

Identifizierung und Charakterisierung
potentieller Wirkstoffe, welche die
Inhibierung von Cdk2 durch p27^{Kip1}
aufzuheben vermögen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Gunnar Weninger
geboren am 05.10.1979 in Hamburg

2012

Referent: Prof. Dr. Dietmar Manstein
Korreferent: Prof. Dr. Nisar Malek
Tag der Promotion: 12.06.2012

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2007 bis März 2012 am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dietmar J. Manstein und am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Nisar P. Malek angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Nisar P. Malek und Herrn Prof. Dr. Dietmar J. Manstein danke ich für die Vergabe der interessanten Themenstellung und die Betreuung meiner Promotionsarbeit, deren Entwicklung sie durch kritische und inspirierende Fachdiskussionen bereichert haben.

Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning danke ich für die Übernahme des Amtes des Drittprüfers.

Herrn Dr. Hakim Djaballah, Herrn Dr. Christophe Antczak und der gesamten HTS Core Facility des Memorial Sloan-Kettering Cancer Centers danke ich für die Gastfreundschaft während meines Aufenthalts in New York und die konstruktive Zusammenarbeit bei den High-Throughput Screenings.

Herrn Dr. Jens Peter von Kries, Herrn Dr. Martin Neuenschwander, Frau Carola Seyffarth und der gesamten Screening Unit des Leibniz-Instituts für molekulare Pharmakologie danke ich ebenfalls für die Gastfreundschaft, die Unterstützung bei der Durchführung der High-Throughput Screenings und die angenehme Zeit in Berlin.

Den Kollegen des Instituts für Biophysikalische Chemie (BPC) sowie des Instituts für Molekularbiologie (IFM) der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Mein Dank richtet sich dabei insbesondere an meine IFM-Arbeitsgruppenkollegen Dr. Uta Kossatz, Hanane Belahmer, Dr. Sangeeta Chauhan, Dr. Olga Weikum, Dr. Irina Nickleit, Miriam Kiene und Raj Bhayadia für die Unterstützung (insbesondere bei der Zellkultur) sowie für anregende Diskussionen.

Besonderer Dank gilt meinen BPC-Arbeitsgruppenkollegen Dr. Amrita Rai, Jayashankar Selvadurai, Anne Hennig, Dr. Sarah Heißler, Dr. Matthias Preller, Dr. Krishna Chinthalapudi, Salma

Pathan, Franz Fischer, Megha Abbey, Roopsee Anand und Bilyana Suvandzhieva für den fachlichen Austausch, freundschaftliche Hilfeleistungen, vielfältigen Diskussionen und Ratschläge.

Außerdem danke ich meinen Freunden außerhalb der MHH, die mich während der Entstehungszeit dieser Arbeit begleitet haben.

Herzlicher Dank gebührt meinen Eltern, meinen Bruder, meinen Verwandten und Angehörigen, die durch ihre uneingeschränkte Unterstützung mein Studium mitsamt Promotion überhaupt erst ermöglicht haben.

Dimidium facti, qui coepit, habet: sapere aude, incipe.
Horaz (Epistulae 1,2,40)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Grundlagen der Zellzyklusregulation	5
1.1.1 Prinzipielle Aspekte des eukaryontischen Zellzyklus	5
1.1.2 Die Bedeutung der Cyclin-abhängigen Kinasen für die Regulation des Zellzyklus im Allgemeinen	8
1.1.3 Die phasenspezifische Rolle bestimmter Cdks in der Regulation des Zellzyklus von Säugetierzellen	9
1.1.4 Die Kontrolle der Cdk-Aktivität durch CKIs	12
1.1.5 Die Funktion von p27 als CKI	13
1.1.6 Die strukturelle Basis der Cdk-Aktivierung und -Inhibierung am Beispiel von Cdk2, Cyclin A und p27	15
1.2 Aufgabenstellung	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Antibiotika	23
2.1.3 Antikörper	23
2.1.4 Proteine/Enzyme	24
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	24
2.1.6 Sonstige Materialien und Gerätschaften	25
2.1.7 Kommerzielle Kits und Standards	26
2.1.8 Bakterienstämme	27
2.1.9 Expressionsvektoren	27
2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1 Klonierung der Expressionskonstrukte	28

2.3	Zellbiologische Methoden	32
2.3.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien	32
2.3.2	Untersuchung der Zellvitalität mittels des MTT-Assays	34
2.3.3	Durchflußzytofluorimetrie	35
2.4	Biochemische Methoden	35
2.4.1	Bakterielle Synthese rekombinanter Proteine	35
2.4.2	Isolierung endogener Proteine	38
2.4.3	Proteincharakterisierung	39
2.5	Biophysikalische Methoden	46
2.5.1	Dynamische Lichtstreuung	46
2.5.2	<i>Microscale</i> Thermophorese	47
2.5.3	FRET-Assay	48
2.5.4	HTRF-Assay	49
2.5.5	<i>Steady-state</i> ATPase-Assay	50
2.5.6	Kinase-Assay	51
2.6	Bioinformatische Methoden	52
2.6.1	<i>Protein-Ligand-Docking</i>	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Bakterielle Synthese der humanen Proteine Cdk2, Cyclin A und p27 als rekombinante Fusionskonstrukte und deren Isolierung mittels Affinitätschromatographie	54
3.1.1	Produktion von GST-p27	54
3.1.2	Produktion von His-p27-YFP und His-eYFP-p27	56
3.1.3	Produktion von His-eCFP-Cyclin A	59
3.1.4	Produktion von MBP-Cdk2 ^{T160E} /His-Cyclin A	61
3.1.5	Produktion von His-Cdk2	63
3.2	Biophysikalische Analysen der rekombinant produzierten Proteine Cdk2, Cyclin A und p27	64
3.2.1	Dynamische Lichtstreuung	64
3.2.2	<i>Microscale</i> Thermophorese	65
3.2.3	<i>Steady-state</i> ATPase-Assay	67
3.2.4	Massenspektrometrie zur Identifizierung von Drp1 als Cdk2-Substrat	70
3.2.5	FRET-Assay	71
3.2.6	HTRF-Assay	76
3.3	<i>High-Throughput Screening</i>	81
3.3.1	FRET-Assay	82
3.3.2	HTRF-Assay	85

3.4	Validierung und Charakterisierung potentieller Wirkstoffe anhand sekundärer Assays	94
3.4.1	FRET-Assay	94
3.4.2	<i>Steady-state</i> ATPase-Assay	96
3.4.3	Kinase-Assay	98
3.4.4	MTT-Assay	100
3.5	Validierung und Charakterisierung potentieller Wirkstoffe anhand zellulärer Versuchsreihen	101
3.5.1	Wirkung von Merbromin auf HeLa-Zellen	101
3.5.2	Wirkung von Eosin Y und Merbromin auf MEF-Zellen	105
3.6	<i>Protein-Ligand-Docking</i>	110
4	Diskussion	112
4.1	Die Bedeutung von p27 in seiner Funktion als CKI für die Entwicklung potentieller Wirkstoffe	112
4.2	Die Entwicklung und Nutzung der <i>in vitro Screening</i> -Systeme zur Identifizierung und Charakterisierung wirkstoffähnlicher Inhibitoren der p27-Bindung	115
4.3	Charakterisierung der in den <i>in vitro Screenings</i> als potentielle Treffer identifizierten Substanzen	116
4.3.1	NF449	116
4.3.2	Pyrogallin	118
4.3.3	Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP9)	118
4.3.4	Aurintricarboxylsäure (ATA)	119
4.3.5	Merbromin	120
4.3.6	Strukturanaloga des Merbromins	121
4.4	Charakterisierung der durch Merbromin und Eosin Y vermittelten Effekte auf HeLa- und MEF-Zellen	122
5	Anhang	125
5.1	Protokoll zur Durchführung des FRET-Assays	125
5.2	Protokoll zur Durchführung des HTRF-Assays	126
	Abkürzungsverzeichnis	127
	Literaturverzeichnis	131
	Lebenslauf	150

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine wirkstoffähnliche Substanz zu identifizieren, welche die Inhibierung von Cdk2 durch p27 aufzuheben vermag. Die diesem Ziel zugrunde liegende Hypothese ist, dass eine derartige Substanz die Zellregeneration anregen könnte. Denn eine Reduktion der p27-Inhibitoraktivität führt bekanntermaßen zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Zellproliferation, weshalb p27 als ein negativer Regulator der Zellzyklusprogression eingestuft wird. Ursächlich hierfür ist, dass die Inhibierung der Cdk2-Komplexe durch p27 ein zentrales Element für die Kontrolle des Restriktionspunktes darstellt. Nach dessen Überschreitung ist die Zelle irreversibel auf die Beendigung des einmal begonnenen Zellzyklus terminiert. Demzufolge stellt p27 in seiner Funktion als Cdk-Inhibitor ein geeignetes Zielobjekt für die Entwicklung regenerativer Wirkstoffe dar. Denn es ist demnach anzunehmen, dass eine wirkstoffbedingte Reduzierung der p27-Inhibitoraktivität eine Zellproliferation erleichtern würde, ohne sie direkt anzutreiben.

Um diese Zielsetzung realisieren zu können, wurden in dieser Arbeit *in vitro* *Screening*-Systeme entwickelt. Diese *Screening*-Systeme erlaubten es, Sammlungen wirkstoffähnlicher Substanzen im Hochdurchsatzmaßstab auf ihr Potential zu testen, die p27-Bindung an Cdk2-Komplexe aufzuheben. Zur Darstellung der *Screening*-Systeme wurden die humanen Proteine p27, Cdk2 und Cyclin A bakteriell als rekombinante Fusionsproteine produziert. Als Detektionsmethode der Protein-Protein-Interaktion zwischen p27 und Cdk2/Cyclin A wurde der intermolekulare FRET ausgewählt. Die Proteine konnten anhand ihrer unterschiedlichen Fusionsanhänge gezielt mit einem FRET-Paar markiert werden. Als besonders geeignet hierfür erwies sich die HTRF-Technologie, welche das homogene FRET-Assayformat mit der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung verbindet, da hierdurch eine relativ hohe Robustheit gegenüber Signalinterferenzen erzielt werden konnte. Die synthetische *in vitro* Umgebung ermöglichte eine unmittelbare Detektion solcher Substanzen, die die p27-Bindung direkt beeinflussen.

Die als potentielle Treffer aus den *Screenings* hervorgegangenen Substanzen wurden anhand sekundärer Assays und zellulärer Versuchsreihen validiert und charakterisiert. Hieraus resultierte die Identifizierung nur sehr weniger Substanzen, die als Leitstruktur neuartiger Wirkstoffe dienen können. Dieses Ergebnis ist aber nicht unerwartet, da Protein-Protein-Interaktionen generell als besonders schwierige Zielobjekte einer Wirkstoffentwicklung gelten. Zumindest für einen der potentiellen Treffer zeigte sich, dass die Behandlung von Zellen mit der Substanz eine Reaktivierung des durch p27 inhibierten Cdk2-Komplexes bewirkt. Jedoch korrelierte die sub-

stanzvermittelte Cdk2-Reaktivierung nicht mit einer gesteigerten Zellproliferation, sondern mit einem vermehrten Zellsterben. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung zeigte eine Abnahme des G₁-Phasenanteils. Dies deutet darauf hin, dass die Cdk2-Reaktivierung zu einem Zellsterben in der G₁-Phase führt. Da jedoch kein Anzeichen einer Apoptose festgestellt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Überlagerung einer gesteigerten Zellzyklusprogression und einer Nekrose infolge der Zytotoxizität der Substanz Ursache für das apparente Zellsterben in der G₁-Phase ist. Demzufolge könnte diese Substanz als eine Leitstruktur für die Entwicklung regenerativer Wirkstoffe dienen.

Schlüsselwörter: p27, Zellzyklus, Wirkstoffentwicklung

Summary

The aim of the work presented here was to identify a drug-like compound which impairs the p27-mediated inhibition of Cdk2. The hypothesis behind this aim is that such a compound could be used to stimulate the cell proliferation. Because reduced expression of p27 is known to increase the proliferation probability of mammalian cells. Therefore p27 is considered as a negative regulator of the cell cycle progression. This applies since the inhibition of Cdk2 by p27-binding is a key element in establishing the restriction point control. Once the restriction point is passed, a cell is irreversibly committed to undergo the cell division. It is likely therefore that an agent which reduces the inhibitor activity of p27 would facilitate the cell proliferation. Thus the p27-binding seems to be a suitable target for a drug discovery study of regenerative agents.

To achieve this goal, *in vitro* screening systems were developed in this work. The screening systems allowed to test drug-like compounds in a high-throughput scale for their ability to displace the p27-binding. The construction of the screening systems was enabled by the recombinant expression of the human proteins Cyclin A, Cdk2 and p27 in *E. coli* followed by affinity chromatography. The intramolecular FRET was chosen as method to detect the protein-protein interaction between p27 and Cdk2/cyclin A. The different affinity tags of the proteins were utilized to label the proteins with the FRET-pair. The HTRF-technology turned out to be particularly suitable for this purpose. Due to combining the homogeneous assay format of FRET with the time resolved fluorescence detection, the HTRF-signal provides a high robustness against interference. The use of such synthetic sensor complexes in a well-defined *in vitro* environment offered the advantage that immediately influencing factors of the direct interaction partners were detectable, i.e., in form of drug-like compounds.

The potential hits of the high-throughput screenings were analyzed by secondary assays using cell-free and cell-based analytical methods. Thereby, only very few hits were confirmed, which could be used as novel drug leads. This result is not unexpected because protein-protein interactions are known as hard targets for drug developments. At least it was shown for one of the potential hits that the treatment of cells with the compound induces a reactivation of Cdk2 inhibited by p27. However the Cdk2-reactivation did not correlate with an increased cell proliferation rate but with a higher cell death rate. The flow cytometric analysis of the cell cycle distribution showed a decrease in the G₁-phase fraction. This suggests that the Cdk2 reactivation leads to cell death in the G₁-phase. However, no evidence for an elevated apoptosis rate could be detected.

Summary

Therefore, it can not be excluded that a superposition of an increased cell cycle progression and necrosis induced by the cytotoxicity of the compound is the reason of the apparent cell death in the G₁-phase. Thus, this compound could serve as a lead structure for a drug development of regenerative agents.

Keywords: p27, cell cycle, drug development

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Zellzyklusregulation

1.1.1 Prinzipielle Aspekte des eukaryontischen Zellzyklus

Ein wesentliches Merkmal des Lebendigen ist es, dass es die Fähigkeit besitzt, sich zu reproduzieren, wodurch so lebenswichtige Prozesse wie Geweberegeneration, Wachstumsentwicklung und Fortpflanzung ermöglicht werden. Die Grundlage hierfür ist in den Zellen zu finden, da die Zelle die kleinste, strukturelle und funktionelle Einheit darstellt, auf der alles Leben basiert. Die Kontinuität des Lebendigen, d.h. Sterblichen, beruht auf der Eigenschaft der Zellen, sich durch Zellteilungen duplizieren zu können. Die Zellteilung resultiert aus dem Ablauf des Zellzyklus, welcher die Entwicklung einer Zelle von der Teilung der Vorgängerzelle bis zu ihrer eigenen Teilung in zwei Tochterzellen beschreibt. Voraussetzung hierfür ist die Vervielfältigung von Zellkomponenten während der Wachstumsperiode, der sogenannten Interphase, und deren gleichmäßige Aufteilung auf die beiden Tochterzellen während der Mitosephase (M-Phase). Insbesondere die exakte Wiedergabe der genetischen (und epigenetischen) Information ist hierbei von zentraler Bedeutung. Als Träger der genetischen Information dient die Desoxyribonukleinsäure (DNA), die in eukaryontischen Zellen in Chromosomen verpackt vorliegt [Watson & Crick 1953]. Die Verdoppelung des Chromosomensatzes geschieht während der Synthese-Phase (S-Phase). Sie ist zeitlich und funktionell von der M-Phase durch zwei *Gap*-Phasen (G_1 - und G_2 -Phase) getrennt. Charakteristisch für die präreplikative G_1 - und prämitotische G_2 -Phase ist ein fortdauerndes Zellwachstum durch Vermehrung des Cytoplasmas und cytoplasmatischer Organellen sowie die Vorbereitung auf die sich anschließende S- bzw. M-Phase. Beispielsweise werden während der G_1 -Phase vermehrt Desoxyribonukleosid-Triphosphate synthetisiert sowie zahlreiche Gene aktiviert, die die spätere DNA-Replikation ermöglichen. G_1 -, S- und G_2 -Phase sind somit die Bestandteile der Interphase. In der M-Phase ereignet sich die Mitose, d.h. die Teilung des Zellkerns, auf die in der Regel die Zytokinese folgt, d.h. die Teilung des Cytoplasmas [Morgan 2007] [Hunt et al. 2011].

Um zu verhindern, dass eine Zelle während der Zellteilung entartet, ist eine strikte Regulation des Zellzyklus erforderlich. Essentiell hierfür sind zellzyklusinterne Kontrollpunkte (*Checkpoints*), die eine hinreichende Dauer und richtige Abfolge der einzelnen Zellzyklusphasen sicherstellen, indem sie den Zellzyklus solange am Phasenübergang hindern, bis die vorherige Zellzyklusphase erfolgreich abgeschlossen worden ist, so dass die notwendigen Voraussetzungen für den

Beginn der nächsten Zellzyklusphase erfüllt sind [Hartwell & Weinert 1989] [Elledge 1996]. Diese *Checkpoints* sind weniger als außergewöhnliche Reaktion auf zelluläre Fehlfunktionen zu verstehen, sondern sind vielmehr integrale Bestandteile eines jeden Zellzyklus, die als Antwort auf Fehlfunktionen eine markantere Ausprägung erfahren. So gewährleisten beispielsweise die *DNA Damage Checkpoints* die DNA-Überprüfung. Fehlerhafte DNA führt zu einer Verzögerung des Zellzyklus kurz vor Ende der G₁- oder G₂-Phase oder in der S-Phase, wodurch eine zeitgerechte DNA-Reparatur ermöglicht wird. Falls zu schwerwiegende Mängel auftreten, wird zumeist ein Zelltod eingeleitet [Weinert 1997]. In der M-Phase tritt beim Übergang von der Metaphase zur Anaphase der Spindelcheckpoint auf, der eine Fehlverteilung der Chromosomen verhindert, indem die Schwesterchromatiden so lange an ihrer Trennung gehemmt werden, bis alle Chromosomen an beiden Polen der mitotischen Spindel in korrekter Weise angeheftet sind [Nasmyth 2001]. Diese *Checkpoints* dienen somit insbesondere dazu, die Integrität des Genoms zu bewahren. Ohne diese *Checkpoints* würde das Auftreten chromosomaler oder genetischer Instabilität erleichtert werden, was sich in einem Verlust oder Veränderung genetischer Information z.B. in Form von Mutationen äußern könnte.

Neben den intrazellulären Verhältnissen beeinflussen auch extrazelluläre Faktoren die Entscheidungsfindung, ob eine Zelle nach vollendeter Zellteilung erneut in den Zellzyklus eintritt oder arretiert, d.h. in ein Ruhezustand, der G₀-Phase, übergeht. Bei einzelligen Organismen sind hierfür vor allem die herrschenden Umweltbedingungen wie z.B. das Nahrungsangebot ausschlaggebend. Bei multizellulären Organismen spielt auch die Kommunikation mit der Umgebung über mitogene oder antimitogene Signale wie z.B. Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle. Empfänglich hierfür sind Zellen nur bis zum Erreichen des Restriktionspunktes (R) inmitten der späten G₁-Phase. Danach ist die Zelle irreversibel auf eine Beendigung des begonnenen Zellzyklus terminiert [Pardee 1974] [Planas-Silva & Weinberg 1997] [Blomen & Boonstra 2007].

Inwiefern der Zellzyklus auf bestimmte mitogene oder antimitogene Signale reagiert, kann sich je nach Zelltyp und Differenzierungsgrad unterscheiden. Beispielsweise proliferieren die Stammzellen von Epithel- oder Blutzellen kontinuierlich mit kontrollierter Geschwindigkeit. Je weiter Zellen ausdifferenzieren, desto mehr verlieren sie an Potential zur Zellteilung. Die meisten Zelltypen eines adulten, multizellulären Organismus arretieren vorzugshalber, wobei sie für unbestimmte Zeit in der G₀-Phase verbleiben. Sie können aber nach Stimulation durch bestimmte mitogene Signale erneut in den Zellzyklus eintreten. Beispielhaft hierfür sind Hepatozyten oder Lymphozyten. Zellen, die terminal differenzieren um hochspezifische Funktionen ausüben zu können, wie beispielsweise Neuronen, Muskelzellen oder Erythrozyten, verlassen den Zellzyklus irreversibel unabhängig von mitogenen Signalen.

Die Loslösung eines aktiven Zellzyklus von den extrazellulären Steuerungsmechanismen kann zu unkontrollierten Zellteilungen führen. Ein hieraus resultierendes autonomes Zellwachstum ist ein typisches Merkmal der Tumorgenese. Ursächlich hierfür ist die Veränderung bestimmter geni-

scher Informationen, wodurch sogenannte Onkogene dauerhaft aktiviert bzw. Tumorsuppressor-Gene deaktiviert werden. Besonders anfällig für karzinogene Noxen (wie z.B. ionisierende Strahlung und mutagene Chemikalien) sind vor allem Zellen, die in einem aktiven Zellzyklus begriffen sind. Durch eine allmähliche Akkumulation dieser in der genetischen Information manifestierten Fehler können die *Checkpoints* außer Kraft gesetzt werden, so dass die Proliferation enthemmt wird. Dies kann katastrophale Konsequenzen zur Folge haben, da hierdurch gesundes Gewebe verdrängt und in seiner Funktion beeinträchtigt wird [Palmero & Peters 1996] [Wagner 1998] [Ford & Pardee 1999].

Aber auch wenn die Regeneration das Risiko des Scheiterns in sich birgt, ist doch die Entstehung neuer Zellen als Ersatz alter, verbrauchter Zellen essentiell. So werden Zellen, die für den Organismus gefährlich werden könnten, da sie z.B. zu viele Mutationen angesammelt haben oder virusinfiziert sind, oder die schlichtweg nicht mehr gebraucht werden, beseitigt, indem sie gezwungen werden, kontrollierten Selbstmord zu begehen, d.h. Apoptose. Eine kontinuierliche Apoptose ist z.B. bei den Zellen der Epithelgewebe zu beobachten, die zu flächenhaften Zellverbänden differenzieren, um so die Oberflächen bedecken und von der Umgebung abgrenzen zu können. Dies ist erforderlich, da Epithelzellen im besonderen Maße den Noxen der Umgebung ausgesetzt sind und somit einer stetigen Abnutzung unterliegen [Mondello & Scovassi 2010] [Ulukaya *et al.* 2011]. In einem gesunden, adulten Organismus stellt sich zwischen Apoptose und Proliferation ein den Anforderungen entsprechendes, zelltypspezifisches Gleichgewicht Namens Homöostase ein, wobei der Zellbestand zumeist aufrecht zu halten ist [Bergmann & Steller 2010]. Eine Schwächung der Homöostase tritt z.B. ein, wenn die Immunabwehr während einer Virusinfektion zu stark sensibilisiert wird. Durch eine hyperaktivierte Immunabwehr kann eine exzessive Apoptose gesunder Zellen bewirkt werden. Zur Wiederherstellung der Homöostase ist dann eine verstärkte Zellregeneration von Nöten. Die physiologisch nützliche Apoptose ist von der Nekrose zu unterscheiden, bei der Zellen direkt infolge letaler Zellschädigungen sterben, die z.B. durch Toxine, Sauerstoffmangel oder physikalische Traumata verursacht werden und somit die zur Wundbildung führen können. Da hiervon nicht nur einzelne Zellen, sondern ganze Zellverbände betroffen sind, führt dies zur einer nicht unmittelbar kompensierbaren Beeinträchtigung der Homöostase. Um Wunden wieder zu schließen, bedarf es erst einer Wundheilung, wobei die gestorbenen Zellen typischerweise durch eine verstärkte Proliferation des Bindegewebes unter Narbenbildung ersetzt werden [Gurtner *et al.* 2008] [Krafts 2010]. Die Entwicklung von Wirkstoffen, die die Zellregeneration unterstützen, ohne dabei ein unkontrolliertes Zellwachstum zu induzieren, ist daher eine zellbiologische Fragestellung von hoher medizinischer Relevanz. Um einen geeigneten Angriffspunkt hierfür definieren zu können, ist es sinnvoll, auf molekularer Ebene Proteine zu betrachten, die für die Regulation des Zellzyklus entscheidend sind oder zumindest unter bestimmten Bedingungen entscheidend werden können.

1.1.2 Die Bedeutung der Cyclin-abhängigen Kinasen für die Regulation des Zellzyklus im Allgemeinen

Die Zellteilung ist für das Fortbestehen aller Lebewesen essentiell. Dementsprechend ist es nicht überraschend, dass die dem Zellzyklus zugrunde liegende molekulare Maschinerie innerhalb der Eukaryonten während der Evolution in ihren zentralen Komponenten hochkonserviert geblieben ist [Hindley & Phear 1984] [Lee & Nurse 1987].

Entscheidend für das Voranschreiten des Zellzyklus ist insbesondere die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinase*, Cdk) [Murray & Hunt 1993]. Cdks gehören zur Klasse der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Denn sie katalysieren den Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP auf bestimmte Serin- und Threoninresten ihrer Proteinsubstrate. Deren Konsensussequenz wird insbesondere durch ein Prolinrest direkt hinter der Phosphorylierungsstelle spezifiziert [Stevenson-Lindert *et al.* 2003]. Ihre Aktivierung bzw. Inaktivierung ist ein zentrales, regulatorisches Motiv für die Kontrolle der Phasenübergänge im Zellzyklus. Dabei werden in die Cdk-Aktivität die Informationen intrazellulärer Signale, d.h. vor allem bzgl. des Passierens der *Checkpoints*, und extrazellulärer Signale, die für die Überschreitung des Restriktionspunktes entscheidend sind, über vielfältige Regulationsmechanismen integriert. Diese umfassen unmittelbare Modifikationen des Cdk-Aktivitätszustands durch bestimmte Phosphorylierungsereignisse oder Protein-Protein-Interaktionen. Mittelbar hierzu können wiederum die diversen direkten und übergeordneten Cdk-Regulatoren sowie Cdk-Substrate z.B. in ihrer Synthese- und Abbaurate, Aktivität oder subzellulären Lokalisation verändert werden [Morgan 1997].

Cdks sind in monomeren Zustand nahezu vollständig inaktiv. Wie ihr Name bereits andeutet, können die Cdks erst nach Bindung an ihre zugehörigen Cycline aktiviert werden. Die hierbei induzierte Konformationsänderung bewirkt, dass das katalytische Zentrum der Cdks für die Interaktion mit den Substraten freigesetzt wird. Die Cycline weisen ein während des Zellzyklus charakteristisch oszillierendes Expressionsmuster auf, während das Expressionsniveau der Cdks im Zellzyklus durchgängig konstant bleibt. Daher wird die Aktivierbarkeit der Cdks durch die phasenspezifische Regulation der Cyclinexpression und -degradation bestimmt [Evans *et al.* 1983] [Radzio-Andzelm *et al.* 1995]. Für eine vollständige Aktivierung ist eine bestimmte Phosphorylierung (von T160 bei Cdk2) in der Aktivierungsschleife (*T-Loop*) erforderlich, wodurch das aktive Zentrum noch weiter geöffnet wird, so dass eine bessere Substratbindung ermöglicht wird [Brown *et al.* 1999b]. Hingegen führt die Phosphorylierung des *P-Loops* (in Position T14 und Y15 bei Cdk2) zu einer Inhibierung, da hierdurch die Formierung der ATP-Bindestelle beeinträchtigt wird. Deren Dephosphorylierung dient somit der Aktivierung [Sebastian *et al.* 1993] [Bártová *et al.* 2004]. Ferner können Cdks z.B. durch die Interaktion mit Cdk-inhibierenden Proteinen (*cyclin-dependent kinase inhibitor*, CKI) inaktiviert werden [Pavletich 1999].

Cdks lösen durch Phosphorylierung ihrer Substrate im Zellkern eine Kaskade von Ereignissen aus, die zum Überwinden der *Checkpoints* führen können. Typisch hierfür sind insbesondere zwei Aspekte. Zum einen werden während einer solchen Kaskade bestimmte Transkriptionsfaktoren aktiviert, die ihrerseits wiederum die Synthese von Proteinen induzieren, die ein Voranschreiten der Zellzyklusphase fördern, wie z.B. phasenspezifische Cycline. Zum anderen wird der Abbau von Proteinen, die als Bremsen der Zellzyklusphase fungieren, wie z.B. CKIs, verstärkt angeregt [Morgan 2007] [Hunt *et al.* 2011].

Die Bedeutung der Cdks für das Voranschreiten des Zellzyklus wird u.a. dadurch belegt, dass bei stark proliferierenden Zellen sowie bei vielen Tumoren bestimmte Cdks eine deutlich erhöhte oder länger anhaltende Aktivität aufweisen. Damit einhergehend ist zumeist eine höhere Expression bestimmter Cycline oder ein Verlust an CKIs zu beobachten. Dabei sind Ursache und Wirkung mitunter schwer zu unterscheiden, da die Cdk-Aktivität auf die Cyclin- und CKI-Level in *Feedback*-Schleifen rückwirken kann. Für das Auslösen der diversen *Feedback*-Schleifen ist das Über- oder Unterschreiten bestimmter Schwellenwerte infolge zunehmender Onkogenaktivität oder abnehmender Tumorsuppressoraktivität entscheidend [Gérard & Goldbeter 2010] [Lavi *et al.* 2011]. Dass die Cdks hierbei eine zentrale Rolle einnehmen, äußert sich darin, dass eine Behandlung mit pharmazeutischen CKIs die Zellproliferation zu reduzieren vermag [Senderowicz 2001] [Song *et al.* 2004] [Wang & Ren 2010].

Somit befinden sich die Cdks in einer Schlüsselposition innerhalb eines reich verstrickten Netzwerks, in dem sowohl externe Signale über die Anforderungen der Umgebung als auch interne Rückmeldungen über den Ablauf des Zellzyklus zur Modellierung der *Checkpoints* bzw. des Restriktionspunktes verarbeitet werden, um durch die Kontrolle eine physiologisch sinnvolle Zellproliferation zu gewährleisten.

1.1.3 Die phasenspezifische Rolle bestimmter Cdks in der Regulation des Zellzyklus von Säugetierzellen

Niedere Eukaryonten verfügen nur über eine Cdk-Form (Cdc2 bei *Schizosaccharomyces pombe*, Cdc28 bei *Saccharomyces cerevisiae*), die im Komplex mit phasenabhängigen Cyclinen alle Cdk-spezifischen Aufgaben bei der Regulation des Zellzyklus auszuüben vermag [Beach *et al.* 1982]. Bei den höheren Eukaryonten hat sich im Verlaufe der Evolution hieraus eine Vielzahl spezialisierter Cdks entwickelt, die zum Teil auch Aufgaben außerhalb der Zellzyklusregulation übernehmen [Roberts 1999] [Harper & Adams 2001]. Für Säugetiere sind neun Cdk-Klassen (Cdk1 bis Cdk9) bekannt, wovon die letzten beiden Cdk-Klassen (Cdk8 und Cdk9) nicht an der Regulation des Zellzyklus, sondern der Transkriptionsmaschinerie beteiligt sind [Morgan 1997] [Oelgeschläger 2002]. Die verschiedenen Cdks assoziieren spezifisch mit bestimmten Cyclinen aus zehn Cyclin-Klassen (Cyclin A bis H sowie K und T). Welche Cdk/Cyclin-Komplexe for-

miert und aktiviert werden können, hängt von der Zellzyklusphase ab, deren Fortschreiten durch sie reguliert wird [MacLachlan *et al.* 1995] [Malumbres & Barbacid 2009].

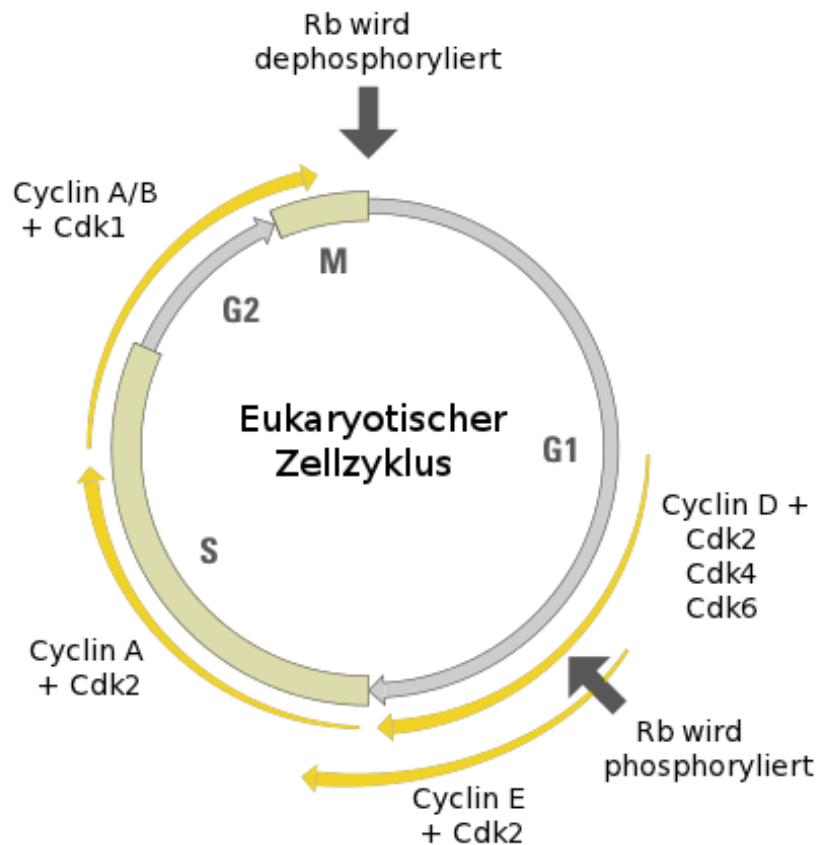


Abb. 1.1: Schema eines typischen Zellzyklus einer Säugetierzelle:

Der Zellzyklus wird durch die sequentielle Aktivierung bestimmter Cdk-Komplexe vorangetrieben.

Die homologe Cdk-Form zu Cdc2 ist durch Cdk1 gegeben [Lee & Nurse 1987]. Cdk1 steuert im Komplex mit Cyclin A und Cyclin B das Voranschreiten der G₂-Phase und die Initiierung der Mitose [Knoblich & Lehner 1993] [Furuno *et al.* 1999]. Anhand von Cdk-Gen-*Knockouts* und -*Knockdowns* konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Cdk-Familie lediglich Cdk1 für einen vollständig ablaufenden Zellzyklus essentiell ist [Berthet *et al.* 2003] [Santamaría *et al.* 2007] [Satyanarayana *et al.* 2008]. Somit ist ihr Potential konserviert geblieben, nicht nur die Mitose, sondern auch die DNA-Synthese zu initiieren. Zu beachten dabei ist, dass für die G₁/S- und G₂/M-Phasenübergänge sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede in der erforderlichen Cdk-Aktivität bestehen. Denn einerseits bedarf es für die Initiierung der Mitose einer höheren Cdk-Aktivität als bei der S-Phase [Stern & Nurse 1996]. Andererseits tragen die phasenabhängigen Cycline zur spezifischen Substraterkennung bei [Loog & Morgan 2005]

[Bloom & Cross 2007]. Durch die Evolution zusätzlicher, phasenspezifischer Cdks ergibt sich eine weitere Regulationsebene, die es ermöglicht, die unterschiedlichen Cdks spezifisch durch bestimmte CKIs oder Phosphorylierungsereignisse in ihrer Aktivität zu modulieren. Dementsprechend werden Zellen mit voranschreitender Differenzierung darauf programmiert, für ihre Zellteilung auch die Cdks der Interphase einzusetzen. Sie werden durch die Cycline der Interphase bevorzugt aktiviert, da sie weit höhere Affinitäten für ihre zugehörigen Cycline aufweisen als Cdk1. Der Zellzyklus wird dann durch die sequentielle Aktivierung bestimmter Cdk-Komplexe vorangetrieben (siehe Abb. 1.1) [Johnson & Walker 1999].

Bedeutend für die Initiierung des Zellzyklus sind die D-Typ Cycline (D1, D2 und D3). Ihre Synthese wird nach Stimulation quieszenter Zellen durch Wachstumsfaktoren verstärkt induziert und ihr Proteinlevel bleibt danach bis zum Entzug der Wachstumsfaktoren zumeist erhöht. D-Typ Cycline binden und aktivieren vorzugsweise Cdk4 und Cdk6. Substrate von Cdk4/6 sind das Retinoblastomprotein (Rb) sowie die verwandten *Pocket*-Proteine p107 (Rb11) und p130 (Rb12). Die Pocket-Proteine der Rb-Familie inhibieren im nicht-phosphorylierten Zustand die E2F-Transkriptionsfaktoren. Die E2F-Transkriptionsfaktoren sind bedeutsam für die transkriptionelle Regulation bestimmter Gene, die den G₁/S-Phasenübergang steuern, sowie Gene, die für die Vorbereitung der DNA-Replikation während der S-Phase erforderlich sind [Cobrinik 2005]. Durch die Cdk4/6-abhängigen Phosphorylierungen verliert Rb partiell an Inhibitorpotential, so dass die Repression des Cyclin E-Promotors aufgehoben wird, während die hemmende Wirkung auf andere Promotoren wie z.B. von Cyclin A bestehen bleibt. Die E-Typ Cycline (E1 und E2) binden an Cdk2. Dieser Komplex wird bis zur späten G₁-Phase durch (Wee1/Mik1-Kinasen vermittelte) Phosphorylierungen von T14 und Y15 in Cdk2 in einem inaktiven Zustand gehalten. Erst deren Dephosphorylierung durch Cdc25A ermöglicht die Aktivierung von Cdk2/Cyclin E [Koff *et al.* 1992] [Welburn *et al.* 2007]. Durch die Cdk2-abhängigen Phosphorylierungen kann Rb komplett inaktiviert werden, so dass E2F freigesetzt und vollständig aktiviert werden kann. Die durch die E2F-Freisetzung gesteigerte Cyclin E-Expression führt zu einem positiven Feedback auf die Cdk2-Aktivität. Hierdurch wird der G₁/S-Phasenübergang bewirkt [Lundberg & Weinberg 1998] [Harbour *et al.* 1999].

Während der S-Phase wird Cyclin E durch Cyclin A2 (Cyclin A1 in Keimzellen) ersetzt, welches bis zur G₂-Phase in steigenden Mengen exprimiert wird. Cdk2-Substrate sind dabei insbesondere G₁-Transkriptionsfaktoren, die durch die Phosphorylierungen deaktiviert werden, und Initiatoren der DNA-Replikation, die hierdurch aktiviert werden. Die zunehmende Aktivität von Cdk2/Cyclin A bewirkt das Voranschreiten des Zellzyklus von der S-Phase bis späten G₂-Phase. Am Ende der Interphase bindet Cyclin A an Cdk1, um die Mitose zu initiieren [van den Heuvel & Harlow 1993] [Pagano *et al.* 1993]. Im Cytoplasma akkumuliert Cyclin B, welches ebenfalls an Cdk1 binden kann, jedoch wird das bereits gebildete Cdk1/Cyclin B durch Phosphorylierung von T14 und Y15 mittels der Wee1/Mik1-Kinasen inaktiviert. Nach

Auflösung der Kernhülle (induziert durch die Cdk1-abhängige Phosphorylierung der Laminifilamentproteine) wird Cyclin A degradiert. Stattdessen bindet vermehrt Cyclin B an Cdk1. Die Phosphatasen Cdc25B und Cdc25C aus dem Zellkern aktivieren Cdk1/Cyclin B, indem sie pT14 und pY15 dephosphorylieren. Die Aktivierung von Cdk1/Cyclin B vollzieht sich schlagartig, da Cdk1/Cyclin B über *Feedback*-Schleifen auf seine Regulatoren rückwirkt. Denn die T14- und Y15-spezifischen Regulatoren sind zugleich Substrate von Cdk1/Cyclin B, wobei durch Phosphorylierung die inhibitorischen Wee1/Mik1-Kinasen inhibiert und aktivierenden Cdc25-Phosphatasen stimuliert werden [Pomerening *et al.* 2003].

Eine Sonderstellung unter den Cdks nimmt Cdk7/Cyclin H ein. Cdk7/Cyclin H fungiert als Cdk-aktivierende Kinase, indem sie Cdks in ihrer Aktivierungsschleife phosphoryliert, wodurch sie vollständig aktiviert werden [Kaldis 1999].

1.1.4 Die Kontrolle der Cdk-Aktivität durch CKIs

Von Interesse für die Modulation der Cdk-Aktivität sind vor allem die physiologischen CKIs, bei denen es sich um Cdk-inhibierende Proteine handelt. CKIs dienen vorrangig der Errichtung des Restriktionspunkts und anderer *Checkpoints*, indem sie durch Inhibierung der Cdks den Zellzyklus anhalten. Sie fungieren somit als Bremsen des Zellzyklus. Ihre Induktion erfolgt insbesondere durch antimitogene Signale und Differenzierungssignale. Bei Säugetieren existieren zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Proteinfamilien an CKIs, die als Ink4- und Cip/Kip-Familie bezeichnet werden. Zur Ink4-Familie zählen p15^{Ink4B}, p16^{Ink4A}, p18^{Ink4C} und p19^{Ink4D}. Die Ink4-Familienmitglieder inhibieren spezifisch Cdk4/6, indem sie einen binären Komplex mit Cdk4/6 formen, welcher eine allosterische Inhibierung der Bindung von Cyclin D vermittelt und die Konformation eines inaktiven Cdk-Zustands stabilisiert [Brotherton *et al.* 1998] [Russo *et al.* 1998]. Hierdurch wird die Phosphorylierung von *Pocket*-Proteinen der Rb-Familie gehemmt, was sich in einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase äußert [Lukas *et al.* 1995] [Medema *et al.* 1995]. Welche Ink4-Proteine bevorzugt exprimiert werden, ist abhängig vom Zelltyp und Differenzierungsgrad [Roussel 1999]. Die CIP/KIP-Familie umfasst p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}. Erhöhte p21-Level sind typischerweise als Stressantworten zu verstehen, die z.B. infolge von DNA-Schädigung oder Onkogenaktivierung auftreten. Der p27-Level wird hingegen zumeist anhand mitogener und antimitogener Signale reguliert [Hengst & Reed 1998]. Auch p57 kann durch antimitogene Signale induziert werden, weist aber eine äußerst zelltypspezifische Expression auf [Swanger & Roberts 1997]. CIP/KIP-Familienmitglieder regulieren die Aktivität verschiedener Cdks, wobei sie nicht nur mit der Cdk-, sondern auch mit der Cyclin-Untereinheit interagieren. Inhibiert werden insbesondere Cdk4/Cyclin D, Cdk2/Cyclin E, Cdk2/Cyclin A und Cdk1/Cyclin A. Für p27 ist beschrieben worden, dass dessen Bindung für die Assoziation von Cdk4 und Cyclin D erforderlich sein kann [Cheng *et al.* 1999]. Durch

bestimmte Phosphorylierungen (von p27Y88 und Y89) verliert p27 an Inhibitorpotential gegenüber Cdk4 [Grimmler *et al.* 2007] [James *et al.* 2008]. Somit agiert p27 dann nicht mehr als Inhibitor, sondern als Aktivator. Ob p27 inhibierend oder aktivierend wirkt, wird zudem über die p27-Verteilung auf die verschiedenen Cdk-Komplexe reguliert. Denn durch die Bindung an Cdk4/Cyclin D kann p27 gegenüber Cdk2/Cyclin E maskiert werden. Folglich kann das an Cdk4/Cyclin D gebundene p27 proliferierenden Zellen als Reservoir an latenten CKI dienen, um auf antimitogene Signale konzertiert reagieren zu können. Beispielsweise werden nach Stimulation mit TGF- β Ink4-Familienmitglieder wie p16 hochreguliert, die p27 aus den Cdk4-Komplexen verdrängen können. Das freigesetzte p27 steht dann für die Inhibierung der Cdk2-Komplexe zur Verfügung. Als Konsequenz auf den Zellzyklus resultiert ein Arrest in der G₁-Phase [Poon *et al.* 1995] [Reynisdóttir & Massagué 1997] [Sandhu *et al.* 1997]. Gegenteiliges trifft zu, wenn z.B. vermehrt Cdk4/Cyclin D gebildet wird oder der p16-Level abnimmt. Dieses Fließgleichgewicht der p27-Verteilung ermöglicht daher die Regulation der beiden für die G₁-Phase bedeutsamen Cdk's in einem einzigen Schritt [Sherr & Roberts 1999] [Blain 2008]. Somit verdeutlicht dies, dass die Inhibierungen durch die Mitglieder der beiden CKI-Familien synergetisch über Cdk4/Cyclin D gesteuert werden können. Anzumerken bleibt, dass das Fließgleichgewicht auch direkt durch bestimmte Phosphorylierungsereignisse (insbesondere des C-terminalen p27T198) modifiziert werden kann; fraglich ist aber, ob und wie hierdurch unmittelbar die Affinität der p27-Bindung zu den Cdk-Komplexen verändert wird [Kossatz *et al.* 2006] [Larrea *et al.* 2008].

1.1.5 Die Funktion von p27 als CKI

Unter den CKIs ist insbesondere p27 von maßgeblicher Bedeutung für die Regulation des Restriktionspunktes. Denn p27 fungiert als ein zentraler Mediator bei der Entscheidungsfindung, ob die Zelle in eine Ruhephase eintritt oder ein erneuter Zellzyklus begonnen wird, indem p27 als sensorische Integrationsplattform diverse mitogene und antimitogene Signale verarbeitet, um die Zellzyklusmaschinerie entsprechend zu beeinflussen. Die Signaltransduktion kann über vielfältige Steuerungsmechanismen auf die p27-Inhibitoraktivität einwirken, wobei p27 z.B. anhand seines Expressionslevels, Stabilität, subzellulären Lokalisation, Bindepartner-Verteilung und Funktion reguliert werden kann. So führen z.B. Kontaktinhibierung, Serumentzug, Nährstoffentzug oder Differenzierung zu einem Anstieg des p27-Levels im Zellkern, woraufhin das Voranschreiten des Zellzyklus gebremst wird [Fang *et al.* 1996] [Durand *et al.* 1997]. In den quieszenten Zellen liegen die Cdk2-Komplexe mit p27 assoziiert und folglich inhibiert vor [Coats *et al.* 1996]. Ausschlaggebend für die Regulation der p27-Inhibitoraktivität sind insbesondere posttranslationale Modifikationen von p27. Beispielsweise können bestimmte onkogene Tyrosinkinasen (z.B. Kinasen der Src-Familie wie Lyn) p27Y88 und Y89 phosphorylieren, wo-

durch p27 an Inhibitorpotential verliert [Chu *et al.* 2007] [Grimmler *et al.* 2007]. Infolge einer Abnahme der p27-Inhibitoraktivität kann es zu einem initialen Anstieg der Cdk2-Aktivität kommen. Wenn die Cdk2-Aktivität einen bestimmten Schwellenwert übersteigt, wird hierdurch der Abbau von p27 induziert, so dass sich eine positive *Feedback*-Schleife formt, die zu einem abrupten Anstieg der Cdk2-Aktivität führt. Denn p27 ist nicht nur Inhibitor, sondern auch ein Substrat für Cdk2. Durch die Phosphorylierung von T187 wird p27 für die Ubiquitinierung mittels der Ubiquitin-Ligase SCF^{Skp2} markiert. Das ubiquitinierte p27 wird vom Proteasom abgebaut und somit der Cdk2-Inhibierung entzogen. Die mit der Zunahme der Cdk2-Aktivität einhergehende Abnahme der p27-Stabilität ist derart ausgeprägt, dass nach Eintritt in den Zellzyklus neu auftretende antimitogene Signale nicht mehr eine erneute Akkumulation von p27 bewirken können. Erst wenn am Ende der Mitose durch Abbau der Cycline die Cdk-Aktivität insgesamt wieder abgefallen ist, kann der p27-Level in der anschließenden G₁-Phase wieder ansteigen. Folglich unterstützt diese *Feedback*-Schleife die Irreversibilität des Restriktionspunktes [Chu *et al.* 2008] [Galea *et al.* 2008].

Zudem wird die Überquerung des Restriktionspunktes durch die Autoinduktion von Skp2 manifestiert. Denn Skp2 ist die Untereinheit des SCF^{Skp2}-Komplexes, die als eine Art Substrat erkennender Adapter fungiert und dabei der Ubiquitin-Ligase ihre Spezifität gegenüber p27 vermittelt. Die Expression von Skp2 wird durch die E2F-Transkriptionsfaktoren induziert. Da die Inhibierung von E2F durch Rb nach dessen Phosphorylierung durch aktiviertes Cdk2 aufgehoben wird (siehe Abschnitt 1.1.3), induziert Skp2 durch Vermittlung des p27-Abbaus seine eigene Expression. Somit ist die p27-Inhibitoraktivität zentraler Bestandteil einer zweiten *Feedback*-Schleife, die durch die reziproke Regulierung von Skp2 und Rb zur Kontrolle des Restriktionspunktes beiträgt [Yung *et al.* 2007] [Assoian & Yung 2008].

Die Bedeutung von p27 für die Kontrolle des Restriktionspunktes belegen insbesondere die p27-Gen-*Knockdowns* und -*Knockouts*. Denn der Phänotyp p27-negativer Mäuse ist durch den Zuwachs an Körpermasse und -größe gekennzeichnet. Zahlreiche Organe sind hyperplastisch. Ferner wird die Funktion von p27 als Tumorsuppressor aufgezeigt. Denn p27-negative Mäuse leiden häufiger an Tumoren der Hypophyse. Jedoch ist keine spontane Erkrankung an Tumoren anderer Art zu beobachten [Fero *et al.* 1996] [Nakayama *et al.* 1996] [Kiyokawa *et al.* 1996]. Allerdings weisen sie eine Prädisposition gegenüber induzierter Tumorgenese (z.B. durch γ -Bestrahlung) auf. Da dies sowohl für die homo- als auch heterozygote Deletion gilt, wird p27 als haploinsuffizienter Tumorsuppressor eingestuft [Fero *et al.* 1998]. Übereinstimmend hiermit wird bei Tumoren häufig ein erniedrigter p27-Level im Zellkern beobachtet. Reduzierte p27-Level weisen zudem eine hohe Korrelation zu einer bösartigen klinischen Entwicklung humaner Tumore auf. Jedoch sind dabei Mutationen des p27-Gens (CdkN1B) nur selten festzustellen [Slingerland & Pagano 2000] [Philipp-Staheli *et al.* 2001]. Tatsächlich scheint ein geringer p27-Level Tumorzellen einen Selektionsvorteil zu verschaffen. Heterozygote p27^{+/-}-Mäuse weisen eine stärkere Prädisposition

zur Tumorgenese auf als homozygote $p27^{-/-}$ -Mäuse [Muraoka *et al.* 2002] [Gao *et al.* 2004]. Somit vermittelt p27 auch onkogene Eigenschaften. Beispielsweise kann p27 als Aktivator von Cdk4/Cyclin D dienen (siehe Abschnitt 1.1.4). So verringert sich in $p27^{-/-}$ -Mäusen der Gehalt an aktiven Cdk4/Cyclin D. Dem Verlust kann p21 teilweise kompensierend entgegenwirken [Cheng *et al.* 1999]. Darüber hinaus übt p27 im Cytoplasma Funktionen unabhängig von seiner Rolle als CKI aus. Beispielsweise ist cytoplasmatisch lokalisiertes p27 an der Regulation der Zytoskelett-Reorganisation beteiligt. Dadurch scheint p27 die Fähigkeit der Tumorzellen zur Metastasierung zu fördern [Denicourt *et al.* 2007]. Eine Stabilisierung des p27-Levels durch eine wirkstoffvermittelte Inhibierung des p27-Abbaus äußert sich in Tumorzellen insbesondere darin, dass je nach Tumorart (und evtl. wirkstoffspezifischen Nebenwirkungen) Autophagie oder Apoptose induziert wird. Zumindest letzteres geschieht wiederum unabhängig von der p27-Funktion als CKI [Chen *et al.* 2008] [Nickeleit *et al.* 2008].

1.1.6 Die strukturelle Basis der Cdk-Aktivierung und -Inhibierung am Beispiel von Cdk2, Cyclin A und p27

Cdks sind relativ kleine Kinasen, die im Größenbereich von 34-40 kDa liegen. Sie bestehen im Wesentlichen nur aus ihrer katalytischen Domäne, die unter den diversen Mitgliedern der Cdk-Familie eine hohe Homologie aufweist. Insbesondere von Cdk2 sind bereits mehrere Strukturen mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst und publiziert worden. Die Strukturen zeigen eine Reihe verschiedener Konformationen, die zur Erklärung unterschiedlicher Aktivitätszustände herangezogen werden können. Die Tertiärstruktur von Cdk2 ähnelt in ihrer Faltung der, die auch bei anderen eukaryontischen Proteinkinasen wie z.B. PKA zu finden ist [Knighton *et al.* 1991]. Die katalytische Domäne umfasst zweiblättrig das katalytische Zentrum und kann somit in zwei Subdomänen unterteilt werden. Dabei besteht die N-terminale Subdomäne (1. *Lobe*, bestehend aus 85 Aminosäuren) maßgeblich aus fünf antiparallelen β -Faltblattsträngen (sowie $\beta 1$ - $\beta 5$) und einer α -Helix (C-Helix). Die größere, C-terminale Subdomäne (2. *Lobe*, bestehend aus 213 Aminosäuren) hingegen ist überwiegend α -helikal [Morgan 1997] [Pavletich 1999]. Als Verbindung zwischen den beiden Subdomänen dient eine Art Scharnier (*Hinge*). Die Scharnierregion kann sich gelenkartig bewegen, wodurch die hydrophobe ATP-Bindetasche, die sich zentral zwischen der N- und C-terminalen Subdomäne befindet, offen gelegt werden kann, um so die Freisetzung von ADP bzw. Bindung von ATP mitsamt Mg^{2+} zu erleichtern. Nach Bindung ragt die Adenin-Base tief in das hydrophobe Innere der ATP-Bindetasche hinein, so dass sie mit der Scharnierregion in Kontakt treten kann. Die N-terminale Subdomäne ist entscheidend für die Stabilisierung und Ausrichtung des gebundenen ATPs. Von Bedeutung dabei sind vor allem die $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Stränge sowie der sie verbindende *P-Loop*, welcher glycinreich und somit hochflexibel ist, so dass ein enger Kontakt mit den β - und γ - Phosphaten des ATPs ermöglicht

wird. Dieses Strukturmotiv ähnelt somit in seiner Funktion einer Klappe, um das ATP in der ATP-Bindetasche einschließen zu können [Bossemeyer 1994] [Hemmer *et al.* 1997]. Die Bindestelle des Substrats liegt in der Peripherie der ATP-Bindetasche und wird insbesondere durch die C-terminale Subdomäne definiert. Ein Schlüsselement hierfür ist der *T-Loop*, der von den konservierten Sequenzmotiven DFG und APE eingerahmt wird (145-172). Der *T-Loop* birgt das (für den *T-Loop* namensgebende) Threonin T160, dessen Phosphorylierung erforderlich ist, um Cdk2 vollständig aktivieren zu können [Bondt *et al.* 1993] [Johnson *et al.* 1996]. In direkter Nachbarschaft zum *T-Loop* befindet sich die C-Helix, die eine entscheidende Rolle für die Cyclin-Bindung spielt.

Die Inaktivität des monomeren Zustands beruht vor allem darauf, dass die Substrat-Bindung durch die Konformation des *T-Loops* blockiert wird. Darüber hinaus trägt die Konformation der C-Helix dazu bei zu verhindern, dass die katalytischen Reste (K33, E51, D145) die für die Katalyse erforderliche Anordnung einnehmen können [Schulze-Gahmen *et al.* 1996]. Ursächlich für die Strukturfindung des inaktiven Zustands ist, dass sich zu Beginn des *T-Loops* ein kurzes, α -helikales Segment (α L12) ausbildet, welches die Positionierung der C-Helix beeinträchtigt und den *T-Loop* in Richtung des *P-Loops* dirigiert. Die konformationelle Anordnung wird durch Ausbildung einer Salzbrücke zwischen dem Aspartat D145 aus dem DFG-Motiv und dem Lysin K33 des β 3-Stranges stabilisiert.

Für die Aktivierung ist die Bindung des Cyclins erforderlich. Die Größe der Cycline schwankt zwischen 35-90 kDa. Der Kernbereich der Cycline besteht aus zwei hintereinander geschalteten Cyclin-Boxen (*cyclin-box fold*, CBF). Beim CBF handelt es sich um ein α -helikales Bündel (α 1- α 5), wobei eine zentrale, hydrophobe α -Helix (α 3) von vier α -Helices umgeben wird. Charakteristisch für die Anordnung ist eine hohe, strukturelle Robustheit. Die N-terminale CBF (Cyclin A2: 208-303) ist unter den Cyclinen konserviert. Die C-terminale CBF (Cyclin A2: 309-399) hingegen ist von weit höherer Variabilität. Die beiden CBFs werden von einer N- und C-terminalen Helix (Cyclin A2, α N: 179-190; α C: 413-432) eingerahmt. Außerhalb dieses homologen Strukturbereiches können Cycline höchst unterschiedlich aufgebaut sein. Zumeist sind hieran regulatorische Elemente wie z.B. *nuclear localization signals* oder *destruction boxes* angefügt. Die Interaktionsfläche des Heterodimers besteht vorwiegend aus Kontakten zwischen der N-terminalen Subdomäne von Cdk2 und der N-terminalen CBF von Cyclin A sowie der C-terminalen Subdomäne von Cdk2 und der α N-Helix von Cyclin A. Vergleicht man die monomeren und heterodimeren Strukturen miteinander, wird ersichtlich, dass Cdk2 während der Heterodimerisierung einer erheblichen konformationellen Umstrukturierung unterliegt, wohingegen Cyclin A in seiner Konformation nahezu unverändert bleibt [Jeffrey *et al.* 1995]. Die Angriffspunkte der Cdk2-Konformationsänderung stellen vor allen die C-Helix und der *T-Loop* dar. Die C-Helix wird durch die Interaktion mit der N-terminalen CBF in ihrer Ausrichtung verändert. Diese Interaktion verleiht der Cyclin-Erkennung maßgeblich ihre Spezifität, was Ausdruck

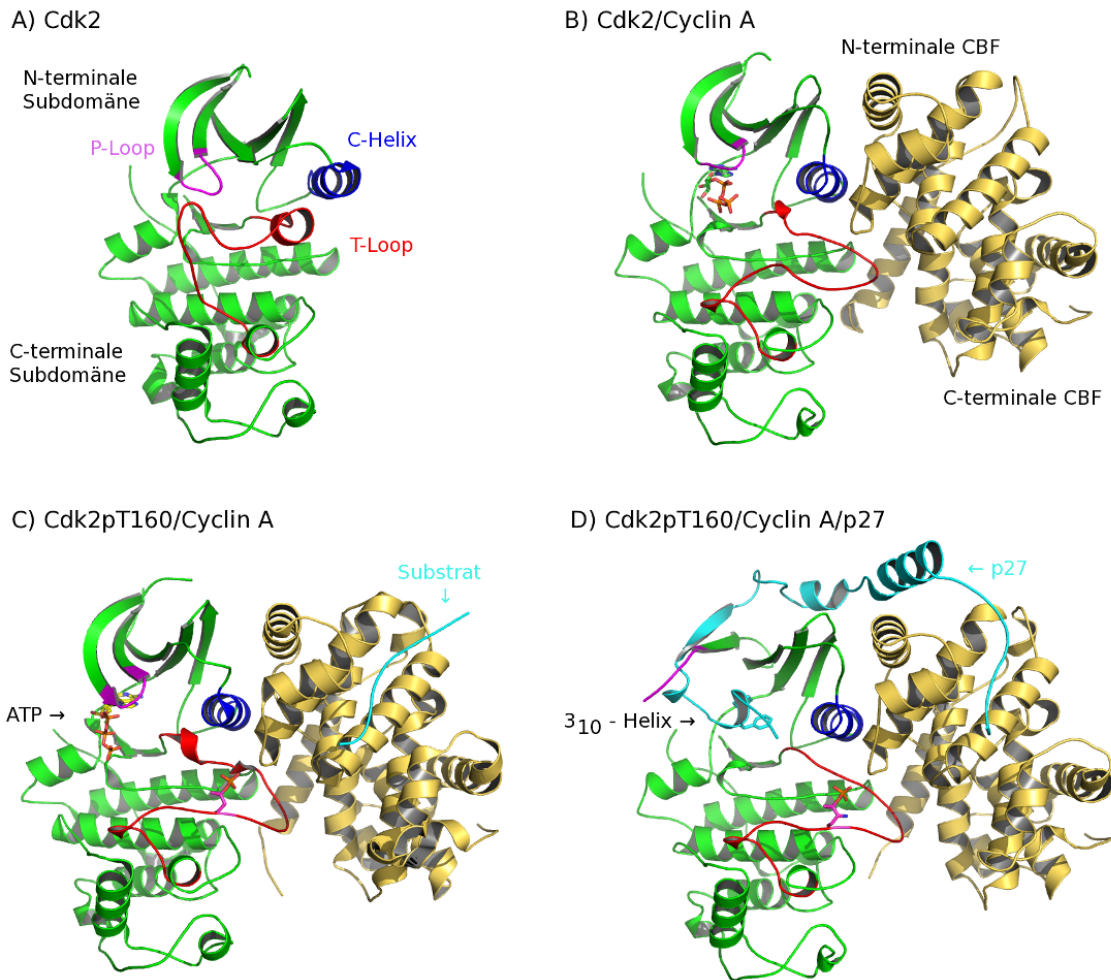


Abb. 1.2: Strukturen unterschiedlicher Cdk2-Komplexe:

A Im monomeren Zustand ist Cdk2 (grün) inaktiv (PDB: 1PW2). **B** Durch Bindung der Cyclin-Einheit (gelb) wird Cdk2 partiell aktiviert. Insbesondere die C-Helix (blau) und der T-Loop (rot) verändern dabei ihre Konformation (PDB: 1FIN). **C** Eine vollständige Aktivierung erlangt Cdk2 erst nach Phosphorylierung von T160 im T-Loop. Hierdurch wird die für den aktiven Zustand erforderliche Konformation des T-Loops stabilisiert. Anhand der Pfeilmarkierungen wird darauf verwiesen, wo das Remote-Substrat und ATP binden (PDB: 2CCH). **D** Durch Bindung von p27 wird Cdk2 inhibiert. Dabei legt sich p27 (cyan) in Form einer 3₁₀-Helix in die ATP-Bindetasche von Cdk2 und in Form einer rigid coil in die remote binding site von Cyclin A (PDB: 1JSU).

in der semi-konservierten Sequenz der C-Helix findet, die für Cdk1 und Cdk2 PSTAIRE lautet. Dabei verdrängt die C-Helix die α L12-Helix, deren α -helikale Struktur daraufhin schmilzt, was wiederum zur Neuausrichtung des T-Loops führt. Der T-Loop wird nach außen exponiert, wobei er mit dem Cyclin A im Bereich zwischen der C-terminalen CBF und der N-terminalen Helix in Kontakt tritt. Somit wird die Bindestelle des Substrats demaskiert. Zwischen dem Lysin K33 des β 3-Stranges und dem Glutamat E55 der C-Helix bildet sich eine unter den Kinasen hochkonser-

vierte Salzbrücke, wodurch das Lysin K33 so positioniert wird, dass es die α - und β -Phosphate des ATPs koordinieren kann, während das zuvor gebundene Aspartat D145 des DFG-Motivs für die Interaktion mit Mg^{2+} freigesetzt wird. Zusammen mit Glutamat E51 vermögen diese katalytischen Reste das γ -Phosphat in eine für den Transfer geeignete Position zu bringen. Hierdurch wird aber nur eine partielle Aktivierung bewirkt; die entsprechende Aktivität liegt bei ca. 0,3%. Für eine vollständige Aktivierung ist die Phosphorylierung von T160 im nun frei liegenden *T-Loop* notwendig. Durch das phosphorylierte pT160 wird die für den aktiven Zustand erforderliche Konformation des *T-Loops* gefestigt. Dabei wird die Phosphatgruppe des pT160 durch drei Arginine (R50, R126 und R150) koordiniert [Russo *et al.* 1996b] [Stevenson *et al.* 2002]. Die korrekte Konformation des *T-Loops* spielt eine wichtige Rolle für die spezifische Substraterkennung. Die Konsensussequenz für $Cdk2^{pT160}$ lautet S/T.P.X.K/R. Der *T-Loop* bildet im aktiven Zustand eine Ausbuchtung, in der das Prolin der Position P+1 der Konsensussequenz passt, und die Phosphatgruppe des pT160 kann mit dem Lysin/Arginin in Position P+3 in Interaktion treten [Brown *et al.* 1999a] [Brown *et al.* 1999b]. Die Substratbindung kann durch eine *remote binding site* des Cyclins unterstützt werden, in der Substrate mit der Konsensussequenz R.X.L. Φ oder R.X.L.X. Φ (wobei Φ eine große, hydrophobe Aminosäure bezeichnet) gebunden werden. Die *remote binding site* wird durch eine konservierte, hydrophobe Spalte auf der Oberfläche der N-terminalen CBF (zwischen $\alpha 1$ und $\alpha 3$) gebildet. Ihre Distanz zum katalytischen Zentrum beträgt ca. 40 Å [Schulman *et al.* 1998][Brown *et al.* 1999a].

Die CKIs der Cip/Kip-Familie inhibieren Cdk2, indem sie die Substratbindung an den beiden Bindestellen unterbinden. Der Cip/Kip-Familie werden p21, p27 und p57 zugeordnet, da sie eine homologe, aminoterminal Domäne von ca. 90 Aminosäuren besitzen, die ihnen ihre Cdk-inhibitorische Funktion verleiht (*kinase-inhibitory domain*, KID). Cip/Kip-Proteine sind intrinsisch unstrukturierte Proteine (IUPs), die erst durch ihre Bindung an Cdk/Cyclin-Komplexe Struktur gewinnen. Die Assoziationsvorgang beginnt mit der Bindung an die Cyclin-Einheit, woran sich der bindungsvermittelte Faltungsmechanismus anschließt [Verkhivker *et al.* 2003] [Lacy *et al.* 2004]. Die Struktur der gebundenen p27-KID (22-106) zeigt, dass sich p27 wie eine Klammer über den Cdk2/Cyc.A-Komplex legt [Russo *et al.* 1996a]. Daher lässt sich die KID in eine N-terminale Cyclin-bindende Subdomäne und eine C-terminale Cdk-bindende Subdomäne unterteilen. Als Linker beider Subdomänen fungiert eine α -Helix. p27 bindet N-terminal in Form einer *rigid coil* (25-34) mit seinem R.X.L.F-Motiv an die *remote binding site* von Cyclin A, ohne dabei dessen Konformation zu verändern. Somit vermag p27 Substrate kompetitiv von der *remote binding site* zu verdrängen. Die Bindung von p27 an Cdk2 führt hingegen zu einer Umstrukturierung der N-terminalen Subdomäne. Denn p27 umspannt als β -hairpin (61-71) die β -Faltblattstruktur der N-terminalen Subdomäne und insertiert selbst als β -Strang (75-81) in die β -Faltblattstruktur. Dadurch wird der $\beta 1$ -Strang verdrängt und der *P-Loop* aufgelöst, so dass die ATP-Bindetasche geöffnet wird. Mittels einer 3_{10} -Helix (85-90) legt sich p27 in das

katalytische Zentrum. Von der 3_{10} -Helix ragt ein Paar aromatischer Aminosäurereste (F87 und Y88) in die ATP-Bindetasche, die die Position der Adenin-Base des ATPs einnehmen. Obwohl p27 nicht nur das ATP verdrängt, sondern auch die ATP-Bindetasche verformt, reicht bereits die Phosphorylierung von p27Y88 aus, um die Cdk-Einheit im trimären Komplex partiell zu aktivieren. Dabei wird die 3_{10} -Helix aus dem katalytischen Zentrum freigesetzt [Chu *et al.* 2007] [Grimmler *et al.* 2007]. Dies verdeutlicht, dass die p27-Inhibitorfunktion durch kleine Modifikationen entscheidend beeinträchtigt werden kann.

1.2 Aufgabenstellung

Ein Hauptaugenmerk der pharmazeutischen Forschung liegt auf der Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von Krebserkrankungen. Von Nutzen hierfür ist das in den letzten Jahrzehnten entwickelte Verständnis über die Grundzüge der molekularen Maschinerie, die der Regulation des Zellzyklus zugrunde liegt. Von zentraler Bedeutung hierfür sind die Cdks und ihre übergeordneten Regulatoren. Um das für Tumore charakteristische unkontrollierte Zellwachstum zu bremsen, sind z.B. gezielt Cdk-Inhibitoren wie Flavopiridol und Roscovitin entwickelt worden [Blagden & de Bono 2005] [Krystof & Uldrijan 2010]. Hingegen ist bislang weitestgehend unberücksichtigt geblieben, dass die Kenntnisse über die Zellzyklusregulation es auch erlauben, mögliche Angriffspunkte zur Entwicklung regenerativer Wirkstoffe zu definieren. Fraglich ist also, ob nicht in Analogie zu den Cdk-Inhibitoren ein Cdk-Aktivator gefunden werden kann. Eine dauerhafte, direkte Cdk-Aktivierung könnte jedoch ein unkontrolliertes Zellwachstum induzieren. Um die Zellproliferation nur zu erleichtern anstatt sie direkt anzutreiben, bietet es sich an, die CKI-Inhibitoraktivität zu reduzieren. Ein besonders geeignetes Zielobjekt hierfür ist p27, da es in seiner Funktion als CKI eine Schlüsselposition in der Errichtung des Restriktionspunktes einnimmt. Bereits eine partielle Aufhebung der p27-Inhibierung kann hinreichend sein, um einen vermehrten Eintritt in den Zellzyklus herbeizuführen. Denn sofern hierdurch genügend initiales Cdk2 aktiviert wird, induziert die Cdk2-Aktivität den Abbau von p27. Durch diese positive *Feedback*-Schleife wird somit eine lawinenartige Aktivierung von Cdk2 bewirkt (siehe Abschnitt 1.1.5). Daher stellt die p27-Bindung an Cdk2-Komplexe aus zellbiologischer Sicht einen attraktiven Angriffspunkt für die Entwicklung eines solchen Wirkstoffes dar.

Jedoch offenbart eine Strukturanalyse, dass p27 sich wie eine Klammer um den Cdk/Cyclin-Komplex legt. Somit besitzt diese Protein-Protein-Interaktion eine relativ große Kontaktfläche. Dies findet u.a. darin Ausdruck, dass p27 an beide Komplex-Unterheiten mit hoher Affinität bindet. Daher handelt es sich bei der Aufgabe, die p27-Bindung zu lösen, um ein durchaus anspruchsvolles Unterfangen. Es ist aber bereits gezeigt worden, dass bestimmte kovalente Modifikationen, wie z.B. die Phosphorylierung von p27Y88, zu einer zumindest partiellen Verdrängung der p27-Bindung und Reaktivierung von Cdk2 führen können (siehe Abschnitt 1.1.6).

Ziel dieser Arbeit ist es, eine wirkstoffähnliche Substanz zu identifizieren, die in ähnlicher Weise p27 verdrängen und somit Cdk2 reaktivieren kann. Hierzu soll zunächst ein hochdurchsatztaugliches *Screening*-System etabliert werden, um anschließend Sammlungen wirkstoffähnlicher Substanzen auf ihr Potential testen zu können, die p27-Bindung zu beeinträchtigen. Die dabei positiv bewerteten Substanzen sollen anschließend anhand sekundärer Assays und zellulärer Versuchsreihen validiert und charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid-Mix: 30%ig (v/v) Acrylamid, 0,8% (v/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
Agar (AppliChem, Darmstadt)
Agarose (Bioline, Luckenwalde)
Ammoniumpersulfat (APS) (Serva, Heidelberg)
 γ [³²P]ATP (Hartmann Analytics, Braunschweig)
Benzamidin-Hydrochlorid (Merck, Darmstadt)
Bradford Reagenz (Biorad, München)
Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)
CaCl₂ (Merck, Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva, Heidelberg)
p-Cumarsäure (Merck, Darmstadt)
DAPI (AppliChem, Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
DMEM (Invitrogen, Karlsruhe)
dNTPs (Fermentas, St. Leon-Rot)
Eosin Y (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Essigsäure (J. T. Baker, Deventer, NE)
Ethanol (J. T. Baker, Deventer, NE)
Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Ethyldiamintetraacetat (EDTA) (Merck, Darmstadt)
Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA) (Merck, Darmstadt)
GlutaMax (Invitrogen, Karlsruhe)
Glycerin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Hefeextrakt (BactoYeast Extract) (Becton Dickinson, Sparks, USA)
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Imidazol (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK)
Isopropylthiogalactosid (IPTG) (Duchefa)

Isopropanol (2-Propanol) (Merck, Darmstadt)
K₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Kaliumacetat (Merck, Darmstadt)
KCl (Merck, Darmstadt)
KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)
Kalilauge (Merck, Darmstadt)
Luminol (Sigma-Aldrich, Schnellendorf)
Magnesiumacetat (Merck, Darmstadt)
Merbromin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Methanol J. T. Baker, Deventer, NE MgCl₂ · 6 H₂O (Merck, Darmstadt)
MgCl₂-Lösung, 4,9 mol/l, titriert (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Milchpulver (Roth, Karlsruhe)
MnCl₂ (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt)
Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt)
NaCl (Merck, Darmstadt)
NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)
NaHCO₃ (Merck, Darmstadt)
NaN₃ (Merck, Darmstadt)
Natronlauge (Merck, Darmstadt)
Natriumacetat (Merck, Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Merck, Darmstadt)
NiSO₄ · 6 H₂O (Merck, Darmstadt)
NF449 (Tocris Bioscience, Bristol, UK)
Pepstatin A (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Phosphoenolpyruvat (PEP) (Roche, Mannheim)
Phosphorsäure, 85% (J. T. Baker, Deventer, NE)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim)
Protoporphyrin IX (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Saccharose (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Salzsäure, 37 %ig (Roth, Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Merck, Darmstadt)
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert (NADH) (Roche, Mannheim)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (Merck, Darmstadt)

Triton X-100 (Merck, Darmstadt)

Xylenecyanol (Appllichem, Darmstadt)

Wasserstoffperoxid 30%ige Lösung in H₂O (Sigma-Aldrich, Schnelldorf)

2.1.2 Antibiotika

Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Penicillin (Gibco, Paisley, UK)

Streptomycin (Gibco, Paisley, UK)

2.1.3 Antikörper

Die im Folgenden aufgelisteten Antikörper wurden je nach Angabe zur Immunodetektion von Western-Blots (WB) oder zur Immunopräzipitation (IP) verwendet.

1. Antikörper	Hersteller	Wirt	Klonalität	c [g/l]	Anwendung
α -Actin, C4	Santa Cruz	Maus	monoklonal	n. a.	WB: 1:10 ³
α -Caspase3	Cell Signaling	Kaninchen	polyklonal	n. a.	WB: 1:10 ³
α -Caspase3, cleaved	Cell Signaling	Kaninchen	polyklonal	n. a.	WB: 1:10 ³
α -Cdk2, M2	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	0,20	WB: 1:10 ³ IP: 1,4 μ g
α -Cyc.A, H432	Santa Cruz	Kaninchen	polyklonal	0,20	WB: 1:10 ³
α -Cyc.E, C19	Delta-Biolabs	Kaninchen	polyklonal	0,20	WB: 4:10 ⁴
α -normal-rabbit	Santa Cruz			0,40	IP: 1,4 μ g
α -PARP	Cell Signaling	Kaninchen	polyklonal	n. a.	WB: 1:10 ³
α -p27[Kip1]	BD Biosciences	Maus	monoklonal	0,25	WB: 1:10 ³

Tab. 2.1: Primäre Antikörper

2. Antikörper	Hersteller	Konjugat	c [g/l]	Anwendung
α -Kaninchen IgG	Amersham	Peroxidase	1,5	WB: 1:10 ⁴
α -Maus IgG	Amersham	Peroxidase	1,5	WB: 1:10 ⁴

Tab. 2.2: Sekundäre Antikörper

Desweiteren wurden die fluorophormarkierten Antikörper α -GST-Eu³⁺-Cryptate (EuK) und α -His-X1665 (beides Produkte von Cisbio Bioassays, Codolet, F) zur Etablierung eines HTRF-Assays verwendet.

2.1.4 Proteine/Enzyme

Alkalische Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIAP) (Roche, Mannheim)
Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin)
Histon H1 (Upstate, NY, USA)
Laktatdehydrogenase (LDH) (Roche, Mannheim)
Phusion Polymerase (Finnzymes, Vantaa, FIN)
Pyruvatkinase (PK) (Roche, Mannheim)
Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot oder New England Biolabs, Frankfurt)
Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
RNAse A (Serva, Heidelberg)
Trypsin/EDTA Solution (Biochrom, Berlin)

Die rekombinant in *E. coli* produzierten, humanen Proteine *Dynamain 1* (Dyn1) und *Dynamain-related protein 1* (Drp1) wurden dankenswerterweise von Jayashankar Selvadurai zur Verfügung gestellt, um sie als Testsubstrate für Cdk2/Cyclin A insbesondere in den FRET-Assays einsetzen zu können.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml Multiply-PCR-Gefäße (Saarstedt, Nümbrecht)
1,5 ml Zentrifugiergefäße (Hettich Lab Technology, Tuttingen)
6 well Zellkulturplatte (Sarstedt, Nümbrecht)
96 well Zellkulturplatte (Sarstedt, Nümbrecht)
96 well Nunc #260836 (Thermo Fisher, Wyman St Waltham, MA, USA)
384 well black Corning #3544 (Corning, Lowell, MA, USA)
1536 well white Corning #3725 (Corning, Lowell, MA, USA)
Monolith NT Capillaries (NanoTemper Technologies, München)
Nitrocellulose-Membran (Serva, Heidelberg)
Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig)
Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA)
Petrischale P100 100x20 mm (Sarstedt, Nümbrecht)
Petrischale P60 60x16 mm (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Pipettenspitzen (Saarstedt, Nümbrecht)
Polypropylen-Einfrierröhrchen (Cryotube, Nunc, Wiesbaden)
Röntgenfilme (Kodak, Stuttgart)
Säulenmaterial Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, München)
Säulenmaterial Ni-NTA superflow (Qiagen, Hilden)

Säulenmaterial Protein A-Sepharose (GE Healthcare, München)

Skalpell (FEATHER, Osaka, Japan)

Vivaspin Konzentratoren (Vivascience AG, Littleton, MA, USA)

Whatman-Filterpapier (Omnilab, Elbingeröder)

2.1.6 Sonstige Materialien und Gerätschaften

Äkta purifier 10 (Amersham Pharmacia, Freiburg)

XK16/20 Säulen (Amersham Pharmacia, Freiburg)

HiTrap ResourceQ (Amersham Pharmacia, Freiburg)

HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Superloop 50 und 150 ml (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Sampleloop 7.8 ml (Amersham Pharmacia, Freiburg)

Peristaltische Pumpe Minipuls 2 (Gilson, WI, USA)

Pipetten 2-1000µl (Gilson, WI, USA)

Magnetrührer (Kern, Bahlingen)

Analysewaage AE 200 (Mettler Toledo, Gießen)

Elektronische Waage (Satorius, Göttingen)

Mikrowelle (Samsung, Schwalbach)

Chemidoc, Geldokumentationssystem (Biorad, München)

Mini Protean (Biorad, München)

Mini Trans-Blot Cell, Western-Blot-Apparatur (Biorad, München)

Trans-Blot SD, Western-Blot-Apparatur (Biorad, München)

Power-Pac 300, Spannungsquelle (Biorad, München)

SensoQuest labcycler SensoQuest (Göttingen Thermoblock)

Flex Cyclor (Analytik Jena, Jena)

NT.015T (NanoTemper Technologies, München)

Viscotek-802-DLS (Malvern Instruments, Westborough, MA, USA)

Mikroskop CK 2 (Olympus, Hamburg)

Leica DM 5000 B (Leica, Wetzlar)

Leica DMI 6000 B (Leica, Wetzlar)

Zellzählkammer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen)

Durchflusszytometer BD LSR2 (BD, Heidelberg)

Photometer DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)

Cary-Eclipse Fluoreszenzspektrometer mit Mikrotiterplatten-Scanner (Varian, Darmstadt)

Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher, Wyman St Waltham, MA, USA)

FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg)

Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Fisher, Wyman St Waltham, MA, USA)
Safire 2 (Tecan, Männedorf, CH)
Victor 5 (PerkinElmer, Boston, MA, USA)
Sanyo CO2 incubator MCO-18AIC (Heraeus, Hanau)
Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Orbital Shaker (Thermo Forma, MA, USA)
Gyrotory Shaker G2 und G10 (New Brunswick Sci., USA)
Vortex-3 (IKA, Staufen)
Ultraschallgerät Sonoplus UW 2200 (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultrazentrifuge Optima LE-80 K mit Rotoren 70 Ti und 45 Ti (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
Ultrazentrifuge Optima Max mit Rotor TLA 120.1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
Zentrifuge Avanti J-20 XP mit Rotoren JLA 16.250 und JA 25.50 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
Zentrifuge Avanti J-HC mit Rotor TY.JS 4.2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge Megafuge 1.0 R (Heraeus, Hanau)

2.1.7 Kommerzielle Kits und Standards

Bio-Rad Protein Assay Kit (Biorad, München)
Phusion High Fidelity PCR Kit (Finnzymes, Vantaa, FIN)
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford, USA)

Größenmarker für DNA:

GeneRuler 1 kb DNA ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

Größenmarker für Proteine:

Prestained Protein Marker, Broad Range (New England Biolabs, Frankfurt)

PageRuler Unstained Protein Ladder, (Fermentas, St. Leon-Rot)

PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)

2.1.8 Bakterienstämme

Für Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet. Als codonoptimierter Expressionsstamm für rekombiante Fusionsproteine diente der *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS. In der folgenden Tabelle sind deren Genotypen und Referenzen aufgelistet.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) <i>plySRARE (Cam^R)</i>	[Hanahan 1983]; Novagen
DH5 α	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZY A-argF</i>) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺)</i> <i>deoR supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen

2.1.9 Expressionsvektoren

Die hier verwendeten Expressionsvektoren dienen dazu, die rekombinante Produktion der humanen Proteine Cdk2, Cyclin A und p27 in *E. coli* zu ermöglichen. Die cDNA der Proteine wurde über die Schnittstellen der *multiple cloning sites* (MCS) in die entsprechenden Expressionsvektoren eingefügt. Bei den Expressionsvektoren pET19b-Vec154, pET19b-Vec155 und pET19b-Vec157 handelt es sich um modifizierte pET19b-Vektoren (Novagen). Die pET19b-Vektoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie *upstream* der MCS einen His-Anhang kodieren, der während der Expression somit N-terminal mit dem Zielprotein fusioniert wird. Die Expression ist über einen T7-Promotor ansteuerbar. pET19b-Vec154 enthält zusätzlich die cDNA von eYFP für eine N-terminale Fusion, pET19b-Vec155 die cDNA von eCFP für eine N-terminale Fusion und pET19b-Vec157 die cDNA von eYFP für eine C-terminale Fusion. Die anderen Expressionsvektoren besitzen einen recht ähnlichen Aufbau. Der Expressionsvektor pMAL-c2X (New England BioLabs) enthält *upstream* der MCS das *malE*-Gen, welches für ein N-terminales fusioniertes *maltose-binding protein* (MBP) kodiert. Der Expressionsvektor pPROEXTHa (Invitrogen) kodiert einen N-terminalen His-Anhang und pGEX-5x-3 (GE Healthcare) einen N-terminalen GST-Anhang. Alle hier verwendeten Expressionsvektoren verleihen eine Ampicillin-Resistenz, welche als Selektionsmarker dient. Zur Plasmidproduktion besitzen die Expressionsvektoren einen *high-copy-number E. coli* Plasmid Replikationsursprung. Über eine *lac*-Operon-Einheit wird mittels IPTG die Expression der Proteine induziert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierung der Expressionskonstrukte

Für die Klonierung wurden die zu integrierenden DNA-Fragmente, die sogenannten *Inserts*, und die Expressionsvektoren zunächst in Form von Plasmiden aus *E. coli* gewonnen und anschließend mit kompatiblen Schnittstellen versehen. Hierzu wurden Plasmidisolierungen und Restriktionsspaltungen im präparativen Maßstab durchgeführt. Sofern die *multiple cloning sites* (MCS) des Vektors für das *Insert* keine geeigneten kompatiblen Schnittstellen aufwiesen, wurde das *Insert* über PCR amplifiziert, wobei geeignete Schnittstellen über die eingesetzten *Primer* angefügt wurden. Nach den Restriktionsspaltungen wurden die *Inserts* und Vektoren gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und anschließend ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden kompetente *E. coli* transformiert. Zur Validierung der Klone wurden Plasmidisolierungen mit sich anschließenden Restriktionsspaltungen im analytischen Maßstab durchgeführt. Sofern hierbei Klone positiv gewertet wurden, folgte eine präparative Plasmidisolierung. Die Plasmid-DNA wurde anhand von Sequenzierungen (GATC Biotech) der *Inserts* verifiziert.

Plasmidisolierung

Um die Plasmid-DNA isolieren zu können, müssen die *E. coli* zunächst aufgeschlossen werden. Hierfür empfiehlt sich die alkalische Lyse, durch die sich bereits ein Großteil der bakteriellen Proteine und Membranen sowie das bakterielle Genom entfernen lässt [Birboim & Doly 1979]. Die alkalische Lyse führt zunächst auch zur Denaturierung der Plasmid-DNA. Aber während die beiden Stränge der Plasmid-DNA nach dem Neutralisieren relativ rasch hybridisieren, verbleibt insbesondere die weit größere chromosomale DNA im denaturierten Zustand und fällt aus. Die Plasmid-DNA lässt sich aus der löslichen Fraktion mittels einer Anionenaustausch-Chromatographie isolieren.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte im mini- oder midipräparativen Maßstab mittels des *QIAprep Spin Miniprep Kits* oder des *QIAGEN Plasmid Midi Kits*. Die Durchführung orientierte sich an den Empfehlungen des Herstellers Qiagen.

Für die Minipräparation wurden 3 ml LB Medium inklusive Ampicillin mit der jeweiligen *E. coli* Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die *E. coli* wurden bei 3500 g abzentrifugiert und in P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die *E. coli* lysiert, indem durch Zugabe von P2-Puffer ein alkalischer Zellaufschluß eingeleitet wurde. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die alkalische Lyse durch Neutralisation mittels Zugabe von N3-Puffer gestoppt. Die in der unlöslichen Fraktion enthaltenen Proteine und chromosomale DNA wurden mit einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert. Um die

Plasmid-DNA aus der löslichen Fraktion zu isolieren, wurde der Überstand auf eine *QIAprep-spin*-Säule gegeben, welche die Plasmid-DNA bindet. Die gebundene Plasmid-DNA wurde mit PE-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mittels EB-Puffer.

Die Midipräparation entspricht in ihrer Durchführung im Wesentlichen der Minipräparation; da jedoch der präparative Maßstab vergrößert wird, sind größere Volumina, längere Inkubationszeiten und Zentrifugationsschritte mit höheren Zentrifugalkräften erforderlich. So wurden für die Midipräparation 50 bis 100 ml statt 3 ml LB Medium angeimpft. Die Resuspension und der Zellaufschluß erfolgten wie zuvor beschrieben. Zur Neutralisation der alkalischen Lyse diente P3-Puffer (anstatt N3-Puffer). Es folgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis, um eine möglichst vollständige Präzipitation erzielen zu können. Nach Zentrifugation bei 5000 g wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand an *tip-100*-Säulen (Qiagen) gebunden. Die gebundene Plasmid-DNA wurde mit QC-Puffer gewaschen und mit QF-Puffer eluiert. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Eluat mittels Isopropanol gefällt und für 30 Minuten bei 6000 g abzentrifugiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in EB-Puffer aufgenommen.

Zur Bestimmung von Reinheit und Menge der isolierten DNA wurde das Absorptionsspektrum von 240 - 320 nm einer in dest. Wasser verdünnten Probe gemessen. Bei der Konzentrationsberechnung wird davon ausgegangen, dass eine Konzentration von 50 µg/ml DNA bei 260 nm eine Absorption von 1,0 aufweist, wenn die Küvettendicke 1 cm beträgt:

$$c_{DNA} = 50 \mu\text{g/ml} \rightarrow \text{Abs}_{260\text{nm}}^{1\text{cm}} = 1,0$$

Luria Bertani (LB)-Medium:

10 g/l Pepton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA

Die Produkte der Plasmidisolierung lassen sich anhand des Musters ihrer Restriktionsspaltungsprodukte analysieren. Gegebenenfalls können für präparative Zwecke mittels Restriktionsspaltungen bestimmte DNA-Fragmente (*Inserts*) aus Vektoren herausgeschnitten bzw. Vektoren geöffnet werden, um sie somit zu linearisieren. Die hierfür verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Fermentas oder New England Biolabs bezogen.

Die Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA wurde gemäß der Empfehlung des Herstellers für die jeweiligen Restriktionsenzyme durchgeführt. Auch die mitgelieferten Puffer wurden

verwendet. Generell wurden ca. 1 bis 3 U Restriktionsenzym pro 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1-2 h unter optimalen Bedingungen.

Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Um eine Selbstligation des linearisierten Vektors zu vermeiden, empfiehlt es sich, den Vektor nach der Restriktionsspaltung mittels der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) zu dephosphorylieren. Erforderlich ist dies aber nur, wenn bei der Linearisierung des Vektors zu sich selbst kompatible Enden erzeugt worden sind.

Nach der Restriktionsspaltung wurde der Restriktionsansatz direkt mit 1 U CIAP (Fermentas) versetzt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 3 h bei 37°C.

Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) lassen sich DNA-Sequenzen spezifisch amplifizieren [Saiki *et al.* 1988]. Für die Amplifizierung werden zwei synthetische Einzelstrang-Oligonukleotide, sogenannte *Primer*, benötigt, die jeweils mit einem Ende der zu amplifizierenden Sequenz der *Template*-DNA hybridisieren. Die Amplifizierung vollzieht sich in mehreren sich wiederholenden Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht, die bei unterschiedlicher Temperatur ablaufen. Im ersten Schritt wird durch Erhitzen auf 98°C die *Template*-DNA denaturiert, so dass es zur Einzelstrangbildung kommt. Im zweiten Schritt wird durch Abkühlung auf die *Primer-Annealing*-Temperatur die Hybridisierung von Primer und *Template*-DNA ermöglicht. Im dritten Schritt wird durch Erhitzen auf 72°C die Polymerase aktiviert, welche die hybridisierten Primer unter Synthese des komplementären DNA-Strangs elongiert, so dass eine neue *Template*-DNA entsteht.

Substanz	Konzentration	Schritt	Temp.	Dauer
Template	0,2 ng/µl	Initiale Denaturierung	98°C	120 s
Phusion	0,02 U/µl	Denaturierung	98°C	20 s
5'Primer	0,5 µM	Primer-Annealing	42-68°C	30 s
3'Primer	0,5 µM	Elongation	72°C	40 s/kb
dNTPs	200 µM	Anzahl der Zyklen	30	
		Finale Elongation	72°C	10 min

Tab. 2.3: Typische Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes sowie Profil eines PCR-Programms

Als Polymerase wurde die *Phusion High-Fidelity DNA polymerase* des *Phusion High fidelity PCR kits* (Finnzymes) verwendet. Sie weist aufgrund ihrer 3'→5' *proofreading*-Funktion eine

äußerst geringe Fehlerrate auf. Zudem fand der mitgelieferte HF-Puffer (Finnzymes) Anwendung. Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 20-100 µl mit dem *SensoQuest Labcycler* (SensoQuest) durchgeführt. Die Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes sowie die typischen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.3 angegeben.

Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich die DNA-Produkte z.B. aus PCR oder Restriktionsspaltungen ihrer Größe nach auftrennen. Die resultierende Bandenverteilung ermöglicht Rückschlüsse auf die Produktzusammensetzung.

Die Agarosegele bestanden zumeist aus 0,5 bis 1% Agarose in TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit Probenauftragspuffer versetzt. Als Größenreferenz diente der *GeneRuler 1 kb DNA ladder* (Fermentas). Nach Probenauftrag wurde die Elektrophorese bei 120 V mit TAE-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Die DNA-Banden auf den Gelen wurden für 10 min mit einer 0,04%igen Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Der Hintergrund wurde für mindestens 10 min mit Wasser entfärbt. Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurden unter UV-Licht visualisiert. Für präparative Zwecke wurden die entsprechenden DNA-Banden gegebenenfalls ausgeschnitten, um so deren DNA isolieren zu können.

TAE-Puffer:

40 mM Tris, pH: 8,5

2 mM Essigsäure

20 mM EDTA

6x Probenauftragspuffer:

50 mM EDTA

0,25% Bromophenolblau

0,25% Xylenecyanol

30% Glycerol

DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA lässt sich aus den Agarosegelen isolieren. Hierzu wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel aus-

geschnitten. Das Gelstück wurde in 0,3 ml OG-Puffer pro 0,1 g Gel durch Erhitzen auf 50°C aufgelöst. Die Lösung wurde auf eine *QIAquick-spin*-Säule gegeben. Nach Zentrifugation wurde die an der Säule gebundene DNA mit PE-Puffer gewaschen und anschließend mit EB-Puffer eluiert.

Ligation linearer DNA

Als Ligation wird die enzymatische Verknüpfung der 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden von Nukleinsäuren durch sogenannte Ligasen bezeichnet. Um kompatible Enden linearisierter Vektoren und DNA-Inserts aus Restriktionsspaltungen bzw. PCRs zu ligieren, kann die T4 DNA-Ligase verwendet werden.

Je Ligrationsansatz wurden ca. 100 ng linearisiertes Plasmid eingesetzt. Hierzu wurde ein ca. 5-facher molarer Überschuss an *Insert* hinzugefügt. Die Ligation erfolgt im Ligasepuffer. Die Ligation wurde durch Zugabe von ca. 2 bis 10 U T4 DNA-Ligase gestartet (Fermentas). Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ligrationsansatz für die Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

Transformation hitzekompetenter *E. coli*

Ca. 100 ng Plasmid-DNA wurden zu ca. 250 µl kompetenter *E. coli* DH5α gegeben und der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock wurde der Ansatz 60 s lang auf 42°C erhitzt. Nach Abkühlen wurde LB-Medium hinzugefügt. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Ein 50 µl Aliquot dieses Ansatzes wurde auf eine Ampicillin-haltige LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Agar:

1.5% Agar in LB-Medium

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die Zellkultur ermöglicht es, bestimmte Zelllinien außerhalb des Organismus unter definierten Bedingungen zu kultivieren. Adhärente Zelllinien zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich an die Oberfläche des Kulturgefäßes anhaften. Die in dieser Arbeit verwendeten adhärenenten Zelllinien sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Zelllinie	Eigenschaft	Referenz
HeLa	Aneuploide, epitheloide Cervixkarzinom Linie, human	[Jones et al. 1971]
MEF	Primäre embryonale Fibroblasten der Maus	

Tab. 2.4: *adhärente Zelllinien*

Die Zellen wurden in Kulturmedium in Petrischalen variabler Größe bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Verhinderung von Bakterienwachstum wurde dem Kulturmedium 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Um die Zellen mit ausreichend Nährstoffen und Platz versorgen zu können, wurden die Zellen ca. alle 3 Tage vor Erreichen der Konfluenz passagiert.

Dazu wurden die Zellen zunächst vom Boden der Petrischale gelöst, indem die Zellen nach Waschen mit PBS für 3 min mit 10 x Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert wurden. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe des FCS-haltigen Kulturmediums gestoppt. Dabei wurden die Zellen ca. 1/3 bis 1/6 verdünnt und auf neue Petrischalen ausgesät. Falls für Experimente das Aussäen einer definierten Anzahl an Zellen erforderlich war, wurde die Zellzahl zuvor mittels einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop ausgezählt.

Um die Zellen dauerhaft lagern zu können, wurden sie eingefroren. Hierzu wurden die Zellen in FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Je 1ml Suspension wurde in die Einfriergefäße aliquotiert. Diese wurden in Papier eingewickelt und bei -80°C möglichst langsam eingefroren. Wenn die Zellen wieder gebraucht wurden, wurden sie bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in Kulturmedium überführt und anschließend ausplattiert.

Kulturmedium:

DMEM

10% FCS

1% Glutamax

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

PBS:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

pH: 7,4

2.3.2 Untersuchung der Zellvitalität mittels des MTT-Assays

Die Zellvitalität einer kultivierten Zellpopulation ist mittels des MTT-Assays bestimmbar. Daher lässt sich hiermit auch untersuchen, inwieweit die Behandlung mit einer bioaktiven Substanz sich zytotoxisch auswirkt. Das Messprinzip des MTT-Assays beruht darauf, dass die metabolische Aktivität lebender Zellen sich kolorimetrisch über den Umsatz des Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) quantifizieren lässt. Denn das gelbe, wasserlösliche MTT wird in lebenden Zellen durch die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität zum blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert, dessen Absorption nach Überführung in organische Lösungsmittel zwecks Quantifizierung photometrisch detektiert werden kann [Mosmann 1983].

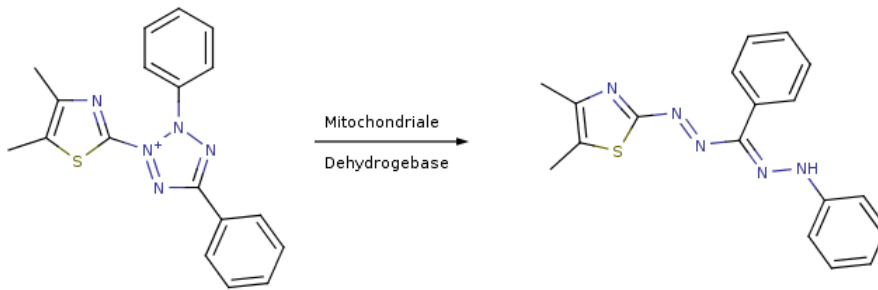


Abb. 2.1: Reaktionsschema der Reduktion von MTT

Die Durchführung des MTT-Assays erfolgte im 96-Well-Plattenformat. Hierzu wurden 50.000 Zellen pro Well ausgesät. Die zu testende Substanz wurde in unterschiedlichen Verdünnungen hinzugefügt, wobei das Endvolumen 180 μ l pro Well betrug. Die Verdünnungsreihe der Substanz erfolgte zuvor im Kulturmedium. Der Anteil an Solvens der Substanz, d.h. im Falle von Merbromin und Eosin Y Wasser, wurde hierbei für alle Bedingungen konstant gehalten. Nach dreitägiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden 20 μ l MTT-Lösung pro Well zugegeben. Während einer vierstündigen Inkubation bei 37°C wurde das MTT von den lebenden Zellen reduziert. Die hierbei gebildeten Formazan-Kristalle wurden bei 4000 x g für 5 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Formazan-Kristalle in 100 μ l pro Well Isopropanol-HCl aufgenommen. Nach vollständigen Lösen der Formazan-Kristalle wurde die Absorption des Formazans bei 590 nm mit dem Mikroplatten-Messgerät FLUOstar Omega (BMG Labtech) bestimmt. Als internes Referenzsignal wurde die Absorption bei 670 nm vermessen.

MTT-Lösung:

5 g/l MTT in PBS

Isopropanol-HCl:

0,1 % HCl in Isopropanol

2.3.3 Durchflußzytofluorimetrie

Mittels der Durchflußzytofluorimetrie lässt sich die Verteilung der Zellzyklusphasen analysieren. Hierzu kann die DNA mit DAPI angefärbt werden, um anhand der Veränderung des DNA-Gehalts Rückschlüsse auf den Verlauf des Zellzyklus ziehen zu können.

Die trypsinbehandelten Zellen wurden mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurden die pelletierten Zellen fixiert, indem 4 ml eisgekühltes 70% Ethanol unter kontinuierlichem Mischen (*Vortexen*) langsam zugetropft wurden. Für die Färbung wurden die fixierten Zellen wiederum abzentrifugiert und das Pellet mit PBS inklusive 1% BSA gewaschen. Die Zellen wurden in 300 bis 500 µl DAPI-Färbelösung aufgenommen und mindestens eine ½h unter Lichtausschluss bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung unter Verwendung des Durchflusszytometers BD LSR2. Hierbei wurden mindestens 10000 Ereignisse aufgezeichnet. Neben der DAPI-Fluoreszenz wurde dabei auch die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung gemessen, woraus sich Informationen über die Grösßen- und Granularitätsmaße der Zellen gewinnen lassen. Die Messdaten wurden mittels der Software FlowJo OSX ausgewertet.

DAPI-Färbelösung:

5% FCS

0,5% Tween

3 mg/l DAPI

0,25 g/l RNase A

in PBS

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Bakterielle Synthese rekombinanter Proteine

Die humanen Proteine Cyclin A, Cdk2 und p27 wurden in *E. coli* überexprimiert und nach Zellaufschluss extrahiert und aufgereinigt.

Expression

In *E. coli* werden weder Cyclin A, Cdk2 noch p27 endogen exprimiert, so dass man sie durch rekombinante Expression in *E. coli* als homotype Proteine produzieren kann. Nachteilig auswirken könnte sich hierbei allerdings, dass eukaryotische Proteine oftmals posttranslational modifiziert werden müssen, um funktionelle Strukturen ausbilden zu können. Es ist aber bereits bekannt, dass dies auf Cyclin A und p27 nicht zutrifft; auf Cdk2 trifft dies nur bedingt zu, da bakteriell synthetisiertes Cdk2 durch Bindung an Cyclin A aktivierbar ist [Welburn & Endicott 2005].

Je nach Expressionsvermögen wurden ca. 2 bis 10 l LB-Medium inklusive Ampicillin mit der jeweiligen Vorkultur angeimpft. Die *E. coli*-Kultur wurde zunächst bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 inkubiert. Die Expression wurde bei der jeweiligen Expressionstemperatur mittels IPTG induziert. Anschließend wurde die Inkubation für weitere 4 bis 6 h fortgesetzt. Die *E. coli* wurden geerntet, indem sie für 20 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Das *E. coli*-Pellet wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt in eisgekühlten Lysepuffer resuspendiert, um die Zellen anschließend aufzuschließen.

Der Aufschluss der *E. coli* geschah mittels Ultraschallbeschallung. Hierzu wurden die *E. coli* mehrmals für ca. 20 s mit dem Gerät Sonoplus (Bandelin electronic) unter Verwendung einer 3/4-Zoll-Spitze auf Eis beschallt. Dabei wurden die Einstellungen *power setting* und *duty cycle* auf 40% und 50% gesetzt. Anschließend wurde das Lysat 45 min lang bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Die lösliche Fraktion wurde im nächsten Schritt einer Affinitätschromatographie unterzogen.

Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie wird der Affinitätsanhang der rekombinanten Proteine spezifisch von einer stationären Phase, dem sogenannten Säulenmaterial, gebunden. Unspezifisch gebundene Moleküle lassen sich durch Waschen zumeist weitestgehend hiervon entfernen. Folglich werden hierbei die am Säulenmaterial gebunden bleibenden Proteine angereichert. Eine schonende Elution der spezifisch gebundenen Proteine wird ermöglicht, indem ein Säulenmaterial-abhängiges Substrat im Überschuss hinzugefügt wird, welches mit der Bindung zwischen Säulenmaterial und Affinitätsanhang interferiert.

So lassen sich z.B. die mit einem His-Anhang rekombinant fusionierten Proteine mittels der immobilisierten Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) aus der löslichen Fraktion von Zelllysaten isolieren [Porath *et al.* 1975]. Denn ein His-Anhang, der ein Sequenzabschnitt aus sechs oder mehr Histidine darstellt, besitzt unter physiologischen pH-Bedingungen eine hohe Affinität zu bestimmten Übergangsmetallen in Form divalenter oder höherwertiger Kationen wie z.B. Ni²⁺ oder Co²⁺ [Hochuli *et al.* 1987]. Hierbei bilden die Übergangsmetalle mit den

Stickstoffatomen der Histidine besonders stabile Chelatkomplexe aus. Bei dem für die IMAC verwendeten Säulenmaterial Nickel-Nitrilotriessigsäure-Sepharose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) werden die Nickelionen durch den vierzähligen, negativ geladenen Chelatbildner Nitrilotriessigsäure an Sepharose-Kügelchen immobilisiert. Die beiden freien Koordinationsstellen können von Histidinresten aus dem His-Anhang besetzt werden. Als eluierendes Reagenz dient überschüssiges Imidazol, welches strukturell der Histidinseitenkette entspricht. Daher kann Imidazol in Konkurrenz mit den gebundenen Polyhistidinen des His-Anhanges treten und somit ihre Verdrängung bewirken.

Analoges trifft auf die Glutathionsepharose-Affinitätschromatographie zu, mittels der sich GST-Fusionsproteine anreichern lassen. Als Säulenmaterial dient Glutathionsepharose (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences), dessen immobilisiertes Glutathion mit hoher Affinität von dem GST-Anhang gebunden wird. Die Elution des immobilisierten Proteins lässt sich durch Zugabe von überschüssigen Glutathion erreichen.

Die Chromatographien erfolgten bei 4°C unter Verwendung des computergesteuerten Flüssigchromatographiesystems ÄKTApurifier 10 (Amersham Biosciences), worin ein Photometer und ein Fraktionssammler integriert sind, um die Elution von Protein anhand der Absorption bei 280 nm verfolgen und das Eluat automatisch fraktionieren zu können. Zunächst wurde die Proteinlösung auf eine mit dem Puffer äquilibrierten Säule aufgetragen. Nach Waschen mit ca. 10 Säulenvolumina wurde das rekombinante Protein eluiert, d.h. im Falle der Glutathionsepharose-Affinitätschromatographie mittels 20 mM Glutathion, im Falle der IMAC mittels eines Imidazolgradientens von 20 bis 250 mM. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels einer SDS-PAGE analysiert. Sofern sie hinreichend reines rekombinantes Protein aufwiesen, wurden die Fraktionen vereinigt und über Nacht dialysiert, um das Imidazol oder Glutathion wieder zu entfernen.

Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Ausschlußchromatographie, bei der Proteine und andere Moleküle ihrer Größe und Form nach getrennt werden. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Mobilität der Moleküle durch ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße. Wenn Moleküle ein kleineres hydrodynamische Volumen besitzen, können sie leichter die Poren des Säulenmaterials durchdringen, wodurch für sie das zu durchquerende Säulenvolumen größer wird. Daher erfahren kleinere, sphärische Moleküle eine längere Aufenthaltsdauer innerhalb der Säule und werden somit erst später eluiert. Der effektive Trennbereich hängt von der Porengröße ab.

Für die Gelfiltration wurde die Säule HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (Amersham

Biosciences) verwendet, welche an das Flüssigchromatographiesystem ÄKTApurifier 10 angeschlossen wurde. Diese Säule ermöglicht die Separierung von Proteinen im Größenbereich von 10 kDa bis 600 kDa. Zunächst wurde das Proteinprodukt aus der Affinitätschromatographie auf die mit dem Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde bei relativ langsamer Flußrate gefahren, d.h. bei ca. 1 ml/min. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden aufgefangen und mittels einer SDS-PAGE analysiert. Sofern sie hinreichend reines rekombinantes Protein aufwies, wurden die Fraktionen vereinigt.

Ultrafiltration

Die Ultrafiltration erlaubt eine Konzentrierung von Makromolekülen, während niedermolekulare Lösungsbestandteile, sofern sie kleiner sind als die Porengröße der Ultrafiltrationsmembran, ausgewaschen werden können.

Das Proteinprodukt wurde durch Zentrifugieren über einem Vivaspin Konzentrator (Vivascience AG) mit einer Ausschlussgrenze von 10, 30 oder 50 kDa eingeeengt. Abschließend wurde das Proteinprodukt aliquotiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

2.4.2 Isolierung endogener Proteine

Endogene Cdk2-Komplexe wurden aus HeLa- oder MEF-Zellen isoliert. Als Methode hierzu diente die Immunopräzipitation.

Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation (IP) ermöglicht es, spezifisch bestimmte Proteine mitsamt ihrer Bindungspartner aus Zelllysaten zu isolieren. Die IP beruht auf der selektiven Erkennung des Zielproteins durch einen spezifischen Antikörper. Der Antikörper wiederum wird an Protein A-Sepharose gebunden, wodurch der Proteinkomplex in eine stationäre Phase überführt wird. In dieser Arbeit wurden IPs durchgeführt, um Cdk2-Komplexe aus MEF- oder HeLa-Zellen zu isolieren.

Die Zellen wurden in eisgekühlten RIPA-Puffer mittels Sonifizierung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert. Mittels des Bradford-Assays wurde die Protein-Konzentration bestimmt. Für jede IP wurden ca. 250 $\mu\text{g/ml}$ Protein in 500 μl RIPA-Puffer eingesetzt. Um einen unspezifisch bindenden Proteinhintergrund möglichst zu vermeiden, wurde das Zelllysate zunächst mit 20 μl Protein A-Sepharose für 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Protein

A-Sepharose wurde abzentrifugiert, der Überstand mit 1,4 µg α -Cdk2 versetzt und für 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Protein A-Sepharose zugegeben, woran sich wiederum eine einstündige Inkubation anschloss. Nach mehrfachen Waschen wurde die immunopräzipitierten Cdk2-Komplexe entweder mittels Kinase-Assays oder Immundetektionen analysiert.

RIPA-Puffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

80 mM mM NaCl

50 mM NaF

20 mM Na₄P₂O₇

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1% (w/v) NP-40

1% (w/v) DOC

0,1% (w/v) SDS

2.4.3 Proteincharakterisierung

Zur Proteincharakterisierung und -identifizierung wurden die Zelllysate oder aufgereinigten Proteinproben einer SDS-PAGE unterzogen. Die hierdurch erzielte gelelektrophoretische Trennung wurde entweder mit einer Coomassiefärbung sichtbar gemacht oder nach Western-blotting auf eine Nitrocellulosemembran spezifisch per Immundetektion auf bestimmte Proteine untersucht. Der Proteingehalt von Zelllysaten wurde anhand von Bradford-Assays bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Proteinprodukte erfolgte mittels Absorptionsmessungen.

Konzentrationsbestimmungen von Proteinproben durch Absorptionsmessung

Laut dem Lambert-Beerschen Gesetz verhält sich die Absorption bei konstanter Messstrecke (z.B. Küvettdicke) und Wellenlänge proportional zur Konzentration, wobei die Proportionalitätskonstante als Extinktionskoeffizient bezeichnet wird. Um die Konzentration eines Proteins per Extinktionsmessung bestimmen zu können, muss daher zunächst sein Extinktionskoeffizient ermittelt werden. Bei bekannter Aminosäuresequenz lässt sich der Extinktionskoeffizient aus den Beiträgen der einzelnen Aminosäurereste aufsummieren. Dies gilt für den Wellenlängenbereich von ca. 250 nm bis 300 nm, in dem hauptsächlich die aromatischen Aminosäurereste absorbieren. Die bei 280 nm absorbierenden Aminosäuren sind Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Cystin (Cys-S-S-Cys), aus deren Anzahl (n) sich der Extinktionskoeffizient (ϵ) berechnen lässt (nach

[Gill & von Hippel 1989]):

$$\epsilon^{280nm} / (M^{-1}cm^{-1}) = 5690 \cdot n_{Trp} + 1280 \cdot n_{Tyr} + 120 \cdot n_{Cys-S-S-Cys}$$

Wenn das Protein rekombinant mit dem fluoreszierenden Protein YFP oder CFP fusioniert ist, kann die Proteinkonzentration auch anhand der YFP- oder CFP-Absorption ermittelt werden, da deren Extinktionskoeffizienten aus der Literatur bekannt sind (YFP: $\epsilon^{514nm} = 84000 M^{-1}cm^{-1}$; CFP: $\epsilon^{434nm} = 26000 M^{-1}cm^{-1}$) [Patterson *et al.* 2001]. Darüber hinaus kann ein Absorptionsspektrum auch schon mögliche Verunreinigungen anzeigen, die sich in einer Verschiebung des Proteinpeaks, der normalerweise bei ca. 280 nm sein Maximum besitzt, bzw. im Auftreten von Nebenmaxima oder in einer Zunahme der Lichtstreuung äußern können.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Absorptionsspektrum von 240 nm bis 320 nm bzw. 600 nm einer im jeweiligen Probenpuffer verdünnten Probe vermessen. Als Basislinie diente der Probenpuffer ohne Protein.

Bradford-Assay

Der Proteingehalt von z.B. Zellysaten kann mit Hilfe des Bradford-Assays ermittelt werden [Bradford 1976]. Der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue-G250* (siehe Abb. 2.2) dient hierbei als Indikator für den Proteingehalt, welcher nach Proteinbindung von einem kationischen Zustand über einen neutralen Zustand in einen anionischen Zustand übergeht. Dieser Übergang ist mit einer Verschiebung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von ca. 470 nm nach ca. 595 nm verbunden. Die Absorptionsänderung bei 595 nm ist hierbei zumindest in erster Näherung proportional zum Proteingehalt. Diese Proportionalität kann mittels einer Eichgerade mit Protein bereits bekannter Konzentrationen ermittelt werden. In der Regel wird hierfür BSA als Standard verwendet.

Die Durchführung des Bradford-Assays erfolgte im 96-Well-Plattenformat als Dreifachbestimmung unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay Kits gemäß den Angaben des Herstellers Bio-Rad. Die Absorption bei 595 nm wurde mit dem Mikroplatten-Messgerät FLUOstar Omega (BMG Labtech) gemessen.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Gelelektrophorese werden elektrisch geladene Makromoleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität, die abhängig ist von Masse, Gestalt und Ladung, sowie aufgrund von Siebeffekten getrennt, die von der Porengröße des verwendeten Gels ab-

hängen. Bei der hier angewandten Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) - Variante (nach [Laemmli 1970]) wird das Detergenz Natriumdodecylsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS), zum Denaturieren von Proteinen hinzugegeben. Bei einer SDS-Konzentration von ca. 0,1% wird ca. ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste gebunden, was durchschnittlich einem Verhältnis 1,4 g SDS pro g Protein entspricht [Lottspeich & Zorbach 1998]. Die SDS-Moleküle umgeben die Proteine als Mizelle. Die SDS-Moleküle stoßen sich mit ihren negativ geladenen Sulfatgruppen gegenseitig ab. Die denaturierten Proteine nehmen dabei eine stäbchenförmige Gestalt an. Da die natürliche Ladung der Proteine im Vergleich zur negativen Ladung, die sich aus der SDS-Bedeckung ergibt, vernachlässigbar ist, erhält man ein ca. proportionales Masse-Ladungsverhältnis. Aufgrund der vergleichbaren Gestalt der denaturierten Proteine hängt die Trennung nur noch von ihrer Molmasse ab; die relative Mobilität eines Proteins verhält sich dabei ca. proportional zum Logarithmus der Molmasse (über eine negative Proportionalitätskonstante). In der Praxis werden als Vergleichssubstanzen molekulare Marker bekannter Molmasse (im Größenbereich des zu untersuchenden Proteins) hinzugegeben. Durch SDS werden kovalente Bindungen zwischen Polypeptidketten nicht gelöst. Um Disulfidbindungen zu lösen, kann ein Disulfidbindungen reduzierendes Agens, wie z.B. 2-Mercaptoethanol, hinzugegeben werden. Aber auch die nichtkovalenten Bindungen bestimmter Strukturelemente können derart stabil sein, dass sie unter den denaturierenden Bedingungen nicht zerfallen, wenn sie nicht kurzzeitig aufgeköcht werden. Dies kann zu einer charakteristischen Veränderung des Laufverhaltens während der SDS-PAGE führen. Ein Beispiel hierfür ist die überaus stabile β -Fass-Struktur fluoreszierender Proteine (siehe Abb. 3.3, Abb. 3.5 und Abb. 3.7).

Um eine gute Auftrennung durch die PAGE erreichen zu können, sollten Polyacrylamidgele möglichst geeigneter Acrylamidkonzentrationen verwendet werden. So sind z.B. für den Nachweis von Proteinen einer Molmasse im Bereich von 30-50 kDa 12%ige Gele geeignet, im Bereich von 50-80 kDa 10%ige Gele (die Prozentzahlen beziehen sich auf die eingesetzte Acrylamidmonomerkonzentration, die Bisacrylamidkonzentration beträgt 2,6% der Gesamtmonomerkonzentration). Über dem eigentlichen Trenngel befindet sich noch ein Sammelgel, das hier zumeist 5%ig ist. Das Sammelgel besitzt größere Poren, einen geringeren pH-Wert und eine geringere Ionenstärke als das Trenngel (siehe Tab. 2.5). Als Puffersystem der Elektrophorese dient ein Tris/Glycin-Puffer. Der pH-Wert des Sammelgels liegt sehr nahe dem isoelektrischen Punkt des Glycins, das deshalb im Sammelgel eine nur geringe Mobilität besitzt, während das Cl⁻ eine hohe Mobilität besitzt. Die Mobilitäten der Protein-SDS-Komplexe liegen dazwischen. Im Bereich hoher Mobilität stellt sich eine niedrigere Feldstärke ein, im Bereich niedriger Mobilität eine höhere, so dass im Sammelgel die Ionen gleich schnell wandern. Die Protein-SDS-Komplexe befinden sich somit in einem Feldstärkegradienten und bilden daher einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten aus. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel wird ihre Geschwindigkeit abrupt verringert. Hierdurch wird eine Konzentrierung der aufgetragenen Probe an der Grenzfläche ermöglicht.

Im Trenngel wird der Feldstärkegradient wieder aufgehoben, da hier Glycin fern von seinem isoelektrischen Punkt ist, so dass es stark beschleunigt wird und die Protein-SDS-Komplexe überholt.

	Trenngele			Sammelgel
Acrylamid	8%	10%	12%	5%
Tris, pH: 8,8	375 mM			
Tris, pH: 6,8				125 mM
SDS	0,1% (w/v)			0,1% (w/v)
APS	0,050% (w/v)			0,080% (w/v)
TEMED	0,017% (v/v)			0,033% (v/v)

Tab. 2.5: SDS-Polyacrylamidgele

Die Gele wurden durch eine radikalische Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (im Verhältnis 37,5 : 1) im Puffer hergestellt. Als Radikalstarter wurde Ammoniumpersulfat (APS) verwendet, welches in zwei Sulfatradikale zerfällt. Als Stabilisator freier Radikale diente N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Vor dem Probenauftrag wurden die Proben 1:4 mit 4x Probenauftragspuffer versetzt. Neben den Proben wurde noch als Molmassenreferenz zumeist 15 µl *Prestained Protein Marker* (der Firma New England Biolabs) in eine der Geltaschen aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde ca. zwei Stunden lang bei 120 V in Elektrophoresepuffer in dem vertikalen Elektrophorese-System von BIO-RAD durchgeführt.

Elektrophorese-Puffer:

200 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

25 mM Tris/HCl, pH 8,3

4x Probenauftragspuffer:

100 mM Tris/HCl

2% (w/v) SDS

2% (v/v) β -Mercaptoethanol

12,5% (w/v) Glycerin

0,01% (w/v) Bromphenolblau

Coomassie-Färbung

Bei der Coomassie-Färbung handelt es sich um eine relativ einfache und schnelle Methode, mit der sich die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden anfärben lassen. Der Farbstoff

der Coomassie-Färbung ist ein Triphenylmethan, der unspezifisch die Proteinbanden blau anfärbt. Hinzu kommt Methanol, welches die Proteine fixiert (siehe Abb. 2.2).

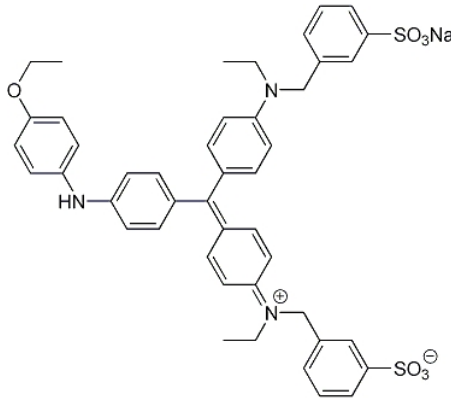


Abb. 2.2: Coomassie-Farbstoff

Die Polyacrylamidgele wurden ca. 15 min in der Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Polyacrylamidgele mehrmals für einige Stunden auf dem Schüttler in einer ca. 40% Ethanollösung gewaschen, bis eine Entfärbung der Hintergrundfärbung erreicht wurde. Die Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt zwischen 1 µg und 0,1 µg.

Coomassie-Färbelösung:

25% Isopropanol

10% Essigsäure

0,05% Coomassie R-250 Brilliant Blue

Western-Blot

Während des Western-Blottings werden die Proteinbanden vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran überführt, um die Proteine für eine immunologische Nachweisreaktion zugänglich zu machen. Dabei wird ein homogenes elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe aus der Gelmatrix in Richtung Anode wandern und dort von der Nitrozellulosemembran gebunden werden. Gel und Membran sind dabei sandwichartig eingerahmt von in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren, die während der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienen.

Das Western-Blotting erfolgte gemäß der Tank-Blot-Variante unter Verwendung einer Nass-Blotapparatur (von BioRad). Hierzu wurden die Whatman-Filterpapiere und Schwämme in Transferpuffer äquilibriert und die Membran kurz mit Methanol aktiviert. Gel und Membran

wurden möglichst luftblasenfrei übereinander gelegt und von beiden Seiten mit je einer Lage Whatman-Filterpapier und Schwamm bedeckt. Dieser Stapel wurde zwischen Anode und Kathode in die Blotapparatur eingespannt. Die Blotapparatur wurde mit eiskaltem Transferpuffer gefüllt und zusätzlich mit einem Eisakku versehen. Für den Transfer wurde für 1 h eine Spannung von 100 V angelegt.

Transferpuffer:

192 mM Glycin

25 mM Tris/HCl, pH 8,3

Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

In der immunologischen Nachweisreaktion wird die Antikörperspezifität gegenüber einem oder mehrere Epitope ausgenutzt, um gezielt ein bestimmtes Protein zu erkennen, was somit auch die spezifische Erkennung eines bestimmten Proteins in Gegenwart zahlreicher anderer Proteine ermöglicht. Der Antikörper-Antigen-Komplex lässt sich detektieren, indem man wiederum einen sekundären Antikörper spezifisch daran binden lässt, an dem ein Enzym konjugiert ist, das eine Färbungs- oder Chemilumineszenzreaktion katalysiert. So katalysiert z.B. die Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Bei dieser Oxidation wird Lumineszenz freigesetzt. Cumarsäure verstärkt die Lumineszenz. Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran sollten vorher z.B. mit Milchpulver abgesättigt werden, da hieran sonst der primäre bzw. sekundäre Antikörper haften bleiben könnte.

Die Membran wurde zunächst eine halbe Stunde in Blockierlösung unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde dann in einem ersten Waschschrift mindestens dreimal fünf Minuten mit TNT-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einer Gebrauchsverdünnung des jeweiligen primären Antikörpers (siehe Tabelle 2.1) über Nacht unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden in einem weiteren Waschschrift entfernt, um die Membran anschließend mit der Gebrauchsverdünnung des sekundären Antikörpers (siehe Tabelle 2.2) versetzen zu können. Nach 1 h Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur folgte wiederum ein Waschschrift. Für die Detektion der Chemilumineszenz wurde die Membran mit ECL-Lösung (ECL-Lsg.1 + ECL-Lsg.2) bedeckt und abschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Blockierlösung:

5% (w/v) Milchpulver in TNT-Puffer

TNT-Puffer:

50 mM NaCl

25 mM Tris-HCl, pH: 7,5

0,05% Tween 20

ECL-Lösung 1:

25 mM Luminol

0,4 mM p-Cumarsäure

100 mM Tris-HCl, pH: 8,5

ECL-Lösung 2

100 mM Tris-HCl, pH: 8,5

0,02 % H₂O₂

Analyse der Proteinbandenverteilung der SDS-PAGEs

Die Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgele oder die Röntgenfilme wurden eingescannt und mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (Vers. 1.44i , National Institutes of Health, USA) und der mathematischen Analysesoftware Origin (Vers. 7.0, Northhampton, MA) analysiert.

Die Analyse-Funktionen von ImageJ ermöglichen es, das Intensitätsprofil einzelner Spuren der SDS-PAGE zu ermitteln und deren Verlauf in ein x-y-Koordinatensystem einzulesen (siehe Abb. 2.3.A und B). Beim Intensitätsprofil wird die Intensität der Proteinbanden gegen R_F aufgetragen. Der R_F -Wert ergibt sich aus dem Verhältnis der zurückgelegten Laufstrecke im Trenngel zur Trenngellänge und ist somit ein Maß für die relative Mobilität eines Proteins im Trenngel. Für die Molmassenbestimmung sind insbesondere die R_F -Werte der Peakmaxima aus den Intensitätsprofilen von Interesse. Die relative Mobilität eines Proteins verhält sich nur in erster Näherung proportional zum Logarithmus der Molmasse. Eine bessere Anpassung ermöglicht eine polynomische Regression 2. Ordnung. Durch sie kann anhand der bekannten Molmassen des Protein-Markers dem Protein-Laufverhalten eine mathematische Gleichung zugeordnet werden, die dessen Abhängigkeit zur Molmasse zumeist relativ gut beschreibt. Die Regression anhand der Marker-Daten und die anschließende Molmassenberechnung für die Proteinprobe lässt sich mit Origin durchführen (siehe Abb. 2.3.C).

Desweiteren können auch die Intensitäten der Proteinbanden benachbarter Spuren miteinander verglichen werden, um evtl. Unterschiede in den (z.B. phosphorylierten) Proteinlevel aufgrund einer unterschiedlichen Probenbehandlung zu quantifizieren.

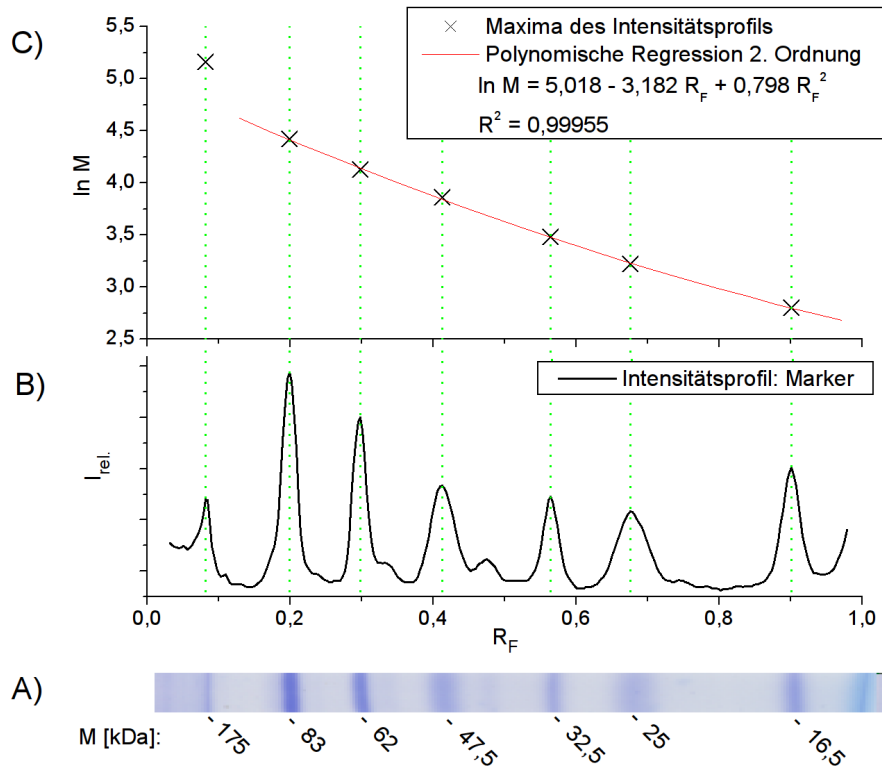


Abb. 2.3: Beispiel der Auswertung einer Markerspur:

A SDS-PAGE (12%iges Acrylamidgel) des Prestained Protein Markers, Broad Range (New England BioLabs), Coomassie-gefärbt; **B** Intensitätsprofil der SDS-PAGE; **C** polynomische Regression 2. Ordnung (Legende: $I_{rel.}$: relative Intensität; R_F : Anteil der zurückgelegten Laufstrecke im Trenngel zur Trenngellänge; M : Molmasse; R^2 : Bestimmtheitsmaß der Regression)

2.5 Biophysikalische Methoden

2.5.1 Dynamische Lichtstreuung

Anhand der dynamischen Lichtstreuung (DLS) lässt sich die Größenverteilung von Partikeln in Lösung analysieren. Der Größenbereich der analysierbaren Partikel reicht von Nano- bis Mikrometern. Da die Intensität des Streulichts proportional zur Molekularmasse (bzw. Radius³) ist, ist die Methode sehr sensitiv gegenüber der Detektion größerer Partikel wie z.B. Aggregate. Das Messprinzip der DLS beruht auf der Detektion der zeitlichen Fluktuationen der Streulichtintensität. Ursache hierfür ist die Abstandsveränderung der Streuzentren durch die Brownsche Molekularbewegung, wodurch es zu Schwankungen der positiven und negativen Interferenzen im Streulicht kommt. Durch Analyse der Fluktuationen hinsichtlich der Größe der Zeitintervalle, in der sie auftreten, lassen sich Rückschlüsse auf die Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen in Lösung ziehen, aus der sich wiederum der hydrodynamische Radius ableiten lässt. Die Abhängigkeit

wird durch die Stokes-Einstein-Beziehung beschrieben:

$$D = kT / (6\pi\eta R_h)$$

Dabei ist D : Diffusionskoeffizient, k : Boltzmannkonstante, T : Temperatur, η : Viskosität der Lösung, R_h : hydrodynamischer Radius des diffundierenden Partikels.

Der hydrodynamische Radius entspricht dem Radius, den eine diffundierende, ideale, feste Kugel unter identischen Bedingungen aufweisen würde. Da das Diffusionsverhalten auch von der Gestalt und der anhaftenden Solvathülle des Partikels abhängt, kann der tatsächliche Partikelradius aber beträchtlich kleiner sein.

Zur Messung der DLS wurde der Viscotek-802-DLS (Malvern Instruments) verwendet. Hierzu wurde die zu untersuchende Probe in einer Küvette einem polarisierten Lichtstrahl ausgesetzt. Die Intensitätsveränderung des gestreuten Lichts wurde als Funktion der Zeit gemessen.

2.5.2 *Microscale* Thermophorese

Die *microscale* Thermophorese (MST) kann als Methode zur Affinitätsbestimmung dienen. Als Thermophorese wird die gerichtete Bewegung von Partikeln entlang eines Temperaturgradienten bezeichnet. Die Thermophorese beruht auf der Brownschen Molekularbewegung. Bei der Thermophorese innerhalb von idealen Gasen ist ein Nettostrom der Partikel von Warm nach Kalt zu beobachten, der direkt durch die Zunahme der Brownschen Molekularbewegung mit ansteigenden Temperaturgradienten erklärt werden kann. Denn auf der wärmeren Seite treffen im statistischen Mittel schnellere Moleküle auf die Partikel als auf der kälteren Seite, so dass ein höherer Nettoimpuls in Richtung der kälteren Seite resultiert. Für in Flüssigkeiten gelöste Partikel wie z.B. Proteine ist dies aber nur bedingt zutreffend. Hier wird die Thermophorese durch die Eigenschaften der Grenzschicht zwischen Partikel und Lösungsmittel entscheidend beeinflusst. Ausschlaggebend sind insbesondere die Größe, Ladung und Solvatationsentropie der Partikel. Mitunter ist sogar eine Umkehr des Nettoimpulses zu beobachten. Eine Thermophorese in Richtung der Wärmequelle wird als negativ definiert [Duhr & Braun 2006a] [Duhr & Braun 2006b] [Reineck *et al.* 2010]. Veränderungen der Oberflächeneigenschaften durch molekulare Interaktionen, wie z.B. bei Protein-Protein-Interaktionen auftreten, können sich folglich in einem veränderten Thermophoreseverhalten äußern. Dabei tritt in der Regel bis zu Partikelkonzentrationen im Bereich von einigen mM keine intrinsische Konzentrationsabhängigkeit der Thermophorese auf [Dhont 2004] [Rauch & Köhler 2002]. Die Affinität molekularer Interaktionen lässt sich daher anhand von MST-Titrations unter konstanten Pufferbedingungen bestimmen. Um die Thermophorese detektieren zu können, kann der zu untersuchende Partikel mit einem geeigneten Fluorophor markiert werden. Die Markierung von p27 erfolgt hier z.B. durch rekombinante

Fusion mit YFP. Zu beachten ist dabei aber, dass sich die Fluoreszenz zumeist auch aufgrund der intrinsischen Temperaturabhängigkeit des Fluorophors verändert. Dieser Prozess wird als Temperatur-Sprung (T.-Jump) bezeichnet, da er eine vergleichsweise kurze Relaxationszeit (50 ms) aufweist. Veränderungen des T.-Jumps deuten auf eine unmittelbare Veränderung der Fluorophor-Umgebung hin und können somit ebenfalls zur Affinitätsbestimmung genutzt werden [Jerabek-Willemsen *et al.* 2011] [Wienken *et al.* 2010] [Zillner *et al.* 2012].

Die MST-Messungen erfolgten mittels des Monoliths NT.015T (NanoTemper Technologies). Hierzu wurden Glaskapillaren mit jeweils mindestens 5 μl fluoreszierender Probe befüllt. Mittels eines IR-Lasers (1480 nm) wurde die Probe lokal erhitzt. Dabei wurde im Bereich des Laserfokus eine schlagartige Temperaturerhöhung um bis zu ca. 8°C bewirkt, wodurch ein mikroskopischer Temperaturgradient zur umgebenden Probe erzeugt wurde. Die Veränderungen der Fluoreszenzverteilung durch Anlegen des Temperaturgradienten wurde mit einem Epifluoreszenzmikroskop vermessen.

2.5.3 FRET-Assay

Protein-Protein-Interaktionen können anhand des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) verfolgt werden. Hierzu werden die Proteine mit einem geeigneten FRET-Paar markiert, bestehend aus einem FRET-Donor und einem FRET-Akzeptor, bei denen es sich um Fluorophore handelt. FRET bedeutet, dass nach Anregung des Donorfluorophors die Energie strahlungslos auf das Akzeptorfluorophor übertragen wird. Der Energietransfer vollzieht sich, wenn bestimmte Resonanzbedingungen erfüllt sind. Hierfür muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen, wodurch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung beider Übergangsdipole ermöglicht wird. Voraussetzung hierfür ist, dass sich Donor und Akzeptor hinreichend nahe beieinander befinden; denn FRET ereignet sich typischerweise nur bei Distanzen kleiner als ca. 10 nm. Somit liefert das Auftreten von FRET Aufschluss darüber, ob sich die mit dem FRET-Paar markierten Positionen in unmittelbarer Nachbarschaft befinden. Da durch Anregung von Schwingungszuständen Energie verloren geht, emittiert das Akzeptorfluorophor bei längeren Wellenlängen als das Donorfluorophor. FRET kann daher anhand der Abnahme der Donorfluoreszenz und Zunahme der Akzeptorfluoreszenz detektiert werden [Szöllosi *et al.* 2006] [Tsien 2009].

In dieser Arbeit wurden Cyclin A und p27 rekombinant mit dem CFP/YFP-FRET-Paar fusioniert. FRET wurde anhand der Veränderung der YFP- zur CFP-Fluoreszenz detektiert. Das während der Assay-Etablierung ausgearbeitete Protokoll zur Durchführung des FRET-Assays im Hochdurchsatzformat befindet sich im Anhang 5.1.

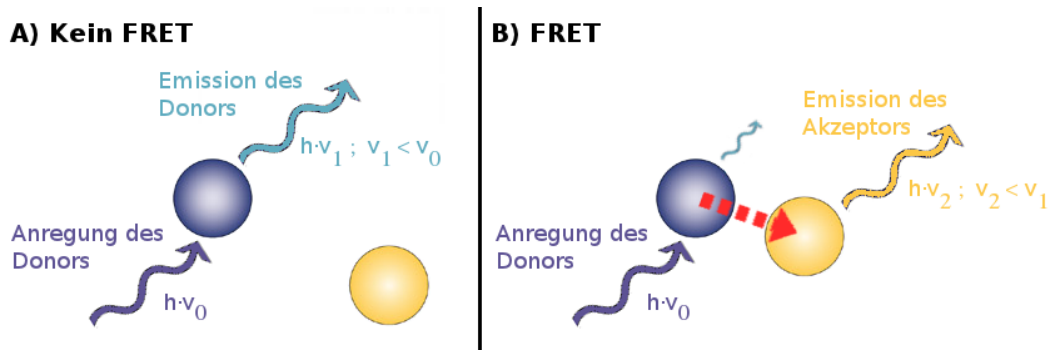


Abb. 2.4: Schema des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET)

2.5.4 HTRF-Assay

Die HTRF-Technologie verbindet das homogene FRET-Assayformat mit der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung (*Homogeneous Time-Resolved Fluorescence*, HTRF). Dazu werden als FRET-Donor Lanthanid-Chelate wie z.B. Europium-Kryptat (EuK) eingesetzt, die besonders lang anhaltende Fluoreszenzlebenszeiten aufweisen. Hierdurch wird es ermöglicht, ein Zeitfenster von mehreren Mikrosekunden zwischen Anregung und Signaldetektion einzufügen. Während dieser Verweildauer kann eine Hintergrundfluoreszenz, die durch direkte Anregung des Akzeptorfluorophors oder einer farbstoffartigen Testsubstanz verursacht werden kann, bereits weitestgehend abklingen. Zudem weisen Lanthanid-Chelate einen besonders großen *Stokes Shift* zwischen ihrer Anregungs- und Emissionswellenlänge auf, welcher im Falle von EuK fast 300 nm beträgt, wodurch ebenfalls die detektierte Hintergrundfluoreszenz verringert werden kann. Dies führt somit zu einer schärferen und weniger störanfälligen Signaldetektion. Ein geeigneter FRET-Akzeptor für Europium-Kryptat ist Xl665, welches ein modifiziertes Allophycocyanin darstellt. EuK und Xl665 emittieren im roten Wellenlängenbereich ($\lambda_{\max., \text{EuK}}: 620\text{nm}$; $\lambda_{\max., \text{Xl665}}: 665\text{ nm}$), in dem Signalinterferenzen mit farbstoffartigen Testsubstanzen vergleichsweise selten auftreten. Die Xl665-Fluoreszenzintensität relativ zur EuK-Fluoreszenzintensität liefert somit ein zuverlässiges HTRF-Signal. Durch die Bildung des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten können zudem λ -unspezifische Messabweichungen bis zu einem gewissen Grade korrigiert werden. Daher eignet sich das HTRF-Signal im besonderen Maße, um Wirkstoff-*Screening*-Systeme zu entwickeln [Mathis 1999] [Shelton et al. 2009] [Degorce et al. 2009].

Die rekombinant produzierten Proteine GST-p27 und MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A wurden anhand ihrer Affinitätsanhänge mittels der Antikörper α -GST-EuK und α -His-XL665 mit dem EuK/Xl665-FRET-Paar markiert (siehe Abb. 2.5). Analog zum FRET-Assay wurde beim HTRF-Assay die Veränderung der Xl665- zur EuK-Fluoreszenz detektiert. Allerdings wurde zwischen Anregung und Detektion ein Zeitversatz von 50 μs eingefügt. Das während der Assay-Etablierung

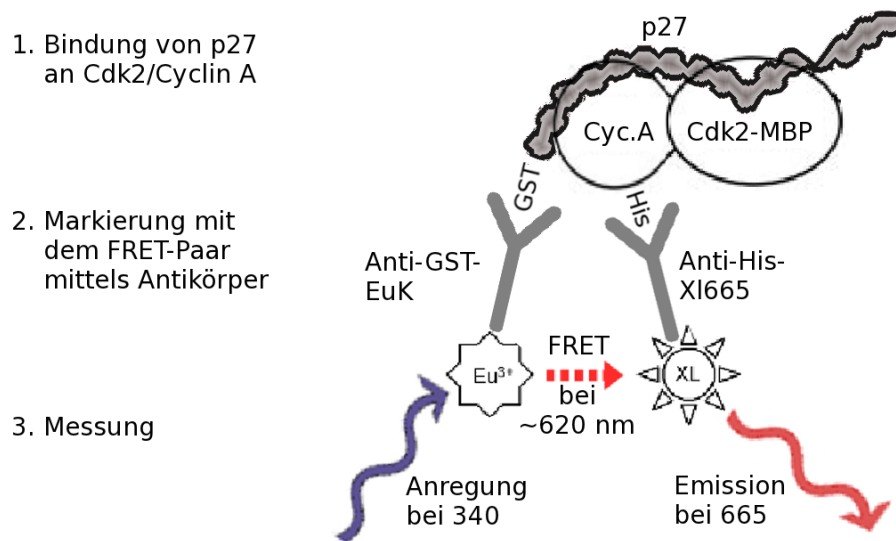


Abb. 2.5: Schema des HTRF-Assays

ausgearbeitete Protokoll zur Durchführung des HTRF-Assays im Hochdurchsatzformat befindet sich im Anhang 5.2.

2.5.5 Steady-state ATPase-Assay

Mittels des *steady-state* ATPase-Assays lässt sich die ATPase-Aktivität von Cdk2 ermitteln. Um die katalytische Umsetzung von ATP zu ADP detektieren zu können, wird der ATP-Umsatz an eine Indikatorreaktion gekoppelt. Als solche dient hier die Oxidation von NADH zu NAD⁺. Da hierbei nur NADH, aber nicht NAD⁺, bei 340 nm stark absorbiert ($\epsilon^{340\text{nm}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), kann der Umsatz an NADH anhand der zeitlichen Abnahme der Absorption bei 340 nm bestimmt werden. Die Kopplung des NADH- und ATP-Umsatzes erfolgt über das PK-LDH-Enzymsystem, wobei die Pyruvatkinase (PK) die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) und ADP zu Pyruvat und ATP katalysiert und Laktatdehydrogenase (LDH) die Umsetzung von NADH und Pyruvat zu NAD⁺ und Laktat katalysiert. Sofern sich ein Fließgleichgewicht (*steady-state*) zwischen den Reaktionen eingestellt hat, wird das ATP durch die Kopplung der Reaktionen regeneriert, wohingegen das NADH oxidiert wird. Dies führt zu einer zeitlich linearen Abnahme der NADH-Absorption im Fließgleichgewicht [Cook *et al.* 1982] [Hagopian *et al.* 2001]. Folglich kann hieraus unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes die katalytische Aktivität der ATPase-Funktion berechnet werden, wobei sich die Abhängigkeit durch folgende Formel ausdrücken lässt:

$$k_{ATPase} = -dAbs_{(NADH)}/dt \cdot (d \cdot \epsilon_{(NADH)} \cdot c_{(Cdk2)})^{-1}$$

Dabei ist Abs: Absorption, t: Zeit, d: Wegstrecke durch Küvette oder Well, ϵ : Extinktionskoeffizient, c: Konzentration.

Der *steady-state* ATPase-Assay zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von Cdk2 wurde in ATPase-Puffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM ATP gestartet. Als Messsignal diente die zeitliche Veränderung der Absorption von NADH bei 340 nm, wobei der linear abfallende Bereich ausgewertet wurde.

ATPase-Puffer:

50 mM HEPES-pH: 7,5
150 mM NaCl
10 mM MgCl₂
2 mM DTT

PK-LDH-Enzymsystem:

0,2 mM NADH
0,5 mM PEP
0,02 mg/ml LDH
0,05 mg/ml PK

2.5.6 Kinase-Assay

Die relative Kinaseaktivität von Cdk2 lässt sich anhand radiometrischer Kinase-Assays bestimmen. Um die Phosphorylierung des Substrats durch Cdk2 quantifizieren zu können, wird für die Kinasereaktion [γ -³²P]ATP eingesetzt, dessen γ -Phosphatgruppe mit ³²P radioaktiv markiert ist. Bei dem enzymatischen Transfer der γ -Phosphatgruppe von dem [γ -³²P]ATP auf das Substrat wird somit auch die Radioaktivität übertragen. Als spezifisches Cdk2-Substrat dient Histon H1. Daher kann nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Produkts anhand der radioaktiven Intensität der Histon H1-Bande die relative Kinase-Aktivität bestimmt werden.

Die Kinasereaktion wurde in Gegenwart von 2,2 g/l Histon H1 und 2,2 mM ATP im Kinase-Puffer bei 30°C durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung wurden 0,22 μ Ci/ μ l [γ -³²P]ATP beigefügt. Nach Erreichen einer bestimmten Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt, indem die Proben durch Erhitzen in Probenauftragspuffer denaturiert wurden. Zur Analyse wurden die Proben gelelektrophoretisch mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde radiometrisch ausgewertet.

Kinase-Puffer:

25 mM Tris-HCl, pH: 7,5

70 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

2.6 Bioinformatische Methoden

2.6.1 *Protein-Ligand-Docking*

Anhand des molekularen *Dockings* lässt sich *in silico* die spezifische Aneinanderlagerung von Biomolekülen simulieren, um anschließend eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der simulierten Bindemodi zu treffen. Daher lässt sich das molekulare *Docking* iterativ nutzen, um einen unbekanntem Bindemodus vorherzusagen. Von besonderem Interesse ist hier das *Protein-Ligand-Docking*. Dabei werden die Liganden, bei den es sich in der Regel um kleinere, chemische Verbindungen handelt, in die Bindetaschen bekannter Proteinstrukturen eingepasst. Aufgrund der Komplexität der Proteine und der Vielseitigkeit ihrer Wechselwirkungen ist eine zweifelsfreie Bestimmung des gebundenen Zustands *a priori* zumindest noch heutzutage schwierig bis unmöglich, stattdessen müssen für ihre Beschreibung mitunter extreme Näherungen getroffen werden, die einer empirischen Überprüfung und Optimierung bedürfen [Cheng *et al.* 2009]. So wird der zu untersuchende Proteinbereich vereinfachend in Form eines starren Gitternetzes beschrieben. Die Einpassung des Liganden erfolgt zunächst entsprechend dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Hierzu wird der Ligand in Position, Orientierung und Konformation variiert. Zudem können auch bestimmte Aminosäurereste gezielt als (partiell) flexibel definiert werden, was aber einen höheren Rechenaufwand erfordert. Dies ist insbesondere sinnvoll, wenn bereits Annahmen über die ungefähre Bindeposition getroffen werden können. Ausschlaggebend für die Einpassung ist somit die Kompatibilität des Liganden in Gestalt und Größe mit der Bindetasche. Anschließend wird anhand der *Scoring*-Funktion der vorliegende Bindemodus bewertet. Das *Scoring* dient der Abschätzung der freien Bindungsenthalpie. Durch iterative Optimierung des *Dockings* werden die lokalen Maxima der *Scoring*-Funktion bestimmt [Kroemer 2007]. Für die iterative Optimierung können unterschiedliche Algorithmen genutzt werden. Z.B. verwendet das Programm GOLD hierfür einen aus der Genetik stammenden Algorithmus, bei dem die Optimierung des Ligandenzustands mit der Evolution von Individuen gleichgesetzt wird. In dieser Gleichsetzung entspricht das Individuum also dem Ligandenzustand, welcher aus einer zunächst zufälligen Population heraus in Analogie zur Mutation, Rekombination und Selektion verändert wird. Dabei werden durch das *Scoring* erfolgversprechende Individuen selektiert. Selektierte Individuen werden miteinander gekreuzt, wobei ihre Nach-

kommen Informationen bzgl. ihrer Positionsveränderung, Orientierung und Konformation erben. Durch eine Mutationsrate wird ein gewisses Maß an zufälligen Abweichungen erzeugt. Eine Evolution über mehrere Generationen führt folglich zur Anpassung (bzw. Optimierung) des Ligandenzustands an die Proteinumgebung [[Kang et al. 2009](#)].

Als Programm für die Durchführung des *Protein-Ligand-Dockings* wurde GOLD verwendet. Als *Scoring-Funktion* diente die *Goldscore function*, welche die Ligandenzustände nach fünf Kriterien bewertet: (1.) die Bindungsenergie intermolekularer Wasserstoffbrücken, (2.) die intermolekulare van-der-Waals-Energie, (3.) die intramolekulare van-der-Waals-Energie des Liganden, (4.) die Energie der Torsionsspannung des Liganden und (5.) die Bindungsenergie der intramolekularen Wasserstoffbrücken. Als Parametereinstellung wurden zumeist die Standardeinstellungen gewählt [[Verdonk et al. 2003](#)].

3 Ergebnisse

3.1 Bakterielle Synthese der humanen Proteine Cdk2, Cyclin A und p27 als rekombinante Fusionskonstrukte und deren Isolierung mittels Affinitätschromatographie

Ziel war es, ein möglichst einfaches Verfahren zur Produktion der humanen Proteine Cdk2, Cyclin A und p27 zu etablieren, um relativ schnell größere Mengen an homotypen Protein hoher Reinheit isolieren zu können. Realisieren ließ sich diese Zielsetzung, indem die rekombinante Expression in *E. coli* als Methode zur Darstellung dieser Proteine genutzt wurde. Hierbei wurden die Proteine N-terminal mit einem Affinitätsanhang fusioniert. Als solche dienten His-, GST- oder MBP-Peptidanhänge. Dies ermöglichte die anschließende Isolierung mittels Affinitätschromatographie. Sofern der Reinheitsgrad nach der Affinitätschromatographie als noch nicht hinreichend befunden wurde, wurden die Proteine anschließend z.B. mittels Gelfiltration noch weiter angereichert.

Die nachfolgenden Untersuchungen zeigten, dass die in *E. coli* produzierten humanen Proteine funktional sind (siehe Abschnitt 3.2). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Affinitätsanhänge die Proteine weder in ihrer Strukturfindung noch in ihrer Funktion maßgeblich beeinträchtigen. Mangels Notwendigkeit wurde daher auf eine Entfernung der Affinitätsanhänge verzichtet.

Zur Darstellung eines FRET-Paars wurden Cyclin A und p27 zudem mit den fluoreszierenden Proteinen eCFP und eYFP rekombinant fusioniert.

3.1.1 Produktion von GST-p27

Für die N-terminale Fusion von p27 mit GST wurde der Expressionsvektor pGEX-p27 verwendet (siehe Abschnitt 2.1.9 und 2.2.1). Hiermit wurde der *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta(DE3)pLysS transformiert. Die Proteinproduktion erfolgte im Wesentlichen wie im Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Davon abweichend wurde die Expression aber erst nach Erreichen einer OD_{600} von 0,8 durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert und die Expressionsdauer betrug 18 h bei 20°C. Dadurch wurde ein relativ hohes Expressionsniveau von GST-p27 erreicht und die Neigung zur Degradation von GST-p27 vermindert. Um GST-p27 aus dem Zelllysate zu extrahieren, wurde eine Affinitätschromatographie gegenüber GST durchgeführt. Als GST-bindendes Medium der

Affinitätschromatographie diente *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (GE Healthcare). Auch nach längeren Waschen der Sepharose wies das Eluat (mittels überschüssigen Glutathions) einen leichten Proteinbackground auf, der als Verunreinigung aufgefasst werden kann. Daher wurde im Anschluss eine Gelfiltration durchgeführt. Die Gelfiltration führte jedoch zu zwei überlappenden Proteinpeaks im Elutionsprofil, was auf eine unvollständige Auftrennung der Proteinfraktionen hindeutet (siehe Abb. 3.1). Eine Erklärung hierfür ergibt sich daraus, dass GST dimerisiert. Folglich eluiert auch GST-p27 als Dimer. Neben Homodimeren können dabei aber auch Heterodimere mit GST-haltigen Fragmenten auftreten. Somit ist es schwierig, GST-haltige Fragmente abzusondern. Der Proteinbackground konnte also nur bedingt entfernt werden, ohne dabei eine größere Menge an Produkt zu verlieren.

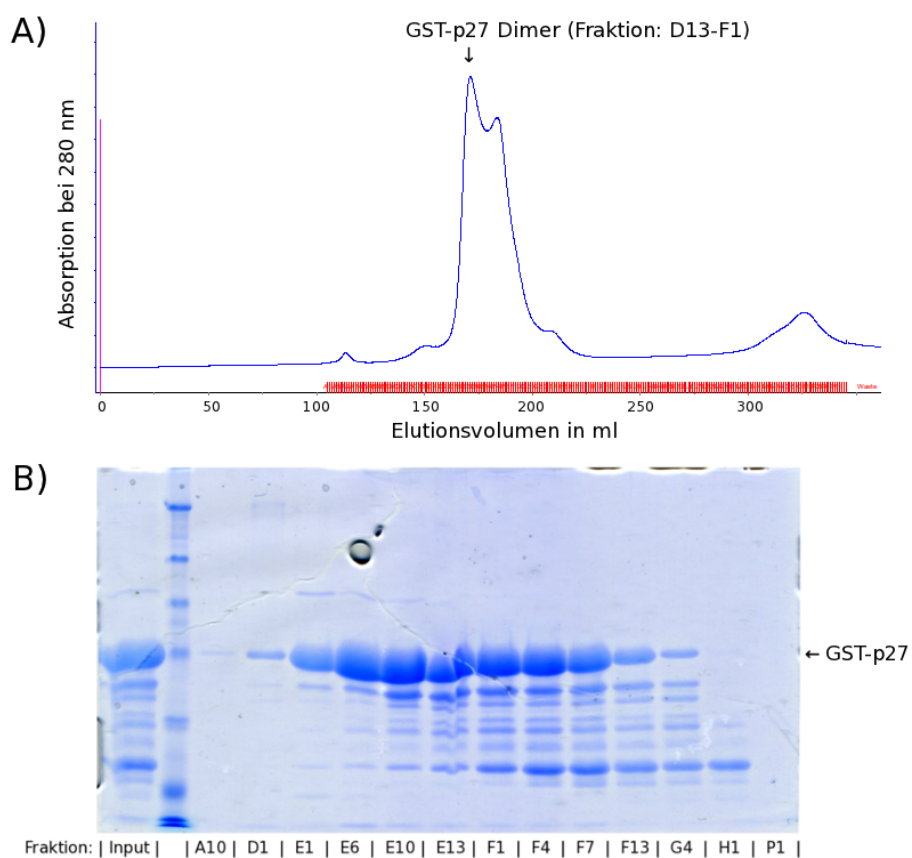


Abb. 3.1: Gelfiltration von GST-p27:

A Elutionsprofil; **B** SDS-PAGE einzelner Elutionsfraktionen, Coomassie-gefärbt: Der Probenauftrag betrug 10 μ l bei einem Fraktionsvolumen von 1 ml.

Insgesamt kann die Produktion jedoch als erfolgreich bezeichnet werden, da das Endprodukt weitestgehend nur noch aus GST-p27 besteht (siehe Abb. 3.2). Denn das Coomassie-gefärbte Gel der SDS-PAGE des Endprodukts weist bei einer Probenmenge von 1.5 μ g nur noch eine si-

gnifikante Proteinbande auf. Verdeutlicht wird dies insbesondere, wenn man das Intensitätsprofil der Coomassiefärbung betrachtet, dargestellt in Abb. 3.2.A rechts neben dem Gel. Die apparente Molmasse, die wie im Abschnitt 2.4.3 beschrieben sich aus der Position der Proteinbande relativ zu den Markerbanden ermitteln lässt, stimmt ungefähr mit der berechneten Molmasse überein, die sich aus der Aminosäuresequenz ergibt (*calculated molecular weight*, cmw). Zudem weist das Absorptionsspektrum eine für Proteine charakteristische Form auf mit einem einzelnen Peak bei einer Wellenlänge von ca. 280 nm (siehe Abb. 3.2.B).

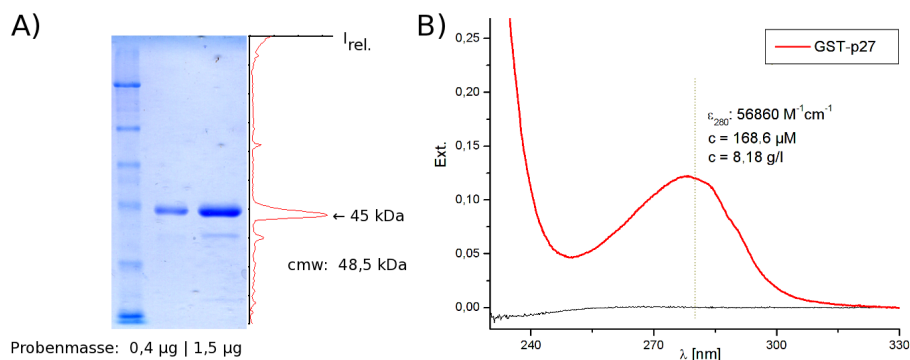


Abb. 3.2: Analyse des Endprodukts einer GST-p27 Synthese:

A SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt: Der Probenauftrag betrug 0,4 µg und 1,5 µg Protein. Die Proben wurden zuvor für 10 min bei 97°C in Probenauftragspuffer denaturiert. **B** Absorptionsspektrum einer 1:80 verdünnten Probe

GST-p27 wurde in der Regel bis zu einer Konzentration von etwa 8 bis 12 g/l in 40 mM TRIS-pH: 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT via Ultrafiltration konzentriert. Die Ausbeute betrug etwa 6 bis 10 mg Protein pro 1 l Starterkultur.

3.1.2 Produktion von His-p27-YFP und His-eYFP-p27

Um ein FRET-Paar darstellen zu können, wurde p27 rekombinant mit eYFP fusioniert. Hierzu wurde die cDNA von p27kip1 vollständiger Länge in die MCS der Vektoren pET19b-Vec154 und pET19b-Vec157 eingefügt (siehe Abschnitt 2.1.9 und 2.2.1), um so ein C- und ein N-terminales Fusionskonstrukt exprimieren zu können. Hiermit wurde der *E. coli*-Expressionsstamm Rosetta(DE3)pLysS transformiert. Die Expressionstests zeigten aber, dass das C-terminale Fusionskonstrukt, d.h. His-p27-eYFP, nur schwach exprimierbar ist und zudem zur Degradation neigt. Nichtsdestotrotz wurde versucht, His-p27-eYFP zu produzieren. Die beste Expressionsbedingung wurde erreicht, wenn die Expression bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mittels 0,1 mM IPTG induziert wurde und die Expressionsdauer etwa 14 h bei 20°C betrug. Die Expressionsbedingung ähnelt somit der von GST-27. His-p27-eYFP wurde dann mittels der immobilisierten-Metall-

Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung von NiNTA (QIAGEN) aus dem Zelllysate extrahiert. Die Ausbeute betrug ca. 0,5 mg Protein pro 1 l Starterkultur. Allerdings erwies sich der Reinheitsgrad als gering.

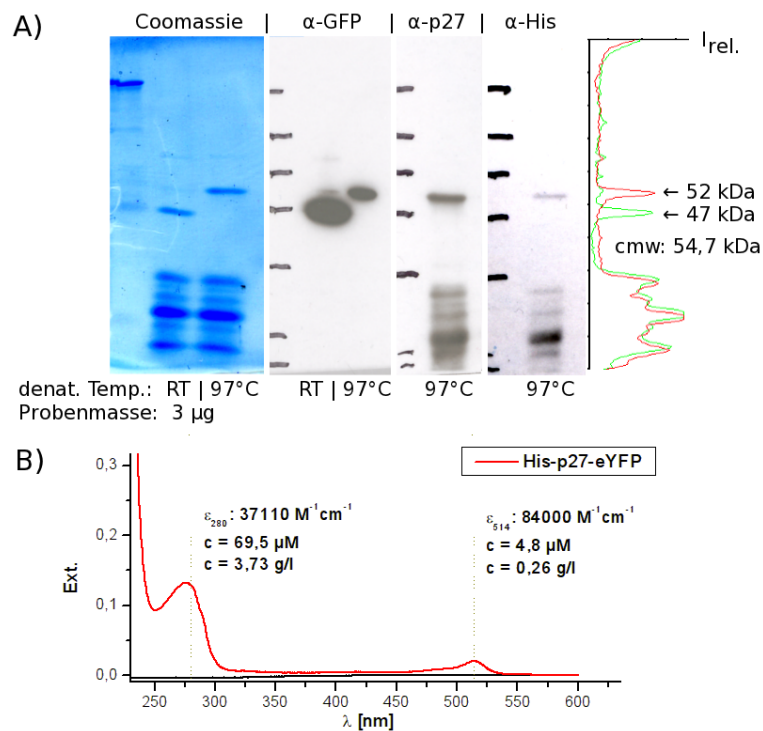


Abb. 3.3: Analyse des Endprodukts der His-p27-eYFP Synthese:

A SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt oder immunodetektiert: Der Probenauftrag betrug 3 µg Protein. Die Proben wurden zuvor für 10 min bei 97°C oder bei Raumtemperatur (RT) in Probenauftragspuffer denaturiert. **B** Absorptionsspektrum einer 1:20 verdünnten Probe

Denn die Coomassie-Färbung und Immundetektionen der SDS-PAGE des Endprodukts belegen, dass His-p27-eYFP zwar exprimiert werden kann, jedoch degradiert es (siehe Abb. 3.3.A). Dieses Ergebnis wird durch das Absorptionsspektrum bestätigt. Vergleicht man nämlich die Konzentration, die sich aus dem Absorptionspeak für Protein bei 280 nm berechnen lässt, mit der Konzentration, die sich aus dem Absorptionspeak für eYFP bei 514 nm berechnen lässt, ergibt sich, dass der Anteil an mit eYFP fusionierten Protein nur etwa 1:14 beträgt (siehe Abb. 3.3.B).

Für das N-terminale Fusionskonstrukt hingegen stellte sich heraus, dass es ähnlich gut exprimierbar ist wie GST-p27 und keine signifikante Degradation aufweist. Die Expression und Affinitätschromatographie von His-eYFP-p27 wurde analog zu der von His-p27-eYFP durchgeführt. Das resultierende Proteinprodukt besaß hiernach bereits einen relativ hohen Reinheitsgrad. Um noch mögliche Aggregate abzutrennen, wurde anschließend eine Gelfiltration durchgeführt.

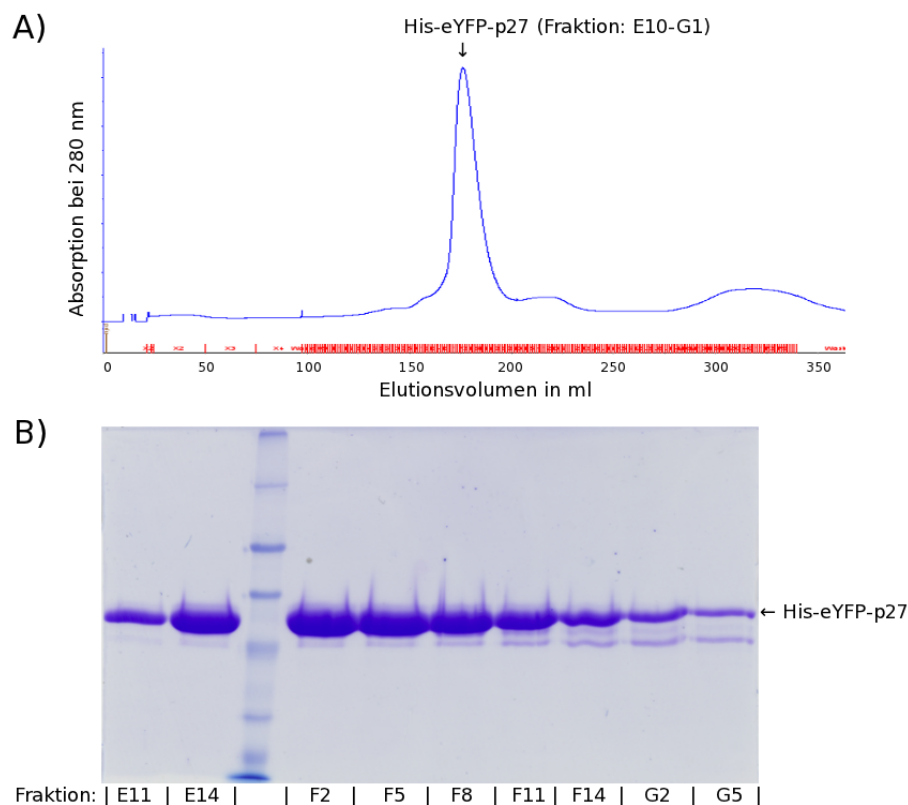


Abb. 3.4: Gelfiltration von His-eYFP-p27:

A Elutionsprofil; **B** SDS-PAGE einzelner Elutionsfraktionen, Coomassie-gefärbt: Der Probenauftrag betrug 10 μ l bei einem Fraktionsvolumen von 1 ml.

Wie zu erwarten eluierte His-eYFP-p27 als einzelner und einziger Proteinpeak des Elutionsprofils (siehe Abb. 3.4).

Die Produktion von His-eYFP-p27 kann als gelungen angesehen werden. Das Coomassie-gefärbte Gel der SDS-PAGE des Endprodukts zeigt nämlich nur noch eine Proteinbande, welche knapp unterhalb der Höhe der berechneten Molmasse läuft (siehe Abb. 3.5.A). Diese Bande lässt sich auch mit Hilfe des p27-Antikörpers detektieren. Wenn die Probe zuvor nicht vollständig denaturiert worden ist, verläuft die Proteinbande bei einer etwas tieferen apparenten Molmasse (d.h. ca. 7 kDa tiefer). Eine vergleichbare Verschiebung in der apparenten Molmasse ist auch für His-p27-eYFP und His-eCFP-Cyc.A beobachtbar (siehe Abb. 3.3.A und Abb. 3.7.A). Verantwortlich hierfür ist die überaus stabile β -Fass-Struktur der fluoreszierenden Proteine, welche erst durch längeres Erhitzen bei 97°C in Probenauftragspuffer vollständig denaturiert wird. Zudem weist das Absorptions- und Emissionsspektrum einen für YFP typischen Absorptions- und Emissionspeak auf (siehe Abb. 3.5.B und Abb. 3.17.A) [Patterson *et al.* 2001]. Aus dem YFP-Absorptionspeak

lässt sich eine Konzentration berechnen, die annähernd mit der übereinstimmt, die sich aus dem Absorptionspeak bei 280 nm ergibt.

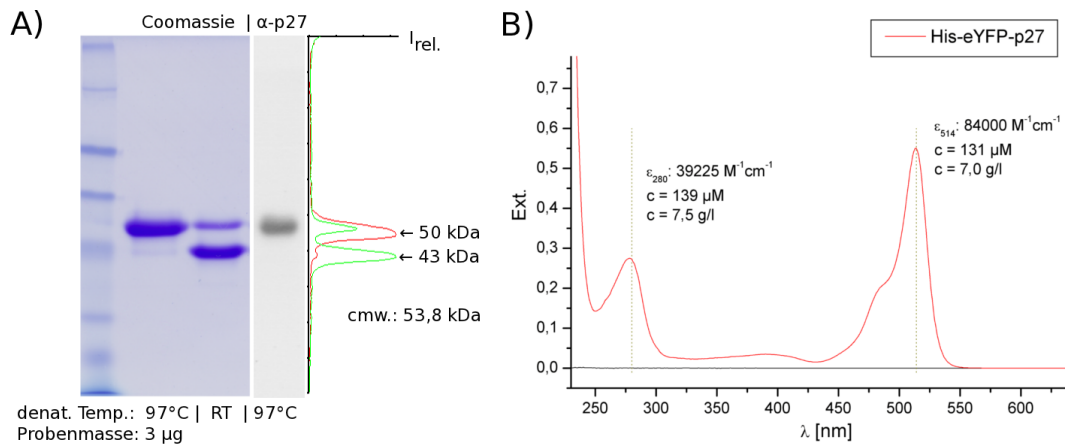


Abb. 3.5: Analyse des Endprodukts einer His-eYFP-p27 Synthese:

A SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt oder immunodetektiert: Der Probenauftrag betrug 3 μ g Protein. Die Proben wurden zuvor für 10 min bei 97°C oder bei Raumtemperatur (RT) in Probenauftragspuffer denaturiert. **B** Absorptionsspektrum einer 1:20 verdünnten Probe

His-eYFP-p27 wurde zumeist bis zu einer Konzentration von etwa 7 bis 12 g/l in 40 mM TRIS-pH: 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT via Ultrafiltration konzentriert. Die Ausbeute betrug etwa 6 bis 10 mg Protein pro 1 l Starterkultur.

3.1.3 Produktion von His-eCFP-Cyclin A

Zur Etablierung eines FRET-Assays wurde neben dem p27-eYFP-Fusionskonstrukt ein Cyclin A-eCFP-Fusionskonstrukt benötigt. Hierzu wurde die cDNA von Cyclin A2 vollständiger Länge in die MCS des Vektors pET19b-Vec155 eingefügt (siehe Abschnitt 2.1.9 und 2.2.1). Nach Transformation des *E. coli*-Expressionsstammes Rosetta(DE3)pLys wurden hiermit Expressionstests durchgeführt. Als eine geeignete Bedingung erwies sich eine sechsstündige Expression bei 30°C nach Induktion mit 0,4 mM IPTG bei einer OD_{600} von 0,6. Die Expression und Affinitätschromatographie wurde im wesentlichen so wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.1). Das Produkt enthielt jedoch noch Degradationsanteile. Mittels einer Gelfiltration konnten diese weitestgehend abgetrennt werden (siehe Abb. 3.6).

SDS-PAGE und Absorptionsspektrum des Endprodukts zeigen, dass die Produktion von His-eCFP-Cyc.A erfolgreich war. Denn auf dem Coomassie-gefärbten Gel der SDS-PAGE lässt

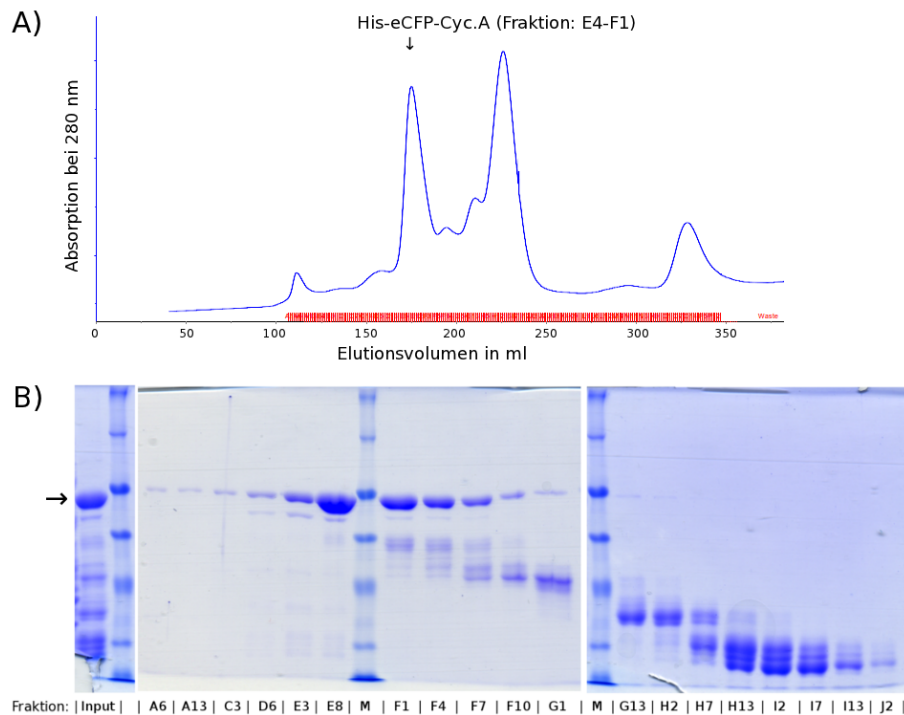


Abb. 3.6: Gelfiltration von His-eCFP-Cyc.A:
A Elutionsprofil; **B** SDS-PAGE einzelner Elutionsfraktionen, Coomassie-gefärbt: Der Proben-
 auftrag betrug 12 μ l bei einem Fraktionsvolumen von 1,5 ml.

sich nur eine signifikante Proteinbande erkennen, dessen apparente Molmasse in etwa mit der berechneten übereinstimmt (siehe Abb. 3.7.A). Das Endprodukt weist ein Absorptions- und Emissionsspektrum auf, welches charakteristisch ist für CFP-Fusionsproteine (siehe Abb. 3.7.B und Abb. 3.17.A) [Patterson *et al.* 2001]. Aus dem eCFP-Absorptionspeak lässt sich in etwa die

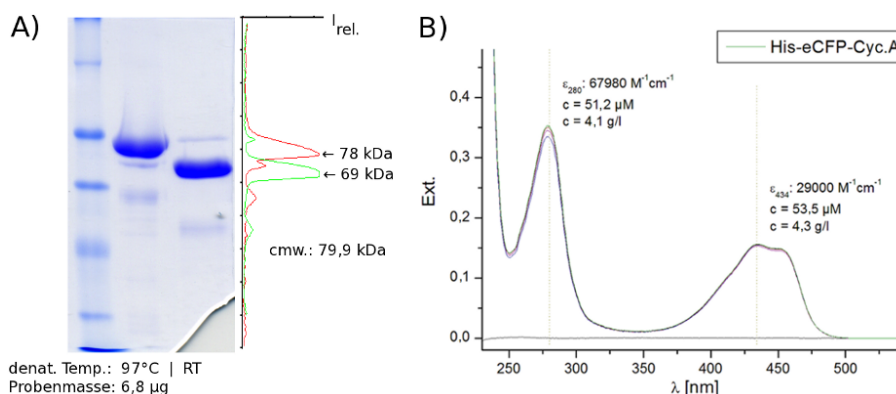


Abb. 3.7: Analyse des Endprodukts einer His-eCFP-Cyc.A Synthese:
A SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt: Der Probenauftrag betrug 6,8 μ g Protein. Die Proben wurden
 zuvor für 10 min bei 97°C oder bei Raumtemperatur (RT) in Probenauftragspuffer denaturiert.
B Absorptionsspektrum einer 1:10 verdünnten Probe

gleiche Konzentration berechnen wie die, die sich aus dem Absorptionspeak bei 280 nm ergibt.

His-eCFP-Cyc.A wurde in der Regel bis zu einer Konzentration von etwa 3 bis 5 g/l in 40 mM TRIS-pH: 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 3% Sucrose via Ultrafiltration konzentriert. Die Ausbeute betrug etwa 0,5 bis 2 mg Protein pro 1 l Starterkultur.

3.1.4 Produktion von MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A

Cdk2 und Cyclin A wurden als Dimer produziert. Als Affinitätsanhang für Cdk2 diente N-terminal fusioniertes MBP und für Cyclin A ein N-terminal fusionierter His-Anhang. Hierzu wurde die cDNA von Cdk2 vollständiger Länge in die MCS des Vektors pMAL-C2x eingefügt und die cDNA von Cyclin A2 vollständiger Länge in die MCS des Vektors pPROEXHTA (siehe Abschnitt 2.1.9 und 2.2.1). Dabei wurde Cdk2 in Position 160 der Aminosäuresequenz von Threonin zu Glutamat mutiert (T160E), um ein Mimikry für phosphoryliertes T160 zu erzeugen (siehe Abschnitt 1.1.6). Nach Transformation des *E. coli*-Expressionsstammes Rosetta(DE3)pLys zeigten die Expressionstests, dass sowohl MBP-Cdk2^{T160E} als auch His-Cyc.A gut exprimierbar

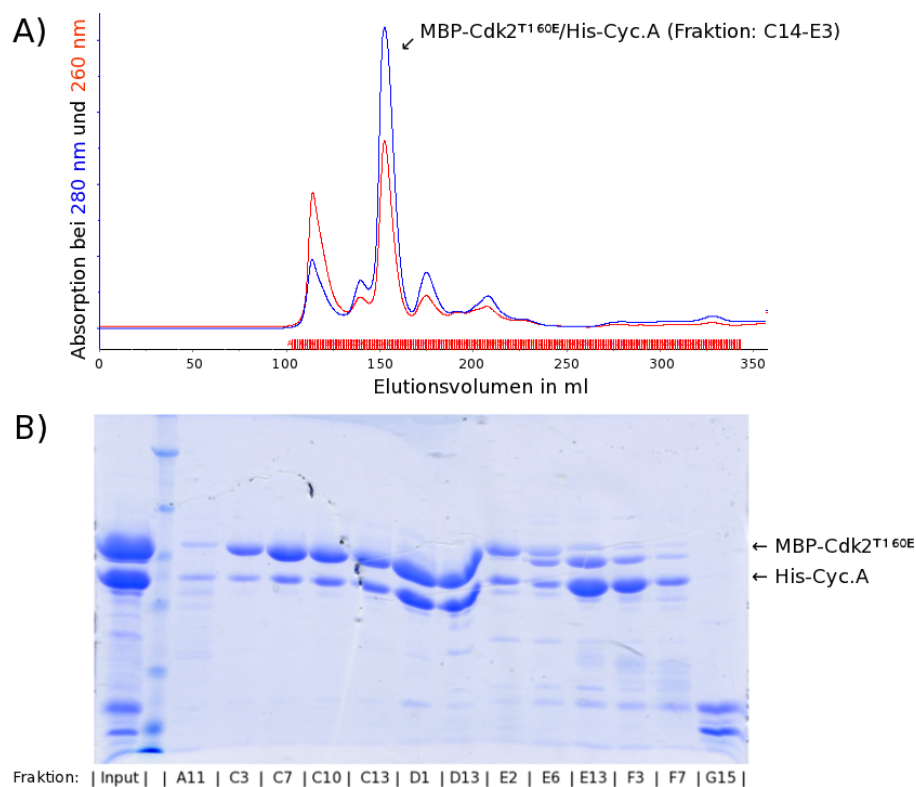


Abb. 3.8: Gelfiltration von MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A:
A Elutionsprofil; **B** SDS-PAGE einzelner Elutionsfraktionen, Coomassie-gefärbt: Der Proben-
 auftrag betrug 10 µl bei einem Fraktionsvolumen von 1 ml.

sind. In beiden Fällen wurde die Expression mit 0,4 mM IPTG bei einer OD_{600} von 0,6 induziert. Nach sechsständiger Expression bei 30°C wurden die Zellysate vereinigt. Hierbei exprimierte MBP-Cdk2^{T160E} besser als His-Cyc.A. Das MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A-Dimer wurde daher per IMAC (d.h. AC gegenüber dem His-Anhang) aus dem Zellysate extrahiert und anschließend per Gelfiltration angereichert (s. Abb. 3.8). Das MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A-Dimer eluierte während der Gelfiltration als einzelner Peak und konnte nahezu vollständig vom Proteinbackground abgetrennt werden.

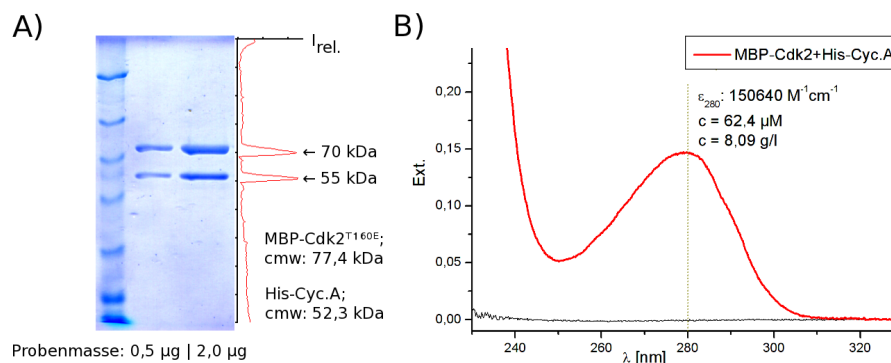


Abb. 3.9: Analyse des Endprodukts einer MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A Synthese:

A SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt: Der Probenauftrag betrug 0,5 und 2 µg Protein. Die Proben wurden zuvor für 10 min bei 97°C in Probenauftragspuffer denaturiert. **B** Absorptionsspektrum einer 3:200 verdünnten Probe

SDS-PAGE und Absorptionsspektrum des Endprodukts belegen, dass die Produktion des MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A-Dimers erfolgreich war. Denn das Coomassie-gefärbte Gel der SDS-PAGE des Endprodukts zeigt zwei Proteinbanden von etwa gleicher Intensität (s. Abb. 3.9.A). Die untere Bande läuft auf Höhe der Molmasse von His-Cyc.A, die obere auf Höhe der Molmasse von MBP-Cdk2^{T160E}. Das Absorptionsspektrum weist den für Proteine charakteristischen Peak bei einer Wellenlänge von 280 nm auf (s. Abb. 3.9.B).

Da MBP-Cdk2^{T160E} und His-Cyc.A als Dimer aufgereinigt werden konnten, zeigt sich bereits hier, dass das bakteriell synthetisierte Cdk2 und Cyclin A miteinander interagieren und dass diese Interaktion nicht wesentlich durch die Affinitätsanhänge beeinträchtigt wird. Dies deutet darauf hin, dass Cdk2 und Cyclin A richtig gefaltet vorliegen.

Das MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A-Dimer wurde in der Regel bis zu einer Konzentration von etwa 8 bis 12 g/l in 25 mM HEPES-pH: 7,3, 400 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 3% Trehalose via Ultrafiltration konzentriert. Die Ausbeute betrug etwa 4 bis 8 mg Protein pro 1 l Starterkultur.

3.1.5 Produktion von His-Cdk2

Cdk2 wurde mit einem N-terminalen His-Anhang rekombinant fusioniert. Hierzu wurde die cDNA von Cdk2 vollständiger Länge in den Vektor pPROEXHTA eingefügt (siehe Abschnitt 2.1.9 und 2.2.1). Nach Transformation von Rosetta(DE3)plysS wurde dessen Expressionsvermögen unter unterschiedlichen Bedingungen getestet. Ein hierfür akzeptables Resultat lieferte eine vierstündige Expression bei 30°C nach Induktion mit 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6. Jedoch zeigte sich, dass His-Cdk2 deutlich schlechter expimierbar ist als MBP-Cdk2^{T160E}. Nach Zellaufschluss wurde His-Cdk2 per IMAC aufgereinigt.

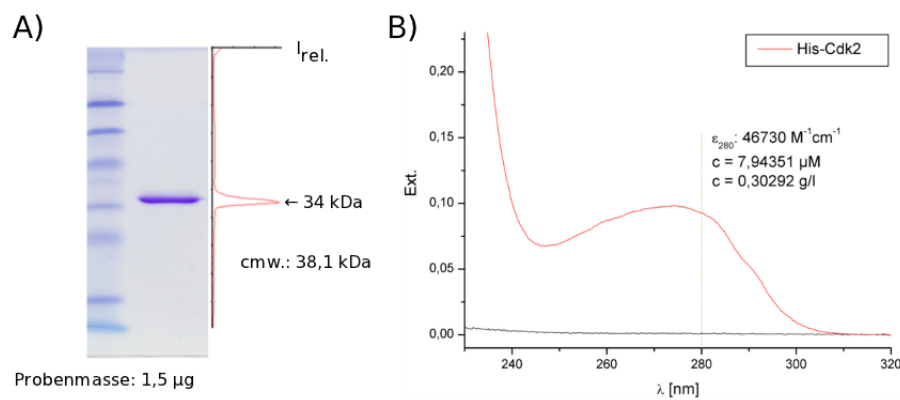


Abb. 3.10: Analyse des Endprodukts einer His-Cdk2 Synthese:

A SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt: Der Probenauftrag betrug 1,5 µg Protein. Die Proben wurden zuvor für 10 min bei 97°C in Probenauftragspuffer denaturiert. **B** Absorptionsspektrum einer 1:4 verdünnten Probe

Das Coomassie-gefärbte Gel der SDS-PAGE des Endprodukts weist nur noch eine signifikante Proteinbande auf, dessen apparente Molmasse mit der berechneten in etwa übereinstimmt (siehe Abb. 3.10.A). Das Absorptionsspektrum zeigt einen Proteinpeak, dessen Absorption bei 260 nm relativ zu der bei 280 nm etwas erhöht ist (siehe Abb. 3.10.B). Dies deutet darauf hin, dass das Endprodukt mit DNA kontaminiert sein könnte.

His-Cdk2 wurde bis zu einer Konzentration von etwa 0,3 bis 1 g/l in 20 mM TRIS-pH: 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 3% Sucrose via Ultrafiltration konzentriert. Die Ausbeute betrug etwa 0,5 bis 1 mg Protein pro 1 l Starterkultur.

3.2 Biophysikalische Analysen der rekombinant produzierten Proteine Cdk2, Cyclin A und p27

Um herauszufinden, ob die rekombinant produzierten Proteine miteinander funktionale Komplexe ausbilden, wurden sie mittels biophysikalischer Analysen untersucht und charakterisiert. Darüber hinaus galt es festzustellen, inwieweit die Proteine zur Etablierung von Assays geeignet und somit für die Identifizierung potentieller Wirkstoffe nutzbar sind. Von Bedeutung dabei war insbesondere, die Messbedingungen so zu optimieren, dass sich hierfür möglichst ideale Ergebnisse erzielen ließen.

3.2.1 Dynamische Lichtstreuung

Die Homogenität der Proteinprodukte ließ sich anhand der dynamischer Lichtstreuung (DLS) beurteilen (siehe Abschnitt 2.5.1). MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A und His-eYFP-p27 wurden separat oder im äquimolaren Verhältnis bei einer Konzentration von ca. 3 g/l Protein in 50 mM HEPES-pH: 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT bei Raumtemperatur untersucht. Hierzu wurde in einer Küvette mit dem Gerät Viscotek-802-DLS das Streulicht zeitaufgelöst vermessen.

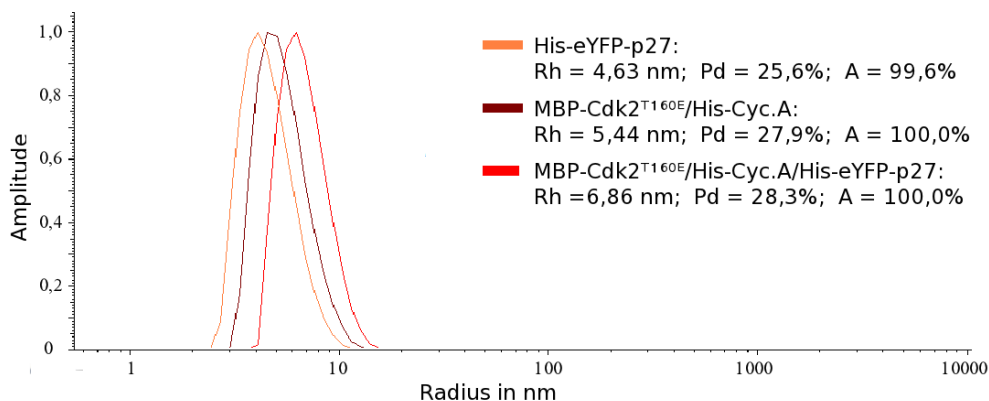


Abb. 3.11: DLS-Analyse:

Die Amplitude der Massenverteilung wurde logarithmisch gegen die Partikelgröße, angegeben als Radius, aufgetragen. Aus der Peakposition wurde der hydrodynamische Radius (Rh), aus der Peakfläche der Anteil an der Gesamtmasse (A) und aus der relativen Standardabweichung die Polydispersität (Pd) ermittelt.

Die DLS-Analyse zeigt, dass die Polydispersität der Proben zwischen 25% und 30% liegt. Die Proben können daher zwar nicht als perfekt monodispers eingestuft werden, zumindest besitzen sie aber eine hinreichend niedrige Polydispersität für die Etablierung von Assays. Die DLS-Massenverteilung weist je Proteinprobe nur einen erkennbaren Peak im Größenbereich von 2 bis 20 nm auf. Dies bestätigt, dass die Aggregate durch die Gelfiltration abgetrennt werden

konnten und sich keine neuen Aggregate ausgebildet haben. MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A und His-eYFP-p27 weisen separat einen etwas kleineren hydrodynamische Radius (4,6 bzw. 5,4 nm) auf als im äquimolaren Gemisch (6,9 nm). Dies kann als ein erstes Indiz dafür bewertet werden, dass p27 und Cdk2^{T160E}/Cyc.A auch in Form rekombinanter Fusionsproteine miteinander interagieren.

3.2.2 Microscale Thermophorese

Die Interaktion zwischen His-eYFP-p27 und MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A wurde mittels der *Microscale Thermophoresis* (MST) untersucht. Die Messbedingungen wurden aus der DLS-Analyse übernommen, um so eine Aggregation ausschließen zu können. Als Messsignal diente die Veränderungen der Fluoreszenzverteilung von His-eYFP-p27 in einer Kapillare nach Anlegen eines mikroskopischen Temperaturgradienten. Der Temperaturgradient wurde mit dem Infrarot-Laser (IR) erzeugt (siehe Abschnitt 2.5.2). Zur Optimierung des Messsignals wurde die Fluoreszenz von His-eYFP-p27 bei unterschiedlichen IR-Laserstärken vermessen. Hierbei stellte sich heraus, dass das MST-Messsignal von His-eYFP-p27 einige Besonderheiten aufweist (siehe Abb. 3.12).

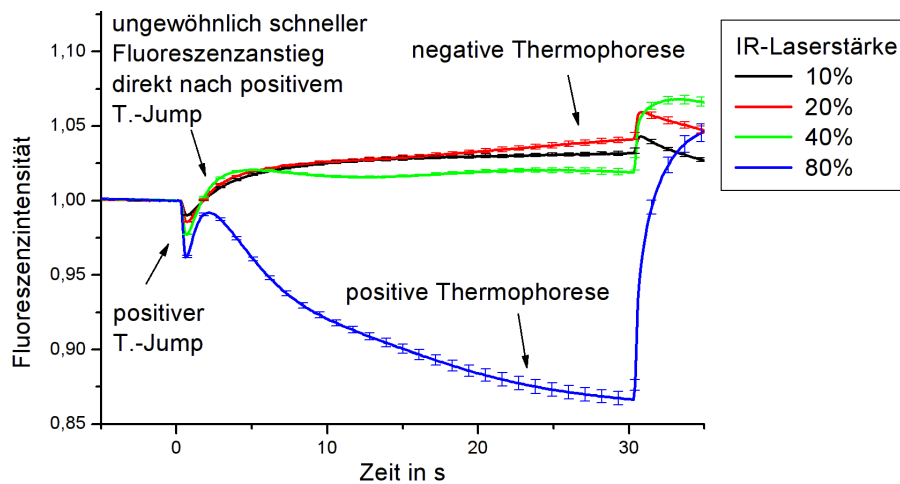


Abb. 3.12: MST-Messdaten von His-eYFP-p27:

Die MST-Messkurven für 200 nM His-eYFP-p27 wurden als Sechsfachbestimmung ermittelt. Sie zeigen, wie sich die gemessene YFP-Fluoreszenz mit der Zeit nach Anlegen eines Temperaturgradienten verändert. Um unterschiedliche Temperaturgradienten zu erzeugen, wurde die IR-Laserstärke variiert.

Denn die MST-Messdaten für His-eYFP-p27 zeigen, dass das Einsetzen des IR-Lasers zunächst einen positiven T.-Jump zur Folge hat. Kurz darauf kommt es zu einem relativ schnellen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dieser Anstieg deutet auf einen zusätzlich neben T.-Jump und Ther-

mophorese auftretenden Prozess hin, der bei anderen Proteinen in der Regel nicht zu beobachten ist. Eventuell ist dieser Prozess aber auch noch als ein Bestandteil des T.-Jumps zu verstehen, der sich dann aus einem schnelleren, positiven Anteil und einem langsameren, negativen Anteil zusammensetzt. Die danach folgende Thermophorese ist bei niedriger IR-Laserstärke negativ. Bei Erhöhung der IR-Laserstärke tritt eine positive Thermophorese ein. Daher bleibt hier festzustellen, dass das MST-Messsignal von His-eYFP-p27 zwar ungewöhnlich, aber durchaus verwendbar ist, da der T.-Jump und die Thermophorese anhand ihrer Form identifiziert und gemessen werden können.

Um nun die Affinität zwischen p27 und Cdk2/Cyclin A zu ermitteln, wurde His-eYFP-p27 mit MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A in zwei unabhängigen Messreihen titriert und die zugehö-

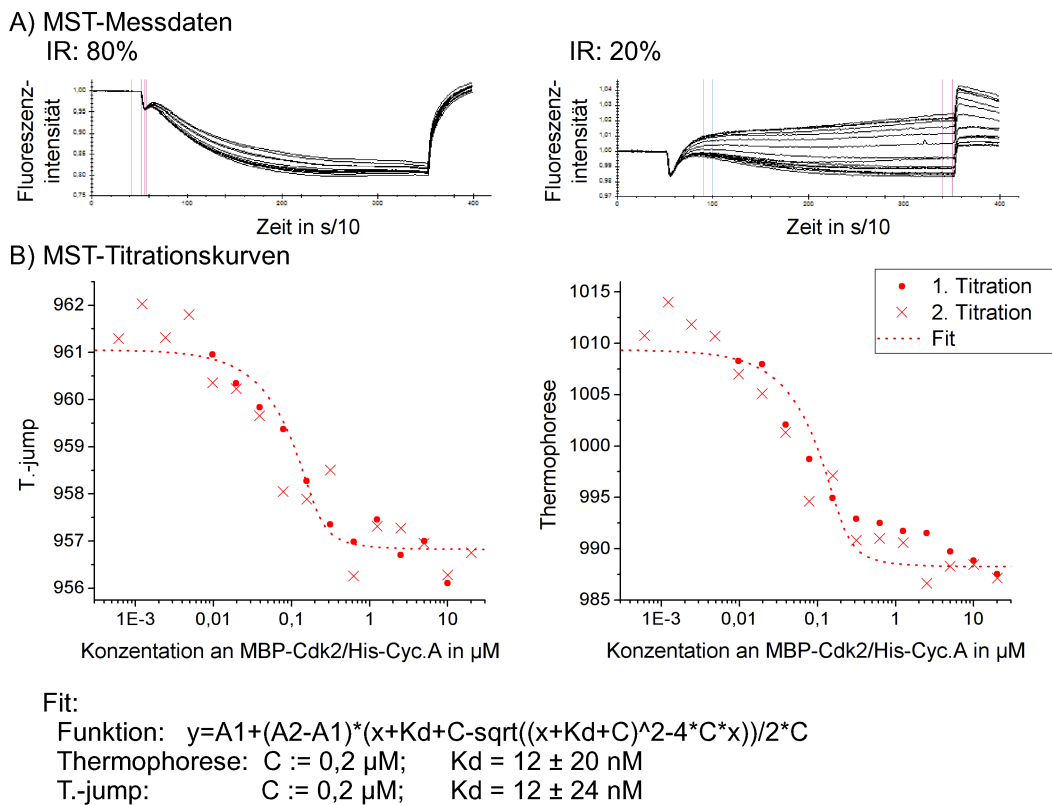


Abb. 3.13: MST-Titration von His-eYFP-p27 mit MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A: 200 nM His-eYFP-p27 wurde mit MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A titriert. **A** Dargestellt sind die Messdaten für eine IR-Laserstärke von 20% und 80%. Die ausgewerteten Start- und Endbereiche sind blau und rot markiert. **B** Die Titrationskurven der Thermophorese sind für die IR-Laserstärke von 20% gezeigt, die des T.-Jumps für eine IR-Laserstärke von 80%. Um die Dissoziationskonstante zu ermitteln, erfolgte eine nichtlineare Kurvenanpassung mit der angegebenen Fit-Funktion. (Legende: C: Konzentration an His-eYFP-p27; Kd: Dissoziationskonstante)

rigen MST-Messsignale gemessen. Die Auswertung der beiden Titrations lieferte für die verschiedenen Laserstärken vergleichbare Resultate. Jedoch erfährt hier der T.-Jump bei höheren IR-Laserstärken eine markantere Ausprägung (siehe Abb. 3.12). Für die Thermophorese ist Gegenteiliges zutreffend. Denn die Thermophorese wechselt bei niedrigeren IR-Laserstärken im Verlaufe der Titration von negativ nach positiv (siehe Abb. 3.13.A). Daher wurde der T.-Jump bei einer IR-Laserstärke von 80% und die Thermophorese bei einer IR-Laserstärke von 20% betrachtet.

Die Titrationskurven zeigen für die Thermophorese und den T.-Jump bei logarithmischer Auftragung vergleichbare sigmoidale Kurvenverläufe (siehe Abb. 3.13.B). Die nichtlineare Kurvenanpassung mit der in der Abb. 3.13 angegebenen Fit-Funktion ergibt für die Titrationskurven der Thermophorese eine Dissoziationskonstante von 12 ± 20 nM und für die Titrationskurven des T.-Jumps eine Dissoziationskonstante von 12 ± 24 nM. Der Literaturwert liegt bei $3,5 \pm 1,2$ nM [Lacy *et al.* 2004].

Daher deutet das Ergebnis der *Microscale* Thermophorese darauf hin, dass His-eYFP-p27 mit hoher Affinität an MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A bindet. Die hierfür ermittelte Dissoziationskonstante ähnelt dem Literaturwert für die p27-Bindung an Cdk2/Cyclin A.

3.2.3 Steady-state ATPase-Assay

Inwieweit MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A aktiv ist und ob es durch GST-p27 inhibiert werden kann, wurde mit Hilfe des *steady-state* ATPase-Assays untersucht. Als Messwert diente hierbei die zeitliche Veränderung der Absorption von NADH bei 340 nm, dessen Umsetzung zu NAD⁺ über das PK-LDH-Enzymsystem an den ATP-Verbrauch gekoppelt ist (siehe Abschnitt 2.5.5). Die Messungen erfolgten in einer Küvette im DU800 Photometer. Der Messpuffer bestand aus 50 mM HEPES-pH: 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT. Dabei ergaben sich folgende Messwerte für die katalytische Aktivität der ATPase-Funktion (k_{ATPase}):

Protein	k_{ATPase}
MBP-Cdk2 ^{T160E} /His-Cyc.A	$0,304 \pm 0,103 \text{ s}^{-1}$
MBP-Cdk2 ^{T160E} /His-Cyc.A/GST-p27	$0,003 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$

Der Messwert für die Aktivität von MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A entspricht in etwa dem Literaturwert, der für (nicht-phosphoryliertes) Cdk2/Cyclin A bei $0,17 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ und für Cdk2^{pT160}/Cyclin A bei $0,20 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$ liegt [Hagopian *et al.* 2001]. Darüber hinaus zeigen die Messdaten, dass GST-p27 (bereits in äquimolarer Menge) diese Aktivität nahezu komplett zu inhibieren vermag.

Somit war die Grundvoraussetzung für die Etablierung eines ATPase-Assays zwischen p27 und Cdk2/Cyclin A erfüllt. Um mehrere parallele Messungen zu ermöglichen, wurde der Assay in ein 96-Well-Plattenformat überführt. Als Messgerät diente der Multiscan FC *plate reader* (Thermo Fisher), mit dem die NADH-Absorption bei 340 nm und die Hintergrundabsorption bei 405 nm gemessen wurden. Für die Berechnung des ATPase-Signals wurde die Hintergrundabsorption von der NADH-Absorption subtrahiert, um so das Hintergrundrauschen zu verringern. Zur Optimierung wurde zunächst die NaCl-Konzentration variiert, wobei ca. 150 mM NaCl als optimale Konzentration ermittelt wurde (siehe Abb. 3.14).

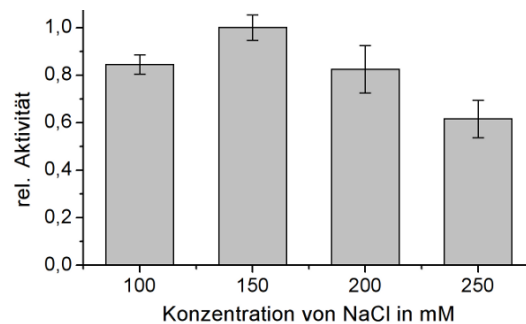


Abb. 3.14: Abhängigkeit der Cdk2-Aktivität von der NaCl-Konzentration:

Die relative ATPase-Aktivität von $0,5 \mu\text{M}$ MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A wurde bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen im 96-Well-Plattenformat als Dreifachbestimmung ermittelt.

Hiernach wurde versucht, die Substratkonzentration zu optimieren. Als Substrat dienten humanes Histon H1 und humanes *dynamamin-related protein 1* (Drp1, Isoform 1).

Aus Abb. 3.15 geht hervor, dass die Cdk2-Aktivität des MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A-Komplexes nicht mit der Substratkonzentration an Drp1 oder Histon H1 ansteigt, sondern vielmehr unabhängig hiervon ist. Dieses Ergebnis ist nicht völlig überraschend, da laut Literatur Cdk2 im nicht-phosphorylierten Zustand eine ca. 20-mal niedrigere Kinase- als ATPase-Aktivität besitzt ($k_{\text{ATPase}} = 0,17 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{Kinase}} = 0,0083 \pm 0,0008 \text{ s}^{-1}$) [Hagopian *et al.* 2001]. Erst durch die Phosphorylierung von T160 steigert sich die Kinase-Aktivität auf das ca. 35-fache der ATPase-Aktivität ($k_{\text{ATPase}} = 0,2 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{Kinase}} = 7,0 \pm 0,7 \text{ s}^{-1}$) [Hagopian *et al.* 2001]. Somit ähnelt MBP-Cdk2^{T160E} eher Cdk2 im nicht-phosphorylierten Zustand. Für MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A/GST-p27 ist ebenfalls kein Aktivitätsanstieg mit zunehmender Substratkonzentration zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass das Substrat p27 nicht derart verdrängen kann, dass die Inhibierung der ATPase-Funktion aufgehoben wird.

Die statistische Signifikanz des Assays wurde bewertet, indem der Z'-Faktor bestimmt wur-

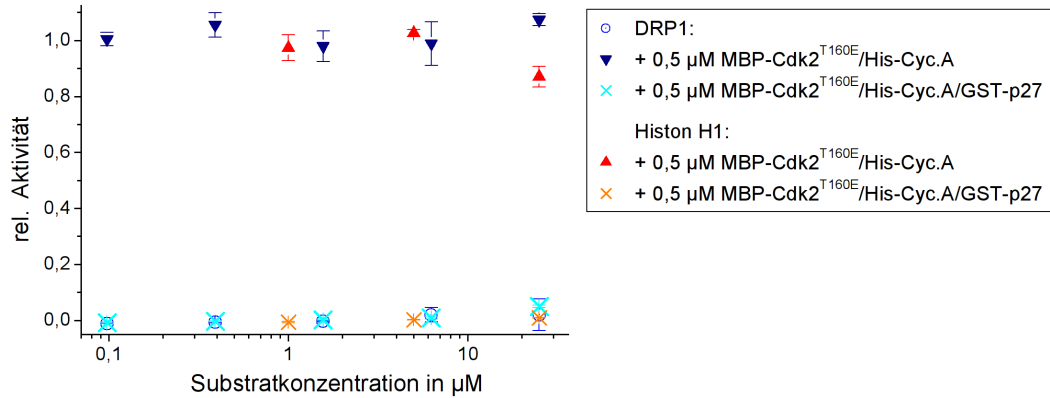


Abb. 3.15: *Abhängigkeit der Cdk2-Aktivität von der Substratkonzentration:*
Die relative Aktivität von MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A mit oder ohne GST-p27 wurde bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen im 96-Well-Plattenformat als Dreifachbestimmung ermittelt.

de. Aktives MBP-Cdk2^{T160E} diente als Positivkontrolle, inhibiertes als Negativkontrolle. Die Messbedingungen blieben unverändert. Anhand dieser Kontrollen wurde der obere und untere Grenzwert der Aktivität gemessen, um den im Assay zur Verfügung stehenden Messbereich sowie dessen Unschärfe definieren zu können. Zur Veranschaulichung der Verteilung beider Grenzwerte wurde ein Aktivitätshistogramm erstellt.

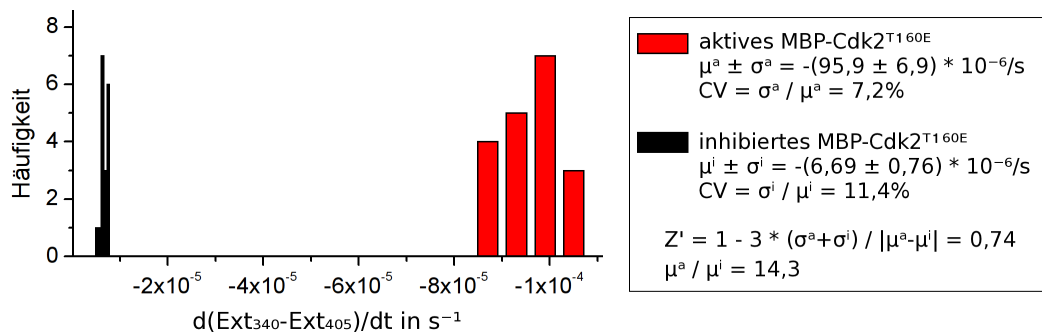


Abb. 3.16: *Aktivitätshistogramm:*
Dargestellt ist das Histogramm für die Aktivität von MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyclin A ohne (rot) und mit GST-p27 (schwarz). Hierzu wurde die zeitliche Veränderung des ATPase-Signals gemessen: $d(Ext_{340}-Ext_{405})/dt$. Gegen den Messwert wurde dessen Häufigkeit aufgetragen. Die Anzahl der Replikate beträgt hier jeweils 18. Für die beiden hierbei auftretenden Peaks wurde der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (σ), die auf den Mittelwert bezogene, relative Standardabweichung ($CV = \sigma/\mu$), Z' -Faktor (Z') und der Quotient beider Mittelwerte (μ^a/μ^i) ermittelt.

Das Histogramm zeigt eine relativ gute Separierung der beiden Aktivitätspeaks (siehe Abb. 3.16). Denn die Inhibition durch p27 führt zu einem unteren Grenzwert, der vom Betrag her 14,3-fach

kleiner ist als der obere Grenzwert. Die relativen Standardabweichungen sind mit 7% und 11% hierzu vergleichsweise klein. Daraus lässt sich ein relativ hoher Z'-Faktor von 0,74 berechnen. Dies verdeutlicht, dass der hier etablierte ATPase-Assay geeignet ist, um potentielle Wirkstoffe zu identifizieren und charakterisieren, die die Inhibierung durch p27 vermindern oder Cdk2 inhibieren.

3.2.4 Massenspektrometrie zur Identifizierung von Drp1 als Cdk2-Substrat

Mittels Massenspektrometrie wurde untersucht, ob MBP-Cdk2^{T160E} Drp1 phosphoryliert. Daran war zweierlei fraglich: zum einen, ob MBP-Cdk2^{T160E} nicht nur über ATPase-Aktivität, sondern auch Kinase-Aktivität verfügt; zum anderen, ob es sich beim humanen Drp1 (Isoform 1) tatsächlich um ein Substrat für Cdk2 handelt. Bereits bekannt war lediglich, dass XDRP1 aus *Xenopus* mit Cyclin A interagiert [Funakoshi *et al.* 1999].

Bakteriell produziertes Drp1 wurde mit MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A unter den gleichen Messbedingungen wie im ATPase-Assay über Nacht inkubiert, mittels einer SDS-PAGE isoliert und proteolytisch verdaut. Die phosphorylierten Peptide wurden mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von *Titansphere*®*TiO-Beads* aufgereinigt und ihre Zusammensetzung wurde mittels Massenspektrometrie analysiert. Das Ergebnis hierfür ist in folgender Tabelle dargestellt:

Name	Drp1-Sequenz
Peptid 1	39-SSVLESLVGR
Peptid 2	531-DKSSKVPSALAPASQEPSPAASAEADGK
Peptid 3	536-VPSALAPASQEPSPAASAEADGKLIQDSR
Peptid 4	536-VPSALAPASQEPSPAASAEADGKLI
Peptid 5	536-VPSALAPASQEPSPAASAEADGK
Peptid 6	607-SKPIPIMPA SPQKGHAVNLLDVPVVAR

Im vorliegenden Farbcode sind grün gefärbte Aminosäurereste mit hoher Wahrscheinlichkeit phosphoryliert, gelb gefärbte möglicherweise phosphoryliert und rot gefärbte Aminosäurereste mit geringer Wahrscheinlichkeit phosphoryliert. Demnach können S548 (in Peptid 3-5) und S616 (in Peptid 6) als phosphorylierte Aminosäurereste des Drp1 identifiziert werden. Insbesondere S616 in S⁶¹⁶.P.Q.K weist eine perfekte Übereinstimmung mit dem Konsensussequenzmotif S/T.P.X.K/R für Cdk2-Substrate auf. S548 in S⁵⁴⁸.P.A.A zeigt keine solche ideale Übereinstimmung; allerdings ist ein Lysin/Arginin (K/R) in Position +3 nicht zwingend erforderlich für Cdk2-Substrate [Stevenson-Lindert *et al.* 2003].

3.2.5 FRET-Assay

Die mit den fluoreszierenden Proteinen rekombinant fusionierten Konstrukte His-eYFP-p27 und His-eCFP-Cyc.A wurden daraufhin untersucht, ob sie ein funktionales FRET-Paar ausbilden können. Hierzu wurden deren Emissionsspektren separat und im äquimolaren Verhältnis unter gleichen Messbedingungen betrachtet. Dabei wurde verglichen, ob die Kombination der separaten Emissionsspektren sich von dem Emissionsspektrum für das äquimolare Gemisch unterscheidet, um so gegebenenfalls spektrale Veränderungen durch FRET erkennen zu können. Für die Anregung wurde eine Wellenlänge von 420 nm gewählt, bei der sich CFP noch relativ gut anregen lässt, während eine direkte Anregung von YFP weitestgehend vermieden wird (siehe Abb. 3.7.B und Abb. 3.5.B). Die Messung erfolgte bei einer Konzentration von 0,5 μM FRET-Paar in 20 mM TRIS-pH: 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT in einer Küvette mit dem Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektralphotometer (Varian).

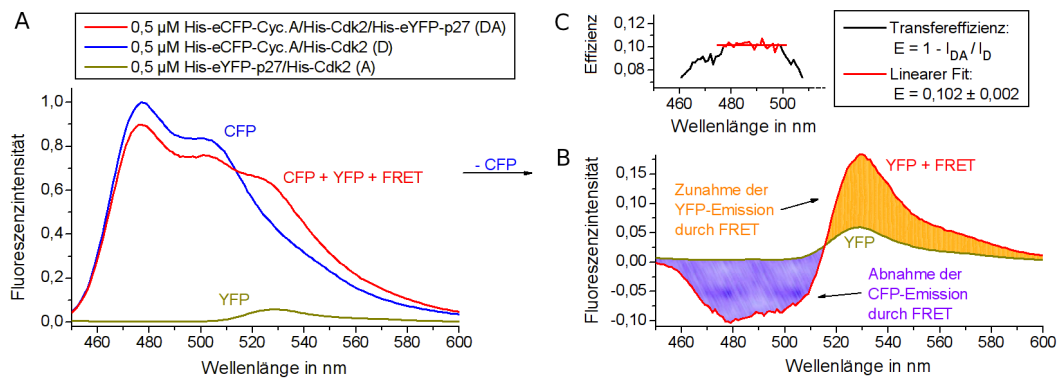


Abb. 3.17: Analyse der Emissionsspektren des FRET-Paars:

A Das CFP-Emissionsspektrum von His-eCFP-Cyc.A/His-Cdk2 ist in blau, das YFP-Emissionsspektrum von His-eYFP-p27/His-Cdk2 in gelb und das Emissionsspektrum von His-eCFP-Cyc.A/His-Cdk2/His-eYFP-p27 unter FRET-Bedingungen in rot dargestellt. Deren Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 420 nm. **B** Um den FRET-Anteil darzustellen, müssen die beiden ersteren Spektren (die den CFP und YFP-Anteil repräsentieren) vom letzteren subtrahiert werden. Dementsprechend zeigt die blaue Fläche die Abnahme der CFP-Fluoreszenz durch FRET, die orange die Zunahme der YFP-Fluoreszenz durch FRET. **C** Die Transfereffizienz wurde anhand der Abnahme der Fluoreszenzintensität (I) des FRET-Donors ($D = \text{CFP}$) in Gegenwart des FRET-Akzeptors ($A = \text{YFP}$) bestimmt.

Die Analyse der Emissionsspektren ergibt, dass His-eCFP-Cyc.A/His-Cdk2 ein für CFP typisches Emissionsspektrum (mit einem Peakmaximum bei 477 nm und einer Peakschulter bei 505 nm) und His-eYFP-p27/His-Cdk2 ein für YFP typisches Emissionsspektrum (mit einem Peakmaximum bei 527 nm) aufweist (siehe Abb. 3.17.A) [Patterson *et al.* 2001]. Im Vergleich zu der Kombination dieser beiden Spektren zeigt das Emissionsspektrum von His-eCFP-Cyc.A/His-

Cdk2/His-eYFP-p27 eine Abnahme der CFP-Fluoreszenz und Zunahme der YFP-Fluoreszenz (siehe Abb. 3.17.B). Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein Energietransfer von CFP nach YFP (d.h. FRET) stattfindet, wenn His-eCFP-Cyc.A, His-Cdk2 und His-eYFP-p27 einen Komplex ausbilden. Demnach stellen His-eCFP-Cyc.A und His-eYFP-p27 ein funktionales FRET-Paar dar. Die Transfereffizienz beträgt ca. 10% (siehe Abb. 3.17.C).

Inwieweit unterschiedliche Mengen an gebundenen p27 mittels FRET detektiert werden können, wurde untersucht, indem His-eCFP-Cyc.A mit His-eYFP-p27 titriert wurde. Die Titration erfolgte in An- und Abwesenheit von Cdk2, um herauszufinden, inwieweit His-Cdk2 die Interaktion des FRET-Paars unterstützt bzw. hierfür erforderlich ist. Die Messbedingungen blieben ansonsten unverändert.

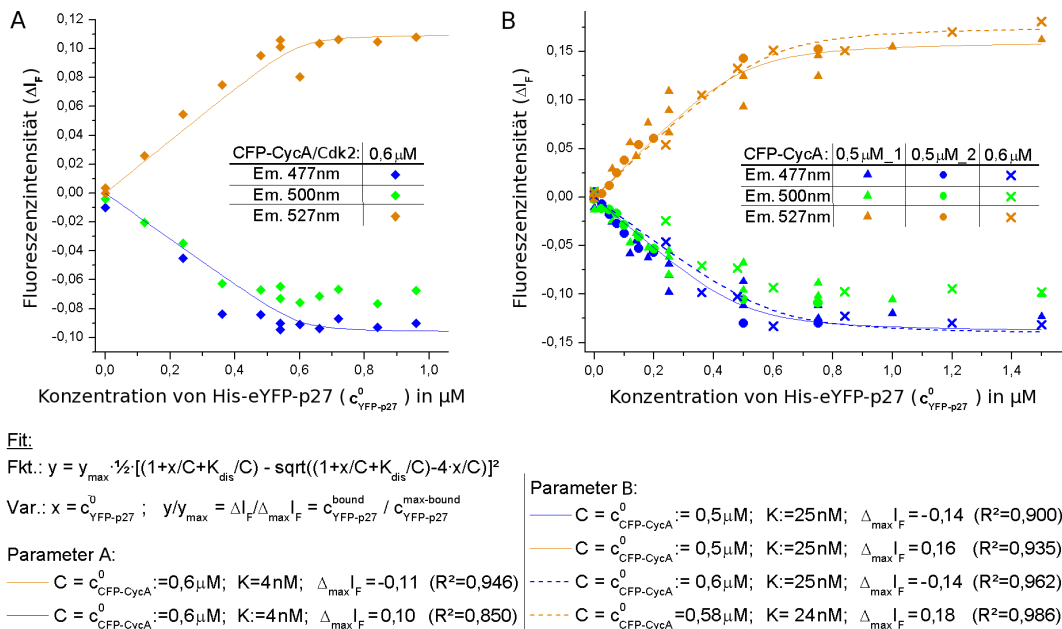


Abb. 3.18: FRET-Titration:

Dargestellt ist die Titration von (A) His-eCFP-Cyc.A/His-Cdk2 und (B) His-eCFP-Cyc.A mit His-eYFP-p27. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität (I_F) des FRET-Paars bei 477 nm (blau), 500 nm (grün) und 527 nm (orange) nach Abzug des YFP- und CFP-Anteils gegen die Konzentration von His-eYFP-p27 aufgetragen. Die resultierenden Titrationskurven wurden mittels einer nichtlinearen Kurvenanpassung unter Verwendung der angegebenen Fit-Funktion simuliert, um so Informationen über die Dissoziationskonstante (K) und FRET-Effizienz (E) zu erhalten ($E = -\Delta_{\text{max}} I_F(477\text{nm})$, da $E = 1 - I_F(\text{CFP}+\text{FRET}, 477\text{nm})/I_F(\text{CFP}, 477\text{nm})$ und $I_F(\text{CFP}, 477\text{nm}) := 1$).

Beim Betrachten der resultierenden Titrationskurven fällt auf, dass mit steigender Konzentration von His-eYFP-p27 die CFP-Fluoreszenz (bei 477 nm und 500 nm) abnimmt, während die

YFP-Fluoreszenz (bei 527 nm) zunimmt (siehe Abb. 3.18). Da der Anteil an YFP-Fluoreszenz durch direkte Anregung bereits subtrahiert worden ist, sind diese Veränderungen FRET-bedingt. Mit Erreichen der Konzentration von His-eCFP-Cyc.A gehen in Titrationskurven in ein Plateau über. Demnach ist das FRET-Signal optimal, wenn das FRET-Paar im äquimolaren Konzentrationsverhältnis vorliegt. Der Übergang zum Plateau scheint in Gegenwart von Cdk2 etwas schärfer zu verlaufen. Dies deutet darauf hin, dass die Sättigung für die Bindung von p27 in Gegenwart von Cdk2 etwas früher erreicht wird. Die Simulation mittels einer nichtlinearen Kurvenanpassung unter Verwendung der in Abb. 3.18 angegebenen Fit-Funktion ergibt, dass die aus der Literatur bekannten Dissoziationskonstanten zumindest augenscheinlich relativ gut zu dem Verlauf der Messkurven passen (siehe Abb. 3.18.A und B). Laut Lacy et al. beträgt die Dissoziationskonstante für die Bindung von p27 an Cdk2/Cyclin A $3,5 \pm 1,2$ nM und für selbiges ohne Cdk2 $25,0 \pm 2,7$ nM [Lacy et al. 2004]. Allerdings ist die Messgenauigkeit für die Bestimmung derart niedriger Dissoziationskonstanten nicht hinreichend (siehe R-Werte der Kurvenanpassungen). Daher kann hier nicht mit der erforderlichen Signifikanz zwischen den beiden Dissoziationskonstanten unterschieden werden.

Die FRET-Effizienz nimmt in Gegenwart von Cdk2 etwas ab (d.h. von 14% auf 10%), was darauf hindeutet, dass der mittlere Abstand zwischen CFP und YFP im trimären Komplex größer ist als im dimären Komplex.

Um Messungen im Hochdurchsatzmaßstab zu ermöglichen, wurde der FRET-Assay miniaturisiert. Hierzu wurde der FRET-Assay in ein 384-Well-Plattenformat überführt, wobei Volumen und Konzentration an FRET-Paar zum unteren Limit hin optimiert wurden. Zur Optimierung der Durchsatzgeschwindigkeit wurde die Messung auf die Bestimmung zweier Messpunkte reduziert; d.h. anstatt ganze Spektren zu vermessen, dienten als charakteristische Messpunkte die Maxima der CFP-Emission (bei 477 nm) und der YFP-Emission (bei 527 nm). Deren Fluoreszenzintensitäten wurden mit dem Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher) unter Verwendung der Filterpaare Ex.425/Em.485 und Ex.425/Em.527 gemessen. Das Verhältnis beider Intensitäten (Em.527/Em.485) diente als FRET-Signal.

Die statistische Signifikanz wurde mittels des Z' -Faktors überprüft. Als oberer Grenzwert wurde das FRET-Signal von His-eCFP-Cyc.A/His-eYFP-p27 unter FRET-Bedingungen verwendet. Dabei betrug das Messvolumen 20 μ l pro Well und die Konzentration 25 μ M. Zur Darstellung eines unteren Grenzwertes wurde das Peptid p27²⁵⁻⁵¹ im Überschuss hinzugefügt, welches mit His-eYFP-p27 um die Bindung zu His-eCFP-Cyc.A konkurriert und somit die FRET-Bedingungen aufheben kann. Die hierbei erzielte Trennung des oberen und unteren Grenzwertes wurde mittels eines Histogramms veranschaulicht.

Das Histogramm zeigt eine relativ gute Separierung der beiden Grenzwerte (siehe Abb. 3.19).

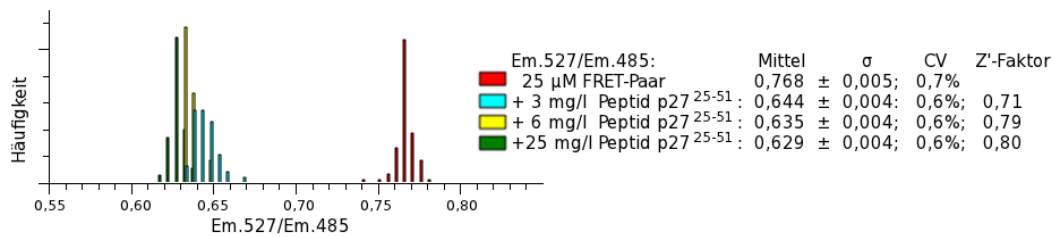


Abb. 3.19: Histogramm des FRET-Assays:

Dargestellt ist das FRET-Histogramm für His-eCFP-Cyc.A/His-eYFP-p27 in An- und Abwesenheit von überschüssigen Peptid p27²⁵⁻⁵¹. Als Signal für die Detektion von FRET diente das Intensitätsverhältnis der YFP- zur CFP-Fluoreszenz (Em.527/Em.485). Hiergegen wurde dessen Häufigkeit aufgetragen.

Der hier ermittelte Z'-Faktor beträgt 0,80.

Inwieweit an His-eCFP-Cyc.A gebundenes His-eYFP-p27 sich wieder verdrängen lässt, wurde anhand von FRET-Titrationsen mit hiermit potentiell interferierenden Cdk-Substraten untersucht. Als solche dienen humanes Dynamin 1 (Dyn1) [Smillie & Cousin 2005] und Drp1 (siehe Abschnitt 3.2.4). Von Dyn1 und Drp1 war zuvor noch nicht bekannt, ob sie mit der bereits beschriebenen *remote substrate-binding site* von Cyclin A interagieren, an der auch p27 bindet [Brown *et al.* 1999a]. Sofern das zuträfe, sollten sie p27 verdrängen können. Generell ist hierbei zu berücksichtigen, dass p27 ein relativ starker Interaktionspartner von Cyclin A ist, der während der Evolution als Inhibitor darauf optimiert worden ist, die Interaktion mit Substraten zu unterbinden. Ein Effekt ist daher erst bei höheren Substratkonzentrationen zu erwarten.

Die Messung des FRET-Signals erfolgte wie zuvor im 384-Well-Plattenformat als Zweipunktbestimmung. Dabei wurde die zeitliche Entwicklung des FRET-Signals im 30-Minuten-Takt bei Raumtemperatur beobachtet. Die bei den Titrationsen resultierenden FRET-Signaländerungen wurde relativ zu der durch überschüssiges GST-p27 erreichten FRET-Signaländerung betrachtet, um so den Anteil an gebundenen His-eYFP-p27 ermitteln zu können. Dabei wurde davon ausgegangen, dass überschüssiges GST-p27 His-eYFP-p27 nahezu vollständig verdrängen kann.

Die Analyse der Titration des FRET-Paars mit Dyn1 und Drp1 ergibt, dass das FRET-Signal mit zunehmender Konzentration an Dyn1 abnimmt, wohingegen ein identischer Konzentrationszuwachs an Drp1 zu keiner signifikanten Veränderung des FRET-Signals führt (siehe 3.20.A und B). Daraus kann geschlossen werden, dass nur Dyn1, nicht aber Drp1 mit der Interaktion zwischen p27 und Cyclin A interferiert. Die hierdurch erzielte Verdrängung vollzieht sich derart langsam, dass sich deren zeitliche Entwicklung verfolgen lässt (siehe 3.20.C). Nimmt man an, dass sich die Entwicklung annähernd exponentiell verhält, ergibt sich für die exponentielle Zeitkonstante (τ) ein Wert von ca. 20 min; der EC₅₀-Wert liegt nach Gleichgewichtseinstellung bei $4,4 \pm 0,8$

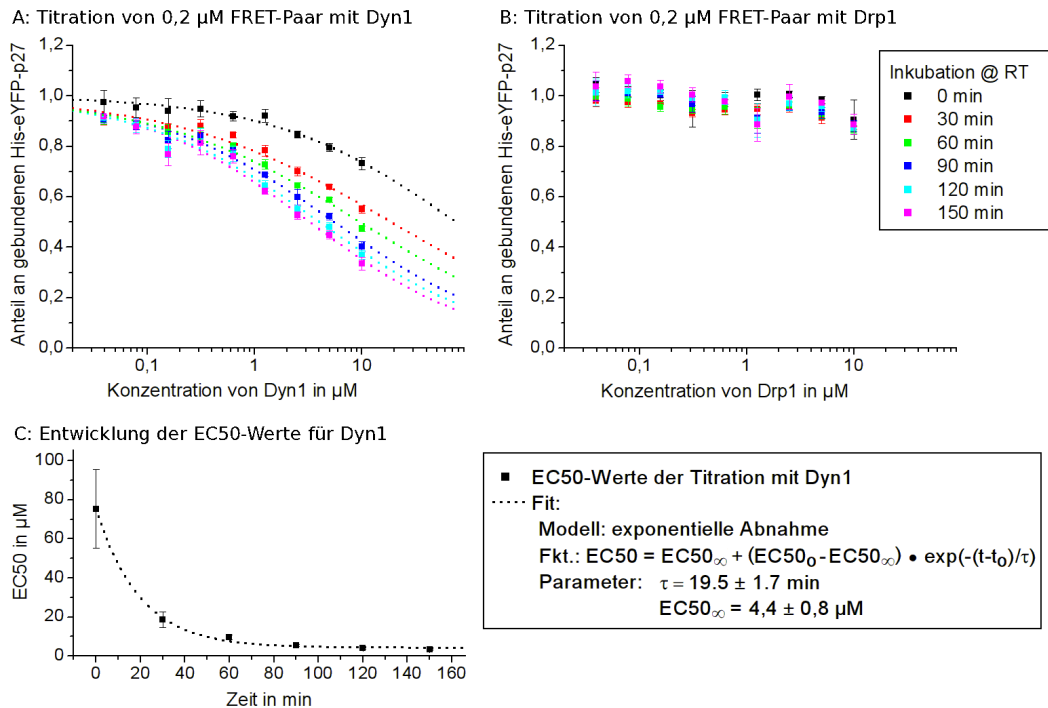


Abb. 3.20: Titration des FRET-Paars mit Dyn1 und Drp1:

His-eCFP-Cyc.A/His-eYFP-p27 wurde mit Dyn1 (A) und Drp1 (B) titriert und die entsprechenden Verhältnisse der YFP- zu CFP-Fluoreszenzintensitäten ($R = \text{Em.527}/\text{Em.485}$) wurden in Vierfachbestimmungen nach bestimmten Inkubationszeiten gemessen. Hieraus wurde der Anteil an gebundenen His-eYFP-p27 (f) berechnet: $f = (R - R_-)/(R_+ - R_-)$, wobei zur Bestimmung des oberen Grenzwertes (+) das FRET-Paar unter FRET-Bedingungen diente und der untere Grenzwert (-) durch Zugabe von überschüssigen GST-p27 dargestellt wurde. C: Die EC₅₀-Werte für die Titration mit Dyn1 wurden mittels einer sigmoidalen Kurvenanpassung ermittelt. Deren zeitliche Entwicklung wurde mit dem mathematischen Modell einer exponentiellen Abnahme beschrieben.

μM . Ob Dyn1 mit Cyclin A oder p27 interagiert, ist bisher noch nicht bekannt. Es lässt sich aber vermuten, dass Dyn1 mit der *remote substrate-binding site* innerhalb der Cyclin-Box von Cyclin A interagiert, durch die häufig Cdk-Substrate zusätzlich erkannt werden [Brown *et al.* 1999a]. Im Gegensatz hierzu bleibt das FRET-Signal für die Titration mit Drp1 nahezu unverändert. Dass Drp1 nicht mit der Interaktion zwischen p27 und Cyclin A konkurriert, steht im Einklang mit der Literatur. Denn laut Funakoshi *et al.* interagiert Drp1 mit dem N-terminalen Bereich von Cyclin A, nicht aber mit der Cyclin-Box, mit der p27 interagiert [Funakoshi *et al.* 1999] [Russo *et al.* 1996a].

Aus der Analyse der Titrations lässt sich daher zum einen schließen, dass auch Anteile an verdrängten His-eYFP-p27 anhand der FRET-Signaländerung detektiert werden können, und zum anderen, dass das FRET-Paar auch über längere Inkubationszeiten bei Raumtemperatur ein

stabiles Messsignal liefert. Zudem ist es gelungen den FRET-Assay zu miniaturisieren, so dass Messungen im Hochdurchsatzmaßstab ermöglicht werden. Der hierfür ermittelte Z' -Faktor deutet auf eine hinreichend hohe statistische Signifikanz hin. Demnach eignet sich der FRET-Assay, um *High-Throughput Screenings* zur Identifizierung potentieller Wirkstoffe durchzuführen.

3.2.6 HTRF-Assay

Neben dem CFP/YFP-basierten FRET-Assay wurde ein HTRF-Assay etabliert. Die Etablierung erfolgte während eines Aufenthaltes in der *High Throughput Screening Core Facility* des *Memorial Sloan-Kettering Cancer Centers* in New York, um hiermit anschließend einen *High Throughput Screen* durchführen zu können. Der HTRF-Assay wurde gleich von Beginn an direkt für Messungen im Hochdurchsatzmaßstab optimiert, wobei zunächst das 384-Well-Plattenformat verwendet wurde. Als FRET-Paar des HTRF-Assays diente Europium-Kryptat (EuK) und modifiziertes Allophycocyanin (XL-665), welche in Form eines α -GST- und α -His-Antikörpers an GST-p27 und MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A gebunden wurden. Erste Messungen hierfür zeigten eine Zunahme des HTRF-Signals. Somit kann angenommen werden, dass das Antikörper-FRET-Paar α -GST-EuK und α -His-XL665 zusammen mit GST-p27 und MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A einen funktionalen HTRF-Sensorkomplex ausbildet.

Um ein möglichst optimales HTRF-Signal zu erzielen, wurden die Konzentrationen und Inkubationszeiten für die Ausbildung des HTRF-Sensorkomplexes variiert. Hierzu wurden zunächst MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A und GST-p27 gegeneinander titriert und bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Antikörper hinzugegeben. Dabei betragen die Messkonzentrationen 2,5 nM α -GST-EuK und 100 nM α -His-XL665; das Messvolumen betrug 20 μ l pro Well. Der Messpuffer bestand aus PBS-pH: 7,4, 400 mM KF, 0,005% Tween 20, 1 mM TCEP. Nach einer zweiten Inkubationszeit für die Antikörperbindung wurde die Emission von XL665 bei 665 nm und von EuK bei 620 nm nach Anregung bei 340 nm mit dem Plattenlesegerät Victor 5 (PerkinElmer) gemessen. Hierbei wurde zwischen Anregung und Detektion ein Zeitversatz von 50 μ s eingefügt. Als HTRF-Signal diente das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten (Em.665/Em.620). Als Positivkontrolle wurde ein direkt aneinander bindendes Antikörper-FRET-Paar verwendet, bestehend aus 2,8 nM α -mouse IgG-EuK und 100 nM α -His-XL665. Für die Negativkontrollen wurde der HTRF-Assay in Abwesenheit von GST-p27 oder MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A durchgeführt. Da hierdurch das Auftreten von FRET unterbunden wurde, entspricht das für die Negativkontrolle gemessene Intensitätsverhältnis dem Hintergrundrauschen des HTRF-Signals.

Die Analyse der Titration ergibt, dass das HTRF-Signal mit zunehmender Konzentration an MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A im Bereich von 25-200 nM ansteigt (siehe Abb. 3.21). Das dabei erzielte HTRF-Signal liegt im Größenbereich der Positivkontrolle und ist deutlich größer als

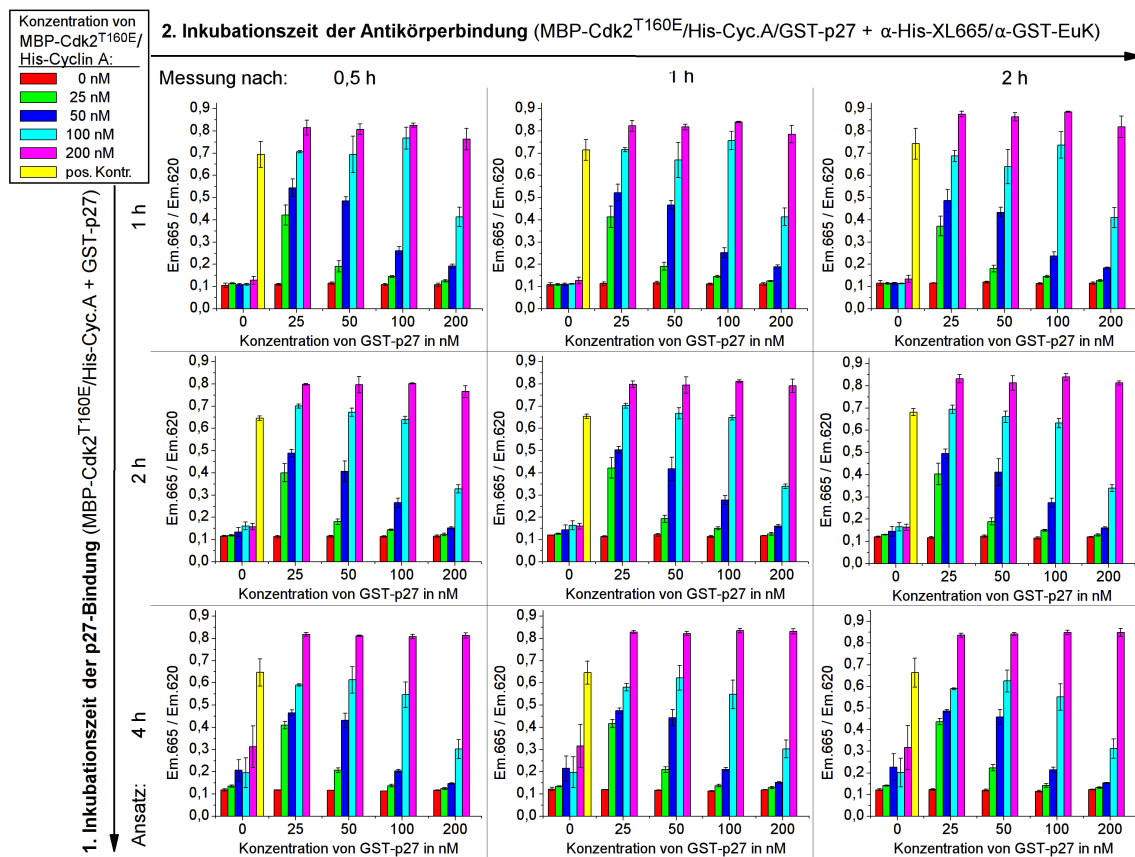


Abb. 3.21: Titration zwischen MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A und GST-p27:

MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A und GST-p27 wurden zunächst gegeneinander titriert und anschließend mit den Antikörpern α -His-XL665 und α -GST-EuK versetzt. Sowohl für ersteres als auch letzteres wurden die Inkubationszeiten variiert. Hiernach wurden die zugehörigen Verhältnisse der XL665- zu EuK-Fluoreszenzintensitäten ($Em.665/Em.620$) in Dreifachbestimmungen gemessen. Diese Verhältnisse sind in Form von Säulendiagrammen gegen die GST-p27-Konzentration aufgetragen. Die Veränderung der MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A-Konzentration wird durch unterschiedliche Säulenfarben symbolisiert (siehe Legende links oben). Die Variation der beiden Inkubationszeiten ist durch die unterschiedliche Anordnung der Säulendiagramme in den Zeilen und Spalten dargestellt.

das der Negativkontrolle, d.h. das maximale Signal/Hintergrund-Verhältnis des HTRF-Assays weist hier den Faktor acht auf. Jedoch ist kein Anstieg des HTRF-Signals mit zunehmender Konzentration an GST-p27 im Bereich von 25-200 nM beobachtbar; wenn die Konzentration von MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A niedriger ist als die von GST-p27, fällt das HTRF-Signal mit zunehmender Konzentration an GST-p27 sogar ab. Dies erklärt sich daraus, dass nur ein kleiner Bruchteil an GST-p27 mit α -GST-EuK markiert worden ist, da die Konzentration an α -GST-EuK und somit an GST-p27/ α -GST-EuK nur 2,5 nM beträgt. Wenn mehr GST-p27 als MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A vorhanden ist, tritt das überschüssige GST-p27 in Konkurrenz mit GST-p27/ α -GST-EuK, um an Cdk2/Cyc.A zu binden. Da hierdurch die Ausbildung des

HTRF-Sensorkomplexes gestört wird, äußert sich das überschüssige GST-p27 in einer Abnahme des HTRF-Signals. Längere Inkubationszeiten für die p27-Bindung oder Antikörperbindung führen zu keiner Veränderung des HTRF-Signals. Dies deutet darauf hin, dass sich der HTRF-Sensorkomplex relativ schnell ausbildet und über einen längeren Zeitraum, d.h. mehrere Stunden, bei Raumtemperatur stabil bleibt. Für die nachfolgenden Messungen wurde daher eine MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A-Konzentration von 200 nM und eine GST-p27-Konzentration von 25 nM gewählt; die Inkubationszeit für die p27-Bindung wurde auf 1 h und die für die Antikörperbindung auf 0,5 h festgesetzt.

Inwieweit bereits gebundenes p27 sich aus dem HTRF-Sensorkomplex wieder verdrängen lässt, d.h. also sich reversibel verhält, wurde anhand einer Titration mit überschüssigen GST-p27 überprüft. Wenn das zusätzlich zugegebene GST-p27 gebundenes GST-p27/ α -GST-EuK aus dem HTRF-Sensorkomplex verdrängt, sollte dies anhand einer HTRF-Signalabnahme detektierbar sein. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die GST-Antikörperbindung sich im Vergleich zur p27-Bindung nahezu irreversibel verhält.

Zudem wurde überprüft, ob die Gegenwart von 1% (v/v) DMSO störend auf den HTRF-Assay einwirkt. Denn dieser Anteil an DMSO gelangt als Lösungsmittel der im *high-throughput screen* verwendeten Substanzen in die Messlösung.

Um die Inkubation mit den in DMSO gelösten Substanzen zu simulieren, wurde die entsprechende Menge an DMSO (10%, 2 μ l/Well) vorgelegt, MBP-Cdk2/His-Cyc.A hinzugefügt und 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der HTRF-Sensorkomplex wie für das vorherige Experiment beschrieben unter den optimierten Bedingungen gebildet. Danach wurde ein variabler Überschuss an GST-p27 hinzugefügt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messbedingungen blieben ansonsten unverändert. Die Konzentrationsabhängigkeit und der zeitliche Verlauf der Verdrängung wurde anhand des HTRF-Signals verfolgt.

Die Analyse der Titration mit überschüssigen GST-p27 ergibt, dass das HTRF-Signal mit zunehmender Konzentration an zusätzlichen GST-p27 und mit andauernder Inkubationszeit abnimmt (siehe Abb. 3.22). Die Gleichgewichtseinstellung ist nach 2 h Inkubation nahezu abgeschlossen. Vergleicht man das HTRF-Signal der Titration mit der Negativkontrolle (siehe Abb. 3.21), zeigt sich, dass nur eine partielle Verdrängung erreicht worden ist. Daher war der Überschuss an GST-p27 nicht ausreichend, um eine Sättigung zu erreichen. Trotzdem ist die erreichte HTRF-Signalabnahme signifikant. Dies deutet somit darauf hin, dass eine Verdrängung von GST-p27 aus dem HTRF-Sensorkomplex messbar ist.

Im Vergleich zum vorherigen Experiment fällt auf, dass die maximal erreichte Intensität des HTRF-Signals nahezu identisch geblieben ist: $Em.665 / Em.620 = ca. 0,8$ (vergleiche Abb. 3.21 und Abb. 3.22). Dies trifft auf die gesamte Inkubationszeit über ca. 4 h zu. Daraus lässt sich

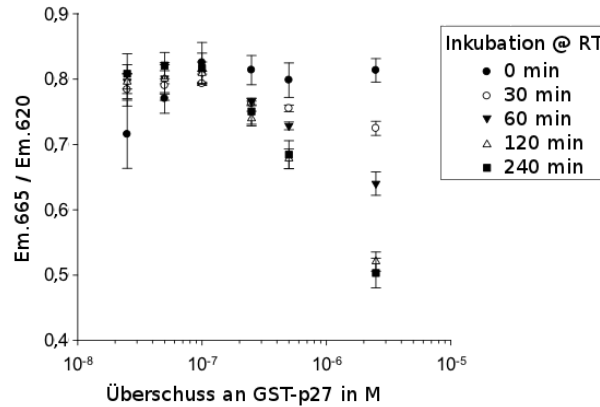


Abb. 3.22: Titration des HTRF-Sensorkomplexes mit überschüssigen GST-p27:
Der HTRF-Sensorkomplex wurde mit überschüssigen GST-p27 titriert und die entsprechenden Verhältnisse der XL665- zu EuK-Fluoreszenzintensitäten (Em.665/Em.620) wurden in Dreifachbestimmungen nach bestimmten Inkubationszeiten gemessen.

schließen, dass die Gegenwart von 1% DMSO nicht störend auf den HTRF-Assay einwirkt.

Die Konzentration von α -His-XL665 wurde ebenfalls anhand einer Titration optimiert. Hierzu wurde nach Gleichgewichtseinstellung der p27-Bindung eine variable Menge an α -His-XL665 zur Messlösung hinzugegeben. Die Zugabe erfolgte zusammen mit 2,5 nM α -GST-EuK. Zugleich wurde der Assay in ein 1536-Well-Plattenformat mit einem Messvolumen von 10 μ l pro Well überführt, um so einen höheren Durchsatz an Messungen zu ermöglichen. Ansonsten blieben die Messbedingungen unverändert. Auch die Positiv- und Negativkontrollen wurden wie gehabt übernommen.

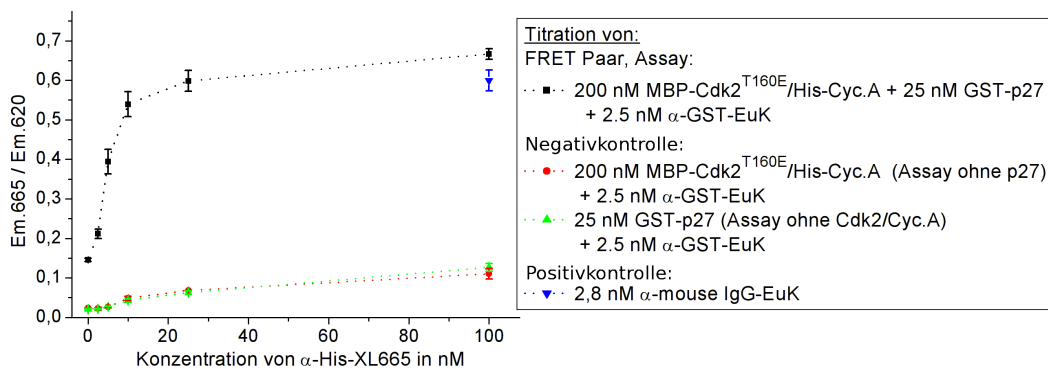


Abb. 3.23: Titration zur Optimierung der Konzentration von α -His-XL665:
MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A/GST-p27 wurde mit α -His-XL665 titriert. Zugleich mit α -His-XL665 wurde α -GST-EuK zugegen, um den HTRF-Sensorkomplex ausbilden zu können. Nach halbstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden entsprechenden Verhältnisse der XL665- zu EuK-Fluoreszenzintensitäten (Em.665/Em.620) in Dreifachbestimmungen gemessen.

Die Analyse der Titration zeigt, dass das HTRF-Signal zunächst mit zunehmender Konzentration an α -His-XL665 ansteigt (siehe Abb. 3.23). Mit dem Erreichen einer Konzentration von ca. 20 nM geht das HTRF-Signal in ein Plateau über. Das hierbei erreichte HTRF-Signal liegt wiederum im Größenbereich der Positivkontrolle. Die Titration der Negativkontrollen weist keinen vergleichbaren Anstieg des HTRF-Signals auf. Daher wurde für die weiteren Messungen eine α -His-XL665-Konzentration von 25 nM gewählt. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis hierfür liegt bei Faktor 9. Dies belegt, dass die Überführung in das 1536-Well-Plattenformat ohne gravierenden Verlust an HTRF-Signalstärke gelungen ist.

Die statistische Signifikanz des HTRF-Assays im 1536-Well-Plattenformat wurde durch Ermittlung des Z' -Faktors überprüft. Zur Darstellung eines oberen Grenzwertes wurde der HTRF-Assay unter FRET-Bedingungen inklusive 1 % DMSO verwendet. Als unterer Grenzwert diente das HTRF-Signal der Negativkontrolle, die alle Bestandteile des HTRF-Assays bis auf GST-p27 enthielt. Um die *high-throughput*-Bedingungen zu simulieren, wurde die Anzahl der Replikate auf 1536 erhöht, was einer vollständig befüllten 1536-Well-Platte entspricht. Die Pipettiervorgänge wurden automatisiert, indem hierfür der Dispenser Flexdrop eingesetzt wurde. Zur Veranschaulichung der erreichten Peakseparierung wurde hierfür das Histogramm erstellt.

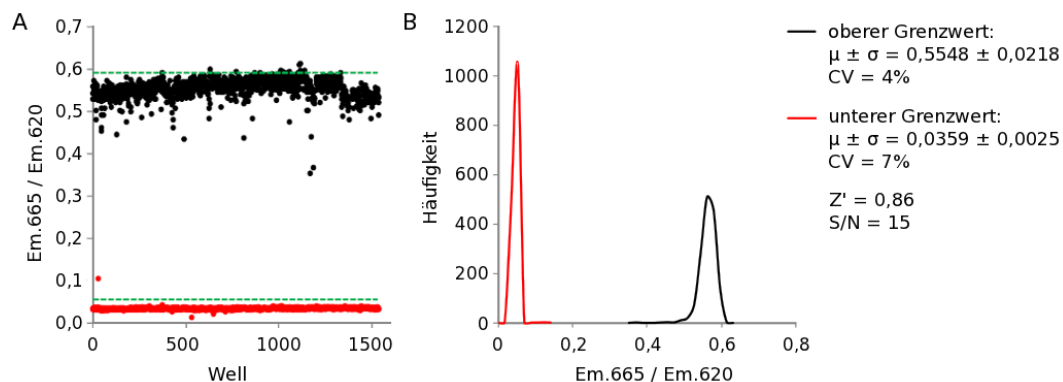


Abb. 3.24: HTRF-Histogramm:

Für eine 1536-Well-Platte mit Positivkontrollen (schwarz) und eine mit Negativkontrollen (rot) wurde das HTRF-Signal (Em.665/Em.620) gemessen. **A** Das HTRF-Signal wurde gegen die Laufnummer des Wells aufgetragen. Die Darstellung verdeutlicht insbesondere, inwieweit hierbei einzelne Ausreißer, d.h. abweichende Messwerte, auftraten. Die beiden grün-gepunkteten Linien markieren die Höhe der HTRF-Signale aus dem vorherigen Experiment, gemessen unter identischen Bedingungen (siehe Abb. 3.23). **B** Für das Histogramm wurde die Häufigkeit des HTRF-Signals gegen das HTRF-Signal aufgetragen. Für die beiden hierbei auftretenden Peaks wurde der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (σ), die auf den Mittelwert bezogene, relative Standardabweichung ($CV = \sigma/\mu$), Z' -Faktor (Z') und das Signal/Hintergrund-Verhältnis (S/N) ermittelt.

Das Histogramm zeigt eine relativ gute Separierung der beiden Grenzwerte (siehe Abb. 3.24.B). Sie befinden sich in guter Übereinstimmung mit den im vorherigen Experiment unter identischen Bedingungen gemessenen HTRF-Signalen, deren Mittelwerte durch die beiden grün-gepunkteten Linien in Abb. 3.24.A symbolisiert werden (vergleiche Abb. 3.23). Dies deutet auf eine gute Reproduzierbarkeit des HTRF-Signals hin. Die Mittelwerte der beiden Grenzwerte unterscheiden sich um den Faktor 15, während die relative Standardabweichung bei 4 und 7% liegt. Der hierfür ermittelte Z' -Faktor beträgt 0,86. Zudem ist die Anzahl der von Mittelwert stark abweichenden Messwerte relativ gering (siehe Abb. 3.24.A). Somit wäre die Anzahl falsch-positiv gewerteter Hits ebenfalls relativ gering.

Als Fazit lässt sich daher hier festhalten, dass es gelungen ist, einen für *High-Throughput Screenings* tauglichen HTRF-Assay zu etablieren. Denn es konnte dargelegt werden, dass der HTRF-Assay es ermöglicht, eine Verdrängung der p27-Bindung zu detektieren (siehe Abb. 3.22). Dabei weist der HTRF-Assay die erforderliche statistische Signifikanz im 1536-Well-Plattenformat auf (siehe Abb. 3.24). Zudem bleibt das HTRF-Signal über mehrere Stunden bei Raumtemperatur stabil (siehe Abb. 3.21 und Abb. 3.22).

3.3 High-Throughput Screening

Ziel der *High-Throughput Screenings* war es, Substanzen zu identifizieren, welche die Interaktion zwischen p27 und Cdk2/Cyclin A aufheben. Hierzu wurden Sammlungen wirkstoffähnlicher Substanzen mit den hierfür zuvor entwickelten *Screening*-Systemen auf ihr Potential getestet, diese Interaktion zu unterbinden. Als *Screening*-Systeme dienten der FRET-Assay und der HTRF-Assay, welche nach hinreichender Optimierung als hochdurchsatztauglich befunden worden waren (siehe Abschnitt 3.2.5 und 3.2.6). Um die Substanzsammlungen im Hochdurchsatzmaßstab screenen zu können, musste die Durchführung unter Aufrechterhaltung einer möglichst hohen Präzision automatisiert werden. Da hierfür eine aufwendigere Laborautomatisierung mit Zugriff zu den Substanzsammlungen erforderlich ist, wurden hierauf spezialisierte Forschungseinrichtungen aufgesucht, d.h. für den FRET-Assay die *Screening Unit* des *Leibniz-Instituts für molekulare Pharmakologie* in Berlin und für den HTRF-Assay die *High Throughput Screening Core Facility* des *Memorial Sloan-Kettering Cancer Centers* in New York. Positiv getestete Substanzen wurden in *Sekundärscreens* validiert, indem ihre Dosis-Wirkungs-Beziehung in den *Screening*-Systemen bestimmt wurde.

3.3.1 FRET-Assay

Primärscreen

Mit dem FRET-Assay wurden 20711 Substanzen im Hochdurchsatz daraufhin getestet, ob sie die (bereits formierte) Bindung zwischen His-eYFP-p27 und His-eCFP-Cyc.A zu lösen vermögen. Die Substanzen entstammten teils der ChemBioNet-Sammlung (Chemdiv) und teils der LOPAC Sammlung (Sigma-Aldrich).

Zur Vorbereitung des *Screens* wurden die Substanzsammlungen mit einem automatisierten *Liquid Handling System* in die 384-Well-Platten verteilt. Dabei wurden jeweils 0,2 µl 1000 µM Substanz in DMSO in die *Wells* vorgelegt, so dass die Messkonzentration an Substanz letztlich 10 µM in 20 µl Assay betrug. Anschließend wurden 19,8 µl/Well FRET-Paar mit Hilfe des Dispensors MicroFlo (Biotek) hinzugegeben. Die Messkonzentration an FRET-Paar betrug 25 µM. Nach einer Inkubationszeit von mindestens einer halben Stunde wurde das FRET-Signal (Em.527 / Em. 485) mit dem Plattenlesegerät Safire 2 (Tecan) gemessen. Je Platte wurden 16 obere und untere Grenzwerte bestimmt. Zur Bestimmung des oberen Grenzwertes wurde 25 µM FRET-Paar inklusive 1% DMSO verwendet. Der untere Grenzwert wurde anhand von 25 µM FRET-Donor, d.h. His-eCFP-Cyc.A, inklusive 1% DMSO bestimmt. Somit wurde die direkte Anregung von YFP vernachlässigt, die im FRET-Assay zum Hintergrund beiträgt, wenn auch nur zu einen gewissen Bruchteil (siehe Abb. 3.17).

Während des *Screens* blieb der obere Grenzwert stabil, wohingegen der untere Grenzwert abnahm. Daher wurde der *Screen* für die Statistik in mehrere Gruppen von Platten unterteilt (A-E).

Die statistische Analyse ergibt, dass die relative Standardabweichung des oberen Grenzwertes für alle Gruppen unterhalb von 3% liegt (siehe 3.25). Zudem liegen die Mittelwerte der Gruppen im gleichen Größenbereich, d.h. sie schwanken zwischen 0,75 und 0,80. Dies deutet darauf hin, dass das FRET-Signal während des *Screens* stabil geblieben ist.

Für den unteren Grenzwert hingegen nehmen die Mittelwerte der Gruppen kontinuierlich ab, d.h. von 0,60 auf 0,53. Durch die Gruppierungen konnten ihre relative Standardabweichungen unterhalb von 3,5% gehalten werden; davon weicht nur Gruppe D ab (CV = 5,1%), die mit 4 der 61 Platten eine kleine Gruppe darstellt. Da der untere Grenzwert abnimmt, verbessert sich das Signal/Hintergrund-Verhältnis von ca. 1,3 für Gruppe A und B auf über 1,4 für Gruppe C und E. Gruppe C und E, die 37 der 61 Platten umfassen, weisen einen akzeptablen Z'-Faktor von über 0,5 auf. Dies spricht dafür, dass während des *Screens* eine hinreichend hohe statistische Signifikanz erzielt werden konnte. Abweichend davon verhalten sich Gruppe A, B und D, deren Z'-Faktoren 0,34, 0,35 und 0,41 betragen. Allerdings zeigen die oberen Grenzwerte, dass sich auch für diese Gruppen das FRET-Signal nicht signifikant verändert hat.

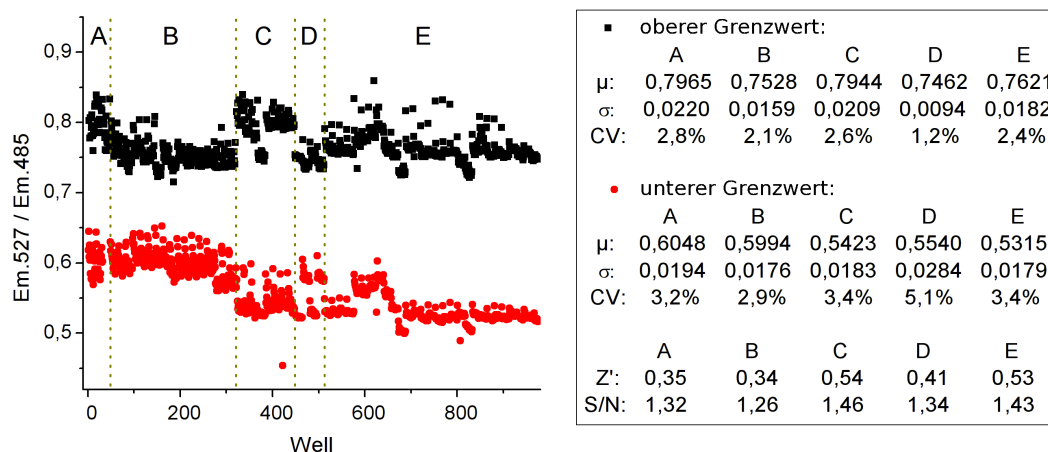


Abb. 3.25: Verteilung der Grenzwerte:

Während des Screens wurden für jede Platte der obere (schwarz) und untere Grenzwert (rot) bestimmt, indem das FRET-Signal (Em.527/Em.485) der Positiv- und Negativkontrollen gemessen wurde. Das FRET-Signal wurde gegen die Laufnummer des Wells aufgetragen. Für die Verteilung des oberen und unteren Grenzwertes wurde der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (σ), die auf den Mittelwert bezogene, relative Standardabweichung ($CV = \sigma/\mu$), Z'-Faktor (Z') und das Signal/Hintergrund-Verhältnis (S/N) ermittelt. Für die statistische Auswertung wurden die insgesamt 61 Platten in vier Gruppen unterteilt, davon enthält Gruppe A: 3 Platten, B: 17 Platten, C: 8 Platten, D: 4 Platten, E: 29 Platten.

Als potentielle Hits wurden die Substanzen eingestuft, deren FRET-Signal um mehr als drei Standardabweichungen vom oberen Grenzwert Richtung unteren Grenzwert abwich. Als solche wurden 326 der insgesamt 20711 Substanzen identifiziert. Dies entspricht einer Trefferquote von 1,6%.

Sekundärscreen

Zur Validierung wurden die im Primärscreen identifizierten Substanzen in einem hierzu identisch durchgeführten Sekundärscreen titriert. Dabei wurde die Substanzkonzentration von 0,8 μM bis 50 μM variiert. Neben den Zweipunktmessungen wurden teilweise auch ganze Emissionsspektren bestimmt. Hierbei wurde FRET anhand der Veränderung der Form der Spektren detektiert. Durch Normierung der Spektren auf einen isobestischen Punkt, der auf 515 nm gesetzt wurde, konnten die Messgenauigkeiten der Absolutwerte reduziert werden. Zur Kontrolle, inwieweit sich die Substanzen unter den Messbedingungen als Farbstoffe verhalten, wurde auch eine Titration in Messpuffer in Abwesenheit von FRET-Paar durchgeführt.

Hierbei stellte sich für die überwiegende Anzahl der potentiellen Hits heraus, dass sie nicht reproduzierbar waren. Zudem zeigten die Titrations, dass es sich bei den Substanzen, die reproduzierbare Messergebnisse ergaben, zumeist um Farbstoffe handelte, die aufgrund ihrer

spektralen Eigenschaften mit dem FRET-Signal interferierten. Dies wurde insbesondere durch die Bestimmung der Emissionsspektren verdeutlicht. Letztlich blieb nur eine Substanz übrig, die FRET reduzierte ohne dabei das Messsignal zu verfälschen, nämlich NF449.

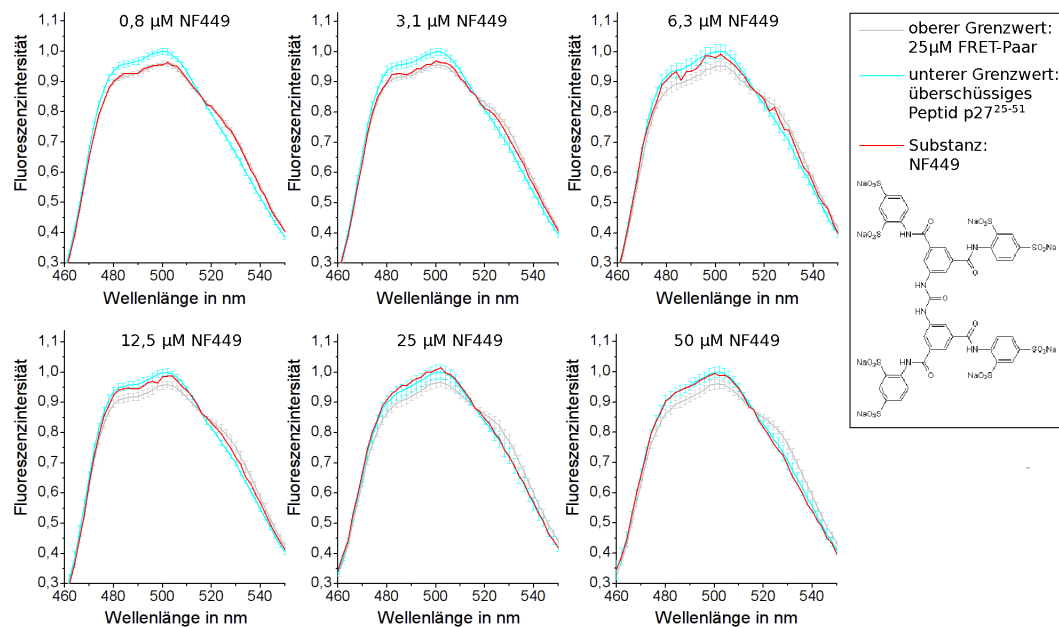


Abb. 3.26: Spektrale Analyse der FRET-Titration mit NF449:

25 μM FRET-Paar wurden mit NF449 titriert und die dazugehörigen Emissionsspektren wurden nach Anregung bei 420 nm gemessen (rot). Hiermit wurde der obere (grau) und untere Grenzwert (cyan) verglichen.

Die Analyse der Emissionsspektren ergibt, dass durch Zugabe von NF449 das FRET-Signal inhibiert wird (siehe Abb. 3.26). Denn das Emissionsspektrum für 1 μM NF449 entspricht dem des oberen Grenzwerts, während das Emissionsspektrum für 25 μM NF449 dem des unteren Grenzwerts gleicht. Dazwischen findet ein kontinuierlicher Übergang statt, wie die Emissionsspektren für 3 μM , 6 μM und 13 μM NF449 belegen. Die Erhöhung von 25 μM auf 50 μM NF449 führt zu keiner signifikanten Veränderung des Emissionsspektrums. Dabei ist auch keine Verzerrung des Emissionsspektrums im Vergleich zu den Grenzwerten erkennbar. Folglich ist die hier erreichte Signalreduktion vergleichbar mit der, die durch überschüssiges Peptid p27²⁵⁻⁵¹, d.h. der Negativkontrolle, bewirkt wird. Demnach löst NF449 die Bindung zwischen p27 und Cyclin A.

3.3.2 HTRF-Assay

Pilot-Screen

Der HTRF-Assay wurde zunächst in einem *Pilot-Screen* an 6912 Substanzen erprobt. Dabei wurde untersucht, mit welcher Zuverlässigkeit potentielle Hits mit dem HTRF-Assay unter *high-throughput*-Bedingungen identifiziert werden können. Identifizieren lassen sich Substanzen, wenn sie die Ausbildung des HTRF-Sensorkomplexes verhindern. Die hierfür verwendete Sammlung der *High Throughput Screening Core Facility* besteht aus diversen, strukturell unterschiedlichen, biologisch aktiven Substanzen, die bereits bekannten Wirkstoffen, experimentell bestätigten Bioaktiva und seltenen Naturstoffen entnommen wurden. Diese Substanzen sind teilweise synthetischer, teilweise natürlicher Herkunft und von diversen Anbietern bezogen (z.B. aus der Microsource Spectrum Collection, Prestwick Chemical Library und Sigma-Aldrich LOPAC Library).

Zunächst wurde die Sammlung mit einem automatisierten *Liquid Handling System* in die 1536-Well-Platten verteilt, wobei 1 μ l 100 μ M Substanz in 10% DMSO in die *Wells* vorgelegt wurde, so dass ihre Messkonzentration letztlich 10 μ M in 10 μ l Assay betrug. Die Zugabe der für den HTRF-Assay erforderlichen Reagenzien wurde anschließend mit Hilfe des Dispensors Flexdrop durchgeführt. Das Protokoll für die Durchführung des Assays wurde genau so übernommen, wie es zuvor während der Assay-Etablierung ausgearbeitet worden war (siehe Abschnitt 5.2); dabei wurden die als optimal befundenen Assay-Bedingungen eingehalten (siehe Abschnitt 3.2.6). Der *Screen* der Substanzen wurde in einem zweiten identisch durchgeführten Durchgang wiederholt, um die Reproduzierbarkeit ermittelter Hits aufzuzeigen und falsch-positiv gewertete Hits abzugrenzen. Jede Platte enthielt 64 Positiv- und Negativkontrollen, die die internen Grenzwerte für den dynamischen Bereich des HTRF-Assays repräsentieren. Als Positivkontrolle diente der HTRF-Assay inklusive 1% (v/v) DMSO ohne Substanz unter FRET-Bedingungen. Die Negativkontrolle enthielt sämtliche Bestandteile der Positivkontrolle bis auf GST-p27. Zur Veranschaulichung der erreichten Separierung wurden die Grenzwerte des *Pilot-Screens* als Histogramm dargestellt.

Das Histogramm verdeutlicht, dass für den *Pilot-Screen* insgesamt eine gute Peakseparierung erzielt werden konnte (siehe Abb. 3.27). Dabei belegt die Verteilung des oberen Grenzwertes, dass das HTRF-Signal während des *Pilot-Screens* nur geringfügig abgefallen ist. Dies wird durch die relative Standardabweichung bestätigt, die 7% beträgt. Das Hintergrundrauschen des HTRF-Signals, welches durch den unteren Grenzwert repräsentiert wird, bleibt annähernd konstant, besitzt aber aufgrund des niedrigeren Mittelwertes eine etwas höhere relative Standardabweichung von 16%. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis liegt bei Faktor 12. Somit ähnelt

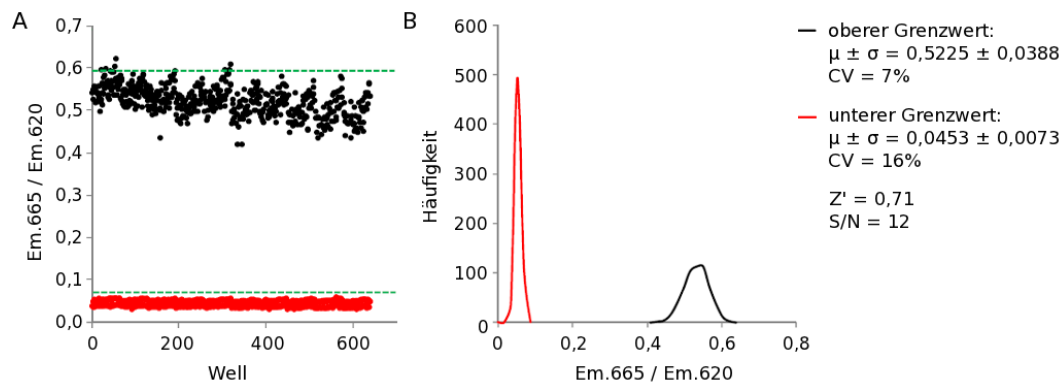


Abb. 3.27: HTRF-Histogramm des Pilot-Screens:

Während des *Pilot-Screens* wurden für jede Platte der obere (schwarz) und untere Grenzwert (rot) bestimmt, indem das HTRF-Signal (Em.665/Em.620) der Positiv- und Negativkontrollen gemessen wurde. **A** Das HTRF-Signal wurde gegen die Laufnummer des Wells aufgetragen. Die beiden grün-gepunkteten Linien repräsentieren das frühere Ergebnis hierfür, gemessen unter identischen Bedingungen (siehe Abb. 3.23). **B** Für das Histogramm wurde die Häufigkeit des HTRF-Signals gegen das HTRF-Signal aufgetragen. Für die beiden hierbei auftretenden Peaks wurde der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (σ), die auf den Mittelwert bezogene, relative Standardabweichung ($CV = \sigma/\mu$), Z'-Faktor (Z') und das Signal/Hintergrund-Verhältnis (S/N) ermittelt.

die Peakseparierung der, die während der Assay-Etablierung unter identischen Bedingungen erzielt worden war (vergleiche Abb. 3.23 und Abb. 3.24). Der Z'-Faktor des *Pilot-Screens* beträgt 0,71. Dieser hierfür relativ hohe Wert weist darauf hin, dass für den gesamten *Pilot-Screen* durchgängig eine hohe statistische Signifikanz erzielt werden konnte, und ist somit Beleg für ein wohldefiniertes, stabiles HTRF-Signal, welches als solches sich gut vom Hintergrundrauschen abgrenzen lässt. Daher spricht dies dafür, dass Signaländerungen durch die Substanzzugabe während des *Pilot-Screens* mit hoher Zuverlässigkeit detektiert werden konnten.

Um dies überprüfen zu können, wurden die Substanzen zweimal in identisch durchgeführten Messreihen mit dem HTRF-Assay vermessen. Ein Vergleich der Resultate beider Messreihen miteinander lieferte somit Aufschluss über die Reproduzierbarkeit gemessener Hits und über das Ausmaß des Auftretens von Messabweichungen unter *high-throughput*-Bedingungen.

Die Analyse der Streuung des HTRF-Signals zwischen den beiden Messreihen ergibt, dass die Messwerte weitestgehend entlang einer Diagonalen im Streudiagramm verteilt sind. Somit resultieren hier für die Duplikate zwischen den Messreihen nahezu gleichgroße Messwerte (siehe Abb. 3.28). Dabei sammelt sich die überwiegende Anzahl der Messwerte bei 0% Signalinhibierung. Dies bedeutet, dass die dazugehörigen, getesteten Substanzen nicht mit den HTRF-Assay interferieren. Setzt man die untere Ausschlussgrenze auf 25% Signalinhibierung, bleiben 14

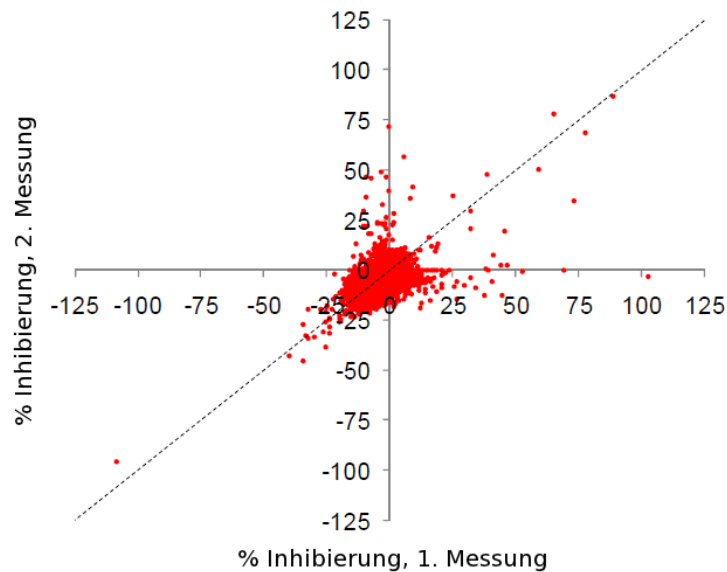


Abb. 3.28: Streudiagramm des *Pilot-Screens*:

Die Substanz-Sammlung der *High Throughput Screening Core Facility* wurde während des *Pilot-Screens* zweimal in identisch durchgeführten Messreihen mit dem HTRF-Assay vermessen. Die Änderung des HTRF-Signals (x) durch die Substanzzugabe wurde relativ zum oberen (+) und unteren (-) Grenzwert (μ) ausgedrückt als Prozentsatz der Signalinhibierung: $\% \text{ Inh.} = 100 * (\mu_+ - x) / (\mu_+ - \mu_-)$. Die Resultate beider Messreihen wurden gegeneinander aufgetragen, um so die Streuung des HTRF-Signals darzustellen. Die Diagonale deutet die Lage gleichgroßer Werte an.

Substanzen übrig, die durch das Resultat beider Messreihen als potentielle Hits eingestuft werden können. Dies entspricht einer relativ niedrigen Rate an potentiellen Hits von 0,18%. Allerdings ist erfahrungsgemäß die Identifizierung von Substanzen, die eine Protein-Protein-Interaktion inhibieren, ein relativ schwieriges Unterfangen. Daher verweist das Ausbleiben einer erhöhten Trefferquote auf eine hohe Robustheit des HTRF-Assays gegenüber Interferenzen, die nicht die p27-Bindung, sondern das HTRF-Messsystem an sich betreffen. Inwieweit dies auch auf die 14 positiv gewerteten Substanzen zutrifft, wurde im späteren überprüft.

Daher bestätigt das Resultat des *Pilot-Screens*, dass der HTRF-Assay genutzt werden kann, um mit einer hinreichenden Zuverlässigkeit potentielle Hits in *High-Throughput Screenings* zu identifizieren. Allerdings ist die Trefferquote derart niedrig, dass sie von der Anzahl einzelner, falsch-positiv gewerteter Hits überstiegen wird. Dies wird verdeutlicht, wenn in Abb. 3.28 die Messwerte betrachtet werden, die sich entlang der x- und y-Achse verteilen.

Daher bedürfen potentielle Hits, die mit dem HTRF-Assay unter *high-throughput*-Bedingungen in Einfachbestimmungen identifiziert worden sind, einer nachträglichen Bestätigung z.B. anhand von HTRF-Titrationen, um falsch-positiv gewertete Hits aussortieren zu können.

Screen der NCI-Sammlung

Um weitere potentielle Hits identifizieren zu können, wurden 55224 Substanzen der NCI-Sammlung einem *Screen* mit dem HTRF-Assay unterzogen. Die Durchführung blieb identisch wie im vorherigen *Pilot-Screen* (siehe Abschnitt 3.3.2); allerdings wurden die Substanzen in nur einer Messreihe vermessen, d.h. als Einfachbestimmung. Wie gehabt wurden für jede Platte 64 Positiv- und Negativkontrollen als interne Grenzwerte mitvermessen. Während des *Screens* stellte sich heraus, dass das HTRF-Signal nicht stabil blieb, sondern abfiel. Die Ursache hierfür ist ungeklärt. Um eine sinnvolle Statistik erheben zu können, wurden die gemessenen Platten in vier Gruppen (A-D) unterteilt. Dabei wurde versucht, Platten möglichst gleichgroßer Grenzwerte zusammenzulegen, um so die relative Standardabweichung der Grenzwerte klein zu halten. Anhand der internen Grenzwerte wurde es ermöglicht, die Entwicklung des HTRF-Signals bei der Berechnung der Signalinhibierung durch die Substanzen berücksichtigen zu können.

Die statistische Analyse ergibt, dass das HTRF-Signal für Gruppe A im Mittel ca. um 25% kleiner ist als das HTRF-Signal früherer Messungen (siehe Abb. 3.29). Für Gruppe B bis D fällt das HTRF-Signal noch weiter ab. Allerdings gilt dies nicht nur für den oberen Grenzwert, sondern auch für den unteren Grenzwert. Dadurch ergibt sich für den *Screen* ein relativ stabiles Signal/Hintergrund-Verhältnis, welches Werte von 10 bis 14 annimmt. Anzumerken ist dabei, dass das HTRF-Signal ja keine Intensität, sondern ein Intensitätsverhältnis darstellt. Somit ist hier ein Verlust an Signal nicht gleichbedeutend mit einem Verlust an Intensität zu Lasten der Messgenauigkeit. So liegen die relative Standardabweichungen der Grenzwerte unterhalb von 15% und sind somit in der gleichen Größenordnung wie im *Pilot-Screen*. Die entsprechenden Z' -Faktoren sind größer gleich 0,5. Dies spricht dafür, dass während des *Screens* eine hinreichend hohe statistische Signifikanz erzielt werden konnte. Abweichend davon verhält sich nur Gruppe D, die allerdings bloß 4 der 46 Platten umfasst. Für diese Gruppe weisen die Grenzwerte höhere relative Standardabweichungen von 16% und 20% auf, während das Signal/Hintergrund-Verhältnis einen niedrigeren Wert von 8 annimmt. Hierdurch resultiert ein Z' -Faktor von 0,36, der auf eine schlechtere Trennung des Signals vom Hintergrundrauschen hindeutet.

Insgesamt gesehen deutet die statistische Analyse der Grenzwerte darauf hin, dass während des *Screens* ein hinreichend großes und stabiles Signalfenster zur Verfügung stand, um zuverlässig potentielle Hits identifizieren zu können.

Für die Identifizierung der potentiellen Hits wurde die untere Ausschlussgrenze auf 50% Signalinhibierung gesetzt. Als Resultat blieben von den insgesamt 55224 Substanzen 525 positiv gewertete Substanzen übrig. Die Trefferquote an potentiellen Hits beträgt somit 0,95%. Daher ist die Trefferquote hier signifikant höher als im *Pilot-Screen*. Eine Erklärung hierfür ergibt sich daraus, dass die Identifizierung hier nicht als Doppel-, sondern als Einfachbestimmung erfolgte.

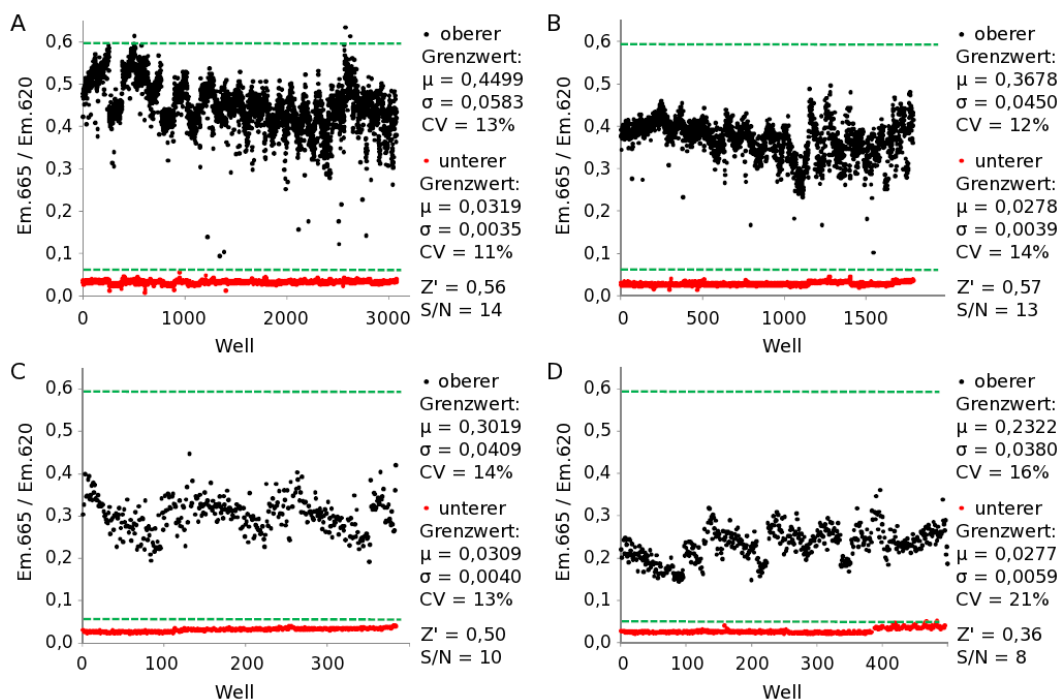


Abb. 3.29: Verteilung der Grenzwerte während des Screens der NCI-Sammlung:

Während des Screens der NCI-Sammlung wurde für jede Platte der obere (schwarz) und untere Grenzwert (rot) bestimmt, indem das HTRF-Signal (Em.665/Em.620) der Positiv- und Negativkontrollen gemessen wurde. Das HTRF-Signal wurde gegen die Laufnummer des Wells aufgetragen. Die beiden grün-gepunkteten Linien repräsentieren das frühere Ergebnis hierfür, gemessen unter identischen Bedingungen (siehe Abb. 3.23). Für die Verteilung der Grenzwerte wurden der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (σ), die auf den Mittelwert bezogene, relative Standardabweichung ($CV = \sigma/\mu$), Z' -Faktor (Z') und das Signal/Hintergrund-Verhältnis (S/N) ermittelt. Für die statistische Auswertung wurden die insgesamt 46 Platten in vier Gruppen unterteilt, davon enthält Gruppe A: 24 Platten, B: 14 Platten, C: 4 Platten, D: 4 Platten.

Dabei hat der *Pilot-Screen* bereits gezeigt, dass bei Einfachbestimmungen eine Häufung an falsch-positiv gewerteten Hits zu erwarten ist. Zudem enthält die NCI-Sammlung mehr chemisch reaktive, optisch aktive und schwer-lösliche Substanzen als die Sammlung, die von der *High Throughput Screening Core Facility* für *Pilot-Screens* zusammengestellt worden ist. Diese Eigenschaften können zu falsch-positiven Hit-Identifizierungen führen. Daher war es sinnvoll, bereits vor der eigentlichen Validierung bestimmte Substanzen auszusortieren. Aussortiert wurden insbesondere solche Substanzen, die bereits in anderen *Screens* gehäuft als falsch-positiv identifiziert worden waren. Ebenfalls aussortiert wurden Wiederholungen sehr ähnlicher Substanzen, d.h., sofern diese große, gemeinsame Strukturanteile aufwiesen. Des Weiteren wurde von Substanzen abgesehen, deren Strukturen dadurch auffielen, dass sie nicht wirkstofftauglich waren. Nach Aussortieren verblieben 120 potentielle Hits, die unterschiedliche, wirkstoffähnliche Struk-

turen aufwiesen. Davon waren 112 kommerziell erhältlich. Diese Substanzen wurden in einem *Sekundärscreen* validiert.

Sekundärscreen

Um die im *Pilot-Screen* und *NCI-Screen* identifizierten Substanzen zu validieren, wurden sie einem identisch durchgeführten *Sekundärscreen* unterzogen. Hierzu wurden die Substanzen in zwei unabhängigen Messreihen titriert, wobei die Substanzkonzentration von ca. 0,05 μM bis 100 μM variiert wurde. Die hierdurch erzielte Inhibierung des HTRF-Signals wurde relativ zur Spanne zwischen unteren und oberen Grenzwert des Assays betrachtet. Die Grenzwerte wurden wiederum anhand der internen Negativ- und Positivkontrollen ermittelt.

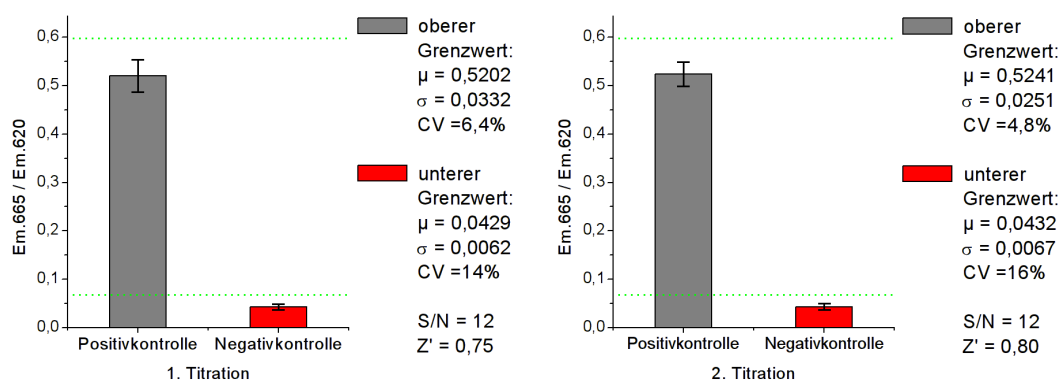


Abb. 3.30: Statistische Analyse der Grenzwerte des Sekundärscreens:

Während des Sekundärscreens wurde für die beiden Titrations der obere (schwarz) und untere Grenzwert (rot) bestimmt, indem das HTRF-Signal ($Em.665/Em.620$) der Positiv- und Negativkontrollen gemessen wurde. Die beiden grün-gepunkteten Linien repräsentieren das frühere Ergebnis hierfür, gemessen unter identischen Bedingungen (siehe Abb. 3.23). Für die Verteilung der Grenzwerte wurden der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (σ), die auf den Mittelwert bezogene, relative Standardabweichung ($CV = \sigma/\mu$), Z'-Faktor (Z') und das Signal/Hintergrund-Verhältnis (S/N) ermittelt.

Die statistische Analyse ergibt, dass während des Sekundärscreens durchgängig eine gute Separierung der Grenzwerte erzielt werden konnte (siehe Abb. 3.30). Denn für das Signal/Hintergrund-Verhältnis lässt sich ein relativ hoher Wert von 12 bestimmen. Im Verbund mit den niedrigen relativen Standardabweichungen, die 16% nicht übersteigen, resultieren hieraus für die beiden Titrations hohe Z'-Faktoren, die 0,75 und 0,80 betragen. Die statistischen Daten bestätigen somit, dass auch für den Sekundärscreen ein hinreichend großes und stabiles Signalfenster zur Verfügung stand.

Von den insgesamt 126 in den Primärscreens identifizierten Substanzen zeigen 6 Substanzen im Sekundärscreen eine konzentrationsabhängige Inhibierung des HTRF-Signals (siehe Abb. 3.31).

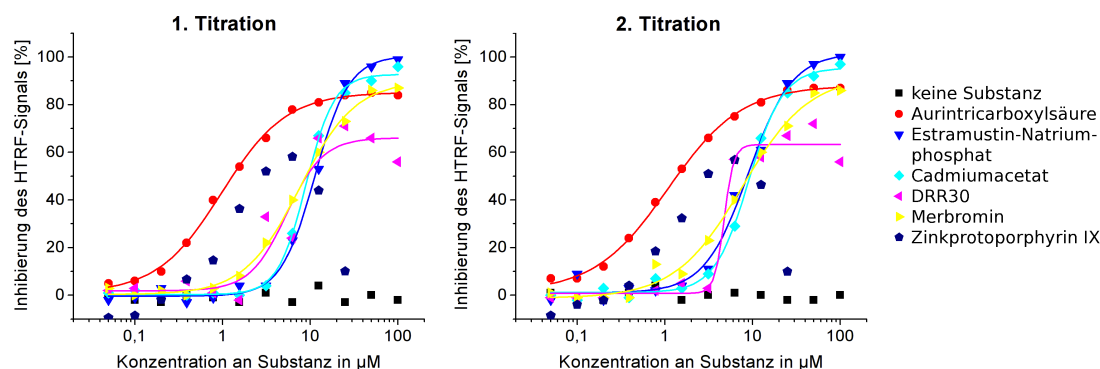


Abb. 3.31: Sekundärscreen der potentiellen Hits:

Während des Sekundärscreens wurden die potentiellen Hits anhand zweier Titrations mit dem HTRF-Assay validiert. Hierbei wurde die Substanzkonzentration von ca. $0,05 \mu\text{M}$ bis $100 \mu\text{M}$ variiert. Die Änderung des HTRF-Signals (x) durch die Substanzzugabe wurde relativ zum oberen (+) und unteren (-) Grenzwert (μ) ausgedrückt als Prozentsatz der Signalinhibierung: $\% \text{ Inh.} = 100 * (\mu_+ - x) / (\mu_+ - \mu_-)$. Die Signalinhibierung ist gegen den Logarithmus der Konzentration an Substanz aufgetragen. Dargestellt sind die Resultate solcher Substanzen, die eine konzentrationsabhängige Signalinhibierung aufweisen.

Wenn die Inhibierung des HTRF-Signals gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen wird, ergibt sich für 5 dieser Substanzen ein sigmoidaler Kurvenverlauf, der auf eine einfache Dosis-Wirkungs-Beziehung hindeutet. Durch sigmoidale Kurvenanpassungen lassen sich IC_{50} -Werte ermitteln, die sich allesamt im Bereich zwischen 1 und $10 \mu\text{M}$ befinden (siehe Tab. 3.1). Eine Substanz, Zinkprotoporphyrin IX (ZnPP9), weist nur anfänglich einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf; ab einer Substanzkonzentration von ca. $10 \mu\text{M}$ nimmt das HTRF-Signals rapide zu und somit die Signalinhibierung ab. Dieser Kurvenverlauf ist nicht durch eine einfache Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erklären.

Um zu überprüfen, inwieweit eine direkte Interferenz mit dem HTRF-Signal zu falsch-positiven Bewertungen geführt haben kann, wurden die Titrations mit den 6 positiv getesteten Substanzen an $\alpha\text{-HIS-XL665}/\alpha\text{-mouse IgG-EuK}$ unter ansonsten identischen Messbedingungen wiederholt. Dieses direkt aneinander bindende Antikörper-FRET-Paar ist bereits für die Etablierung des HTRF-Assays als positiv Kontrolle beschrieben worden (siehe Abschnitt 3.2.6, Abb. 3.21 und Abb. 3.23).

Abb. 3.32 zeigt, dass zwar 4 der 6 Substanzen die Emissionen bei 620 nm und 665 nm in ihrer Intensität um mehr als 50% verändern, aber nur eine Substanz, nämlich DRR30, reduziert das HTRF-Signal der Kontrolle um mehr als 50% . Die für DRR30 beobachtete Konzentrationsabhängigkeit des HTRF-Signals ähnelt der, die im Sekundärscreen ermittelt worden war. Dies deutet darauf hin, dass DRR30 ein falsch-positiv gewerteter Hit ist.

Für ZnPP9 bleibt das HTRF-Signal der Kontrolle bei ZnPP9-Konzentrationen unterhalb von 10 μM konstant, danach nimmt es aber rapide zu. Dieser Anstieg entspricht der im *Sekundärscreen* beobachteten Abnahme der Signalinhibierung ab ca. 10 μM ZnPP9 (siehe Abb. 3.31). Somit ist die Signalinterferenz nur Ursache für den Rückgang der Signalinhibierung, nicht aber für den Anstieg der Signalinhibierung bei kleineren ZnPP9-Konzentrationen. Daher lässt sich ZnPP9 hier nicht als falsch-positiver Hit einstufen.

Da auch für die anderen 4 Substanzen keine vergleichbare Reduktion des HTRF-Signals der Kontrolle zu beobachten ist, lässt sich für sie ausschließen, dass eine direkte Interferenz mit dem HTRF-Signal zu einer falsch-positiven Bewertung während des *Sekundärscreens* geführt hat. Alle im *Sekundärscreen* bestätigten potentiellen Hits sind im *Pilot-Screen* identifiziert worden.

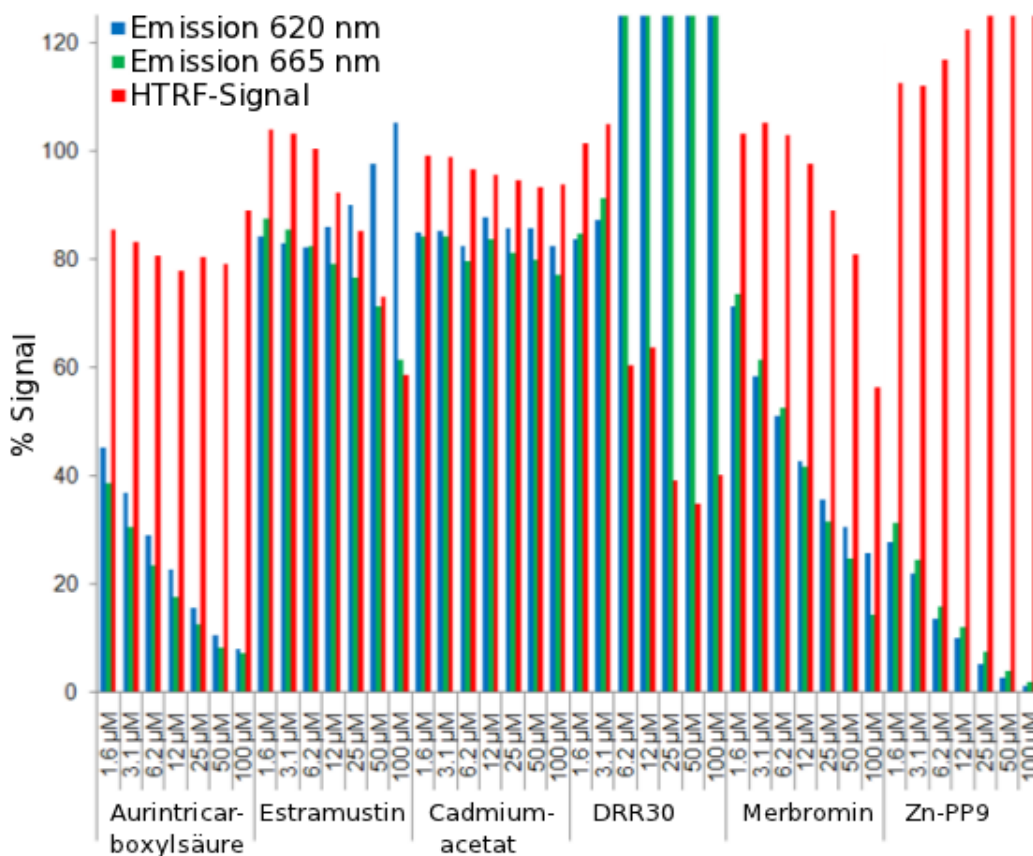
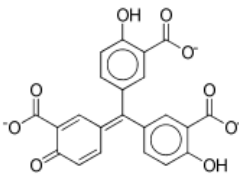
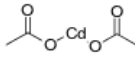
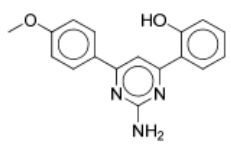
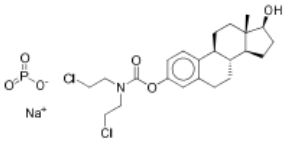
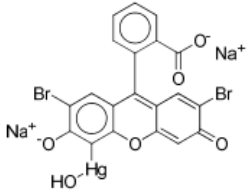
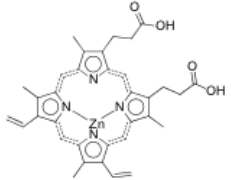


Abb. 3.32: Direkte Interferenz mit dem HTRF-Signal:

α -HIS-XL665/ α -mouse IgG-EuK wurde mit den sechs im *Sekundärscreen* positiv getesteten Substanzen titriert. Für die Substanzkonzentrationen von 1,6 bis 100 μM sind die Emission bei 620 nm (blau) und 665 nm (grün) sowie das HTRF-Signal (Em.665/Em.620) (rot) als Säulendiagramm dargestellt. Die Signalstärke in Abwesenheit von Substanz wurde auf 100% gesetzt. Die Emissionen für DRR30 liegen ab 6 μM außerhalb der angegebenen Skala (Em.665: \rightarrow 830% und Em.620: \rightarrow 309% bei 100 μM). Das HTRF-Signal für ZnPP9 übersteigt ab 25 μM ebenfalls die Skala.

3 Ergebnisse

Dies spricht dafür, dass die Falsch-Positiv-Rate im *NCI-Screen* wesentlich höher war als im *Pilot-Screen*.

Substanz	Strukturformel	IC ₅₀
Aurintricarboxylsäure		1,1 µM
Cadmiumacetat		9,0 µM
DRR30		5,1 µM
Estramustin-Natriumphosphat		10,1 µM
Merbromin		7,5 µM
Zinkprotoporphyrin IX		partiell

Tab. 3.1: Übersicht der im Sekundärscreen positiv getesteten Substanzen.

3.4 Validierung und Charakterisierung potentieller Wirkstoffe anhand sekundärer Assays

Die in den *High-Throughput Screenings* identifizierten Substanzen wurden anhand sekundärer Assays untersucht. Zwar konnten bereits durch die *Sekundärscreens* die Messergebnisse für die potentiellen Hits zuverlässig validiert werden; doch die Ursache der Messergebnisse blieb durch die Validierung unberücksichtigt. Um bestätigen zu können, dass tatsächlich die Schwächung der Interaktion zwischen p27 und Cdk2/Cyclin A zur Hit-Identifizierung geführt hatte, wurden alternative FRET-, ATPase- und Kinase-Assays durchgeführt. Inwieweit die Substanzen zelltoxisch wirken, wurde anhand von MTT-Assays untersucht. Dabei wurden die Dosis-Wirkungs-Beziehungen mittels Titrationen ermittelt.

3.4.1 FRET-Assay

Ob die in den *High-Throughput Screenings* identifizierten Substanzen gebundenes p27 verdrängen können, wurde mittels des FRET-Assays untersucht. Die Durchführung des Assays erfolgte wie im Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Dabei wurde das FRET-Paar, bestehend aus YFP-p27/CFP-Cyc.A in Ab- oder Anwesenheit von Cdk2, mit den Substanzen titriert und anschließend für mindestens 1 h inkubiert. Da einige Substanzen in DMSO gelöst vorlagen, wurde für sie der Anteil an DMSO in den Messreihen konstant gesetzt (d.h. üblicherweise auf 1 oder 2% (v/v)). Die Fluoreszenzintensitäten für YFP und CFP wurden bei 527 nm und 485 nm gemessen. Um die Hintergrundfluoreszenz bestimmen zu können, wurde die Titration in Abwesenheit von FRET-Paar unter ansonsten gleichen Messbedingungen wiederholt. Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz wurde der Quotient der Fluoreszenzintensitäten ($Em.527/Em.485$) berechnet. Dieser Quotient diente als Signal zur Detektion von FRET. Das so bestimmte FRET-Signal wurde relativ zur Spanne zwischen oberen und unteren Grenzwert des Assays gesetzt, um das Ausmaß einer FRET-Änderung beschreiben zu können.

Die Analyse der Titration ergibt, dass Cadmiumacetat, DRR30, Estramustin-Natriumphosphat und Pyrogallin das FRET-Signal nicht signifikant beeinflussen (siehe Abb. 3.33). Demnach handelt es sich bei diesen Substanzen um falsch-positiv gewertete Hits.

Aurintricarboxylsäure (ATA) verändert zwar das FRET-Signal, allerdings resultiert kein sigmoidaler Kurvenverlauf, aus der sich eine einfach Dosis-Wirkungs-Beziehung ableiten ließe. Es ist daher anzunehmen, dass ATA direkt mit dem FRET-Signal interferiert, obgleich weder ein signifikanter Quench der CFP- und YFP-Fluoreszenz noch eine relevante Eigenfluoreszenz unter den Messbedingungen zu beobachten ist. Eine besonders deutlich ausgeprägte Interferenz mit dem FRET-Signal weist Merbromin auf. Denn es absorbiert bei 485 nm, wodurch die

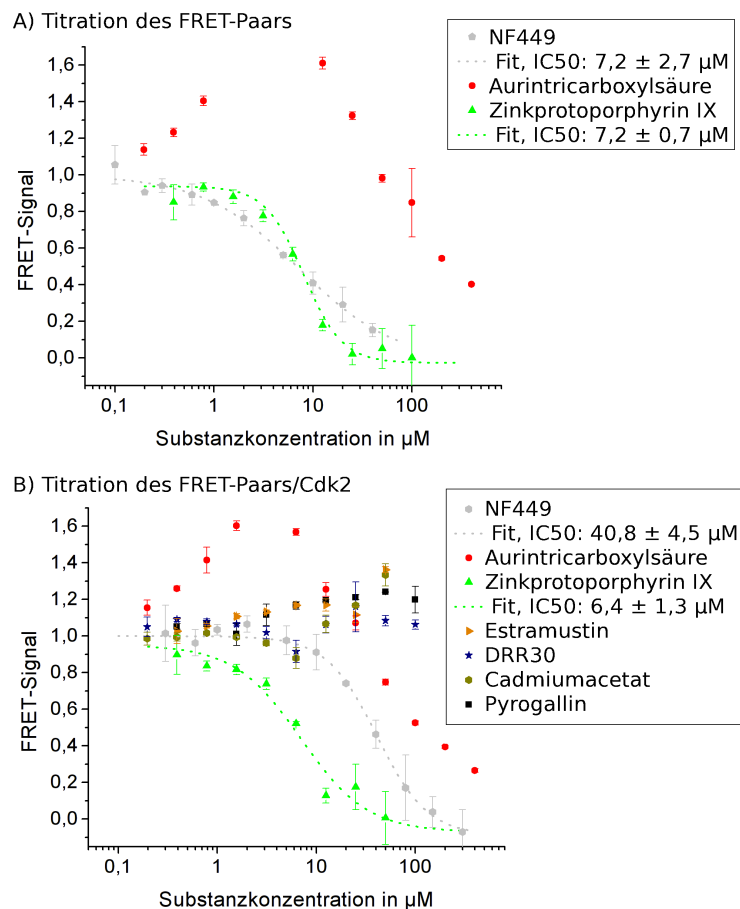


Abb. 3.33: Titration des FRET-Paars mit den potentiellen Hits:

His-eYFP-p27/His-eCFP-Cyc.A wurde in Gegenwart (A) oder Abwesenheit von Cdk2 (B) mit den Substanzen titriert die entsprechenden Verhältnisse der YFP- zu CFP-Fluoreszenzintensitäten ($R = \text{Em.527}/\text{Em.485}$) wurden in Vierfachbestimmungen gemessen. Hieraus wurde der Anteil an verbleibenden FRET-Signal (f) berechnet: $f = (R - R_-)/(R_+ - R_-)$, wobei zur Bestimmung des oberen Grenzwertes (+) das FRET-Paar unter FRET-Bedingungen diente und der untere Grenzwert (-) durch Zugabe von überschüssigen GST-p27 dargestellt wurde.

CFP-Emission gequench wird, und fluoresziert bei 527 nm, so dass die YFP-Emission von der Merbromin-Emission überlagert wird (siehe 3.34). Dadurch nimmt das FRET-Signal bereits bei niedrigen Konzentrationen an Merbromin Werte an, die sich weit außerhalb der in Abb. 3.33 angegebenen Skala befinden. Deshalb wurde von einer Darstellung der Titrationskurve von Merbromin in Abb. 3.33 abgesehen. ATA und Merbromin können somit hier nicht als Hits bestätigt werden.

Die Titration mit Zinkprotoporphyrin IX (ZnPP9) zeigt bei logarithmischer Auftragung den erwarteten sigmoidalen Kurvenverlauf. Allerdings quench ZnPP9 die Fluoreszenz des FRET-Paars. Da der Quench für die CFP- und YFP-Fluoreszenz annähernd gleich stark ist, bleibt

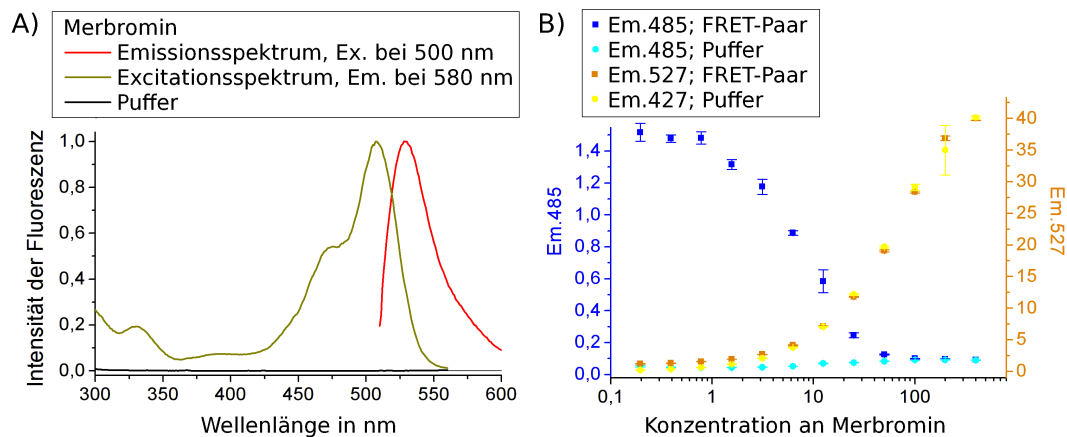


Abb. 3.34: Signalinterferenz durch Merbromin:

A Emissions- und Excitationsspektrum von Merbromin in Puffer; **B** Titration des FRET-Paars mit Merbromin.

der Quotient der Fluoreszenzintensitäten hierdurch unbeeinflusst. Jedoch führt dies zu einem Verlust an Messgenauigkeit, was sich in einer Zunahme der Standardabweichung mit steigender ZnPP9-Konzentration äußert. Der IC_{50} -Wert für die Inhibierung des FRET-Signals durch ZnPP9 liegt bei ca. 7 μ M. Die Gegenwart von Cdk2 führt zu keiner signifikanten Veränderung des IC_{50} -Wertes. Dies spricht dafür, dass ZnPP9 die p27-Bindung an Cdk2/Cyclin A ähnlich schwächt wie die an Cyclin A. Daher deutet dies auf eine Interaktionsweise hin, für die kein Unterschied besteht zwischen der Bindung von p27 an Cyclin A und an Cdk2/Cyclin A, d.h. die hierfür unspezifisch ist. Ob dabei die Bindung zwischen p27 und Cdk2 gelöst wird, ist hier nicht zu beantworten, da anhand der Inhibierung des FRET-Signals nicht zwischen partieller und vollständiger Dissoziation unterschieden werden kann.

Auch die Titration mit NF449 resultiert in einem sigmoidalen Kurvenverlauf. NF449 zeigt keine direkte Interferenz mit dem FRET-Signal. Der IC_{50} -Wert für die Inhibierung des FRET-Signals durch NF449 liegt bei ca. 7 μ M. Wenn Cdk2 hinzugefügt wird, steigt der IC_{50} -Wert auf ca. 41 μ M an. Somit unterbindet NF449 die Bindung von p27 an Cyclin A mit höherer Effizienz als die an Cdk2/Cyclin A.

3.4.2 Steady-state ATPase-Assay

Mittels des *steady-state* ATPase-Assays wurde untersucht, ob die in den *High-Throughput Screenings* identifizierten Substanzen die Cdk2-Inhibierung durch p27 aufheben oder die Cdk2-Aktivität direkt beeinflussen. Die Durchführung des Assays erfolgte im Wesentlichen wie im Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Davon abweichend wurde vor Initiierung der ATPase-Aktivität MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A mit der jeweiligen Substanz für mindestens eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Titrationen wurde der Anteil an DMSO konstant gesetzt

(d.h. üblicherweise auf 1 oder 2% (v/v)). Ansonsten blieben die Messbedingungen unverändert.

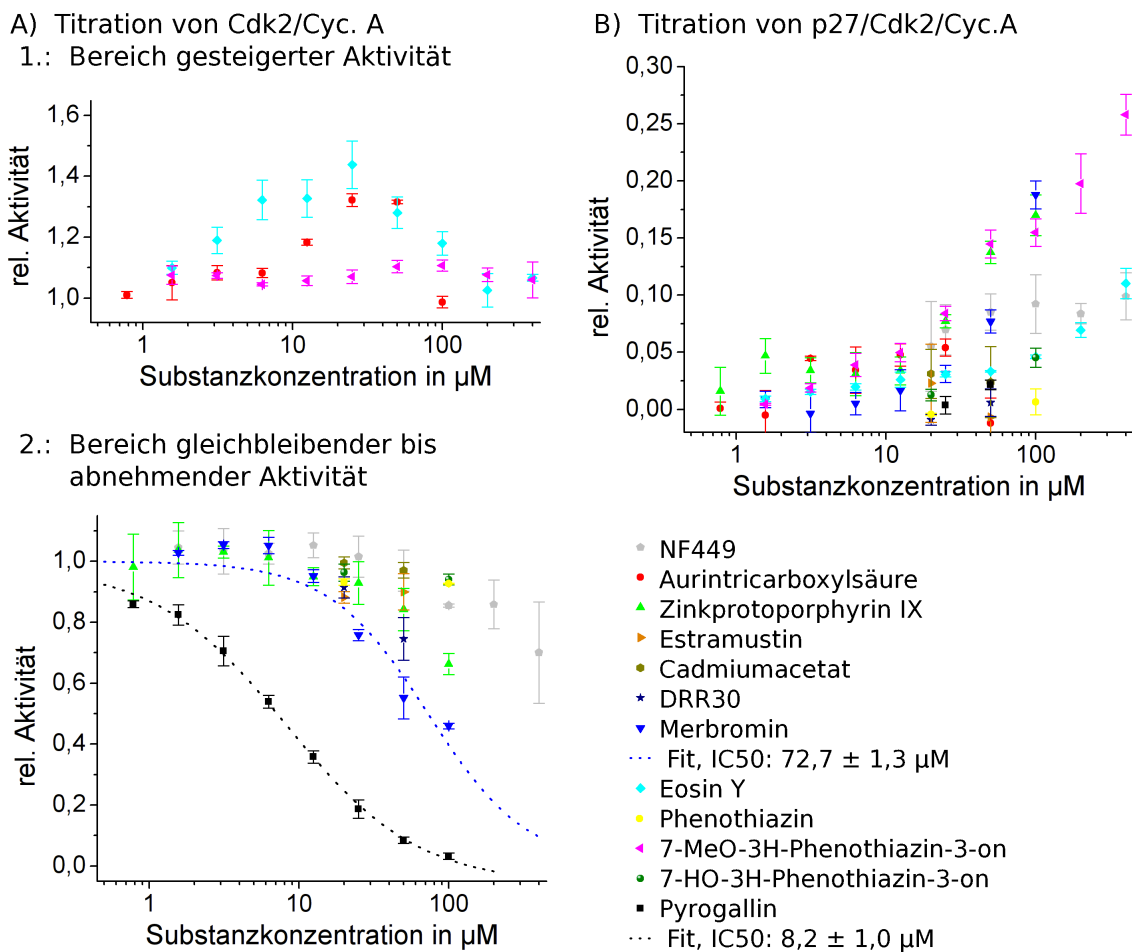


Abb. 3.35: Einfluss der Substanzen auf die Cdk2-Aktivität: MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A ohne (A) oder mit GST-p27 (B) wurde mit den Substanzen titriert. Die entsprechenden relativen Aktivitäten wurden in Dreifachbestimmungen ermittelt.

Die Analyse ergibt, dass nur wenige der getesteten Substanzen einen direkten Effekt auf die Cdk2-Aktivität ausüben (siehe Abb. 3.35.A). Die stärkste hier beobachtete Cdk2-Inhibierung wird durch Pyrogallin bewirkt. Die logarithmische Auftragung hiervon zeigt einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Dies deutet auf eine einfache Dosis-Wirkungs-Beziehung hin. Die Kurvenanpassung resultiert in einem IC_{50} -Wert, der ca. $8 \mu\text{M}$ beträgt. Hierdurch wird zugleich belegt, dass mit dem *steady-state* ATPase-Assay Cdk2-Inhibitoren identifiziert und charakterisiert werden können. Da Pyrogallin sich als eine im *Pilot-Screen* falsch-positiv identifizierte Substanz herausgestellt hat, kann hier kein Zusammenhang zu den Resultaten des HTRF-Assays geknüpft werden. Als ein schwacher Cdk2-Inhibitor erweist sich Merbromin, dessen IC_{50} -Wert größer als $50 \mu\text{M}$ ist. Ein sigmoidaler Kurvenverlauf hierfür konnte aufgrund des hohen IC_{50} -Wertes

nicht vollständig aufgelöst werden. Alle anderen hier getesteten Substanzen bewirken entweder eine noch wesentlich schwächere oder gar keine Inhibierung. Aurintricarboxylsäure (ATA), die wie Merbromin zur Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffe gehört, inhibiert Cdk2 nicht, sondern steigert dessen Aktivität. Die Zunahme beträgt maximal ca. 30% bei 25 μM ATA. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Aktivität wieder ab. Eine ähnliche Aktivitätssteigerung wird durch Eosin Y hervorgerufen, das als ein Tetrabromfluorescein ebenfalls zu den Triphenylmethanfarbstoffen, d.h. genauer gesagt zu den Xanthenfarbstoffen, zugeordnet werden kann. Die Zunahme erreicht maximal ca. 40% bei 25 μM Eosin Y. Weitere hier getestete strukturanaloge Verbindungen des Merbromins sind Phenothiazin, 7-Hydroxy-3H-Phenothiazin-3-on und 7-Methoxy-3H-Phenothiazin-3-on. Diese Substanzen haben keinen direkten Einfluss auf die Cdk2-Aktivität.

Nur wenige der hier getesteten Substanzen vermögen die Inhibierung durch p27 derart aufzuheben, dass eine erkennbare Reaktivierung von Cdk2 resultiert (siehe Abb. 3.35.B). Die beste Effektivität hierfür besitzen ZnPP9, Merbromin und 7-Methoxy-3H-Phenothiazin-3-on, die bei 100 μM eine 20%ige Reaktivierung bewirken, d.h. verglichen zu nicht-inhibierten Cdk2. NF449 bewirkt ab Konzentrationen größer als 50 μM maximal eine Reaktivierung von ca. 10%. Eosin Y und 7-Hydroxy-3H-Phenothiazin-3-on erreichen bei 100 μM eine Reaktivierung von ca. 5%. Die übrigen Substanzen zeigen eine noch schwächere oder gar keine Reaktivierung.

Abschließend bleibt hier festzustellen, dass die in den *High-Throughput Screenings* identifizierten Substanzen keine oder nur schwache Effekte in den *steady-state* ATPase-Assay zeigen. Dabei spiegeln die hier beobachteten Veränderungen der Cdk2-Aktivität nicht die in den *Sekundärscreens* ermittelten Dosis-Wirkungs-Beziehungen wider. Daher lässt sich vermuten, dass die p27-Bindung nur partiell durch die Substanzen unterbunden wird, wodurch zwar eine vollständige Inhibierung des HTRF- bzw. FRET-Signals bewirkt werden kann, nicht aber eine vollständige Reaktivierung der ATPase-Funktion.

3.4.3 Kinase-Assay

Ob Merbromin auch die Aktivität von immunopräzipitierten Cdk2-Komplexen aus MEF-Zellen steigern kann, wurde anhand von radiometrischen Kinase-Assays untersucht.

Hierzu wurden zunächst MEF-Zellysate einer Immunopräzipitation (IP) gegenüber Cdk2 unterzogen. Der Proteingehalt war zuvor anhand eines Bradford-Assays bestimmt worden. Für die IP wurde 1,4 μg α -Cdk2 pro 250 μg Protein in 500 μl RIPA-Puffer eingesetzt. Als negativ Kontrolle diente eine IP gegenüber Kaninchen-IgG. Zur Isolation des Cdk2-Antikörper-Komplexes wurde jeweils 20 μl Protein A - Sepharose hinzugegeben. Nach Waschen und Überführung in den Kinase-Puffer wurden die immunopräzipitierten Cdk2-Komplexe für 2 h mit Merbromin

inkubiert und anschließend die Cdk2-Aktivität bestimmt. Als Cdk2-Substrat dienten 2,2 g/l Histone H1. Die Kinase-Reaktion wurde durch Zugabe von 2,2 mM ATP gestartet. Zur radioaktiven Markierung wurden 0,22 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ [γ - ^{32}P]ATP beigefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von Probenauftragspuffer gefolgt von 10 minütigen Erhitzen bei 97°C gestoppt. Die Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen, das Gel wurde unter Vakuum getrocknet und die radioaktiv markierten Proteinbanden auf dem Gel wurden durch Exponieren gegen einen Röntgenfilm visualisiert. Die Intensität der Proteinbande für phosphoryliertes Histon H1, welches eine apparente Molmasse von ca. 30 kDa besitzt, wurde als relatives Maß der Cdk2-Aktivität gewertet.

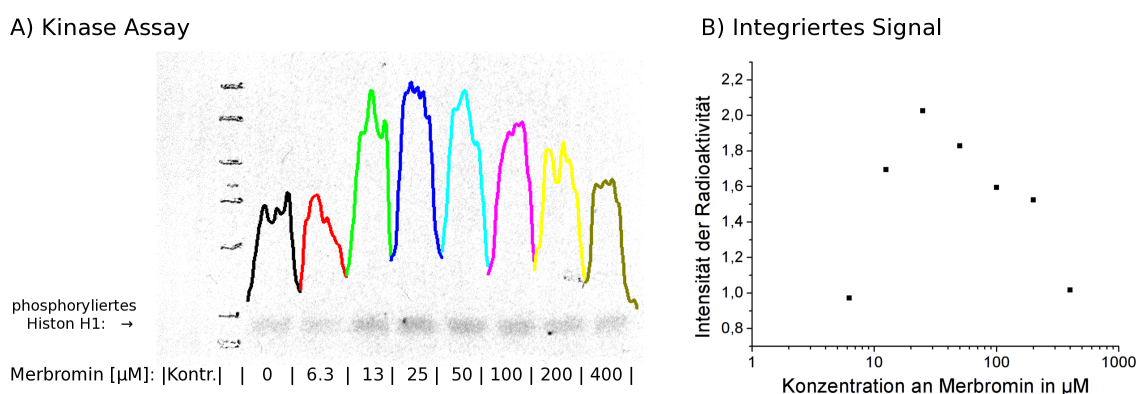


Abb. 3.36: Kinase-Assay:

A Immunpräzipitierte Cdk2-Komplexe wurden mit Merbromin titriert, für 2 h inkubiert und mittels des radiometrischen Kinase-Assays analysiert. **B** Zur Bestimmung der Kinase-Aktivität wurde anhand der Intensität der radioaktiv markierten Bande die Menge an phosphorylierten Histon H1 quantifiziert.

Die Analyse des Kinase-Assays ergibt, dass Merbromin die Cdk2-Aktivität steigern kann (siehe Abb. 3.36). Bei 25 μM Merbromin wird ein Maximum erreicht, wobei die Aktivität auf das ca. 2-fache ansteigt. Hiernach fällt die Aktivität wieder ab. Eine Erklärung hierfür liefert das Resultat des ATPase-Assay, da dabei gezeigt werden konnte, dass Merbromin zwar Cdk2 in Gegenwart von p27 reaktivieren kann, höhere Konzentrationen jedoch zu einer direkten Inhibierung von Cdk2 führen (siehe Abschnitt 3.4.2).

Um zu untersuchen, ob p27 durch Merbromin und durch dessen Struktur analogon Eosin Y aus Cdk2-Komplexe verdrängt werden kann, wurde die Menge an gebunden bleibenden p27 analysiert. Hierzu wurde die IP und Titration wiederholt. Zum Entfernen des nicht gebundenen p27 wurden die immunpräzipitierten Cdk2-Komplexe ausgiebig gewaschen. Der Proteinlevel an gebunden gebliebenen p27 wurde per Immundetektion bestimmt.

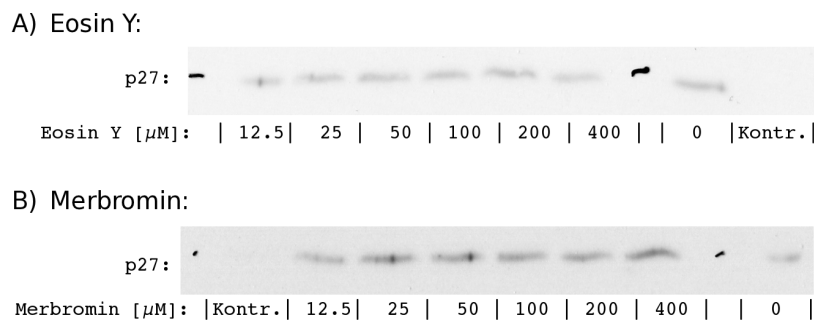


Abb. 3.37: Immunopräzipitierte Cdk2-Komplexe wurden mit Eosin Y (A) oder Merbromin (B) titriert, für 2 h inkubiert und gewaschen. Mittels Immundetektion wurde der Proteinlevel an gebundenen p27 visualisiert.

Die Immundetektion zeigt, dass der Proteinlevel an gebundenen p27 mit zunehmender Konzentration sowohl an Merbromin als auch an Eosin Y stabil bleibt (siehe Abb. 3.37). Dies deutet darauf hin, dass weder Merbromin noch Eosin Y p27 vollständig verdrängen können. Hieraus folgt, dass Merbromin die Kinase-Aktivität steigert, obgleich p27 gebunden bleibt.

3.4.4 MTT-Assay

Inwieweit Merbromin und Eosin Y zelltoxisch wirken, wurde anhand von MTT-Assays untersucht [Mosmann 1983]. Die Zelltoxizität wurde sowohl gegenüber MEF- als auch HeLa-Zellen bestimmt. Hierzu wurden jeweils 50000 Zellen/Well in 96-Well Platten ausgesät, mit Substanz titriert und für 72 h unter ansonsten optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Der Anteil an Substanzlösungsmittel wurde für alle Bedingungen innerhalb der Titrationen konstant gehalten. Als Signal für die Vitalität diente der Umsatz des MTT-Reagenzes. Die dabei gebildeten Formazan-Kristalle wurden in Isopropanol-HCl gelöst. Der Umsatz wurde anhand der Absorption des Formazans bei 590 nm mit dem Mikroplatten-Messgerät FLUOstar Omega quantifiziert. Als internes Referenzsignal wurde die Absorption bei 670 nm vermessen, die als Signalhintergrund subtrahiert wurde.

Die Analyse des MTT-Assays ergibt, dass Eosin Y nur schwach zelltoxisch wirkt (siehe Abb. 3.38.B). Denn der IC_{50} -Wert der MTT-Signalhemmung liegt für MEF-Zellen bei ca. 206 μM und für HeLa-Zellen bei ca. 800 μM . Merbromin behandelte Zellen weisen niedrigere IC_{50} -Werte auf; für MEF-Zellen beträgt der IC_{50} -Wert ca. 23 μM und für HeLa-Zellen ca. 116 μM . Somit ist Merbromin wesentlich toxischer als Eosin Y (siehe Abb. 3.38.A).

Die hier bestimmten IC_{50} -Werte dienten dazu, den oberen Grenzbereich an einsetzbarer Substanzkonzentration für die folgenden zellulären Versuchsreihen definieren zu können.

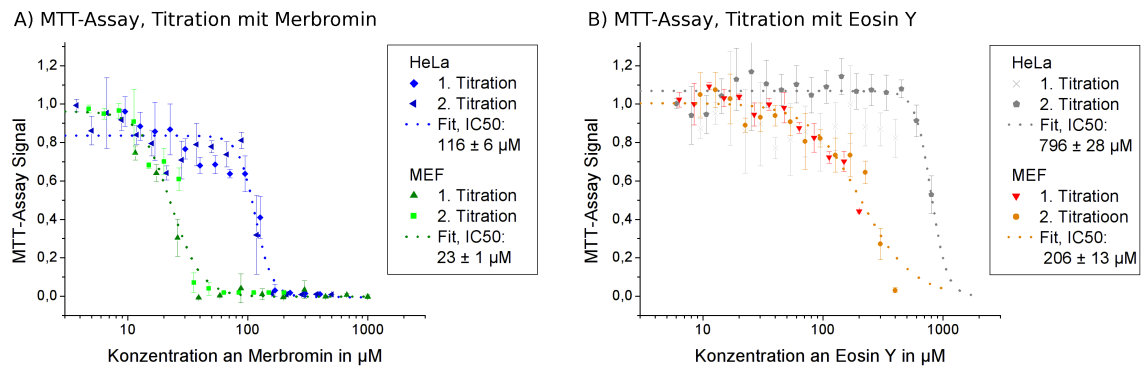


Abb. 3.38: MTT-Assay für Merbromin und Eosin Y:

Mittels des MTT-Assays wurde die Vitalität von HeLa- und MEF-Zellen nach 72 h Behandlung mit Merbromin (A) und Eosin Y (B) in je zwei unabhängigen Titrations mit Dreifachbestimmungen ermittelt. Dargestellt sind deren Titrationskurven, wobei das MTT-Signal unveränderter Vitalität auf 1 gesetzt wurde, während keine Vitalität dem Wert 0 entspricht.

3.5 Validierung und Charakterisierung potentieller Wirkstoffe anhand zellulärer Versuchsreihen

Anhand der ATPase-Assays konnte gezeigt werden, dass Merbromin die Inhibierung von Cdk2 durch p27 partiell aufheben kann. Zudem konnte für dessen Struktur analogon Eosin Y dargelegt werden, dass es die Cdk2-Aktivität direkt steigert. Im folgenden wurde untersucht, ob diese Substanzen die Cdk2-Aktivität auch in Zellen steigern können und ob hierdurch die Proliferation beeinflusst wird.

3.5.1 Wirkung von Merbromin auf HeLa-Zellen

Zunächst wurde die Wirkung von Merbromin auf HeLa-Zellen untersucht. Hierzu wurden jeweils 250000 Zellen in DMEM-Medium inklusive 10% FCS auf P60-Petrischalen ausgesät. Zur Behandlung wurden die Zellen mit 0, 50 oder 100 µM Merbromin versetzt und hiermit für 24 h, 48 h oder 72 h unter ansonsten optimalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Für jede Bedingung wurden Triplikate erstellt. Nach der Behandlung wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer unter einem Mikroskop ausgezählt. Die Zellen wurden mittels Sonifizierung in eisgekühlten RIPA-Puffer aufgeschlossen. Der Proteingehalt der Zelllysate wurde anhand von Bradford-Assays bestimmt. Zelllysate von je 250 µg Protein wurden aliquotiert und mit flüssig Stickstoff schockgefroren, um die Aliquots anschließend bei -80°C lagern zu können.

Die Versuchsreihe wurde später in einem etwas größeren Maßstab mit P100-Petrischalen wiederholt, wobei jeweils 650000 Zellen ausgesät wurden. Die Durchführung blieb ansonsten identisch.

Die Analyse der Zellzählung ergibt, dass der Zellzuwachs mit zunehmender Konzentration an

3 Ergebnisse

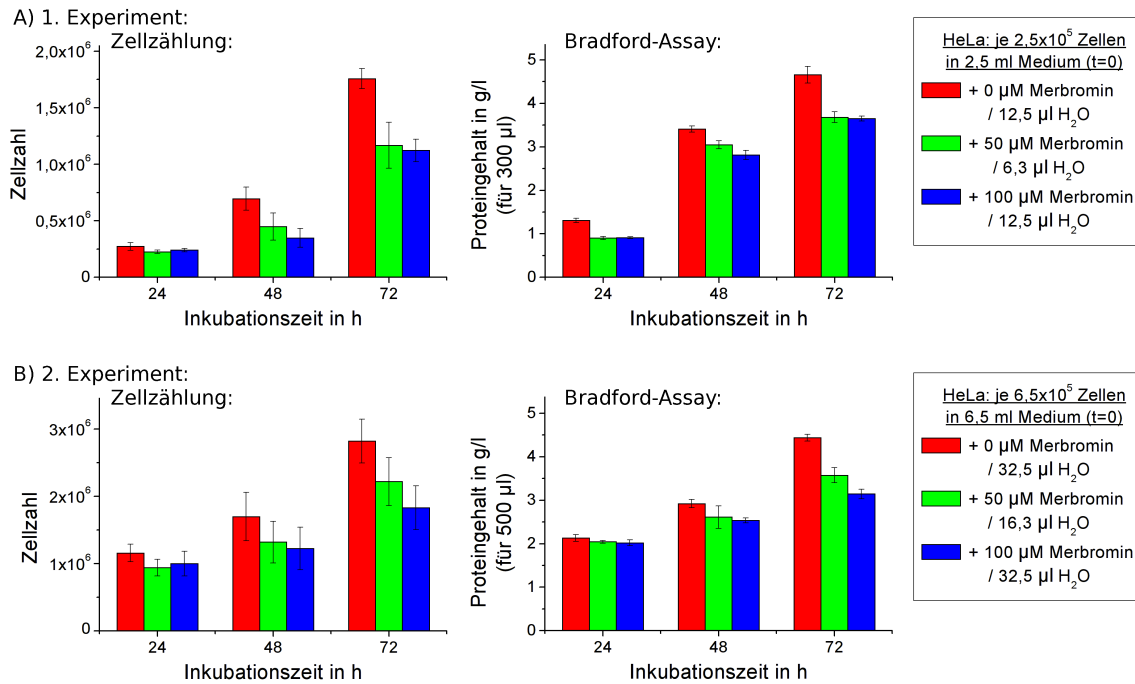


Abb. 3.39: Proliferation von HeLa-Zellen nach Behandlung mit Merbromin:

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (A, B) wurden HeLa-Zellen mit 0, 50 oder 100 µM Merbromin für 24 h, 48 h oder 72 h als Triplikate inkubiert. Für sie wurde die Zellzahl durch Zellzählung und der Proteingehalt anhand von Bradford-Assays bestimmt.

Merbromin und Inkubationszeit abnimmt (siehe Abb. 3.39). So ist die Zellzahl nach 72 h Inkubation mit Merbromin um ca. ein Drittel niedriger als die, die unter gleichen Bedingungen ohne Merbromin erzielt wird. Dieser Trend wird durch das Ergebnis des Bradford-Assays bestätigt, da die hierbei ermittelte Entwicklung des Proteingehalts eine hohe Korrelation zum beobachteten Zellzuwachs aufweist. Dies legt nahe, dass durch die Behandlung mit Merbromin die apparente Proliferationsrate verringert wird.

Um die Wirkung der Merbromin-Behandlung auf die Cdk2-Aktivität der HeLa-Zellen zu ermitteln, wurden radiometrische Kinase-Assays durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die Zelllysate einer Immunopräzipitation (IP) gegenüber Cdk2 unterzogen. Für die IP wurde 1,4 µg α-Cdk2 pro 250 µg Protein in 500 µl RIPA-Puffer eingesetzt. Zur Isolation des Cdk2-Antikörper-Komplexes wurde jeweils 20 µl Protein A - Sepharose hinzugegeben. Der Kinase-Assay wurde wie im Abschnitt 3.4.3 beschrieben durchgeführt.

Die Auswertung des Kinase-Assays zeigt, dass die Behandlung der HeLa-Zellen mit Merbromin zu einem Anstieg der Cdk2-Aktivität führt (siehe Abb. 3.40). Dabei nimmt die Cdk2-Aktivität

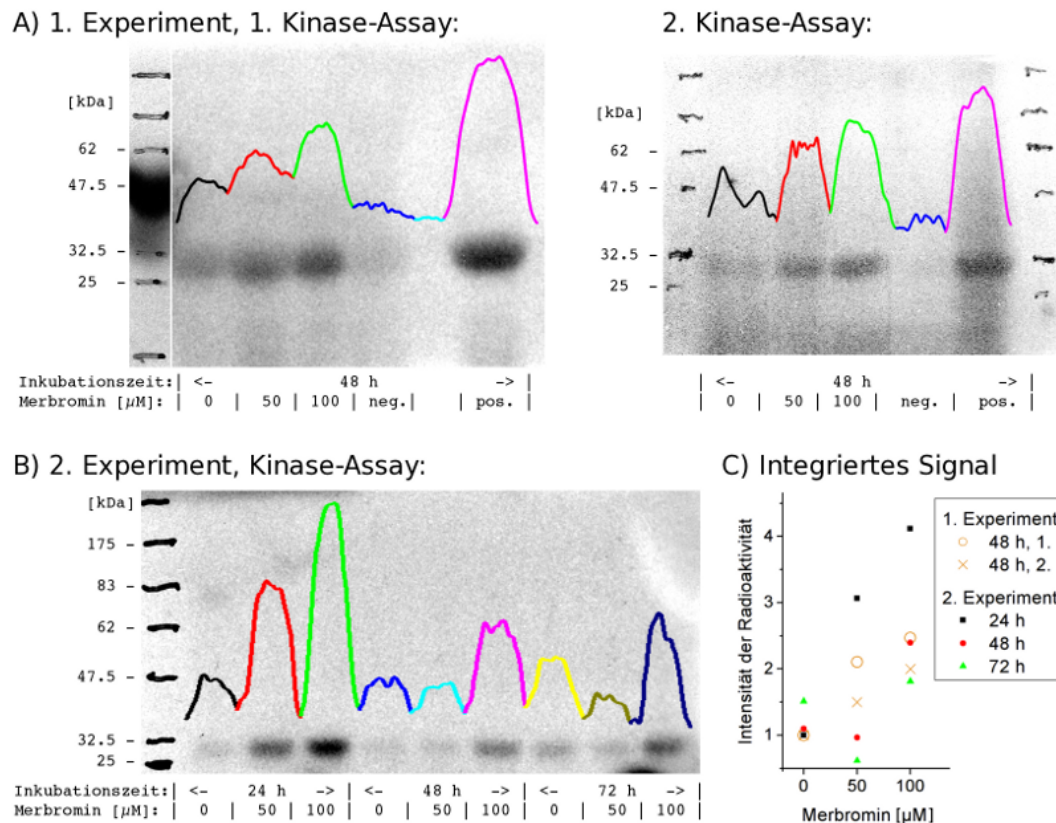


Abb. 3.40: Cdk2-Aktivität von HeLa-Zellen nach Behandlung mit Merbromin:

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (A, B) wurden HeLa-Zellen mit Merbromin behandelt. Nach IP gegen Cdk2 wurden die entsprechenden Kinase-Aktivitäten radiometrisch bestimmt. Zur Ermittlung der unmittelbaren Wirkung (pos.) wurde eine Probe erst nach der IP mit 100 μM Merbromin für mindestens 1h bei 4°C inkubiert. Als negativ Kontrolle (neg.) diente eine IP gegen Kaninchen-IgG. Nach den Kinase-Assays wurde die Menge an phosphorylierten Substrat (Histon H1) anhand der Intensität der radioaktiv markierten Proteinbande für die unterschiedlich mit Merbromin behandelten Proben quantifiziert (C).

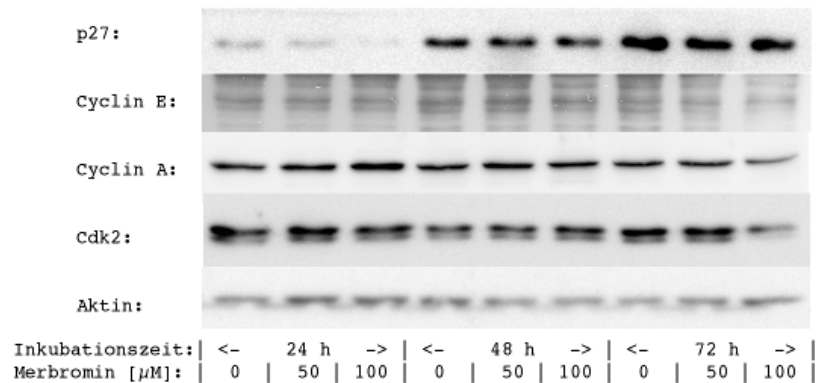
mit zunehmender Konzentration an Merbromin zu und fällt mit länger als 24 h andauernden Inkubationszeiten ab. Maximal wurde ein ca. 4-facher Anstieg der Cdk2-Aktivität für die 24 h Inkubation mit 100 μM Merbromin beobachtet. Ein ähnlich starke Zunahme ist zu beobachten, wenn das immunopräzipitierte Cdk2 direkt mit Merbromin versetzt wird. Nach 48 h fällt die Zunahme auf das ca. 2-fache ab.

Für die beiden unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen konnten ähnliche Resultate erzielt werden (vergleiche A und B in Abb. 3.39 und 3.40). Dies spricht dafür, dass die Wirkung der Merbromin-Behandlung auf HeLa-Zellen reproduzierbar ist.

An den Zelllysaten aus der 2. Versuchsreihe wurde mittels Immundetektion untersucht, ob

die Merbromin-Behandlung zu Veränderungen in den Proteinlevel von Cdk2, Cyclin A, Cyclin E oder p27 geführt hat. Um zu klären, ob die Reduzierung der apparenten Proliferationsrate auf der Induktion von Apoptose beruht, wurden auch die Proteinlevel von PARP und Caspase 3 betrachtet. Denn das vermehrte Auftreten von Spaltprodukten dieser beiden Proteine kann als ein Indikator für Apoptose angesehen werden.

Westernblot Zellzyklusproteine:



Westernblot Apoptosemarker:

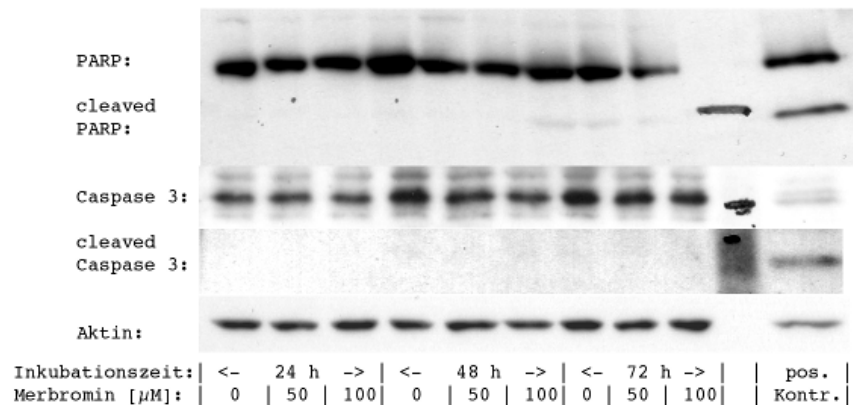


Abb. 3.41: Einfluss von Merbromin auf bestimmte Proteinlevel in HeLa-Zellen:

Nach Behandlung mit Merbromin wurden die Zelllysate mittels Immundetektion analysiert.

Die Immundetektion zeigt, dass die Proteinlevel von Cdk2, Cyclin A und Cyclin E während der Merbromin-Behandlung stabil geblieben sind (siehe Abb. 3.41). Die Menge an p27 nimmt hingegen mit zunehmender Konzentration an Merbromin ab. Dies trifft zumindest auf den 24 h Zeitpunkt zu. Mit zunehmender Inkubationszeit steigt der basale p27-Level, während die Abnahme des p27-Levels durch die Merbromin-Behandlung geringer wird.

Dies deutet darauf hin, dass die durch Merbromin bewirkte Cdk2-Reaktivierung eine Abnahme des p27-Levels hervorruft. Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit der Lite-

ratur, laut der durch die Cdk2-Phosphorylierung von p27^{T187} der Abbau von p27 induziert wird [Sheaff *et al.* 1997]. Da p27 als Cdk2-Inhibitor fungiert, formen die Cdk2-Aktivierung und der p27-Abbau eine positive *Feedback*-Schleife, wodurch die Merbromin-bedingte Cdk2-Reaktivierung noch gesteigert werden kann. Eine Erhöhung des basalen p27-Levels scheint diesen Mechanismus zu unterbinden.

Die Immundetektion zeigt ferner, dass durch die Merbromin-Behandlung kein Anstieg der Spaltprodukte von PARP und Caspase 3 bewirkt wird (siehe Abb. 3.41). Dies spricht dagegen, dass die Reduktion der apparenten Proliferationsrate durch Apoptose verursacht wird.

3.5.2 Wirkung von Eosin Y und Merbromin auf MEF-Zellen

Die Wirkung von Eosin Y und von Merbromin auf MEF-Zellen wurde untersucht. Die Behandlung der MEF-Zellen erfolgte wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben. Davon abweichend wurde eine Versuchsreihe auch bei schlechteren Wachstumsbedingungen durchgeführt, wofür die Serumkonzentration von 10% FCS auf 5% oder 2% reduziert wurde.

Die Analyse der Zellzählung ergibt, dass weder Merbromin noch Eosin Y das Zellwachstum erkennbar anregen. Vielmehr nimmt der Zellzuwachs mit zunehmender Konzentration an Merbromin oder Eosin ab (siehe Abb. 3.42). Für Merbromin verringert sich der Zellzuwachs ab einer Konzentration größer als 25 μM , für Eosin Y ab einer Konzentration größer als 50 μM . Wenn die Wachstumsbedingungen durch Verringerung der Serumkonzentration verschlechtert werden, beeinträchtigt Merbromin bereits bei 25 μM deutlich das Zellwachstum. Eosin Y zeigt unter den gleichen Bedingungen keinen Effekt auf das Zellwachstum.

Für die mit Eosin Y behandelten MEF-Zellen wurde die Cdk2-Aktivität anhand radiometrische Kinase-Assays bestimmt sowie die Proteinlevel an p27, Cyclin A, Cyclin E und Cdk2 immunodetektiert. Die Durchführung erfolgte wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben.

Die Analyse des Kinase-Assays ergibt, dass die Behandlung mit Eosin Y zu einer Erhöhung der Cdk2-Aktivität führt (siehe Abb. 3.43.A und B). Die Cdk2-Aktivität erreicht nach 48 h Behandlung bei ca. 25 μM Eosin Y ein Maximum, wobei die Aktivität um das 3- bis 4-fache ansteigt. Mit zunehmender Konzentration fällt die Cdk2-Aktivität wieder auf das Ausgangsniveau ab. Beim 24 h Zeitpunkt ist das Maximum schwächer ausgeprägt als beim 48 h Zeitpunkt.

Die Immundetektion zeigt, dass die Proteinlevel an p27, Cyclin A, Cyclin E und Cdk2 durch die Behandlung mit Eosin Y nicht beeinflusst werden. Somit ist hier der Anstieg der Cdk2-Aktivität nicht mit einer Abnahme des p27-Proteinlevels verknüpft.

3 Ergebnisse

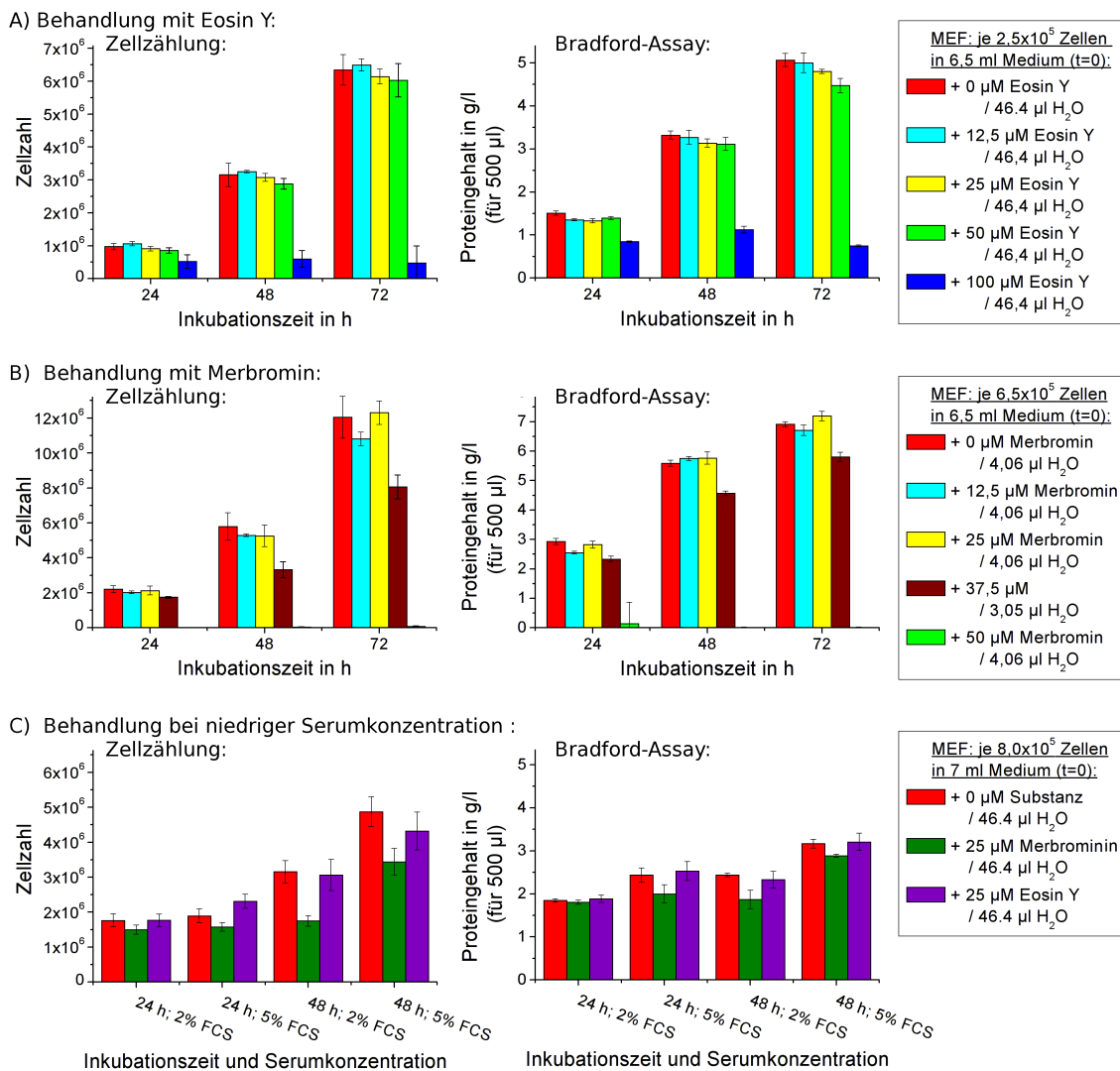


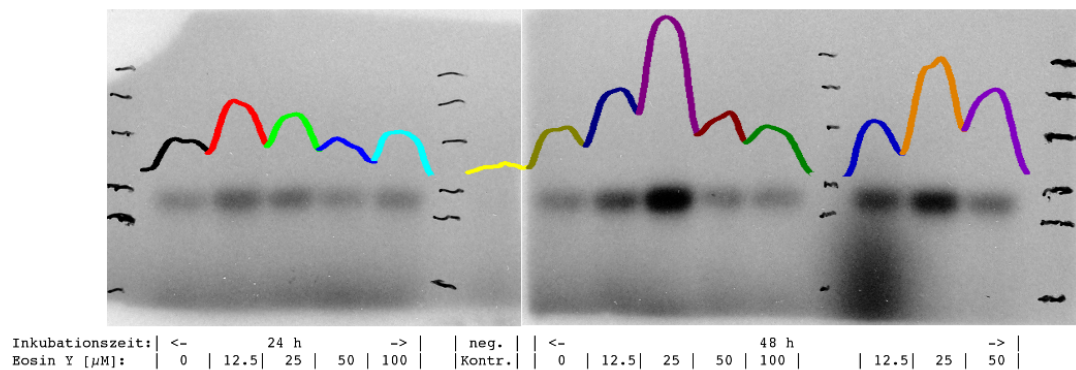
Abb. 3.42: Proliferation von MEF-Zellen nach Behandlung mit Eosin Y oder Merbromin:

MEF-Zellen wurden mit Eosin Y (A) oder Merbromin (B) für 24 h, 48 h oder 72 h unter optimalen oder eingeschränkten (C) Wachstumsbedingungen als Triplikate inkubiert. Für sie wurde die Zellzahl durch Zellzählung und der Proteingehalt anhand von Bradford-Assays bestimmt.

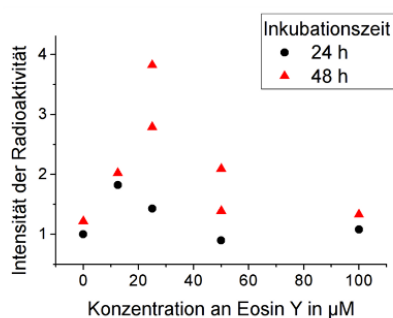
Analog hierzu wurde für die unter eingeschränkten Wachstumsbedingungen behandelten MEF-Zellen die Cdk2-Aktivität ermittelt und bestimmte Proteinlevel immunodetektiert. Die Durchführung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Die Auswertung der Cdk2-Aktivität ergibt, dass sowohl die Behandlung mit Eosin Y als auch mit Merbromin zu einer ähnlichen Steigerung der Cdk2-Aktivität führen (siehe Abb. 3.44). Wie zu erwarten, steigt die Cdk2-Aktivität auch mit zunehmender Serumkonzentration an, wohingegen der Proteinlevel an p27 abnimmt.

A) Kinase-Assay:



B) Integriertes Signal:



C) Immundetektion:

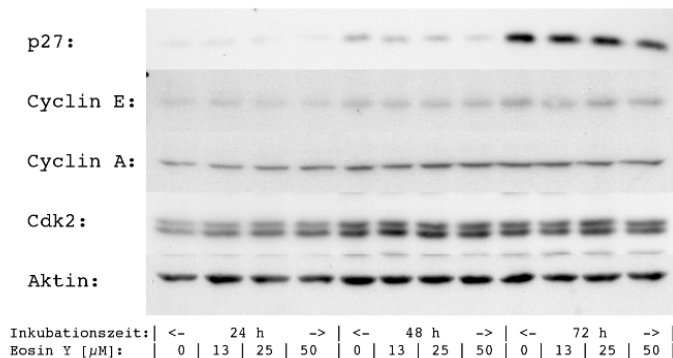


Abb. 3.43: Einfluss von Eosin Y auf die Cdk2-Aktivität und bestimmte Proteinlevel:

MEF-Zellen wurden mit Eosin Y unter optimalen Wachstumsbedingungen behandelt. **A** Nach IP gegen Cdk2 wurden die entsprechenden Kinase-Aktivitäten radiometrisch bestimmt. **B** Zur Bestimmung der Kinase-Aktivität wurde die Menge an phosphorylierten Histone H1 anhand der Intensität der radioaktiv markierten Proteinbande quantifiziert. **C** Die Zellysate wurden mittels Immundetektion analysiert.

Die Behandlung mit Eosin Y zeigt keinen Einfluss auf die Proteinlevel an p27, Cyclin A, Cyclin E und Cdk2. Dies bestätigt somit, dass der durch Eosin Y bewirkte Cdk2-Aktivitätsanstieg nicht mit einer Abnahme des p27-Proteinlevels verbunden ist. Anders verhält es sich für die mit Merbromin behandelten Zellen. Für sie ist unter eingeschränkten Wachstumsbedingungen eine Abnahme der Proteinlevel an p27 und Cyclin E und eine Zunahme des Proteinlevels an Cyclin A erkennbar, während der Proteinlevel an Cdk2 unverändert bleibt. Die Unterschiede in den Proteinlevel erfahren bei Verringerung der Serumkonzentration von 5% auf 2% FCS und Verlängerung der Inkubationszeit von 24 h auf 48 h eine deutlich stärkere Ausprägung.

Die Abnahme an Cyclin E bei gleichzeitiger Zunahme an Cyclin A deutet darauf hin, dass sich die Verteilung des Zellzyklus von der G_{0/1}- zur S-Phase verschiebt. Denn demnach nimmt das Verhältnis der G_{0/1}- zur S-Phase ab. Jedoch ist dies hier nicht mit einer Zunahme sondern Abnahme der apparenten Proliferationsrate verbunden.

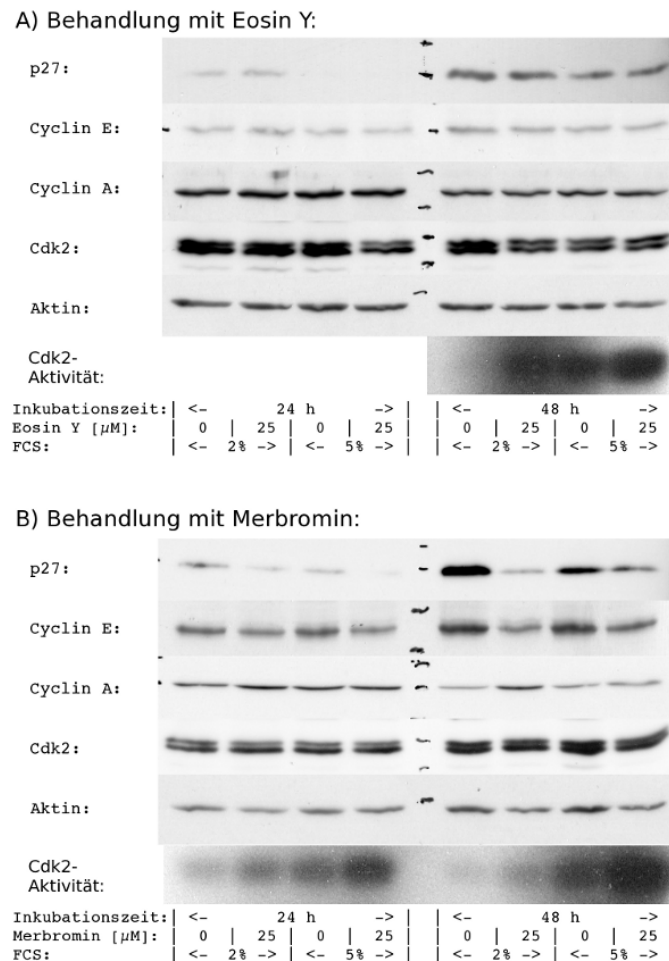


Abb. 3.44: Einfluss von Merbromin oder Eosin Y auf die Cdk2-Aktivität und bestimmte Proteinlevel unter eingeschränkten Wachstumsbedingungen:
MEF-Zellen wurden 24 h oder 48 h lang mit 25 μ M Eosin Y oder Merbromin unter eingeschränkten Wachstumsbedingungen behandelt. Die Zellysate wurden mittels Immundetektion analysiert. Zudem wurde nach IP gegen Cdk2 die entsprechende Kinase-Aktivität radiometrisch bestimmt.

Um die Verteilung der Zellzyklusphasen näher analysieren zu können, wurden die mit Merbromin behandelten Zellen mittels der Durchflusszytometrie untersucht. Die Behandlung der MEF-Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben bei 25 μ M Merbromin; die Serumkonzentration wurde auf 1% FCS reduziert. Vor der Durchflusszytometrie wurden die Zellkerne mittels DAPI gefärbt, welches nicht mit der Fluoreszenz von Merbromin interferiert.

Die durchflusszytometrische Analyse ergibt, dass die Behandlung mit Merbromin in den ersten 24 h keine signifikante Veränderung der Zellzyklus-Verteilung bewirkt (siehe Abb. 3.45.B).

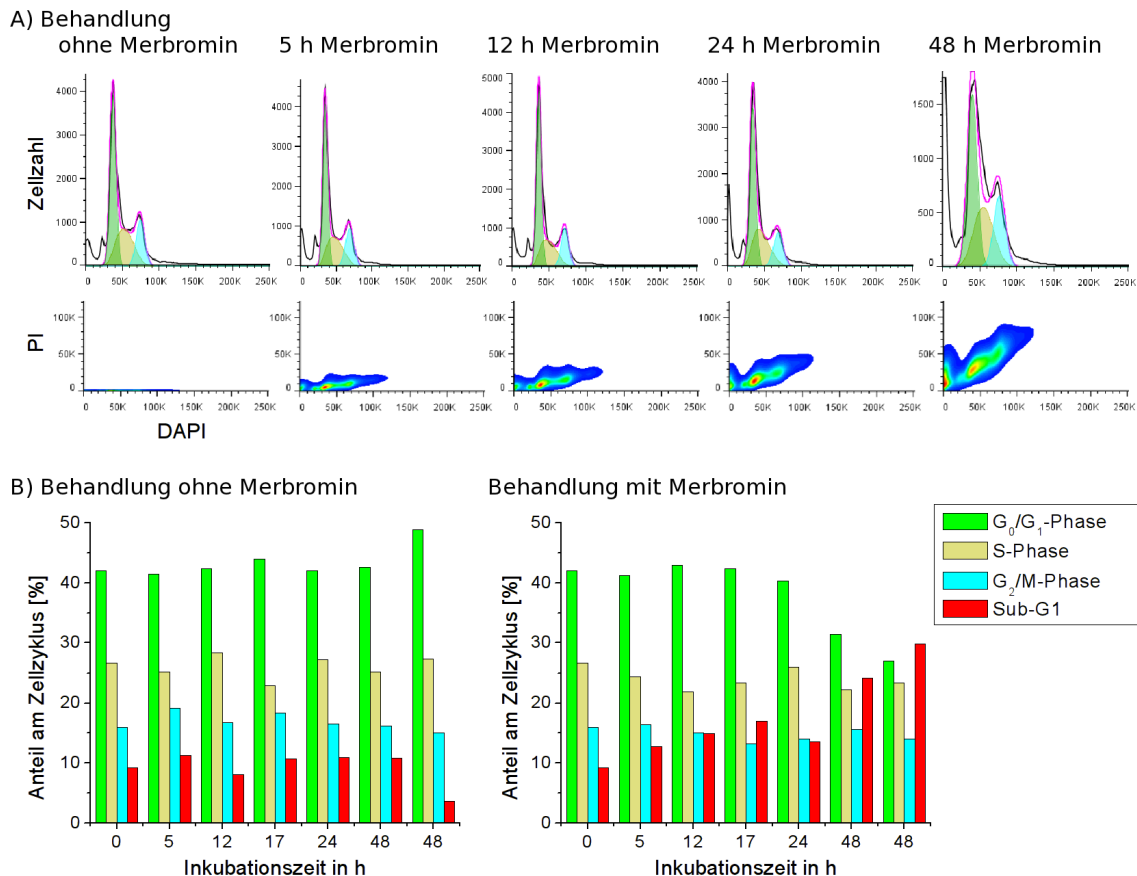


Abb. 3.45: Durchflusszytometrische Analyse Merbromin behandelter MEF-Zellen: Der zelluläre DNA-Gehalt wurde anhand der DAPI-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zudem wurde der Merbromin-Gehalt anhand seiner Fluoreszenz im PI-Kanal detektiert. **A** Dargestellt ist das Histogramm der DAPI-Fluoreszenz und der Konturplot der Merbromin-Fluoreszenz gegen die DAPI-Fluoreszenz. **B** Aus dem Histogramm wurde die Zellzyklus-Verteilung gemäß dem Dean-Jet-Fox Modell bestimmt.

Lediglich ein schwacher Anstieg der Sub-G₁-Population ist zu beobachten. Erst für den 48 h Zeitpunkt der Merbromin-Behandlung ist eine deutliche Abnahme des G_{0/1}-Phasenanteils von ca. 40% auf 30% beobachtbar. Der Anteil der S- und G₂/M-Phase bleibt unverändert. Der Anteil der Sub-G₁-Population steigt hingegen von ca. 15% auf 25%. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Rückgang der G_{0/1}-Phase auf ein vermehrtes Zellsterben zurückzuführen ist. Anhand der im PI-Kanal detektierten Fluoreszenz des Merbromins ist erkennbar, dass das Merbromin relativ langsam von den MEF-Zellen aufgenommen wird (siehe Abb. 3.45.A). Der Gehalt an Merbromin ist nach 48 h Inkubation in etwa doppelt so hoch wie nach 24 h. Sowohl die toten Zellen der Sub-G₁-Population als auch die Zellen der G_{0/1}, S- und G₂/M-Phase können anhand ihrer Merbromin-Fluoreszenz detektiert werden. Die Zellen der G₂/M-Phase liefern dabei ein Signal von ca. doppelt so starker Intensität wie das der G_{0/1}. Somit ähnelt die Merbromin-Färbung

der DAPI-Färbung der Zellkerne.

Dass das Merbromin so langsam von den MEF-Zellen aufgenommen wird, kann als Erklärung dienen, warum in den ersten 24 h keine signifikante Veränderung der Zellzyklus-Verteilung zu beobachten ist. Erst danach wird eine kritische Konzentration erreicht, ab der die Zellen vermehrt zu sterben beginnen. Da die Anteile der S- und G₂/M-Phase stabil bleiben, sind hiervon wohl vor allem die in der G_{0/1}-Phase ruhenden Zellen betroffen. Dies führt zu einer Abnahme des Verhältnisses der G_{0/1}- zur S-Phase, was sich wiederum in Übereinstimmung befindet mit der beobachteten Veränderung der Proteinlevel der Cycline. Aus dem Zellsterben resultiert zudem die Reduzierung der apparenten Proliferationsrate. Ob das Zellsterben tatsächlich durch die Merbromin bedingte Steigerung der Cdk2-Aktivität hervorgerufen wird, wird durch das Resultat der Eosin Y Behandlung in Frage gestellt, da Eosin Y eine ähnliche Steigerung der Cdk2-Aktivität bewirkt, ohne dass dabei ein vermehrtes Zellsterben eintritt. Umgekehrt kann das Resultat der Eosin Y Behandlung aber auch als Bestätigung dafür aufgefasst werden, dass der Anstieg der Cdk2-Aktivität nicht nur auf einer Selektion bereits aktiver Zellen beruht. Dagegen spricht auch, dass bereits für den 24 h Zeitpunkt der Merbromin-Behandlung eine signifikante Steigerung der Cdk2 Aktivität zu beobachten ist, wohingegen die Unterschiede in den Proteinlevel der Cycline erst für den 48 h Zeitpunkt eindeutig in Erscheinung treten.

3.6 Protein-Ligand-Docking

Um einen Eindruck zu gewinnen, wie Merbromin die Aktivität von Cdk2 beeinflussen kann, wurde Merbromin *in silico* anhand eines *Protein-Ligand-Dockings* in die ATP-Bindetasche von Cdk2 eingepasst. Hierfür wurde zunächst die Struktur des Liganden Merbromin mittels des chemischen Strukturzeichnungsprogramms ChemDraw generiert und energieoptimiert. Die Struktur von Cdk2 im aktiven Zustand (PDB: 2CCH) wurde im *Docking*-Programm GOLD präpariert. Die Wassermoleküle wurden entfernt und die Hydrogen-Atome angefügt. Als Suchbereich wurde definiert, was sich innerhalb einer Entfernung von 15 Å zu Atom 265 (NZ von Cdk2K33) befindet. Die Aminosäurereste Y15, K33, E51, F80 und D145 wurden als flexibel gesetzt. Als *Scoring*-Funktion diente die *Goldscore function*.

Die *Goldscore function* weist für die fünf am höchsten bewerteten Posen *Scoring*-Werte größer als 50 auf, was darauf hindeutet, dass Merbromin sich relativ gut in die ATP-Bindetasche einpassen lässt. Ihr RMSD liegt unterhalb von 1,5 Å; diese fünf Posen sind daher ähnlich lokalisiert. Demnach ragt Merbromin tief in das hydrophobe Innere der ATP-Bindetasche von Cdk2 hinein. Neben hydrophoben Interaktionen weist die Pose mit dem höchsten *Scoring*-Wert insbesondere polare Kontakte mit Lysin K33, Glutamat E51 und Aspartat D145 sowie

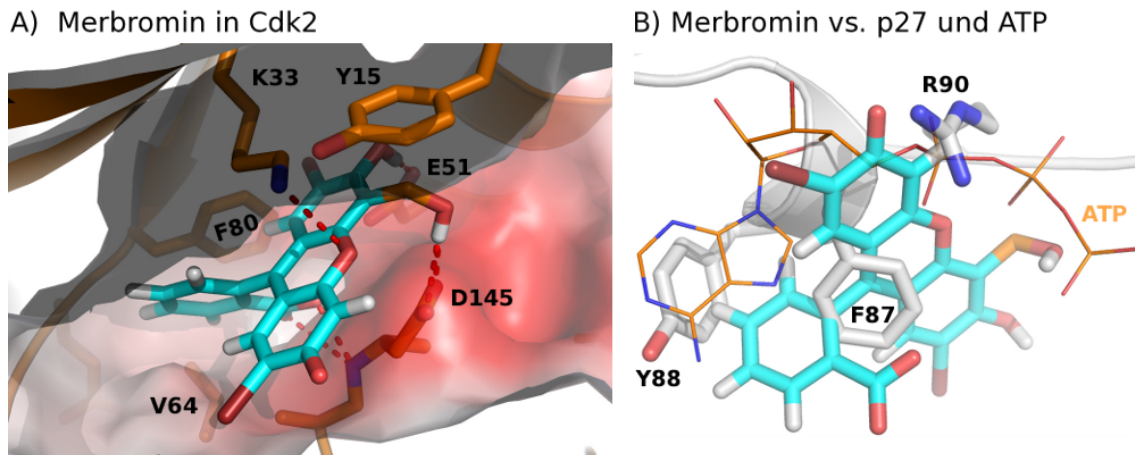


Abb. 3.46: Molekulares Docking von Merbromin in die ATP-Bindetasche:

Dargestellt ist die Docking-Pose, für die während des Protein-Ligand-Dockings der höchste Scoring-Wert ermittelt wurde. **A** Dabei ragt Merbromin tief in das hydrophobe Innere der ATP-Bindetasche von Cdk2 hinein. **B** Die Bindeposition von Merbromin ist im Vergleich zu der von p27 (grau) und ATP (orange) gezeigt.

π -stacking-Interaktionen der aromatischen Ringe mit Phenylalanin F80 und Tyrosin Y18 auf. Demnach verhindert Merbromin, dass K33, E51 und D145 ihre Aufgabe in der Ausrichtung der Phosphatkette des ATPs (siehe Abschnitt 1.1.6) wahrnehmen können (siehe Abb. 3.46.A). Merbromin tendiert während des Protein-Ligand-Dockings dazu, eine Position einzunehmen, die mit der von p27F87 überlappt, wohingegen die Position der Adenin-Base des gebundenen ATPs vor allem durch p27Y88 eingenommen wird. Beide Positionen überlappen nur peripher (siehe Abb. 3.46.B). Eine hieraus resultierende Interferenz mag eine Ursache dafür sein, dass Merbromin ein schwacher Cdk2-Inhibitor ist. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass Merbromin einen Bindemodus einnehmen kann, in dem ATP und Merbromin nebeneinander in der ATP-Bindetasche vorliegen. Wie aber Merbromin das durch p27 inhibierte Cdk2 reaktiviert, ohne dabei Cdk2 selbst zu inhibieren, kann anhand des Resultats des Protein-Ligand-Dockings nicht erklärt werden.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung von p27 in seiner Funktion als CKI für die Entwicklung potentieller Wirkstoffe

Die Zellregeneration wird durch die Zellzyklusregulation kontrolliert, um ein ausartendes Zellwachstum zu verhindern. Die Kehrseite hiervon ist aber, dass die Zellregeneration mitunter zu stark limitiert wird. Bislang ist noch kein Wirkstoff beschrieben worden, der die Zellregeneration anregt, indem er direkt in die Zellzyklusregulation eingreift. Das bereits vorhandene Verständnis über die molekulare Maschinerie der Zellzyklusregulation ermöglicht es aber, potentielle Angriffspunkte hierfür zu definieren.

So führt bekanntermaßen eine Reduktion des p27-Proteinlevels zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Zellproliferation. Daher wird p27 als ein negativer Regulator der Zellzyklusprogression eingestuft, d.h. p27 fungiert als eine Bremse innerhalb des Zellzyklus. Entscheidend hierfür ist vor allem die Inhibierung der Cdk2-Komplexe durch p27 am Restriktionspunkt. Nach Überschreiten des Restriktionspunktes ist die Zelle irreversibel auf eine Beendigung des begonnenen Zellzyklus terminiert. Bereits eine partielle Schwächung des p27-Inhibitorpotentials kann hinreichend sein, um eine initiale Cdk2-Aktivierung zu erzielen, die durch Induktion des p27-Abbaus die weitere Cdk2-Aktivierung vermittelt. Infolge dessen triggert die Aktivität von Cdk2/Cyclin E den G₁/S-Phasenübergang, während die Aktivität von Cdk2/Cyclin A die Progression durch die anschließende S-Phase antreibt. Demnach stellt p27 in seiner Funktion als CKI ein geeignetes Zielobjekt für die Entwicklung regenerativer Wirkstoffe dar (siehe Abschnitt 1.1.5).

Ein solcher Wirkstoff könnte dazu dienen, das Zellwachstum zu stimulieren, um beschädigte Gewebe oder Organe zu regenerieren. Insbesondere Wundheilungen könnten hierdurch angeregt werden. Ferner könnte ein solcher Wirkstoff für die Behandlung bestimmter degenerativer Erkrankungen von Nutzen sein, die mit einem schleichenden Funktionsverlust wichtiger Zellsysteme und Organe verbunden sind, wie z.B. chronische Entzündungen und Autoimmunkrankheiten [Stocum 2004] [Steiner *et al.* 2006].

Um eine Identifizierung wirkstoffähnlicher Substanzen zu ermöglichen, die die p27-Bindung an Cdk2-Komplexe beeinträchtigen, wurden in dieser Arbeit *in vitro Screening*-Systeme entwickelt. Die niedrige Trefferrate der *High-Throughput Screens* verdeutlicht jedoch, dass die Verdrängung der p27-Bindung schwierig zu erzielen ist. Letztlich resultierten aus den *High-Throughput Screens*, in denen insgesamt mehr als 80000 Substanzen getestet wurden, nur fünf

positiv validierte Treffer (siehe Abschnitt 3.3). Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit der Literatur, laut der Protein-Protein-Interaktionen generell als besonders anspruchsvolle Zielobjekte für eine Wirkstoffentwicklung gelten [Whitty & Kumaravel 2006]. Die Schwierigkeit einer derartigen Wirkstoffentwicklung begründet sich in der mangelhaften Kompatibilität wirkstoffähnlicher Substanzen, bei denen es sich um relativ kleine organische Verbindungen handelt, zur Kontaktfläche einer Protein-Protein-Interaktion. Denn die Kontaktfläche erstreckt sich zumeist über einen Bereich größer als Tausend \AA^2 [Conte *et al.* 1999]. Dieser Wert übersteigt bei weitem die Bindungsfläche, die eine einzelne niedermolekulare Substanz abzudecken vermag. Zudem ist eine solche Kontaktfläche typischerweise nur geringfügig zerklüftet, so dass häufig keine markanten Bindungsstellen geformt werden, die als Angriffspunkte für eine Wirkstoffentwicklung dienen könnten [Preissner *et al.* 1998]. Die Fläche, die p27 im Cdk2-Komplex klammerförmig bedeckt, ist sogar um ein Vielfaches größer als Tausend \AA^2 . Der Literaturwert beträgt 5752 \AA^2 [Russo *et al.* 1996a]. Selbst wenn dieser Wert im Vergleich zu anderen Protein-Protein-Interaktionen zu hoch erscheint, wird aus der Struktur des Komplexes (PDB: 1JSU) doch ersichtlich, dass p27 mit der gesamten Länge seiner KID (ca. 90 Aminosäuren) Cdk2/Cyclin A eng umschlingt. Dies findet Ausdruck in der hohen Affinität, mit der p27 sowohl an die Cdk- als auch Cyclin-Einheit bindet [Lacy *et al.* 2004].

Enzymaktivitäten sind hingegen leichter durch Wirkstoffe angreifbar, da Enzyme über vorgeformte Bindetaschen verfügen, in denen die Substratseitenketten bzw. Cosubstrate (ATP, NAD^+ , etc.) als ihre natürlichen Liganden binden. Hinsichtlich dessen wäre die Wirkstoffentwicklung von Inhibitoren der Wee1- oder Mik1-Kinasen attraktiver, die Cdks durch Hemmung der Phosphorylierung des *P-Loops* (T14Y15 bei Cdk1/Cdk2) aktivieren. Jedoch dienen diese Phosphorylierungsereignisse vor allem dazu, ein vorzeitiges Eintreten in die Mitose zu verhindern, wohingegen sie von eher untergeordneter Bedeutung für die Kontrolle des Restriktionspunktes sind. Beispielsweise induziert der Wee1-Inhibitor MK-1775 verstärkt Apoptose in p53-defizienten Tumorzellen infolge der Behandlung mit DNA-schädigenden Noxen. Die höhere Anfälligkeit dieser Tumorzellen gegenüber einer DNA-Schädigung erklärt sich daraus, dass ein durch die p53-Defizienz bedingter Verlust des *DNA Damage Checkpoints* der G_1 -Phase zu einer stärkeren Abhängigkeit von den *DNA Damage Checkpoints* der S- und G_2 -Phase führt, welche durch die MK-1775 bedingte Inhibierung der Wee1-Kinase beeinträchtigt werden. Hingegen wird die Kontrolle des G_1/S -Phasenüberganges durch die Wee1-Inhibition nicht signifikant beeinflusst. Eine erhöhte Proliferationsrate ist nicht beschrieben worden [Hirai *et al.* 2009] [Hamer *et al.* 2011]. Die prinzipielle Durchführbarkeit einer wirkstoffvermittelten Inhibierung einer Protein-Protein-Interaktion ist vor allem am Beispiel einiger Naturstoffe belegbar. Ein seit langen bekannter Inhibitor einer Protein-Protein-Interaktion ist durch das Alkaloid Colchicin sowie dessen Analoga gegeben, welche die Interaktion zwischen α - und β -Tubulinen der Mikrotubuli hemmen und hierdurch den Spindelfaseraufbau während der Metaphase der Mitose un-

terbinden [Bhattacharyya *et al.* 2008] [Finkelstein *et al.* 2010]. Ferner können Protein-Protein-Interaktionen durch Wirkstoffe auch stabilisiert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Pilztoxin Brefeldin A. Brefeldin A stabilisiert den Arf1-GDP/Sec7-Komplex in einem inaktiven Zustand. Hierdurch hemmt Brefeldin A den GDP-GTP-Austausch, welcher ansonsten durch den GDP-GTP-Austauschfaktor Sec7 vermittelt wird. Das G-Protein Arf1 ist beteiligt an der Regulation des retrograden Transports von Vesikeln vom Golgiapparat zum endoplasmatischen Retikulum. Die Arf1-Inhibierung durch Brefeldin A bewirkt einen Stopp des Transports, was zur Auflösung des Golgiapparats führt und somit eine Sekretion durch die Zellen verhindert [Chardin & McCormick 1999] [Zeghouf *et al.* 2005]. Anhand dieser Beispiele wird ersichtlich, dass durch eine wirkstoffvermittelte Modifizierung einer Protein-Protein-Interaktion zelluläre Prozesse entscheidend beeinflusst werden können. Abgesehen von derartigen Naturstoffen sind bisher nur sehr wenige medikamentös einsetzbare Wirkstoffe identifiziert worden, die eine Protein-Protein-Interaktion modifizieren. Mittlerweile gibt es aber vielversprechende Wirkstoffkandidaten hierfür, die insbesondere auch durch rationales *de novo* Wirkstoffdesign entwickelt worden sind [Betzi *et al.* 2009]. Beispielsweise ist es gelungen, niedermolekulare Inhibitoren für die Interaktion zwischen dem Tumorsuppressor p53 und seinem negativen Regulator Mdm2 zu designen [Lauria *et al.* 2010] [Chen *et al.* 2011]. Die Möglichkeit der Modifizierung einer Protein-Protein-Interaktion mittels einer niedermolekularen Substanz erklärt sich insbesondere daraus, dass nicht alle Bereiche der Kontaktfläche gleichmäßig zur Interaktion beitragen. Oftmals lassen sich bestimmte Zentren innerhalb der Kontaktfläche definieren, die einen wesentlichen Beitrag zur Freien Bindungsenergie leisten. Diese sogenannten *hot spots* werden häufig von energetisch unbedeutenderen Aminosäuren umgeben, deren Aufgabe z.B. darin bestehen kann, die *hot spots* gegenüber dem Lösungsmittel abzuschirmen. Die p27-Bindung an Cdk-Komplexe weist mindestens zwei solcher *hot spots* auf, d.h. nämlich die ATP-Bindetasche der Cdk-Einheit und die *substrate remote binding site* der Cyclin-Einheit. Daher ist es nicht überraschend, dass einige der in den *High-Throughput Screens* identifizierten Substanzen eine inhibierende Wirkung gegenüber Cdk2 zeigen (siehe Abschnitt 3.4.2). Zudem zeichnet sich p27 dadurch aus, dass es ein intrinsisch unstrukturiertes Protein (IUP) ist. IUPs vermitteln Protein-Protein-Interaktionen bestimmte Eigenschaften, die einer Wirkstoffentwicklung zum Vorteil gereichen können. Die Kontaktfläche, die IUPs bedecken, ist zumeist weniger flach strukturiert als bei anderen Protein-Protein-Interaktionen. Typischerweise besitzen die strukturbehafteten Bindepartner Furchen, in die sich die IUPs legen, indem sie mit hydrophoben Aminosäureresten in die Furchen hinein ragen. Während des Bindevorgangs falten sich die IUPs [Dunker *et al.* 2008] [Wang *et al.* 2011]. So legt p27 sich z.B. in Form einer 3_{10} -Helix in die ATP-Bindetasche, wobei die aromatischen Aminosäurereste p27F87Y88 das hydrophobe Innere der ATP-Bindetasche ausfüllen. Durch eine Blockierung dieser *hot spots* kann der bindungsvermittelte Faltungsmechanismus entscheidend gestört werden. Beispielsweise führt die Phosphorylierung des Tyrosins p27Y88 dazu, dass Cdk2

partiell aktiviert wird. Folglich wird hierdurch nicht nur die Blockade der 3_{10} -Helix aufgehoben, sondern auch die Umstrukturierung des β -Faltblattes der katalytischen Domäne revidiert (siehe Abschnitt 1.1.6). Zumindest eine der hier identifizierten Substanzen scheint eine ähnliche Reaktivierung von Cdk2 in Gegenwart von p27 zu bewirken.

4.2 Die Entwicklung und Nutzung der *in vitro* Screening-Systeme zur Identifizierung und Charakterisierung wirkstoffähnlicher Inhibitoren der p27-Bindung

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, *in vitro* Screening-Systeme zu entwickeln, um Sammlungen wirkstoffähnlicher Substanzen im Hochdurchsatzmaßstab auf ihr Potential zu testen, die Interaktion zwischen p27 und Cdk2/Cyclin A zu unterbinden. Dabei ergab sich aus dem Umstand, dass die Messungen in einer synthetischen *in vitro*-Umgebung erfolgten, der Vorteil, dass hierdurch eine unmittelbare Detektion von Faktoren in Form wirkstoffähnlicher Substanzen ermöglicht wurde, die die p27-Bindung direkt beeinflussen. Jedoch erforderte dies zunächst die Etablierung eines Verfahrens zur Produktion der Proteine p27, Cyclin A und Cdk2. Durch die bakterielle Synthese dieser humanen Proteine als rekombinante Fusionskonstrukte und deren anschließende Isolierung mittels Affinitätschromatographie ließ es sich realisieren, relativ schnell größere Mengen an homotypen Protein hoher Reinheit zu gewinnen (siehe Abschnitt 3.1).

Als Detektionsmethode der Protein-Protein-Interaktion wurde der intermolekulare FRET ausgewählt. Hierzu mussten die Zielproteine p27 und Cyclin A (mit oder ohne Cdk2) mit den Fluorophoren, die das FRET-Paar bilden, markiert werden. Zwei verschiedene FRET-Assays wurden etabliert, nämlich zum einen der CFP/YFP-basierte FRET-Assay (im Folgenden schlicht als FRET-Assay bezeichnet) und zum anderen der HTRF-Assay. Für den FRET-Assay wurden Cyclin A und p27 rekombinant mit dem CFP/YFP-FRET-Paar fusioniert. Für den HTRF-Assay wurden hingegen Cdk/Cyclin A und p27 mittels Antikörperbindung mit dem EuK/Xl665-FRET-Paar markiert. Beide Assays konnten derart optimiert werden, dass für sie eine hinreichend hohe statistische Signifikanz erzielt werden konnte, um Messungen im Hochdurchsatzmaßstab zu ermöglichen (siehe Abschnitt 3.2).

Von höherer Eignung hierfür erwies sich der HTRF-Assay, da dessen Signaldetektion eine relativ hohe Robustheit gegenüber Signalinterferenzen und Schwankungen der Hintergrundfluoreszenz besitzt. Die Ergebnisse der *High-Throughput Screens* belegen, dass hieraus ein bedeutsamer Vorteil gegenüber dem FRET-Assay resultiert. Denn das HTRF-Signal erlaubt es auch farbstoffartige Testsubstanzen richtig einzustufen. Dies äußert sich u.a. in einer Reduktion der initialen Trefferquote von 1,6% für den FRET-Assay auf 0,95% für den HTRF-Assay. Es ist anzunehmen, dass insbesondere der relativ große *Stokes Shift* von fast 300 nm und der Zeitversatz von 50 μ s

zwischen Anregung und Detektion die Eigenschaften sind, die dem HTRF-Signal die hierfür erforderliche Robustheit verleihen (siehe Abschnitt 2.5.4). Zu beachten ist, dass die Durchführung des HTRF-Assay bei relativ hohen Salzkonzentrationen erfolgte. Hierdurch kann eine wirkstoffvermittelte Verdrängung der p27-Bindung erleichtert worden sein, zumal p27 einen vergleichsweise hohen Anteil an hydrophilen Aminosäuren aufweist (siehe Abschnitt 3.3).

Zur Validierung und Charakterisierung potentieller Treffer wurden sekundäre *in vitro* Screening-Systeme verwendet, die hierfür zuvor erfolgreich etabliert worden waren. Neben dem FRET-Assay diente hierzu insbesondere der *steady-state* ATPase-Assay, welcher eine funktionelle Charakterisierung der Testsubstanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Cdk2-Aktivität in Ab- und Anwesenheit von p27 ermöglicht. Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden anhand von Titrationen ermittelt (siehe Abschnitt 3.4).

4.3 Charakterisierung der in den *in vitro* Screenings als potentielle Treffer identifizierten Substanzen

In dieser Arbeit sind einige wirkstoffähnliche Substanzen identifiziert worden, die entweder die Inhibierung von Cdk2 durch p27 oder direkt die Cdk2-Aktivität beeinflussen können.

4.3.1 NF449

Aus dem *High-Throughput Screening* unter Verwendung des FRET-Assays resultierte als Treffer eine wirkstoffähnliche Substanz Namens NF449. Eine falsch-positive Identifizierung aufgrund einer Signalinterferenz kann für NF449 ausgeschlossen werden, da NF449 über keine relevanten farbstoffartigen Eigenschaften verfügt. NF449 ist ein Strukturanalogon von Suramin. Dementsprechend besitzt NF449 eine symmetrische Struktur, bei der die zentrale Harnstoffgruppe über zwei Isophthalamid-Einheiten mit vier terminalen Phenylringen verbunden ist, die mit je zwei negativ geladenen Sulfonatgruppen substituiert sind. Suramin kann aufgrund seiner hochgradigen Toxizität bei entsprechender Dosierung als Antiprotozoikum z.B. zur Behandlung von Trypanosomen-Krankheiten wie

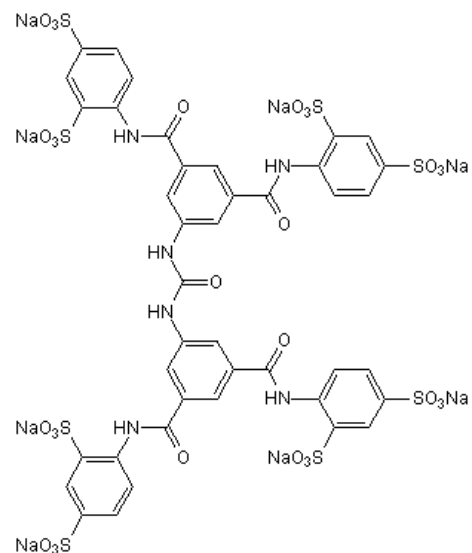


Abb. 4.1: Strukturformel von NF449

der Schlafkrankheit oder zur Behandlung der tropischen Wurmerkrankung Onchozerkose, die die sogenannte Flussblindheit hervorruft, eingesetzt werden [Barrett & Gilbert 2006]. Im Gegensatz zu Suramin ist NF449 trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit weit weniger toxisch und kann

daher nicht als Antiprotozoikum dienen [Arita *et al.* 2008] [Krejci *et al.* 2010]. Derzeit werden Suramin und seine Analoga als Therapeutika gegen HIV, Hepatitis und verschiedene Krebserkrankungen erprobt [Polenova *et al.* 1997] [Schulze *et al.* 2007] [McGeary *et al.* 2008]. Für Suramin und seine Analoga sind bereits einige Bioaktivitäten beschrieben worden. Demnach agieren sie zum einen als Antagonist purinergere P2-Rezeptoren (P2X und P2Y) [Lambrecht *et al.* 2002] und zum anderen als Antagonist der G-Protein α -Untereinheit [Freissmuth *et al.* 1996]. Dabei unterscheidet sich NF449 von Suramin insofern, dass es eine weit höhere subtypspezifische Selektivität und Affinität hinsichtlich dieser beiden Zielobjekte aufweist. Denn NF449 ist vor allem ein potenter Antagonist für P2X₁ [Hülsmann *et al.* 2003] [Rettinger *et al.* 2005] und für G_{s α} [Hohenegger *et al.* 1998]. Weitere bekannte Interaktionspartner des Suramins sind verschiedene Proteasen, DNA-Polymerasen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren [Brigotti *et al.* 2006] [Clercq 2009]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ist anzunehmen, dass dies auch auf NF449 zutrifft. Z.B. ist vor kurzem dargelegt worden, dass NF449 die Kinaseaktivität des *fibroblast growth factor receptors 3* (FGFR3) inhibiert, ohne dabei kompetitiv mit ATP zu konkurrieren [Krejci *et al.* 2010].

Die Resultate des FRET-Assays zeigen, dass NF449 die p27-Bindung an Cyclin A inhibiert. Der hierfür ermittelte IC₅₀-Wert beträgt ca. 7 μ M. In Gegenwart von Cdk2 steigt der IC₅₀-Wert auf ca. 41 μ M an. Jedoch deuten die Resultate des *steady-state* ATPase-Assays darauf hin, dass selbst bei NF449-Konzentrationen größer als 100 μ M für den durch p27 inhibierten Cdk2-Komplex nur eine Reaktivierung von maximal ca. 10% erreicht werden kann. NF449 bewirkt zudem keine bedeutsame Inhibierung der ATPase-Funktion von Cdk2. Folglich interferiert NF449 vorrangig mit der p27-Bindung an Cyclin A, wohingegen die p27-vermittelte Cdk2-Inhibierung hiervon weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Es kann davon ausgegangen werden, dass NF449 mit der *remote binding site* der N-terminalen CBF von Cyclin A interagiert, da hier der *hot spot* der Cyclin-p27-Interaktion vorliegt. Die *remote binding site* fungiert zugleich als unterstützende Bindestelle für schwache Cdk2-Substrate. Daher könnte NF449 als deren Inhibitor dienen.

Jedoch besitzt NF449 Eigenschaften, die gegen dessen Wirksamkeit sprechen. Mit einem Molekulargewicht von ca. 1500 Da ist NF449 zu groß für einen typischen Wirkstoff. Wegen seiner niedrigen Lipophilie (LogP: 2,90) ist NF449 nicht membranpermeabel und kann daher nicht direkt auf intrazelluläre Zielobjekte einwirken. Zudem kann NF449 aufgrund seines polyanionischen Charakters und hohen Flexibilität im Bereich des IC₅₀-Wertes von 7 μ M bzw. 41 μ M mit zahlreichen Interaktionspartnern interagieren, so dass nicht die erforderliche Selektivität erzielt werden kann. Daher handelt es sich bei NF449 nur um eine eingeschränkt nutzbare Leitstruktur zur Wirkstoffentwicklung.

4.3.2 Pyrogallin

Ein hier eher zufällig identifizierter Cdk2-Inhibitor ist Pyrogallin. Pyrogallin ist ein Benzotropolon-artiger Farbstoff, welcher durch oxidative Dimerisierung von Pyrogallol, ein Bestandteil des schwarzen Tees, entsteht [Chong & Sullivan 2007]. Pyrogallin ist bereits als ein ATP-kompetitiver Inhibitor der Janus kinase (JAK) beschrieben worden [Lee *et al.* 2011].

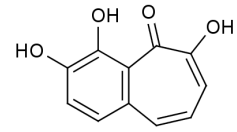


Abb. 4.2: Strukturformel von Pyrogallin

Bei Pyrogallin handelt es sich um eine im *Pilot-Screen* falsch-positiv identifizierte Substanz. Weder die Resultate des HTRF- noch des FRET-Assays deuten darauf hin, dass Pyrogallin die p27-Bindung verdrängen kann. Übereinstimmend hiermit lässt sich auch im *steady-state* ATPase-Assays keine Cdk2-Reaktivierung in Gegenwart von p27 feststellen. Jedoch zeigt sich dabei, dass Pyrogallin Cdk2 inhibiert. Der hierfür ermittelte IC_{50} -Wert liegt bei ca. 7 μM . Der für die Inhibierung von JAK publizierte IC_{50} -Wert beträgt 6,4 μM . Zu dessen Bestimmung diene anstelle des *steady-state* ATPase-Assays ein Fluoreszenzpolarisation-basierter Assay [Lee *et al.* 2011]. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die Übereinstimmung der IC_{50} -Werte die Folge eines Assay-spezifischen Artefaktes ist. Jedoch spricht die annähernd gleichstarke Inhibierung von JAK und Cdk2 dagegen, dass Pyrogallin ein selektiver Proteinkinaseinhibitor ist.

Die Selektivität und Affinität sind demzufolge noch zu gering, um Pyrogallin als eine spezifische Leitstruktur zur Wirkstoffentwicklung eines Cdk2-Inhibitors einstufen zu können.

4.3.3 Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP9)

Im HTRF-basierten *Pilot-Screen* wurde Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP9) als Treffer identifiziert. Protoporphyrin IX gehört zur Gruppe der Porphyrine. Als Komplexverbindung mit einem zweiwertigen Eisen-Ion (Fe^{2+}) bildet Protoporphyrin IX das rot-farbige Häm, welches als prosthetische Gruppe z.B. des Hämoglobins fungiert. Insbesondere in den roten Blutzellen ist das Häm reichhaltig vertreten, dem sie ihre Farbe verdanken. Das Häm übernimmt als prosthetische Gruppe die Funktion molekularen Sauerstoff zu binden. Bei Eisenmangel wird ein zweiwertiges Zink-Ion (Zn^{2+}) in das Protoporphyrin IX inkorporiert, so dass ZnPP9 entsteht [Labbé *et al.* 1999]. ZnPP9 ist ebenfalls ein roter Farbstoff.

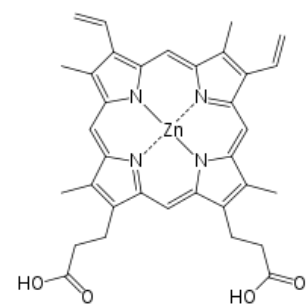


Abb. 4.3: Strukturformel von ZnPP9

Die Resultate des HTRF-Assays deuten zwar darauf hin, dass ZnPP9 die p27-Bindung verdrängt; jedoch resultiert bei einer Titration nur ein anfänglich sigmoidaler Kurvenverlauf, da ZnPP9 bei Konzentrationen größer als 10 μM mit dem HTRF-Signal positiv interferiert. Mittels des

FRET-Assays lässt sich für die Inhibierung der p27-Bindung an Cyclin A ein IC_{50} -Wert von ca. 7 μM ermitteln. Dieser IC_{50} -Wert erweist sich als unabhängig davon, ob Cdk2 zugegen ist oder nicht. Im *steady-state* ATPase-Assay bewirkt ZnPP9 nur eine partielle Aufhebung der p27-Inhibierung, woraus eine Cdk2-Reaktivierung resultiert, die bei einer Substanzkonzentration von 100 μM knapp unterhalb von 20% bleibt. Zudem bewirkt ZnPP9 eine geringfügige Inhibierung der ATPase-Funktion von Cdk2.

Somit kann ZnPP9 durch p27 inhibiertes Cdk2 nur bei sehr hohen Konzentrationen partiell reaktivieren. Hingegen wird PP9 in Form von FePP9 als prosthetische Gruppe Häm-bindender Proteine stark gebunden. Ob ZnPP9 hier als eine Leitstruktur zur Wirkstoffentwicklung genutzt werden kann, ist daher fraglich.

4.3.4 Aurintricarboxylsäure (ATA)

Im HTRF-basierten *Pilot-Screen* wurden zwei Triphenylmethanfarbstoffe identifiziert, d.h. Aurintricarboxylsäure (ATA) und Merbromin. ATA neigt in wässriger Lösung dazu zu polymerisieren und kann daher in unterschiedlichen Spezies vorliegen. Für ATA sind bereits verschiedene Bioaktivitäten beschrieben worden. Insbesondere im polymeren Zustand kann ATA mit bestimmten Protein-Nukleinsäure-Interaktionen interferieren. So inhibiert ATA verschiedene Nukleinsäure-bindende Enzyme wie z.B. Endonukleasen, Topoisomerasen, RNA- und DNA-Polymerasen, indem es die Bindung von RNA/DNA

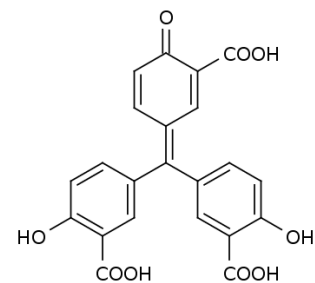


Abb. 4.4: Strukturformel von ATA

an die Enzyme verhindert [González *et al.* 1980] [Benchokroun *et al.* 1995] [Ghosh *et al.* 2009]. Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass ATA bestimmte Enzyme, die in der Regulierung des zellulären Metabolismus involviert sind, inhibiert, wie z.B. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase [Bina-Stein & Tritton 1976] und Phosphofruktokinase [McCune *et al.* 1989]. ATA übt eine anti-apoptotische Wirkung aus, die u.a. darauf zurückgeführt wird, dass ATA Endonukleasen inhibiert, die sonst im Verlaufe der Apoptose die DNA fragmentieren würden [Hallick *et al.* 1977]. Ferner tritt ATA als potenter Calpain-Inhibitor auf [Posner *et al.* 1995]. Zudem kann ATA die Aktivität bestimmter Rezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. Jak2 und IGF-1R stimulieren [Rui *et al.* 1998] [Haimsohn *et al.* 2002].

Im HTRF-Assay wurde ATA als potentieller Inhibitor der p27-Bindung identifiziert. Der hierfür ermittelte IC_{50} -Wert liegt bei ca. 1,1 μM . Mittels des FRET-Assays ist ATA nicht analysierbar, da ATA aufgrund seiner Farbstoffeigenschaften das FRET-Signal verfälscht. Im *steady-state* ATPase-Assay zeigt ATA nur eine geringfügige Reaktivierung der durch p27 inhibierten Cdk2-Komplexe. Hingegen bewirkt ATA in Abwesenheit von p27 eine Zunahme der Cdk2-Aktivität, die bei einer Substanzkonzentration von 25 μM ca. 30% beträgt. Ob die Cdk2-Aktivierung sich analog zur

Stimulierung der Rezeptor-Tyrosinkinase verhält, ist fraglich, da vermutet wird, dass ATA die Rezeptor-Tyrosinkinase über ihre extrazelluläre Rezeptordomäne ansteuert [Lee *et al.* 2008]. Die für die Aktivitätssteigerung von Cdk2 erforderliche Konzentration an ATA liegt im zweistelligen μM -Bereich. Somit ist die Fähigkeit zur Cdk2-Aktivierung im Vergleich zu anderen Bioaktivitäten von ATA nur relativ schwach ausgeprägt. Die Identifizierung von ATA ist hier aber insbesondere im Kontext mit der gleichzeitigen Identifizierung von Merbromin als potentiellen Treffer interessant, da die beiden Substanzen strukturell verwandt sind, d.h. genauer gesagt der Familie der Triphenylmethanfarbstoffe angehören.

4.3.5 Merbromin

Merbromin kann neben den Triphenylmethanfarbstoffen auch den Xanthenfarbstoffen zugeordnet werden, da in der Merbrominstruktur zwei der aromatischen Ringe über eine Etherbindung tricyclisch miteinander verknüpft sind. Zudem trägt Merbromin eine (quecksilberhaltige) Hydroxymercuri-Gruppe. Merbromin wurde lange Zeit als Antiseptikum unter dem Handelsnamen Mercurochrom vertrieben und als Mittel zur Wundheilung und Wunddesinfektion eingesetzt. Die wundheilende Wirkung wird darauf zurückgeführt, dass Merbromin eine Schorfbildung anregt, wodurch die Wunden abgedeckt werden können. Zudem unterstützt seine bakterizide und fungizide Wirkung schützend die Wundheilung [Naumann 1929] [Mohite & Bhatnagar 2009]. Jedoch wurde Mercurochrom in Deutschland (anno 2003) vom Markt genommen, da nicht auszuschließen ist, dass dessen Applikation eine Quecksilbervergiftung verursachen kann [Yeh *et al.* 1978] [Eschborn 2003]. Dessen antiseptischer Wirkungsmechanismus ist ungeklärt. Überhaupt sind bislang relativ wenige Bioaktivitäten für Merbromin beschrieben worden. Erst vor kurzem wurde in einem *High-Throughput Screen* festgestellt, dass Merbromin als ein potenter Inhibitor der Proteinmethyltransferasen agiert [Ibáñez *et al.* 2012].

Merbromin wurde im *Pilot-Screen* mittels des HTRF-Assays als potentieller Inhibitor der p27-Bindung identifiziert. Der hierfür ermittelte IC_{50} -Wert liegt bei $7,5 \mu\text{M}$. Mittels des FRET-Assays ist Merbromin nicht analysierbar, da Merbromin aufgrund seiner Farbstoffeigenschaften zu stark mit dem FRET-Signal interferiert. Mittels des *steady-state* ATPase-Assays lassen sich für Merbromin zwei entgegengesetzte Wirkungen auf die Cdk2-Komplexe beobachten. Zum einen bewirkt Merbromin eine partielle Reaktivierung der durch p27 inhibierten Cdk2-Komplexe. Bei einer Substanzkonzentration von $100 \mu\text{M}$ wird eine Reaktivierung von ca. 20% erreicht. Zum anderen inhibiert Merbromin Cdk2 direkt. Der hierfür ermittelte IC_{50} -Wert beträgt $73 \mu\text{M}$. Eine Überlagerung der Reaktivierung und Inhibierung ist in den radiometrischen Kinase-Assays

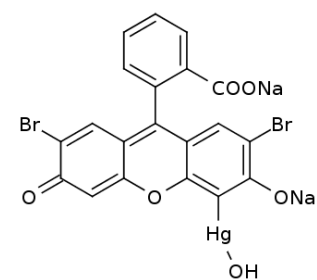


Abb. 4.5: Strukturformel von Merbromin

beobachtbar, mittels dem der Effekt von Merbromin auf Cdk2-Komplexe, isoliert per Immunopräzipitation aus MEF-Zelllysaten, untersucht worden ist. Denn der Kinase-Assay zeigt, dass Substanzkonzentration zwischen 10-100 μM eine Steigerung der Cdk-Aktivität bis auf das ca. 2-fache bewirken. Noch größere Substanzkonzentration hingegen führen zu einer Inhibierung. Eine Immundetektion der immunopräzipitierten Cdk2-Komplexe verdeutlicht zudem, dass der Proteinlevel an gebundenen p27 bei Waschen mit zunehmender Konzentration an Merbromin stabil bleibt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Merbromin die Kinase-Aktivität steigert, obgleich p27 gebunden bleibt. Dies deutet darauf hin, dass die p27-Bindung nur partiell aufgehoben wird. Dieses Ergebnis scheint im Widerspruch zu dem des HTRF-Assay zu stehen, da anhand des HTRF-Signals die Verdrängung der p27-Bindung detektiert worden ist. Ob bereits eine partielle Aufhebung der p27-Bindung bzw. eine Veränderung des Bindungsmodi eine Inhibierung des HTRF-Signals hervorgerufen haben kann, ist fraglich. Eine Erklärung ergibt sich möglicherweise daraus, dass die höhere Salzkonzentration im HTRF-Assay eine vollständige Dissoziation erleichtert haben kann.

Eine Cdk2-Reaktivierung ist somit nur bei relativ hohen Konzentrationen, sprich im zweistelligen μM -Bereich, zu beobachten. Bei derart hohen Konzentrationen ist die Induzierung weiterer Bioaktivitäten wahrscheinlich. Insbesondere die Gefahr einer Quecksilbervergiftung liegt auf der Hand. Merbromin kann aber als eine Leitstruktur zur Wirkstoffentwicklung dienen. Daher ist es sinnvoll, Strukturanaloga des Merbromins zu untersuchen.

4.3.6 Strukturanaloga des Merbromins

Eosin Y

Ein nah verwandtes Strukturanalogon von Merbromin ist Eosin Y. Eosin Y unterscheidet sich vom Merbromin insbesondere dadurch, dass es quecksilberfrei ist. Ähnlich wie Merbromin kann Eosin Y als Antiseptikum zur Wundbehandlung verwendet werden [Arad *et al.* 1999] [Badri *et al.* 2011].

Mittels des *steady-state* ATPase-Assays lässt sich nur eine geringfügige Reaktivierung von Cdk2 in Gegenwart von p27 feststellen. Bei einer Substanzkonzentration von 100 μM beträgt die Reaktivierung ca.

5%. Ähnlich wie ATA bewirkt Eosin Y vielmehr eine direkte Aktivierung von Cdk2. Bei einer Substanzkonzentration von 25 μM nimmt die Cdk2-Aktivität um ca. 40% zu. Eine Erhöhung der Substanzkonzentration über ca. 25 μM führt hingegen zu einer Abnahme der Aktivität.

Die beobachtete Zu- und Abnahme der Cdk2-Aktivität im Verlaufe der Titration lässt auf zwei verschiedene Bindemodi von Eosin Y schließen. Diese konzentrationsabhängige Beeinflussung der Cdk2-Aktivität ähnelt der durch Merbromin, bei der die Cdk2-Reaktivierung durch eine

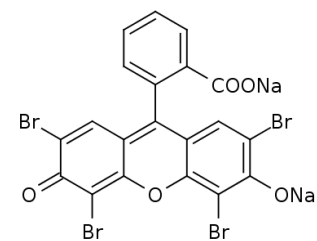


Abb. 4.6: Strukturformel von Eosin Y

direkte Inhibierung überlagert wird. Das Ergebnis des *Ligand-Protein-Dockings* verdeutlicht, dass die Struktur des Merbromins sich relativ gut in die ATP-Bindetasche von Cdk2 einpassen lässt (siehe Abschnitt 3.6). Daher kann angenommen werden, dass Merbromin und Eosin Y bei sehr hohen Konzentrationen Cdk2 kompetitiv inhibieren. Die direkte Aktivierung durch Eosin Y ist hingegen eher durch einen allosterischen Bindemodus erklärbar. Ob die Bindemodi der direkten Aktivierung und der Reaktivierung sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Merbromin und Eosin Y ähneln, ist fraglich.

Phenothiazin-Derivate

Weitere im *steady-state* ATPase-Assay getestete Strukturanaloga von Merbromin sind Phenothiazin sowie die Phenothiazin-Derivate 7-Hydroxy-3H-Phenothiazin-3-on und 7-Methoxy-3H-Phenothiazin-3-on. Diese Substanzen zeigen keine direkte Wirkung auf die Cdk2-Aktivität. 7-Methoxy-3H-Phenothiazin-3-on bewirkt eine Reaktivierung von Cdk2 in Gegenwart von p27, die vergleichbar ist mit der Reaktivierung durch Merbromin. Die beiden anderen Substanzen zeigen keinen vergleichbaren Einfluss auf die p27-Inhibierung.

Daher reaktiviert 7-Methoxy-3H-Phenothiazin-3-on durch p27 inhibiertes Cdk2, ohne dabei Cdk2 direkt zu inhibieren. Jedoch wird hierbei im Vergleich zu Merbromin keine Verbesserung der effektiven Substanzkonzentration erzielt, da auch für eine Cdk2-Reaktivierung durch 7-Methoxy-3H-Phenothiazin-3-on Substanzkonzentrationen im zweistelligen μM -Bereich erforderlich sind.

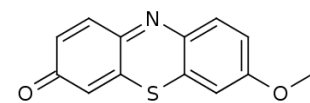


Abb. 4.7: Strukturformel von 7-MeO-3H-Phenothiazin-3-on

4.4 Charakterisierung der durch Merbromin und Eosin Y vermittelten Effekte auf HeLa- und MEF-Zellen

Nachdem Merbromin und dessen Strukturanalogen Eosin Y als potentielle Treffer anhand der *in vitro Screening*-Systeme positiv validiert worden waren, wurde untersucht, ob diese Substanzen die Cdk2-Aktivität auch in Zellen steigern können und ob sich infolge dessen das Proliferationsverhalten verändert (siehe Abschnitt 3.5). Die Ergebnisse der Kinase-Assays aus den zellulären Versuchsreihen deuten darauf hin, dass sowohl durch die Behandlung der Zellen mit Merbromin als auch mit Eosin Y die Cdk2-Aktivität deutlich gesteigert werden kann. Die durch Eosin Y vermittelte Steigerung der Cdk2-Aktivität zeigt keinerlei Auswirkungen auf die apparente Proliferationsrate. Auch die Proteinlevel an p27, Cyclin A, Cyclin E und Cdk2 bleiben unverändert. Dies trifft sowohl auf die Behandlung von MEF-Zellen unter optimalen als auch unter eingeschränkten Wachstumsbedingungen zu. Dabei ist die beobachtete Zunahme der Cdk2-Aktivität durchaus als

signifikant einzustufen. Bei einer Substanzkonzentration von ca. 25 μM steigt die Cdk2-Aktivität auf das ca. Zwei- bis Vierfache der Kontrolle an. Die durch Merbromin vermittelte Steigerung der Cdk2-Aktivität liegt im gleichen Größenbereich. Aber anders als für Eosin Y führt die Behandlung mit Merbromin zu einer Abnahme der apparenten Proliferationsrate. Vergleicht man die ermittelten Zellzahlen mit den dazugehörigen Cdk2-Aktivitäten, wird ersichtlich, dass die Zunahme der Cdk2-Aktivität mit der Zunahme der zelltoxischen Wirkung der Substanz korreliert. MEF-Zellen sind gegenüber Merbromin wesentlich sensitiver als HeLa-Zellen. Dies wird insbesondere durch die Resultate des MTT-Assays belegt; der nach dreitägiger Behandlung mit Merbromin ermittelte IC_{50} -Wert der MTT-Signalhemmung beträgt für MEF-Zellen ca. 23 μM und für HeLa-Zellen ca. 116 μM . Aus dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse Merbromin-behandelter MEF-Zellen lässt sich schließen, dass die Zellen vermehrt in der $\text{G}_{0/1}$ -Phase sterben. Insbesondere unter eingeschränkten Wachstumsbedingungen führt dies zu einer Verschiebung der Zellzyklusverteilung zugunsten der S- und G_2 -Phase. Infolge dessen lässt sich eine Abnahme des Proteinlevels an Cyclin E bei gleichzeitiger Zunahme des Proteinlevels an Cyclin A beobachten, deren Änderung somit als Konsequenz einer Selektion durch ein phasenspezifisches Zellsterben verstanden werden kann. Nicht erklären lässt sich hierdurch jedoch die beträchtliche Cdk2-Aktivitätszunahme sowie der damit verbundene drastische Abfall des Proteinlevels an p27, der auch noch unter optimalen Wachstumsbedingungen zu beobachten ist. Ob die Verhältnismäßigkeit zwischen Ursache und Wirkung sich umgekehrt verhält (d.h. also eine Merbromin-bedingte Steigerung der Cdk2-Aktivität Ursache des Zellsterbens ist), wird dadurch in Frage gestellt, dass die Behandlung mit Eosin Y eine quantitativ ähnliche Steigerung der Cdk2-Aktivität bewirkt, ohne ein Zellsterben zu induzieren. Die Resultate der *steady-state* ATPase-Assays deuten jedoch darauf hin, dass Merbromin das durch p27 inhibierte Cdk2 partiell reaktiviert, wohingegen Eosin Y die Aktivität von nicht inhibierten Cdk2 steigert. Demnach besteht ein qualitativer Unterschied zwischen den beiden Aktivitätssteigerungen. Da nicht-inhibierte Cdk2-Komplexe vor allem erst nach Überschreitung des Restriktionspunktes in der späten G_1 -Phase auftreten, lässt sich folgern, dass Eosin Y keinen (oder nur geringfügigen) Einfluss auf die Cdk2-Aktivität der in der $\text{G}_{0/1}$ -Phase bleibenden Zellen nehmen kann, so dass hierdurch auch kein $\text{G}_{0/1}$ -phasenspezifisches Zellsterben ausgelöst werden kann. Im Gegensatz dazu lassen die Ergebnisse für Merbromin darauf schließen, dass Merbromin die p27-Inhibierung der Cdk2-Komplexe partiell aufheben kann. Die hierdurch erzielte initiale Cdk2-Reaktivierung ähnelt gewissermaßen der, die durch Phosphorylierung von p27Y88 bewirkt wird, da hierbei das gebundene p27 ebenfalls an Inhibitorpotential gegenüber die Cdk-Einheit im trimären Komplex verliert. Infolge der initialen Cdk2-Reaktivierung kann Cdk2 p27T187 phosphorylieren, wodurch der Abbau von p27 induziert wird. In Übereinstimmung hiermit befindet sich die Beobachtung, dass die Behandlung mit Merbromin zu einer starken Abnahme des Proteinlevels an p27 führt. Demnach kann angenommen werden, dass eine hierdurch vermittelte verfrühte

Cdk2-Aktivierung das beobachtete Zellsterben verursacht hat. Jedoch lässt sich infolge der Merbromin-Behandlung kein Anstieg der Spaltprodukte von PARP und Caspase 3 feststellen, was dagegen spricht, dass es sich bei dem beobachteten Zellsterben um Apoptose handelt. Da Merbromin eine quecksilberhaltige Verbindung ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen an einer zur Nekrose führenden Quecksilbervergiftung sterben. Demnach könnte das apparent phasenspezifische Zellsterben durch die Überlagerung zweier Effekte zustande kommen, nämlich zum einen die nekrotische Quecksilbervergiftung und zum anderen die Ankurbelung der Zellzyklusprogression. Ob ein Weg gefunden werden kann, das Zellsterben zu unterdrücken, und infolge dessen dann tatsächlich eine höhere Proliferationsrate resultiert, ist eine mögliche Fragestellung zukünftiger Projekte.

5 Anhang

5.1 Protokoll zur Durchführung des FRET-Assays

Details des FRET-Assays:

- Plattentyp: 384 well black Corning #3544
- Messvolumen: 20 µl
- Messung mittels Safire 2:
 1. Ex. 420 nm / Em. 485 nm
 2. Ex. 420 nm / Em. 527 nm
- FRET-Signal: Em. 527 nm / Em. 485 nm
- Positivkontrolle: 1% DMSO (v/v)
- Negativkontrolle: Positivkontrolle ohne His-eYFP-p27

Durchführung des FRET-Assays:

1. Vorlage von 0,2 µl Substanz in DMSO;
für Kontrollen: 0,2 µl DMSO
2. Zugabe von 19,8 µl FRET-Paar mit MicroFlo
- 0,5 h Inkubation
3. Messung mittels Safire 2

Zusammensetzung des FRET-Assays:

- Messpuffer: 10 mM Tris, pH 8,0, 150mM NaCl, 20mM DTT
- 25 mM His-eCFP-Cyc.A/His-eYFP-p27

5.2 Protokoll zur Durchführung des HTRF-Assays

Details des HTRF-Assays:

- Plattentyp: 1536 well white Corning #3725
- Messvolumen: 10 μ l
- Messung mittels Victor:
Filterpaare:
 1. Ex. 340 nm / Em. 620 nm
 2. Ex. 340 nm / Em. 665 nm- Zeitversatz der Detektion: 50 μ s
- HTRF-Signal: Em. 665 nm / Em. 620 nm
- Positivkontrolle: 1% DMSO (v/v)
- Negativkontrolle: Positivkontrolle ohne GST-p27

Durchführung des HTRF-Assays:

1. Vorlage von 1 μ l Substanz in 10% DMSO (v/v);
für Kontrollen: 1 μ l 10% DMSO (v/v)
2. Zugabe von 2.5 μ l 4x MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A mittels Flexdrop
- 20 min Inkubation
3. Zugabe von 2.5 μ l 4x GST-p27 mittels Flexdrop
- 1 h Inkubation
4. Zugabe von 4 μ l 2,5x Antikörpermix mittels Flexdrop: α -GST-EuK + α -His-XL665
- 0,5 h Inkubation
5. Victor-Messung

Zusammensetzung des HTRF-Assays:

- Messpuffer: PBS, pH 7,4, 400 mM KF, 0,005% Tween 20, 1 mM TCEP
- GST-p27: 25 nM final; 4x = 100 nM (5000x vom Stock)
- MBP-Cdk2^{T160E}/His-Cyc.A: 200 nM final; 4x = 800 nM (103,4x vom Stock)
- α -His-XL665: 25 nM final; 2,5x = 62,5 nM (42,7x vom Stock)
- α -GST-EuK: 2.5 nM final; 2,5x = 6,25 nM (57,6x vom Stock)

Abkürzungsverzeichnis

α -	anti-
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AC	Affinitätschromatographie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATA	Aurintricarboxylsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
C-	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CBF	<i>cyclin-box fold</i>
Cdc	<i>cell division cycle</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; Cyclin-abhängige Kinase
Ci	Curie
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
Cip	<i>Cdk-interacting protein</i>
CKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
Cyc	<i>Cyclin</i>
cmw	<i>calculated molecular weight</i>
Da	Dalton
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
Drp	<i>dynamin-related protein</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
Dyn	Dynamamin
ϵ	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EuK	Europium-Kryptat
eYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
g	Gravitationskonstante
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
HTRF	<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
IC ₅₀	<i>concentration for 50% inhibition</i>
IMAC	immobilisierte-Metall-Affinitätschromatographie
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid
IR	infrarotes Licht
IUP	intrinsisch unstrukturiertes Protein
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KID	<i>kinase-inhibitory domain</i>
Kip	<i>kinase-inhibitory protein</i>
λ	Wellenlänge
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LB	Luria Bertani

Abkürzungsverzeichnis

μ-	Mikro-
m-	Milli-
m	Meter
M	Molar (mol/l)
MBP	<i>maltose-binding protein</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minute
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n-	Nano-
N-	Aminoterminus
n.a.	nicht angegeben
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
³² P	radioaktives Phosphorisotop der Massenzahl 32
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pi	anorganisches Phosphat
PK	Pyruvatkinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
Rb	Retinoblastoma-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCF	SKP1/Cullin-1/F-Box-Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
T.	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
U	<i>unit</i> ; Aktivitätseinheit für Enzyme
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZnPP9	Zink-Protoporphyrin IX

Ein-/Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Literaturverzeichnis

- [Arad *et al.* 1999] A. Arad, D. Mimouni, D. Ben-Amitai, A. Zeharia and M. Mimouni. *Efficacy of topical application of eosin compared with zinc oxide paste and corticosteroid cream for diaper dermatitis*. *Dermatology*, vol. 199, no. 4, pages 319–322, 1999.
- [Arita *et al.* 2008] Minetaro Arita, Takaji Wakita and Hiroyuki Shimizu. *Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity*. *J Gen Virol*, vol. 89, no. Pt 10, pages 2518–2530, Oct 2008.
- [Assoian & Yung 2008] Richard K Assoian and Yuval Yung. *A reciprocal relationship between Rb and Skp2: implications for restriction point control, signal transduction to the cell cycle and cancer*. *Cell Cycle*, vol. 7, no. 1, pages 24–27, Jan 2008.
- [Badri *et al.* 2011] Talel Badri, Nadia Kerkeni, Rym Benmously, Inçaf Mokhtar and Samy Fenniche. *[Should aqueous eosin continue to be used in therapeutics?]*. *Presse Med*, vol. 40, no. 5, pages 553–555, May 2011.
- [Barrett & Gilbert 2006] Michael P Barrett and Ian H Gilbert. *Targeting of toxic compounds to the trypanosome's interior*. *Adv Parasitol*, vol. 63, pages 125–183, 2006.
- [Beach *et al.* 1982] D. Beach, B. Durkacz and P. Nurse. *Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast*. *Nature*, vol. 300, no. 5894, pages 706–709, Dec 1982.
- [Benchokroun *et al.* 1995] Y. Benchokroun, J. Couprie and A. K. Larsen. *Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells*. *Biochem Pharmacol*, vol. 49, no. 3, pages 305–313, Jan 1995.
- [Bergmann & Steller 2010] Andreas Bergmann and Hermann Steller. *Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration*. *Sci Signal*, vol. 3, no. 145, page re8, 2010.
- [Berthet *et al.* 2003] Cyril Berthet, Eiman Aleem, Vincenzo Coppola, Lino Tessarollo and Philipp Kaldis. *Cdk2 knockout mice are viable*. *Curr Biol*, vol. 13, no. 20, pages 1775–1785, Oct 2003.

- [Betzi *et al.* 2009] Stéphane Betzi, Françoise Guerlesquin and Xavier Morelli. *Protein-protein interaction inhibition (2P2I): fewer and fewer undruggable targets*. Comb Chem High Throughput Screen, vol. 12, no. 10, pages 968–983, Dec 2009.
- [Bhattacharyya *et al.* 2008] Bhabatarak Bhattacharyya, Dulal Panda, Suvroma Gupta and Mithu Banerjee. *Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin*. Med Res Rev, vol. 28, no. 1, pages 155–183, Jan 2008.
- [Bina-Stein & Tritton 1976] M. Bina-Stein and T. R. Tritton. *Aurintricarboxylic acid is a nonspecific enzyme inhibitor*. Mol Pharmacol, vol. 12, no. 1, pages 191–193, Jan 1976.
- [Birnboim & Doly 1979] H. C. Birnboim and J. Doly. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, vol. 7, no. 6, pages 1513–1523, Nov 1979.
- [Blagden & de Bono 2005] S. Blagden and J. de Bono. *Drugging cell cycle kinases in cancer therapy*. Curr Drug Targets, vol. 6, no. 3, pages 325–335, May 2005.
- [Blain 2008] Stacy W Blain. *Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off*. Cell Cycle, vol. 7, no. 7, pages 892–898, Apr 2008.
- [Blomen & Boonstra 2007] V. A. Blomen and J. Boonstra. *Cell fate determination during G1 phase progression*. Cell Mol Life Sci, vol. 64, no. 23, pages 3084–3104, Dec 2007.
- [Bloom & Cross 2007] Joanna Bloom and Frederick R Cross. *Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control*. Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 8, no. 2, pages 149–160, Feb 2007.
- [Bondt *et al.* 1993] H. L. De Bondt, J. Rosenblatt, J. Jancarik, H. D. Jones, D. O. Morgan and S. H. Kim. *Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2*. Nature, vol. 363, no. 6430, pages 595–602, Jun 1993.
- [Bossemeyer 1994] D. Bossemeyer. *The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element*. Trends Biochem Sci, vol. 19, no. 5, pages 201–205, May 1994.
- [Bradford 1976] M. M. Bradford. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, vol. 72, pages 248–254, May 1976.
- [Brigotti *et al.* 2006] Maurizio Brigotti, Roberta R Alfieri, Pier Giorgio Petronini and Domenica Carnicelli. *Inhibition by suramin of protein synthesis in vitro. Ribosomes as the target of the drug*. Biochimie, vol. 88, no. 5, pages 497–503, May 2006.

- [Brotherton *et al.* 1998] D. H. Brotherton, V. Dhanaraj, S. Wick, L. Brizuela, P. J. Domaille, E. Volyanik, X. Xu, E. Parisini, B. O. Smith, S. J. Archer, M. Serrano, S. L. Brenner, T. L. Blundell and E. D. Laue. *Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d*. *Nature*, vol. 395, no. 6699, pages 244–250, Sep 1998.
- [Brown *et al.* 1999a] N. R. Brown, M. E. Noble, J. A. Endicott and L. N. Johnson. *The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases*. *Nat Cell Biol*, vol. 1, no. 7, pages 438–443, Nov 1999.
- [Brown *et al.* 1999b] N. R. Brown, M. E. Noble, A. M. Lawrie, M. C. Morris, P. Tunnah, G. Divita, L. N. Johnson and J. A. Endicott. *Effects of phosphorylation of threonine 160 on cyclin-dependent kinase 2 structure and activity*. *J Biol Chem*, vol. 274, no. 13, pages 8746–8756, Mar 1999.
- [Bártová *et al.* 2004] Iveta Bártová, Michal Otyepka, Zdenek Kríz and Jaroslav Koca. *Activation and inhibition of cyclin-dependent kinase-2 by phosphorylation; a molecular dynamics study reveals the functional importance of the glycine-rich loop*. *Protein Sci*, vol. 13, no. 6, pages 1449–1457, Jun 2004.
- [Chardin & McCormick 1999] P. Chardin and F. McCormick. *Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive*. *Cell*, vol. 97, no. 2, pages 153–155, Apr 1999.
- [Chen *et al.* 2008] Qing Chen, Weilin Xie, Deborah J Kuhn, Peter M Voorhees, Antonia Lopez-Girona, Derek Mendy, Laura G Corral, Veronique Plantevin Krenitsky, Weiming Xu, Laure Moutouh de Parseval, David R Webb, Frank Mercurio, Keiichi I Nakayama, Keiko Nakayama and Robert Z Orlowski. *Targeting the p27 E3 ligase SCF(Skp2) results in p27- and Skp2-mediated cell-cycle arrest and activation of autophagy*. *Blood*, vol. 111, no. 9, pages 4690–4699, May 2008.
- [Chen *et al.* 2011] Jianzhong Chen, Jinan Wang, Beisi Xu, Weiliang Zhu and Guohui Li. *Insight into mechanism of small molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction: molecular dynamics simulation and free energy analysis*. *J Mol Graph Model*, vol. 30, pages 46–53, Sep 2011.
- [Cheng *et al.* 1999] M. Cheng, P. Olivier, J. A. Diehl, M. Fero, M. F. Roussel, J. M. Roberts and C. J. Sherr. *The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts*. *EMBO J*, vol. 18, no. 6, pages 1571–1583, Mar 1999.

- [Cheng *et al.* 2009] Tiejun Cheng, Xun Li, Yan Li, Zhihai Liu and Renxiao Wang. *Comparative assessment of scoring functions on a diverse test set*. J Chem Inf Model, vol. 49, no. 4, pages 1079–1093, Apr 2009.
- [Chong & Sullivan 2007] Curtis R Chong and David J Sullivan. *New uses for old drugs*. Nature, vol. 448, no. 7154, pages 645–646, Aug 2007.
- [Chu *et al.* 2007] Isabel Chu, Jun Sun, Angel Arnaout, Harriette Kahn, Wedad Hanna, Steven Narod, Ping Sun, Cheng-Keat Tan, Ludger Hengst and Joyce Slingerland. *p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2*. Cell, vol. 128, no. 2, pages 281–294, Jan 2007.
- [Chu *et al.* 2008] Isabel M Chu, Ludger Hengst and Joyce M Slingerland. *The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy*. Nat Rev Cancer, vol. 8, no. 4, pages 253–267, Apr 2008.
- [Clercq 2009] Erik De Clercq. *Antiviral drug discovery: ten more compounds, and ten more stories (part B)*. Med Res Rev, vol. 29, no. 4, pages 571–610, Jul 2009.
- [Coats *et al.* 1996] S. Coats, W. M. Flanagan, J. Nourse and J. M. Roberts. *Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle*. Science, vol. 272, no. 5263, pages 877–880, May 1996.
- [Cobrinik 2005] David Cobrinik. *Pocket proteins and cell cycle control*. Oncogene, vol. 24, no. 17, pages 2796–2809, Apr 2005.
- [Conte *et al.* 1999] L. Lo Conte, C. Chothia and J. Janin. *The atomic structure of protein-protein recognition sites*. J Mol Biol, vol. 285, no. 5, pages 2177–2198, Feb 1999.
- [Cook *et al.* 1982] P. F. Cook, M. E. Neville, K. E. Vrana, F. T. Hartl and R. Roskoski. *Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit*. Biochemistry, vol. 21, no. 23, pages 5794–5799, Nov 1982.
- [Degorce *et al.* 2009] François Degorce, Amy Card, Sharon Soh, Eric Trinquet, Glenn P Knapik and Bing Xie. *HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications*. Curr Chem Genomics, vol. 3, pages 22–32, 2009.
- [Denicourt *et al.* 2007] Catherine Denicourt, Cheryl C Saenz, Brian Datnow, Xian-Shu Cui and Steven F Dowdy. *Relocalized p27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma*. Cancer Res, vol. 67, no. 19, pages 9238–9243, Oct 2007.

- [Dhont 2004] Jan K G Dhont. *Thermodiffusion of interacting colloids. I. A statistical thermodynamics approach*. J Chem Phys, vol. 120, no. 3, pages 1632–1641, Jan 2004.
- [Duhr & Braun 2006a] Stefan Duhr and Dieter Braun. *Thermophoretic depletion follows Boltzmann distribution*. Phys Rev Lett, vol. 96, no. 16, page 168301, Apr 2006.
- [Duhr & Braun 2006b] Stefan Duhr and Dieter Braun. *Why molecules move along a temperature gradient*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 103, no. 52, pages 19678–19682, Dec 2006.
- [Dunker *et al.* 2008] A. Keith Dunker, Christopher J Oldfield, Jingwei Meng, Pedro Romero, Jack Y Yang, Jessica Walton Chen, Vladimir Vacic, Zoran Obradovic and Vladimir N Uversky. *The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins*. BMC Genomics, vol. 9 Suppl 2, page S1, 2008.
- [Durand *et al.* 1997] B. Durand, F. B. Gao and M. Raff. *Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation*. EMBO J, vol. 16, no. 2, pages 306–317, Jan 1997.
- [Elledge 1996] S. J. Elledge. *Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis*. Science, vol. 274, no. 5293, pages 1664–1672, Dec 1996.
- [Eschborn 2003] Holger Reimann Eschborn. *Merbromin im Spiegel der Expertenmeinungen*. Pharmazeutische Zeitung, vol. 39, 2003.
- [Evans *et al.* 1983] T. Evans, E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt. *Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division*. Cell, vol. 33, no. 2, pages 389–396, Jun 1983.
- [Fang *et al.* 1996] F. Fang, G. Orend, N. Watanabe, T. Hunter and E. Ruoslahti. *Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage*. Science, vol. 271, no. 5248, pages 499–502, Jan 1996.
- [Fero *et al.* 1996] M. L. Fero, M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L. H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, K. Kaushansky and J. M. Roberts. *A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice*. Cell, vol. 85, no. 5, pages 733–744, May 1996.
- [Fero *et al.* 1998] M. L. Fero, E. Randel, K. E. Gurley, J. M. Roberts and C. J. Kemp. *The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression*. Nature, vol. 396, no. 6707, pages 177–180, Nov 1998.

- [Finkelstein *et al.* 2010] Yaron Finkelstein, Steven E Aks, Janine R Hutson, David N Juurlink, Patricia Nguyen, Gal Dubnov-Raz, Uri Pollak, Gideon Koren and Yedidia Bentur. *Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug*. Clin Toxicol (Phila), vol. 48, no. 5, pages 407–414, Jun 2010.
- [Ford & Pardee 1999] H. L. Ford and A. B. Pardee. *Cancer and the cell cycle*. J Cell Biochem, vol. Suppl 32-33, pages 166–172, 1999.
- [Freissmuth *et al.* 1996] M. Freissmuth, S. Boehm, W. Beindl, P. Nickel, A. P. Ijzerman, M. Hohenegger and C. Nanoff. *Suramin analogues as subtype-selective G protein inhibitors*. Mol Pharmacol, vol. 49, no. 4, pages 602–611, Apr 1996.
- [Funakoshi *et al.* 1999] M. Funakoshi, S. Geley, T. Hunt, T. Nishimoto and H. Kobayashi. *Identification of XDRP1; a Xenopus protein related to yeast Dsk2p binds to the N-terminus of cyclin A and inhibits its degradation*. EMBO J, vol. 18, no. 18, pages 5009–5018, Sep 1999.
- [Furuno *et al.* 1999] N. Furuno, N. den Elzen and J. Pines. *Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase*. J Cell Biol, vol. 147, no. 2, pages 295–306, Oct 1999.
- [Galea *et al.* 2008] Charles A Galea, Yuefeng Wang, Sivashankar G Sivakolundu and Richard W Kriwacki. *Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits*. Biochemistry, vol. 47, no. 29, pages 7598–7609, Jul 2008.
- [Gao *et al.* 2004] Hui Gao, Xuesong Ouyang, Whitney Banach-Petrosky, Alexander D Borowsky, Yong Lin, Minjung Kim, Hansol Lee, Weichung-Joseph Shih, Robert D Cardiff, Michael M Shen and Cory Abate-Shen. *A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 101, no. 49, pages 17204–17209, Dec 2004.
- [Ghosh *et al.* 2009] Utpal Ghosh, Kalyan Giri and Nitai P Bhattacharyya. *Interaction of aurintricarboxylic acid (ATA) with four nucleic acid binding proteins DNase I, RNase A, reverse transcriptase and Taq polymerase*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, vol. 74, no. 5, pages 1145–1151, Dec 2009.
- [Gill & von Hippel 1989] S. C. Gill and P. H. von Hippel. *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, vol. 182, no. 2, pages 319–326, Nov 1989.

- [González *et al.* 1980] R. G. González, R. S. Haxo and T. Schleich. *Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein–nucleic acid interactions.* Biochemistry, vol. 19, no. 18, pages 4299–4303, Sep 1980.
- [Grimmler *et al.* 2007] Matthias Grimmler, Yuefeng Wang, Thomas Mund, Zoran Cilensek, Eva-Maria Keidel, M. Brett Waddell, Heidelinde Jäkel, Michael Kullmann, Richard W Kriwacki and Ludger Hengst. *Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases.* Cell, vol. 128, no. 2, pages 269–280, Jan 2007.
- [Gurtner *et al.* 2008] Geoffrey C Gurtner, Sabine Werner, Yann Barrandon and Michael T Longaker. *Wound repair and regeneration.* Nature, vol. 453, no. 7193, pages 314–321, May 2008.
- [Gérard & Goldbeter 2010] Claude Gérard and Albert Goldbeter. *From simple to complex patterns of oscillatory behavior in a model for the mammalian cell cycle containing multiple oscillatory circuits.* Chaos, vol. 20, no. 4, page 045109, Dec 2010.
- [Hagopian *et al.* 2001] J. C. Hagopian, M. P. Kirtley, L. M. Stevenson, R. M. Gergis, A. A. Russo, N. P. Pavletich, S. M. Parsons and J. Lew. *Kinetic basis for activation of CDK2/cyclin A by phosphorylation.* J Biol Chem, vol. 276, no. 1, pages 275–280, Jan 2001.
- [Haimsohn *et al.* 2002] Michal Haimsohn, Rachel Beery, Avraham Karasik, Hannah Kanety and Avraham Geier. *Aurintricarboxylic acid induces a distinct activation of the IGF-I receptor signaling within MDA-231 cells.* Endocrinology, vol. 143, no. 3, pages 837–845, Mar 2002.
- [Hallick *et al.* 1977] R. B. Hallick, B. K. Chelm, P. W. Gray and E. M. Orozco. *Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation.* Nucleic Acids Res, vol. 4, no. 9, pages 3055–3064, Sep 1977.
- [Hamer *et al.* 2011] Philip C De Witt Hamer, Shahryar E Mir, David Noske, Cornelis J F Van Noorden and Tom Würdinger. *WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe.* Clin Cancer Res, vol. 17, no. 13, pages 4200–4207, Jul 2011.
- [Hanahan 1983] D. Hanahan. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol, vol. 166, no. 4, pages 557–580, Jun 1983.

- [Harbour *et al.* 1999] J. W. Harbour, R. X. Luo, A. Dei Santi, A. A. Postigo and D. C. Dean. *Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1*. Cell, vol. 98, no. 6, pages 859–869, Sep 1999.
- [Harper & Adams 2001] J. W. Harper and P. D. Adams. *Cyclin-dependent kinases*. Chem Rev, vol. 101, no. 8, pages 2511–2526, Aug 2001.
- [Hartwell & Weinert 1989] L. H. Hartwell and T. A. Weinert. *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events*. Science, vol. 246, no. 4930, pages 629–634, Nov 1989.
- [Hemmer *et al.* 1997] W. Hemmer, M. McGlone, I. Tsigelny and S. S. Taylor. *Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, vol. 272, no. 27, pages 16946–16954, Jul 1997.
- [Hengst & Reed 1998] L. Hengst and S. I. Reed. *Inhibitors of the Cip/Kip family*. Curr Top Microbiol Immunol, vol. 227, pages 25–41, 1998.
- [Hindley & Phear 1984] J. Hindley and G. A. Phear. *Sequence of the cell division gene CDC2 from Schizosaccharomyces pombe; patterns of splicing and homology to protein kinases*. Gene, vol. 31, no. 1-3, pages 129–134, Nov 1984.
- [Hirai *et al.* 2009] Hiroshi Hirai, Yoshikazu Iwasawa, Megumu Okada, Tsuyoshi Arai, Toshihide Nishibata, Makiko Kobayashi, Toshifumi Kimura, Naoki Kaneko, Junko Ohtani, Kazunori Yamanaka, Hiraku Itadani, Ikuko Takahashi-Suzuki, Kazuhiro Fukasawa, Hiroko Oki, Tadahiro Nambu, Jian Jiang, Takumi Sakai, Hiroharu Arakawa, Toshihiro Sakamoto, Takeshi Sagara, Takashi Yoshizumi, Shinji Mizuarai and Hidehito Kotani. *Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents*. Mol Cancer Ther, vol. 8, no. 11, pages 2992–3000, Nov 2009.
- [Hochuli *et al.* 1987] E. Hochuli, H. Döbeli and A. Schacher. *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues*. J Chromatogr, vol. 411, pages 177–184, Dec 1987.
- [Hohenegger *et al.* 1998] M. Hohenegger, M. Waldhoer, W. Beindl, B. Böing, A. Kreimeyer, P. Nickel, C. Nanoff and M. Freissmuth. *G α -selective G protein antagonists*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, no. 1, pages 346–351, Jan 1998.
- [Hunt *et al.* 2011] Tim Hunt, Kim Nasmyth and Béla Novák. *The cell cycle*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, vol. 366, no. 1584, pages 3494–3497, Dec 2011.

- [Hülsmann *et al.* 2003] Martin Hülsmann, Peter Nickel, Matthias Kassack, Günther Schmalzing, Günter Lambrecht and Fritz Markwardt. *NF449, a novel picomolar potency antagonist at human P2X1 receptors*. Eur J Pharmacol, vol. 470, no. 1-2, pages 1–7, May 2003.
- [Ibáñez *et al.* 2012] Glorymar Ibáñez, David Shum, Gil Blum, Bhavneet Bhinder, Constantin Radu, Christophe Antczak, Minkui Luo and Hakim Djaballah. *A High Throughput Scintillation Proximity Imaging Assay for Protein Methyltransferases*. Comb Chem High Throughput Screen, Jan 2012.
- [James *et al.* 2008] Melissa K James, Arpita Ray, Dina Leznova and Stacy W Blain. *Differential modification of p27Kip1 controls its cyclin D-cdk4 inhibitory activity*. Mol Cell Biol, vol. 28, no. 1, pages 498–510, Jan 2008.
- [Jeffrey *et al.* 1995] P. D. Jeffrey, A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massagué and N. P. Pavletich. *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex*. Nature, vol. 376, no. 6538, pages 313–320, Jul 1995.
- [Jerabek-Willemsen *et al.* 2011] Moran Jerabek-Willemsen, Christoph J Wienken, Dieter Braun, Philipp Baaske and Stefan Duhr. *Molecular interaction studies using microscale thermophoresis*. Assay Drug Dev Technol, vol. 9, no. 4, pages 342–353, Aug 2011.
- [Johnson & Walker 1999] D. G. Johnson and C. L. Walker. *Cyclins and cell cycle checkpoints*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, vol. 39, pages 295–312, 1999.
- [Johnson *et al.* 1996] L. N. Johnson, M. E. Noble and D. J. Owen. *Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation*. Cell, vol. 85, no. 2, pages 149–158, Apr 1996.
- [Jones *et al.* 1971] H. W. Jones, V. A. McKusick, P. S. Harper and K. D. Wu. *George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin*. Obstet Gynecol, vol. 38, no. 6, pages 945–949, Dec 1971.
- [Kaldis 1999] P. Kaldis. *The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals*. Cell Mol Life Sci, vol. 55, no. 2, pages 284–296, Feb 1999.
- [Kang *et al.* 2009] Ling Kang, Honglin Li, Hualiang Jiang and Xicheng Wang. *An improved adaptive genetic algorithm for protein-ligand docking*. J Comput Aided Mol Des, vol. 23, no. 1, pages 1–12, Jan 2009.
- [Kiyokawa *et al.* 1996] H. Kiyokawa, R. D. Kineman, K. O. Manova-Todorova, V. C. Soares, E. S. Hoffman, M. Ono, D. Khanam, A. C. Hayday, L. A. Frohman and A. Koff. *Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1)*. Cell, vol. 85, no. 5, pages 721–732, May 1996.

- [Knighton *et al.* 1991] D. R. Knighton, J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, N. H. Xuong, S. S. Taylor and J. M. Sowadski. *Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase*. *Science*, vol. 253, no. 5018, pages 414–420, Jul 1991.
- [Knoblich & Lehner 1993] J. A. Knoblich and C. F. Lehner. *Synergistic action of Drosophila cyclins A and B during the G2-M transition*. *EMBO J*, vol. 12, no. 1, pages 65–74, Jan 1993.
- [Koff *et al.* 1992] A. Koff, A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J. W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D. O. Morgan, B. R. Franza and J. M. Roberts. *Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle*. *Science*, vol. 257, no. 5077, pages 1689–1694, Sep 1992.
- [Kossatz *et al.* 2006] Uta Kossatz, Jörg Vervoorts, Irina Nickeleit, Holly A Sundberg, J. Simon C Arthur, Michael P Manns and Nisar P Malek. *C-terminal phosphorylation controls the stability and function of p27kip1*. *EMBO J*, vol. 25, no. 21, pages 5159–5170, Nov 2006.
- [Krafts 2010] Kristine P Krafts. *Tissue repair: The hidden drama*. *Organogenesis*, vol. 6, no. 4, pages 225–233, 2010.
- [Krejci *et al.* 2010] Pavel Krejci, Shunichi Murakami, Jirina Prochazkova, Lukas Trantirek, Katarina Chlebova, Zhufeng Ouyang, Anie Aklian, Jiri Smutny, Vitezslav Bryja, Alois Kozubik and William R Wilcox. *NF449 is a novel inhibitor of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling active in chondrocytes and multiple myeloma cells*. *J Biol Chem*, vol. 285, no. 27, pages 20644–20653, Jul 2010.
- [Kroemer 2007] Romano T Kroemer. *Structure-based drug design: docking and scoring*. *Curr Protein Pept Sci*, vol. 8, no. 4, pages 312–328, Aug 2007.
- [Krystof & Uldrijan 2010] Vladimír Krystof and Stjepan Uldrijan. *Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer drugs*. *Curr Drug Targets*, vol. 11, no. 3, pages 291–302, Mar 2010.
- [Labbé *et al.* 1999] R. F. Labbé, H. J. Vreman and D. K. Stevenson. *Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission*. *Clin Chem*, vol. 45, no. 12, pages 2060–2072, Dec 1999.
- [Lacy *et al.* 2004] Eilyn R Lacy, Igor Filippov, William S Lewis, Steve Otieno, Limin Xiao, Sonja Weiss, Ludger Hengst and Richard W Kriwacki. *p27 binds cyclin-CDK complexes through a sequential mechanism involving binding-induced protein folding*. *Nat Struct Mol Biol*, vol. 11, no. 4, pages 358–364, Apr 2004.

- [Laemmli 1970] U. K. Laemmli. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, vol. 227, no. 5259, pages 680–685, Aug 1970.
- [Lambrecht *et al.* 2002] Günter Lambrecht, Kirsten Braun, MiSusannechelle Damer, Matthias Ganso, Caren Hildebrandt, Heiko Ullmann, Matthias U Kassack and Peter Nickel. *Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists*. Curr Pharm Des, vol. 8, no. 26, pages 2371–2399, 2002.
- [Larrea *et al.* 2008] Michelle D Larrea, Jiyong Liang, Thiago Da Silva, Feng Hong, Shan H Shao, Kathy Han, D. Dumont and Joyce M Slingerland. *Phosphorylation of p27Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4*. Mol Cell Biol, vol. 28, no. 20, pages 6462–6472, Oct 2008.
- [Lauria *et al.* 2010] A. Lauria, M. Tutone, M. Ippolito, L. Pantano and A. M. Almerico. *Molecular modeling approaches in the discovery of new drugs for anti-cancer therapy: the investigation of p53-MDM2 interaction and its inhibition by small molecules*. Curr Med Chem, vol. 17, no. 28, pages 3142–3154, 2010.
- [Lavi *et al.* 2011] Orit Lavi, Doron Ginsberg and Yoram Louzoun. *Regulation of modular Cyclin and CDK feedback loops by an E2F transcription oscillator in the mammalian cell cycle*. Math Biosci Eng, vol. 8, no. 2, pages 445–461, Apr 2011.
- [Lee & Nurse 1987] M. G. Lee and P. Nurse. *Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2*. Nature, vol. 327, no. 6117, pages 31–35, 1987.
- [Lee *et al.* 2008] Dong Yoon Lee, Mee-Kyung Kim, Mi-Jeong Kim, Bharat Raj Bhattarai, Bhooshan Kafle, Keun-Hyeung Lee, Jae-Seung Kang and Hyeongjin Cho. *Antiapoptotic Effect of Aurintricarboxylic Acid; Extracellular Action versus Inhibition of Cytosolic Protein Tyrosine Phosphatases*. Bull Korean Chem Soc, vol. 29, no. 2, 2008.
- [Lee *et al.* 2011] Byung Il Lee, Hyung Jun Ahn, Ki Cheol Han, Dae Ro Ahn and Dongyun Shin. *Pyrogallin, an ATP-Competitive Inhibitor of JAK3*. Bull Korean Chem Soc, vol. 32, pages 1077–1079, 2011.
- [Loog & Morgan 2005] Mart Loog and David O Morgan. *Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates*. Nature, vol. 434, no. 7029, pages 104–108, Mar 2005.
- [Lottspeich & Zorbas 1998] F. Lottspeich and H. Zorbas. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, 1998.

- [Lukas *et al.* 1995] J. Lukas, D. Parry, L. Aagaard, D. J. Mann, J. Bartkova, M. Strauss, G. Peters and J. Bartek. *Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. Nature, vol. 375, no. 6531, pages 503–506, Jun 1995.
- [Lundberg & Weinberg 1998] A. S. Lundberg and R. A. Weinberg. *Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes*. Mol Cell Biol, vol. 18, no. 2, pages 753–761, Feb 1998.
- [MacLachlan *et al.* 1995] T. K. MacLachlan, N. Sang and A. Giordano. *Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, vol. 5, no. 2, pages 127–156, 1995.
- [Malumbres & Barbacid 2009] Marcos Malumbres and Mariano Barbacid. *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer, vol. 9, no. 3, pages 153–166, Mar 2009.
- [Mathis 1999] Mathis. *HTRF(R) Technology*. J Biomol Screen, vol. 4, no. 6, pages 309–314, 1999.
- [McCune *et al.* 1989] S. A. McCune, L. G. Foe, R. G. Kemp and R. R. Jurin. *Aurintricarboxylic acid is a potent inhibitor of phosphofructokinase*. Biochem J, vol. 259, no. 3, pages 925–927, May 1989.
- [McGeary *et al.* 2008] Ross P McGeary, Andrew J Bennett, Quoc B Tran, Kelly L Cosgrove and Benjamin P Ross. *Suramin: clinical uses and structure-activity relationships*. Mini Rev Med Chem, vol. 8, no. 13, pages 1384–1394, Nov 2008.
- [Medema *et al.* 1995] R. H. Medema, R. E. Herrera, F. Lam and R. A. Weinberg. *Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92, no. 14, pages 6289–6293, Jul 1995.
- [Mohite & Bhatnagar 2009] Prashant N. Mohite and Ashok M. Bhatnagar. *Mercurochrome Iit efficacious and safe?* The Internet Journal of Surgery, vol. 21, 2009.
- [Mondello & Scovassi 2010] Chiara Mondello and A. Ivana Scovassi. *Apoptosis: a way to maintain healthy individuals*. Subcell Biochem, vol. 50, pages 307–323, 2010.
- [Morgan 1997] D. O. Morgan. *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors*. Annu Rev Cell Dev Biol, vol. 13, pages 261–291, 1997.
- [Morgan 2007] D.O. Morgan. The cell cycle: Principles of control. New Science Press Ltd, 2007.

- [Mosmann 1983] T. Mosmann. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, vol. 65, no. 1-2, pages 55–63, Dec 1983.
- [Muraoka *et al.* 2002] Rebecca S Muraoka, Anne E G Lenferink, Brian Law, Elizabeth Hamilton, Dana M Brantley, L. Renee Roebuck and Carlos L Arteaga. *ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells*. Mol Cell Biol, vol. 22, no. 7, pages 2204–2219, Apr 2002.
- [Murray & Hunt 1993] Andrew Murray and Tim Hunt. *The cell cycle: An introduction*. W.H. Freeman, 1993.
- [Nakayama *et al.* 1996] K. Nakayama, N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, I. Horii, D. Y. Loh and K. Nakayama. *Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors*. Cell, vol. 85, no. 5, pages 707–720, May 1996.
- [Nasmyth 2001] K. Nasmyth. *Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis*. Annu Rev Genet, vol. 35, pages 673–745, 2001.
- [Naumann 1929] H. E. Naumann. *Die Behandlung der Gonorrhöe mit Mercurochrom*. Archives of Dermatological Research, vol. 158, pages 715–715, 1929. 10.1007/BF01827045.
- [Nickeleit *et al.* 2008] Irina Nickeleit, Steffen Zender, Florenz Sasse, Robert Geffers, Gudrun Brandes, Inga Sörensen, Heinrich Steinmetz, Stefan Kubicka, Teresa Carlomagno, Dirk Menche, Ines Gütgemann, Jan Buer, Achim Gossler, Michael P Manns, Markus Kalesse, Ronald Frank and Nisar P Malek. *Argyriin a reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27(kip1) in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition*. Cancer Cell, vol. 14, no. 1, pages 23–35, Jul 2008.
- [Oelgeschläger 2002] Thomas Oelgeschläger. *Regulation of RNA polymerase II activity by CTD phosphorylation and cell cycle control*. J Cell Physiol, vol. 190, no. 2, pages 160–169, Feb 2002.
- [Pagano *et al.* 1993] M. Pagano, R. Pepperkok, J. Lukas, V. Baldin, W. Ansorge, J. Bartek and G. Draetta. *Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts*. J Cell Biol, vol. 121, no. 1, pages 101–111, Apr 1993.

- [Palmero & Peters 1996] I. Palermo and G. Peters. *Perturbation of cell cycle regulators in human cancer*. *Cancer Surv*, vol. 27, pages 351–367, 1996.
- [Pardee 1974] A. B. Pardee. *A restriction point for control of normal animal cell proliferation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 71, no. 4, pages 1286–1290, Apr 1974.
- [Patterson *et al.* 2001] G. Patterson, R. N. Day and D. Piston. *Fluorescent protein spectra*. *J Cell Sci*, vol. 114, no. Pt 5, pages 837–838, Mar 2001.
- [Pavletich 1999] N. P. Pavletich. *Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors*. *J Mol Biol*, vol. 287, no. 5, pages 821–828, Apr 1999.
- [Philipp-Staheli *et al.* 2001] J. Philipp-Staheli, S. R. Payne and C. J. Kemp. *p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer*. *Exp Cell Res*, vol. 264, no. 1, pages 148–168, Mar 2001.
- [Planas-Silva & Weinberg 1997] M. D. Planas-Silva and R. A. Weinberg. *The restriction point and control of cell proliferation*. *Curr Opin Cell Biol*, vol. 9, no. 6, pages 768–772, Dec 1997.
- [Polenova *et al.* 1997] T. Polenova, T. Iwashita, A. G. Palmer and A. E. McDermott. *Conformation of the trypanocidal pharmaceutical suramin in its free and bound forms: transferred nuclear overhauser studies*. *Biochemistry*, vol. 36, no. 46, pages 14202–14217, Nov 1997.
- [Pomerening *et al.* 2003] Joseph R Pomerening, Eduardo D Sontag and James E Ferrell. *Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2*. *Nat Cell Biol*, vol. 5, no. 4, pages 346–351, Apr 2003.
- [Poon *et al.* 1995] R. Y. Poon, H. Toyoshima and T. Hunter. *Redistribution of the CDK inhibitor p27 between different cyclin.CDK complexes in the mouse fibroblast cell cycle and in cells arrested with lovastatin or ultraviolet irradiation*. *Mol Biol Cell*, vol. 6, no. 9, pages 1197–1213, Sep 1995.
- [Porath *et al.* 1975] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson and G. Belfrage. *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. *Nature*, vol. 258, no. 5536, pages 598–599, Dec 1975.
- [Posner *et al.* 1995] A. Posner, K. J. Raser, I. Hajimohammadreza, P. W. Yuen and K. K. Wang. *Aurintricarboxylic acid is an inhibitor of mu- and m-calpain*. *Biochem Mol Biol Int*, vol. 36, no. 2, pages 291–299, Jun 1995.

- [Preissner *et al.* 1998] R. Preissner, A. Goede and C. Frömmel. *Dictionary of interfaces in proteins (DIP). Data bank of complementary molecular surface patches.* J Mol Biol, vol. 280, no. 3, pages 535–550, Jul 1998.
- [Radzio-Andzelm *et al.* 1995] E. Radzio-Andzelm, J. Lew and S. Taylor. *Bound to activate: conformational consequences of cyclin binding to CDK2.* Structure, vol. 3, no. 11, pages 1135–1141, Nov 1995.
- [Rauch & Köhler 2002] J. Rauch and W. Köhler. *Diffusion and thermal diffusion of semidilute to concentrated solutions of polystyrene in toluene in the vicinity of the glass transition.* Phys Rev Lett, vol. 88, no. 18, page 185901, May 2002.
- [Reineck *et al.* 2010] Philipp Reineck, Christoph J Wienken and Dieter Braun. *Thermophoresis of single stranded DNA.* Electrophoresis, vol. 31, no. 2, pages 279–286, Jan 2010.
- [Rettinger *et al.* 2005] Jürgen Rettinger, Kirsten Braun, Henrike Hochmann, Matthias U Kaskack, Heiko Ullmann, Peter Nickel, Günther Schmalzing and Günter Lambrecht. *Profiling at recombinant homomeric and heteromeric rat P2X receptors identifies the suramin analogue NF449 as a highly potent P2X1 receptor antagonist.* Neuropharmacology, vol. 48, no. 3, pages 461–468, Mar 2005.
- [Reynisdóttir & Massagué 1997] I. Reynisdóttir and J. Massagué. *The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2.* Genes Dev, vol. 11, no. 4, pages 492–503, Feb 1997.
- [Roberts 1999] J. M. Roberts. *Evolving ideas about cyclins.* Cell, vol. 98, no. 2, pages 129–132, Jul 1999.
- [Roussel 1999] M. F. Roussel. *The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer.* Oncogene, vol. 18, no. 38, pages 5311–5317, Sep 1999.
- [Rui *et al.* 1998] H. Rui, J. Xu, S. Mehta, H. Fang, J. Williams, F. Dong and P. M. Grimley. *Activation of the Jak2-Stat5 signaling pathway in Nb2 lymphoma cells by an anti-apoptotic agent, aurintricarboxylic acid.* J Biol Chem, vol. 273, no. 1, pages 28–32, Jan 1998.
- [Russo *et al.* 1996a] A. A. Russo, P. D. Jeffrey, A. K. Patten, J. Massagué and N. P. Pavletich. *Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex.* Nature, vol. 382, no. 6589, pages 325–331, Jul 1996.

- [Russo *et al.* 1996b] A. A. Russo, P. D. Jeffrey and N. P. Pavletich. *Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation*. Nat Struct Biol, vol. 3, no. 8, pages 696–700, Aug 1996.
- [Russo *et al.* 1998] A. A. Russo, L. Tong, J. O. Lee, P. D. Jeffrey and N. P. Pavletich. *Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a*. Nature, vol. 395, no. 6699, pages 237–243, Sep 1998.
- [Saiki *et al.* 1988] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, vol. 239, no. 4839, pages 487–491, Jan 1988.
- [Sandhu *et al.* 1997] C. Sandhu, J. Garbe, N. Bhattacharya, J. Daksis, C. H. Pan, P. Yaswen, J. Koh, J. M. Slingerland and M. R. Stampfer. *Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells*. Mol Cell Biol, vol. 17, no. 5, pages 2458–2467, May 1997.
- [Santamaría *et al.* 2007] David Santamaría, Cédric Barrière, Antonio Cerqueira, Sarah Hunt, Claudine Tardy, Kathryn Newton, Javier F Cáceres, Pierre Dubus, Marcos Malumbres and Mariano Barbacid. *Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle*. Nature, vol. 448, no. 7155, pages 811–815, Aug 2007.
- [Satyanarayana *et al.* 2008] Ande Satyanarayana, Cyril Berthet, Javier Lopez-Molina, Vincenzo Coppola, Lino Tessarollo and Philipp Kaldis. *Genetic substitution of Cdk1 by Cdk2 leads to embryonic lethality and loss of meiotic function of Cdk2*. Development, vol. 135, no. 20, pages 3389–3400, Oct 2008.
- [Schulman *et al.* 1998] B. A. Schulman, D. L. Lindstrom and E. Harlow. *Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, no. 18, pages 10453–10458, Sep 1998.
- [Schulze-Gahmen *et al.* 1996] U. Schulze-Gahmen, H. L. De Bondt and S. H. Kim. *High-resolution crystal structures of human cyclin-dependent kinase 2 with and without ATP: bound waters and natural ligand as guides for inhibitor design*. J Med Chem, vol. 39, no. 23, pages 4540–4546, Nov 1996.
- [Schulze *et al.* 2007] Andreas Schulze, Philippe Gripon and Stephan Urban. *Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans*. Hepatology, vol. 46, no. 6, pages 1759–1768, Dec 2007.

- [Sebastian *et al.* 1993] B. Sebastian, A. Kakizuka and T. Hunter. *Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15*. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90, no. 8, pages 3521–3524, Apr 1993.
- [Senderowicz 2001] A. M. Senderowicz. *Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies*. Leukemia, vol. 15, no. 1, pages 1–9, Jan 2001.
- [Sheaff *et al.* 1997] R. J. Sheaff, M. Groudine, M. Gordon, J. M. Roberts and B. E. Clurman. *Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1*. Genes Dev, vol. 11, no. 11, pages 1464–1478, Jun 1997.
- [Shelton *et al.* 2009] Christopher C Shelton, Yuan Tian, David Shum, Constantin Radu, Hakim Djaballah and Yue-Ming Li. *A miniaturized 1536-well format gamma-secretase assay*. Assay Drug Dev Technol, vol. 7, no. 5, pages 461–470, Oct 2009.
- [Sherr & Roberts 1999] C. J. Sherr and J. M. Roberts. *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, vol. 13, no. 12, pages 1501–1512, Jun 1999.
- [Slingerland & Pagano 2000] J. Slingerland and M. Pagano. *Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer*. J Cell Physiol, vol. 183, no. 1, pages 10–17, Apr 2000.
- [Smillie & Cousin 2005] Karen J Smillie and Michael A Cousin. *Dynamin I phosphorylation and the control of synaptic vesicle endocytosis*. Biochem Soc Symp, no. 72, pages 87–97, 2005.
- [Song *et al.* 2004] Yongcheng Song, Djohan Kesuma, Jian Wang, Yu Deng, Jinao Duan, Jerry H Wang and Robert Z Qi. *Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine*. Biochem Biophys Res Commun, vol. 317, no. 1, pages 128–132, Apr 2004.
- [Steiner *et al.* 2006] Barbara Steiner, Susanne Wolf and Gerd Kempermann. *Adult neurogenesis and neurodegenerative disease*. Regen Med, vol. 1, no. 1, pages 15–28, Jan 2006.
- [Stern & Nurse 1996] B. Stern and P. Nurse. *A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast*. Trends Genet, vol. 12, no. 9, pages 345–350, Sep 1996.
- [Stevenson-Lindert *et al.* 2003] Lisa M Stevenson-Lindert, Paul Fowler and John Lew. *Substrate specificity of CDK2-cyclin A. What is optimal?* J Biol Chem, vol. 278, no. 51, pages 50956–50960, Dec 2003.

- [Stevenson *et al.* 2002] Lisa M Stevenson, Michael S Deal, Jonathan C Hagopian and John Lew. *Activation mechanism of CDK2: role of cyclin binding versus phosphorylation*. *Biochemistry*, vol. 41, no. 26, pages 8528–8534, Jul 2002.
- [Stocum 2004] D. L. Stocum. *Tissue restoration through regenerative biology and medicine*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, vol. 176, pages III–VIII, 1–101, back cover, 2004.
- [Swanger & Roberts 1997] W. J. Swanger and J. M. Roberts. *p57KIP2 targeted disruption and Beckwith-Wiedemann syndrome: is the inhibitor just a contributor?* *Bioessays*, vol. 19, no. 10, pages 839–842, Oct 1997.
- [Szölloosi *et al.* 2006] János Szölloosi, Sándor Damjanovich, Péter Nagy, György Vereb and László Mátyus. *Principles of resonance energy transfer*. *Curr Protoc Cytom*, vol. Chapter 1, page Unit1.12, Nov 2006.
- [Tsien 2009] Roger Y Tsien. *Indicators based on fluorescence resonance energy transfer (FRET)*. *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2009, no. 7, page pdb.top57, Jul 2009.
- [Ulukaya *et al.* 2011] Engin Ulukaya, Ceyda Acilan and Yusuf Yilmaz. *Apoptosis: why and how does it occur in biology?* *Cell Biochem Funct*, vol. 29, no. 6, pages 468–480, Aug 2011.
- [van den Heuvel & Harlow 1993] S. van den Heuvel and E. Harlow. *Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control*. *Science*, vol. 262, no. 5142, pages 2050–2054, Dec 1993.
- [Verdonk *et al.* 2003] Marcel L Verdonk, Jason C Cole, Michael J Hartshorn, Christopher W Murray and Richard D Taylor. *Improved protein-ligand docking using GOLD*. *Proteins*, vol. 52, no. 4, pages 609–623, Sep 2003.
- [Verkhivker *et al.* 2003] Gennady M Verkhivker, Djamal Bouzida, Daniel K Gehlhaar, Paul A Rejto, Stephan T Freer and Peter W Rose. *Simulating disorder-order transitions in molecular recognition of unstructured proteins: where folding meets binding*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 9, pages 5148–5153, Apr 2003.
- [Wagner 1998] H. P. Wagner. *Cell cycle control and cancer*. *Indian J Pediatr*, vol. 65, no. 6, pages 805–814, 1998.
- [Wang & Ren 2010] L. M. Wang and D. M. Ren. *Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor: recent advances in combination chemotherapy*. *Mini Rev Med Chem*, vol. 10, no. 11, pages 1058–1070, Oct 2010.

- [Wang *et al.* 2011] Jihua Wang, Zanxia Cao, Liling Zhao and Shuqiang Li. *Novel Strategies for Drug Discovery Based on Intrinsically Disordered Proteins (IDPs)*. Int J Mol Sci, vol. 12, no. 5, pages 3205–3219, 2011.
- [Watson & Crick 1953] J. D. Watson and F. H. Crick. *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*. Nature, vol. 171, no. 4361, pages 964–967, May 1953.
- [Weinert 1997] T. Weinert. *A DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine*. Science, vol. 277, no. 5331, pages 1450–1451, Sep 1997.
- [Welburn & Endicott 2005] Julie Welburn and Jane Endicott. *Methods for preparation of proteins and protein complexes that regulate the eukaryotic cell cycle for structural studies*. Methods Mol Biol, vol. 296, pages 219–235, 2005.
- [Welburn *et al.* 2007] Julie P I Welburn, Julie A Tucker, Tim Johnson, Lisa Lindert, Marc Morgan, Antony Willis, Martin E M Noble and Jane A Endicott. *How tyrosine 15 phosphorylation inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2-cyclin A*. J Biol Chem, vol. 282, no. 5, pages 3173–3181, Feb 2007.
- [Whitty & Kumaravel 2006] Adrian Whitty and Gnanasambandam Kumaravel. *Between a rock and a hard place?* Nat Chem Biol, vol. 2, no. 3, pages 112–118, Mar 2006.
- [Wienken *et al.* 2010] Christoph J Wienken, Philipp Baaske, Ulrich Rothbauer, Dieter Braun and Stefan Duhr. *Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis*. Nat Commun, vol. 1, page 100, 2010.
- [Yeh *et al.* 1978] T. F. Yeh, R. S. Pildes and H. V. Firor. *Mercury poisoning from mercurochrome therapy of an infected omphalocele*. Clin Toxicol, vol. 13, no. 4, pages 463–467, 1978.
- [Yung *et al.* 2007] Yuval Yung, Janice L Walker, James M Roberts and Richard K Assoian. *A Skp2 autoinduction loop and restriction point control*. J Cell Biol, vol. 178, no. 5, pages 741–747, Aug 2007.
- [Zeghouf *et al.* 2005] M. Zeghouf, B. Guibert, J-C. Zeeh and J. Cherfils. *Arf, Sec7 and Brefeldin A: a model towards the therapeutic inhibition of guanine nucleotide-exchange factors*. Biochem Soc Trans, vol. 33, no. Pt 6, pages 1265–1268, Dec 2005.
- [Zillner *et al.* 2012] Karina Zillner, Moran Jerabek-Willemsen, Stefan Duhr, Dieter Braun, Ger- not Längst and Philipp Baaske. *Microscale thermophoresis as a sensitive method to quantify protein: nucleic Acid interactions in solution*. Methods Mol Biol, vol. 815, pages 241–252, 2012.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gunnar Weninger
Geburtsdatum: 05.10.1979
Geburtsort: Hamburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Werdegang

seit Dez. 2007 Promotion an der Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Biophysikalische Chemie, AG Prof. Dr. D.J. Manstein und Institut für Molekularbiologie, AG Prof. Dr. N.P. Malek

- Juli 2007 Diplom an der Leibniz Universität Hannover, Institut für Biophysik, AG PD Dr. C. Zeilinger; Thema: Untersuchungen temperaturabhängiger Struktur- und Funktionsänderungen von Ionenkanälen.

Okt. 2001 - Juli 2007 Studium der Biochemie an der Medizinische Hochschule Hannover und der Leibniz Universität Hannover
Wahlfächer: Biophysikalische Chemie, Humanphysiologie

Juli 2000 - April 2001 Wehrdienst

- April 2000 Abitur am Amandus-Abendroth-Gymnasium in Cuxhaven