/HU efficiently blocked tumor growth ($P < 0.001$) correlating with BIM induction and EGFR downregulation. We provide a molecular rationale for the potent anti-cancer activities of this drug combination. Our data suggest its exploitation as a potential strategy for the treatment of HNSCC and other tumor entities characterized by therapy resistance linked to dysregulated EGFR activation.

Bioassays to monitor Taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors

Knauer, S. K., Fetz, V., Rabenstein, J., Friedl, S., Hofmann, B., Sabiani, S., Schroder, E., Kunst, L., Proschak, E., Thines, E., Kindler, T., Schneider, G., Marschalek, R., Stauber, R. H., Bier, C.

PLoS ONE 2011,6(5): e18253. doi:10.1371/journal.pone.0018253

BACKGROUND: Threonine Aspartase 1 (Taspase1) mediates cleavage of the mixed lineage leukemia (MLL) protein and leukemia provoking MLL-fusions. In contrast to other proteases, the understanding of Taspase1's (patho)biological relevance and function is limited, since neither small molecule inhibitors nor cell based functional assays for Taspase1 are currently available. **METHODOLOGY/FINDINGS:** Efficient cell-based assays to probe Taspase1 function in vivo are presented here. These are composed of glutathione S-transferase, autofluorescent protein variants, Taspase1 cleavage sites and rational combinations of nuclear import and export signals. The biosensors localize predominantly to the cytoplasm, whereas expression of biologically active Taspase1 but not of inactive Taspase1 mutants or of the protease Caspase3 triggers their proteolytic cleavage and nuclear accumulation. Compared to in vitro assays using recombinant components the in vivo assay was highly efficient. Employing an optimized nuclear translocation algorithm, the triple-color assay could be adapted to a high-throughput microscopy platform (Z' factor = 0.63). Automated high-content data analysis was used to screen a focused compound library, selected by an in silico pharmacophor screening approach, as well as a collection of fungal extracts. Screening identified two compounds, N-[2-[(4-amino-6-oxo-3H-pyrimidin-2-yl)sulfanyl]ethyl]benzenesulfonamide and 2-benzyltriazole-4,5-dicarboxylic acid, which partially inhibited Taspase1 cleavage in living cells. Additionally, the assay was exploited to probe endogenous Taspase1 in solid tumor cell models and to identify an improved consensus sequence for efficient Taspase1 cleavage. This allowed the in silico identification of novel putative Taspase1 targets. Those include the FERM Domain-Containing Protein 4B, the Tyrosine-Protein Phosphatase Zeta, and DNA Polymerase Zeta. Cleavage site recognition and proteolytic processing of these substrates were verified in the context of the biosensor. **CONCLUSIONS:** The assay not only allows to genetically probe Taspase1 structure function in vivo, but is also applicable for high-content screening to identify Taspase1 inhibitors. Such tools will provide novel insights into Taspase1's function and its potential therapeutic relevance.

An update on the pathobiological relevance of nuclear receptors for cancers of the head and neck

Stauber, R. H., Wunsch, D., Knauer, S. K., Fetz, V.

Histol Histopathol. 2010 Aug;25(8):1093-104

Cancers of the head and neck are among the most common neoplasms worldwide, characterized by local tumor aggressiveness, high rate of early recurrence, development of metastasis and second primary tumors. Although disease management of head and neck cancer has improved significantly, overall survival-rates remained largely unchanged over the last decades. Thus, in addition to modern chemo-radiation treatment strategies combined with sophisticated surgery, there is still a need for molecular markers and key regulatory factors exploitable for chemoprevention and targeted therapies. A critical event in carcinogenesis is the uncontrolled modulation of genetic programs, mediated by deregulated signaling cascades, together with downstream transcriptional modulators. Hence, nuclear receptors, belonging to a superfamily of transcription factors implicated in a broad spectrum of physiological and pathophysiological processes, have also been associated with HNC. Enhanced expression of several nuclear receptors has been shown in head and neck cancer cells, and strategies targeting these molecules have been developed and tested in the clinics. In particular, the effects of retinoids targeting nuclear receptors of the thyroid hormone receptor-like receptor subfamily have been vigorously examined in large clinical chemoprevention trials. This review seeks to provide a general overview of nuclear receptors' molecular functions and summarizes their prognostic/therapeutic relevance, as well as the (pre)clinical studies targeting nuclear receptors in HNC.

Inducible NO synthase confers chemoresistance in head and neck cancer by modulating survivin

Fetz, V., Bier, C., Habtemichael, N., Schuon, R., Schweitzer, A., Kunkel, M., Engels, K., Kovács, A.F., Schneider, S., Mann, W., Stauber, R.H., Knauer, S.K.

Int J Cancer. 2009 May 1;124(9):2033-41

The dual role of the inducible NO synthase (iNOS) and NO signaling in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a complex and can both promote or inhibit tumor progression. However, the underlying molecular mechanisms are not yet resolved in detail. We show for the first time that conditions, favoring low NO levels conferred resistance against cisplatin/taxol-induced apoptosis in HNSCC cell lines. Cytoprotection was mediated by survivin, because we observed its upregulation subsequent to low doses of the NO donors S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) and sodium nitroprusside (SNP) or ectopic expression of physiologic amounts of iNOS. Also, RNAi-mediated depletion of survivin blocked NOs anti-apoptotic effects. Induction of survivin involves activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt (PI3K/Akt) pathway, which was antagonized by the PI3K-inhibitor LY294002. Importantly, application of the iNOS-specific inhibitor 1400W combined with RNAi-mediated downregulation of survivin cooperatively enhanced drug-induced cell death. The iNOS/survivin-axis appears to be also of clinical relevance since immunohistochemistry revealed that iNOS expression correlated with enhanced survivin levels in HNSCC specimens. In contrast, high NO concentrations suppressed survivin levels in HNSCC but also in non-malignant cells resulting in apoptosis. Cell death induced by high amounts of SNAP/SNP or by strong overexpression of iNOS involved activation of p38MAP-kinase, which was counteracted by the p38MAP-kinase inhibitor SB202190. Here, we provide evidence for a novel molecular mechanism how NO signaling may contribute to therapy resistance in HNSCC by modulating survivin expression. Our data further suggest pursuing pharmacogenetic iNOS/survivin-targeting approaches as potential therapeutic strategies in head and neck cancer.

Translocation Biosensors – Cellular System Integrators to Dissect CRM1-Dependent Nuclear Export by Chemicogenomics

Fetz, V., Knauer, S.K., Bier, C., Von Kries, J.P., Stauber, R.H.

Sensors 2009, 9(7), 5423-5445

Fluorescent protein biosensors are powerful cellular systems biology tools for dissecting the complexity of cellular processes with high spatial and temporal resolution. As regulated nucleo-cytoplasmic transport is crucial for the modulation of numerous (patho)physiological cellular responses, a detailed understanding of its molecular mechanism would open up novel options for a rational manipulation of the cell. In contrast to genetic approaches, we here established and employed high-content cellular translocation biosensors applicable for dissecting nuclear export by chemicogenomics. A431 cell lines, stably expressing a translocation biosensor composed of glutathione S-transferase, GFP and a rational combination of nuclear import and export signals, were engineered by antibiotic selection and flow cytometry sorting. Using an optimized nuclear translocation algorithm, the translocation response could be robustly quantified on the Cellomics Arrayscan® VTI platform. Subsequent to assay optimization, the assay was developed into a higher density 384-well format high-content assay and employed for the screening of the 17K *ChemBioNet* compound collection. This library was selected on the basis of a genetic algorithm used to identify maximum common chemical substructures in a database of annotated bioactive molecules and hence, is well-placed in the chemical space covered by bioactive compounds. Automated multiparameter data analysis combined with visual inspection allowed us to identify and to rationally discriminate true export inhibitors from false positives, which included fluorescent compounds or cytotoxic substances that dramatically affected the cellular morphology. A total of 120 potential hit compounds were selected for Cellomics Arrayscan® VTI based rescreening. The export inhibitory activity of 20 compounds effective at concentrations < 25 µM were confirmed by fluorescence microscopy in several cell lines. Interestingly, kinetic analysis allowed the identification of inhibitors capable to interfere with the export receptor CRM1-mediated nuclear export not only in an irreversible, but also in a reversible fashion. In sum, exploitation of biosensor based screening allows the identification of chemicogenomic tools applicable for dissecting nucleo-cytoplasmic transport in living cells.

NO signaling confers cytoprotectivity through the survivin network in ovarian carcinomas

Engels, K., Knauer, S. K., Loibl, S., Fetz, V., Harter, P., Schweitzer, A., Fisseler-Eckhoff, A., Kommoss, F., Hanker, L., Nekljudova, V., Hermanns, I., Kleinert, H., Mann, W., du Bois, A., Stauber, R. H.

Cancer Res. 2008 Jul 1;68(13):5159-66

Despite considerable success in the treatment of epithelial ovarian cancer (EOC), therapy resistance counteracts improvement of long-term survival. The dual role of survivin as an apoptosis inhibitor and mitotic regulator has been associated with disease outcome. However, the molecular mechanisms involved in the deregulated expression in EOC of survivin need further investigation. Here, we show that high amounts of the nitric oxide (NO) donors, S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) and sodium nitroprusside (SNP) or strong overexpression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) suppressed survivin levels via the p38MAPK pathway and triggered apoptosis in ovarian cancer cell lines (OCC). Importantly, low NO concentrations conferred resistance against carboplatin/paclitaxel-induced apoptosis. Cytoprotection was mediated by survivin because we observed its up-regulation subsequent to low SNAP/SNP doses or ectopic expression of low amounts of iNOS. Also, RNAi-mediated depletion of survivin blocked the antiapoptotic effects of NO signaling. Induction of survivin involves activation of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway, which was antagonized by the PI3K-inhibitor, LY294002. Interestingly, application of the iNOS-inhibitor 1400W together with RNAi-mediated survivin down-regulation cooperatively enhanced drug-induced apoptosis in OCCs. The iNOS/survivin interdependencies seem to be also of clinical relevance because immunohistochemistry revealed that low iNOS levels correlate with survivin expression ($P < 0.01$) in carboplatin/paclitaxel-treated EOC patients with minimal postoperative residual tumor ($n = 54$). Also, iNOS and survivin expression were associated with increased risk for disease progression. Our study uncovers a novel molecular mechanism of how NO signaling may contribute to therapy resistance in EOC by modulating survivin expression. Pharmacogenetic iNOS/survivin-targeting strategies may hence be pursued to complement current treatment modalities in EOC.

Dynamic survivin in head and neck cancer: molecular mechanism and therapeutic potential

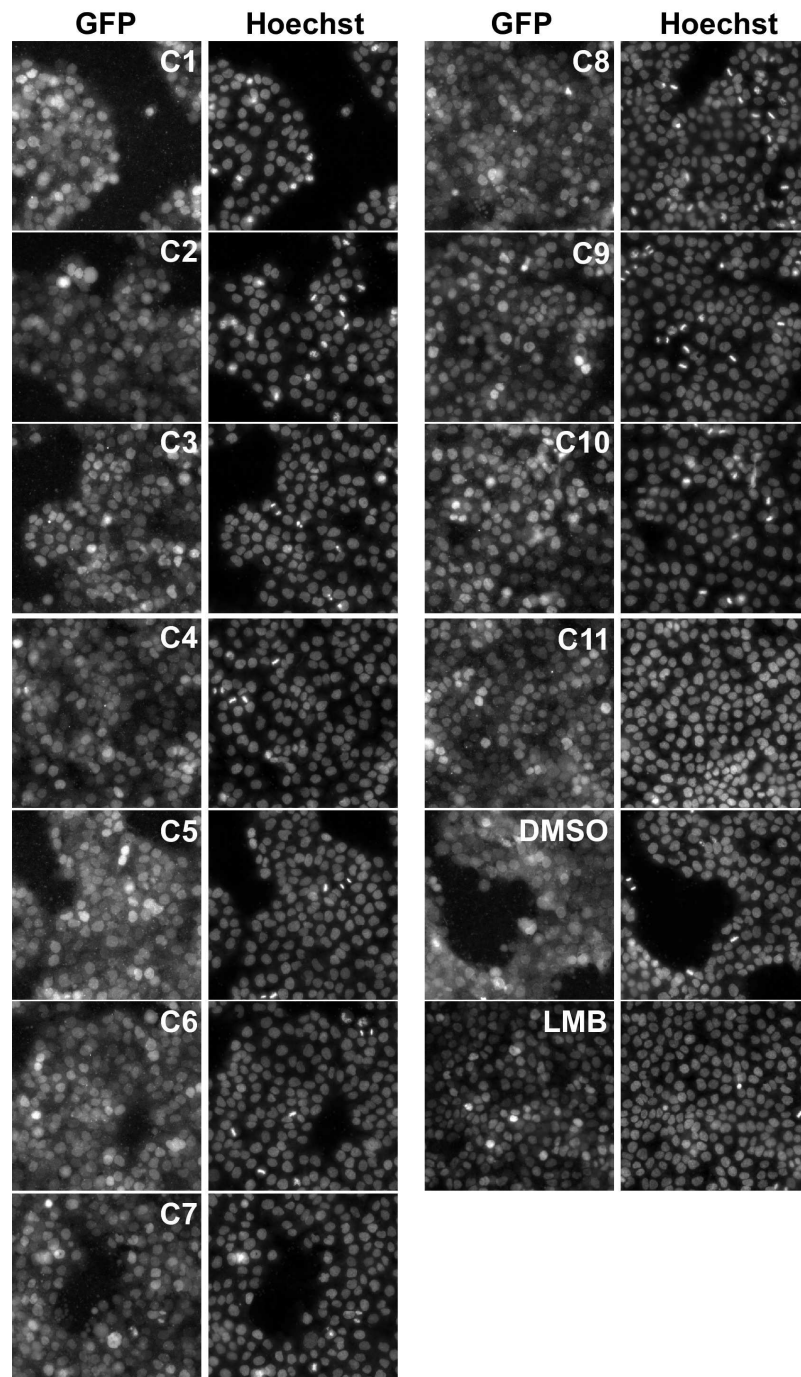
Lippert, B.M., Knauer, S.K., Fetz, V., Mann, W. and Stauber, R.H.

Int J Cancer. 2007 Sep 15;121(6):1169-74

Although disease management of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) has improved significantly, therapy resistance leading to tumor recurrence still counteracts improvement of long-term survival. Consequently, identification of molecular markers that signal increased risk of treatment failure or, which can be exploited by targeted therapy, is urgently needed. Survivin is strongly expressed in HNSCC, and its proposed dual role as an apoptosis inhibitor and a mitotic effector positioned survivin in the front line of cancer research. Notably, survivin is detected as a cytoplasmic and as a nuclear protein in HNSCC patients, which stimulated numerous studies to investigate and to speculate on the functional and prognostic significance of its dynamic localization. This review focuses on our current understanding of the molecular mechanisms regulating survivin's intracellular localization and discusses its potential prognostic and therapeutic relevance for head and neck cancer.

6 Anhang

Abb. A-1: Aufnahmen der potentiellen Hits vom ArrayScanVTI®



Schwarz-weiß Aufnahmen der A431RevNES-Zellen, erstellt bei der Hochdurchsatzanalyse mit dem ArrayScanVTI®. Es ist jeweils links das Signal des ersten Kanals (Hoechst) und rechts das GFP-Signal des RevNES-Biosensors gezeigt.

Abb. A-2: Homologe Substanzen zu C3

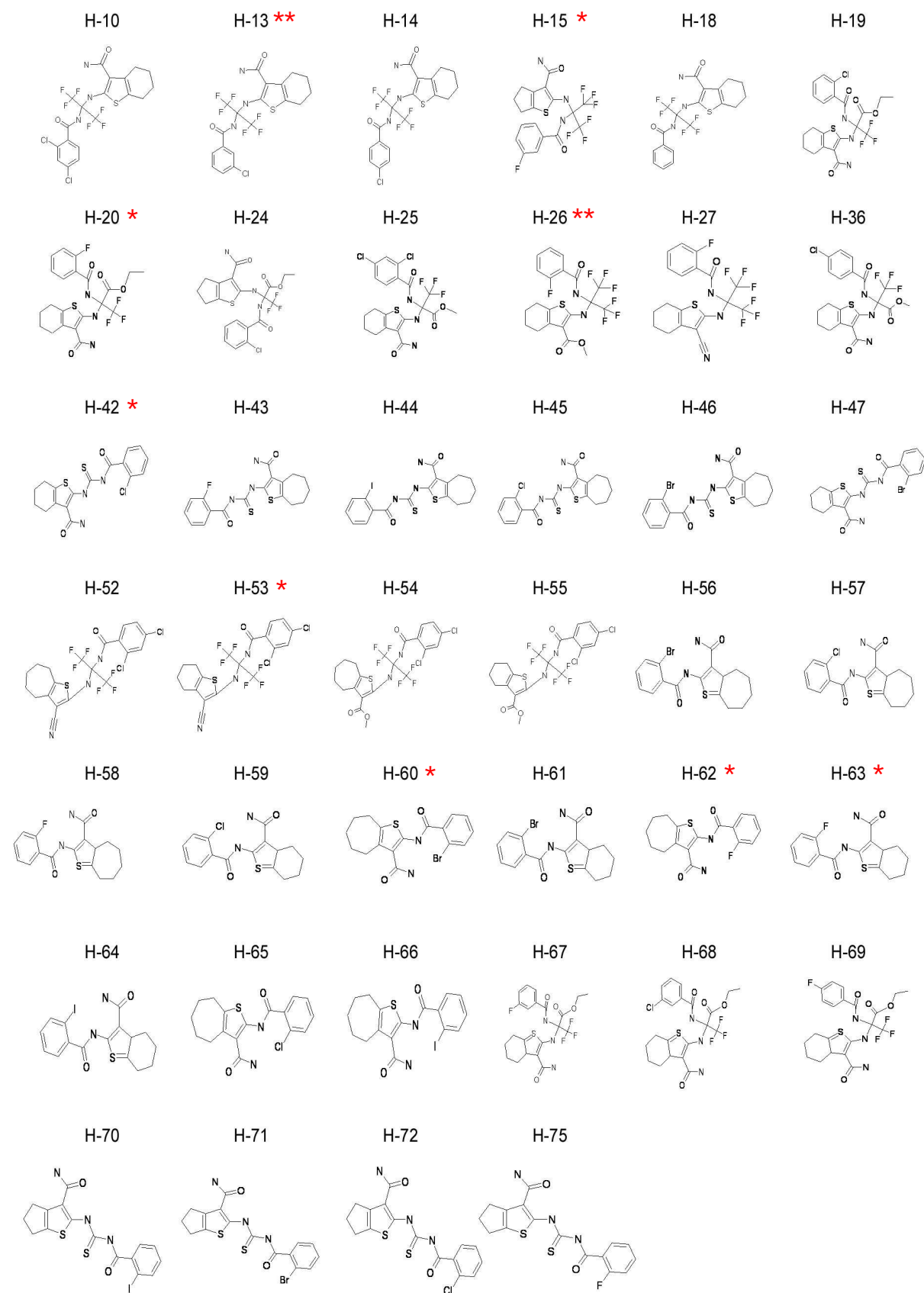
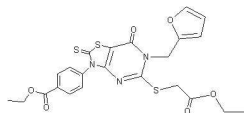


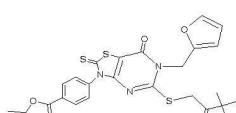
Abb. A-3: Homologe Substanzen zu C4/C5/C6/C8/C9

Zu C4 homologe Substanzen

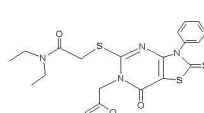
H-11



H-22

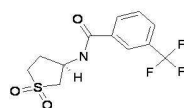


H-23

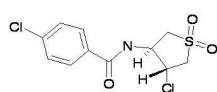


Zu C5 homologe Substanzen

H-32 *

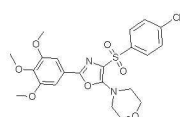


H-73 *

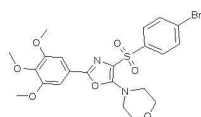


Zu C6 homologe Substanzen

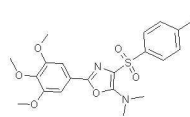
H-16



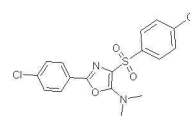
H-17



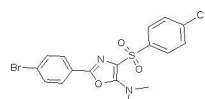
H-28



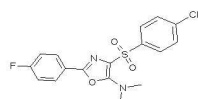
H-29



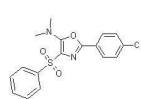
H-30



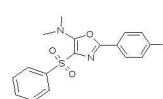
H-31



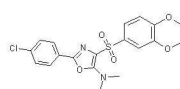
H-34



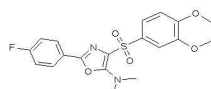
H-35



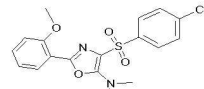
H-37



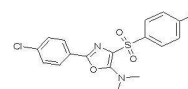
H-38



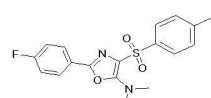
H-41



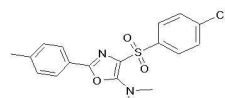
H-48



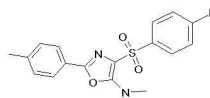
H-49



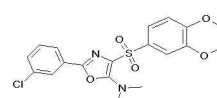
H-50



H-51

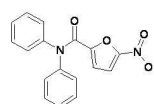


H-74

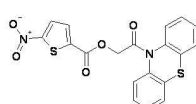


Zu C8 homologe Substanzen

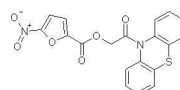
H-21



H-39



H-40

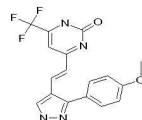


Zu C9 homologe Substanzen

H-12



H-33



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendete habe.

Mainz, den

Verena Fetz