

**ETABLIERUNG DER HUMANEN MYT1 KINASE ALS ZIELSTRUKTUR
MODERNER ARZNEISTOFFENTWICKLUNG:
BEITRÄGE ZU EXPRESSION UND ASSAYENTWICKLUNG**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften)
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Apothekerin und staatl. gepr. Dipl. LMC Claudia Bäßler geb. Philipp
geb. am 25. April 1982 in Nordhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wolfgang Sippl, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Hans-Herrmann Rüttinger, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Manfred Jung, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Halle (Saale), August 2011

verteidigt am: 15.12.2011

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Formelverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Zielsetzung	4
2 Grundlagen	5
2.1 Zellzyklus	5
2.2 Kinasen	6
2.2.1 Cyclin-abhängige Kinasen unter besonderer Berücksichtigung der G2/M-Phase	8
2.2.2 Wee Kinasen	9
2.2.2.1 Wee1 Kinase	10
2.2.2.2 Myt1 Kinase inklusive Bezug zu Vorarbeiten aus der AG Sippl	11
2.3 Tumorerkrankungen und deren Therapie	12
2.4 Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Krebstherapie	13
2.5 Naturstoffe in der Krebstherapie	14
2.5.1 Alglynglykolipide als potentielle Myt1 Kinase-Inhibitoren	15
2.6 Fluoreszenzpolarisation	15
2.7 Kapillarelektrophorese	18
3 Material und Methoden	21
3.1 Geräte	21
3.2 Verbrauchsmaterial	23
3.3 Reagenzien und sonstiges Material	23
3.3.1 Laborchemikalien	23
3.3.2 Kits	24
3.3.3 Antikörper	24
3.3.4 Enzyme	25
3.3.5 Molekulargewichtsstandards	25
3.3.6 Bakterienstämme	25
3.3.7 Plasmide	25
3.3.8 Material zur Aufreinigung der Myt1 Kinase	26

3.4	Lösungen	26
3.4.1	Pufferlösungen für Markierung und Testung	26
3.4.2	Sonstige Lösungen für Markierung und Testung	27
3.4.3	Puffer und Lösungen für den ELISA	27
3.4.4	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot	28
3.4.5	Medien und Lösungen für Expression der Myt1 Kinase	30
3.4.6	Lösungen zur Aufreinigung der Myt1 Kinase	33
3.5	Peptidsubstrate	33
3.5.1	Aufarbeitung der Peptidlyophilisate	34
3.5.2	Massenspektrometrische Qualifizierung	35
3.5.3	Quantifizierung der Peptidlösungen	35
3.5.3.1	Absorptionsmessung bei 280 nm	36
3.5.3.2	Säurehydrolyse und Quantifizierung über HPLC	36
3.5.4	Fluoreszenzmarkierung der Peptide	37
3.5.4.1	Markierung mit Fluoreszenzmarker ABD-F	38
3.5.4.2	Markierung mit Fluoreszenzmarker Fluorescein-5-maleimid	39
3.5.5	Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten Peptide über HPLC	41
3.5.5.1	Aufreinigung der ABD-markierten Peptide	41
3.5.5.2	Aufreinigung des F5M-markierten pTpY	42
3.5.6	Massenspektrometrische Qualifizierung der markierten Peptide	42
3.5.7	Quantifizierung der ABD-markierten Peptide	43
3.5.8	Aufnahme von Fluoreszenzspektren	43
3.5.9	Quantifizierung von pTpY-F5M	44
3.6	Entwicklung von Testsystemen zur Aktivitätsbestimmung der Myt1	44
3.6.1	Fluoreszenzpolarisations Assay	44
3.6.1.1	Allgemeines und Plattenreader BMG NOVOstar	44
3.6.1.2	Nachweis der Spezifität des Phospho-CDC2 Tyr ¹⁵ Antikörpers - ELISA	46
3.6.1.3	Auswahl der Sonde und Sensitivitätstest	47
3.6.1.4	Bestimmung der optimalen AK Konzentration	47
3.6.1.5	Verdrängungsexperimente	48
3.6.1.6	Erste Umsatzversuche mit Enzym	48
3.6.1.7	Optimierung der FP Methode und Bestimmung des Signalfensters	51
3.6.2	Kapillarelektrophorese Methode	53
3.6.2.1	Allgemeines	53
3.6.2.2	Erste Umsatzversuche mit Enzym	54
3.6.2.3	Optimierung der CE Methode	55
3.7	Herstellung Myt1	56

3.7.1	Strategien	56
3.7.2	Expression in E. coli	57
3.7.2.1	Überblick	57
3.7.2.2	Molekularbiologische Arbeiten	58
3.7.2.3	Schüttelkolbenkultivierung	59
3.7.2.4	Probenanlage und Probenaufbereitung	60
3.7.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
3.7.2.6	Western Blot	62
3.7.2.7	Adaption auf Minimalmedium	63
3.7.2.8	Fermentation	65
3.7.2.9	Optimierung der Expression	66
3.7.2.10	Aufschluss und Reinigung	66
3.7.3	Expression in Insektenzellen	69
3.7.4	Expression in humanen Zellen	70
3.8	Aktivitätsbestimmung Myt1	70
3.8.1	Überblick	70
3.8.2	Berechnung von Aktivität und Hemmung via CE Methode	71
3.8.3	Berechnung von Aktivität und Hemmung via FP Assay	72
3.9	Inhibitorentestung	74
3.9.1	Untersuchte Verbindungen	74
3.9.2	Testung mit Hilfe der CE Methode	75
3.9.3	Testung mit Hilfe des FP Assays	76
4	Ergebnisse und Diskussion	79
4.1	Fluoreszenzmarkierte Peptide als Substrate	79
4.1.1	Peptididentifizierung mittels MALDI-TOF/TOF- und LTQ-Orbitrap-XL-MS	79
4.1.2	Quantifizierung von TY Stammlösung	80
4.1.2.1	Absorptionsmessung bei 280 nm	80
4.1.2.2	Hydrolyse und Quantifizierung über HPLC	80
4.1.2.3	Vergleich der beiden Methoden	81
4.1.3	Identifizierung der fluoreszenzmarkierten Peptide	81
4.1.3.1	ABD-markierte Peptide	81
4.1.3.2	F5M – markiertes pTpY	83
4.1.4	Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten Peptide	84
4.1.4.1	ABD-markierte Peptide	84
4.1.4.2	F5M-markiertes pTpY	84
4.1.5	Fluoreszenzspektren	86
4.1.6	Zusammenfassung	87

4.2	Testsysteme zur Aktivitätsbestimmung der Kinase Myt1	88
4.2.1	Entwicklung eines Fluoreszenzpolarisations Assays	88
4.2.1.1	ELISA	93
4.2.1.2	Auswahl der Platte	95
4.2.1.3	Auswahl der Sonde	95
4.2.1.4	Optimale AK Konzentration	99
4.2.1.5	Verdrängungsexperimente	99
4.2.1.6	Erste Umsatzversuche und Aktivitätstest	101
4.2.1.7	Optimierung der FP Methode und Bestimmung des Signalfensters	104
4.2.2	Entwicklung einer Kapillarelektrophorese Methode	110
4.2.2.1	Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzmarkers	110
4.2.2.2	Erste Umsatzversuche und Aktivitätsmessungen der Myt1 Kinase	113
4.2.2.3	Optimierung der CE Methode	115
4.2.3	Zusammenfassung und Diskussion	117
4.2.3.1	Vergleich der beiden Testsysteme	117
4.3	Expression der Myt1 Kinase	120
4.3.1	Überblick	121
4.3.2	Bakterielle Expression	122
4.3.2.1	Überblick	122
4.3.2.2	Expressionssysteme I - III	123
4.3.2.3	Fermentation	125
4.3.2.4	Aufschluss und Reinigung	126
4.3.2.5	<i>Codon Usage</i> optimierte Expressionssysteme IV und V	131
4.3.3	Myt1 Kinase aus Expressionen in Insektenzellen und humanen Zellen	139
4.3.4	Vergleich der unterschiedlichen Expressionsmethoden	139
4.3.5	Zusammenfassung und Diskussion	140
4.4	Bestimmung von Kinaseaktivität und Hemmung	143
4.4.1	Myt1-Aktivitätsbestimmung über CE und FP	143
4.4.2	Hemmstoffuntersuchungen	146
4.4.3	Zusammenfassung und Diskussion	150
5	Schlussbetrachtung	153
5.1	Zusammenfassung	153
5.2	Ausblick	155
6	Literaturverzeichnis	157
Anhang		163

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
ABD	Peptidgebundener Fluoreszenzmarker (7-sulfamoylbenzofurazan)
ABD-F	4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan
α -HCCA	α -Cyano-4-hydroxymitsäure
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Brij 35	Polyoxyethylenminolaurylether
CAK	Cyclin-abhängige Kinase 2 aktivierende Kinase
CCD	Contactless Conductivity Detection (Leitfähigkeitsdetektion)
CDC	Cell division control protein (CDC2 = CDK1)
CDK	Cyclin dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
CE	Kapillarelektrophorese
CMGC	Containing CDK, MAPK, GSK3, CLK families
CRM	Nuklearer Transport Rezeptor
CRS	Cytoplasmatic retention sequence
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTMAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EOF	Elektroendosmotischer Fluss
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronensprayionisation
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
F5M	Fluorescein-5-maleimid
FLD	Fluoreszenzdetektor
FP	Fluoreszenzpolarisation
ggf.	gegebenenfalls
GA	Gain Adjustment
Glu	Glutaminsäure
HeLa-Zellen	Humane Endothelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lachs
HEC	Hydroxyethylcellulose

His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactosid
LB	Luria Bretani (LB Medium)
M	Mitose
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight
MBB	Monobrombiman
MM	Minimalmedium
mP	Millipolarisation
MPF	M-phase-promoting factor
MS	Massenspektrometrie
m/V	Masse pro Volumen
n.b.	nicht bestimmbar
NTA	Nitrilotriacetat
OD	optische Dichte
O-DMA	O-Demethylangolensin
Plk1	Polo like kinase 1
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of the Mean
SK	Schüttelkolben
SL	Stammlösung
SOB	Super Optimal Broth (-Medium)
SOC	SOB-Medium mit 20 mM Glucose
TBS	Tris Buffered Saline
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
TY	CDC2-abgewandeltes Peptid TY
TpY	CDC2-abgewandeltes Peptid mit Phosphatgruppe am Tyrosin
pTY	CDC2-abgewandeltes Peptid mit Phosphatgruppe am Threonin
pTpY	CDC2-abgewandeltes Peptid mit Phosphatgruppe am Threonin und Tyrosin
UV	Ultraviolett
V/V	Volumen pro Volumen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Zellzyklus mit den beteiligten Proteinen	5
Abb. 2.2 Das Dendrogramm des humanen Genoms	7
Abb. 2.3 Kontrolle der CDC2 Aktivität durch inhibitorische Phosphorylierung	9
Abb. 2.4 Regulation der Wee Kinaseaktivität und Beeinflussung des G2/M-Übergangs	10
Abb. 2.5 Kinasedomäne der Wee1A	11
Abb. 2.6 Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Myt1	12
Abb. 2.7 Schematische Darstellung des Messprinzips zur Bestimmung der FP	16
Abb. 2.8 Schematische Übersicht der FP-Unterschiede zwischen kleinen und großen Molekülen	17
Abb. 2.9 Schematischer Aufbau einer CE Anlage	18
Abb. 2.10 Theoretische Trennung verschiedener Kationen bei der Elektrophorese	19
Abb. 2.11 Theoretische Trennung von Kationen, Anionen und Neutralteilchen unter Ausnutzung des EOF	20
Abb. 3.1 Primärstruktur der CDC2-abgewandelten Peptide	34
Abb. 3.2 Markierungsreaktion mit ABD-F	38
Abb. 3.3 Markierungsreaktion mit F5M	40
Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Plattenbelegung des ELISA	46
Abb. 3.5 Fließschema zur Adaption von E. coli HM130 pGEX6P1-hMyt1-His ₄ an MM	64
Abb. 3.6 Aufschluss und Reinigung von E. coli HM130 pGEX6P1-hMyt1-His ₄ über IMAC	68
Abb. 4.1 Kalibriergerade für Tyrosinbestimmung im Peptidhydrolysat	80
Abb. 4.2 Beispielchromatogramm für einen Markierungsansatz mit ABD-F	82
Abb. 4.3 Beispielchromatogramm für einen Markierungsansatz mit F5M	83
Abb. 4.4 Emissionsspektren der Kalibrierlösungen von Fluorescein-5-maleimid	85
Abb. 4.5 Kalibriergerade zur Quantifizierung von pTpY-F5M	85
Abb. 4.6 Anregungs- und Emissionsspektrum von TY-ABD	86
Abb. 4.7 Anregungs- und Emissionsspektrum von pTpY-F5M	87
Abb. 4.8 Schema für den FP Assay, Variante 1	90
Abb. 4.9 Schema für den FP Assay, Variante 2	92
Abb. 4.10 Schematischer Aufbau des ELISA	93
Abb. 4.11 ELISA – Platte: Zustand nach der Farbentwicklung	94
Abb. 4.12 Graphische Auswertung des ELISA	94
Abb. 4.13 Sensitivitätstest mit TY-ABD	97
Abb. 4.14 Sensitivitätstest mit pTpY-F5M	98
Abb. 4.15 Direkttitration von AK an pTpY-F5M	99
Abb. 4.16 Verdrängungstitrationen des pTpY-F5M mit Antikörper durch die Peptide TY, TpY, pTY und pTpY	100
Abb. 4.17 Titrationskurven des pTpY-F5M-AK-Komplexes mit TpY oder pTpY	101
Abb. 4.18 Erste Umsatzmessungen ohne Abstoppen der Enzymreaktion	102

Abb. 4.19 Vergleich unterschiedlicher Techniken zum Abstoppen der Enzymreaktion	103
Abb. 4.20 Beispielhafte Darstellung des Hintergrundkorrektureffekts beim FP Assay	104
Abb. 4.21 Optimierung des Gain Adjustments durch Verwendung von Fluorescein	106
Abb. 4.22 Fluoreszenzpolarisation des Maximalsignals in Abhängigkeit der AK Konzentration	107
Abb. 4.23 Signalfenster und Z'-Faktor des FP Assays in Abhängigkeit der AK Konzentration	109
Abb. 4.24 Retentionszeitbestimmung der Peptid-ABD Referenzlösungen über CE	112
Abb. 4.25 Elektropherogramm einer Aktivitätsbestimmung der Myt1	114
Abb. 4.26 Vergleich unterschiedlicher Inkubationszeiten einer Umsatzprobe	115
Abb. 4.27 Mehrfache Injektion eines Peptidmixes zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Signalstärke und Retentionszeit	116
Abb. 4.28 Übersicht über die Klonierung der humanen Myt1 Kinase am Beispiel des Expressionssystems I	123
Abb. 4.29 Adaption von <i>E. coli</i> HM130 / CAG597 auf Minimalmedium	124
Abb. 4.30 Western Blot einer Expression von GST-hMyt1-His ₄ mit <i>E. coli</i> HM130 pGEX6P1-hMyt1-His ₄	125
Abb. 4.31 Batch-Fermentation 15 l zur Produktion von GST-Myt1-His ₄ in <i>E. coli</i> HM130	126
Abb. 4.32 Analyse der 1/OD-Proben der Batch-Fermentation	126
Abb. 4.33 SDS-Polyacrylamid-Gel und Western Blot nach Aufschluss und Reinigung von 200 g BFM über GSH-Säule bei Raumtemperatur (Reinigung A)	128
Abb. 4.34 Diagramm zur Reinigung von <i>E. coli</i> HM130 pGEX6P1-hMyt1-His ₄	129
Abb. 4.35 SDS-Polyacrylamid-Gel nach Aufschluss und Reinigung von 200 g BFM über IMAC (Reinigung B)	130
Abb. 4.36 Adaption von <i>E. coli</i> BL21 pET-20b-Myt1 / pGEX-2T-Myt1 auf Minimalmedium	132
Abb. 4.37 SDS-Polyacrylamid-Gel von <i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T-Myt1 (Modell IV) auf die Expression und Löslichkeit von GST-hMyt1-His ₆	133
Abb. 4.38 SDS-Polyacrylamid-Gel von <i>E. coli</i> BL21 pET-20b-Myt1 (Modell V) auf die Expression und Löslichkeit von hMyt1-His ₆	133
Abb. 4.39 Beurteilung der Expression und Löslichkeit von hMyt1-His ₆ mittels SDS-PAGE und Western Blot	137
Abb. 4.40 Western Blots nach Aufschluss und Reinigung (IMAC) von 8 g BFM <i>E. coli</i> BL21 pET-20b-Myt1	138
Abb. 4.41 Darstellung eines Reaktionsverlaufs mit Enzympräparation aus Insektenzellen via CE	145
Abb. 4.42 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf Umsätze beim FP Assay	148
Abb. 4.43 Einfluss von Sunitinib auf Umsatz und Positivkontrollen im FP Assay	149
Abb. 4.44 Massenbestimmung von TY mittels MALDI-TOF/TOF	163
Abb. 4.45 Massenbestimmung von TpY mittels MALDI-TOF/TOF	164
Abb. 4.46 Massenbestimmung von pTpY mittels MALDI-TOF/TOF	165

Abb. 4.47 Massenbestimmung von pTY mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS	166
Abb. 4.48 Massenbestimmung von TY-ABD mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS	167
Abb. 4.49 Massenbestimmung von TpY-ABD mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS	168
Abb. 4.50 Massenbestimmung von pTY-ABD mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS	169
Abb. 4.51 Massenbestimmung von pTpY-ABD mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS	170
Abb. 4.52 Massenbestimmung von pTpY-F5M mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS	171
Abb. 4.53 Analyse der 1/OD-Proben von E. coli BL21 pGEX-2T-Myt1 (Modell IV)	172
Abb. 4.54 Analyse der 1/OD-Proben von E. coli BL21 pET-20b-Myt1 (Modell V)	173
Abb. 4.55 SDS-Polyacrylamid-Gel des rekombinanten Enzyms Myt1 aus der Expression in S2-Zellen	174

Formelverzeichnis

Formel 2.1 Zusammenhang zwischen Polarisationswert und der Rotations-Relaxationszeit	15
Formel 2.2 Berechnung der Polarisation	17
Formel 2.3 Berechnung der Anisotropie	17
Formel 2.4 Berechnung der Anisotropie aus der Polarisation und vice versa	18
Formel 3.1 Berechnung der Polarisation unter Einbezug des K-Faktors	45
Formel 3.2 Berechnung des Volumens Bakteriensuspension zur Entnahme einer x/OD-Probe	60
Formel 3.3 Auswertung CE: Berechnung des Quotienten Q	71
Formel 3.4 Auswertung CE: Berechnung des Substratumsatzes	72
Formel 3.5 Auswertung CE: Berechnung der Hemmung durch einen Inhibitor	72
Formel 3.6 Berechnung der Fluoreszenzpolarisation unter Beachtung des K-Faktors	73
Formel 3.7 Berechnung des 100 % Umsatzes im FP Assay	73
Formel 3.8 Berechnung des Substratumsatzes [%] im FP Assay	74
Formel 3.9 Berechnung der Hemmung [%] im FP Assay	74
Formel 4.1 Formel zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ bei 280 nm für Peptide oder Proteine	80
Formel 4.2 Berechnung der Masse von TY-ABD	82
Formel 4.3 Berechnung der Masse von pTpY-F5M	84
Formel 4.4 Berechnung des Signalfensters und des Z'-Faktors	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Aufarbeitung, Reinheit und theoretische Konzentration der ersten Peptide	35
Tabelle 3.2 Übersicht über die HPLC Methode zur Peptidquantifizierung	37
Tabelle 3.3 Übersicht über die HPLC Methode zur Aufreinigung eines Markierungsansatzes	41
Tabelle 3.4 Übersicht der Änderungen der HPLC Methode zur Aufreinigung von pTpY-F5M	42
Tabelle 3.5 Ansätze und deren Komponenten bei Umsatzexperimenten mittels FP Assay	48
Tabelle 3.6 Pipettierschema [μ l] zu Umsatzexperimenten mittels FP-Assay vor der Durchführung der Optimierung	49
Tabelle 3.7 Endkonzentrationen im FP Assay, bezogen auf Enzymreaktion und Gesamtvolumen vor der Optimierung	51
Tabelle 3.8 Pipettierschema für die Standardansätze im FP Assay nach Optimierung des Messsystems	52
Tabelle 3.9 Zusammenfassung der Geräteparameter nach Optimierung des FP Assays	53
Tabelle 3.10 Schritte und Parameter der optimierten CE Methode	54
Tabelle 3.11 Pipettierschema [μ l] zur Aktivitätsbestimmung der Myt1	55
Tabelle 3.12 Übersicht über die zur selektiven Kultivierung eingesetzten Antibiotika	59
Tabelle 3.13 Pipettierschema [μ l] zur Myt1 Aktivitätsbestimmung mittels FP Assay	73
Tabelle 3.14 Pipettierschema [μ l] der Screeningexperimente mittels CE Methode	76
Tabelle 3.15 Pipettierschema [μ l] der Screeningexperimente mittels FP Assay	77
Tabelle 4.1 Gegenüberstellung der theoretischen und der tatsächlich gefundenen monoisotopischen Massen von TY, TpY, pTY und pTpY	79
Tabelle 4.2 Gegenüberstellung der ermittelten und der theoretischen Konzentration der TY SL	81
Tabelle 4.3 Gegenüberstellung der theoretischen und der tatsächlich gefundenen monoisotopischen Massen von TY-ABD, TpY-ABD, pTY-ABD und pTpY-ABD	83
Tabelle 4.4 Akzeptanzkriterien für Signalfenster und Z'-Faktor	108
Tabelle 4.5 Ermittelte Signalfenster und Z'-Faktoren für die verschiedenen AK-Konzentrationen im FP-Assay	108
Tabelle 4.6 Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten bakteriellen Expressionssysteme zur Gewinnung der Myt1 Kinase	122
Tabelle 4.7 Übersicht der durchgeführten Experimente mit <i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T-hMyt1	123
Tabelle 4.8 Übersicht zu Aufschluss und Reinigung der Myt1 Kinase aus der durch Fermentation gewonnenen Biomasse von <i>E. coli</i> HM130 pGEX6P1-hMyt1-His ₄	127
Tabelle 4.9 Auswertung der Schüttelkolbenversuche zur Optimierung der Expression und Löslichkeit von GST-hMyt1-His ₆ in <i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T-Myt1	134
Tabelle 4.10 Auswertung der Schüttelkolbenversuche zur Optimierung der Expression und Löslichkeit von hMyt1-His ₆ in <i>E. coli</i> BL21 pET-20b-Myt1	135
Tabelle 4.11 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf Umsätze bei der CE Methode	147

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Die Grundlagenforschung hat in den vergangenen Jahren entscheidend dazu beigetragen, die biologische Heterogenität von Krebserkrankungen, molekulare Mechanismen und interindividuelle Unterschiede im menschlichen Genom besser zu verstehen. Dieses Wissen wird seit einiger Zeit für die zielgerichtete Krebstherapie genutzt¹.

Während die konventionelle Krebstherapie hauptsächlich auf die Abtötung schnell proliferierender Zellen abzielt, ohne dabei eine Unterscheidung zwischen normalen und kanzerogenen Zellen zu ermöglichen, wird bei der Entwicklung neuer Krebstherapeutika der Schwerpunkt auf eine spezifische und individualisierte Behandlung gelegt. Der Begriff der „individualisierten“ Medizin ist jedoch nicht als eine auf den einzelnen Patienten personalisierte Therapie zu verstehen, sondern beschreibt vielmehr die Therapie gegenüber bestimmten Krebsformen und damit assoziierten speziellen molekularen Veränderungen. Heute lassen sich viele Tumorerkrankungen unterschiedlichen biologischen Subtypen zuordnen. Diese zeichnen sich jeweils durch bestimmte Fehlfunktionen auf molekularer Ebene aus und können nach ihrer Identifizierung als Zielstruktur für eine medikamentöse Behandlung fungieren.

Die zielgerichtete Krebstherapie umfasst beispielsweise die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern, Tyrosinkinase-Inhibitoren, Cyclin-abhängige Kinase(CDK)-Inhibitoren oder Proteasom-Inhibitoren. Hemmstoffe wie Imatinib, Erlotinib, Sunitinib oder Pazopanib greifen gezielt in Signalwege des Tumorstoffwechsels ein und sind aus der heutigen Therapie nicht mehr wegzudenken. Das Gleiche gilt auch für Antikörper wie z.B. Trastuzumab, eingesetzt zur Behandlung bestimmter Brustkrebsarten oder Bevacizumab als Angiogenesehemmer. Zum Teil stellen diese Krebstherapeutika die einzige Möglichkeit zur Therapie von Tumorerkrankungen dar, die auf klassische Chemo- oder Strahlentherapie nicht ansprechen. Schließlich, aber nicht zuletzt, helfen diese neuen Therapeutika, häufig in Kombination mit traditioneller Chemotherapie, Resistenzen von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu überwinden und dabei deren typische Nebenwirkungen zu reduzieren.

Eine Welle neuer Medikamente dieses Wirkungsansatzes kündigte Anfang 2011 der Verband der forschenden Pharmaunternehmen an. So soll beispielsweise die neue Arzneistoffgruppe der CTLA-4-Antagonisten die Aktivierung von T-Killerzellen bei fortgeschrittenen Tumoren, wie dem schwarzen Hautkrebs, erleichtern. Die monoklonalen Antikörper Ipilimumab und Tremelimumab befinden sich derzeit in einem fortgeschrittenen Stadium der klinischen Entwicklung. Ipilimumab hat im März 2011 eine Zulassung in den USA erhalten und ist in der EU zur Zulassung eingereicht. Tremelimumab befindet sich derzeit in der Erprobung mit Patienten in der klinischen Phase II². Sie sollen ihre Wirkung über eine Blockade des CTLA-4 Proteins auf der Oberfläche der T-Killerzellen, welches normalerweise die Zellen vor einer zu schnellen Immunreaktion bewahrt, erzielen. Eine andere Gruppe neuer Medikamente stellen die Integrin-Inhibitoren dar. Diese sollen die Ausbildung von Tochtergeschwulsten und die Bildung neuer Blutgefäße verhindern. Ein Beispiel hierfür ist Cilengitide, welches zur Behandlung bösartiger Formen von Hirntumoren getestet wird. Weitere vielversprechende Kandidaten sind Inhibitoren von Histon-Deacetylasen (HDAC). HDAC bewirken durch Acetyl-

Abspaltung von Histon-Molekülen eine enge Bindung dieser an die DNA, wodurch regulatorische Genabschnitte für die Transkription blockiert werden. Auf diesem Weg wird beispielsweise auch die Expression von Tumorsuppressorgenen beeinflusst. Im September 2010 hat einer der HDAC-Inhibitoren (Vorinostat) von der europäischen Arzneimittelagentur EMA eine so genannte *Orphan Designation* für die Behandlung maligner Mesotheliome erhalten³. Bei Mesotheliomen handelt es sich um seltene und schwer diagnostizierbare Bindegewebstumore im Bereich des Mesothels.

Gene, die den Zellzyklus kontrollieren, indem sie DNA-Replikation, Zellteilung oder DNA-Reparaturmechanismen steuern, sind bei Tumorzellen häufig verändert⁴. Der gezielte Eingriff in den Zellzyklus stellt einen interessanten und vielversprechenden Ansatz für Krebstherapeutika dar, worauf im Folgenden der Fokus gelegt wird. Der Zellzyklus gesunder Zellen weist drei Kontrollpunkte auf, die von Cyclin-abhängigen Kinasen und ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, gesteuert werden. Krebszellen zeigen häufig, zumindest für eines der regulierenden Enzyme, eine erhöhte Aktivität, was zu Störungen des gesamten Kontrollsystems führen und eine unbegrenzte Vermehrung von Zellen zur Folge haben kann. CDK-Inhibitoren sollen diese Kontrolle wieder gewährleisten. Dem Verband forschender Pharmaunternehmen nach befinden sich derzeit zehn solcher Substanzen in klinischen Prüfungen³. Nicht nur Cyclin-abhängige Kinasen stellen ein Target für zukünftige Krebstherapeutika dar.

Die Wee Kinasen Wee1 und Myt1 sind Schlüsselenzyme des G2/M-Übergangs im Zellzyklus. Sie verhindern durch eine inhibitorische Phosphorylierung der CDC2/Cyclin B Kinase den Mitoseeintritt und erlauben somit der Zelle die Einleitung von notwendigen Reparaturmechanismen. Eine Aktivierung des CDC2/Cyclin B Komplexes führt hingegen über eine Reihe weiterer Proteine zur Mitose. Mit der Erkenntnis, dass die Wee1 ein negativer Regulator des CDC2/Cyclin B Komplexes ist, entstand die Idee, durch Inhibition der Wee1 einen Abbruch des G2/M-Übergangs mit unkontrolliertem Eintritt in die Mitose erreichen zu können. Dies würde sich auf Krebszellen auswirken, die auf Grund von Mutationen einen Verlust des G1/S-Kontrollpunkts aufweisen und deswegen zur Reparatur von DNA-Schäden vermehrt im G2/M-Übergang verharren. Der Wegfall dieses Kontrollpunkts würde eine erhöhte Empfindlichkeit der betroffenen Krebszellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen bewirken. Präklinische Studien mit kürzlich entwickelten Wee1 Inhibitoren zeigten, dass p53-defiziente Tumore gegenüber dieser Therapie eine erhöhte Empfindlichkeit aufweisen. Ein Befund, der für die Theorie spräche, dass eine Wee1 Inhibition bei Zellen mit Veränderungen im G1/S-Übergang effektiver sei⁴. PD-166285 konnte bereits 2001 als Inhibitor der Wee1 identifiziert werden, da es bei bestrahlten Krebszellen eine Abschaffung des G2-Arrestes bewirkte⁵. Eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Strahlung wiesen dabei Zellen auf, die mit dem Inhibitor behandelt wurden und p53-inaktiv waren. Für die Verbindung konnte bereits in nanomolaren Konzentrationen eine effektive Hemmung der Phosphorylierung der CDC2 an Tyrosin(15) nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde auch eine Inhibition der Threonin(14) Phosphorylierung der CDC2 festgestellt, die normalerweise durch die Myt1 Kinase vermittelt wird. Es handelt sich bei dieser Verbindung demnach nicht um einen spezifischen Wee1 Inhibitor. Darüber hinaus weist er nur ein geringes therapeutisches Fenster zwischen zellulärer Effektivität und Toxizität auf. In einem Mausmodell konnten für PD-166285 außerdem weitere Effekte bezüglich Mikrotubuli-Stabilisation und Inhibition der Cyclin D Expression nachgewiesen werden, so dass schließlich spekuliert wurde, PD-166285 würde seine Anti-Tumorwirkung über mehrere Mechanismen entfalten.

Interessant ist, dass die Inhibition der Wee1 und Myt1 scheinbar nicht die gleichen Effekte auslösen. Mit Hilfe von humanen Gebärmutterkrebszellen (HeLa Zellen), die einen Defekt für den G1/S-Kontrollpunkt aufwiesen, konnten ein Abbruch des Doxorubicin-induzierten G2-Arrestes und eine erhöhte Apoptose festgestellt werden. Dies war die Folge einer reduzierten Wee1-Aktivität. Die Herabsenkung der Myt1-Aktivität führte hingegen bei einem Adriamycin-induzierten G2-Arrest zum Abbruch dieser Phase, aber nicht zum erhöhten Zelltod. WANG und Kollegen schlossen anhand ihrer Ergebnisse, dass sich die Wee1, jedoch nicht die Myt1, als Target für die Therapie von speziell p53-defizienten Tumoren eignete⁶.

2009 wurde von dem hochselektiven Wee1 Inhibitor MK-1775 berichtet, der die Sensitivität von p53-defizienten Tumorzellen gegenüber DNA-zerstörenden Substanzen gezielt erhöhte. Einen eigenen antitumoralen Effekt zeigt die Substanz nicht. Die Erhöhung der antitumoralen Wirkung verschiedener Chemotherapeutika konnte für MK-1775 nicht nur in vitro, sondern auch in vivo an einem Rattenmodell nachgewiesen werden⁷. Inzwischen hat dieser Wee1 Hemmstoff die Phase klinischer Studien erreicht. Zwei Phase-I-Studien untersuchen derzeit die Kombination aus MK-1775 mit Standard-Chemotherapeutika, wie Gemcitabin, Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil etc., mit dem Ziel die maximal tolerierbare Dosis und die empfohlene Dosis für die zukünftigen Phase-II-Studien zu ermitteln^{8;9}.

Zusammengefasst stellt die Inhibition der Wee1 eine aussichtsreiche Option zur Therapie bestimmter Krebsarten dar, wenn diese mit Standard-Chemotherapeutika kombiniert werden. Die Wirkung wird durch einen Abbruch des G2/M-Übergangs erreicht und erhöht damit die Effizienz DNA-schädigender Therapien von p53-defizienten Tumoren. Ob sich die Wee1 als Zielstruktur für diesen Wirkungsansatz auch in Bezug auf eine eventuell erhöhte Toxizität tatsächlich eignet, werden derzeitige und zukünftige klinische Studien zeigen müssen.

Wie bereits erwähnt, ist auch die Myt1 Kinase ein negativer Regulator des G2/M-Übergangs. In der Literatur finden sich auch Angaben über die Myt1 als mögliche Zielstruktur für die antitumorale Kombinationstherapie¹⁰. Die Myt1 ist eine dualspezifische Kinase, die die CDC2 an Threonin(14) und Tyrosin(15) phosphoryliert und dabei eine negative Regulation des CDC2/Cyclin B Komplexes mit Auslösung eines G2/M-Arrestes bewirkt, wenn DNA-Schäden auftreten¹¹⁻¹³. Die membrangebundene Myt1 Kinase, beeinflusst nicht nur den Mitoseintritt, sondern auch die intrazelluläre Membrandynamik während der Mitose, wie z.B. die Formierung des Golgi-Apparates¹⁴. Außerdem konnte die Myt1 mit pathologischen Veränderungen des Körpers und verschiedenen anderen Aspekten in Zusammenhang gebracht werden: z.B. in Form einer Beteiligung bei der Entwicklung der Augen in *Drosophila melanogaster*¹⁵, einer möglichen Bedeutung bei UV-A induziertem Hautkrebs¹⁶ und auf der Ebene der PKMYT1, dem korrespondierenden Gen der Myt1 Kinase, als potentiell Biomarker des klarzelligigen Nierenzellkarzinoms¹⁷. Auch bei der Reaktivierung Kaposi-Sarkom-assoziiierter latenter Herpes-Infektionen scheint die Überexpression von PKMYT1 eine Rolle zu spielen¹⁸. Diese Reihe von Beteiligungen beweist die Bedeutung der Myt1 Kinase als wichtiges Enzym des Zellzyklus.

Bis heute stehen keine selektiven Inhibitoren der Myt1 Kinase zur Verfügung. Eine Inhibition der Myt1 könnte über eine vorzeitige Aktivierung der CDC2 zur Aufhebung des wichtigen Kontrollpunkts der G2/M-Phase und zum verfrühten Eintritt in die Mitose führen. Es wird vermutet, dass insbesondere schnell proliferierende Zellen dadurch einer erhöhten Apoptose unterliegen^{19; 5; 10}.

Die wirkliche Eignung der Myt1 als Zielstruktur für eine Krebstherapie ist derzeit noch nicht absehbar. Hemmstoffe der Myt1 könnten allerdings helfen, die biologische Rolle dieses Enzyms besser zu verstehen und auf diesem Fundament ein Eingreifen in pathologische Veränderungen zu ermöglichen. Zu diesem Zweck ist in Bezug auf die Myt1 Grundlagenforschung notwendig. Diese Art der Forschung könnte sodann, dem Beispiel der Wee1 Kinase-Inhibitoren folgend, in weiterführenden Studien in Präklinik und Klinik fortgesetzt werden. Bei erwiesener Eignung der Myt1 könnte das hier vorgestellte Repertoire neuer Krebstherapeutika oder neuer Zielstrukturen um ein weiteres Target ergänzt werden.

1.2 Zielsetzung

Ausgehend von einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2005 durch ZHOU et al., die von der Entdeckung neuer Alkylglykolipide als Inhibitoren der Myt1 Kinase berichtet, wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Schmidt ein neues Forschungsthema aufgenommen. Neben der Neosynthese der nativen Alkylglykolipide war das erklärte Ziel, Testsysteme zu entwickeln, die eine Bestimmung der biologischen Aktivität dieser Verbindungen an der Myt1 Kinase und eventuell anderen Kinasen ermöglichen sollten. Um die Phosphorylierungsaktivität der Myt1 Kinase spezifisch zu bestimmen, wurden zwei Methoden erwogen. Die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus mit Hilfe einer kapillarelektrophoretischen Auftrennung stellte eine Methode dar. Die Durchführung der anderen Methode sollte auf Basis von Fluoreszenzpolarisations-Messungen erfolgen.

Da das angesprochene Target, die den Zellzyklus beeinflussende Kinase Myt1, bis heute nicht kommerziell zu erwerben ist, muss diese in Eigenregie rekombinant hergestellt werden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand zunächst in der Recherche geeigneter Testsysteme zur Aktivitätsbestimmung der Myt1 Kinase, eine mögliche Übertragung in den eigenen Arbeitsbereich zu evaluieren und diese Systeme schließlich zu etablieren. Auf Grund der vorhandenen Technik in Form eines Plattenreaders und einer Veröffentlichung von KRISTJÁNSDÓTTIR fiel die Wahl auf einen Fluoreszenzpolarisations-basierten Assay und eine Kapillarelektrophorese Methode. Sobald die potentiellen Methoden feststanden, sollten diese entwickelt werden. Eine Forderung bestand darin, die Methoden so aufzubauen, dass sie auch mit der Myt1 verwandten Wee1 Kinase durchführbar wären. Eine Anforderung, die langfristig gesehen, den Vergleich der Wirkungen an Myt1 und Wee1 ermöglichen würde und schließlich Rückschlüsse auf die Spezifität von Verbindungen zuließe.

Gleichzeitige Aufgabe stellte die rekombinante Expression der Myt1 dar. Zu diesem Zweck wurde mit der AG Prof. Markus Pietzsch „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ des Institutsbereichs Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der MLU Halle-Wittenberg kooperiert. In Zusammenarbeit sollte anschließend eine geeignete Expressionsmethode der humanen Myt1 in *E. coli* entwickelt werden.

Letztlich sollten die zu entwickelnden Methoden die biochemische Testung der in der Arbeitsgruppe synthetisierten Glycolipide und anderer potentieller Inhibitoren grundsätzlich ermöglichen.

2 Grundlagen

2.1 Zellzyklus

Der Zellzyklus der eukaryotischen Zelle durchläuft vier Phasen, in dessen Verlauf die Zelle wächst, ihr Erbgut verdoppelt und dieses auf zwei Tochterzellen verteilt. In der G₀-Phase befindet sich die Zelle in Ruhe, diese Phase wird nicht standardmäßig durchlaufen. Die G₁-Phase ist gekennzeichnet durch Zellwachstum und Zellkompartmentierung. In der sich anschließenden S-Phase erfolgt die Verdopplung des Erbguts, so dass nach einer weiteren Phase des Wachstums (G₂-Phase) die Zelle die Teilung vornimmt (M-Phase) (Abb. 2.1). So entstehen aus einer Zelle zwei identische Tochterzellen. G₁-, S- und G₂-Phase bilden zusammen die Interphase.

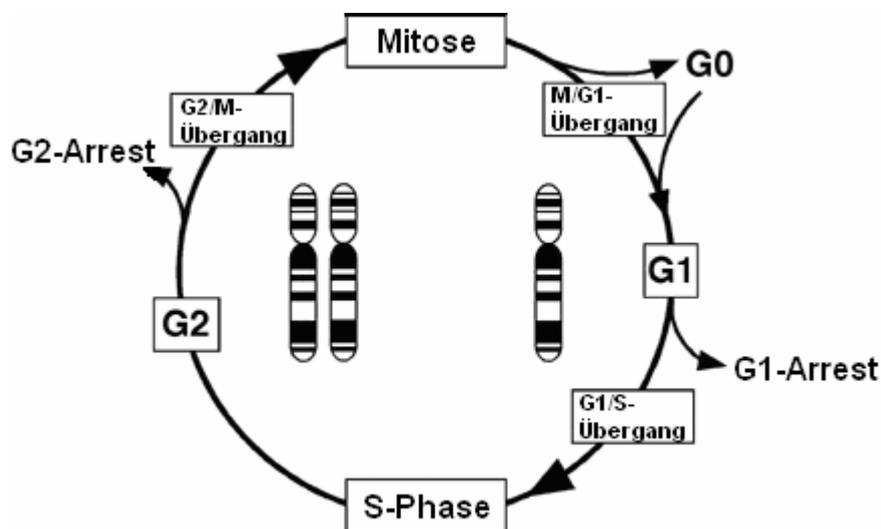


Abb. 2.1 Zellzyklus mit den beteiligten Proteinen²⁰

Dieser sich immer wiederholende Regelkreis wird durch strenge Kontrollmechanismen, die so genannten *Checkpoints* gewährleistet. Der Zellzyklus ist durch drei solcher Kontrollpunkte gekennzeichnet. Zwei dieser Checkpoints liegen an den Übergängen zwischen G₁- und S-Phase sowie G₂- und M-Phase. Hier sorgen sie für die Induktion eines Zellzyklusarrestes, wenn dieser auf Grund von DNA-Schäden erforderlich ist. Ein dritter Kontrollpunkt sichert in der Mitosephase die korrekte Bindung der Chromosomen an den Spindelapparat²¹. Eine überragende Funktion innerhalb der Kontrollmechanismen übernehmen die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs oder CDCs) im Zusammenspiel mit Cyclinen und CDK-Inhibitoren, auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

2.2 Kinasen

Proteinkinasen sind wichtige Regulatoren von Signalwegen, die unter anderem die Proliferation von Zellen beeinflussen. Allen Proteinkinasen ist gemein, dass sie die γ -Phosphatgruppe des Adenosintriphosphats (ATP) auf Proteine übertragen. Dabei dienen jeweils die Hydroxylgruppen in den Seitenketten der Aminosäuren (AS) Serin, Threonin oder Tyrosin als Akzeptoren der Phosphatgruppe. Die Phosphorylierung von Proteinen ist stets durch die Einwirkung von Proteinphosphatasen reversibel. Auf zwei unterschiedliche Arten kann die Phosphorylierung der so modifizierten Proteine zu einer Aktivitätsänderung führen:

1. Das Einführen negativer Ladung ändert die Konformation eines Proteins und beeinflusst somit die Fähigkeit mit anderen Proteinen in Form von Signalkaskaden zu interagieren. So kann durch die Phosphorylierung die Aktivität eines Proteins zu- oder abnehmen, und diese als eine Art molekularer Schalter verstanden werden.
2. Phosphorylierte Tyrosinreste in Proteinen können als Bindestellen für spezielle Domänen anderer Proteine dienen und so die Interaktion zwischen den Proteinen fördern.

Meist funktionieren Proteinkinasen in Form von Kaskaden, in denen eine Kinase die nächste phosphoryliert, um Signale, die an eine Zelle herangetragen werden, bis ins Zellinnere weiterzuleiten und zu verstärken²².

Die Proteinkinasen bilden eine große Proteinfamilie und seit der kompletten Sequenzierung des menschlichen Genoms²³ ist auch die Identifizierung der für Proteinkinasen codierenden Genabschnitte möglich. Somit kennt man heute 518 Proteinkinasen und bezeichnet dieses komplette Set als „Kinom“. Sie beeinflussen entscheidend alle biologischen Funktionen einer Zelle, wie z.B. die Kommunikation zwischen Zellen, die Übermittlung externer Signale ins Zellinnere (Signaltransduktion), den Metabolismus, die Transkription, den Zellzyklus, die Zellproliferation und den Zelltod. Eine Vielzahl pathophysiologischer Zustände sind eine Folge von fehlerhaft ablaufenden Phosphorylierungsnetzwerken und somit stellen Kinasen ein gutes Target für medikamentöse Interventionen und Wirkstoffentwicklung dar²². Es wird angenommen, dass 164 Proteinkinasen an der Entwicklung diverser Tumorerkrankungen beteiligt sind²². Eine Intervention mit Arzneistoffen hätte demzufolge ein enormes Potential für die Therapie komplexer Krankheiten.

Die Gemeinsamkeiten aller Proteinkinasen – gleicher Reaktionsmechanismus, ähnliche Proteinsequenz und dreidimensionale Struktur in ihren katalytischen Zentren sowie Bindung von ATP als Co-Substrat – führen dazu, dass einige allgemeingültige Prinzipien für die Adressierung dieser Proteinklasse durch Wirkstoffe gelten. So können zum Beispiel Inhibitoren an Proteinkinasen durch Einteilung in ATP-kompetitive und Substrat-kompetitive Inhibitoren unterschieden werden. Daneben sind Wirkstoffe denkbar, die fernab vom katalytischen Zentrum der Kinase ihre Wirkung entfalten.

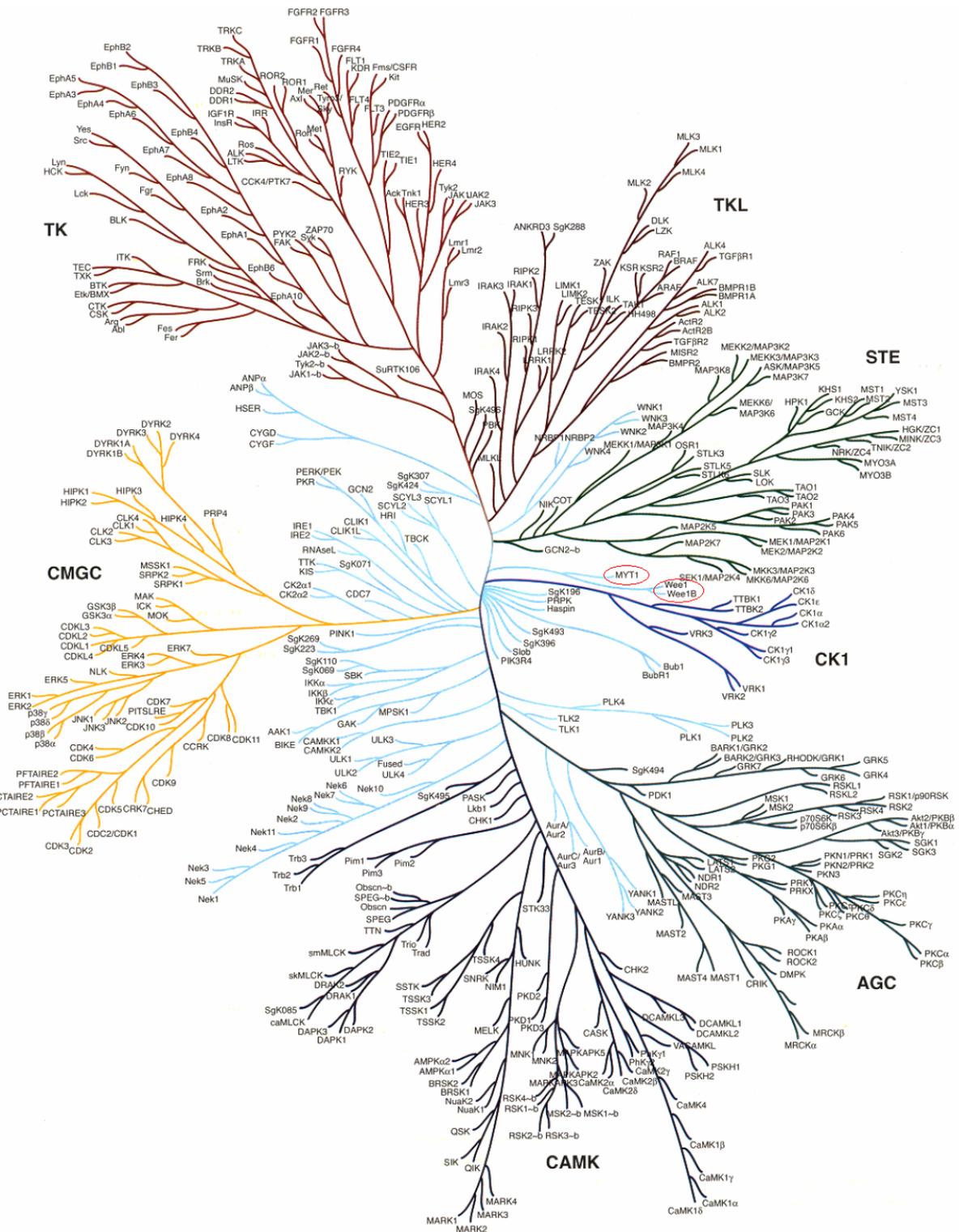


Abb. 2.2 Das Dendrogramm des humanen Genoms: Es zeigt die phylogenetischen Zusammenhänge aller 518 Proteinkinasen, ihre Unterteilung in sieben Gruppen (TK, TKL, STE, CMGC, CK1, AGC, CAMK), weitere Familien und Subfamilien. Die in dieser Arbeit relevanten Kinasen sind rot markiert.

Die im humanen Genom kodierten Proteinkinasen kann man auf der Grundlage von Sequenzhomologien in sieben große Gruppen einteilen, deren Untergliederung in 134 Familien und 201 Subfamilien möglich ist²⁴ (Abb. 2.2). Die hier untersuchten Kinasen, Wee1 und Myt1 Kinase weichen sequentiell deutlich von anderen Kinasen ab und können keiner der sieben Gruppen zugeordnet werden.

2.2.1 Cyclin-abhängige Kinasen unter besonderer Berücksichtigung der G2/M-Phase

Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs oder CDCs) gehören zur Gruppe der CMGC. CDKs müssen in einem Komplex mit einem Cyclin vorliegen, um volle Aktivität zu erlangen. Während die Konzentration der Cycline innerhalb des Zellzyklus variiert, da jeweils nur bestimmte Cycline exprimiert werden, bleibt die Konzentration der CDKs, auf Grund der gleichmäßigen Biosynthese, relativ konstant. Somit fungieren die Cycline als regulatorische Untereinheiten der CDKs. Gegenspieler der Cycline sind verschiedene Inhibitoren der CDKs, wie beispielsweise p16, p21 oder das Tumorsuppressorgen p53. Da das Interesse der AG Dr. Schmidt hauptsächlich Kinasen mit Beteiligung am G2/M-Übergang gilt, wird dieser im Nachstehenden näher beleuchtet.

Der Beginn der Mitose ist abhängig von der hoch konservierten CDC2 Kinase^{25; 26} (auch bekannt als CDK1). CDC2 allein als Monomer ist inaktiv. Im Gegensatz dazu führt die CAK-vermittelte Phosphorylierung an Thr¹⁶¹ der CDC2 zu einer stabilen Akkumulation mit Cyclin B als Bindungspartner. Infolge dieser beiden Ereignisse erfolgt eine Strukturänderung der CDC2, die schließlich in einer Aktivierung dieser mündet²⁷ und den Eintritt in die Mitosephase erst ermöglicht²¹. Während der Interphase kommt es durch den Einfluss der unten beschriebenen Wee Kinasen zu einer zusätzlichen Phosphorylierung an Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ der CDC2 und damit zu einer Unterdrückung der CDC2/Cyclin B Aktivität²⁸⁻³¹. Die Aktivität der dualspezifischen Phosphatase CDC25 führt zum Zeitpunkt des G2/M-Übergangs, wenn die Zelle für die Mitose bereit ist, zu einer Dephosphorylierung an Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ der CDC2 und damit zu einer Kaskade von weiteren Phosphorylierungen, die schließlich die Mitose einleiten (siehe Abb. 2.3). Daher sind auch die CDC25 Phosphatasen wichtige Effektoren der CDC2/Cyclin B Aktivität. In Säugerzellen sind drei Isoformen, CDC25A bis CDC25C, bekannt³². Der Komplex aus CDC2 und Cyclin B wird auch *Maturation-Promoting-Factor* (MPF), die Reifung fördernder Faktor³¹, oder *M-Phase-Promoting-Factor*²⁹ genannt.

Ein weiterer, die Mitose steuernder Aspekt, wurde mit der Entdeckung der unterschiedlichen Verteilung von CDC2/Cyclin B und seinen regulatorischen Enzymen in bestimmten Zellkompartimenten aufgezeigt. So konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass während der Interphase der CDC2/Cyclin B Komplex zwischen Cytosol und Zellkern wandern kann. Zum Zeitpunkt der G2/M-Phase kommt es zu einer nukleären Akkumulation des Komplexes bedingt durch die verminderte Affinität der nukleären Exportsequenz CRS des Cyclin B zum nukleären Exportfaktor CRM1^{30; 12}.

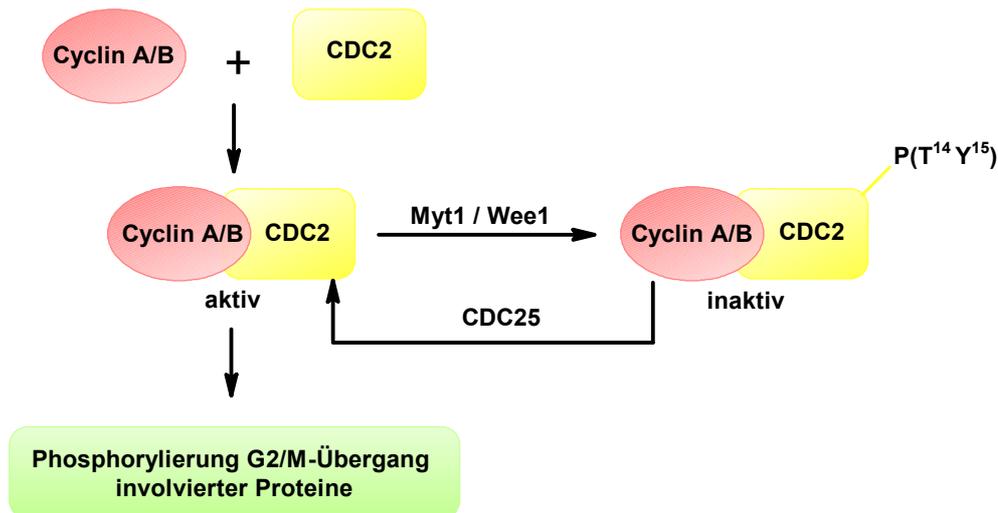


Abb. 2.3 Kontrolle der CDC2 Aktivität durch inhibitorische Phosphorylierung: Während der Interphase assoziiert CDC2 mit dem akkumulierenden Cyclin B zu einem Komplex und wird durch die CAK an Thr¹⁶¹ phosphoryliert. Gleichzeitig phosphorylieren Myt1 und Wee1 den CDC2/Cyclin B Komplex im aktiven Zentrum der CDC2 an den zwei konservierten Resten Thr¹⁴ und Tyr¹⁵, welches zu einer Blockade der Aktivität des Komplexes führt. Am G2/M-Übergang entfernt die CDC25 Phosphatase die beiden inhibitorischen Phosphatreste an Thr¹⁴ und Tyr¹⁵.

2.2.2 Wee Kinasen

Die Wee Kinasen sind entscheidende Regulatoren der G2/M-Phase des Zellzyklus und beeinflussen somit den Mitosebeginn. Die Familie der Wee Kinasen führt zu einer Phosphorylierung von konservierten Threonin- und Tyrosinresten der CDC2 und verwandten CDKs. Diese Phosphorylierungen bewirken eine Inhibierung der CDC2/Cyclin B Aktivität und blockieren den Mitoseeintritt³⁰. Während die Wee1 und die Wee1-homologen ausschließlich die Phosphorylierung von Tyr¹⁵ bewirken, zeichnet sich die Myt1 durch ihre phosphorylierende Aktivität gegenüber Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ der CDC2 aus²⁷.

Auf der Ebene der AS-Sequenz gleichen sich die Kinasen am meisten in ihrer Kinasedomäne. Auf Grund fehlender Gemeinsamkeiten mit anderen Kinasen bilden die Wee Kinasen eine eigene Subfamilie (siehe Abb. 2.2). Ein gemeinsames Merkmal der Wee Kinasefamilie ist das Vorhandensein von fünf konservierten Resten in der Kinasedomäne. Diese sind Trp in der Subdomäne IV, Glu und Asp in Subdomäne VIII sowie Trp und Arg in Subdomäne X. Sie stellen für die Familie der Wee charakteristische Reste dar. Die nicht-katalytischen Regionen der Proteine sind relativ divergent, jedoch für jede einzelne der Wee Kinasen wichtig für Protein-Protein-Wechselwirkungen und die subzelluläre Lokalisation²⁹.

Während die Wee Kinasen inhibitorische Kinasen des CDC2/Cyclin B Komplexes sind, treten die CDC25 Phosphatasen als Aktivatoren des Komplexes auf. Sowohl die Wee Kinasen, als auch die CDC25C Phosphatase werden durch eine übergeordnete Kinase, die Polo-like Kinase1 (Plk1), beeinflusst (siehe Abb. 2.4).

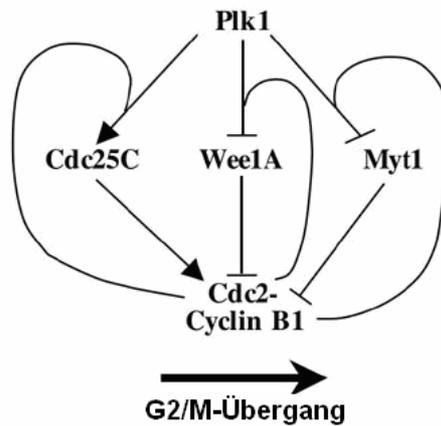


Abb. 2.4 Regulation der Wee Kinaseaktivität und Beeinflussung des G2/M-Übergangs: Der Phosphorylierungsprozess wird zum Teil durch die Plk1 reguliert. Sie inaktiviert die Myt1 und Wee1A und aktiviert die CDC25C durch Phosphorylierung. Durch eine Rückkopplungsschleife bewirkt der CDC2/Cyclin B1 Komplex Phosphorylierungen an den drei Enzymen, worauf die Wee Kinasen gehemmt werden – Voraussetzung für den korrekten Beginn der Mitose³⁴.

2.2.2.1 Wee1 Kinase

Die Wee1 und Wee1-ähnlichen Kinasen sind löslich und hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Im Menschen können zwei Wee1 Kinasen mit unterschiedlicher zeitlicher und räumlicher Expression (Wee1A und Wee1B) unterschieden werden. Die somatische Wee1 Kinase, Wee 1A, ist eine aus drei Domänen bestehende Serin/Threonin-Kinase mit 646 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von über 70 kDa³⁵ (Wee1_human: P30291³⁶). Die katalytische Kinasedomäne umfasst 271 Aminosäuren von Phe²⁹⁹ bis Leu⁵⁶⁹³⁶. Sie ist atypisch bezüglich ihrer Aktivität, da sie sequentiell eine Serin/Threonin-Kinase ist, aber Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Die Wee1 führt über die Phosphorylierung von Tyr¹⁵ der CDC2 zu einer Inhibierung des CDC2/Cyclin B Komplexes³⁷. Die Aktivität der Wee1 erreicht innerhalb der S- und G2-Phase ein Maximum, während in der M-Phase des Zellzyklus die Aktivität auf Grund einer Phosphorylierung durch Plk1 unterdrückt ist¹³.

Eine Kristallstruktur der Kinasedomäne der Wee1A wurde bereits 2005 von SQUIRE et al. veröffentlicht (siehe Abb. 2.5). Sie zeigt den für Kinasen typischen bilobären Aufbau. Der N-terminale Teil besteht hauptsächlich aus β -Faltblättern und der typischen Glycin-reichen Schleife, während der C-terminale Bereich durch α -Helices gekennzeichnet ist. Beide Teile sind über eine bewegliche Peptidsequenz von fünf Aminosäuren (377 – 381) (*Hinge*-Region) miteinander verbunden, so dass sich zwischen beiden Bereichen eine Art Spalt oder Scharnier ergibt. Dieses Gebiet bildet den aktiven, katalytischen Teil der Kinasedomäne und beherbergt in der Abbildung den ATP-kompetitiven Inhibitor PD0407824.

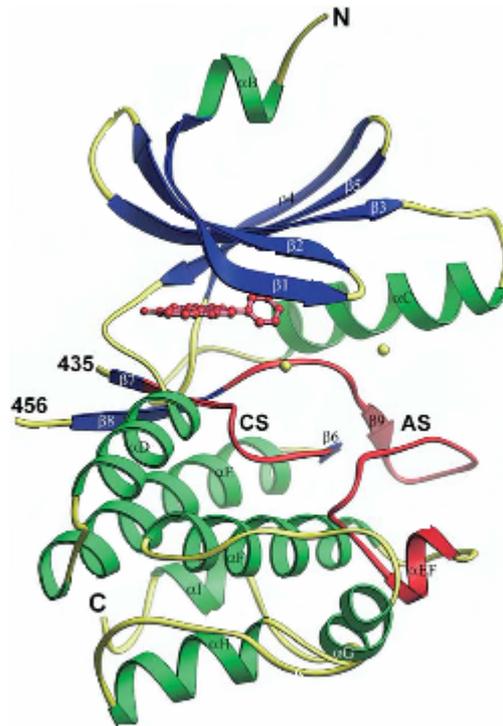


Abb. 2.5 Kinasedomäne der Wee1A: Kristallstruktur der Kinasedomäne (291 bis 575) im Komplex mit dem ATP-kompetitiven Inhibitor der Gesamt-Wee1A, PDO407824. Zwei Mg^{2+} Ionen sind gelb, β -Faltblätter blau, α -Helices grün und der Inhibitor sowie katalytisches- (CS) und Aktivierungs-Segment (AS) rot dargestellt³⁵.

2.2.2.2 Myt1 Kinase inklusive Bezug zu Vorarbeiten aus der AG Sippl

Erste ausführliche Erkenntnisse zur Myt1 wurden 1995 mit dem Modellorganismus *Xenopus* (Krallenfrosch) Oozyten gewonnen^{38; 29}. Zwei Jahre später publizierten LIU et al. Ergebnisse zu Untersuchungen an der humanen Myt1 Kinase¹¹. Die Myt1 unterscheidet sich relativ stark von anderen Mitgliedern der Wee Kinasefamilie. Ein Unterscheidungsmerkmal ist ihre Fähigkeit, die CDC2 Kinase an Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ zu phosphorylieren, ein weiteres ist ihre Lokalisation in der Zelle. Myt1 ist membranassoziiert und befindet sich im Cytosol am ER und Golgi Apparat^{39; 29; 11; 40}. Die Myt1 Kinase stellt eine inhibitorische Kinase des MPF dar und vermag die Mitose z.B. so lange zu verhindern, wie die DNA erkennbare und reparable Schäden aufweist oder die DNA-Replikation noch nicht vollständig abgelaufen ist. Zum Ende der G2-Phase bewirkt umgekehrt die Aktivität der CDC25 Phosphatasen eine Abspaltung der Phosphatreste am CDC2/Cyclin B Komplex. Sie stellen somit den Gegenspieler zur Myt1 und auch zu den Wee Kinasen dar und führen zur Einleitung der Mitose²⁹. Auch die Myt1 wird während der M-Phase durch die Plk1 hyperphosphoryliert und somit inhibiert³⁴.

Zu Beginn der Arbeit im Jahr 2007 bis 2010 existierte noch keine Kristallstruktur der Myt1. Bekannt war jedoch die Aminosäuresequenz (PMyt1_human: Q99640⁴¹) und die bestehende hohe Homologie zur kristallisierten Wee1A. Zur Wee1A zeigt sie eine Sequenzidentität von 34 % und Sequenzhomologie von 48 %⁴². Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde in der Arbeitsgruppe um Prof. W. Sippl ein Homologiemodell der Myt1 erstellt, welches für Dockingexperimente genutzt wurde. Seit September 2010 ist eine Kristallstruktur für die katalytische Domäne der Myt1 veröffentlicht (Abb. 2.6), die heutigen *Virtual Screenings* potentieller Hemmstoffe dient.

Insgesamt besteht die Myt1 aus drei Domänen, die durch 499 Aminosäuren gebildet werden und ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa erreichen. Die Kinasedomäne umfasst 250 Aminosäuren von Phe¹¹⁰ bis Leu³⁵⁹ (vgl. Wee1A: katalytische Kinasedomäne umfasst 271 Aminosäuren von Phe²⁹⁹ bis Leu⁵⁶⁹). Das aktive Zentrum wird N-terminal durch die verdrillten fünf β -Faltblätter und die Glycin-reiche Schleife begrenzt (oberer Teil der Abb. 2.6). Die Hinge-Region bildet eine Drehachse, die beim Übergang von aktiv zu inaktiv eine Torsion beider Teile um 5 - 10° ermöglicht und dabei gleichzeitig eine Art Tasche zur Aufnahme des Cosubstrates ATP bildet. Auf der gegenüberliegenden Seite bilden mehrere α -Helices den größeren C-terminalen Abschnitt der Domäne (unterer Teil der Abb. 2.6). Die Myt1 weist das für Kinasen typische DFG-Motiv (D251, F252, G253) am Beginn der Aktivierungsschleife auf. Interessanterweise besitzt die Wee1A als bisher einzige der bekannten Kinasen statt des DFG- ein DLG-Motiv (D463, L464, G465)³⁵.

Außerhalb der abgebildeten Kinasedomäne der Myt1 liegt ein 17 bis 20 hydrophobe oder ungeladene Aminosäuren umfassender Bereich, der das Membran-Assoziationsmotiv darstellt und für die Lokalisation in Membranen verantwortlich sein könnte. Die genaue Länge und Position des Abschnittes ist je nach Organismus und Literaturquelle verschieden: *Xenopus* Myt1: Ile³⁷³ bis Asn³⁹²²⁹; humane Myt1 gemäß Proteindatenbank: Leu³⁸² bis Ala³⁹⁸⁴¹); humane Myt1 gemäß LIU et al. Arg³⁷⁸ bis His³⁹⁹¹².

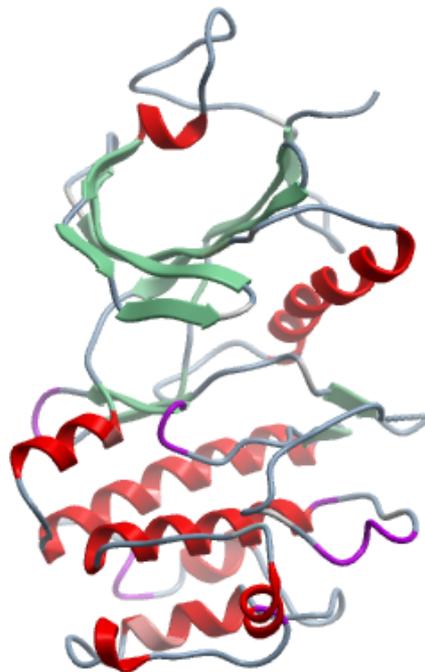


Abb. 2.6 Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Myt1: β -Faltblätter sind grün und α -Helices rot dargestellt⁴³.

2.3 Tumorerkrankungen und deren Therapie

Es wird zwischen benignen und malignen Tumoren unterschieden. Erstere wie Warzen, Polypen und Adenome müssen nicht beunruhigen. Demgegenüber stehen maligne Tumore wie Karzinome, Sarkome und Gliome, die einer Behandlung bedürfen. Die häufigsten Tumorarten in Deutschland sind das Mammakarzinom, das Prostatakarzinom, Lungenkrebs und das kolorektale Karzinom⁴⁴.

Der Anfang eines jeden Tumors liegt in der Mutation von intakten Zellen zu Krebszellen. Für diesen Vorgang reicht keine einmalige Mutation aus, die Kanzerogenese ist vielmehr eine Folge mehrerer Mutationen. Beispielsweise zeigen aktuelle Untersuchungen die Beteiligung von 70 – 80 Mutationen bei Dickdarm- und Brustkrebs, von denen zur Tumorentstehung etwa 15 – 20 treibende Mutationen zählen und die restlichen 60 Mutationen Begleitmutationen darstellen können⁴⁵. Über die Vielfalt der Mutationen ist jedem Tumortyp ein bestimmtes Mutationsprofil, ähnlich einem Fingerabdruck, zuzuordnen. Viele Tumore zeigen daneben auch gemeinsame Mutationen, die zum Beispiel häufig die Inaktivierung von Tumorsuppressoren oder die Aktivierung von Onkogenen betreffen. Unter Umständen kann auch ein einziges Ereignis eine Tumorentwicklung auslösen, beispielsweise wenn dieses durch chromosomale Translokation vermittelt ist, das zur Zerstörung von Genen oder Bildung neuartiger Fusionsgene führt⁴⁵.

Die konventionelle Chemotherapie richtet sich gegen schnell teilende Zellen, ohne dabei normale von Krebszellen zu unterscheiden. Häufig besteht das Ziel im Abtöten der Zellen durch Induktion von DNA-Schäden. Diesem Wirkungsmechanismus folgen Platinverbindungen, Alkylantien, Anti-Metabolite und DNA-Topoisomerase-Inhibitoren. Die Kontrollmechanismen des Zellzyklus sorgen bei normalen sowie Krebszellen für die Reparatur der DNA. Sind diese Mechanismen erschöpft oder unzureichend, kann die Zelle in den Zustand der Seneszenz übergehen oder den programmierten Zelltod einleiten. Häufig zeigen Krebszellen, im Gegensatz zu normalen Zellen, Veränderungen innerhalb der Kontrollmechanismen. Beispielsweise führt die Mutation des p53 Tumorsuppressorgens in Krebszellen zum Abbruch des Kontrollpunktes der G1-Phase des Zellzyklus, was zur Folge hat, dass DNA trotz Schädigung in der anschließenden S-Phase dupliziert wird. Die Mehrzahl von Tumoren (> 50 %) zeigen eine Beeinträchtigung des G1-Kontrollpunktes²¹.

Obwohl die konventionelle Krebstherapie viele Nebenwirkungen zur Folge hat und Resistenzen die Wirkung einschränken, ist ihre Anwendung noch immer unverzichtbar. Heutige Bestrebungen zielen auf die geschickte Kombination mit anderen Mitteln ab, die z.B. die Überwindung von Resistenzen oder eine fokussierte Therapie gestatten.

In den vergangenen Jahren ermöglichte der Fortschritt in der Diagnostik eine individuelle und genaue Identifikation der Ursachen einer jeden Krebsart. Damit konnte eine gezielte Therapie realisiert werden, die nicht wie zuvor nach einer Art Gießkannen-Prinzip (wie Alkylantien oder Platinverbindungen), sondern über das Ansprechen bestimmter molekularer Strukturen arbeitet. Zu diesen neuen Therapieoptionen zählen neben monoklonalen Antikörpern oder Wachstumsfaktor-Inhibitoren auch Tyrosinkinase-Inhibitoren.

2.4 Tyrosinkinase-Inhibitoren zur Krebstherapie

Tyrosinkinase-Inhibitoren stellen mit ihrem Wirkprinzip eine Bereicherung zur Standardtherapie von Krebs dar. Im Gegensatz zu Zytostatika wirken sie nicht unmittelbar zytotoxisch, sondern entfalten ihre Wirkung durch Beeinflussung verschiedener Wege der Signaltransduktion. Man unterscheidet monoklonale Antikörper, die gegen Rezeptor-Tyrosinkinasen gerichtet sind (z.B. Bevacizumab), von kleinen inhibitorisch wirkenden Molekülen. Zuletzt genannte Tyrosinkinase-Inhibitoren besitzen einen

gemeinsamen molekularen Wirkungsmechanismus, der auf einer Verdrängung von ATP aus dessen Bindungstasche in der Proteinkinase beruht.

Tyrosinkinasen können über folgende Mechanismen für die Entwicklung maligner Tumoren verantwortlich sein: Über eine balancierte Translokation können neue Fusionsproteine gebildet werden, die dauerhaft aktiviert vorliegen, wie es beim BCR-ABL-Fusionsprotein der Philadelphia-Chromosom-positiven chronisch myeloischen Leukämie der Fall ist. Außerdem können Aktivierungen durch aktivierende Mutation oder durch Überexpression infolge von Genamplifikationen ausgelöst werden. Ein Mechanismus, der bei vielen Karzinomen für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) bekannt ist⁴⁶.

Das Paradebeispiel unter den heutigen Tyrosinkinase-Inhibitoren ist Imatinib (Glivec[®]), welches schon seit 2001 in Europa zur Therapie von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie zugelassen ist⁴⁷. Bei dieser Erkrankung erfolgt eine stärkere Expression der genetisch veränderten Tyrosinkinase BCR-ABL, an dessen ATP-Bindungstasche Imatinib bindet und damit den Phosphattransfer auf andere Proteine hemmt. Dies ist ein Vorgang, der zu Störungen der Signaltransduktion führt und schließlich in Apoptose mündet. Da Imatinib auch die Rezeptor-Tyrosinkinasen c-kit und PDGFR hemmt, eignet es sich ebenfalls zur Behandlung von gastrointestinalen Stromazelltumoren und bestimmten hämatologischen Erkrankungen^{46; 48}.

In der Folge wurden weitere Inhibitoren entwickelt, die ähnliche oder andere Tyrosinkinasen hemmen (z.B. Gefitinib, Sunitinib, Erlotinib, Dasatinib etc.), aber im Vergleich zur Muttersubstanz mehr Nebenwirkungen zeigen⁴⁵. Dennoch können sie eine Alternative darstellen, wenn sich bereits auf Grund von Mutationen Resistenzen gegen Imatinib gebildet haben.

Der Vergleich der Wirkung verschiedener Tyrosinkinase-Inhibitoren hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität gegenüber den Wee Kinasen stellt ebenfalls ein Ziel der AG Dr. Schmidt dar. Da es sich bei diesen Verbindungen ausschließlich um ATP-kompetitive Hemmer handelt, könnte eine Gegenüberstellung mit anderen Verbindungen, die abseits der Bindungstasche wirken, interessant sein. Auf Grund ihrer Struktur ist ein solcher Wirkungsmechanismus für die in der AG synthetisierten Alglyglykolipide⁴⁹ - für die eine Myt1-inhibierende Wirkung bereits durch ZHOU et al. beschrieben wurde¹⁰ - denkbar.

2.5 Naturstoffe in der Krebstherapie

Das Meer besitzt eine enorme Artenvielfalt und hält deswegen ein umfangreiches Reservoir an Naturstoffen bereit, welches sich für pharmakologische, medizinische und (bio)technologische Anwendungen als wertvoll erweist. Für die Behandlung von Krebserkrankungen wurde bereits eine ganze Reihe von marinen Naturstoffen in fortgeschrittenen klinischen Studien getestet. Beispiele hierfür sind: das Didemninderivat Aplidin zur Behandlung von multiplen Myelomen, das Depsipeptid Kahalalid F gegen Prostata- und Lungenkrebs und das Aminosteroid Squalamin, ebenfalls zur Behandlung von Lungenkrebs⁵⁰. Ein Beispiel für einen marinen Naturstoff, der die Marktreife erlangt hat, ist Ziconotid. Bei diesem Peptid handelt es sich nicht um ein Antitumormittel sondern um ein nicht-opioides Analgetikum.

Weil viele potentiell interessante Substanzen nur in Spuren vorhanden sind, wären zu dessen Gewinnung große Materialmengen notwendig. Eine Möglichkeit um die nachhaltige Versorgung mit solchen Substanzen sicherzustellen, stellt die chemische Total- und Partialsynthese dar.

Der stereoselektiven Totalsynthese von Algenglykolipiden mit möglicher Myt1-inhibierender Wirkung widmen sich ebenfalls Mitarbeiter der AG Dr. Schmidt.

2.5.1 Algenglykolipide als potentielle Myt1 Kinase-Inhibitoren

2005 konnte bei einem systematischen Screening verschiedener Naturstoffe aus Pflanzen und marinen Organismen für den Extrakt UM 2972M aus einer unbekanntenen Alge eine biologische Aktivität gegenüber der Myt1 Kinase über einen Fluoreszenzpolarisations-basierten Assay nachgewiesen werden. Nach Reinigung und Strukturaufklärung konnte die größte biologische Aktivität zwei marinen Algenglykolipiden zugeordnet werden. Hierbei handelte es sich um Glycoglycerolipide mit IC_{50} -Werten von ca. 120 bis 450 nM¹⁰.

Auf dieser Basis wurden sowohl die Naturstoffe selbst, als auch Derivate nach Austausch und Abwandlung bestimmter Molekülbereiche in der AG Dr. Schmidt mit dem Ziel synthetisiert, weitere detaillierte Informationen über Struktur-Wirkungsbeziehungen der Myt1 Kinase zu erhalten. Als Bindungsstelle dieser Verbindungen ist eine Region abseits der für die oben beschriebenen Tyrosinkinase-Inhibitoren typischen ATP-Bindungstasche denkbar. Für p38 Mitogen-aktivierte Protein (MAP) Kinasen ist bereits eine solche Lipidbindungsstelle beschrieben worden⁵¹ und durchaus auch für die Myt1 vorstellbar.

Die Daten über die Struktur und Wirkung der Verbindungen gegenüber der Kinase ermöglichten eine nähere Charakterisierung der Myt1, was schließlich über die Erstellung einer potentiellen Leitstruktur das Auffinden neuartiger Kinase-Inhibitoren erleichtern würde. Der Theorie über mögliche Konsequenzen einer Myt1-Hemmung folgend, könnten solche Inhibitoren ergänzend zur konventionellen Chemotherapie eingesetzt werden, um Resistenzerscheinungen zu überwinden^{10;49}.

2.6 Fluoreszenzpolarisierung

Das Phänomen der Fluoreszenzpolarisierung (FP) wurde erstmals von PERRIN im Jahr 1926 beschrieben⁵². Wie Formel 2.1 zeigt, ist der Polarisationswert eines Moleküls proportional zur Rotations-Relaxationszeit. Diese ist abhängig von der Viskosität (η), der absoluten Temperatur (T), dem Molekülvolumen (V) und der allgemeinen Gaskonstante (R)⁵³.

$$\text{Polarisationswert} \sim \text{Rotations} - \text{Relaxationszeit} = \frac{3 \eta V}{R T}$$

Formel 2.1 Zusammenhang zwischen Polarisationswert und der Rotations-Relaxationszeit

Bei konstanter Temperatur und Viskosität ist die Polarisation direkt proportional zum Molekülvolumen (und damit auch zum Molekulargewicht). Änderungen des Molekülvolumens können beispielsweise aus der Assoziation bzw. Dissoziation zweier oder mehrerer Moleküle, von Degradation oder Konformationsänderungen herrühren.

Das beschriebene Phänomen lässt sich folgendermaßen ausnutzen: Wird ein kleines, fluoreszierendes Molekül (Sonde bzw. Ligand) mit linear polarisiertem Licht angeregt, so ist das Emissionslicht auf Grund schneller Molekülrotation nahezu vollständig depolarisiert. Wird hingegen der Ligand an ein Makromolekül (Rezeptor) gebunden, steigt das Molekülvolumen an. Mit dem Anstieg des Molekülvolumens wird die Beweglichkeit des Liganden eingeschränkt, die Rotationsgeschwindigkeit

nimmt ab und der Polarisationsgrad des emittierten Lichts steigt an. Es lassen sich also zwei Grenzfälle beschreiben: Eine maximale Fluoreszenzpolarisation wird erreicht bei einer Probe aus unbeweglichen, isotrop im Raum verteilten Molekülen, deren Orientierung innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustands unverändert bleibt. Die Fluoreszenzpolarisation geht jedoch gegen null, wenn die angeregten Probenmoleküle während der Fluoreszenz-Lebensdauer eine statistische Verteilung einnehmen und das Licht in der Folge vollständig depolarisiert wird⁵⁴. Der freie und der gebundene Ligand haben jeweils einen intrinsischen Polarisationswert. Dieser ist hoch für den gebundenen Zustand (Ligand-Rezeptor-Komplex) und niedrig für den freien Liganden.

Die Messung der Polarisation ermöglicht die direkte Bestimmung des Anteils eines gebundenen Liganden an einem Rezeptor in einem homogenen System⁵⁵. Die Fluoreszenzpolarisation ist weniger anfällig gegenüber Quenchingeffekten als die Fluoreszenz und wird vor allem in der Arzneistoffentwicklung angewandt. Sie erlaubt die Untersuchung von Arzneistoff-Rezeptorinteraktionen und Protein-Proteininteraktionen⁵⁶⁻⁵⁸ und wird außerdem in Assays zur Suche von Enzyminhibitoren verwendet⁵⁹⁻⁶².

Die Detektion erfolgt, wie in Abbildung 2.7 gezeigt, senkrecht zur Anregung. Licht einer bestimmten Wellenlänge passiert einen vertikalen Polarisator und regt fluoreszierende Moleküle in der Probelösung an. Für die Moleküle, deren Übergangsdipolmoment in Richtung des elektrischen Feldstärkevektors orientiert ist, ist die Wahrscheinlichkeit der Absorption am größten⁵⁴. Das bedeutet vereinfacht ausgedrückt, dass nur die Moleküle, die sich in der vertikal polarisierten Ebene befinden, Licht absorbieren, somit angeregt werden und anschließend Licht emittieren. Dieses Emissionslicht wird sowohl in der horizontalen (d.h. in der um 90° gedrehten Ebene) als auch in der vertikalen Ebene (d.h. in der zur Anregung parallelen Ebene) gemessen.

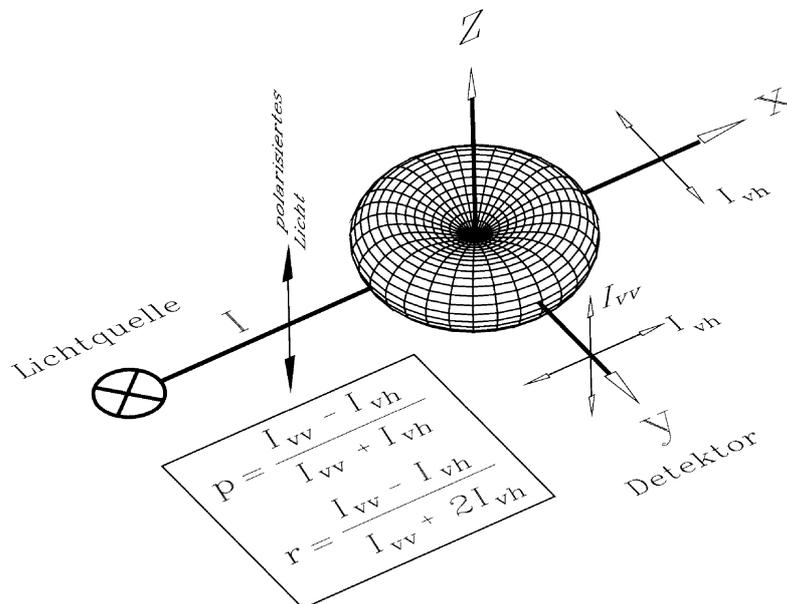


Abb. 2.7 Schematische Darstellung des Messprinzips zur Bestimmung der FP⁶³

Die Polarisation wird nach Formel 2.2 kalkuliert und ist eine Funktion des Ausmaßes der Molekülrotation während der Zeitspanne zwischen Exzitation und Emission.

$$Polarisation [P] = \frac{Intensität_{vertikal} - Intensität_{horizontal}}{Intensität_{vertikal} + Intensität_{horizontal}}$$

Formel 2.2 Berechnung der Polarisation

Wie aus Formel 2.2 ersichtlich ist, handelt es sich bei der Polarisation P um eine dimensionslose Größe, die das Verhältnis von Lichtintensitäten wiedergibt. Der Polarisationswert wird in der Regel in der Einheit Millipolarisation (mP, eine Polarisationseinheit = 1000 mP) angegeben.

In Abbildung 2.8 ist zum besseren Verständnis der Zusammenhang zwischen Molekülvolumen und Molekülrotation noch einmal grafisch aufbereitet. Kleine Fluorophore rotieren während des Anregungszustandes schnell und haben zum Zeitpunkt der Emission niedrige Polarisationswerte. Große Fluorophore, in diesem Fall durch Bindung an ein zweites, großes Molekül erreicht, rotieren während des Anregungszustandes langsamer und haben daher einen höheren Polarisationswert.

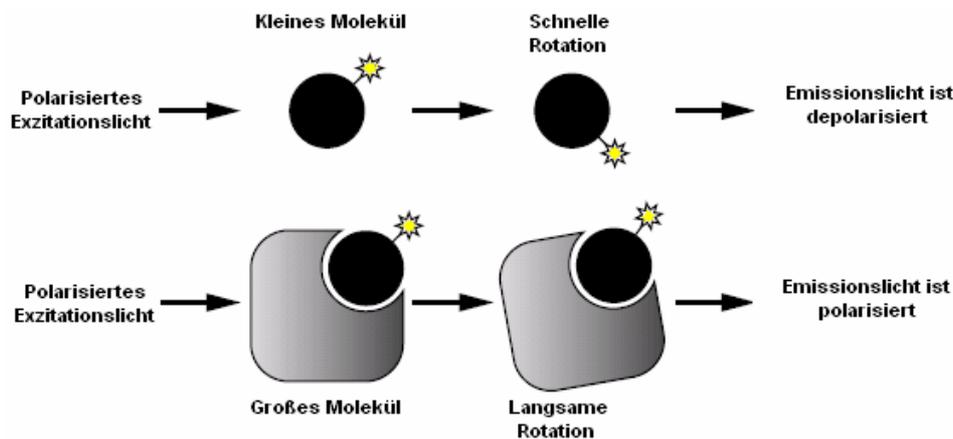


Abb. 2.8 Schematische Übersicht der FP-Unterschiede zwischen kleinen und großen Molekülen

Neben der Angabe der Polarisation P findet man in der Literatur häufig auch die Anisotropie A als quantitatives Maß für die Fluoreszenzpolarisation. Die Anisotropie berechnet sich nach der Formel 2.3.

$$Anisotropie [A] = \frac{Intensität_{vertikal} - Intensität_{horizontal}}{Intensität_{vertikal} + 2Intensität_{horizontal}}$$

Formel 2.3 Berechnung der Anisotropie

Die Angabe der Anisotropie hat den Vorteil, dass die Beiträge aller Polarisationsrichtungen der emittierten Strahlung berücksichtigt werden. Die senkrecht zur Anregung polarisierte Fluoreszenzstrahlung (horizontale Strahlung) lässt sich in Komponenten für in x -Richtung und in y -Richtung polarisierte Strahlung aufteilen. Beide Komponenten besitzen die gleiche mittlere Intensität $I_{horizontal}$. Die Gesamtintensität der Fluoreszenz ist damit gegeben durch $I_{vertikal} + 2I_{horizontal}$ ⁵⁴. Die Anisotropie und die Polarisation können nach Formel 2.4 in die jeweils andere Größe umgerechnet werden⁵³.

$$A = \frac{2 \times P}{3 - P} \qquad P = \frac{3 \times A}{2 + A}$$

Formel 2.4 Berechnung der Anisotropie aus der Polarisation und vice versa

In dieser Arbeit wird stets die Polarisation in der Einheit [mP] angegeben. Bezüglich der Polarisation sind drei Grenzfälle denkbar. Im Fall von $P = 0$ spricht man von unpolarisierter Strahlung ($I_{\text{vertikal}} \approx I_{\text{horizontal}}$). Für $P = 1$ bzw. -1 ist die emittierte Strahlung vollständig polarisiert, d.h. es tritt keine bzw. nur eine horizontale Komponente auf. Bei $P < 1$ bzw. > -1 handelt es sich um teilweise polarisierte Strahlung.

2.7 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist eine hoch effiziente Methode zur Trennung von Probeionen in einer engen Kapillare (25 - 100 μm), die mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist. Einen typischen schematischen Aufbau einer CE zeigt Abbildung 2.9. Die prinzipiellen Komponenten sind ein Hochspannungstransformator, eine Kapillare, die durch einen Detektor führt, der mit einer Auswerteeinheit verbunden ist und ein Probeaufgabesystem gegebenenfalls mit Autosampler. In der Regel wird die CE Anlage per Computer gesteuert. Die Kapillare wird in einem ersten Schritt mit der Elektrolytlösung (z.B. Puffer) gefüllt und anschließend geringe Mengen der Probelösung (i.d.R. 1 – 20 nl) in das detektorferne Kapillarende eingeführt. Schließlich werden beide Kapillarenden in je ein Reservoir mit den Hochspannungselektroden und der verwendeten Elektrolytflüssigkeit eingetaucht. Die Elektroden sind aus inertem Material, z.B. Platin und dienen der Ausbildung einer Hochspannung (z.B. 10 – 30 kV) über die Kapillare. Diese führt zu elektrophoretischer Bewegung und dazu, dass die in der Probe befindlichen Ionen durch die Kapillare wandern und den *on line*-Detektor passieren. Das erstellte Diagramm des Detektorsignals gegen die Zeit heißt Elektropherogramm.

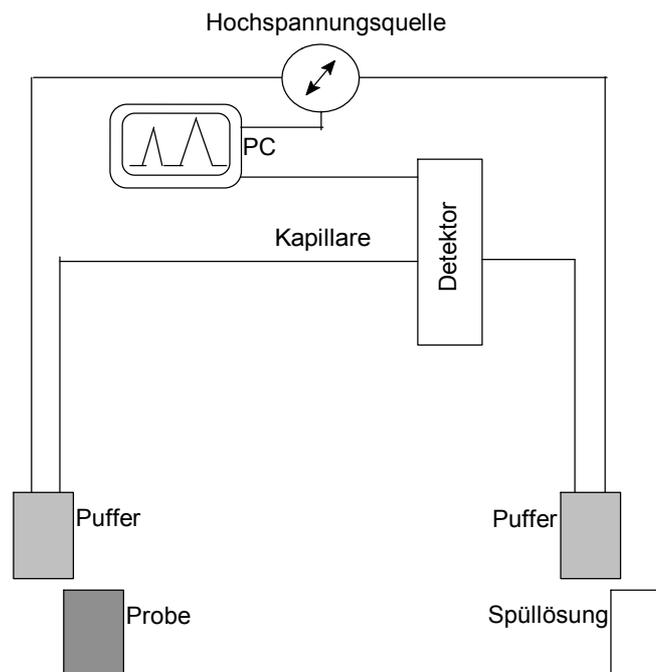


Abb. 2.9 Schematischer Aufbau einer CE Anlage⁶⁴

Als Elektrophorese bezeichnet man die Bewegung von Ionen unter Einfluss einer angelegten Spannung, wobei sich das Ion in Richtung der passenden Elektrode bewegt und den Detektor durchläuft. Die Wanderungsrate oder Mobilität des Ions ist größtenteils abhängig von seiner Größe und Anzahl der Ladungen. Demzufolge bewegt sich ein kleines Molekül schneller als ein großes Molekül mit gleicher Anzahl von Ladungen und ein Molekül mit zwei Ladungen bewegt sich schneller als ein Molekül gleicher Größe aber nur einer Ladung (Abb. 2.10). Die tatsächliche elektrophoretische Geschwindigkeit der Ionen ist abhängig von ihren Mobilitäten und der Größe der angelegten Spannung.

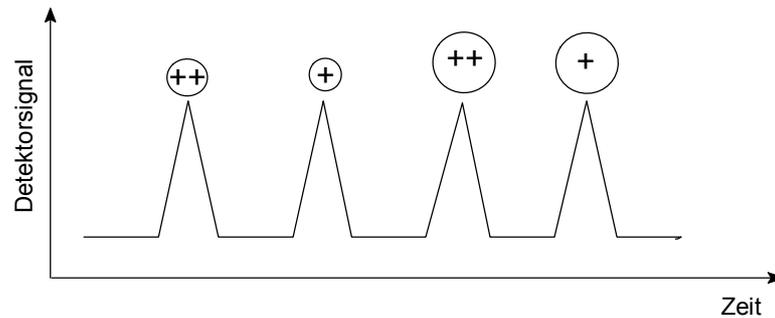


Abb. 2.10 Theoretische Trennung verschiedener Kationen bei der Elektrophorese⁶⁴

Wird eine Spannung an eine mit Elektrolytlösung gefüllte Kapillare angelegt, kommt es neben den Probeionen auch zu einer Bewegung der Ionen der Elektrolytlösung in Richtung des Detektors. Ein solcher Fluss tritt bei hohen pH-Werten auf, wenn die im Inneren der Kapillare befindlichen Silanolgruppen dissoziieren und eine negative Ladung erhalten. Kationen der Elektrolytlösung binden an die negativen Gruppen und wandern nach Anlegen einer Spannung zur Kathode. Neben den Kationen wandern auch die Kationen-solvatisierenden Wassermoleküle und es kommt zum Nettoionenstrom (Fluss der Elektrolytlösung), auch Elektroendosmotischer Fluss (EOF) genannt. Das Ausmaß eines solchen EOF ist hauptsächlich vom pH-Wert der Elektrolytlösung abhängig. Bei einem pH-Wert kleiner vier liegen die Silanolgruppen an der inneren Kapillaroberfläche kaum dissoziiert vor und das Ausmaß des EOF ist sehr gering. Ein pH-Wert größer neun hingegen führt zur vollständigen Ionisierung der Silanolgruppen und infolgedessen zu einem starken EOF. Der EOF ermöglicht die Trennung und Detektion von Kationen und Anionen gleichzeitig in einem Analyseschritt, da der EOF bei einem pH-Wert größer sieben stark genug ist, um auch Anionen in Richtung der Kathode zu bewegen. Ein Elektropherogramm einer Mischung von Kationen, Anionen und Neutralteilchen, unter Ausnutzung des EOF, zeigt Abbildung 2.11. Somit ist der pH-Wert eine wichtige Stellgröße zur Beeinflussung der Trennung von Ionen, da er sowohl die Ladung der Elektrolytlösung, als auch das Ausmaß des EOF beeinflusst.

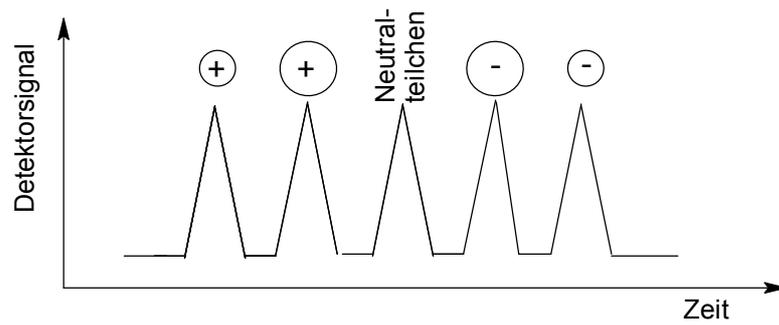


Abb. 2.11 Theoretische Trennung von Kationen, Anionen und Neutralteilchen unter Ausnutzung des EOF: Kleine Anionen werden stärker zurückgehalten als größere Anionen und werden deswegen später detektiert. Doppelt geladene Anionen bewegen sich noch stärker gegen den EOF und werden noch später detektiert. Das Signal für Neutralteilchen repräsentiert alle ungeladenen Teilchen und den EOF⁶⁴.

In dieser Arbeit erfolgt eine Trennung von unterschiedlich phosphatierten Peptiden, deren einziges Unterscheidungsmerkmal die Anzahl der gebundenen Phosphatgruppen ist. Die Trennung der von der Sequenz her gleichen Peptide erfolgt bei saurem pH-Wert in 2 M Essigsäure und 0,1% Hydroxyethylcellulose (HEC). Für die Separation der verwendeten Peptide spielt somit der EOF keine Rolle. Eine Trennung ist hierbei auf Grund der unterschiedlichen Anzahl von Ladungen und der ungleichen molaren Massen möglich.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Analysenwaage	LE225D (Sartorius)
Autoklav	Varioklav (H+P Labortechnik GmbH)
Brenner (Flow Box)	Fuego basic (WLD-TEC GmbH)
Dispenser	Eppendorf research pro 5 - 100 (Eppendorf)
Fermentieranlage und Zubehör	BiostatC (B. Braun Biotech Internat. sartorius group)
Prozessleitsystem	MFCS win (Sartorius Stedim Systems GmbH)
Pumpen	Watson Marlow Limited 101 U/R Watson Marlow sci 323
Sterilfilter	Minisart 0,2 µm (Sartorius Stedium Biotech)
Thermostat	DC 10 (Thermo Haake)
Flow Box	NUAIR, Biological Safety Cabinet (Zapf Instrument)
Fluoreszenzspektrometer	MPF-44 (Perkin Elmer)
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 2-4 (Christ) mit Anlagensteuerung LDC-1M
Gelelektrophoreseeinrichtung	Mighty Small II (Hoefer)
Hochdruckhomogenisator	APV 200
HPLC und Zubehör	1200 (Agilent Technologies) mit:
UV/VIS Detektor	G1365B MWD
Pumpe	G1312A
Entgaser	G1379B
Autosampler	G1329A
Säulenofen	G1316A
Kühleinheit	G1330B
Inkubator	Innova 4230 (New Brunswick Scientific)
Kapillarelektrophorese (CE)	Prince

Fluoreszenz Detektor	Argos 250B FL-Detector (Flux Instruments) Exc: Breitbandfilter 240 - 400 nm Em: Blockingfilter 495 nm
MALDI-TOF/TOF-MS Mikrotiterplattenreader	Ultraflex III TOF/TOF (Bruker) NOVOstar (BMG Labtech) FLUOstar (BMG Labtech)
Orbitrap - MS	LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) mit nano-ESI (Proxeon Emitter)
pH-Meter	inoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten)
Photometer	Ultraspec 1100 pro und Genesys 6 (ThermoSpectronic Rochester)
Pipetten	Eppendorf Research 2,5; 10; 100; 200; 1000 (Eppendorf) und 2; 10; 100; 1000 (VWR)
SDS-PAGE Anlage und Zubehör	(Amersham Biosciences)
Schüttler für 96-Well-Platten	inkubator 1000 mit Titramax 1000 (Heidolph)
SpeedVac	miVac DUO concentrator (Barnstead)
Thermoblock	MKR13 (HLC BioTech)
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner (VWR)
Vortexer	7-2020 (neoLab)
Waage	BP221S (Sartorius) BL310 CP3202P
Wipptisch	Rocky 1000 (Fröbel Labortisch)
Zentrifuge für Eppendorfgefäße	miniSpin plus (Eppendorf)
Zentrifuge (Zellernte)	Hermle ZK630 (Eppendorf)
Zentrifuge (Aufschluss und Reinigung)	Avanti J301 (Beckman Coulter)

3.2 Verbrauchsmaterial

Elisa-Platte	96-Well-Mikrotiterplatte, <i>medium binding</i> , farblos (Greiner BioOne)
Glasvials für CE	0,3 ml Micro-Insert (Grace Alltech)
Mikrotiterplatten	96-Well <i>half-area</i> Mikrotiterplatte schwarz (Greiner BioOne) 96-Well <i>half-area</i> Mikrotiterplatte schwarz, <i>non binding surface</i> (Corning)
PD-10 Säulen	(GE Healthcare)
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. 0,1-10; 2-200; 50-1000 (Eppendorf)
Reaktionsgefäße	<i>Safe-Lock Tubes</i> 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf) Multi-Reaktionsgefäße 0,65 ml (Roth)
Reaktionsgefäße (beschichtet)	Protein LoBind 1,5 ml <i>Safe-Lock Tubes</i> (Eppendorf)
Verdunstungsschutz für Mikrotiterplatten	EASYseal Klebefolien (Greiner BioOne)
Vials und Kappen für HPLC	SR-Flasche 03, conic-PP mit SR-Kappe SR 11-L/Sil (Ziemer)

3.3 Reagenzien und sonstiges Material

3.3.1 Laborchemikalien

Alle hier nicht extra aufgeführten Chemikalien stammen aus der Chemikalienausgabe des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und waren mindestens von analytischer Qualität.

α -HCCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (Bruker)
ABD-F	4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan (Sigma)
ACN	LiChrosolv® (Merck)
ABTS	3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure (Sigma)
ATP	(Sigma)
BSA	Rinderserumalbumin Ig-G <i>free</i> (Sigma)
CDC2-abgewandelte Peptide	TY: QKIGEGTYGVVYKC; TpY: QKIGEGTpYGVVYKC;

	pTY: QKIGEGpTYGVVYKC; pTpY: QKIGEGTpYGVVYKC (Probiodrug, Halle)
Citronensäure	Citronensäure Anhydrat (Fischer)
Destilliertes Wasser	mQ-Wasser aus Millipore Anlage
DMF	(Sigma)
DMSO	DMSO for molecular biology (Sigma)
DTT	Dithiothreitol (Sigma)
EDTA	Dinatrium-EDTA Dihydrat (Sigma)
FCS	Fetal calf serum
F5M	Fluorescein-5-maleimid (Pierce)
Glycerol	Glycerol for molecular biology (Sigma)
Kalibrierstandard für MALDI-TOF/TOF	Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics)
Molybdat	Dinatrium-Molybdat Dihydrat
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (Sigma)
TEMED	Tetramethylethyldiamin (Sigma)
TFA	Uvasol [®] TFA (Merck)
Tris Base	Trizma [®] Base (Sigma)
Tween 20	(Serva)
Inhibitoren:	
Imatinib	Imatinib Mesylat (Novartis)
Sunitinib	SU-11248 (Pfizer)
Übrige Inhibitoren	(LC Laboratories)
3.3.2 Kits	
Plasmidpräparation	GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
Western Blot	CheLuminate-HRP PicoDetect (AppliChem)
3.3.3 Antikörper	
FP Assay	Phospho-CDC2 (Tyr ¹⁵) AK (Cell Signaling Technology, Nr. 9111)
Western Blot	A: 1. Anti-Myt1 AK (Cell Signaling Technology, Nr. 4282) 2. Monoklonaler anti-Kaninchen AK mit konjugierter Peroxidase (HRP) (Dianova) B: 1. Anti-GST (2GH1) AK (Cell Signaling Technology) 2. Monoklonaler anti-Maus AK mit konjugierter Peroxidase (HRP) (Dianova) C: 1. Anti-His AK mit konjugierter Peroxidase (HRP)

ELISA	1. Phospho-CDC2 (Tyr ¹⁵) AK (Cell Signaling Technology, Nr. 9111) 2. Monoklonaler anti-Kaninchen IgG-POD (Sigma, Nr. A1949)
-------	--

3.3.4 Enzyme

Benzonase	250 U/μl (Merck)
-----------	------------------

3.3.5 Molekulargewichtsstandards

SDS-PAGE	Unstained Protein Ladder (Fermentas) Page Ruler Protein Ladder (Fermentas)
Agarose-Gelelektrophorese	MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas)

3.3.6 Bakterienstämme

Nachfolgend sind die eingesetzten *Escherichia coli* Stämme, mit ihren jeweiligen genetischen Charakteristika aufgeführt:

<i>E. coli</i> BL21 (Gold3)	B F- dcm+ The ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ (DE3) endA Tet; Fa. Stratagene
<i>E. coli</i> HM130	F- delta_lacX74 galE galK thi rpsL(strA)delta_phoA (Pvull) F' ptr, degP, ompT eda51::Tn10(tetr) delta_tsp::kanr; George Georgiou Laboratory
<i>E. coli</i> CAG597	F- lacZ(am) pho(am) tyrT[supC(ts)] trp(am) rpsL(StR) rpoH(am)165 zhg::Tn10 mal(am) ⁶⁵

E. coli HM130 und *E. coli* CAG597 wurden dankenswerterweise von Dr. Frank Erdmann (MPG, Halle (Saale)) zur Verfügung gestellt.

3.3.7 Plasmide

pGEX-2T	(GE Healthcare) Der Vektor besitzt einen tac Promotor, eine N-terminale Glutathion-S-Transferase (GST-Tag) sowie als Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Ligation des Myt1 Gens erfolgte über die Restriktionsschnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI.
pGEX6P1	Dieser Vektor ist eine Modifikation des pGEX-2T-hMyt1 Vektors, in dem C-terminal zum hMyt1 Gen eine

Tetrahistidin-Sequenz eingefügt wurde (Dr. Frank Erdmann, MPG, Halle (Saale)).

pET-20b

(Novagen) Der Vektor besitzt einen T7 Promotor, eine C-terminale Polyhistidin-Region (6 x His) und zu Selektionszwecken ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Subklonierung erfolgte über *NdeI* und *EcoRI*, so dass eine *pelB* Signalsequenz für einen potentiell periplasmatischen Transport des rekombinanten Proteins entfernt wurde.

3.3.8 Material zur Aufreinigung der Myt1 Kinase

GST-Myt1-Fusionsproteine

Protino Glutathion Agarose 4B (Macherey-Nagel)

Polyhistidin-Myt1-Fusionsproteine

Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)

3.4 Lösungen

3.4.1 Pufferlösungen für Markierung und Testung

Der pH-Wert der jeweiligen Puffer wurde mit 5 M oder 3 M Salzsäure auf den jeweils angegebenen Wert eingestellt. Alle zehnfach (10x) konzentrierten Puffer werden ebenfalls mit Salzsäure auf ihren angegebenen pH-Wert eingestellt. Diese Puffer wurden gebrauchsfertig durch 1:10 Verdünnen mit mQ-Wasser und gegebenenfalls Lösen von weiteren Substanzen. Eine erneute Einstellung des pH-Wertes war hier in der Regel nicht notwendig. Wenn nicht abweichend aufgeführt, wurde mQ-Wasser als Lösungsmittel zur Herstellung der Puffer und Lösungen verwendet.

Puffer für Markierung mit ABD-F	50 mM Tris	6,06 g/l
	2 mM EDTA	0,74 g/l
Puffer für Markierung mit F5M	siehe Zusammensetzung 10x / 1x PBS-Puffer unter Abschnitt 3.4.3	
Kinasepuffer	25 mM Tris	3,03 g/l
	10 mM MgCl ₂	2,03 g/l
	150 mM NaCl	8,78 g/l
	pH 7,4 mit 3 M HCl eingestellt, unmittelbar vor Gebrauch versetzt mit Molybdat SL	
Puffer zum Verdünnen des AK Phospho-CDC2 (Tyr ¹⁵)	siehe Kinasepuffer	

3.4.2 Sonstige Lösungen für Markierung und Testung

ATP Stammlösung	10 mM in mQ-Wasser	0,352 g/100 ml
ATP Verdünnungslösung 1	1 mM in Puffer; aus ATP SL und Kinasepuffer hergestellt	
DTT Stammlösung	500 mM in mQ-Wasser	0,77 g/10 ml
Molybdat Stammlösung	500 mM in mQ-Wasser Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1,21 g/10 ml
Salzsäure zum Abstoppen der Markierungsreaktion	1 M HCl	
Salzsäure zur Peptidhydrolyse	6 M HCl (mit Argon entgast und gesättigt)	
Salzsäure zum Einstellen der Puffer	5 M oder 3 M HCl	
Inhibitor Stammlösungen	10 mM in DMSO	
Inhibitor Verdünnungslösung 1	1 mM in 20 % DMSO, 80 % mQ-Wasser; aus Inhibitor SL, DMSO und mQ-Wasser hergestellt	
Peptid-ABD Stammlösung	in mQ-Wasser (Konzentration verschieden ~ 0,5 bis 2 mM)	
Peptid-ABD Verdünnungslösung 1 für CE	100 µM; aus Peptid-ABD SL mit Kinasepuffer hergestellt	
pTpY-F5M Stammlösung	in mQ-Wasser (Konzentration verschieden ~ 50 - 100 µM)	
pTpY-F5M Verdünnungslösung	1 µM in Kinasepuffer	
Laufmittel HPLC	A: 0,1 % TFA in mQ-Wasser B: 0,1 % TFA in 20 % mQ-Wasser 80 %ACN; mittels Ultraschallbad 15 min entgast	
Laufmittel CE	2 M Essigsäure mit 0,1 % Hydroxyethylcellulose; filtriert durch Mikrometerfilter	

3.4.3 Puffer und Lösungen für den ELISA

Low-Cross-Puffer	(Candor Bioscience GmbH)	
10x PBS-Puffer	26 mM KCl	2 g/l

	1,38 M NaCl	80 g/l
	100 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	17,8 g/l
	17 mM KH ₂ PO ₄	2,4 g/l
1x PBS-Puffer	10x PBS-Puffer 1:10 mit mQ-Wasser verdünnt	
1x PBS-T-Puffer	1x PBS-Puffer mit 0,05 % Tween 20	
Blocking-Puffer	1x PBS-Puffer mit 10 % FCS	
ABTS-Lösung	3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonsäure, 0,3 mg/ml in 0,1 M Zitronensäurelösung; pH 4,35 mit NaOH Pellets eingestellt; aliquotiert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert; unmittelbar vor Gebrauch 10 ml ABTS-Lösung mit 10 µl H ₂ O ₂ versetzt (0,1 %)	

3.4.4 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

SDS-PAGE

Probenpuffer	225 mM Tris	2,72 g/100 ml
	5 % (m/V) SDS	5 g/100 ml
	0,05 % Bromphenolblau	0,05 g/100 ml
	50 % (m/V) Glycerin	50 g/100 ml
	pH 6,8 mit 3 M HCl eingestellt; vor Verwendung 10 µl Mercaptoethanol je ml zugesetzt	
Trenngelpuffer	1,5 M Tris	18,18 g/100 ml
	0,04 % (m/V) SDS	0,04g/100 ml
	0,01 % (m/V) NaN ₃	0,01 g/100 ml
	pH 8,8 mit 3 M HCl eingestellt	
Sammelgelpuffer	500 mM Tris	6,06 g/100 ml
	0,04 % (m/V) SDS	0,04g/100 ml
	0,01 % (m/V) NaN ₃	0,01 g/100 ml
	pH 6,8 mit 3 M HCl eingestellt	
30 % Acryl-/Bisacrylamid	29,1 % (m/V) Acrylamid	29,1 g/100 ml
	0,9 % (m/V) Bisacrylamid	0,9 g/100 ml
APS Lösung (gesättigt)	Ammoniumperoxidsulfat (APS) wurde so in 2 ml dest. Wasser gelöst, dass noch ungelöstes APS am Boden verblieb	
TEMED	Tetramethylethylendiamin direkt eingesetzt	

Trenngel 12,5 %	2,5 ml Trenngelpuffer 4,2 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid 3,3 ml dest. Wasser 10 µl TEMED 20 µl APS Lösung gesättigt	
Sammelgel 4,5 %	1,25 ml Sammelgelpuffer 0,75 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid 3,0 ml dest. Wasser 10 µl TEMED 8 µl APS Lösung gesättigt	
10x Kathodenpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 1 % SDS 0,01 % NaN ₃	30,28 g/l 144 g/l 10 g/l 0,1 g/l
1x Kathodenpuffer	10x Kathodenpuffer 1:10 mit dest. Wasser verdünnt	
Coomassie Färbung		
Coomassie Färbelösung	1 g Coomassie Brilliant Blau G-250 in 700 ml mQ-Wasser gelöst, 200 ml Isopropanol, und 100 ml Eisessig zugesetzt und filtriert	
Entfärbelösung	20 % (V/V) Isopropanol 10 % (V/V) Eisessig	200 ml/l 100 ml/l
Trocknerlösung	20 % (V/V) Ethanol 10 % (V/V) Glycerin	200 ml/l 100 ml/l
Silberfärbung		
Fixierlösung	50 % (V/V) Methanol 12 % (V/V) Eisessig Formaldehyd (37 %)	500 ml/l 120 ml/l 0,5 ml/l
Sensitivierungslösung	Na ₂ S ₂ O ₃ stets frisch angesetzt	40 mg/ 200 ml
Silber-Färbelösung	AgNO ₃ Formaldehyd (37 %) stets frisch angesetzt	0,4 g/ 200 ml 150 µl/ 200 ml

Entwicklerlösung	Na ₂ CO ₃	12 g/ 200 ml
	Formaldehyd (37 %)	100 µl / 200 ml
	Na ₂ S ₂ O ₃ – Lösung (0,02 % (m/V))	4 ml / 200 ml
	stets frisch angesetzt	
Stopplösung	50 % (V/V) Methanol	
	12 % (V/V) Essigsäure	
Trocknerlösung	3 % (V/V) Glycerin in mQ-Wasser	
<u>Western Blot</u>		
Transferpuffer	25 mM Tris	3,02 g/l
	150 mM Glycin	11,26 g/l
	10 % (V/V) Methanol	100 ml/l
	pH 8,3 mit 3 M HCl eingestellt	
TBS-T Puffer	50 mM Tris	6,06 g/l
	150 mM NaCl	8,77 g/l
	0,2 % (V/V) Tween 20	2 ml/l
	pH 7,5 mit 3 M HCl eingestellt	
Blockinglösung	5 % (m/V) Magermilchpulver	0,5 g/10 ml
	in TBS-T Puffer	

3.4.5 Medien und Lösungen für Expression der Myt1 Kinase

LB-Medium (fest) pH 7,5	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Agar	15 g/l
	pH 7,5 eingestellt, autoklaviert; Zugabe der Antibiotika nach Abkühlen auf 50 °C (optional)	
LB-Medium (flüssig)	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7,5 eingestellt, autoklaviert; Zugabe der Antibiotika direkt vor Gebrauch (optional)	
Antibiotika Stammlösung	Ampicillin	50 mg/ml
	Streptomycin	5 mg/ml
	Kanamycin	12,5 mg/ml
	Tetracyclin	5 mg/ml
	Die Herstellung von Ampicillin, Streptomycin und Kanamycin Stammlösung erfolgte mit mQ-Wasser,	

Tetracyclin mit 70 % (V/V) Ethanol. Lösungen anschließend sterilfiltriert (ausgenommen Tetracyclin), aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

Antibiotika Arbeitskonzentration

Ampicillin	100 µg/ml Medium
Streptomycin	10 µg/ml Medium
Kanamycin	25 µg/ml Medium
Tetracyclin	10 µg/ml Medium

Die Zugabe der Antibiotika erfolgte direkt vor dem Beimpfen in Form der jeweiligen Stammlösung.

Minimalmedium (MM)

Bestehend aus Salzlösung, MgSO₄-Lösung (0,5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O), Thiaminlösung (0,01 g/l Thiamin), Spurenelementlösung (3 ml/l TES SL), Glucoselösung (10 g/l Glucose) und optional Antibiotika (jeweilige Zusammensetzung der Lösungen anschließend aufgeführt).

MgSO₄-Lösung, Thiaminlösung, Spurenelement-lösung, und Glucoselösung wurden in Form ihrer Stammlösung hergestellt und autoklaviert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden diese zur ebenfalls autoklavierten Salzlösung gegeben, so dass sich für das Minimalmedium die oben genannten Konzentrationen ergaben (der geringfügige Verdünnungseffekt der Salzlösung durch die Zugabe der übrigen Lösungen wurde dabei vernachlässigt).

Salzlösung

Na ₂ SO ₄	2,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,68 g/l
NH ₄ Cl	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	14,6 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4,0 g/l
(NH ₄) ₂ -H-Citrat	1,0 g/l

autoklaviert; in Abhängigkeit der Anzahl der eingesetzten Antibiotika wurden für 100 ml MM z.B. 97,0 ml Salzlösung eingesetzt (Zugabe von 200 µl Antibiotikum SL)

MgSO₄ Stammlösung

MgSO₄ 125 g/l
autoklaviert; zur Herstellung von 100 ml MM wurden 400 µl MgSO₄ SL benötigt

Thiamin Stammlösung

Thiamin-HCl 10 g/l
frisch hergestellt und steril filtriert; zur Herstellung von 100 ml MM wurden 100 µl der Thiamin SL benötigt

Spurenelementlösung (TES SL)	Konz. MM	Einwaage für 250 ml TES SL
CaCl ₂	0,5 g/l	125 mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,18 g/l	45 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	0,1 g/l	25 mg
Na ₂ -EDTA	10,05 g/l	2,78 g
FeCl ₃	8,35 g/l	2,08 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,16 g/l	40 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,18 g/l	45 mg
SL in mQ-Wasser hergestellt und autoklaviert; zur Herstellung von 100 ml MM wurden 300 µl TES SL benötigt		
Glucose Stammlösung	Glucose	500 g/l
autoklaviert; zur Herstellung von 100 ml MM wurden 2 ml der SL benötigt		
Autoinduktionsmedium	Bestehend aus Lösung 1 – 3 und LB-Medium; neben 92,9 ml LB-Medium wurden 2 ml Lösung 1, 5 ml Lösung 2, und 100 µl Lösung 3 zusammengefügt; aus der Zugabe von Lösung 1 – 3 ergeben sich folgende Endkonzentrationen: 0,05 % Glucose, 0,5 % Glycerin, 0,2 % Lactose, 25 mM KH ₂ PO ₄ , 25 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM MgSO ₄	
Lösung 1	Glucose Glycerin Lactose autoklaviert	2,5 g/100 ml 25 g/100 ml 10 g/100 ml
Lösung 2	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ autoklaviert	6,8 g/100 ml 7,1 g/100 ml
Lösung 3	MgSO ₄ x 7 H ₂ O autoklaviert	9,86 g/ 20 ml
IPTG Stammlösung	100 mM IPTG in mQ-Wasser (23,8 g/l), frisch hergestellt und sterilfiltriert	

3.4.6 Lösungen zur Aufreinigung der Myt1 Kinase

Aufschlusspuffer	50 mM Tris pH 8,0 mit 3 M HCl eingestellt, filtriert durch 0,22 µm Filter und entgast; vor Verwendung Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten, EDTA-frei (2 Stück je 50 ml) zugefügt	6,06 g/l
Bindingpuffer für IMAC	50 mM Tris 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0 mit 3 M HCl eingestellt, filtriert durch 0,22 µm Filter und entgast	6,06 g/l 17,53 g/l 0,68 g/l
Elutionspuffer für IMAC	50 mM Tris 300 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 8,0 mit 3 M HCl eingestellt, filtriert durch 0,22 µm Filter und entgast	2,43 g/400 ml 7,01 g/400 ml 13,62 g/400 ml
Elutionspuffer für Reinigung über GST-Tag	50 mM Tris 10 mM red. Glutathion pH 8,0 mit 3 M HCl eingestellt, filtriert durch 0,22 µm Filter und entgast	0,61 g/100 ml 0,31 g/100 ml
Puffer zur Umpufferung	siehe Kinasepuffer	

3.5 Peptidsubstrate

Das natürliche Substrat der hier besprochenen Myt1 und Wee1 ist die CDC2. In Anlehnung an einen im Jahr 2005 von ZHOU et al. beschriebenen Fluoreszenzpolarisations Assay¹⁰ wurde in den Testsystemen hier nicht die gesamte CDC2, sondern nur ein für die Phosphorylierung durch die Kinase relevanter Abschnitt der CDC2 verwendet. Dieser Abschnitt umfasst 14 Aminosäuren (AS) und entspricht der Sequenz der CDC2 an deren relativem Anfang, nämlich der achten bis 21. AS. Dennoch ist das hier gewählte CDC2 Peptid nicht genau mit der Sequenz der humanen CDC2⁶⁶ identisch, sondern weicht bezüglich der ersten (N-terminalen) und letzten (C-terminalen) AS von der Originalsequenz ab. Somit entspricht der von uns gewählte Peptidabschnitt den in der Literatur beschriebenen Peptiden, wie sie für FP-Myt1-Kinaseassays bereits verwendet wurden^{61; 10}.

Die Sequenz des CDC2-abgewandelten Peptids lautet:

(NH₂)-Gln-Lys-Ile-Gly-Glu-Gly-**Thr-Tyr**-Gly-Val-Val-Tyr-Lys-Cys-(COOH). Die beiden fett gedruckten Aminosäuren Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) bilden die zwei Phosphorylierungsstellen der beiden Kinasen Myt1 und Wee1. Sie werden oft auch als Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ bezeichnet, da sie die 14. und 15. AS

der CDC2 darstellen. Da es sich aber bei dem hier verwendeten Peptid nur um einen Abschnitt handelt, entsprechen die beiden AS tatsächlich nicht der 14. und 15., sondern auf das Peptid bezogen nur der siebenten und achten AS. Dennoch soll weiterhin, wenn es um die Phosphorylierung durch die beiden Kinasen geht, die Bezeichnung Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ bestehen bleiben.

Neben dem Drei-Buchstaben-Aminosäure-Code gibt es den Ein-Buchstaben-Aminosäure-Code. Bei diesem steht für Thr der Buchstabe **T** und für Tyr der Buchstabe **Y**. Aus diesem Grund wird im Folgenden das CDC2-abgewandelte Peptid mit **TY** bezeichnet.

Für die Messungen ist es erforderlich, dass nicht nur das eigentliche Peptidsubstrat der Kinase vorhanden ist, sondern auch Peptide als Referenzen zur Verfügung stehen, die an den betroffenen AS phosphoryliert sind. Neben TY stehen alle möglichen Kombinationen an Phosphorylierungen von Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ zur Verfügung: Das sind die beiden monophosphorylierten Peptide pTY und TpY. pTY trägt das Phosphat an Threonin und TpY an Tyrosin. Theoretisch ist die Monophosphorylierung an Thr¹⁴ nur durch die Myt1 möglich, die Bildung von TpY hingegen durch Myt1 und Wee1. Als drittes Referenzpeptid dient pTpY, welches das diphosphorylierte Peptid darstellt und je eine Phosphatgruppe am Threonin und Tyrosin trägt. Eine Übersicht aller Peptide gibt Abbildung 3.1.

- **[NH₂]-Gln-Lys-Ile-Gly-Glu-Gly-Thr-Tyr-Gly-Val-Val-Tyr-Lys-Cys-[COOH]**
= **TY**
- **[NH₂]-Gln-Lys-Ile-Gly-Glu-Gly-PThr-Tyr-Gly-Val-Val-Tyr-Lys-Cys-[COOH]**
= **pTY**
- **[NH₂]-Gln-Lys-Ile-Gly-Glu-Gly-Thr-PYr-Gly-Val-Val-Tyr-Lys-Cys-[COOH]**
= **TpY**
- **[NH₂]-Gln-Lys-Ile-Gly-Glu-Gly-PThr-PYr-Gly-Val-Val-Tyr-Lys-Cys-[COOH]**
= **pTpY**

Abb. 3.1 Primärstruktur der CDC2-abgewandelten Peptide: Peptidsubstrat TY (grau unterlegt) und drei weitere, als Referenz dienende Peptide mit gleicher AS-Sequenz, jedoch unterschiedlichem Phosphorylierungsgrad

Die hier verwendeten Peptide wurden freundlicherweise von der Firma Probiodrug in Halle (Saale) synthetisiert und durch die AG Dr. Schmidt kommerziell erworben.

3.5.1 Aufarbeitung der Peptidlyophilisate

Die Peptide lagen in gereinigter, lyophilisierter Form als TFA-Salze vor und zunächst wurde je eine Charge in 100 mM Tris/HCl Puffer pH 7,1 gelöst. Tabelle 3.1 führt neben den eingesetzten Mengen, die laut Datenblatt angegebene Reinheit, das zum Lösen verwendete Puffervolumen und die daraus resultierende theoretische Konzentration der Peptide auf. Die Peptidlösungen wurden anschließend aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Da pTY erst zu einem späteren Zeitpunkt verfügbar war, ist dieses noch nicht in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1 Aufarbeitung, Reinheit und theoretische Konzentration der ersten Peptide

Peptid	Einwaage [mg]	Reinheit [%] lt. Datenblatt	Volumen [μ l] Puffer	Theoretische Konz. [mM]
TY	11,02	98,35	900	7,8
TpY	1,65	95,7	500	1,98
pTpY	5,06	73,15	600	3,62

Dieses zuerst verwendete Verfahren stellte sich als nicht grundsätzlich geeignet dar, und deswegen wurden, nachdem die so hergestellten Peptid-SL aufgebraucht waren, alle folgenden Peptidlösungen bedarfsgerecht hergestellt. Dazu wurden die Peptide eingewogen und, je nachdem für welche Anwendung sie benötigt wurden, in der erforderlichen Menge Puffer oder mQ-Wasser gelöst. Ebenso wurde auch mit pTY verfahren.

3.5.2 Massenspektrometrische Qualifizierung

Zur Identitätskontrolle wurden die Peptide TY, TpY und pTpY mit Hilfe der *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*-Massenspektrometrie untersucht. Dazu wurden aus den oben aufgeführten Peptid-SL Verdünnungen mit einer Konzentration von 10 μ M hergestellt. Diese Peptidlösungen wurden anschließend 1:25 mit einer Mischung von 0,1 % TFA in Wasser / ACN (1:1) gemischt. Ebenso wurde eine Standardlösung mit einer Mischung verschiedener Standardpeptide (Peptid Standard II (Bruker)) durch 1:25 Verdünnen mit ACN / 0,1 % TFA in Wasser (1:1) hergestellt. Je 1 μ l der so angefertigten Proben- bzw. Standardlösung wurde mit je 1 μ l einer Matrixlösung nach der „Dried droplet-Methode“ auf dem Probenträger kokristallisiert. Es ergab sich eine fein granuläre Matrix. Die Matrixlösung, bestehend aus α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA) gesättigt in 0,1 % TFA in Wasser / ACN (1:1), wurde durch 1:4 Verdünnen mit 0,1 % TFA in Wasser / ACN (1:1) hergestellt. Die Messungen wurden mit einem Bruker Ultraflex III MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer, welches mit einem Neodyn-Jag-Laser ($\lambda = 355$ nm) bestückt war, durchgeführt. Die Massenspektren wurden im Reflektormodus für TpY und pTpY auf Grund der Phosphatgruppen im negativen und für TY im positiven Ionisationsmodus aufgenommen.

Das Peptid pTY wurde als 1 μ M Lösung einer Mischung von 0,1 % HCOOH in 80 % Wasser / 20 % ACN an einem LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer untersucht. Die Aufgabe erfolgte *off line* mittels nano-ESI.

Diese Messungen konnten dankenswerterweise im Arbeitskreis Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik von Prof. Dr. Andrea Sinz am Institut für Pharmazie der Universität Halle-Wittenberg durchgeführt werden.

3.5.3 Quantifizierung der Peptidlösungen

Peptide absorbieren UV-Licht im Bereich um 214 nm. Sowohl die AS, als auch die Peptidbindung tragen hierzu bei⁶⁷. Darüber hinaus kommt es durch bestimmte AS zur Absorption von UV-Licht bei höheren Wellenlängen. Neben den Peptiden absorbieren viele andere Substanzen Licht im Bereich um

220 nm. Um Interferenzen durch andere Komponenten zu minimieren, misst man die Absorption wässriger Proteinlösungen in der Regel bei 280 nm. Allein die Aminosäuren Tryptophan (Trp, W), Tyrosin (Tyr, Y) und zu einem geringeren Teil Cystin (Cys-Cys, C-C) tragen zur Peptid- oder Proteinabsorption bei 280 nm bei. Phenylalanin (Phe, F), obwohl eine aromatische AS, absorbiert bei niedrigeren Wellenlängen (240-265 nm)^{68; 69}.

Da die unter 3.5.1 aufgeführten Peptidlösungen durch Lösen von Lyophilisaten hergestellt wurden, sollte eine Überprüfung der Konzentration der TY SL erfolgen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Lyophilisate neben Peptid unbekannte Mengen an TFA-Salz enthielten, war anzunehmen, dass die tatsächliche Konzentration der Peptid-SL unter der theoretischen Konzentration liegen würde. Bei Bedarf sollte die Quantifizierung der Referenzpeptide später erfolgen.

Für eine Abschätzung der Peptidkonzentration wurden zunächst zwei Methoden zur Quantifizierung in Betracht gezogen: a) Absorptionmessung der verdünnten Stammlösung bei 280 nm^{68; 69} und b) saure Hydrolyse des Peptids zu den AS und anschließende Bestimmung des im Hydrolysat enthaltenen Tyrosins⁷⁰.

3.5.3.1 Absorptionmessung bei 280 nm

Die Absorptionmessung wurde an einem Ultraspec 1100 pro Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einer Küvette aus Quarzglas (L = 0,099 cm) vorgenommen. Die unter 3.5.1 hergestellte TY SL wurde 1:20 mit mQ-Wasser verdünnt und gegen mQ-Wasser als Blindwert vermessen.

3.5.3.2 Säurehydrolyse und Quantifizierung über HPLC

Die Quantifizierung der Peptidlösungen erfolgte nach vollständiger Säurehydrolyse in die Aminosäuren und anschließender Ermittlung des im Peptidhydrolysat enthaltenen Tyrosins über HPLC mit externer Standardmethode.

Die Säurehydrolyse erfolgte in Anlehnung eines in der Literatur beschriebenen Verfahrens zur Totalhydrolyse von Proteinen⁷⁰. Hierzu wurden 10 µl TY-SL 1:10 mit 6 M HCl (mit Argon entgast und gesättigt) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß versetzt und 20 h bei 750 U/min und 99 °C im Thermomixer inkubiert. Es wurde eine Doppelbestimmung mit zwei Parallelansätzen durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Blindwert angesetzt, der anstatt Peptidlösung nur 100 mM Tris/HCl Puffer pH 7,1 respektive mQ-Wasser enthielt.

Nach der Säurehydrolyse konnten die Hydrolysate direkt auf die HPLC aufgegeben werden. Das Abziehen der Säure an der SpeedVac und ein Wiederaufnehmen des Rückstandes in Wasser vor der flüssigchromatographischen Analyse, so wie in der Literatur⁷⁰ beschrieben, erwies sich als unnötig, da gleiche Ergebnisse erzielt wurden. Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Geräte- und Methodenparameter.

Tabelle 3.2 Übersicht über die HPLC Methode zur Peptidquantifizierung

HPLC Gerät	1200 Series (Agilent Technologies)	
UV-Detektor	214 und 280 nm; Quantifizierung bei 280 nm	
Säule	Jupiter C18 250 x 4,6 mm, beheizt auf 25 °C	
Laufmittel	A: 0,1 % TFA in mQ-Wasser B: 0,1 % TFA in 20 % mQ-Wasser 80 % ACN	
Gradient	Zeit [min]	[%] B
	0	5
	22	27
	23	95
	33	95
	34	5
	44	5
Fluss	1 ml/min	

Während der gesamten Untersuchung wurden die Proben- und Standardlösungen im Autosampler bei 4 °C gekühlt.

Chromatographiert wurden die Hydrolysate der Probe, des Blindwertes und eine 1:10 in Wasser verdünnte, unbehandelte TY Lösung. Die zwei Parallelansätze der Probe wurden doppelt bestimmt. Der Vergleich der Chromatogramme der Probenhydrolysate mit der unbehandelten Peptidlösung diente der Kontrolle der vollständigen Hydrolyse des Peptids.

Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Standardmethode mit Tyrosin. Dazu wurde eine SL von Tyrosin in 5 M HCl angefertigt und aus dieser sechs Verdünnungen im Konzentrationsbereich von 90 bis 250 µg/ml hergestellt. Über die Messung der Absorption der Tyrosinstandards bei 280 nm und die Ermittlung der Peakflächen wurde eine Kalibriergerade erstellt, die jeweils aus einer Doppelbestimmung hervorging.

3.5.4 Fluoreszenzmarkierung der Peptide

Sowohl für den geplanten Fluoreszenzpolarisations (FP) Assay, als auch für die Bestimmungen der Peptide über Kapillarelektrophorese (CE) mussten die CDC2-abgewandelten Peptide fluoreszenzmarkiert vorliegen. In der Applikation als kleine, fluoreszierende Moleküle verwendet, werden sie in der FP auch als Sonden bezeichnet.

Zunächst wurde die Markierung mit Fluorescein-5-maleimid (F5M) über die Thiofunktion des C-terminalen Cysteins, so wie es die Literatur^{61;10} vorschlug, getestet. Dazu erfolgten nach der Markierung von TY und pTpY mit F5M ein Reinigungsschritt mittels HPLC und anschließend die Untersuchung der erhaltenen Produkte mittels CE. Stabilitätsprobleme der markierten Peptide während der Elektrophorese, sowie die Bildung einer Vielzahl von Neben- und Zerfallsprodukten

während der Markierungsreaktion, aber auch nach der Reinigung, machten die Suche nach alternativen Fluoreszenzmarkern erforderlich. Da das mittels CE erhaltene Elektropherogramm der markierten Peptide keine einheitlichen Peaks aufwies, wurde Fluorescein-5-maleimid als Fluoreszenzmarker für die Peptide zunächst als ungeeignet betrachtet.

Als weitere, potentiell geeignete Fluoreszenzmarker kamen Fluorescamin und Monobrombiman in Betracht, genügten aber auch nicht allen Anforderungen. Eine Trennung von Fluorescamin-markierten Peptiden und somit Unterscheidung des Phosphorylierungsstatus war mittels CE nicht möglich, da die für die Trennung essentiellen freien Aminfunktionen mit Fluorescamin abgesättigt waren. Monobrombiman scheiterte auf Grund schlechter Ausbeuten bei der Markierung und schlechter Reproduzierbarkeit der Signale im Elektropherogramm.

Schließlich erwies sich die Markierung mit dem Benzofurazanderivat ABD-F, ebenfalls über das am C-Terminus gelegene Cystein, als am besten geeignet für die anschließende CE Analytik.

3.5.4.1 Markierung mit Fluoreszenzmarker ABD-F

Diese Methode der Markierung gewährleistet, dass die für die Trennung über CE erforderlichen primären Aminfunktionen der Peptide (Lys² und Lys¹³, sowie die Aminfunktion am N-Terminus) unsubstituiert vorliegen.

4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan (ABD-F) ist selbst nicht fluoreszierend, bildet aber nach Reaktion mit einer Thiofunktion eine fluoreszierende Verbindung mit einem Maximum an Fluoreszenzintensität bei pH 2⁷¹. Bei der Markierung reagiert ABD-F unter Abspaltung eines Fluoridions mit der Thiofunktion des C-terminalen Cysteins (Abb. 3.2).

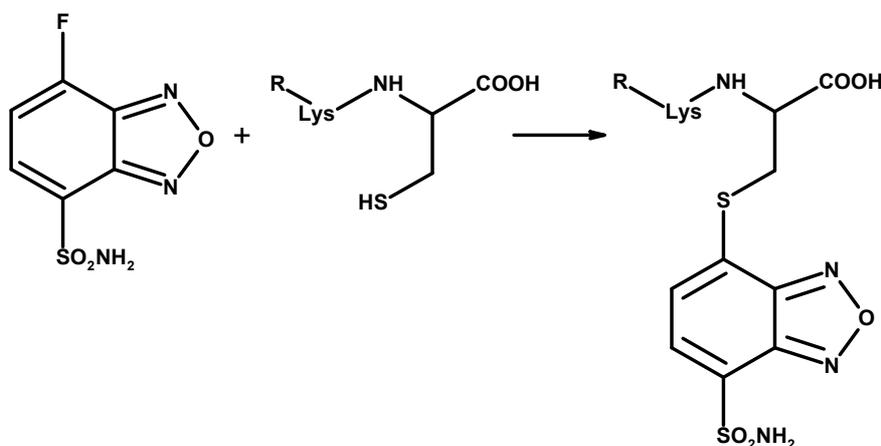


Abb. 3.2 Markierungsreaktion mit ABD-F: ABD-F reagiert mit der Thiofunktion des C-terminalen Cysteins des Peptids in Form einer nucleophilen Substitutionsreaktion unter Ausbildung einer Thioetherbrücke zum fluoreszierenden Produkt (Peptid-ABD)^{72; 71}.

Für die Markierungsreaktion wurde entweder Peptid-SL oder lyophilisiertes Peptid nach Lösen in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8,0 mit 2 mM EDTA mit einem fünf- bis achtfachen molaren Überschuss an ABD-F versetzt und 10 min bei 50 °C im Thermomixer bei 400 U/min inkubiert. Die aus lyophilisiertem Peptid hergestellte Lösung wurde auf eine Konzentration bis etwa 10 mM eingestellt. Pro Ansatz wurde maximal 700 nmol Peptid eingesetzt.

ABD-F wurde zunächst in ACN angelöst und anschließend mit dem dreifachen Volumen an 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8,0 mit 2 mM EDTA (Lösungsmittelverhältnis 1:4) zu einer ca. 80 bis 100 mM Lösung verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch die Lagerung auf Eis und Zugabe von 1 M HCl bis zur sauren Reaktion gestoppt.

Für eine gute Umsetzung waren folgende Schritte unbedingt zu beachten: strikte Einhaltung des pH-Wertes während der Markierungsreaktion und die Verwendung von stets frisch hergestellter ABD-F Lösung. Ein pH-Wert kleiner acht hatte eine Verschiebung der Reaktionsprodukte in Richtung des unmarkierten Peptids zur Folge. Dem Ansäuern des Markierungsansatzes nach der Reaktion kam eine zweifache Bedeutung zu: Erstens wurde die Reaktion abgestoppt, da die Reaktivität der Thiofunktion im Sauren stark herabgesetzt ist und zweitens wurde das gebildete fluoreszierende Produkt stabilisiert, weil die Markierungsreaktion unter basischen und reduktiven Bedingungen reversibel ist^{72; 71; 73}. Der Zusatz von Phosphinen (z.B. TCEP) zur Reduktion eventueller Disulfide, wie in der Literatur zur Markierung von Thiolen mittels ABD-F häufig beschrieben⁷⁴⁻⁷⁶, beeinflusste die Markierungsreaktion nicht positiv. Woraus sich schließen lässt, dass die Peptide unter den vorliegenden Bedingungen zum größten Teil reduziert vorlagen.

Im Anschluss an die Markierung war eine Aufreinigung mittels HPLC zur Gewinnung der reinen ABD-markierten Peptide notwendig. Dabei konnten der Überschuss an Markierungsreagenz, unmarkiertem Peptid und gegebenenfalls markierten Peptidverunreinigungen von dem eigentlichen Produkt abgetrennt werden.

3.5.4.2 Markierung mit Fluoreszenzmarker Fluorescein-5-maleimid

Obwohl sich ABD-markierte Peptide für die Messungen mittels CE als geeignet erwiesen, konnte mit diesen über Fluoreszenzpolarisation keine ausreichende Sensitivität erreicht werden (siehe dazu auch Abschnitte 3.6.1 und 4.2.1 - Entwicklung eines FP Assays). Bei der Entwicklung eines FP Assays auf Grundlage der Veröffentlichungen von KRISTJÁNSDOTTÍR und ZHOU et al.^{61; 10} wurde zunächst angestrebt, ein Testsystem zu entwickeln, welches ABD-markiertes, anstatt Fluorescein-markiertes Peptid als fluoreszierende Sonde nutzt. Auf diese Weise hätte man sowohl für die CE als auch für die FP das gleiche fluoreszierende Peptid verwenden können. Dieser Ansatz hätte eine Neuerung dargestellt, da bisher in der Literatur FP Messungen hauptsächlich mit Fluorescein-markierten Substanzen, jedoch nicht mit ABD-markierten beschrieben wurden^{61; 10}. Grundsätzlich sollten jedoch Polarisationsmessungen auch mit anderen fluoreszierenden Substanzen möglich sein - so auch beispielsweise ABD-markierte Peptide. Auf Grund der erwähnten geringen Sensitivität der ABD-markierten Peptide erfolgte daher noch einmal, zum Zweck der Entwicklung eines FP Assays, die Markierung mit einem Fluoresceinderivat.

Für den FP Assay wurde auf Grund seines Aufbaus als kompetitiver Assay nur fluoreszenzmarkiertes pTpY benötigt. Die Markierung erfolgte mit Fluorescein-5-maleimid (F5M). Zerfallsprodukte des F5M-markierten Peptids störten im Unterschied zur CE Analytik bei dieser Methode nicht, da hier durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers eine ausreichende Spezifität erzielt werden konnte.

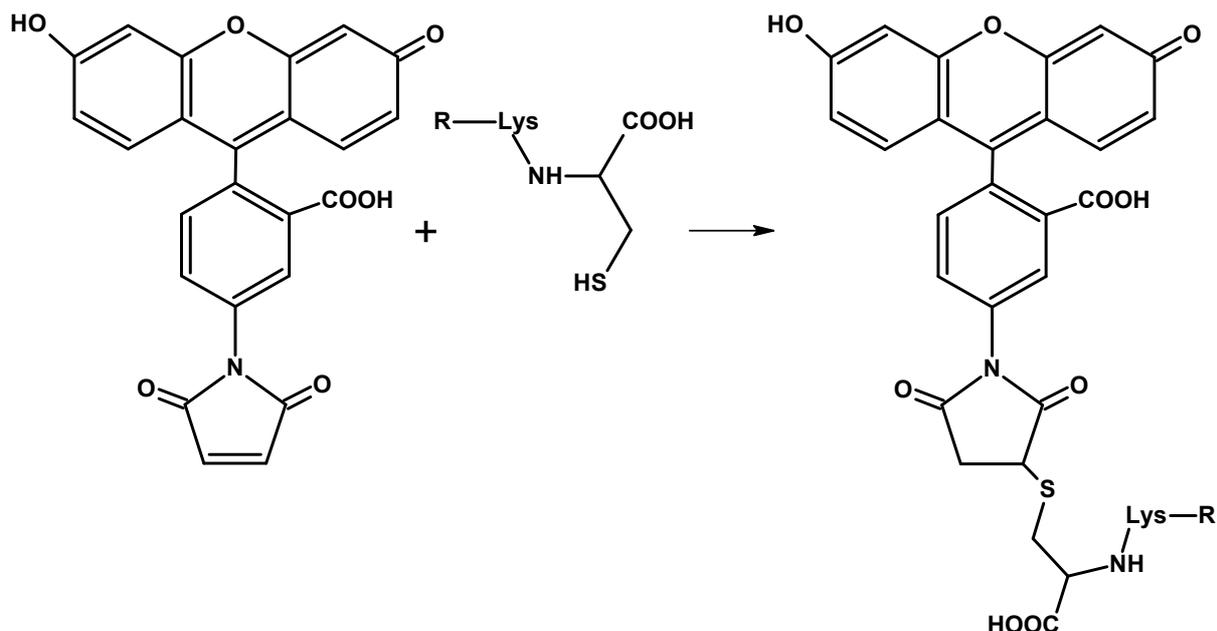


Abb. 3.3 Markierungsreaktion mit F5M: F5M reagiert mit der Thiofunktion des C-terminalen Cysteins des Peptids in Form einer Additionsreaktion unter Ausbildung einer Thioetherbrücke zum fluoreszierenden Produkt (pTpY-F5M).

F5M ist ein Derivat des Fluoresceins, welches ebenfalls durch Reaktion mit der Thiofunktion des endständigen Cysteins eine Bindung mit dem Peptid eingeht. Die Bindungsknüpfung erfolgt über eine Additionsreaktion an die Doppelbindung des Maleimids (Abb. 3.3).

Für die Markierung wurde pTpY SL oder lyophilisiertes pTpY so in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1x PBS-Puffer pH 7,1 verdünnt bzw. gelöst, dass bei der Reaktion nach Zugabe eines 15- bis 20fachen molaren Überschusses des F5M die pTpY Konzentration ca. 100 μM betrug⁷⁶. Die Herstellung der F5M-Lösung erfolgte erst unmittelbar vor Gebrauch durch Lösen der Substanz in DMSO zu einer 15 – 20 mM Lösung. Diese Lösung sowie der Markierungsansatz während einer zweistündigen Inkubation bei RT wurden vor Licht geschützt. Ein Abstoppen der Reaktion erfolgte nicht, so dass der Ansatz entweder unmittelbar der Reinigung unterzogen oder bis zur weiteren Aufarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde.

Eine bessere Umsetzung konnte durch Verwendung von Phosphatpuffer anstatt Tris-Puffer erreicht werden. Für die selektive Markierung von Thiofunktionen war auch hier die Einhaltung eines pH-Bereiches von pH 6,5 bis 7,5 wichtig. Bei einem pH-Wert von 7,0 ist die Maleimidgruppe gegenüber freien Thiofunktionen ca. 1000fach reaktiver als gegenüber Aminen⁷⁷. Bei pH-Werten $> 7,5$ steigen sowohl die Reaktivität gegenüber primären Aminen als auch die Hydrolyse neigung des Maleimids⁷⁸. Die Verwendung von reduktiv wirkenden Reagenzien, wie z.B. Dithiothreitol (DTT) oder Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), zur Bildung von freien Thiofunktionen, führte hier zu keiner verbesserten Umsetzung. Der Verzicht hatte den Vorteil, dass kein zusätzlicher Reinigungsschritt zur Entfernung des überschüssigen DTTs benötigt wurde.

Im Anschluss an die Markierung war auch hier eine Aufreinigung mittels HPLC zur Gewinnung des reinen F5M-markierten pTpY notwendig. Störende Verbindungen konnten dabei analog 3.5.4.1 entfernt werden.

3.5.5 Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten Peptide über HPLC

3.5.5.1 Aufreinigung der ABD-markierten Peptide

Nach der Markierungsreaktion wurde der zur Stabilisierung mit 1 M HCl angesäuerte Ansatz entweder direkt der Aufreinigung über HPLC zugeführt oder gegebenenfalls bis zur Aufreinigung bei -20 °C tiefgefroren. Eine Kühlung des Markierungsansatzes erfolgte während der gesamten Aufreinigung im Autosampler bei 4 °C. Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Geräte- und Methodeneinstellungen.

Tabelle 3.3 Übersicht über die HPLC Methode zur Aufreinigung eines Markierungsansatzes

HPLC Gerät	1200 Series (Agilent Technologies)	
UV-Detektor	214, 280 und 385 nm	
Säule	Jupiter C18 250 x 4,6 mm, beheizt auf 25 °C	
Laufmittel	A: 0,1 % TFA in mQ-Wasser B: 0,1 % TFA in 20 % mQ-Wasser 80 % ACN	
Laufzeit	62 min	
Gradient	Zeit [min]	[%] B
	0	5
	40	39
	41	95
	48	95
	49	5
62	5	
Fluss	1 ml/min	

Die Detektion erfolgte bei 214 nm, 280 nm und zusätzlich bei 385 nm, da das ans Peptid gebundene ABD-F eine Absorption bei 385 nm aufweist. Dennoch konnte diese Wellenlänge nicht der alleinigen Detektion dienen, da die Signalintensität im Gegensatz zu den Signalen bei 214 und 280 nm sehr gering war.

Parallel zum Markierungsansatz wurden ABD-F Lösung und unbehandelte Peptidlösung ebenfalls flüssigchromatographisch untersucht, um Aufschluss über die Retentionszeiten dieser Substanzen zu erhalten und eine Zuordnung der Signale zu ermöglichen. Außerdem diente eine massenspektrometrische Analyse einzelner Peakfraktionen der eindeutigen Identifizierung des markierten Peptids (siehe 3.5.6). Nachdem eine eindeutige Zuordnung der Signale erfolgt war, konnte die entsprechende Fraktion, die das markierte Peptid enthielt, gesammelt werden. Die Aufreinigung eines Ansatzes erfolgte in mehreren, aufeinander folgenden Läufen. Die Fraktionen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gesammelt und anschließend vereint. Im Anschluss erfolgte das Abziehen des ACN

an einer SpeedVac für ca. 40 min bei 30 °C, so dass pro Eppendorfgefäß 100 bis 200 µl gereinigte Peptid-ABD Lösung übrig blieben. Diese eingeeengten Lösungen wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und der Gefriertrocknung über Nacht an der Anlage Alpha 2-4 (Fa. Christ) zugeführt. Bis zur Wiederaufnahme der Lyophilisate in mQ-Wasser wurden diese bei -20 °C vor Licht geschützt, aufbewahrt.

3.5.5.2 Aufreinigung des F5M-markierten pTpY

Die Kühlung des Markierungsansatzes erfolgte während der gesamten Aufreinigung im Autosampler bei 4 °C. Die HPLC Methode zur Aufreinigung des Markierungsansatzes mit F5M gleicht der in Tabelle 3.3 aufgeführten Methode mit folgenden Unterschieden: einer Laufzeit von 69 min, eine zusätzliche Detektorwellenlänge von 485 nm (anstatt 385 nm) und einem veränderten Gradienten. Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über die gegenüber 3.5.5.1 abweichenden Methodenparameter.

Tabelle 3.4 Übersicht der Änderungen der HPLC Methode zur Aufreinigung von pTpY-F5M

UV-Detektor	214, 280 und 485 nm	
Laufzeit	69 min	
Gradient	Zeit [min]	[%] B
	0	20
	50	39
	51	95
	58	95
	59	5
	69	5

Die Detektion erfolgte zusätzlich bei 485 nm, da das F5M-markierte pTpY bei dieser Wellenlänge eine zusätzliche Absorption aufweist. Auch hier war jedoch die Signalintensität bei 485 nm zu gering, als dass sie für die selektive Detektion hätte genutzt werden können.

Parallel zum Markierungsansatz wurden F5M-Lösung und die Lösung von pTpY ebenfalls flüssigchromatographisch untersucht. Die Zuordnung der Signale erfolgte auch hier über die unterschiedlichen Retentionszeiten und massenspektrometrische Analysen. Die Gewinnung und Lagerung der entsprechenden pTpY-F5M Lyophilisate erfolgte analog 3.5.5.1.

3.5.6 Massenspektrometrische Qualifizierung der markierten Peptide

Zur Identitätskontrolle wurden die markierten Peptide TY-ABD, TpY-ABD, pTY-ABD, pTpY-ABD und pTpY-F5M mit einem LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer untersucht. Die Aufgabe erfolgte *off line* mittels nano-ESI. Für die Bestimmung wurden die bei der Aufreinigung an der HPLC gewonnenen Fraktionen direkt oder gegebenenfalls nach Verdünnen mit Wasser eingesetzt.

3.5.7 Quantifizierung der ABD-markierten Peptide

Die nach der Markierung und Aufreinigung erhaltenen Peptid-ABD Lyophilisate wurden in einem geringen Volumen mQ-Wasser (bis zu 100 µl) gelöst. Dies geschah für die Peptid-ABD SL bewusst in mQ-Wasser und nicht in Puffer, um eine bessere Lagerstabilität der Lösung zu gewährleisten.

Ein Teil der hergestellten Lösungen wurde für eine Quantifizierung zurückgestellt, der andere Teil der Peptid-ABD Lösungen aliquotiert und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Für die geplanten Umsatzversuche mit Enzym war es erforderlich, die Konzentration der hergestellten Peptid-ABD Lösungen zu bestimmen. Hierbei wurde das bereits unter 3.5.3.2 beschriebene Verfahren der Säurehydrolyse in die Aminosäuren mit anschließender Quantifizierung des Tyrosins über HPLC angewandt. Die Quantifizierung von F5M-markiertem pTpY erfolgte mit dem unter Punkt 3.5.9 beschriebenen Verfahren.

Für die Säurehydrolyse wurden 5 µl Peptid-ABD SL mit 95 µl 6 M HCl in einem 1,5 µl Eppendorfgefäß versetzt und für 20 h bei 750 U/min und 99 °C im Thermomixer inkubiert. Parallel dazu wurde ein Blindwert angesetzt, der anstatt Peptidlösung 5 µl mQ-Wasser enthielt.

Nach der Säurehydrolyse konnten die Hydrolysate direkt auf die HPLC aufgegeben werden. Die hierfür verwendeten Geräte- und Methodeneinstellungen sind identisch mit den in Tabelle 3.2 unter 3.5.3.2 aufgeführten Parametern. Eine Kühlung der Proben- und Standardlösungen während der gesamten Untersuchung erfolgte im Autosampler bei 4 °C.

Durch Vergleich der Chromatogramme des Probenhydrolysats mit nicht hydrolysiertes Peptid-ABD Lösung konnte der Ansatz auf Vollständigkeit der Hydrolyse überprüft werden.

Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Standardmethode mit Tyrosin als externen Standard. Dazu wurde eine SL von Tyrosin in 5 M HCl in einer Konzentration von 1,0 mg/ml angefertigt und aus dieser sieben Verdünnungen mit den Konzentrationen 25, 30, 35, 40, 50, 60 und 66 µg/ml hergestellt. Über die Messung der Absorption der Tyrosinstandards bei 280 nm und die Ermittlung der Peakflächen wurde eine Kalibriergerade erstellt.

3.5.8 Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Das mit dem Fluoreszenzmarker ABD-F gekoppelte TY, stellvertretend für die drei anderen ABD-markierten Peptide, und das mit F5M markierte pTpY sollten nun bezüglich ihrer fluoreszierenden Eigenschaften untersucht werden.

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren diente ein Fluoreszenz Spektrophotometer MPF-44 der Firma Perkin-Elmer. Die Messungen erfolgten in einer Küvette aus Quarzglas mit einer Weglänge von 10 mm bei einer Spaltbreite von fünf, einer Verstärkung von eins und einer Geschwindigkeit für den Wellenlängenscan von 60 nm pro Minute.

TY-ABD wurde als 5 µM Lösung einmal in Tris/HCL Puffer pH 7,6 und zum Vergleich in 2 M Essigsäure vermessen. Die Aufnahme des Emissionsspektrums erfolgte bei einer konstanten Wellenlänge für die Anregung bei 389 nm. Das Anregungsspektrum wurde bei konstanter Emission bei einer Wellenlänge von 513 nm aufgenommen.

pTpY-F5M wurde in 1x PBS-Puffer pH 7,1 zu einer theoretischen Konzentration von ca. 60 nM gelöst. Die Aufnahme des Emissionsspektrums erfolgte bei einer konstanten Wellenlänge für die Anregung bei 485 nm. Das Anregungsspektrum wurde bei konstanter Emission bei einer Wellenlänge von 520 nm aufgenommen.

3.5.9 Quantifizierung von pTpY-F5M

Das nach der Markierung und Aufreinigung erhaltene Peptid-F5M Lyophilisat wurde in einem geringen Volumen mQ-Wasser (bis zu 100 μ l) gelöst, aliquotiert und lichtgeschützt bei -20 °C tiefgefroren (pTpY-F5M SL). Ein definiertes Volumen dieser Lösung diente der Quantifizierung mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie.

Die Messungen wurden am Spektrophotometer MPF-44 mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt. Die Kalibrier- und Probenlösungen wurden in einer Quarzküvette (Weglänge von 10 mm) bei einer Spaltbreite von 5 nm, einer Verstärkung von 0,3 und einer Anregungswellenlänge von 485 nm vermessen. Für jede Lösung erfolgte die Aufnahme eines Emissionsspektrums bis zu einer Wellenlänge von ca. 590 nm.

Zur Herstellung der Probenlösung wurden die pTpY SL so mit 1x PBS-Puffer pH 7,1 verdünnt, dass sie eine theoretische Konzentration von 50 – 100 nM annahmen.

Die theoretische Konzentration wurde folgendermaßen ermittelt: Aus dem Volumen des Markierungsansatzes und der in diesem Ansatz eingestellten Konzentration von pTpY (100 μ M) ließ sich, 100 % Umsatz und 100 % Ausbeute bei der Reinigung vorausgesetzt, die theoretisch gewonnene Stoffmenge von pTpY-F5M berechnen. Unter Einbeziehung des zum Lösen des Lyophilisats verwendeten Volumens mQ-Wasser konnte anschließend die theoretische Konzentration der pTpY-F5M SL errechnet werden. Da nicht von einer 100 %igen Ausbeute ausgegangen werden kann, wurde die theoretische Konzentration mit einem Faktor von 0,5 bis 0,8 (eine Ausbeute von 50 - 80 % repräsentierend) korrigiert.

Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Standardmethode mit Fluorescein-5-maleimid als externen Standard. Dazu wurde eine 10 mM SL von F5M in DMSO hergestellt. Die Herstellung der weiteren Verdünnungen, wie einer 100 μ M Verdünnungslösung 1 und einer 10 μ M Verdünnungslösung 2 erfolgte in 1x PBS-Puffer. Verdünnungslösung 2 diente anschließend der Herstellung von sieben Kalibrierlösungen mit den F5M-Konzentrationen 10, 20, 40, 70, 100, 130 und 150 nM.

Aus den Emissionsspektren wurde anschließend die maximale Fluoreszenzintensität der Probe sowie der Kalibrierlösungen ermittelt und mit Hilfe dieser eine Kalibriergerade erstellt, die schließlich der Konzentrationsbestimmung der Probe diente.

3.6 Entwicklung von Testsystemen zur Aktivitätsbestimmung der Myt1

3.6.1 Fluoreszenzpolarisations Assay

3.6.1.1 Allgemeines und Plattenreader BMG NOVOstar

Die Messungen wurden im Mikroplattenreader NOVOstar der Firma BMG durchgeführt. Als Lichtquelle benutzt dieses Gerät eine High-Energy-Xenon-Lampe. Bei dem Detektor handelt es sich um einen Photomultiplier. Die zu messenden Wellenlängen werden über austauschbare Filter gewählt. Die Lichtleitung zwischen der Lichtquelle, der Probe und dem Photomultiplier findet über Glasfaserkabel statt.

Folgende Besonderheiten sind bei Messungen der Fluoreszenzpolarisation mit diesem Gerät zu beachten: Der Plattenreader ist nur in der Lage, einen Maximalwert von 65000 RFU (relative Fluoreszenzeinheiten) anzuzeigen. Um dieses maximale Signalfenster jeweils voll auszuschöpfen und

einen größtmöglichen Signal-Hintergrund-Abstand zu erhalten, werden die RFU durch ein so genanntes „Gain Adjustment“ auf die maximale Fluoreszenzintensität feinjustiert. Darüber hinaus ist im Fluoreszenzpolarisationsmodus Weiteres zu beachten. Wie in Abschnitt 2.6 ausgeführt, erfolgt die Messung des Emissionssignals in der zur Einstrahlungsebene parallelen und um 90° versetzten Ebene. Es ist daher notwendig, über einen so genannten „K-Faktor“ die Fluoreszenzintensität der beiden Ebenen feinjustieren. Das *Gain Adjustment* und die Ermittlung des K-Faktors, der die Fluoreszenzintensität der zweiten Ebene anpasst, erfolgten hier über die freie Sonde (Peptid-ABD oder pTpY-F5M). Dazu war die Eingabe des theoretischen Polarisationswertes der benutzten Sonde in mP notwendig, da das Gerät den K-Faktor bzw. die Verstärkung der zweiten Ebene so wählt, dass der resultierende Polarisationswert dem eingegebenen Wert für die freie Sonde entspricht. Bei jeder Messung wurde ein Well für das *Gain Adjustment* und die Einstellung des K-Faktors mitgeführt.

Die Assayentwicklung erfolgte anfangs auf Basis der ABD-markierten Peptide (Assayvariante 1). Auf Grund der geringen Sensitivität dieser wurde alternativ dazu eine zweite Variante getestet, deren Basis F5M-markiertes pTpY bildete.

Die Berechnung der resultierenden Polarisierungen aus den Rohdaten erfolgte nicht über die geräteinterne *Software* des BMG NOVOstar sondern über eine Excel Auswertemaske, da auf diese Weise mit Hilfe des über das *Gain Adjustment* ermittelten K-Faktors alle Werte einer Messung normiert werden konnten. Folgende Formel diente darin zur Berechnung der FP, wobei, wenn nicht abweichend aufgeführt, jeder Wert für die Fluoreszenzintensität durch den für die Ebene jeweiligen Blindwert korrigiert wurde:

$$\text{Polarisation [mP]} = \frac{\text{Intensität}_{\text{vertikal}} - k * \text{Intensität}_{\text{horizontal}}}{\text{Intensität}_{\text{vertikal}} + k * \text{Intensität}_{\text{horizontal}}} * 1000$$

Formel 3.1 Berechnung der Polarisation unter Einbezug des K-Faktors

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPadPrism.

Parameter der Assayvariante 1

Grundlagen dieses Assays bildeten die ABD-markierten Peptide. Die Messungen am BMG NOVOstar erfolgten mit Exzitationsfiltern der Wellenlängen $\lambda_{\text{Ex}} = 380 \text{ nm}$ (+/- 10 nm) und einem Emissionsfilterpaar der Wellenlänge $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$. Das *Gain Adjustment* und die Einstellung des K-Faktors wurde auf einem Well mit 1 μM TY-ABD Lösung durchgeführt und bei jeder Messung wiederholt. Für die freie Sonde TY-ABD wurde hierbei ein Polarisationswert von 50 mP angenommen. Für die Versuche wurden zunächst einfache schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma Greiner BioOne (Katalognummer 655101) und später schwarze *half-area* 96-Well-Mikrotiterplatten (Greiner BioOne, Katalognummer: 675076) mit EASYseal Klebefolien (Greiner BioOne, Katalognummer: 676001) zum Verdunstungsschutz während der Inkubation verwendet. Bei allen Messungen wurde Puffer für den Hintergrundabgleich mitgeführt. Das Volumen pro Well betrug 280 μl (Platte 655101) bzw. 160 μl (*half-area* Platte 675076). Als Antikörper (AK) wurde ein Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ Antikörper (Produktnummer: 9111) der Firma Cell Signaling Technology verwendet. Die Konzentration des AK betrug laut Datenblatt 6,4 $\mu\text{g/ml}$. Die Verdünnung des AK erfolgte in Kinasepuffer zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ und dann weiter entsprechend zu einer Konzentration von 0,05 bis 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Um ein Anhaften des AK an Wänden der Reaktionsgefäße oder der 96-Well-Platte zu vermeiden, wurde gemäß der Empfehlung im Datenblatt des Antikörpers 5 % (m/V) BSA enthaltender Puffer zur Verdünnung des AK verwendet. Um einen einheitlichen, gleichmäßigen Meniskus im Well zu erzielen, wurde zusätzlich dem Puffer Tween 20 in einer Endkonzentration von 0,05 % (V/V) zugesetzt.

Parameter der Assayvariante 2

Die Assayvariante 2 basierte auf der Verwendung von pTpY-F5M als fluoreszierende Sonde. Die Messungen am BMG NOVOstar wurden mit Exzitationsfiltern der Wellenlängen $\lambda_{\text{Ex}} = 480 \text{ nm}$ (+/-10 nm) und einem Emissionsfilterpaar der Wellenlänge $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$ durchgeführt. Für die Einstellung des geräte- und methodenbedingten K-Faktors wurde zunächst eine 500 bis 150 nM Lösung von pTpY-F5M verwendet. Für die freie Sonde wurde ein Polarisationswert von 35 mP vorgegeben. Durch Verwendung von oberflächenbeschichteten Platten (96-Well *half-area non-binding* Platten, Firma Corning, Katalognummer: 3686) in Kombination mit beschichteten Eppendorfgefäßen, konnte bei diesem Assay auf BSA und Tween 20 im Puffer zur Verdünnung des AK verzichtet werden. Auch hier wurden während der Inkubation EASYseal Klebefolien zum Verdunstungsschutz eingesetzt. Das Assayvolumen betrug 100 μl . Wie in der Assayvariante 1 wurde auch hier der Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ Antikörper verwendet, welcher eine Endkonzentration im Well von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ aufwies.

3.6.1.2 Nachweis der Spezifität des Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ Antikörpers - ELISA

Zum Nachweis der Spezifität über einen ELISA wurden viermal je 50 μl der Peptidlösungen in 1x PBS-Puffer (TY, pTY, TpY, pTpY) in Konzentrationen von 20, 10 und 1 μM in eine ELISA Platte mit klarem Boden pipettiert und diese über Nacht stehen gelassen. Zusätzlich erfolgte für viermal 50 μl des 1x PBS-Puffers und viermal 50 μl der 20 μM Peptidlösungen als Negativkontrolle ebenfalls eine Inkubation über Nacht in der Platte (Aufbau siehe Abb. 3.4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	A20	A10	A1	B20	B10	B1	C20	C10	C1		
B	P	A20	A10	A1	B20	B10	B1	C20	C10	C1		
C	P	A20	A10	A1	B20	B10	B1	C20	C10	C1		
D	P	A20	A10	A1	B20	B10	B1	C20	C10	C1		
E								D20	D10	D1		
F	A20	B20	C20	D20				D20	D10	D1		
G								D20	D10	D1		
H								D20	D10	D1		

Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Plattenbelegung des ELISA: Die Inkubation erfolgte über Nacht mit P – 1x PBS-Puffer, A – Peptid TY, B – Peptid pTY, C – Peptid TpY, D – Peptid pTpY in einer jeweiligen Konzentration von 20, 10 oder 1 μM . Gelb unterlegte Felder stellen die Negativkontrolle, blau unterlegte Felder den Blindwert (Blank) dar.

Nach erfolgter Inkubation (AG-Bindung, *Coating*) und je zweimaligem Waschen mit 1x PBS-T-Puffer und 1x PBS-Puffer (Waschschritt) wurden je Well 100 μl Blocking-Puffer pipettiert, welches dem Abfangen unspezifischer Wechselwirkungen diente. Nach erneutem Waschen erfolgte eine 90minütige Inkubation von 40 μl der zu testenden AK-Lösung (Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK) in einer Konzentration von 0,07 $\mu\text{g/ml}$. Dieser Inkubationsschritt erfolgte bei allen Proben, den Blindwerten, jedoch nicht bei der Negativkontrolle und war von einem dritten Waschschritt gefolgt. Die Bindung des zweiten AK erfolgte durch eine 90minütige Inkubation von je 50 μl pro Well eines monoklonalen anti-*rabbit* IgG-POD Antikörpers in 40.000facher Verdünnung in *Low-Cross*-Puffer. Nach einem vierten Waschschritt erfolgte die Zugabe von je 50 μl ABTS-Lösung und damit der Nachweis der gebundenen

AK mittels Farbreaktion. Die Farbentwicklung erfolgte 60 min und wurde durch Zupipettieren von je 25 μl eines Gemisches aus DMF und 40 % SDS-Lösung in Wasser (1:1) gestoppt.

Die photometrische Auswertung erfolgte am FLUOstar Plattenreader (Fa. BMG) durch die Bestimmung der Absorption bei 405 nm.

3.6.1.3 Auswahl der Sonde und Sensitivitätstest

Sensitivitätstest mit TY-ABD

Der Sensitivitätstest einer Sonde dient der Bestimmung der Konzentration ab der das Polarisationsignal einer freien Sonde unabhängig von der eingesetzten Konzentration ist. Stellvertretend für alle übrigen ABD-markierten Peptide wurde für diesen Test TY-ABD ausgewählt. Die Messung erfolgte mit einem Volumen pro Well von 250 μl in schwarzen 96-Well-Platten (Greiner). Jede Konzentrationsstufe wurde doppelt angesetzt und zweimal vermessen. Folgende Konzentrationen wurden in Kinasepuffer aus einer TY-ABD SL hergestellt: 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 μM . Das *Gain Adjustment* mit einem „*required value*“ von 95 % und einem Ziel – Polarisationswert von 50 mP wurde auf dem Well mit der höchsten Fluoreszenz, das heißt auf einem Well mit 40 μM TY-ABD durchgeführt. Die Messungen am NOVOstar erfolgten mit Exzitationsfiltern der Wellenlängen $\lambda_{\text{Ex}} = 380 \text{ nm}$ (+/- 10 nm) und einem Emissionsfilterpaar der Wellenlänge $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$.

Sensitivitätstest mit pTpY-F5M

Erst nachdem festgestellt werden musste, dass die Sensitivität von ABD-markierten Peptiden für den FP Assay nicht ausreichte, wurde Fluorescein-5-maleimid als Markierungsreagenz erneut in Betracht gezogen.

Der Sensitivitätstest für eine Fluorescein-gekoppelte Sonde wurde mit pTpY-F5M durchgeführt. Anders als bei der Assayvariante 1, wurde für die Variante 2 nur fluoreszierendes pTpY benötigt, da diesem prinzipiell ein kompetitiver Charakter zu Grunde liegen sollte.

Das Arbeitsvolumen betrug 150 μl (Reduzierung auf 100 μl möglich) in einer schwarzen, beschichteten *half-area* 96-Well-Platte der Firma Corning. Jede Konzentrationsstufe wurde doppelt angesetzt und dreimal vermessen. Folgende Konzentrationen wurden in Kinasepuffer aus einer pTpY-F5M SL hergestellt: 500, 300, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 1 nM. Das *Gain Adjustment* mit einem *Required Value* von 95 % und einem Zielpolarisationswert von 35 mP wurde auf dem Well mit der höchsten Fluoreszenz, das heißt auf einem Well mit 500 nM pTpY-F5M durchgeführt. Die Messung erfolgte mit dem BMG NOVOstar mit Exzitationsfiltern der Wellenlängen $\lambda_{\text{Ex}} = 480 \text{ nm}$ (+/-10 nm) und einem Emissionsfilterpaar der Wellenlänge $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$.

3.6.1.4 Bestimmung der optimalen AK Konzentration

In diesem Experiment wurde eine gleichbleibende Konzentration der Sonde mit steigenden Konzentrationen des Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK versetzt und anschließend die FP bestimmt. Dazu wurde eine 5 nM pTpY-F5M Lösung in Kinasepuffer mit der 6,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AK SL so versetzt, dass sich folgende AK Konzentrationen ergaben: 0,01, 0,03, 0,05, 0,07, 0,10, 0,15, 0,20 und 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Lösungen wurden zu je 150 μl in Wells einer beschichteten *half-area* 96-Well-Platte (Corning) pipettiert. Zum Vergleich wurden zu den acht Wells mit AK weitere acht Wells mit 5 nM pTpY-F5M Lösung in Kinasepuffer versehen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30 °C erfolgte die Messung der Proben. Das *Gain Adjustment*, die Messung und die Auswertung erfolgten wie unter 3.6.1.3.

Der **Umsatz** stellt ein mittleres Signal dar, hier erfolgt der maximale (100 %) Umsatz des Substrats. Die **Negativkontrolle** (NK) bildet das Maximalsignal, hier findet auf Grund der Abwesenheit des Enzyms kein Umsatz statt, die FP bleibt unberührt und wird allein durch pTpY-F5M und den AK bestimmt. Das **Minimalsignal** wird durch einen Ansatz gebildet, der zwar Sonde, jedoch keinen AK enthält und somit die FP der freien Sonde repräsentiert. Die **Positivkontrolle** (PK) enthält alle Komponenten der Umsatzprobe und zusätzlich TpY, welches bei Inaktivität des Enzyms trotzdem zu einer Absenkung der FP führt. Der **Blank** symbolisiert den Reagenzien-Blindwert. Die Fluoreszenzintensitäten des Blanks wurden in der Regel bei der Berechnung der FP von den Fluoreszenzintensitäten der übrigen Proben subtrahiert. Der **Umsatz Inhibitor** gleicht einem normalen Umsatz mit dem Unterschied, dass nicht DMSO sondern Inhibitor zugesetzt wird. Die **modifizierte Negativkontrolle** (NK mod) enthält Enzym, jedoch kein ATP. Bei Verwendung von ATP-freien Enzymextrakten erfolgt hier, wie bei der normalen NK, kein Umsatz. Sowohl NK mod als auch das Minimalsignal wurden nicht standardmäßig bei jeder Messreihe mitgeführt.

Bei den Umsatzversuchen wurden die in Tabelle 3.5 aufgeführten Ansätze (ausgenommen Umsatz Inhibitor) so angefertigt, dass eine dreifache Bestimmung durchgeführt werden konnte.

Für die Versuche wurden ausschließlich schwarze, beschichtete *half-area* 96-Well-Mikrotiterplatten (Corning) mit EASYseal Klebefolien zum Verdunstungsschutz während der Inkubation verwendet. Alle Verdünnungen wurden in Eppendorfgefäßen angefertigt und für zehn Sekunden im Vortexer homogenisiert. Bei allen Ansätzen wurde zur Vergleichbarkeit mit späteren Inhibitorentests ein DMSO Gehalt von 1 % eingestellt. Für die Einstellung des geräte- und methodenbedingten K-Faktors und zur Durchführung des *Gain Adjustments* wurde eine 150 nM Lösung der freien Fluoreszenzsonde (pTpY-F5M) verwendet. Zunächst fand eine 90- bis 120minütige Vorinkubation aller Ansätze im Inkubator bei 30 °C und 350 rpm statt, um die Enzymreaktion ablaufen zu lassen (Inkubationsansatz 1). Anschließend erfolgte die Zugabe von je 25 µl 100 mM EDTA zum Abstoppen der enzymatischen Umsetzung und je 25 µl der Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK-Lösung. Nach einer erneuten Inkubation über 30 min bei 30 °C und 350 rpm (Inkubationsansatz 2) erfolgte die Messung der Proben im Plattenreader. Das Assayvolumen betrug 100 µl pro Well. Um eventuell vorhandene Phosphatasen zu inhibieren wurde in allen Ansätzen eine Molybdatkonzentration von 2 mM eingestellt. Das Pipettierschema ist Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6 Pipettierschema [µl] zu Umsatzexperimenten mittels FP-Assay vor der Durchführung der Optimierung

	Puffer+Mb	TY 100 µM	DMSO 20 %	Enzym	ATP 1 mM		TpY 5 µM	EDTA 100 mM	pTpY-F5M+AK	
Umsatz	32,5	5	2,5	5	5	Inkubation 1,5 bis 2 h bei 30 °C	0	25	25	Inkubation 20 - 30 min bei 30 °C
NK (Max. Signal)	37,5	5	2,5	0	5		0	25	25	
PK	31,5	5	2,5	5	5		1	25	25	
Blank	92,5	0	2,5	0	5		0	0	0	
	Inkubationsansatz 1						Inkubationsansatz 2			

Es wurde von links nach rechts pipettiert. Für eine höhere Richtigkeit und Präzision des Pipettiervorgangs wurden die Pipettier Volumina der ersten vier Lösungen mit der jeweils benötigten Anzahl an

Messpunkten (drei Parallelansätze) zuzüglich eines kleinen Überschusses multipliziert und in Eppendorfgläsern zusammenpipettiert. Die Lagerung der Lösungen erfolgte bis zur Vorlage in die Mikrotiterplatte auf Eis. Da für alle Ansätze die Bestimmung in Triplikaten vorgesehen war, wurden alle in Tabelle 3.6 angegebenen Volumina mit dem Faktor 3,5 multipliziert. Folgende Volumina ergaben sich:

Blank (x 3,5): 323,8 µl Kinasepuffer
 8,8 µl DMSO 20 %
 17,5 µl ATP 1 mM
 → je 100 µl pro Well (3 x)

Umsatz (x 3,5): 113,8 µl Kinasepuffer
 17,5 µl TY 100 µM
 8,8 µl DMSO 20 %
 17,5 µl Enzym Myt1
 → je 45µl pro Well (3 x)

Negativkontrolle (x 3,5): 131,3 µl Kinasepuffer
 17,5 µl TY 100 µl
 8,8 µl DMSO 20 %
 → je 45 µl pro Well (3 x)

Positivkontrolle (x 3,5): 110,3 µl Kinasepuffer
 17,5 µl TY 100 µM
 8,8 µl DMSO 20 %
 17,5 µl Enzym Myt1
 → je 44 µl pro Well (3 x)

Die jeweils angegebenen Volumina pro Well wurden in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von je 5 µl ATP-Lösung (1 mM) bei den Ansätzen Umsatz, Negativ- und Positivkontrolle gestartet. Bei der Enzymreaktion lag eine Peptidkonzentration von 10 µM und eine ATP Konzentration von 100 µM vor. Nach Zugabe von je 25 µl der EDTA- und der AK-Lösung ergab sich somit für das Peptid eine Konzentration von 5 µM. Die Sonde bzw. der AK wiesen eine Konzentration von 5 nM und 0,1 µg/ml auf. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich TpY in einer Konzentration von 50 nM (siehe Pipettierschema), konnte aber bei Bedarf beliebig, jedoch meist zwischen 25 und 100 nM, angepasst werden. Tabelle 3.7 zeigt abschließend die sich ergebenden Endkonzentrationen bezogen auf die Enzymreaktion und auf das Gesamtvolumen (Assaykonzentration).

Tabelle 3.7 Endkonzentrationen im FP Assay, bezogen auf Enzymreaktion (50 μ l) und Gesamtvolumen (entspricht Assaykonzentration, 100 μ l) vor der Optimierung

	Mb [mM]	TY [μ M]	DMSO [%]	Enzym [%]	ATP [μ M]	EDTA [mM]	pTpY-F5M [nM]	AK [μ g/ml]
Konz. Enzymreaktion	2	10	1	10	100	-	-	-
Konz. Gesamtvolumen	2	5	0,5	5	50	25	5	0,1

Der Zusatz von EDTA, zum Abstoppen der Enzymreaktion im Inkubationsansatz 1, erfolgte nicht von Anfang an. Im Rahmen der ersten Umsatzexperimente wurde zunächst im zweiten Schritt ausschließlich Sonde-AK-Lösung zugegeben und auf das Abstoppen der Reaktion verzichtet. Bei Ansätzen dieser Art konnten jedoch keine Umsätze festgestellt werden, so dass verschiedene Techniken zum Abstoppen der Enzymreaktion erwogen und getestet wurden. Folgende Methoden kamen in Betracht: Abstoppen durch EDTA Zugabe, Abstoppen durch Denaturierung des Enzyms in Form von Erhitzen im Thermoblock bei 60 °C für 30 min oder Behandlung in der Mikrowelle für 0,5 min. Dass eine solche thermische Behandlung zur Inaktivierung des Enzyms führen würde, wurde vor Durchführung der FP Experimente mittels CE Vorversuchen nachgewiesen. Der erste Inkubationsschritt erfolgte nicht wie sonst üblich direkt in der Platte, sondern im Eppendorfgefäß. Erst nach der jeweiligen Behandlung mit EDTA, Thermoblock oder Mikrowelle wurde in die Wells aliquotiert und die Sonde-AK-Lösung zupipettiert. Nach einer weiteren Inkubation auf einem Schüttler erfolgte nach 30 min die FP Messung. Diese Ansätze wurden mit konventionell hergestellten PK, NK und U TY, bei denen gar keine Methode zum Abstoppen der Reaktion angewandt wurde, verglichen.

3.6.1.7 Optimierung der FP Methode und Bestimmung des Signalfensters

Zur Verbesserung des Assays erfolgten Experimente zur Kalibrierung des Messsystems (*Gain Adjustment*) und anschließend, unter den neuen Bedingungen für das *Gain Adjustment* (GA), eine erneute Bestimmung der optimalen AK Konzentration.

In dem ersten Experiment erfolgte der Vergleich unterschiedlicher Vorgehensweisen zur Durchführung des GA. Zum einen erfolgte dieses wie bisher mit der Sonde pTpY-F5M, jedoch nicht in der ursprünglichen Konzentration von 500 oder 150 nM, sondern mit niedrigeren Konzentrationen von 5, 10, 20 und 50 nM (jeweils in Kinasepuffer). Zum anderen wurde das GA mit 5, 10, 20 und 50 nM Fluoresceinlösung (jeweils in Kinasepuffer) durchgeführt. Für die Messungen wurden ein *Required Value* von einheitlich 70 % und ein Zielpolarisationswert für die Kalibranten von je 35 mP festgelegt. Vermessen wurden je zwei Ansätze der Negativkontrolle (Maximalsignal) und des Minimalsignals. Diese wiesen eine unterschiedliche Sondenkonzentration von 1, 2, 3,5 oder 5 nM pTpY-F5M auf, so dass sich je acht Ansätze für das Minimal- und Maximalsignal ergaben. In ihrer Zusammensetzung glichen sie, bis auf die variierende Sondenkonzentration und einem Zusatz von Glycerol zum Minimalsignal, den Angaben in Abschnitt 3.6.1.6. Das Zusammenpipettieren von Kinasepuffer, Glycerol 86 % (nur bei Minimalsignal), TY 100 μ M, DMSO 20 %, ATP 1 mM, EDTA 100 mM, Sonde 100 μ M und AK 1 μ g/ml (nur bei Maximalsignal) in dieser Reihenfolge erfolgte direkt in die Platte.

Daneben wurden sechs Wells mit dem Reagenzienblindwert (Blankzusammensetzung siehe 3.6.1.6) und weitere acht Wells mit den unterschiedlichen Lösungen für das GA (Fluorescein und pTpY-F5M in einer Konzentration von 5, 10, 20 und 50 nM je Well) befüllt. Das Arbeitsvolumen pro Well betrug 100 μ l. Die Messungen erfolgten nach gründlichem Durchmischen der Ansätze durch Auf- und Abpipettieren und 20minütiger Inkubation auf dem Schüttler bei 30 °C und Stufe 6. Auf Grund der verschiedenen Lösungen für das GA ergaben sich insgesamt acht Messungen.

Für das zweite Experiment, in dem noch einmal die Auswirkung auf das Polarisationsignal des Maximalsignals (NK) durch steigende AK Konzentrationen untersucht werden sollte, wurden die im vorausgehenden Experiment ermittelten optimalen Bedingungen für das GA gewählt. Aus diesem Grund erfolgte hier das GA auf einem Well mit 50 nM Fluorescein. Angefertigt wurden vier Ansätze des Maximalsignals mit 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 und 0,4 μ g/ml AK. Parallel dazu wurden Lösungen für das Minimalsignal angefertigt, die keinen AK, jedoch zum jeweiligen Ansatz für das Maximalsignal gleiche Mengen Glycerol enthielten. Auf diese Weise ergaben sich Glycerol Konzentrationen von 0,39 % (entsprechend der Glycerolmenge der NK mit 0,05 μ g/ml AK) bis 3,13 % (entsprechend der Glycerolmenge der NK mit 0,4 μ g/ml). Je Ansatz und Konzentrationsstufe wurden vier Wells der Platte befüllt, das Arbeitsvolumen betrug auch hier 100 μ l. Das Zusammenfügen der Lösungen und Verdünnungen erfolgte wie beim vorhergehenden Experiment direkt in der Platte. Auch hier wurde die Messung am NOVostar nach einer 20minütigen Inkubation auf dem Schüttler bei 30 °C und Stufe 6 vorgenommen. Nach Durchführung der Optimierung ergab sich für alle oben genannten Ansätze folgendes Pipettierschema:

Tabelle 3.8 Pipettierschema für die Standardansätze im FP Assay nach Optimierung des Messsystems. Alle Angaben erfolgen in μ l. Das Gesamtvolumen je Well beträgt 100 μ l. Angabe der sich ergebenden Konzentrationen während der Enzymreaktion und nach Abstoppen der Reaktion und Zugabe der Sonde-AK-Lösung als Konzentration im Gesamtvolumen.

	Puffer+Mb	TY 10 μ M	DMSO 20%	Inhibitor 1mM	Enzym	ATP 1 mM		TpY 5 μ M	EDTA 100 mM	pTpY-F5M+AK
							Enzymreaktion			
Umsatz	32,5	5	2,5	0	5	5		0	25	25
Umsatz Inhibitor	32,5	5	0	2,5	5	5		0	25	25
Negativkontrolle (NK)	37,5	5	2,5	0	0	5		0	25	25
Positivkontrolle (PK)	31,5	5	2,5	0	5	5		1	25	25
Minimalsignal	37,5	5	2,5	0	0	5		0	25	25*
Blank	92,5	0	2,5	0	0	5		0	0	0
										* - ohne AK
Konz. Enzymreaktion		1 μ M	1%	50 mM	10%	100 μ M				
Konz. Gesamtvolumen		500 nM	0,50%	25 mM	5%	50 μ M	50 nM	25 mM	5 nM / 0,3 μ g/ml	

Tabelle 3.9 fasst außerdem die unter den optimierten Bedingungen festgelegten Geräteparameter des NOVostar abschließend zusammen. Änderungen erfolgten beim *Required Value*, welches von

ursprünglich 95 % auf 80 % reduziert wurde. Es beschreibt, dass das höchste Fluoreszenzsignal (gebildet durch die Fluoresceinlösung, die für das GA genutzt wird) zu 80 % das zur Verfügung stehende Messfenster von 65000 RFU ausnutzt. Die entscheidende Änderung stellt jedoch die Verwendung von Fluorescein anstatt Fluorescein-5-maleimid zur Durchführung des GA dar.

Tabelle 3.9 Zusammenfassung der Geräteparameter nach Optimierung des FP Assays

Parameter	Einstellungen
Anzahl der Zyklen	3
Zyklusdauer	Mindestdauer
Anzahl der Lichtblitze	100
Intervallzeit	1 s
<i>Required Value</i>	80 %
<i>Gain Adjustment</i>	Fluorescein 20 - 50 nM; <i>Target</i> mP: 35
<i>Scan-Modus</i>	<i>Plate-Mode</i>

3.6.2 Kapillarelektrophorese Methode

3.6.2.1 Allgemeines

Die Versuche wurden am Gerät Prince mit einer 60 bis 75 cm langen Kapillare mit einem Durchmesser von 75 μM durchgeführt. Als Detektorsystem wurde ein Fluoreszenz Detektor (Typ Argos 250B FL-Detector der Firma Flux Instruments) mit einem Breitbandfilter von 240 – 400 nm für die Anregung und einem Blockingfilter von 495 nm für die Emission verwendet. Die Länge der Kapillare zum Detektor betrug in der Regel 50 cm. Die Steuerung der Anlage erfolgte von einem PC mit der Software Borwin.

Die endgültige CE Methode wies folgende Parameter auf. Als Laufmittel wurde 2 M Essigsäure mit 0,1 % Hydroxyethylcellulose (HEC) verwendet, da in einigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Einstellung eines sauren pH-Wertes für die Unterscheidung der verschieden phosphorylierten Peptide unerlässlich ist. Weiterhin musste gesichert sein, dass die Peptide freie Aminfunktionen aufweisen, damit bei dem sauren pH-Wert die Ausbildung von positiven Ladungen möglich war und bei Anlegen einer positiven Spannung von 25 kV die Wanderung durch das elektrische Feld erfolgen konnte. Die Verwendung des thiolreaktiven Fluoreszenzmarkers ABD-F garantierte, dass die für die Trennung an der CE nötigen Aminfunktionen frei blieben.

Außerdem erfolgte zwischen den Läufen ein Spüllauf mit 1 M Natronlauge (NaOH). Bei sinkender Sensitivität, auf Grund zu vieler aufeinander folgender Läufe mit proteinhaltigen Proben, musste der sonst übliche einminütige Spüllauf auf etwa fünf Minuten ausgedehnt werden. Bei ungereinigten Enzymextrakten war unter Umständen nach jedem Probenlauf ein einminütiger Spüllauf erforderlich.

Die Gesamtdauer eines Laufes betrug ca. 20 min, wobei die Aufnahme eines Elektropherogrammes ca. 16 min betrug und die restliche Zeit auf das Spülen und Injizieren der Probe entfiel. Der vorzeitige Abbruch eines Laufs war bei der CE jederzeit möglich. Durch Änderung des Laufdrucks konnte die Auflösung beeinflusst werden, welches bei Reduktion des Laufdrucks auf wenige mbar zur Erhöhung der Migrationszeiten und damit verbunden auch zur Verlängerung der Analysenzeit führte.

Tabelle 3.10 Schritte und Parameter der optimierten CE Methode

Methodenschritt	Parameter
1. Spülen mit Natronlauge (ggf.)	1 N NaOH, bei 1000 mbar, 1 min
2. Spülen mit Laufmittel	2 M CH ₃ COOH mit 0,1 % HEC, bei 1000 mbar, 1 min
3. Injektion der Probe	bei 25 – 80 mbar, 0,3 – 0,7 min
4. Lauf und Detektion	2 M CH ₃ COOH mit 0,1 % HEC, bei 10 mbar, 25 kV, 16 min

Die Ermittlung der Retentionszeiten der Peptide erfolgte mit den aufgereinigten, markierten Peptiden als 10 bis 20 µM Lösung in mQ-Wasser zunächst einzeln und anschließend als Mischung. In der Regel war dieser Vorgang arbeitstäglich zu wiederholen. Als Probenaufnahmegefäße wurden 0,3 ml Micro-Inserts aus Glas verwendet. Um eine ausreichende Eintauchtiefe der Kapillare zu gewährleisten, durften nicht weniger als 70 µl Peptidlösung in diesen vorgelegt werden.

Grundsätzlich konnte die Messung mit Polyacrylamid belegten⁷⁹ sowie mit unbelegten Kapillaren erfolgen. Während ein großer Teil der Methodenentwicklung mit einer beschichteten Kapillare erfolgte, wurden die Optimierung und Aktivitätsbestimmungen der Kinase mit unbelegten Kapillaren vorgenommen.

Zur Feststellung, ob sowohl markierte Substrate (TY-ABD, pTY- und TpY-ABD) als auch markierte Produkte (pTY-, TpY- und pTpY-ABD) konzentrationsabhängig zu einer linearen Erhöhung des Fluoreszenzsignals im gewünschten Konzentrationsbereich führten, erfolgte für jedes Peptid einzeln eine Kalibrierung im Bereich von 4 – 20 µM. Für diese Tests wurden aus den jeweiligen Peptid-ABD SL je eine 100 µM Verdünnung in mQ-Wasser hergestellt und diese weiter verdünnt, so dass Lösungen der Konzentrationen 4, 8, 12, 16 und 20 µM entstanden. Für jede Konzentration erfolgte eine Doppelbestimmung mit der in Tabelle 3.10 aufgeführten Methode. Anschließend wurden die Peakflächen ermittelt und gegen die Konzentration in einem Diagramm aufgetragen.

3.6.2.2 Erste Umsatzversuche mit Enzym

Wie bei dem FP Assay erfolgte auch bei der CE Methode bis zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung ohne den Einfluss von Enzym oder anderen Stoffen, die die Enzymreaktion beeinflussen konnten. Für die ersten Umsatzexperimente an der CE wurden Proben hergestellt, die neben dem Substrat (TY-ABD), Cosubstrat (ATP) und einer Enzymfraktion nur Puffer enthielten. Das Ansatzvolumen betrug 100 µl. Es wurden eine Probe mit Enzym, TY-ABD und ATP in Puffer und eine Blindprobe, die kein Enzym enthielt,

angesetzt. Als Puffermedium wurde Kinasepuffer eingesetzt. TY-ABD wies in den Versuchen eine Endkonzentration von 10 μM und ATP eine Endkonzentration von 100 μM auf. Die Herstellung der 100 μM Verdünnung von TY-ABD erfolgte durch Verdünnen einer TY-ABD SL mit Puffer. Die Herstellung der ATP Verdünnung erfolgte aus einer 10 mM ATP SL durch Mischen dieser mit einem zehnfachen Überschuss an Puffer. Die Inkubation der Ansätze wurde bei 30 °C im Thermomixer bei 350 rpm für eine und 15 Stunden durchgeführt. Um auszuschließen, dass es sich bei den Signalen der Probe um Störsignale durch die Myt1 Präparation handelte, wurde zusätzlich bei Bedarf eine zweite, modifizierte Blindprobe angesetzt, die Enzym aber kein ATP enthielt.

Anschließend wurde untersucht, ob durch Erhöhung der ATP Endkonzentration von 100 μM auf 500 μM und durch Erhöhung der Inkubationstemperatur von 30 °C auf 37 °C der Umsatz weiter zu steigern war. Außerdem wurde ein Ansatz hergestellt, der nach einer Inkubationszeit von 1, 3, 4, 6 und 8 h jeweils vermessen wurde. Die Inkubation erfolgte durchgängig während der ersten Stunde im Thermoblock und für die folgende Zeit im auf 30 °C beheizbaren Autosampler der CE Anlage. Um eine erste Untersuchung der DMSO-Verträglichkeit des Messsystems und der Kinase vorzunehmen, wurden Umsatzproben mit 5, 1 und 0,5 % DMSO angefertigt.

Für die hier durchgeführten Experimente inklusive der ersten Umsatzversuche wurde als Enzym eine Proteinfraktion nach Aufarbeitung und Reinigung von Zellen aus einer Expression der Myt1 in *E. coli* HM130 pGeX6P1 hMyt1-His₄ verwendet (siehe Abschnitt 3.7.2).

3.6.2.3 Optimierung der CE Methode

Zur Beeinflussung des Laufverhaltens wurden verschiedene Laufmittelzusätze getestet. Dazu wurden dem zu Beginn der Entwicklung verwendeten Laufmittel 2 M Essigsäure verschiedene Reagenzien zugesetzt. Lösungen von Polyvinylpyrrolidon (PVP), Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTMAB) und Brij 35 (Polyoxyethylenlaurylether) in einer Konzentration von 0,025 und 0,075 % in 2 M Essigsäure wurden hergestellt, filtriert und anstatt der reinen 2 M Essigsäure als Laufmittel eingesetzt. Daneben wurden 1 % Cyclodextran M70 und 0,1 % Hydroxyethylcellulose (HEC) in 2 M Essigsäure getestet. Zum Studium des Laufverhaltens, des Signal-Rausch-Verhältnisses und der Signalstabilität wurden sowohl Läufe mit den Peptidreferenzen als auch mit Umsatzproben bei + 25 kV und 20 mbar durchgeführt. Mit Abschluss der Optimierung wurde folgendes Pipettierschema für die Myt1-Aktivitätsbestimmung genutzt:

Tabelle 3.11 Pipettierschema [μl] zur Aktivitätsbestimmung der Myt1

	Kinasepuffer	DMSO [20 %]	TY-ABD [100 μM]	Myt1 Präparation	ATP [1 mM]
Umsatzprobe	65 (55)	5	10	10 (20)	10
Blindprobe ohne Enzym	75	5	10	-	10
Blindprobe ohne ATP	75 (65)	5	10	10 (20)	-

Nach Vorlegen des Kinasepuffers und der 20 %igen DMSO Lösung wurden Substrat und Myt1 Präparation zupipettiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von ATP gestartet und in der Regel eine Stunde im Thermoblock bei 30 °C inkubiert. In Abhängigkeit der Enzymaktivität wurde die Menge zugegebener Myt1 Präparation variiert. Dies wurde durch einen höheren bzw. niedrigeren Anteil Kinasepuffer ausgeglichen, so dass immer 100 µl Gesamtvolumen pro Ansatz beibehalten wurden. Sollte dieselbe Probe als Verlaufskontrolle der Enzymreaktion mehrmals vermessen werden, wurde sie nach der ersten Injektion im Autosampler der CE belassen und bei 30 °C weiter inkubiert. Im anderen Fall war ein Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von EDTA Lösung zu einer Endkonzentration von 25 mM zu bewerkstelligen.

3.7 Herstellung Myt1

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist weder die humane Myt1 noch ein Homolog der Myt1 käuflich zu erwerben. Mit dem Ziel der Arbeitsgruppe, potentielle Myt1 Kinase-Inhibitoren mittels verschiedener biochemischer Methoden zu testen, war es erforderlich das Enzym selbst herzustellen.

Dazu kooperierte die Arbeitsgruppe Schmidt mit der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Pietzsch (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und mit Dr. Frank Erdmann der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle (Saale). Alle Experimente zur Expression in *E. coli* wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Pietzsch in Zusammenarbeit durchgeführt^a. Dr. Frank Erdmann führte alle Arbeiten zur Expression der Myt1 und Wee1 in Insektenzellen und humanen Zellen durch^b.

3.7.1 Strategien

Die rekombinante Herstellung der Myt1 ist theoretisch auf verschiedenen Wegen möglich. Während dieser Arbeit erfolgten Experimente mit *E. coli* als Expressionsmodell, aber auch mit Insektenzellen und humanen Zellen.

Experimente zur Herstellung der Myt1 über bakterielle Expression erfolgten mit verschiedenen Stämmen, Vektoren und unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Die jeweilige Expression wurde dabei stets von weiteren notwendigen Schritten begleitet: Dem Aufschluss eines Ansatzes folgte stets ein Aufreinigungsschritt, der meist mehrere enzymhaltige Fraktionen hervorbrachte, die schließlich einer Aktivitätsmessung, häufig mit Hilfe der CE Methode, zugeführt werden mussten.

^a Für die Zusammenarbeit und die Möglichkeit alle Experimente zur Expression in *E. coli* im Arbeitskreis von Prof. Dr. Pietzsch durchführen zu dürfen, danke ich recht herzlich. Insbesondere danke ich Dr. Hertel und Karin Büttner für ihre Unterstützung bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen und biotechnischen Techniken und die stete Bereitschaft ihr biochemisches *Know-how* mit einzubringen.

^b Bei Dr. Frank Erdmann bedanke ich mich für die Durchführung der Expressionen in Insektenzellen und humanen Zellen. Außerdem danke ich Dr. Frank Erdmann für das Zur-Verfügung-Stellen der Stämme *E. coli* CAG597 und *E. coli* HM130 mit dem umklonierten Vektor pGEX6P1-hMyt1-His4.

3.7.2 Expression in *E. coli*

3.7.2.1 Überblick

Im Folgenden erfolgt die Auflistung und Darstellung aller in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Expressionssysteme.

I. *E. coli* BL21 pGEX-2T-Myt1Hu

(pGEX-2T-hMyt1 mit N-terminalen GST-Tag und Ampicillin-Resistenzgen)

II. *E. coli* CAG597 pGEX6P1-hMyt1-His₄

(Verwendung des partiell Protease-defizienten Stammes *E. coli* CAG597 (enthält Streptomycin- und Tetracyclin-Resistenzgen); ursprüngliches Plasmid pGEX-2T-Myt1Hu umkloniert von Dr. Erdmann mit zusätzlichem C-terminalen His₄-Tag zu pGEX6P1-hMyt1-His₄ und Ampicillin-Resistenzgen)

III. *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄

(Verwendung des partiell Protease-defizienten Stammes *E. coli* HM130 (enthält Kanamycin- und Tetracyclin-Resistenzgen); Plasmid, siehe System II; Adaption auf Minimalmedium und Batch Fermentation)

IV. *E. coli* BL21 pGEX-2T-Myt1

(auf Expression in *E. coli* optimierte Codon Usage der Myt1, N-terminaler GST-Tag und C-terminaler His₆-Tag und Ampicillin-Resistenzgen; Adaption auf Minimalmedium)

V. *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1

(auf Expression in *E. coli* optimierte Codon Usage der Myt1, nur C-terminaler His₆-Tag und Ampicillin-Resistenzgen; Adaption auf Minimalmedium)

Bei den aufgeführten Systemen erfolgten zusammengefasst folgende Arbeiten:

1. Transformation des jeweiligen Plasmids in den jeweiligen *E. coli* Stamm über Elektroporation oder Hitzeschock-Transformation. Selektion der erfolgreich transformierten Zellen auf LB-Agarplatten (unter Zusatz der jeweils entsprechenden Antibiotika).
2. Anlage von Kryokulturen für eine Stammhaltung. Dies erfolgte jeweils aus Vorkulturen in 15 ml Falconröhrchen mit je 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum oder aus Adaptionkulturen nach erfolgreicher Adaption auf Minimalmedium (MM).
3. Durchführung von Plasmidpräparationen mit Hilfe des GeneJet Plasmid Miniprep Kits (Fa. Fermentas) aus Vorkulturen in 15 ml Falconröhrchen mit je 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum. Die Abschätzung einer erfolgreichen Plasmidpräparation erfolgte über Restriktionsverdau (im Falle von pGEX-2T-hMyt1 mit *Bam*HI), DNA-Gelelektrophorese (zur Abschätzung der Größe und Quantifizierung der Plasmid-DNA). Die Überprüfung der Korrektheit der Sequenz erfolgte jeweils über eine Sequenzierung (Fa. MWG).
4. Durchführung von Schüttelkolbenversuchen zur Expression der Myt1 Kinase unter Variation des Mediums (LB-Medium, Autoinduktionsmedium). Gleichzeitige Anlage von 1/OD-Proben und anschließende Überprüfung einer Expression mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.
5. Durchführung von Schüttelkolbenversuchen zur Optimierung der Proteinexpression, z.B. durch Variation der Temperatur, Medienzusammensetzung, IPTG-Konzentration zur Induktion, insbesondere bei Expressionssystem IV und V.
6. Adaption auf Minimalmedium bei Expressionssystem III, IV und V.
7. Fermentation von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ im Biostat C Bioreaktor auf Minimalmedium.

8. Aufschluss und Aufreinigung über den GST-Tag und / oder His-Tag.
9. Aktivitätsbestimmungen von Rohproteinextrakten und Fraktionen aus Aufreinigungen über die CE Methode.

Die Aufnahme von Wachstumskurven, die Anlage von 1/OD-Proben, das Anfertigen von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit anschließender Coomassie- oder Silberfärbung und Western Blots erfolgten stets bei Bedarf.

3.7.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Expressionsmodell I: Die Klonierung der Myt1Hu DNA (1512 Bp) in den Vektor pGEX-2T (4900 Bp) wurde durch die Firma MWG so durchgeführt, dass sich N-terminal zur Myt1 Kinase ein GST-Tag befand. In Zusammenarbeit mit Karin Büttner (AG Pietzsch) wurden die Herstellung elektrokompenter Zellen, die Transformation, die Plasmidpräparation mit anschließendem Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG. Die Herstellung kompetenter Zellen des *E. coli* Stammes BL21(DE3) erfolgte nach dem Protokoll des Quiagen Laborhandbuches (*Quiagen Bench guide*)⁸⁰. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert. Für die Transformation wurden 1 µl der Plasmid-Lösung (50 ng/µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 1 mM EDTA)) zu 40 µl elektrokompenter Zellen gegeben. Die Transformation der kompetenten Zellen erfolgte durch Elektroporation mit einem Stromimpuls von 1800 Volt. Anschließend wurde der Transformationsansatz zügig in 1 ml SOC-Medium (2 % (m/v) Trypton, 0,5 % (m/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) aufgenommen und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die transformierte Bakterienkultur wurde auf LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Je eine Kolonie diente dem Beimpfen von je 5 ml LB_{Amp}-Medium in 15 ml Falconröhrchen, die bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubierten. Diese Vorkulturen dienten sowohl zur Anlage von Kryokulturen (500 µl steriles Glycerin + 500 µl Bakteriensuspension) als auch zur Plasmidpräparation mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas gemäß Herstellerprotokoll. Zur Kontrolle der Reinheit der Plasmidpräparation und zur Abschätzung der DNA-Menge folgten ein Restriktionsverdau mit *Bam*HI, eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese und schließlich die Sequenzierung, die der Absicherung der korrekten Basenfolge der für die Myt1 Kinase codierenden DNA diente.

Expressionsmodell II und III: *E. coli* CAG597 pGEX6P1-hMyt1-His₄ und *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ wurden freundlicherweise von Dr. Frank Erdmann nach Umklonierung des für Modell I genutzten pGEX-2T-hMyt1 und Transformation in die beiden Protease-defizienten Stämme CAG597 und HM130⁸¹ in Form von Kryokulturen zur Verfügung gestellt. Der Vektor weist neben dem N-terminal gelegenen GST-Tag zusätzlich C-terminal einen Polyhistidin-Tag (His₄-Tag) zur erleichterten Aufreinigung auf. Die Anzucht der Expressionsstämme erfolgte auf LB-Agarplatten mit den jeweils benötigten Antibiotika für *E. coli* CAG597 bei 30 °C und für *E. coli* HM130 bei 37 °C. Anschließend erfolgte die Adaption auf MM gemäß Abschnitt 3.7.2.7.

Expressionsmodell IV und V: Beide Modelle zeichnen sich durch Plasmide aus, die eine auf Expression in *E. coli* optimierte *Codon Usage* der Myt1 enthalten. Die Optimierung der für die Myt1 Kinase codierenden DNA und die Transformation in *E. coli* BL21 wurde dankenswerterweise durch Anna Schildbach (AG Pietzsch) durchgeführt. Die Klonierung des Fragments *Bam*HI-*Nde*I-Insert-6xHis-Stopp-*Eco*RI erfolgte durch die Firma GENEART in den Vektor pET-20b über die Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Eco*RI und in den Vektor pGEX-2T über die Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI.

pGEX-2T codiert für das Protein GST-Myt1-His₆ und pET-20b für Myt1-His₆. Je 5 µg Plasmid-DNA wurden in 10 µl TE-Puffer gelöst und ein Aliquot mittels Hitzeschock-Transformation in *E. coli* BL21 Zellen transformiert. Alle weiteren Arbeiten erfolgten analog Expressionsmodell I. Nachdem die Richtigkeit der DNA-Sequenz mittels Sequenzierung nachgewiesen wurde, fand vor einer Adaption auf MM zunächst mit beiden Expressionsstämmen ein Vorversuch zur Expression der Myt1 in Autoinduktionsmedium statt. Dazu wurden je 5 ml Autoinduktionsmedium mit je einer Kolonie inokuliert und im 15 ml Falconröhrchen bei 28 °C und 120 rpm über Nacht inkubiert. Die Auswertung per SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte jedoch keine Banden, die für eine Expression von GST-Myt1-His₆ (83 kDa) oder Myt1-His₆ (55,5 kDa) stünden. Nach der Adaption auf MM wurden mit beiden Stämmen Versuche zur Optimierung der Expression durchgeführt.

3.7.2.3 Schüttelkolbenkultivierung

Die Anzucht der Expressionsstämme erfolgte bei 37 °C (Expressionsmodell I, III – IV) bzw. 30 °C (Expressionsmodell II) aus den angelegten Kryokulturen auf Agarplatten oder direkt als Suspensionskultur in LB-, Minimal- oder Autoinduktionsmedium. Zur selektiven Kultivierung wurde die durch Plasmide vermittelte Antibiotikaresistenz genutzt. Dazu wurden dem Medium nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Antibiotikallösungen in der in Tabelle 3.12 aufgeführten Zusammensetzung zugesetzt.

Tabelle 3.12 Übersicht über die zur selektiven Kultivierung eingesetzten Antibiotika

Expressionssystem	Benötigte Antibiotika mit der jeweils benötigten Endkonzentration im Medium
<i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T-hMyt1	Ampicillin (100 µg/ml)
<i>E. coli</i> CAG597 pGEX6P1-hMyt1-His ₄	Streptomycin (10 µg/ml) Tetracyclin (10 µg/ml) Ampicillin (100 µg/ml)
<i>E. coli</i> HM130 pGEX6P1-hMyt1-His ₄	Kanamycin (25 µg/ml) Tetracyclin (10 µg/ml) Ampicillin (100 µg/ml)
<i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T-Myt1	Ampicillin (100 µg/ml)
<i>E. coli</i> BL21 pET-20b-Myt1	Ampicillin (100 µg/ml)

Für die Startkultur wurden entweder eine einzelne Kolonie einer Agarplatte oder Zellen einer Kryokultur entnommen, 5 ml Medium (im 15 ml Falconröhrchen) beimpft und etwa 8 h bei 180 rpm inkubiert (Vorkultur (VK) 1). Mit der VK 1 wurden 100 ml Medium im 1 l Schüttelkolben (SK) angeimpft, eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 bis 0,1 eingestellt und bei 80 rpm inkubiert (Expressionskultur oder VK 2). Je nachdem, ob eine Proteinexpression im kleineren (100 ml Medium in 1 l SK) oder größeren Maßstab (500 ml Medium in 2 l SK) erfolgen sollte, wurde VK 2 zum Beimpfen von 500 ml Medium im 2 l SK genutzt oder direkt als Expressionskultur eingesetzt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 erfolgten bei Verwendung von LB- oder Minimalmedium gegebenenfalls eine Temperatur-

absenkung (z.B. auf 30 °C) und die Induktion der Proteinsynthese durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 0,4 mM. Die Bakterienkulturen wurden 4 h bei der jeweiligen Temperatur bei 80 rpm geschüttelt. Wurde Autoinduktionsmedium zur Proteinexpression genutzt, erfolgte die Kultivierung über den gesamten Zeitraum bei 28 °C. Intensivere Untersuchungen zum Einfluss der IPTG-Konzentration und Induktionstemperatur erfolgten bei Expressionsmodell IV und V zu einem späteren Zeitpunkt (siehe Abschnitt 3.7.2.9). Die Produktbildung wurde durch die stündliche Entnahme von 1/OD-Proben und deren anschließender Untersuchung über SDS-PAGE und gegebenenfalls Western Blot beurteilt. Zur Analyse des Einflusses der Produktbildung auf die Wachstumsrate wurde zusätzlich der gleiche Versuch ohne IPTG Zugabe durchgeführt.

Bei Expressionen im 2 l SK, erfolgte nach 4 h die Zellernte durch Abtrennung des Mediums für 20 min bei 4 °C und 10000 g. Nach dem Zentrifugieren wurden die Bakterien bis zur weiteren Aufarbeitung gemäß Abschnitt 3.7.2.10 bei – 80 °C gelagert.

3.7.2.4 Probenanlage und Probenaufbereitung

Eine Probenanlage bezeichnet das Entnehmen von x/OD-Proben einer Fermentation. Sie dient der In-Prozesskontrolle, da mit Hilfe solcher Proben SDS-PAGE, Western Blots oder unter Umständen Aktivitätstest möglich sind. Die Abkürzung OD bezeichnet die Optische Dichte, die bei 600 nm von einer mikroorganismenhaltigen Suspension bestimmt wird. x/OD Proben weisen, unabhängig vom Entnahmezeitpunkt, stets gleiche Zellzahlen auf, so dass sie direkt miteinander vergleichbar sind und die Änderung des Proteingehalts während einer Expression beurteilt werden kann. Das x kann für 1, 5 oder 10 stehen und bezeichnet eine bestimmte Zellmenge, nämlich die einfache, fünffache oder zehnfache Zellmenge. Bei der Berechnung x/OD wird die Menge mikroorganismenhaltiger Suspension in [ml] berechnet, die x/OD Zellen enthält. Das Volumen zur Entnahme einer 1/OD-Probe wird nach Formel 3.2 berechnet.

$$V_{\text{Probe}} [\text{ml}] = \frac{x}{OD_{600}} \quad (x = 1, 5 \text{ oder } 10)$$

Formel 3.2 Berechnung des Volumens Bakteriensuspension zur Entnahme einer x/OD-Probe

Darüber hinaus kann die optische Dichte bei 600 nm genutzt werden, um das Biomassewachstum zu beurteilen. Dazu wird die OD₆₀₀ oder die Biotrockenmasse gegen die Fermentationszeit in einem Diagramm aufgetragen, so dass eine charakteristische Wachstumskurve erhalten wird. Eine Abschätzung der Biotrockenmasse erfolgt durch Multiplikation der OD₆₀₀ mit dem Faktor 0,3.

In dieser Arbeit dienten meist 1/OD-Proben der Beurteilung des Biomassewachstums. Dazu wurde ca. 5 ml mikroorganismenhaltige Suspension steril in ein Zentrifugenröhrchen entnommen, eine entsprechende Verdünnung mit dem jeweiligen Medium hergestellt und gegen Medium als Blindwert die OD bei 600 nm bestimmt. Die OD₆₀₀, korrigiert um den angewandten Verdünnungsfaktor, diente zur Berechnung des benötigten Volumens zur Entnahme einer x/OD-Probe nach Formel 3.4. Das berechnete Volumen Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert, 5 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert, der zellfreie Überstand mittels Kanüle und Unterdruck abgesaugt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert. Sollte, wie im Falle der Fermentation, prozessbegleitend die Substratkonzentration bestimmt werden, so wurde der Überstand nicht verworfen, sondern zur Glucosebestimmung mittels Blutzuckermessgerät (GlukoSmart Plus) verwendet.

Angelegte 1/OD-Proben dienten in dieser Arbeit der Überprüfung der Enzymexpression über SDS-PAGE oder Western Blot. Die Verwendung von 1/OD-Proben zur intrazellulären Enzymaktivitätsbestimmung war im Falle von Myt1 Kinase Messungen nicht möglich, da der Rohenzymextrakt einer aus *E. coli* gewonnenen Probe eine Vielzahl von Phosphatasen enthält, die einer eventuellen Kinaseaktivität direkt entgegenstehen.

Zur Vorbereitung der Proben für SDS-PAGE oder Western Blot wurden die x/OD-Proben mit 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert, 5 min bei 99 °C im Thermoblock inkubiert, auf einem Vortexer wenige Sekunden gemischt und schließlich zur Abtrennung der DNA 2 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert. Im Fall von Fraktionen aus einer Aufreinigung wurden 20 µl Proteinlösung im Verhältnis 1:1 (V/V) mit Probenpuffer versetzt, 2 min bei 99 °C im Thermoblock inkubiert und auf einem Vortexer wenige Sekunden gemischt.

Eine Unterscheidung der exprimierten Proteine in eine lösliche und unlösliche Fraktion war nach folgendem Aufschluss möglich: Hierzu wurden die x/OD-Proben in 130 µl Lysepuffer resuspendiert, 60 min bei 37 °C inkubiert und darauf folgend 5 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert (Lysepuffer: 50 mM Tris / HCl pH 8,0, 2,0 mM MgCl₂, 1 mg/ml Lysozym, 10 U/ml Benzonase). Der Überstand diente der Gewinnung löslicher Proteinfraction, während das Pellet unlösliche Proteine bildete. In ein gekühltes Reaktionsgefäß wurden 52 µl des Überstandes überführt und die Proteine durch Zugabe von 100 µl kaltem Aceton (-20 °C) gefällt. Durch eine 10minütige Zentrifugation bei 16100 g und 4 °C konnten die gefällten Proteine nach Verwerfen des Überstandes abgetrennt werden. Sie bildeten die lösliche Proteinfraction. Nachdem sie in 40 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3 min bei 99 °C erhitzt wurden, standen sie für eine SDS-PAGE zur Verfügung. Das Pellet wurde zweimal in 1 ml Tris / HCl pH 8 resuspendiert und 5 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Das gewaschene Pellet wurde schließlich in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 3 min bei 99 °C inkubiert und für die SDS-PAGE eingesetzt.

3.7.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Aussagen bezüglich der Proteinexpression allgemein, der Reinheit einzelner Proteinfractionen und deren Molekulargewichte zu treffen, fand die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) Verwendung⁸². Diese Methode basiert auf der Vereinheitlichung der Nettoladung der zu trennenden Proteine. Durch die Zugabe des Detergenz SDS vor der Auftrennung der Proteine (Enzyme) kommt es zur Denaturierung dieser. Gleichzeitig werden vorhandene Disulfidbrücken durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol gespalten. Durch paralleles Auftragen von Größenstandards (Proteinmolekulargewichtsmarker, Fa. Fermentas) war eine Kalibrierung des Gels und somit ein Abschätzen der Molekulargewichte der Proteine möglich.

Für die SDS-PAGE stand eine vertikale Elektrophoreseeinrichtung mit dazugehörigen Glasplatten, Aluminiumplatten, Klammern, *Spacern* und Kämmen zur Verfügung. Die Herstellung der Gele erfolgte nach Abschnitt 3.4.4. Nach Zusammenführen der Komponenten des Trenngels (12,5 %) wurde die Lösung vorsichtig zwischen Glas- und Aluminiumplatten gegeben und mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach einer 30minütigen Polymerisation, wurde das Isopropanol verworfen, der verbleibende Zwischenraum mit Sammelgel gefüllt und unmittelbar der Kamm in das Sammelgel eingebracht, um die für die Beladung des Gels erforderlichen Probestaschen zu erhalten. Zum Einsatz kamen 10- und 15-zinkige Käme. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel mit Alu-

und Glasplatte in die mit 1x Kathodenpuffer befüllte Elektrophoresevorrichtung gespannt. Nach Entfernen des Kamms war das Gel gebrauchsfertig.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte gemäß Teil 2 des Abschnitts 3.7.2.4. Die Beladung des Gels wurde je Tasche mit 10 µl der aufgearbeiteten Proben und mit 5 µl Molekulargewichtsstandard durchgeführt. Die Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte für 6 min bei einer Stromstärke von 80 mA (zwei Gele). Zur anschließenden Auftrennung der Proteine im Trenngel kam es bei 60 mA in ca. 40 min (zwei Gele).

Zur Detektion der aufgetrennten Proteine dienten entweder eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250 Färbelösung, die sensitivere Silberfärbung oder ein Western Blot. Die Inkubation des Gels in der Coomassie Färbelösung erfolgte über Nacht auf einem Wipptisch. Durch Schwenken des Gels in Entfärbelösung (dreimal jeweils ca. 45 min) wurde überschüssiger, nicht gebundener Farbstoff entfernt und die Proteinbanden sichtbar.

Die Silberfärbung erfolgte nach BLUM⁸³. Sie wurde in dieser Arbeit immer dann durchgeführt, wenn niedrige Proteinkonzentrationen zu erwarten waren, oder Proteine mit Hilfe einer Coomassie Färbung nicht ausreichend sensitiv im Gel dargestellt werden konnten. Gegenüber der Coomassie Färbung (200 – 400 ng je Bande) ist die Silberfärbung aufwendiger, jedoch mit einer Empfindlichkeit von 5 – 30 ng je Bande deutlich sensitiver⁸⁴. Dafür wurde das Gel über Nacht mit Fixierlösung behandelt und am folgenden Tag dreimal mit Ethanol (50 %) (V/V) für je 20 min gewaschen und darauf mit Sensitivierungslösung für eine Minute behandelt. Nach drei weiteren Waschschritten mit mQ-Wasser für je 20 sec erfolgte für 30 min eine Behandlung mit Silber-Färbelösung, welche wiederum durch erneutes dreimaliges Waschen beendet wurde. Die eigentliche Farbgebung erfolgte im Anschluss durch die Inkubation des Gels bis zur gewünschten Bandenstärke in Entwicklerlösung (1 - 3 min). Eine Terminierung des Färbeprozesses erfolgte durch eine 10minütige Behandlung mit Stopplösung. Schließlich wurde die Silberfärbung durch einen letzten Waschschriff in Methanol (50 %) (V/V) beendet. Sollten die Gele haltbar gemacht werden, erfolgte dies, nach je 30minütiger Lagerung des Gels in mQ-Wasser bzw. Trocknerlösung, indem sie luftblasenfrei zwischen zwei mit Wasser benetzte Cellophanfolien gelegt wurden und über ein bis zwei Tage in einem Rahmen eingespannt trockneten.

3.7.2.6 Western Blot

Mit Hilfe von Western Blots können vorhandene Banden im Gel mit spezifischen Antikörpern eindeutig zugeordnet werden. In dieser Arbeit wurden Blots mit anti-Myt1, anti-His, und anti-GST Antikörpern angefertigt. Auf diese Weise konnte zusätzlich die vollständige Expression des Proteins überprüft und bestimmt werden, von welchem Ende ein möglicher Abbau stattfand, da die hier exprimierten Proteine teilweise N-terminal einen GST-Tag und C-terminal einen His-Tag aufwiesen.

Für den Western Blot wurden die gemäß 3.7.2.4 aufgearbeiteten 1/OD-Proben oder Proteinlösungen in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Eine Nitrocellulosemembran wurde 10 min vor dem Blotten mit Transferpuffer durchtränkt. Das SDS-Polyacrylamid Gel wurde in Transferpuffer gespült, auf die Nitrocellulosemembran gelegt, welche sich wiederum auf vier Lagen Filterpapier befand, und anodenwärts ausgerichtet. Auf der anderen Seite (gelseitig) wurden ebenfalls vier Lagen Filterpapier aufgelegt und der Kathode entgegen gerichtet. Diese Sandwich-artige, gut mit Transferpuffer durchtränkte Packung wurde in die Blotapparatur eingebracht, in der für 60 bis 90 min bei einem Strom von 2 mA/cm² das Blotten auf die Membran erfolgte. Um die Effizienz des Transfers unmittelbar abzuschätzen, konnten die transferierten Proteine auf der Membran

anschließend mit einer 10 %igen Ponceau S-Lösung visualisiert werden. Nach dem Entfärben und Spülen der Membran mit TBS-T Puffer wurde diese für 60 min bei 37 °C in einer Lösung von 5 % Magermilchpulver in TBS-T Puffer (Blockinglösung) blockiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren. Anschließend wurde der spezifische erste Antikörper (anti-Myt1 AK, anti-His AK, anti-GST AK) 1:1000 in Blockinglösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Blot-Membran mit TBS-T Puffer für je 5 min wurde diese mit dem zweiten Antikörper (anti-Kaninchen AK 1:2500, anti-Maus AK 1:5000 in Blockinglösung verdünnt) für 60 min bei RT inkubiert und darauf erneut gründlich mit TBS-T Puffer gewaschen (3 x 5 min). Für die Detektion wurde das Chemilumineszenz-Kit der Firma AppliChem in Verbindung mit lichtempfindlichem Filmmaterial verwendet.

Die Western Blots konnten im Arbeitskreis von Dr. Frank Erdmann (MPG, Halle (Saale)) durchgeführt werden^c.

3.7.2.7 Adaption auf Minimalmedium

Die Adaption von LB-Medium auf Minimalmedium erfolgte mit dem Ziel einer besseren Steuerbarkeit des Fermentationsprozesses im Bioreaktor. Im Minimalmedium unterliegt ein Stamm definierten Bedingungen, so dass eine spätere Optimierung von Fermentationen zu Hochzelldichten erfolgen kann. Ziel dieses Versuches war die Umstellung der Expressionsmodelle II – V von LB-Medium auf MM. Bei *E. coli* CAG597 pGEX6P1-hMyt1-His₄ (Modell II) gelang keine Adaption, da dieser Stamm auf MM kein Wachstum zeigte. Es wurde das Minimalmedium nach WILMS verwendet⁸⁵, dessen Zusammensetzung und Herstellung in Abschnitt 3.4.5 beschrieben wird.

Die Adaption erfolgte bei allen Expressionsmodellen nach gleichem Schema, wobei sich das eingesetzte Medium lediglich durch Zugabe verschiedener Antibiotika unterschied. Die Arbeitsschritte zur Adaption werden beispielhaft anhand der Adaption von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ in Abb. 3.5 dargestellt. Das Beimpfen einer Agarplatte wurde aus der jeweiligen Kryokultur durchgeführt. Aus der jeweils letzten Adaptionskultur wurden in der exponentiellen Wachstumsphase Kryokulturen (500 µl steriles Glycerol + 500 µl Bakteriensuspension) angelegt und diese zur Stammhaltung bei -80 °C eingefroren. Die Adaption des Stammes galt als erfolgreich, wenn der Prozentanteil LB-Medium kleiner 0,01 % war und die Zellen eine Wachstumskurve ähnlich der in Vorkultur 2 aufwiesen.

^c Für die Unterstützung bei der Anfertigung der Western Blots bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Martina Heidler.

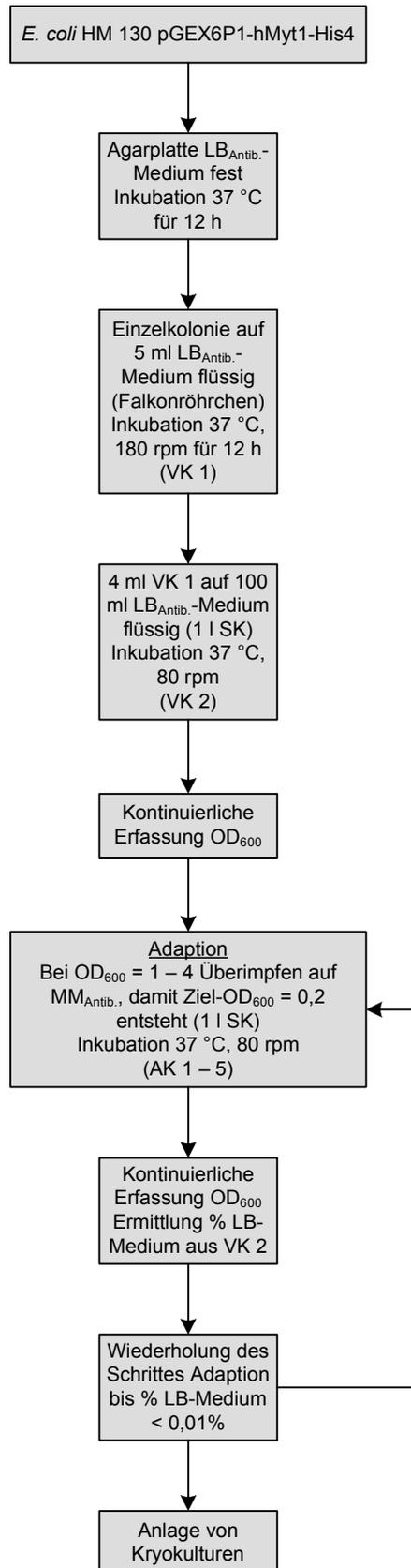


Abb. 3.5 Fließschema zur Adaption von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ an MM: Die Inkubation erfolgte im Inkubator Infors, die zur Selektion eingesetzten Antibiotika (Antib.) waren Kanamycin, Tetracyclin und Ampicillin; VK – Vorkultur, AK – Adaptionkultur.

3.7.2.8 Fermentation

Die Auswertung der Schüttelkolbenkultivierungen des Expressionsstammes III (*E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄) zeigte, dass erstmalig Myt1 produziert werden konnte. Die Ausbeute war jedoch gering, da sowohl die Expression niedrig war, als auch ein großer proteolytischer Abbau dafür sorgte, dass die vorhandenen Mengen zusätzlich minimiert wurden. Die Aufreinigung von wenigen Gramm Biofeuchtmasse führte daher zu so geringen Mengen an Kinase, dass sie nur über Western Blot nachweisbar war. Diese Präparation wies Aktivität auf, war jedoch so schwach konzentriert, dass sie für ein umfangreicheres Testprogramm nicht ausreichte. Aus diesem Grund sollte über eine Fermentation im größeren Maßstab möglichst viel Biomasse erzeugt werden, die die Gewinnung größerer Mengen aktiver Kinase erlaubte.

Die Kultivierung von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ wurde im Fermenter als Batch mit späterer IPTG Induktion und gleichzeitiger Temperaturabsenkung auf 24 °C durchgeführt. Hierfür wurde Minimalmedium eingesetzt. Der Produktnachweis erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot der ab der Induktion angelegten 1/OD-Proben.

Im Vorfeld der Fermentation und prozessbegleitend wurde durch Dr. Norbert Volk (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) zur besseren Prozessplanung eine Simulation der Fermentation durchgeführt. Diese diente der Bestimmung des Induktionszeitpunktes und der Substratkonzentration während der Batch-Phase. Da die Fermentation dieses Stammes erstmalig durchgeführt wurde, bildeten lediglich die Erkenntnisse aus vorangegangenen Schüttelkolbenkultivierungen die Grundlage für eine Simulation

Die Vorkultur zum Beimpfen eines Ansatzvolumens von 15 l wurde folgendermaßen hergestellt: Mit einer nach Abschnitt 3.7.2.7 hergestellten Kryokultur von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ wurden 25 ml MM_{Amp/Kana/Tetra} angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm für 16 h inkubiert (Vorkultur (VK) 1). VK 1 diente sodann zum Beimpfen von 100 ml MM_{Amp/Kana/Tetra} (VK 2). Diese wurde auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt und bei 37 °C und 90 rpm über 9 h inkubiert. Mit Hilfe von VK 2 wurden sechs 2 l SK mit je 500 ml Medium auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,2 beimpft und 14 h bei 37 °C und 80 rpm inkubiert (VK 3). Bei einer OD₆₀₀ von 2,7 wurde VK 3 bei 4000 g 3 min zentrifugiert, die gewonnenen Zellen in 540 ml der Salzlösung des MM resuspendiert und bis zum Inokulieren auf Eis gelagert. Für die Fermentation wurde ein 20 l Biostat C mit einem Endvolumen beimpften Mediums von 15 l eingesetzt. Die Fermentation wurde bei einer Rührerdrehzahl von 800 rpm und einer Begasungsrate von 8 l/min gestartet (Start-OD₆₀₀ = 0,28). Während der Fermentation wurde der pH-Wert gemessen und mit 25 % (V/V) Ammoniumhydroxid-Lösung und 20 % (V/V) o-Phosphorsäure auf pH 7 eingestellt. Der Gelöstsauerstoff wurde durch Steigerung der Rührerdrehzahl und Begasungsrate ≥ 20 % gehalten. Als Antischaummittel kam Silikon-Antischaumemulsion zum Einsatz.

Das Wachstum der Zellen wurde bei 37 °C durchgeführt. 10 h nach Fermentationsbeginn wurde die Temperatur auf 30 °C herabgesenkt und mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Drei Stunden nach Induktion erfolgte in drei Etappen die Zellernte (halbstündlich jeweils 5 l) durch Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C über 15 min. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen bei -80 °C gelagert. Während der Fermentation wurden halbstündlich Proben entnommen, die zum einen der Bestimmung der Substratkonzentration (Glucose) und zum anderen der photometrischen

Untersuchung des Biomassewachstums gemäß Abschnitt 3.7.2.4 dienen. Ab Induktion erfolgte zusätzlich halbstündlich die Anlage von 1/OD-Proben.

3.7.2.9 Optimierung der Expression

Mit Expressionsmodell III konnte Myt1 Kinase erstmals erzeugt werden. Trotz des Einsatzes des partiell Protease-defizienten Stammes HM130 musste hier ein stark proteolytischer Abbau bereits während der Expression und im noch stärkeren Ausmaß bei Aufschluss und Reinigung in Kauf genommen werden. Die Ausbeuten gereinigten und aktiven Enzyms waren demzufolge gering. Durch eine Fermentation in 15 l Medium konnten diese Nachteile durch Produktion von verhältnismäßig viel Biomasse teilweise kompensiert werden.

Mit Expressionsmodell IV und V sollte untersucht werden, ob durch Optimierung der *Codon Usage* auf eine Expression in *E. coli* eine verbesserte Expression, eventuell auch unter geringerem proteolytischen Abbau, erzielt werden konnte.

Expressionsmodell IV steht für die Bildung des Fusionsproteins GST-Myt1-His₆ und Modell V für das Myt1-Protein mit C-terminalem His₆-Tag. Beide Expressionen sollten in dem Stamm *E. coli* BL21 erfolgen.

Ein erster Versuch der Expression in Autoinduktionsmedium zeigte gemäß SDS-PAGE keine Expression der gewünschten Proteine. Jedoch zeigten sich nach Adaption auf MM, anschließender Anzucht bei 37 °C im 2 l SK und Expression nach Induktion mit 0,4 mM IPTG bei 24 °C im Gel die gewünschten Banden – hauptsächlich jedoch in der unlöslichen Proteinfraction. Ziel der Optimierungsexperimente war daher durch Variation der Expressionstemperatur und der IPTG-Konzentration die Bildung löslicher Anteile der Myt1 zu erhöhen.

Für die Versuche erfolgte zunächst die Kultivierung von IV und V in 2 l SK mit 500 ml Medium bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,5. Für die unterschiedlichen Ansätze wurde die Bakterien-suspension zu je 50 ml auf 300 ml SK aufgeteilt. Diese wurden dann auf diverse Temperaturen (30 °C, 24 °C, 16 °C) herunter gekühlt oder dabei belassen (37 °C) und die Expression durch Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0, 0,01, 0,1, 0,5 mM IPTG) eingeleitet. Nach der Induktion erfolgte die Inkubation für weitere 4 Stunden. Um den Aufwand der Probenanlage zu begrenzen erfolgte die Entnahme von Proben nicht wie üblich stündlich, sondern zum Induktionszeitpunkt Null und nach 4 h als Momentaufnahme. Für die SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgten der Aufschluss der Proben und die Unterscheidung in lösliche und unlösliche Proteinfraction wie in Abschnitt 3.7.2.4 beschrieben.

3.7.2.10 Aufschluss und Reinigung

Die aus einer Schüttelkolbenkultivierung oder aus der Fermentation des Expressionsstammes III gewonnenen, in der Regel tiefgefrorenen Bakterien wurden in Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0) unter Zusatz von Protease-Inhibitor-Cocktail Tabletten (1 Tablette / 50 ml Aufschlussvolumen) bei Raumtemperatur aufgetaut und resuspendiert. Pro Aufschluss wurden bis zu 200 g Biofeuchtmasse (BFM) in 200 ml Aufschlusspuffer eingesetzt. Da über Schüttelkolbenkultivierung je Liter Kultur nur ca. 6 – 10 g Biofeuchtmasse gewonnen wurden, erfolgte der Aufschluss mit geringeren Mengen Puffer. Nach dem vollständigen Auftauen der Zellen wurden MgCl₂-Lösung in einer Endkonzentration von 2 mM sowie Benzonase (7,5 µl / 50 ml Aufschlussvolumen) zugegeben und der Ansatz, in Abhängigkeit der Viskosität der Suspension, bis zu 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde sodann durch 3 – 4 Passagen im Hochdruckhomogenisator (HDH) bei etwa 700 bar aufgeschlossen. Während des

Aufschlusses wurden die einzelnen Passagen auf Eis und der HDH auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der Zellfragmente durch 30minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 rpm.

Die Reinigung der Myt1 Kinase erfolgte mit einem chelatisierenden Sepharose-Gel (Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare). Dieses Gel trägt Nickel-NTA (Nitrilo-tri-acetic acid) Gruppen für die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC). Sie ermöglichen die Reinigung rekombinanter Proteine mit Polyhistidin-*Tag* am N- oder C-Terminus. Bei rekombinanten Proteinen mit GST-*Tag* (Expressionsmodell I – IV) erfolgte außerdem die Reinigung mittels Glutathion-Agarose-Gel (Protino Glutathion Agarose 4B, Macherey-Nagel). Des Weiteren wurde die Kombination beider Strategien mit dem Ziel einer besseren Aufreinigung getestet.

Der Aufschluss und die Reinigung von 200 g BFM aus der Fermentation von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ mittels IMAC ist beispielhaft für das allgemeine Vorgehen in Abb. 3.6 dargestellt.

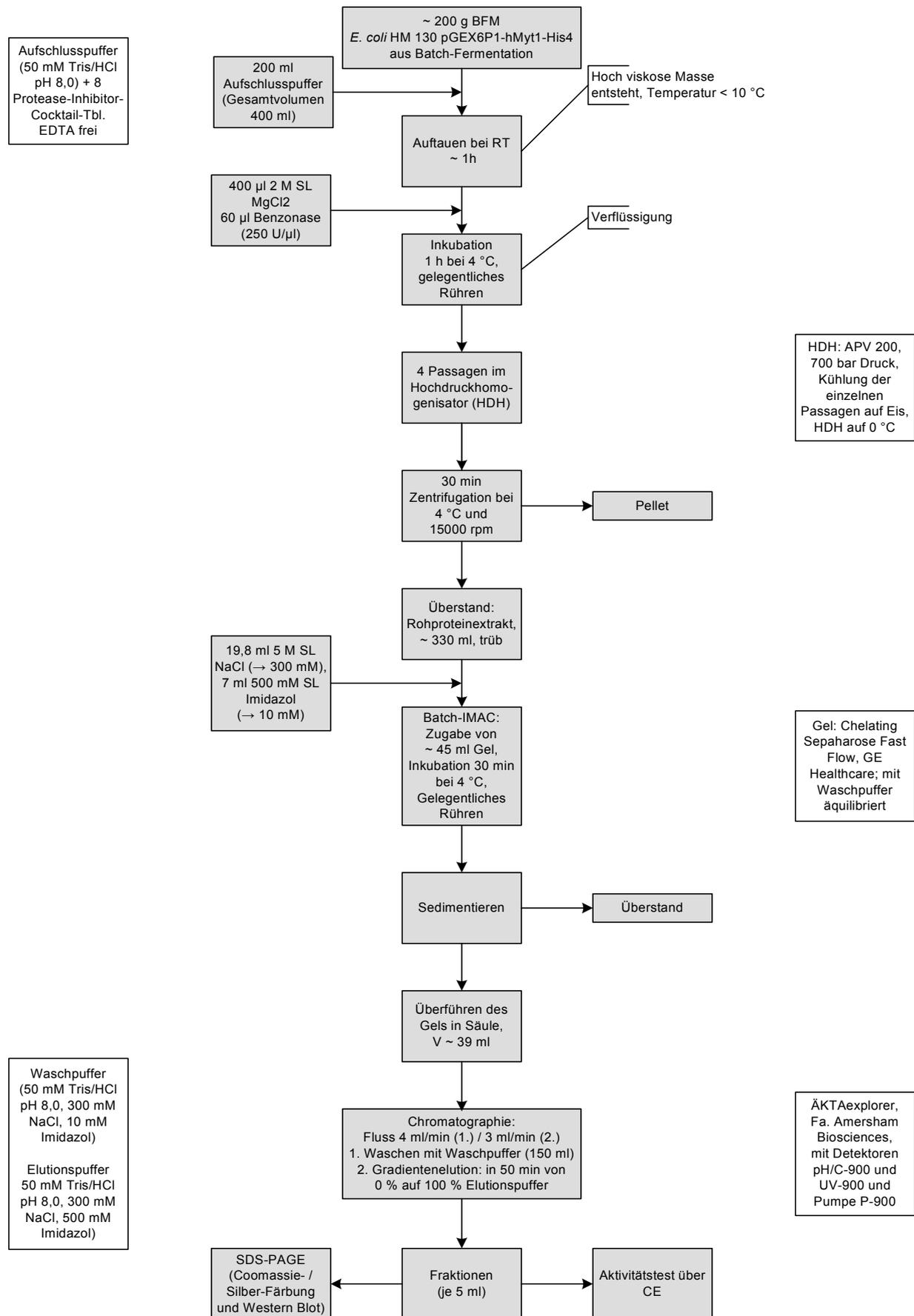


Abb. 3.6 Aufschluss und Reinigung von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ über IMAC

Sollten kleinere Mengen an Biofeuchtmasse aufgeschlossen und gereinigt werden, so erfolgte eine Anpassung des oben aufgeführten Ablaufs hinsichtlich kleinerer Volumina. Beispielsweise wurde für den Aufschluss von 8 g BFM *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1 50 ml Aufschlusspuffer mit einer Tablette Protease-Inhibitormischung EDTA-frei verwendet. Der Rohproteinextrakt wurde direkt auf die mit 6 ml Gelmaterial gepackte, mit Waschpuffer äquilibrierte Säule gegeben, wo das His-tagged Protein auf Grund seiner Affinität zu den dort immobilisierten Nickelionen gebunden wurde. Der Wasch- und Elutionsvorgang erfolgte mit je 50 ml Puffer. Das Volumen jeder gesammelten Fraktion betrug anstatt 5 nur 2 ml.

Reinigungen über den GST-Tag erfolgten nach gleichem Prinzip bis auf die Verwendung einer GSH-Säule mit einem Volumen von 5 ml und einem abweichenden Wasch- und Elutionspuffer (Waschpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM Glutathion (reduziert)). Wurde eine Kombination aus beiden Verfahren angewendet, so erfolgte zuerst die IMAC und anschließend mit aktiven Fraktionen aus der ersten eine zweite Reinigung über den GST-Tag. Für die SDS-PAGE wurden nicht nur die Fraktionen, sondern zusätzlich auch Proben der während der Aufreinigung erhaltenen Überstände eingesetzt.

Aktive Kinase enthaltende Fraktionen wurden außerdem vereinigt und bei 4 °C über eine mit Kinasepuffer äquilibrierte PD 10-Säule (Fa. Amersham Biosciences) von Imidazol befreit. Eine solche Umpufferung basiert auf den Prinzipien einer Größenausschlusschromatographie. Bei dem hier verwendeten Gel Sephadex G-25 handelt es sich um ein verzweigtes Dextran, welches ein dreidimensionales Netzwerk mit unterschiedlichen Porengrößen bildet. Eine Separation beruht darauf, dass kleinere Partikel in Kavitäten eindringen und mit dem Säulenmaterial wechselwirken, während großvolumigere Moleküle das Gel schneller durchwandern. Das hier verwendete Material weist eine Ausschlussgröße von ca. 5 kDa auf, welches die Abtrennung der Proteine von kleineren Molekülen, wie Imidazol ermöglicht⁸⁶.

Obwohl eine negative Beeinflussung der Enzymaktivität oder Messtechnik durch Imidazol denkbar wäre, zeigten anschließende Aktivitätsmessungen keine Beeinflussung der Aktivität, bzw. Störungen der Methoden. Dies könnte in generell niedrigen Imidazolgehalten begründet liegen, da insbesondere das GST-hMyt1-His₄-Protein auf Grund der Kürze des Polyhistidin-Tags eine geringere Retention am nickelhaltigen Absorptionsmaterial aufweisen dürfte. Tatsächlich äußerte sich dies in einer relativ frühen Elution des Proteins während des ca. 37minütigen Gradienten von null Prozent auf 100 % Elutionspuffer (Imidazolgehalt von 500 mM).

Zur Konservierung der affinitätschromatographisch gewonnenen Enzymlösungen wurden diese mit einem Glycerolanteil von 10 % aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

3.7.3 Expression in Insektenzellen

Expressionsversuche erfolgten durch Dr. Frank Erdmann in S2-Zellen und Sf9-Zellen der Organismen *Drosophila melanogaster* und *Spodoptera frugiperda*. Nach der Klonierung der humanen Myt1 in Volllänge in die Vektoren pMT/BiP/V5-HisA (1) und pMIB/V5-HisA (2) (Invitrogen) erfolgte die Transfektion der Plasmide durch Lipofektion und Elektroporation. Bei der BiP- (1) und der HBM-Sequenz (2) handelt es sich um Sekretionssignale, welche die sekretierende Expression des gewünschten Gens ermöglichen. Auf diese Weise gelingt eine vereinfachte und direkte Ernte der

Proteinlösung von den kultivierten Zellen. Eine Aufreinigung des Proteins über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) war auch hier durch eine Polyhistidin-Sequenz möglich.

Zu Aktivitätsuntersuchungen mittels CE Methode und FP Assay gelangten sowohl ungereinigte als auch über IMAC aufgereinigte und gegebenenfalls über Gelfiltration von Imidazol befreite Proteinlösungen. Diese konnten über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert und für Aktivitätsmessungen eingesetzt werden.

Darüber hinaus dienten die oben genannten Systeme auch der Expression der humanen Wee Kinase. Ungereinigte Proteinlösungen der Wee Expression in Insektenzellen wurden via CE und FP Assay auf Aktivität geprüft und zusammen mit Myt1 Präparationen für ein Inhibitorscreening eingesetzt (siehe Abschnitt 3.9.2 f.).

3.7.4 Expression in humanen Zellen

Gegen Ende dieser Arbeit begann Dr. Frank Erdmann mit Expressionsversuchen in humanen Zellen. Dazu wurde die Sequenz der humanen Myt1 in Volllänge in den Vektor pcDNA[®] 4/HisMax C (Invitrogen) kloniert und mittels Polyethylenimin als Transfektionsreagenz in HEK293-Zellen transfiziert. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie.

Mit Hilfe dieser humanen Expression konnten inzwischen weitere interessante Erkenntnisse zu Zellaufschluss der humanen Zellen und Myt1-Gewinnung gewonnen werden⁸⁷.

3.8 Aktivitätsbestimmung Myt1

3.8.1 Überblick

Die Aktivitätsbestimmung der Myt1 erfolgte während dieser Arbeit zum größten Teil über die CE Methode, da diese früher als der FP Assay etabliert war. Erst mit Abschluss dieser Arbeit war der FP Assay soweit entwickelt, dass auch mit diesen Aktivitätsbestimmungen möglich gewesen wären. Heute wird zur reinen Feststellung der Aktivität neuer Enzympräparationen hauptsächlich die Fluoreszenzpolarisation gewählt. Deswegen werden in diesem Abschnitt beide Methoden aufgeführt und auch die Berechnung von Aktivität und Hemmung beider Systeme vorgestellt.

Alle CE Messungen wurden an der CE Anlage Prince, wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, durchgeführt. Da die Myt1, wie bereits unter 2.2.2.2 erörtert, zu einer Phosphorylierung von Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ der CDC2 führt, sollte in dem hier verwendeten System durch die Kinaseaktivität eine Umsetzung von TY zu TpY, pTY und pTpY erfolgen. Einen solchen Umsatz konnte man durch die Bildung von zusätzlichen Signalen im Elektropherogramm bei der Retentionszeit von monophosphorylierten oder diphosphoryliertem Peptid erkennen.

Für Standard-Aktivitätsbestimmungen wurden eine Umsatzprobe und zwei unterschiedliche Blindproben, wie in Tabelle 3.11 aufgeführt, angesetzt. Eine Blindprobe enthielt bis auf das Enzym alle Komponenten, die in der Probe auch enthalten waren. Die andere Blindprobe enthielt bis auf ATP alle Komponenten der Probe. Als Puffer wurde Kinasepuffer eingesetzt. 2 mM Molybdat wurden diesem zugesetzt, um Phosphatasen, die potentielle Verunreinigungen der Enzymlösung darstellen können, zu hemmen. TY-ABD wies in den CE Versuchen eine Endkonzentration von 10 µM und ATP eine Endkonzentration von 100 µM auf. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 30 °C im Thermomixer bei 350 rpm für mindestens eine Stunde. Um mehrere Fraktionen einer Aufreinigung zu testen, wurde

zunächst je Fraktion nur eine Umsatzprobe angesetzt. Ist Aktivität für eine oder mehrere Fraktionen festgestellt worden, sind diese gegebenenfalls vereinigt und einer Umpufferung unterzogen worden. War genug Enzympräparation vorhanden, wie zum Beispiel in Folge der Aufreinigung von 200 g BFM aus der Fermentation von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄, wurden im Anschluss verschiedene Versuche unternommen, um die Enzymreaktion hinsichtlich der Durchführung von Inhibitorenuntersuchungen zu optimieren. So sollte beispielsweise für Inhibitorentests ein maximaler Substratumsatz von ca. 20 % erreicht werden, was über die zugegebene Enzymmenge gesteuert werden konnte. Die Optimierung der Enzymreaktion hinsichtlich der Substratkonzentration ist ebenso möglich, erfolgte jedoch in dieser Arbeit nicht.

Hinsichtlich der DMSO-Verträglichkeit wurden kleinere Versuchsreihen durchgeführt. Da die zu untersuchenden Verbindungen häufig nicht wasserlöslich sind, werden sie in industriellen Screenings und auch hier als Stammlösungen in DMSO hergestellt. Durch Verdünnen der Stammlösungen mit Wasser oder Puffer wurden diese dann auf ein für das Testsystem verträgliches Maß an DMSO gebracht. Übliche DMSO Konzentrationen in *in vitro* Testsystemen liegen bei 1 bis 5 %. Für die Untersuchung der DMSO-Verträglichkeit wurden in der Probe DMSO Gehalte von 5, 1 und 0,5 % eingestellt und anschließend die Beeinflussung der Kinaseaktivität beurteilt.

Zur weiteren Charakterisierung der Umsetzung erfolgten ferner Versuche mit verschiedenen Inkubationszeiten wie 30, 60, 90, 120, 240 min, 8 und 15 h.

Ungeachtet der Tatsache, dass hier nur die Aktivitätsbestimmung der Myt1 Kinase in Rede steht, ist die Übertragung aller folgenden Berechnungen auf Untersuchungen mit der Wee1 Kinase uneingeschränkt möglich.

3.8.2 Berechnung von Aktivität und Hemmung via CE Methode

Mit Hilfe der Software Borwin erfolgte die Steuerung der CE und zum Teil die Auswertung. Zunächst wurden für alle Analyten die Peakflächen bestimmt. Bei der Elektrophorese ist es erforderlich die ermittelten Peakflächen durch die Migrationszeit zu dividieren. Auf diese Weise wird eine Korrektur des jeweiligen Fluoreszenzsignals vorgenommen, da die Stärke des Signals von der Migrationsgeschwindigkeit abhängt. Ein langsam am Detektor vorbeiziehendes fluoreszierendes Teilchen ergäbe demzufolge höhere und breitere Signale als ein schnell vorbeiziehendes. Als Zweites wurde der Anteil Q der im Rahmen der Enzymreaktion gebildeten phosphorylierten Peptide berechnet. Da TY-ABD von vornherein meist (geringe) Verunreinigungen aufwies, diese aber genau mit den monophosphorylierten Peptiden migrierten, musste gleichzeitig eine Korrektur der Peakflächen mit dem Blindwert gemäß Formel 3.3 erfolgen.

$$Q_{p(TY)} = \frac{\frac{A_{p(TY)}}{t_{p(TY)}} - \frac{A_{Blind}}{t_{Blind}}}{\frac{A_{TY}}{t_{TY}}}$$

Formel 3.3 Auswertung CE: Berechnung des Quotienten Q

Da für die später folgenden Hemmstoffuntersuchungen bereits der Umsatz zum monophosphorylierten Peptid ausreichte um Inhibitionen zu erkennen, erfolgte in der Regel der Umsatz zu den monophosphorylierten Peptiden pTY / TpY und nur $Q_{pTY/TPY}$ musste berechnet werden. Bei längeren

Inkubationszeiten zeigte sich meist auch ein Signal für pTpY, so dass dann zwei Quotienten, nämlich $Q_{pTY/TPY}$ und Q_{pTPY} berechnet wurden. Durch Anwendung der Quotientenbildung wurde die Beeinflussung des Ergebnisses durch Pipettierfehler minimiert, da das Verhältnis der Peptide zueinander gewahrt blieb. Außerdem konnte auf diese Weise auch ausgeschlossen werden, dass bei verminderter Detektorsensitivität, auf Grund von Belägen im Kapillarrinneren, falsch auf eine Hemmung geschlossen wurde, wenn diese mit kleineren Signalen verbunden war.

Zur Berechnung des Substratumsatzes wurden drittens alle berechneten Anteile Q , inklusive des Anteils für das Substrat TY-ABD ($Q_{TY} = 1$), zusammengenommen und 100 % gesetzt. Da nur TY-ABD als Fluorophor eingesetzt wurde, war die Angabe in „% Substratumsatz“ möglich.

$$\text{Umsatz [\% Substratumsatz]} = 100 * \frac{Q_{p(TY)}}{\sum Q}$$

Formel 3.4 Auswertung CE: Berechnung des Substratumsatzes

Im Fall von Hemmstoffuntersuchungen wurde der Substratumsatz eines Ansatzes mit Hemmstoff ins Verhältnis zum Substratumsatz einer gewöhnlichen Umsatzprobe gestellt (Formel 3.5).

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \left(100 * \frac{\text{Umsatz}_{\text{Inhibitor}}}{\text{Umsatz}_{\text{DMSO}}}\right)$$

Formel 3.5 Auswertung CE: Berechnung der Hemmung durch einen Inhibitor

Wie eingangs bereits erwähnt, wurden die aus den bakteriellen Expressionen gewonnenen Enzympräparationen häufig über die CE Methode auf ihre Aktivität untersucht. Hier bereiteten unsaubere Proteinlösungen insofern Probleme, als dass sich an der Kapillarinenseite schneller und stärker Beläge bildeten, die zu schwächeren Signalen und damit zur verschlechterten Auswertbarkeit führten. Durch intensives Spülen mit Natronlauge konnten diese Effekte teils umgangen werden.

Zum Nachweis sehr kleiner Enzymaktivitäten eignete sich jedoch die CE Methode nicht. Seitdem die FP Methode vollständig etabliert war, konnte diese zum Nachweis geringer Umsätze herangezogen werden.

3.8.3 Berechnung von Aktivität und Hemmung via FP Assay

Umsätze im unteren Prozentbereich wurden via CE nicht erkannt. Bei Einsatz von 10 μM TY-ABD konnte ein Umsatz erst ab etwa 10 % sicher identifiziert werden. Anders verhält es sich beim FP Assay. Hier kann beispielsweise bei einer Ausgangskonzentration von 10 μM Substrat ein Umsatz von weniger als ein Prozent sicher erkannt werden.

Während infolge der Optimierung des FP Assays die Substratkonzentration in der Enzymreaktion von 10 μM auf 1 μM reduziert wurde, kann zur Beantwortung der Frage, ob überhaupt Aktivität vorhanden ist, die Substratkonzentration höher, z.B. 10 - 50 μM , gewählt werden. Auf diese Weise können auch geringe Umsätze von etwa 0,1 % zu einer deutlichen Absenkung des FP Signals gegenüber der Negativkontrolle (Maximalsignal) führen. Ein typisches Pipettierschema zur Myt1-Aktivitätsbestimmung mit erhöhten Substratkonzentrationen von 20 μM zeigt folgende Tabelle. Die Vorgehensweise zur Herstellung der Lösungen und zur Reihenfolge des Pipettierens stimmt mit den Angaben der Kapitel 3.6.1.6 f. überein. Zur Berechnung der Aktivität wurden folgende Ansätze benötigt: Der Umsatz kennzeichnet eine gewöhnliche Probe mit einem DMSO Gehalt von 1 %. Auch

hier enthielten von Beginn an alle Ansätze 1 % DMSO, da das Fernziel in der Testung von Inhibitoren lag. Außerdem wurden Ansätze für das Maximal- und Minimalsignal und den Blindwert (Blank) angefertigt. Der Blindwert diente der Korrektur der Signale mit dem Hintergrund.

Tabelle 3.13 Pipettierschema [μl] zur Myt1 Aktivitätsbestimmung mittels FP Assay

	Puffer+Mb	TY 100 μM	DMSO 20 %	Enzym	ATP 1 mM		EDTA 100 mM	pTpY-F5M 20 nM	pTpY-F5M+AK		
Umsatz	27,5	10	2,5	5	5	Inkubation 2 h bei 30 °C	25	0	25	Inkubation 20 - 30 min bei 30 °C	
NK (Max. Signal)	32,5	10	2,5	0	5		25	0	25		
Minimalsignal	37,5	5	2,5	0	5		25	25	0		
Blank	92,5	0	2,5	0	5		0	0	0		
Konz. Enzymreaktion		20 μM	1 %	10 %	10 μM						
Konz. Gesamtvolumen		10 μM	0,5 %	5 %	5 μM			25 mM	5 nM		5 nM / 0,3 $\mu\text{g/ml}$
	Enzymreaktion						Inkubationsansatz 2				

Die Auswertung der Messungen erfolgte zunächst mit Hilfe einer Excel Auswertemaske. Dabei dienten die um den Hintergrund korrigierten Fluoreszenzintensitäten beider Ebenen zur Berechnung der Polarisation nach Formel 3.6. Hierbei geht auch der K-Faktor ein, der während des *Gain Adjustments* die Feinjustierung beider Ebenen kennzeichnet. Er sollte stets nahe 1 liegen. Bei seiner Berechnung wurde der Ziel-Polarisationswert des Fluoresceins auf 35 mP festgelegt. Damit lässt sich durch einfaches Umstellen der Formel 3.6 der K-Faktor berechnen und im Umkehrschluss bei gegebenen K-Faktor die Polarisation der Proben.

$$P [mP] = \frac{I_{||} - K * I_{\perp}}{I_{||} + K * I_{\perp}} * 1000$$

Formel 3.6 Berechnung der Fluoreszenzpolarisation unter Beachtung des K-Faktors: Die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten für die vertikale ($I_{||}$) und die horizontale (I_{\perp}) Polarisationssebene sind hintergrundbereinigt.

Die Differenz der Fluoreszenzpolarisationen des Minimalsignals und der Negativkontrolle (Maximalsignal) bilden das Messfenster. Während das Minimalsignal die freie Sonde repräsentiert, stellt das Maximalsignal die vollständig gebundene Sonde dar. Infolge der Aktivität des Enzyms wird phosphoryliertes Peptid gebildet, welches in Konkurrenz zur Sonde um die AK-Bindung tritt. Ein 100 % Umsatz würde theoretisch, vorausgesetzt die Substratkonzentration ist zu Beginn der Enzymreaktion ausreichend hoch, das FP-Niveau der freien Sonde aufweisen und berechnet sich nach Formel 3.7. Die Umsatzprobe sollte einen Polarisationswert zwischen Maximal- und Minimalsignal annehmen.

$$100 \% \text{ Umsatz} \equiv FP_{Max} - FP_{Min}$$

Formel 3.7 Berechnung des 100 % Umsatzes im FP Assay

Der Substratumsatz in % wurde berechnet, indem der Quotient aus der Differenz der Polarisationswerte des Maximalsignals und der Umsatzprobe und der Differenz der Polarisationswerte des Maximalsignals und des Minimalsignals mit dem Faktor 100 multipliziert wurde (Formel 3.8). Der Begriff „Probe“ steht hier allgemein für eine Umsatzprobe mit DMSO oder mit Inhibitor.

$$\text{Substratumsatz [\%]} = \frac{FP_{Max} - FP_{Probe}}{FP_{Max} - FP_{Min}} \cdot 100$$

Formel 3.8 Berechnung des Substratumsatzes [%] im FP Assay

Die Hemmung in Prozent konnte berechnet werden, indem der Quotient aus der FP einer gewöhnlichen Umsatzprobe mit DMSO und einem „Umsatz Inhibitor“ mit 100 multipliziert und das Produkt von 100 subtrahiert wurde.

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{[\%] \text{ Substratumsatz Inhibitor}}{[\%] \text{ Substratumsatz DMSO}} \cdot 100$$

Formel 3.9 Berechnung der Hemmung [%] im FP Assay

3.9 Inhibitorentestung

Im Rahmen einer Diplomarbeit im Fachbereich Lebensmittelchemie erfolgte die Testung verschiedener Flavonoide und Resveratrol in Form eines Screenings über die CE Methode⁸⁸. Für diese Versuche wurden Enzympräparationen genutzt, die infolge der Fermentation von Expressionsmodell III hergestellt wurden. Der damals bestehende FP Assay in der Assayvariante 1 erwies sich zum damaligen Zeitpunkt als ungeeignet zur Testung oben genannter Verbindungen. Er wurde schließlich vollkommen neu in Form der Variante 2 aufgestellt.

Nach der Entwicklung der Assayvariante 2 erfolgten weitere Inhibitorentests, auf die in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird. Die Untersuchungen wurden mit Enzympräparationen der Myt1 und Wee1 Kinase aus Expressionen in Insektenzellen (siehe 3.7.3) durchgeführt. Während sich viele andere Präparationen auf Grund geringer Menge und Aktivität nicht für Hemmstoffuntersuchungen eigneten, zeichneten sich diese durch augenscheinlich hohe Umsätze aus und standen in ausreichender Menge zur Verfügung.

3.9.1 Untersuchte Verbindungen

Getestet wurden 22 verschiedene Verbindungen, zum Teil typische Tyrosinkinase-Inhibitoren und Substanzen für die in der Literatur eine Beeinflussung der Myt1 und Wee1 Kinase beschrieben ist. Als Standardinhibitoren an den Kinasen sollten die typischen ATP-kompetitiven Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib (Glivec[®] (Novartis))⁸⁹ und Sunitinib (Sutent[®] (Pfizer)) dienen. Einen weiteren Teil bildeten drei Verbindungen, die in der eigenen Arbeitsgruppe synthetisiert wurden. Dabei handelte es sich um zwei Endverbindungen der synthetisierten Alglykolipide α CG13 und β CG13 und einem Derivat einer Zwischenverbindung des Syntheseweges (BS4). Im Folgenden werden alle getesteten Verbindungen zur Übersicht aufgeführt:

Staurosporin	SB203580
Roscovitin	K252a
U0126	Tyrphostin
HA-1077	Bisindolylmaleimid (in DMF)
Gö6976	Dasatinib
Gefitinib	Lapatinib

Lestaurtinib	PKC412
Sunitinib	Imatinib
Erlotinib	Lapatinib
Vatalinib	BS4
α CG13	β CG13

Für die Testung wurden die Substanzen als 10 mM Stammlösung in DMSO gelöst. Die jeweilige Stammlösung diente anschließend der Herstellung einer 1 mM Verdünnung in mQ-Wasser mit einem DMSO Gehalt von 20 %. Imatinib wurde davon abweichend als 10 mM Lösung in mQ-Wasser gelöst, da die Verbindung als Mesylat vorlag. Alle Verbindungen wurden zunächst bei einer Konzentration von 50 μ M auf ihre Wirkung gegenüber der Myt1 getestet. Hätte eine Substanz bei dieser Konzentration eine Hemmung von > 50 % aufgewiesen, sollte diese später einer IC₅₀-Bestimmung unterzogen werden.

Für die Versuche mittels CE wurden 5 μ l der 1 mM Lösung auf den Probenansatz (Gesamtvolumen 100 μ l) gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 50 μ M bei einem DMSO Anteil von 1 % ergab. Da die Enzymreaktion im FP Assay in einem Volumen von 50 μ l stattfand, war hier nur die Zugabe von 2,5 μ l der 1 mM Hemmstofflösung notwendig, um eine Konzentration von 50 μ M mit einem DMSO Gehalt von 1 % einzustellen.

3.9.2 Testung mit Hilfe der CE Methode

Die Screeningversuche, die mittels CE Methode durchgeführt wurden, fanden alle am Gerät Prince unter Verwendung der im Abschnitt 3.6.2 aufgeführten Parameter und Methode statt. Bei dieser Testung kam bereits die optimierte CE Methode zum Einsatz. Die Ermittlung der Peakflächen erfolgte mit der gerätesteuern Software Borwin und anschließend mit Hilfe von Microsoft Excel.

Ein Ansatz ohne Testverbindung, nur mit 1 % DMSO, diente zur Definition des Substratumsatzes. Ein Blindwert, bestehend aus TY-ABD, ATP und Puffer, also ohne Kinase, definierte den Nullwert (keine Aktivität der Kinase) und diente der Korrektur der Peakflächen. Für die Verdünnung der Peptid SL und der ATP SL wurde ausschließlich Kinasepuffer verwendet. Alle Proben wiesen eine Peptidkonzentration von 10 μ M, eine ATP Konzentration von 100 μ M und eine Konzentration der Testverbindung von 50 μ M auf, außerdem wurde ein DMSO Gehalt von 1 % eingestellt. Die Inkubation aller Ansätze erfolgte für 90 min bei 30°C und 350 rpm im Thermoblock. Das Pipettierschema ist Tabelle 3.14 zu entnehmen.

Tabelle 3.14 Pipettierschema [μ l] der Screeningexperimente mittels CE Methode

	Kinase- puffer	DMSO [20 %]	TY-ABD [100 μM]	ATP [1 mM]	Enzym Präparation
Umsatzprobe Myt 1 / Wee 1	65	5	10	10	10
Umsatzprobe Inhibitor	75	5	10	10	-
Blindprobe ohne Enzym	75	5	10	10	-

Es wurde von links nach rechts in Eppendorfgefäße pipettiert. Die Lagerung der Lösungen erfolgte auf Eis bis zum Starten der Reaktion mit Enzym. Nach jeder Zugabe eines Bestandteiles erfolgte das Mischen der Probe mit Hilfe eines Vortexers, gegebenenfalls wurde die Probe zusätzlich kurz zentrifugiert. Das Assayvolumen betrug 100 μ l pro Ansatz. Für eine Messung an der CE wurden jeweils nur wenige Nanoliter benötigt. Dennoch war eine Mindestfüllhöhe von ca. 100 μ l pro Glasvial einzuhalten, damit die Kapillare während der Injektion ausreichend tief in die Messlösung eintauchen konnte. Nach der Inkubation erfolgte das Überführen der Lösungen in ein Glasvial und die direkte Vermessung an der CE. Die Messung wurde analog Abschnitt 3.6.2.1 durchgeführt. Das Ansetzen der Proben erfolgte zeitlich gestaffelt, mindestens mit einem 25minütigen Abstand zueinander, damit gewährleistet wurde, dass alle Proben nach der gleichen Inkubationszeit vermessen werden konnten. Es war davon auszugehen, dass mit der Injektion die Enzymreaktion gestoppt war, da zum einen der pH der Essigsäure zur Inaktivierung der Kinase beitrug und zum anderen die Komponenten voneinander bei der Elektrophorese getrennt wurden.

Nach der Versuchsdurchführung ließen sich Aussagen zu Substratumsatz und Hemmung der Verbindungen treffen. Hierzu wurden die Elektropherogramme ausgewertet. Die Quantifizierung beruhte auf der Ermittlung der Peakflächen und der Zu- bzw. Abnahme dieser durch die Kinasereaktion. Zunächst erfolgte die Zuordnung der Signale für TY-ABD und pTY-/TpY-ABD anhand der Retentionszeit und dem Vergleich mit den jeweiligen Elektropherogrammen der Referenzen. Zur Erinnerung: Eine Unterscheidung von TpY-ABD und pTY-ABD war über CE nur dann möglich, wenn die Messung mit einem niedrigen Laufdruck durchgeführt wurde. Da aber für die Feststellung einer Inhibition die Unterscheidung der monophosphorylierten Peptide nicht notwendig war, erfolgten die Messungen mit höherem Laufdruck und dadurch mit kürzeren Laufzeiten. Die Peakflächen wurden für alle Proben mit Inhibitor, den Blindwert und die Umsatzproben ermittelt. Die Berechnung von Substratumsatz und Hemmung erfolgte über die Formeln 3.3 bis 3.5.

3.9.3 Testung mit Hilfe des FP Assays

Die Durchführung der Testung erfolgte bezüglich der Assayparameter und der Herstellung und Zusammensetzung der Lösungen wie in Abschnitt 3.6.1.6 beschrieben. Sie fand damit vor der Optimierung des Assaysystems statt. Im Folgenden wird gesondert auf wichtige Punkte der Herstellung der Lösungen und der anschließenden Bestimmung eingegangen.

Die Herstellung der zu testenden Verbindungen ist Abschnitt 3.9.1 zu entnehmen. Für die Versuche wurden schwarze 96-Well *half-area* NBS Platten, Firma Corning mit EASYseal Klebefolien zum Verdunstungsschutz während der Inkubation verwendet. Alle Verdünnungen wurden in Eppendorfgefäßen angefertigt und für zehn Sekunden im Vortexer homogenisiert. Die Testung der Substanzen erfolgte je als Doppelbestimmung mit einer jeweiligen Konzentration von 50 µM pro Testverbindung bei einer DMSO Konzentration von 1 % einmal mit einer Myt1- und einmal mit einer Wee1 Enzympräparation. Bei allen anderen Ansätzen wurde zur Vergleichbarkeit ebenso ein DMSO Gehalt von 1 % eingestellt. Die Ansätze Umsatz Myt1 und Umsatz Wee1 enthielten keine Testverbindung und dienten zusammen mit dem Maximalsignal (NK) der grafischen Abschätzung eines Substratumsatzes. Diese Ansätze, sowie der Blindwert wurden dreifach angefertigt. Für die Einstellung des geräte- und methodenbedingten K-Faktors und zur Durchführung des GA wurde eine 150 nM Lösung der freien Fluoreszenzsonde (pTpY-F5M) verwendet. Zunächst erfolgte die Enzymreaktion während einer 90minütigen Inkubation bei 30 °C im Schüttler. Anschließend erfolgte durch Zugabe von EDTA das Abstoppen der Reaktion in dessen Folge die Sonde-AK-Lösung zugegeben wurde. Während einer erneuten Inkubation bei 30 °C auf dem Schüttler erfolgte die AK Bindung und somit die Vorbereitung der Detektion. In der Messlösung ergab sich für den AK eine Konzentration von 0,1 µg/ml. Zur besseren Übersicht zeigt Tabelle 3.15 das Pipettierschema mit den dazugehörigen Konzentrationen.

Tabelle 3.15 Pipettierschema [µl] der Screeningexperimente mittels FP Assay

	Puffer+Mb	TY 100 µM	DMSO 20%	Inhibitor 1 mM	Enzym- lösung	ATP 1 mM		TpY 5 µM	EDTA 100 mM	pTpY-F5M +AK	
Umsatz Myt1 / Wee 1	32,5	5	2,5	0	5	5	Enzymreaktion	0	25	25	
Umsatz Inhibitor	32,5	5	0	2,5	5	5		0	25	25	
Maximalsignal (NK)	37,5	5	2,5	0	0	5		0	25	25	
Positivkontrolle (PK)	31,5	5	2,5	0	5	5		1	25	25	
Blank	92,5	0	2,5	0	0	5		0	0	0	
Konz. Enzymreaktion		1 µM	1%	50 µM	10%	100 µM					
Konz. Gesamtvolumen		500 nM	0,50%	25 µM	5%	50 µM		50 nM	25 mM	5 nM / 0,1 µg/ml	

Zur Herstellung von Verdünnungen und zur Anfertigung der Ansätze wurde Kinasepuffer verwendet. Für eine höhere Richtigkeit und Präzision des Pipettiervorgangs wurden die Pipettierolumina gleicher Ansätze mit der jeweils benötigten Anzahl an Messpunkten zuzüglich eines kleinen Überschusses multipliziert und in Eppendorfgefäßen zusammenpipettiert. Die Lagerung der Lösungen erfolgte bis zur Vorlage in die Mikrotiterplatte auf Eis. Da für die Kontrolllösungen (Blindwert, Minimalsignal, Maximalsignal, Umsatz DMSO) die Bestimmung in Triplikaten vorgesehen war, wurden alle in Tabelle 3.15 angegebenen Volumina mit dem Faktor 3,5 multipliziert. Die Ansätze für die verschiedenen Inhibitoren wurden mit dem Faktor 2,2 multipliziert, da sie jeweils nur doppelt bestimmt wurden.

Blindwert (x 3,5):	323,8 µl Kinasepuffer 8,8 µl DMSO (20 %) 17,5 µl ATP (1 mM) → je 100 µl pro Well (3 x)
Maximalsignal (x 3,5):	131,3 µl Kinasepuffer 17,5 µl TY (100 µM) 8,8 µl DMSO (20 %) 17,5 µl ATP (1 mM) → je 50 µl pro Well (3 x)
Positivkontrolle (x 3,5):	110,3 µl Kinasepuffer 17,5 µl TY (100 µM) 8,8 µl DMSO (20 %) 17,5 µl ATP (1 mM) → je 44 µl pro Well (3 x)
Umsatz Myt1 / Wee 1 (x 7):	227,6 µl Kinasepuffer 35 µl TY (100 µM) 17,5 µl DMSO (20 %) 35 µl ATP (1 mM) → je 45 µl pro Well (3 x)
Umsatz Inhibitor (22 x 2,2):	1573 µl Kinasepuffer 242 µl TY (100 µM) → je 88 µl pro Eppendorfgesäß Zugabe von je 5,5 µl Inhibitor (1 mM) und 11 µl ATP (1 mM) → je 45 µl pro Well (2 x)

Die jeweils angegebenen Volumina wurden in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von je 5 µl Enzympräparation der Myt1 oder Wee 1 gestartet. Nachdem beide Inkubationsschritte abgeschlossen waren, wurden die Proben im Plattenreader vermessen. Die Auswertung erfolgte graphisch mit Hilfe der Software GraphPad Prism.

4 Ergebnisse und Diskussion

Angeichts der Komplexität der Aufgabenstellung und der unterschiedlichen Arbeiten, die fachübergreifend pharmazeutische, biotechnologische und teils biochemische Tätigkeiten erforderten, wird zur besseren Übersicht jeder Themenabschnitt mit einer Zusammenfassung und Diskussion beendet. Abschließend werden im Rahmen einer Schlussbetrachtung nochmals eine Zusammenfassung und ein Ausblick gegeben.

Die Präsentation von Ergebnissen der Testung über den FP Assay erfolgt entweder als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) bzw. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) oder als Box-Whisker-Plot mit dem Median, Interquartilsabstand (Box) und dem kleinsten und größten Datenwert (Whisker).

4.1 Fluoreszenzmarkierte Peptide als Substrate

4.1.1 Peptididentifizierung mittels MALDI-TOF/TOF- und LTQ-Orbitrap-XL-MS

Um zu verifizieren, dass die von der Fa. Probiobdrug synthetisierten, CDC2-abgewandelten Peptide tatsächlich der gewünschten Sequenz und Aminosäurezusammensetzung entsprechen, sollten die Lösungen der Peptide mittels MALDI-TOF/TOF-MS untersucht werden. Hierzu wurden die Peptide TY, TpY und pTpY in einer Endkonzentration von ca. 400 nM mit Matrix kokristallisiert und vermessen. pTY wurde zu einem späteren Zeitpunkt mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS identifiziert.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-MS für TY, TpY und pTpY zeigen Abb. 4.44 bis Abb. 4.46 (siehe Anhang). Das mittels LTQ-Orbitrap-XL erstellte Massenspektrum für pTY zeigt Abb. 4.47 (siehe Anhang). Ein Vergleich der theoretischen und gefundenen Massen, sowie deren prozentuale Abweichung wird in Tabelle 4.1 geführt.

Tabelle 4.1 Gegenüberstellung der theoretischen und der tatsächlich gefundenen monoisotopischen Massen von TY, TpY, pTY und pTpY und deren prozentuale Abweichung

	TY	pTY	TpY	pTpY
Theoretische Masse	1544,77 [M+H] ⁺	1625,70 [M+2H] ⁺²	1622,70 [M-H] ⁻	1702,70 [M-H] ⁻
Gefundene Masse	1544,77	1625,88	1622,70	1702,65
Abweichung [%]	0	+ 0,01	0	- 0,003

4.1.2 Quantifizierung von TY Stammlösung

4.1.2.1 Absorptionsmessung bei 280 nm

Der molare Absorptionskoeffizient bei 280 nm eines Peptids oder Proteins ist abhängig vom Gehalt an Tryptophan (W), Tyrosin (Y) und Cystin (C-C) und errechnet sich aus der jeweiligen Anzahl (n) dieser Aminosäuren sowie der für die Aminosäure charakteristischen molaren Absorption bei 280 nm (Formel 4.1).

$$\epsilon_{280\text{ nm}} = (nW \cdot 5500) + (nY \cdot 1490) + (n \cdot C \cdot 125)$$

Formel 4.1 Formel zur Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ bei 280 nm für Peptide oder Proteine⁶⁸

Da das hier verwendete Peptid weder Cystin-, noch Tryptophan-, aber zwei Tyrosinreste enthält, beträgt der molare Extinktionskoeffizient für TY (ϵ_{TY}) $2980\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Für die 1:20 verdünnte TY Lösung ergab sich eine Absorption von 0,063. Mit Hilfe der Formel 4.1, dem molaren Extinktionskoeffizienten für TY von $2980\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, der Weglänge $L = 0,099\text{ cm}$ und der Beachtung eines Verdünnungsfaktors von 20 ergibt sich daher mit Hilfe der Berechnung nach dem Lambert Beer'schen Gesetz ($A = \epsilon cL$) eine Konzentration c der TY SL von 4,27 mM, also rund 4,3 mM.

4.1.2.2 Hydrolyse und Quantifizierung über HPLC

Flüssigchromatographisch konnte gezeigt werden, dass eine 20stündige Hydrolyse, wie unter 3.5.3.2 beschrieben, ausreicht, um die hier verwendeten Peptide vollständig in ihre Aminosäuren zu hydrolysieren.

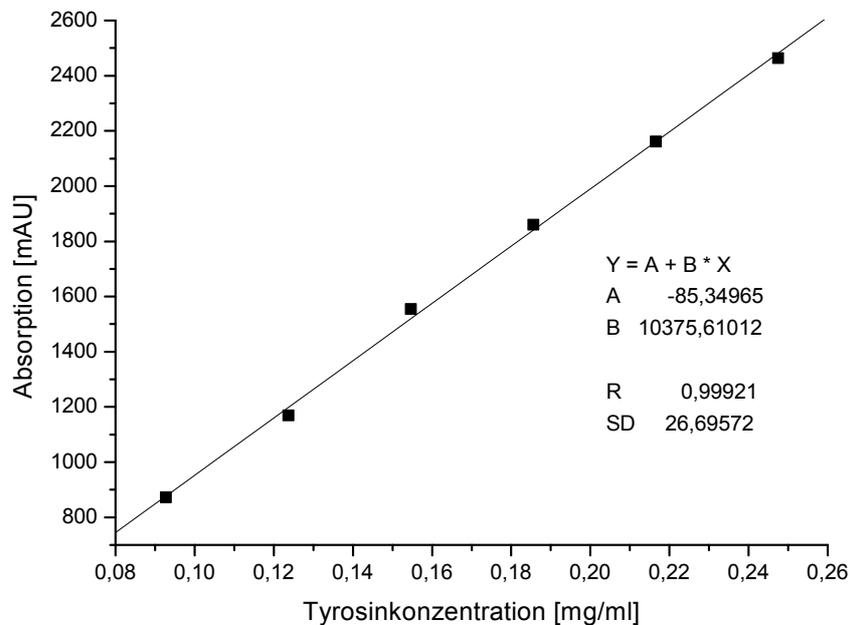


Abb. 4.1 Kalibriergerade für Tyrosinbestimmung im Peptidhydrolysat

Chromatogramme der Probenhydrolysate enthielten nach Vergleich mit einem Chromatogramm der Peptidlösung kein Signal für das intakte Peptid. Für die Quantifizierung über eine externe Kalibrierung

wurden die für die Tyrosinstandards ermittelten Peakflächen in Abhängigkeit ihrer Konzentration dargestellt (Abb. 4.1). Über lineare Regression wurde eine Kalibriergerade erhalten.

Die Quantifizierung der Proben erfolgte über die Ermittlung der Peakfläche des durch Tyrosin in den Probenhydrolysaten gebildeten Signals bei 280 nm. Unter Beachtung der Tatsache, dass jedes Molekül Peptid zwei Moleküle Tyrosin nach Hydrolyse liefert, konnte für die TY SL somit eine Konzentration von 4,5 mM ermittelt werden.

4.1.2.3 Vergleich der beiden Methoden

Tabelle 4.2 stellt noch einmal die Ergebnisse der zwei verschiedenen Quantifizierungsmethoden gegenüber.

Tabelle 4.2 Gegenüberstellung der ermittelten und der theoretischen Konzentration der TY SL

Peptid	Theoretische Konz. [mM]	Konz. [mM] (nach 3.5.3.1)	Konz. [mM] (nach 3.5.3.2)
TY	7,8	4,3	4,5

Es zeigt sich, dass beide Methoden ähnliche Ergebnisse liefern. Deutlich wird aber auch, dass die unter 3.5.1 errechnete, theoretische Konzentration der TY Lösung stark von den hier ermittelten Konzentrationen abweicht. Damit ergab sich eine „Reinheit“ für TY von ca. 57 %, bezogen auf die ursprüngliche Einwaage von 11,02 mg. Ein großer Teil der „Verunreinigung“ dürfte somit auf das in den Peptidlyophilisaten enthaltene TFA-Salz entfallen, da das von der Firma mitgelieferte Datenblatt eine Reinheit für TY von 98,35 % vorgab und auch das Chromatogramm der Peptidlösung keine größeren Nebenpeaks zeigte.

Obwohl die Absorptionsmessung der Peptidlösungen bei 280 nm wesentlich weniger experimentellen Aufwand bereitete, wurde für alle weiteren Konzentrationsbestimmungen die Methode der Säurehydrolyse mit anschließender Detektion des Tyrosins über HPLC (3.5.3.2) gewählt. Erstens, weil weniger Peptidlösung für die Methode 2 benötigt wurde und zweitens, hauptsächlich die Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten Peptide notwendig war. Die Beeinflussung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{ nm}}$ durch den Fluoreszenzmarker ist wahrscheinlich, jedoch wegen fehlender Daten nicht quantifizierbar und somit nicht abschätzbar. Aus diesem Grund ist die Methode 3.5.3.1 nur für die unmodifizierten Peptide geeignet. In allen folgenden Untersuchungen wurde für die TY SL, die über HPLC Bestimmung erhaltene Konzentration von 4,5 mM angenommen.

4.1.3 Identifizierung der fluoreszenzmarkierten Peptide

Um die korrekte Bildung der fluoreszenzmarkierten Peptide und damit verbunden, die erfolgreiche flüssigchromatographische Aufreinigung dieser Verbindungen nachzuweisen, wurde von der jeweils gewonnenen Fraktion des markierten Peptids ein Massenspektrum angefertigt.

4.1.3.1 ABD-markierte Peptide

Ein Chromatogramm der Aufreinigung eines Markierungsansatzes von pTpY mit ABD-F zeigt Abb. 4.2.

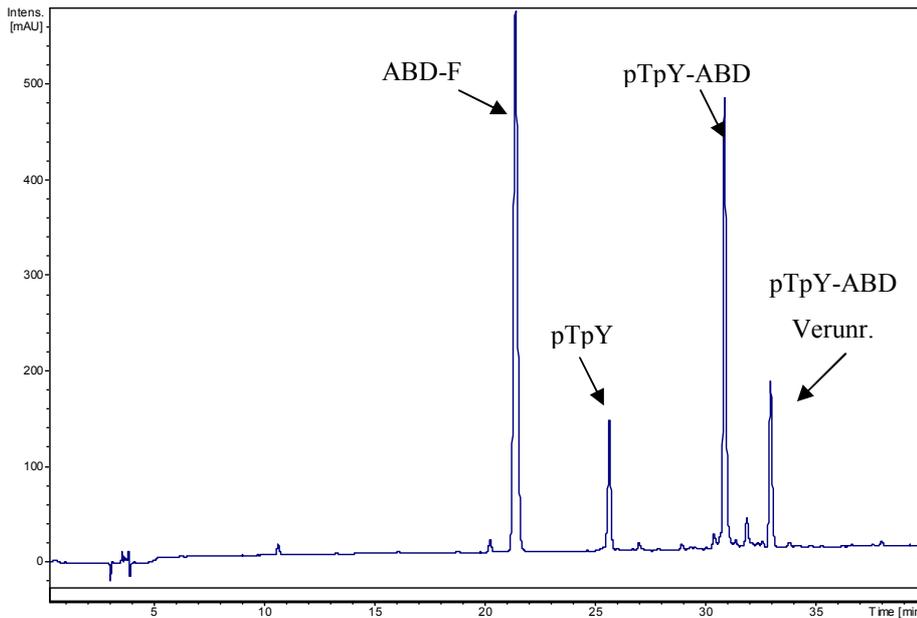


Abb. 4.2 Beispielchromatogramm für einen Markierungsansatz mit ABD-F: Umsetzung von pTpY mit ABD-F; Darstellung der Absorption bei 214 nm. Per LTQ-Orbitrap-XL-MS konnte für pTpY-ABD das richtige Signal zugeordnet werden und die Verunreinigung als ein um zwei Aminosäuren verkürztes pTpY-ABD-Derivat identifiziert werden.

Alle vier Peptide wurden mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS in Verbindung mit einer *off line* nano-ESI untersucht. Die Ergebnisse inklusive der theoretischen und der gefundenen Massen, sowie deren prozentuale Abweichung zeigen Tabelle 4.3 bzw. Abb. 4.48 bis Abb. 4.51 im Anhang. Die theoretische Masse von ABD-F - markiertem Peptid lässt sich am Beispiel von TY-ABD folgendermaßen errechnen:

1543,77	TY		
+ 216,995	ABD-F		
- 1	Wasserstoff (der Thiolfunktion)		
- 19	Fluorid (des ABD-F)		
1740,765	TY-ABD (entspricht [M])	→	[M+H] ⁺ = 1741,765

Formel 4.2 Berechnung der Masse von TY-ABD

Tabelle 4.3 Gegenüberstellung der theoretischen und der tatsächlich gefundenen monoisotopischen Massen von TY-ABD, TpY-ABD, pTY-ABD und pTpY-ABD sowie deren prozentuale Abweichung

	TY-ABD	pTY-ABD	TpY-ABD	pTpY-ABD
Theoretische Masse	871,385 [M+2H] ⁺²	911,35 [M+2H] ⁺²	911,35 [M+2H] ⁺²	951,35 [M+2H] ⁺²
Gefundene Masse	871,389	911,38	911,38	951,35
Abweichung [%]	+0,0005	+0,004	+0,004	0

4.1.3.2 F5M – markiertes pTpY

Ein Chromatogramm der Aufreinigung eines Markierungsansatzes von pTpY mit Fluorescein-5-Maleimid zeigt Abb. 4.3.

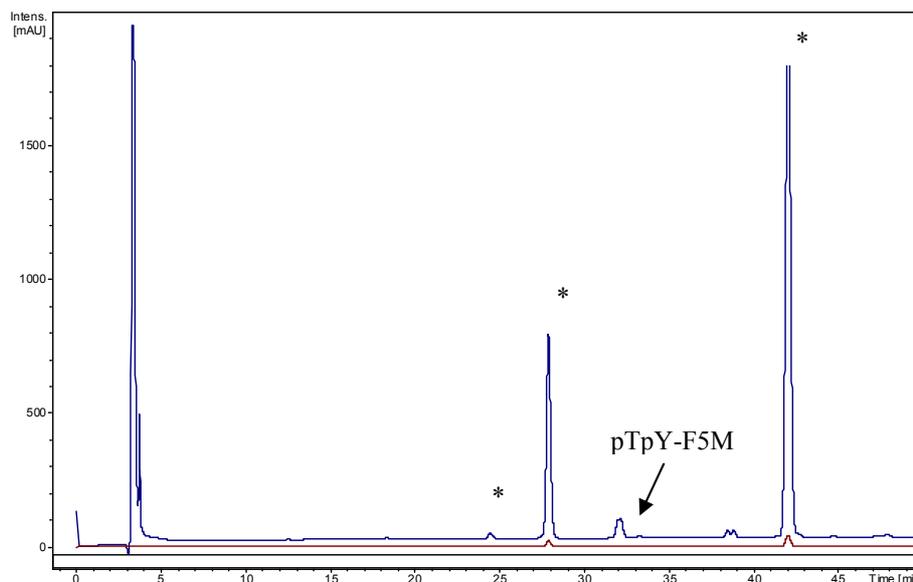


Abb. 4.3 Beispielchromatogramm für einen Markierungsansatz mit F5M: Umsetzung von pTpY mit F5M; Darstellung der Absorption bei 214 nm (blau) und 485 nm (rot). Per LTQ-Orbitrap-XL-MS konnte für pTpY-F5M das richtige Signal zugeordnet werden. Weitere mit * markierte Peaks sind Verunreinigungen des F5M.

Die Identität von pTpY-F5M konnte mittels massenspektrometrischer Analyse an einem LTQ-Orbitrap-XL-MS in Verbindung mit einer *off line* nano-ESI (Abb. 4.52, siehe Anhang) nachgewiesen werden. Neben dem gewünschten Produkt konnten durch Vergleich mit einem Chromatogramm einer Lösung von F5M drei weitere Peaks dem Markierungsreagenz zugeordnet werden. Es erfolgte keine weitere Identifizierung dieser vermutlich durch Abbau bzw. Hydrolyse entstandenen Verunreinigungen⁷⁸.

Eine Markierung der Peptide TY, pTY und TpY mit F5M war für die Anwendung im FP Assay nicht notwendig. Die theoretische Masse von pTpY-F5M ergibt sich aus folgender Berechnung:

1703,70	pTpY		
+ 427,07	F5M		
+ 1	Wasserstoff (der an die Doppelbindung des Maleimids addiert wird)		
- 1	Wasserstoff (der Thiofunktion)		
2130,77	pTpY-F5M (entspricht [M])	→	[M+3H] ³⁺ = 711,26

Formel 4.3 Berechnung der Masse von pTpY-F5M

Im Massenspektrum wurde ein Molekülion $[M+3H]^{3+}$ mit einer Masse/Ladungszahl von 711,603 identifiziert. Auf der Grundlage dieses Ergebnisses lässt sich eine tatsächliche Masse von 2131,809 g/mol errechnen. Somit weicht die gefundene von der theoretisch ermittelten Masse um 1,03 Masseneinheiten ab. KRISTJÁNSDOTTÍR et al. erwarteten ein theoretisches Molekulargewicht von 2131,1 g/mol, konnten jedoch nur ein um 2 Masseneinheiten größeres Produkt (MW 2133 g/mol) nachweisen⁶¹.

4.1.4 Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten Peptide

Die in mQ-Wasser gelösten Peptid-ABD und pTpY-F5M Lyophilisate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Ein Teil der hergestellten Lösung diente der Konzentrationsbestimmung, die notwendig war, um Umsatzversuche mit Enzym durchführen zu können. Die Quantifizierung der unterschiedliche Fluoreszenzmarker tragenden Peptide wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Während die Quantifizierung der ABD-markierten Peptide über HPLC erfolgte, wurde das F5M – markierte pTpY fluorimetrisch bestimmt.

4.1.4.1 ABD-markierte Peptide

Hier wurde das unter 3.5.3.2 für unbehandeltes Peptid beschriebene Verfahren der Säurehydrolyse in die Aminosäuren mit anschließender Quantifizierung des Tyrosins über HPLC angewendet. Die Auswertung erfolgte analog 4.1.2.2 mit der Ausnahme, dass hier Tyrosinstandards niedrigerer Konzentrationen (25 – 66 µg/ml) für die Erstellung einer Kalibriergeraden im Konzentrationsbereich der Proben notwendig waren. Es wurden Peptid-ABD Lösungen von 0,5 mM bis ca. 2 mM erhalten.

4.1.4.2 F5M-markiertes pTpY

Die Quantifizierung von pTpY-F5M konnte im Gegensatz zu den ABD-markierten Peptiden fluorimetrisch erfolgen, da mit Fluorescein-5-maleimid bereits ein fluoreszierendes Agens vorlag, welches als Standard fungieren konnte. Das Benzuofurazanderivat ABD-F fluoresziert nicht in freier, unkonjugierter Form und kann daher nicht für einen solchen Zweck der externen Kalibrierung eingesetzt werden.

Die Durchführung erfolgte gemäß Abschnitt 3.5.9. Zur Erstellung einer Kalibrierfunktion wurden die jeweiligen Fluoreszenzmaxima der Emissionsspektren der Kalibrierlösungen grafisch ermittelt und gegen die Konzentration aufgetragen. Abb. 4.4 zeigt die Emissionsspektren der Standards und Abb. 4.5 die über lineare Regression erhaltene Kalibrierfunktion.

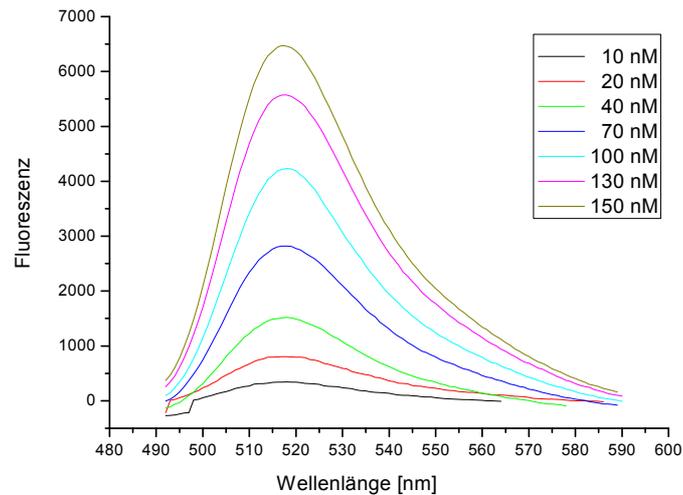


Abb. 4.4 Emissionsspektren der Kalibrierlösungen von Fluorescein-5-maleimid

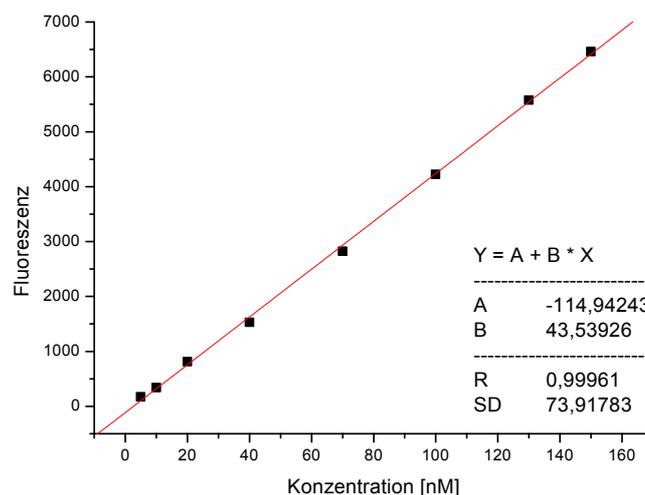


Abb. 4.5 Kalibriergerade zur Quantifizierung von pTpY-F5M: Die Messpunkte stellen die jeweiligen Emissionsmaxima der F5M - Standards in Abhängigkeit der Konzentration dar.

Die pTpY-F5M SL wurde mit 1x PBS-Puffer verdünnt, so dass die Probe unter Einbeziehung der theoretisch ermittelten Konzentration im Kalibrierbereich lag. Für beide Verdünnungsstufen wurde das Emissionsmaximum bei 520 nm bestimmt und die Konzentration der pTpY-F5M SL mit Hilfe der Kalibrierfunktion berechnet. So wurde z.B. bei einer theoretisch angenommenen Konzentration der SL von 120 μM (ausgehend von einer 80 %igen Ausbeute bei Markierung und Reinigung) diese 1:1000 und 1:2000 verdünnt und das Emissionsspektrum der so angefertigten Probenlösung aufgenommen. Die Berechnung ergab mit Hilfe der Kalibrierfunktion eine Konzentration der SL von 53 μM . Dies zeigt, dass die Gesamtausbeute der Markierung und Aufreinigung mit rund 35 % weitaus schlechter war, als zuvor mit 80 % angenommen. Die Verluste sind vermutlich hauptsächlich der Aufreinigungsstrategie geschuldet, da das Sammeln der Fraktionen jeweils nur in der oberen Hälfte des Peaks erfolgen konnte, um relativ reines pTpY-F5M zu erhalten.

4.1.5 Fluoreszenzspektren

Als eines der ersten Experimente, nachdem fluoreszenzmarkiertes Peptid zur Verfügung stand, wurden Fluoreszenzspektren des mit ABD-F markierten TY, stellvertretend für alle übrigen ABD-markierten Peptide, und pTpY-F5M aufgenommen.

Während ABD-F für sich allein genommen nicht fluoresziert, weisen die ABD-Peptidkonjugate eine maximale Fluoreszenzintensität bei pH 2 auf⁷². Es erfolgte eine Überprüfung des Fluoreszenzverhaltens von TY-ABD zum einen in 2 M Essigsäure und zum anderen in Tris/HCl Puffer pH 7,6. Das Absorptionsmaximum lag für beide Lösungsmittel bei ca. 400 nm, das Emissionsmaximum zwischen 520 und 530 nm. Es zeigte sich außerdem, dass auch bei pH-Werten größer sieben das TY-ABD Konjugat fluoresziert. Dies war eine Voraussetzung dafür, dass, wie ursprünglich geplant, auch Messungen der Fluoreszenzpolarisation am Plattenreader vorgenommen werden konnten. Für diese musste ein pH-Wert im Bereich von 7,4 - 7,6 eingehalten werden, da hier ein Antikörper eingesetzt werden sollte. Die höheren Fluoreszenzintensitäten des Peptid-ABD Konjugats unter sauren Bedingungen kamen wiederum den Messungen an der CE zugute, da für die Trennung der unterschiedlich phosphorylierten Peptide 2 M Essigsäure eingesetzt wurde.

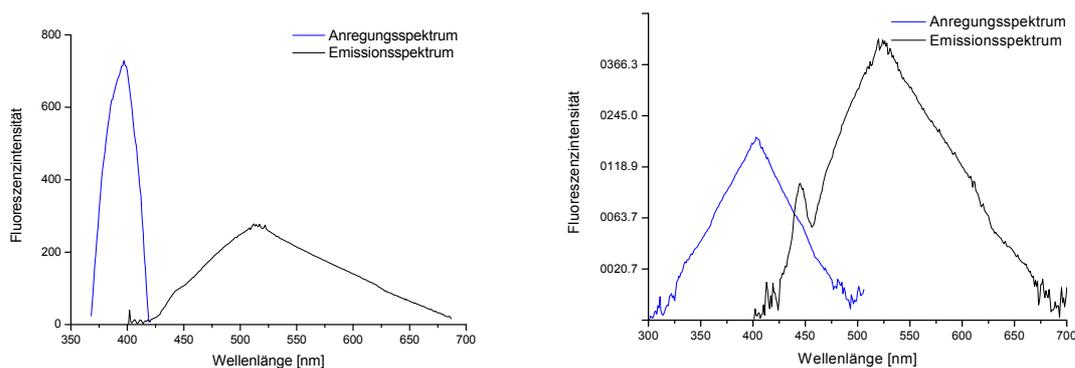


Abb. 4.6 Anregungs- und Emissionsspektrum von TY-ABD: Aufnahme der Spektren einer 5 μ M Lösung von TY-ABD in 2 M Essigsäure (Spektrum links) und in Tris/HCl Puffer pH 7,6 (Spektrum rechts).

Da für die Messungen der Fluoreszenzpolarisation Emissionsfilter von 520 nm eingesetzt wurden, war eine nahezu maximale Signalausbeute möglich.

Sowohl das Markierungsreagenz F5M allein als auch in Konjugation zum pTpY über eine Sulfidbrücke weisen eine ausgeprägte Fluoreszenz im Bereich von 520 nm auf. Im Gegensatz zu ABD-Konjugaten nimmt die Fluoreszenzintensität bei pH-Werten < 7 ab. Da für die Trennung der Peptidreferenzen über CE ein pH-Wert von ca. 2 benötigt wurde, eignete sich pTpY-F5M für die CE Methode nicht. pTpY-F5M wurde aus diesem Grund, der sehr guten Fluoreszenzintensität zum Trotz, nur für den FP Assay eingesetzt. Die Suche nach einem alternativen Markierungsreagenz mit Fluoreszenzmaximum im Sauren ergab die potentielle Eignung der Substanz ABD-F.

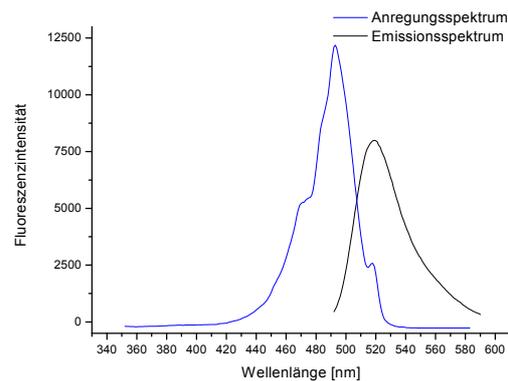


Abb. 4.7 Anregungs- und Emissionsspektrum von pTpY-F5M: Aufnahme der Spektren einer 50 nM Lösung von pTpY-F5M in 1x PBS-Puffer pH 7,1.

Durch Vergleich der Spektren von pTpY-F5M und TY-ABD wird deutlich, dass das Fluorescein-markierte Peptid um etwa drei Zehnerpotenzen stärker fluoresziert. Diese Eigenschaft bedingt später die bessere Eignung für den FP Assay.

4.1.6 Zusammenfassung

Die bis hierhin vorgestellten Ergebnisse schaffen die Grundlage für einige folgende Abschnitte, die sich mit der Entwicklung von Testsystemen für die Myt1 beschäftigen. Auf Basis zweier Veröffentlichungen von KRISTJÁNSDÓTTIR et al. und ZHOU et al. sollte ein FP Assay etabliert werden, der sich an der aufgeführten Literatur orientiert. Während sich der etablierte FP Assay im Nachhinein betrachtet in einigen Details von dem durch KRISTJÁNSDÓTTIR vorgestellten Assay unterscheidet, wurde das eingesetzte Substrat exakt aus der Literatur übernommen. Bei dem Substrat handelt es sich nicht um die gesamte CDC2, sondern um ein 14 Aminosäuren umfassendes Peptid, welches sich an die Sequenz der CDC2 anlehnt. Eine Abweichung besteht einmal am C-Terminus, hier wurde Glycin durch Cystein ersetzt, um eine Fluoreszenzmarkierung über die Thiofunktion einzubringen. Der zweite Austausch wurde am N-Terminus des Peptids vollzogen – Glutaminsäure wurde ohne nachvollziehbaren Grund durch Glutamin ersetzt. N-terminale Glutamine neigen zur Pyroglutaminsäure-Bildung unter Abspaltung von Ammoniak. Für den FP-Assay scheint dies bedeutungslos zu sein. Dass dieser Austausch Auswirkungen auf das zweite Testsystem, die CE Methode haben könnte, war zu Beginn der Entwicklung noch nicht absehbar. An dieser Stelle sei nur kurz erwähnt, dass die Zyklisierungsreaktion am N-Terminus zum Verlust einer positiven Ladung führt, was das Laufverhalten bei der CE beeinflusst (siehe Punkt 4.2.2.3). Um diese Vorgänge auszuschließen, könnte für die Zukunft der Austausch des N-terminalen Glutamins gegen Glutaminsäure, die native Aminosäure an dieser Position der CDC2, erwogen werden.

Während ZHOU et al. im FP Assay genau das oben erwähnte CDC2-abgewandelte Peptidsubstrat zur Testung von Myt1 Kinase-Inhibitoren einsetzen, sich aber in den übrigen Punkten auf KRISTJÁNSDÓTTIR beziehen, beschreibt dieser, dass Wee1, aber nicht Myt1 zur Phosphorylierung des Peptidsubstrates führen würde. Deshalb wurde für die Myt1 Testung Cdk2/CyclinA als Substrat eingesetzt, welches anschließend einem Trypsinverdau zu pTpY unterworfen werden musste, um die Messung im FP Assay durchführen zu können. Hier unterscheiden sich also die Literaturangaben zur Substratspezifität der Myt1 Kinase deutlich voneinander.

In Bezug auf diese Thematik werden derzeit in der Arbeitsgruppe Dr. Schmidt Experimente mit unterschiedlichen Substraten und Myt1-Präparationen sowohl aus *E. coli* als auch aus humanen Zellen durchgeführt. Das CDC2-abgewandelte Peptid sowie die gesamte CDC2 und ein Komplex aus CDC2 und Cyclin werden dabei als potentielle Substrate eingesetzt. Diese Untersuchungen könnten mehr Klarheit über die Substratspezifität der einzelnen Enzympräparationen geben. Da beide Testsysteme auf die Wee1 Kinase adaptierbar sind und diese Kinase in das Untersuchungsspektrum der Arbeitsgruppe aufgenommen werden soll, wäre es interessant, ob die Literaturangaben bezüglich der Substratspezifität der Wee1 Kinase bestätigt werden können und hier eine Aktivität bei Einsatz des pTY Substrates, jedoch nicht bei Verwendung von TY messbar ist.

Der Problematik um die Substratspezifität der Wee Kinasen ungeachtet, konnte die Entwicklung der Testsysteme nur unter der Voraussetzung einer umfassenden Charakterisierung der Peptide TY, pTY, TpY und pTpY, deren Fluoreszenzmarkierung mit ABD-F und F5M und einer genauen Untersuchung der markierten Peptide erfolgen. Genau dieses Ziel konnte über die oben dargestellten Methoden erreicht werden.

4.2 Testsysteme zur Aktivitätsbestimmung der Kinase Myt1

Ziel der Arbeitsgruppe Medizinische Chemie unter Leitung von Prof. W. Sippl ist die Synthese und kontinuierliche Testung potentieller Inhibitoren der Myt1. Dazu war die Entwicklung von Methoden notwendig, die Aktivitätsmessungen und somit auch Substanztestungen an der Myt1 ermöglichen.

4.2.1 Entwicklung eines Fluoreszenzpolarisations Assays

KRISTJÁNSDÓTTIR et al. beschrieben 2003⁶¹ einen kompetitiven Myt1 Kinaseassay. Sie verwendeten darin als Substrat der Myt1 und Wee1 sowohl ein CDC2-abgewandeltes Peptid mit den beiden Phosphorylierungsstellen Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ als auch das native Proteinsubstrat Cdk2/CycA. Das CDC2-abgewandelte Peptid war mit Fluorescein-5-maleimid C-terminal über die Thiofunktion des Cysteins fluoreszenzmarkiert. Die Messung der Fluoreszenzpolarisation erfolgte nach der Kinasereaktion, bei der phosphoryliertes Substrat gebildet wurde, durch Zugabe eines spezifisch gegen phosphoryliertes Peptid gerichteten Antikörpers. Ein kompetitiver Ansatz ergab sich dadurch, dass zu einer Lösung aus AK und phosphoryliertem, fluoreszenzmarkiertem Referenzpeptid (hohes FP Signal) der Kinaseansatz mit phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid zugegeben wurde. Hier kam es durch phosphoryliertes Peptid zu einer kompetitiven Verdrängung des fluoreszenzmarkierten, phosphorylierten Referenzpeptids aus der Antikörperbindung (niedriges FP Signal). ZHOU et al. griffen den zuvor beschriebenen Assay 2005 zur Testung von marinen Algenglykolipiden¹⁰ auf. Sie führten den Assay jedoch nicht kompetitiv, sondern einfach durch und nutzten nur CDC2-abgewandeltes Peptid als Substrat der Myt1 Kinase. Es wurde also nach einer Kinasereaktion direkt die Erhöhung der Fluoreszenzpolarisation durch AK-Zugabe gemessen.

Der in der Arbeitsgruppe Schmidt inzwischen etablierte FP Immunoassay (Assayvariante 2) weist einen kompetitiven Charakter auf. Als Fluoreszenzsonde wird, wie in genannter Literatur beschrieben, CDC2-abgewandeltes Peptid, welches mit dem Fluoreszenzmarker Fluorescein-5-maleimid (F5M) gekoppelt

wird, verwendet. Damit lehnt sich der hier entwickelte Assay stark an die Merkmale des von KRISTJÁNSDÓTTIR entwickelten Assays an. Im Folgenden werden beide Varianten des Assayaufbaus vorgestellt:

Assayvariante 1

In der Entwicklung des Assays wurde zunächst der in Abb. 4.8 dargestellte Aufbau angestrebt. Da für die CE Methode Peptide verwendet wurden, die als Fluoreszenzmarker ein Benzofurazanderivat (4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan, ABD-F) trugen, sollte der FP-Assay ebenfalls auf Grundlage dieser Peptide in einer nicht kompetitiven, an ZHOU et al. angelehnten Form, entwickelt werden. Auf diese Weise hätten dieselben fluoreszierenden Substrate in zwei verschiedenen Assaysystemen eingesetzt werden können.

ABD-F wird über die Thiofunktion der endständigen Aminosäure Cystein an das Peptid kovalent gebunden und wird dadurch zu einem fluoreszierenden Molekül, TY-ABD genannt. Das Peptid TY stellt gemäß ZHOU et al. das Substrat der hier untersuchten Myt1 dar und kann durch dieses Enzym in einer Kinasereaktion sowohl am Tyrosin (Tyr¹⁵ bzw. Y¹⁵) als auch am Threonin (Thr¹⁴ bzw. T¹⁴) phosphoryliert werden (siehe dazu auch Kapitel 2.2.2.2). Neben dem markierten Peptid TY-ABD existierten drei weitere Modifikationen, die als Referenzpeptide fungierten und die Möglichkeiten der unterschiedlichen Phosphorylierung von TY repräsentieren – pTY, TpY und pTpY. Sie dienten in fluoreszenzmarkierter Form zum einen der Entwicklung des FP Assays in der Variante 1, und zum anderen bei der CE Methode als Referenzen zur Bestimmung der Retentionszeiten im Elektropherogramm (siehe 4.2.2).

Die Fluoreszenzsonden für sich allein genommen weisen keine hohen Fluoreszenzpolarisationen auf, da sie relativ kleine Moleküle von 1741 Da (TY-ABD) bis 1900 Da (pTpY-ABD) darstellen. Zu einer Erhöhung der Polarisation kommt es für ein kleines fluoreszierendes Molekül, z.B. pTpY-ABD, durch Bindung an ein Makromolekül, im vorliegenden Fall durch Bindung eines Antikörpers. Der hier verwendete AK ist CDC2-spezifisch gegen phosphoryliertes Tyr¹⁵ gerichtet und bindet somit selektiv TpY oder pTpY. Bezogen auf die Kinasereaktion im Assay bedeutet das Folgendes: Kinase führt in Anwesenheit von ATP als Cosubstrat zur Phosphorylierung von TY-ABD. Die Zugabe von AK bewirkt eine selektive Bindung des entstandenen TpY-ABDs oder pTpY-ABDs, welches zu einer Erhöhung des Polarisationssignals führt (Abb. 4.8).

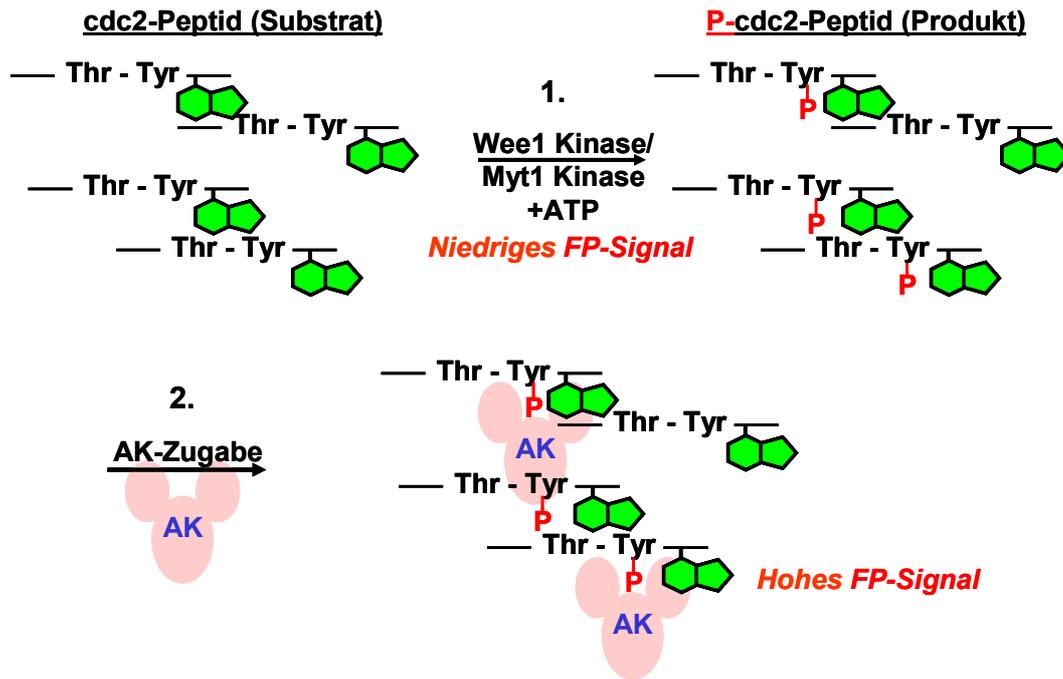


Abb. 4.8 Schema für den FP Assay, Variante 1: Fluoreszenzmarkiertes CDC2-abgewandeltes Peptid wird in einer ersten Reaktion mit Kinase und ATP umgesetzt. Der Ansatz weist ein niedriges FP-Signal auf. Erst nach Zugabe eines spezifischen Phospho-CDC2 (Tyr¹⁵) AK in einer zweiten Reaktion erhöht sich das Polarisationssignal.

Wird im Fall von Hemmstoffuntersuchungen die Kinaseaktivität gehemmt, kommt es in Folge einer verminderten Phosphorylierung von TY-ABD zu einer geringeren Signalerhöhung.

Bei diesem Assay wurde bovines Serumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 2,5 % eingesetzt, da zum einen herstellerseitig für die Verdünnung des AK ein BSA Gehalt von 5 % empfohlen wurde, und zum anderen angenommen wurde, dass auf diese Weise das Anhaften des AK an Wandungen von Eppendorfgefäßen und Wells verhindert werden könnte. Jedoch musste letztlich festgestellt werden, dass ein so hoher Anteil von BSA auch zu unspezifischen Adsorptionen der Sonde an das Protein führt, was bewirkt, dass die Reaktion zwischen AK und Sonde nicht richtig abläuft. Auffallend war außerdem, dass durch die Zugabe von BSA bereits der Reagenzienblindwert relativ hohe Signalintensitäten aufwies, was sich schließlich in einer großen Streuung der Werte bei nur kleinem Signalfenster von wenigen mP-Einheiten äußerte. Eine sichere Identifizierung einer Inhibition bei Hemmstoffuntersuchungen wäre schlussendlich auf Grund des kleinen Messfensters nicht möglich gewesen. Neben BSA wurde dem Puffer, und somit auch der Messlösung, der Emulgator Tween 20 in einer Endkonzentration von 0,05 % zugesetzt. Hiermit konnte ein gleicher Meniskus in jedem Well gewährleistet werden – ein äußerst wichtiger Aspekt für FP Messungen.

Nachdem BSA als Problem erkannt wurde, begann die Suche nach Alternativen. Als eine gute Möglichkeit für den vollständigen BSA-Verzicht im Puffer, konnte die Verwendung von beschichteten 96-Well-Platten und beschichteten Eppendorfgefäßen identifiziert werden. So wurde sichergestellt, dass die eingesetzte Menge an AK sich auch tatsächlich in Lösung befand, somit der Reaktion vollständig zur Verfügung stand und nicht immobilisiert an Wandungen vorlag. Daneben konnte durch Verwendung von *half-area* Platten der Substanzbedarf erheblich gesenkt werden. Auch auf den Einsatz von Tween konnte verzichtet werden, weil die Beschichtung der Platten für einen gleichmäßigen Meniskus in jedem Well sorgte.

Trotz der oben genannten Verbesserungen (Verzicht auf BSA, Tween und Reduktion des Messvolumens um die Hälfte), konnten bei einem ersten Screening von Flavonoiden mittels FP Assay keine sinnvoll auswertbaren Ergebnisse erhalten werden, da das Signalfenster, gebildet aus der Differenz aus Maximal- und Minimalkontrolle, noch immer zu klein war.

Demnach musste im Laufe der Entwicklung und bei der ersten Anwendung des Assays erkannt werden, dass sich dieser Assay unter Verwendung von ABD-markierten Peptiden nicht wesentlich optimieren ließ. So waren die ABD-markierten Peptide zwar sehr gut für die CE Methode geeignet, für einen FP Assay, so wie er hier durchgeführt werden sollte, jedoch weniger.

Die Ursache für das Scheitern des FP Assays in Variante 1 liegt hauptsächlich in einem falschen Sonde-AK-Verhältnis begründet. Die ABD-markierten Peptide zeichnen sich durch eine relativ niedrige Sensitivität aus, die für Messungen mittels Kapillarelektrophorese durchaus ausreichend ist, jedoch für die Messung der FP nicht genügt. Aus diesem Grund mussten bei der Assayvariante 1 die ABD-Sonden im niedrigen mikromolaren Bereich eingesetzt (pTpY-ABD 1 μ M) werden. Damit unterschied sich diese Variante in Bezug auf die Sondenkonzentration deutlich von der Konzentration der Fluorescein-markierten Peptide, welche KRISTJÁNSDÓTTIR et al. (1 nM pTpY-Fluorescein)⁶¹ oder ZHOU et al. (2,5 nM TY-Fluorescein)¹⁰ in ihren Assays verwendet hatten. Mit der hier eingesetzten AK Konzentration von durchschnittlich 0,07 μ g/ml (bis 0,3 μ g/ml maximal) sollte sich an den Verhältnissen aus beiden Publikationen (4,0 μ g/ml oder 1,0 μ g/ml) orientiert werden. Ein so hoher AK Gehalt war jedoch schon allein deswegen nicht realisierbar, weil die AK Stammlösung, die von der Firma Cell Signaling zur Verfügung gestellt wurde, nur eine Konzentration von 6,4 μ g/ml aufwies. Bei näherem Begutachten musste festgestellt werden, dass das Sonde-AK-Verhältnis bei KRISTJÁNSDÓTTIR ca. 1:130 und in der entwickelten Assayvariante 1 bei 500:1 lag. Hier herrschte also eine deutliche Diskrepanz.

Da kein Spielraum für eine wesentliche Erhöhung der AK Konzentration bestand, wurde bei einem letzten Experiment die Konzentration der Sonde pTpY-ABD auf 1 nM gesenkt. Bei diesen Proben lagen jedoch die Fluoreszenzen erwartungsgemäß im Bereich der von reinem Puffer, und die Zugabe von AK bewirkte keine Änderung der FP. Somit wurde an dieser Stelle das Vorhaben der Entwicklung eines FP Assays auf Basis von ABD-markierten Sonden aufgegeben und sich der Entwicklung eines alternativen Assays gewidmet.

Assayvariante 2

Nachdem verstanden wurde, dass ABD-markierte Peptide auf Grund ihrer geringen Fluoreszenz im nanomolaren Bereich für den FP Assay eher ungeeignet waren, wurde die Markierung von pTpY mit Fluorescein-5-maleimid vorgenommen und dieses als Sonde für den FP Assay getestet. Demzufolge sollte die größere Fluoreszenzintensität von Fluorescein als fluoreszierendes Agens genutzt werden, was gleichzeitig eine stärkere Anlehnung dieses Assays am Modell des von KRISTJÁNSDÓTTIR entwickelten FP Assays bedeutete.

Bezüglich der Gerätetechnik stand diesem neuen Ansatz nichts entgegen. Alle Messungen erfolgten am BMG NOVOstar. Die Umstellung des Plattenreaders auf die entsprechenden Exzitations- und Emissionswellenlängen war durch den Wechsel des Filters für die Anregung von 380 auf 480 nm möglich.

Die Grundlagen des Assays sind denen der Variante 1 ähnlich. Die Fluoreszenzsonde pTpY-F5M allein weist ebenfalls keine hohe FP auf, da auch sie eine relativ kleine Molekülmasse von 2131 Da besitzt. Die Erhöhung der FP wird durch die Bindung des spezifischen Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK erreicht.

Der Aufbau des Assays in Variante 2 unterscheidet sich von dem vorhergehenden vor allem darin, dass er kompetitiv ist (siehe Abb. 4.9). Hierin wird ausschließlich pTpY-F5M als fluoreszierende Sonde eingesetzt, das Substrat TY, welches in der Kinasereaktion zu phosphoryliertem Peptid (TpY, pTY oder pTpY) umgesetzt wird, ist nicht markiert. Es kommt also nach der Zugabe eines Gemisches von pTpY-F5M und AK (Schritt 2 in der Abbildung) in einem dritten Reaktionsschritt zu der eigentlichen Kompetitionsreaktion zwischen zugesetztem markiertem pTpY-F5M und gebildetem unmarkiertem TpY und pTpY. Verdrängt beispielsweise ein Molekül unmarkierten TpYs ein Molekül pTpY-F5M aus der Bindung zum AK, so kommt es in der Folge zu einer Verminderung des FP Signals. Die Sonde pTpY-F5M läge nun ungebunden vor. Im Fall von Hemmstoffuntersuchungen wird bei Inhibition der Kinase weniger phosphoryliertes Peptid gebildet. Damit kommt es zu einer geringeren Verdrängung der Sonde aus der Bindung zum AK und die Signalverminderung fällt schwächer aus.

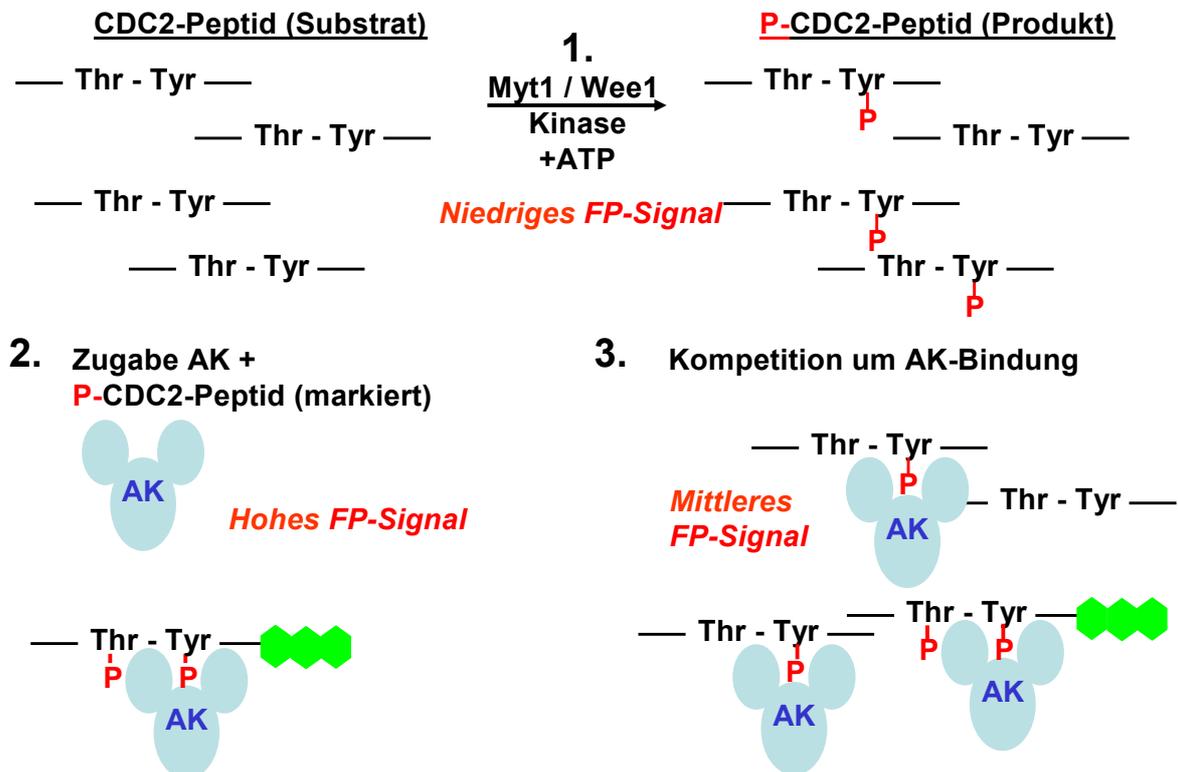


Abb. 4.9 Schema für den FP Assay, Variante 2: Unmarkiertes CDC2-abgewandeltes Peptid (TY) wird in einer ersten Reaktion mit Kinase und ATP umgesetzt. Der Ansatz weist ein niedriges FP Signal auf (1). Anschließend erfolgt die Zugabe einer Lösung von spezifischem Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ Antikörper und markiertem, phosphoryliertem Peptid (pTpY-F5M), die eine hohe Polarisation aufweist (2.). Es folgt eine Kompetitionsreaktion zwischen markiertem und unmarkiertem phosphoryliertem Peptid und eine mittlere FP stellt sich ein (3).

Auf die detaillierte Vorgehensweise bei der Entwicklung des Assays wird in den folgenden Punkten näher eingegangen.

4.2.1.1 ELISA

In diesem initialen Experiment sollte die Spezifität des Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ Antikörpers der Firma Cell Signaling gegenüber TpY und pTpY in einem ELISA nachgewiesen werden. Die Sensitivität des Antikörpers stellte die Grundvoraussetzung für das Gelingen des FP Assays dar. Den schematischen Ablauf des ELISA zeigt Abb. 4.10.

Der Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK wurde im Kaninchen (*rabbit*) erzeugt. Aus diesem Grund wurde als zweiter AK ein anti-*rabbit* AK gewählt, der über eine gebundene Peroxidase verfügt, welche als Katalysator einer Farbreaktion fungierte. Der Konzentrationsbereich der Peptide von 20 μM über 10 bis hin zu 1 μM wurde in Anpassung der zukünftig geplanten Peptidkonzentration im Assay ausgewählt.

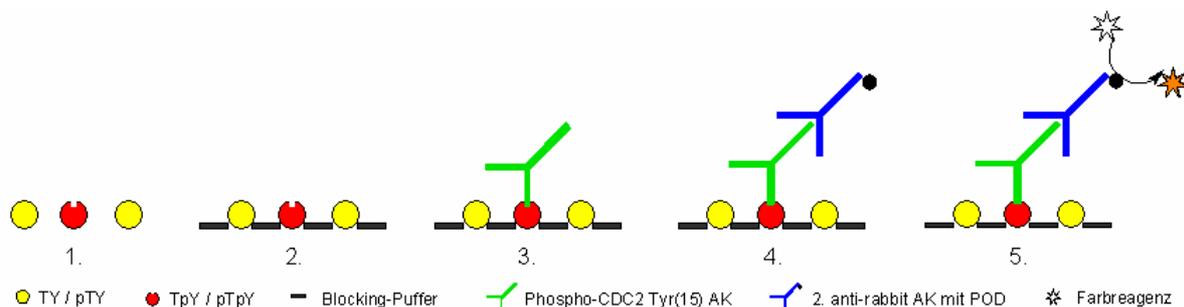


Abb. 4.10 Schematischer Aufbau des ELISA: 1. Beschichten der Wells einer 96-Well-Platte mit Peptid; 2. Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Kälberserumprotein; 3. Spezifische Bindung des Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK an Peptid TpY oder pTpY; 4. Zugabe eines aus Kaninchen stammenden Peroxidase-gekoppelten AK; 5. Nachweis des gebundenen AK durch enzymatische Farbreaktion mit ABTS als Substrat.

Abb. 4.11 und 4.12 zeigen zum einen, dass der ELISA erfolgreich durchgeführt wurde, da Blindwert und Negativkontrolle bei vorhandenen positiven Proben negativ sind. Zum anderen wird deutlich, dass die Proben TY und pTY nicht gefärbt sind. Somit hat bei diesen Proben der erste AK nicht an das Peptid TY und pTY gebunden, worauf ebenfalls kein Zweit-AK zur Bindung kam und daher keine Farbreaktion erfolgen konnte. Dass jedoch eine spezifische Reaktion des AK mit TpY und pTpY möglich ist, zeigen die Proben mit diesen beiden Peptiden. Hier kam es auf Grund der Bindung des Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK bei 10 und 1 μM Peptid zu einer Bindung des Zweit-AK, so dass anschließend die Peroxidase-katalysierte Farbreaktion ablaufen konnte.

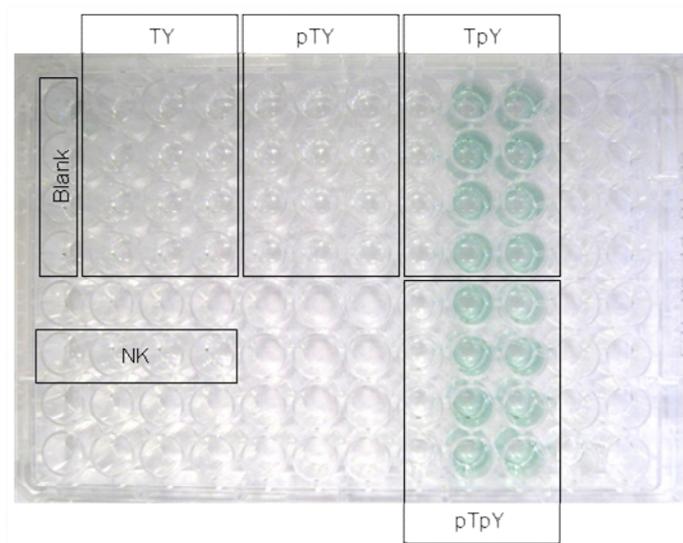


Abb. 4.11 ELISA – Platte: Zustand nach der Farbentwicklung: Der Blank, die Negativkontrolle und die Proben mit TY und pTY reagierten nicht, hingegen reagierten TpY und pTpY erwartungsgemäß, allerdings erst ab einer Konzentration von 10 μ M und kleiner.

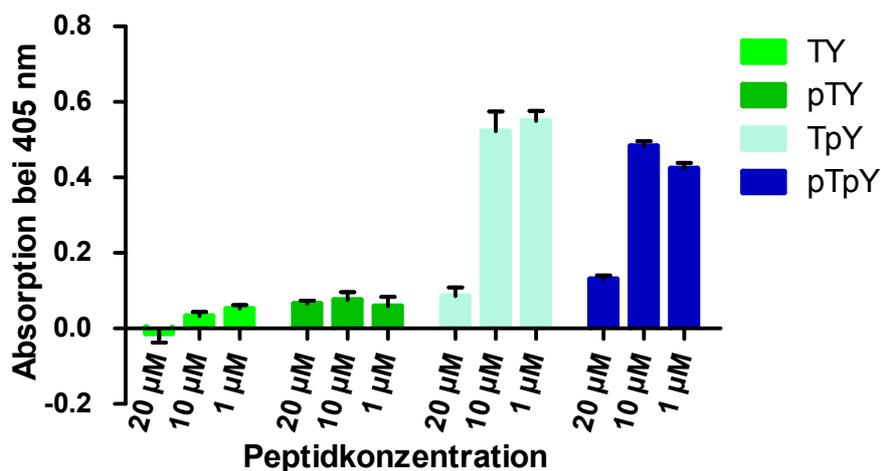


Abb. 4.12 Graphische Auswertung des ELISA: Darstellung der Absorption als Maß der Affinität des AK zum Peptid. Der AK weist bei Konzentrationen kleiner 10 μ M eine deutliche Spezifität gegenüber TpY und pTpY auf. Absorptionen (blankkorrigiert) ergeben sich aus einer Dreifachmessung, Parallelansätze $n = 4$, Fehlerbalken zeigen SEM.

Das Ausbleiben einer deutlichen Färbung bei 20 μ M TpY und 20 μ M pTpY könnte in zu hohen Peptid-Konzentrationen (Antigen(AG)-Konzentrationen) begründet liegen, da die Bildung eines AG-AK-Komplexes eine dem Massenwirkungsgesetz folgende Gleichgewichtsreaktion darstellt. Das heißt, eine optimale Vernetzung des AG durch AK erfolgt nur in einem bestimmten Mengenverhältnis im Äquivalenzbereich. Ist die Konzentration eines der beiden Reaktionspartner zu groß oder zu klein, kommt es zur Verringerung der AG-AK-Komplexe. Im vorliegenden Fall könnten die 20 μ M Peptid einen zu großen AG-Überschuss darstellen. Der hier beschriebene Sachverhalt wird durch die Heidelberger-Kurve verdeutlicht⁹⁰.

Nichtsdestoweniger konnte in diesem Experiment die Spezifität des Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK gegenüber TpY und pTpY eindeutig bewiesen werden, und ein Fortschreiten in der Assayentwicklung war möglich.

4.2.1.2 Auswahl der Platte

Während der Assayentwicklung wurden drei unterschiedliche Arten von 96-Well-Platten verwendet. Erste Messungen erfolgten mit einfachen, schwarzen Platten der Firma Greiner (Produktnummer: 655101). Hier wurde ein Volumen pro Well von 250 bis 280 μl eingesetzt. Schnell wurde das Erfordernis erkannt, die aufgewendete Menge an Substrat und AK je Well zu minimieren, um letztlich mehr Messungen durchführen zu können und die Kosten pro Well zu senken.

Bei einfachen Fluoreszenzmessungen ist es durchaus möglich nur halb oder unter Umständen auch weniger gefüllte Wells zu vermessen ohne Qualitätseinbußen bei der Messgenauigkeit in Kauf nehmen zu müssen. FP Messungen sollten jedoch mit relativ gut gefüllten Wells durchgeführt werden. Daher wurden bald *half-area* 96-Well-Platten der Firma Greiner (Produktnummer: 675076) verwendet. Dadurch konnte das Ansatzvolumen pro Well auf 150 μl reduziert werden. Ein weiteres wichtiges Kriterium für eine möglichst störungsfreie Messung der FP ist die Form des durch die im Well befindliche Probenlösung gebildeten Meniskus. Dieser Meniskus muss für FP Messungen in jedem Well gleichförmig sein. Eine solche Gleichmäßigkeit kann zum einen durch den Einsatz von emulgierenden Substanzen im Puffer (in Assayvariante 1 0,05 % Tween 20), zum anderen aber durch eine Oberflächenbeschichtung der Platten gewährleistet werden.

Für den Assay wurden sehr geringe Konzentrationen des AK eingesetzt (meist 0,1 $\mu\text{g/ml}$). In Lösung befindliche Proteine weisen eine gewisse Affinität zu Gefäßwänden aus Polystyren auf, beispielsweise Innenwände von Eppendorfgefäßen oder unbeschichteten Platten. Teilweise wird diese Eigenschaft ausgenutzt, wie zum Beispiel beim Blockieren von Oberflächen (*Coating*) beim ELISA (siehe dazu z.B. auch Abschnitt 4.2.1.1). Um solche Effekte zu unterbinden, enthalten Puffer von AK häufig einen geringen Anteil an Fremdprotein, z.B. Rinderserumalbumin (RSA / BSA), welches erste unspezifische Wechselwirkungen des AK abfängt. Aus selbigem Grund wurde anfangs, wie im Datenblatt für den AK auch empfohlen, dem Puffer zur Verdünnung des AK BSA zugesetzt. Bei den FP Messungen ergab sich somit eine BSA Endkonzentration von 2,5 %. Wie sich aber herausstellte, interferierte das BSA bei den FP Messungen unter anderem mit der Sonde und war somit ein erheblicher Störfaktor im Assaysystem 1.

Als am besten geeignete Platte konnte schließlich die schwarze *half-area non-binding* 96-Well-Platte mit flachem Boden der Firma Corning (Produktnummer: 3686) identifiziert werden. Diese Platte wurde sodann für den FP Assay im Assaysystem 2 eingesetzt. Die Platte zeichnet sich durch eine geringe Proteinbindung aus, was für diesen Assay den Vorteil birgt, dass auf den Einsatz von BSA im Puffer vollständig verzichtet werden kann. Außerdem wird durch die Oberflächenbeschichtung, auch ohne Einsatz eines Emulgators, ein sehr gleichförmiger, konkaver Meniskus geschaffen. Das Assayvolumen wurde bis auf 100 μl pro Well gesenkt. Eine weitere Reduktion des Volumens pro Well ist bei diesen Platten denkbar, und bietet eine Möglichkeit der zukünftigen Optimierung des Assays.

4.2.1.3 Auswahl der Sonde

Das hier ausgewählte Substrat der Myt1 Kinase ist ein aus 14 AS bestehendes Peptid, welches einen Teilbereich des CDC2 Proteins darstellt und die spezifische Binderegion bzw. Phosphorylierungsstelle für die Kinase enthält. Für den FP Assay muss das Substrat mit einem fluoreszierenden Molekül verlinkt werden. Hierzu wurde zunächst, entgegen der Vorgehensweise bei KRISTJÁNSDÓTTIR, die Verknüpfung des Peptids mit einem Sulfamoylbenzofurazanderivat (ABD-F) am C-Terminus durchgeführt. Auf diese Weise hätte man sowohl für die CE Methode, als auch für den FP Assay dasselbe fluoreszierende Substrat verwenden können. Wie bereits einleitend unter 4.2.1 erläutert,

wurde schließlich für die FP Methode ein anderes fluoreszierendes Substrat (Sonde) hergestellt, da die Fluoreszenz der ABD-markierten Peptide nicht ausreichend war. Grundsätzlich wäre zwar der Einsatz von ABD-markierten Sonden als Substrate im mikromolaren Konzentrationsbereich möglich, doch dann wäre auch die Verwendung des AK in der gleichen Konzentration, am besten jedoch mit einem mehrfachen Überschuss, notwendig. Der Erhöhung der AK Konzentration waren jedoch sowohl natürliche, als auch finanzielle Grenzen gesetzt, da die AK Stammlösung firmenseitig nur eine Konzentration von ca. 188 nM besaß. Für eine gute AG-AK-Reaktion, denn prinzipiell ist die Bindung des phosphorylierten Peptids (TpY oder pTpY) eine solche Reaktion, ist ein bestimmtes Verhältnis zwischen beiden Reaktionspartnern zu wahren (siehe dazu auch Abschnitt 4.2.1.1). Denn nur wenn die Sonde, welche definitionsgemäß auf Grund des niedrigen Molekulargewichtes eine niedrige FP aufweist (theoretische Grundlagen siehe Abschnitt 2.6), durch den AK gebunden bzw. immobilisiert wird, wirkt sich das direkt auf die Rotationsgeschwindigkeit aus und die FP steigt.

Wie im Abschnitt über die Grundlagen der FP Messung erläutert, ist der Polarisationswert eine konzentrationsunabhängige Konstante, da dieser Wert ein Verhältnis von Fluoreszenzintensitäten darstellt. Die niedrigste Konzentration der Sonde, bei der ein gleich-bleibendes Polarisationsignal vorliegt, sollte den Arbeitsbereich für die Entwicklung eines FP basierten Assays bieten, da hier die Wahrscheinlichkeit von Messfehlern gering ist. Wesentlich geringere Sondenkonzentrationen führen auf Grund größerer Streuung der Einzelwerte zu ungenaueren Polarisationswerten. Hierfür kann bei sinkender Sondenkonzentration der größer werdende Einfluss des Streulichts auf die Fluoreszenz verantwortlich gemacht werden.

Um die Konzentration zu ermitteln, ab dem die FP konzentrationsunabhängig wird und sich bei graphischer Darstellung eine asymptotische Annäherung an einen bestimmten Wert ergibt, wurden sowohl für die ABD-markierten Peptide, als auch später für das F5M markierte pTpY Sensitivitätstests durchgeführt. Dazu wurde die jeweilige Sonde in unterschiedlichen Konzentrationen vermessen.

Beispielhaft für alle übrigen ABD-markierten Peptide zeigt Abbildung 4.13, dass die Fluoreszenz-polarisation von TY-ABD erst im mikromolaren Bereich stabil ist. Niedrigere Konzentrationen der ABD-markierten Peptide sind, auf Grund der begrenzten Empfindlichkeit des NOVOSTAR nicht sicher messbar. Auf eine Blindwertkorrektur der Polarisationswerte wurde hier verzichtet, da sich anderenfalls durch den natürlich hohen Bindwert teilweise negative Polarisationen errechneten.

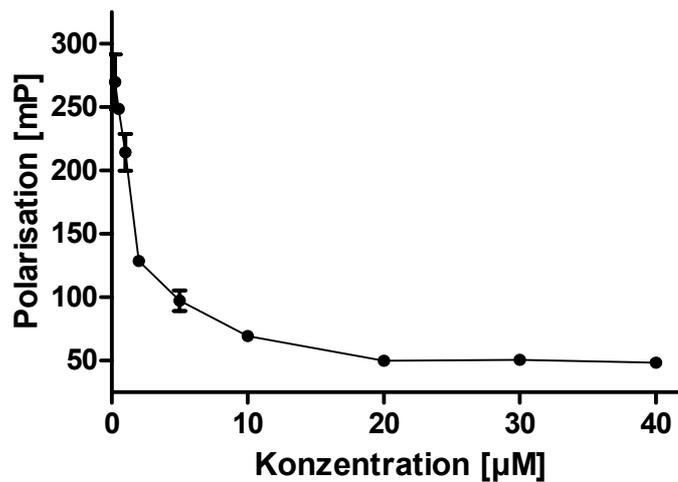


Abb. 4.13 Sensitivitätstest mit TY-ABD: Dargestellt ist die Abhängigkeit des Polarisationssignals von der TY-ABD Konzentration. Ab einer Konzentration von ca. 20 μM ist die FP konzentrationsunabhängig. Polarisationswerte (ohne Hintergrundkorrektur) ergeben sich aus einer Zweifachmessung, Parallelansätze $n = 2$, Fehlerbalken zeigen SD.

Trotz der notwendigen hohen Sondenkonzentration und wider besseres Wissen, dass optimalerweise im Vergleich zum Peptid höhere AK Konzentrationen eingesetzt werden müssen, wurde anschließend eine fixe Konzentration von TpY-ABD (20 μM) mit steigenden Mengen an AK versetzt. Das Polarisationsignal blieb jedoch auch in Anwesenheit von AK unverändert (ohne Abbildung). Der Verzicht auf BSA im Puffer für den Antikörper oder die Reduktion der Sondenkonzentration auf 1 oder 10 μM verbesserten an diesem Ergebnis nichts.

Neben dem Austausch des Gerätes gegen ein empfindlicheres, um Messungen im nanomolaren Bereich durchführen zu können, gab es infolge der obigen Ergebnisse daher nur die Möglichkeit eine andere, leistungsfähigere Fluoreszenzsonde zu testen. Da ein neueres, leistungsfähigeres Gerät für die Messung der FP nicht zur Verfügung stand, wurde die Markierung von pTpY mit F5M durchgeführt. Diese Sonde wurde einem Sensitivitätstest unterzogen und durch anschließendes Zutitrieren von AK auf ihr Polarisationsverhalten getestet.

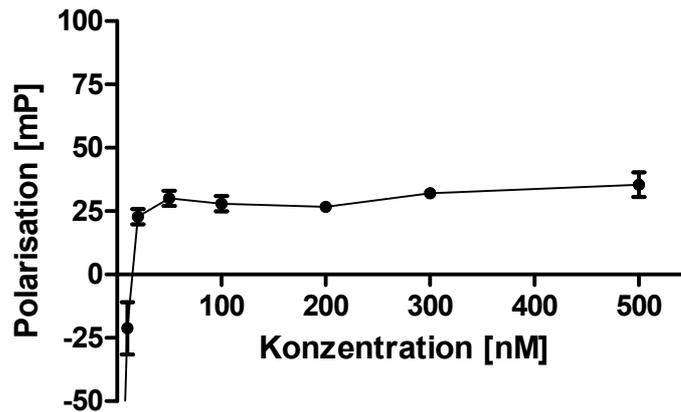


Abb. 4.14 Sensitivitätstest mit pTpY-F5M: Dargestellt ist die Abhängigkeit des Polarisationsignals von der pTpY-F5M Konzentration. Ab einer Konzentration von ca. 20 nM ist die FP konzentrationsunabhängig. Konzentrationen von 10 nM und niedriger führen zu negativen Polarisationswerten (Datenpunkte für 1 und 5 nM nicht mehr dargestellt). Polarisationswerte (hintergrundkorrigiert) ergeben sich aus Dreifachmessungen, Parallelansätze $n = 2$, Fehlerbalken zeigen SD.

In dem folgenden Experiment wurde in Form einer Direkttitration mit AK die Eignung von pTpY-F5M als potentielle Sonde für den FP Assay überprüft. Dabei wurde eine konstante pTpY-F5M Konzentration mit sieben verschiedenen AK Konzentrationen (0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 025 $\mu\text{g}/\text{ml}$) titriert. Gemäß der Ergebnisse des Sensitivitätstests läge die optimale Sondenkonzentration für diese Bestimmung zwischen 20 und 50 nM pTpY-F5M. Dessen ungeachtet wurde eine Sondenkonzentration von 5 nM pTpY-F5M ausgewählt, um von Anfang an ein relativ günstiges Sonden(AG)-AK-Verhältnis sicherzustellen und den Einsatz an AK so hoch wie nötig, jedoch so gering wie möglich zu halten. Denn ein einfaches Rechenbeispiel zeigt: Bei einer Sondenkonzentration von 35 nM müsste bereits zum Erreichen eines 1:1 Verhältnisses von Sonde und AK eine AK Konzentration von 1,19 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt werden. Dies bedeutete bei nur einem mit 100 μl gefüllten Well ca. 19 μl der AK SL ($c = 6,4 \mu\text{g}/\text{ml}$) und somit einen Preis pro Well von rund 53 Euro (einzig auf den AK bezogen). Die hier eingesetzte 5 nM Lösung der Sonde entspricht, gegenüber der bei KRISTJÁNSDÓTTIR im Assay verwendeten Lösung, der fünffach höheren Sondenkonzentration. Diese Konzentration war mindestens notwendig, da die Fluoreszenzintensitäten einer ein nanomolaren Lösung auf dem Niveau des Blindwertes lagen und mit Hilfe des NOVOstar auf Grund seiner vergleichsweise geringen Sensitivität beide Ansätze nicht mehr unterschieden werden konnten. Die gewählten 5 nM pTpY-F5M stellten somit zu diesem Zeitpunkt die minimal messbare Konzentration dar.

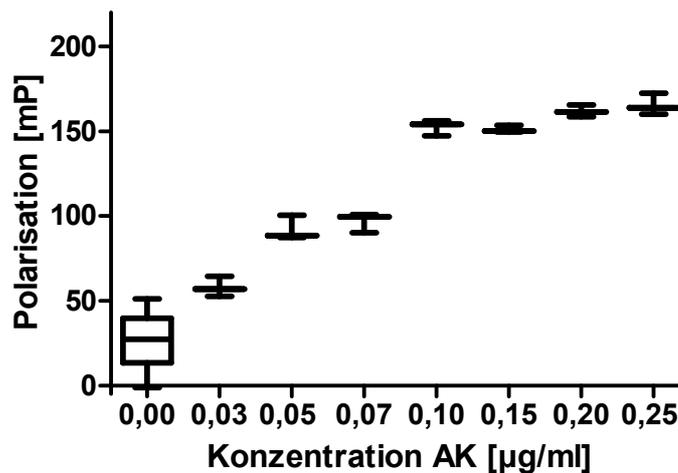


Abb. 4.15 Direkttitration von AK an pTpY-F5M: Eine Konzentration von 5 nM pTpY-F5M wurde mit sieben verschiedenen Konzentrationen des Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK titriert. Polarisationswerte (hintergrundkorrigiert) ergeben sich aus Dreifachmessungen der freien Sonde (kein AK) in $n = 7$ Parallelansätzen und den Einzelsätzen für die unterschiedlichen AK Konzentrationen.

Abb. 4.15 zeigt konzentrationsabhängig die Zunahme des Polarisationssignals bei steigender AK Konzentration. Die Messung der Fluoreszenzpolarisierung erfolgte 30 Minuten nach Zugabe des AK und zur Bewertung der Stabilität noch einmal nach 16 Stunden. Der Unterschied der Polarisationswerte ging nicht über die normale Streuung hinaus. Von der Stabilität der Gleichgewichtseinstellung war somit auch über einen längeren Zeitraum auszugehen. Die relativ große Standardabweichung der freien Sonde (0 µg/ml AK) ist, wie oben bereits erläutert, auf den großen Einfluss des Streulichtes zurückzuführen. Sie hebt sich in dieser Konzentration vom Hintergrund kaum ab.

Wie in den Grundlagen zur FP bereits erläutert, kommt es beim Signalanstieg zu einer zunehmenden Immobilisation der Sonde durch Bindung dieser in Form von AG-AK-Komplexen. Dabei wird aus dem relativ kleinen beweglichen Molekül pTpY-F5M (2,13 kDa) ein großer, träger Komplex aus pTpY-F5M und AK (ca. 36 kDa), der einen höheren Fluoreszenzpolarisationswert aufweist. Diese Ergebnisse waren die Grundlage für die Entwicklung eines FP Assays auf Basis einer F5M-markierten Sonde.

4.2.1.4 Optimale AK Konzentration

Wie in Abb. 4.15 deutlich wird, steigt ab einer AK Konzentration von 0,1 µg/ml die Polarisation nur noch langsam an. Diese Konzentration des AK kann als optimal angesehen werden, da jede weitere Erhöhung der AK Menge zwar zu einer Steigerung der Kosten pro Well, jedoch nicht zu einer nutzbaren Erhöhung der Polarisation führt. Für die folgenden Experimente wurde nun eine Sondenkonzentration von 5 nM und eine AK Konzentration von 0,1 µg/ml festgelegt. Dies entsprach einem Sonde-AK-Verhältnis von 5 nM zu 3 nM, was noch kein optimales Verhältnis darstellte, womit jedoch zunächst gearbeitet werden konnte.

4.2.1.5 Verdrängungsexperimente

Wie bereits unter Punkt 4.2.1.1 mittels ELISA festgestellt, bindet der AK sowohl pTpY als auch TpY. TY und pTY weisen keine Phospho-Tyrosin-Funktion auf und werden somit erwartungsgemäß im ELISA nicht vom AK gebunden. Die folgenden Experimente sollten nun das Bindungsverhalten des Antikörpers gegenüber den vier Referenzpeptiden näher bestimmen. Dazu wurde eine Lösung aus

pTpY-F5M und AK in den im Vorversuch bestimmten Konzentrationsverhältnissen (5 nM pTpY-F5M und 0,1 µg/ml AK) mit steigenden Konzentrationen jeweils eines Peptids versetzt, inkubiert und anschließend die FP bestimmt. In Abbildung 4.16 sind für jedes Peptid die Polarisierungen in Abhängigkeit der Peptidkonzentration (TpY und pTpY je: 1, 2, 5, 10, 20, 100, 500, 1000 nM, 5 und 50 µM; TY je: 10, 100, 200, 1000 nM, 5, 10 und 50 µM und pTY je: 1, 10, 20, 100, 500, 1000 nM, 5 und 50 µM) dargestellt.

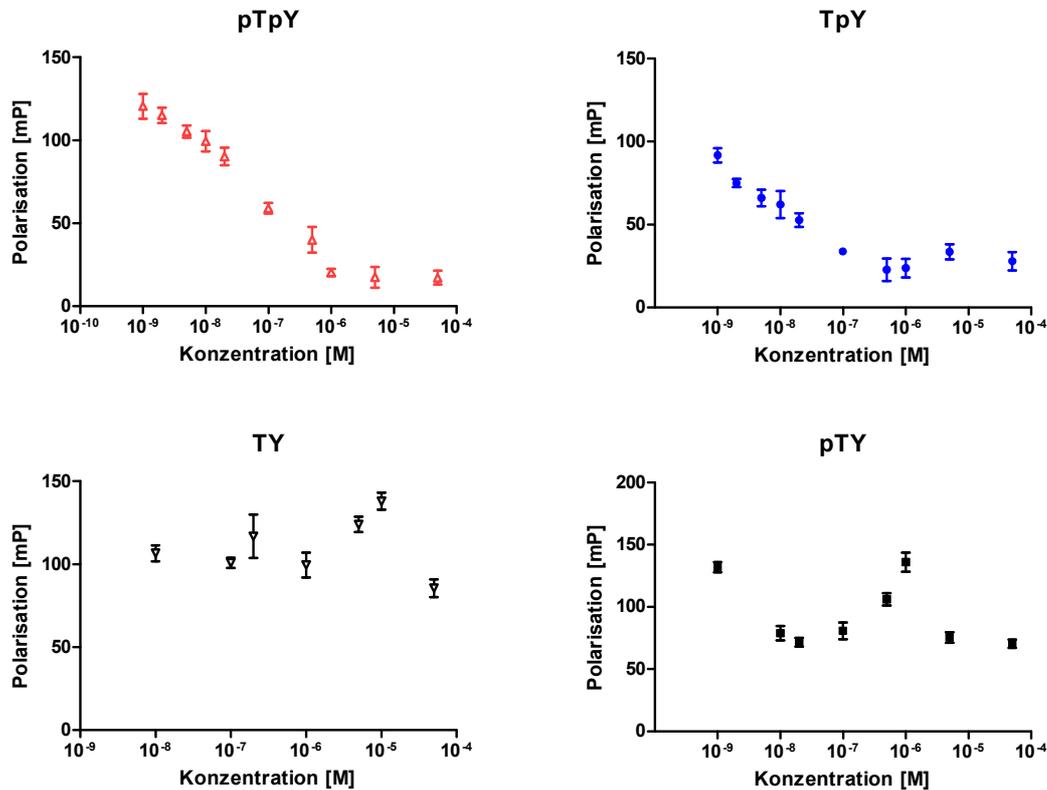


Abb. 4.16 Verdrängungstitrationen des pTpY-F5M mit Antikörper durch die Peptide TY, TpY, pTY und pTpY: Halblogarithmische Darstellung der Polarisation des Sonde-AK-Komplexes in Abhängigkeit der jeweiligen Peptidkonzentration. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD (hintergrundkorrigiert), die aus dreifach gemessenen Doppelbestimmungen resultieren.

Zu einer deutlichen Absenkung der Polarisationswerte kommt es erwartungsgemäß nur bei den beiden Tyrosin-phosphorylierten Peptiden TpY und pTpY. Hier erfolgt konzentrationsabhängig eine kontinuierliche Abnahme der ursprünglich hohen Polarisation des Sonde-AK-Komplexes, da mit steigender Peptidkonzentration (TpY oder pTpY) die Sonde (pTpY-F5M) aus der Bindung zum AK freigesetzt wird und der AK die nicht fluoreszierenden Peptide TpY und pTpY bindet. Die freie Sonde zeichnet sich daraufhin nur noch durch ein kleines Molekulargewicht aus und weist einen niedrigen Polarisationswert auf.

Die verhältnismäßig große Streuung der Polarisierungen für die unterschiedlichen Konzentrationsstufen der Peptide TY und pTY war für die weitere Entwicklung des Assays nicht bedenklich, da für die nachfolgenden Messungen eine konstante Substratkonzentration (Peptidkonzentration) festgelegt wurde, der Fehler innerhalb einer Konzentrationsstufe gering war und zukünftig gleichbleibende Bedingungen vorherrschen sollten.

Abbildung 4.17 zeigt die oben aufgeführten Ergebnisse nach nichtlinearer Regression unter der Annahme eines einseitigen Bindungsmechanismus. Für die Peptide ergibt sich hieraus eine Dissoziationskonstante im Gleichgewicht von ca. 21 nM für TpY und 122 nM für pTpY. Sie geben den Wendepunkt der Verdrängungskurve an, das heißt diejenige Konzentration, welche die halbmaximale FP Minderung verursacht (EC_{50}). Für die Peptide TY und pTY lässt sich bis zu der relativ hohen Konzentration von 50 μ M keine Tendenz feststellen, die Sonde aus der Bindung zum AK zu verdrängen und somit die Polarisation zu senken.

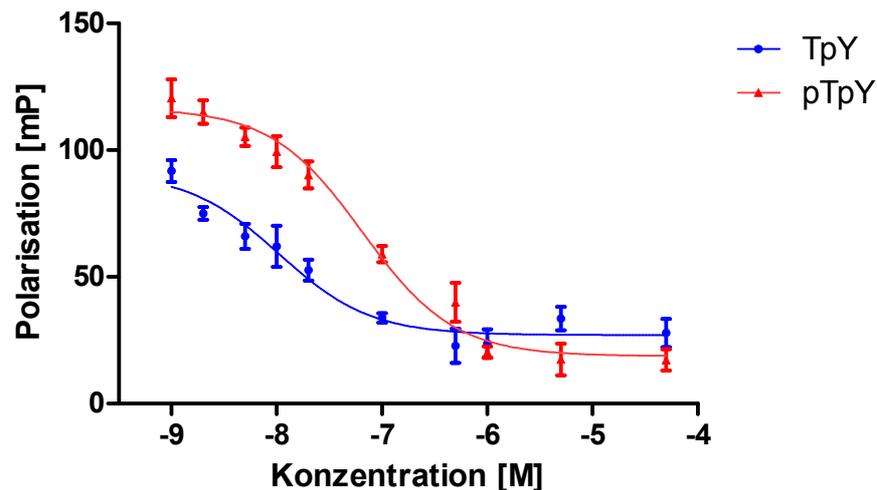


Abb. 4.17 Titrationskurven des pTpY-F5M-AK-Komplexes mit TpY oder pTpY: Bildung nach nichtlinearer Regression unter Annahme eines einseitigen Bindungsmechanismus. Polarisationen als Mittelwerte \pm SD einer dreifach gemessenen Doppelbestimmung ($n=2$).

4.2.1.6 Erste Umsatzversuche und Aktivitätstest

Bis hierhin erfolgte die Entwicklung des Assays ohne Enzym. Die vorausgehenden Experimente schafften mit ihren Ergebnissen die Grundlagen für den folgenden Abschnitt, da in diesen die grundsätzlichen Parameter, wie das FP Signal der freien und gebundenen Sonde und das Verhältnis zum AK bestimmt wurden.

Die Durchführung von Umsatzmessungen erfordert die Zugabe von Enzym, Substrat und Cosubstrat in Form von ATP sowie die Durchführung eines zusätzlichen Inkubationsschrittes. Daher ergab sich an dieser Stelle eine Reihe von neuen Ansätzen, für die die Einführung einer Nomenklatur notwendig ist. Der **Umsatz** (U) bezeichnet eine normale Probe, bestehend aus den Komponenten Substrat, Cosubstrat, Enzym und zusätzlichen Reagenzien wie Puffer, Molybdat und DMSO. Das Molybdat fungiert als Phosphataseinhibitor. DMSO ist das am häufigsten verwendete Lösungsmittel für Inhibitoren. Um bei reinen Aktivitätsuntersuchungen und bei Inhibitorentests den direkten Vergleich der Aktivitäten zu ermöglichen, wurde bereits in der Entwicklungsphase des Assays DMSO zugegeben. Während der Entwicklung wurde festgestellt, dass der erste Inkubationsschritt – die Kinasereaktion – terminiert werden musste. Um die Reaktion abzustoppen wurde daher jedem Ansatz EDTA zugefügt. Einer **Positivkontrolle** (PK) wurde zusätzlich an dieser Stelle TpY zugegeben, um bei mangelnder Aktivität des Enzyms trotzdem die Gewissheit zu haben, dass die Reaktion mit dem AK funktioniert und die FP absenkbar ist. Sowohl bei der PK, als auch bei der Umsatzprobe wird die FP von dem ursprünglich hohen Niveau des pTpY-F5M-AK-Komplexes durch die Anwesenheit von gebildeten oder

zugegebenen (PK) TpY oder pTpY herabgesenkt. Die **Negativkontrolle** (NK) enthält bis auf Enzym alle Komponenten der Umsatzprobe. Es findet somit bei der NK keine Umsetzung des Substrates TY statt, so dass kein Tyrosin-phosphoryliertes Peptid mit pTpY-F5M um die Bindung zum AK konkurrieren kann. Die FP bleibt bei der NK unbeeinflusst und stellt das Maximalsignal dar. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die Zugabe von Enzym zu Störungen der Bindung von AK zu Sonde oder Peptid führt, wurde außerdem bei einigen Messungen eine **modifizierte Negativkontrolle** (NK mod) mitgeführt. NK mod enthielt Enzym jedoch kein Cosubstrat (ATP). Erwartungsgemäß wiesen NK und NK mod vergleichbare FP Werte auf. Das **Minimalsignal** repräsentiert bei Abwesenheit des AK die FP der freien Sonde. Auch dieser Ansatz wurde nicht standardmäßig bei allen Messreihen mitgeführt. Der **Umsatz Inhibitor** ist durch eine FP zwischen Umsatzprobe und NK gekennzeichnet. Je nach Inhibition ist bei diesem Ansatz die Bildung von TpY oder pTpY minimiert. Daher wird weniger pTpY-F5M aus der Bindung zum AK verdrängt und die FP sinkt in einem geringeren Maß als beim Umsatz. Der **Blank** symbolisiert den Reagenzien-Blindwert. Die Fluoreszenzintensitäten des Blanks werden bei der Berechnung der FP von den Fluoreszenzintensitäten der übrigen Proben subtrahiert, was in den Bildunterschriften als „hintergrundkorrigiert“ bezeichnet wird.

Ohne Abstoppen der Enzymreaktion konnte bei den ersten Umsatzversuchen mittels FP Assay keine Aktivität der Myt1 Kinase festgestellt werden, obwohl die gleiche Enzympräparation bei CE Messungen zu einem Umsatz geführt hatte. Aus Abb. 4.18 wird Folgendes ersichtlich: Die Umsatzproben verhalten sich beide, sowohl die mit TY als auch die mit TpY als Substrat, wie die NK und die NK mod. Eine PK, die alle Komponenten einer Umsatzprobe und zusätzlich 100 nM TpY enthielt, zeigt eine deutliche Absenkung der FP. Die in diesem Experiment mitgeführte NK mod und PK beweisen, dass eine Enzymzugabe die FP Messung grundsätzlich nicht störte. Interferenzen des Enzyms und eine Inaktivität des Enzyms wurden daher zunächst ausgeschlossen.

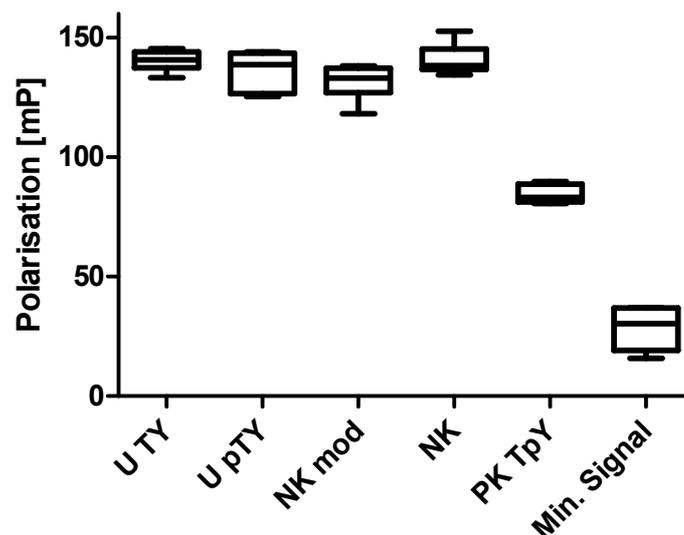


Abb. 4.18 Erste Umsatzmessungen ohne Abstoppen der Enzymreaktion: Dargestellt als Box-Whisker-Plot; Polarisationswerte (hintergrundkorrigiert) ergeben sich aus dreifach gemessenen Parallelansätzen ($n=2$).

Als ein möglicher Grund wurde erwogen, dass ein Abstoppen der Enzymreaktion Voraussetzung für die spätere Messbarkeit von Umsätzen ist. Aus diesem Grund wurden folgende Abstopptechniken zur Terminierung der Enzymreaktion getestet:

1. Der Zusatz von EDTA. Dieser führt zur Bindung von Magnesiumionen, die als Cofaktor bei Kinasereaktionen essentiell sind.
 2. Die thermische Deaktivierung des Enzyms während einer 30minütigen Erwärmung der Probe bei 60 °C im Thermoblock.
 3. Die thermische Deaktivierung des Enzyms während einer 0,5minütigen Mikrowellenbehandlung.
- Dass die zweite und dritte Möglichkeit sicher zu einer Inaktivität des Enzyms führten, wurde in CE Vorversuchen nachgewiesen.

Abbildung 4.19 zeigt deutlich, dass einzig bei Einsatz von EDTA ein Umsatz in Form einer FP Abnahme detektierbar war. Alle übrigen Abstopptechniken scheinen anhand der Ergebnisse dieses Experimentes ungeeignet, da bei den Umsatzproben keine Erniedrigung der FP erreicht werden konnte. Die 50 nM TpY enthaltende PK zeigt bei allen Ansätzen eine Absenkung der Polarisierung. Daneben weist die NK eine gleichbleibend hohe FP auf. Dies beweist, dass grundsätzlich keine der getesteten Abstopptechniken zu Störungen der FP Messung führte. Dennoch eignet sich weder die Mikrowellenbehandlung noch die thermische Deaktivierung, da die Messung einer Kinaseaktivität in Form einer Polarisationsenkung nicht möglich war. Als einzig geeignete Methode zum Abstoppen präsentiert sich die EDTA-Zugabe, da hier die FP der Umsatzproben herabgesenkt wurde und somit Aktivität der Kinase nachweisbar war.

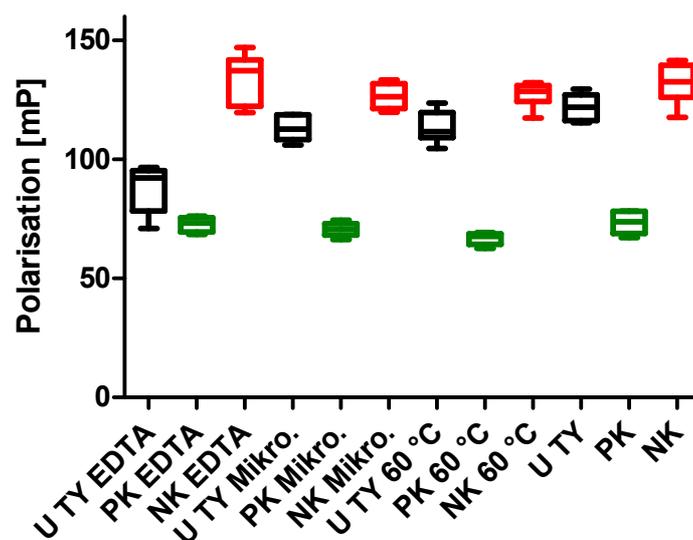


Abb. 4.19 Vergleich unterschiedlicher Techniken zum Abstoppen der Enzymreaktion: U sind schwarz, PK grün und NK rot dargestellt. U TY, PK und NK sind Vergleichsproben ohne Abstoppen der Enzymreaktion. Dargestellt als Box-Whisker-Plot; Polarisationswerte (hintergrundkorrigiert) ergeben sich aus dreifach gemessenen Parallelansätzen ($n=2$).

Auf Grund der gezeigten Ergebnisse erfolgte fortan bei allen Ansätzen zwischen Inkubationsschritt 1 (Enzymreaktion) und 2 (AK-Bindung) die Zugabe von EDTA-Lösung zu einer Endkonzentration von 25 mM. Dies bewirkt ein Abstoppen der Enzymreaktion und gewährleistet auch, dass nach unterschiedlich langer Inkubation im Schritt 2 trotzdem gleiche Ergebnisse erzielt werden können.

Für die in Abbildung 4.18 und 4.19 präsentierten Experimente wurde über Ionenaustausch aufgereinigte Myt1 aus einer Expression in *Drosophila melanogaster* verwendet.

Zur Absicherung und um den Vorteil des Abstoppens der Reaktion zu verifizieren, wurden weitere ähnliche Experimente mit EDTA durchgeführt. Diese erfolgten nicht nur mit oben genannten

Präparationen der Myt1 sondern auch mit einer ungereinigten Enzympräparation, die Wee1-Kinaseaktivität aufweisen sollte.

Während dieser Untersuchungen wurde der Bedarf einer weiteren Optimierung des FP Assays erkannt. Wurde, wie ursprünglich vorgesehen, eine Blindwertkorrektur vorgenommen, kam es bei der Auswertung der NK mit mäßiger Reproduzierbarkeit zu einer so großen Streuung der FP Werte, dass Umsatzprobe und NK sich kaum voneinander unterschieden. Erfolgte die Berechnung der Polarisationen ohne vorherige Korrektur der Fluoreszenzintensitäten um den Hintergrund, war die Streuung von Parallelansätzen bedeutend kleiner. Abbildung 4.20 soll diese Problematik demonstrieren. Ursprünglich diente dieses Experiment der Untersuchung des Effekts unterschiedlicher Volumina der Enzympräparationen von Wee1 und Myt1.

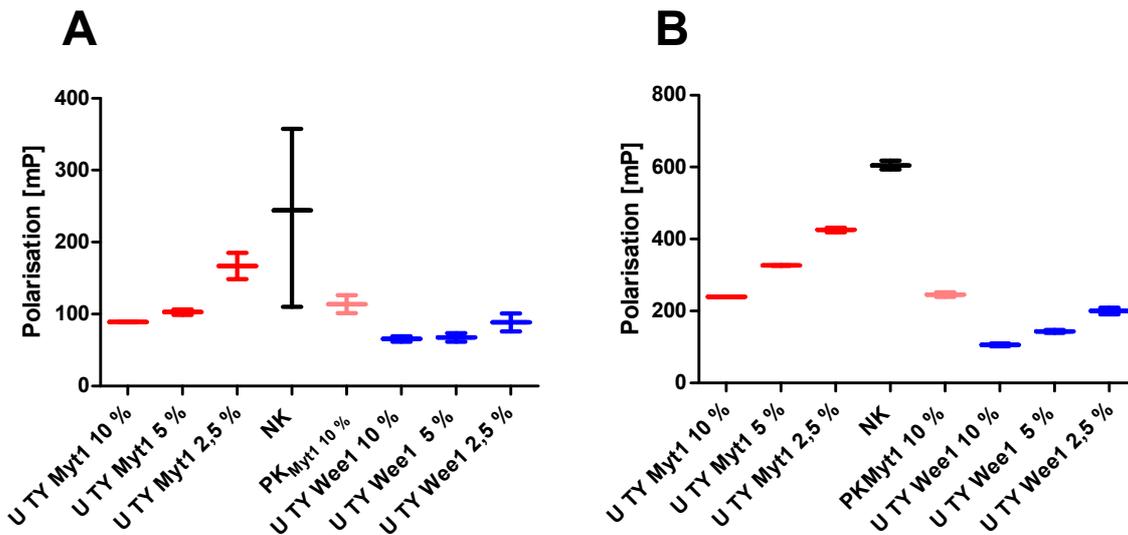


Abb. 4.20 Beispielhafte Darstellung des Hintergrundkorrektureffekts beim FP Assay: Demonstration anhand eines Experiments zur Beurteilung des Substratumsatzes in Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen Enzympräparation (Myt1 / Wee1 aus *D. melano-gaster*). A – Polarisationen nach Hintergrundkorrektur; B – Polarisationen ohne Hintergrundkorrektur; Mittelwerte \pm SD ergeben sich für U und PK aus dreifach gemessenen Parallelansätzen ($n = 2$) und für die NK aus dreifach gemessenen Parallelansätzen ($n = 3$).

Die grafische Auswertung zeigt deutlich eine Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Menge eingesetzten Enzyms. Erwartungsgemäß führen die höchsten Enzymmengen zu den größten Umsätzen. Eine Hintergrundkorrektur (Abb. 4.20 A) führt zu einer größeren Streuung der Einzelwerte. Dies betrifft insbesondere einen Wert der NK. Würde dieser als Ausreißer bewertet, ergäbe sich annähernd eine Grafik wie unter 4.20 B (ohne Hintergrundkorrektur) dargestellt. Da ein solcher Fall selten, jedoch nicht einmalig auftrat, erschien die Bewertung dieses abweichenden Wertes als Ausreißer nicht gerechtfertigt. Aus diesem Grund wurde eine weitere Optimierung des FP Assays angestrebt.

4.2.1.7 Optimierung der FP Methode und Bestimmung des Signalfensters

Leider wiesen Messungen unter den bisher entwickelten Bedingungen immer wieder große Standardabweichungen auf. Der Vergleich verschiedener Messerrien zeigte, dass die Schwankungen mit wechselnden Blindwerten assoziiert waren. Zeigten die Blindwerte einer Messserie kleine Fluoreszenzen, ergaben sich für die berechneten Polarisationen der Proben sinnvolle Werte mit relativ

geringem Fehler. Waren die Blindwerte aber sehr hoch, ergaben sich für die Polarisierungen der Proben, durch die Korrektur mit dem Hintergrundsignal, große Standardabweichungen, teilweise sogar negative Werte. Dieses Phänomen trat auf, obwohl sich die Blindwerte in ihrer Zusammensetzung von Messserie zu Messserie glichen.

Das System lieferte in der bisherigen Form bezüglich seiner Reproduzierbarkeit demnach keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Dies konnte mit der Kalibrierung des Systems zusammenhängen. Wie bereits unter 3.6.1.1 erläutert, muss bei FP Messungen arbeitstäglich eine Kalibrierung des Messsystems erfolgen. Bei diesem so genannten *Gain Adjustment* (GA) wird einerseits die Detektorsensitivität eingestellt, und andererseits eine Feinjustierung beider Detektionsebenen mit einem Fluorophor bekannter FP (*Target-mP*) vorgenommen. Die Justierung beider Ebenen wird durch den K-Faktor repräsentiert. Da in der Assayvariante 2 pTpY-F5M als Sonde eingesetzt wurde, sollte diese auch zur Kalibrierung des Systems verwendet werden. Weil für reines Fluorescein der Zielpolarisationswert bekannt war (35 mP)⁹¹ und dieses auch das Fluorophor der Sonde darstellte, wurde für die Sonde der gleiche Zielwert angenommen.

Während das GA bei den ersten Messungen mit einer Sondenkonzentration von 500 nM pTpY-F5M, einem *Required Value* von 95 % und einem Ziel-Polarisationswert von 35 mP durchgeführt wurde, erfolgte später das GA jeweils auf einem Well mit 150 nM pTpY-F5M. Durch weiteres Absenken der Sondenkonzentration sollte das zur Verfügung stehende Messfenster von 65000 relativen Fluoreszenzeinheiten besser ausgenutzt werden. Hintergrund war, dass der eigentliche Messbereich, auf Grund der niedrigen Sondenkonzentration in den Proben (5 nM), bei Auswahl einer zu hohen Konzentration für das GA im unteren Bereich des Messfensters lag. Aber auch unter diesen Bedingungen war die Reproduzierbarkeit von Messserien noch nicht vollkommen befriedigend.

Schließlich konnte das System durch folgende weitere Änderungen in der Kalibrierung zur Zufriedenheit verbessert werden: Messungen durch A. Rohe zeigten, dass zur täglichen Kalibrierung des Messsystems, die Verwendung von Fluoresceinlösung im unteren nanomolaren Konzentrationsbereich von 20 – 50 nM besser geeignet ist⁸⁷. Wird Fluorescein für das GA eingesetzt und diesem ein Ziel-Polarisationswert von 35 mP zugewiesen, so weist pTpY-F5M als freie Sonde einen Polarisationswert von 95 mP auf. Bei weiterer Verwendung der Sonde pTpY-F5M für das GA müsste also dieser Polarisationswert als Zielwert bei der Kalibrierung des Systems eingestellt werden. Bisher wurde also ein zu niedriger Zielwert für die Sonde angenommen. Demzufolge kam es bei zu großen Fluoreszenzintensitäten des Blindwertes zum oben beschriebenen Problem, nämlich negative Polarisationswerte oder eine zu große Streuung der Polarisierungen der Proben.

Da Fluorescein im Gegensatz zu pTpY-F5M kommerziell verfügbar ist und gegenüber des selbst markierten und aufgereinigten pTpY-F5M eine gleichbleibende Qualität in Bezug auf Reinheit und Gehalt aufweist, wurde von nun an Fluorescein zur täglichen Kalibrierung des NOVOstar eingesetzt.

Zur Definition und Charakterisierung des neuen Messfensters wurde ein weiteres Experiment angeschlossen. In diesem wurden 5, 10, 20 und 50 nM Fluorescein für je ein GA bei einem *Required Value* von 70 % und einem Ziel-Polarisationswert von 35 mP eingesetzt und verschiedene Ansätze eines Maximalsignals (entspricht Negativkontrolle) und eines Minimalsignals (jeweils als Parallelansätze, n = 2) vermessen. Maximalsignal und Minimalsignal waren dabei so zusammengesetzt wie unter 3.6.1.6 und 4.2.1.6 beschrieben, unterschieden sich jedoch bei einer festen AK Konzentration von 0,1 µg/ml in ihrer Sondenkonzentration, die 1, 2, 3,5 oder 5 nM pTpY-F5M betrug. Diese Messungen zeigten, dass bei einem GA mit 50 nM Fluorescein und einer Sondenkonzentration von 5 nM Maximal- und Minimalsignal bei dem kleinsten y-Fehler die größte Differenz aufwiesen. Bei

sinkender Sondenkonzentration wurde hingegen die Streuung der Polarisationswerte größer, was besonders bei Durchführung des GA mit 20 nM Fluorescein deutlich wird (siehe Abb. 4.21).

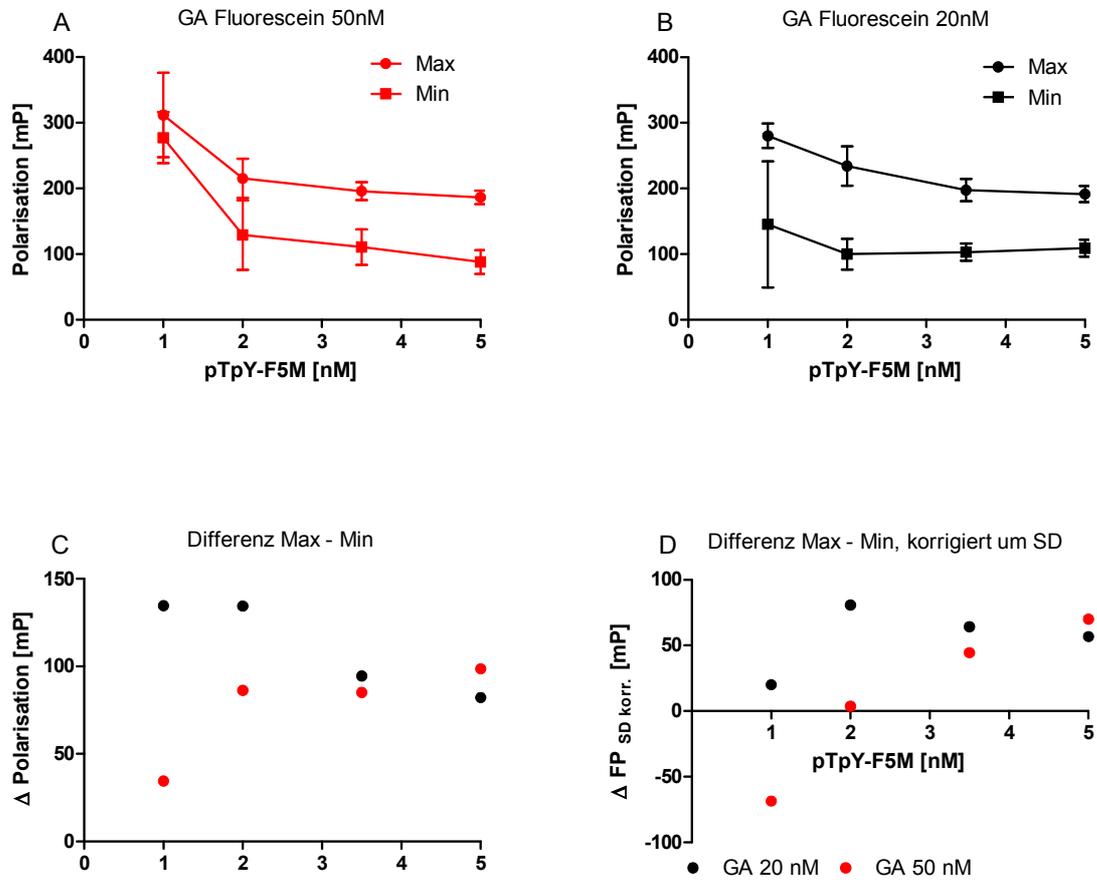


Abb. 4.21 Optimierung des Gain Adjustments durch Verwendung von Fluorescein: Dargestellt sind Maximal- und Minimalsignal nach vorausgegangenem Gain Adjustment mit 20 oder 50 nM Fluorescein (A und B). Grafik C und D zeigen die aus den FP Werten errechneten Differenzen zwischen Maximal- und Minimalsignal. Polarisationswerte ergeben sich aus einer dreifach gemessenen Doppelbestimmung ($n = 2$), abgebildet als Mittelwert \pm SD⁸⁷. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Wie in der Grafik zu erkennen, nehmen die absoluten Polarisierungen bei konstanter AK- aber sinkender Sondenkonzentration sowohl beim Maximal- als auch Minimalsignal zu. Die Zunahme des Maximalsignals liegt begründet in der damit einhergehenden Erhöhung des AK-Sonde-Verhältnisses, was zunächst wünschenswert ist. Die gleichzeitige Steigerung des Minimalsignals ist jedoch nur mit der begrenzten Sensitivität des Gerätes und dem zunehmenden Einfluss von Streulicht bei gegen null strebender Fluoreszenz zu begründen, da die freie Sonde theoretisch durch einen konzentrationsunabhängigen Polarisationswert gekennzeichnet ist. Eine Zunahme der Streuung bei sinkender Sondenkonzentration zeigt deutlich die gerätebedingten Grenzen der Sensitivität. Die um die Standardabweichung korrigierte Polarisationsdifferenz ($\Delta = (\text{Max} - \text{SD}) - (\text{Min} + \text{SD})$) steigt tendenziell bei zunehmender Sondenkonzentration (Abb. 4. 21 D). Für eine begrenzte Streuung muss demzufolge die Sondenkonzentration bei 5 nM liegen. Da bei dieser Konzentration jedoch das AK-Sonde-Verhältnis noch zu Gunsten der Sonde liegt, war auch hier eine Anpassung der AK

Konzentration mit dem Ziel der Erhöhung der Polarisationsdifferenz zwischen Minimal- und Maximalsignal möglich, allerdings auf Grund wirtschaftlicher Aspekte begrenzt.

In einem weiteren Experiment (ähnlich dem unter 3.6.1.3 f. beschriebenen Versuch) wurden daher unter den neuen Bedingungen für das GA noch einmal die Folgen einer Erhöhung der AK Konzentration in den Ansätzen für das Maximalsignal untersucht. Bei einer konstanten Sondenkonzentration von 5 nM pTpY-F5M für die Ansätze Minimal- und Maximalsignal (NK) wurden den NK steigende Mengen an AK (0,05, 0,1, 0,15, 0,2 und 0,4 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Diese AK Konzentrationen entsprechen einem AK-Sonde-Verhältnis von 0,294 (0,05 $\mu\text{g/ml}$), 0,588 (0,1 $\mu\text{g/ml}$), 0,882 (0,15 $\mu\text{g/ml}$), 1,176 (0,2 $\mu\text{g/ml}$) und 2,352 (0,4 $\mu\text{g/ml}$). Den Ansätzen für das Minimalsignal wurde in Anpassung zum Maximalsignal die zur Antikörperkonzentration äquivalente Menge Glycerol (0,39 bis 3,13 %) zugesetzt, um einen eventuellen viskositätsverändernden und damit die FP beeinflussenden Effekt des in der AK Lösung enthaltenen Glycerols bei beiden Signalarten gleichzustellen. Die Bestimmung erfolgte je Konzentrationsstufe mit vier Parallelansätzen (je dreimal gemessen) und ist in Abbildung 4.22 grafisch dargestellt. Die Grafik zeigt deutlich die Zunahme des Polarisationssignals der NK in Abhängigkeit der AK Konzentration. Parallel dazu wird bei steigenden Werten für das Maximalsignal (NK) die relative Standardabweichung geringer. Das Minimalsignal bleibt von steigenden Glycerol Konzentrationen relativ unbeeinflusst, weist aber eine gleichbleibende Standardabweichung von ca. 15 mP auf. Diese verhältnismäßig hohe relative Standardabweichung liegt begründet in den kleineren Absolutwerten für die FP. Bei gleichbleibenden Minimalsignal und steigendem Maximalsignal wird die Differenz zwischen beiden Ansätzen stetig größer.

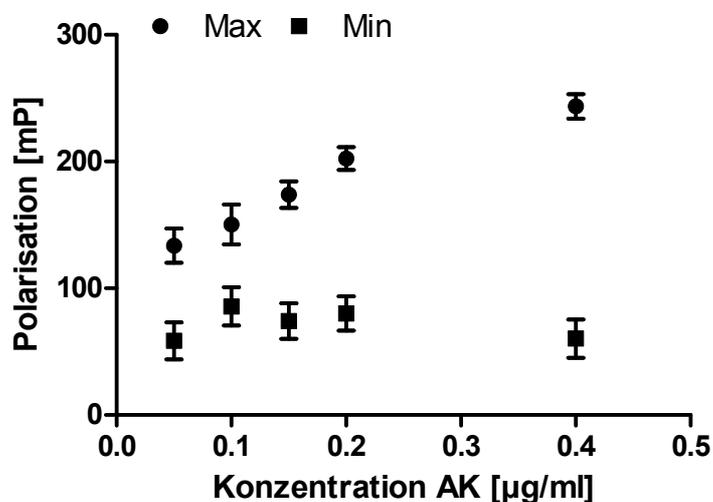


Abb. 4.22 Fluoreszenzpolarisation des Maximalsignals in Abhängigkeit der AK Konzentration: Gezeigt sind je Konzentrationsstufe vier Parallelansätze des Maximal- bzw. Minimalsignals, die, im Falle des Maximalsignals (NK), steigende Konzentrationen des Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK enthalten. Das Minimalsignal enthält für die direkte Vergleichbarkeit mit der NK äquivalente Mengen Glycerol, um einen rein viskositätsbeeinflussenden Effekt auf die FP auszuschließen. Polarisationswerte ergeben sich aus dreifach gemessenen Parallelansätzen ($n = 4$), abgebildet als Mittelwert \pm SD.

Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse wurden darüber hinaus zur Berechnung des Signalfensters und des Z'-Faktors genutzt. Die beiden Parameter Signalfenster und Z'-Faktor dienen der Beurteilung der Qualität und Durchführbarkeit einer Testmethode^{92; 93}. Das Signalfenster ist ein Maß für die Qualität eines Nutzsignals, welches von einem Hintergrundsignal überlagert wird. Beim FP Assay

entsprechen die maximalen Testsignale der Negativkontrolle, die durch AK und Sonde gekennzeichnet wird. Das minimale Testsignal wird durch den Polarisationswert der freien Sonde gebildet. Zur Bestimmung des Signalfensters dienen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Maximal- bzw. Minimalsignale, die aus den 12 Einzelwerten ($n = 4$, dreimal gemessen) des vorausgehenden Experimentes stammen. Die Berechnung erfolgte für jede AK Konzentration separat.

$$\text{Signalfenster} = \frac{\bar{x}_{Max} - \bar{x}_{Min} - 3(s_{Max} + s_{Min})}{s_{Max}} \quad Z\text{'-Faktor} = \frac{\bar{x}_{Max} - \bar{x}_{Min} - 3(s_{Max} + s_{Min})}{\bar{x}_{Max} - \bar{x}_{Min}}$$

Formel 4.4 Berechnung des Signalfensters und des Z'-Faktors: \bar{x}_{Max} Mittelwert des Maximalsignals, \bar{x}_{Min} Mittelwert des Minimalsignals, s_{Max}/s_{Min} Standardabweichung des Maximalsignals bzw. Minimalsignals

Zur Berechnung des Z'-Faktors wurden die gleichen Daten verwendet, die zur Bestimmung des Signalfensters dienen. Auch bei diesem Parameter wird ein maximales Testsignal mit einem Hintergrundsignal verglichen. Zusätzlich geht die Differenz von Maximal- und Minimalsignal als Quotient in die Berechnung mit ein. Tabelle 4.4 stellt die Akzeptanzkriterien des Signalfensters und des Z'-Faktors dar.

Tabelle 4.4 Akzeptanzkriterien für Signalfenster und Z'-Faktor^{92; 93}

Signalfenster	Z'-Faktor
Empfohlen: > 2	Exzellente: > 0,5
Akzeptabel: > 1	Durchführbar: $0 < Z' < 0,5$
Nicht akzeptabel: < 1	Nicht akzeptabel: $< / = 0$

Die Ergebnisse der Berechnung von Signalfenster und Z'-Faktor sind in Tabelle 4.5 aufgeführt. Mit steigender Konzentration des Antikörpers im Maximalsignal (NK) werden Signalfenster und Z'-Faktor größer. Mit einer AK-Konzentration von mindestens 0,15 µg/ml ist der empfohlene Bereich für das Signalfenster erreicht und im Sinne des Z'-Faktors der FP Assay durchführbar.

Tabelle 4.5 Ermittelte Signalfenster und Z'-Faktoren für die verschiedenen AK-Konzentrationen im FP-Assay

AK Konzentration im FP Assay [µg/ml]	Signalfenster	Z'-Faktor
0,05	-0,73	-0,13
0,1	-1,78	-0,43
0,15	2,5	0,26
0,2	6,1	0,45
0,4	11,36	0,6

Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse zum Signalfenster und Z'-Faktor soll außerdem Abbildung 4.23 dienen.

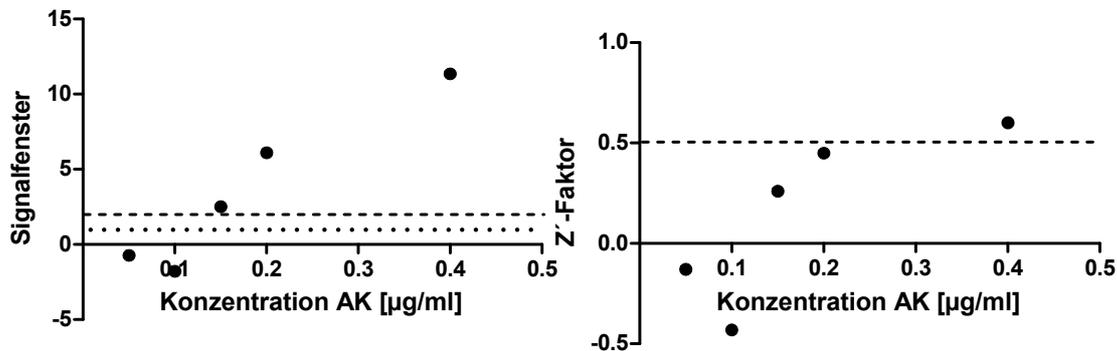


Abb. 4.23 Signalfenster und Z'-Faktor des FP Assays in Abhängigkeit der AK Konzentration: Ein Signalfenster von > 1 (---) bzw. > 2 (---) gilt als akzeptabel bzw. empfohlen. Testsysteme mit Z'-Faktoren zwischen 0 und 0,5 sind durchführbar, bei Werten $> 0,5$ (---) exzellent.

Die zuvor durchgeführten Messungen, bei denen das GA stets mit der Sonde und nicht mit reinem Fluorescein vorgenommen wurde, zeigten, wie oben beschrieben, teils Probleme bei der Blindwertkorrektur. Das Auslassen einer Blindwertkorrektur führte dann meist zu einheitlich höheren Polarisierungen aller Ansätze und zu kleineren Standardabweichungen - das Signalfenster war somit größer. Grundsätzlich ist jedoch die Durchführung eines Hintergrundabgleichs erwünscht, was bei Durchführung des GA mit Fluorescein stets möglich ist. Hierbei ist die Streuung der FP Werte und auch deren Reproduzierbarkeit von Messreihe zu Messreihe deutlich verbessert. Fortan wird daher das GA mit Fluorescein durchgeführt. Wie Abbildung 4.22 und Tabelle 4.5 zeigen, kann auch durch eine Erhöhung der AK Konzentration eine weitere Verbesserung des Assays erfolgen. Für einen Kompromiss zwischen Preis und maximaler Polarisationsdifferenz zwischen Minimal- und Maximalsignal werden daher zukünftig $0,3 \mu\text{g/ml}$ AK je Ansatz eingesetzt.

Der zweite Aspekt, der zu einer Optimierung des FP Systems führte, bezieht sich auf die im Ansatz verwendete Substratkonzentration und beruht auf folgender Überlegung: Da für die Testung von Inhibitoren ein Umsatz von 10 bis 20 % angestrebt werden sollte, ist eine Herabsetzung der Substratkonzentration von ursprünglich $10 \mu\text{M}$ auf $1 \mu\text{M}$ empfehlenswert. Anderenfalls ist eine normale Umsatzprobe von einer Inhibitorprobe nicht auf Grund ihres FP Signals unterscheidbar. Da bei einer zu hohen Substratkonzentration von z.B. $10 \mu\text{M}$ bei einem Umsatz von 20 % $1 \mu\text{M}$ Produkt im Gesamtvolumen (TpY oder pTpY) entstünden, wäre eine Inhibition von 50 % auf Grund des dann noch vorhandenen Produkts von 500 nM kaum in Form einer Polarisationsänderung erkennbar. Die in Abschnitt 4.2.1.5 bestimmte Dissoziationskonstante von pTpY über 132 nM untermauert diese These.

Mit den oben aufgeführten Änderungen ergibt sich abschließend für die Standardansätze des FP Assays – Umsatz, Umsatz Inhibitor, Negativkontrolle (Maximalsignal), Positivkontrolle, Minimalsignal und Reagenzienblindwert (Blank) – das im Methodenteil in Tabelle 3.8 aufgezeigte Pipettierschema.

4.2.2 Entwicklung einer Kapillarelektrophorese Methode

Eine zweite Möglichkeit zur Durchführung von Aktivitätstests oder zur Testung von potentiellen Kinase-Inhibitoren bildet die Kapillarelektrophorese (CE). Hierzu findet sich in der Literatur eine Vielzahl von Beispielen⁹⁴⁻⁹⁷. In dieser Arbeit erfolgte die Etablierung einer CE Methode in Kombination mit Fluoreszenzdetektion (CE-FLD), obgleich während der Entwicklung auch andere Detektionsmöglichkeiten, wie Leitfähigkeits- (CCD) und UV-Detektion, Anwendung fanden. Letztendlich wurde der CE-FLD Methode auf Grund der größten Sensitivität der Vorzug gegeben. Prinzipiell wird hierbei das mit einem Fluoreszenzmarker versehene Peptid direkt vermessen. Eine Differenzierung der unterschiedlich phosphorylierten Peptide erfolgt infolge ihrer Massen sowie Ladungen und der dadurch bedingten unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in der Kapillare.

Vorraussetzung für das spätere Messen von Proben, die neben den Peptiden Enzym und weitere Reagenzien enthalten, war zunächst die Entwicklung einer CE Methode, die die Detektion der unterschiedlich phosphorylierten Referenzpeptide ermöglichte.

4.2.2.1 Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzmarkers

Für die Fluoreszenzdetektion der Peptide war die Markierung aller Referenzpeptide (TY, TpY, pTY und pTpY) mit einem Fluoreszenzmarker notwendig. Dieses wurde mit dem Benzofurazanderivat 4-Fluoro-7-Sulfamoylbenzofurazan (ABD-F) erreicht. ABD-F ist ein thiolreaktives Reagenz, welches nach Konjugation bei pH 2 seine größte Fluoreszenz zeigt. Mit dieser Eigenschaft ist es für die hier angestrebte Applikation unter den hier getesteten Fluoreszenzmarkern am besten geeignet.

Bevor ABD-F zum Einsatz kam, wurde eine Reihe von anderen Markierungsreagenzien getestet. Während dieser diversen Experimente konnten auch die CE Bedingungen für eine Trennung der unterschiedlich phosphorylierten Peptide ermittelt werden.

Die ersten Messungen von F5M-, Monobrombiman (MBB)- und Fluorescamin-markierten Peptiden erfolgten unter Standardbedingungen im leicht basischen mit 0,01 M Boraxpuffer pH 8,0 bei + 25 kV in unbeschichteten *fused-silica* oder mit Polyacrylamid beschichteten Kapillaren (Innendurchmesser 75 μ M) einer Länge von 75 cm (50 cm bis zum Detektor). Während die beiden thiolreaktiven Reagenzien F5M und MBB nach Umsetzung mit den Referenzpeptiden in der CE uneinheitliche und mehrere Signal zeigten, welches für eine Zersetzung oder Abbau sprach, wurden mit Fluorescamin-markierten Peptiden vielversprechende Elektropherogramme erhalten. Eine vorausgehende Aufreinigung der F5M- und MBB-Markierungsansätze mittels HPLC trug nicht zu verbesserten Elektropherogrammen bei. Fluorescamin konnte als aminreaktives Reagenz, welches erst nach der Konjugation mit dem Peptid fluoresziert, ohne einen Reinigungsschritt direkt in die CE injiziert werden. Die Markierung erfolgte in 0,01 M Boraxpuffer pH 9,2 und erforderte keine Inkubationszeiten. Überschüssiges Reagenz störte die Detektion nicht, da es bei Kontakt mit Wasser zu einem nicht fluoreszierenden Produkt hydrolysierte. Die Elektropherogramme zeigten einen gemeinsamen Peak für alle Fluorescamin-markierten Peptide, eine Trennung bzw. Unterscheidung der Phosphorylierungsgrade war nicht möglich. Der Zusatz von 1 mg/ml β -Cyclodextrin zum Boraxpuffer pH 8,0 oder der Ersatz dieses Elektrolyten durch 0,01 M Boraxpuffer pH 6,0 führte zu keiner verbesserten Trennung der Fluorescamin-markierten Referenzpeptide.

Auf der Suche nach optimierten Laufbedingungen wurde daher in Anlehnung an GAMBLE und Kollegen die Messung im Sauren mit 2 M Essigsäure getestet⁹⁸. Mittels CE-FLD wurden bei Anlegen einer positiven Spannung während des Laufs (+ 25 kV) keine Signale erhalten. Eine Messung unter negativer

Spannung (- 25 kV) führte wiederum zu einem Signal, jedoch mit verdoppelter Retentionszeit und erneut ungetrennt. Der Grund hierfür lag in der Derivatisierung der freien Aminfunktion durch Fluorescamin. Während bei Messungen im Basischen und Neutralen bis schwach Sauren die Carbonsäurefunktionen des C-terminalen Cysteins (α -COOH des freien Cysteins $pK_s = 1,7$) und der Glutaminsäure (γ -COOH $pK_s = 4,25$)⁹⁹ an Position 5 dissoziieren, liegen diese in 2 M Essigsäure ($pH \sim 2$) größtenteils protoniert und damit ungeladen vor. Somit führen in 2 M Essigsäure weder die derivatisierten Amin- noch die Carbonsäurefunktionen zur Ausbildung von Ladungen. Das ungeladene Molekül wandert nicht im angelegten elektrischen Feld. Hinzu kommt, dass in dem basischen Markierungsansatz mit Fluorescamin (Boraxpuffer $pH 9,2$) die Carbonsäurefunktionen zwar deprotoniert vorliegen, bei Anlegen einer positiven Spannung diese Anionen jedoch nicht zur Kathode wandern, bzw. beim Injizieren in die Kapillare nicht hineingezogen werden. Dass bei der Messung unter negativer Spannung ein Signal vorhanden war, könnte auf die im Markierungsansatz befindlichen Anionen zurückgeführt werden, die bei Injektion in die Kapillare gelangen und bei Anlegen einer negativen Spannung nach Durchmischung mit der 2 M Essigsäure als Neutralteilchen den Detektor erreichen.

Da unter diesen Bedingungen mittels CE-FLD noch keine Trennung der Peptide erreicht werden konnte, erfolgten anschließend Leitfähigkeitsmessungen mit den in Tris-Puffer gelösten, unmarkierten Peptiden. Dies geschah via CE-CCD (*Conductivity Capacity Detection*) in 2 M Essigsäure als Laufmittel bei + 17,5 kV in einer unbeschichteten 50 μm dicken, 55 cm langen Kapillare. Hierbei konnten erstmalig die unterschiedlich phosphorylierten Peptide voneinander getrennt werden. Damit waren zunächst die Bedingungen zur elektrophoretischen Trennung der unmarkierten Peptide gefunden und es musste lediglich eine Übertragung auf markierte Peptide erfolgen. Auf Grund dieser Erkenntnisse waren die Anforderungen an einen passenden Fluoreszenzmarker definiert: Erstens musste er thiolreaktiv sein, um über freie Aminfunktionen am Peptid zu verfügen und eine Protonierung im Sauren zu ermöglichen. Zweitens sollte das Fluoreszenzmaximum des Markers im Sauren liegen. Drittens sollte möglichst erst bei Konjugation zum Peptid das Fluorophor gebildet werden. Alle drei geforderten Eigenschaften wurden von 4-Fluoro-7-Sulfamoylbenzofurazan (ABD-F) erfüllt, so dass dieses Reagenz fortan zur Markierung eingesetzt wurde. Die fünfminütige Markierung mit ABD-F erfolgte bei 50 °C in Tris-Puffer $pH 8$ gemäß Abschnitt 3.5.4.1. Ohne Aufreinigung über HPLC konnten bereits gute Elektropherogramme erhalten werden, die einen Hauptpeak für das jeweils markierte Peptid zeigten und dessen Retentionszeiten sich deutlich voneinander unterschieden. Da alle im Peptid enthaltenen Verunreinigungen mit Thiolgruppen auch markiert wurden, war jedoch für die spätere Testung eine chromatographische Aufreinigung notwendig (siehe dazu Abschnitt 3.5.5.1). Abbildung 4.24 zeigt vier Elektropherogramme der gereinigten Peptid-ABD Referenzlösungen, die zur Ermittlung der Retentionszeiten der Peptide dienen.

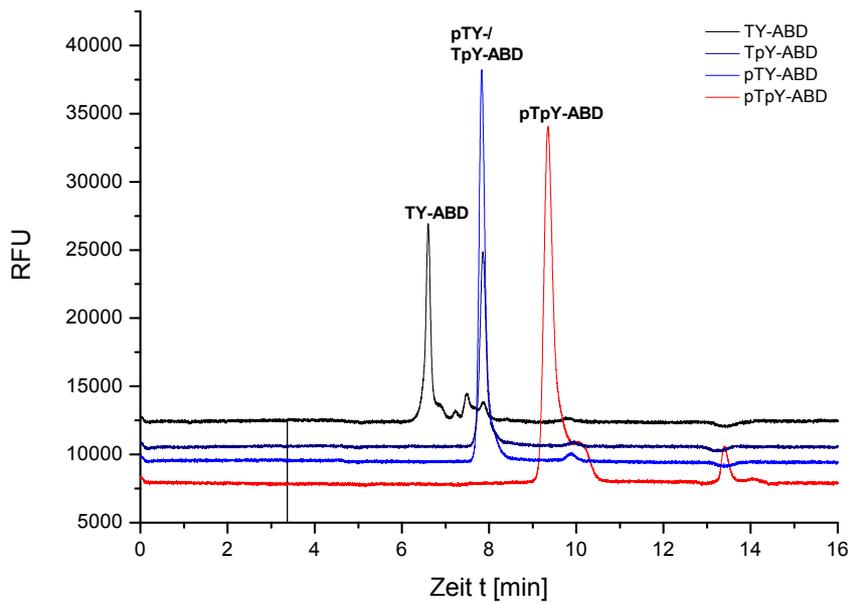


Abb. 4.24 Retentionszeitbestimmung der Peptid-ABD Referenzlösungen über CE: Messung der Referenzlösungen in 2 M Essigsäure ($10 - 20 \mu\text{M}$) bei 25 kV und einem Druck von 10 mbar bei einer Kapillarlänge von 75 cm (bis zum Fluoreszenzdetektor 50 cm) und einem Kapillardurchmesser von $75 \mu\text{m}$.

Die Trennung der Peptid-ABD Referenzen erfolgt auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladung und molaren Masse, weshalb im Folgenden die Ladungsverhältnisse etwas näher betrachtet werden. Bei pH 2 trägt TY-ABD drei positive Ladungen durch den N-Terminus und der ϵ -Aminfunktion zweier Lysine ($\text{pK}_s = 10,3$)⁹⁹. Die Carboxylfunktion des C-Terminus könnte unter diesen Bedingungen teilweise dissoziiert vorliegen (freies Cystein pK_{s1} von $1,7$)⁹⁹, wodurch eine negative Ladung hinzukäme. Allerdings ist die Acidität der freien Carboxylgruppe bei Peptiden gegenüber den entsprechenden Aminosäuren geringer⁹⁹, was den Anteil der Peptidmoleküle mit negativ geladenem C-Terminus reduzieren sollte. Das Einführen einer Phosphatgruppe, wie bei TpY- und pTY-ABD der Fall, führt bei pH 2 zu einer weiteren negativen Ladung, da auch diese teilweise dissoziiert vorliegen sollte ($\text{pK}_{s1} = 2,1$, $\text{pK}_{s2} = 7,2$, $\text{pK}_{s3} = 12,4$)¹⁰⁰. pTpY-ABD würde demzufolge sogar zwei zusätzliche negative Ladungen tragen. Jede negative Ladung trägt zur Verminderung der Migrationsgeschwindigkeit bei und führt zur Erhöhung der Migrationszeit, weshalb zuerst das unphosphorylierte, dann die monophosphorylierten Peptide und zuletzt pTpY-ABD migrieren.

Der Nachweis, dass im untersuchten Konzentrationsbereich von $4 - 20 \mu\text{M}$ ein linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration besteht, konnte erbracht werden, indem für alle vier Peptide in diesem Konzentrationsbereich eine Kalibrierung mit linearer Regression durchgeführt wurde. Die relativen Reststandardabweichungen (RSD) für die Kalibrierfunktion lagen bei allen vier Peptiden unter 3%. Für TY-, pTY- und TpY-ABD nahm der Regressionskoeffizient jeweils einen Wert $> 0,999$ und für pTpY-ABD $> 0,99$ an.

Auf Grund der Unterscheidbarkeit der Peptide im Elektropherogramm und des linearen Zusammenhangs zwischen Peakfläche und Peptidkonzentration im Bereich von $4 - 20 \mu\text{M}$ war der Anteil von unphosphoryliertem zu phosphoryliertem Peptid nach einer Kinasereaktion direkt bestimmbar. Die Umsatzversuche mit Kinase und auch die Inhibitorentestung wurden mit

Konzentrationen von 10 μM TY-ABD durchgeführt, so dass bei der Auswertung davon auszugehen war, dass sowohl die Abnahme des Signals für TY-ABD als auch die Zunahme des Signals für mono- oder diphosphoryliertes Peptid, in diesem Konzentrationsbereich linear verliefen.

Die grundlegenden Parameter der CE Methode waren somit definiert: Nach einer Fluoreszenzmarkierung der Peptide mit ABD-F erfolgte die elektrophoretische Trennung dieser in 2 M Essigsäure bei positiver Spannung in einer 75 μm dicken, mindestens 55 cm langen Kapillare. Die moderate Erhöhung der Spannung oder des Drucks während des Laufs von 10 bis 20 mbar führte zu einer Verkürzung der Retentionszeit bei gleichbleibender Auflösung. Zu hohe Drücke oder Spannungen führten hingegen vermehrt zu Störsignalen und Verschlechterung der Trennung. Der Druck während der Injektion konnte zwischen 25 und 80 mbar variiert werden. Je höher der Injektionsdruck desto mehr Probe gelangte in die Kapillare und das Detektorsignal stieg. Jedoch führten höhere Injektionsdrücke zu einer verschlechterten Auflösung der Peaks. Eine weitere Möglichkeit zur Verminderung der Messdauer stellte das Kürzen der Kapillare dar – die Reduktion der Kapillarlänge um die Hälfte führte zu einer Verminderung der Retentionszeit auf ein Viertel. Die Messung konnte sowohl mit Polyacrylamid-beschichteten als auch mit unbelegten Kapillaren erfolgen.

4.2.2.2 Erste Umsatzversuche und Aktivitätsmessungen der Myt1 Kinase

Nachdem die grundsätzlichen Methodenparameter für die Bestimmung der Referenzpeptide feststanden, wurde in den folgenden Experimenten überprüft, ob bei Zugabe einer Myt1 Präparation aus der Expression von *E. coli* HM130 pGeX6P1-hMyt1-His₄ ein Umsatz mittels CE messbar war. Da die Myt1, wie bereits unter 2.2.2.2 erörtert, zu einer Phosphorylierung von Thr¹⁴ und Tyr¹⁵ der CDC2 führt, sollte in dem hier verwendeten System durch die Kinaseaktivität eine Umsetzung von TY-ABD zu TpY-, pTY- und pTpY-ABD erfolgen.

Ein solcher Umsatz war bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde durch die Bildung zusätzlicher Signale im Elektropherogramm der Umsatzprobe (Abb. 4.25) bei der Retentionszeit von monophosphorylierten Peptid erkennbar. Die dazugehörige Blindprobe, die alle Komponenten, jedoch kein Enzym enthielt, zeigte bis auf einen kleinen Peak für eine dem TY-ABD zugehörige Verunreinigung kein zusätzliches Signal für monophosphoryliertes Peptid. Ebenso verhielt sich eine modifizierte Blindprobe, die Enzym, aber kein ATP enthielt (ohne Abb.).

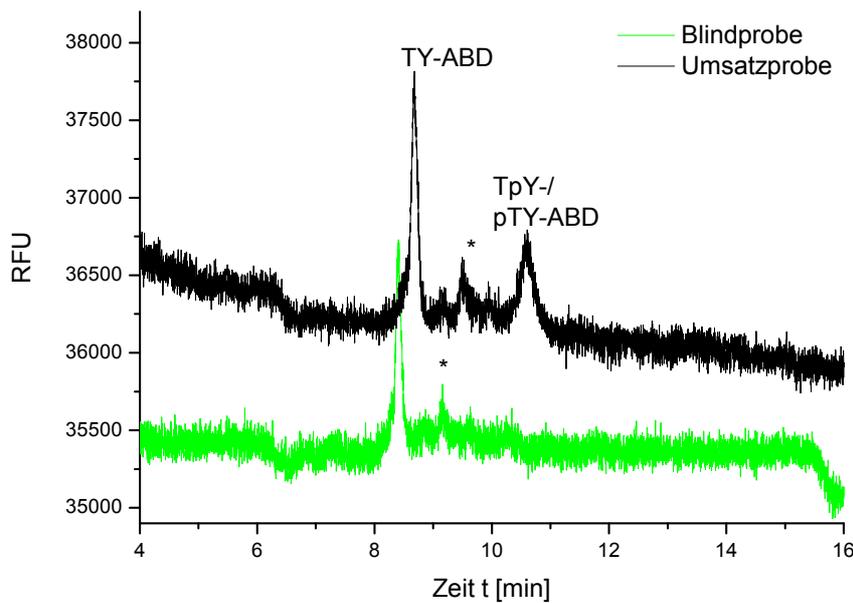


Abb. 4.25 Elektropherogramm einer Aktivitätsbestimmung der Myt1: Inkubation der Ansätze für eine Stunde bei 30 °C. Konzentration der Ansätze: 10 μ M TY-ABD, 100 μ M ATP in Puffer und 20 μ l Enzymfraktion; die Blindprobe ist enzymfrei. Probe 0,3 min bei 50 mbar injiziert, Lauf mit 2 M Essigsäure bei 25 kV und 10 mbar.* - Verunreinigung der TY-ABD Lösung.

Eine Inkubation über 15 Stunden führte gemäß Abb. 4.26 zur deutlichen Bildung von pTpY-ABD. Ein weiterer Ansatz einer Probe wurde nach einer, drei, vier, sechs und acht Stunden Inkubationszeit vermessen. Hierbei wurde die Bildung von pTpY-ABD erst nach sechs bis acht Stunden im Elektropherogramm erkennbar (ohne Abb.). Bezüglich des Ablaufs der Kinasereaktion lässt sich also vermuten, dass zunächst die Bildung von monophosphoryliertem Peptid erfolgt und erst daraus diphosphoryliertes Peptid generiert wird. Die Tatsache, dass zunächst das Signal für pTY-ABD bzw. TpY-ABD zunimmt und ab der sechsten Stunde nicht größer wird, sogar eher abnimmt, scheint diese Theorie zu bestätigen. Eine Unterscheidung, ob beide monophosphorylierte Peptide bei der Reaktion gebildet wurden und, wenn zutreffend, in welchem Verhältnis zueinander, war an dieser Stelle nicht möglich (siehe dazu auch Abschnitt 2.7). Die Ergebnisse zeigten aber, dass eine Inkubationszeit von einer bis zwei Stunden durchaus ausreichten, um eine Umsetzung von TY-ABD zu monophosphoryliertem Peptid zu erhalten und die Aktivität der Kinase, auch im Hinblick auf später folgende Inhibitorenuntersuchungen, zu bestimmen. Von Enzymcharge zu Enzymcharge konnte es jedoch erforderlich sein, die eingesetzte Enzymmenge pro Ansatz als auch die Inkubationszeit anzupassen, um stets ähnliche Umsätze zu erhalten.

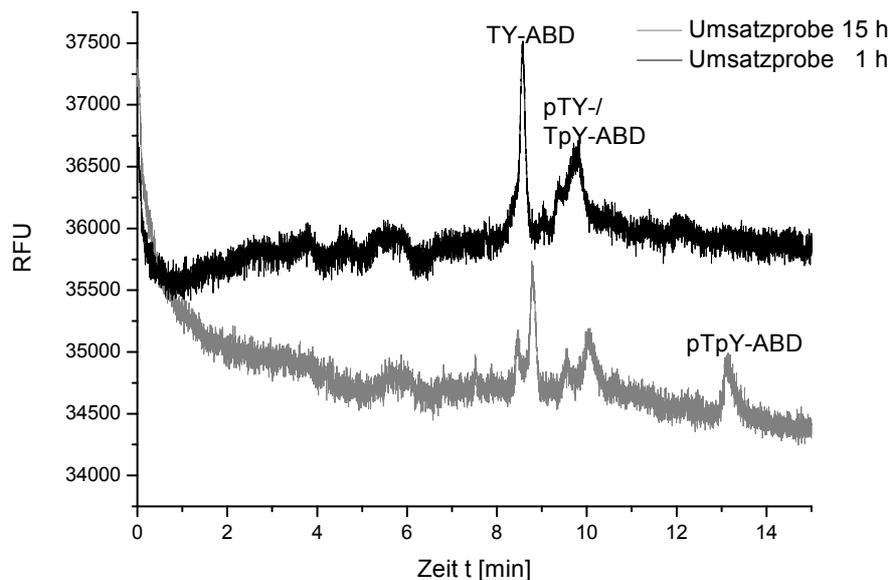


Abb. 4.26 Vergleich unterschiedlicher Inkubationszeiten einer Umsatzprobe: CE Bestimmung einer Umsatzprobe nach einer und 15 Stunden Inkubation bei 30 °C. Konzentration des Ansatzes: 10 μM TY-ABD, 100 μM ATP in Puffer und 20 μl Enzymfraktion (aus Reinigung B von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄). Laufbedingungen siehe Abb. 4.25.

Eine Erhöhung der ATP Konzentration von 100 μM auf 500 μM und die Änderung der Inkubationstemperatur von 30 °C auf 37 °C hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Phosphorylierung. Die Erhöhung der Enzymmenge pro Ansatz von ursprünglich 20 μl Enzymfraktion auf 40 μl Enzymfraktion führte zu einer deutlichen Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses, da vermutlich die hohe Proteinkonzentration zu Belägen in der Kapillare führte.

Da die zu testenden Substanzen in industriellen Screenings und auch hier in der Regel in DMSO gelöst werden, wurden bereits an dieser Stelle erste Untersuchungen durchgeführt, um die DMSO Verträglichkeit der Kinase zu überprüfen. Gleichzeitig konnte untersucht werden, ob das Messsystem DMSO in moderat höheren Konzentrationen tolerierte. Hierzu wurden verschiedene Umsatzproben mit 5, 1 und 0,5 % DMSO versetzt und mit einer Probe verglichen, die kein DMSO enthielt. 5 % DMSO im Ansatz führten, vermutlich durch den denaturierenden Einfluss des DMSO, dem einige Enzyme sehr empfindlich gegenüber sind, zu einer vollständigen Inhibition der Kinase aus *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄, beeinträchtigten die Messung selbst jedoch nicht. 1 % und 0,5 % DMSO waren für das System und die Kinase verträglich, da der Umsatz dieser Proben vergleichbar mit dem Umsatz einer Probe ohne DMSO war. Diese Ergebnisse haben dazu geführt, dass bei den folgenden Experimenten ein DMSO Gehalt von 1 % eingestellt wurde. Die übrigen Konzentrationen in einer Umsatzprobe blieben mit 100 μM ATP und 10 μM TY-ABD zunächst unverändert.

4.2.2.3 Optimierung der CE Methode

Eine Schwäche der entwickelten Methode zeigte sich in Retentionszeitschwankungen innerhalb einer Messreihe, die besonders dann auftraten, wenn Umsatzproben aus Aktivitätstests vermessen wurden. Von Lauf zu Lauf kam es besonders bei diesen Proben zur Erhöhung der Retentionszeit bei gleichzeitiger Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses, weil die Kapillaroberfläche allmählich

durch Fremdproteine belegt wurde. Teilweise konnte dieses Phänomen durch längeres Spülen mit Natronlauge beseitigt werden. Dieses Vorgehen war aber nicht zufriedenstellend, da das Problem selbst nicht vollständig beseitigt und zusätzlich die Gesamtanalysenzeit erhöht wurde.

Aus diesem Grund wurde das Retentionsverhalten und die Beeinflussung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Zusatz unterschiedlicher Reagenzien wie Polyvinylpyrrolidon (PVP), Dodecyltrimethylammoniumbromid (DTMAB), Brij 35, Cyclodextran M 70 und Hydroxyethylcellulose (HEC) zur 2 M Essigsäure untersucht. Als Probe wurde entweder eine Umsatzprobe oder eine Mischung der Referenzpeptide (Peptidmix) eingesetzt. Eine Beeinflussung des Signal-Rausch-Verhältnisses konnte durch je 0,025 % und 0,075 % PVP, DTMAB oder Brij 35 in 2 M Essigsäure nicht festgestellt werden.

Eine Verbesserung der CE Methode konnte jedoch durch den Zusatz von 0,1 % HEC erzielt werden. Während unter den Vorbedingungen (2 M Essigsäure allein) die Retentionszeit einer Mischung der Peptide innerhalb einer Messreihe schwanken konnte, wurde durch den Anteil von 0,1 % HEC im Laufmittel die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten, die Trennung und auch die Signalstärke verbessert. Dies gelang, weil störungsfrei bei höheren Drücken während des Injizierens und während eines Laufes gearbeitet werden konnte (Abb. 4.27). Außerdem konnte mit diesem Reagenzzusatz die Untersuchung von Umsatzproben im Rahmen von Aktivitätstests nach einer Enzymexpression optimiert werden. Eine Unterscheidung der Signale des Substrats bzw. Produkts von durch Hydrolyse gebildeten Störkomponenten konnte erheblich verbessert werden und somit die Differenzierung einer Probe mit Umsatz gegenüber einer Probe ohne Umsatz aber mit Störpeaks erleichtern.

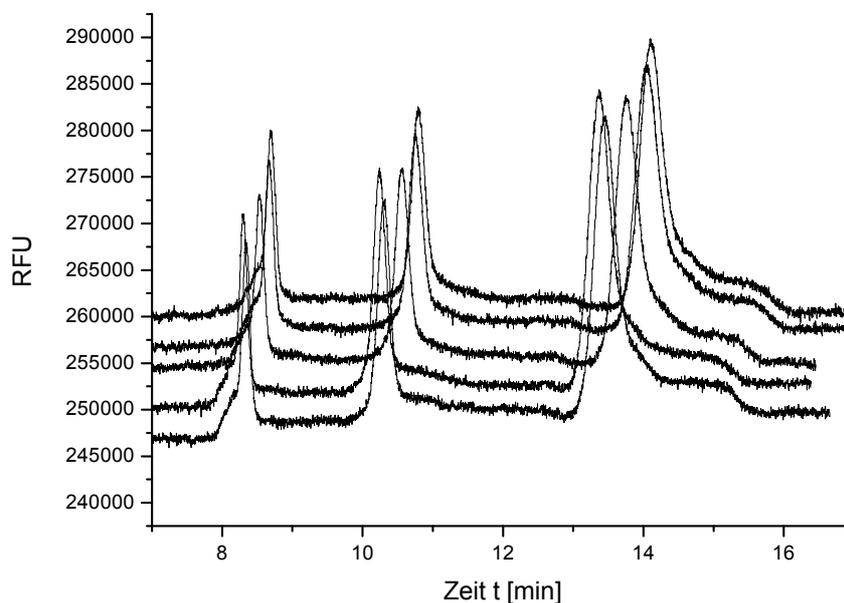


Abb. 4.27 Mehrfache Injektion eines Peptidmixes zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Signalstärke und Retentionszeit: 0,1 % HEC in 2 M Essigsäure, Peptidmix 0,5 min bei 50 mbar injiziert, 20 mbar Druck und 25 kV während des Laufes; Peak 1 TY-ABD, Peak 2 pTY-/TpY-ABD, Peak 3 pTpY-ABD

Durch Erhöhung des Injektionsdrucks, der Injektionszeit und die Variation des Drucks während eines Laufs wurde bei Bedarf die Methode hinsichtlich Signalhöhe und Retentionsverhalten modifiziert. Mit steigendem Injektions- und Laufdruck konnten die Signalhöhe verstärkt und die Elektrophoresedauer verkürzt werden. Umgekehrt war durch starke Erniedrigung des Laufdrucks auf wenige Millibar sogar

eine Trennung beider monophosphorylierten Peaks möglich, so dass alle vier Peptide differenziert werden konnten. Ein druckloses Messen führte allerdings zu stärkeren Basislinienschwankungen, die sich wiederum nachteilig auf die Auswertbarkeit auswirkten⁸⁷.

Nach Abschluss der Optimierung ergab sich für Aktivitätsbestimmungen das in Tabelle 3.11 gezeigte Pipettierschema.

4.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Es wurden zwei Testsysteme entwickelt, die die Möglichkeit bieten sollten, in der Arbeitsgruppe synthetisierte potentielle Hemmstoffe auf ihre Wirkung gegenüber der Myt1 Kinase zu testen.

Beide Systeme dienten in dieser Arbeit hauptsächlich der Testung und Aktivitätsbestimmung der bei der Optimierung der Expression und Reinigung der Myt1 anfallenden Enzymchargen. Dabei bedingten sich die beiden Prozesse (Methodenentwicklung / -etablierung und Enzymexpression) teilweise gegenseitig: Der Abschluss der Entwicklung eines Testsystems kann nur bei Vorhandensein des jeweiligen Enzyms erfolgen. Umgekehrt kann eine erfolgreiche Expression und Reinigung nur über ein funktionierendes Testsystem überprüft werden. Da in der Arbeitsgruppe und am Standort zu Beginn der Arbeit weder das Eine noch das Andere vorhanden war und die Myt1 Kinase damals wie heute nicht käuflich zu erwerben ist, stellte die Aufgabe eine Herausforderung dar.

Zum Ersten wurde ein Assay etabliert, der unter Verwendung der Fluoreszenzpolarisation bereits in der Literatur in einer ähnlichen Form beschrieben wurde. Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Fluoreszenzpolarisations Immunoassay, der im Gegensatz zur anfangs angestrebten Assayvariante in Bezug auf den Bedarf von Antikörper und Markierungsreagenz wesentlich kostengünstiger war. Die Kostenersparnis ergibt sich aus dem Kompartitionsprinzip⁶¹, welches dem Assay zu Grunde liegt. Außerdem ermöglicht ein solcher Ansatz die Anwendung eines breiteren Antigenspektrums, da nicht nur markierte Peptide, sondern auch ganze Proteinkomplexe eingesetzt werden können⁵⁹. Auf Grund der Möglichkeit, den Assay im 96-Well-Plattenformat ausführen zu können, ist die Methode geeignet, mehrere Messungen zeitgleich durchzuführen und somit einen hohen Durchsatz an Proben, z.B. für Inhibitorentestung an Kinasen zu erzielen. In der Optimierungsphase konnte der Assay durch die Änderung der Kalibrierung des Systems bezüglich der Hintergrundkorrektur verbessert werden, was positive Auswirkungen auf die Streuung der Einzelwerte und damit Signalfenster und Z'-Faktor hatte. Gemessen an den Qualitätskriterien für Assays nach ZHANG und IVERSEN handelt es sich hier um einen exzellenten Assay, der für Hochdurchsatz-Screenings bestens geeignet ist (siehe dazu Punkt 4.2.1.7).

Zum Zweiten wurde ein Testsystem entwickelt, welches als Messverfahren die elektrophoretische Auftrennung des Probenansatzes mittels CE und anschließender Fluoreszenzdetektion nutzt. Diese Methode hat den Vorteil, den Ablauf einer Kinasereaktion genau verfolgen und nachvollziehen zu können. Allerdings birgt sie auch den Nachteil des insgesamt geringen Durchsatzes in Folge von relativ langen Retentionszeiten und der Tatsache, dass immer nur ein Ansatz untersucht werden kann.

Neben offensichtlichen Vor- und Nachteilen dieser Methoden zeigen sich einige erst im Detail, weshalb im folgenden Abschnitt eine Gegenüberstellung beider Methoden abschließend erfolgt.

4.2.3.1 Vergleich der beiden Testsysteme

Die Analytik mittels CE benötigte Probenmengen im Nanoliterbereich, wenngleich ein Ansatzvolumen von ca. 100 µl erforderlich war, damit die Kapillare bei der Probenaufnahme tief genug in die

Probenlösung eintauchen konnte. Deswegen, aber auch auf Grund der Tatsache, dass neben der Technik an sich nur wenige zusätzliche Materialien für die Analytik benötigt werden, ist es eine verhältnismäßig günstige Methode. Der FP Assay hingegen ist kostenintensiver. Trotz Verwendung von *half-area* Platten wird bisher pro Well ein Volumen von 100 μl benötigt, da für FP Messungen empfohlen ist, die Wells relativ hoch mit Messlösung zu befüllen, um Werteschwankungen zu minimieren. Bei den hier durchgeführten Zwei- bis Dreifachbestimmungen bedeutete das, mit einem herstellungsbedingt kleinen Aufschlag von 20 μl , ein Volumen von insgesamt 220 bis 320 μl je Probenansatz. Einen weiteren erheblichen Beitrag zur Kostensteigerung dieses Assays leistet der verwendete Antikörper. Nach der Optimierung werden 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper benötigt, somit ergibt sich pro Well allein durch den darin enthaltenen AK ein Preis von 11,06 Euro. Das sind Kosten, die definitiv für ein Screening großer Substanzbibliotheken zu hoch sind. Der Wechsel auf einen unspezifischeren anti-Phospho-Tyrosin Antikörper, sowie weiteres Reduzieren des Volumens pro Well könnten Optionen zur Kostenreduktion darstellen. Möglicherweise geht dies aber zu Lasten der Sensitivität und Spezifität, was sich z.B. in einem kleineren Signalfenster und damit in der Assaygüte niederschlagen könnte.

Ein wesentlicher Vorteil des FP Assays im Plattenformat ist die deutliche Zeitersparnis. Die CE Analyse nur einer Probe benötigt mit Spülen der Kapillare ca. 20 min. Da jede Probe mindestens zweimal vermessen werden sollte, würde man beispielsweise für eine IC_{50} -Bestimmung nur einer Substanz einen ganzen Tag benötigen. Die Vermessung einer ganzen 96-Well-Platte benötigt bei dreimaliger Messung ca. 10 min. Hier können aber theoretisch, wenn die vier Wells der Eckbereiche der Platte frei bleiben, 92 Wells befüllt werden. Abzüglich der 13 Wells, die standardmäßig auf Gain Adjustment, Blindwert, Maximal-(NK) und Minimalsignal sowie den Umsatz entfallen, bleiben 79 Wells zur Testung von Substanzen. Bei einer Dreifach-Bestimmung könnten somit im Screening 26 Verbindungen gleichzeitig bestimmt werden.

Des Weiteren weist der FP Assay nach der Optimierung eine Sensitivität auf, die durch die CE Methode unerreichbar bleibt. Die Methode ermöglicht selbst geringe Aktivitäten der Myt1 zu erkennen. Während beim FP Assay der Umsatz von wenigen Nanomolar Substrat in Form eines erniedrigten FP Signals erkannt wird, sind bei der CE mindestens ein mikromolar phosphoryliertes Peptid notwendig, um einen Peak wahrzunehmen. Beispielsweise würde ein einprozentiger Umsatz zu TpY bei Einsatz von 10 μM Substrat mittels FP erkannt, jedoch über die CE Methode unerkannt bleiben. In Bezug auf die Spezifität verhält es sich ähnlich. Durch den Einsatz des hoch spezifischen Phospho-CDC2 Tyr¹⁵ AK wird die Unterscheidung einer Phosphorylierung am Tyrosin(15) (TpY und pTpY) von einer am Threonin(14) (pTY) möglich, da dieser mit dem zuletzt genannten Peptid keinen Komplex eingeht. Die Unterscheidung der monophosphorylierten Peptide via CE ist auch möglich, allerdings nur bei stark reduzierten Laufdrücken, die wiederum längere Analysenzeiten von etwa 30 min pro Lauf erfordern. Darüber hinaus zeigte sich die CE empfindlich gegenüber unsauberer Enzympräparationen.

Hohe Umsätze können durch verschiedene andere, nicht nur auf die Wirkung von Kinasen zurückführbare Phänomene vorgetäuscht werden. Im Folgenden wird auf diese Einflussfaktoren näher eingegangen:

Das Trennprinzip bei der Elektrophorese beruht auf Größe und Ladung der Analyten. Die hier verwendeten Peptide zeichnen sich durch eine relativ ähnliche Größe aus – sie unterscheiden sich

lediglich in der Anzahl der Phosphatgruppen. TY trägt drei positive Ladungen, die durch den N-Terminus und zwei Lysin-Seitenketten gebildet werden. Jede Phosphorylierung des Peptids führt teilweise bei pH 2 zu einer zusätzlich negativen Ladung. Diese Tatsache bedingt größtenteils die unterschiedlichen Retentionszeiten der Peptide und ist reproduzier- bzw. kalkulierbar. Nicht berechenbar sind aber Vorgänge, die zur Veränderung der Peptidlänge und des Ladungszustandes führen und vollkommen unerkant bleiben. Beispielsweise könnte eine Pyroglutaminsäurebildung am N-terminalen Glutamin zum Verlust einer positiven Ladung führen und somit das Laufverhalten vollkommen verändern. Ein pyroGlu-TY würde dann mit TpY und pTY migrieren. Einen ähnlichen Effekt könnten Peptidasen auslösen, wenn sie durch unsaubere Enzympräparationen in den Ansatz hineingebracht würden und beim Peptid zur Abspaltung von Aminosäuren führten. Dies könnte Einfluss auf die Größe haben und beispielsweise bei C-terminaler Spaltung des Dipeptids Lys-Cys einen weiteren Ladungsverlust beinhalten. Diese Vorgänge könnten zur Änderung des Migrationsverhaltens führen, sind nicht abschätzbar und können nur über hochreine Enzympräparationen minimiert werden. Der Ausschluss einer Pyroglutaminsäurebildung wäre vergleichsweise einfach möglich, indem das N-terminale Glutamin der Peptide durch Glutaminsäure ersetzt würde. Eine Zyklisierung mit Ammoniak-Abspaltung wäre dann ausgeschlossen und überdies entspräche Glutaminsäure der natürlichen Aminosäure an dieser Position.

Unterdessen bietet die CE Methode insofern einen Vorteil, als dass sie eine kontinuierliche Endpunktbestimmung zulässt. Ohne Abstoppen der Enzymreaktion mit EDTA kann eine Probe mehrmals hintereinander injiziert werden, was Studien über den Reaktionsverlauf ermöglicht. Sollen kleinere Zeitintervalle als 20 bis 30 Minuten gemessen werden, ist der Ansatz mehrerer Umsatzproben erforderlich, die nach unterschiedlichen Zeiten durch EDTA Zugabe terminiert werden. Auf diese Weise gelingt es mit der CE Methode Kinetiken zu erstellen. Sie gewährt innerhalb eines Laufes alle Peptide – sowohl beide monophosphorylierten als auch das biphosphorylierte – zu erfassen und gibt einen guten Einblick über die Änderung von Substrat- und Produktkonzentration.

Hier zeigt sich neben der hohen Kosten der zweite Nachteil des FP Assays: Bisher ist mit diesem als Einpunktassay nur eine diskontinuierliche Endpunktbestimmung möglich. Ursprünglich war der Assay so konzipiert, dass Sonde und AK zusammen mit Substrat und Enzym inkubiert wurden und das kontinuierliche Messen der FP durch die Inkubation der Platte im Reader direkt ermöglicht werden konnte. Dieser Ansatz gelang nicht, so dass verschiedene Techniken zum Abstoppen der Reaktion erwogen wurden. Schließlich wurde als Terminierungsreagenz EDTA ausgewählt. Infolgedessen erfolgt momentan zuerst die Enzymreaktion, dann das Abstoppen mit EDTA und in einem zweiten Schritt die Zugabe von AK und Sonde, was die AK-Reaktion auslöst. Dennoch sollte in der Zukunft, sobald sehr reine Myt1-Präparationen vorhanden sind, ein gemeinsamer Ansatz mit Substrat, Enzym, Sonde und AK noch einmal zur Testung gelangen. Auf diese Weise könnten auch mittels FP Assay Kinetiken einfach und schnell bestimmt werden.

Nachteilig wirkt außerdem der ausschließliche Einsatz eines Phospho-Tyrosin Antikörpers, der lediglich die Erkennung von Umsätzen zu TpY und pTpY ermöglicht. Die Bildung von pTY ist bislang über den Assay nicht detektierbar und eine reine Threonin(14) Phosphorylierung durch die Myt1 bleibt unerkant. Um diesen Mangel auszuräumen, wäre die Adaption des Messsystems hinsichtlich der Verwendung eines gegen Phospho-Threonin gerichteten Antikörpers notwendig. Ein spezifischer, monoklonaler Phospho-CDC2 Thr¹⁴ AK ist derzeit kommerziell nicht verfügbar, so dass zunächst unspezifischere AK auf ihre Eignung getestet werden müssten.

Trotz der vielen möglichen Verbesserungen gilt für beide Methoden, dass mit deren Etablierung ein Tool zur Aktivitätsbestimmung von Kinasen geschaffen wurde. In dieser Arbeit erfolgten hauptsächlich Arbeiten mit der Myt1 Kinase. Ebenso ist aber auch die Übertragung auf andere Kinasen, wie z.B. die Wee1 Kinase möglich. Teilweise können die Methoden die Defizite der jeweils anderen ausgleichen – wie z.B. dass die langwierige CE Methode das Erstellen von Kinetiken ermöglicht, was bisher über den zügig messenden FP Assay noch nicht möglich ist, dieser sich hingegen besser für IC₅₀-Bestimmungen eignet.

Die Eignung der CE Methode zur Substanztestung konnte im Rahmen einer Diplomarbeit im Fachbereich Lebensmittelchemie demonstriert werden⁸⁸. Der FP Assay wurde zum Abschluss dieser Arbeit in einer kleineren Testserie erprobt. Ergebnisse dieser Testung werden in Abschnitt 4.4.2 dargestellt.

4.3 Expression der Myt1 Kinase

Die Myt1 ist ein am Endoplasmatischen Retikulum und Golgi Apparat gebundenes Enzym, welches als negativer Regulator des CDC2/Cyclin B Komplexes am G2/M-Übergang im Zellzyklus beteiligt ist. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist weder die humane Myt1 noch ein Homolog der Myt1 käuflich zu erwerben. Da das Ziel der Arbeitsgruppe die Testung potentieller Myt1 Kinase-Inhibitoren mittels verschiedener biochemischer Methoden war, musste das Enzym selbst hergestellt werden.

In der Literatur ist bereits 1997 durch LIU et al. die rekombinante Expression der humanen Myt1 Kinase als N-terminale Fusion mit Glutathion-S-Transferase in *E. coli* JM109 pGEX-2TNMyt1 beschrieben worden¹¹.

Für die rekombinante Eigenherstellung der humanen Myt1 kooperierte die Arbeitsgruppe Dr. Schmidt mit der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Pietzsch (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) und mit Dr. Frank Erdmann der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie in Halle (Saale).

Prinzipiell kommen für die Herstellung der Myt1 verschiedene Strategien in Betracht, die sich in der Auswahl des Expressionsmodells grundlegend unterscheiden. In Frage kommen erstens eine bakterielle Expression, des Weiteren eine Expression in Hefen, drittens in Insektenzellen und schließlich die Expression in humanen Zellen. Die Expression in *E. coli* und Insektenzellen erfolgte durch die eigene Arbeitsgruppe aktiv in Zusammenarbeit mit den oben genannten Institutionen. Aktuell wird von Dr. Frank Erdmann eine rekombinante Expression der Myt1 in humanen Zellen bearbeitet.

Keines der genannten Expressionsmodelle eignete sich von Beginn der Experimente an so gut, dass es als das einzig Beste gelten könnte. Auf Grund der bereits vorhandenen Literatur sowie der Möglichkeit einer Expression im größeren Maßstab, wurde sich besonders in dieser Arbeit mit verschiedenen Strategien zur rekombinanten Herstellung der Myt1 in *E. coli* beschäftigt. Dazu wurden verschiedene Stämme und Vektoren getestet. Parallel erfolgten durch Dr. Frank Erdmann Experimente zur

Expression in Insektenzellen. Die unterschiedlichen Ansätze und Fraktionen daraus wurden durch die Arbeitsgruppe Dr. Schmidt auf Aktivität getestet.

4.3.1 Überblick

Weil *E. coli* zu den am besten untersuchten Organismen gehört, hat man schon früh damit begonnen, sie für die heterologe Expression von Proteinen zu verwenden, um auf diese Weise große Mengen von rekombinanten Proteinen zu gewinnen⁸⁴. Grundlegend wird dabei die für das entsprechende Protein codierende cDNA in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert und dieser in die Bakterienzelle beispielsweise durch Elektroporation oder Hitzeschock transformiert. Erfolgreich transformierte Zellen werden durch das gleichzeitige Einbringen eines Antibiotikaresistenzgens und der Anzucht in antibiotikahaltigen Medien selektiert. Während der sich anschließenden Kultivierung der Bakterien erfolgt nach Induktion die Expression des gewünschten Proteins.

Die Vorteile von bakteriellen Expressionssystemen, speziell *E. coli*, sind ihre relativ einfache Handhabbarkeit, leichte Manipulierbarkeit und Wirtschaftlichkeit. Die Kultivierung ist verhältnismäßig kostengünstig und bietet die Möglichkeit der Hochzellichtefermentation. Auf der anderen Seite können Schwierigkeiten bei der Expression Nachteile darstellen, zum Beispiel weil überexprimierte Proteine für den Wirtstamm toxisch sind oder im Bakterium nicht löslich und in so genannten Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies*) akkumulieren. Oft stellt sich auch die Reinigung des exprimierten Proteins und damit die Abtrennung zahlreicher bakterieller Proteine als schwierig heraus. Der Aufschluss von unlöslichen Proteinen (*Inclusion Bodies*) ist möglich, erfordert dann aber, angesichts der erfolgten Denaturierung, den aufwendigen Schritt der Rückfaltung und Wiederherstellung der Aktivität des Proteins. Das Einbringen eines Affinitäts-Tags, wie zum Beispiel der Histidin-Tag (eine Polylhistidin-Sequenz von in der Regel sechs bis acht Aminosäuren Länge) oder GST-Tag (Glutathionyl-S-Transferase), kann die Aufreinigung des exprimierten Proteins über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC - *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) oder Glutathion-Agarose-Säulen (GSH-) erleichtern. Das Prinzip der IMAC basiert auf einer reversiblen Interaktion zwischen verschiedenen Aminosäureseitenketten, vor allem von Histidin und Cystein, und immobilisierten Metallionen, wie zum Beispiel Nickelionen¹⁰¹. Die Komplexbindungen können durch Zusatz von Imidazol gelöst und die gereinigten Proteine eluiert werden. Fusionsproteine mit GST-Tag binden reversibel an GSH-Säulen. Eine Elution erfolgt bei Verwendung Glutathion-haltiger Puffer. Das Einbringen einer zusätzlichen Protease-Schnittstelle, beispielsweise für Thrombin, ermöglicht nach der Aufreinigung die Entfernung des Tags, so dass nur das gewünschte Protein erhalten wird. Dieses Vorgehen kann notwendig werden, wenn das Fusionsprotein keine Aktivität zeigt.

Durch eine geschickte Wahl der Kultivierungs- und Expressionsbedingungen lässt sich von Beginn an die Löslichkeit rekombinanter Proteine beeinflussen. Entscheidende Faktoren können dabei sein: die Art des Induktors, seine Konzentration, die Kopienzahl des Plasmids und die Lokalisierung des exprimierten Proteins¹⁰². So konnte für verschiedene Proteine gezeigt werden, dass ein Transport ins Periplasma zu erhöhten Mengen an löslichem, korrekt gefaltetem Enzym führen kann. Des Weiteren beeinflussen die Kultivierungstemperatur sowie die Temperatur nach Induktion die Menge löslichen Proteins. Zum Beispiel können eine niedrigere Wachstumstemperatur als 37 °C¹⁰³ sowie eine Temperaturabsenkung nach IPTG-Induktion zu einem höheren Anteil löslichen Proteins führen¹⁰⁴. Eine Alternative zur Induktion mit IPTG kann die Verwendung von Autoinduktionsmedium¹⁰⁵ sein. Bei diesem werden üblichem LB-Medium Glucose, Glycerin und Lactose, sowie ein Phosphatpuffer und

MgSO₄ zugesetzt. Die Zellen wachsen zunächst auf Glucose. Ist diese verbraucht, stellen die Zellen auf Lactose um, zwischenzeitlich dient Glycerin als Kohlenstoffquelle. Die Lactose wird zu Glucose und Galactose hydrolysiert, letztere induziert die Proteinexpression. Der Phosphatpuffer verhindert, dass der pH-Wert über die Zeit der Kultivierung zu stark absinkt, und MgSO₄ sorgt bei *E. coli* für das Erreichen höherer Zelldichten. Im Gegensatz zur IPTG-Induktion, bei der in der Regel bei einer optischen Dichte von 0,5 induziert wird, wachsen die Zellen in Autoinduktionsmedium zunächst zu einer hohen Dichte heran, bevor die Proteinexpression induziert wird.

4.3.2 Bakterielle Expression

4.3.2.1 Überblick

Alle in der Arbeit erprobten bakteriellen Expressionssysteme sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tabelle 4.6 Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten bakteriellen Expressionssysteme zur Gewinnung der Myt1 Kinase

Expressionssystem	Stamm / Besonderheit	Plasmid / Besonderheit	Anmerkung
<i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T-hMyt1	<i>E. coli</i> BL21 Gold(DE3) (Stratagene)	pGEX-2T-hMyt1 (GST-Myt1)	-
<i>E. coli</i> CAG597 pGEX6P1-hMyt1-His ₄	<i>E. coli</i> CAG597	pGEX6P1-hMyt1-His ₄ (GST-Myt1-His ₄)	Keine Adaption auf MM möglich
<i>E. coli</i> HM130 pGEX6P1-hMyt1-His ₄	<i>E. coli</i> HM130 (partiell Protease-defizient)	pGEX6P1-hMyt1-His ₄ (GST-Myt1-His ₄)	Adaption auf MM, Fermentation im Biostat C Bioreaktor
<i>E. coli</i> BL21 pGEX-2T-Myt1	<i>E. coli</i> BL21 Gold(DE3) (Stratagene)	pGEX-2T-Myt1 (GST-Myt1-His ₆), <i>Codon Usage</i> optimiert	Adaption auf MM; Optimierung Expression
<i>E. coli</i> BL21 pET-20b-Myt1	<i>E. coli</i> BL21 Gold(DE3) (Stratagene)	pET-20b-Myt1 (Myt1-His ₆), <i>Codon Usage</i> optimiert	Adaption auf MM; Optimierung Expression

Das Expressionsprotokoll orientierte sich zunächst an einer 1997 erschienenen Veröffentlichung von LIU et al.¹¹, wobei einige Veränderungen hinsichtlich Expressionsstamm und Vektor gemacht wurden. Auf Grundlage der Primärsequenz der humanen Myt1 Kinase erfolgte durch die Firma GE Healthcare die Gensynthese. Erste Experimente nutzten das Vektorsystem pGEX-2T-hMyt1 in *E. coli* BL21Gold(DE3) (I) mit N-terminal gelegener Glutathionyl-S-Transferase (GST-Tag) für eine spätere Aufreinigung (Abb. 4.28).

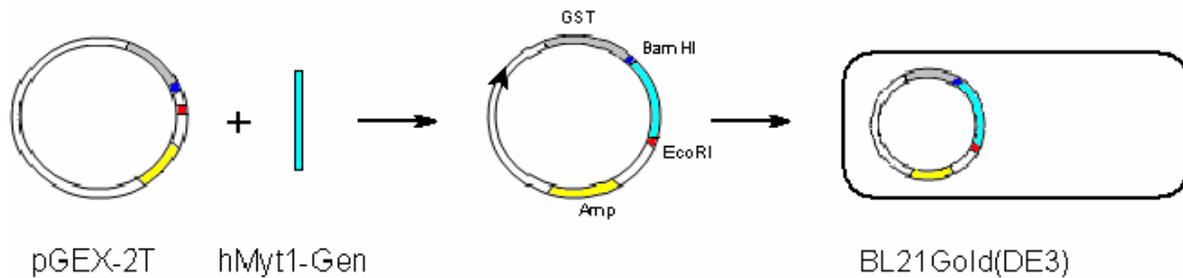


Abb. 4.28 Übersicht über die Klonierung der humanen Myt1 Kinase am Beispiel des Expressionssystems I: Das hMyt1-Gen wurde so in das Plasmid pGEX-2T ligiert, dass das Enzym einen N-terminalen GST-Tag erhält. Außerdem besitzt der Vektor einen tac Promotor und ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Dieses Plasmid (pGEX-2T-hMyt1) wurde in *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) transformiert.

4.3.2.2 Expressionssysteme I - III

Zunächst wurde *E. coli* BL21 pGEX-2T-hMyt1 in einem Vorversuch mit Autoinduktionsmedium, bei dem die Expression durch die Metabolisierung von Lactose induziert wird, bei 28 °C über 16 h inkubiert. Ein SDS-Polyacrylamid-Gel von aufgearbeiteten 1/OD Proben am Ende der Inkubationszeit zeigte keine Bande für GST-Myt1 bei 83 kDa. Es folgten weitere Expressionsversuche deren Bedingungen und Ergebnisse in folgender Tabelle aufgeführt werden.

Tabelle 4.7 Übersicht der durchgeführten Experimente mit *E. coli* BL21 pGEX-2T-hMyt1, dem ersten Konstrukt zur Expression der humanen Myt1 Kinase. Die GST-Myt1 weist eine theoretische Molekülgröße von 26 kDa (GST) + 56,8 kDa (Myt1) (= 82,8 kDa) auf.

Ziel / Beschreibung	Bedingungen	Referenz	Ergebnis SDS-PAGE
Vorversuch: Expression von GST-Myt1 in <i>E. coli</i> BL21 mit pGEX-2T-hMyt1	Autoinduktionsmedium nach STUDIER ¹⁰⁵ ; Inkubation 16 h bei 28 °C im 15 ml Falcon-Röhrchen		Keine Banden bei 83 kDa
SK-Versuch: Expression von GST-Myt1 in <i>E. coli</i> BL21 mit pGEX-2T-hMyt1	LB _{Amp} -Medium; Inkubation bei 37 °C bis OD ₆₀₀ = 0,5 Induktion mit 0,4 mM IPTG für 4 h bei 24 °C im 1 l SK	LIU et al.: Induktion mit 0,5 mM IPTG für 4,5 h bei 30 °C	Keine Banden bei 83 kDa
Expression von GST auf Plasmid pGEX-2T (ohne Insert) in <i>E. coli</i> BL21 (Funktioniert Expression mit Autoinduktionsmedium?)	Autoinduktionsmedium nach STUDIER; Inkubation 16 h bei 28 °C im 15 ml Falcon-Röhrchen		Bande in 26 kDa Größe (→Expression funktioniert)
SK-Versuch: Expression von GST-Myt1 in <i>E. coli</i> BL21 mit pGEX-2T-hMyt1	Autoinduktionsmedium nach STUDIER; Inkubation 16 h bei 28 °C im 1 l SK		Keine Banden bei 83 kDa

Da die Arbeiten mit dem ersten Expressionssystem erfolglos waren, weil vermutlich zu geringe Mengen der GST-Myt1 exprimiert wurden und dies in Kombination mit einem zu starken proteolytischen Abbau des Zielproteins stand, folgten weitere Expressionen mit anderen Expressions- und Reinigungsstrategien.

Erste Fortschritte konnten mit einem durch Dr. Frank Erdmann umklonierten Konstrukt erzielt werden. Dieses wies neben einem GST-Tag einen C-terminal zum Myt1 Protein gelegenen His₄-Tag in dem Vektor pGEX6P1 auf. Die Expression von pGEX6P1 hMyt1-His₄ erfolgte in *E. coli* CAG597 und *E. coli* HM130 (II und III), zwei für einige *E. coli*-Proteasen defiziente Stämme⁸¹.

Die Umstellung von Komplexmedium (LB-Medium) auf Minimalmedium ist für eine bessere Steuerung und Optimierung von Fermentationsprozessen empfehlenswert. Im Hinblick auf eine geplante Fermentation erfolgte die Adaptionen der Expressionsstämme wie in Abschnitt 3.7.2.7 ausgeführt, wobei währenddessen das Biomassewachstum verfolgt wurde. Da sich der Stamm *E. coli* CAG597 nicht auf Minimalmedium umstellen ließ (kein Wachstum), erfolgte lediglich für *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ eine Adaption auf Minimalmedium (Abb. 4.29). Eine Expression mit Expressionsstamm II wurde daher nicht weiter verfolgt.

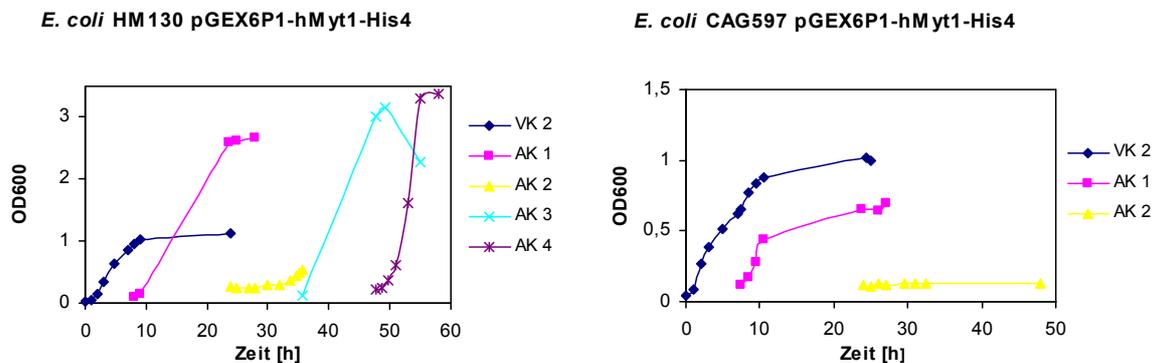


Abb. 4.29 Adaption von *E. coli* HM130 / CAG597 auf Minimalmedium: Die Umstellung erfolgte von LB-Medium_{Antib.} (VK) auf Minimalmedium_{Antib.} (AK) nach WEISS et al. Der Gehalt an LB-Medium in den Adaptionkulturen sank dabei stetig von ursprünglich ca. 10 % (AK 1) auf ca. 0,0003 % (AK 5). Durchführung in 1 l Schüttelkolben mit je 100 ml Medium bei 37 °C. Eine Adaption von *E. coli* CAG597 war bei 37 °C und 30 °C nicht möglich (rechte Abb.); VK – Vorkultur, AK – Adaptionkultur, Antib. – Antibiotika.

In kleineren Expressionsversuchen und bei der Umstellung auf Minimalmedium wurde deutlich, dass mit einem größeren proteolytischen Abbau während der Expression und Reinigung zu rechnen war. Grundsätzlich konnte jedoch die Expression, wie aus Abbildung 4.30 ersichtlich, im Western Blot, jedoch nicht eindeutig über eine 83 kDa Bande im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel, nachgewiesen werden.

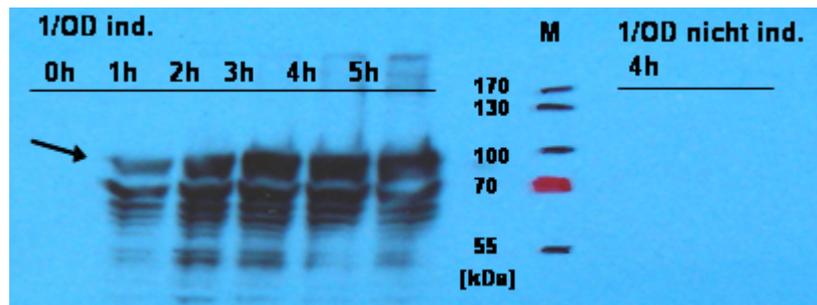


Abb. 4.30 Western Blot einer Expression von GST-hMyt1-His₄ mit *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄: Kultivierung in 500 ml MM (2 l SK) bei 37 °C bis zu OD₆₀₀=0,5 und Induktion mit 0,4 mM IPTG nach Temperaturabsenkung auf 30 °C. Gezeigt wird ein anti-Myt1 Blot von stündlich nach Induktion entnommenen 1/OD-Proben (0 – 5 h) eines Ansatzes mit Induktion und eines Ansatzes ohne Induktion zum Vergleich. Der Pfeil kennzeichnet das Myt1-Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 83 kDa. Darunterliegende Banden zeigen Proteolyseprodukte.

4.3.2.3 Fermentation

Die vielversprechenden Ergebnisse des Schüttelkolbenversuchs bestätigten die bisherige Strategie, zeigten jedoch auch, dass die Mengen exprimierten Myt1 Proteins sehr gering waren. Ein Nachweis gelang im sehr sensitiven Western Blot, aber nicht über Coomassie-Färbung des SDS-Polyacrylamid-Gels. Um eine möglichst große Enzymmenge zu erhalten, wurde mit Expressionsmodell III eine Batch-Fermentation durchgeführt. Die Produktion von möglichst viel Biomasse sollte die geringe Expression und die zu erwartenden großen Verluste während der Aufreinigung kompensieren.

Die Durchführung der Batch-Fermentation im 15 l Maßstab erfolgte wie in Abschnitt 3.7.2.8 beschrieben. Dabei wurde die Vorkultur abzentrifugiert, in 540 ml Salzlösung resuspendiert und zum Beimpfen von 14,56 l Minimalmedium eingesetzt. Bis zur Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte das Biomassewachstum für 10 h bei 37 °C. Zeitgleich zur Induktion wurde die Temperatur auf 30 °C herabgesetzt. Die Ergebnisse der Fermentation sind in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt. 840 g Biofeuchtmasse konnten gewonnen werden. Das Ziel der Produktion größerer Mengen Biomasse war somit erreicht.

Abbildung 4.31 zeigt Wachstum und Glucoseverbrauch von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ während der Fermentation im Bioreaktor. Zunächst war das Wachstum durch eine lange Lag-Phase gekennzeichnet. Nach ca. 8 h Fermentationszeit gingen die Zellen in ein exponentielles Wachstum über. Nach der Induktion erfolgte der Übergang in die Phase der Produktbildung, welche zur Verringerung der Wachstumsrate führte. Die Biotrockenmasse stieg während der Fermentation von 0,08 g/l auf 8,16 g/l. Auf Grund des hohen Substratverbrauchs war bereits 3,5 h nach Induktion die Glucosekonzentration auf 3,5 g/l gesunken, so dass mit der Zellernte begonnen wurde und die Produktbildung nicht weiter verfolgt werden konnte.

Abbildung 4.32 demonstriert deutlich, dass eine Erhöhung der Expression von GST-Myt1-His₄ erzielt wurde, welches auf das Induzieren bei höheren Zelldichten zurückführbar ist. Erneut war ein Nachweis des Zielproteins lediglich im anti-Myt1 Western Blot und nicht mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gels möglich. Wiederholt fiel im Blot neben einer Zunahme des Produktes über die Zeit die große Zahl an Proteolyseprodukten auf. Da eine Aktivitätsbestimmung aus dem Rohproteinextrakt nicht möglich war, konnten an dieser Stelle noch keine Aussagen zur Aktivität der

exprimierten Myt1 getroffen werden und die sonst übliche Aktivitätsangabe „Aktivität pro Gramm Biotrockenmasse“ konnte nicht erfolgen. Aktivitätsbestimmungen waren erst aus aufgereinigten Extrakten möglich, weshalb sich an die Fermentation und Zellernte verschiedene Reinigungen anschlossen.

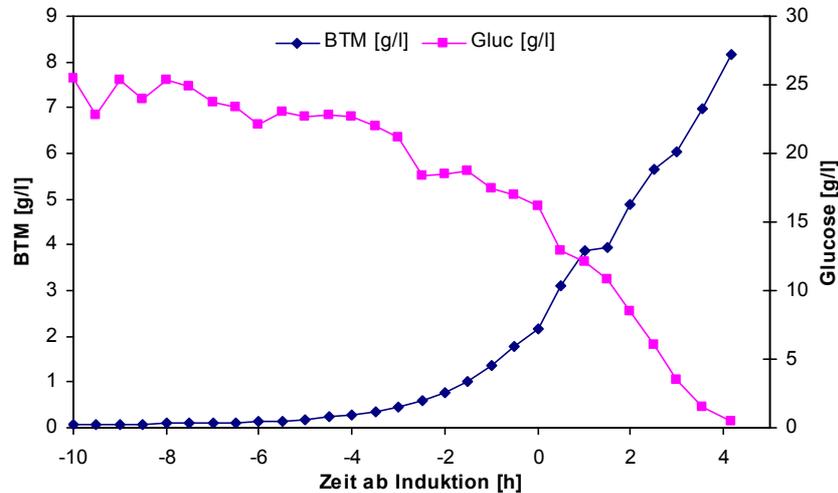


Abb. 4.31 Batch-Fermentation 15 l zur Produktion von GST-Myt1-His₄ in *E. coli* HM130. Dargestellt sind Biotrockenmasse (BTM) und Glucosekonzentration. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C in MM_{Antib.}. Parallel zur IPTG-Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte eine Temperaturabsenkung auf 30 °C.

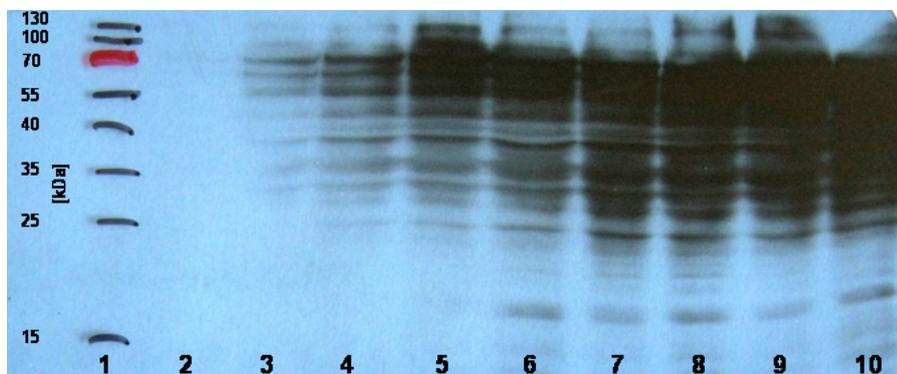


Abb. 4.32 Analyse der 1/OD-Proben der Batch-Fermentation (siehe Abb. 4.31) hinsichtlich der GST-hMyt1-His₄-Bildung (ca. 83 kDa) durch Western Blot mit anti-Myt1 AK. Lane 1 – 10: Molekulargewichtsmarker PPL (1), 1/OD-Proben Induktionszeit 0 – 4,2 h: 0 h (2), 0,5 h (3), 1,0 h (4), 1,5 h (5), 2,0 h (6), 2,5 h (7), 3,0 h (8), 3,6 h (9), 4,2 h (10).

4.3.2.4 Aufschluss und Reinigung

Aus dem aus der Fermentation gewonnenen Vorrat an Biomasse erfolgten dreimalig Aufschluss und Reinigung von je ca. 200 g Biofeuchtmasse. Im Folgenden mit Reinigung A – C betitelt und in Tabelle 4.8 zur Übersicht zusammengefasst. Da es galt, das perfekte Aufschluss- und Reinigungsregime zu ermitteln, erfolgten Aufschluss und Reinigung bei den Aufarbeitungen unterschiedlich. Reinigung A wurde lediglich über den GST-Tag durchgeführt. Reinigung B erfolgte über den His-Tag mit Hilfe einer IMAC-Säule. Zusätzlich wurde, im Gegensatz zur Reinigungsstrategie A, weitestgehend bei 4 °C und in Anwesenheit einer Protease-Inhibitormischung gearbeitet. Strategie C vereinte die erstgenannten

Reinigungsmethoden - zuerst wurde mittels Nickelaffinitätschromatographie aufgereinigt (über den His-Tag), gefolgt von einer Reinigung über eine GSH-Säule (über den GST-Tag).

Tabelle 4.8 Übersicht zu Aufschluss und Reinigung der Myt1 Kinase aus der durch Fermentation gewonnenen Biomasse von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄. Aufgeführt sind drei getestete Strategien zu Aufschluss und Reinigung (A – C), wobei sich B als die geeignetste herausstellte; HDH – Hochdruckhomogenisation, T – Temperatur, RT – Raumtemperatur.

	Aufschluss (je 200 g BFM in 200 ml Aufschlusspuffer)	Reinigung	Ergebnis Gel / Blot	Aktivität
A	Auftauen und Aufschluss mit Benzonase bei 37 °C und HDH (2mal; gekühlt auf Eis)	Batch Absorption an Glutathion Agarose Gel (5 ml), Chromatographie bei RT an ÄKTAexplorer	Keine Bande bei 83 kDa, Abbau-banden bei 70 und 45 – 25 kDa	Keine
B	Auftauen bei RT (Suspension T < 10 °C), Aufschluss mit Benzonase bei 4 °C und HDH (4mal; gekühlt auf Eis); Einsatz von Protease-Inhibitoren	Batch IMAC Absorption an Ni ²⁺ -Chelating Sepharose Gel (45 ml), Chromatographie bei RT an ÄKTAexplorer	Banden bei 83 kDa, Abbaubanden bei ca. 25 kDa	Vorhanden
C	Auftauen bei RT (Suspension T < 10 °C), Aufschluss mit Benzonase bei 4 °C und HDH (4mal; gekühlt auf Eis); Einsatz von Protease-Inhibitoren	(1) Batch IMAC Absorption an Ni ²⁺ - <i>chelating</i> Sepharose Gel (45 ml), Chromatographie bei RT an ÄKTAexplorer;	Banden bei 83 kDa, Abbaubanden bei < 40 kDa	Vorhanden
		(2) Aktive Fraktionen auf gepackte Säule des Glutathion Agarose Gels aufgegeben (5 ml), Chromatographie bei RT an ÄKTAexplorer	Bandenmuster von Auftrag und Durchlauf unterscheiden sich nicht; kaum Banden in eluierten Fraktionen	Im Durchlauf vorhanden (→ keine Bindung an Gelmaterial)

Als beste Strategie stellte sich schließlich die einfache Reinigung über den His-Tag heraus, die zur Reduktion des proteolytischen Abbaus bei 4 °C und in Anwesenheit diverser Protease-Inhibitoren durchgeführt werden musste (Reinigungsstrategie B).

Reinigung A, die weitestgehend bei Raumtemperatur ohne Protease-Inhibitoren vorgenommen wurde, führte zu großen Verlusten des Produktes durch Proteolyse. Dies fand vermutlich größtenteils bereits während des Aufschlusses der Zellen bei 37 °C in Anwesenheit von Benzonase statt. Anti-His und Anti-GST Western Blots sowie ein über Silberfärbung markiertes SDS-Polyacrylamid-Gel zeigten

Proteolyseprodukte bei ca. 70 kDa und im weitaus größeren Maßstab bei 25 – 45 kDa (Abb. 4.33). Ein Abbau musste von beiden Seiten erfolgt sein, da mittels anti-GST Western Blot Fragmente beider Größen und mittels anti-His Western Blot (ohne Abb.) ein 30 kDa großes Fragment nachgewiesen werden konnten.

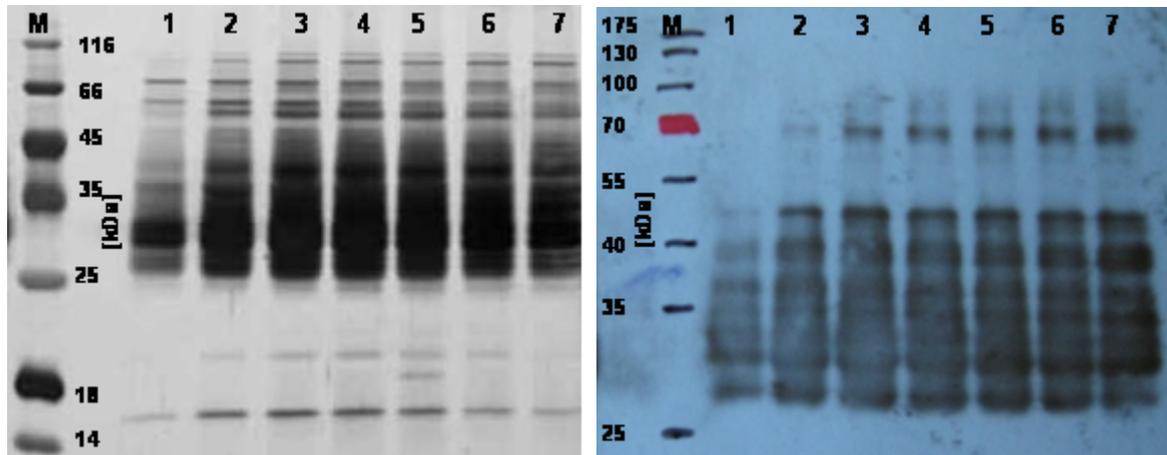


Abb. 4.33 SDS-Polyacrylamid-Gel und Western Blot nach Aufschluss und Reinigung von 200 g BFM über GSH-Säule bei Raumtemperatur (Reinigung A): Linke Abb. Gel (12,5 %ig) nach Silberfärbung, rechte Abb. Western Blot mit anti-GST AK; (M) Molekulargewichtsmarker, (1 – 7) Fraktionen nach Reinigung; Zellen entstammten der Fermentation von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄. Das Zielprotein GST-hMyt1-His₄ (ca. 83 kDa) kann neben der Vielzahl von Proteolyseprodukten nicht nachgewiesen werden.

Ein Teil des Verlusts bei Reinigung A war vermutlich bereits auf eine unzureichende Bindung des Zielproteins an das Glutathion-Agarose-Gel zurückzuführen. Protein, welches bereits beim Aufschluss N-terminal einer Proteolyse unterlag, wies einen unvollständigen oder keinen GST-Tag auf und war deswegen nicht mehr in der Lage, an das Absorptionsmaterial zu binden. Der Teil des Zielproteins, welcher noch intakt war und den Tag enthielt, konnte zwar an das Säulenmaterial binden, unterlag aber auf der Säule weiter einer ungehemmten Proteolyse, was den vollständigen Verlust von GST-hMyt1-His₄ erklären könnte. Die erhaltenen Fraktionen der Reinigung A wurden parallel einer Aktivitätsbestimmung über CE gemäß Abschnitt 3.8 unterzogen. Keine der Fraktionen zeigte einen eindeutigen Umsatz des eingesetzten TY zu mono- oder diphosphorylierten Produkt, eine Aktivität war also nicht nachweisbar. Dennoch wurde festgestellt, dass die Zugabe der Fraktionen bei den CE Messungen zu großen Sensitivitätsverlusten beim TY-Signal führte. Innerhalb einer Inkubationszeit von nur 40 min kam es zum vollständigen Verlust des TY-Signals, so dass es kapillarelektrophoretisch nicht mehr nachweisbar war. Möglicherweise ist dies auf die Veränderung der Kapillaroberfläche durch die Enzymfraktionen zurückzuführen oder eine Folge von Abbauvorgängen des TY durch Peptidasen, die trotz Reinigung nicht entfernt wurden. Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass für Messungen über CE wesentlich sauberere Enzymfraktionen benötigt wurden.

Auf Grund der Erkenntnisse aus Reinigung A, wurden bei Aufschluss und Reinigung B folgende Aspekte geändert: Der Aufschluss durch Benzonasebehandlung und Hochdruckhomogenisation erfolgte weitestgehend bei 4 °C in Anwesenheit eines Protease-Inhibitor-Cocktails (EDTA-frei, Firma Roche). Einzig das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur wobei die Zellsuspension eine Temperatur von 10 °C nicht überstieg. Die eigentliche Reinigung erfolgte, nach 30minütiger Inkubation des Rohproteinextraktes mit dem Absorptionsmaterial (Sephacrose-Gel mit Nickel-NTA-Gruppen) bei

4 °C, als Metallchelataffinitätschromatographie. Die Chromatographie selbst wurde bei Raumtemperatur mit Hilfe einer ÄKTAexplorer (Firma Amersham Biosciences) durchgeführt und über die kontinuierliche Bestimmung der Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm verfolgt (Abb. 34). Auch hier sollte ein SDS-Polyacrylamid-Gel der gewonnenen Fraktionen und ein CE Aktivitätstests Aufschluss über den Erfolg der Reinigung geben. Zum ersten Mal während dieser Arbeit konnte das Zielprotein über ein Coomassie-gefärbtes Gel (Abb. 4.35) nachgewiesen und die Aktivität der Kinase über CE Messungen bewiesen werden (siehe dazu Abb. 4.25 und 4.26).

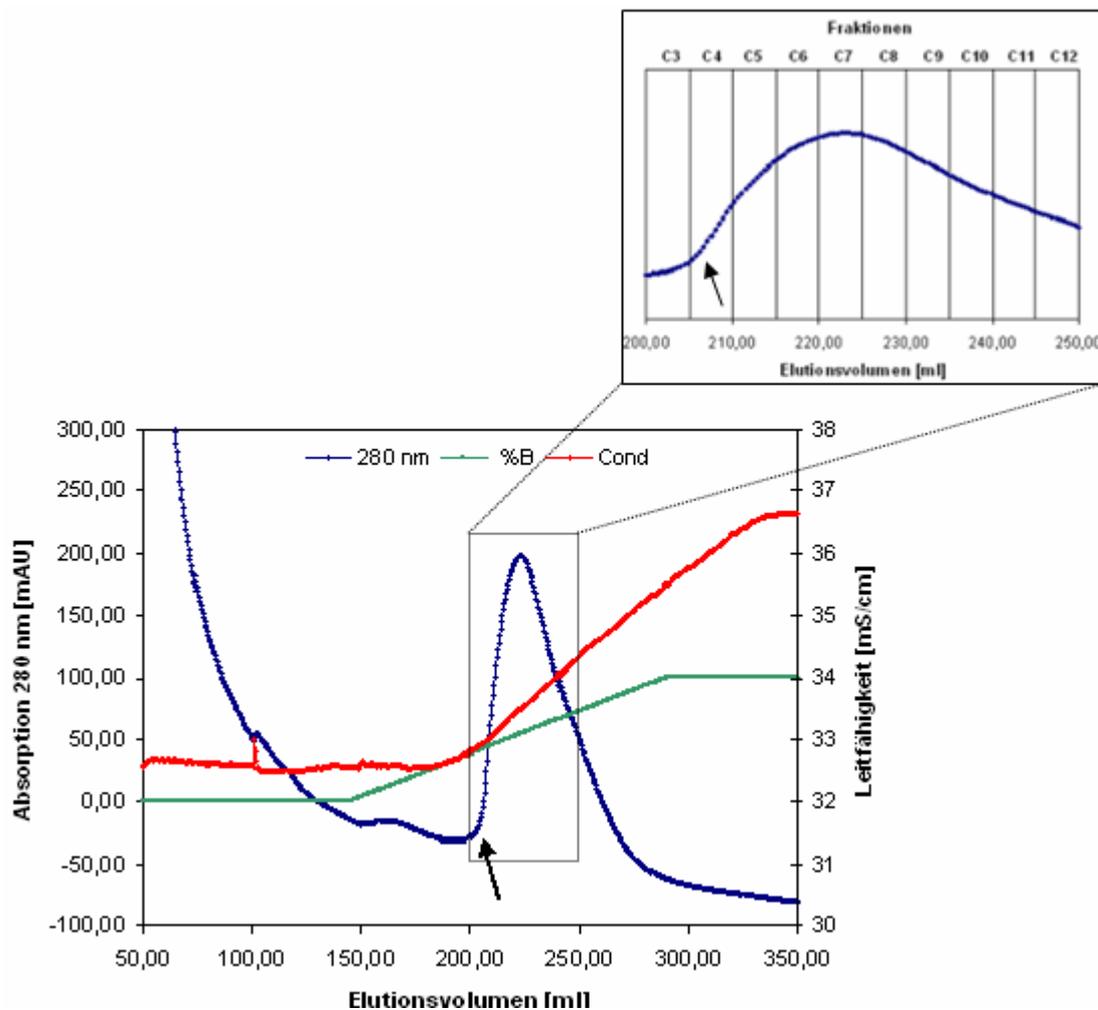


Abb. 4.34 Diagramm zur Reinigung von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ über Batch IMAC (Reinigung B): Dargestellt ist der Verlauf der Reinigung des Proteins nach Absorption des Zielproteins an das Gelmaterial (Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) mit Hilfe einer ÄKTAexplorer. Durchführung siehe Abschnitt 3.7.2.10. Die Elution des Zielproteins erfolgt relativ zu Beginn des Gradienten mit Imidazol-haltigem (500 mM) Tris-Puffer. Die Fraktion mit der höchsten Kinaseaktivität (C4) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (Elutionsvolumen 205 – 210 ml). Anschließend (Fraktion C5 ff.) eluiert der größte Teil der gebundenen Proteine. Sie bilden das Maximum der Absorption bei 280 nm. Gemäß Gel (Abb. 4.35) und CE Aktivitätstest handelt es sich dabei hauptsächlich um Proteolyseprodukte des GST-hMyt1-His₄-Proteins ohne Kinaseaktivität.

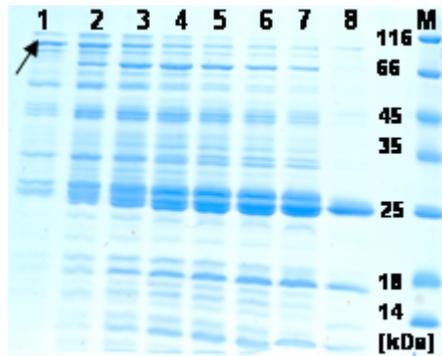


Abb. 4.35 SDS-Polyacrylamid-Gel nach Aufschluss und Reinigung von 200 g BFM über IMAC (Reinigung B): Aufschluss mit Benzonase und HDH bei 4 °C in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren, Reinigung über den His-Tag mit Nickelaffinitätschromatographie bei Raumtemperatur; (M) Molekulargewichtsmarker, (Lane 1 - 8) Fraktionen (C4-C10, D1) nach Reinigung; Zellen entstammten der Fermentation von *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄. Das Zielprotein GST-hMyt1-His₄ (ca. 83 kDa) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet, Fraktion C4–D10 weisen in abnehmender Intensität diese Bande auf.

Wie Abbildung 4.35 zu entnehmen ist, enthielten die Fraktionen C4 bis C10 das Zielprotein GST-hMyt1-His₄ in abnehmender Konzentration, während die Menge an Proteolyseprodukten in dieser Reihenfolge zunahm. Fraktion C4 stellte die, in Bezug auf das Zielprotein, sauberste Fraktion dar. In ihr konnte über CE Messungen die höchste Aktivität festgestellt werden. Das Bandenmuster spricht für einen starken Abbau von N-terminaler Seite, also von Seiten der Glutathion-S-Transferase. Ein C-terminaler Abbau hätte eine Abspaltung des His-Tags zur Folge gehabt, was bedeutete, dass die Proteine nicht an das Gelmaterial hätten binden können. Zusätzlich wird dies im Gel durch den relativ starken Anteil von Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 25 – 27 kDa belegt, was etwa der Größe des GST-Tags entspricht.

Dem Einsatz der Protease-Inhibitormischung (EDTA-frei) zum Trotz, trat also auch hier eine starke Proteolyse auf. Die Mischung verschiedener Inhibitoren hemmt zwar ein breites Spektrum von Serin- und Cystein-Proteasen, beeinflusst jedoch nicht die Funktion von Aspartyl- und Metalloproteasen, die durch EDTA effektiv gehemmt würden. Der Einsatz von EDTA verbietet sich jedoch in höheren Konzentrationen, auf Grund seines chelatisierenden Effektes, zum einen gegenüber dem Nickelionen-tragenden Sepharose-Gel der IMAC und zum anderen gegenüber Magnesiumionen, die den Cofaktor der Myt1 Kinase darstellen. Die erste Interaktion könnte zu einer verminderten Kapazität des Säulenmaterials führen, die zweite zur Inaktivität der Kinase.

Die affinitätschromatographische Reinigung über den His-Tag führte wegen der Verwendung Imidazolhaltiger Puffer während der Gradientenelution zwangsläufig dazu, dass die so gewonnenen aktiven Fraktionen gewisse Mengen an Imidazol enthielten, dessen Effekte auf Proteinaktivität und Messsystem zunächst nicht abschätzbar waren. Aus diesem Grund wurde mit der aktivsten Fraktion der Reinigung B (5 ml) eine Umpufferung auf Kinasepuffer an einer PD-10 Säule vorgenommen, was weder zu einer Verbesserung noch Verschlechterung der Aktivität führte. Dies könnte in generell niedrigen Imidazolgehalten nach der Reinigung begründet liegen, da, wie in Abb. 4.34 demonstriert, das GST-hMyt1-His₄-Protein zu Beginn des Imidazolgradienten eluierte. Die Kürze des Polyhistidin-Tags mit nur vier Histidinresten könnte für die geringe Retention am nickelhaltigen Absorptionsmaterial und die damit verbundene frühe Elution verantwortlich sein. Mit Hilfe der Aufzeichnung der Leitfähigkeit während der Reinigung konnte der wahre Gehalt des Elutionspuffers im

Eluenten ermittelt werden. Die aktivste Fraktion wies einen Elutionspuffergehalt von ca. 9,7 % auf, was einem Imidazolgehalt von etwa 50 mM entsprach. Da dieser Imidazolgehalt keine negativen Effekte auf Messsystem und Enzymaktivität ausübte, lässt sich feststellen, dass geringe Mengen Imidazol (≤ 5 mM bei Einsatz von 10 % (V/V) Enzymlösung pro Umsatzprobe) die Analytik nicht stören. Die via Reinigungsstrategie B gewonnenen Enzymlösungen konnten bis zur weiteren Verwendung ohne nennenswerten Aktivitätsverlust mit einem Glycerolanteil von 10 % bei -80 °C über fünf Wochen gelagert werden. Sie wurden für die Testung von potentiellen Inhibitoren mit Isoflavon-Grundgerüst im Zuge der Anfertigung einer Diplomarbeit im Fach Lebensmittelchemie genutzt⁸⁸. Alle übrigen aus Reinigung B erhaltenen Fraktionen (C5 - C10), die ohne Umpufferung mit einem Glycerolanteil von 10 % als Aliquote bei -80 °C gelagert wurden, erlitten innerhalb von zwei Monaten einen Aktivitätsverlust von ca. 90 %, was nach Aufbrauchen der aktiven Enzymlösung aus Fraktion C4 einen erneuten Aufschluss mit Reinigung erforderte.

Weil die Enzymlösungen auch nach Reinigung B (IMAC) Proteinverunreinigungen enthielten, sollte mit Reinigungsstrategie C versucht werden, Fremdproteine durch die Kombination mehrerer Reinigungsschritte auszuschließen. Proteine, die im Schritt Eins (IMAC) noch an das Nickel-NTA-Material banden und deswegen bei der Elution mitgeschleppt wurden, sollten im zweiten Schritt der Reinigung über eine GSH-Säule entfernt werden. Diesem Prinzip folgend, wurden weitere 200 g Zellen aufgeschlossen, der Rohproteinextrakt einer Nickelaffinitätschromatographie unterzogen und, nach Identifikation der aktiven Fraktionen, eine zweite Reinigung über eine GSH-Säule durchgeführt. Der gesamte Vorgang wurde durch eine entsprechende Analytik begleitet (Aktivitätsmessungen, Western Blots mit anti-Myt1, anti-GST und anti-His AK).

Über Reinigungsstrategie C konnte nicht der gewünschte Erfolg erzielt werden. Während Schritt 1 mit der Reinigung über den His-Tag wieder zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte, konnte keine weitere Aufreinigung im Schritt 2 mit GSH-Säule erzielt werden. Viel mehr führte diese Prozedur zu einem weiteren Abbau des Zielproteins, verbunden mit Aktivitätsverlust.

Zusammengefasst erwies sich die Aufreinigung der Kinase über den His-Tag, also Reinigungsstrategie B, als die geeignetste Methode. Hier war die Ausbeute gereinigten Proteins am größten. Bei der Kombination beider Reinigungsverfahren kam es möglicherweise bereits während der ersten Reinigung mittels IMAC zu einem starken proteolytischen Abbau von N-terminaler Seite, so dass es bei der zweiten Reinigung über den GST-Tag zu keiner ausreichenden Bindung des GST-Myt1-Fusionsproteins an das Absorptionsmaterial kommen konnte und die Verluste bezüglich Menge und Aktivität groß waren.

4.3.2.5 Codon Usage optimierte Expressionssysteme IV und V

Auf der Suche nach weiteren Möglichkeiten zur Verbesserung der Expression und Minimierung des proteolytischen Abbaus erfolgte die Optimierung der Codon Usage des für die Myt1 codierenden Genabschnittes hinsichtlich einer Expression in *E. coli*. Zuvor entsprach sie einer humanen Codierung, was bei einer Expression in bakteriellen Expressionsstämmen zu Störungen der Proteinexpression durch verlangsamtes Ablesen der DNA führen kann.

Tatsächlich wurde die größte Enzyymbildung initiiert, nachdem die Codon Usage der humanen Myt1 Kinase für die Expression in *E. coli* optimiert wurde. Das durch die Firma Geneart synthetisierte Codon-

optimierte Gen wurde in zwei verschiedene Vektoren eingebracht. pGEX-2T-Myt1 trug die Information für die Bildung eines Fusionsproteins aus N-terminalem GST-Tag, Myt1 Kinase und C-terminalem His₆-Tag und pET-20b-Myt1 codierte für ein Protein aus Myt1 und C-terminal gelegenen His₆-Tag, also ohne GST. Für diese beiden Varianten erfolgte ein Expression in *E. coli* BL21 (DE3) (IV und V). Ein erster Vorversuch einer Expression in Autoinduktionsmedium bei 28 °C, bei dem die Expression durch die Metabolisierung von Lactose induziert wird, führte laut SDS-Polyacrylamid-Gel zu keiner erfolgreichen Bildung der Zielproteine.

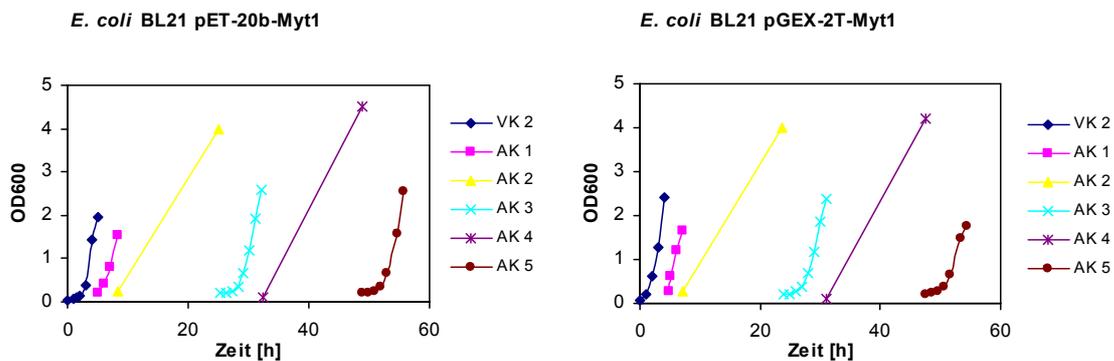


Abb. 4.36 Adaption von *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1 / pGEX-2T-Myt1 auf Minimalmedium: Die Umstellung erfolgte von LB-Medium_{Amp} (VK) auf Minimalmedium_{Amp} (AK). Der Gehalt an LB-Medium in den AK sank dabei stetig von ursprünglich ca. 11 % (AK 1) auf ca. 0,0001 % (AK 5). Durchführung in 1 l Schüttelkolben mit je 100 ml Medium bei 37 °C. (VK – Vorkultur, AK – Adaptionkultur, Amp – Ampicillin)

Nach der Umstellung von LB_{Amp}-Medium auf MM_{Amp} (Abb. 4.36) schlossen sich Expressionsversuche mit IPTG als Induktor an. Dafür erfolgte für beide Konstrukte die Kultivierung in 2 l Schüttelkolben mit 500 ml MM_{Amp} bei 37 °C, bzw. 24 °C nach Induktion mit 0,4 mM IPTG (Endkonzentration). Diese Strategie wurde gewählt, um schnelleres Wachstum zu Beginn mit niedrigeren Expressionsraten nach Induktion zu kombinieren, was gemäß Literatur¹⁰⁶ zu einer geringeren Bildung von *Inclusion Bodies* führen kann. Jeweils ein Parallelansatz, der nicht mit IPTG induziert, aber ansonsten gleich behandelt wurde, diente dem Vergleich und der Beurteilung des Einflusses der Induktion. Die Auswertung stündlich entnommener Proben mittels SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte deutlich eine Zunahme der Expression der Zielproteine über die Zeit (Abb. 4.37 und 4.38). Leider offenbarte sie auch, dass zum großen Teil der Anteil unlöslichen Proteins stieg. Lösliches Protein hingegen schien, sobald welches vorhanden war, einer Hydrolyse zu unterliegen. Die nicht induzierte Kultur wies jeweils keine Bildung des Zielproteins auf, was erneut für einen funktionstüchtigen Promotor sprach. Diese Beobachtungen galten für beide Konstrukte. Modell V wies gegenüber Modell IV möglicherweise Banden im Bereich des löslichen Zielproteins auf, was erneut darauf hindeutete, dass insbesondere das GST-Myt1-Fusionsprotein einer starken Proteolyse unterlag.

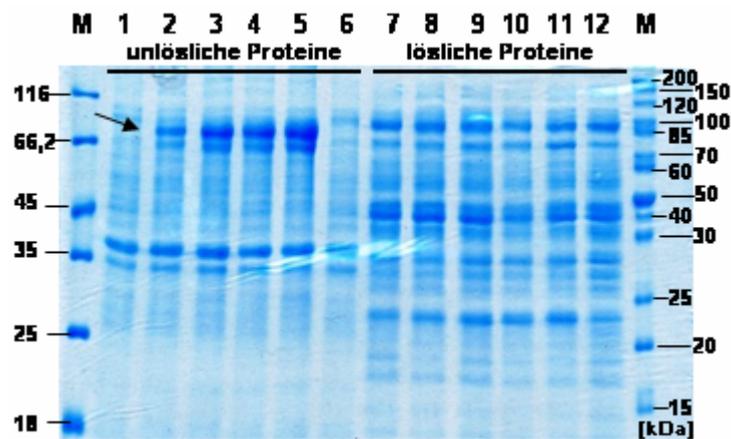


Abb. 4.37 SDS-Polyacrylamid-Gel von *E. coli* BL21 pGEX-2T-Myt1 (Modell IV) auf die Expression und Löslichkeit von GST-hMyt1-His₆: Kultivierung in 500 ml MM_{Amp} (2 l SK) bei 37 °C bis zu OD₆₀₀ = 0,5 und Induktion mit 0,4 mM IPTG nach Temperaturabsenkung auf 24 °C. Gezeigt wird ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %iges Gel von stündlich nach Induktion entnommenen 1/OD-Proben (0 – 4 h) eines Ansatzes mit Induktion (1 – 5, 7 – 11). Lane 6 und 12 zeigen zum Vergleich eine nach 4 h nach Temperaturabsenkung entnommene 1/OD Probe eines Ansatzes ohne Induktion; (M) Molekulargewichtsmarker, (1 + 7) induziert (id.) 0 h, (2 + 8) id. 1 h, (3 + 9) id. 2 h, (4 + 10) id. 3 h, (5 + 11) id. 4 h, (6 + 12) nicht id. 4 h. Das Zielprotein GST-hMyt1-His₆ (ca. 83 kDa) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und hauptsächlich in der unlöslichen Proteinfraction enthalten, die Zunahme des Proteins über die Zeit ist erkennbar.

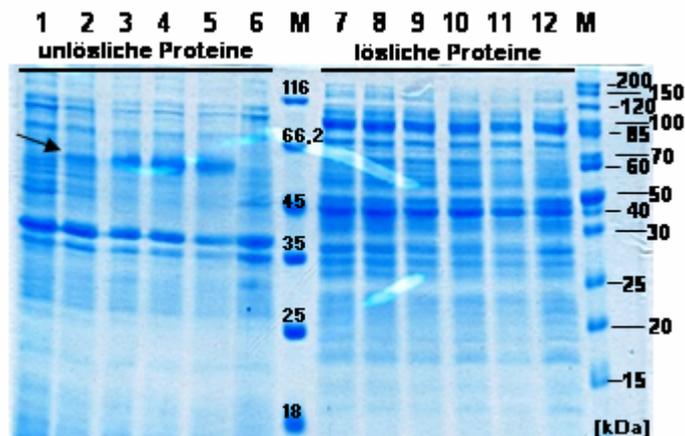


Abb. 4.38 SDS-Polyacrylamid-Gel von *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1 (Modell V) auf die Expression und Löslichkeit von hMyt1-His₆: Kultivierung in 500 ml MM_{Amp} (2 l SK) bei 37 °C bis zu OD₆₀₀ = 0,5 und Induktion mit 0,4 mM IPTG nach Temperaturabsenkung auf 24 °C. Gezeigt wird ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %iges Gel von stündlich nach Induktion entnommenen 1/OD-Proben (0 – 4 h) eines Ansatzes mit Induktion (1 – 5, 7 – 11). Lane 6 und 12 zeigen zum Vergleich eine nach 4 h nach Temperaturabsenkung entnommene 1/OD Probe eines Ansatzes ohne Induktion; (M) Molekulargewichtsmarker, (1 + 7) induziert (id.) 0 h, (2 + 8) id. 1 h, (3 + 9) id. 2 h, (4 + 10) id. 3 h, (5 + 11) id. 4 h, (6 + 12) nicht id. 4 h. Das Zielprotein hMyt1-His₆ (ca. 55,5 kDa) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und hauptsächlich in der unlöslichen Proteinfraction enthalten, die Zunahme über die Zeit ist erkennbar.

In Folge dieser Ergebnisse sollte mit Hilfe der Variation von IPTG-Konzentration und Expressionstemperatur in weiteren Expressionsversuchen im SK eine Optimierung hinsichtlich der Bildung größerer Anteile löslichen Myt1 Proteins durchgeführt werden. SCHEIN et al. konnten beispielsweise demonstrieren, dass Proteine bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C in Form von *Inclusion Bodies* akkumulieren, während sie bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C in löslicher,

aktiver Form vorliegen¹⁰³. Außerdem ist für einige DE3 Stämme, wie z.B. Tuner (DE3), Origami B(DE3) und Rosetta-gami B(DE3), eine Beeinflussung der Expression durch Variation der IPTG-Konzentration beschrieben, was auf eine lacY1 Mutation zurückzuführen ist¹⁰⁷. Obwohl der hier verwendete Stamm *E. coli* BL21 (DE3) eine solche Mutation nicht aufweist, sollte trotzdem eine mögliche Beeinflussung durch unterschiedliche IPTG-Konzentrationen untersucht werden. Ein unterschiedliches Ansprechen der Modelle **IV** und **V** war nämlich auch auf Grund der verschiedenen Promotoren in den Vektoren möglich. Während für pET-20b mit dem einfachen T7 Promotor 0,4 mM IPTG empfohlen werden, ist für T7lac Promotoren, wie ihn pGEX-2T aufweist, eine IPTG Konzentration von 1 mM empfohlen¹⁰⁷. Demzufolge wurden SK-Versuche mit *E. coli* BL21 pGEX-2T-Myt1 (IV) und *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1 (V) in Minimalmedium, mit Wachstum der Zellen bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 durchgeführt. Dann erfolgte entweder eine Temperaturabsenkung auf 30, 24 oder 16 °C oder die Temperatur wurde bei 37 °C belassen um anschließend die Induktion mit 10, 100 oder 500 µM IPTG vorzunehmen. Vier Stunden nach Induktion erfolgte die Anlage von Proben, die danach aufgeschlossen und, unterschieden in lösliche und unlösliche Proteinfraction, dem Vergleich der verschiedenen Expressionsvarianten über SDS-Polyacrylamid-Gele dienten. Die Auswertung der Gele ist in Abb. 4.53, 4.54 (siehe Anhang) und zur Übersicht in den Tabellen 4.9 und 4.10 zusammengefasst.

Tabelle 4.9 Auswertung der Schüttelkolbenversuche zur Optimierung der Expression und Löslichkeit von GST-hMyt1-His₆ in E. coli BL21 pGEX-2T-Myt1: Der Optimierungsversuch erfolgte durch Variation der Expressionstemperatur und Induktorkonzentration. Die Analyse erfolgte mit Hilfe von Coomassie-gefärbten Gelen (siehe Abb. 4.53 f.), dessen Ergebnisse in Bezug auf das Zielprotein (ca. 83 kDa) hier zusammengefasst werden.

Temperatur	IPTG- Konzentration	unlösliche Proteinfraction	lösliche Proteinfraction
37 °C	0 mM	keine Bande	keine Bande
	0,01 mM	keine Bande	keine Bande
	0,1 mM	Bande bei ~ 80 kDa	schwache Bande?
	0,5 mM	Bande bei ~ 80 kDa	schwache Bande?
30 °C	0 mM	keine Bande	keine Bande
	0,01 mM	keine Bande	schwache Bande?
	0,1 mM	schwache Bande bei ~ 80 kDa	schwache Bande?
	0,5 mM	Bande bei ~ 80 kDa	schwache Bande?
24 °C	0 mM	keine Bande	keine Bande
	0,01 mM	keine Bande	keine Bande
	0,1 mM	keine Bande	keine Bande
16 °C	0 mM	keine Bande	keine Bande
	0,01 mM	keine Bande	keine Bande
	0,1 mM	keine Bande	keine Bande
	0,5 mM	schwache Bande bei ~ 80 kDa	keine Bande

Tabelle 4.10 Auswertung der Schüttelkolbenversuche zur Optimierung der Expression und Löslichkeit von hMyt1-His₆ in *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1: Der Optimierungsversuch erfolgte durch Variation der Expressionstemperatur und Induktorkonzentration. Die Analyse erfolgte mit Hilfe von Coomassie-gefärbten Gelen (siehe Abb. 4.53 f.), dessen Ergebnisse in Bezug auf den Nachweis des Zielproteins (ca. 53 kDa) hier zusammengefasst werden.

Temperatur	IPTG-Konzentration	unlösliche Proteinfraktion	lösliche Proteinfraktion
37 °C	0 mM	keine Bande	keine Bande
	0,01 mM	schwache Bande bei ~ 55 kDa	keine Bande
	0,1 mM	Bande bei ~ 55 kDa	keine Bande
	0,5 mM	Bande bei ~ 55 kDa	keine Bande
30 °C	0 mM	keine Bande	keine Bande
	0,01 mM	keine Bande	keine Bande
	0,1 mM	Bande bei ~ 55 kDa	keine Bande
	0,5 mM	Bande bei ~ 55 kDa	keine Bande
24 °C	0 mM	keine Bande	keine Bande
	0,01 mM	keine Bande	keine Bande
	0,1 mM	Bande bei ~ 55 kDa	keine Bande
16 °C	0 mM	keine Bande	keine Bande
	0,01 mM	keine Bande	keine Bande
	0,1 mM	keine Bande	keine Bande
	0,5 mM	schwache Bande bei ~ 55 kDa	keine Bande

Die Ergebnisse des Optimierungsversuchs waren in ihrer Bedeutung für das weitere Vorgehen begrenzt. Vier Stunden nach Induktion waren gemäß der Gele keine signifikanten Mengen löslicher Myt1 Kinase vorhanden. Ohne IPTG-Induktion erfolgte keine Expression des Zielproteins und 0,01 mM IPTG führten nur bei 37 °C zu einer geringen Bildung von GST-hMyt1-His₆. Dies ließ zum einen darauf schließen, dass geringe Induktorkonzentrationen zur Induktion nicht ausreichten und zum anderen bewies es, dass der Promotor seine Funktion erfüllte. Bei pET-20b-Myt1 führten 0,1 und 0,5 mM IPTG bei 24, 30 und 37 °C zur Bildung von hMyt1-His₆ in Form von *Inclusion Bodies*, also in unlöslicher Form. Generell war das Wachstum der Zellen mit niedrig werdender Temperatur deutlich verringert, was auch mit einer geringeren Expression einherging. Zur Induktion dieser Ansätze wurden höhere IPTG-Konzentrationen benötigt.

Summarisch waren die Ergebnisse des Konstrukts mit pGEX-2T-Myt1 zur Bildung von GST-hMyt1-His₆ schlechter, was erneut auf eine stärkere Proteolyseempfindlichkeit hinweist.

Auf Grund einer anderen Zielsetzung und der kleinen Ansatzgrößen erfolgten im Zuge der Optimierungsexperimente keine Aktivitätsmessungen. Diese sollten sich in den Folgeexperimenten anschließen. Zusammengenommen konnten durch die Änderung der Expressionstemperatur und

Induktorkonzentration die Expression und vor allem die Löslichkeit der Zielproteine nicht positiv beeinflusst werden. Zwar führte eine geringere Expressionstemperatur zu geringeren Bildungsraten, diese waren jedoch nicht mit der Bildung größerer Mengen löslichen Proteins assoziiert.

Anhand dieser Erkenntnisse schien die Kultivierung von *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1 bei 37 °C bis zur IPTG-Induktion und anschließende Temperaturabsenkung auf 30 °C und Induktion mit 0,1 mM IPTG am vielversprechendsten. Aus diesem Grund wurden mit Expressionssystem V weitere Expressionen im Schüttelkolben durchgeführt, unter anderem, um bei diesem Konstrukt weitere Erkenntnisse über die Bildung und den damit scheinbar einhergehenden proteolytischen Abbau von Myt1-His₆ zu gewinnen. Außerdem sollten parallel Aktivitätsmessungen durchgeführt werden. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. In 2 l SK mit je 500 ml MM_{Amp} erfolgte zunächst das Wachstum bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 37 °C, gefolgt von einer Temperaturabsenkung auf 30 °C und Induktion mit 0,1 mM IPTG. Anhand von SDS-Polyacrylamid-Gelen und Western Blots von stündlich oder halbstündlich entnommenen Proben, konnte zum einen das Wachstum mit Hilfe einer Wachstumskurve, als auch die Bildung und Verteilung von unlöslichem zu löslichem Myt1-His₆-Protein beurteilt werden. Drei Stunden nach Induktion wurden die Zellen geerntet um diese später einem Aufschluss und einer Reinigung über IMAC zu unterziehen und Fraktionen anschließend auf Aktivität zu untersuchen.

Eine Darstellung der Blots und Gele erfolgt in Abb. 4.39. Die Bilder A–C zeigen stündlich oder halbstündlich während der Expression entnommene 1/OD-Proben. Bereits mit Hilfe der weniger sensitiven SDS-PAGE (Bild A) wird deutlich, dass der Anteil unlöslicher Myt1 über die Dauer der Expression zunahm. Die oben aufgestellte Theorie, wonach lösliche Myt1, sobald vorhanden, einer starken Proteolyse unterliegt, wird durch einen anti-Myt Western Blot (Bild B) bestätigt. Der größte Anteil löslichen Proteins lag nach 2,5 h vor, was mit einem zweiten Experiment bestätigt werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt sollte also optimalerweise die Zellernte erfolgen. Bild C zeigt einen anti-His Western Blot, in welchem in der löslichen Proteinfraction keine Polyhistidin-Struktur nachgewiesen werden konnte. Dies könnte erstens an der geringeren Sensitivität des anti-His Blots gegenüber dem anti-Myt Blot, zweitens an einer schlechten Zugänglichkeit des His-Tags oder drittens am vollkommenen Fehlen der Polyhistidin-Sequenz liegen. Der dritte Fall läge vor, wenn es während der Translation zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese käme, so dass der C-Terminus des Zielproteins unvollständig bliebe. Auf der Seite des unlöslichen Zielproteins zeigt sich in Bild C eine starke Zunahme der Bandenintensität über die Expressionszeit, was sich mit den Beobachtungen im anti-Myt Blot (Bild B) und Coomassie-gefärbten Gel (Bild A) deckt.

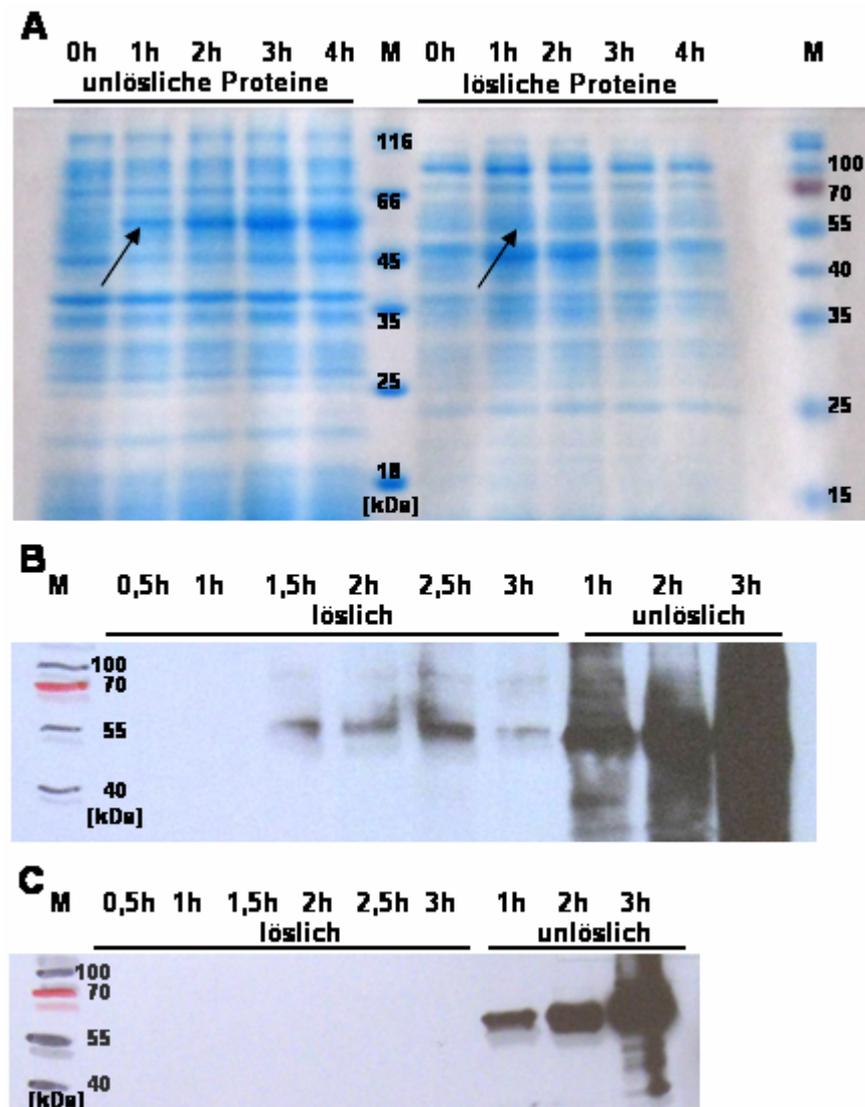


Abb. 4.39 Beurteilung der Expression und Löslichkeit von hMyt1-His6 mittels SDS-PAGE und Western Blot: Kultivierung von Modell V in 500 ml MM_{Amp} (2 l SK) bei 37 °C bis zu $OD_{600} = 0,5$ und Induktion mit 0,1 mM IPTG nach Temperaturabsenkung auf 30 °C. Gezeigt werden ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel (A), ein anti-Myt1 Western Blot (B) und ein anti-His Western Blot (C) von stündlich / halbstündlich nach Induktion entnommenen 1/OD-Proben (0–3 h) mit Unterscheidung dieser in eine lösliche und unlösliche Proteinfraktion. A: Myt1-positive Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet, in der unlöslichen Fraktion nimmt die Intensität der Banden über die Zeit zu; B: lösliche Myt1-positive Banden bei 1,5–2,5 h, geringere Intensität bereits 3 h nach Induktion auf Grund Abbau; C: Nachweis His-positiver Banden nur in unlöslicher Fraktion. (M) Molekulargewichtsmarker

In Anbetracht dieser Ergebnisse war der Erfolg einer Aufreinigung des Rohproteinextraktes nach Aufschluss der geernteten Zellen aus diesen Versuchen fraglich. Würde das Zielprotein überhaupt an das nickelhaltige Absorptionsmaterial binden können, wenn in der löslichen Proteinfraktion durch einen Blot kein His-Tag nachweisbar war?

Acht Gramm Biofeuchtmasse wurden gemäß Abschnitt 3.7.2.10 bei 4 °C mittels Hochdruckhomogenisation in Anwesenheit der Protease-Inhibitormischung aufgeschlossen und über IMAC an einer ÄKTAexplorer aufgereinigt. Western Blots mit anti-Myt1 und anti-His AK sollten ein Vorliegen gereinigter Myt1 beweisen (Abb. 4.40). Anhand der Abbildungen der Blots wird deutlich, dass im IMAC Eluat Myt1-positive Banden nachgewiesen werden können (Abb. 4.40 A). His-positive Banden können

jedoch nicht eindeutig im Blot bestimmt werden, sie sind nur schwach zu erkennen. Im Rohproteinextrakt sowie im Durchlauf sind reichlich Myt1- und His-positive Banden nachweisbar. Dies spricht erstens für eine unvollständige Abtrennung unlöslicher Myt1 während der Zentrifugation des Zellrohextraktes bei 15000 rpm. Zweitens offenbart es, dass große Teile der Myt1 nicht an das Säulenmaterial gebunden hatten und demzufolge durch den Waschvorgang entfernt wurden. Dies konnte auf einer Unzugänglichkeit des His-Tags beruhen, da eine Bindung an das Harz nur erfolgen kann, wenn der His-Tag sich auf der Oberfläche des Myt1-His₆-Proteins befindet.

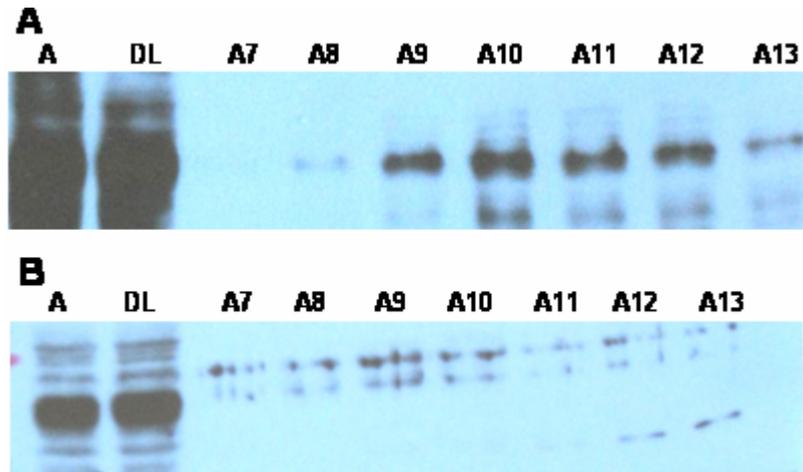


Abb. 4.40 Western Blots nach Aufschluss und Reinigung (IMAC) von 8 g BFM *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1: Dargestellt werden anti-Myt1 (A) und anti-His (B) Western Blots mit Rohproteinextrakt (A), Durchlauf (DL) und einzelnen Fraktionen des IMAC Eluats (A7 – A13). A: Myt1-positive Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa im Auftrag und Durchlauf und deutlich in Fraktion A9 – A12 vorhanden; B: His-positive Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa im Auftrag und Durchlauf, im Eluat nur schwach nachweisbar.

Ein Coomassie-gefärbtes Gel zeigte nur sehr schwache Banden bei 55 kDa in den IMAC Eluaten, wies aber auch keine anderen Banden auf, was für einen guten Erfolg hinsichtlich der Abtrennung anderer unerwünschter Proteine sprach.

Nachdem Myt1 Kinase nach der Aufreinigung mittels Blot nachgewiesen wurde, konnte also die oben aufgeworfene Frage eindeutig beantwortet werden. Eine Aufreinigung über den His-Tag war trotz der fehlenden Nachweisbarkeit in der löslichen Proteinfraction der 1/OD-Proben (siehe Abb. 4.39 C) möglich. Die Verluste in Form von unlöslicher Kinase waren jedoch immens.

Bis zu diesem Punkt war noch kein Nachweis erfolgt, ob das Expressionsmodell **V** mit der Codon-optimierten DNA zur Expression aktiven Zielproteins in der Lage war. Darüber sollte ein Aktivitätstest mit den über Reinigung erhaltenen Enzymfraktionen Aufschluss geben. Mittels CE Methode konnte nur ein sehr geringer Umsatz für Fraktion A10 festgestellt werden, der aber auf Grund der Störanfälligkeit der CE Methode nicht sicher schien. Deshalb erfolgten hier zusätzlich Aktivitätsmessungen mit Hilfe des noch in der Entwicklung befindlichen FP Assays. Darin konnte für Fraktion A10 und A11 ein geringer Umsatz festgestellt werden.

Mit diesen Ergebnissen wurde aufgezeigt, dass auch Expressionsmodell **V** neben Modell **III** zur Myt1 Gewinnung grundsätzlich geeignet ist. Aber auch hier wäre eine Vergrößerung des Expressionsansatzes unumgänglich, um ausreichend Kinase für Inhibitorscreenings zu erhalten. Außerdem sprechen die Resultate aus der Reinigung für die Notwendigkeit der weiteren Verbesserung der Aufschluss- und Aufreinigungsstrategie, da hier die Verluste löslicher Kinase wiederholt groß waren.

4.3.3 Myt1 Kinase aus Expressionen in Insektenzellen und humanen Zellen

Myt1 Expressionsversuche durch Dr. Frank Erdmann wurden durch unsere Arbeitsgruppe in Form von Aktivitätsmessungen begleitet. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten ausschließlich Messungen mit Enzympräparationen aus Insektenzellen. Als Expressionssystem wurden *Spodoptera frugiperda* und *Drosophila melanogaster* genutzt. Die Gewinnung enzymhaltiger Lösungen war hierbei vergleichsweise simpel. Da das Zielprotein, ein Fusionsprotein aus Myt1 Kinase und Polyhistidin-Tag, durch die Insektenzellen direkt in das Medium sekretiert wurde, war die Gewinnung von enzymhaltigen Lösungen über eine einfache Zentrifugation, bei der die Zellen abgetrennt wurden, möglich. Getestet wurden über Ionenaustausch gereinigte, aber auch ungereinigte Enzympräparationen. Der Polyhistidin-Tag bot auch, wie bei den bisher vorgestellten bakteriellen Expressionen, die Möglichkeit einer Affinitätschromatographischen Reinigung. Ein erstes Coomassiegefärbtes Gel ungereinigter und einer gereinigten Fraktion schien vielversprechend (Abb. 4.55, siehe Anhang).

Zunächst übertrafen Aktivitätsmessungen über CE die Erwartungen deutlich – es konnten Umsätze von TY-ABD zu monophosphoryliertem Peptid verzeichnet werden, wie sie zuvor nie bei Einsatz der in *E. coli* exprimierten Kinase gemessen wurden. Auch die Geschwindigkeit der Umsetzung war für bisherige Erfahrungen ungewöhnlich hoch. Außerdem zeigten sich die Enzympräparationen als auffallend robust, indem sie über mehrere Wochen ohne größeren Aktivitätsverlust bei 4 °C gelagert werden konnten. Die hohe Aktivität und die Lagerstabilität ermöglichten somit eine längere Periode der Weiterentwicklung der beiden Testsysteme, die sich noch immer im Aufbau bzw. in der Konsolidierung befanden.

Bald erfolgten erste Hemmstoffuntersuchungen mit Inhibitoren, für die in der Literatur eine Myt1 Wirkung beschrieben ist (z.B. Staurosporin, K252a). Mit keiner Substanz konnten die in der Literatur angegebenen Hemmdaten über die CE Methode bestätigt werden, was Zweifel weckte, ob es sich bei den gemessenen Umsätzen ausschließlich um Myt1-Kinase-Aktivität handelte. Nach weiteren Untersuchungen konnten zum einen die CE Methode und zum anderen die Proteinlösungen als potentielle Fehlerquelle identifiziert werden. Detailliertere Ausführungen zu Nachteilen der CE Messungen finden sich in Abschnitt 4.2.3.

Auf Grund der fehlenden Hemmbarkeit der in Insektenzellen exprimierten Enzympräparation wurde durch Dr. Frank Erdmann ein drittes Expressionssystem erwogen: Derzeit werden humane Zellen als Expressionsmodell zur Myt1 Gewinnung getestet.

4.3.4 Vergleich der unterschiedlichen Expressionsmethoden

Ob eine Expression in Bakterien, Insektenzellen oder humanen Zellen durchgeführt wird, das ideale Expressionssystem gibt es nicht, alle haben sie ihre Vor- und Nachteile. Alle können zu unvorhersehbaren Komplikationen führen und ihre jeweilige Entwicklung beansprucht Zeit. Auch wenn die Arbeitsgruppe zu Beginn der biotechnologischen Arbeiten glaubte, eine bereits veröffentlichte Methode müsse nur adaptiert und den örtlichen Gegebenheiten angepasst werden, muss eine solche Übertragung nicht zwangsläufig reibungslos ablaufen. Auf die Expertise der Arbeitsgruppe von Prof. Pietzsch stützend, erfolgten in Zusammenarbeit mit dieser die ersten Expressionsversuche mit *E. coli* BL21 Zellen. Dass die erste Wahl auf ein bakterielles Expressionssystem fiel, war nicht zufällig. Primär

entscheidend war das Vorhandensein einer Veröffentlichung bezüglich dieser Fragestellung. Grundlage dieser Arbeiten bildeten bereits 1997 publizierte Ergebnisse von LIU et al., die humane Myt1 in Volllänge als GST-Fusionsprotein in *E. coli* JM109 Zellen mit dem Vektor pGEX-2TNMyt1 exprimierten¹¹. Außerdem zählt *E. coli* zu den am besten untersuchten Organismen, auch in Bezug auf die heterologe Expression von Proteinen. Zu Vorzügen und Hemmnissen bakterieller Expressionssysteme siehe Abschnitt 4.3.1. Zum Dritten besitzt die Arbeitsgruppe um Prof. Pietzsch große Erfahrung im Umgang mit *E. coli*. Des Weiteren waren alle für die bakterielle Expression benötigten Mittel bereits vorhanden.

Was die Expression in Insektenzellen und humanen HEK293-Zellen betrifft, können zu praktischen Belangen in dieser Arbeit keine detaillierten Angaben erfolgen, da die Durchführung bei Dr. Frank Erdmann lag. Die Handhabung von Insektenzellen ist im Allgemeinen relativ unkompliziert – sie wachsen schneller als Säugerzellen und benötigen keinen CO₂-Inkubator. Ein Vorteil der Myt1 Bildung in Insektenzellen lag in der Möglichkeit der direkten Sekretion des Zielproteins in das die Zellen umgebende Medium. Das Medium ließ sich von den Zellen durch Zentrifugation abtrennen und ein aufwendiger Aufschluss, wie es bei Bakterien notwendig ist, entfiel. Aktivitätsversuche konnten über CE direkt, sogar ohne weitere Aufreinigungen, erfolgen. Dies sparte Zeit, führte jedoch auch zu Störsignalen während der CE, die eine Auswertung teilweise erschwerten. Aber auch ein Aufreinigungsschritt war leicht auszuführen, da es sich bei diesem Protein ebenfalls um eine Fusion mit einer C-terminalen Polyhistidin-Sequenz handelte. Grundsätzlich positiv ist, dass Insektenzellen viele der eukaryotischen Proteinmodifikationen, wie Glycosylierungen, Phosphorylierungen oder Acylierungen unterstützen, weil sie selbst zu den Eukaryoten gehören. Auf diese Modifikationen muss man bei bakteriellen Expressionssystemen verzichten⁸⁴. Hier liegen aber auch Nachteile, da sich manche posttranslationale Modifikation von der in Säugerzellen unterscheidet und Schwierigkeiten bereiten kann.

Die Synthese der humanen Myt1 in HEK293-Zellen ist insofern die beste Wahl, als dass es sich um den Wirtstamm handelt aus dem das Protein stammt. Das bewirkt in der Regel, dass Modifikationen und Faltung so erfolgen, wie sie es tatsächlich sollen. Die Handhabung humaner Zellen ist jedoch komplizierter als bei den erstgenannten Expressionssystemen und teurer.

Mittelfristig muss entschieden werden, ob die Arbeitsgruppe auf Grund der Vorzüge des humanen Expressionssystems an diesem festhält oder nicht doch eine bakterielle Expression der Kinase auf Grund der leichteren Handhabung und einem günstigeren Umgang etabliert.

4.3.5 Zusammenfassung und Diskussion

Im Laufe dieser Arbeit wurden fünf bakterielle Expressionssysteme zur rekombinanten Herstellung der Myt1 Kinase getestet. Dabei konnten wichtige Erkenntnisse zur Expression, Aufschluss und Reinigung der Myt1 und grundsätzliche Einblicke in die *Upstream*- und *Downstream*-Prozesse der Biotechnologie gewonnen werden. Als Expressionsstamm dienten *E. coli* BL21, *E. coli* HM130 und *E. coli* CAG597. Bei HM130 und CAG597 handelt es sich um für einige *E. coli*-Proteasen defiziente Stämme. Der letztere eignete sich nicht zur Anzucht in Minimalmedium, weshalb er für weitere Versuche keine Bedeutung hatte. Für eine bessere Prozesssteuerung, im Hinblick auf Fermentationen, wurden alle übrigen Expressionssysteme auf Minimalmedium adaptiert. Neben unterschiedlichen Stämmen kamen verschiedene Vektoren zum Einsatz, in die das hMyt1 Gen kloniert wurde. Die Proteinbildung wurde bei allen Systemen chemisch durch IPTG induziert. Versuche einer Kultivierung und Expression der

Kinase in Autoinduktionsmedium zeigten keinen Erfolg. Obwohl für einige rekombinant hergestellte Enzyme Aktivitätsbestimmungen direkt durch Einsatz des Zellrohextraktes möglich sind, war das leider für die hier hergestellte Kinase nicht der Fall. Dem direkten Einsatz des bakteriellen Zellrohextraktes stehen die darin enthaltenen Phosphatasen und Proteasen entgegen. Durch die Anwesenheit von 2 mM Molybdat können enthaltene Phosphatasen inhibiert werden. Das größere Problem stellen jedoch Proteasen dar, die zu einem schnellen Abbau des Substrates (z.B. TY oder TY-ABD) und zusätzlich des Antikörpers im Fall des FP Assays führen können. Die im Aufschluss verwendete Protease-Inhibitormischung EDTA-frei hemmt zwar ein breites Spektrum von Serin- und Cystein-Proteasen, die dann im Testsystem nicht mehr stören, Aspartyl- und Metalloproteasen bleiben aber unbeeinträchtigt. Aspartyl- und Metalloproteasen wären durch EDTA hemmbar, der Einsatz verbietet sich hier jedoch, da der Chelatbildner für die Kinase essentielle Magnesiumionen binden würde. Zum Vergleich kann der Einsatz von EDTA im FP Assay zur Terminierung der Kinasereaktion herangezogen werden. Diese Tatsache führt also dazu, dass der Erfolg jeder Expression erst nach einer aufwendigen Aufschluss- und Reinigungsprozedur abschließend bewertet werden kann, weil dann erst eine Aktivitätsmessung möglich ist. Der Entwicklungsprozess einer geeigneten Expression ist somit gegenüber anderen etwas verlangsamt.

Für eine erleichterte Aufreinigung der exprimierten Proteine wurden Fusionen der Myt1 mit Glutathion-S-Transferase, Polyhistidin oder der Kombination beider eingesetzt. *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ (Expressionssystem III) codiert für ein GST-hMyt1-His₄ Fusionsprotein. Es schien geeignet zur Herstellung der Myt1, und da über Expressionen im Schüttelkolben-Maßstab nicht ausreichend Protein erzeugt werden konnte, erfolgte eine Fermentation im 15 l Maßstab. Auf diese Weise konnten 800 g Biofeuchtmasse gewonnen werden, die portioniert zu je 200 g über verschiedene Reinigungsstrategien der Gewinnung der Kinase dienten. Diese wurde für Aktivitätstests und erste Inhibitorenuntersuchungen via CE Methode eingesetzt.

Eine Verbesserung der Expression sollte durch eine Optimierung der Originalsequenz in Bezug auf die *Codon Usage* erfolgen. Expressionssystem IV und V tragen in BL21 Zellen ein auf die Expression in *E. coli* optimiertes hMyt1 Gen, zum einen in dem Vektor pGEX-2T (für GST-hMyt1-His₆) und zum anderen in pET-20b (für hMyt1-His₆). Experimente in Schüttelkolben wiesen eine deutliche Verbesserung der Expressionseffizienz auf. Die Myt1 Kinase wurde allerdings zum größten Teil in Form unlöslicher *Inclusion Bodies* exprimiert. Der lösliche Teil der Myt1 unterlag schon während der Expressionsphase, bereits drei Stunden nach Induktion, einer ausgeprägten Proteolyse, die beim GST-hMyt1-His₆ Protein intensiver als beim hMyt1-His₆ Protein war. Dennoch konnte bereits aus ca. 8 g BFM *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1, die aus zwei Schüttelkolbenkulturen erhalten wurden, nach Aufschluss und IMAC aktive Kinase gewonnen werden. Die Auswertung der Expressionen hatte gezeigt, dass der Anteil löslichen Proteins relativ zeitig nach einer Induktion mit IPTG am größten war und dann stark abnahm. Daher wäre eine frühe Ernte, ca. 2,5 h nach Induktion, bei den beiden Modellen IV und V, unter Inkaufnahme einer verminderten Gesamtproteinmenge am besten geeignet, um größtmögliche Teile löslichen Proteins zu erhalten.

System III und V wurden so weit geführt und optimiert, dass Kinase exprimiert, gereinigt und Aktivität festgestellt werden konnte. Die Vorzüge des Expressionsmodells III lagen vermutlich im proteasedefizienten Stamm *E. coli* HM130. Interessant wäre es, diesen Vorteil mit dem des Modells V, nämlich der optimierten *Codon Usage*, zu kombinieren. Die verbesserte Expressionseffizienz von V könnte auf diese Weise besser genutzt werden, da möglicherweise ein größerer Anteil löslichen

Zielproteins, auf Grund einer geringeren Anzahl an Proteasen, erhalten bliebe. Dies könnte unter Umständen auch eine, gegenüber Modell **IV** und **V**, längere Expressionszeit ermöglichen, so dass nicht bereits 2,5 Stunden nach Induktion die Zellernte erfolgen müsste. Eine Kombination aus **III** und **V** könnte folglich ein aussichtsreiches Expressionssystem zur rekombinanten Synthese humaner Myt1 Kinase darstellen.

Im Folgenden sollen noch einmal in Kürze einige wichtige Aspekte zur Expression der Myt1 zusammengefasst werden: Bei der rekombinanten Expression der Myt1 in *E. coli* ist insbesondere ihre Proteolyseempfindlichkeit zu beachten. Ein Fusionsprotein mit einer Polyhistidin-Sequenz ist gegenüber einer GST-hMyt1-Fusion zu bevorzugen, da hier eine geringere Proteolyse festgestellt werden konnte. Der Einsatz von proteasedefizienten Stämmen, wie z.B. *E. coli* HM130 erscheint vor diesem Hintergrund sinnvoll. Da vergleichsweise geringe Mengen hMyt1 exprimiert werden, ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel zum Nachweis einer erfolgreichen Expression häufig nicht ausreichend. Die sensitivere Silberfärbung und, noch besser, ein anti-Myt1 Western Blot geben in dieser Hinsicht mehr Sicherheit. Um größere Mengen des Enzyms gewinnen zu können, ist unter Umständen ein *Scale-Up* der Produktion der Myt1 vom Schüttelkolben- zum Fermentationsmaßstab zu erwägen. Wie mit Expressionsmodell **III** demonstriert, konnte der *Scale-Up* auf den 15 l Maßstab erfolgreich durchgeführt werden. Durch die Induktion bei höheren Zelldichten, konnte eine stärkere Expression erzielt werden. Die Biomassernte könnte zukünftig verbessert werden, indem zu Beginn der Ernte die Temperatur des Bioreaktors auf 4 °C herabgesenkt wird, um proteolytische Vorgänge während der Zellernte zu minimieren. Größere Mengen an Zellen sollten mittels flüssigem Stickstoff erst schockgefrostet und dann bei -80 °C gelagert werden. Generell empfiehlt sich zum Erhalt der Tertiärstruktur von Proteinen, wenn sie in Lösung, z.B. nach einer Reinigungsprozedur vorliegen und eingefroren werden sollen, diese mit flüssigem Stickstoff schockzufrieren. Aufschluss und Reinigung müssen in Gegenwart von Protease-Inhibitoren und vorzugsweise bei 4 °C durchgeführt werden, um eine Proteolyse möglichst auszuschließen. Die geeignetere Reinigungsmethode stellte die IMAC dar, vermutlich auch, weil bei einer Proteolyse der GST-Tag bevorzugt abgespalten wurde.

Folgende Ansatzpunkte zur Verbesserung der bakteriellen Expressionssysteme sind denkbar: Erstens die Kombination aus optimierter *Codon Usage* in pET-20b (aus System V) und proteasedefizienten *E. coli* Stamm (*E. coli* HM130 aus System III). Auf diese Weise könnte eine Minimierung der Proteolyse erreicht werden.

Ein besonderes Problem bei System **IV** und **V** stellten *Inclusion Bodies* dar. Gemäß Literatur können eine niedrigere Kultivierungstemperatur als 37 °C¹⁰³, das Absenken der Temperatur nach IPTG-Induktion¹⁰⁴, sowie eine Kultivierung in Minimalmedium¹⁰⁷ zu einem höheren Anteil löslichen Proteins führen. Diese traditionellen Wege zur Erhöhung der Löslichkeit rekombinanter Proteine wurden bei den beiden Systemen ohne größeren Erfolg getestet. Eine alternative Strategie, um aktive, lösliche Proteine zu erhalten, kann der Transport ins Periplasma darstellen^{106; 107}. Ein solcher Ansatz ist als zweite Möglichkeit zur Verbesserung des bakteriellen Expressionssystems vorstellbar. Der Transport ins Periplasma könnte auch bei der Myt1 Expression zu erhöhten Mengen löslichen Proteins führen. Dies kann durch Einbringen von Prä-Sequenzen in das Genom erreicht werden. Ursprünglich verfügt der Vektor pET-20b mit der pelB Signalsequenz über eine solche Prä-Sequenz im Bereich seiner Klonierungsstelle. Im Expressionssystem **V** wurde dieser Teil jedoch bei der Ligation der hMyt1 cDNA in die Klonierungsstelle des pET-20b durch Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Eco*R I

entfernt. Durch eine erneute Klonierung des Inserts in den Vektor pET-20b über die Restriktionsschnittstellen *Bam*H I und *Eco*R I bliebe die pelB Signalsequenz erhalten. Damit wäre die pelB Signalsequenz am 5' Ende sowie ein Hexahistidin-Tag am 3' Ende im gleichen Leserahmen mit der Sequenz der hMyt1. Das Enzym würde folglich bei der Synthese in das Periplasma transportiert und C-terminal einen His-Tag tragen.

Neben der Möglichkeit das Expressionssystem **V** so zu modifizieren, dass weniger Myt1 in Form von *Inclusion Bodies* akkumuliert, bestünde zum Dritten die Möglichkeit, das System so zu belassen und im besonderen Maße die Bildung von unlöslichem Protein zu forcieren. Die in großer Anzahl gebildeten *Inclusion Bodies* könnte man sodann präparieren, was einer Denaturierung der Proteine gleich käme. Über eine anschließende Rückfaltung wäre die erneute Bildung aktiven Enzyms möglich.

Bezüglich des Aufschlusses und der Reinigung der *E. coli* Zellen könnte der Einsatz geringer Mengen Solubilisierungsreagenz von Nutzen sein. In der Arbeitsgruppe Schmidt konnte inzwischen eine Verbesserung des Aufschlusses von Myt1-exprimierenden HEK293-Zellen durch den Einsatz von Tensiden erzielt werden. Die Tenside Triton X-100 und NP-40 in einer Konzentration von 0,5 % erwiesen sich als besonders geeignet für eine erfolgreiche Präparation nativer Myt1 Kinase aus den humanen Zellen. Möglicherweise wurde bisher der Tatsache, dass es sich bei der Myt1 um eine Membran-assoziierte Kinase handelt, bei deren Aufschluss und Reinigung zu wenig Beachtung geschenkt. Die Aminosäuren 382 bis 398 bilden das Membranassoziationsmotiv der Myt1 Kinase. Proteine mit hydrophoben Bereichen oder Membranassoziationsmotiven⁴¹ neigen dazu, bei Verwendung von Standard-Aufschlusspuffern, in die unlösliche Fraktion zu wandern und dort mit bakteriellen Lipiden oder Membranen zu assoziieren. Einige solcher Proteine können durch den Zusatz millimolarer Mengen nicht-ionischer oder zwitterionischer Detergenzien im Aufschlusspuffer häufig wieder herausgelöst werden¹⁰⁷. Ob eine Detergenzzugabe auch Vorteile für den Aufschluss Myt1-exprimierender bakterieller Zellen birgt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen. Möglicherweise kann so der Anteil löslichen Myt1 Proteins erhöht werden.

4.4 Bestimmung von Kinaseaktivität und Hemmung

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Enzympräparationen aus unterschiedlichen Expressionssystemen auf ihre Myt1-Aktivität untersucht. Präparationen der Wee1 Kinase wurden aus Insektenzellen gewonnen, welche auch hinsichtlich ihrer Aktivität getestet wurden. Größtenteils kam zu diesem Zweck die CE Methode zum Einsatz, da diese schneller als der FP Assay etabliert war und den Vorteil bot, einen direkten Einblick in die Veränderungen der Substrat- und Produktkonzentration zu gewähren.

4.4.1 Myt1-Aktivitätsbestimmung über CE und FP

Für verschiedene Präparationen der Myt1 konnte mittels CE Methode Aktivität nachgewiesen werden. So wurde z.B. für verschiedene Präparationen des Expressionssystems III in *E. coli* HM130 Zellen und für verschiedene Enzympräparationen aus Insektenzellen ein Substratumsatz festgestellt. Geringe Aktivität war auch für Präparationen aus Expressionsmodell V nachweisbar. Mit Expressionsmodell III wurde ein größerer Fermentationsansatz im 15 l Maßstab durchgeführt. Im Laufe dieser Fermentation konnte genug Biomasse gewonnen werden, um mehrere Aufschluss- und Reinigungsvarianten zu

testen und anschließend die Aktivität diverser Fraktionen zu bestimmen. Grundsätzlich führten proteolytische Vorgänge während der Aufschluss- und Reinigungsprozedur häufig dazu, dass keine aktiven Fraktionen der Myt1 gewonnen werden konnten oder nur geringe Umsätze messbar waren, die nicht ausreichend sicher bestimmt werden konnten. Zufriedenstellende Umsätze wurden mit Enzympräparationen erzielt, die aus Zellen gewonnen wurden die bei 4 °C aufgeschlossen und anschließend über IMAC aufgereinigt wurden (siehe dazu auch Abschnitt 4.3.2.4).

Unabhängig vom Expressionssystem erfolgte bei Umsatzproben in Gegenwart der Enzympräparationen und ATP im Allgemeinen die Umsetzung von TY-ABD zu mono- und diphosphorylierten Peptiden. Die Bildung von monophosphoryliertem TY-ABD war meist innerhalb der ersten Stunde nachweisbar. Im Fall von Enzympräparationen aus dem bakteriellen Expressionssystem III konnte ein Signal für pTY-ABD nach sechs bis acht Stunden Inkubation identifiziert werden. Auf der Grundlage von Umsatzproben, die unterschiedlich lange inkubiert und anschließend über CE vermessen wurden, wäre der Ablauf einer Kinasereaktion mit der Myt1 folgendermaßen denkbar: In einem ersten Schritt könnte die Bildung von monophosphoryliertem Peptid erfolgen, welches anschließend zu diphosphoryliertem Peptid umgewandelt wird. Für diese Theorie spräche die Beobachtung, dass bis zu einer Inkubationszeit von ca. sechs Stunden das Signal für pTY-ABD bzw. TpY-ABD stetig größer wurde und anschließend, bei einer längeren Inkubation wieder abnahm, parallel dazu aber ein weiteres Signal entstand. Dieses, bei längerer Inkubation neu entstehende Signal, wies bei CE Messungen die Migrationszeit der pTpY-ABD Referenz auf. Abbildung 4.26 zeigt die Elektropherogramme einer für eine oder 15 Stunden inkubierten Umsatzprobe mit Enzymlösung aus *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄, für die ein solcher Reaktionsverlauf festgestellt werden konnte. Eine Unterscheidung, ob beide monophosphorylierten Peptide bei der Reaktion gebildet wurden, und wenn zutreffend, in welchem Verhältnis zueinander, erfolgte bei den Messungen nicht, da unter den gewählten Laufbedingungen keine Auftrennung von pTY-ABD und TpY-ABD erfolgen konnte.

Nachdem für die Myt1-Präparationen aus *E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄ (Reinigung B) Aktivität nachgewiesen wurde, erfolgte mit diesen Präparationen ein kleineres Inhibitorscreening von diversen Flavonoiden, Resveratrol, Imatinib und Sunitinib im Rahmen einer Diplomarbeit im Fach Lebensmittelchemie⁸⁸, auf dessen Ergebnisse hier nicht noch einmal gesondert eingegangen wird.

Die zweiten positiv getesteten Enzympräparationen, die hier Erwähnung finden sollen, stammten aus Expressionen in Insektenzellen - *Spodoptera frugiperda* und *Drosophila melanogaster*. Neben dem Wirtsorganismus unterschieden sich die Präparationen zusätzlich durch die jeweils eingesetzte Transfektionsmethode, die elektrophoretische Transfektion oder Lipofektion. Der Vergleich aller Ansätze bezüglich ihrer Aktivität zeigte die Überlegenheit von Myt1 Chargen, die über Lipofektion und Expression in *D. melanogaster* erzeugt wurden. Diese führten zu Substratumsätzen, wie sie bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht festgestellt werden konnten. Die Umsetzung von TY-ABD erfolgte schnell und in hohem Ausmaß, wie in Abbildung 4.41 durch Darstellung eines Reaktionsverlaufes demonstriert. Weitere Experimente, bei denen anstatt TY-ABD das monophosphorylierte Substrat eingesetzt wurde, zeigten im Vergleich zum Standardsubstrat einen ähnlichen Reaktionsverlauf. Theorien, wonach die Myt1 bevorzugt Threonin(14) phosphorylieren würde⁶⁶, konnten mit diesen Experimenten nicht bestätigt werden. Eher deuteten die Befunde auf eine effiziente Phosphorylierung von beiden Aminosäuren der CDC2, nämlich Threonin(14) und Tyrosin(15), was wiederum andere

Literaturquellen (z.B. MÜLLER et al.²⁹) mit der Angabe, die Myt1 sei dualspezifisch gegenüber Tyr¹⁵ und Thr¹⁴ der CDC2, bestätigte.

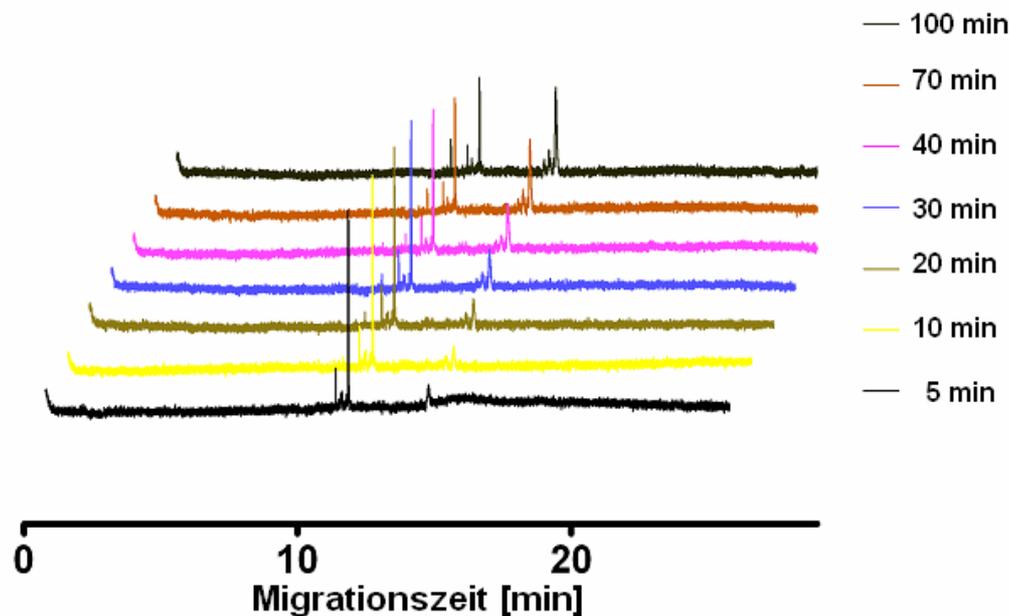


Abb. 4 41 Darstellung eines Reaktionsverlaufs mit Enzympräparation aus Insektenzellen via CE: Umsatzproben mit Myt1 Präparation aus *D. melanogaster* (Lipofektion). Hier wird der Umsatz von TY-ABD zu monophosphoryliertem Peptid dargestellt. Weitere Versuche mit TpY-/pTY-ABD als Substrate zeigten die Bildung von pTpY-ABD in ähnlicher Weise. CE Bedingungen: Injektion bei 80 mbar über 0,8 min, Lauf bei 25 kV und 2 mbar Druck.

Dieselben Enzymlösungen wurden auch für Aktivitätsuntersuchungen via FP Assay eingesetzt. Dieser befand sich, was das Messen von realen Umsatzproben anging, noch immer in der Erprobungsphase. Zunächst konnte, ohne Abstoppen der Enzymreaktion in den Umsatzproben, keine Aktivität nachgewiesen werden. Umsatzproben verhielten sich wie Negativkontrollen. EDTA als Terminierungsreagenz führte in einem anschließenden Experiment dazu, dass ein Umsatz nachgewiesen werden konnte (siehe dazu Abb. 4.18 f. des Abschnitts 4.2.1.6).

Ähnliche Umsätze konnten mit Hilfe von Präparationen der Wee1 Kinase (aus *D. melanogaster*, Elektroporation) erreicht werden. Die Wee1 enthaltenden Enzympräparationen zeichneten sich im FP Assay gegenüber den Myt1 Präparationen durch noch höhere Substratumsätze aus. Die höheren Umsätze ließen sich über die für Wee1 postulierte Tyrosin(15)-Spezifität gegenüber der CDC2 erklären. Theoretisch sollte durch die Wee1 eine Phosphorylierung der CDC2 nur an dieser Aminosäure stattfinden und nicht, wie bei der Myt1, zusätzlich an Threonin(14). Da der eingesetzte AK spezifisch gegen Phospho-Tyrosin(15) gerichtet war, konnte die Verdrängung der Sonde aus der Bindung zum AK bei Wee1-Substratumsätzen ausgeprägter erfolgen.

Des Weiteren belegten die FP-Umsatzmessungen mit Myt1 und Wee1 aus Insektenzellen eine Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Menge eingesetzten Enzyms, was in Abbildung 4.20 dargestellt wird. Aus diesen Ergebnissen ergab sich, dass für die Proben mit Wee1 5 % Enzympräparation im Ansatz eingesetzt wurden. Myt1 Proben enthielten hingegen meist 10 % Enzympräparation.

Da von beiden Enzympräparationen ausreichende Mengen zur Verfügung standen, wurden auch diese anschließend für Hemmstoffuntersuchungen über CE und FP eingesetzt, in denen hauptsächlich bekannte Kinase-Inhibitoren getestet wurden (siehe folgenden Abschnitt).

Als Lösungsmittel für die Inhibitoren wurde DMSO genutzt. Der DMSO-Zusatz erforderte zusätzliche Untersuchungen zur DMSO-Verträglichkeit, sowohl der Kinase, als auch der jeweiligen Messmethode. Im Hinblick auf schlecht lösliche Verbindungen ist besonders von Interesse, wie viel DMSO vom Enzym und Testsystem vertragen werden, da durch einen höheren Anteil des Lösungsmittels das Ausfallen der Testverbindung vermieden werden kann. Üblich sind durchaus 1 – 10 % DMSO in Testsystemen wie dem hier verwendeten FP Assay⁶¹. Eine DMSO-Empfindlichkeit der Myt1 aus *E. coli* HM130 pGEX-2T-hMyt1-His₄ ist im Rahmen von Umsatzmessungen mit einem DMSO Anteil von 5 % festgestellt worden. Bei diesem DMSO Gehalt war über CE kein Umsatz feststellbar. Der Vergleich mit Proben, die 1 und 0,5 % DMSO enthielten, zeigte gegenüber einer DMSO-freien Umsatzprobe keinen Aktivitätsverlust. 5 % DMSO im Ansatz hatten vermutlich einen denaturierenden oder wenigstens Konformations-beeinflussenden Effekt, so dass die Aktivität, zumindest über CE, nicht mehr messbar war. Diese Ergebnisse hatten dazu geführt, dass bei der Testung der Substanzen in allen Proben ein DMSO Gehalt von 1 % eingestellt wurde.

Was die DMSO-Verträglichkeit der Myt1 Präparationen aus Insektenzellen betrifft, wurde diese, für das vom Ursprung neue Enzym, gesondert untersucht. Bei 5 % DMSO verfügte die Kinase im Vergleich zu Standard-Assay-Bedingungen über 50 % der ursprünglichen Aktivität – im Detail: 67 % Substratumsatz bei 1 % DMSO standen 34 % Substratumsatz bei 5 % DMSO gegenüber. Bei diesem System wäre also durchaus eine moderate Erhöhung des Lösungsmittelanteils bei der Testung von Inhibitoren möglich gewesen. Bezüglich der DMSO-Verträglichkeit der CE Methode ist anzumerken, dass sich bei steigendem DMSO Anteil die Migrationszeit der Peptide erhöhte, was die Analytik selbst jedoch nicht beeinträchtigte. Was den FP Assay betrifft, war bei sehr hohen DMSO Konzentrationen zum einen mit einer Beeinträchtigung der Bindung der Sonde an den Antikörper zu rechnen. Zum anderen musste von einer Beeinflussung des Polarisations signals durch die Änderung der Viskosität ausgegangen werden, da eine steigende Viskosität gemäß Formel 2.1 zum Anstieg der Fluoreszenz polarisation führt. Die Viskositätsbeeinflussung durch 1 % DMSO im Ansatz ist als äußerst gering und nahezu vernachlässigbar zu betrachten. Sollte dieser Anteil aber doch zu einer Änderung der Polarisations geführt haben, war diese reproduzierbar, da bei allen Untersuchungen stets gleiche Bedingungen vorherrschten.

4.4.2 Hemmstoffuntersuchungen

In Bezug auf die Ergebnisse der Testung verschiedener Flavonoide hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Myt1 Kinase wird auf die Diplomarbeit zu dieser Thematik verwiesen⁸⁸. Darin konnten nur über die CE Methode erhaltene Ergebnisse ausgewertet werden. Zu dieser Zeit bestand die FP Methode noch in der Assayvariante 1. Das Screening der gleichen Verbindungen über diesen Assay bewies die mangelnde Eignung jener Methode. Mit Abschluss der Diplomarbeit wurde der Entschluss zur Neuentwicklung des Assays in der Variante 2 gefasst, dem heutigen FP Assay.

Die Entwicklungsphase der Assayvariante 2 sollte mit einem ersten, kleineren Inhibitoren screening abgeschlossen werden. Nachdem ein erster Testlauf möglich schien, wurde dieser mit den oben beschriebenen Enzympräparationen aus Insektenzellen vorgenommen. Diese Präparationen zeigten hohe Umsätze und waren in ausreichender Menge vorhanden, so dass ein Screening von 22 Verbindungen über beide Methoden ohne Probleme möglich war.

Zuerst erfolgte die Testung über die CE Methode. Um die Enzymreaktion so kurz wie nötig zu gestalten, auch im Hinblick auf den Zeitbedarf bei der Testung von verschiedenen Substanzen über die CE Methode, wurde die Inkubationszeit bei den Screeningexperimenten in der Regel auf 90 Minuten

beschränkt. Nach dieser Zeit war schon genug monophosphoryliertes Peptid vorhanden, um eine quantitative Auswertung über die Minderung oder Erhöhung der Produktbildung durch eine Substanz durchzuführen. Bei der Auswahl der 22 Testverbindungen (siehe Abschnitt 3.9.1) wurde sich auf Substanzen beschränkt, für die bereits in der Literatur Angaben zur Hemmung von Wee Kinasen existierten. Demzufolge waren Staurosporin als unselektiver Kinaseinhibitor, neben verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren wie beispielsweise Imatinib, Sunitinib und anderen Hemmstoffen wie K252a, einem potenten Serin/Threonin-Proteinkinase-Inhibitor, vertreten. Darüber hinaus wurden drei Verbindungen aus der eigenen Arbeitsgruppe zur Testung eingesetzt. Hierbei handelte es sich unter anderem um α CG13 und β CG13, zwei durch Christiane Göllner in Form einer Neosynthese⁴⁹ nachempfundene Alglynglykolipide. Für diese beschrieb ZHOU et al. 2005 eine Myt1 Inhibition¹⁰. Unerwarteterweise konnten die über CE ermittelten Substratumsätze durch Zusatz der Inhibitoren in einer Konzentration von 50 μ M kaum beeinflusst werden. Eine Gegenüberstellung der im Screening festgestellten Hemmung mit Literaturdaten zeigt die folgende Tabelle. Aufgeführt werden eine Auswahl von Verbindungen, die A. Rohe im Rahmen seiner Diplomarbeit in der AG Dr. Schmidt mit Myt1 Enzympräparation von *D. melanogaster* (Elektroporation) getestet hat.

Tabelle 4.11 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf Umsätze bei der CE Methode: Angabe der Hemmung [%] gegenüber einer Umsatzprobe mit 100 % Aktivität (0 % Hemmung) als Mittelwert \pm Spannweite ($n = 2$). n.b. – nicht bestimmbar (infolge Eigenfluoreszenz des Staurosporins)

Substanzname	Literaturwerte: Myt1-Aktivität [%] bei 100 μ M Inhibitor ⁶¹	Getestete Inhibitor- Konzentration	Hemmung [%] (CE)
Umsatzprobe	-	-	0
Staurosporin	0 \pm 3	50 μ M	n.b.
K252a	- 11 \pm 35	10 μ M	7 \pm 4
Roscovitin	53 \pm 29	50 M	12 \pm 5
HA-1077	68 \pm 17	50 μ M	7 \pm 4
Genistein	54 \pm 6	50 μ M	5 \pm 12

Auf Grund von Löslichkeitsproblemen der getesteten Hemmstoffe, wurden diese grundsätzlich nicht bei einer Konzentration von 100 μ M, sondern bei 50 μ M mit einem DMSO Anteil von 1 % getestet. Selbst bei dieser Konzentration zeigte die eine oder andere Verbindung noch Löslichkeitsprobleme. Im Gegensatz dazu enthielten Proben der Literaturreferenz bis zu 10 % DMSO, um die Substanzen ausreichend in Lösung zu halten. Ähnlich den in der Tabelle aufgeführten Beispielen verhielten sich alle über CE getesteten Verbindungen; sie führten zu keiner Hemmung des Substratumsatzes. Einige Substanzen konnten nicht bestimmt werden, weil sie auf Grund ihrer eigenen Fluoreszenz ein Störsignal im Elektropherogramm bildeten. Im Fall von Staurosporin beispielsweise fiel die Migrationszeit der Substanz mit der der Peptide zusammen, so dass eine quantitative Auswertung nicht möglich war.

Die Testung mit Hilfe des FP Assays erfolgte gemäß Abschnitt 3.9.3. Die Optimierung des Assaysystems war zur Zeit der Untersuchung noch nicht zum Abschluss gebracht, da bei diesen Hemmstofftests das GA noch immer mit pTpY-F5M, anstatt mit Fluorescein, durchgeführt wurde. Die graphische Auswertung für einen Teil der Verbindungen zeigt die folgende Abbildung (Abb. 4.42). Die Messung der aufgeführten Substanzen bei einer Konzentration von 50 μM erfolgte in zwei Messserien, in denen je ein Teil der Verbindungen an der Myt1 und an der Wee1 getestet wurde. Die Darstellung erfolgt nach Enzymen getrennt über die Graphen A für die Testung mit Wee1 und B für die Testung mit Myt1. Da pro Serie nur ein Ansatz für Negativkontrolle und Positivkontrolle angefertigt wurden, zeigen die Graphen jeweils dieselben Kontrollen (NK und PK TpY). Die Ergebnisse der Serie 2 für die Myt1 zeigen für die Umsatz- und Inhibitorproben generell höhere Fluoreszenzpolarisationswerte als für Serie 1. Diese Tatsache liegt in der niedrigeren Enzymkonzentration von 5 % begründet. Da die Polarisationsdifferenz von 50 mP zwischen NK und Umsatzprobe in der Serie 2 (Myt1) zu niedrig war, wurden folgende Experimente wieder mit 10 % Myt1 durchgeführt. In der grafischen Auswertung ist auffällig, dass die Umsätze der getesteten Hemmstoffe fast alle auf dem Niveau der normalen Umsatzproben für Myt1 bzw. Wee1 liegen. Eine Ausnahme bildete eine Verbindung.

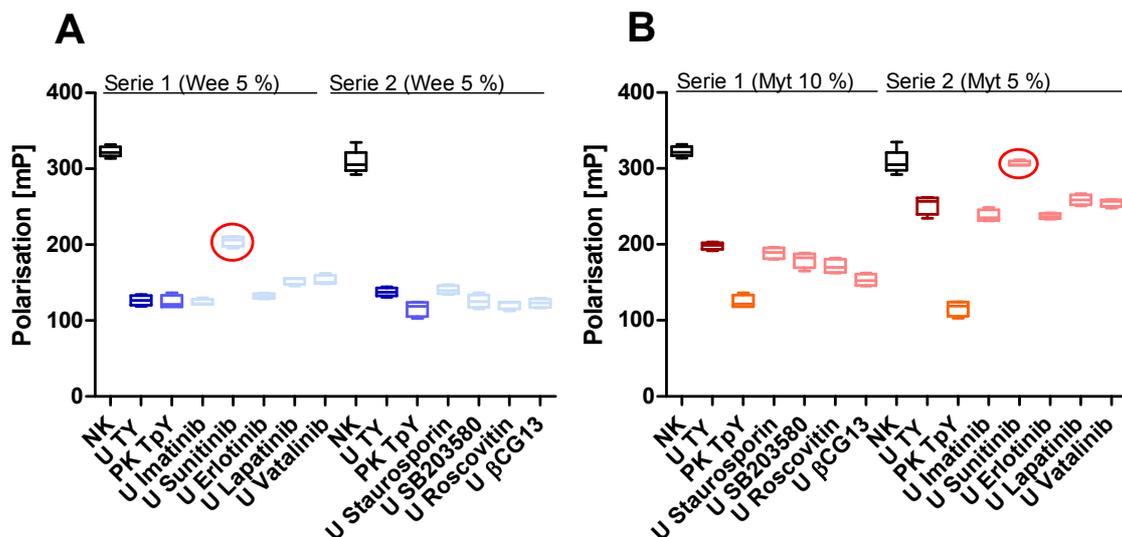


Abb. 4.42 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf Umsätze beim FP Assay: A Inhibitorentestung mit Wee1 (*D. melanogaster*); B Inhibitorentestung mit Myt1 (*D. melanogaster*). Bis auf die mit roter Umrandung gekennzeichnete Sunitinibprobe zeigt keine Verbindung eine Hemmung der eingesetzten Enzympräparationen in Form einer Erhöhung des FP Signals. Dargestellt als Box-Whisker-Plot; Polarisationswerte ergeben sich aus dreifach gemessenen Parallelansätzen ($n = 2$) für die Umsatzproben, PK und Proben mit Inhibitor und $n = 3$ für die NK.

Lediglich die Sunitinibproben führten zu einer Erhöhung des FP Signals und somit scheinbar auch zu einer Verminderung des Substratumsatzes, bzw. zu einer Hemmung. Demzufolge konnte auch anhand der FP Messungen, mit Ausnahme von Sunitinib, für keine der 22 getesteten Verbindungen eine deutliche Hemmung der Enzympräparationen nachgewiesen werden. Da sich dieser Befund in Bezug auf Sunitinib nicht mit der CE Bestimmung deckte, wurde die Messung wiederholt und zusätzlich zur normalen Sunitinibprobe eine modifizierte Positivkontrolle (PK_{mod}) angesetzt. Für die PK_{mod} und die Standard-PK wären exakt gleiche FP Werte zu erwarten gewesen. Die Sunitinibprobe bestätigte das vorhergehende in Abb. 4.42 grafisch dargestellte Ergebnis. Die PK_{mod} , die wie sonst üblich TpY, aber

zusätzlich 50 μM Sunitinib enthielt, zeigte im Vergleich zur Standard-PK eine abweichende Fluoreszenzpolarisation, nämlich die der Sunitinibprobe (siehe Abb. 4.43). Dieses Experiment belegte, dass es sich hier nicht um eine Hemmung des Substratumsatzes durch Sunitinib handelte, sondern die Substanz selbst eine Störung hervorrief, die ausschließlich eine Inhibition vortäuschte. Sunitinib hatte vermutlich bei den FP Messungen durch seine eigene Fluoreszenz zur Beeinflussung der Fluoreszenzintensitäten beider Ebenen geführt und die Polarisationen dabei zufällig so beeinflusst, dass eine Hemmung beider Enzyme hätte angenommen werden können.

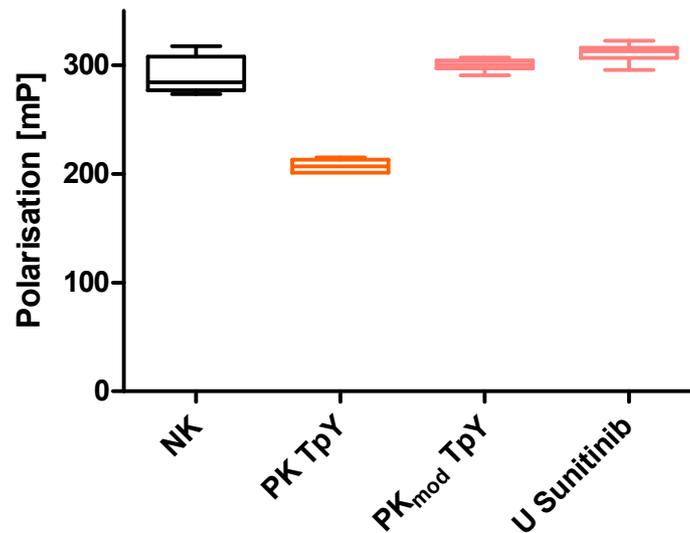


Abb. 4.43 Einfluss von Sunitinib auf Umsatz und Positivkontrollen im FP Assay: Der Vergleich einer Standard-PK mit 50 nM TpY (PK TpY) mit einer modifizierten PK (PK_{mod} TpY), die zusätzlich 50 μM Sunitinib enthält, beweist, dass die hohe FP der Sunitinibprobe nicht auf einer Inhibition der Kinase beruht. PK TpY, PK_{mod} TpY und U Sunitinib enthalten 10 % Myt1 Präparation. Dargestellt als Box-Whisker-Plot (vergleiche Abb. 4.42).

Das Beispiel Sunitinib zeigt, dass nicht nur die CE Methode, sondern auch der FP Assay gegenüber fluoreszierenden Testverbindungen empfindlich sein kann. Störungen wären immer dann denkbar, wenn die zu untersuchende Substanz Fluoreszenzstrahlung im gleichen Wellenlängenbereich wie Fluorescein emittiert, nämlich im verwendeten Messfenster von 520 ± 10 nm.

Nach der Optimierung des Assays dürften Effekte dieser Art deutlich minimiert sein, da auf Grund der verbesserten Kalibrierung des Systems mit reinem Fluorescein eine Hintergrundkorrektur gut möglich ist. Standardmäßig enthalten die Ansätze für den Blindwert keine Inhibitoren, da zunächst davon ausgegangen wird, dass die Verbindungen selbst keinen Einfluss auf die Fluoreszenzpolarisation ausüben. Substanzen, die aber im gleichen Wellenlängenbereich wie Fluorescein fluoreszieren, können Störungen verursachen – am Beispiel von Sunitinib konnte das demonstriert werden. Über den Zusatz dieser Substanzen zum Blindwert, mit anschließender Korrektur der übrigen Sunitinibhaltigen Proben um diesen Wert, wäre das Problem zu lösen. Die in Abbildung 4.42 f. vorgestellten Ergebnisse wurden ohne Hintergrundkorrektur erhalten. Der störende Einfluss des Sunitinibs konnte dennoch verhältnismäßig einfach durch Zugabe zu einer PK nachgewiesen werden. Demzufolge hemmte auch Sunitinib keine der beiden Kinasen im FP Assay.

4.4.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Testung über CE Methode und FP Assay zusammengefasst, ließen sich die mit Enzympräparationen aus Insektenzellen erhaltenen Substratumsätze durch keinen der eingesetzten Substanzen deutlich hemmen. Die beim FP Assay vorgetäuschte Inhibition durch Sunitinib konnte als Störung identifiziert werden. Demzufolge stimmen die über beide Methoden erhaltenen Untersuchungsergebnisse überein. Hier zeigen sich klare Vorteile für die Durchführung von Aktivitätsuntersuchungen mittels zweier, auf unterschiedlichen Messprinzipien beruhenden Methoden. Ohne die CE Daten wäre der „Sunitinibeffekt“ im FP Assay vermutlich unerkannt geblieben und als Inhibition der Enzyme Myt1 und Wee1 gewertet worden. Zumal eine Inhibition durch Sunitinib gemäß der Literaturdaten und dem Wirkungsspektrum als Tyrosinkinase-Inhibitor durchaus denkbar gewesen wäre. Die Widersprüchlichkeit zwischen CE und FP Ergebnissen in Bezug auf Sunitinib deckte jedoch den Fehler auf. Eine modifizierte Positivkontrolle bestätigte schließlich den störenden Einfluss von Sunitinib beim FP Assay, welcher auf eine Eigenfluoreszenz der Verbindung zurückführbar war. Störungen dieser Art können für nachfolgende Experimente durch Einsatz entsprechender Blindwerte, die die jeweils zu testende Substanz enthalten, ausgeschlossen werden. Durch die Optimierung des FP Assays sollte ein solches Vorgehen grundsätzlich möglich sein, so dass auch für fluoreszierende Substanzen eine Kinasehemmung sicher festgestellt werden kann.

Die offensichtliche Diskrepanz der hier ermittelten Hemmwerte gegenüber den in der Literatur beschriebenen, ließ Zweifel an den gemessenen Substratumsätzen aufkommen und legte den Verdacht nahe, dass diese nicht ausschließlich auf Myt1- oder Wee1-Kinaseaktivität beruhten. Bezüglich der CE Methode lassen sich eine Reihe von Fehlerquellen diskutieren, die unabhängig von der Spezifität der Kinasereaktion vorliegen könnten. Folgende Aspekte sind dabei zu bedenken:

Ein Substratumsatz errechnet sich bei der CE Methode aus den Signalen für TY-ABD (Substrat) sowie den phosphorylierten Peptiden p(TY)-ABD und pTpY-ABD, nach deren Zuordnung auf Grund ihrer Migrationszeit gegenüber den Referenzpeptiden. Die unterschiedliche Ladung und Größe der Peptide bedingen die jeweiligen Migrationszeiten. So erhält beispielsweise durch Phosphorylierung von TY-ABD dieses dreifach positiv geladene Molekül eine negative Ladung (da die Phosphatgruppe bei pH 2 mit einem pK_{s1} von 2,1¹⁰⁰ zumindest teilweise dissoziiert vorliegt), was eine langsamere Elektrophorese zur Kathode bewirkt. Soweit sollten diese Prozesse reproduzierbar sein und bei Referenzpeptiden, sowie Substrat und Produkt identisch auftreten. Problematisch sind Vorgänge während der Enzymreaktion, die ebenfalls Größe und Ladungszustand der Peptide verändern, aber nicht beherrschbar oder unmittelbar erkennbar sind. Der N-Terminus der eingesetzten Peptide wird durch die Aminosäure Glutamin gebildet. Glutamin neigt unter Abspaltung von Ammoniak zur Pyroglutaminsäure-Bildung – ein Vorgang der zum Verlust einer positiven Ladung führt. In Folge dieser Reaktion ergäbe sich für ein pyro-Glu-TY-ABD eine Nettoladung, die der von p(TY)-ABD entspräche. Die Verschiebung der Migrationszeit in Richtung der monophosphorylierten Peptide wäre die Folge. Diese Vorgänge trugen vermutlich teilweise bei Blindproben dazu bei, dass kleine Signale für p(TY)-ABD detektiert wurden. Ein zweiter möglicher Faktor zur Beeinflussung von Größe und Ladung der Peptide, könnte die Verunreinigung der Enzympräparationen mit anderen Enzymen darstellen. Zum einen wären Enzyme denkbar, die andere funktionelle Gruppen der Aminosäuren modifizieren, beispielsweise in Form einer Acetylierung von Aminfunktionen - auch das würde zum Verlust einer positiven Ladung führen. Zum anderen könnten Peptidasen vom eingesetzten Peptidsubstrat ganze Aminosäuren abspalten, was erstens die Größe und zweitens, in Abhängigkeit der Aminosäuren, die

Ladung veränderte. Ereignisse dieser Art sind einzig durch Verwendung hochreiner Enzymlösungen zu unterbinden. Die oben erwähnte Pyroglutaminsäure-Bildung wäre durch Austausch des N-terminalen Glutamins gegen Glutaminsäure, der nativen Aminosäure an dieser Position der CDC2, auszuschließen.

Beim FP Assay bewirkten die Testverbindungen ebenso wenig eine Inhibition. Die für die CE Methode beschriebenen möglichen Fehlerquellen können jedoch nicht allein dafür verantwortlich sein, da diese beim FP Assay ausgeschlossen sein sollten und keinen Grund für die fehlende Messbarkeit einer Hemmung darstellen. So dürften eine Pyroglutaminsäure-Bildung und eine Modifikation anderer funktioneller Aminosäuregruppen, auf Grund der Spezifität der Antikörperreaktion nicht stören. Davon ausgeschlossen wären Modifikationen, die zu einer sterischen Hinderung der AK-Bindung führten. Somit müssen weitere entscheidende Faktoren vorliegen, denen bisher noch keine Beachtung geschenkt wurde. Hierbei könnte es sich unter anderem um die Enzympräparationen selbst handeln. Die aus Insektenzellen gewonnenen Enzyme hatten zu bis dato unerreicht hohen Substratumsätzen geführt. Nach 100 min Inkubation konnte ein Umsatz von 68 % bestimmt werden (siehe Abb. 4.41) – eine für humane Zellzyklusinasen wie Myt1 und Wee1 ungewöhnlich hohe Aktivität. Möglich ist also auch, dass eine Phosphorylierung am Tyrosin(15) nicht nur durch Myt1 und Wee1 sondern auch durch andere Enzyme erfolgte. Außerdem wiesen die Enzympräparationen aus Insektenzellen mit mäßiger Reproduzierbarkeit eine Eigenfluoreszenz auf, die zumindest beim FP Assay als Störfaktor wahrgenommen wurde und die Fluoreszenzintensitäten ebenfalls beeinflusste. Da bei den Messungen keine Hintergrundkorrektur mit enzymhaltigen Blindwerten erfolgte, ist auch ein Einfluss auf die errechneten FP Signale in der Form denkbar, als dass hohe Umsätze durch niedrige FP Werte nur vorgetäuscht oder mögliche Inhibitionen durch eine fehlende FP Erhöhung nicht erkannt wurden.

Demnach konnten zwar die CE-Störfaktoren beim FP Assay ausgeschlossen werden, Zweifel gegenüber den Enzympräparationen waren jedoch nicht endgültig auszuräumen.

Die Ergebnisse dieser ersten Inhibitorentests enttäuschten zunächst, da sie teilweise zur zitierten Literatur widersprüchliche Ergebnisse lieferten. Dennoch boten die Hemmstoffuntersuchungen die Möglichkeit die Testsysteme erstmalig in einer Testung unter Beweis zu stellen sowie mögliche Fehlerquellen (wie z.B. den durch Sunitinib verursachten Fehler) zu identifizieren und auszuräumen. Die Hemmstofftests dürfen daher nur als ein Anfang für weiterführende Arbeiten betrachtet werden, die sich hauptsächlich mit der Testung von Inhibitoren beschäftigen. Die in dieser Arbeit etablierten Methoden können dazu einen wichtigen Beitrag leisten.

Die in den letzten Absätzen aufgeführten Überlegungen und Befunde führten unmittelbar zu zwei Maßnahmen. Erstens wurde durch Dr. Frank Erdmann eine Expression der Myt1 in humanen Zellen vorbereitet. Zweitens erfolgte die Optimierung des FP Assays hinsichtlich der täglichen Kalibrierung des Geräts mit Fluorescein, was eine Hintergrundkorrektur zum Ausschluss störender Fluoreszenzen (durch Enzympräparationen oder Testsubstanzen) bei allen Umsatzversuchen ermöglichte.

Die zweite Maßnahme wurde bereits abgeschlossen (siehe dazu Abschnitt 4.2.1.7). Der große Vorteil der hohen Spezifität der Antikörperreaktion gegenüber einer Phosphorylierung am Tyrosin(15) kann somit für zukünftige Aktivitäts- und Inhibitorenuntersuchungen voll ausgeschöpft werden. Eine sinnvolle Anpassung der Zusammensetzung des Blindwertes, je nach Bedarf und Fragestellung, ermöglicht auch die Bestimmung von fluoreszierenden Substanzen, die bei der CE Methode stören könnten, weil sie gegenüber den Peptiden gleiche Migrationszeiten aufweisen.

In Bezug auf die Testung von Myt1 Präparation aus humanen Zellen (HEK293-Zellen) konnten kürzlich erste Erkenntnisse gewonnen werden⁸⁷. Unter Verwendung der hier entwickelten Methoden sollen weiterführende Experimente die Frage beantworten, welches Substrat für Myt1-Aktivitätstests und Inhibitorenuntersuchungen geeigneter ist. Eine zusätzliche Option zu dem bisher eingesetzten CDC2-abgewandelten Peptid, stellen die CDC2 und der CDC2-Cyclin B-Komplex dar. In der Literatur finden sich hinsichtlich der Substratwahl bei Myt1-Untersuchungen unterschiedliche Angaben. Während KRISTJÁNSDOTTÍR CDK2-Cyclin A-Komplexe einsetzt, weil er mit dem CDC2-abgewandelten Peptid keine Myt1-Aktivität feststellen konnte⁶¹, postulieren andere Literaturquellen eine Inaktivität der Myt1 gegenüber CDK2 und nur eine Aktivität gegenüber CDK1^{40; 11}, welche der CDC2 entspricht. Diesen Referenzen zum Trotz berichtet ZHOU von erfolgreichen Aktivitäts- und Hemmstoffuntersuchungen mit dem CDC2-abgewandelten Peptid TY¹⁰.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Myt1 aus bakterieller Expression und aus Insektenzellen ein Substratumsatz bei Einsatz von TY festgestellt werden, was zunächst mit Erkenntnissen ZHOU konform geht. Dennoch besteht mit den aktuellen Ergebnissen aus Experimenten mit Myt1 aus humanen Zellen und den unterschiedlichen Literaturangaben bezüglich der Substratspezifität der Myt1 weiter Unklarheit. Weitere Experimente in Bezug auf das Substratspektrum vom CDC2-abgewandelten Peptid, über CDC2 als Gesamtprotein bis hin zu CDC2-Cyclin-Komplexen müssen sich demzufolge anschließen, um die Wirren bezüglich der Substratspezifität der Myt1 aufzuklären. Die entwickelten Testsysteme liefern dafür eine wichtige Grundlage.

5 Schlussbetrachtung

5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Entwicklung zweier Testsysteme zur Aktivitätsbestimmung der beiden Wee Kinasen, Myt1 und Wee1. Methode 1 basiert auf einer Trennung von Substrat und Produkt mittels Kapillarelektrophorese und anschließender Fluoreszenzdetektion. Die zweite Methode wird durch einen Fluoreszenzpolarisations Immunoassay gebildet, der mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers arbeitet. Als Substrat der Kinasen wurden Peptide eingesetzt, welche einen Ausschnitt der CDC2 darstellen und die beiden Phosphorylierungsstellen von Myt1 und Wee1 aufweisen. Die Auswahl des ursprünglichen Substrats, sowie der unterschiedlich phosphorylierten Peptide (TY, pTY, TpY und pTpY) erfolgte in Anlehnung an zwei Literaturquellen^{10; 61}, die sich mit Myt1-Aktivitätsmessungen beschäftigten. Bei der CE Methode sollte eine kapillarelektrophoretische Auftrennung des Substrats und der im Zuge der Enzymreaktion gebildeten, phosphorylierten Peptide erfolgen. Die dafür notwendigen Parameter konnten bestimmt und in der CE Methode eingesetzt werden. Eine Trennung der Peptide, die sich nur durch ihren Phosphorylierungsstatus unterschieden, konnte in 2 M Essigsäure bei + 25 kV erzielt werden. Zur Detektion der kapillarelektrophoretisch getrennten Peptide wurden Leitfähigkeits-, UV-photometrische- und Fluoreszenzmessungen erwogen und getestet. Die Fluoreszenzdetektion erwies sich auf Grund ihrer Sensitivität als besonders geeignet. Zu diesem Zweck mussten die Peptide mit einem Fluoreszenzmarker versehen werden. Unter verschiedenen Markierungsreagenzien konnte das Benzofurazanderivat ABD-F als geeigneter Fluoreszenzmarker für die CE identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurden die günstigsten Bedingungen für die Markierung ermittelt und eine geeignete Reinigungsstrategie über HPLC etabliert. Durch Gefriertrocknung der aufgereinigten, markierten Peptide konnten diese über längere Zeit stabil gehalten werden und eine bedarfsgesteuerte Herstellung von Lösungen markierter Peptide wurde ermöglicht. Dass sich ABD-markierte Peptide als Sonde für FP Messungen nicht eignen, wurde mit einer ersten Assayvariante festgestellt und in dieser Arbeit gezeigt. Die Fluoreszenz ABD-markierter Peptide im nanomolaren Bereich war hierfür zu gering, weshalb mikromolare Mengen eingesetzt werden mussten. Diese hohen Sondenkonzentrationen hätten wiederum einen erheblichen Anteil AK erfordert, was nicht realisierbar war.

Fluoreszenzmarker mit sehr großer Fluoreszenzquantenausbeute stellen Fluoresceinderivate dar. Aus diesem Grund erfolgte für die FP Methode eine Markierung von pTpY mit Fluorescein-5-maleimid. Auch hier wurde eine anschließende Aufreinigung des Markierungsansatzes mittels HPLC erreicht. Alle Peptide, sowohl unmarkierte als auch markierte, wurden über massenspektrometrische Methoden charakterisiert und verifiziert.

Mit pTpY-F5M als Sonde und einem spezifischen Antikörper wurde sodann ein FP Assay entwickelt, der auf einem Kompartitionsprinzip zwischen markiertem pTpY-F5M und, infolge der Kinasereaktion gebildeten Tyrosin-phosphoylierten, unmarkierten Peptiden basiert. Bei dem verwendeten AK handelt es sich um einen spezifischen Phospho-CDC2 (Tyr¹⁵) AK. Seine Spezifität, ausschließlich gegenüber der Phospho-Tyrosin Peptide, wurde mit Hilfe eines ELISAs bewiesen. Der Antikörper bindet die Sonde pTpY-F5M und verursacht auf diese Weise gegenüber freiem pTpY-F5M einen Anstieg des Polarisationssignals. TpY und pTpY können wiederum die Sonde aus der Bindung zum AK verdrängen

und ein Absenken des FP Signals bewirken. Durch den Wechsel von Standard-96-Well-Platten auf beschichtete *half-area* 96-Well-Platten konnte gegenüber der Assayvariante 1 auf Rinder-serumalbumin im Puffer verzichtet und der Einsatz der Reagenzien nahezu halbiert werden. Durch die Oberflächenbehandlung der Platten wird ein Anhaften des Antikörpers an der Wandung nahezu ausgeschlossen. Ein weiterer Vorzug dieser Platten zeigt sich in der Gleichförmigkeit der Menisken, die für FP Messungen wichtig ist.

Auf diesen Grundlagen wurde ein FP Assay entwickelt, der gegenüber der CE Methode eine Empfindlichkeitssteigerung von beinahe drei Zehnerpotenzen erreicht. Die hohe Spezifität des Antikörpers, gepaart mit der großen Sensitivität der Fluorescein-markierten Sonde, ermöglichen selbst kleine Umsätze im nanomolaren Bereich sicher zu detektieren. Gegenüber der CE Methode und der Assayvariante 1 zeichnet sich dieser Assay durch einen sehr niedrigen Bedarf an markiertem Peptid aus. Während bei diesen beiden Systemen sowohl das Substrat als auch die phosphorylierten Peptide fluoreszenzmarkiert sein müssen und im mikromolaren Bereich eingesetzt werden, genügen beim endgültig etablierten FP Assay wenige Nanomolar der Sonde pTpY-F5M. Auch alle übrigen Peptide, die im FP Assay als Substrate bei der Kinasereaktion eingesetzt werden können, werden im Vergleich zur CE Methode im geringeren Maße verbraucht. Des Weiteren bietet die Durchführung im 96-Well-Plattenformat den Vorteil eines hohen Probendurchsatzes.

In Bezug auf Aktivitätsbestimmungen können beide Messsysteme ergänzend zueinander eingesetzt werden. Die CE Methode gestattet beispielsweise durch eine kontinuierliche Endpunktbestimmung die Verlaufsdarstellung der Enzymreaktion. Der Auf- und Abbau von Produkt und Substrat kann genau verfolgt und nachvollzogen werden und schließlich die Bestimmung kinetischer Parameter ermöglichen. Der FP Assay eignet sich dazu weniger, lässt aber die gleichzeitige Testung mehrerer Enzymchargen oder -präparationen zu. Für beide Methoden gilt, dass sie mindestens für zwei Kinasen, nämlich Myt1 und Wee1, einsetzbar sind. Bei der Änderung des Substratspektrums wäre sogar eine Ausweitung auf zusätzliche, den G2/M-Übergang beeinflussende Kinasen möglich. Im Zuge dieser Arbeit erfolgten Aktivitätsbestimmungen verschiedener Enzympräparationen größtenteils über die CE Methode. Insbesondere auf Grund der geringen Vorbereitungszeit zur Herstellung der Ansätze und der Einfachheit der Messungen ist diese für einen solchen Zweck gut geeignet. Allerdings müssen der CE Methode auch eine nicht unbedeutende Störanfälligkeit gegenüber unsauberen Enzympräparationen und eine verhältnismäßig niedrige Empfindlichkeit eingeräumt werden. Myt1-Präparationen aus *E. coli* zeigten beispielsweise nur geringe Umsätze, was eine Quantifizierung über CE mitunter erschwerte. Mit der derzeitigen Methode lässt sich Produkt erst bei einem Gehalt von wenigstens einem mikromolar sicher nachweisen, weshalb hoch aktives Enzym benötigt wird. Ob diese Empfindlichkeit tatsächlich ausreicht um Aktivitätsbestimmung humaner Zellzykluskinasen, wie Myt1 und Wee1, valide durchführen zu können, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Nichtsdestoweniger handelt es sich bei der CE Methode um eine kostengünstige Alternative zum FP Assay, welche ein wertvolles Werkzeug bildet, die Reaktionsmechanismen der Myt1 Kinase verstehen zu lernen. Der FP Assay ist in seiner optimierten Form ein leistungsfähiger Assay, der, abgesehen von den hohen Kosten, hervorragend für die Hochdurchsatztestung von Inhibitoren geeignet ist.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit lag im biotechnologischen und biochemischen Bereich, der sowohl *Upstream*- als auch *Downstream*-Prozesse einschließt. Für eine Expression der Myt1 Kinase in *E. coli* wurden verschiedene Expressionsstämme und Vektoren eingesetzt und miteinander verglichen. Ein Expressionssystem konnte bis zur Fermentation im 15 l Maßstab geführt werden, was die Ausbeute

synthetisierten Myt1 Enzyms gegenüber Expressionen im Schüttelkolben deutlich erhöhte. Mit Hilfe der aus der Fermentation gewonnenen Biomasse konnten wichtige Erkenntnisse zu Aufschluss und Reinigung der Myt1 gewonnen werden. Als problematisch erwies sich die Proteolyseempfindlichkeit des Zielproteins. Nach einer Optimierung der *Codon Usage* der Myt1 auf eine Expression in *E. coli* konnte die Expression im Schüttelkolben erheblich verbessert werden. Leider befand sich ein Großteil des gebildeten Myt1 Proteins in unlöslichen Komplexen. Die Variation der Expressionsbedingungen hinsichtlich Temperatur bei Expression sowie Induktion, Medienzusammensetzung und Induktorkonzentration führte zu keiner wesentlichen Verbesserung des Verhältnisses von unlöslichem zu löslichem Zielprotein. Ob, wie kürzlich in der AG Dr. Schmidt an Myt1 Präparationen aus HEK293-Zellen gezeigt, ein Aufschluss der Zellen in Gegenwart von Detergenzien auch bei bakteriellen Systemen Vorteile bietet und die Ausbeute löslichen Proteins erhöht werden kann, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Myt1 Präparationen, die im Anschluss der Fermentation gewonnen wurden, konnten für erste Hemmstoffuntersuchungen genutzt werden. Im Rahmen einer Diplomarbeit im Fachbereich Lebensmittelchemie konnten zehn Flavonoide, Resveratrol sowie die beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib und Sunitinib über die CE Methode auf ihre Wirkung an der Myt1 getestet werden. Die polyphenolischen Verbindungen zeigten bei 50 μM kaum eine Beeinflussung der Myt1. Für Imatinib und Sunitinib war jedoch eine deutliche Verringerung des Substratumsatzes bestimmbar.

Den Enzympräparationen aus bakteriellen Expressionen folgten Myt1- und Wee1-Präparationen aus Insektenzellen. Diese zeichneten sich in beiden Testsystemen durch sehr hohe Substratumsätze aus, die jedoch durch keinen Standardinhibitor hemmbar waren. Eine Tatsache, die Zweifel an den Präparationen aufkommen ließ und das Einstellen der Expression in Insektenzellen zur Folge hatte. Bei jener Testung zeigten sich beim FP Assay Probleme hinsichtlich der Hintergrundkorrektur, so dass bei der Inhibitorenuntersuchung darauf verzichtet werden musste. Durch die Einführung der Kalibrierung mit Fluorescein, anstatt mit der Sonde pTpY-F5M, konnte die Hintergrundkorrektur erheblich verbessert werden. Zukünftig sollte daher auch die Untersuchung fluoreszierender Verbindungen kein Problem darstellen.

Inzwischen werden mit Hilfe der hier entwickelten Methoden Enzympräparationen aus HEK293-Zellen auf ihre Myt1 Aktivität getestet. Die Untersuchungen erfolgen unter Einsatz verschiedener Substrate – neben dem CDC2-Peptidsubstrat werden die gesamte CDC2 und der Komplex aus CDC2 und Cyclin B eingesetzt. Diese Experimente belegen erneut die Eignung und die Vielseitigkeit der hier etablierten Methoden und tragen überdies dazu bei, die Myt1 Kinase in Bezug auf ihre Substratspezifität und andere Eigenschaften besser zu verstehen.

5.2 Ausblick

Die Arbeiten an den Testsystemen und den Wee Kinasen werden in der Arbeitsgruppe Dr. Schmidt fortgeführt, mit dem Ziel die entwickelten Methoden kontinuierlich zu verbessern und den jeweiligen Anforderungen in Bezug auf das Enzym- und Substratspektrum anzupassen. Mittelfristig bleibt das Ziel, die in der Arbeitsgruppe synthetisierten Glykoglycerolipide und andere potentielle Hemmstoffe bezüglich ihrer biologischen Aktivität untersuchen zu können. Mit Hilfe von Kompetitionsanalysen mit dem Cosubstrat ATP könnten anschließend Hemmstoffe hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens untersucht werden und beispielsweise Aufschluss darüber geben, ob die Glykoglycerolipide ihre

Wirkung über einen allosterischen Mechanismus erzielen. Diese Untersuchungen würden weiterhin dazu beitragen die molekularen Mechanismen der Myt1 Kinase zu verstehen und zusammen mit der Arbeitsgruppe für virtuelles Screening (Prof. Dr. W. Sippl, MLU Halle-Wittenberg) eine strukturbasierte Wirkstoffentwicklung voranzutreiben.

Mit Abschluss der Arbeit können noch keine gesicherten Aussagen über das Substratspektrum der Myt1 gemacht werden. Hierzu müssen weitere Experimente folgen, die Schritt für Schritt das gesamte Substratspektrum, vom CDC2-Peptid bis hin zu Komplexen aus CDC2 und verschiedener Cycline, untersuchen. Die Problematik der Substratspezifität spiegelt sich derzeit genauso in der zur Myt1 Kinase vorhandenen Literatur wider, was noch mehr beweist, dass Untersuchungen auf diesem Gebiet notwendig und lohnenswert sind.

Je nachdem, ob sich die Expression in humanen Zellen als günstig erweist, um ausreichende Mengen aktiver Kinase dauerhaft herzustellen, sollten Untersuchungen mit dem bakteriellen Expressionsmodell *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1 fortgesetzt werden. Hierbei handelt es sich um eine Codon-optimierte Myt1, die eine verbesserte Proteinbildung in *E. coli* zur Folge haben sollte. Die Expression mit diesem Modell schien zuletzt vielversprechend, obgleich große Anteile des Zielproteins Myt1-His₆ in unlöslicher Form anfielen und lösliche Anteile einer ausgeprägten Proteolyse unterlagen. Bezüglich der unlöslichen Myt1 könnten mehrere Strategien verfolgt werden. Zum einen sollte ein Aufschluss der *E. coli* Zellen in Gegenwart von Solubilisatoren getestet werden. In dieser Arbeit wurde der Aufschluss der Bakterienzellen in Abwesenheit von Tensiden durchgeführt. Kürzlich konnte jedoch in der AG Dr. Schmidt gezeigt werden, dass zur erfolgreichen Präparation der Myt1 aus humanen Zellen eine Solubilisierung unumgänglich ist. Möglicherweise kann hier eine Verbesserung des Aufschlusses erfolgen.

Zum anderen könnte man den unlöslichen, in Form von *Inclusion Bodies* akkumulierten Teil der Myt1 Kinase aufreinigen, lösen und einen Versuch der Rückfaltung unternehmen. Ein Prozess der eine Reaktivierung der Proteine ermöglicht, jedoch unter Umständen schwierig und zeitaufwendig ist. Was die Proteolyseempfindlichkeit des löslichen Teils des Zielproteins aus *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1 betrifft, könnte diese durch den Austausch des Expressionsstammes BL21 gegen HM130 positiv beeinflusst werden. Dieser für einige *E. coli* Proteasen defiziente Stamm hat sich als günstig im hier verwendeten Expressionsmodell III (*E. coli* HM130 pGEX6P1-hMyt1-His₄) erwiesen und sollte sich auch für die Expression der Codon-optimierten Myt1 eignen.

6 Literaturverzeichnis

1. Sicherstellung einer effizienten Arzneimittelversorgung in der Onkologie. Gutachten im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit, <http://www.bundesgesundheitsministerium.de>. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
2. vfa. Die forschenden Pharma-Unternehmen. Arzneimittelentwicklung - So wirken die Krebsmedikamente der Zukunft. 29.03.2011, <http://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/so-wirken-die-krebsmedikamente-der-zukunft.html>. Zuletzt geprüft am 29.05.2011.
3. Sven Siebenand. Die neue deutsche Welle, *Pharmazeutische Zeitung* 156, 35, (10.02.2011).
4. Stathis, A. & Oza, A. Targeting Wee1-like protein kinase to treat cancer, *Drug News Perspect.* 23, 425–429, (2010).
5. Wang, Y. *et al.* Radiosensitization of p53 mutant cells by PD0166285, a novel G2 checkpoint abrogator, *Cancer Research* 61, 8211–8217, (2001).
6. Wang, Y., Decker, S. J. & Sebolt-Leopold, J. Knockdown of Chk1, Wee1 and Myt1 by RNA interference abrogates G2 checkpoint and induces apoptosis, *Cancer Biol. Ther.* 3, 305–313, (2004).
7. Hirai, H. *et al.* Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents, *Mol. Cancer Ther.* 8, 2992–3000, (2009).
8. A dose escalation study of MK1775 in combination with either Gemcitabine, Cisplatin, or Carboplatin in adults with advanced solid tumors, <http://clinicaltrialsfeeds.org> Identifier: NCT00648648. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
9. A dose escalation study of MK1775 in combination with 5-FU or 5-FU/CDDP in patients with advanced solid tumor, <http://clinicaltrials.gov> Identifier: NCT01047007. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
10. Zhou, B.-N. *et al.* New glycolipid inhibitors of Myt1 kinase, *Tetrahedron* 61, 883–887, (2005).
11. Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. & Piwnica-Worms, H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex., *Mol Cell Biol* 17, 571–583, (1997).
12. Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C. E. & Piwnica-Worms, H. Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes., *Mol Cell Biol* 19, 5113–5123, (1999).
13. Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. & Nishida, E. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate., *J Biol Chem* 278, 25277–25280, (2003).
14. Nakajima, H. *et al.* Myt1 protein kinase is essential for Golgi and ER assembly during mitotic exit, *J. Cell Biol.* 181, 89–103, (2008).
15. Price, D. M., Jin, Z., Rabinovitch, S. & Campbell, S. D. Ectopic expression of the Drosophila Cdk1 inhibitory kinases, Wee1 and Myt1, interferes with the second mitotic wave and disrupts pattern formation during eye development, *Genetics* 161, 721–731, (2002).
16. Choi, H. S., Bode, A. M., Shim, J.-H., Lee, S.-Y. & Dong, Z. c-Jun N-terminal kinase 1 phosphorylates Myt1 to prevent UVA-induced skin cancer, *Mol. Cell. Biol.* 29, 2168–2180, (2009).

17. Tan, X. *et al.* Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma, *Int J Cancer*, 1080–1088, (2008).
18. Bryan, B. A., Dyson, O. F. & Akula, S. M. Identifying cellular genes crucial for the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency, *J Gen Virol*, 519–529, (2006).
19. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W. & Greenberg, A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis, *Science* 263, 1143–1145, (1994).
20. Reactome Datenbank. Cell cycle checkpoints, <http://www.genomeknowledge.org>. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
21. Leijen, S., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. Abrogation of the G2 checkpoint by inhibition of Wee-1 kinase results in sensitization of p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents, *Current Clinical Pharmacology* 5, 186–191, (2010).
22. Winckler, T., Zündorf, I. & Dingermann, T. Protein-Tyrosinkinase als Wirkstoff-Targets. Eine wichtige Gruppe intrazellulärer Regulatoren, *Pharmazie in unserer Zeit* 37, 370–380, (2008).
23. Venter, J. C., Adams, D. & Myers, E. W. e. a. The sequence of the human genome, *Science*, 1304–1351, (2001).
24. Manning, C., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome, *Science*, 1912.1934, (2002).
25. Nurse, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase, *Nature* 344, 503–508, (1990).
26. Nigg, E. A., Krek, W. & Peter, M. Vertebrate cdc2 kinase: its regulation by phosphorylation and its mitotic targets, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56, 539–547, (1991).
27. Mueller, P. R. & Leise, W. F. *Measurement of Wee kinase activity. in Methods in molecular biology - Cell cycle control*, edited by T. Humphrey & G. Brooks (Humana Press, Totowa, NJ, 2005).
28. El Touny, L. H. & Banerjee, P. P. Identification of Both Myt-1 and Wee-1 as Necessary Mediators of the p21-Independent Inactivation of the cdc-2/Cyclin B1 Complex and Growth Inhibition of TRAMP Cancer Cells by Genistein, *The Prostate* 66, 1542–1555, (2006).
29. Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15., *Science* 270, 86–90, (1995).
30. Yang, J. *et al.* Control of Cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1, *Genes & Development*, 2131–2143, (1998).
31. T. Humphrey & G. Brooks eds. *Methods in molecular biology - Cell cycle control. Mechanisms and protocols* (Humana Press, Totowa, NJ, 2005).
32. Lindqvist, A., Källström, H. & Karlsson Rosenthal, C. Characterisation of Cdc25B localisation and nuclear export during the cell cycle and in response to stress., *J Cell Sci* 117, 4979–4990, (2004).
33. Reactome Datenbank. Wee1-mediated phosphorylation of Cyclin B1:phospho-Cdc2 complexes, <http://www.genomeknowledge.org>. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
34. Reactome Datenbank. Polo-like kinase mediated events, <http://www.genomeknowledge.org>. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
35. Squire, C. J., Dickson, J. M., Ivanovic, I. & Baker, E. N. Structure and inhibition of the human cell cycle checkpoint kinase, Wee1A kinase: an atypical tyrosine kinase with a key role in CDK1 regulation., *Structure* 13, 541–550, (2005).

36. Protein Knowledgebase (UniProtKB). Wee1-like protein kinase, <http://www.uniprot.org/uniprot/P30291>. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
37. Parker, L. L. & Piwnica-Worms, H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase, *Science* 257, 1955–1957, (1992).
38. Mueller, P. R., Coleman, T. R. & Dunphy, W. G. Cell cycle regulation of a Xenopus Wee1-like kinase, *Molecular and Cellular Biology*, 119–134, (1995).
39. Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T. & Newport, J. Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14, *Mol. Biol. Cell* 5, 273–282, (1994).
40. Booher, R. N., Holman, P. S. & Fattaey, A. Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity., *J Biol Chem* 272, 22300–22306, (1997).
41. Protein Knowledgebase (UniProtKB). Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase, <http://www.uniprot.org/uniprot/Q99640>. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
42. Lindner, M. *In silico Untersuchungen von Polyphenolen an Kinasen mit Beteiligung am G2/M-Übergang im Zellzyklus*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 08.04.2008.
43. Chaikuad, A. & et al. Human protein kinase Myt1. 2010, http://www.thesgc.org/structures/structure_description/3P1A/. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
44. Deutsche Krebsgesellschaft (DKG). Krebshäufigkeit - Schätzung 2002, <http://www.krebsgesellschaft.de>. Zuletzt geprüft am 28.04.2011.
45. Siebenand, S. & Wolf, E. Kampf gegen Windmühlen. Fortbildung Krebstherapie, *Pharmazeutische Zeitung* 156, 70–74, (2011).
46. Müller-Tidow, C., Krug, U., Brunberg, U., Berdel, W. E. & Serve, H. Tyrosinkinase als Ziele neuer onkologischer Therapien. Aussichten und Probleme, *Deutsches Ärzteblatt* 104, 1312–1319, (2007).
47. European Medicines Agency. Glivec - Authorisation details, <http://www.ema.europa.eu>. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
48. Morphy, R. Selectively Nonselective Kinase Inhibition: Striking the Right Balance, *Journal of Medicinal Chemistry Perspective*, 1413–1437, (2010).
49. Göllner, C., Philipp, C., Dobner, B., Sippl, W. & Schmidt, M. First total synthesis of 1,2-dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6-deoxy-6-amino- α -D-glucosyl)-glycerol - a glycolipid of a marine alga with a high inhibitor activity against human Myt1-kinase. *Carbohydrate Research* 344, 1628–1631, (2009).
50. Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P. & Gerwick, W. H. Marine natural products as anticancer drugs, *Mol. Cancer Ther.* 4, 333–342, (2005).
51. Diskin, R., Engelberg, D. & Livnah, O. A novel lipid binding site formed by the MAP kinase insert in p38 α , *J. Mol. Biol.* 375, 70–79, (2008).
52. Perrin, F. Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité, *Journal de Physique et le Radium* 7, 390–401, (1926).
53. Fluorescence polarization. Technical Resource guide. Invitrogen ed., 2006.
54. Galla, H.-J. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. 1st ed. (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1988).
55. Jameson, D. M. & Croney, J. C. Fluorescence polarization: past, present and future, 167–173, (2003).

56. Dédier, S., Reinelt, S., Rion, S., Folkers, G. & Rognan, D. Use of Fluorescence Polarization to monitor MHC-peptide interactions in solution, *Journal of Immunological Methods*, 57–66, (2001).
57. Parker, G. J., Law, T. L., Lench, F. J. & Bolger, R. E. Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase / phosphatase assays, *Journal of Biomolecular Screening* 5, 77–87, (2000).
58. Owicki, J. C. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer, *Journal of Biomolecular Screening* 5, 297–305, (2000).
59. Seethala, R. & Menzel, R. A Fluorescence Polarization competition immunoassay for tyrosine kinases, *Analytical Biochemistry*, 257–262, (1998).
60. Turek, T. C., Small, E. C., Bryant, R. W. & Hill, W. A. G. Development and validation of a competitive AKT serine / threonine kinase fluorescence polarization assay using a product-specific anti-phospho-serine antibody, *Anal Biochem*, 45–53, (2001).
61. Kristjánssdóttir, K. & Rudolph, J. A fluorescence polarization assay for native protein substrates of kinases., *Anal Biochem* 316, 41–49, (2003).
62. Singh, P., Lillywhite, B., Bannaghan, C. & Broad, P. Using IMAP technology to identify kinase inhibitors: comparison with a substrate depletion approach and analysis of the nature of false positives., *Comb Chem High Throughput Screen* 8, 319–325, (2005).
63. Schmidt, W. *Optische Spektroskopie. Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker* (VCH, Weinheim, 1994).
64. K. D. Altria ed. *Methods in Molecular Biology. Capillary Electrophoresis Guidebook*. Principles, Operation, and Applications (Humana Press, Totowa, NJ).
65. Baker, T. A., Grossman, A. D. & Gross, C. A. A gene regulating the heat shock response in *Escherichia coli* also affects proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6779–6783, (1984).
66. Protein Knowledgebase (UniProtKB). Cyclin-dependent kinase 1, <http://www.uniprot.org/uniprot/P06493>. Zuletzt geprüft am 25.07.2011.
67. Kuipers, B. J. H. & Gruppen, H. Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5445–5451, (2007).
68. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Science*, 2411–2423, (1995).
69. Pierce. Tech Tip 6 - Extinction Coefficients, www.piercenet.com.
70. Weiss, M., Manneberg, M., Juranville, J.-F., Lahm, H.-W. & Fountoulakis, M. Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins, *Journal of Chromatography A*, 263–275, (1998).
71. Treuheit, M. J. & Kirley, T. L. Reversibility of Cysteine Labeling by 4-(Aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole, *Anal Biochem*, 138–142, (1993).
72. Toyo'oka, T. & Imai, K. New Fluorogenic Reagent Having Halogenbenzofurazan Structure for Thiols: 4-(Aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole, *Analytical Chemistry* 56, 2461–2464, (1984).
73. Hansen, S. K. *et al.* Allosteric Inhibition of PTP1B Activity by Selective Modification of a Non-Active Site Cysteine Residue, *Biochemistry*, 7704–7712, (2005).

74. Chin, C. C. Q. & Wold, F. The use of Tributylphosphine and 4-(Aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole in the study of protein sulfhydryls and disulfides, *Analytical Biochemistry*, 128–134, (1993).
75. Whittle, M. C., Stobaugh, J. F. & Wong, O. S. High performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine in human plasma using a water-soluble phosphine reducing agent and fluorogenic derivatization, *Chromatographia Supplement* 52, 78–82, (2000).
76. Molecular Probes: The Handbook. Thiol-Reactive Probes. Invitrogen ed., April 2006.
77. Produktinformation: Fluorescein-5-maleimid. Thermo Scientific ed., www.piercenet.com.
78. Bigelow, D. J. & Inesi, G. Frequency-Domain Fluorescence Spectroscopy resolves the location of Maleimide-directed spectroscopic probes within the tertiary structure of the Ca- ATPase of Sarcoplasmic Reticulum, *Biochemistry* 30, 2113–2125, (1991).
79. Hjertén, S. High-performance electrophoresis - Elimination of electroendosmosis and solute adsorption, *Journal of Chromatography*, 191–198, (1985).
80. Bench Guide. Competent Cells and Transformation. Quiagen, 2001, www.quiagen.com.
81. Park, S. J., Georgiou, G. & Lee, S. Y. Secretory Production of Recombinant Protein by a High Cell Density Culture of a Protease Negative Mutant Escherichia coli Strain, *Biotechnology Progress* 15, 164–167, (1999).
82. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685, (1970).
83. Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* 8, 93–99, (1987).
84. H. Rehm & T. Letzel eds. *Der Experimentator. Proteinbiochemie / Proteomics* (Spektrum Akademischer Verlag, 2010).
85. Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syltatk, C., Mattes, R., Siemann, M. & Altenbuchner, J. High-Cell-Density Fermentation for Production of L-N-Carbamoylase Using an Expression System Based on the Escherichia coli rhaBAD Promoter, *Biotechnology and Bioengineering* 73, 95–103, (2001).
86. GE Healthcare Bio-Sciences ed. *Gel filtration. Principles and Methods*. 18-1022-18 (2010).
87. Rohe, A. *Untersuchungen zur humanen Myt1-Kinase*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2011.
88. Philipp, C. *In vitro Studien zur Wirkung von Bioflavonoiden an der Myt1 Kinase*. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2009.
89. Kunick, C. & Egert-Schmidt, A.-M. Die kurze Geschichte der Proteinkinase-Inhibitoren, *Pharmazie in unserer Zeit* 37, 360–368, (2008).
90. H. Hahn, S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz & S. Suerbaum eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (Springer, 2009).
91. Handbuch NOVOstar. Gain Adjustment Fluorescence Polarization Mode / Target mP. BMG Labtech ed.
92. Zhang, Chung & Oldenburg. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays, *J Biomol Screen* 4, 67–73, (1999).
93. Iversen, P. W., Eastwood, B. J., Sittampalam, G. S. & Cox, K. L. A Comparison of Assay Performance Measures in Screening Assays: SignalWindow, Z' Factor, and Assay Variability Ratio, *Journal of Biomolecular Screening*, 247–252, (2006).

94. Cahours, X., Viron, C., Morin, Ph., Renimel, I., André, P. & Lafosse, M. Short-end injection procedure in capillary electrophoresis for determination of enzymatic reaction kinetics, *Analytica Chimica Acta* 441, 15–21, (2001).
95. He, Y. & Yeung, E. S. High-throughput screening of kinase inhibitors by multiplex capillary electrophoresis with UV absorption detection, *Electrophoresis* 24, 101–108, (2003).
96. Hinneburg, I., Kempe, S., Rüttinger, H. H. & Neubert, R. H. H. A CE method for measuring phototoxicity in vitro, *Chromatographia* 62, 325–329, (2005).
97. Fan, Y., Ludewig, R., Imhof, D. & Scriba, G. K. E. Development of a capillary electrophoresis-based assay of sirtuin enzymes, *Electrophoresis* 29, 3717–3723, (2008).
98. Gamble, T. N., Ramachandran, C. & Bateman, K. P. Phosphopeptide isomer separation using capillary zone electrophoresis for the study of protein kinases and phosphatases., *Anal Chem* 71, 3469–3476, (1999).
99. Belitz, Grosch & Schieberle. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 5th ed. (Springer, 2001).
100. Küster & Thiel. *Rechentafeln für die Chemische Analytik*. 104th ed. (Walter de Gruyter, 1993).
101. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* 258, 598–599, (1975).
102. Jana, S. & Deb, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 289–298, (2005).
103. Schein, C. H. & Noteborn, M. H. M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature, *nature biotechnology* 6, 291–294, (1988).
104. Kataeva, I. *et al.* Improving solubility of *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Clostridium thermocellum* JW-20 proteins expressed into *Escherichia coli*, *J. Proteome Res.* 4, 1942–1951.
105. Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures, *Protein Expression and Purification*, 207–234, (2005).
106. Baneyx, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Current Opinion in Biotechnology*, 411–421, (1999).
107. pET System Manual. 11th Edition. Novagen ed.

Anhang

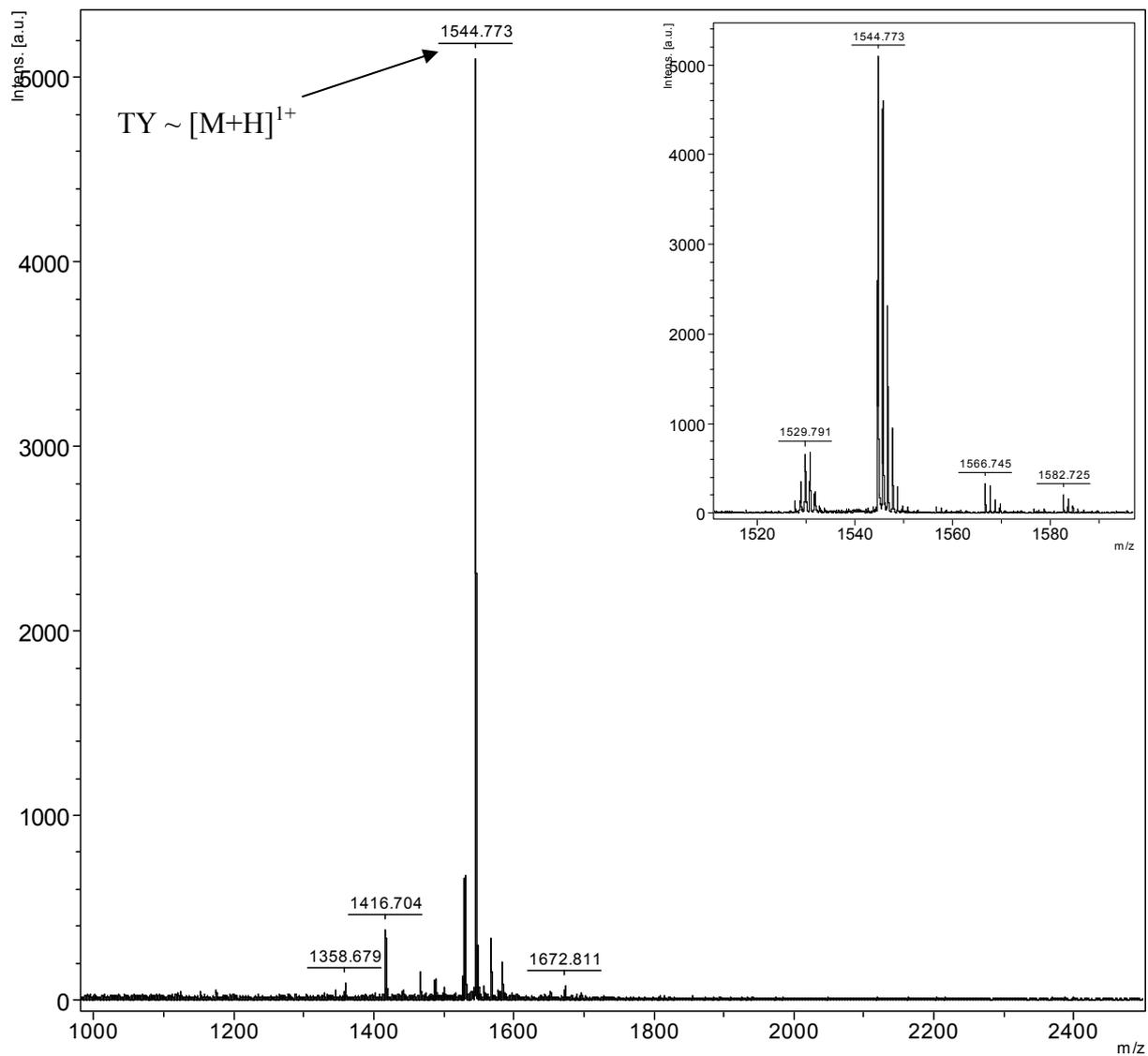


Abb. 4.44 Massenbestimmung von TY mittels MALDI-TOF/TOF: Der Ausschnitt zeigt den TY betreffenden Massenausschnitt im Detail. Angabe der m/z Werte der monoisotopischen Massen.

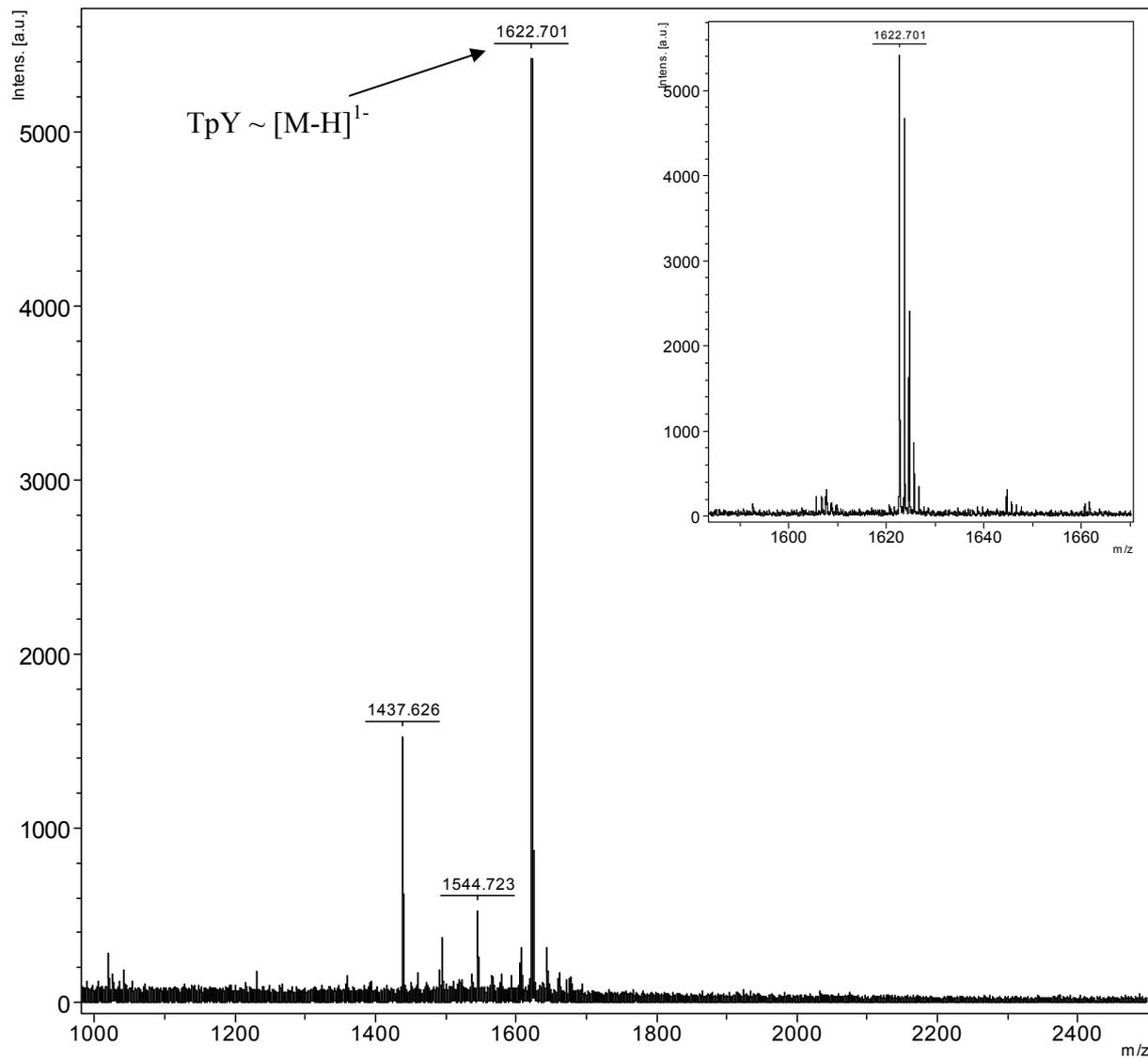


Abb. 4.45 Massenbestimmung von TpY mittels MALDI-TOF/TOF: Der Ausschnitt zeigt den TpY betreffenden Massenausschnitt im Detail. Angabe der m/z Werte der monoisotopischen Massen.

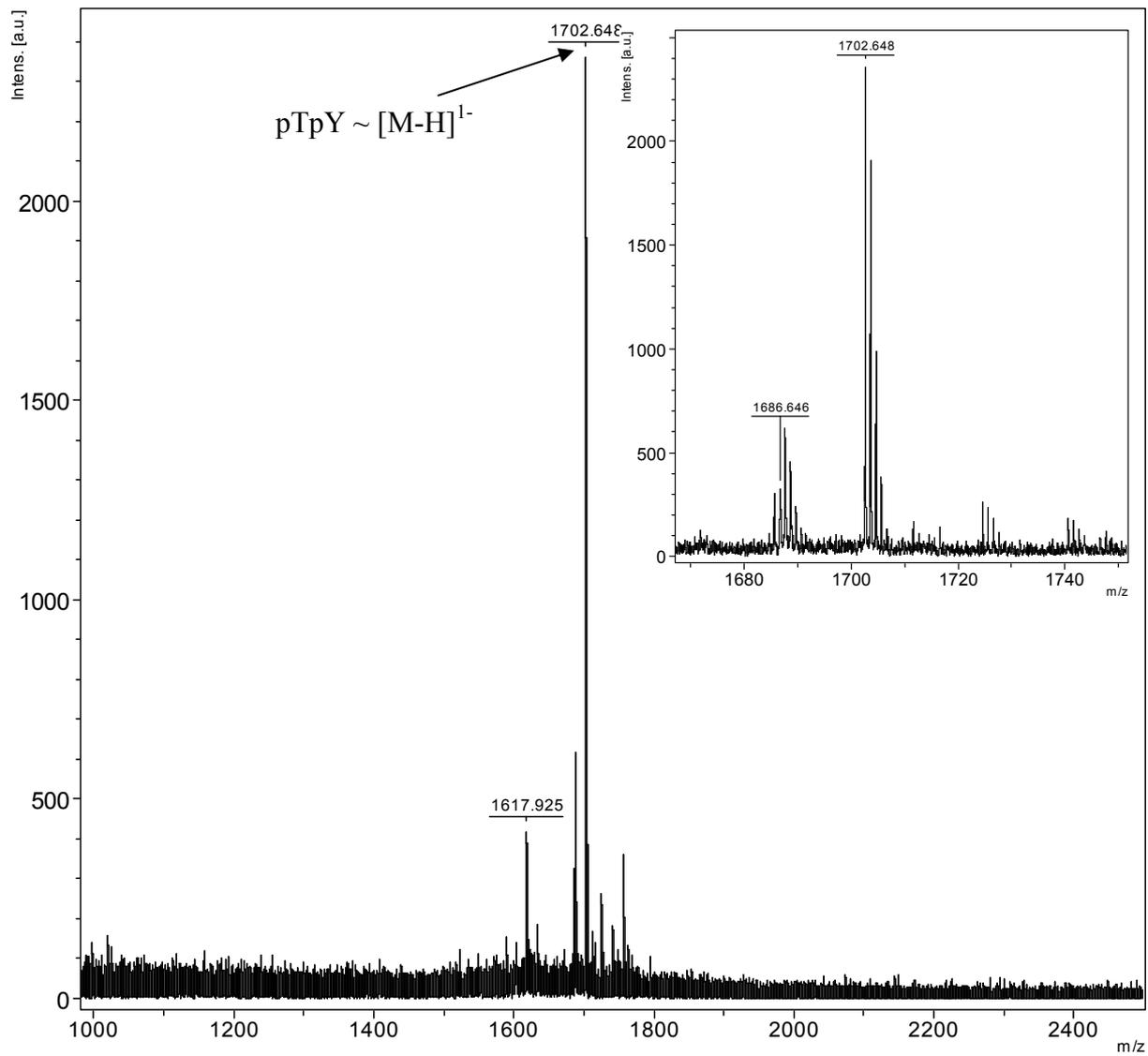


Abb. 4.46 Massenbestimmung von pTpY mittels MALDI-TOF/TOF: Der Ausschnitt zeigt den pTpY betreffenden Massenausschnitt im Detail. Angabe der m/z Werte der monoisotopischen Massen.

\\D5qpmf1\data\orbitrap\...PTY-03

3/24/2009 1:43:07 PM

PTY

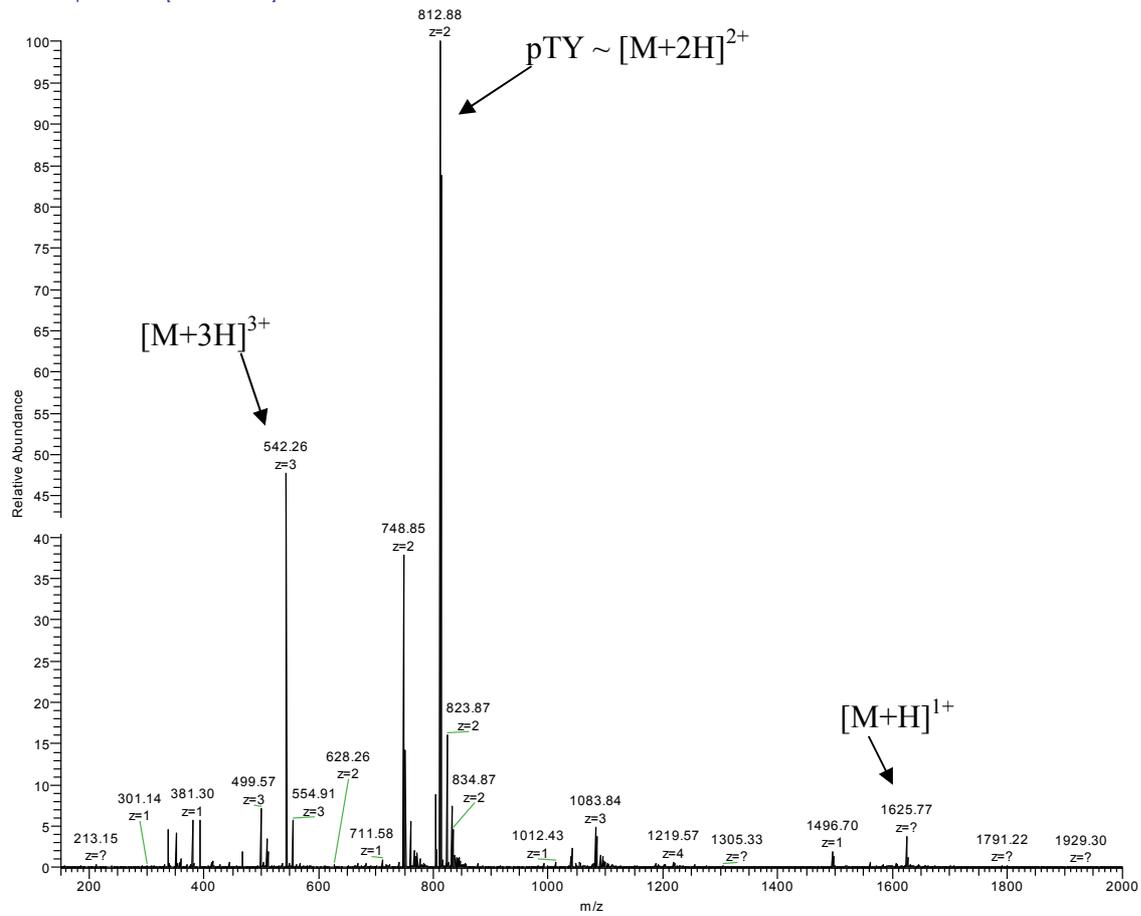
PTY-03 #72 RT: 2.02 AV: 1 NL: 1.82E8
T: FTMS + p NSI Full ms [150.00-2000.00]

Abb. 4.47 Massenbestimmung von pTY mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS: Angabe der m/z Werte der monoisotopischen Massen.

\D5qpmbf1\Data Orbitrap\...TY_ABD

3/18/2009 1:03:15 PM

TY_ABD

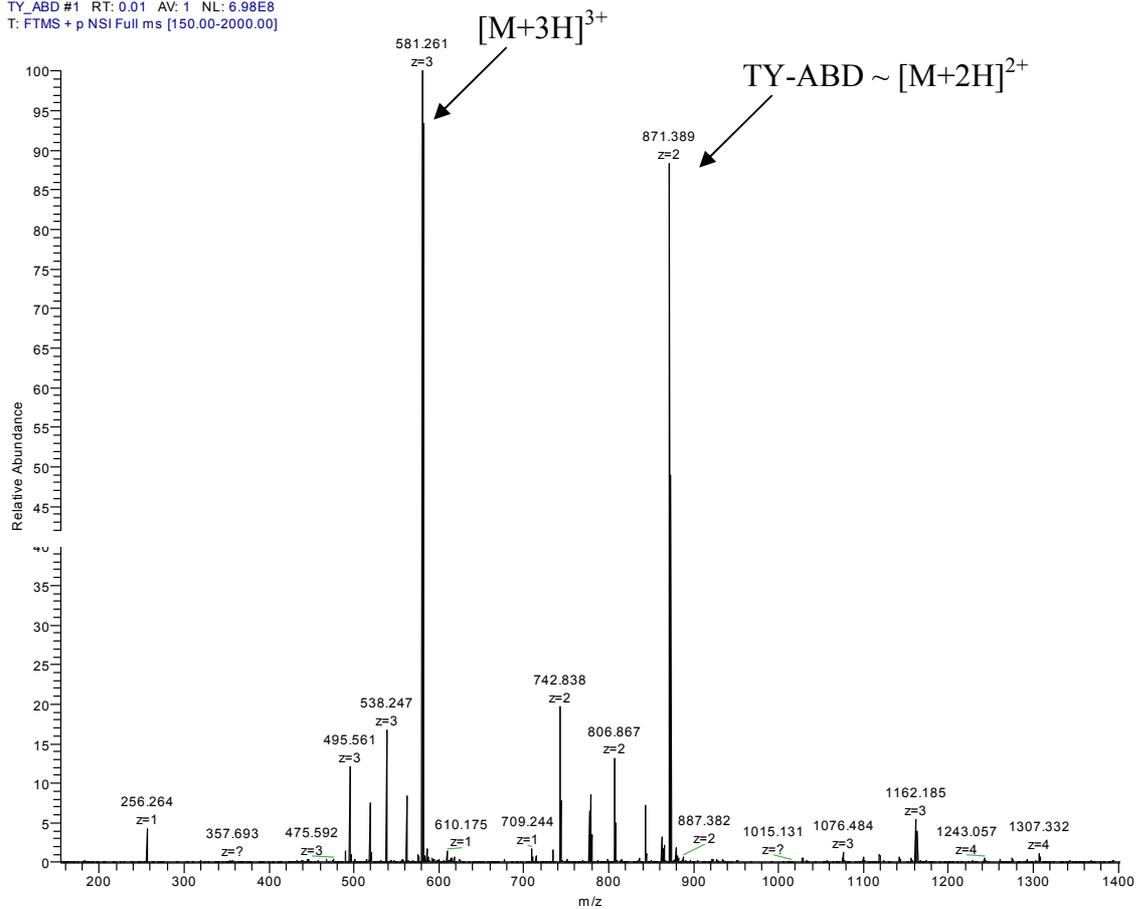
TY_ABD #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 6.98E8
T: FTMS + p NSI Full ms [150.00-2000.00]

Abb. 4.48 Massenbestimmung von TY-ABD mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS: Angabe der m/z Werte der monoisotopischen Massen.

\D5qpmf1\Data Orbitrap\...Claudia\Chr

11/21/2008 9:17:37 AM

TpY-ABD

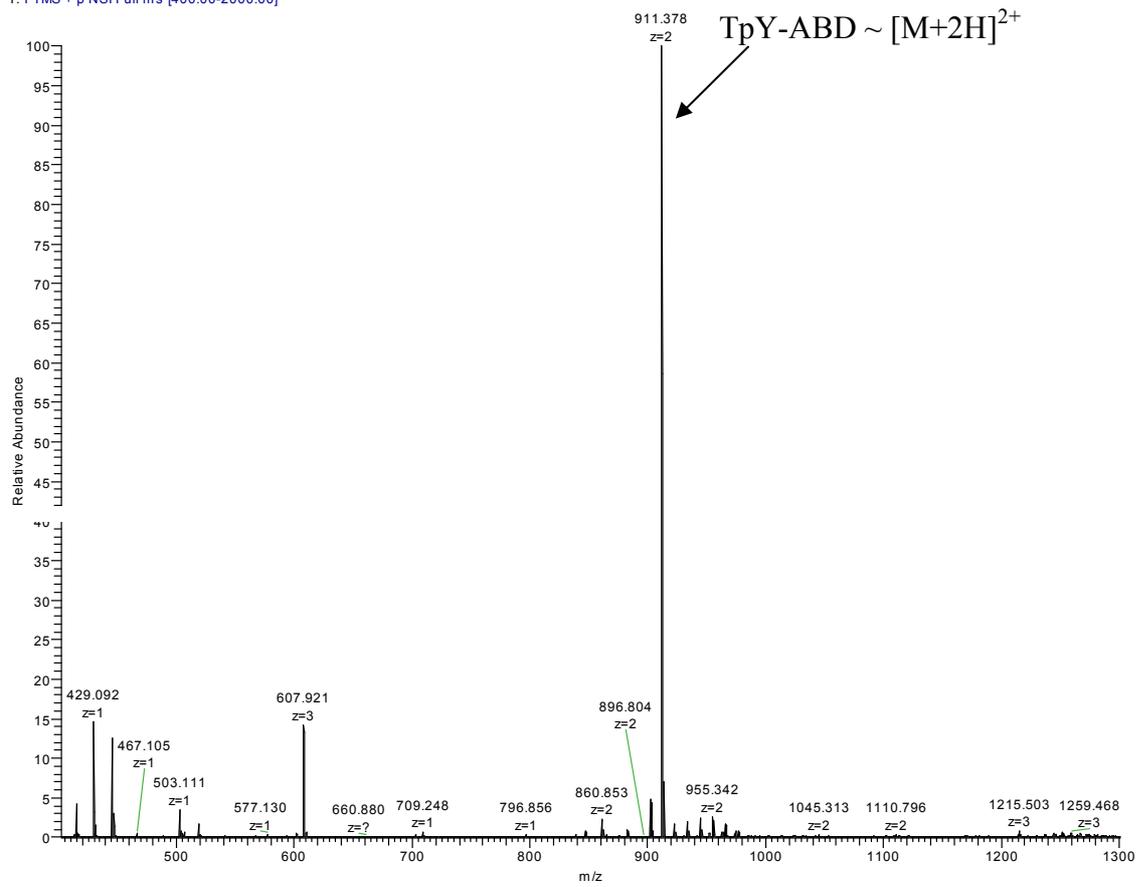
Chr #4-103 RT: 0.06-1.54 AV: 100 NL: 1.04E7
T: FTMS + p NSI Full ms [400.00-2000.00]

Abb. 4.49 Massenbestimmung von TpY-ABD mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS: Angabe der m/z Werte der monoisotopischen Massen.

PTY-ABD-01 #18 RT: 0.62 AV: 1 NL: 5.37E6
T: FTMS + p NSI Full ms [150.00-2000.00]

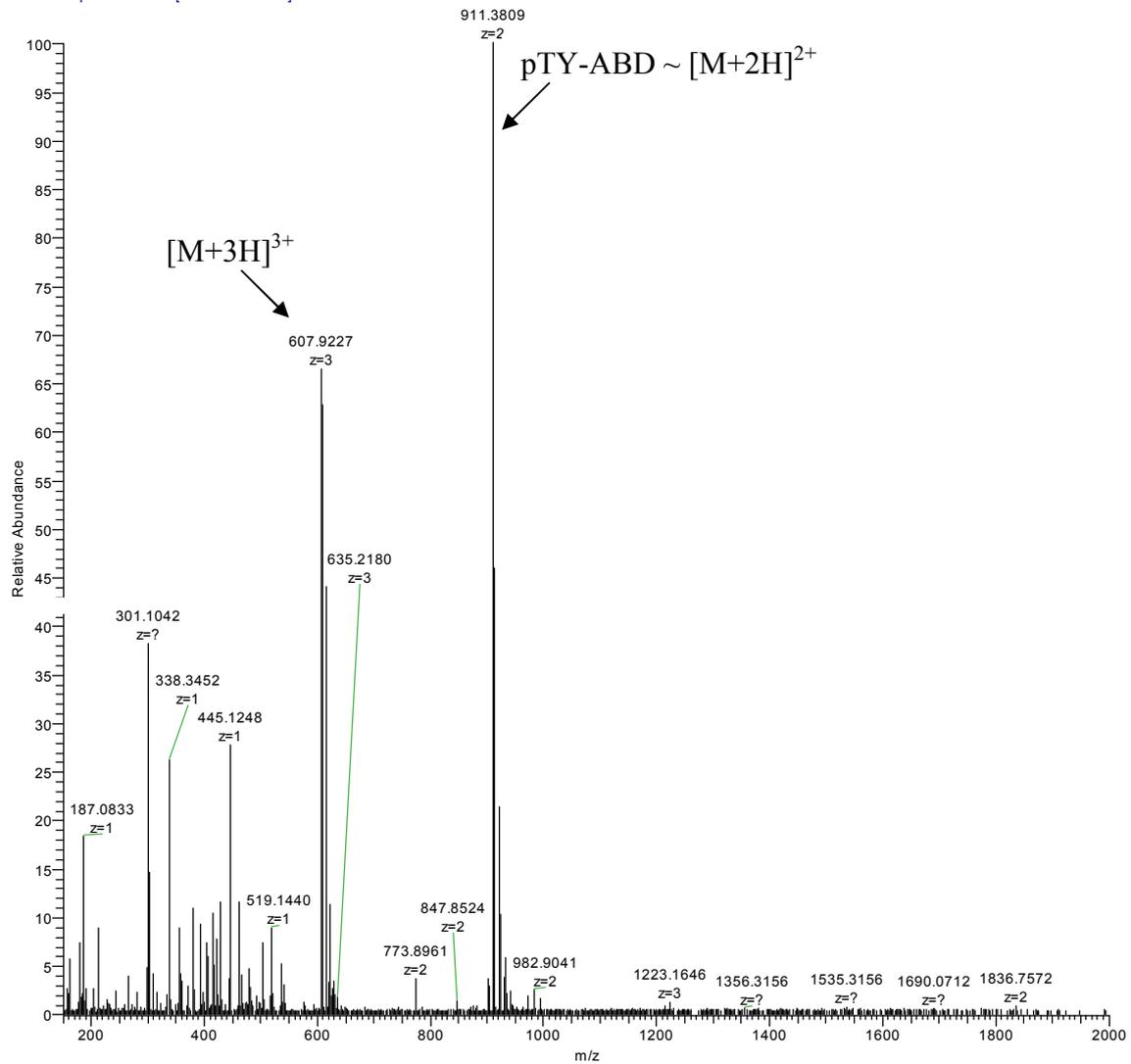


Abb. 4.50 Massenbestimmung von pTY-ABD mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS: Angabe der m/z Werte der mono-isotopischen Massen.

\D5qpmf1\Data Orbitrap\...090123\Chr

1/23/2009 11:15:04 AM

Chr.694Peak1

Chr #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.66E7
 T: FTMS + p NSI Full ms [150.00-2000.00]

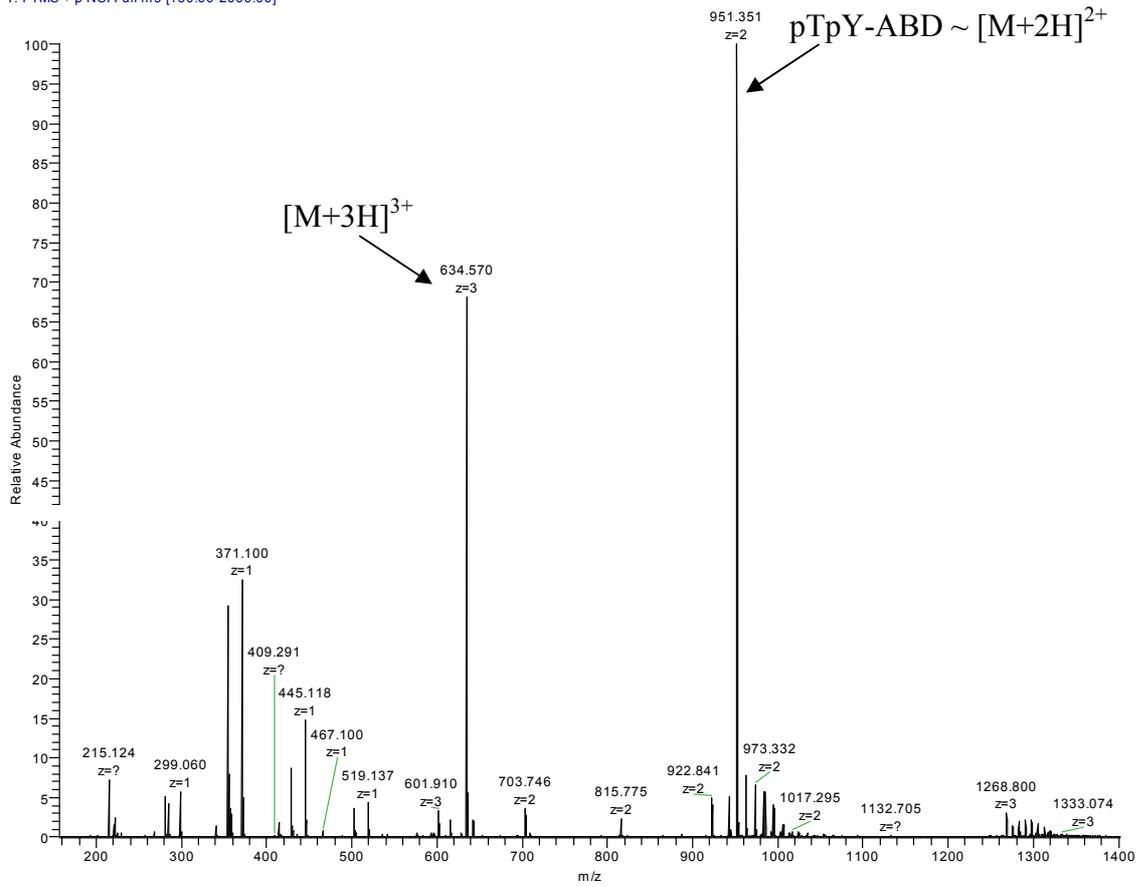


Abb. 4.51 Massenbestimmung von pTpY-ABD mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS: Angabe der m/z Werte der monoisotopischen Massen.

E:\Data\...pTpY+F5m_090430102012

4/30/2009 10:20:13 AM

pTpY+F5m

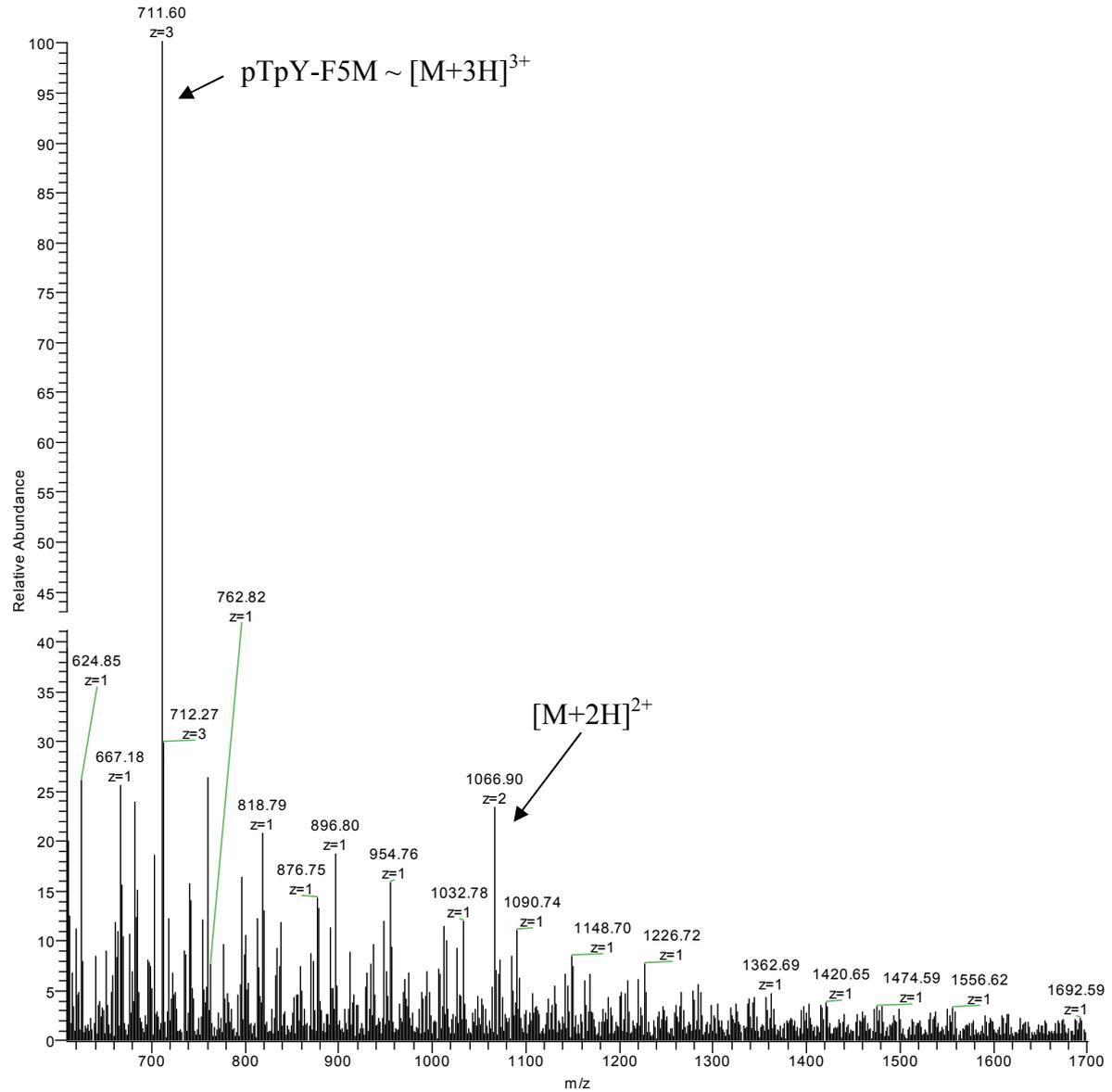
pTpY+F5m_090430102012 #1-100 RT: 0.00-0.85 AV: 100 NL: 2.57E5
T: FTMS + p NSI Full ms [600.00-2000.00]

Abb. 4.52 Massenbestimmung von pTpY-F5M mittels LTQ-Orbitrap-XL-MS: Angabe der m/z Werte der mono-isotopischen Massen.

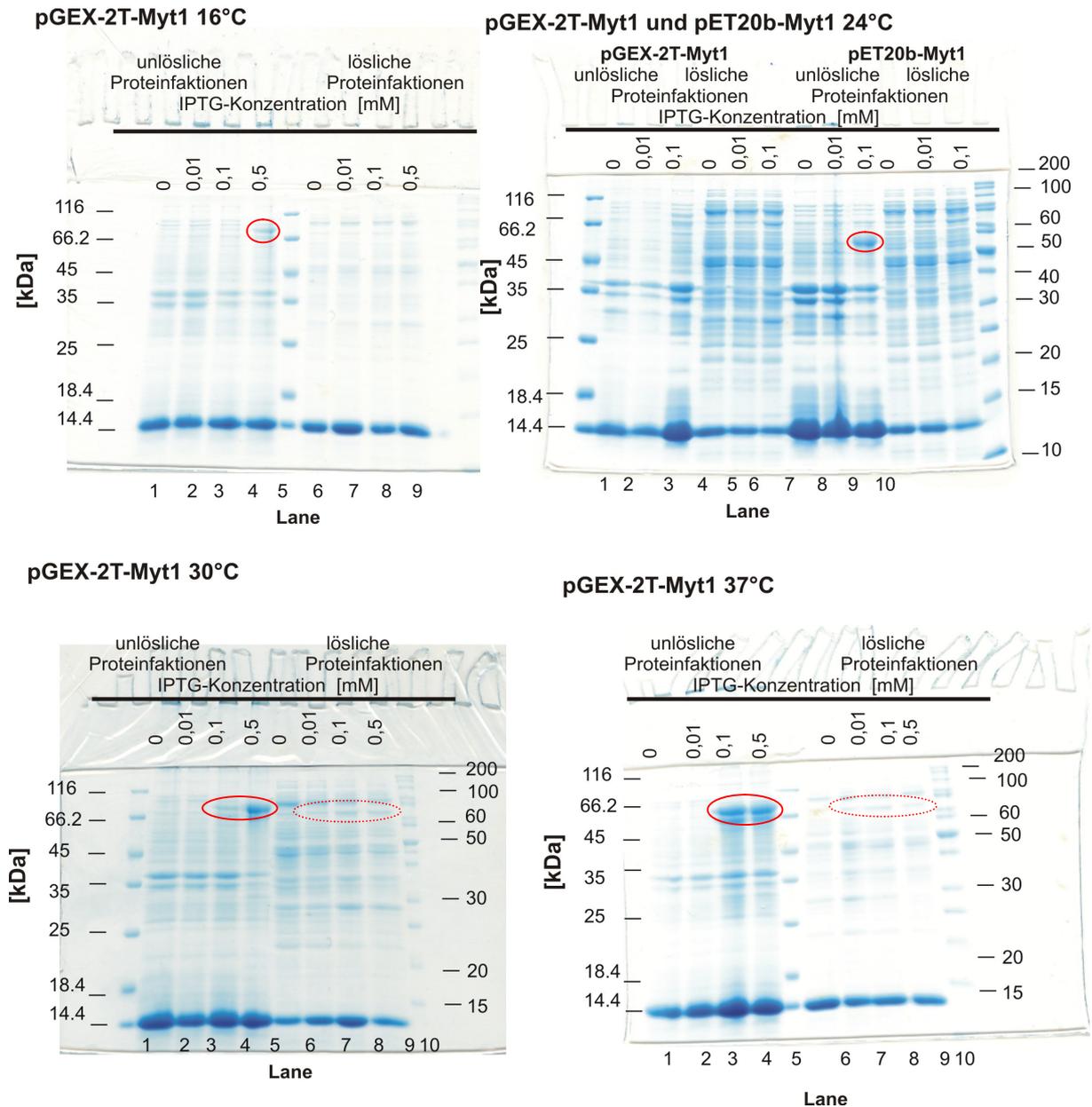
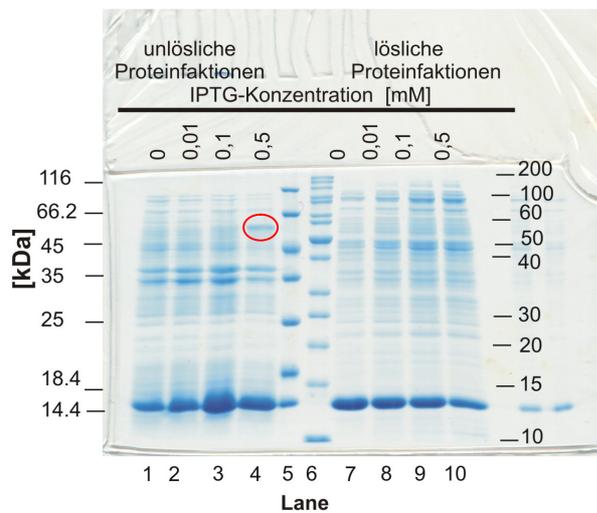
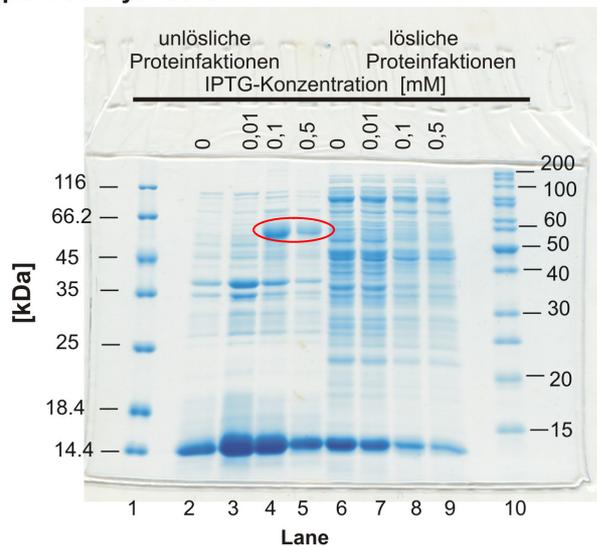


Abb. 4.53 Analyse der 1/OD-Proben von *E. coli* BL21 pGEX-2T-Myt1 (Modell IV) aus dem Optimierungsversuch zur Expression von GST-hMyt1-His₆: Die Kultivierung erfolgte zunächst in 2 l SK bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 und die Expression anschließend in 300 ml SK mit je 50 ml MM bei einer Expressionstemperatur von 37, 30, 24 (gemeinsames Gel mit Modell V) oder 16 °C und einer IPTG-Konzentration von 10, 100 oder 500 µM. Gezeigt werden Coomassie-gefärbte 12,5 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele von 4 h nach Induktion entnommenen 1/OD-Proben, die zu einer löslichen und unlöslichen Proteinfraktion aufgearbeitet wurden. Die jeweils eingesetzten Expressionsbedingungen und IPTG-Konzentrationen sind direkt den Abbildungen zu entnehmen. Erfolgte der Nachweis der Zielproteine GST-hMyt1-His₆ und hMyt1-His₆ durch eine Bande bei ca. 83 kDa bzw. 55,5 kDa, sind die betreffenden Banden durch eine rote Umrandung gekennzeichnet. Gestrichelte Linien zeigen das mögliche Vorliegen des Zielproteins an.

pET20b-Myt1 16°C



pET20b-Myt1 30°C



pET20b-Myt1 37°C

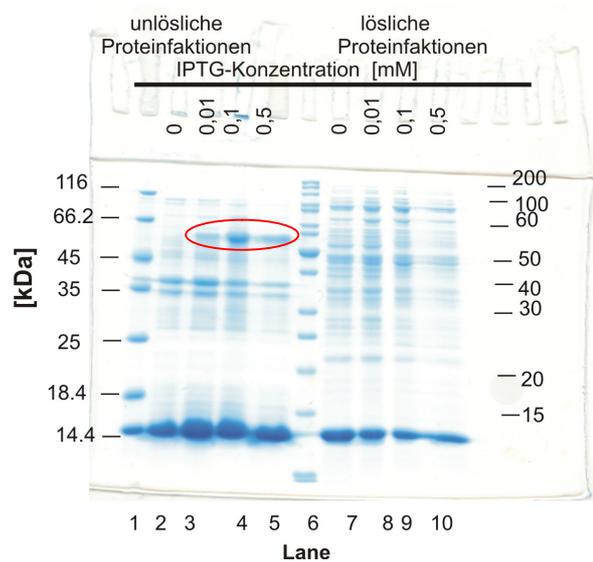


Abb. 4.54 Analyse der 1/OD-Proben von *E. coli* BL21 pET-20b-Myt1 (Modell V) aus dem Optimierungsversuch zur Expression von hMyt1-His₆: Die Kultivierung erfolgte zunächst in 2 l SK bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ und die Expression anschließend in 300 ml SK mit je 50 ml MM bei einer Expressionstemperatur von 37, 30, 24 (siehe Abb. 4.53) oder 16 °C und einer IPTG-Konzentration von 10, 100 oder 500 μ M. Gezeigt werden Coomassie-gefärbte 12,5 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele von 4 h nach Induktion entnommenen 1/OD-Proben, die in eine lösliche und unlösliche Proteinfraktion aufgearbeitet wurden. Die jeweils eingesetzten Expressionsbedingungen und IPTG-Konzentrationen sind direkt den Abbildungen zu entnehmen. Erfolgte der Nachweis des Zielproteins hMyt1-His₆ durch eine Bande bei ca. 55,5 kDa ist die betreffende Bande durch eine rote Umrandung gekennzeichnet.




Abb. 4.55 SDS-Polyacrylamid-Gel des rekombinanten Enzyms Myt1 aus der Expression in S2-Zellen: Dargestellt wird ein Coomassie-gefärbtes Gel mit Rohproteinextrakt (Lane 1 und 2) und Protein nach Reinigung über Ionenaustausch (Lane 3); M – Molekulargewichtsmarker; Quelle: Dr. Frank Erdmann, Max-Planck-Forschungsstelle (Halle(Saale))

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Claudia Bäßler, geb. Philipp
Geburtsdatum /-ort	25. April 1982 in Nordhausen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulischer Werdegang

09/1988 – 07/1992	Grundschule, Sülzhayn
09/1992 – 06/2000	Herder-Gymnasium, Nordhausen Abschluss Abitur

Hochschulausbildung

10/2001 – 09/2005	Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/2003	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
09/2005	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11/2006	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker
10/2006 – 04/2009	Lebensmittelchemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/2008	Zweiter Abschnitt der Prüfung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker
10/2008 – 04/2009	Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades: Diplom-Lebensmittelchemikerin Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät II mit dem Thema: „In vitro Studien zur Wirkung von Bioflavonoiden an der Myt1 Kinase“
04/2010	Dritter Abschnitt der Prüfung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker

04/2010	Erlaubnis zum Führen der Berufsbezeichnung „Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin“
2007 – 2010	Promotionsvorhaben zum Thema „Etablierung der humanen Myt1 Kinase als Zielstruktur moderner Arzneistoff-entwicklung: Beiträge zu Expression und Assayentwicklung“ am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Herrn Prof. Wolfgang Sippl
Berufstätigkeit	
01/2001	Eintritt in die Laufbahn der Sanitätsoffizieranwärter der Bundeswehr, Fachrichtung Wehrpharmazie
01/2001 – 09/2001	Militärische Vorausbildung mit Erste Hilfe Lehrgang und Offizierlehrgang in Hildesheim und München mit anschließender Beurlaubung zum Studium
10/2005 – 03/2006 München	Pharmaziepraktikum am Zentralen Institut der Bundeswehr in München
04/2006 – 09/2006	Pharmaziepraktikum Marien-Apotheke in Niedersachswerfen
05/2009 – 04/2010	Praktisches Jahr zur Ausbildung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker am Landesuntersuchungsamt in Halle (Saale)
05/2010	Aufnahme der Tätigkeit als Sanitätsoffizier der Bundeswehr
seit 11/2010	Prüfleiter in der Laborgruppe <i>Zentrale Apparative Analytik</i> der Abteilung III – Lebensmittelchemie und Ökochemie – des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, Koblenz
Urbar, August 2011	

Liste der Veröffentlichungen

Publikationen: Myt1 Kinase – Testung und Synthese

Göllner, Christiane; Philipp, Claudia; Dobner, Bodo; Sippl, Wolfgang; Schmidt, Matthias:
First total synthesis of 1,2-dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6-deoxy-6-amino- α -D-glucosyl)glycerol - a glycoacylglycerolipid of a marine alga with a high inhibitor activity against human Myt1-kinase.
Carbohydrate Research 2009, 344, 1628–1631

Poster und Vorträge: Myt1 Kinase – Testung und Synthese

Philipp, Claudia; Göllner, Christiane; Rüttinger, Hans-Herrmann; Sippl, Wolfgang; Pietzsch, Markus; Schmidt, Matthias:
Generation of Myt1 kinase and development of Myt1 kinase bioassays.
DPhG-Tagung – Jena 2009

Göllner, Christiane; Philipp, Claudia; Dobner, Bodo; Sippl, Wolfgang; Schmidt, Matthias:
New glycoacylglycerolipid-derivatives as potential lead structures for Myt1 kinase inhibitors.
DPhG-Tagung – Jena 2009

Philipp, Claudia; Göllner, Christiane; Sippl, Wolfgang; Schmidt, Matthias:
Entwicklung und Vergleich biochemischer Assays zur Bestimmung der Aktivität potentieller Myt1 Kinaseinhibitoren.
DPhG-Tagung – Bonn 2008

Göllner, Christiane; Philipp, Claudia; Dobner, Bodo; Sippl, Wolfgang; Schmidt, Matthias:
Neo synthesis of marine glycoacylglycerolipids and derivatives as potential inhibitors of Myt1 kinase.
DPhG-Tagung – Bonn 2008

Rohe, Alexander; Philipp, Claudia; Balgarov, Petar; Göllner, Christiane; Al-Mazaideh, G.; Erdmann, Frank; Sippl, Wolfgang; Rüttinger, Hans-Herrmann; Schmidt, Matthias:
Development of a CE based assay for determination of human Myt1 kinase activity.
DPhG-Tagung – Braunschweig 2010

Rohe, Alexander; Erdmann, Frank; Philipp, Claudia; Al-Mazaideh, G.; Göllner, Christiane; Sippl, Wolfgang; Schmidt, Matthias:
The human PKMYT1 as a target in Assay Development.
DPhG-Tagung – Innsbruck 2011

Weitere Veröffentlichungen:

Imming, Rainer; Philipp, Claudia:
Bestimmung von Cyanid in Lebensmitteln
LChG, 20. Arbeitstagung Regionalverband Süd-Ost – Dresden 2010

Danksagung

Ich bedanke mich bei all denjenigen, die mich während der Promotion unterstützten und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Sippl für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation, die Überlassung des interessanten Themas und die gewährten Freiräume bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. Matthias Schmidt, meinem unmittelbaren Betreuer, danke ich besonders für die freundliche, fortwährende Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Frau Prof. Dr. Andrea Sinz und deren gesamter Arbeitsgruppe danke ich für die gewährte Hilfsbereitschaft, das freundliche Zur-Verfügung-Stellen eines Laborarbeitsplatzes und die vielen Tipps und Ratschläge. Insbesondere bedanke ich mich für die Möglichkeit der Nutzung der HPLC und für die Unterstützung bei der Anfertigung der Massenspektren.

Herrn Prof. Dr. Rüttinger sowie Frau Peters danke ich herzlich für die immerwährende Unterstützung, die freundliche Atmosphäre und die nette Aufnahme in ihr Labor zur Durchführung der kapillarelektrophoretischen und fluorimetrischen Messungen. Die gewährte Hilfsbereitschaft, ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen fachlichen Hinweise trugen in großem Maße zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch und seinen Arbeitskreis für die gewährte Unterstützung beim Erlernen der molekularbiologischen, biochemischen und biotechnologischen Arbeiten und die Möglichkeit diese in dessen Laboren durchführen zu dürfen. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Thomas Hertel und Frau Karin Büttner für die zahlreichen Ratschläge und Anmerkungen sowie ihre praktischen Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente zur Expression der Myt1 Kinase.

Herrn Prof. Dr. Imming danke ich für die Erlaubnis der Nutzung des Plattenreaders.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Frank Erdmann von der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle (Saale) für seine Unterstützung zur Expression der Myt1 Kinase und die Möglichkeit der Anfertigung von Western Blots.

Ich danke meiner Kollegin und Freundin Frau Dipl.-Pharm. Christiane Göllner und allen übrigen Mitgliedern der AG Schmidt für die angenehme Atmosphäre im Labor und die gute Zusammenarbeit.

Ein großer Dank geht an Tim, Matthias, Sarah und Anna, den Lektoren meiner Arbeit, die sich, teilweise fachfremd, durch die zahlreichen Fachtermini kämpfen mussten, mit ihren Korrekturvorschlägen jedoch beitrugen, die Arbeit im würdigen Format abzuschließen.

Meinem Mann Tim danke ich für seine liebevolle und geduldige Unterstützung und auch für so manche Stichelei, die mich animierte, die Arbeit fertig zu stellen. Von ganzem Herzen danke ich auch meinen Eltern und meiner Schwester für die Liebe, Geborgenheit, Geduld, moralische Unterstützung und die Zeit, in der sie immer für mich da waren und mich über so manche Enttäuschung während der praktischen Arbeiten hinweg trösteten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben.

Urbar, August 2011

Claudia Bäßler