

Aus dem Department für Zellbiologie (Osteologie)

des Ludwig Boltzmann Instituts

Institut für Osteologie

(Leiter: Prim. Priv. Doz. Dr. Jochen Zwerina)

**Der Einfluss von Bisphosphonaten und Statinen auf die
Osteoblastogenese, Osteoblastendifferenzierung und auf die
Prozessierung von Lamin A**

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Lukas Rath

Wien, im Juli 2022

Interne Betreuerin: Univ.-Prof. Dr. med. univ. Veronika Sexl

Externer Betreuer: Thomas Dechat, PhD, MSc

Gutachter:

Inhaltverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1. Lamin A Prozessierung und Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom | 1 |
| 1.2. Statine..... | 2 |
| 1.3. Bisphosphonate | 3 |
| 1.4. Osteogene Differenzierung..... | 3 |
| 2. Material und Methoden | 5 |
| 2.1. Zellkultur | 5 |
| 2.2. Chemikalien | 5 |
| 2.3. Antikörper..... | 5 |
| 2.4. SDS-Page (Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gelelektrophorese)..... | 6 |
| 2.5. Western Blot | 6 |
| 2.6. Immunfluoreszenz..... | 7 |
| 2.7. Alkalische Phosphatase Assay..... | 7 |
| 2.8. Alizarin Rot Färbung..... | 8 |
| 2.9. Experimentaufbau | 8 |
| 3. Ergebnisse..... | 9 |
| 3.1. Statine sind keine effizienten Farnesylierungsinhibitoren | 11 |
| 3.2. Bisphosphonate zeigen die geringste Farnesylierungsinhibition | 13 |
| 3.3. Eine neue Kombinationstherapie könnte die Effizienz von FTIs erhöhen..... | 15 |
| 3.4. Differenzierung..... | 18 |

| | |
|--------------------------------|----|
| 4. Diskussion | 21 |
| 5. Zusammenfassungen | 25 |
| 6. Summary | 26 |
| 7. Abkürzungsliste | 27 |
| 8. Referenzen | 29 |
| 9. Abbildungsverzeichnis | 33 |

1. Einleitung

1.1. Lamin A Prozessierung und Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom

Die Kernlamina besteht überwiegend aus vier Proteinen, namentlich Lamin A, B1, B2 und C. Zugeordnet werden sie den Typ-V-Intermediärfilamenten. Die wichtigsten A-Typ Lamine, Lamin A und C, stammen von einem Gen (*LMNA*) durch alternatives Splicing. B-Typ Lamine werden von zwei Genen kodiert, *LMNB1* bzw. *LMNB2* (T. Dechat et al., 2010).

Lamin A und C weisen in den ersten 566 Aminosäuren dieselbe Sequenz auf. Am carboxyterminalen Ende unterscheiden sich die Proteine. Lamin C hat dort 6 individuelle Aminosäuren und Lamin A 98. Während Lamin C dann bereits als reifes Protein vorliegt, durchläuft Lamin A eine Prozessierung am carboxyterminalen Ende (Adam et al., 2013). Die Lamine B1, B2 und A werden als Prälamine translatiert und tragen am C-Terminus eine -CAAX-Box (C steht für Cystein, AA für zwei aliphatische Aminosäuren und X für eine beliebige Aminosäure (Gao et al., 2009)) (T. Dechat et al., 2010). Als erstes wird an das Cystein durch eine Farnesyltransferase (FTase) eine Farnesylgruppe angehängt (Thomas Dechat et al., 2008). Farnesyl ist, wie Geranylgeranyl, ein Isoprenyl Lipid und fungiert als posttranslationale Modifikation von Proteinen (Basso et al., 2006). Danach werden die letzten drei Aminosäuren der -CAAX-Box proteolytisch entfernt. Die beteiligten Enzyme sind wahrscheinlich ZMPSTE24 (Zinc metalloprotease related to Ste24p) und RCE1 (Ras-converting enzyme 1) (Thomas Dechat et al., 2008). Als nächstes folgt die Carboxymethylierung des Cysteins durch ICMT (Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase) (T. Dechat et al., 2010). Damit sind die B-Typ Lamine fertig prozessiert, wodurch sie farnesyliert und carboxymethyliert bleiben (Thomas Dechat et al., 2008). Bei Lamin A werden in einem letzten Vorgang 15 C-terminale Aminosäuren, inklusive des farnesylierten Cysteins, durch ZMPSTE24 proteolytisch abgespalten (Adam et al., 2013). Eine Laminopathie in der die Prozessierung von Lamin A fehlerhaft verläuft ist das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS) (Thomas Dechat et al., 2008). HGPS kommt bei einer von 20 Millionen Geburten vor und ist durch vorzeitiges Altern gekennzeichnet (Dhillon, 2021). Ohne Behandlung sterben die Patient*innen im Schnitt mit 14,6 Jahren. Die Todesursache ist meist Herzinfarkt oder Schlaganfall bedingt durch Atherosklerose (Gordon et al., 2016). Die häufigste Punktmutation in *LMNA*, welche mit HGPS assoziiert wird, führt nicht zu einem Aminosäureaustausch, aber zur Aktivierung einer

alternativen Spleißstelle. Das hat zur Folge, dass letztendlich 50 Aminosäuren am C-Terminus von Lamin A fehlen, welche die Schnittstelle für die ZMPSTE24 enthalten. Das entstehende Proteinprodukt wird Progerin genannt. Die Aminosäuren fehlen oberhalb der -CAAX-Box, weshalb diese unverändert bleibt und farnesyliert wird. Dabei kommt es zur Akkumulierung von dauerhaft farnesyliertem Progerin, was für den Phänotyp der Krankheit verantwortlich sein soll. Deswegen wird versucht, die Farnesylierung mithilfe von Farnesyltransferaseinhibitoren zu unterbinden (Thomas Dechat et al., 2008). Lonafarnib, ein FTI, wurde am 20. November 2020 in den USA zur Behandlung von HGPS zugelassen. Die Lebenserwartung der Patient*innen stieg im Durchschnitt um 2.5 Jahre durch eine Lonafarnib Behandlung (Dhillon, 2021). Auch in einem HGPS Mausmodell hat ein FTI den Krankheitsphänotyp verbessert (Yang et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurden HGPS-knockin Mäuse erzeugt, die nicht farnesylierbares Progerin exprimieren und trotzdem HGPS entwickelten. Wonach das Progerin alleine für die Toxizität verantwortlich sein könnte (Yang et al., 2008). Somit wäre die Farnesylierungsinhibition begrenzt krankheitsmildernd. Bei einer neueren Studie mit nicht farnesylierbaren Knock-in Progerin Mäusen, wo ein anderer Teil der -CAAX-Box verändert wurde, war kein HGPS ersichtlich (Yang et al., 2011). Ein anderer Grund, warum die Farnesylierungsinhibition ihre Grenzen hat, ist eine alternative Prenylierung durch eine Geranylgeranyltransferase (Davies et al., 2009). Ergebnisse haben gezeigt, dass in der Anwesenheit eines FTIs Prälamina A und Progerin geranylgeranylgeranylisiert werden können (Varela et al., 2008).

1.2. Statine

Farnesyl und Geranylgeranyl sind Produkte des Mevalonatweges. Statine inhibieren die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), welche das erste Enzym des Mevalonatweges ist. Dementsprechend wird auch die Bildung der Intermediärprodukte Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat inhibiert (Buhaescu & Izzedine, 2007). Die eigentliche Anwendung der Statine ist, kardiovaskuläre Krankheiten zu therapieren, indem sie das Low-Density Lipoprotein Cholesterol reduzieren (Jiang et al., 2018). Eine klinische Studie über die Anwendung einer Triple-Medikament Therapie bei HGPS Patient*innen mit Lonafarnib, Pravastatin und Zoledronate ergab keine zusätzlichen Vorteile gegenüber einer Monotherapie mit Lonafarnib (Gordon et al., 2016). In dieser Studie wird von einer klinischen Anwendung der Triple-Medikament Therapie bei HGPS

abgeraten (Gordon et al., 2016). In vorangegangenen Experimenten unsererseits wurden verschiedene Statine (Pravastatin, Lovastatin, Simvastatin und Rosuvastatin) ausprobiert und Atorvastatin als das am besten funktionierende ausgewählt. Atorvastatin wird gemeinsam mit Simvastatin und Lovastatin als relativ lipophil beschrieben. Simvastatin und Lovastatin werden als Prodrugs eingesetzt und lagen deshalb in inaktiver Form vor (Pasha et al., 2006). Auch die chemische Aktivierung der Prodrugs (Sadeghi et al., 2000), hat zu keinen besseren Ergebnissen als mit Atorvastatin geführt. Im Vergleich dazu sind das bereits oben genannte Pravastatin und Rosuvastatin hydrophil (Pasha et al., 2006).

1.3. Bisphosphonate

Bisphosphonate haben eine hohe Affinität für Knochenmineral, indem sie an Hydroxylapatitkristalle binden (Park et al., 2021). Klinische Anwendung finden Bisphosphonate dadurch bei Osteoklasten bedingten Knochenschwund, Knochenmetastasen und vielen weiteren Knochenkrankheiten (Drake et al., 2008). Bisphosphonate, die Stickstoff enthalten, inhibieren die Farnesylpyrophosphatsynthase (FPPS), ein weiteres Enzym des Mevalonatweges (Buhaescu & Izzedine, 2007). Lipophile Bisphosphonat-Präparate zeigen eine Inhibierung der FPPS und der Geranylgeranylpyrophosphatsynthase (GGPPS) (Zhang et al., 2009). BPH-715 inhibiert sowohl die FPPS als auch die GGPPS, wobei die GGPPS vorrangig inhibiert wird (Zhang et al., 2009). Im Bezug auf Tumorzellwachstumshemmung weist BPH-715 einen IC_{50} von 100-200 nM auf. Zoledronate dagegen, erreicht erst bei 15 μ M den IC_{50} . In 30 % der menschlichen Tumore ist Ras, welches auch posttranslational farnesyliert wird, mutiert. Diese Ras-Mutanten können zwar mit FTIs inhibiert werden, jedoch ist die Effektivität beschränkt, weil eine alternative Prenylierung durch Geranylgeranyl stattfinden kann (Zhang et al., 2009). Auch bei Lamin A könnte eine alternative Prenylierung stattfinden, wenn mit einem FTI behandelt wird (Davies et al., 2009).

1.4. Osteogene Differenzierung

Osteogene Differenzierung wird durch die Expression von Osteoblast-Markern wie alkalische Phosphatase (ALP), Bildung einer Kollagen Typ I Extrazellulärmatrix (ECM) und die spätere Ablagerung von Hydroxylapatit gekennzeichnet. Die ECM ist ausschlaggebend für die Differenzierung. Während der osteogenen Differenzierung wird sie von mesenchymalen Stammzellen sekretiert. Der Kontakt zu einer Kollagen Typ I Matrix ist essentiell für Osteoblasten-Vorläuferzellen, um zu reifen Osteoblasten differenzieren (Hanna et al., 2018).

Statine wird eine knochenbauende Wirkung zugeschrieben. Simvastatin induziert zum Beispiel die Osteoblastendifferenzierung und erhöht die Mineralisierung. Die Produktion von ALP, Morphogenetischem Knochenprotein 2 (BMP-2) und Kollagen Typ I wird durch Simvastatin erhöht (Maeda et al., 2001). Bisphosphonate werden bei verschiedensten Knochenkrankheiten eingesetzt. In einer Studie wurde der Einfluss von Bisphosphonaten, die in den USA zugelassen sind, auf humane Knochenmarkstromazellen analysiert. Dokumentiert wurde eine erhöhte Proliferation und ferner die Initiierung osteoblastischer Differenzierung (von Knoch et al., 2005).

In dieser Arbeit wurde versucht die Möglichkeiten der Farnesylierungsinhibition bzw. Prenylierungsinhibition in murinen mesenchymalen Stromazellen zu untersuchen. Darüber hinaus, wird untersucht warum keine zusätzlichen Vorteile durch Pravastatin und Zoledronate in der Triple-Medikament Therapie hervorgerufen wurden und welche Lösungen es dazu geben könnte. Weiters wurde versucht folgende Fragen zu beantworten: Gibt es vielleicht Möglichkeiten die Effizienz der FTIs durch eine Kombinationstherapie mit dem lipophilen Bisphosphonat BPH-715 zu erhöhen? Haben wir vielleicht eine Nebenwirkung von FTIs entdeckt? Kann eine zweite Analyseverfahren, neben der IF mit Anti-Prälamin A Antikörpern, zur Untersuchung der Prenylierungsinhibition etabliert werden?

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Die verwendeten Zellen waren murine mesenchymale Stromazellen (ATCC® CRL-12424 Manassas, Virginia, USA), genannt D1. Je nach Experiment wurden die Zellen in Proliferationsmedium oder Differenzierungsmedium kultiviert. Das Proliferationsmedium bestand aus Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) mit zusätzlich 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (Sigma Aldrich), 2 mM GlutaMax (Thermo Fisher Scientific Inc.) und 4,5 mg/ml Glucose, das Differenzierungsmedium aus DMEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich), 2 mM GlutaMax (Thermo Fisher Scientific Inc.), 10 mM Beta-Glycerophosphat und 50 µg/ml Ascorbinsäure. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37 °C, und 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für Differenzierungsexperimente wurden die Zellen in 6-Well Platten (Greiner Bio-One International GmbH, 657160, Österreich) und für Immunfluoreszenzfärbungen in 12-Well Platten (Cole-Parmer, 01927-72, Deutschland) kultiviert.

2.2. Chemikalien

Um in den Mevalonatweg einzugreifen, wurden unterschiedliche Statine, Bisphosphonate und Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI) eingesetzt. Als FTI wurde Lonafarnib (Sigma-Aldrich, SML1457) verwendet. Bisphosphonate waren BPH-715 (MedChemExpress, HY-118224, USA) und Zoledronate (Supelco, PHR1893, USA). Bei den Statinen kam Atorvastatin (Supelco, PHR1422, USA) zum Einsatz. Alle Chemikalien wurden in Dimethylsulfoxide (DMSO) gelöst, außer Zoledronate, welches in Wasser gelöst wurde.

2.3. Antikörper

Um ein Verständnis für die Effizienz der Farnesylierungsinhibierung zu bekommen, wurde ein Anti-Lamin A/C (Maus monoklonal; Active Motif, 3A6-4C11, USA) Antikörper verwendet. Für das Western Blotting wurde der Lamin A/C Antikörper 1:2000 verdünnt. Ein Anti-Prälamin A spezifischer Antikörper (Maus monoklonal; Merck KGaA, PL-1C7, Deutschland) wurde in einer

1:200 Verdünnung für die Immunfluoreszenz (IF) verwendet. Ein Anti-Farnesyl Antikörper (Hase polyklonal; NordicMubio, NMB-X1165P, Niederlande) wurde in einer 1:50 Verdünnung für die IF und in einer 1:1000 Verdünnung für das Western Blotting verwendet. Beim Anti-Farnesyl Antikörper gehen wir von einer Kreuzreaktivität mit Geranylgeranyl aus.

2.4. SDS-Page (Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gelelektrophorese)

Um für spätere Western Blot Analysen aus den jeweiligen Zellkulturen Proteinlysate zu gewinnen, wurden diese zuerst dreimal mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen und mit 95 °C heißem SDS-Puffer (3 % SDS, 0,25 M Tris, pH 6,8) lysiert. Die so gewonnenen Lysate wurden anschließend für zweimal fünf Minuten in einem Ultraschallbad sonifiziert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit der Bicinchoninsäure (BCA) Methode ermittelt. Im Anschluss wurden 5 µg der jeweiligen Proteinlysate mittels 10%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Dazu wurden die Proben mit 4x Laemmli Puffer (200 mM Tris Cl, 400 mM Dithiothreitol, 8 % SDS, 0,4 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol) vermengt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Gele liefen bei konstanten 100 V und für ungefähr zwei Stunden, im Falle der darauffolgenden Analyse mit dem Anti-Farnesyl Antikörper, und für vier bis fünf Stunden im Falle des Anti-Lamin A/C Antikörpers.

2.5. Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels 90-minütigem Wet-Blotting bei 100 V in Transferpuffer (0,024 M Tris, 0,19 M Glycine, 20 % Methanol, 0,037 % SDS) auf eine Nitrocellulosemembran (GE-Healthcare; Porengröße 0,45 µm, USA) transferiert. Nach dem Blotten wurden die Membranen einmal mit destilliertem Wasser gespült, zweimal für fünf Minuten mit Tris-buffered saline mit 0,05 % Tween 20 (TBST) gewaschen und danach 30 Minuten mit 5 % Milchpulver in TBST blockiert. Im Anschluss mit dem jeweiligen primären Antikörper (verdünnt in 5 % Milchpulver in TBST) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membranen wurden dann dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen und anschließend 1 h mit den entsprechenden sekundären Antikörpern [Ziege anti-Maus (Proteintech, SA00001-1, USA) bzw. Ziege anti-Hase (Proteintech, SA00001-2, USA), abhängig vom Primärantikörper, jeweils an eine Meerrettich Peroxidase gekoppelt], 1:10000 in 5 % Milchpulver in TBST verdünnt inkubiert. Danach wurde dreimal für fünf Minuten gewaschen und mit

Chemilumineszenz Substrat (Merck Millipore; WBKLS0100, USA) und mit dem Vilber Lourmat Fusion FX7 Transilluminator (Vilber, Frankreich) detektiert.

2.6. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden die Zellen auf Deckgläschen wachsen gelassen, mit 4%igem Paraformaldehyd in PBS für 15 Minuten fixiert und für fünf Minuten mit 0,5%igem Triton-X in PBS permeabilisiert. Als nächstes wurden die Zellen mit 2%igem Bovinem Serum Albumin (BSA) in PBS geblockt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen immer mehrmals mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern für 90 Minuten bei 37 °C. Die primären Antikörper wurden in 2%igem BSA in PBS verdünnt. Danach wurde dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und mit den Sekundärantikörpern [1:500 gemeinsam mit Hoechst (1:10000) in PBS verdünnt] für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Sekundärantikörper waren Ziege anti-Maus (Invitrogen, USA, A11001, gekoppelt an Alexa Fluor 488) und Ziege anti-Hase (Invitrogen, USA, A32732, gekoppelt an Alexa Fluor Plus 555). Im Anschluss wurde dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann mit Fluoroshield (Sigma-Aldrich, F6182) auf Objektträger gemountet und mit Nagellack versiegelt. Die nun fertig gefärbten Zellen wurden mit dem Leica SP5 Mikroskop unter Verwendung eines 63x Objektivs und Immersionsöl (Leica, Deutschland, Type F) untersucht. Das Pinhole wurde so eingestellt, dass die optische Schichtdicke circa 1,451 µm betrug.

2.7. Alkalische Phosphatase Assay

Für die Probengewinnung wurden die Zellen zuerst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl 0,1x Tris-EDTA Puffer eingefroren. Nach dem Auftauen wurden jeweils 50 µl der einzelnen Überstände mit 125 µl 1x para-Nitrophenylphosphat (pNPP; 2,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat, 0,1 M Diethanolamin, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) versetzt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die enzymatische Reaktion zu beenden, wurden 25 µl 0,5 M NaOH hinzupipettiert. Danach wurden die jeweiligen Absorptionen bei 405 nm bzw. bei 492 nm gemessen. Um die Konzentrationen der Alkalischen Phosphatase (ALP) in mU/ml zu bestimmen, wurden die bei 492 nm gemessenen Werte von jenen bei 405 nm gemessenen abgezogen, der Leerwert subtrahiert und der so erhaltene Wert in eine Kalibrationsgerade eingesetzt. Die Kalibrationsgerade wurde mit bekannten Konzentrationen einer käuflich erwerblichen ALP (Merck Millipore, USA, 10713023001), welche genauso wie die Proben behandelt wurden, erstellt.

2.8. Alizarin Rot Färbung

Um den Grad der Mineralablagerung zu bestimmen, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, für 15 Minuten mit 10 % Formaldehyd fixiert und danach zweimal mit Wasser gewaschen. Die Zellen können so für die weitere Analyse bei -20 °C gelagert werden. Für die Färbung wurden die Zellen mit einer 40 mM Alizarinrot Lösung (pH 4,1) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde viermal für fünf Minuten mit Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 10%iger Essigsäure für 30 Minuten inkubiert, die gesamte Probe mit 200 µl 10%igem Ammoniumhydroxid versetzt und die Absorption der so erhaltenen Lösung bei 405 nm gemessen.

2.9. Experimentaufbau

Für Immunfluoreszenzfärbungen und SDS-Page Auftrennungen wurden rund 60.000 Zellen pro cm² in den Platten ausgestreut. Nach 24 h proliferieren wurden die einzelnen Wirkstoffe und Wirkstoffkombinationen den Zellen hinzugefügt. Die Wirkstoffe wurden in Proliferationsmedium zu folgenden Konzentrationen verdünnt: Atorvastatin 10 µM, BPH-715 10 µM, Zoledronate 30 µM, Lonafarnib 10 µM und Kombination (Lonafarnib 10 µM, BPH-715 10 µM). Für SDS-Page und nachfolgenden Western Blots wurden nach 24 und 48 Stunden Proben gewonnen. Im Falle der IF wurden bei allen Wirkstoffen nach 24 und 48-stündiger Behandlung Zellen fixiert. Bei Lonafarnib und der Kombination wurden zusätzlich auch nach 72 Stunden Zellen fixiert.

Ebenfalls 60.000 Zellen pro cm² wurden für die Differenzierung der Zellen ausgestreut. Die Zellen befinden sich in Proliferationsmedium, solange bis die Konfluenz erreicht wird. Meist ist dies schon nach 24 Stunden der Fall. In selteneren Fällen erst nach 48 h. Wenn die Konfluenz erreicht ist, werden die Wirkstoffe in Differenzierungsmedium zu folgenden Konzentrationen verdünnt: Atorvastatin 10 µM, Lonafarnib 10 µM und Kombination (Lonafarnib 10 µM, BPH-715 5 µM). Nach 4, 7 und 12 Tagen wurden die Zellen fixiert bzw. eingefroren für die ALP und AR Messungen. Das Medium wird grob alle 3 Tage gewechselt.

3. Ergebnisse

Allen Experimenten gehen längere Experimentserien voraus, um die optimalen Konzentrationen der Wirkstoffe zu finden. Aus Eigeninitiative habe ich durch Literaturrecherche einen Anti-Farnesyl Antikörper gefunden, welcher in dieser Arbeit als alternative Nachweismethode für die Farnesylierungsinhibition getestet wurde. Ursprünglich wurde dazu immer ein Antikörper gegen Prälamina A verwendet. Um eine grobe Quantifizierung der Prozessierungsinhibition von Lamin A zu erreichen, wurde mit verschiedenen Auftrennungen mittels SDS-Page experimentiert, um die Prälamina A und Lamin A Bande elektrophoretisch so weit wie möglich voneinander zu trennen. Dadurch können Prälamina A Level relativ zu den Lamin A Leveln bewertet werden. Eine reine Prälamina A Antikörper Inkubation der Membran hätte weniger Aussagekraft.

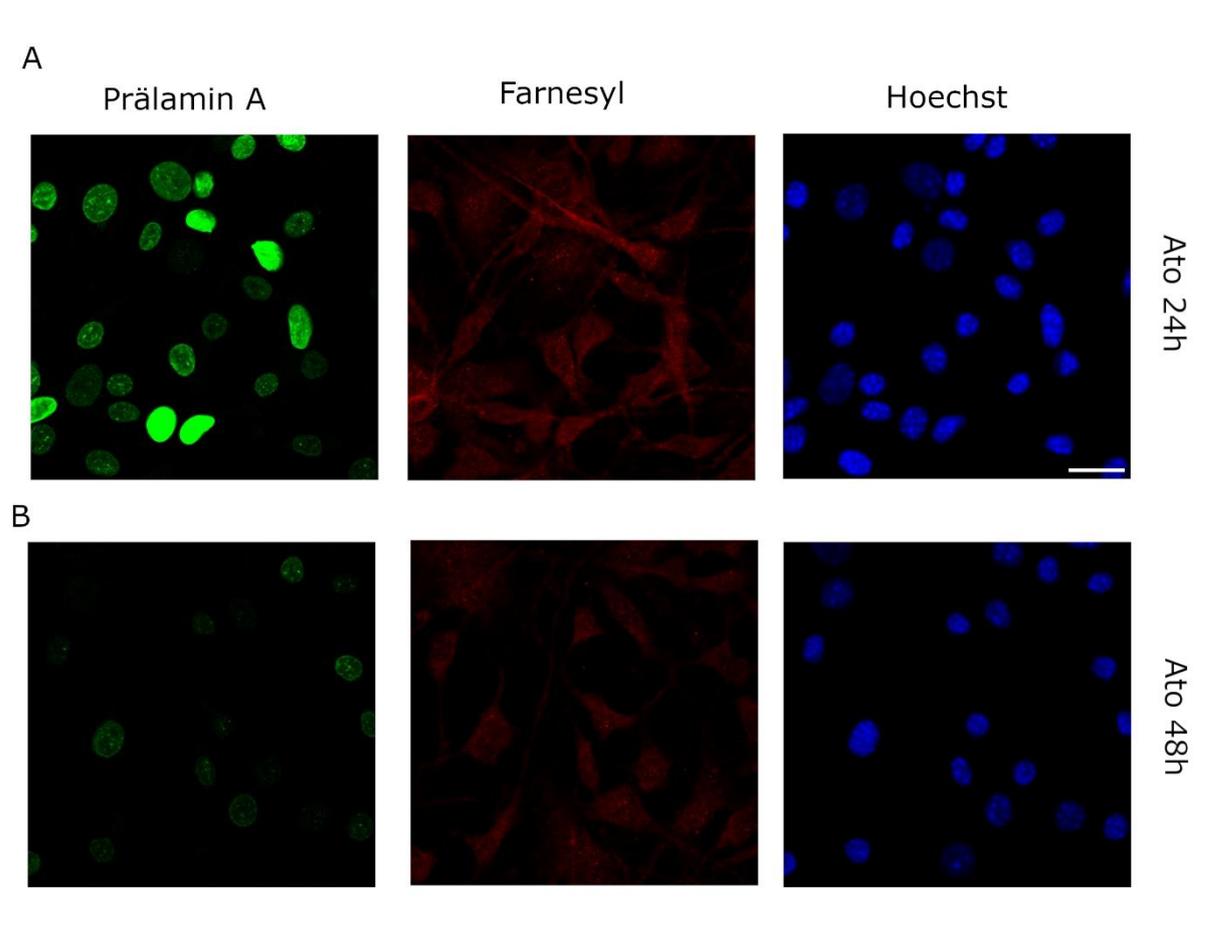


Abbildung 1: D1-Zellen, die mit 10 μM Atorvastatin behandelt wurden. Nach 24 h (A), 48 h (B) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamina A (grün) Antikörpern durchgeführt.

Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten ist, eine nach 24 h nachlassende Prälamina A Akkumulation. Maßstabsskala, 20 μ m.

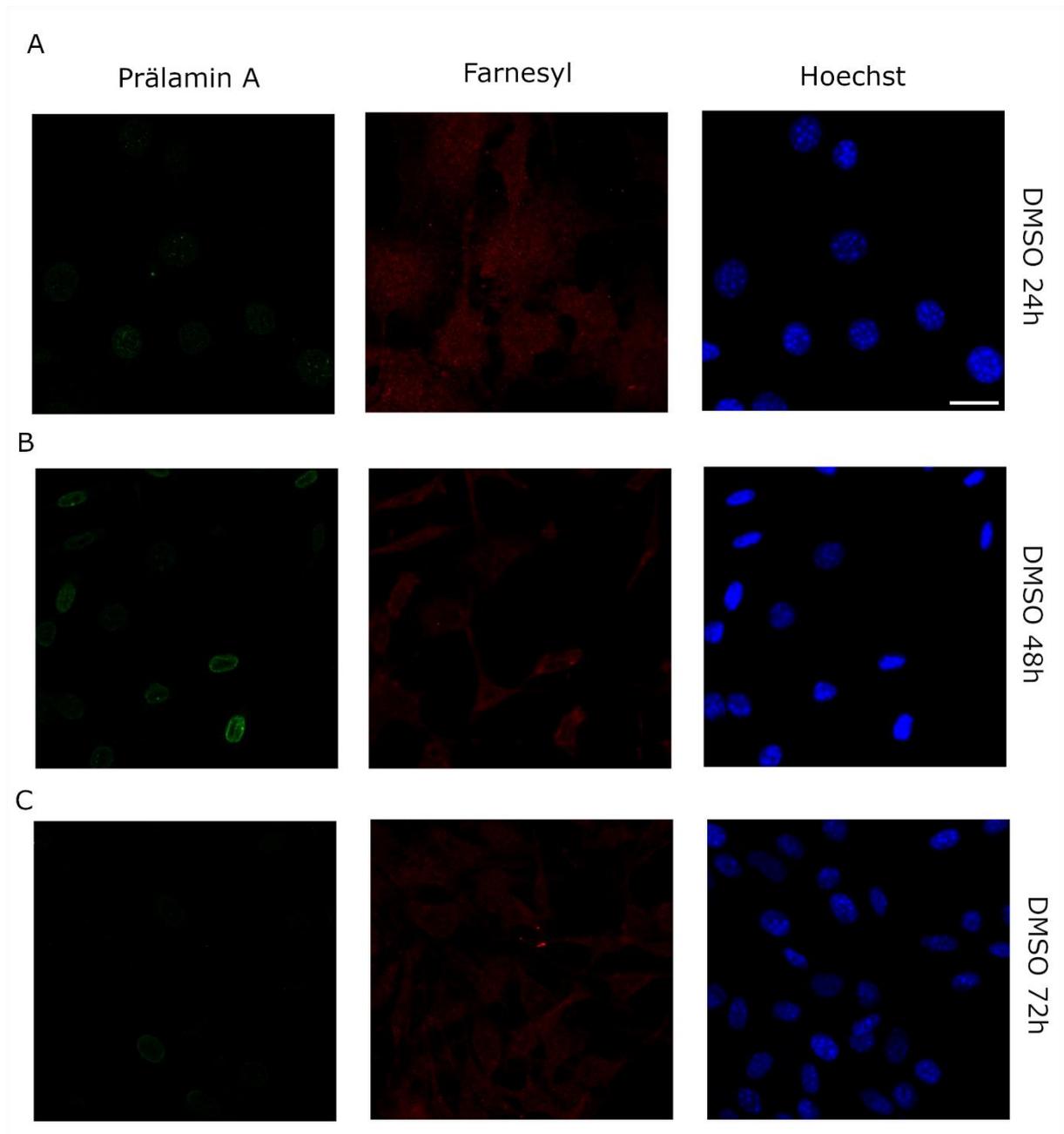
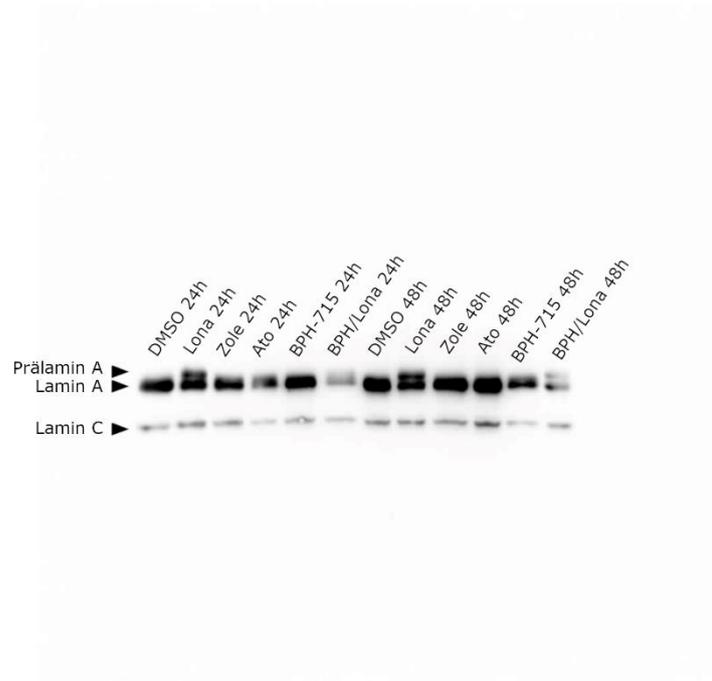


Abbildung 2: D1-Zellen wurden nur mit Trägersubstanz DMSO als Negativkontrollen behandelt. Nach 24 h (A), 48 h (B) und 72 h (C) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamina A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten ist, dass auch ohne Behandlung Prälamina A im Zellkern detektierbar ist, sowie ein diffuses Anti-Farnesyl Signal verteilt über die Zellen. Maßstabsskala, 20 μ m.

3.1. Statine sind keine effizienten Farnesylierungsinhibitoren

Atorvastatin-Behandlung der D1 Zellen hat innerhalb der ersten 24 h eine Prälamina A Akkumulation bewirkt (Abbildung 1A). Jedoch lässt die Akkumulation nach 48 h wieder nach (Abbildung 1B). Die Signale sind dann kaum mehr intensiver als bei den Negativkontrollen (Abbildung 2). Genauso lässt die vorerst sichtbare allgemeine Farnesylierungsinhibition nach 24 h massiv nach was vor allem in den Western Blots offensichtlich ist (Abbildung 3B). Während nach 24 h Atorvastatin-Behandlung nur wenige Farnesylbanden im Vergleich zur DMSO Kontrolle wahrnehmbar waren, was für eine temporäre Farnesylierungsinhibition spricht, waren nach 48 h Behandlung wieder alle Banden ersichtlich (Abbildung 3B). Bei den Lamin A/C Blots war keine spezifische Prälamina A Bande sichtbar (Abbildung 6A).

A



B

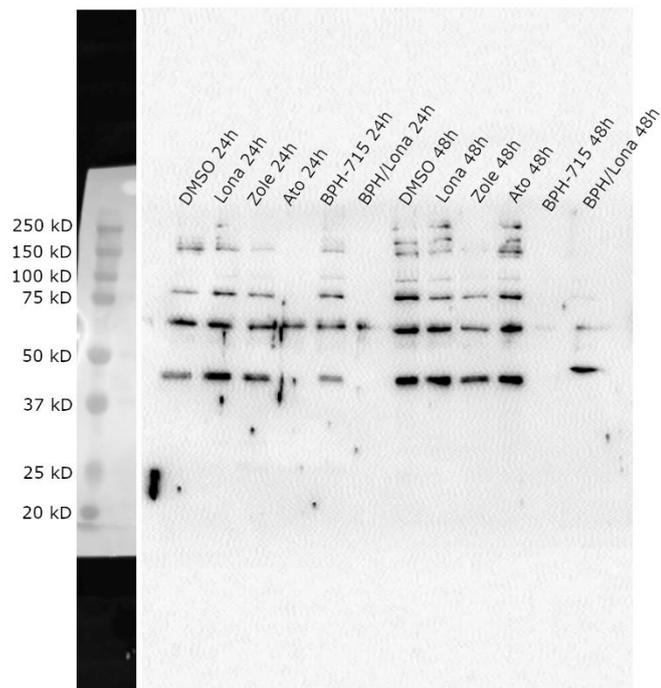


Abbildung 3: Western Blot Analyse von Zellen, die 24 h bzw. 48 h mit DMSO, 10 μ M Lonafarnib (Lona), 30 μ M Zoledronate (Zole), 10 μ M Atorvastatin (Ato), 10 μ M BPH-715 oder einer Kombination aus 10 μ M BPH-715 und 10 μ M Lonafarnib (BPH/Lona) behandelt wurden. Es wurden 5 μ g der entsprechenden Proteinlysate aufgetragen und mittels Western Blot mit Lamin A/C Antikörpern (A) bzw. Anti-Farnesyl Antikörpern (B) analysiert.

3.2. Bisphosphonate zeigen die geringste Farnesylierungsinhibition

Nachdem verschiedene stickstoffhaltige Bisphosphonate (Ibandronate, Zoledronate und Alendronate) in vorherigen Experimenten ausprobiert wurden, waren die Ergebnisse bezüglich Prälamin A Akkumulation nicht erfolgreich. Zoledronate zeigte in diesen Versuchen noch die stärkste Akkumulation von Prälamin A in der Immunfluoreszenz. Das Prälamin A Signal nach Zoledronate Behandlung (Abbildung 4C und D) ist jedoch nur leicht erhöht gegenüber den Negativkontrollen (Abbildung 2). Ähnlich schwache Prälamin A Signale zeigt auch das lipophile Bisphosphonat BPH-715 (Abbildung 4A und B). Eine spezifische Prälamin A Bande konnte in mit Zoledronate als auch BPH-715 behandelten D1-Zellen mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3A). Auch kann man keine generelle Prenylierungsinhibition der beiden Bisphosphonate nachweisen (Abbildung 3B). Die Farnesylsignale der IF zeigen bei beiden Bisphosphonaten ähnliche Ergebnisse. Die Zellkerne sind deutlich ausgespart sichtbar (Abbildung 4).

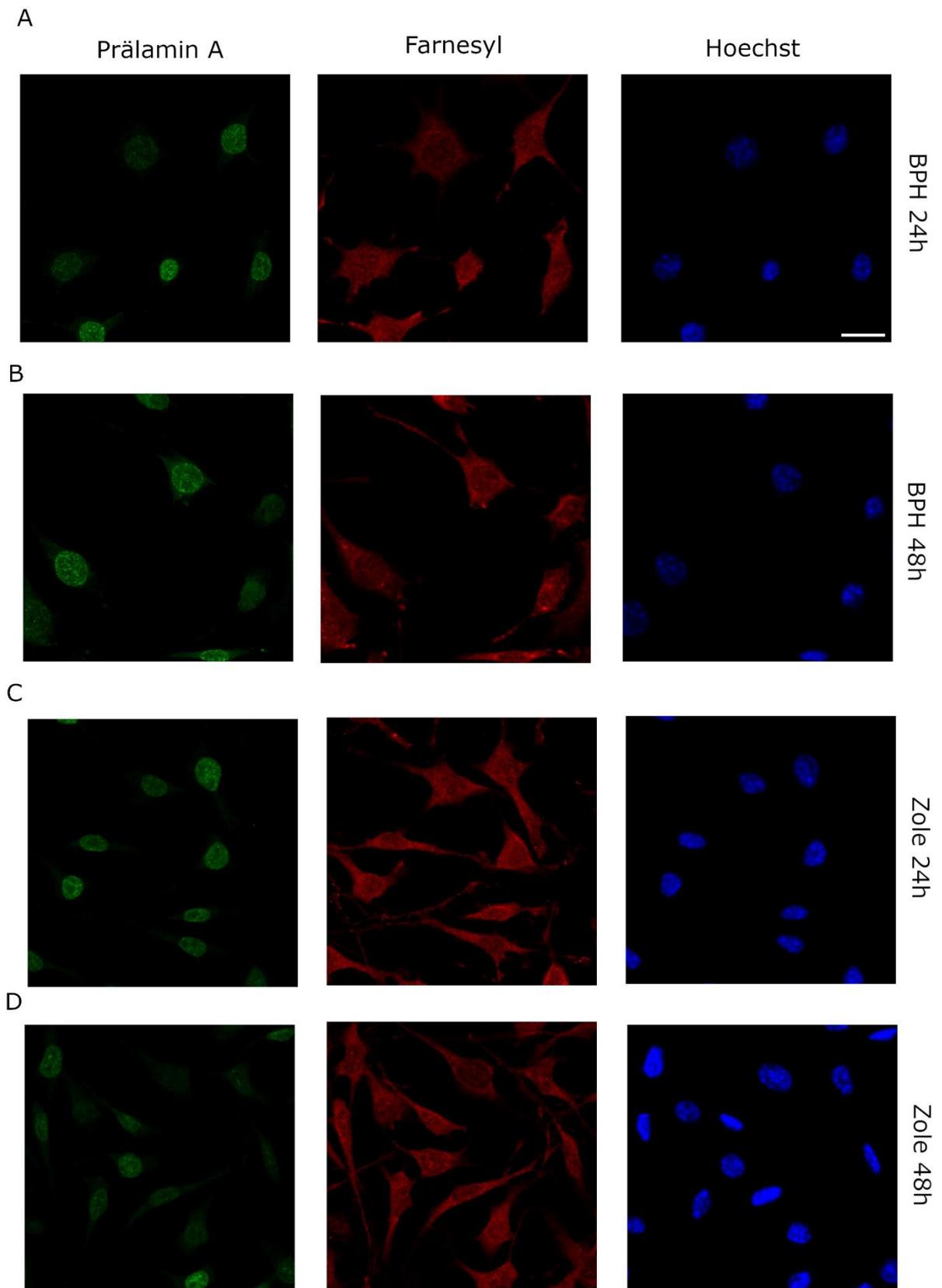


Abbildung 4: D1-Zellen, die mit 10 μ M BPH-715 (A und B) bzw. 30 μ M Zoledronate (C und D) behandelt wurden. Nach 24 h (A und C) bzw. nach 48 h (B und D) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamin A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten sind die schwachen Prälamin A Signale in allen Aufnahmen. Anti-Farnesyl Färbungen in B und D weisen typisch ausgesparte Zellkerne auf. Maßstabsskala, 20 μ m.

3.3. Eine neue Kombinationstherapie könnte die Effizienz von FTIs erhöhen

In dieser Arbeit wird mittels Western Blot gezeigt, dass trotz Behandlung mit Lonafarnib sowohl nach 24 h als auch nach 48 h noch immer mehr Lamin A als Prälamin A vorhanden ist (Abbildung 3A). Somit wäre im Fall von HGPS der Großteil von Progerin immer noch farnesyliert bzw. geranylgeranyliert. Auch sieht man keine Verringerung der Intensität der Farnesylbanden nach einer Lonafarnib Behandlung (Abbildung 3B).

Somit ergab sich für mich die Schlussfolgerung mit Lonafarnib, einem FTI, und mit BPH-715, einem primären GGPPS Inhibitor, eine Kombinationstherapie zu erproben. Die Prälamin A Färbung der Kombination (Abbildung 5) ist im Vergleich zur Monotherapie mit Lonafarnib (Abbildung 6) bei allen Zeitpunkten intensiver.

Im Western Blot mit dem Anti-Farnesyl Antikörper konnten bei den Proben, die mit der Kombination behandelt wurden, sowohl nach 24 h als auch nach 48 h fast keine Banden mehr detektiert werden (Abbildung 3B). Demzufolge zeigt die Kombinationsbehandlung die beste Prenylierungsinhibierung. Interessanterweise wurde bei dieser Behandlung generell eine starke Reduktion des Lamin A Signals beobachtet (unverhältnismäßig zum Anstieg des Prälamin A Signals) (Abbildung 3A). Nach 24 h scheint kein prozessiertes Lamin A mehr vorhanden zu sein und nach 48 h ist sowohl eine schwache Prälamin A Bande als auch eine schwache Lamin A Bande zu sehen (Abbildung 3A). Die Lamin C Bande ist bei der Kombination ähnlich ausgeprägt wie bei den anderen Proben (Abbildung 3A).

Die Anti-Farnesyl IF-Färbungen bieten bei den meisten Medikamenten wenig Aussagekraft. Die Färbungen zeigen meist ein vermehrt zytoplasmatisches Signal (Abbildung 1, Abbildung 2, Abbildung 4). Die Zellkerne sind teilweise sogar gut sichtbar ausgespart (Abbildung 4B und D). Überraschenderweise zeigen die mit Lonafarnib behandelten Zellen ein gut sichtbares nucleoplasmatisches Signal (Abbildung 6A und B). Bei der Kombinationstherapie zeigt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 5A und B). Hier ist hervorzuheben, dass das zytoplasmatische

Farnesylnal immer schwächer wird. Nach 24 h ist noch ein ausgeprägtes zytoplasmatisches Signal vorhanden (Abbildung 5) und bereits nach 72 h Behandlung ist dieses kaum mehr sichtbar (Abbildung 5C). Das nucleoplasmatische Signal ist dagegen immer noch sichtbar (Abbildung 5). Das spricht wieder für eine generelle gute Prenylierungsinhibition.

Hervorzuheben ist auch, dass das Prälamina A Signal unabhängig von der Behandlungsdauer immer ähnlich intensiv ist. Sowohl bei der Kombination (Abbildung 5), als auch bei Lonafarnib (Abbildung 4). Genauso ist bei der Prälamina A Bandenintensität kein Unterschied zwischen einer 24-stündigen oder 48-stündigen Lonafarnib Inkubation sichtbar (Abbildung 3A). Eine Akkumulation von Prälamina A ist bereits nach vier Stunden nachweisbar (Adam et al., 2013).

Bei der Kombinationstherapie zeigen die Kerne der behandelten Zellen eine andere Morphologie (hauptsächlich kreisförmig) (Abbildung 5) als die Kerne der nur mit Lonafarnib behandelten Zellen (eher länglich und unförmig) (Abbildung 6).

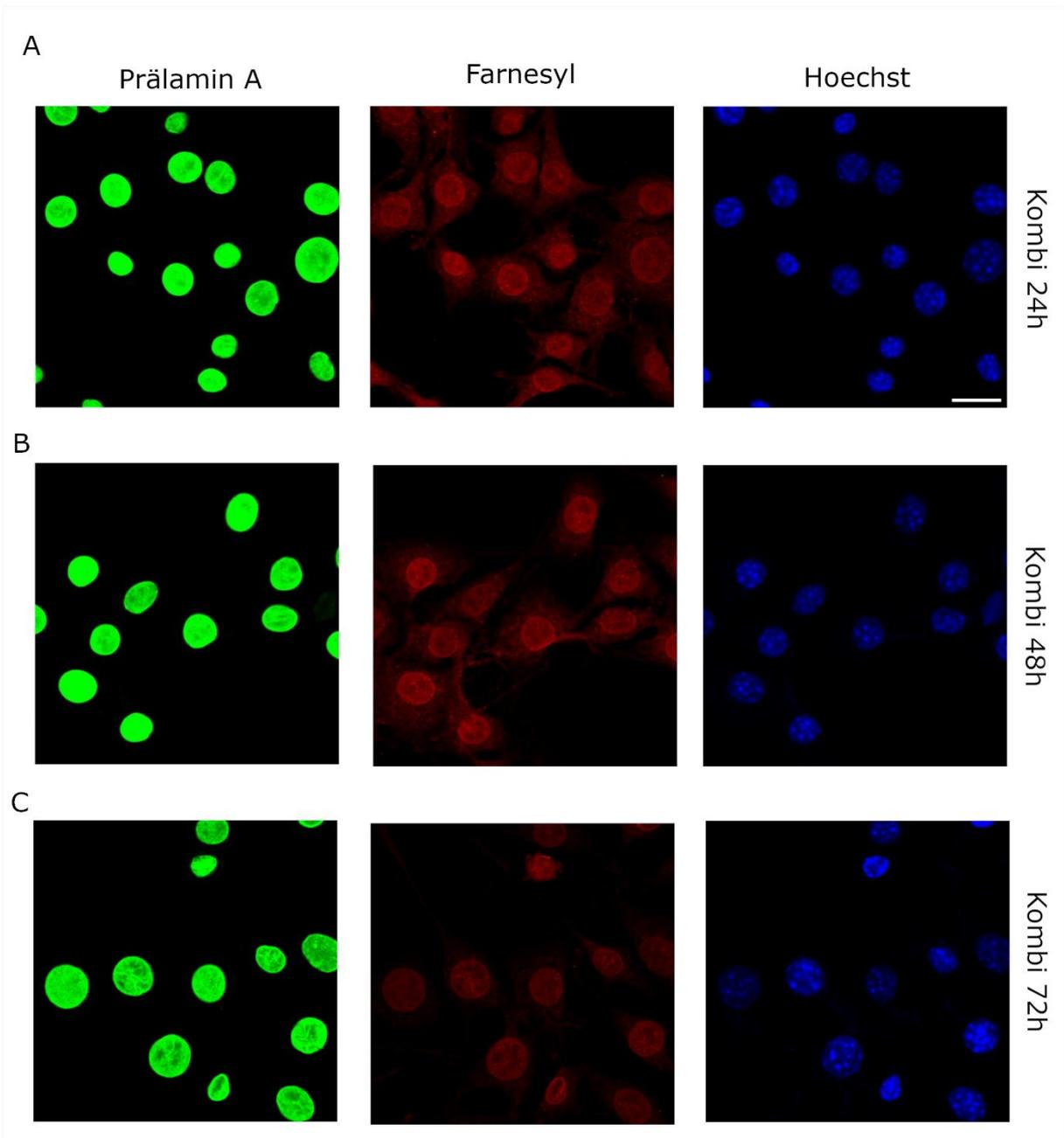


Abbildung 5: D1-Zellen, die mit 10 μM BPH-715 und 10 μM Lonafarnib kombiniert behandelt wurden (Kombi). Nach 24 h (A), 48 h (B) und 72 h (C) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamin A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten sind, die intensiven Prälamin A Signale, eine sehr runde Zellkernmorphologie und ein deutlich sichtbares nucleoplasmatisches Farnesyl Signal. Nach 72-stündiger Behandlung ist das zytoplasmatische Farnesyl Signal fast nicht mehr sichtbar (C). Maßstabsskala, 20 μm .

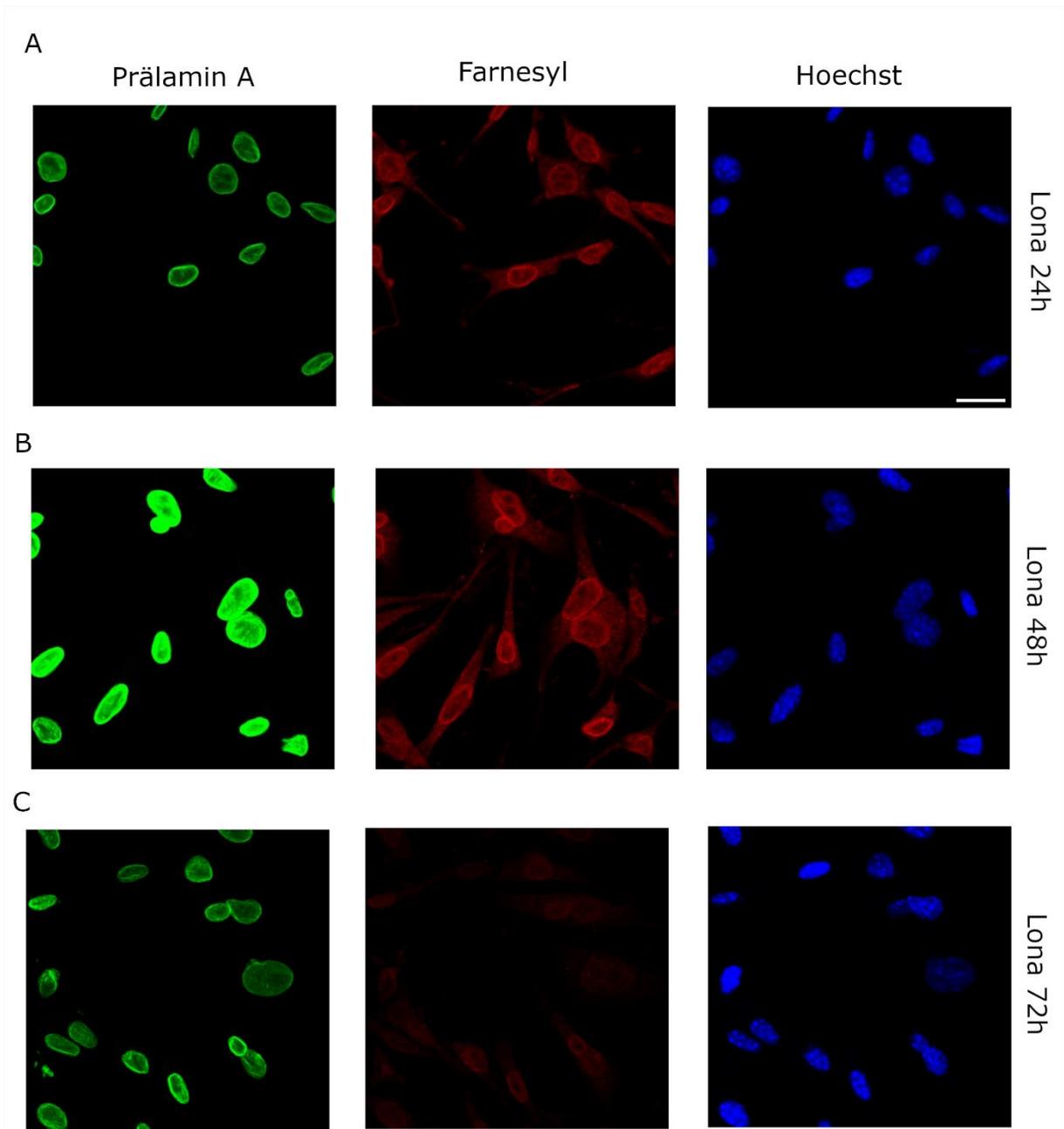


Abbildung 6: D1-Zellen, die mit 10 μM Lonafarnib behandelt wurden. Nach 24 h (A), 48 h (B) und 72 h (C) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamin A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten sind Prälamin A Signale, deren Intensität von der Behandlungsdauer unabhängig ist, und gut sichtbare nucleoplasmatische, sowie Zellkernmembran assoziierte Farnesyl Signale. Maßstabsskala, 20 μm .

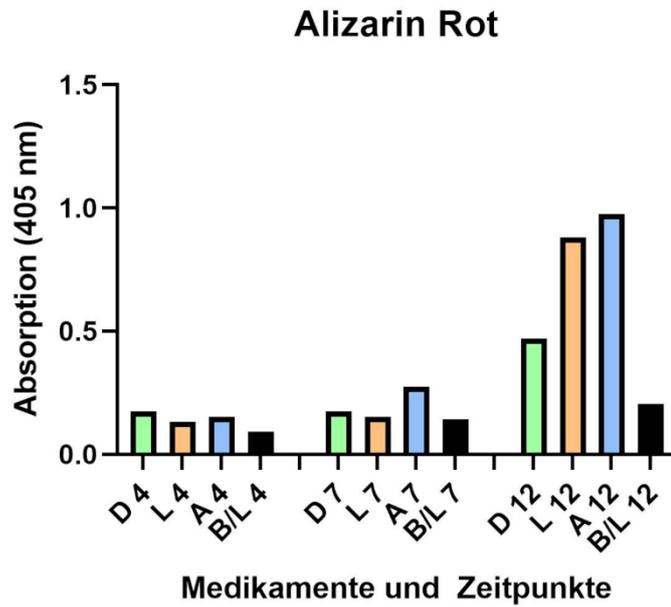
3.4. Differenzierung

Die Auswirkung der verschiedenen Wirkstoffe auf die osteogene Differenzierung der D1 Zellen wurde mittels Alizarin Rot Färbung und ALP-Aktivitätsmessung analysiert. Dazu wurden D1

Zellen in Ab- bzw. Anwesenheit der unterschiedlichen Wirkstoffe zur Differenzierung induziert und nach 4, 7 bzw. 12 Tagen für die Analysen aufbereitet. Atorvastatin scheint, wie in der Literatur beschrieben, die Mineralisierung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen leicht zu erhöhen (Abbildung 7A). Jedoch ist die ALP Aktivität zu allen gemessenen Zeitpunkten geringer als jene der unbehandelten Zellen (Abbildung 7B). Die mit Lonafarnib behandelten Zellen weisen überraschenderweise am Tag 12 eine stärkere Mineralisierung als die unbehandelten Zellen auf (Abbildung 7A). Die geringeren ALP Aktivitäten decken sich mit der Erfahrung aus vergangenen Experimenten und zeigen, dass FTIs die Differenzierung leicht inhibieren (Abbildung 7B). Die Kombination aus Lonafarnib und BPH-715 scheint die Differenzierung erheblich zu behindern. Sowohl die ALP Aktivitäten als auch die Mineralisierung fallen wesentlich geringer aus (Abbildung 7A und B). Jedoch war die Konzentration von BPH-715 wahrscheinlich zu hoch. Am Ende der zwölf Tage waren schon viele apoptotische Zellen zu beobachten.

Durch verschiedenste Probleme waren längere Zeit keine Differenzierungsexperimente möglich. Dadurch fehlten wichtige Informationen über die richtigen Konzentrationen der Bisphosphonate. 5 μM für BPH-715 und 30 μM für Zoledronate waren im Falle der Differenzierung toxisch für die Zellen, weswegen keine Ergebnisse bezüglich ALP Messung und Alizarin Rot Färbung verfügbar sind. Bei Experimenten, die in Proliferationsmedium durchgeführt wurden, konnte innerhalb von 72 h bei diesen Konzentrationen keine Toxizität beobachtet werden. Der spannendste Aspekt des Differenzierungsexperiments ist, dass 5 μM BPH-715 in Kombination mit 10 μM Lonafarnib nicht toxisch war. BPH-715 alleine war allerdings schon toxisch.

A



B

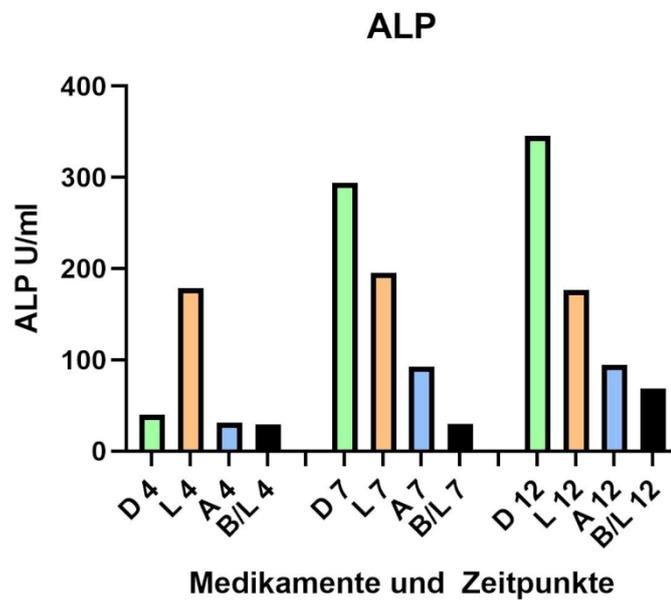


Abbildung 7: Osteogene Differenzierung der D1 Zellen mit Medikamentenbehandlung. Die Differenzierung lief über 12 Tage und die Zeitpunkte der Probenahme waren Tag 4, 7 und 12. Die Zellen wurden mit DMSO (D), 10 μ M Lonafarnib (L), 10 μ M Atorvastatin (A) und 5 μ M BPH-715 in Kombination mit 10 μ M Lonafarnib (B/L) behandelt. A: Die Mineralisierung der Zellen wurde mithilfe der Alizarin Rot Färbung durch Absorptionsmessung bei 405 nm bestimmt. B: Die ALP Aktivität wurde mithilfe einer ALP-Aktivitäts Standardgerade errechnet.

4. Diskussion

Statine bewirken bei D1 Zellen nur eine temporäre Farnesylierungsinhibition (Abbildung 1). Der Hintergrund für eine ausschließlich temporäre Inhibition der Statine könnte in der Induktion des zu inhibierenden Enzyms liegen. Bereits nach 16 h führt eine Lovastatin Behandlung in der Zellkultur zu 15fach erhöhten Proteinleveln der HMG-CoA Reduktase. Auch andere, in der klinischen Anwendung befindliche Statine, zeigen eine starke Induktion der HMG-CoA Reduktase (Simvastatin 15fach, Pravastatin 12fach, Fluvastatin 11fach, Atorvastatin 9fach und Rosuvastatin 17fach) (Jiang et al., 2018). Folglich könnte die im Vergleich zu den anderen Statinen geringste HMG-CoA Reduktase Induktion von Atorvastatin ein weiterer Grund dafür sein, warum Atorvastatin in meinen Experimenten am besten in Bezug auf die Akkumulation von Prälamina A funktioniert hat. Die Ursache, weshalb die Proteinlevel der HMG-CoA Reduktase nach Statinbehandlung mit der Zeit ansteigen, könnte eine reduzierte Ubiquitinierung der HMG-CoA Reduktase sein. Um der HMG-CoA Reduktase Akkumulierung entgegenzutreten, wurden Sterol Analoga entwickelt. Ein Beispiel hierfür ist HMG499 (Cmpd 81), welches als HMG-CoA Reduktase Degrader fungiert. Dadurch wird die Statin induzierte HMG-CoA Reduktase Akkumulierung verhindert (Jiang et al., 2018). HMG499 ist am Markt erhältlich und würde einige weiterführende Experimente ermöglichen. Vielleicht wäre eine dauerhafte Prenylierungsinhibition durch eine Kombination von HMG499 und Statinen möglich. In einer ganz aktuellen Studie wurde HMG499 weiterentwickelt. Dort konnte, durch Adaptionen, die Nebenwirkung der Cholesterollakkumulierung von HMG499 unterbunden werden und die Effizienz der Verbindung erhöht werden (Li et al., 2022). Damit kommt vielleicht in der Zukunft ein noch besserer HMG-CoA Reduktase Degrader auf den Markt.

Zoledronate induziert kaum stärkere Prälamina A Signale (Abbildung 4C und D) als die Negativkontrollen (Abbildung 2). Ein Grund dafür könnte sein, dass Bisphosphonate generell als hydrophil bezeichnet werden und dadurch eine sehr geringe Bioverfügbarkeit von <1 % nach oraler Applikation vorweisen. Dadurch müssen sie parazellulär transportiert werden (Drake et al., 2008). Ein parazellulärer Transport *in vitro*, könnte möglicherweise auch eine verringerte zelluläre Aufnahme der Bisphosphonate in der Zellkultur bedeuten. Es wurde mit verschiedensten Konzentrationen experimentiert. Doch auch mit zytotoxischen Konzentrationen in Vorexperimenten konnte keine effizientere Farnesylierungsinhibition und Akkumulation von Prälamina A erzielt werden.

Eine Lösung diesbezüglich sollten lipophile Bisphosphonate wie BPH-715 bringen. Doch auch BPH-715 (Abbildung 4A und B) induzierte kein intensiveres Prälamin A Signal als Zoledronate. Ein Grund dafür könnte sein, dass BPH-715 die FPPS erst inhibiert, wenn das Medikament bereits zytotoxisch wirkt. Jedoch könnte die GGPPS bereits bei niedrigen Konzentrationen gut inhibiert werden, weshalb BPH-715 in Kombination mit Lonafarnib eingesetzt wurde.

Alternative Prenylierung bei Medikation mit einem FTI ist der Grund für die geringe Effizienz der FTIs (Varela et al., 2008). Deswegen wurde versucht mit einer Triple-Medikament Therapie hier anzusetzen. Warum die Triple-Medikament Therapie bei der Behandlung von HGPS nicht effektiver ist, könnte an der oben beschriebenen HMG-CoA Reduktase Induktion liegen und an der geringen Bioverfügbarkeit der Bisphosphonate. Neue Erkenntnisse und Wirkstoffe könnten zu einer Kombination von HMG-CoA Degradern mit Statinen oder lipophilen Bisphosphonate führen. Lipophile Bisphosphonate weisen eine geringere Affinität zu Knochenmineral auf und eine erhöhte zelluläre Aufnahme, weshalb die *in vivo* Aktivität gegenüber der zugelassenen Bisphosphonate erhöht ist (Zhang et al., 2009). Deswegen sollten noch weitere Studien mit der in dieser Arbeit vorgestellten Kombinationstherapie durchgeführt werden. Zwei Besonderheiten sprechen für diese Kombinationstherapie. Erstens wiesen die Kerne von Zellen, welche mit einer Kombination aus Lonafarnib und BPH-715 behandelt wurden, eine sehr kreisförmige Morphologie auf (Abbildung 5). HGPS Zellen zeigen häufig deformierte Zellkerne (Varela et al., 2008). Zweitens könnten die schwachen Lamin A und Prälamin A Banden auf eine Degradierung von Prälamin A und Lamin A hindeuten (Abbildung 3A). Im Falle von HGPS Zellen, würde das eine Degradierung von Progerin bedeuten. Niedrigere Lamin A Synthese Level deuten auf eine Reduktion des Krankheitsphänotyps hin (Yang et al., 2010). Demnach wäre die Übertragung der Kombinationstherapie auf HGPS Zellen ein spannendes Ziel für die Zukunft.

Lonafarnib induziert ein nucleoplasmatisches Farnesyl Signal (Abbildung 6). Nachdem Lamin A alternativ durch Geranylgeranyl prenyliert werden kann, wäre es möglich, dass auch B-Typ Lamine alternativ prenyliert werden. Durch die Geranylgeranylisierung könnten Probleme bei der weiteren -CAAX-Box Prozessierung auftreten. Die endoproteolytische Abspaltung der letzten drei Aminosäuren könnte behindert werden, was eine schlechtere Kernmembranverankerung zur Folge haben könnte. Folglich könnten die Proteine geranylgeranyliert nucleoplasmatisch akkumulieren. So wurde gezeigt, dass FTI Behandlung zu einer erhöhten nucleoplasmatischen Akkumulation von Lamin B2 führen kann (Adam et

al., 2013). Demgegenüber steht, dass geranylgeranyl ein 45fach effektiverer Membrananker ist als Farnesyl (Davies et al., 2009). Weiter entsteht bei Anwesenheit eines FTIs eine Form von Lamin B2, die elektrophoretisch langsamer migriert als das eigentliche posttranslational prozessierte Lamin B2. Allerdings findet die Akkumulierung auch in Anwesenheit eines Geranylgeranyltransferaseinhibitors (GGTIs) statt (Adam et al., 2013). Somit muss man davon ausgehen, dass das nucleoplasmatische Lamin B2 Signal nicht farnesyliert und nicht geranylgeranyliert ist. Um die Prozessierung der B-Typ Lamine in Anwesenheit der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe genauer zu untersuchen, könnten in weiteren Experimenten die Immunpräzipitation von Lamin B1 und B2 mit anschließender Analyse mittels Western Blot mit Anti-Farnesyl und Anti-Lamin B1 bzw. B2 Antikörpern durchgeführt werden. A-Typ und B-Typ Lamine bilden getrennte, aber miteinander interagierende Netzwerke unter der inneren Kernmembran (Adam et al., 2013). Nachdem unsere Kombinationstherapie eine veränderte Kernmorphologie zeigte, wäre es interessant zu wissen, wieviel der B-Typ Lamine in farnesylierter Form vorliegt und inwieweit das die Struktur der einzelnen Netzwerke und dadurch die Morphologie der Zellkerne beeinflusst. Hochauflösende Immunfluoreszenzmikroskopie in Kombination mit Immunpräzipitation und massenspektroskopischer Analyse könnte dazu beitragen.

Eine weitere Theorie hinter dem nucleoplasmatischen Farnesyl Signal betrifft die FTase. Die kristalline Struktur der FTase zeigt zwei Einbuchtungen, welche jeweils eine für Farnesylpyrophosphat und eine für das -CAAX-Motiv sein könnten (Mukherjee & Guha, 2006). Lonafarnib ist ein -CAAX-Kompetitor (Dhillon, 2021). Die FTase bildet mit Farnesylpyrophosphat einen nicht kovalenten Komplex, der dann eine -CAAX-Box farnesyliert (Baumann & Menon, 2002). Während also die -CAAX Bindungsstelle durch Lonafarnib geblockt ist, kann weiterhin Farnesylpyrophosphat in der Farnesylbindungsstelle binden. Dafür müsste jedoch die FTase im Kern lokalisiert sein. Die genaue Lokalisierung der FTase ist jedoch immer noch nicht genau geklärt. Zmpste24 und Icmt, zwei Enzyme der Prälamina A Prozessierung, sind sowohl in der inneren Kernmembran als auch in der ER Membran lokalisiert (Barrowman et al., 2008). Bei einer IF mit Anti-Farnesyltransferase Antikörpern konnte kein eindeutig nukleär angereichertes Signal entdeckt werden (Barrowman et al., 2008). Dementsprechend kann von einer Lokalisierung der FTase sowohl im Kern als auch im Zytosol ausgegangen werden. Der Komplex zwischen FTase und Farnesylpyrophosphat könnte durch Lonafarnib Behandlung im Kern akkumulieren, weshalb das deutliche nukleäre Farnesyl Signal auftritt. Diese veränderte Lokalisierung bzw. Akkumulierung könnte in

Immunfluoreszenzstudien mit Anti-FTase Antikörpern überprüft werden. Zusätzlich könnte eine FTase Knockout Zelllinie dazu verwendet werden, um zu überprüfen, ob das nach Lonafarnib Behandlung im Zellkern akkumulierende Farnesyl Signal tatsächlich von an die FTase gebundenem Farnesylpyrophosphat stammt. Darüber hinaus könnte mit dieser Knockout Zelllinie die alternative Prenylierung von Prälamins A bewiesen werden und die Effizienz der FTIs besser verglichen werden. Ein Problem könnte jedoch sein, dass FTIs in Fibroblasten Zellseneszenz verursachen (Adam et al., 2013). Bei einem FTase Knockout könnten also die Zellen nicht mehr teilungsfähig sein.

5. Zusammenfassungen

Lamin A wird als Prälamina A translatiert und anschließend carboxyterminal am -CAAX Motiv posttranslational modifiziert. Die -CAAX-Box wird farnesyliert, endoproteolytisch gespalten und carboxymethyliert. Danach werden die letzten 15 Aminosäuren, inklusive farnesylierter -CAAX-Box, proteolytisch abgeschnitten. Beim Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom bleibt das mutierte Lamin A Protein dauerhaft farnesyliert, weshalb die Patient*innen den Phänotyp des vorzeitigen Alterns tragen. Ein bereits zur Behandlung zugelassener Farnesyltransferaseinhibitor, Lonafarnib, soll die Farnesylierung verhindern und dadurch zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führen. Eine Lonafarnib Behandlung induziert eine Prälamina A Akkumulation in mesenchymalen Stromazellen. Der Effekt der Behandlung ist jedoch begrenzt, was auf eine alternative Prenylierung durch Geranylgeranyl zurückzuführen sein könnte. Farnesyl und Geranylgeranyl sind Produkte des Mevalontweges. Statine und Bisphosphonate inhibieren unterschiedliche Schritte genau dieses Syntheseweges. Statine greifen zu einem frühen Zeitpunkt ein, indem sie die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase inhibieren. Bisphosphonate hingegen inhibieren die Farnesylpyrophosphat synthase und Geranylgeranylpyrophosphat synthase. Eine Triple-Medikament Therapie bestehend aus Lonafarnib (Farnesyltransferaseinhibitor), Zoledronat (Bisphosphonat) und Pravastatin (Statin) sollte bei Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom Patient*innen Besserung gegenüber der Lonafarnib Monotherapie bringen, welche jedoch aus bis jetzt nicht bekannten Gründen nicht eintrat. In dieser Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot der Einfluss von Statinen, Bisphosphonaten und Lonafarnib in murinen mesenchymalen Stromazellen auf die Prozessierung von Lamin A, die allgemeine zelluläre Farnesylierung und die osteogene Differenzierung untersucht. Mit einer alternativen Kombinationsbehandlung bestehend aus Lonafarnib und einem lipophilen Bisphosphonat konnte eine verbesserte Prenylierungsinhibition geschaffen werden. Gleichzeitig konnte eine neue Perspektive zur Bewertung von Prenylierungsinhibitionen erprobt und ein vermeintlicher Nebeneffekt von Farnesyltransferaseinhibitoren identifiziert werden.

6. Summary

Lamin A is translated as prelamin A and subsequently post-translationally modified. The modification occurs carboxy-terminal at a so-called CAAX box. The CAAX-box becomes farnesylated, endoproteolytically cleaved, and carboxymethylated. In a final step, the last 15 amino acids, including the farnesylated CAAX-box, are proteolytically cleaved off. In Hutchinson-Gilford progeria syndrome, the mutated lamin A protein remains permanently farnesylated, which causes the phenotype of premature aging. A farnesyltransferase inhibitor already approved for treatment, lonafarnib, prevents farnesylation, thus leading to an improved disease pattern. Lonafarnib treatment induces prelamin A accumulation in mesenchymal stromal cells. However, the effect of the treatment is limited, which may be due to alternative prenylation by geranylgeranyl. Farnesyl and geranylgeranyl are products of the mevalonate pathway, which is inhibited by statins and bisphosphonates at different steps. Statins intervene at an early stage by inhibiting the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Bisphosphonates, on the other hand, inhibit the farnesyl pyrophosphate synthase and the geranylgeranyl pyrophosphate synthase. A triple-drug therapy consisting of lonafarnib (farnesyltransferase inhibitor), zoledronate (bisphosphonate), and pravastatin (statin) was expected to improve treatment outcomes compared to the lonafarnib monotherapy in Hutchinson-Gilford progeria syndrome patients. However, no improvement was observed due to reasons yet unknown. In this study the influence of statins, bisphosphonates and lonafarnib on the processing of lamin A, on the cellular farnesylation in general, and on the osteogenic differentiation was investigated in murine stromal cells. Using an alternative combination treatment consisting of lonafarnib and a lipophilic bisphosphonate demonstrated an improved prenylation inhibition. Furthermore, a new perspective to evaluate prenylation inhibition was tested and a potential side effect of farnesyltransferase inhibitors was identified.

7. Abkürzungsliste

| | |
|----------|--|
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| FTI | Farnesyltransferaseinhibitor |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| IF | Immunfluoreszenz |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| SDS-Page | Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gelelektrophorese |
| TBST | Tris-buffered saline mit 0,05 % Tween 20 |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| ALP | Alkalische Phosphatase |
| pNPP | para-Nitrophenylphosphat |
| FTase | Farnesyltransferase |
| HGPS | Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom |

| | |
|---------|--------------------------------------|
| FPPS | Farnesylpyrophosphatsynthase |
| GGPPS | Geranylgeranylpyrophosphatsynthase |
| ECM | Extrazellulärmatrix |
| GGTI | Geranylgeranyltransferaseinhibitor |
| HMG-CoA | 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A |

8. Referenzen

- Adam, S. A., Butin-Israeli, V., Cleland, M. M., Shimi, T., & Goldman, R. D. (2013). Disruption of lamin B1 and lamin B2 processing and localization by farnesyltransferase inhibitors. *Nucleus*, *4*(2), 142–150. <https://doi.org/10.4161/nucl.24089>
- Barrowman, J., Hamblet, C., George, C. M., & Michaelis, S. (2008). Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(12), 5398–5408. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-07-0704>
- Basso, A. D., Kirschmeier, P., & Bishop, W. R. (2006). Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, *47*(1), 15–31. <https://doi.org/10.1194/jlr.R500012-JLR200>
- Baumann, N. A., & Menon, A. K. (2002). *Chapter 2 Lipid modifications of proteins* (pp. 37–54). [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(02\)36004-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(02)36004-6)
- Buhaescu, I., & Izzedine, H. (2007). Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications. *Clinical Biochemistry*, *40*(9–10), 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.03.016>
- Davies, B. S. J., Fong, L. G., Yang, S. H., Coffinier, C., & Young, S. G. (2009). The Posttranslational Processing of Prelamin A and Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *10*(1), 153–174. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150150>
- Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., & Goldman, R. D. (2010). Nuclear Lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(11), a000547–a000547. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000547>
- Dechat, Thomas, Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., & Goldman, R. D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Development*, *22*(7), 832–853. <https://doi.org/10.1101/gad.1652708>
- Dhillon, S. (2021). Lonafarnib: First Approval. *Drugs*, *81*(2), 283–289.

<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01464-z>

- Drake, M. T., Clarke, B. L., & Khosla, S. (2008). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(9), 1032–1045. <https://doi.org/10.4065/83.9.1032>
- Gao, J., Liao, J., & Yang, G.-Y. (2009). CAAX-box protein, prenylation process and carcinogenesis. *American Journal of Translational Research*, 1(3), 312–325. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956441>
- Gordon, L. B., Kleinman, M. E., Massaro, J., D'Agostino, R. B., Shappell, H., Gerhard-Herman, M., Smoot, L. B., Gordon, C. M., Cleveland, R. H., Nazarian, A., Snyder, B. D., Ullrich, N. J., Silvera, V. M., Liang, M. G., Quinn, N., Miller, D. T., Huh, S. Y., Downton, A. A., Littlefield, K., ... Kieran, M. W. (2016). Clinical Trial of the Protein Farnesylation Inhibitors Lonafarnib, Pravastatin, and Zoledronic Acid in Children With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation*, 134(2), 114–125. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022188>
- Hanna, H., Mir, L. M., & Andre, F. M. (2018). In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>
- Jiang, S.-Y., Li, H., Tang, J.-J., Wang, J., Luo, J., Liu, B., Wang, J.-K., Shi, X.-J., Cui, H.-W., Tang, J., Yang, F., Qi, W., Qiu, W.-W., & Song, B.-L. (2018). Discovery of a potent HMG-CoA reductase degrader that eliminates statin-induced reductase accumulation and lowers cholesterol. *Nature Communications*, 9(1), 5138. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07590-3>
- Li, X.-Z., Jiang, S.-Y., Li, G.-Q., Jiang, Q.-R., Li, J.-W., Li, C.-C., Han, Y.-Q., Song, B.-L., Ma, X.-R., Qi, W., & Qiu, W.-W. (2022). Synthesis of heterocyclic ring-fused analogs of HMG499 as novel degraders of HMG-CoA reductase that lower cholesterol. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 236, 114323. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114323>
- Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T., & Horiuchi, N. (2001). Simvastatin Promotes Osteoblast Differentiation and Mineralization in MC3T3-E1 Cells. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications, 280(3), 874–877.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4232>

Mukherjee, J., & Guha, A. (2006). Ras Signaling Pathways and Farnesyltransferase Inhibitors. In *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy* (pp. 173–184). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-012088410-0/50050-0>

Park, J., Pandya, V. R., Ezekiel, S. J., & Berghuis, A. M. (2021). Phosphonate and Bisphosphonate Inhibitors of Farnesyl Pyrophosphate Synthases: A Structure-Guided Perspective. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.612728>

Pasha, M. K., Muzeeb, S., Basha, S. J. S., Shashikumar, D., Mullangi, R., & Srinivas, N. R. (2006). Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors— atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis an. *Biomedical Chromatography*, 20(3), 282–293.
<https://doi.org/10.1002/bmc.561>

Sadeghi, M. M., Collinge, M., Pardi, R., & Bender, J. R. (2000). Simvastatin Modulates Cytokine-Mediated Endothelial Cell Adhesion Molecule Induction: Involvement of an Inhibitory G Protein. *The Journal of Immunology*, 165(5), 2712–2718.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2712>

Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A. P., Navarro, C. L., Suárez, M. F., Cau, P., Cadiñanos, J., Osorio, F. G., Foray, N., Cobo, J., de Carlos, F., Lévy, N., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nature Medicine*, 14(7), 767–772.
<https://doi.org/10.1038/nm1786>

von Knoch, F., Jaquier, C., Kowalsky, M., Schaeren, S., Alabre, C., Martin, I., Rubash, H. E., & Shanbhag, A. S. (2005). Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 26(34), 6941–6949.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.059>

Yang, S. H., Andres, D. A., Spielmann, H. P., Young, S. G., & Fong, L. G. (2008). Progerin elicits disease phenotypes of progeria in mice whether or not it is farnesylated. *Journal of*

Clinical Investigation, 118(10), 3291–3300. <https://doi.org/10.1172/JCI35876>

- Yang, S. H., Chang, S. Y., Andres, D. A., Spielmann, H. P., Young, S. G., & Fong, L. G. (2010). Assessing the efficacy of protein farnesyltransferase inhibitors in mouse models of progeria. *Journal of Lipid Research*, 51(2), 400–405. <https://doi.org/10.1194/jlr.M002808>
- Yang, S. H., Chang, S. Y., Ren, S., Wang, Y., Andres, D. A., Spielmann, H. P., Fong, L. G., & Young, S. G. (2011). Absence of progeria-like disease phenotypes in knock-in mice expressing a non-farnesylated version of progerin. *Human Molecular Genetics*, 20(3), 436–444. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq490>
- Zhang, Y., Cao, R., Yin, F., Hudock, M. P., Guo, R.-T., Krysiak, K., Mukherjee, S., Gao, Y.-G., Robinson, H., Song, Y., No, J. H., Bergan, K., Leon, A., Cass, L., Goddard, A., Chang, T.-K., Lin, F.-Y., Beek, E. Van, Papapoulos, S., ... Oldfield, E. (2009). Lipophilic Bisphosphonates as Dual Farnesyl/Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Inhibitors: An X-ray and NMR Investigation. *Journal of the American Chemical Society*, 131(14), 5153–5162. <https://doi.org/10.1021/ja808285e>

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: D1-Zellen, die mit 10 μ M Atorvastatin behandelt wurden. Nach 24 h (A), 48 h (B) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamin A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten ist, eine nach 24 h nachlassende Prälamin A Akkumulierung. Maßstabsskala, 20 μ m. 9

Abbildung 2: D1-Zellen wurden nur mit Trägersubstanz DMSO als Negativkontrollen behandelt. Nach 24 h (A), 48 h (B) und 72 h (C) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamin A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten ist, dass auch ohne Behandlung Prälamin A im Zellkern detektierbar ist, sowie ein diffuses Anti-Farnesyl Signal verteilt über die Zellen. Maßstabsskala, 20 μ m. 10

Abbildung 3: Western Blot Analyse von Zellen, die 24 h bzw. 48 h mit DMSO, 10 μ M Lonafarnib (Lona), 30 μ M Zoledronate (Zole), 10 μ M Atorvastatin (Ato), 10 μ M BPH-715 oder einer Kombination aus 10 μ M BPH-715 und 10 μ M Lonafarnib (BPH/Lona) behandelt wurden. Es wurden 5 μ g der entsprechenden Proteinlysate aufgetragen und mittels Western Blot mit Lamin A/C Antikörpern (A) bzw. Anti-Farnesyl Antikörpern (B) analysiert. 12

Abbildung 4: D1-Zellen, die mit 10 μ M BPH-715 (A und B) bzw. 30 μ M Zoledronate (C und D) behandelt wurden. Nach 24 h (A und C) bzw. nach 48 h (B und D) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamin A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten sind die schwachen Prälamin A Signale in allen Aufnahmen. Anti-Farnesyl Färbungen in B und D weisen typisch ausgesparte Zellkerne auf. Maßstabsskala, 20 μ m. 15

Abbildung 5: D1-Zellen, die mit 10 μ M BPH-715 und 10 μ M Lonafarnib kombiniert behandelt wurden (Kombi). Nach 24 h (A), 48 h (B) und 72 h (C) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamin A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten sind, die intensiven Prälamin A Signale, eine sehr runde Zellkernmorphologie und ein deutlich sichtbares nucleoplasmatisches Farnesyl Signal. Nach 72-stündiger Behandlung ist das zytoplasmatische Farnesyl Signal fast nicht mehr sichtbar (C). Maßstabsskala, 20 μ m. 17

Abbildung 6: D1-Zellen, die mit 10 μM Lonafarnib behandelt wurden. Nach 24 h (A), 48 h (B) und 72 h (C) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Farnesyl (rot) und Anti-Prälamina A (grün) Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Zu beachten sind Prälamina A Signale, deren Intensität von der Behandlungsdauer unabhängig ist, und gut sichtbare nucleoplasmatische, sowie Zellkernmembran assoziierte Farnesyl Signale. Maßstabsskala, 20 μm 18

Abbildung 7: Osteogene Differenzierung der D1 Zellen mit Medikamentenbehandlung. Die Differenzierung lief über 12 Tage und die Zeitpunkte der Probenahme waren Tag 4, 7 und 12. Die Zellen wurden mit DMSO (D), 10 μM Lonafarnib (L), 10 μM Atorvastatin (A) und 5 μM BPH-715 in Kombination mit 10 μM Lonafarnib (B/L) behandelt. A: Die Mineralisierung der Zellen wurde mithilfe der Alizarin Rot Färbung durch Absorptionmessung bei 405 nm bestimmt. B: Die ALP Aktivität wurde mithilfe einer ALP-Aktivitäts Standardgerade errechnet. 20