

# **Massenspektrometrie-basierte Hochdurchsatz-Protein-Liganden Bindungsassays**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) von der Fakultät  
für Chemie der Universität Dortmund angenommene

## **Dissertation**

**Von Diplom-Biochemikerin  
Kerstin Reinecke  
Aus Nürnberg**

Dekan:

1. Gutachter: Prof. H. Waldmann

2. Gutachter: PD H. Prinz

Tag der mündlichen Prüfung



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund in der Zeit vom Juli 2001 bis Juli 2004 angefertigt.





# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	1
1.1	Massenspektrometrie und Hochdurchsatzassays .....	2
1.1.1	Matrix-assistierte-Laserdesorption-Ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitrohr (MALDI-TOF) .....	2
1.1.2	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) .....	4
1.1.3	MALDI-Massenspektrometrie-Bindungsassay .....	5
1.1.4	Bindungsstudien mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie (HPLC-MS).....	9
1.1.5	Gelfiltrations-Assays .....	12
1.2	Protein-Liganden Systeme .....	14
1.2.1	Streptavidin .....	14
1.2.2	Ras Protein .....	14
1.2.3	E. coli Guanylatkinase.....	16
1.2.4	Farnesyltransferase: Eine Protein-Prenyltransferase.....	17
1.2.5	Cdc25a.....	18
1.3	Zielsetzung .....	20
2	Materialien und Geräte .....	23
2.1	Material .....	23
2.1.1	Verbrauchswaren.....	23
2.1.2	Chemikalien .....	23
2.2	Geräte .....	24
2.3	Lösungen .....	25
2.4	Plasmide und Bakterienstämme .....	27
3	Methoden.....	29
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	29
3.1.1	Rekonstitution von DNA aus Filterpapier.....	29
3.1.2	Elektrotransformation.....	29
3.1.3	Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (“Mini-Präp”).....	29
3.1.4	Restriktion von Plasmid-DNA (Testrestriktion.....	30
3.1.5	Agarosegelelektrophorese .....	30
3.1.6	Sequenzieren .....	30
3.2	Proteinchemische Methoden .....	31
3.2.1	Proteinmengenbestimmung nach Bradford.....	31
3.2.2	Proteinbestimmung mit BCA (Bicinchoninsäure) .....	31
3.2.3	Proteinexpression und Aufreinigung.....	31
3.2.3.1	Farnesyltransferase.....	31
3.2.3.2	Farnesyltransferase.....	32

---

3.2.3.3	Nukleotidkinasen.....	32
3.2.3.4	Cdc25a.....	33
3.2.4	Aktivitätstests .....	34
3.2.4.1	Nukleotidkinasen.....	34
3.2.4.2	Cdc25a Enzym-Assay .....	35
3.2.5	SDS-Gele.....	36
3.2.5.1	Nach Schägger.....	36
3.2.5.2	Nach Laemmli .....	36
3.2.6	Tryptischer Verdau im Gel und in Lösung.....	37
3.2.7	Untersuchung der tryptischen Fragmente in der Nano-Elektrospray-Massenspektrometrie.....	38
3.2.8	Untersuchung der tryptischen Fragmente mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie	39
3.3	Methoden Elektrospray-Assay .....	39
3.3.1	Kopplung von Protein an POROS EP .....	39
3.3.2	Kontrolle der Immobilisierung mit SDS-Page.....	40
3.3.3	Befüllen der Säulen .....	40
3.3.4	Durchführung der Bindungsstudien .....	40
3.3.5	High-Throughput Gelfiltrations-Liganden-Protein-Bindungstests .....	41
3.3.6	Quantifizierung der Gelfiltrations-Bindungstests .....	41
3.3.7	Speed Screen .....	41
3.4	MALDI-Assay.....	42
3.4.1	Immobilisierung .....	42
3.4.1.1	Goldplatten .....	42
3.4.1.2	Blattgold .....	42
3.4.1.3	Mit Poly-L-Lysin beschichteter Laserdruckerfolie .....	42
3.4.1.4	Nitrocellulose .....	43
3.4.2	Bindungstest .....	43
3.4.2.1	Goldträger-DTSP .....	43
3.4.2.2	Blattgold-MPA .....	43
3.4.2.3	Auf Nitrocellulose .....	44
3.4.2.4	Laserdruckerfolie .....	44
3.4.2.5	MALDI-Messungen mit den selbsthergestellten Trägern .....	45
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Proteinexpression .....	47
4.1.1	Mononukleotid-Kinasen.....	47
4.1.2	Farnesyltransferase.....	48
4.1.3	Cdc25a.....	49
4.1.4	Enzymatischer Assay Cdc25a .....	52
4.2	MALDI-Assay.....	56
4.2.1	Matrix und Matrixauftrag.....	56
4.2.2	Immobilisierung auf Gold .....	61

---

4.2.2.1	DTSP-Methode.....	61
4.2.2.2	Mercaptopropionsäure.....	69
4.2.2.3	Immobilisierung auf Nitrocellulose .....	77
4.2.2.4	Immobilisierung auf Laserdruckerfolie.....	80
4.3	HPLC-MS-Assay .....	87
4.3.1	Testen der Beladung des POROS-EP mit Protein.....	87
4.3.2	Eluierung durch Denaturierung.....	88
4.3.2.1	Streptavidin-Biotin .....	88
4.3.2.2	Farnesyltransferase-Bisubstrat-Inhibitoren .....	93
4.3.2.3	Ras: GTPase Aktivatoren .....	95
4.3.3	Eluierung durch Verdrängung.....	98
4.3.3.1	Guanylatkinase: Nukleotide .....	98
4.3.3.2	Ras: Nukleotide .....	102
4.3.4	Frontale Affinitätschromatographie gekoppelt mit ESI-MS.....	105
4.3.4.1	Packung der Säule .....	105
4.3.4.2	Cdc25A-Phosphatase-Inhibitoren .....	106
4.3.4.3	Phosphatase-Inhibitoren der AF-Reihe .....	116
4.3.4.4	Das „Sterben“ der Säule bei Cdc25a.....	121
4.4	Die Löslichkeit der eingesetzten Substanzen.....	123
4.5	Gel-Filtrations-Assays.....	128
4.5.1	Gelfiltrationsassay nach S. Sauer .....	128
4.5.2	Speed Screen .....	144
5	Diskussion.....	147
5.1	MALDI-TOF Bindungsassay .....	147
5.1.1	Immobilisierung auf Goldträgern und Blattgold.....	147
5.1.2	Immobilisierung auf Nitrocellulose .....	150
5.1.3	Immobilisierung auf Laserdruckerfolie.....	151
5.1.4	Bewertung der Immobilisierungstechniken und Proteinarrays für eine MALDI-TOF-basierten Bindungsassay.....	153
5.2	ESI-Assay.....	154
5.2.1	Verdrängung der Liganden durch Denaturierung .....	154
5.2.1.1	Streptavidin .....	154
5.2.1.2	Farnesyltransferase.....	154
5.2.1.3	Ras-GTPase-Aktivatoren .....	155
5.2.1.4	Guanylatkinase .....	156
5.2.1.5	Ras-Nukleotide.....	156
5.2.2	Frontale Affinitätschromatographie .....	159
5.2.3	Gelfiltrationsassay .....	163
5.2.3.1	Gelfiltrationsassay nach Sauer .....	164
5.2.3.2	Speed Screen .....	167
5.2.4	Löslichkeit und promiske Inhibitoren .....	167

5.2.5	Zusammenfassung von FAC-MS, Gelfiltrationsassay nach Sauer und Speed Screen	171
6	Zusammenfassung.....	173
7	Literatur.....	177

Anhang

Danksagung

Lebenslauf

---

# Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
Cdc25a	Cyclin dependent cyclase 25a
$\alpha$ CHCA	$\alpha$ -Cyanohydroxyzimtsäure
(k)Da	(Kilo-)Dalton
DHB	Dihydrobenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrol
DTSP	Dithiobis(succinimdypropionat)
DTT 1,4	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDC	N-Ethyl-N'-(3-(dimethyl)aminopropyl)carbodiimid
ESI	Electrospray Ionisation
FTase	Farnesyltransferase
LB	Luria Berani
MALDI-TOF	Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation-Flugzeitrohr (time of flight)
ME	Mercaptoethanol
MPA	Mercaptopropionsäure
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NP 40	Nonphenylpolyethylenglycol
NPP	para-Nitrophenolphosphat
PEG	Polyethylenglycol
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RBD	<i>Ras binding domain</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen



# 1 Einleitung

Im vergangenen Jahrzehnt wurde die pharmazeutische Forschung von einem Goldrausch erfasst. Immer neue natürliche oder synthetische Stoffe, die in Flora und Fauna entdeckt wurden oder in den Archiven großer pharmazeutischer oder chemischer Unternehmen schlummerten werden wie glänzende Nuggets behandelt. Man entdeckte – häufig nur zufällig – die Wirksamkeit dieser Substanzen, so etwa an den Schaltstellen in den Signaltransduktionswegen tierischer Zellen. Diese Schaltstellen in Gestalt von Enzymen regeln so sensible Bereiche wie die Zellproliferation, sprich das Zellwachstum und die Zellteilung. Eine Fehlfunktion in der Zellproliferation führt zur unkontrollierten Vermehrung der Zelle, der Entwicklung eines Krebstumors. Wirksame Substanzen können zudem als Leitstrukturen dienen, um Substanzbibliotheken zu erstellen, deren Mitglieder noch effektiver die Enzyme beeinflussen.

Zunächst müssen diese Verbindungen ausgewählt werden. Wie soll eine Vorauswahl aus der Vielzahl von neuen, möglicherweise medizinisch relevanten Substanzen getroffen werden? Wie kann man aus der großen Menge der durch kombinatorische Chemie entstandenen Produkte Inhibitoren für Krebsregulatoren finden. Eine unabdingbare Voraussetzung für die Funktion einer Substanz, z.B. eine Inhibition, ist die Bindung an das Zielprotein. Dieser Umstand ist ein erstes Auswahlkriterium für die Nützlichkeit (und damit weitere Untersuchung) des Stoffes. Massenspektrometrie ist schon über einen längeren Zeitraum eine wesentliche Methode für die Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen nach der Synthese im Hochdurchsatzmaßstab (High Throughput Screening, HTS). [1,2, 3, 4]

Das einfachste System, um einen Bindungsassay durchzuführen, wäre ein Chip-basierendes System. Das Zielprotein ist an die Oberfläche des Chips kovalent gebunden, und nicht-kovalentbindenden Moleküle können in geeigneter Art und Weise detektiert werden. Die bisherigen Methoden zeigten die gebundenen Substanzen nur indirekt, z.B. über Fluoreszenz [5, 6] oder Radioaktivität. In der Methode der vorliegenden Arbeit würden die Verbindungen direkt im Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation-Flugzeitrohr (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight, MALDI-TOF)-Massenspektrometer sichtbar gemacht. So würde direkt kontrollierbar, ob es sich wirklich um die eingesetzte Substanz handelt. Derartige Systeme sind bereits in der Literatur beschrieben. Ihr Aufbau wird in Kapitel 1.1.3 und 1.3 näher beschrieben.

Ein weiteres System zur raschen Detektion von Liganden ist ein Durchflusssystem. Die Liganden werden dem kovalent an ein Trägermaterial gebundenen Protein im Fluss angeboten. Nicht-gebundener Ligand wird weggespült und detektiert. Gebundener Ligand könnte nach Elution mit geeigneten Elutionsmitteln gemessen werden. Ein derartiges System ließe sich mit HPLC gekoppelten ESI-MS verwirklichen. Auch hierzu existieren bereits Arbeiten, die in Kapitel 1.1.4 und 1.3 vorgestellt werden.

## 1.1 MASSENSPEKTROMETRIE UND HOCHDURCHSATZASSAYS

Die Massenspektrometrie begann mit den Forschungen von Sir J.J. Thomson am Cavendish Labor der Universität von Cambridge, die zur Entdeckung des Elektrons 1897 führten. Im ersten Jahrzehnt des 20. Jahrhunderts baute Thomson das erste Massenspektrometer, das damals Parabol spectrograph genannt wurde, um die Masse-zu-Ladung-Relationen von Ionen feststellen zu können [7, 8, 9]. Ionen, die in Entladungsröhren erzeugt wurden, wurden in elektrische und magnetische Felder geleitet, die die geladenen Teilchen in eine parabelförmige Flugbahn lenkten. Die Strahlen wurden auf Fluoreszenzschirmen oder Photoplatten detektiert. Den Nobelpreis für Physik erhielt Thomson 1906 für seine Arbeiten über die Leitung der Elektrizität in Gasen. In den nächsten Jahren wurde die Massenspektrometrie-Technik immer weiter entwickelt.

Das Konzept der Flugzeitrohr-Massenspektrometrie wurde 1946 von W.E. Stephens an der Universität von Pennsylvania vorgestellt. [10] Im Flugzeitrohr-Analysator werden die Ionen durch ihre unterschiedlichen Geschwindigkeiten getrennt, während sie auf einem geraden Weg zu einem Kollektor gemäß ihrer steigenden Masse-zu-Ladung-Relation fliegen. Die ersten Flugzeitrohr-Instrumente wurden gegen Ende der vierziger Jahre des 20. Jahrhunderts gebaut. [11, 12]

Bis in die achziger Jahre des selben Jahrhunderts bereiteten große und kleine Biomoleküle (wie Proteine und Peptide) Probleme bei der massenspektrometrischen Analyse: Bei den herkömmlichen Ionisierung bzw. Vaporisationstechniken kommt es zur Dekomposition oder auch Fragmentierung dieser Moleküle. Ebenfalls ist die Messbarkeit schlecht. Ein bedeutender Fortschritt gelang mit der Verwendung so genannter „weicher Ionisierungs-Methoden“, wie die Elektrospray-Ionisierung (ESI) und die Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisierung (MALDI) in der massenspektrometrischen Analyse von Proteinen und Peptiden.

### 1.1.1 Matrix-assistierte-Laserdesorption-Ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitrohr (MALDI-TOF)

Die MALDI, Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie, wurde in der heute verwendeten Form erstmals 1987 von Karas/Hillenkamp vorgestellt. [13] Für die Ionisierung wird die Probe etwa 1000-10000fach in Matrixlösung verdünnt auf einen metallischen Probenhalter aufgetragen. Bei der Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zur Kokristallisation von Matrix und Probe. Die Matrix-Moleküle können bei der Wellenlänge im UV-Bereich die Energie des Lasers absorbieren, etwa über  $\pi$ -Elektronensysteme. Durch einen intensiven Laserimpuls kommt es der Theorie nach zu einem explosionsartigen Übergang der Matrixmoleküle in die Gasphase. Dabei werden auch Probenmoleküle mitgerissen. Durch die photoionisierten, radikalischen Matrixmoleküle sollen die Probenmoleküle durch Photonentransfer ionisiert werden. Die entstandenen Ionen werden in einem starken elektrischen Feld (20 kV) auf ein einheitliches elektrostatisches Potential beschleunigt und können dann im Flugrohr fliegen bis sie auf einen Detektor in Gestalt eines Sekundärelektronenvervielfachers treffen. Durch das elektrische Feld erhalten die Ionen die kinetischen Energie  $E_{kin}$ , die definiert ist durch:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = zeU,$$



wobei  $m$  die Masse des Ions ist,  $v$  die Fluggeschwindigkeit im Rohr,  $z$  die Ladungszahl des Ions,  $e$  die Elementarladung und  $U$  die angelegte Beschleunigungsspannung. Nach Umstellen erhält man:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{v^2}$$

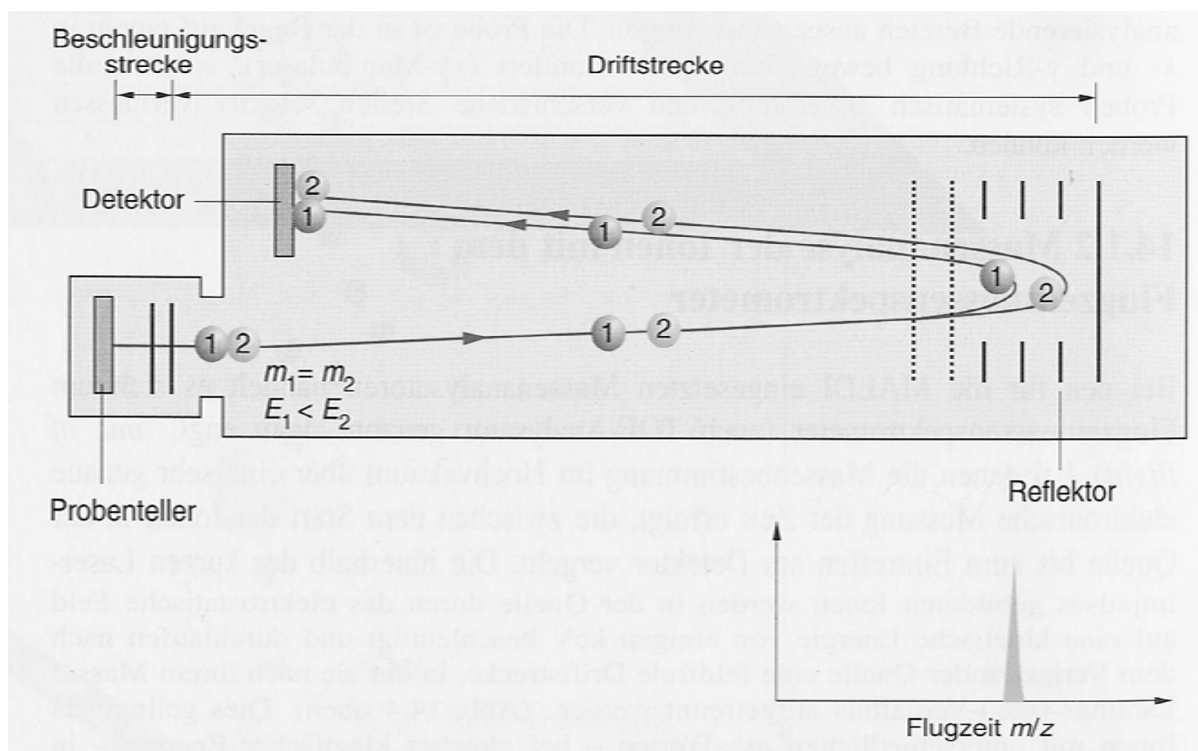
Da  $v$  von der Zeit abhängig ist, lässt sich so leicht aus der Flugzeit  $m/z$  ermitteln, denn kleine Ionen fliegen schneller durch das TOF als größere. Letztlich erhält man so im Spektrometer  $m/z$ . (Das muss bei der Auswertung der Spektren beachtet werden.)

Durch den Einbau eines Reflektors konnte die Auflösung des TOF noch vergrößert werden. Die Auflösung eines Massenanalysators besagt, wie gut Massendifferenzen getrennt voneinander zu detektieren sind. Im Spektrum zeigt sich dies dann bis zu welcher Massendifferenz zwei Massen noch als getrennte Peaks dargestellt werden. Durch einen Reflektor wird die Auflösung erhöht, da er eventuelle Verteilungen der Energie bei gleichschweren Ionen während der Beschleunigung nivelliert.

Die Auflösung wird angegeben durch:

$$R = \frac{m_1}{m_1 - m_2}$$

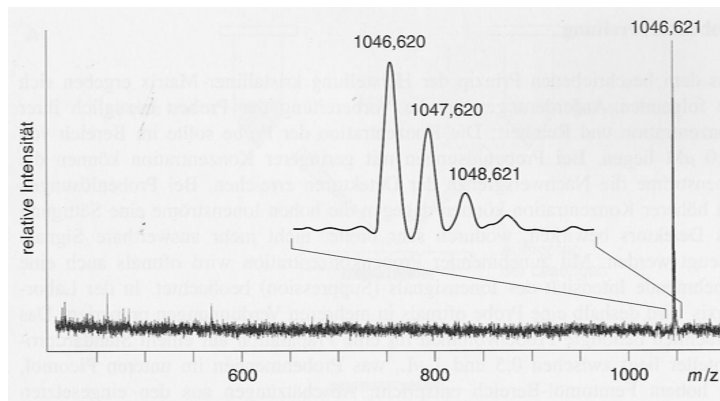
Bei modernen MALDI-TOF-Geräten liegt die Auflösung bis 5000 Da bei etwa 15000. Der Massenbereich liegt von 1Da bis 1000 kDa. [14]



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Flugzeitrohrs mit Reflektor eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (MS). [14]

Die charakteristischen Mehrfachpeaks einer Masse im kleineren  $m/z$  Bereich werden durch die Isotopenverteilung der im Molekül befindlichen Atome hervorgerufen. Bei z.B. Kohlenwasser-

stoffen sind dies  $^{13}\text{C}$  und  $^{14}\text{C}$ . Sobald ein  $^{13}\text{C}$  im Molekül anstatt eines  $^{12}\text{C}$  vorhanden ist, vergrößert sich die Masse um 1 Da. Die Moleküle, die jeweils ein C-Isotop besitzen, bilden dann die Masse +1 m/z.



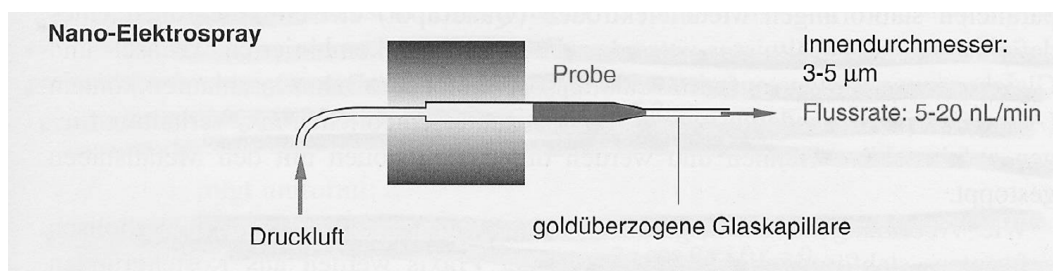
**Abbildung 2:** Spektrum einer MALDI-TOF-MS-Messung mit vergrößertem Isotopenmuster. [14]

### 1.1.2 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Bei ESI-MS werden stark geladene Tröpfchen der Analytlösung aus einer Kapillare in einem elektrischen Feld verteilt (versprüht) und desolvatisiert. Damit ermöglicht diese Ionisationsmethode eine Ionisierung des Analyten ohne ihn zu fragmentieren. Dies ist der Hauptvorteil der ESI gegenüber Ionisationsmethoden wie Laser-Desorption und in noch stärkerem Maß "fast atom bombardement" oder Plasmadesorption, bei denen es zu hochenergetischen Stößen kommt. Bei der Desolvation kommt es zu einem Verdampfen des Lösungsmittels, was zu einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche führt. Diese Erhöhung löst einen Zerfall in Mikrotröpfchen aus (Coulumbexplosionen) und endet schließlich in einer Desolvation der Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer. Damit Analytionen in der Lösung vorliegen, muss diese leicht sauer oder leicht basisch sein. Das Einbringen der entstandenen Analytmoleküle in das Hochvakuum der Massenanalysatoren erfolgt über ein Interface. Durch die Potentialdifferenz zwischen Kapillare und Interface werden die Ionen beschleunigt. Das in der Arbeit genutzte ESI-Massenspektrometer LCQ-Deca besitzt zwei Arten von Massenanalysatoren: einen Quadrupol-Analysator und eine nachgeschaltete Ionenfalle. Der Quadrupol-Massenfilter wurde Mitte der fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts von der Forscher-Gruppe um Wolfgang Paul entwickelt. Im Quadrupol wird ein quadrupolares elektrisches Feld (bestehend aus Radiofrequenz und direkter Spannung) zur Trennung der Ionen eingesetzt. Sobald ein bestimmtes Feld angelegt ist, können nur Ionen mit bestimmten m/z-Werten, das Feld oszillierend durchqueren, ohne dass die Ionen auf die Wände des Analysators prallen. Die Ionenfalle arbeitet auch nach dem Prinzip des Quadrupolmassenfilters, allerdings beschreiben die Ionen Kreisbahnen in der Ionenfalle, wodurch bestimmte m/z in der Ionenfalle "gefangen" werden können. Das ermöglicht dann eine Tandem-MS-Messung. Im Tandem MS (auch MS/MS genannt) wird ein Eltern-Ion durch seine Masse selektiert und durch „Kollisions-induzierte Dissoziation“ fragmentiert. Die Massen der entstehenden Ionen werden bestimmt. Die Kombination milder Ionisationsbedingun-

gen und Tandem MS sind ideal für die Analyse von Mischungen und ist besonders geeignet für die Sequenzanalyse von Peptiden. Denn durch die Festlegung einer bestimmten Fragmentierungsenergie brechen die Peptide an einer definierten Stelle der Peptidbindung. Diese Technik wurde in den 1960ern von Malcolm Dole theoretisch entwickelt, jedoch erst in den 1980ern von John B. Fenn praktisch genutzt [15].

Verfeinert wurde die Elektrospraytechnik durch die Nanospraymethode. Durch eine sehr feine gezogene vergoldete Glaskapillare ist es möglich eine Flussrate von 5 bis 20 nL/min zu erreichen.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Aufbaus einer Nanospray-Apparatur. [14]

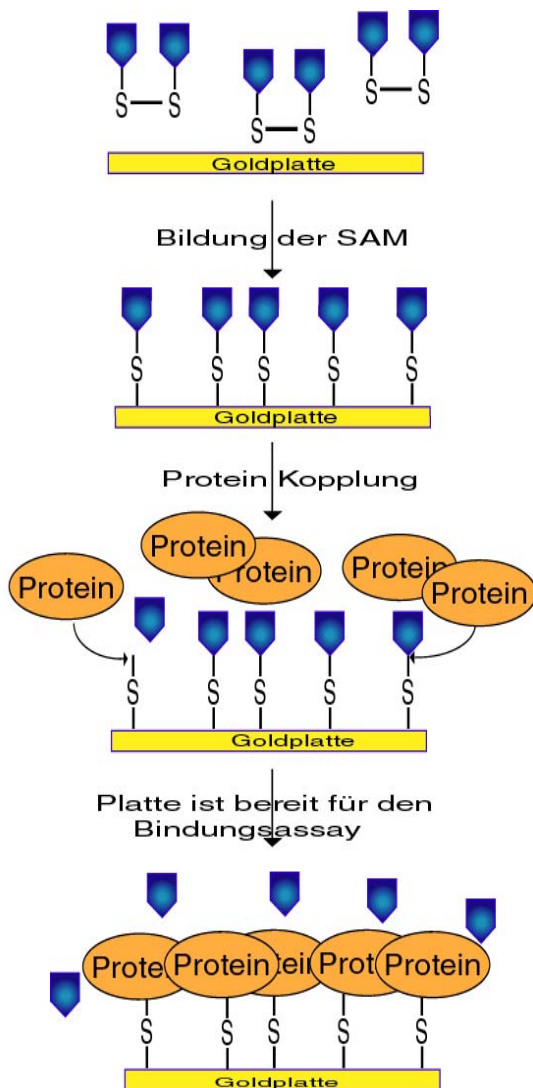
### 1.1.3 MALDI-Massenspektrometrie-Bindungsassay

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde bereits zur Untersuchung von Protein-Liganden-Bindung eingesetzt. Das Messen von gebundenen Liganden im MALDI als Ergänzung zur Analyse mit Oberflächen-Plasmonresonanz („surface plasmon resonance“, SPR) konnte in einigen Arbeiten präsentiert werden. [16, 17] Nach der Durchführung des klassischen SPR-Experiments mit einem Liganden wird dieser Ligand direkt auf dem Biacore-Chip im MALDI detektiert. Dies wird entweder als Beweis für das Vorhandensein des verwendeten Liganden ausgenutzt oder zur Identifikation von störenden Substanzen eingesetzt. Allerdings werden keine Kontrollen zur unspezifischen Bindung gezeigt.

Auch ein Immunoassay mit indirekter MS-Analyse wurde bereits etabliert. [18] Dabei erfolgt der Bindungstest in einer mit Affinitätsmaterial gefüllten Pipettenspitze. Die Elution der Liganden erfolgte direkt in die MALDI-Matrix. Jedoch ist diese Art von Bindungstest umständlich. Einfacher ist es das Protein an einer MALDI-kompatiblen Oberfläche zu immobilisieren, und diese nach der Durchführung der Bindungstests direkt in das MALDI-Gerät zur Messung zu überführen. In einer neueren Variante, dem so genannten MALDI-MES (MALDI-mass spectrometry assisted enzyme-screening), wird die enzymatische Aktivität mit einer im MALDI detektierbaren Massenveränderung bestimmt. [19]

Als Träger für das immobilisierte Protein wurden auswechselbare goldbeschichtete Platten des Herstellers des Voyager DE Pro (das MALDI-Massenspektrometer), Applied Biosystems, eingesetzt. Diese Platten passen in das Probenträgersystem dieser Firma für ihr Massenspektrometer. Für die Kopplung an die Goldoberfläche der Platten wurde der „self assembled monolayer“ (SAM)-Effekt von funktionalen Thiolen verwandt (siehe Abbildung 2). Bei diesem Effekt

kommt es zu einer Selbstorganisation der Moleküle aus einer Lösung heraus an die Oberfläche. Die Goldoberfläche wird gleichmäßig mit den Thiolen bedeckt, wobei die Thiolfunktion sich zur Goldoberfläche hin ausrichtet, um daran kovalent zu binden, während weitere funktionelle Gruppen des Moleküls frei stehen und damit für die Bindung von z.B. Proteinen zugänglich sind.



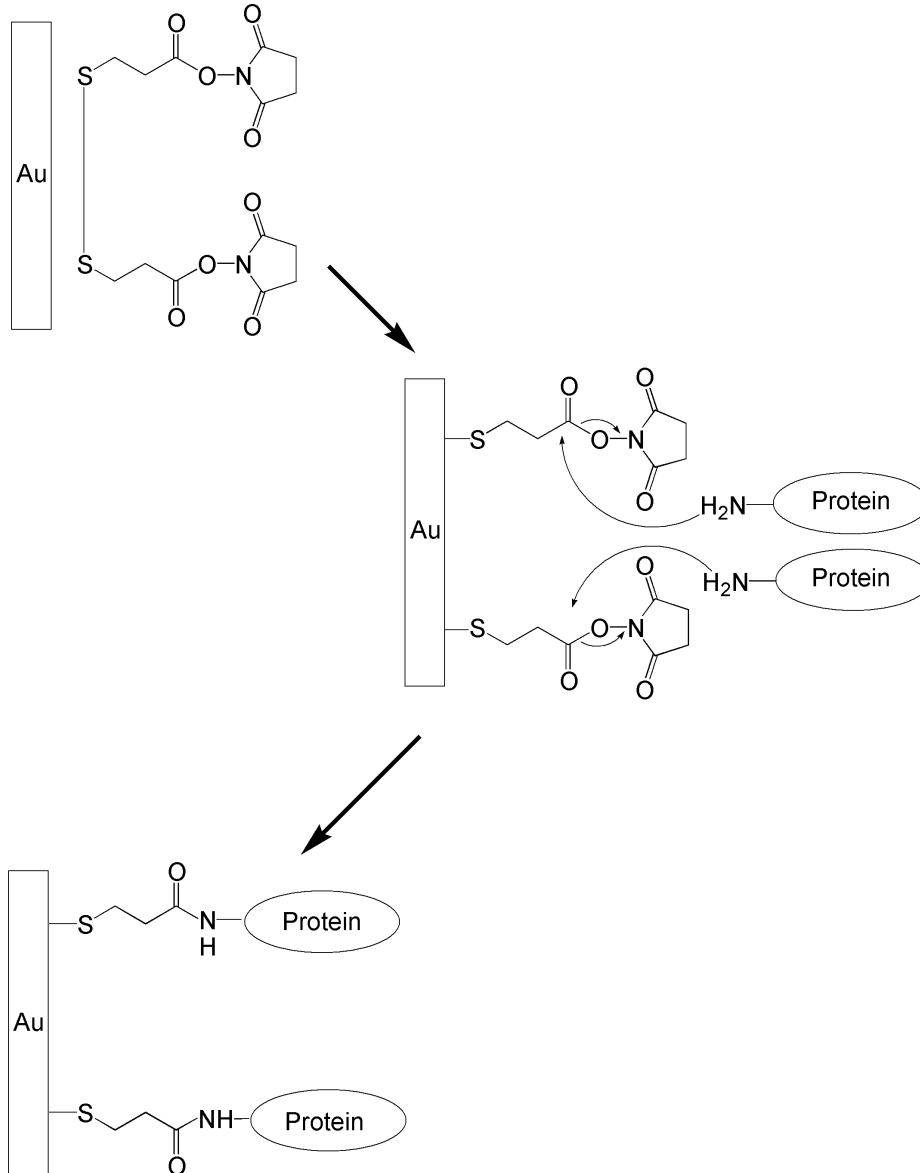
**Abbildung 4:** Prinzip der Kopplung von Protein an Goldoberflächen. Nach Ausbildung der selbstorganisierenden einlagigen Schicht („self-assembled monolayer“, SAM) wird das Protein mit der Aminogruppe seines N-Terminus über die reaktive Gruppe des kovalent gebundenen Moleküls an die Goldoberfläche immobilisiert.

Im hiesigen Ansatz wurde die Arbeit von mehreren Gruppen weiterverfolgt, die die Bildung von SAMs von Thiolen an Goldoberflächen zur Proteinimmobilisierung. Als Reagenz wurde zunächst DTSP (Dithio-bis-[succinimidylpropionsäure]) verwendet, dessen Thiol-Gruppe kovalent an die Goldoberfläche bindet und mit seiner Succinimidfunktion eine Reaktionsmöglichkeit für den N-Terminus der Proteine anbietet (siehe Abbildung 3).

Nachdem die kovalente Bindung von Proteinen an Goldelektroden durch Katz erstmalig beschrieben wurde, [20] wurde DTSP bereits zur Immobilisierung von Protein für einen mas-

senspektrometrischen Affinitäts-Assay eingesetzt. [21, 22, 23] Das immobilisierte Protein kann nun den zu testenden Substanzen ausgesetzt werden. Nach der Bindung werden ungebundene Liganden abgewaschen und das Protein mit der MALDI-Matrix denaturiert. Dadurch wird der gebundene Ligand aus dem Protein gelöst und ist im MALDI nachweisbar.

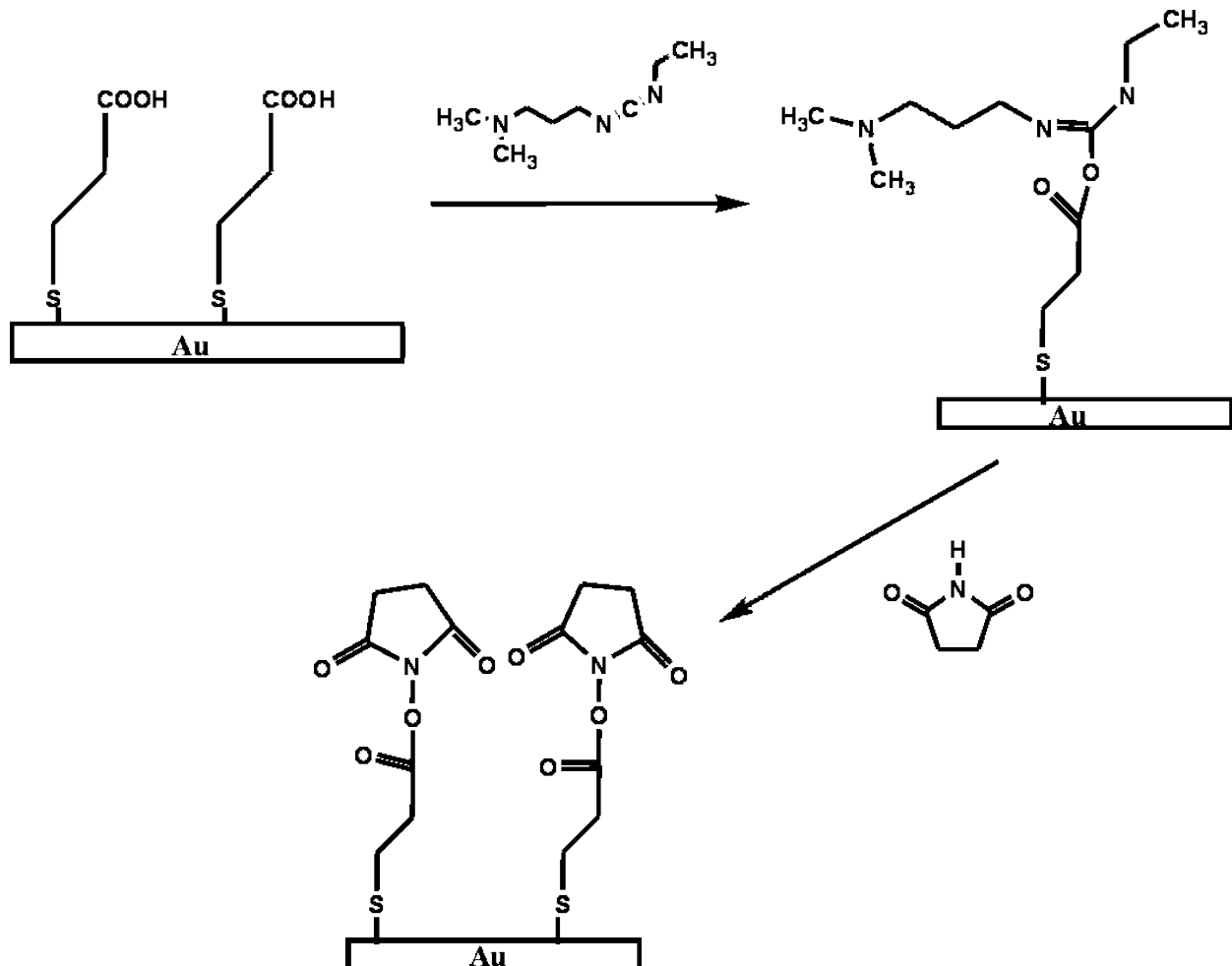
Die Avidin/Biotin-Interaktion wurde bereits in einer MALDI-Massenspektrometrie basierten Analyse von Liganden eingesetzt. [24] Aufgrund der hohen Affinität des Biotins an Avidin/Streptavidin ( $K_D = 10^{-8}$ ) [14] und den vier Bindungsstellen für Biotin pro Proteinmolekül ist ein gutes Signal in der Massenspektrometrie zu erwarten.



**Abbildung 5:** Reaktionsschema der Kopplung von Proteinen an Gold über Dithiobis-(succinimidylpropionat) (DTSP). Die Disulfidbrücke des DTSP bricht an der Goldoberfläche auf und die Schwefelgruppen binden kovalent an das Gold. Die Aminogruppen der N-Termini der Proteine reagieren mit der Succinimidylgruppe zu einer Amidbindung. Das Protein ist dadurch kovalent an die Oberfläche

Eine weitere Methode zur Kopplung an Goldoberflächen über SAM-Bildung ist die Funktionalisierung der Oberfläche mit Mercaptopropionsäure und anschließender Aktivierung der Carbon-

säuregruppe mit N-Hydroxysuccinimid in Anwesenheit wasserlöslicher Carbodiimide, wie N-Ethyl-N'-(3-(dimethyl)aminopropyl)carbodiimid (EDC). [25, 26, 27, 28, 29]



**Abbildung 6:** Reaktionsschema der Kopplung von Proteinen an Gold über Mercaptopropionsäure (MPA). Die Schwefelgruppe der MPA bindet kovalent unter der Bildung eines „single monolayers“ (SAM) an das Gold. Die Carboxylgruppen werden einer gekoppelten Reaktion von N-Ethyl-N'-(3-(dimethyl)aminopropyl)carbodiimid EDC und N-Hydroxysuccinimid (NHS) zu Succinimidylresten funktionalisiert. Die Amingruppen der N-Termini der Proteine reagieren mit der Succinimidylgruppe zu einer Amidbindung. Das Protein ist dadurch kovalent an die Oberfläche gebunden.

Der N-Terminus des zu immobilisierenden Proteins kann nun wie beim DTSP-SAM mit der so entstandenen N-Hydroxysuccinimidfunktion zu einer kovalenten Bindung reagieren (siehe auch Abbildung 4)

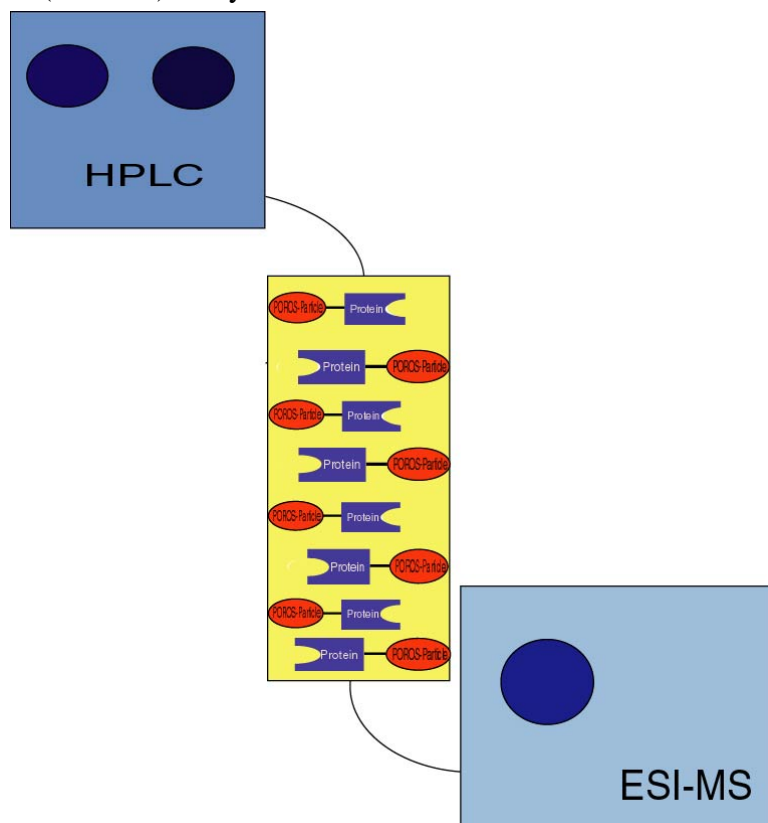
Ferner wird nach neuen Oberflächen für die Probenaufgabe in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie und deren Anwendung in einem Affinitätsassay gesucht. Bereits beschrieben wurde die Verwendung von Streptavidin beschichteten Deckgläschen für die Anreicherung und anschließende Detektion von Mikroorganismen. [30] Für diesen Zweck werden auch Affinitätsmembranen eingesetzt, die auf den Stahlprobenträger geklebt werden. [31]

In dieser Arbeit wurden neben vergoldeten Metallplatten, die Eignung einer weiteren Oberfläche für die MALDI-Messung überprüft, und zwar Laserdrucker-Folien. Diese Folien können bedruckt und danach vergoldet werden. Nach der Vergoldung könnten Proteine an diese Oberfläche über Thiol kovalent gebunden werden.

Weiter besteht die Möglichkeit, das Protein direkt an die unvergoldeten Folien zu koppeln. [32] In dieser Arbeit wird genau dieser Weg erstmals in Bezug auf für die Messung im MALDI-TOF bestimmte Oberflächen beschritten. Eine direkte Messung im MALDI von an Nitrocellulose gebundenen Antikörpern mit ihren Liganden wurde bereits beschrieben. [33] Jetzt sollen erstmals kleine Liganden an das auf Nitrocellulose absorbierte Protein binden und detektiert werden.

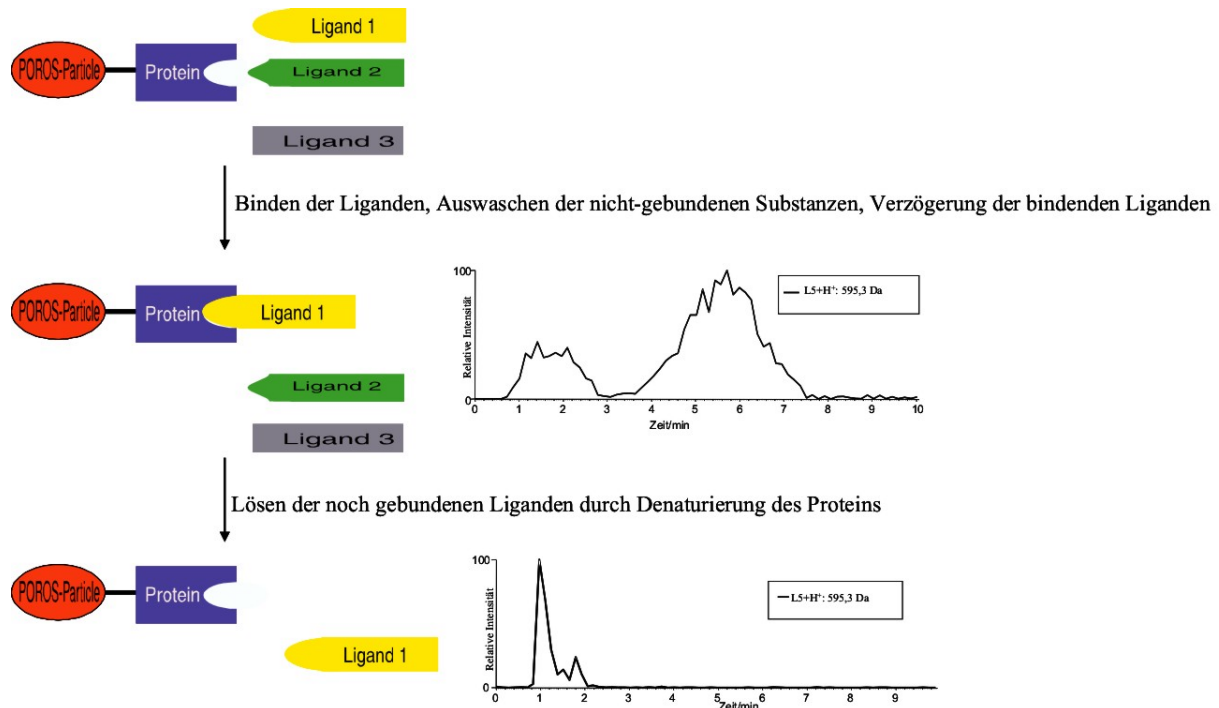
#### 1.1.4 Bindungsstudien mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie (HPLC-MS)

In diesem Verfahren wird ein Durchfluss-System eingesetzt: Der Assay wird nach zwei unterschiedlichen Prinzipien aufgebaut. Mit dem ersten Prinzip soll besonders affine Binder untersucht werden. Nachdem das Protein an einem Trägermaterial immobilisiert wurde, kann mit diesem modifizierten Trägermaterial eine Säule befüllt werden und diese in einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, high pressure liquid chromatography) eingesetzt werden. Die in Wasser gelösten Substanzen werden dem Protein im Fluss zur Bindung angeboten. Überschüssige Liganden werden wegspült, gebundener Ligand mit einem geeigneten Elutionsmittel vom Protein gelöst und in einem Ionenfallenmassenspektrometer mit Elektrosprayquelle (ESI-MS) analysiert.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des HPLC-Elektrospray-Massenspektrometrie-Systems zum Testen von Protein-Liganden-Bindung wie in dieser Arbeit verwendet.

Die Detektion der nicht-gebundenen und wieder freigegebenen Liganden im Massenspektrometer erlaubt eine einfache Unterscheidung der Substanzen anhand der Massen. Es ist somit keine weitere Markierung der zu untersuchenden Verbindungen nötig. Mit diesem Verfahren können auch Mischungen untersucht werden. Einzige Voraussetzung ist, dass die Liganden unterschiedliche Massen besitzen.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des Ablaufs des Assays, dem immobilisierten Protein werden verschiedene mögliche Liganden in einer Mischung zum Binden angeboten (obere Abbildung). Nur ein für das Protein affiner Ligand bindet das immobilisierte Protein. Der Ligand wird durch Denaturierung des Proteins wieder freigesetzt.

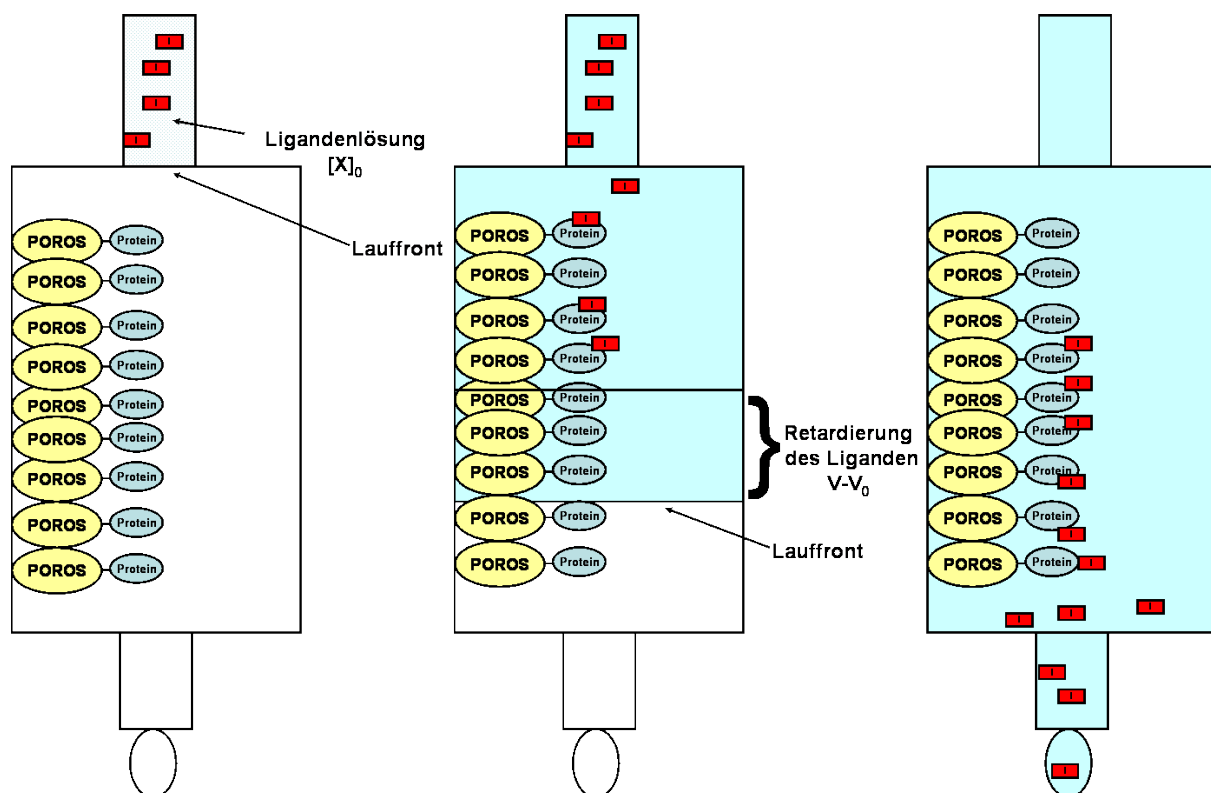
Ähnliche Assays arbeiten z.B. mit einer Trennung der Protein-Liganden-Bindung durch gepulste Ultrafiltration und nachfolgende Analyse der Liganden durch ESI-MS. [34] Dabei erfolgt eine Abtrennung des Protein-Liganden-Komplexes durch eine Membran, die das Protein nicht passieren kann, von ungebundenen Substanzen. Durch ein organisches Lösungsmittel wird das Protein denaturiert und die Liganden freigesetzt. Diese können die Membran wieder passieren und werden direkt im ESI-MS detektiert. In einem anderen System erfolgt die Trennung des Protein-Liganden-Komplexes vom ungebundenen Liganden durch eine Avidinsäule. [35] In zwei weiteren Systemen wurden Liganden an eine Affinitätssäule gebunden und Proteine zur Bindung angeboten.[36, 37]

Eine in dieser Arbeit verwendete weitere Alternative zur Untersuchung von schwächer bindenden Liganden ist die „frontal affinity chromatography“ (FAC) in Kombination mit Massenspektrometrie, wie sie von Schriemer et al. durchgeführt wurde. [38, 39, 40] Hier wurde das Protein nach seiner Biotinylierung an eine Avidin-Affinitätssäule gebunden und dem immobili-



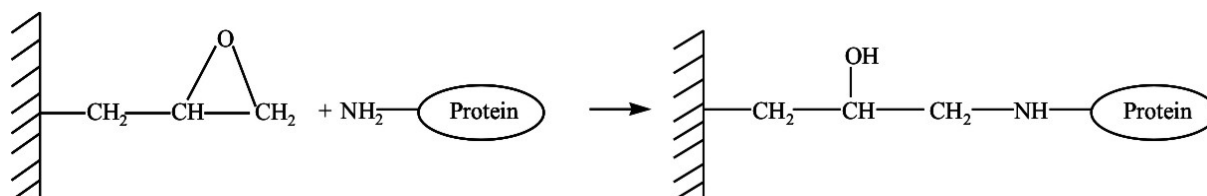
sierten Protein Substanzen im Durchfluss zur Bindung angeboten. Die Verzögerung gebundener Liganden gegenüber nicht-gebundenen Substanzen im Durchfluss wurde durch Detektion mit ESI-MS bestimmt. Auch bei weiteren Protein-Liganden-Systemen wurde die FAC gekoppelt mit ESI-MS erfolgreich eingesetzt, unter anderem für die Untersuchung von Galektinen [41], von Lektinen [42], von Bindern des  $\beta$ -Östrogenrezeptors [43] und von Inhibitoren des Epidermal Growth Factors. [44] Dabei zeigte das System seine Eignung im Einsatz bei Bindungsstudien von Naturstoffen. [45] Diese Veröffentlichungen besitzen alle eine Gemeinsamkeit: Es wurden nur sehr gut wasserlösliche Liganden eingesetzt. Dies könnte ein erster Hinweis auf die Limitierung der Methode sein. Ein Vorteil dieses Systems ist die Eignung zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$ , die erstmals von Kasai [41] beschrieben worden, jedoch ohne Kopplung an ein HPLC-MS-System.

In der vorliegenden Dissertation soll die die FAC modifiziert werden. Anstatt der langwierigen fortgesetzten Infusion des Liganden, wird lediglich eine bestimmte Menge Substanz aufgegeben. Dies führt nicht nur zu Einsparungen beim Stoffbedarf, sondern ermöglicht es, die FAC in einem automatisierten System zu verwenden. Abbildung 9 zeigt das Prinzip der FAC, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt werden soll. Der Ligand wird auf eine Säule befüllt mit Protein-beladenen Chromatographiematerial aufgegeben. Die Liganden besetzen die freien Bindungsstellen des immobilisierten Proteins. Nach einer gewissen Zeit löst sich der Ligand wieder vom Protein und wird von der Säule gespült. Durch ESI-MS wird der Ligand im Eluat detektiert.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Ablaufs der frontalen Affinitätschromatographie (frontal affinity chromatography, FAC), nach Kasai. [46]

Als Trägermaterial wird POROS EP 20 verwendet, ein epoxidiertes Perfusionmaterial, an dessen Epoxidgruppen jedes beliebige Protein über seine N-terminale Aminogruppe gebunden werden kann (Abbildung 10). Dieses Material wurde bereits mehrfach für Bindungsstudien und Enzymaktivitätsmessungen durch HPLC eingesetzt, allerdings wurde gebundener bzw. ungebundener Ligand bei diesen Arbeiten nur über UV-Adsorption bestimmt (über die HPLC DAD). [36, 37]



**Abbildung 10:** Reaktionsschema der Proteinkupplung an POROS EP. Die Aminogruppe des N-Terminus des Proteins reagiert mit der Epoxidgruppe des Säulenmaterials zu einer kovalenten Bindung. [49]

Die schlechte Reaktivität des Epoxids mit löslichen Proteinen, gerade bei dem für Proteine optimalen neutralen pH-Werten, verringert die Immobilisierungsrate. Zur Verbesserung der effektiven Immobilisierung wird ein Absorptionsschritt des Proteins an das Material durchgeführt. [50] Durch hohe Salzkonzentrationen wird eine Art Aussalzungseffekt erzielt: Es kommt zu einer Assoziation des Makromoleküls mit der Oberfläche des POROS-Materials durch das Salz, und damit zu einer Erhöhung der effektiven Konzentration der nukleophilen Gruppen des Makromoleküls in der Nähe der Epoxidgruppen.

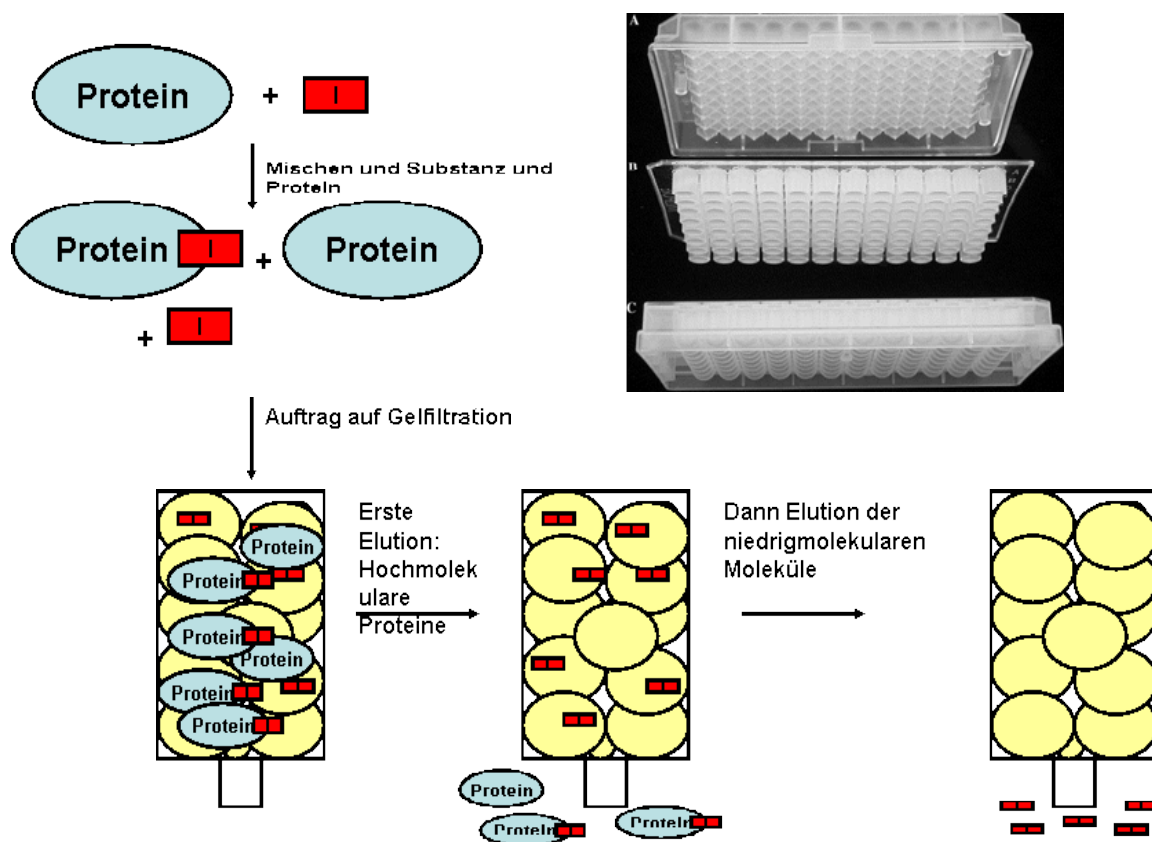
Ein weiterer Ansatz wird in dieser Arbeit aus der Kooperation mit der Arbeitsgruppe Sauer aus Berlin vorgestellt. Ähnlich der gepulsten Ultrafiltration wird hier der freie Ligand vom gebundenen Liganden abtrennt. In diesem Fall geschieht dies durch einen Gelfiltrationsschritt. Zum Vergleich wurden von der Gruppe Mayr/Zehender (Novartis, Basel) einige Messungen mit dem Speed Screen System aufgenommen, das ebenfalls auf der Trennung von gebundenem und freiem Material durch Gelfiltration beruht, wobei allerdings online mit der HPLC-MS gekoppelt ist. Zuvor wurden bereits Online-Systeme mit Größenausschlusschromatographie entwickelt. Blom et al. haben 1999 ein System vorgestellt, in dem eine SEC-Säule in einer HPLC-MS-Anlage vor eine Reverse-Phase-Säule gekoppelt wurde. [51] Allerdings kann mit diesem Aufbau nicht der gleiche Durchsatz erreicht werden, wie im Speed Screen. Aber eine Bestimmung der relativen Dissoziationskonstanten ist möglich.

### 1.1.5 Gelfiltrations-Assays

Schon seit einiger Zeit wurden Größenausschlusschromatographie und Massenspektrometrie zur Überprüfung von Ligandenbindung eingesetzt. [52, 51] In Kooperation mit zwei Arbeitsgruppen ergab sich die Möglichkeit zwei dieser Testverfahren mit den in dieser Arbeit aufgebauten Bindungsassays zu vergleichen.

Der Assay, den die Arbeitsgruppe Sauer vom MPI Berlin entwickelt hat, erfolgt in zwei Schritten: Zunächst werden dem Protein einzeln oder gepoolt Liganden zum Binden angeboten. In

einem ersten Gelfiltrationsschritt wird dann das Protein mit oder ohne gebundenen Liganden von nicht gebundenem Material abgetrennt. Nach dem Prinzip der Gelfiltration tritt zunächst das Protein aus der Säule wieder aus. Die Nichtbinderfraktion wird mit organischem Lösungsmittel eluiert. Das Protein der Proteinfraktion wird zunächst durch Erhitzen denaturiert, wodurch der gebundene Ligand wieder freigesetzt wird. In einem zweiten Schritt wird diese denaturierte Proteinfraktion auf eine weitere Gelfiltrationssäule aufgegeben, wobei der freigesetzte Ligand vom denaturierten Protein getrennt wird und aufgefangen werden kann ("Binderfraktion"). Die Binder- und Nichtbinderfraktion können nun massenspektrometrisch quantifiziert werden. Der gesamte Bindungsassay wird dabei im Mikrotiterplattenformat unter Verwendung eines neuentwickelten Gelfiltrationsmaterials durchgeführt.



**Abbildung 11:** Prinzip des Sauer-Assays und SpeedScreens: Beim Sauer-Assay wird die Proteinfraktion durch Hitze denaturiert und die freigesetzten kleinen Moleküle vom Protein durch eine zweite Gelfiltration abgetrennt. Das Photo rechts oben zeigt die im Assay eingesetzten Mikrotiterplatten mit Einsätzen.

Die Arbeitsgruppe Mayr/Zehender der Novartis AG hat ihr System „Speed Scan“ getauft. [53] In einer Mikrotiterplatten-Vertiefung mit winzigem Durchlass (Well) werden Ligandengemisch und Proteinlösung gemischt. Diese Platte wird auf eine Mikrotiterplatte mit Gelfiltrations(SEC)-material gesetzt, die ebenfalls kleine Durchlässe für die Flüssigkeit besitzt. Unter diese Platte kommt zum Auffangen der Eluate wiederum eine passende Mikrotiterplatte. Durch Zentrifugation wird das Protein-Liganden-Gemisch auf das SEC-Material aufgetragen und die durchfließende Proteinfraktion aufgefangen. Die Loslösung des nicht an das Protein gebundenen Liganden

erfolgt durch Denaturierung des Proteins mit organischem Lösungsmittel. Es soll möglich sein, bis zu 400 Substanzen unterschiedlicher Masse pro Mikrotiterplatten-Vertiefung zu detektieren. Damit wäre es möglich 600.000 potentielle Liganden pro Tag an einem Protein zu messen. Die Proteinfraction wird direkt von der 96-well-Mikrotiterplatte in das HPLC-MS System eingespritzt. Anders als beim Assay von S. Sauer werden die zurückgehaltenen niedermolekularen Verbindungen nicht massenspektrometrisch untersucht.

## 1.2 PROTEIN-LIGANDEN SYSTEME

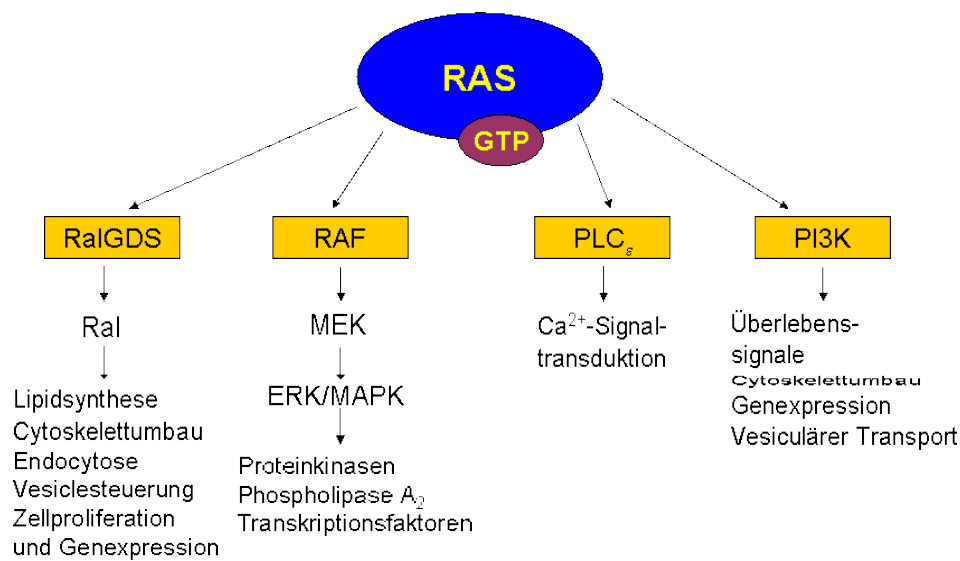
Zunächst werden die verwendeten Proteine und ihre Liganden vorgestellt. Die Auswahl erfolgte unter verschiedenen Gesichtspunkten. Zunächst wurde ein System ausgewählt, das den Aufbau des Durchflussbindungstests mit Elektrospray und den Proteinarraytests mit MALDI-TOF erleichtern sollte. Das leicht verfügbare Streptavidin mit seinem hochaffinen Binder Biotin war hier die nahe liegende und somit erste Wahl. Die weiteren Proteine werden zum einen nach ihrem Stellenwert für die Ligandensynthese im Arbeitskreis Waldmann ausgewählt, zum anderen nach ihrer Verfügbarkeit.

### 1.2.1 Streptavidin

Das aus dem *Streptomyces avidinii*-Bakterium stammende Streptavidin ist in Kombination mit Biotin, dem Vitamin H, ein beliebtes System zur affinen Kopplung. Durch die vier Bindungsstellen pro Proteinmolekül und die große Bindungskonstante von  $10^{15} \text{ mol}^{-1}$  ist es besonders geeignet, z.B. für die Markierung bei der Hybridisierung von DNA. Da es zudem relativ günstig ist und nur geringe Ansprüche bei der Handhabung stellt, wurde es zur Etablierung der Bindungsassays eingesetzt. [54]

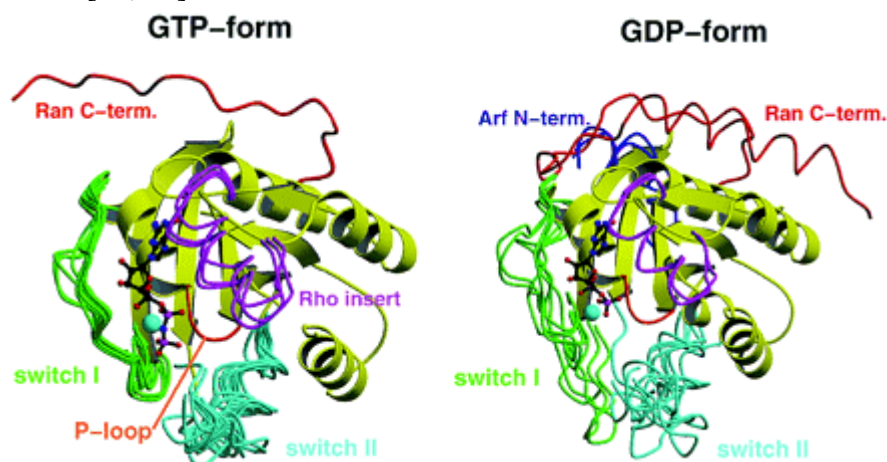
### 1.2.2 Ras Protein

Die Ras-Proteine gehören zu der Ras-(rat-adeno-sarcoma) Superfamilie und fungieren als Schalter in den Signaltransduktionswegen der Zelle. Über die Erregung eines Rezeptors in der Zellmembran wird Ras durch den Grb-Sos-Komplex aktiviert. Diese Aktivierung besteht im Austausch von am Ras gebundenen GDP gegen GTP. Durch die Anlagerung des GTPs ändert Ras seine Konformation dahingehend, dass es in der Lage ist, Effektorproteine zu binden (s. Abbildung 12). Ein Beispiel für ein Effektorprotein ist Raf, die erste Kinase in der MAP-Kinase Signalkaskade, an deren Ende die Expression verschiedener Gene durch die Phosphorylierung einiger Transkriptionsfaktoren steht. Damit ist Ras der Vermittler zwischen einem Signal, das von außen auf die Zelle einwirkt, und dem Ziel des Signals im Zellkern. Sobald GTP zu GDP und eine Phosphatgruppe zerfallen ist, ist Ras wieder inaktiv und die Bindung zu den Effektoren wird gelöst. Daher wird die Signalweitergabe durch die GTPase Aktivität des Ras reguliert. [55, 56]



**Abbildung 12:** Die Effektoren des Ras-Proteins [55]

Durch Bindung an Ras erhöhen die GEFs die Dissoziationsrate des gebundenen Nukleotids und stabilisieren kurzfristig den nukleotidfreien Zustand. Bei der Rückbindung von Nukleotid ist nachfolgend das in der Zelle höher konzentrierte GTP bevorzugt. Nur im GTP-gebundenen Zustand ist die *switch*-I-Region so orientiert, dass eine Bindung und damit Aktivierung von Effektorproteinen stattfinden kann. Die konservierte Sequenz PM1 ( $_{10}GxxxxGK S/T_{17}$ ) liegt in der ersten Schleife, die das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat umschließt und deshalb auch als Phosphat- oder P-Schleife bezeichnet wird. Ein in allen Ras-Proteinen gleich positioniertes Threonin in Position 35 (PM2) und das Konsensus-Motiv PM3 ( $_{57}DxxG Q/H/T_{61}$ ) sind an der Koordination des Magnesiums beteiligt und stabilisieren das  $\gamma$ -Phosphat. Nach der irreversiblen GTP-Hydrolyse gehen diese Kontakte zum  $\gamma$ -Phosphat verloren, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führt. [55, 56]



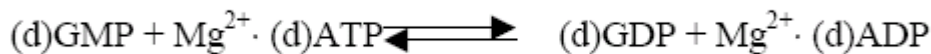
**Abbildung 13:** Röntgenstrukturanalyse der GTP- und GDP-gebundenen Form von H-Ras. [57]

Das aktivierte GTP-Ras ist nun in der Lage, verschiedene Effektoren zu binden und somit Signaltransduktionswege zu aktivieren. Eine Veränderung des Ras kann schwerwiegende Folgen für die Zelle haben.

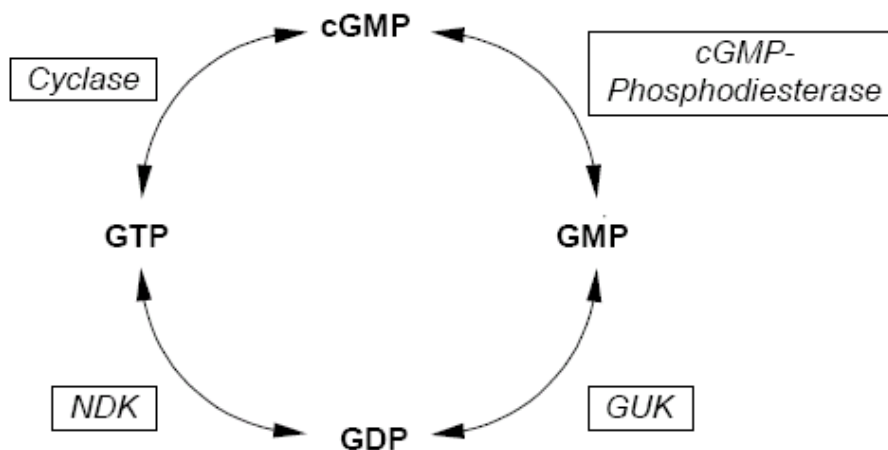
### 1.2.3 E. coli Guanylatkinase

Im Verlauf der Arbeit werden verschiedene Nukleotidkinasen expremiert. Für die massenspektrometrischen Bindungsassays wird die E. coli Guanylatkinase (GK) eingesetzt.

Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung von GMP die reversible Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von ATP zu GMP und nach folgendem Reaktionsschema [67]:



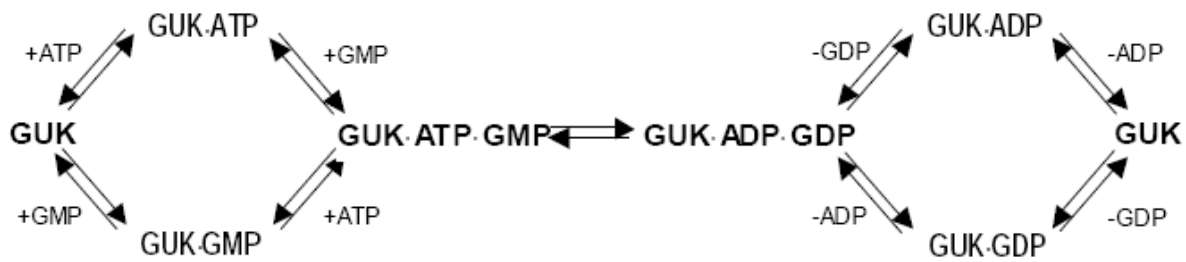
Der Guanylatkinase besitzt nicht nur eine wichtige Position bei der Bereitstellung von GTP zur DNA-Synthese in der Zelle, sondern besitzt auch eine zentrale Funktion im Guanosinphosphat-Kreislauf (cGMP-Zyklus, siehe Abbildung 14). [59]



**Abbildung 14:** Darstellung des cGMP-Zyklus, GUK = Guanylatkinase, NDK = Nukleosiddiphosphatkinase

Durch den cGMP-Zyklus besitzt die Guanylatkinase eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellzyklus-regulierenden Enzymen, wie z.B. Ras-Proteinen, die durch eine Guanosintriphosphat-Bindung aktiviert werden. [60],[68]

Erste kinetische Untersuchungen wurden von Agarwal an aus Säugergewebe gewonnenem Enzym durchgeführt. [62], Eine vollständige Aufklärung des katalytischen Mechanismus gelang allerdings erst an rekombinanter S-cervisiae-Guanylatkinase. [63] Ähnlich den übrigen Mononukleotidkinasen binden beide Substrate zunächst an das Enzym und bilden einen ternären Komplex. Sowohl die Bindung der Substrate GMP und ATP+Mg<sup>+</sup>, wie auch die Freisetzung der Produkte GDP und ADP erfolgt zufällig als *bi-bi-random*-Mechanismus. Der katalytische Mechanismus wird in Abbildung 15 schematisch dargestellt.



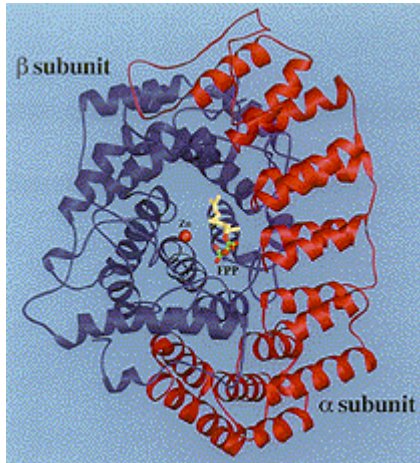
**Abbildung 15:** Schema des bi-bi-random-Reaktionsmechanismus der Guanylatkinase. Das  $Mg^{2+}$ -Ion des  $Mg^{+}ATP$ -Komplexes wurde aus Platzgründen weggelassen. [63]

Die Bindungsdomäne der Guanylatkinase für die Substrate gilt als sehr flexibel. [65] Müller-Diekman et al. nehmen an, dass die katalytischen Zentren von Mononukleotidkinasen sich durch die Bindung der Substrate aneinanderlagern und sich durch die Produktfreisetzung wieder voneinander trennen. Daher liegen die Enzyme in zwei unterschiedlichen Konformationen vor. [66] Die in dieser Arbeit eingesetzte *E. coli* Guanylatkinase zeigt hingegen eine kooperative Bindung von GMP. [61] „Kooperative Bindung“ bedeutet, dass das erste gebundene Substrat die Konformation des Proteins dahingehend ändert, dass die Bindung weiterer Substrate beeinflusst wird. Diese Konformationsänderung kann eine Erleichterung oder aber eine Erschwerung der Bindung weiterer Substrate bedeuten.

#### 1.2.4 Farnesyltransferase: Eine Protein-Prenyltransferase

Ein wichtiger Faktor für die biologische Aktivität der Ras-Proteine ist ihre Farnesylierung am C-Terminus des Proteins. Nur mit dem Farnesylrest ist eine Verankerung der Ras-Proteine an der Zellmembran möglich. Die  $Zn^{2+}$ -abhängige Prenyltransferase katalysiert die Farnesylierung am C-terminalen CaaX-Motiv des Ras-Proteins. [64] Eine Verankerung an der Membran ist eine der Voraussetzungen für die Aktivität der Ras-Proteine. Das macht Farnesyltransferase interessant als Ziel der Krebsforschung. Dabei wird die Farnesylgruppe aus dem Farnesylpyrophosphat an das Cystein des CaaX-Motivs gekoppelt. Diese Farnesylgruppe ist entscheidend für die biologische Aktivität des Ras-Proteins. Es bildet den Anker des Proteins an die Membran. Zudem ist die Proteolyse, Methylierung oder Palmitoylierung von der Farnesylierung abhängig. Daher ist die Farnesyltransferase ein Ziel für die Krebsforschung [69, 70, 71].





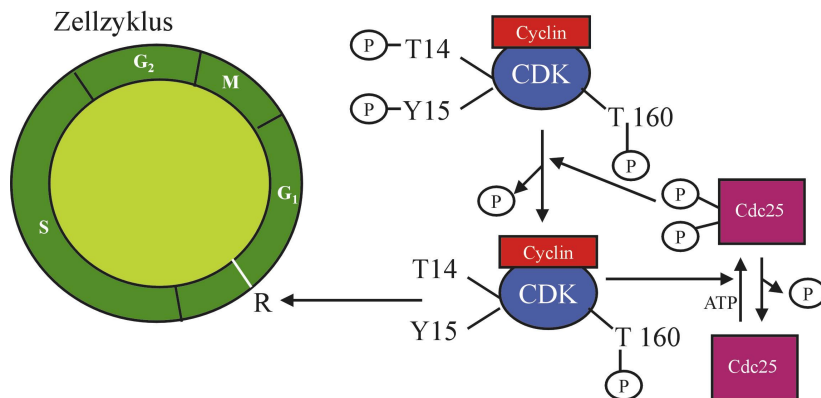
**Abbildung 16:** Röntgenstrukturanalyse der Farnesyltransferase mit Farnesylpyrophosphat im katalytischen Zentrum. [64]

Das Protein besteht aus einem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Heterodimer, die fassartig angeordnet sind. Im Inneren dieser Struktur befindet sich die hydrophobe Tasche, in die das Farnesylpyrophosphat binden kann. Das Nukleophil für den Angriff auf die ionisierte Farnesylgruppe ist das  $\text{Zn}^{2+}$ -aktivierte Thiolat des Cysteins. [64] Ein Farnesyltransferaseinhibitor kann die Struktur der Farnesylpyrophosphats nachahmen, um das katalytische Zentrum für das eigentliche Substrat zu blockieren.

### 1.2.5 Cdc25a

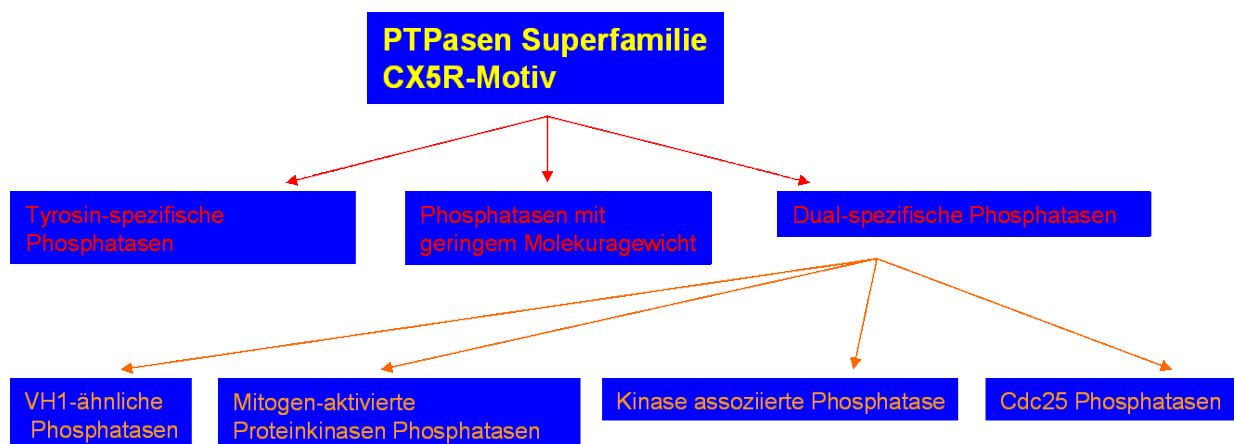
Eines der ersten regulatorischen Proteine des Zellzyklus, das isoliert werden konnte, [72] war die Phosphatase Cdc25a, nach der die gesamte Familie der Cdc25 Phosphatasen benannt wurde. Die Mitglieder dieser Familie (neben Cdc25a gehören ihr Cdc25b und Cdc25c an) regulieren die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen in höheren eukaryotischen Zellen durch Dephosphorylierung der inhibierenden Phosphorylierungsstellen. Beispielsweise aktiviert die Phosphatase Cdc25a den Cdk2-Cyclin-Komplex durch Hydrolyse je eines Phospho-Threonin und Phospho-Tyrosinrestes und reguliert somit den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus (Abbildung 4). [73, 74] Die katalytische Einheit der Cdks ist allerdings erst im Komplex mit weiteren regulatorischen Untereinheiten den Cyclinen aktiv. Dabei reguliert Cdc25a den Übergang von der G1 zur S Phase. [76, 75] Dieser Punkt ist ein Kontrollpunkt im Zellzyklus. Durch Kontrollpunkte im Zellzyklus kann der Zellzyklus gestoppt werden, wenn ein Fehler bei der Mitose durch z.B. geschädigte DNA auftritt. In menschlichen Zellen beeinflusst eine stabile Form der Phosphatase ebenfalls die Mitose. [77] In einem höheren Organismus wie z.B. einem Säugetier führt das Versagen der Kontrollpunkte dazu, dass die Zellproliferation unkontrolliert abläuft. Dies bedeutet die Bildung von Krebs.





**Abbildung 17:** Schema der Funktion der Cdc25a-Phosphatase im Zellzyklus.[72]

Cdc25a gehört der Superfamilie der PTPasen an, deren Mitglieder durch das CX<sub>5</sub>R Motiv gekennzeichnet sind. Der hohe Verwandtschaftsgrad der Phosphatasen lässt vermuten, dass Inhibitoren für eine Phosphatase auch gegen andere Phosphatasen aus dieser Familie wirksam sind.



**Abbildung 18:** Einordnung der Cdc25a-Phosphatase in die Familie der Phosphatasen [78]

Das CX<sub>5</sub>R-Motiv spielt die entscheidende Rolle der katalytischen Aktivität aller Phosphatasen. [64] In mehreren Arbeiten kristallisierte sich das Cystein als Nukleophil, welches das Phosphatatom direkt angreift, heraus, während das Arginin zur Stabilisierung des Übergangszustandes dient. Das CX<sub>5</sub>R Motiv entspricht im Cdc25a den Aminosäuren Cys<sup>430</sup> bis Arg<sup>436</sup>. Interessant ist, dass bisher beim Cdc25a keine Aminofunktion identifiziert werden konnte, die als „general acid“ dient. [79] Auch besitzt die katalytische Domäne dieser Phosphatase keinen Loop, der die Bindung des Substrats erleichtern könnte. [80]



**Abbildung 19:** Katalytische Domäne des Cdc25a nach Fauman et al [79]

In vielen Arbeiten wurde bereits der Zusammenhang zwischen einer Überexpression von Cdc25a und der Entstehung bestimmter Krebsarten aufgezeigt. Dazu gehören Kopf- und Halstumoren, Nicht-Hodgkin-Lymphome und Lungenkrebs der nicht-kleinen Zellen. Zudem kann Cdc25a mit Ras kooperativ als Onkogen wirken. Die Koexpression von Ras und Cdc25a bewirkt ein Zellwachstum in Kultur und Tumorenbildung in nackten Mäusen. [81]

Da die Cdc25-Phosphatasen diese enorm wichtige Rolle bei der Entstehung etlicher Krebsarten und auch von Alzheimer spielen, und sie dadurch attraktive Ziele für die Inhibierung sind, [66] sind nun eine Reihe bekannt, die als Leitstrukturen für die Inhibitorensuche dienen.

In einer neuen Veröffentlichung werden Surinam und seine Derivate als Cdc25a-Inhibitoren beschrieben, [82] wobei der  $IC_{50}$ -Wert für Surinam bei  $1,5 \mu\text{M}$ , der des stärksten Derivat bei  $0,38 \mu\text{M}$  liegt. Auch wurden Inhibitoren für Cdc25a in marinen Schwämmen gefunden. [83] Die Dipeptide Stevastelin A ( $IC_{50} = 2 \mu\text{M}$ ) und B ( $IC_{50} = 19,8 \mu\text{M}$ ) sind VHR-Inhibitoren, die von Michael Manger näher untersucht wurden. Dabei entwickelte er unter anderem Inhibitoren für die Cdc25a-Phosphatase mit einem  $IC_{50}$  von bis zu  $1 \mu\text{M}$ . [84] Lars Wittenberg baute eine Substanzbibliothek der  $\gamma$ -Hydroxybutenolid-Einheit des Dysidiolids auf, die ebenfalls Inhibitoren mit einem  $IC_{50}$  von bis  $1 \mu\text{M}$  aufweist. [85] Interessant ist in dem Zusammenhang auch die Zusammenstellung in Koch et al. [86]

### 1.3 ZIELSETZUNG

Die große Menge der neusynthetisierten biologisch aktiven Substanzen verlangt nach einem schnellen und zuverlässigen Testsystem. Die Methode der Massenspektrometrie erlaubt eine Identifizierung und Quantifizierung von Proben ohne spezielle Marker (wie sie bei Fluoreszenz- oder NMR-Messungen nötig sind). Daher ist sie das Mittel der Wahl beim Screenen von Substanzbibliotheken. In diesem Projekt wird die Möglichkeit ausgelotet, die Massenspektrometrie zur Untersuchung von Protein-Liganden-Bindung einzusetzen. Dazu trifft der freie Ligand auf immobilisiertes Protein und kann an dieses binden, während nicht bindende Substanzen durch

Waschen entfernt werden. Durch geeignete Elutionsmittel wird der gebundene Ligand wieder gelöst und massenspektrometrisch identifiziert. Hier wurden zwei Möglichkeiten der massenspektrometrischen Analyse eingesetzt, zum einen das HPLC-gekoppelte Elektrospray-Ioneneffallenmassenspektrometer und das MALDI-TOF-Massenspektrometer. Die MALDI-TOF-Messungen sind einfach und schnell mit hoher Empfindlichkeit durchzuführen, während ESI-MS die Möglichkeit zur Quantifizierung von Bindung eröffnet. Dabei sollen die Schwierigkeiten näher betrachtet werden, die die Untersuchung von Substanzbibliotheken mit sich bringen und ausgelotet werden, ob diese umgangen werden können.

Sowohl im Bereich eines MALDI-MS, wie eines ESI-MS-basierten Bindungsassays, gibt es, wie in Kapitel 1 erwähnt, bereits Veröffentlichungen über einsatzfähige Systeme. Dazu gehören die Arbeiten von Bundy und Fenselau und Alonso und Fenselau. Alle drei Arbeiten beschreiben ein System, in dem ein Lektin auf einer Gold- [21, 31] bzw. einer Glasoberfläche [30] immobilisiert wurde. Diesem Lektin wurde entweder ein einzelner Binder wie Oligomannose 9 oder die Carbohydrate eines E. Coli-Extraktes zur Bindung angeboten. Die Arbeiten, bei denen eine Goldoberfläche eingesetzt wurde, unterscheiden sich bezüglich der eingesetzten Organismen, aus denen die Zellextrakte stammen. Brockman und Orlando veröffentlichten 1995 ein System, bei dem ein Antikörper gegen Biotin auf einer Goldoberfläche mit derselben Technik kovalent gebunden wurde [22], wie in der Veröffentlichung von Bundy und Fenselau [21]. Diesem Antikörper wurde biotinyliertes Insulin und Myoglobin als Kontrolle zur Bindung angeboten. Eine weitere Verbesserung ihrer Technik bestand in einer weiteren Veröffentlichung darin, einen  $\gamma$ -INF-Antikörper über SAM und Dextranlinker an eine Goldoberfläche zu binden. [104] In einer Arbeit von Neubert et al. wird der MALDI-Affinitätsassay nochmals verbessert indem die Orientierung bei der Immobilisierung kontrolliert wurde. [23] Allerdings dient der Affinitätsassay dazu Schwangerschafts- und Krebsmarker aus Blut, also Antigene mithilfe von Antikörpern, zu analysieren. Etliche Arbeiten und besonders die von Nelson und Mitarbeitern befassen sich mit der Untersuchung von Oberflächen-Plasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR)-Protein-Chips im MALDI-MS. Hier wird jedoch nicht das Screenen von Substanzbibliotheken, sondern von Antikörper-Antigenbindung und Protein-Peptidbindung beschrieben. [17, 18, 16, 109, 103, 143]

Im Bereich der Durchflusssysteme wurde vor allen Dingen die frontale Affinitätschromatographie ("frontal affinity chromatography", FAC) in Kombination mit Massenspektrometrie, das FAC/MS-System, zur Untersuchung von Protein-Liganden-Bindung beschrieben, in einer neueren Veröffentlichung von Schriemer sogar Hochdurchsatzmessung von Substanzbibliotheken als etabliert bezeichnet. [47] Sehr viele Arbeiten dazu stammen aus der Gruppe um Schriemer. [38, 39, 40] In diesen Arbeiten wurde Protein nach seiner Biotinylierung an eine Avidin-Affinitätssäule gebunden und dem immobilisierten Protein Substanzen im Durchfluss zur Bindung angeboten. Dabei handelt sich hauptsächlich um Lektine bzw. Galektine mit verschiedenen Sachheriden als Liganden. Auch bei Veröffentlichungen anderer Gruppen (wie z.B. die um Kasai) wurde die Untersuchung von Lektinen und Galektinen und ihren Bindern beschrieben. [42, 41] Die Gruppe um Schriemer untersuchte auch die Binder des  $\beta$ -Östrogenrezeptors. [43] Eine weiteres Team um Xu befasste sich mit den Inhibitoren des Epidermal Growth Factors [44] und zeigten dabei die Eignung des Systems zu Bindungsstudien von Naturstoffen, die sich als Heiß-

wasserextrakt aus chinesischen Kräutern gewinnen ließen. [45] In zwei Reviews wird die FAC/MS als die Perspektive im Hochdurchsatz-Screening von Substanzbibliotheken beschrieben. [48, 134]

Die MALDI-MS und HPLC-MS- basierten Bindungsassays sollen in dieser Arbeit aufgebaut und hinsichtlich ihrer praktischen Einsetzbarkeit für heterogene Substanzbibliotheken überprüft werden. Dazu sollen Ergebnisse, die in Gelfiltrationsassays anderer Arbeitsgruppen mit diesen Substanzen gewonnen werden, als Vergleich dienen. Teilweise sollen auch die massenspektroskopischen Analysen, die sich an die Gelfiltrationsassays anschließen, selbst durchgeführt werden. Neben der Veröffentlichung von Muckenschnabel et al., mit deren Speed Screen Substanzen in dieser Arbeit getestet werden sollen, sei hier auf frühere Arbeiten von Wabnitz verwiesen, die mit Mikro Spin Säulen und mit Mikrotiterplatten die Gelfiltrationsassays mit einem Enzym namens Peptiddeformylase und fünf ihrer Inhibitoren durchführten und anschließend die Proben der ESI-MS zuführten. [87] Blom et al. koppelten eine größere Gelfiltrationssäule direkt mit der LC-MS, um das humane Matrixmetalloprotease und 4 ihrer Inhibitoren in einem Gemisch zu untersuchen. [51] Die Gelfiltrationsassays bieten die Möglichkeit ohne die Immobilisierung eines Proteins arbeiten zu können und sind deshalb ein interessanter Vergleich zu den Bindungsassays, die auf der kovalenten Bindung des Zielenzym an einer Array-Oberfläche oder Säulenmaterial beruhen.

**Im Verlauf der Arbeit soll gezeigt werden, wie sinnvoll der Einsatz von derartigen Techniken zum Screenen von Substanzbibliotheken ist, und ob sich diese Techniken zu einem Routinesystem ausbauen lassen.**

# 2 Materialien und Geräte

## 2.1 MATERIAL

### 2.1.1 Verbrauchswaren

- 15 und 50 ml Plastikröhrchen (Falcon)
- Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- Pipettenspitzen (Gilson, Eppendorf)
- Mikrotiterplatten (Nunc)
- Blattgold, Scheidegold, 24 Karat (Imperator)
- POROS 20 EP Media (Bio Perseptive)
- Nitrocellulose (Schleicher und Schuell)

### 2.1.2 Chemikalien

- Harnstoff (Roth)
- Tris (Roth)
- Coffein (Sigma)
- Ammoniumsulfat (AppliChem)
- EDTA-Natriumsalz (GERBU)
- Zinksulfat (Serva)
- Coomassie G250 (Serva)
- Guanidinhydrochlorid (GERBU)
- Zitronensäure (J.T.Baker)
- Ammoniumhydrogencarbonat (Fluka)
- Natriumchlorid (Riedel-de-Haen)
- POROS EP 20 Applied Biosystems
- Dithioerythriol (GERBU)
- HEPES (Serva)
- Sinapinsäure (Sigma)
- $\alpha$ -Cyano-hydroxy-Zimtsäure (Sigma)
- THAP (Fluka)
- Dihydroxybenzoesäure (Sigma)

## Chemikalien (Forts.)

- NP40 (Calbiochem)
- DTE (Serva)
- Acrylamid (Diagonal)
- Glycin (Roth)
- Glycerin (Roth)
- Ammoniumpersulfat (Serva)
- DTSP (Sigma-Aldrich)
- Mercaptopropionsäure (Sigma-Aldrich)
- N-Hydroxysuccinimid (Sigma-Aldrich)
- EDC (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Sigma)
- Trypsin, bovin pancreas (Roche)

**2.2 GERÄTE**

- MALDI-TOF Voyager DE-PRO Biospectrometry Workstation (Perseptive Biosystems)
- ESI-MS: LCQ Deca und LCQ Classic (Finnigan)
- LTQ (Finnigan)
- HPLC-System: Agilent 1100 Serie (Hewlett-Packard)
- HPLC-Säulen: CC125/4 Nucleodur 120-5 C18: (Macherey+Nagel)
- Centrifuge 5415R (Eppendorf)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf)
- Schüttler: Series 25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)
- Zentrifuge: Sorvall Superspeed (DuPont)
- Centrifuge 5403 (Eppendorf)
- Centrifuge 5415R (Eppendorf)
- Rotoren: SS-34; SLA-3000; GS-3 (Sorvall)
- Agarose-Gelanlagen: DNA-Sub Cell (BioRad)
- Acrylamid-Gelanlagen: MiniProtean II (BioRad)
- Powerpack Biometra 25 (Biometra)
- Powerpack Phero-Stab 500 (Biotec-Fischer)
- Micropipetten (Gilson, Eppendorf)
- Inkubator: CO2-Autozero (Heraeus)
- Sonifier (Branson 250)

## Geräte (Forts.)

- Photometer (Eppendorf)
- Mikrotiterplattenreader (Finnigan)
- Mikroskop Axiolab 40 (Zeiss)
- UV/VIS-Spektrometer (Cary UV/VIS)
- MALDI-Probenträger (Applied Biosystems)

**2.3 LÖSUNGEN**

- TBE 89 mM Tris; 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
- Laemmli-Gel: Upper Buffer 0,4% (w/v) SDS; 0,5 M Tris/HCl, pH 7,5
- Laemmli-Gel: Lower Buffer 0,5% (w/v) SDS; 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- Laemmli-Gel: Laufpuffer 192 mM Glycin, 25 mM Tris; 0,1% (w/v) SDS
- ABA 38,5% 37,5 % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid
- Schägger-Gel 10x Anodenpuffer 2M Tris/HCl, pH 8,9
- Schägger-Gel 10x Kathodenpuffer 1 M Tris/HCl, 1 M Tricin; 1 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) NaN<sub>3</sub>, pH 8,25
- ABA 49,5 % 48 % Acrylamid, 1,5 % Bisacrylamid
- Coomassie Färbelösung für Acrylamidgele 0,1% Coomassie R250; 10% Essigsäure; 50% Methanol
- Entfärbelösung für Coomassiefärbung 10% Essigsäure; 5% Methanol
- 5x Bradford-Reagenz 50% (v/v) konz. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 25 % (v/v) Ethanol; 0,05% (w/v) Serva Blue G
- BCA-Assay, Reagenz A 1 % Bicinchoninsäure-2Natrium; 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,16 % NatriumKaliumtartrat; 0,4% NaOH; 0,95 % NaHCO<sub>3</sub>; auf pH 11,25 mit 50 % NaOH (aq.) einstellen
- BCA-Assay, Reagenz B 4 % Kupfersulfat in Aqua bidest.
- Denaturierender Lysepuffer, Cdc25a 8 M Harnstoff; 10 mM TrisCl; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; mit NaOH auf pH 8 einstellen

## Lösungen (Forts.)

- Denaturierender Elutionspuffer 1, Cdc25a 8 M Harnstoff; 10 mM TrisCl; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; mit HCl auf pH 5,9 einstellen
- Denaturierender Elutionspuffer 2, Cdc25a 8 M Harnstoff; 10 mM TrisCl; 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; mit HCl auf pH 4,5 einstellen
- Schägger-Gel Gelpuffer 3 M Tris/HCl, 0,3 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) NaN<sub>3</sub>
- Laufpuffer für die HLPC-MS 0,1 mM Natriumacetat, mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt
- EP-High Salt Buffer 1,5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 100 mM Natriumphosphat; pH 8,5-9,0
- Farnesylierungspuffer 30 mM Tris/HCl, pH 7,8; 20 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM ZnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTE
- Phosphatpuffer 56 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,13
- Nukleotidkinasen-Assaypuffer 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM ATP; 1 mM GMP; 0,5 mM PEP; 0,25 mM NADH; 5 U Lactatdehydrogenase; 4 U Pyruvatkinase
- Cdc25a-Assaypuffer 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM DTE, pH 8,0
- Trypsin-Verdaupuffer 50mM Ammoniumhydrogencarbonat, 5 mM CaCl<sub>2</sub>
- LB-Medium 10 g NaCl; 10 g Bacto-Pepton; 5 g Yeast-Extract pro Liter Aqua Bidest; pH 7- 7,4
- SET 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 20 mM TrisCl; pH 7,8
- Lysepuffer Nukleotidkinasen 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol
- Waschpuffer Nucleotidkinasen 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
- Elutionspuffer Nukleotidkinasen 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol
- MRFA-Stocklösung 5 nmol/µl in 50 % Methanol, 50 % Wasser



## **2.4 PLASMIDE UND BAKTERIENSTÄMME**

- XL1
- BL21-DE3
- Plasmide
- pET23 rat FT
- pET9d mit Cdc25A-His
- ADK1
- pURK1
- pEcAK
- pHsAK1



# 3 Methoden

Die molekularbiologischen und proteinchemischen Methoden wurden entnommen aus Maniatis: Protocol of molecular biology. [88] Zusammensetzungen von Puffern wurden von Stoll und Blanchard 1990 veröffentlicht. [89]

## 3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 3.1.1 Rekonstitution von DNA aus Filterpapier

Das Filterpapier wurde möglichst exakt mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. Dann wurde in drei Portionen 50 µl TE-Puffer pH 8,0 zugegeben und geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren wurde bei 4°C für drei Stunden inkubiert. Die DNA-Lösung wurde danach in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

### 3.1.2 Elektrotransformation

Für die Elektrotransformation wurden bis zu 20 µl Plasmid-Lösung und 70 µl kompetente Bakterien vermischt (für Plasmid-Aufreinigung wurde der XL1-Stamm, für Proteinexpression der BL21-DE3-Stamm eingesetzt), für eine Minute auf Eis inkubiert und luftblasenfrei in die Elektroküvette (welche trocken sein muss) überführt. Der Elektroschock wurde bei einer Kapazität von 125 µF und einem Widerstand von 800 Ohm mit 1,5 kV Spannung ausgeführt. Die Zeitkonstante betrug etwa 10 bis 16. Dieser Ansatz wurde in einem Milliliter LB-Medium aufgenommen, in ein Röhrchen überführt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und übernacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.3 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (“Mini-Präp”)

Von einer LB-Agar-Platte wurden einige Kulturen der transformierten E. coli gepickt und damit 5ml-LB-Kulturen angelegt und diese bei 37°C für fünf bis sechs Stunden geschüttelt. Nach dem Erreichen der gewünschten Dichte (also bei einer OD von etwa 1,5) wurden von jeder Kultur 1,5 ml in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden fünf Minuten lang bei Raumtemperatur in einer Eppendorftischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wurde durch Invertieren gemischt und dann für fünf Minuten bei 4°C inkubiert. Darauf folgend wurden 150µl Lösung III addiert und die Proben für weitere 10 Minuten auf Eis stehengelassen. Nach 10 Minuten Zentrifugation (RT,

14000 rpm) wurden Proteine mit 400  $\mu$ l Phenol in TE und 200  $\mu$ l Chloroform gefällt. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 400  $\mu$ l Chloroform extrahiert. Für eine bessere Phasentrennung wurde kurz anzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem zweifachen Volumen Ethanol abs. vermischt. Die DNA wurde 30 Minuten lang bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 20  $\mu$ l TE aufgenommen.

### 3.1.4 Restriktion von Plasmid-DNA (Testrestriktion)

Es wurde folgender Ansatz pipettiert und bei der für das entsprechende Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) für eine Stunde inkubiert.

10  $\mu$ l-Ansatz:                x  $\mu$ l DNA (etwa 1  $\mu$ g DNA)  
                                  1  $\mu$ l 10fach Restriktionspuffer  
                                  0,3  $\mu$ l Enzym 10 U/ $\mu$ l  
                                  8,7 – x  $\mu$ l Millipore Wasser

### 3.1.5 Agarosegelelektrophorese

Je nach Fragmentgröße wurde eine 0,8 bis 2% Agarose-Lösung in TBE mit Ethidiumbromid (120  $\mu$ l 1%/2l) aufgekocht. Die Lösung wurde in die Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Gelkammer in eine mit TBE-Puffer (mit Ethidiumbromid) gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und der Kamm herausgezogen. Die DNA-Proben wurden mit 3-fach Probenpuffer versetzt und ebenso wie der Marker in die Probentaschen des Gels gegeben. Das Gel lief für etwa eine halbe Stunde bei einer Spannung von etwa 60 bis 100 Volt.

### 3.1.6 Sequenzieren

Für die Sequenzierung eines Plasmids musste zunächst die Sequenzier-PCR durchgeführt werden. Für den Ansatz wurden 0,7  $\mu$ l DNA-Lösung (Konzentration: 0,5 bis 1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l Primer (Konzentration je 1 pmol/ $\mu$ l T7-Promotor und T7-Terminator), 3  $\mu$ l Wasser, 2  $\mu$ l DMSP und 4  $\mu$ l ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit® gemischt. Dieses Kit enthielt, zusätzlich zu den dNTP einer einfachen PCR, Didesoxytrinukleotide, die mit vier verschiedenen Farbstoffen, entsprechend der Basen, markiert sind. Das Sequenzierprogramm der PCR-Maschine für einen Zyklus sah folgendermaßen aus: 10 Sekunden bei 96°C, 10 Sekunden bei 50°C und 4 Sekunden bei 60°C. Dieser Zyklus wurde 25mal wiederholt und der Ansatz danach bis zur Verwendung bei 4°C gekühlt.

## 3.2 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

### 3.2.1 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

In der nachfolgenden Aufstellung sind die Mengen an BSA-Protein und die Volumina für die Kalibrierreihe des Bradfordtests aufgeführt. (vgl. Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Standardproben für Proteinmengenbestimmung

Stocklösung BSA	$\mu\text{l}$ Stocklösung für ein ml Bradfordreagenz	$\mu\text{g}$ BSA/ 1ml Assay
0,1 mg/ml	20	2
0,2 mg/ml	20	4
0,4 mg/ml	20	8
0,6 mg/ml	20	12
0,8 mg/ml	20	16
1 mg/ml	20	20

Zwischen einem und 20  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung wurde in eine 1-ml Plastikkuvette pipettiert und 1ml 1:5 verdünnte Bradford-Reagenz zugefügt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595nm Wellenlänge im UV/VIS-Spektrometer bestimmt [90].

### 3.2.2 Proteinbestimmung mit BCA (Bicinchoninsäure)

Es wurden Standardproben mit einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  mit folgenden Proteinmengen (BSA) vorbereitet und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt: 2,5, 5, 10, 25, 50 und 100  $\mu\text{g}$ . Von den unbekanntem Proteinproben wurden ebenfalls 50  $\mu\text{l}$  in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Für die Arbeitslösung wurden 9,8 ml Reagenz A mit 200  $\mu\text{l}$  Reagenz B gemischt und davon zu jeder Proteinprobe 950  $\mu\text{l}$  gegeben. Die Ansätze wurden 15 min lang bei 56°C zur Reaktion gebracht. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Proben abgekühlt und in Einmalküvetten gefüllt. Bei 562 nm wurde die Absorption bestimmt [75].

### 3.2.3 Proteinexpression und Aufreinigung

#### 3.2.3.1 Farnesyltransferase

Die Expression und Aufreinigung der Ratten-Farnesyltransferase erfolgte nach Zimmerman et al<sup>1</sup> [95] in dem Labor von J.Kuhlmann. Expressionsbedingungen: 15 Liter reiches Induktionsmedium wurden mit einer über Nacht Vorkultur 1:100 angeimpft und die E. coli (mit dem FPT/pET23a-Plasmid) bei 37°C unter Schütteln hochgezogen (180 rpm). Bei OD<sub>680</sub>=1 wurde mit einer Endkonzentration von 0,4 mM IPTG und 0,5 mM ZnSO<sub>4</sub> für sechs Stunden bei 34°C unter Schütteln (180 rpm) induziert. Nach Zentrifugation (15 Minuten, 4000 rpm, 4°C) wurden die

Pellets in Farnesylierungspuffer (3ml/g Pellet) aufgenommen und nach Zusatz einer Spatelspitze DNaseI und 1 mM PMSF (Endkonzentration) die Bakterien im Fluidizer lysiert. Das Lysat wurde bei 17.000 rpm und 4°C für 30 Minuten in einem Beckmann JA-17-Rotor zentrifugiert und der ribosomenhaltige Überstand 1:10 mit 10% Streptomycinsulfat-Lösung versetzt. Nach 20 Minuten Rühren bei 4°C wurde erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand für die Aufreinigung über eine DEAE-Sephacel-Säule (2,6 x 10 cm) mittels FPLC verwendet. Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen und mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in Farnesylierungspuffer eluiert. Die FTase enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-Page ermittelt und vereinigt. Diese wurden über eine Phenyl-Sepharose-Säule (2,6 x 10 cm) durch Aufgabe über Einfließenlassen und Eluation mit einem linearen KCl-Gradienten von 1,5 M bis 0 KCl in Farnesylierungspuffer weiter aufgereinigt. Über SDS-Page (Laemmli-Gel) und Aktivitätsbestimmung wurden die FTase-Fraktionen ermittelt und vereinigt.

### 3.2.3.2 Farnesyltransferase

Die Aktivität der Farnesyltransferase wurde über ihre Fähigkeit nachgewiesen, die Bindung eines Prenylrestes an das C-terminale Ende des Ras-Proteins, die CaaX-Sequenz, zu katalysieren. 15 µg Farnesyltransferase (im Bradford Assay bestimmt) aus den Gelfiltrationsfraktionen, 20 µg H-Ras und 3 nmol NBD-Farnesylpyrophosphat wurden in 100 µl Farnesylierungspuffer gemischt und für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf ein SDS-Gel aufgetragen und das Gel für eine Stunde unter 100 Volt gesetzt. Das Gel wurde nach dem Lauf auf dem Phosphorimager untersucht.

### 3.2.3.3 Nukleotidkinasen

#### *Aufreinigung der His-Tag-Proteine*

Expressionsbedingungen: Die Expression erfolgte in BL21-DE3. Ein Liter LB-Medium wurden 1:100 mit einer über Nacht-Vorkultur angeimpft und die Bakterien bei 37° unter Schütteln hochgezogen. Bei einer OD<sub>680</sub> von 0,7 wurde mit 1 mM IPTG über Nacht bei 25°C unter Schütteln induziert. Die Kulturen wurden bei 4°C mit 3500 rpm für 10 Minuten in einem RC-3B-Rotor abzentrifugiert.

Für die Aufreinigung der His-Tag-Proteine wurden die Pellets in 20 ml His-Tag-Lyse-Puffer mit 4,35 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen. Nach 10 Minuten Rotieren bei 4°C wurden die Bakterien für 3 bis 4 Minuten im Ultraschall lysiert und für weitere 10 Minuten bei 4°C rotiert. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 4° mit 10.000 rpm (Sorvall Superspeed, RC-5B) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit aufgeschlämmten NiNTA-Agarose-beads versetzt (1ml NTA-beads/6 ml Überstand) und für zwei Stunden bei 4°C rotiert. Mit dieser Matrix wurde eine kleine Säule beladen und diese zweimal mit dem einfachen Bettvolumen Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des His-getaggen Proteins mit dem einfachen Bettvolumen Elutionspuffer. Die Säule wurde mit einem Bettvolumen Elutionspuffer nachgespült und diese Eluti-

on getrennt von der ersten gesammelt. Das Protein wurde in einem Laemmli-Gel und mit einer Aktivitätsbestimmung überprüft.

### ***Aufreinigung der GST-Fusionsproteine***

*E. coli*-Zellen einer 1 Liter-Kultur wurden durch Behandlung mit Ultraschall (30 - 60 Sekunden, 50% Pulse, 200 Watt) und abwechselnder Kühlung auf Eis (jeweils abwechselnd 30 – 60 Sekunden Ultraschall und 30 Sekunden Kühlung, insgesamt 3 Schritte) aufgeschlossen. Zur Erhöhung der Effizienz des Zellaufschlusses, sowie der Löslichkeit des GST-Fusionsproteins, wurde das Bakterienlysat nach Zugabe von Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) und Triton X-100 (Endkonzentration 1%) 30 - 60 Minuten vorsichtig bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 10minütige Zentrifugation bei 12000 g und 4°C pelletiert und der Überstand von 50 ml mit dem löslichen Protein in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 2 ml 50%ige Glutathion Sepharose 4B-Lösung, die mit PBS-Puffer äquilibriert wurde, hinzugefügt und der gesamte Ansatz 30 Minuten bei RT unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die gesamte Matrix mit absorbiertem Fusionsprotein wurde nun in eine 10 ml-Säule überführt und der Durchlauf mit dem ungebundenen Protein aufgefangen. Die Glutathion Sepharose 4B-Matrix wurde danach mit mindestens 3 x 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Die expremierten Proteine konnten auf zwei unterschiedliche Arten eluiert werden:

#### ***A. Elution als GST-Fusionsprotein***

Das gebundene Fusionsprotein wurde in 3 Schritten durch Zufügen von jeweils 1ml Glutathion-Elutionspuffer und daran anschließender mindestens 10minütiger Inkubation bei RT eluiert. Die drei Fraktionen mit gereinigtem Fusionsprotein wurden zum Schluss vereinigt.

#### ***B. Thrombin-Verdau zur Freisetzung des Proteins ohne GST-Anhang***

Durch Einwirkung der Protease Thrombin auf das noch an die Sepharose 4B-Matrix gebundene Fusionsprotein war es möglich, das Protein vom N-terminalen Gast-Anteil, welcher an die Matrix gebunden bleibt, abzuspalten und direkt zu eluieren. Dazu wurde die Matrix mit einem Volumen Thrombinlösung (50 U Thrombin in 1 ml PBS-Puffer) 2 - 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Ein Unit der Thrombinlösung spaltet 100 µg eines Testproteins in 16 Stunden bei 22°C. Dieser Schritt wurde mindestens zweimal wiederholt, bis das gesamte gebundene Protein von der Säule abgespalten war. Die Kontrolle der Menge an eluiertem Protein erfolgte durch den Bradford-Assay. Zur Kontrolle der Proteinaufreinigung wurden jeweils Aliquots der einzelnen Aufreinigungsschritte entnommen, nach der Zugabe von 6x Laemmli-Puffer 5 bis 10 Minuten auf 95°C erhitzt und durch Gelelektrophorese auf einem 12% (15%) -igen Polyacrylamidgel qualitativ analysiert. Gereinigte Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **3.2.3.4 Cdc25a**

Das Plasmid wurde von I. Hoffmann, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Expressionsbedingungen: Das Animpfen erfolgte aus einer Über-Nacht-Kultur mit 0,05 OD<sub>680</sub> in der Expressi-

onkultur (LB-Medium). Die Expressionskultur wurde bei 37°C hochgezogen, bis eine  $OD_{680}=0,5$  erreicht war. Es erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG Endkonzentration für 4 Stunden bei 37°C unter Schütteln. Die Bakterien wurden danach bei 4° C und 3000 rpm für 10 Minuten pelletiert (GS-3-Rotor, Sorvall Superspeed) und einmal mit SET gewaschen. Die Pellets wurden in nativen Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert. Es wurde mit Ultraschall für etwa 4 Minuten mit der 5 mm Mikrotyp (Output 30%, Stufe 5) lysiert. Das Lysat wurde für 30 Minuten bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall Superspeed). Die Pellets wurden in denaturierenden Lysepuffer resuspendiert, mit einer Spatelspitze DNaseI versetzt und für eine Stunde bei RT geschüttelt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert, 30 Minuten, RT mit 13000 rpm (SS34, Sorvall Superspeed). Der Überstand wurde mit Ni-NTA-beads versetzt und für eine Stunde bei RT gerollt. Mit dieser Matrix wurde ein Säule befüllt. Diese wurde zunächst mit Waschpuffer gewaschen und dann das Protein in zwei Elutionsschritten mit Elutionspuffer eluiert. Das Protein wurde in einem Schägger-Gel und mit einer Aktivitätsbestimmung überprüft.

### 3.2.4 Aktivitätstests

#### 3.2.4.1 Nukleotidkinasen

Für einen 1 ml-Ansatz wurden 500 µl 2x-Reaktionspuffer mit 20 µl ATP (100mM); 20 µl PEP (25 mM), 10 µl NADH (25 mM), 1 µl LDH (5U/µl) und 2µl PK (2U/µl) versetzt. Vor dem Start wurden 5 µl Enzymlösung und 10 µl Substratlösung (100 mM) zugegeben und der Ansatz mit Aqua bidest. auf 1 ml aufgefüllt. Der Umsatz des NADH wurde bei 340 nm Absorption im UV/VIS-Spektrometer gemessen.

Zur Bestimmung der Aktivität der Nukleotidkinasen wurde ein gekoppelter Enzym-Assay mit den Enzymen Lactatdehydrogenase (LDH) und Pyruvatkinase (PK) [62]. durchgeführt. Das Enzym Pyruvatkinase katalysierte in diesem Assay die Übertragung von 2 Phosphatresten des Substrats Phosphoenolpyruvat (PEP) auf die Nukleotide, im Falle von Guanylatkinase ADP und GDP als Reaktionsprodukte der Guanylatkinasereaktion. Neben ATP und GTP wurden bei dieser Reaktion 2 Moleküle Pyruvat gebildet, die in einer darauf folgenden, durch das Enzym Lactatdehydrogenase katalysierten Reaktion unter Verbrauch von 2 Molekülen NADH + H<sup>+</sup> zu 2 Molekülen Lactat reduziert wurden. Im Gegensatz zu NADH absorbiert das während dieser Reaktion gebildete NAD<sup>+</sup> bei einer Wellenlänge von 340 nm fast nicht mehr und kann deshalb photometrisch nachgewiesen werden. Eine Einheit (Unit, U) ist definiert als die Menge an Guanylatkinase, die notwendig ist, um 1 µmol Phosphat in 1 Minute bei 25°C und pH 7,6 von ATP auf GMP zu übertragen.

Zu 0,5 ml an Assaypuffer (Zusammensetzung siehe Material) wurden jeweils 5 µl der Enzymlösung, und die Änderung der Absorption bei 340 nm (Absorptionsmaximum von NADH) und 25°C über einen Zeitraum von 3 bis 5 Minuten mit einem Uvikon 943-Photometer gemessen. Die Messung wurde unter sättigenden Bedingungen durchgeführt, d.h. im Assay waren alle Substrate im Überschuss vorhanden. Dadurch war eine lineare Abnahme der Absorption bei 340 nm im Anfangsbereich gewährleistet. Mit Hilfe einer eingebauten Software zur Berechnung von



zeitabhängigen Kinetiken war es dann möglich, aus dem linearen Bereich des Reaktionsablaufes die Steigung zu berechnen, die der Abnahme der Absorption pro Minute entsprach ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ). Die spezifische Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

Volumenaktivität in der Testlösung

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta A_{340} / \Delta t}{2 \cdot \epsilon \cdot d}$$

Volumenaktivität in Proteinprobe

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta A_{340} / \Delta t \cdot V}{2 \cdot \epsilon \cdot d \cdot v}$$

Die spezifische Aktivität bestimmt sich durch

Spezifische Aktivität = Volumenaktivität/Proteinkonzentration

und die Wechselzahl durch

$k_{\text{cat}} = \mu\text{mol (Substrat)} / (\mu\text{mol (Enzym)} \cdot \text{s})$

$\Delta A_{340}/\Delta t = \text{Absorptionsänderung pro Zeiteinheit}$

$\epsilon = \text{molarer Absorptionskoeffizient von NADH (6,2 mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ bzw. 6,2 cm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ bei 340 nm)}$

$d = \text{Lichtweg (Schichtdicke der Meßküvette) [cm] (i.a. 1 cm)}$

$V = \text{Reaktionsvolumen [ml]}$

$v = \text{Enzym-Probevolumen [ml]}$

$c = \text{Proteinkonzentration [mg/ml]}$

$U = \text{Enzym-Einheit, definiert als die Menge Enzym, welche die Umwandlung von 1 } \mu\text{mol GMP in GDP pro Minute unter den vorgegebenen Reaktionsbedingungen katalysiert.}$

### 3.2.4.2 Cdc25a Enzym-Assay

Die Aktivitätsbestimmung der Cdc25a wurde in Küvetten für 1 ml etabliert, und wurde anschließend routinemäßig ausgeführt als 200- $\mu\text{l}$ -Ansatz in Mikrotiterplatten.

Die Aktivität der Tyrosinphosphatase Cdc25a wurde über die Dephosphorylierung des Substrates sehr schwach gelben p-Nitrophenylphosphat (pNPP; Sigma-Aldrich) gemessen. pNPP ist ein farbloses Substrat, das zu dem leuchtend gelben p-Nitrophenol hydrolysiert, was zu einer Zunahme der Absorption bei 405 nm führt.

Für den Küvetten-Assay wurden 100  $\mu\text{l}$  Cdc25a mit 100  $\mu\text{l}$  100 mM DTT in Assaypuffer und 700  $\mu\text{l}$  Assaypuffer gemischt. Das DTT war unbedingt notwendig, um die Bindung des Substrates in das aktive Zentrum des Enzyms zu ermöglichen. Aufgrund der schlechten Stabilität von DTT in Lösung, musste es vor den Versuchen frisch zugesetzt werden. Der Assay wurde durch die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  0,5 M pNPP gestartet und die Messung der Absorption bei 405 nm über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen.

Für den Mikrotiterplatten-Assay wurden 20  $\mu$ l Cdc25a mit 20  $\mu$ l 100 mM DTT in Assaypuffer und 140  $\mu$ l Assaypuffer gemischt. Der Assay wurde durch die Zugabe von 20  $\mu$ l 0,5 M pNPP gestartet und die Messung der Absorption bei 405 nm über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Nach Baratte et al. [93]

Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren wurde der Mikrotiterplatten-Assay eingesetzt. Die Substanzen lagen in Stocklösung von 5 oder 10 mM in DMSO vor. Daten und Substanzen wurden von Michael Manger zur Verfügung gestellt.

### 3.2.5 SDS-Gele

#### 3.2.5.1 Nach Schägger

Das Gießen der Gele und die Elektrophorese erfolgten im Mini-ProteanII System von BioRad. Für die 12% Trenn- und 5% Sammelgele wurde folgendermaßen pipettiert (vgl. Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Pipettierschema für Schägger-Gel

	<b>12% Trenngel</b>	<b>5% Sammelgel</b>
<b>Wasser</b>	1,6 ml	1,45 ml
<b>Gelpuffer</b>	1,25 ml	0,6 ml
<b>ABA 49,5%</b>	0,9 ml	180 $\mu$ l
<b>10 % APS</b>	19 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l

Nach dem Gießen des Trenngels zwischen zwei durch 0,75 mm Spacer getrennte Glasscheiben des Systems wurde es bis zum Abschluss der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel wurde nach dem Entfernen des Isopropanols auf das Trenngel gegossen und ein 10er Kamm eingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde der Gelhalter in die Laufkammer eingesetzt. Die innere Gelkammer wurde mit Kathodenpuffer, die Laufkammer mit Anodenpuffer gefüllt. Nach dem Probenauftrag wurde das Gel bei 120 V bis zum Erreichen des unteren Glasrandes der Lauffront gefahren. Die Gele wurden dann aus der Apparatur entfernt und in Coomassie Blue für 15 Minuten bei RT gefärbt. Die Entfärbung erfolgte für eine Stunde bei RT in Entfärberlösung, anschließend wurden die Gele photographiert oder getrocknet.

#### 3.2.5.2 Nach Laemmli

Hier wurden die gleichen Apparaturen wie bei den Schägger-Gelen eingesetzt und auch ähnlich verfahren, allerdings wurden die 10% Trenn- und 5% Sammelgele nach folgendem Schema pipettiert (vgl. Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Mengen für Laemmli-Gel

	<b>10% Trenngel, 15 ml</b>	<b>5% Sammelgel, 5 ml</b>
<b>Wasser</b>	5,9 ml	3,4 ml
<b>1,5 M Tris (pH 8,8)</b>	3,8 ml	-
<b>1 M Tris (pH 6,8)</b>	-	0,63 ml
<b>10 % SDS</b>	0,15 ml	0,05 ml
<b>30% Acrylamid/Bisacrylamid</b>	5 ml	0,83 ml
<b>10 % APS</b>	0,15 ml	0,05 ml
<b>TEMED</b>	0,006 ml	0,005 ml

Sowohl die innere Gelkammer, wie auch die Laufkammer wurden mit SDS-Laufpuffer befüllt und das Gel wie ein Schagger-Gel gefahren und mit Coomassie Blue gefärbt. [94]

### 3.2.6 Tryptischer Verdau im Gel und in Lösung

Eine Portion von 25 µg lyophilisierten Trypsins wurde in 10 µl 1mM HCl (zur Stabilisierung) aufgenommen. Das mit Verdauopuffer verdünnte Protein wurde so mit Trypsin versetzt, dass auf 50 µg Protein 1µg Trypsin kam. Dabei ist darauf zu achten, dass evtl. vorhandener Harnstoff auf unter 1 M Konzentration in der Probe verdünnt wird, da Trypsin bis zu dieser Harnstoffkonzentration noch effektiv arbeiten kann. Der Ansatz wurde für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Für den In-Gel-Verdau wurde die interessierende Bande aus dem Gel ausgestochen und zunächst mit 20 µl Acetonitril bedeckt. Die nächsten 10 Minuten wurde das Einschrumpfen bei Raumtemperatur durch Schütteln unterstützt. Der Überstand wurde abgenommen und das Gelstück mit 20 µl 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung versetzt. Nach fünf Minuten wurden 20 µl Acetonitril hinzugefügt und für weitere 15 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde vom gewaschenen Gelstück abgenommen und dieses für 30 Minuten in der Speed-Vac getrocknet. Die getrocknete Probe wurde für 45 Minuten bei 56°C mit 20 µl 10 mM DTT-Lösung (in 100 mM Ammoniumbicarbonat) zur Spaltung der Cystein-Schwefelbrücken aufgeschwemmt. Anschließend wurde die DTT-Lösung entfernt und das Gel wieder mit 20 µl Acetonitril für fünf Minuten geschrumpft. Das Acetonitril wurde gegen 20 µl 55 mM Jodacetamidlösung (in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat) ersetzt und die SH-Gruppen für 20 Minuten im Dunklen alkyliert. Nach Absaugen der Iodacetamidlösung wurde die Probe mit 20 µl 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung für fünf Minuten gewaschen und anschließend wieder mit 20 µl Acetonitril für fünf Minuten geschrumpft. Nach Entfernen des Acetonitrils wurde das Gelstück für 30 Minuten in der Speed-Vac getrocknet.

Die so vorbereiteten Gelstücke wurden nun mit 20 µl Verdauopuffer (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 12,5 ng/µl Trypsin, Sequencing grade) versetzt. Während des 45-minütigen Aufquellens des Gelstückchens im Verdauopuffer wurde der Ansatz auf Eis gehalten, um ein Starten des Trypsinverdau zu vermeiden. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurde der Überstand abgesaugt und

das Gelstück mit möglichst wenig (5 bis 20  $\mu\text{l}$ ) Verdauopuffer ohne Trypsin versetzt. Der Verdau erfolgte übernacht bei 37°C.

Ein kleiner Teil (0,5 $\mu\text{l}$ ) des Überstandes wurde nach dem Verdau für die MALDI-Messung abgenommen, der Rest wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Um eine möglichst große Menge für die Nanospray-MS zu erhalten, wurde nun möglichst viel Peptid aus dem Gel extrahiert. Dazu wurde das Gelstück mit 20  $\mu\text{l}$  einer wässrigen 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung bedeckt, für 15 Minuten bei RT inkubiert und der Überstand mit dem Überstand aus dem Übernacht-Verdau vereinigt. Eine weitere Extraktion erfolgte durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  5% Ameisensäure für 15 Minuten, die wieder zu einem Anschwellen des Gels führte und Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Acetonitril für 15 Minuten, das zu einem Schrumpfen des Gelstücks führte. Die erhaltene Lösung mit den Peptiden wurde wiederum mit den beiden zuvor abgenommenen Überständen vereinigt. Der gesamte Ansatz wurde nun bis zur Trockene in der Speed-Vac behandelt (etwa 2 Stunden lang).

Nach Shevchenko, Mann [96].

### **3.2.7 Untersuchung der tryptischen Fragmente in der Nano-Elektrospray-Massenspektrometrie**

Die Nano-Elektrospray-Massenspektrometrie (Nano-ESI-MS) stellt eine einfache Modifikation der Elektrospray-Massenspektrometrie dar [14]. Bei der Nano-ESMS ist der Durchmesser der Nanospray-Kapillare auf wenige Mikrometer reduziert, folglich sind freigesetzte Nano-Elektrospray-Tropfen sehr viel kleiner im Vergleich zur ES-MS. Je kleiner der Tropfen, desto geringer ist der Salzgehalt/Tropfen. Salzaddukte stellen ein großes Hindernis bei der Beurteilung von Massenspektren dar. Mit der Nano-ESMS ist es jedoch möglich, Peptide und Proteine in wässrigen Lösungen, ohne Zugabe von organischen Lösungsmitteln, im nativen Zustand zu untersuchen.

Nano-ESMS zur Untersuchung von Proteinen und zur Bestimmung der peptischen Fragmente aus dem tryptischen Verdau von Proteinen eingesetzt, um sicherzustellen, dass tatsächlich das gewünschte Protein aufgereinigt wurde.

Die NS-MS wurde mit einem Finnigan LCQ Massenspektrometer, ausgerüstet mit einem Mikromanipulator für die korrekte Positionierung der Nanospray-Nadel, durchgeführt. Die aus dem tryptischen Verdau erhaltenen Peptide wurden in 5  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen. Zu untersuchende Proteine wurden dialysiert und in Wasser, bzw. Ammoniumacetatpuffer aufgenommen. Die Nanospray-Nadeln wurden nach Protokoll von [97] angefertigt und mit 1 bis 2  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden wässrigen Protein- bzw. Peptidlösung gefüllt. Sie wurden dann auf dem Mikromanipulator fixiert und in die Nähe des Eingangs des MS gebracht. Zur Initialisierung des Elektrosprays wurde zunächst ein Tropfen der Probe pneumatisch aus der Nadel herausgedrückt und anschließend eine Spannung von 900 V angelegt. Ein im MS-Mode entdecktes Peptid wurde der ms/ms-Untersuchung unterzogen, um Aussagen über die Peptidsequenz zu erhalten. Die Auswertung erfolgte mit der Xcalibur Software und dem darin angeschlossenen „sequest search“.

### 3.2.8 Untersuchung der tryptischen Fragmente mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Eine weniger aufwendige Möglichkeit zur Ermittlung von Protein- und Peptidmassen ist die Messung im MALDI-TOF-Massenspektrometer. Dazu wurden die 0,5 µl Lösung aus dem tryptischen Verdau mit 4 µl gesättigter  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure in 0,1 % TFA/Acetonitril (2:1) gemischt. Ein Mikroliter der Mischung wurde auf ein Feld des MALDI-MS-Probensträgers aufgegeben und bei RT getrocknet. Nach dem Trocknen wurden 2 µl eiskalte 0,1% TFA-Lösung aufgegeben, um die Probe von eventuellen Salzresten zu waschen. Der Tropfen wurde umgehend mit der Eppendorfpipette wieder abgesaugt. Durch diese Prozedur wurde die Empfindlichkeit der Messung erhöht, denn auch bei der MALDI-TOF-MS wirken sich Salze ungünstig auf die Messempfindlichkeit aus. Zur Erhöhung der Genauigkeit bei der Auswertung der Messungen wurde neben die Peptidprobe ein Standard aufgetragen, bestehend aus Bradykinin (904,4681 Da), Angiotensin I (1296,6853 Da), Glu-Fibrino-Pep B (1570,6774 Da), ACTH (1-17) + (18-39) + (7-38) (2093,0867 + 2465,1989 + 3657,9294 Da) und bovinem Insulin (5730,6087 Da). Mithilfe der Spektren dieser Mischung wurden die Spektren des tryptischen Verdau in der Software „Data Explorer“ kalibriert. Die Auswertung der Peptidpeaks aus den Spektren erfolgte durch die MS-Fit-Datenbank der UCSF (<http://prospector.ucsf.edu/>).

## 3.3 METHODEN ELEKTROSPRAY-ASSAY

### 3.3.1 Kopplung von Protein an POROS EP

Das zu immobilisierende Protein wurde in Natriumphosphatpuffer umgepuffert und die Proteinmenge mit dem Bradford-Assay bestimmt. Auf 50 mg POROS EP wurde 1-4 mg Protein gegeben, welches zuvor mit dem gleichen Volumen EP high salt Puffer versetzt wurde. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei RT unter Schütteln wurde in 500 µl-Schritten das 0,9 fache Volumen an EP high salt Puffer zugefügt und der Ansatz jeweils für weitere 5 Minuten bei RT unter Schütteln inkubiert. Durch die Zugabe hoher Salzkonzentrationen wird das Protein an der reaktiven Oberfläche des POROS ausgesalzt und steht so der Immobilisierungsreaktion besser zur Verfügung [43]. Nach dem Erreichen der Endkonzentration an Salz von 1,1 M wurde der Ansatz 16 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Aufbewahrung bei 4°C musste der Ansatz 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt werden, damit das Natriumsulfat nicht auskristallisieren und dadurch die Proteine und das Material zerstört werden konnten. Nach BioPerseptive [49].

### 3.3.2 Kontrolle der Immobilisierung mit SDS-Page

Von dem mit Protein modifizierten POROS-Material wurden 20  $\mu\text{l}$  abgenommen und, mit 20  $\mu\text{l}$  2x SDS-Probenpuffer versetzt, für fünf Minuten bei 95° gekocht. Durch diese Behandlung löste sich die Bindung des Proteins an das POROS-EP. Nach kurzer Zentrifugation (30 sec, 13000 rpm, Eppendorftischzentrifuge) wurden 10  $\mu\text{l}$  des Überstands auf ein 10 % Schägger-Gel aufgetragen und das Gel nach den üblichen Bedingungen gefahren und mit Coomassie Blue gefärbt. Um das Protein zuordnen zu können, wurden die üblichen Standardproteine auf das Gel mit aufgetragen.

### 3.3.3 Befüllen der Säulen

Als Laufpuffer wurde 0,1 mM Ammoniumacetat in H<sub>2</sub>O mit pH 7,2 verwendet, da Ammoniumacetat als leichtflüchtiges Salz in der Massenspektrometrie nicht stört.

Die 3-cm- (Durchmesser 3mm) oder 10-, bzw. 2-cm- Säulen, (Durchmesser 1mm), wurden mit Hilfe einer analytischen Säule (Durchmesser 4mm) und einer Kontron-Pumpe befüllt. Es wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  aufgeschlammtes Protein-beladenes POROS EP eingefüllt und mit einer Flussrate von 500 ml/min Wasser in die Säule gespült, bis diese vollständig gefüllt war. Die fertige Säule wurde vor dem Einsetzen in das HPLC-MS System mithilfe einer alten HPLC-Pumpe eine halbe Stunde mit Milliporewasser gespült, um den Hochsalzpuffer zu entfernen, der sonst im Massenspektrometer ausgefallen wäre.

### 3.3.4 Durchführung der Bindungsstudien

Zur Durchführung der Bindungsstudien wurde zunächst das HPLC-MS-System bestehend aus dem Agilent 1100 HPLC-System und dem Finnigan LCQ-Deca Elektrospray Quadrupol Massenspektrometer eingesetzt. Durch eine Neuanschaffung war es zu einem späteren Zeitpunkt möglich, das Agilent 1100 HPLC-System mit dem Finnigan LTQ Elektrospray Quadrupol Massenspektrometer mit einer neuartigen Ionenfalle zu verwenden. Die Säule wurde in den Säulenwechsler der HPLC eingebaut und mit Puffer für eine halbe Stunde gespült. Als Laufpuffer wurde 0,1 mM Ammoniumacetat, mit Ammoniak auf pH 7,2 eingestellt, verwendet. Für Auftragsvolumen von 100  $\mu\text{l}$  und kleiner wurde der Autosampler verwendet, für Auftragsvolumen von über 100  $\mu\text{l}$  zunächst ein manueller Injektor (Rheodyne). Durch ein neues HPLC-System der 1100er Serie von Agilent wurde es möglich, über den Autosampler Probenvolumina von bis zu 500  $\mu\text{l}$  aufzugeben. Die eingesetzten Substanzen wurden in Wasser gelöst, bzw. deren Stocklösungen in Wasser verdünnt und in Konzentrationen zwischen 1 und 500  $\mu\text{M}$  je nach Ligandenart verwendet. Es wurde wahlweise eine fused silica Kapillare oder ein Metall-Needle-Kit im ESI-Kopf verwendet. Die Messungen wurden bei RT mit 0,05 ml/min Flussrate durchgeführt.

### 3.3.5 High-Throughput Gelfiltrations-Liganden-Protein-Bindungstests

Diese Experimente wurden von Dr. Sascha Sauer am MPI für molekulare Genetik in Berlin durchgeführt. Das Protein und sein zu testender Ligand (oder die Mischung von Liganden) wurden äquimolar gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die DMSO-Konzentration betrug in der Probe etwa 2%. Die Gelfiltrationssäulen wurden zunächst mit 200µl 100% Methanol befeuchtet und anschließend mit 200µl Milliporewasser äquilibriert. Die Flüssigkeit wurde durch Anlegen eines Vakuums abgesaugt. Vor dem Auftrag wurden die Proben noch mit 50µl Bindungs-/Waschpuffer versetzt. Auf die äquilibrierten Säulen wurden nun die Proben aufgetragen und ebenfalls durch die Säule gesaugt. Die austretende Flüssigkeit wurde aufgefangen ("Binderfraktion"). Die Säulen wurden jetzt mit 50µl Puffer gewaschen und anschließend die "Nichtbinderfraktion" mit 25 und 10 µl Methanol eluiert und aufgefangen. Die "Binderfraktion" enthielt das Protein und wurde für 10 min bei 95° inkubiert. Die denaturierte Binderfraktion wurde auf frische Gelfiltrationssäulen aufgetragen, die mit je 200 µl Methanol und 200µl Wasser vorbehandelt waren. Nach dem Probenauftrag wurden die Säulen mit 50 µl Puffer gewaschen und anschließend in zwei Schritten mit 25 und 10µl Methanol eluiert und das Eluat aufgefangen. Die Proben wurden in der SpeedVac getrocknet.

### 3.3.6 Quantifizierung der Gelfiltrations-Bindungstests

Das System zur Evaluierung der Proben bestand aus der Agilent 1100 HPLC und dem ThermoFinnigan LTQ Massenspektrometer. Es wurde eine C8-Säule mit einem Gradienten von 30-90% Acetonitril/Wasser mit 0,1% Ameisensäure gefahren. Die Proben wurden in der entsprechenden Menge 50% Methanol aufgenommen, um eine 10 µM Lösung zu erhalten. Zur Quantifizierung wurde direkt vor der Messung der Proben eine Kalibrierkurve aufgenommen. Dazu wurden Lösungen der Substanzen zu 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM hergestellt. Von den ersten drei Lösungen wurden jeweils 10, 20 und 50 µl injiziert, von der 10 µM Lösung nur 10 µl. So wurden Substanzmengen von 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 pmol auf die Säule aufgegeben. Von den Proben wurden 10 µl einer 2 µM und 5 µM Verdünnung aufgegeben.

### 3.3.7 Speed Screen

Die Experimente wurden von der Arbeitsgruppe Mayr/Zehender bei Novartis in Basel, wie in der Veröffentlichung dargestellt, durchgeführt. [53]

## **3.4 MALDI-ASSAY**

### **3.4.1 Immobilisierung**

#### **3.4.1.1 Goldplatten**

Zunächst wurden die goldbeschichteten Platten der Firma Applied Biosystems mit Isopropanol gründlich gewaschen und dann für 20 Minuten in 0,01M DTSP in Isopropanol verbracht. Anschließend wurde nach gründlichen Waschen in Isopropanol und Ethanol die Proteinlösung in Immobilisierungspuffer aufgetragen, und zwar 2  $\mu$ l 1mg/ml Protein pro well. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssiges Protein wurde zunächst mit reichlich eiskaltem Bindungspuffer abgewaschen. Die Platte war dann bereit für den Bindungstest und wurde bei 4°C in einer feuchten Kammer gelagert (modifiziert nach Fenselau und Bundy, 1999 und Nelson et al 1999 und Randall et al, 1999; Brockmann A.H. und Orlando R, 1995). [17, 18, 20, 22]

#### **3.4.1.2 Blattgold**

Das Blattgold wurde mittels doppelseitigen Klebebands auf einer Laserdruckerfolie befestigt. Zunächst wurde die Beschichtung der Goldoberfläche für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Lösung von 40  $\mu$ M Mercaptopropionsäure in 75% Ethanol p.a. in Wasser durchgeführt. Diese Beschichtung wurde nach Waschen der Oberfläche mit 10 ml 75% Ethanol und mit 10 ml Phosphatpuffer mit 50 mM NHS und 2 mM EDC in Phosphatpuffer für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur aktiviert. Dann wurde die Lösung mit einer Pipette entfernt und die Proteinlösung (Protein in Phosphatpuffer) aufgegeben. Die Kopplung des Proteins erfolgte für etwa 16 Stunden bei 4°C. Vor der Verwendung im Bindungstest wurde die Oberfläche mit dem entsprechenden Assaypuffer gespült. [25, 26, 27]

Bei einer zweiten Methode wurde die Thiol-SAM nicht aktiviert, sondern das Protein direkt aufgegeben und dann quervernetzt. Zur Quervernetzung wurden 100  $\mu$ l 25 % Glutaraldehyd auf die Proteinprobe bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Das Glutaraldehyd wurde mit Wasser nach einer halben Stunde wieder abgewaschen. Vor der Verwendung im Bindungstest wurde die Oberfläche mit dem entsprechenden Assaypuffer gespült. [26]

#### **3.4.1.3 Mit Poly-L-Lysin beschichteter Laserdruckerfolie**

Mit Hilfe des Laserdruckers wurde ein Probenplatzmuster auf der Folie aufgebracht. Die Folie wurde in Größe eines MALDI-Probentellers zurechtgeschnitten. Für die Poly-L-Lysin-



Beschichtung wurde ein Folienstück für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in 2 ml wässrige Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) inkubiert. Nach dem Abwaschen des Poly-L-Lysins mit Proteinpuffer wurden je 2 µl der Proteinlösung (0,1 mg/ml Streptavidin) pro Probenposition aufgegeben und die Folie über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C aufbewahrt. Das Protein wurde mit 250 µl 25% Glutaraldehydlösung pro Folie für eine Stunde bei Raumtemperatur quervernetzt. [32]

#### **3.4.1.4 Nitrocellulose**

Ansatz 1: Ein etwa 2x2 mm großes Stück Nitrocellulose wurde unbehandelt auf den Träger geklebt. Auf die Nitrocellulose wurden Probenmarkierungen mit Bleistift angebracht.

Ansatz 2: 10 mg Nitrocellulose wurden in 1 ml Aceton aufgenommen und mit dieser Lösung eine dünne Schicht auf eine glatte Metalloberfläche gegossen. Diese Nitrocelluloseschicht wurde nach dem Trocknen auf den MALDI-Probenträger geklebt. Zunächst wurde die Nitrocelluloseschicht mit Proteinpuffer angefeuchtet und überschüssiger Puffer abgeschüttelt. Mit einem Bleistift wurden Probenmarkierungen angebracht. Das Protein wurde in der gewünschten Konzentration in seinem Puffer mit den entsprechenden Zusätzen (Methanol, NP40) verdünnt und 10 µl der Lösung auf die feuchte Oberfläche aufgetragen.

Die Kontrolle der Immobilisierung erfolgte mit Färbung durch Ponceau Red.

### **3.4.2 Bindungstest**

#### **3.4.2.1 Goldträger-DTSP**

Die mit Protein modifizierte Platte wurde mit reichlich Bindungspuffer gewaschen. Pro well wurden je 1 µl 10 mM Biotin in Bindungspuffer aufgegeben und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit viel Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Auf jedes well wurde dann 0,5 µl der dem Liganden entsprechenden Matrix aufgegeben und nach dem Trocknen das MALDI-Spektrum aufgenommen. Bei bestimmten Proben musste vor Auftrag der Matrix mit 1 µl organischem Lösungsmittel denaturiert werden.

Für den GDP/GTP-Austausch mit immobilisiertem Ras wurde GTP-beladenes V12Ras immobilisiert. Dann erfolgte nach Waschen mit Ras-Puffer folgender Ansatz in einer Zeitreihe: Ras-Puffer + 5 mM GDP + 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 5 mM SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Durch Eintauchen in eiskaltes Wasser wurde überschüssiges Nukleotid abgewaschen. Mit einem 1 µl Isopropanol wurde Ras denaturiert (nicht abwaschen!), dann die THAP-Matrix aufgegeben.

#### **3.4.2.2 Blattgold-MPA**

Für den Bindungsassay an dem mit MPA-immobilisierten Protein wurden jeweils 2 µl Lösung der Verbindung (im Puffer des Proteins, bei Cdc25a 50 mM Tris, 50 mM NaCl und 1 mM DTE mit pH 8) auf den Proteinpunkt aufgegeben. Dem Liganden wurde nun eine Stunde bei 4°C in einer feuchten Kammer Zeit gegeben an das Protein zu binden. Der überschüssige Ligand wurde

anschließend durch einmal Waschen mit 0,1% NP-40 und durch zweimaliges Waschen mit Wasser für jeweils 5 Minuten unter Schütteln entfernt. Nach dem Trocknen der Oberfläche wurde 1 µl Matrixlösung (10 mg/ml DHB in 50% Acetonitril und 0,1 % TFA in Wasser) aufgetragen. Es durfte sich keine Flüssigkeit mehr an der Folie befinden, da ein Einbringen von Flüssigkeit dem MALDI-TOF mit seinem Hochvakuum schaden würde. Die Trägerfolie mit dem Blattgold wurde mit doppelseitigem Klebeband auf den Probenhalter befestigt. Sobald die Matrix getrocknet war, wurden die Messungen im Voyager DE PRO unter Standardbedingungen im positive mode durchgeführt.

### 3.4.2.3 Auf Nitrocellulose

Nach der Immobilisierung des Proteins wurde auf die Nitrocellulose jeweils ein Mikroliter einer 1 mM molaren Lösung der zu testenden Substanz aufgegeben. Dazu wurde die Verbindung im für das Protein optimalen Bindungspuffer plus den die Oberfläche benetzenden Zusätzen aufgenommen. Bei Cdc25a war das ein Puffer aus 50 mM Tris, 50 mM NaCl und 1 mM DTE mit pH 8. Biotin wurde in PBS aufgenommen. Während der Inkubationszeit von einer Stunde bei 4°C wurde die Nitrocellulose in einer feuchten Kammer aufbewahrt, um ein Austrocknen der Oberfläche zu vermeiden. Die Nitrocellulose wurde anschließend zweimal im Bindungspuffer und einmal in PBS ohne S mit 0,1 % NP-40 für jeweils 5 Minuten unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach dem Trocknen der Nitrocellulose an der Luft bei Raumtemperatur wurde ein Mikroliter der Matrixlösung (10 mg/ml DHB in 50% Acetonitril und 0,1 % TFA in Wasser) aufgetragen. Die Messung erfolgte im Voyager DE PRO im positive unter Standardbedingungen.

### 3.4.2.4 Laserdruckerfolie

Auf der mit Streptavidin-beladener Laserdruckerfolie wurde der der Bindungstest mit Biotin durchgeführt. Auf die Proteinpunkte auf der Folie wurde für eine halbe Stunde lang eine Lösung aus 1 mM Biotin in PBS ohne S bei Raumtemperatur gegeben. Um den überschüssigen Liganden zu entfernen, wurde einmal mit 0,1% NP-40 und zweimal mit Wasser für fünf Minuten unter Schütteln gewaschen. Nach dem Trocknen an der Luft wurden die Proteinpunkte mit je 1 µl Matrixlösung (1mg/ml DHB in 50% Acetonitril und 0,1 % TFA in Wasser) versetzt. Nach dem Trocknen wurde die Folie mit Leit-C auf den MALDI-Probenhalter aufgeklebt. Die Messungen wurden im Voyager DE PRO im positive mode durchgeführt.

### Standardbedingungen MALDI-TOF

Geräteeinstellungen:

Voltage:	Accelerating	20000V
Grid	76	
Guide Wire	0,002	
Delay Time	100 nsec	
Mass Range:	100-400 Da	
Low Mass Gate:	aus	
Mode:	Positive oder negative Ion Mode, Reflector	

#### **3.4.2.5 MALDI-Messungen mit den selbsthergestellten Trägern**

Die vergoldeten Träger wurden mit Leitpaste-C (nach Göcke) auf einen MALDI Stahlprobenteller geklebt und unter Vakuum getrocknet, bis das Lösungsmittel komplett verdampft war. Ein  $\mu\text{l}$  einer Testprobe wurde mit einem  $\mu\text{l}$  Matrix vermischt, auf den Träger pipettiert und getrocknet. Dann erfolgte die MALDI-Messung unter Standardbedingungen.

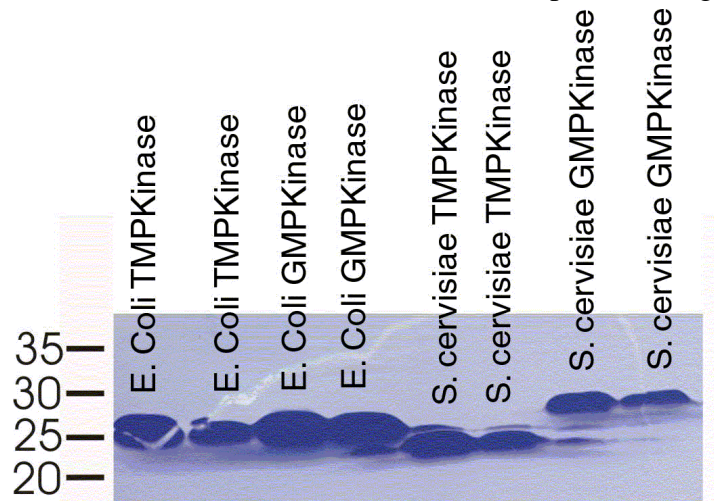


# 4 Ergebnisse

## 4.1 PROTEINEXPRESSION

### 4.1.1 Mononukleotid-Kinasen

Die Expression der Mononukleotidkinasen erfolgte mit Unterstützung von M. Konrad in seinem Labor am MPI für Biophysik in Göttingen. Die verwendeten Plasmide wurden in M. Konrads Arbeitsgruppe kloniert. Es wurden die TMP- und GMP-Kinasen des Menschen, von *S. cerevisiae* und *E. coli* expremiert und auf ihre Aktivität hin getestet. Auf den Gelbildern ist jeweils die erste und zweite Fraktion der Proteinaufreinigung zu sehen. Die humane TMP-Kinase liegt als GST-Fusionsprotein, die anderen Mononukleotidkinasen liegen als His<sub>6</sub>-Tag Proteine vor. Entsprechend wurden unterschiedliche Aufreinigungsprotokolle (siehe 2.5.2.3) genutzt. Die His-Tag-Proteine wurden über Nickel-NTA komplexiert und anschließend mit Imidazol eluiert. Das GST-Fusionsprotein wurde durch Glutathion-Sepharose affin gebunden und durch Schneiden mit Thrombin eluiert. Die Thrombin-Schnittstelle liegt dabei zwischen GST und dem gewünschten Protein, so dass der GST-Teil des Fusionsproteins wegfällt.



**Abbildung 20:** SDS-PAGE der Mononukleotidkinasen nach der Aufreinigung, die Beschriftung über den Banden zeigt an, um welche Mononukleotidkinase es sich jeweils handelt.

Die spezifische Aktivität der Proteine liegt im durchschnittlichen Bereich [62]. Die spezifische Aktivität eines Proteins ist die Menge Protein, die benötigt wird. In der nachfolgenden Tabelle 4 ist ein Überblick über die Berechnung der spezifischen Aktivität der expremierten Mononukleotidkinasen dargestellt.

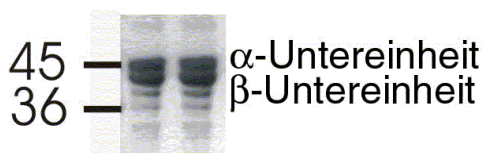
**Tabelle 4:** Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten Mononukleotidkinasen

Protein	Konzentration $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Eingesetzte Menge $\mu\text{g}$	$\Delta$ Absorption/min	Volumen- aktivität U/ml	Spez. Ak- tivität U/mg
HsTMPK	7,1	35,5	0,17	0,0137	0,002
HsGMPK	3,6	18	0,11	0,0089	0,0024
ScTMPK	1,2	6	0,74	0,059	0,5
ScGMPK	0,67	3,5	0,34	0,0274	0,041
EcTMPK	4,6	23	0,63	0,051	0,012
EcGMPK	2,8	14	0,41	0,033	0,012

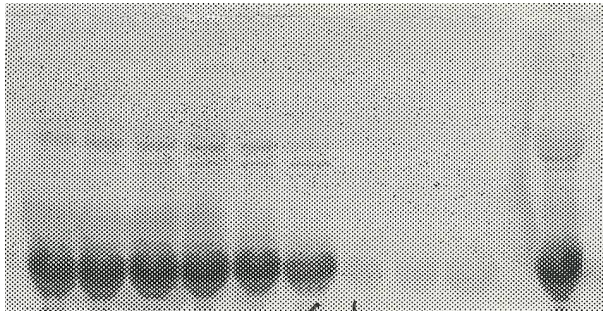
Zur Immobilisierung an POROS-EP sind diese Proteine somit hervorragend geeignet.

#### 4.1.2 Farnesyltransferase

Die Farnesyltransferase wurden mit Unterstützung von J. Kuhlmann und Ch. Nowak im Labor von J. Kuhlmann am MPI für molekulare Physiologie, Dortmund, expremiert. Der Klon stammt aus ihrer Arbeitsgruppe. Die Farnesyltransferase besteht aus einer  $\alpha$ -und einer  $\beta$ -Untereinheit (Abbildung 21). Da hier ohne Affinitätstag gearbeitet wurde, ist die Reinheit etwas schlechter als die der Mononukleotidkinasen.

**Abbildung 21:** SDS-PAGE der Farnesyltransferase nach der Aufreinigung.

Die Aktivität wurde in der Arbeitsgruppe Kuhlmann von Ch. Nowak bestimmt, allerdings nur qualitativ, so dass hier keine genauen Aussagen getroffen werden können. Zu sehen ist in dem Gel das durch Farnesyltransferase mit einem fluoreszierenden NBD-Prenylrest markierte Ras. Die Bande 1 bis 9 (Abbildung 22) zeigt dabei die Fraktionen nach der Gelfiltrationschromatographie. In den ersten sechs Fraktionen ist nach diesem Gel die meiste aktive Farnesyltransferase eluiert. In Bande 10 wurde zum Vergleich ein mit fluoreszierendem Farnesyl-markiertes Ras aus einer vorhergehenden Expression aufgetragen. Allerdings ist das vorliegende Protein für eine Immobilisierung an Goldoberflächen und POROS-EP absolut ausreichend gewesen.



**Abbildung 22:** Ergebnis der Fluoreszenzmessung der SDS-PAGE nach Aktivitätstest der Farnesyltransferase. Die leuchtenden Punkte sind das NBD-Prenyl-markierte H-Ras. Bande 1 bis 9: 1. bis 9. Fraktion der Gelfiltration; Bande 10: Positivkontrolle.

### 4.1.3 Cdc25a

Zunächst wurde versucht cdc25a nativ aufzureinigen. Allerdings bildeten sich Inclusion bodies, bestehend aus in Wasser unlöslichem Protein, die sich durch 8 M Harnstoff wieder in Lösung bringen liessen. Die Bildung der Inclusion bodies liess sich aber auch als erster Reinigungs- und Konzentrierungsschritt nutzen. So konnten die Inclusion Bodies nach der Aufreinigung durch Zentrifugation pelletiert und das Pellet mit 8M Harnstoff in Lösung gebracht werden. Es zeigte sich jedoch, dass sich auch mit dem direkten Zellaufschluss durch 8 M Harnstoff Cdc25a in genügend hoher Reinheit gewinnen liess, wie die SDS-PAGE in Abbildung 23 zeigt. Dies hatte den Vorteil, dass sich Cdc25a ständig in Lösung befand und nicht auf den NTA-Beads bei der Aufreinigung ausfallen konnte. Betrachtet man die Protokolle bei Veröffentlichungen zur Aufreinigung von Cdc25a wie die von Loukaci et al [99], so zeigt sich, dass Cdc25a als GST-Fusionsprotein wasserlöslich ist und sich nativ aufreinigen lässt. Die Umklonierung zu einem GST-Fusionsprotein wäre also eine Alternative zur Aufreinigung in 8 M Harnstoff. Die Bande des Cdc25a ist auf dem SDS-Gel (Abbildung 23) in etwa der Höhe des Standards bei 66 kDa auszumachen; Cdc25a hat eine molare Masse von etwa 59 kDa.



**Abbildung 23:** SDS-PAGE von Cdc25a-Phosphatase nach der Aufreinigung. Bande 1: Aufschluss; Bande 2: 1. Elution von NTA-Beads, Bande 3: 2. Elution von NTA-Beads; Bande 4: Durchfluss beim Auftrag des Zellaufschluss' auf die NTA-Beads

Die zweite Bande unterhalb von 66 kDa ist wahrscheinlich ein Abbauprodukt des Proteins. Dennoch lag die Reinheit höher als die des kommerziellen Herstellers.

Zur Überprüfung, dass es sich bei dem Protein um Cdc25a handelt, wurde ein tryptischer Verdau mit anschließender MALDI-TOF-MS und Nanospray-MS Analyse durchgeführt. Nach einer Verdünnung des Harnstoffs auf 2 M stellt dieser laut Angaben des Herstellers kein Problem für die Aktivität der Protease dar. Die Analyse der Fragmente wurde mit Protein Prospector durchgeführt. Die Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen die MALDI-Spektren des tryptischen In-Gel-Verdaus des expremierten Proteins mit der Zuordnung der Peaks zu den möglichen tryptischen Fragmenten der Phosphatase.

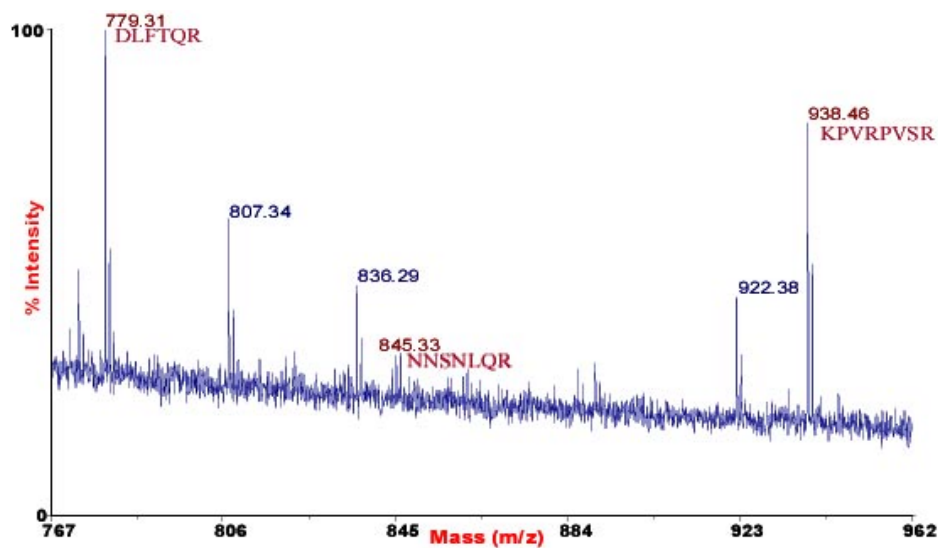


Abbildung 24: MALDI-Spektrum des tryptischen Verdaus von Cdc25a Massenbereich 767 - 962 Da

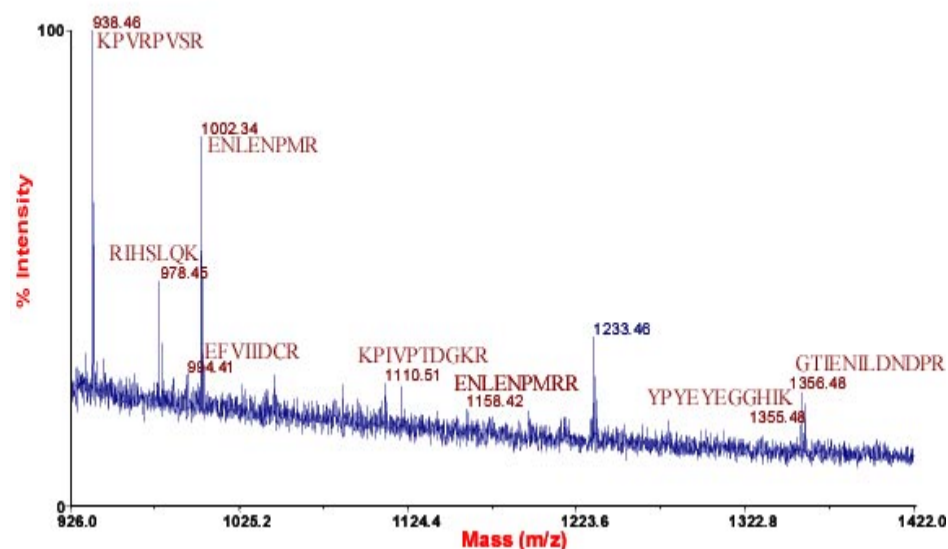
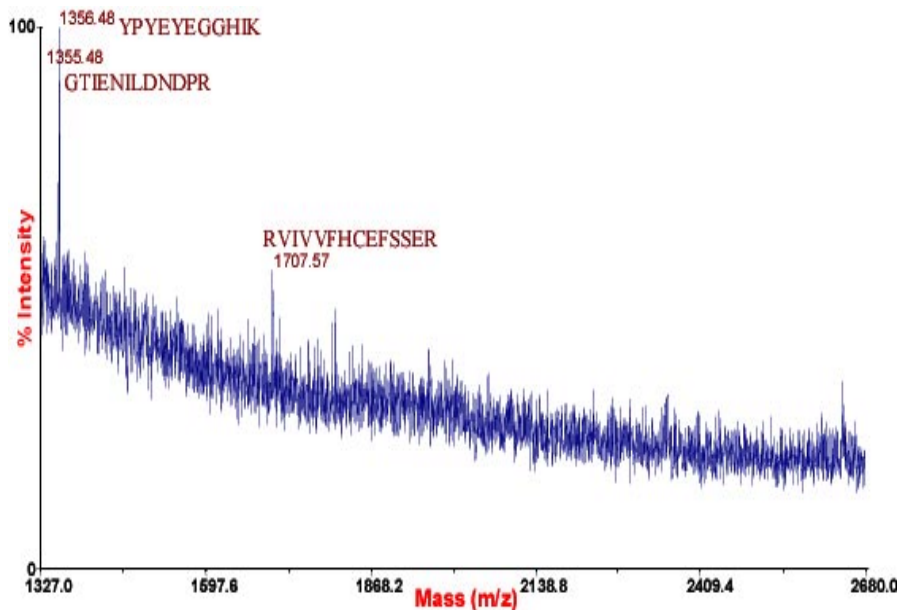


Abbildung 25: MALDI-Spektrum des tryptischen Verdaus von Cdc25a Massenbereich 962 - 1422 Da





**Abbildung 26:** MALDI-Spektrum des tryptischen Verdaus von Cdc25a Massenbereich 1327 - 2680 Da

In Tabelle 5 ist die Zuordnung der ms/ms-Spektrum gefundenen Massen zu den Peptidsequenzen des tryptischen Verdaus von Cdc25a aufgelistet.

**Tabelle 5:** Zuordnung der im MALDI-Spektrum gefundenen Massen zu den Peptidsequenzen des tryptischen Verdaus des exprimierten Cdc25a

Theoretische Masse [Da]	Gefundene Masse [Da]	Position in der AS-Sequenz	Peptidsequenz
779,40	779,31	169-174	DLFTQR
845,42	845,33	66-72	NNSNLQR
938,59	938,46	149-156	KPVRPVS
978,58	978,45	103-110	RIHSLPQK
994,50	994,41	378-385	EFVIIDCR
1002,47	1002,34	95-102	ENLENPMR
1110,66	1110,51	414-423	KPIVPTDGKR
1158,57	1158,42	95-103	ENLENPMRR
1355,62	1355,48	386-396	YPYEYGGHIK
1356,68	1356,48	323-334	GTIENILDNDPR
1707,86	1707,57	423-436	RVIVVFHCEFSSER

Zusätzlich zu der MALDI-Messung wurde eine Nanospray-Messung am Ionenfallen-MS durchgeführt. Bei der anschließenden Analyse mit Sequest Search wurden von 10 aufgenommenen MS/MS-Spektren 6 der Cdc25a-Phosphatase zugeordnet. Die restlichen MS/MS-Spektren waren nicht aussagekräftig genug, um sie einem Protein zuzuordnen zu können. Jedoch sind die sechs gefundenen Peptide mehr als ausreichend, um das untersuchte Protein definitiv als Cdc25a zu bestimmen.

```

database=C:\Xcalibur\database\human.fasta, accession=gij4502705|ref|NP_001780.1|
peptide(s)=AHETLHQSLSLASSPK ENLENPMR IHSLPQK YPYEYEGGHIK KPIVPTDGK RIHSLPQK
Analyzing ...
>gij4502705|ref|NP_001780.1| cell division cycle 25A_gij266556|sp|P30304|MP11_HUMAN M-PHASE INDUCER
PHOSPHATASE 1_gij105590|pir||A41648 protein-tyrosine-phosphatase (EC 3.1.3.48) cdc25A -
human_gij180171|gb|AA58415.1| (M81933) putative [Homo sapiens] [MASS=58796]
MELGSPAPR RLLFACSPPP ASQPVVKALF GASAAGGLSP YTNLTVTMDQ LQGLGSDYEQ PLEVKNNSNL QRMGSSESTD
SGFCLDSPGP LDSKENLENP MRRRIHSLPQK LLGCSPALKR SHSDSLDHD I FQLIDPDENK ENEAFEFKKP VRPVSRGCLH
SHGLQEGKDL FTQRQNSAQL GMLSSNERDS SEPGNFIFLF TPQSPVTATL SDEDDGFVDL LDGENLKNEE ETPSCMASLW
TAPLVMRTTN LDNRCKLFDS PSLCSSSTRS VLKRPERSQE ESPPGSTKRR KSMMSGASPKE STNPEK AHETLHQSLSLASS
PKGTIENILD NDRDLIGDF SKGYLFHTVA GKHQDLKYIS PEIMASVLNG KFANLIKEFV IIDCRYPYEY EGGHIK GAVN
LHMEEEVEDF LLK KPIVPTD GKRIVVFHC EFSSERGRPM CRYVRERDRL GNEYPKLHYP ELYVLKGGYK EFFMKCQSYC
EPPSYRPMHH EDFKEDLKKF RTKSRTWAGE KSKREMYRSL KKL
>monoisotopic mass = 58741
position sequence (NCBI BLAST link)
*****
307-322 AHETLHQSLSLASSPK
95-102 ENLENPMR
104-110 IHSLPQK
386-396 YPYEYEGGHIK
414-422 KPIVPTDGK
103-110 RIHSLPQK
Protein Coverage: 52/523 = 9.9% by amino acid count, 5902/58741 = 10.0% by mass
Search SWISS-PROT with gj4502705|ref|NP_001780.1| via accession, descr./ID, or full text field.

```

**Abbildung 27:** Ergebnisse der Messungen mit Nanospray-MS. Zu erkennen ist die Zuordnung der Peptidsequenzen aus dem tryptischen Verdaus des exprimierten Cdc25a MALDI-Spektrum des tryptischen Verdaus von Cdc25a

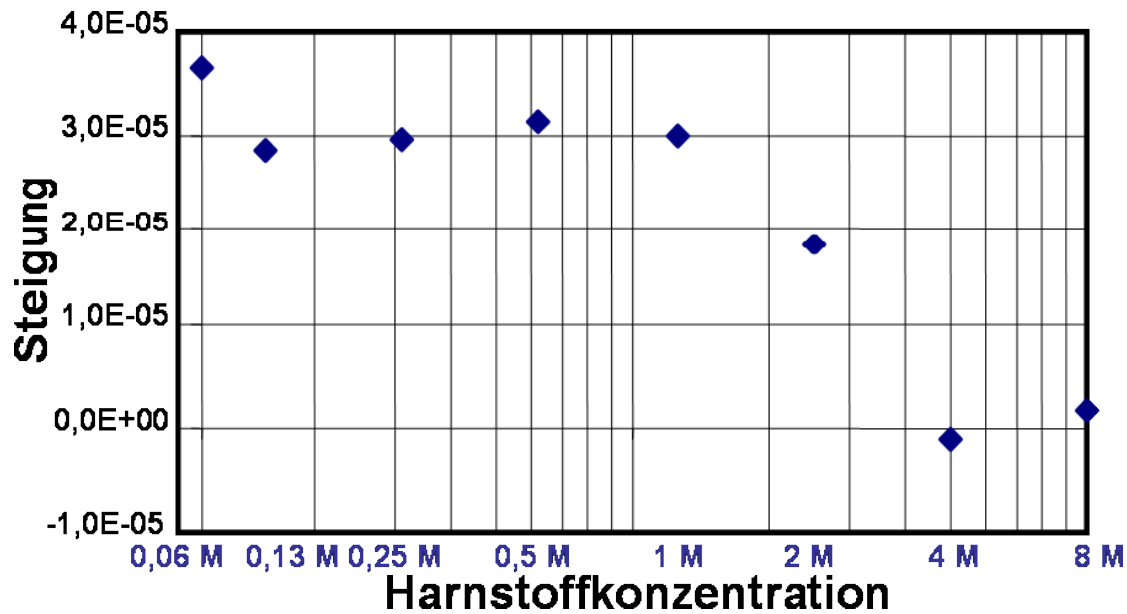
Damit handelt es sich bei aufgereinigten Protein eindeutig um die humane Cdc25a-Phosphatase.

#### 4.1.4 Enzymatischer Assay Cdc25a

Für die Kopplung wurde enzymatisch aktives Cdc25a benötigt. Zudem sollte zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der getesteten Verbindungen ein Assay etabliert werden. Der Aktivitätstest wurde mit einem künstlichen Substrat, dem p-Nitrophenolphosphat (NPP) durchgeführt. Das Enzym spaltet die Phosphatgruppe vom NPP ab, woraufhin sich das stark gelbe p-Nitrophenol bildet. Dieser Farbumschlag der Lösung von nahezu farblos zu gelb kann bei 405 nm im UV/VIS-Spektrometer gemessen werden.

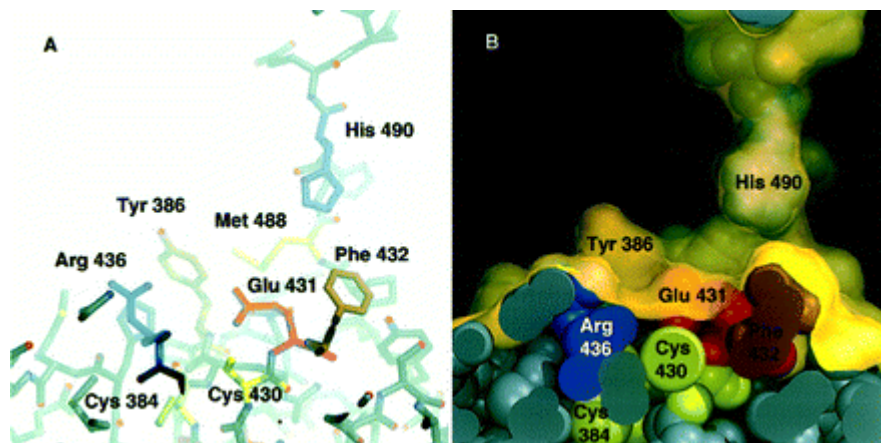
Problematisch am Cdc25a schien zu Beginn die Bildung der Inclusion bodies. Das nicht lösliche Protein aggregierte, war schwierig in nativen Puffern aufzureinigen und büßte dadurch seine Aktivität ein. Nur die denaturierende Aufreinigung mit 8M Harnstoff brachte das Protein wieder in Lösung. Versuche, durch Veränderungen der Expressionsbedingungen lösliches Protein zu erhalten, scheiterten. Die Rückfaltung des Proteins und Wiederherstellung der Aktivität aus denaturierenden Bedingungen mussten daher erreicht werden. Im Fall des Cdc25a gelang die Rückfaltung relativ einfach durch Verdünnung des Harnstoffes im Enzympuffer. Durch die Verdünnung der Enzymlösung um den Faktor 10 in Testpuffer war die Aktivität wiederhergestellt.

Wie die Abbildung 28 zeigt, blieb die Aktivität von Cdc25a bis zu einer Konzentration von 1 M Harnstoff unbeeinflusst. Vermutlich ist das aktive Zentrum durch den Harnstoff kaum denaturiert worden, so dass die Rückfaltung sehr rasch geschah.



**Abbildung 28:** Diagramm zur Abhängigkeit der Cdc25a von der Harnstoffkonzentration im Assaypuffer. Aufgetragen ist die Harnstoffkonzentration im Assaypuffer gegen die Steigung des linearen Teils der Messung der Absorption bei 405 nm über die Zeit.

Der Zusatz von DTE ist absolut notwendig für die Aktivität des Proteins, da sich ein Cystein im aktiven Zentrum befindet (Cys<sub>430</sub>), das in SH-Form (reduziert) vorliegen muss, damit das Protein aktiv ist. Das freie Cystein spielt eine entscheidende Rolle für die Katalyse [98].



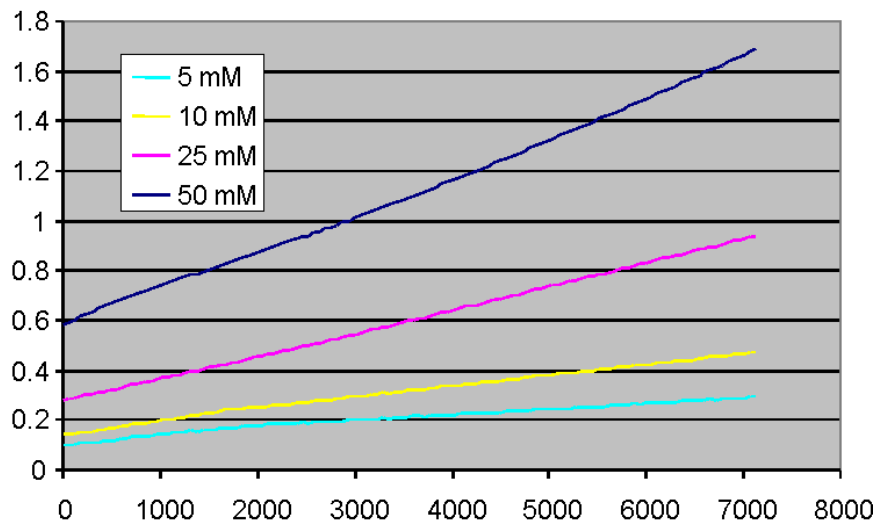
**Abbildung 29:** Die active site des Cdc25a, deutlich zu sehen ist links das Cys<sub>384</sub>, das mit dem entscheidenden Cys<sub>430</sub> eine Disulfidbrücke bilden kann

Die Erklärung für die, auch in unseren Enzymassays festgestellte Notwendigkeit, ein reduzierendes Agens wie DTE bzw. DTT zuzusetzen, um katalytische Aktivität zu erhalten [100], liefert eine Röntgenstrukturanalyse von Fauman et al. Einige Kristalle des Cdc25a zeigten in der Röntgenstrukturanalyse die Bildung einer Disulfidbrücke mit Cys<sub>384</sub> [79].

Andere Arbeiten beschreiben die Bildung von Inclusion bodies, bei dem Versuch Cdc25a in *E. coli* als His-Tag Protein zu exprimieren [72]. Die native Aufreinigung gelang dort mit GST-Fusionsprotein. Renaturierung der His-Tag-Cdc25a führte zu niedrigen Phosphatase-Aktivitäten

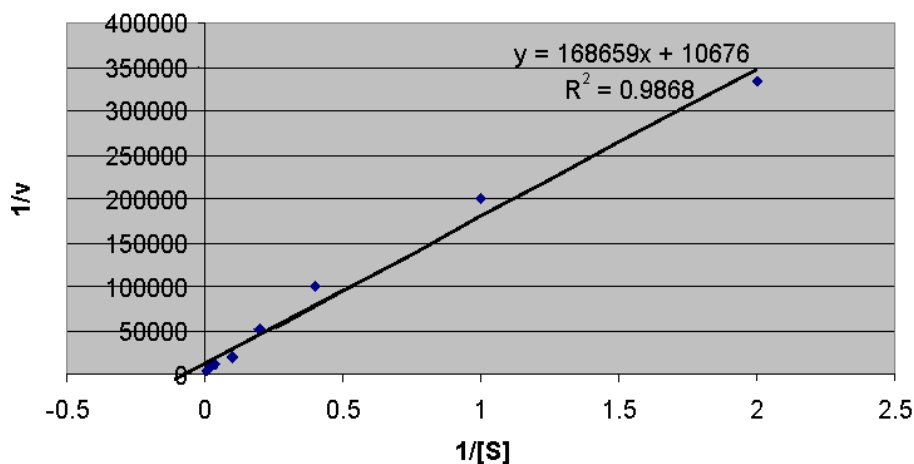
( $k_{\text{cat}}K_{\text{MS}}$  von  $< 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei pNPP) [100, 101]. In unserem Fall jedoch brachte die Renaturierung eine mehr als akzeptable Aktivität des Enzyms.

Messungen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen zeigten (siehe Abbildung 30), dass die Anfangsgeschwindigkeit die gleiche ist. Allerdings wird bei der fortlaufenden Reaktion Substrat verbraucht, daher lässt die Geschwindigkeit nach, bis das gesamte Substrat verbraucht ist.



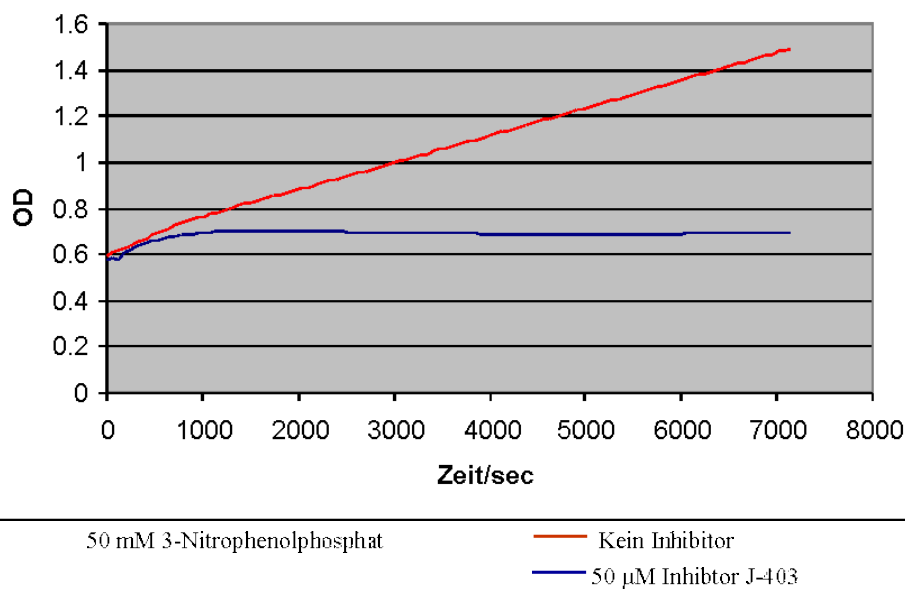
**Abbildung 30:** Aktivität der Cdc25a bei verschiedenen Substratkonzentrationen, aufgetragen ist die Zeit in Sekunden gegen die Absorption bei 405 nm.

Aus dem Anstieg der Absorption über die Zeit wird die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten, als  $V$  bezeichnet, für die unterschiedlichen Enzymkonzentrationen, als  $[S]$  bezeichnet, wurden in einem Lineweaver-Burk-Plot aufgetragen. Dazu werden die reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten  $1/V$  gegen die reziproken Substratkonzentrationen  $1/S$  aufgetragen. Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der x-Achse ist der negative reziproke Wert von  $K_{\text{M}}$ . Der Wert für  $V_{\text{max}}$  ergibt aus dem Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der y-Achse als reziproker Wert. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität mittels Lineweaver-Burk-Plot für das hier experimentierte Cdc25a ergab einen  $K_{\text{M}}$ -Wert von 15,87 mM und  $v_{\text{max}}=9,3\text{e-}5$ .



**Abbildung 31:** Bestimmung des  $K_{\text{M}}$ -Wertes von Cdc25a nach Lineweaver-Burk

Wurde ein potenter Phosphatase-Inhibitor zugesetzt, wie in der Abbildung 32 gezeigt, sank die Aktivität des exprimierten Cdc25a's erwartungsgemäß. Hier handelt es sich J-403, dessen  $IC_{50}$ -Wert bereits mit kommerziellen Cdc25a ermittelt wurde und  $1 \mu\text{M}$  beträgt. Der  $IC_{50}$ -Wert beschreibt die Inhibitor-Konzentration bei der die maximale Reaktionsgeschwindigkeit durch den Inhibitor halbiert wird. Der in der Graphik gezeigte Inhibitor soll lediglich als Beispiel dienen, die Werte für weitere Inhibitoren, die in dieser Arbeit zum Vergleich mit den Assayergebnissen herangezogen wurden, sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst.



**Abbildung 32:** Aktivität der Cdc25a mit und ohne Phosphatase-Inhibitor; aufgetragen ist die Zeit in Sekunden gegen die Absorption bei 405 nm.

Für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte ist es ausreichend, den Aktivitätstest mit verschiedenen zugesetzten Inhibitor-Konzentrationen über 10 Minuten lang durchzuführen. Dann kann ermittelt werden, bei welcher Substanzkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal wird. Diese Reihenmessungen wurden alle von Heike Rimpel, AG Waldmann, durchgeführt und ausgewertet. Die  $IC_{50}$ -Werte aller verwendeten Verbindungen sind im Anhang aufgelistet.

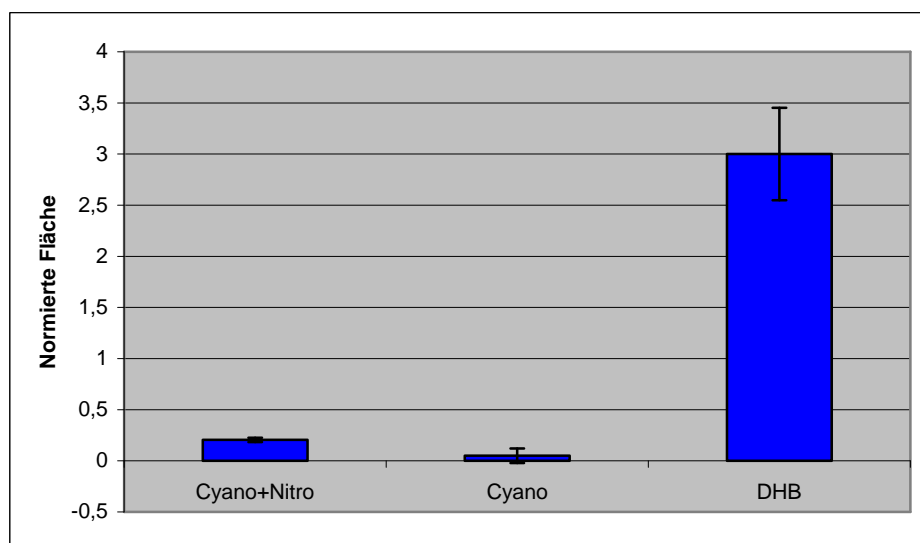
## 4.2 MALDI-ASSAY

### 4.2.1 Matrix und Matrixauftrag

Da die zu erwartenden Liganden sehr klein sein würden, wurde zunächst die Matrix für die Messung von Biotin und von den zweiten, ausführlich getesteten Liganden, den Nukleotiden, optimiert. Die Matrix konnte allerdings nicht für jede einzelne Substanz angepasst werden, daher wird sie für eine Gruppe von Substanzen eingestellt. Biotin stand hier stellvertretend für kleine organische Moleküle.

Für die Messung mit Biotin wurden drei Matrices für kleine Moleküle getestet. Biotin wird im „positive mode“ gemessen, das bedeutet, dass nur positiv geladene Ionen detektiert werden. Um die Größe der erhaltenen Signale vergleichen zu können, war eine Normierung nötig. Normierung bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Fläche des interessierenden Substanzpeaks mit einer Peakfläche aus einer, in den Proben ständig konstant enthaltenen, Substanz verglichen wird. Da Koffein, ein beliebtes Standardmolekül in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, die Ionisation des Biotins stark unterdrückte, wurde ein Matrixpeak zur Normierung gewählt. Daher musste die Matrixmischung in diesen MALDI-TOF-Bindungsassays immer möglichst exakt angesetzt werden. Zum Vergleich wurde die Peakfläche der Substanz durch die Peakfläche des Matrixpeaks bei 277,3 m/z dividiert. Dieser Quotient wird im Folgenden „normierte Peakfläche“ genannt. Allerdings handelt es sich dabei um keine wirkliche Quantifizierung, sondern lediglich um eine Orientierungshilfe.

Die normierten Peakflächen von freiem Biotin (je 1 µl 5 mM in Wasser), das mit unterschiedlichen Matrices (je 1 µl) versetzt wurde, sind in Abbildung 33 gegeneinander aufgetragen. Die Mischung von 10mg/ml Dihydroxybenzoesäure (DHB) in Aceton brachte die beste Signalausbeute (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Normierte Peakfläche des Biotin-Signals nach Bindungsassay; Matrixmischungen: 1)Cyano+Nitro: 20 mg/ml Nitrocellulose in Aceton+1:1 Isopropanol+20 mg/ml aCHCA, 2) Cyano: 20 mg/ml aCHCA in Aceton, 3) DHB: 10 mg/ml DHB in Aceton

Bei Nucleotiden muss darauf geachtet werden, ob die positiv oder negativ geladenen Ionen detektiert werden sollen. Die Struktur der Nucleotide zeigt an, dass sie in wässriger Lösung negativ geladen vorliegen.

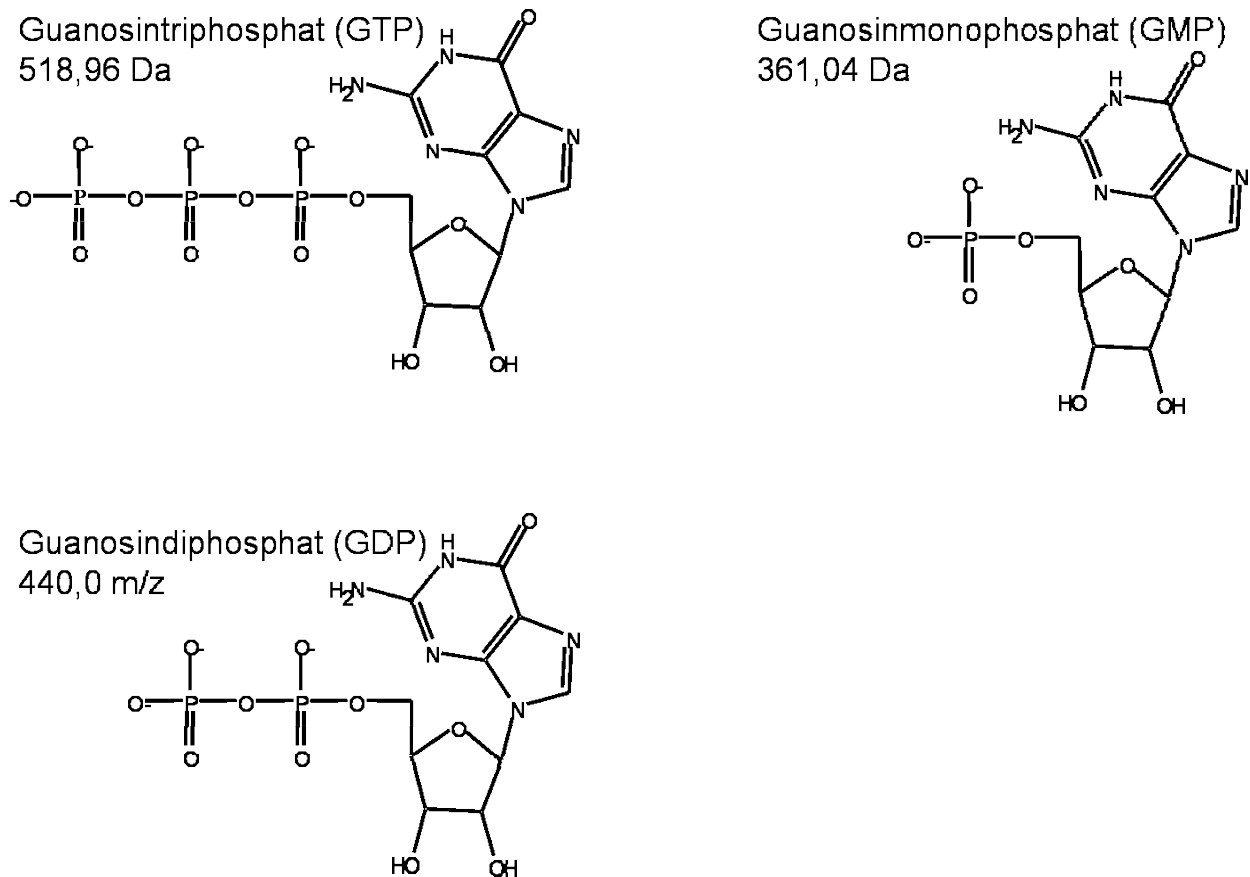
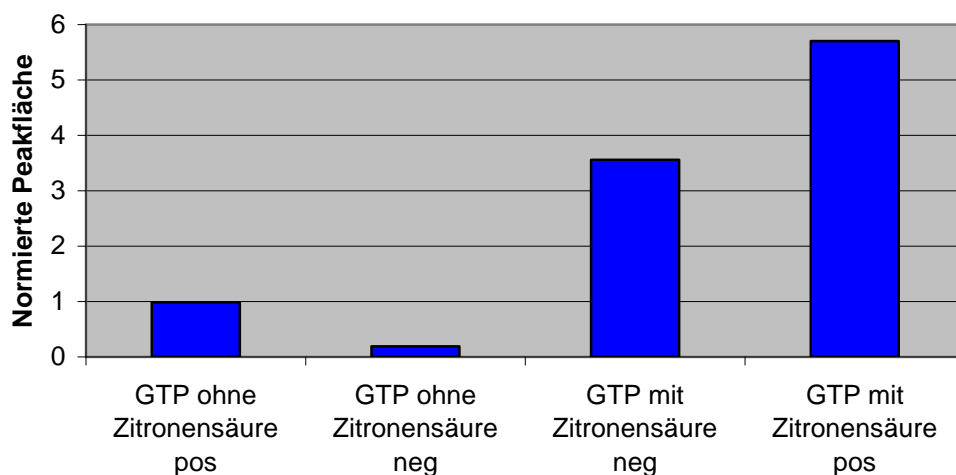


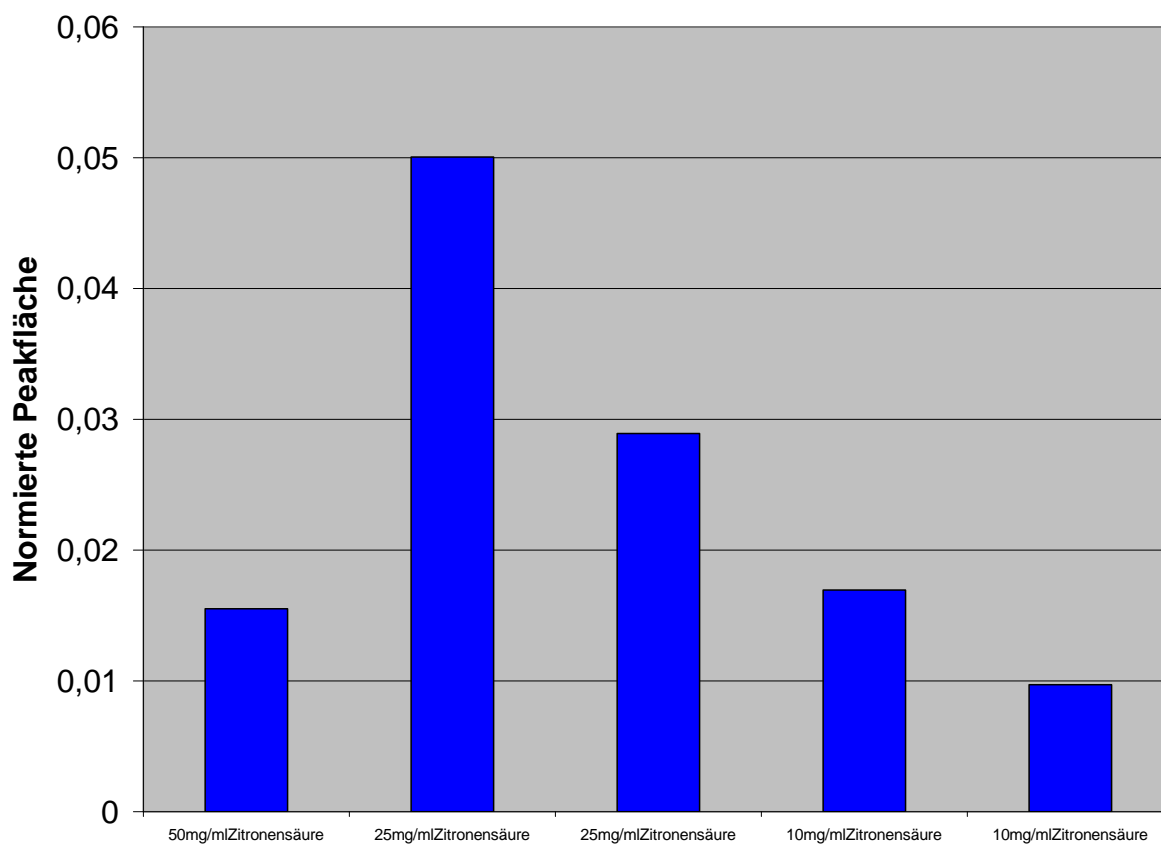
Abbildung 34: Strukturen der Guanosinnucleotide

Nucleotide allein konnten am besten in folgender Matrix gemessen werden: THAP gesättigt + 25 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril in Aqua bidest. Bei Versuchen mit HCCA und DHB konnten bei 5 nmol Nucleotid überhaupt keine Nucleotidpeaks im Spektrum ausgemacht. Durch Zusatz von Zitronensäure zur THAP-Lösung wurde eine deutliche Verbesserung des Nucleotidsignals bei der Messung im MALDI-TOF erzielt. Die Zugabe von Zitronensäure ermöglichte eine Messung des Nucleotids im positive ion mode. Die Größe der auf den THAP-Peak normierten Nucleotidsignalfächen werden in Abbildung 35 gezeigt.



**Abbildung 35:** Normierte Peakflächen des GTP/GDP-Signal (auf Matrixpeak 333,4 m/z) in positive (pos) und negative (neg) ion mode; Mit: THAP gesättigt + 25 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril in Aqua bidest.; Ohne: gesättigt in 50% Acetonitril in Aqua bidest

Zur Ermittlung der unteren Messgrenze wurde eine Reihe von GTP-Mengen aufgetragen und mit je einem Mikroliter der zuvor ermittelten Matrix versetzt.

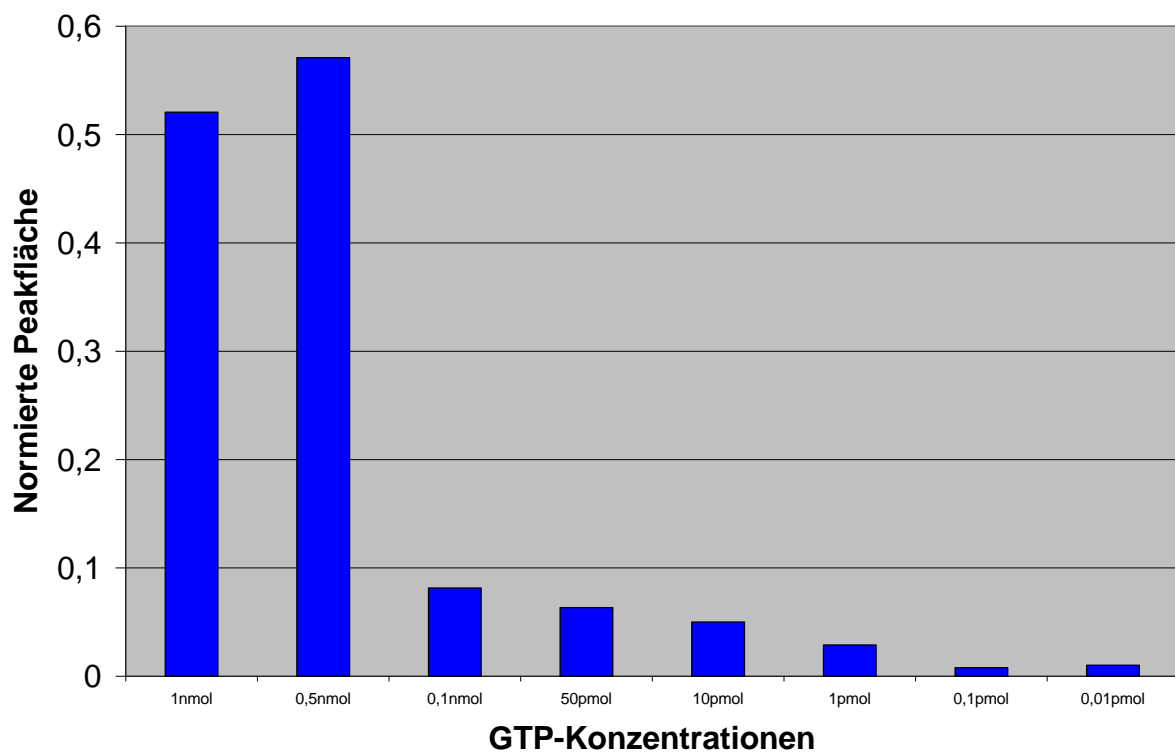


**Abbildung 36:** Normierte Peakfläche (auf 333,4 m/z) des GTP-Signals (522,3 m/z) im negative ion mode; aufgetragen gegen unterschiedliche Konzentrationen von Zitronensäure in der Matrixmischung,



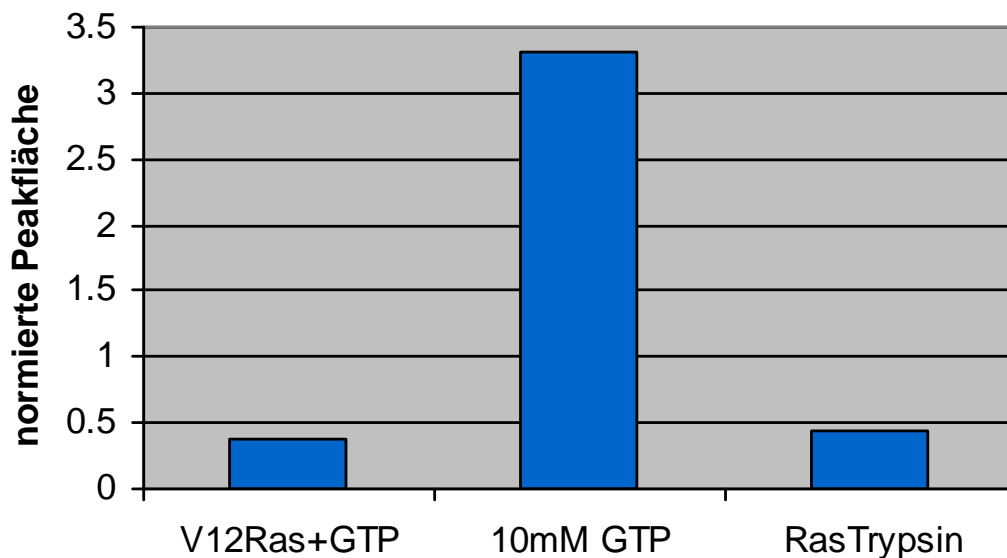
10 pmol GTP THAP gesättigt + 50, 25, 10, 5 und 2,5 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril in Aqua bidest.

Die niedrigste im MALDI messbare Menge an GTP liegt, wie das Diagramm in Abbildung 37 zeigt, unter Verwendung der optimierten Matrix (gesättigtes THAP in 50% Acetonitril in Aqua bidest. mit 25 mg/ml Zitronensäure) bei einem pmol.



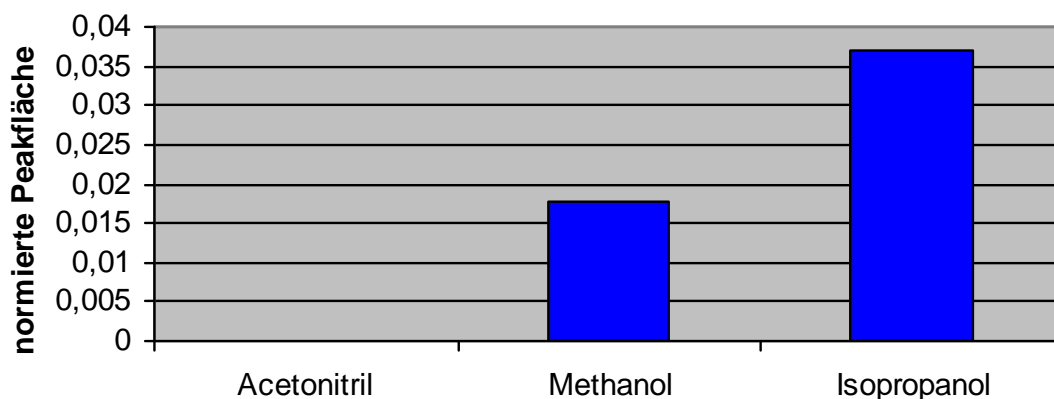
**Abbildung 37:** Normierte Peakfläche (auf 333,4 m/z) des GTP-Signals (bei 522,3 m/z) im negative ion mode aufgetragen gegen verschiedene Mengen von GTP

Die Messung der an Ras gebundenen Nukleotide erwies sich als schwierig. . Nur Matrixlösung auf das Nukleotid-beladene Ras zu geben, reichte nicht aus, um die Nukleotide aus dem Ras zu lösen und im MALDI-MS messen zu können. V12Ras ist eine Mutante, bei der die intrinsische GTPase-Aktivität des Ras' ausgeschaltet ist. Dadurch ist das GTP im Protein stabiler. Für die durch die normierten Peakflächen in Abbildung 38 abgebildeten Messungen wurde jeweils ein Mikroliter Protein bzw. GTP oder Peptidfragmentlösung aufgetragen und mit einem Mikroliter Matrixlösung versetzt. Die Bindung des GTP an das Ras ist so stark, dass 50% Acetonitril nicht ausreichen, das Protein soweit zu denaturieren, dass es GTP freigibt. Auch ein tryptischer Verdau von GTP-beladenem Ras brachte keine Steigerung der Signalintensität, anscheinend blieb die Bindungstasche des Nukleotids davon unberührt.



**Abbildung 38:** Normierte Peakfläche des GTP-Signals (auf 333,4 m/z) gefunden in je 1  $\mu$ l V12Ras, 10 mM und tryptischer Verdau von 12VRas, im negative Ionmode gemessen, Matrix: THAP gesättigt + 25 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril in Aqua bidest.

Daher wurde das Protein, bei der Messung in Abbildung 39 handelt es sich um GDPwtRas, vor dem Matrixauftrag mit je einem Mikroliter Lösungsmittel denaturiert. Nach dem Eintrocknen wird THAP-Matrix aufgetragen und im MALDI-TOF gemessen. Durch eine vorhergehende Denaturierung mit Isopropanol war die größte Signalausbeute zu erreichen. Durch Zugabe von Acetonitril war keine Denaturierung festzustellen, da kein GDP-Signal messbar war. Methanol ermöglichte zwar eine Signaldetektion, allerdings eine geringere als Isopropanol.



**Abbildung 39:** Test verschiedener Lösungsmittel zur Denaturierung von Ras. Auf Matrix-Peak (333,4 m/z) normiertes Signal von GDP nach der Freisetzung des Nukleotids durch Denaturierung des Proteins mit organischen Lösungsmittel. Eingesetzte Menge Protein: 50 pmol wtRas(GDP) Als Matrix wurde die für Nukleotide optimierte Matrix verwendet; THAP gesättigt + 25 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril in Aqua bidest., m/z bei 425, negativ ionmode

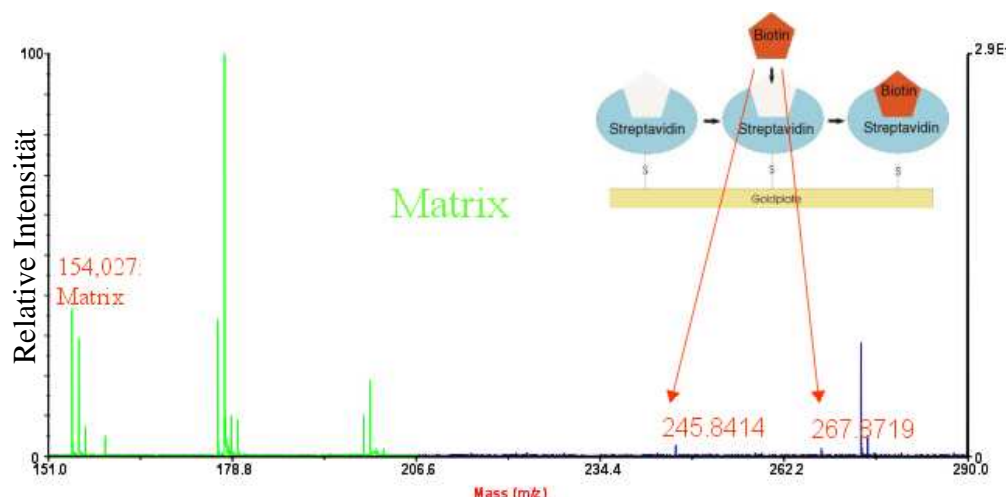
## 4.2.2 Immobilisierung auf Gold

### 4.2.2.1 DTSP-Methode

#### 4.2.2.1.1 Streptavidin-Biotin

Zu Beginn der Versuchsreihen zur Etablierung eines MALDI-MS-basierten Liganden-Bindungsassays wurde versucht, einen aus der Literatur bekannten Assay aufzubauen. In dem beschriebenen Assay wurde das Protein über eine SAM an Gold gebunden. Das verwendete Thiolreagenz zur SAM-Bildung war DTSP. Als Beispielsystem wurde Streptavidin-Biotin eingesetzt, da dieses System gut beschrieben und leicht verfügbar ist [54]. Zudem ist Biotin ein hochaffiner Ligand für Streptavidin, der verschiedene Waschprozeduren gut überstehen sollte. Streptavidin besitzt je 4 Bindungsstellen pro Molekül für Biotin, daher sollte die Orientierung auf der Oberfläche keine allzu große Rolle spielen, da davon auszugehen ist, dass immer eine Bindungsstelle erreichbar bleiben wird.

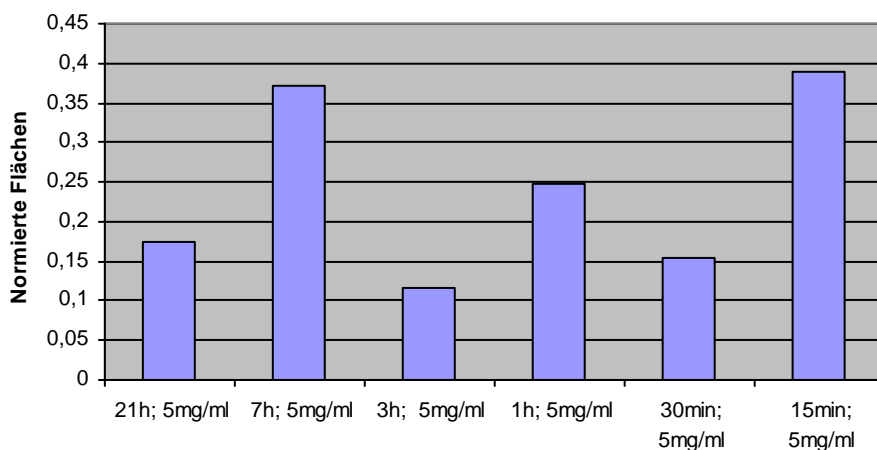
Zunächst wurden alle Optimierungsschritte der Immobilisation an dem Streptavidin-Biotin-System aufgrund seiner hohen Affinität durchgeführt (siehe 2.2.1). Dennoch mussten diese Bedingungen für andere Proteine modifiziert werden. Das Streptavidin wurde zu 1 mg/ml in Immobilisierungspuffer (100 mM Na-Phosphat-Puffer, 500 mM NaCl, pH 7,3) aufgenommen und wie beschrieben an der Goldplatte (auswechselbarer Goldprobenträger von Perseptive Biosystems) immobilisiert (siehe 2.4.1). Der Bindungstest wurde mit 1 µl 10 mM Biotin in Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,2 mit 100 mM NaCl) durchgeführt (siehe 2.2.1). Nach dem Trocknen wurden die Proben mit 0,5 µl Matrix (0,5 µl 5 mg/ml Dihydroxybenzoesäure (DHB) in Aceton) versetzt und im MALDI gemessen. Diese Matrixmischung war, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, für Biotin optimiert worden. Abbildung 40 zeigt das im MALDI-TOF aufgenommene Spektrum mit den Biotin- und Matrixmassen. Die Signale der Matrixmassen besitzen eine bis zu hundertfache höhere Intensität gegenüber dem Signal der Masse des Biotins. Die Massen der Matrix lassen sich auch als interne Standards nutzen, um Signalintensitäten bei verschiedenen Messungen vergleichen zu können. Coffein war als interner Standard nicht zu verwenden, da es die Ionisation von Biotin unterdrückte.



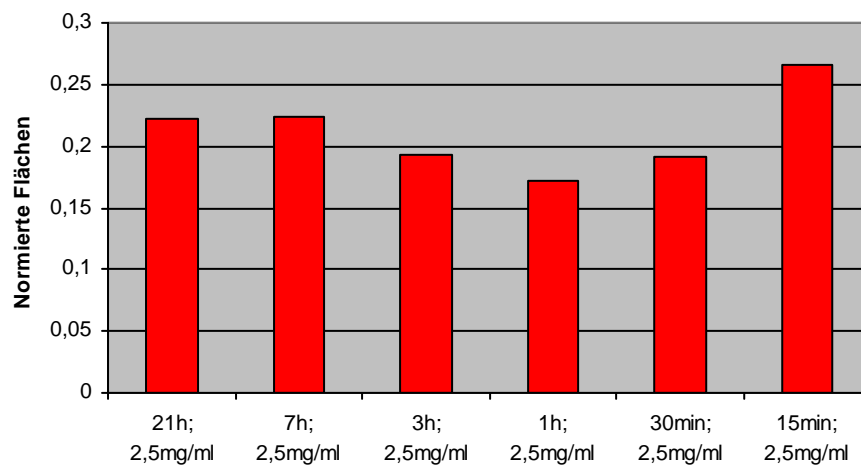
**Abbildung 40:** MALDI-Massenspektrum von Biotin gelöst aus immobilisierten Streptavidin gemessen in 0,5  $\mu$ l 5 mg/ml DHB in Acetonitril; 245,8414: Biotin+H<sup>+</sup>; 267,8719: Biotin+Na<sup>+</sup>

Durch Variation der Immobilisierungsbedingungen des Streptavidins sollte eine Verbesserung des Biotinsignals nach dem Bindungsassay erreicht werden. Dazu wurde Streptavidin in verschiedenen Mengen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 4°C auf der Goldoberfläche nach dem DTSP-Protokoll immobilisiert.

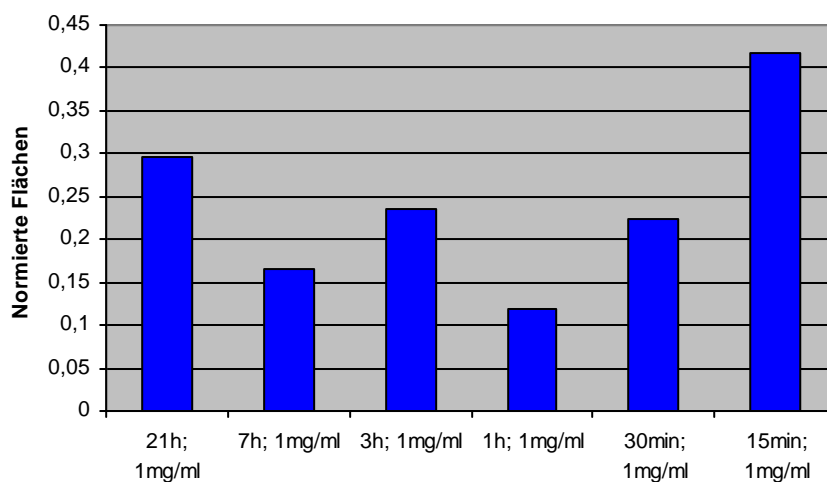
Die Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von Streptavidin (5 mg/ml, 2,5 mg/ml und 1 mg/ml) zu unterschiedlichen Inkubationszeiten (21 h, 7 h, 3 h, 1 h, 30 min und 15 min) brachten keine einheitlichen Ergebnisse. Es ist lediglich zu erkennen, dass das beste Ligandensignal bei allen drei Konzentrationen jeweils mit nur 15 Minuten Inkubationszeit erreicht wurde (vgl. Abbildung 41 bis Abbildung 43).



**Abbildung 41:** Normierte Peakfläche des Biotin-Signal nach Lösung des Biotins aus immobilisierten Streptavidin gemessen in 0,5  $\mu$ l 5 mg/ml DHB in Acetonitril; 245,8414: Biotin+H<sup>+</sup>; 267,8719: Biotin+Na<sup>+</sup>

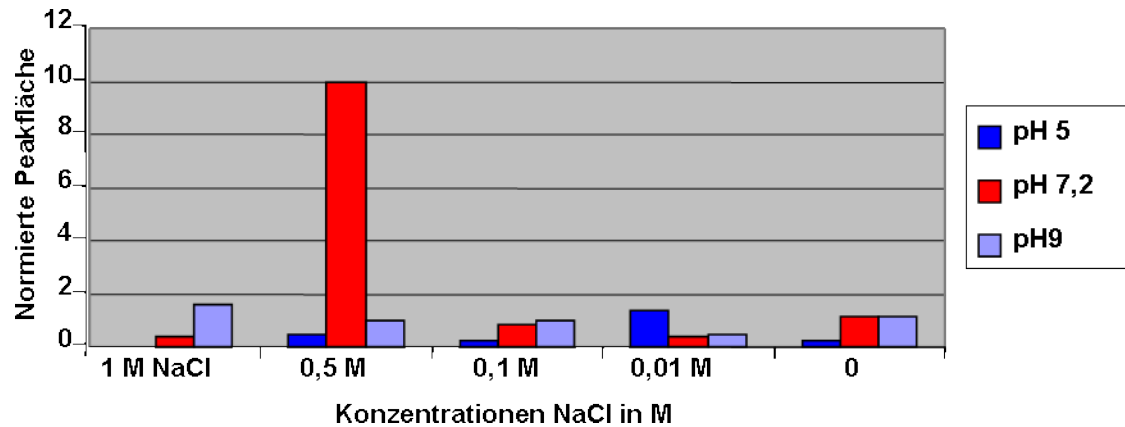


**Abbildung 42:** Normierte Peakfläche des Biotin-Signal nach Lösung des Biotins aus immobilisierten Streptavidin gemessen in 0,5  $\mu$ l 2,5 mg/ml DHB in Acetonitril; 245,8414: Biotin+H<sup>+</sup>; 267,8719: Biotin+Na<sup>+</sup>



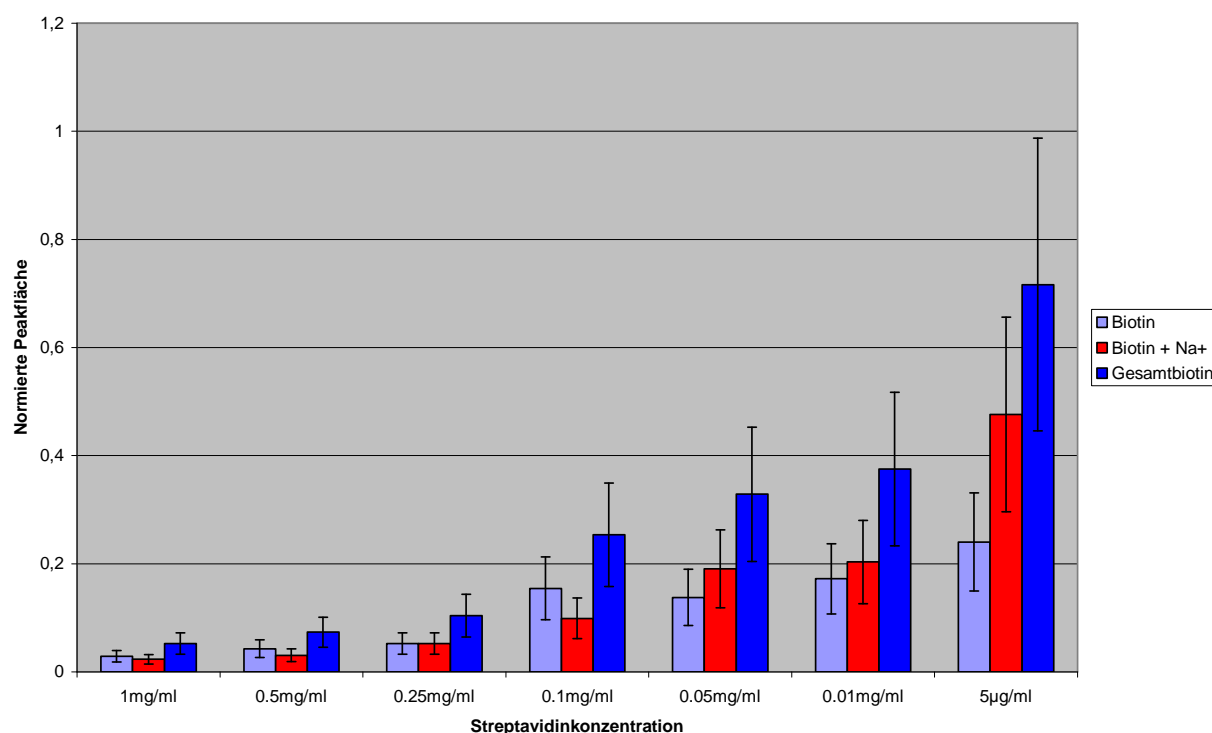
**Abbildung 43:** Normierte Peakfläche des Biotin-Signal nach Lösung des Biotins aus immobilisierten Streptavidin gemessen in 0,5  $\mu$ l 1 mg/ml DHB in Acetonitril; 245,8414: Biotin+H<sup>+</sup>; 267,8719: Biotin+Na<sup>+</sup>

Auch die Variation des pH-Wertes (zwischen pH 4,5 und 9) und des Salzgehaltes (zwischen 0,1 und 1 M NaCl) im Immobilisierungspuffer zeigten keine Verbesserung des nach dem Durchführen des Biotin-Bindungsassays gemessenen MALDI-Signals. Daher wurde die für die vorhergehenden Immobilisierungen verwendete Natriumchloridkonzentration von 0,5 M im Immobilisierungspuffer beibehalten.



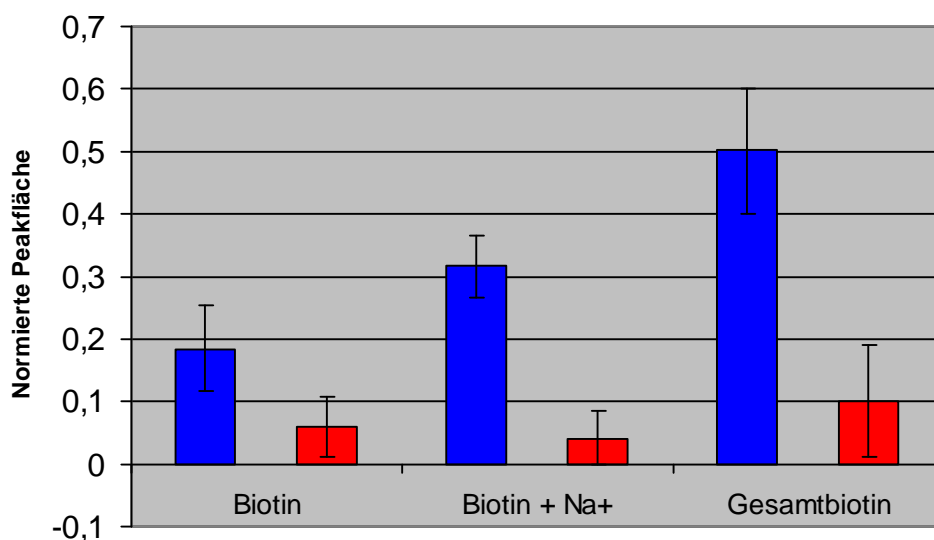
**Abbildung 44:** Normierte Peakflächen des Biotin-Signals nach Bindungsassay. Verschiedene Salzkonzentrationen und pH-Werte bei der Immobilisierung von Streptavidin. Nach Biotin-Bindungsassay Auftrag von 1  $\mu$ l der DHB-Matrix und messen des Biotin Signals bei 245,3 Da. Das Signal wurde Signal normiert auf DHB-Matrixpeak bei 273 Da. Der Wert für mit 1 M NaCl bei pH 5 wurde herausgenommen, da es sich offensichtlich um einen Messfehler handelte.

Weitere Versuche zeigten, dass eine Verringerung der Proteinkonzentration auf bis zu 5  $\mu$ g/ml bei der Immobilisierung ein zehnfach verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis des Biotins nach dem Bindungsassay gegenüber 1 mg/ml Proteinkonzentration bei der Immobilisierung ergaben. Allerdings ist dieser Wert ungewöhnlich. In einer Veröffentlichung von Koopmann und Blackburn [28] wurde ebenfalls eine derartige Reihe für Neutravidin getestet, wobei allerdings das Protein selbst im MALDI gemessen wurde (es wurde nur nicht-kovalent an die Oberfläche gebunden). Hier wurde ein optimaler Wert von 500 ng (entspricht 1  $\mu$ l 0,5 mg/ml Proteinlösung) gefunden. Auch andere Vorschriften zur Immobilisierung von Protein an Goldoberflächen verlangen nach einer größeren Menge Protein. (Fenselau et al und andere) [20, 21].



**Abbildung 45:** Mittelwerte der normierten Peakflächen des Biotinsignals für eine Messung mit 10 mM Biotin im Bindungsassay mit unterschiedlichen Streptavidin-Konzentrationen bei Immobilisierung des Proteins. Die Messung des Biotins erfolgte mit der DHB-Matrix-Mischung und die Flächen wurden auf den Matrixpeak 154,5 m/z normiert.

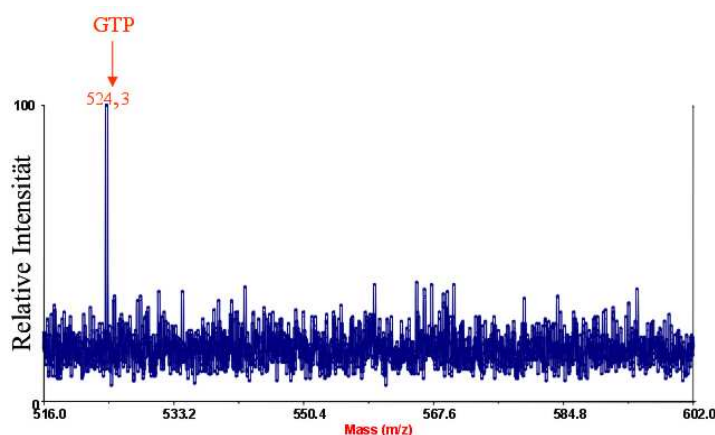
In Abbildung 45 ist neben der normierten Peakfläche des Peaks 245,3 Da (der Biotin + H<sup>+</sup> entspricht) auch die normierte Peakfläche des Peaks 267,3 Da dargestellt. Hierbei handelt es sich um Biotin + Na<sup>+</sup>, Biotin ist hier durch die Anlagerung eines Natriumions, wahrscheinlich aus dem vorher verwendeten Immobilisierungspuffer, positiv geladen und somit im MALDI-TOF im positive mode messbar. Die Flächen des Biotin + Na<sup>+</sup>-Peaks wurden miteinbezogen, um eine höhere Signalausbeute zu erhalten. Es ließ sich allerdings keine Vorhersage treffen, welcher Massenpeak im Spektrum größer ist. In Abbildung 45 ist Biotin + H<sup>+</sup> blau, Biotin + Na<sup>+</sup> rot dargestellt. Bei den Messungen mit den immobilisierten Streptavidin-Konzentrationen von 1 mg/ml bis 0,1 mg/ml war das Biotin + H<sup>+</sup>-Signal größer als das Biotin + Na<sup>+</sup>-Signal, bei den nachfolgenden Konzentrationen war es umgekehrt. Daher ist es sinnvoll, die normierten Peakflächen beider Signale für die Auswertung zu addieren. Diese Gesamtfläche wird hier „Gesamtbiotin“ genannt. Zur Überprüfung der Messergebnisse wurden Kontrollmessungen durchgeführt. Kontrollen sind nötig, um unspezifische Bindung des Liganden an die verwendeten Oberflächen feststellen zu können. Für die Kontrollen wurde die Goldoberfläche vorbereitet wie zur Immobilisierung, aber anstatt Protein an die SAM binden zu lassen, wurde lediglich mit Immobilisierungspuffer gespült. Auf diesen derart behandelten, aber proteinfreien Goldoberflächen wurde der Ligand ebenso lange inkubiert und den gleichen Waschprozeduren unterzogen, wie auf der Proteinoberfläche. Es stellte sich beim Messen des Biotin-Signals heraus, dass auch auf der proteinfreien Oberfläche nach dem Waschen Biotin zu finden war. Die rote Säulen im Diagramm (Abbildung 46) zeigen die normierte Peakflächen der Biotin-Signale aus den Kontrollmessungen.



**Abbildung 46:** Mittelwerte der normierte Peakflächen der Messung des Biotinsignal nach Bindungsassay von immobilisiertem Streptavidin (blau) und von DTSP-behandelter proteinfreier Goldoberfläche (rot). Dabei sind jeweils paarweise die normierten Peakflächen bei 245,3 m/z (Biotin + H<sup>+</sup>), bei 267,3 m/z (Biotin+Na<sup>+</sup>) und die Summe der normierten Peakflächen als "Gesamtbiotin".

#### 4.2.2.1.2 Ras

Ras wurde nach dem mit Streptavidin ermittelten Protokoll auf der Goldoberfläche immobilisiert. Es wurden nur die Puffer durch Ras-Immobilisierungs (100 mM Na-Acetat-Puffer, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2)- und Ras-Bindungspuffer (64 mM TrisCl, 2 mM DTE, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5) ersetzt. Zunächst wurde dem immobilisierten Ras kein weiteres Nukleotid zum Binden angeboten, sondern versucht, das bereits vor der Immobilisierung am Protein gebundene Nukleotid zu messen. Es wurde V12Ras eingesetzt, eine Mutation, bei der die intrinsische GTPase Aktivität von Ras extrem verlangsamt ist, und somit GTP nicht zersetzt wird. Vor der Immobilisierung wurde dieses V12Ras mit GTP beladen und bis zur Verwendung eingefroren (freundlicherweise von Robert Gail, MPI Dortmund zur Verfügung gestellt), so dass es bei der Immobilisierung und Messung im GTP-beladenen Zustand vorlag.

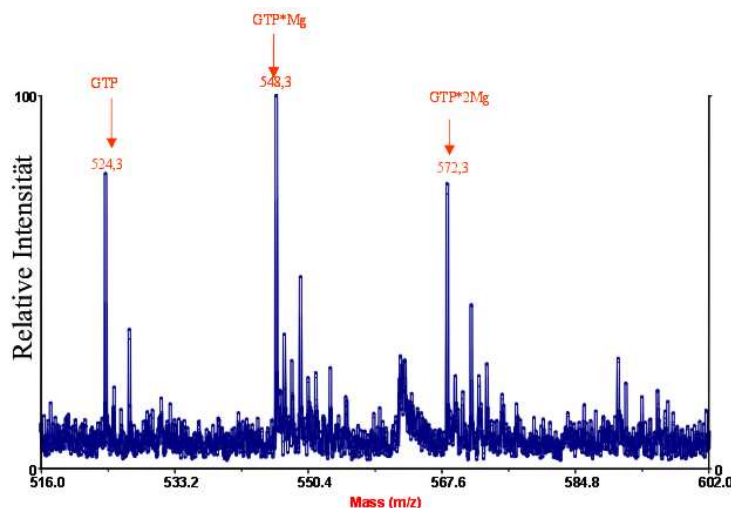


**Abbildung 47:** MALDI-Massenspektrum von GTP aus auf der Goldoberfläche immobilisiertem V12Ras (50 pmol) (ohne weiteren Zusatz von GTP), nach Denaturieren mit 1 µl Isopropanol und Mes-



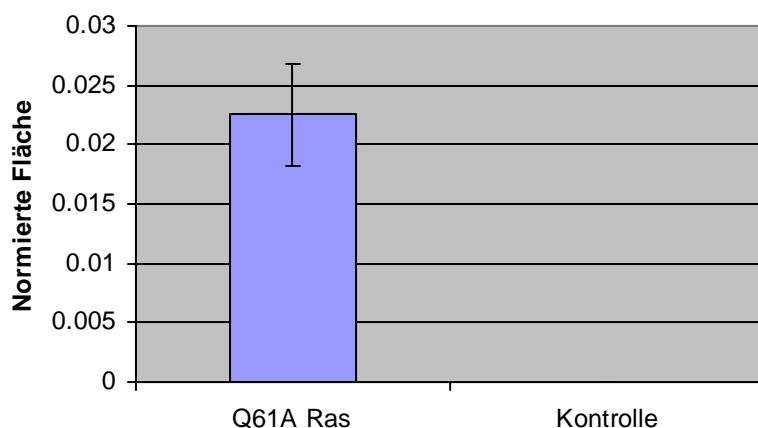
sung in 1  $\mu$ l Matrix (10 mg/ml THAP + 25 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril): 524,3: GTP+H<sup>+</sup>

Bei dem in Abbildung 47 gezeigten Spektrum wurde V12Ras auf der Goldoberfläche immobilisiert und nach dreimaligem Waschen mit je 50 ml Wasser mit 1  $\mu$ l Isopropanol denaturiert. Nach dem Trocknen wurde pro Probe 0,5  $\mu$ l Matrix (10 mg/ml Trihydroxyacetophenon (THAP) + 25 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril) aufgegeben. Diese Matrix-Mischung war als optimal für die Messung von Nukleotiden als negatives und positives Ion ermittelt worden. Zur Abschätzung der Konzentration an gemessenen GTP wurde eine Kontrollmessung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass mindestens 50 pmol Ras-Protein mit gebundenen Liganden nötig sind, um ein ausreichendes Ligandensignal zu erzeugen (gezeigt Abbildung 48). Das bedeutet, dass pro Probenposition mindestens 50 pmol Ras immobilisiert wurden, denn das Signal von GTP+H<sup>+</sup> aus immobilisierten V12Ras war identifizierbar, allerdings mit einem schlechten Signal/Rausch-Verhältnis. Das Signal des GTP aus 50 pmol immobilisierten V12Ras beträgt gegenüber dem Matrixsignal nur etwa 2%. Dagegen erreichte das Signal aus der gleichen Menge nicht-kovalent-gebundenen Ras im Mittel ca. 70% der Größe des Signals der Matrix (bezogen auf das Matrix-Signal bei 335,7 Da aus der THAP-Matrix).



**Abbildung 48:** MALDI-Massenspektrum von GTP aus nicht immobilisierten V12Ras: 1  $\mu$ l Proteinlösung (50 pmol) in 64 mM Tris, pH 7.5 (15,4  $\mu$ g/ $\mu$ l) auf einer Position des MALDI-Stahlprobenträgers getrocknet, denaturiert mit 1  $\mu$ l Isopropanol + 1  $\mu$ l Matrix (10 mg/ml THAP + 25 mg/ml Zitronensäure in 50% Acetonitril); 524,3: GTP+H<sup>+</sup>; 548,3: GTP+Mg<sup>2+</sup>; 572,3: 2GTP+2Mg<sup>2+</sup>

Die Messungen wurden mit einer weiteren immobilisierten Ras-Mutante wiederholt. Bei dem Q61ARas wurde in der Aminosäuresequenz an der Position 61 durch Klonierung ein Glutamin gegen ein Alanin ausgetauscht. Für den Bindungsassay spielt diese Mutierung allerdings keine Rolle, da sie nicht die Nukleotidbindung beeinflusst. Das Q61A-Ras war vor der Immobilisierung mit GTP beladen. Zur Kontrolle des Untergrundes wurde lediglich ein Mikroliter der verwendeten Matrix auf die mit DTSP behandelte, aber proteinfreie Goldoberfläche gegeben. Das Diagramm in Abbildung 49 zeigt die Mittelwerte der normierten Peakflächen dieser Messungen. Das freigesetzte GTP ist deutlich im MALDI-MS zu messen gewesen.



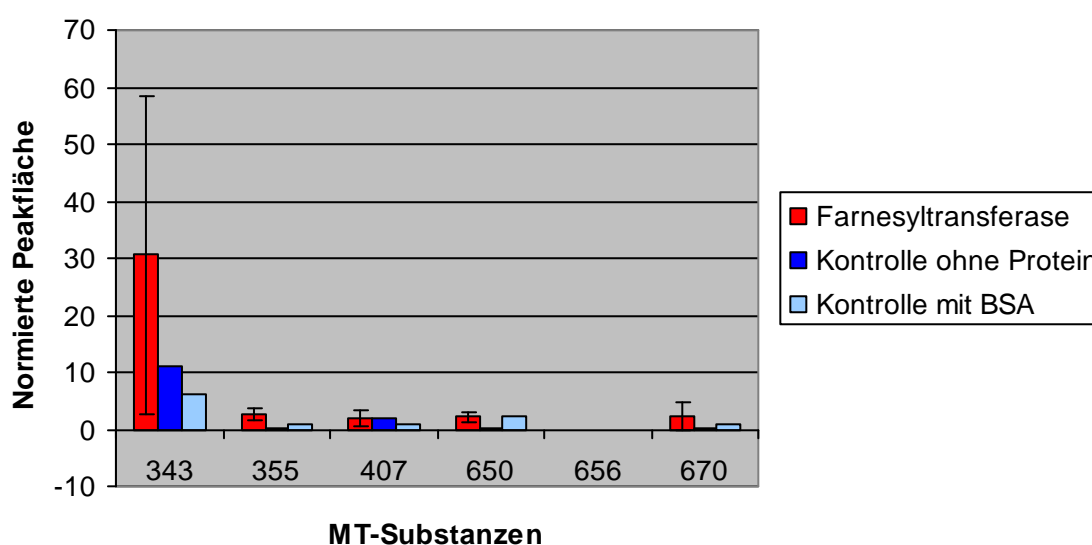
**Abbildung 49:** Normierte Peakfläche (auf 335,7 m/z) des GTP-Signals aus Q61A-Ras bei 524,3 m/z. Dargestellt sind: 1) Auf Goldoberfläche immobilisiertes Q61ARas mit GTP beladen (vor der Immobilisierung) und 2) eine Kontrollmessung, bei die THAP-Matrix auf mit DTSP behandelte Goldoberfläche

Ein Austausch von GDP gegen GTP wurde ebenfalls versucht. Dazu wurde das an die Oberfläche gebundene Protein an jeder Probenposition mit 1  $\mu$ l 5 mM GTP in modifizierten Ras-Bindungspuffer-Puffer (+ 5 mM  $\text{MgCl}_2$  + 5 mM  $\text{SO}_4^{2-}$ ) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Abwaschen des überschüssigen Nukleotids mit dreimal je 25 ml Wasser wurde das Protein mit 1  $\mu$ l Isopropanol pro Probenposition denaturiert und 0,5  $\mu$ l THAP-Matrix aufgegeben. Diese Messung scheiterte aber an der hohen nicht spezifischen Absorption auf der Oberfläche. Diese wurde in Kontrollen mit unbehandelten und BSA-modifizierten Goldplatten festgestellt. Auch Versuche mit den im ESI-Assay eingesetzten GTPase-Aktivatoren Bindung an Ras im MALDI zu zeigen, brachten aufgrund der unspezifischen Adsorption kein eindeutiges Ergebnis.

#### 4.2.2.1.3 Farnesyltransferase

Für die Untersuchung der Farnesyltransferase-Inhibitoren erfolgte die Immobilisierung wie beschrieben, unter Verwendung des Farnesyltransferase-Immobilisierungspuffers (100 mM Na-Acetat-Puffer, 20 mM KCl 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_4$ , pH 7,4). Dieser Puffer ist eine leichte Modifikation des üblichen Puffers bei Einsatz von Farnesyltransferase. Verwendet wurden Farnesyltransferase-Inhibitoren von M. Thutewohl, AG Waldmann, die allerdings nicht alle gut wasserlöslich sind. Daher wurden für den Bindungstest nur die Verbindungen ausgesucht, die beim Verdünnen in Wasser nicht ausfielen. Jeder dieser Inhibitoren wurde in einer Konzentration von 100  $\mu$ M in Farnesyltransferase-Immobilisierungspuffer (100 mM Na-Acetat-Puffer, 20 mM KCl 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_4$ , pH 7,4) der an der Goldoberfläche gebundenen Farnesyltransferase zum Binden angeboten. Nach dem Abwaschen von überschüssigen Liganden wurden nach dem Matrixauftrag (0,5 mg/ml DHB in Acetonitril) die MALDI-Spektren unter Standardbedingungen im positive ion mode aufgenommen. Die auf den Matrixpeak 273,3 Da normierten Peakflächen sind in Abbildung 50 dargestellt. Neben den normierten Peakflächen der Messungen

mit Farnesyltransferase sind auch die Signale nach dem Bindungstest an BSA-behandelte und unbehandelte Goldoberflächen aufgetragen. Bei einem Teil der Substanzen war kein Signal messbar, wie bei MT 656. Bei den meisten Substanzen wurde jedoch eine relativ hohe unspezifische Bindung an BSA festgestellt. Auch blieben diese Substanzen auf der unbehandelten Oberfläche haften und liessen sich auch nicht durch intensives Waschen (5 mal 50 ml für je 5 Minuten) mit wässrigen Lösungen wieder lösen. Bei MT343 ließ sich bei einer Messung ein größeres Signal detektieren als bei den Kontrollmessungen. Daher ist in dem Diagramm ein vergleichsweise großer Mittelwert der normierten Peakfläche von MT343 dargestellt. Ob hier nur die unspezifische Oberflächenabsorption oder die auch verringerte Wasserlöslichkeit der Substanzen eine Rolle spielte, ließ sich nicht klären. Daher wurden die Messungen der Farnesyltransferase-Inhibitoren im MALDI-Assay an dieser Stelle abgebrochen.

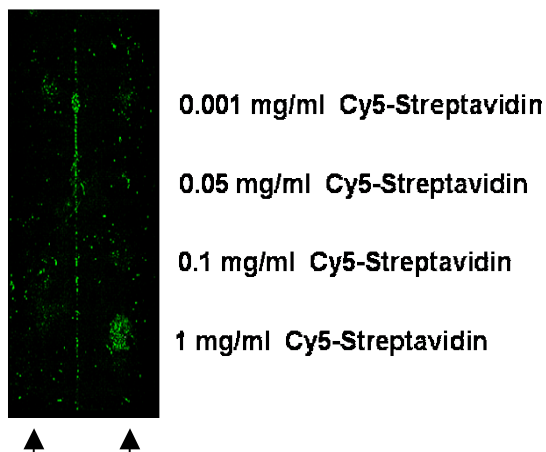


**Abbildung 50:** Mittelwerte der normierten Peakfläche (auf 273,3 m/z) der Signale der MT-Substanzen. Die anderen Messungen wurden nur jeweils einmal durchgeführt. Zu sehen sind die Substanzen MT343 bis MT670. Bei jeder Messung wurden jeweils 10 µl der 100 µM Inhibitorlösung (in Immobilisierungspuffer) aufgetragen. Die Farben der Säulen zeigen an, um welche Oberfläche es sich bei den Versuchen gehandelt hat: rot: Auf Gold immobilisierte Farnesyltransferase, dunkelblau: unbehandelte Goldoberfläche, hellblau: auf Gold immobilisiertes BSA.

#### 4.2.2.2 Mercaptopropionsäure

Da die kommerziell erhältlichen, austauschbaren goldenen MALDI-Probenträger äußerst kostenintensiv sind, wurde der Einsatz von Blattgold auf Trägerfolie getestet. Das Blattgold wurde mit einem Kleber aus der Vergoldungstechnik, der lösemittel- und wasserbeständig ist, auf eine Laserdruckerfolie als Träger aufgebracht. Die Trägerfolie diente zur Stabilisierung des sehr empfindlichen Blattgoldes. Mit dieser Goldoberfläche wurde eine andere Immobilisierungsmethode an Goldoberflächen getestet. Bei dieser Methode erfolgt die Bildung des Monolayers mit Mercaptopropionsäure (MPA). Nach der Ausbildung der Schwefel-Gold-Bindung über die SH-Gruppe der MPA, wird die Säuregruppe der MPA durch N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-(3-(dimethyl)aminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert. An diese aktivierte Säurefunktion kann der N-Terminus eines Proteins nun eine Peptidbindung ausbilden. [26,28]

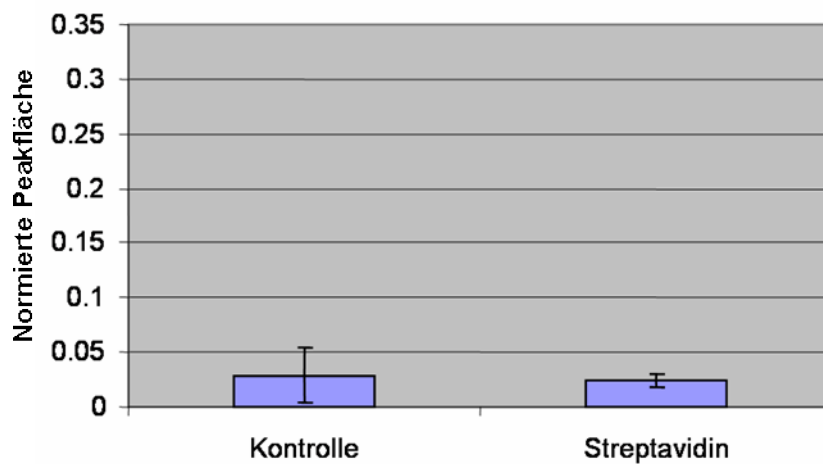
Da das Blattgold trotz Trägerfolie eine sehr geringe Schichtdicke aufweist, war hier ein Test zur Immobilisierung von Protein mit Cy5 gelabelten Protein möglich. Die die auswechselbaren Goldprobenträger von Applied Biosystems passen aufgrund ihrer Größe nicht in das für die Detektion nötige Fluoreszenzmessgerät. Cy5-Streptavidin war ein großzügiges Geschenk der Firma Chimera, Ron Wacker (Chimera) half bei der Durchführung der Fluoreszenzmessungen. Es ergab sich aber nur ein schwaches Signal. Die erste Vermutung ist, dass das am N-Terminus sitzende Cy5, die Kopplung blockiert. Bei der umgekehrten Vorgehensweise wurde Streptavidin ohne Fluoreszenzlabel an die Oberfläche gebunden und Cy5-Biotin zur Bindung angeboten. Auch hier war kaum Signal zu detektieren. Ob das Protein nun wirklich gebunden hat, lässt sich schwer feststellen, da die Goldoberfläche das Fluoreszenzsignal „schlucken“ (dämpfen) könnte (Hinweis von Ron Wacker). Üblicherweise wird das Protein auf Glasträger immobilisiert.



**Abbildung 51:** Fluoreszenzsignal von Cy5-Streptavidin. Das Protein in Phosphatpuffer wurde über MPA-SAM, aktiviert mit EDC (2 mM) und NHS (5 mM), immobilisiert. Zu sehen ist das Fluoreszenzsignal von unterschiedlichen Konzentrationen an Protein bei dem Immobilisierungsversuch.

#### 4.2.2.2.1 Streptavidin

Als nächstes wurde überprüft, in wie weit Ligandenionen, Biotin, per MALDI zu detektieren sind. Der Ligand Biotin wurde dazu unter den bereits genannten Bedingungen bei den Versuchen mit gekauften Goldträgern und DTSP dem immobilisierten Protein zur Bindung angeboten. Nach dem Auswaschen wurde die in den gerade genannten Versuchen verwendete Matrix verwendet. Das ermittelte und normierte Biotin-Signal war extrem niedrig, verglichen mit Versuchen mit gekauften Trägern und DTSP lag es im Bereich der Kontrollen.

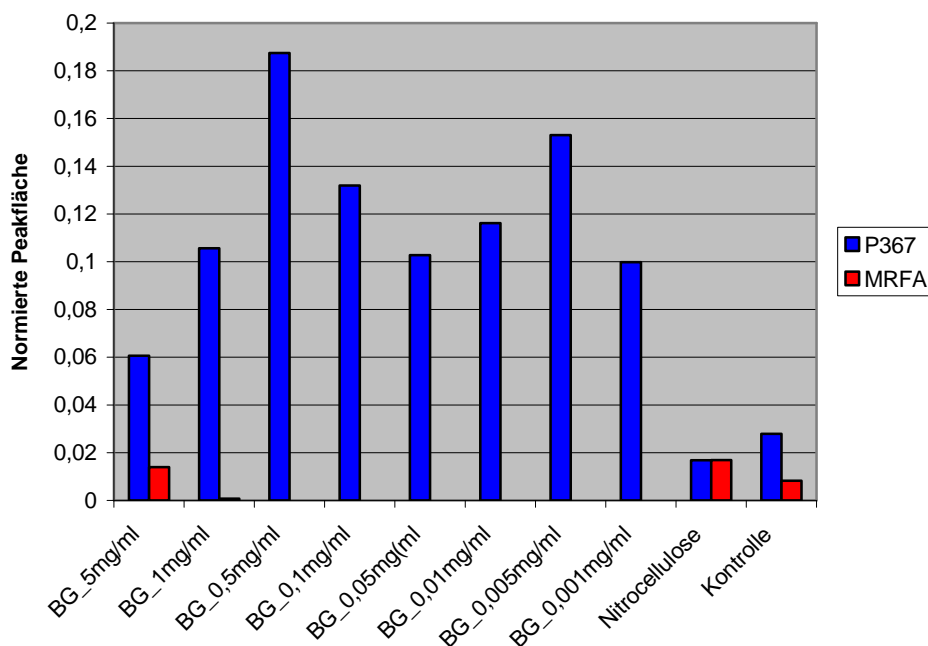


**Abbildung 52:** Mittelwerte der normierten Peakflächen des Biotinsignals nach Bindungsassays. Kontrolle: proteinfreie mit MPA, EDC und NHS behandelte Blattgoldoberfläche; Streptavidin: 1 mg/ml Streptavidin über MPA, EDC und NHS an Blattgold immobilisiert. Messung in DHB-Matrix.

Trotz der Ergebnisse der Immobilisierungsversuche mit Cy5-Streptavidin und Streptavidin wurde die Immobilisierung noch mal mit Cdc25a versucht.

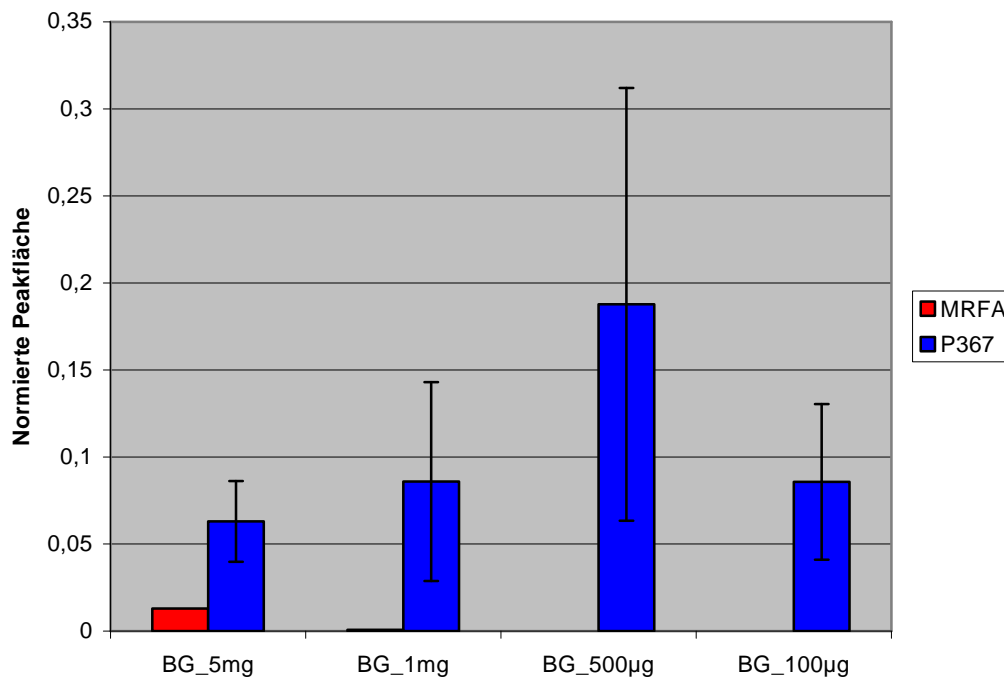
#### 4.2.2.2.2 Cdc25a

Durch eine Konzentrationsreihe wurden 0,5 mg/ml Cdc25a als beste Proteinkonzentration bei der Immobilisierung ermittelt. Dazu wurden 0,5 mg/ml Cdc25a in Phosphatpuffer über Mercaptopropionsäure immobilisiert. Zum Bindungstest wurde dem Cdc25a die Substanz P367, ein von M. Manger synthetisierter Inhibitor, angeboten. Zum Test von unspezifischer Bindung wurde MRFA zur Probe zugesetzt. Die ersten Versuche zeigten positive Ergebnisse. Im Gegensatz zur Nitrocelluloseoberfläche, zeigte sich auf der Goldoberfläche kaum unspezifische Bindung von MRFA. Auch auf der unbehandelten Goldoberfläche war die unspezifische Bindung von P367 niedriger als das Signal der Proteinproben.



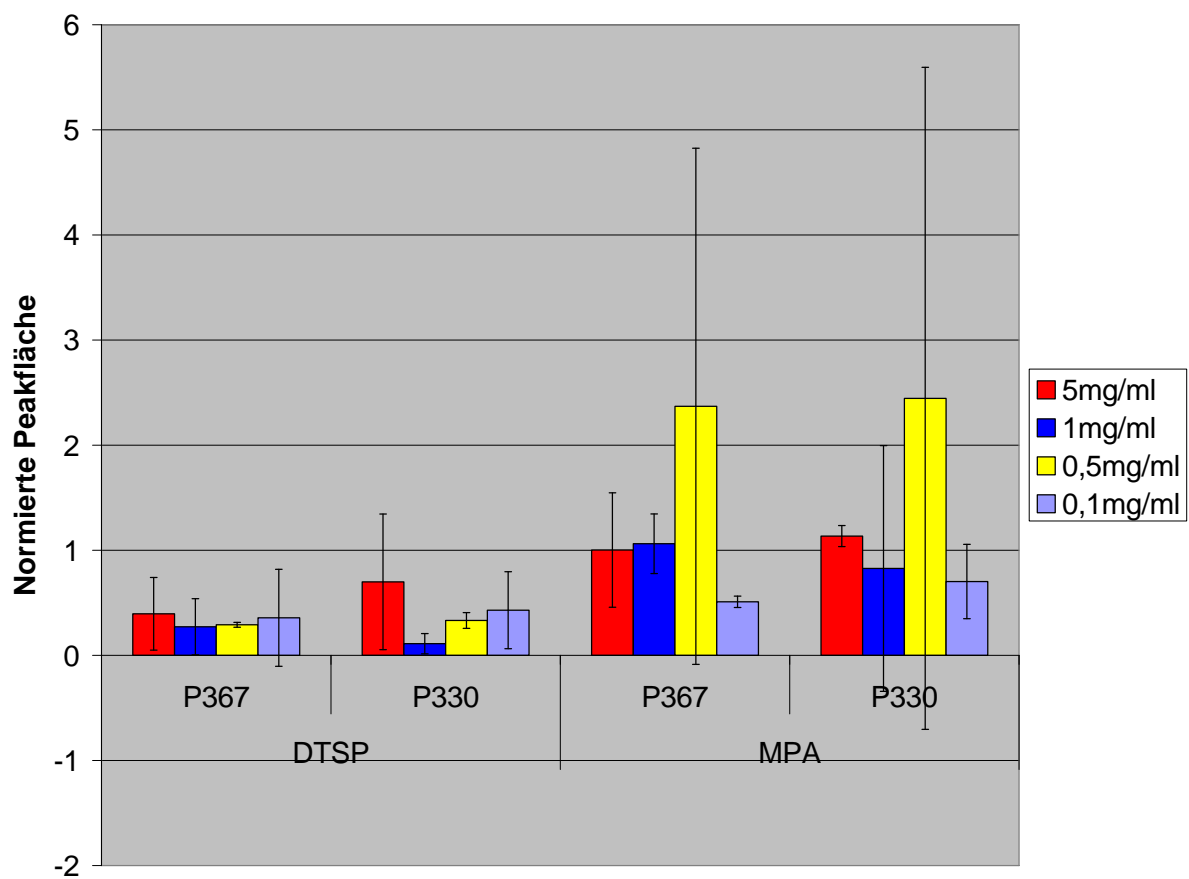
**Abbildung 53:** Normierte Peakfläche des Signals von P367 (blau) und MRFA (rot) nach Bindungsassay an Cdc25a behandelte Blattgoldoberfläche. Für die Versuche wurden unterschiedliche Konzentrationen Cdc25a über MPA, EDC und NHS an Blattgold immobilisiert (BG\_X mg/ml). Als Kontrollen Bindungsassay mit an Nitrocellulose absorbiertes Cdc25a (Nitrocellulose) und auf proteinfreier, mit MPA behandelte Blattgoldoberfläche (Kontrolle). Messung in DHB-Matrix.

Die Versuche mit der so behandelten Blattgoldoberfläche wurden mehrfach wiederholt. Immer wieder zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 5 mg/ml eine unspezifische Bindung von MRFA zu messen war. Auch ist das vom P367-Ion erhaltene Signal geringer, als bei niedrigeren Immobilisierungskonzentrationen. Eine Konzentration von 0,5 mg/ml Cdc25a bei der Immobilisierung ergibt nach Ligandenbindung und Waschen das stärkste Signal, zu erkennen anhand der normierten Peakfläche (siehe Abbildung 54).



**Abbildung 54:** Mittelwerte der normierten Peakflächen der Signale von P367 (blau) und MRFA (rot) nach Bindungsassay. Unterschiedliche Konzentrationen von Cdc25a an Blattgold nach MPA-SAM-Protokoll immobilisiert (BG\_x mg/ml). Messung in DHB-Matrix.

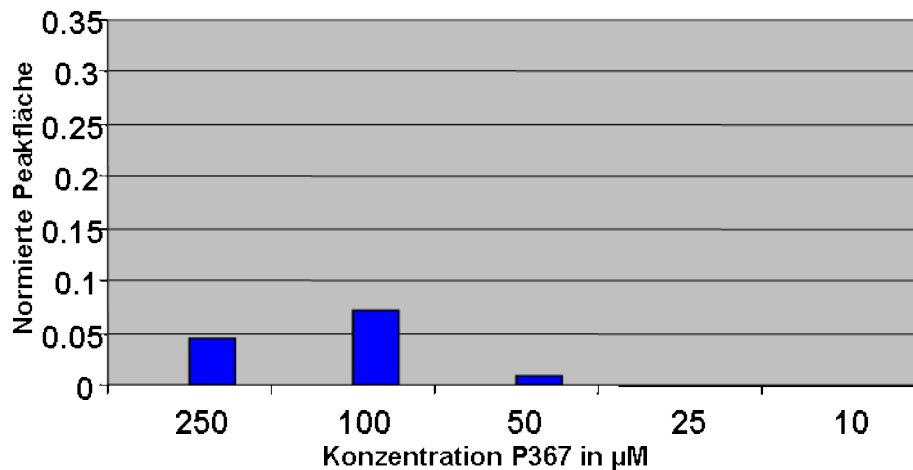
Um die Immobilisierung durch Mercaptoethanol bewerten zu können, wurde auf der Blattgoldoberfläche Cdc25a mit DTSP immobilisiert. Zur Immobilisierung auf Blattgold mit DTSP wurde das bereits bei den gekauften Goldprobenträgern eingesetzte Protokoll verwendet. Abbildung 55 zeigt den Vergleich zwischen diesen beiden Immobilisierungsmethoden im Bindungsassay. Die Immobilisierung von Cdc25a mit MPA ergab nach dem Bindungsassay mit den Phosphatase-Inhibitoren P367 und P330 ein größeres Signal dieser beiden Substanzen als durch die Immobilisierung von Cdc25a mit DTSP an Blattgold.



**Abbildung 55:** Mittelwerte der normierten Peakflächen der Signale von P367 und P330. Unterschiedliche Cdc25a-Konzentrationen wurden nach DTSP-SAM- und nach MPA-SAM-Protokoll auf Blattgold immobilisiert. Messung erfolgt in DHB-Matrix.

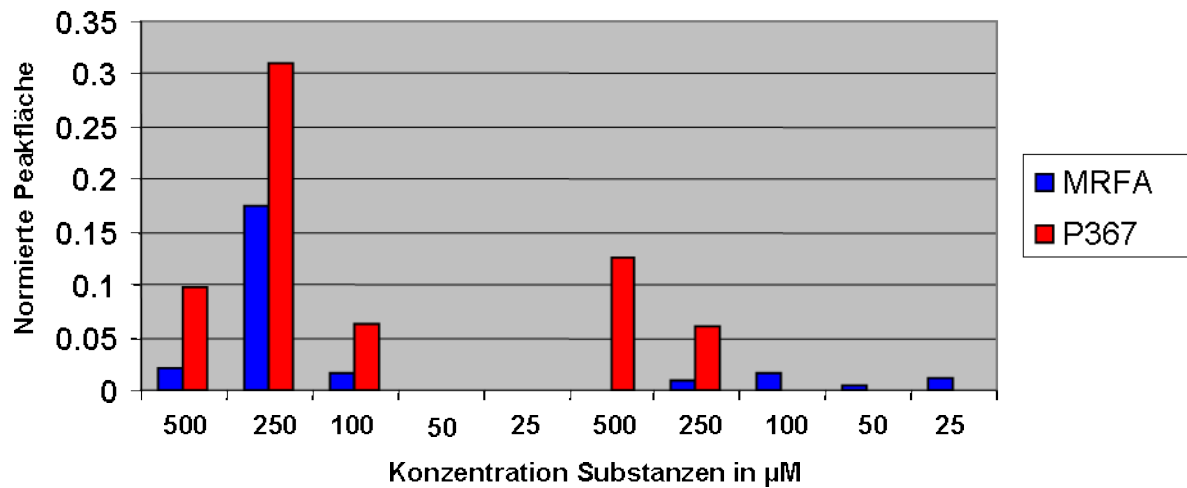
Diese Experimente wirkten recht viel versprechend diesen Assay doch etablieren zu können. Allerdings ließ eine Konzentrationsreihe Zweifel aufkommen. Selbst wenn unterschiedliche Ligandenkonzentrationen zum Binden angeboten werden (wobei all diese Konzentrationen stark im Überschuss gegenüber dem immobilisierten Protein waren), dürfte das normierte Signal nicht damit korreliert sein (Abbildung 56).





**Abbildung 56:** Normierte Peakflächen (auf 273,3 m/z) des P367-Signals (691,2 m/z) nach Bindungsassay an Cdc25a-Blattgoldoberfläche. Die Konzentration an Cdc25a betrug bei der Immobilisierung nach MPA-SAM-Protokoll 0,5 mg/ml. Für den Bindungsassay wurde P367 dem Enzym in unterschiedlichen Konzentrationen zum Binden angeboten (250 µM bis 10 µM). Gemessen wurde in DHB-Matrix.

In einem weiteren Experiment sollte die unspezifische Bindung der Cdc25a-Inhibitoren an ein Protein festgestellt werden. Eine derartige unspezifische Bindung wäre auch an der Oberfläche des Cdc25a möglich, also eine Bindung nicht in der active site, eine unwirksame Bindung. Hierzu wurde nach dem bereits beschriebenen Protokoll BSA über MPA an die Blattgoldoberfläche immobilisiert. Danach wurden das MRFA und der bereits verwendete Cdc25a-Inhibitor P367 zur Bindung angeboten. Nach Waschen und Auftrag von Matrixlösung ergaben sich die Abbildung 57 gezeigten normierten Peakflächen der Signale. Die so erhaltenen Signale sind in etwa genauso groß, wie die bei Cdc25a erhaltenen Signale (vgl. Abbildung 57). Auch MRFA bindet unspezifisch an das BSA. Die Durchführung dieser Konzentrationsreihe auf dem Kontrollprotein BSA zeigte, dass auch hier mit steigender Substanzkonzentration das Signal zunahm. Dieser Vergleich zeigte, dass es sich auch bei der Signalzunahme bei der Messung von P367 nach Bindungsassay mit immobilisierten Cdc25a nur um unspezifische Bindung des Inhibitors an die Phosphatase handeln kann.



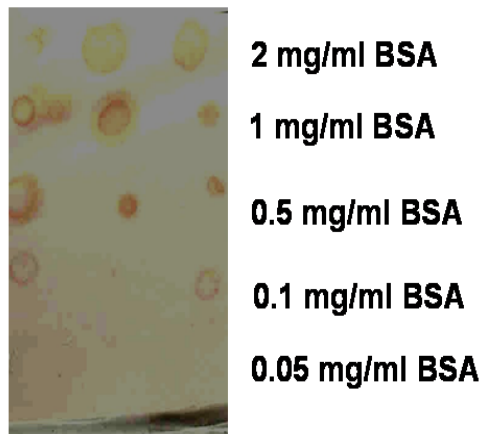
**Abbildung 57:** Normierte Peakflächen (auf 273,3 m/z) des P367- (rot) (691,5 m/z) und MRFA-Signals (blau) (524,3 m/z) nach Bindungsassay an BSA-Blattgoldoberfläche. BSA wurde dazu in verschiedenen Konzentrationen über MPA-SAM-Protokoll immobilisiert. Zu sehen sind die normierten Peakflächen zweier Messungen. Die Messung erfolgte in DHB-Matrix.

### 4.2.2.3 Immobilisierung auf Nitrocellulose

Eine weitere Oberfläche für die Proteinbindung ist Nitrocellulosemembran.

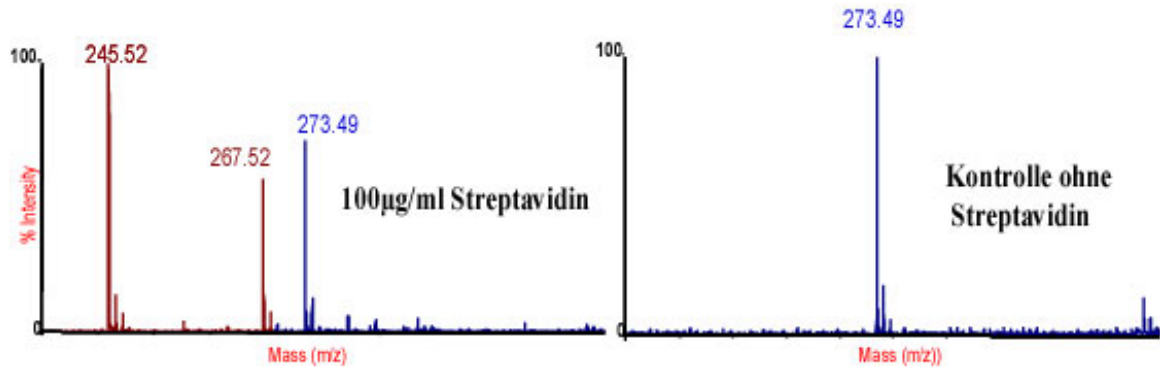
Eine entscheidende Verbesserung des Signals bei Verwendung der Nitrocellulose zur Immobilisierung des Proteins wurde durch eine Technik aus dem Bereich der Proteinchemie, dem Western Blotting, erreicht. Beim Blotting werden die im SDS-Gel befindlichen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu muss die Membran mit 20% Methanol aktiviert werden.

Die jeweiligen Mengen BSA werden in einer Lösung von Phosphatpuffer und 20 % Methanol aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Nitrocellulosemembran mit dest. Wasser gewaschen. Die Visualisierung des gebundenen Proteins an der Nitrocellulosemembran erfolgt durch den Farbstoff Ponceau Red. Bis zu einer Konzentration von 0,1 mg/ml ist gebundenes BSA auf der Membran nachweisbar. Offen ist jedoch, ob bei einer Menge von 0,05 mg/ml BSA kein Protein auf der Membran gebunden hat, oder ob es nicht mehr nachweisbar ist.



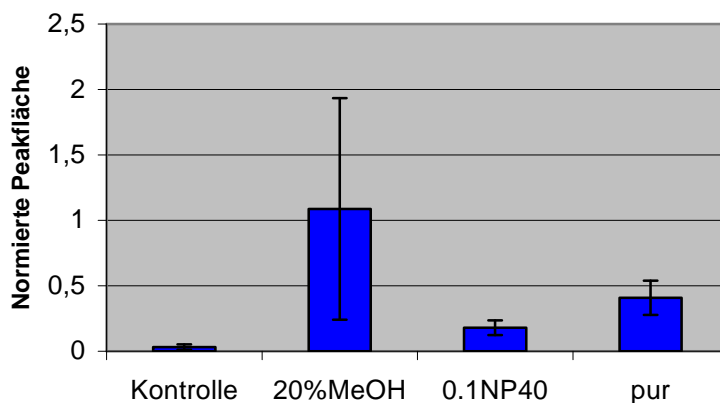
**Abbildung 58:** Nitrocellulose mit BSA in verschiedenen Konzentrationen. Dazu wurden je 5  $\mu$ l Proteinlösung in Phosphatpuffer mit 20 % Methanol für eine Stunde aufgegeben. Das immobilisierte Protein wurde nach Waschen mit Phosphatpuffer und Wasser mit Ponceau Red angefärbt.

Daher wurde dem Streptavidin auch hier 20% Methanol zugesetzt. Abbildung 59 zeigt das MALDI-Spektrum dieser Probe nach Aufgabe der optimierten DHB-Matrix.



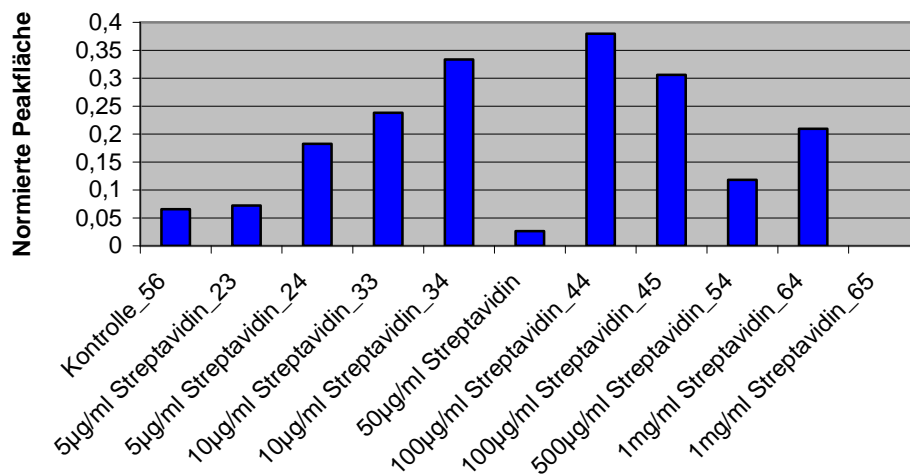
**Abbildung 59:** MALDI-Spektren nach Bindungsassay von Biotin auf Nitrocellulose mit und ohne absorbierten Streptavidin. Links: Biotin+H<sup>+</sup> bei 245,52 m/z und Biotin+Na<sup>+</sup> bei 267,52 m/z, DHB-Matrix bei 273,49 m/z nach Bindungsassay auf Nitrocellulose behandelt mit 0,1 mg/ml Streptavidin in Phosphatpuffer/20 % Methanol. Rechts: Gefundene Signale nach Bindungsassay mit proteinfreier Nitrocellulose: DHB-Matrix bei 273,49 m/z.

Verschiedene Zusätze wurden getestet hinsichtlich der Verbesserung des MALDI-Signals. Um die Signale vergleichen zu können wurde auf den Matrixpeak bei 273,3 Da normiert. Der Zusatz von 20% Methanol verbesserte anscheinend die Bindung des Proteins an die Membran, das Signal des Liganden Biotin war hier am besten zu messen. Ein Zusatz von 0,1% NP-40, ein Detergenz, das häufig zur verbesserten Benetzung einer Oberfläche eingesetzt wird, hingegen brachte keine Verbesserung, wie Abbildung 60 zeigt.



**Abbildung 60:** Mittelwerte der Biotinpeakflächen nach Durchführen des Bindungsassays unter verschiedenen Pufferbedingungen an Streptavidin immobilisiert an Nitrocellulose. Die Biotinpeakflächen wurden normiert auf den DHB-Matrixpeak 273,3 Da. 1) Kontrolle: Bindungsassay mit Bindungspuffer ohne Zusätze Nitrocellulosemembran ohne Streptavidin, 2) Zusatz von 20% Methanol zum Bindungspuffer bei Assay, 3) Zusatz von 0,1% NP40 beim Binden von Biotin an immobilisiertes Streptavidin, 4) Bindungspuffer ohne weitere Zusätze beim Binden von Biotin an immobilisiertes Streptavidin

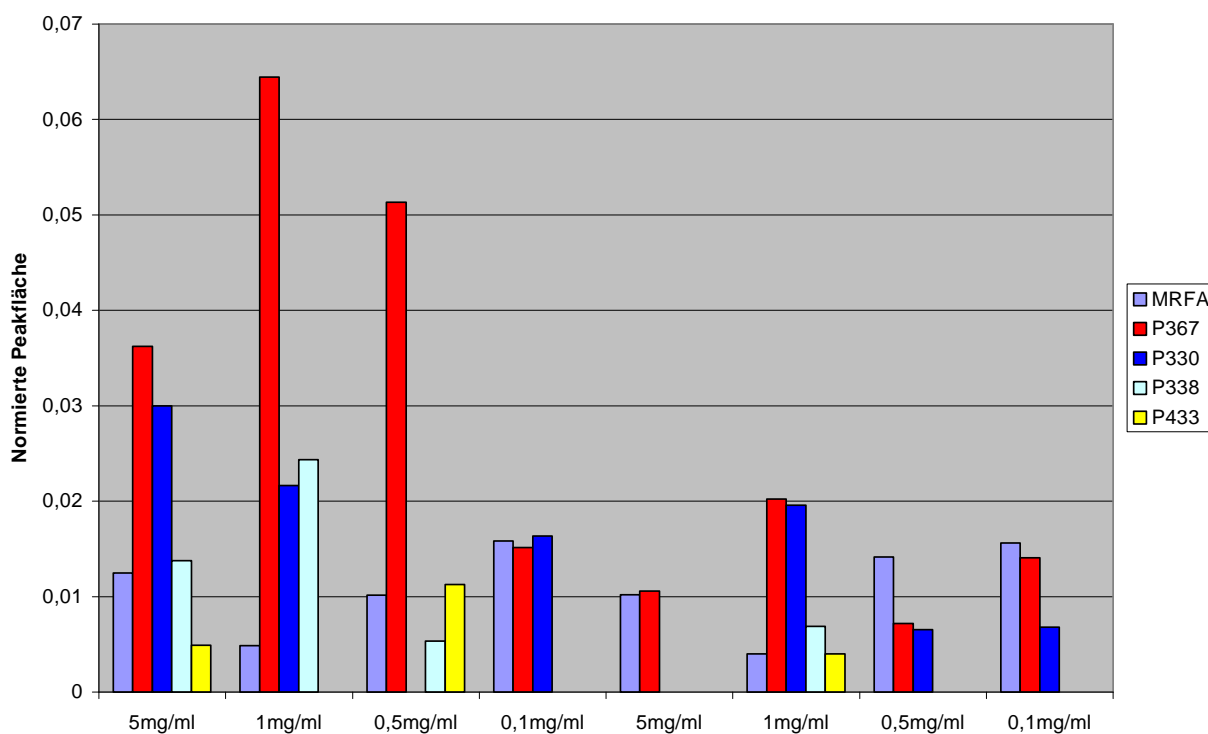
Auch der Einfluss verschiedener Streptavidin-Konzentrationen auf das Biotinsignal nach dem Bindungsassay wurde untersucht. Dazu wurden die in Abbildung 61 angegebenen Streptavidin-Lösungen zu je 10 µl auf die Nitrocellulosemembran aufgegeben.



**Abbildung 61:** Normierte Peakfläche des Biotinsignals nach Bindungsassay auf Nitrocellulose mit verschiedenen Streptavidin-Konzentrationen bei Immobilisierung. 5 µg/ml Streptavidin bis 1 mg/ml Streptavidin: Streptavidin in Phosphatpuffer mit 20% Methanol für eine Stunde auf Membran inkubiert. Kontrolle: Bindungsassay auf proteinfreier Nitrocellulose

Allerdings ließen sich diese Versuche nicht reproduzieren. Einzig die niedrige unspezifische Bindung konnte in folgenden Versuchen weiter nachgewiesen werden. Eventuell konnte das Biotin bei weiteren Versuchen nicht mehr vom Streptavidin gelöst, weil sich das Protein bei der Denaturierung über den freigesetzten Liganden gelegt hat, der damit nicht mehr messbar war.

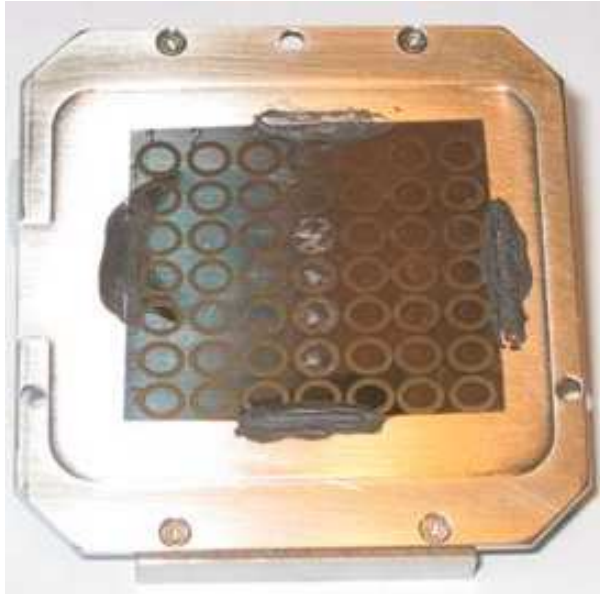
Es wurden noch Versuche unternommen Cdc25a an Nitrocellulose zu binden und die Bindung von Inhibitoren nachzuweisen. Auch hier wurde bei der Verwendung von Methanol im Immobilisierungspuffer ein höheres Ligandensignal gefunden. Allerdings zeigte bei allen Messungen eine relativ hohe unspezifische Bindung des Peptids MRFA, das auch bei dem HPLC-MS basierten Bindungsassay zum Feststellen unspezifischer Bindung eingesetzt wurde. Intensiveres Wasche führte lediglich dazu, dass gar keine Signal mehr zu finden war. Daher wurden die Versuche mit Nitrocellulose als Oberfläche zur Proteinbindung an dieser Stelle beendet.



**Abbildung 62:** Normierte Peakflächen der Signale der Substanzen MRFA, P367, P330, P338 und P433 nach Bindungsassay auf Nitrocellulose mit immobilisierter Cdc25a. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Cdc25a (5 mg/ml bis 0,1 mg/ml in Phosphatpuffer) mit (links) und ohne (rechts) die Gegenwart von 20% Methanol für eine Stunde auf der Nitrocellulose immobilisiert. Bindungsassay: je 1  $\mu$ l einer 1 mM Lösung der P-Substanzen, 1  $\mu$ l einer 0,1 mM MRFA-Lösung.

#### 4.2.2.4 Immobilisierung auf Laserdruckerfolie

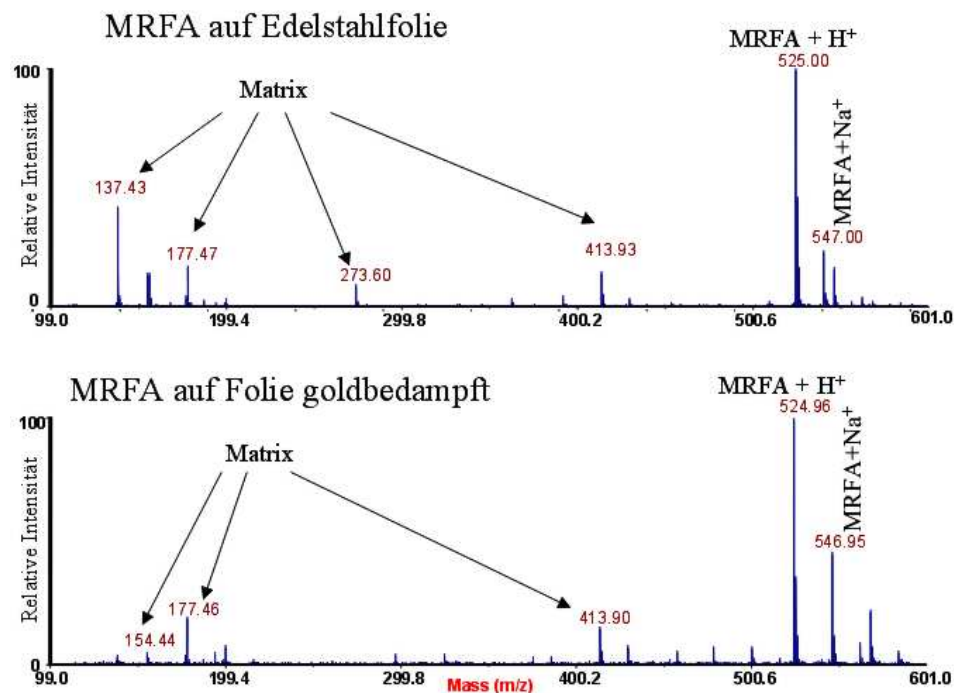
Als ein weiteres Beispiel für mögliche Oberflächen zur Immobilisierung von Protein und zur Verwendung als MALDI-Target diente die Absorption von Protein an Kunststoffoberflächen, wie z.B. im ELISA-Test. Laserdruckerfolien rückten in das Blickfeld des Interesses, da sie hitzebeständig, ideal im Durchmesser sind; sie sind leicht zu handhaben, aber dünn genug, um auf den MALDI-Messträger zu passen. Abbildung 63 zeigt eine mit Gold bedampfte Laserdruckerfolie, die auf einen MALDI-Messträger geklebt wurde. Die vergoldete Folie wird auf den Stahlträger mit Leitpaste C geklebt, einem Kleber, der aus der Elektronenmikroskopie stammt. Neben der Adhäsion an die Oberfläche garantiert er auch die Leitung zwischen dem Träger und der Folie.



**Abbildung 63:** Photo einer Laserdruckerfolie, goldbedampft, mit einem leitfähigen Kleber (Leit-C nach Göcke) auf den Stahlprobenträger befestigt, der Probenauftrag von 1  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  MRFA in 1  $\mu\text{l}$  DHB gesättigt in 50% Acetonitril/0,3% TFA ist auf den mittleren Positionen erkennbar

Zunächst wurde in Messungen festgestellt, ob es überhaupt möglich ist, Proben auf dieser Oberfläche im MALDI-TOF zu messen.

Die Messung einer identischen Probe (1  $\mu\text{l}$  50  $\mu\text{M}$  MRFA in 1  $\mu\text{l}$  DHB gesättigt in 50% Acetonitril/0,3% TFA) auf den unterschiedlichen Oberflächen zeigte, dass die Qualität der Spektren und Messempfindlichkeit auf der goldbedampfte Folie der genauso gut ist, wie auf einer Stahlfolie (siehe Abbildung. 15). In beiden Spektren ist der MRFA+H<sup>+</sup>-Signal bei 525 Da und das MRFA+Na<sup>+</sup>-Signal deutlich größer als die Matrix-Peaks und übersteigt das Rauschen 100fach. Auch Versuche mit vergoldeten Deckgläschen zeigten ein ebenso gutes Signal, wie die Folie. Allerdings waren die Folien einfacher in der Handhabung (zur Bearbeitung genügte eine Schere, für die Deckgläschen wurde ein Glasschneider benötigt), besitzen eine höhere Stabilität als die Gläschen und sind mit einem Laserdrucker beschreibbar. Hieraus ergeben sich ein einfacher Probenauftrag sowie eine verbesserte Herstellung der Leitfähigkeit. Für den Vergleich wurde eine Edelstahlfolie auf dem Träger befestigt, um den Unterschied auszugleichen, der durch das Aufkleben einer Folie entstehen könnte. Die MALDI-Spektren in Abbildung 64 zeigen den Vergleich zwischen Metallfolie und goldbedampfter Laserdruckerfolie auf einen Träger geklebt.

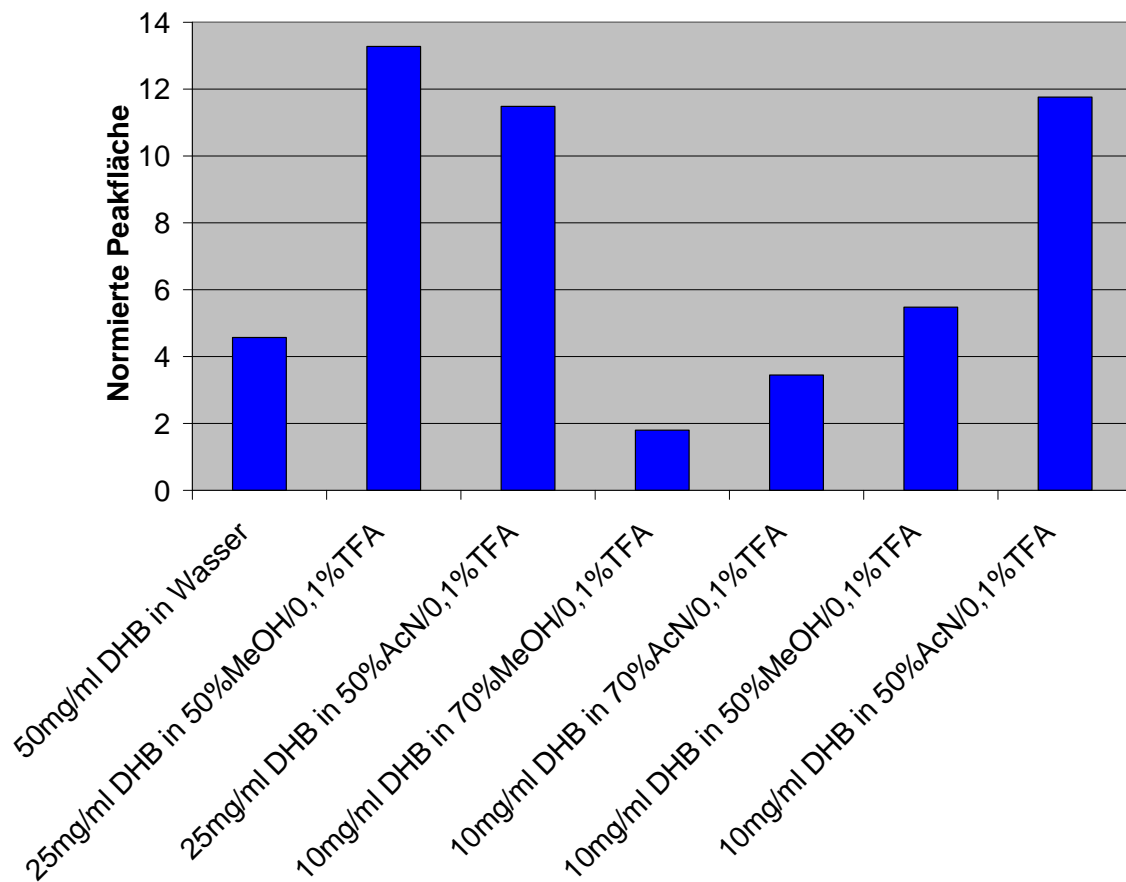


**Abbildung 64:** MALDI-Massenspektren von 1  $\mu$ l 50  $\mu$ M MRFA in DHB-Matrix (gesättigt in 50% Acetonitril/0,15% TFA) auf Stahlfolie und auf goldbedampfter Laserdruckerfolie

Zu Beginn wurde die Überlegung angestellt, dass die Folien auf irgendeine Weise leitfähig gemacht werden müssen. Neben der Besputterung mit Gold wurden Graphitbahnen auf die Folie mit dem Laserdrucker gedruckt für eine MALDI-Messung. Es stellte sich aber heraus, dass die Folie auch unbehandelt für MALDI-Messungen eingesetzt werden konnte. Es konnten Mengen von 50-1 pmol MRFA in DHB-Matrix (Abbildung 16) sowohl auf der vergoldeten bzw. graphitbedruckten wie auch auf der unbehandelten Folie im MALDI detektiert werden. Nur der Untergrund ist auf den unbehandelten oder nur mit graphitbedruckten Folien größer als nach der Goldbedampfung.

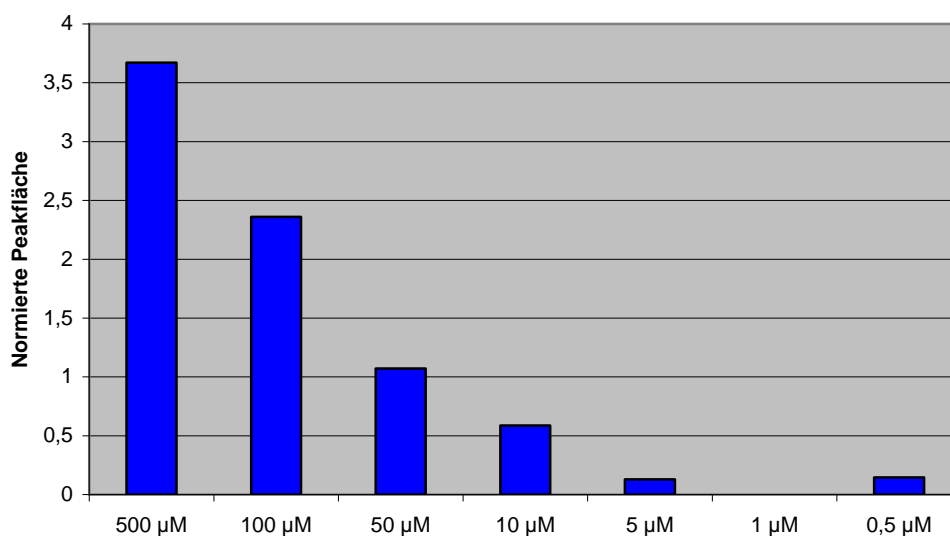
Für die Experimente zur Immobilisierung von Streptavidin wurde zunächst wurde die beste Matrixmischung für die Messung von Biotin auf unbehandelter Laserdruckerfolie ermittelt.





**Abbildung 65:** Normierte Peakflächen (auf 273,4 m/z) des Signals von 10 µl 1 mM Biotinlösung bei verschiedenen Matrices auf der Laserdruckerfolie. Die Konzentrationen an DHB und Lösungsmitteln sind der Abbildung zu entnehmen.

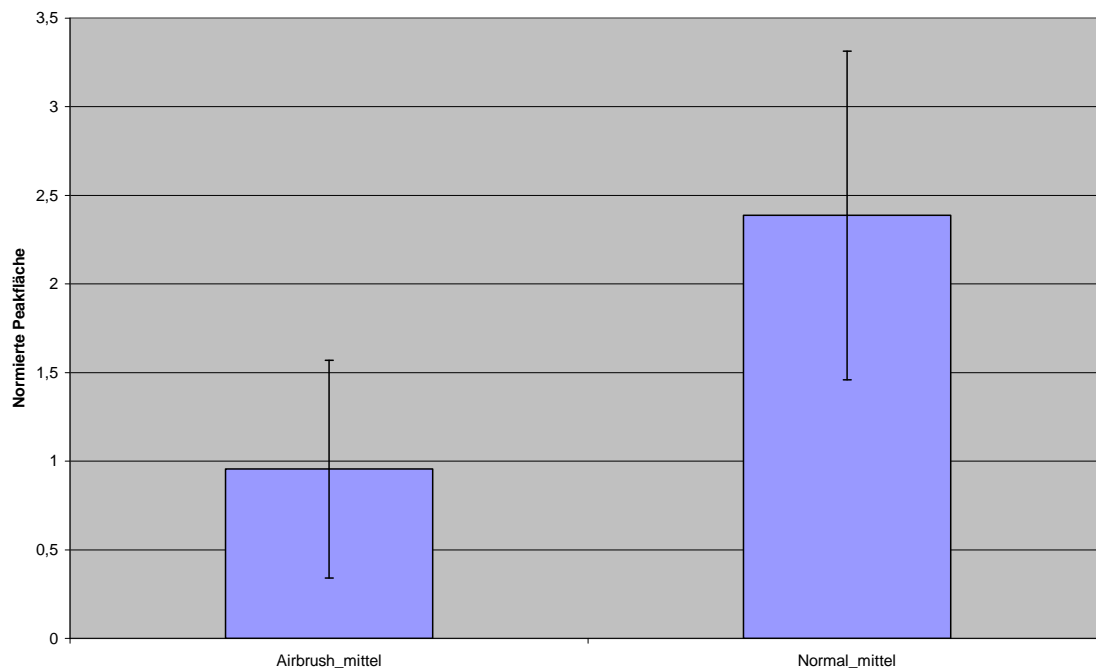
Der Auftrag der Messwerte im Balkendiagramm in Abbildung 66 zeigt, dass sich Biotin bis zu einer Konzentration von 5 µM verlässlich auf der Folie messen lässt. Es ist aber auch möglich bei noch geringeren Konzentrationen ein Signal zu erhalten.



**Abbildung 66:** Normierte Peakflächen (auf 273,4 m/z) des Signals (245,4 m/z) von je 1 µl Biotinlösung in den angegebenen Konzentrationen in DHB-Matrix (25 mg/ml in 50% Methanol/0,1% TFA in Wasser).

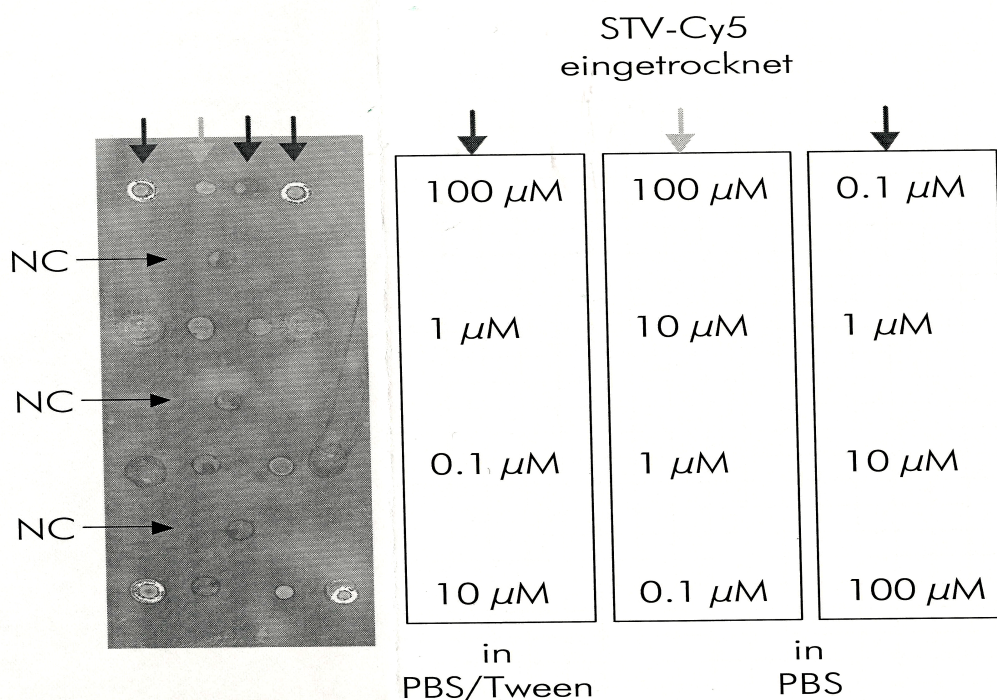
Mit dem Einsatz der Laserdruckerfolie wurde es möglich, den Einsatz des Tintenstrahldruckers zur Beschichtung der Folien zu testen. Das Aufbringen von Matrix und anderen Lösungen mit dem Tintenstrahldrucker wurde getestet. Dazu wird ein handelsüblicher Bubble Jet Drucker (Canon) verwendet. Die Leerpatronen waren ein Geschenk der Firma Pelikan. Die Aufgabe jedoch verschmierte sofort und trocknete nicht gleichmäßig. Auch verstopften die Düsen des Druckerkopfes nach jedem Auftrag von Matrix, trotz „Nachspülens“ mit Wasser und Lösungsmittel.

Nach den unbefriedigenden Beschichtungsversuchen mit dem Tintenstrahldrucker wurde noch versucht eine möglichst dünne Beschichtung durch die Airbrush-Technik zu erzielen. Dies sollte vor allem die Matrixschicht verdünnen, die kleinen Signale aus dem Bindungsassay zu vergrößern. Im Versuch mit Substanzen auf unbehauelter Laserdruckerfolie, um die prinzipielle Eignung dieser Auftragechnik für MALDI-TOF-Messungen zu untersuchen, verbesserte sich das Signal nicht, im Gegenteil das Matrix-Signal-Verhältnis verschlechtert sich. Abbildung 67 zeigt die normierten Peakflächen des Biotinsignals von 1 µl 5 mM Biotin einmal durch Airbrush mit DHB-Matrix beschichtet, einmal durch die übliche Tropfentechnik mit Matrix gemischt.



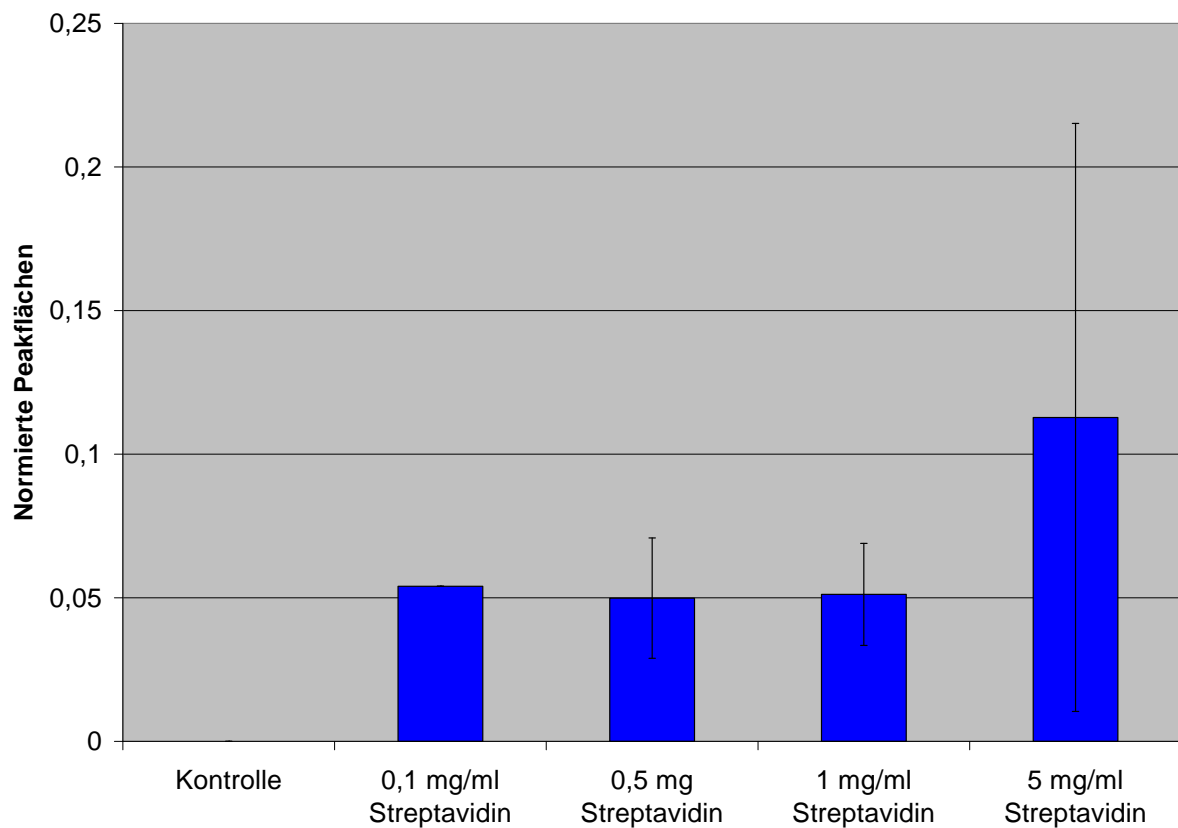
**Abbildung 67:** Mittelwerte der normierten Peakflächen (auf 273,4 m/z) des Biotinsignals bei 1  $\mu$ l 5 mM Biotinlösung bei in Abbildung 66 genannter Matrix. Airbrush: Auftrag der Matrix mittels Airbrushtechnik; Normal: Auftrag der Matrix mittels konventioneller Tropfentechnik.

Durch Testen mit Hilfe von Cy5-gelabelten Streptavidin (ein Geschenk von Ron Wacker, Chimera AG) sollte Gewissheit darüber erlangt werden, ob überhaupt Protein an die Laserdruckerfolienoberfläche immobilisiert werden kann. Cy5-gelabeltes Streptavidin wurde mit dem in den Experimenten üblichen Verfahren auf der Oberfläche immobilisiert. Jedoch erwies sich diese Oberfläche für eine Desorption von Protein als wenig effektiv. Schon das Eintrocknen geschah unregelmäßig und nach dem Waschen der Oberfläche ging ein Großteil des Proteins verloren.



**Abbildung 68:** Fluoreszenzsignal nach der Immobilisierung von Cy5-Streptavidin an Poly-L-Lysin-behandelter Laserdruckerfolie

Dennoch wurde getestet, ob die gebundene Proteinmenge ausreicht für die Durchführung des Bindungsassays. Dazu wurde unmarkiertes Streptavidin über eine Poly-L-Lysin-Schicht an die Laserdruckerfolie gebunden und mit 25% Glutaraldehyd quervernetzt. Dabei wurden Konzentrationen von 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 5 mg/ml Streptavidin (je 2  $\mu\text{l}$ ) in Streptavidin-immobilisierungspuffer aufgegeben. Dem immobilisierten Streptavidin wurden je 2  $\mu\text{l}$  1 mM Biotinlösung in PBS ohne S zur Bindung angeboten. Nach dem Auftrag der üblichen DHB-Matrixmischung für Biotin wurden die MALDI-TOF-Messungen unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Peakflächen des Biotinsignals wurden auf den DHB-Peak bei 277,3 m/z normiert. In Abbildung 69 werden die normierten Peakflächen für die unterschiedlichen Streptavidin-Konzentrationen bei der Immobilisierung gezeigt. Das größte Biotinsignal wurde für eine Streptavidinkonzentration von 5 mg/ml erhalten. Die Biotin-Signale bei den anderen Protein-Konzentration sind nur etwa halb so groß wie das Signal bei 5 mg/ml. Das Signal des Biotin+H<sup>+</sup> ist auch niedriger als bei auf DTSP-Gold immobilisierten Streptavidin (0,3) bzw. Nitrocellulose immobilisierten Streptavidin (normierte Peakfläche: 0,35 - 1).



**Abbildung 69:** Normierte Peakflächen des Biotinsignals nach Bindungsassay auf Laserdruckerfolie mit unterschiedlichen Streptavidin-Konzentrationen, immobilisiert über Poly-L-Lysin

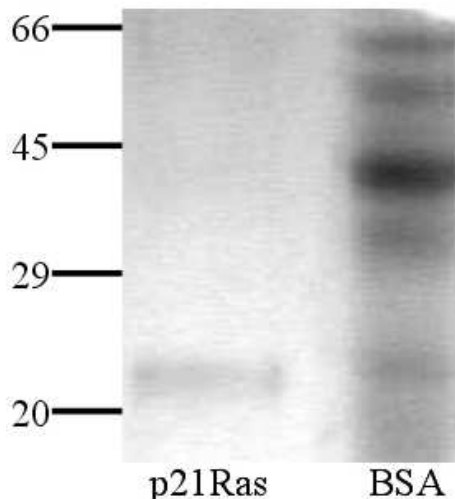
Diese Ergebnisse waren nicht zuverlässig reproduzierbar. Daher wurden die Versuche, einen MALDI-MS basierten Protein-Liganden Bindungstest mit Laserdruckerfolie als Immobilisierungsoberfläche durchzuführen, eingestellt.

### 4.3 HPLC-MS-ASSAY

#### 4.3.1 Testen der Beladung des POROS-EP mit Protein

Zunächst sollte sichergestellt werden, dass das gewünschte Protein tatsächlich an das Säulenmaterial gebunden hatte. Hierzu sollte das Protein nach dem Lösen vom POROS-EP durch SDS-PAGE nachgewiesen werden. Nach mehrfachem Waschen des beladenen POROS-EP, um nicht immobilisiertes Protein zu entfernen, wurden 20  $\mu$ l in Puffer aufgeschwemmtes POROS verwendet. Die Bindung des Proteins an das Säulenmaterial wurde durch das Mercaptoethanol des SDS-Gelprobenpuffers und die hohen Temperaturen (95°C), die zur Probenvorbereitung eingesetzt werden, zerstört. Es wurde sowohl mit Ras, als auch mit BSA beladenes POROS getestet. Auf dem Gel war nach Färbung mit Coomassie die Proteinbande des p21Ras bei 21 kDa zu er-

kennen. Da das verwendete BSA einen verhältnismäßig geringen Reinheitsgrad besaß, ist die Vielzahl der auf dem Gel gefundenen Proteinbanden nicht verwunderlich. Auch das Ergebnis für BSA zeigt, dass das Protein zuverlässig an das POROS-EP mit dem verwendeten Protokoll immobilisiert wurde.



**Abbildung 70:** SDS-Gel nach Schägger; je 20µl Aufschlammung von POROS-EP mit Protein beladen in Puffer, versetzt mit 2x Probenpuffer, 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Low-Marker, Zahlen stehen für kDa, Färbung erfolgte mit Coomassie

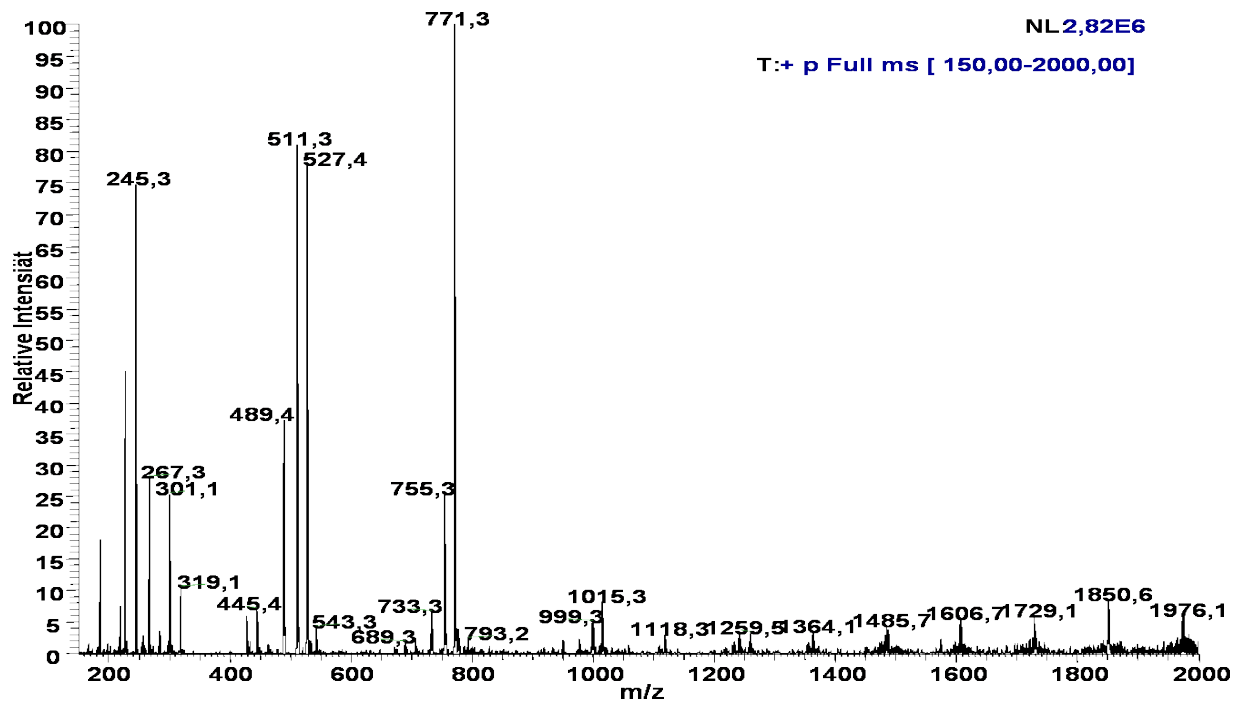
Zusätzlich wurde das alte Säulenmaterial mit Trypsin versetzt, um das daran gebundene Protein zu verdauen. Mittels HPLC-MS-Messung konnten Peptide des Ras-Proteins nachgewiesen werden.

### 4.3.2 Eluierung durch Denaturierung

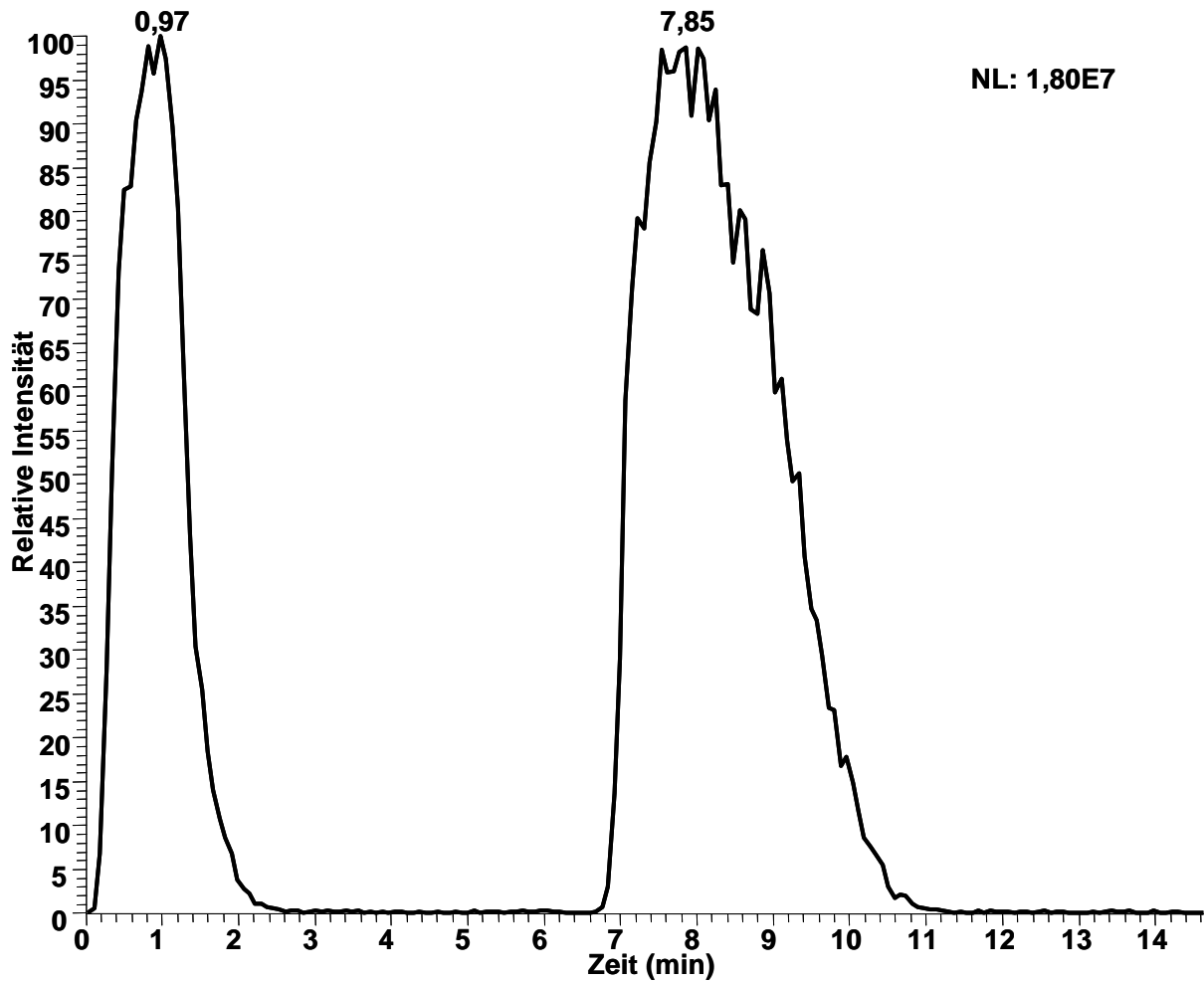
#### 4.3.2.1 Streptavidin-Biotin

Die Etablierung einer POROS-EP-Affinitätssäule wurde zunächst im Hochdruckflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)-System bestehend aus dem Elektrospray-Ionenfallenmassenspektrometer LCQ Deca und dem Agilent 1100er HPLC-System mit manuellem Injektor durchgeführt. Der manuelle Injektor wurde deshalb angeschlossen, um mit größeren Auftragsvolumina arbeiten zu können als durch den Autosampler des Agilent-Systems vorgegeben (100 µl). Für die Arbeiten mit der Streptavidin-POROS-Säule wurde eine 500µl-Schleife in den Handinjektor eingesetzt. Die Leersäule (Durchmesser 3mm, Höhe, 30 mm) wurde mittels einer freistehenden HPLC-Pumpe mit dem Streptavidin-beladenen POROS-Material befüllt und in das Agilent HPLC-System eingebaut. Als Laufmittel für die Versuche wurde beim Auftragen des Biotins Wasser verwendet. Die jeweils aufgetragene Biotinmenge beträgt 2,5 µmol, da je 0,5 ml 5 mM Biotinlösung aufgegeben wurde. Das ergibt eine Gesamtmenge von 5 µmol aufgetragenes Biotin. Aus den über die Zeit aufgenommenen Massenspektren wird für die Masse eines Ions ein Chromatogramm, das den zeitlichen Verlauf der Intensität dieses Massenpeaks verfolgt. Bei dem Massenpeak 267,3 Da handelt es sich um Biotin + Na<sup>+</sup>. Der Peak 733,3 Da ist ein Ag-

gregat von 3 Biotin-Molekülen ( $3 \cdot 244,3 + 1$ ), Peak 755,3 von 3 Biotin-Molekülen plus Natrium-Ion ( $3 \cdot \text{Biotin (244,3 Da)} + \text{Na}^+ (23 \text{ Da})$ ), bei 771,3 von 3 Biotin-Molekülen und Kalium ( $3 \cdot 244,3 \text{ Da} + \text{K}^+ (39 \text{ Da})$ ). Die Peaks 551,3 ( $2 \cdot 244,3 + \text{Na}^+$ ) und 527,4 ( $2 \cdot 244,3 + \text{K}^+$ ) lassen sich auch durch eine Aggregation von Biotin erklären. Die Massen ab etwa 1000 Da sind Verunreinigungen im Massenspektrometer, das Muster ist typisch für eine Kalibriersubstanz der ESI-Massenspektrometrie. Dass dieser Untergrund zu sehen ist, zeigt bereits wie schwierig die Messungen bei geringen Mengen Substanz sind. Gehen die Substanzmengen noch weiter runter, wird es schwierig, ihre Peaks vom Untergrund der Messung zu unterscheiden.



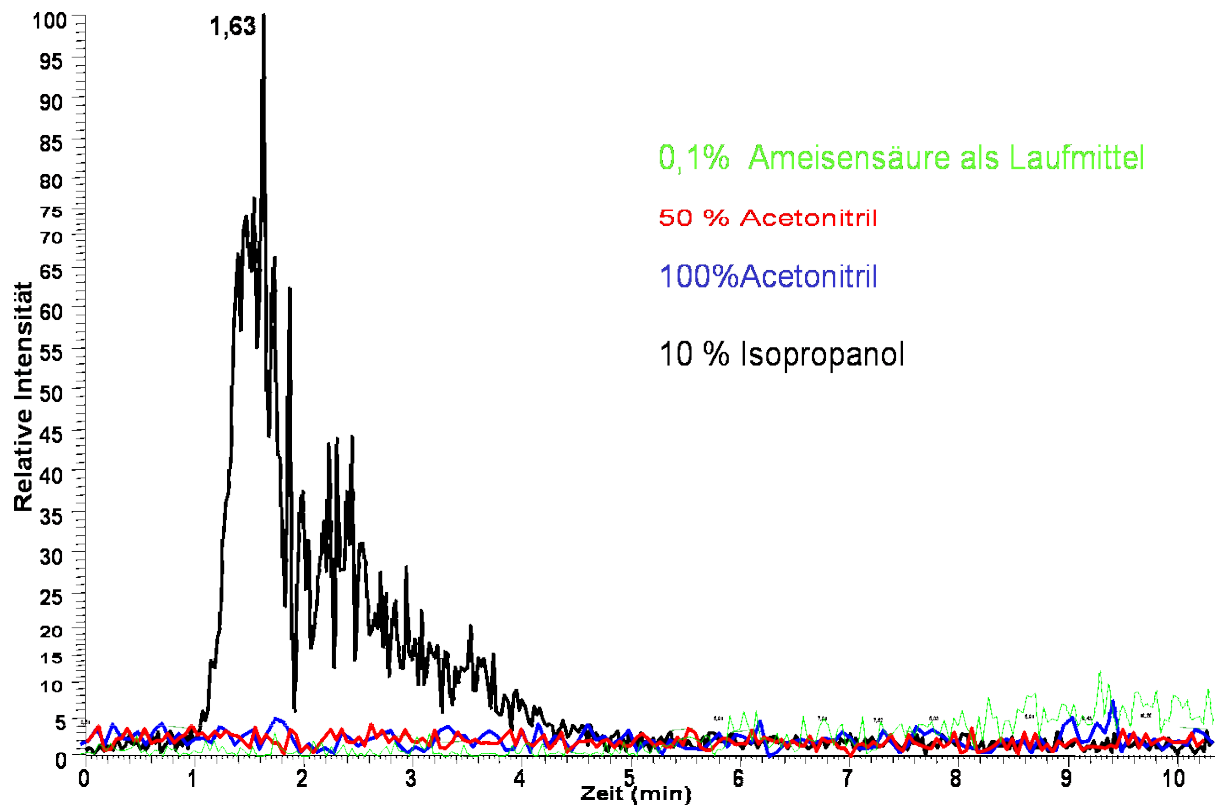
**Abbildung 71:** Spektrum der Beladung der Streptavidin-Affinitätssäule gemittelt über die Zeit des ersten Peaks im Massenchromatogramm, das einfach positiv-geladene Biotin hat die Masse von 245,3 ( $244,3 + 1$ ) Da



**Abbildung 72:** Massenchromatogramm der Aufgabe des Biotins auf die Streptavidin-POROS-Affinitätssäule. Es erfolgte eine Aufgabe mit Start der HPLC-MS und eine Aufgabe bei 6 Minuten. Laufmittel: Wasser, Flussgeschwindigkeit: 0,3 ml/min; von der 5 mM Biotinlösung (in Wasser) wurden jeweils 0,5 ml aufgegeben. Detektierte Masse bei 245,4 Da, Die Normalisierung des größten Peaks wurde mit  $1,8 \cdot 10^7$  angegeben. Peakfläche 1. Peak:984665352, 2. Peak: 2040591070

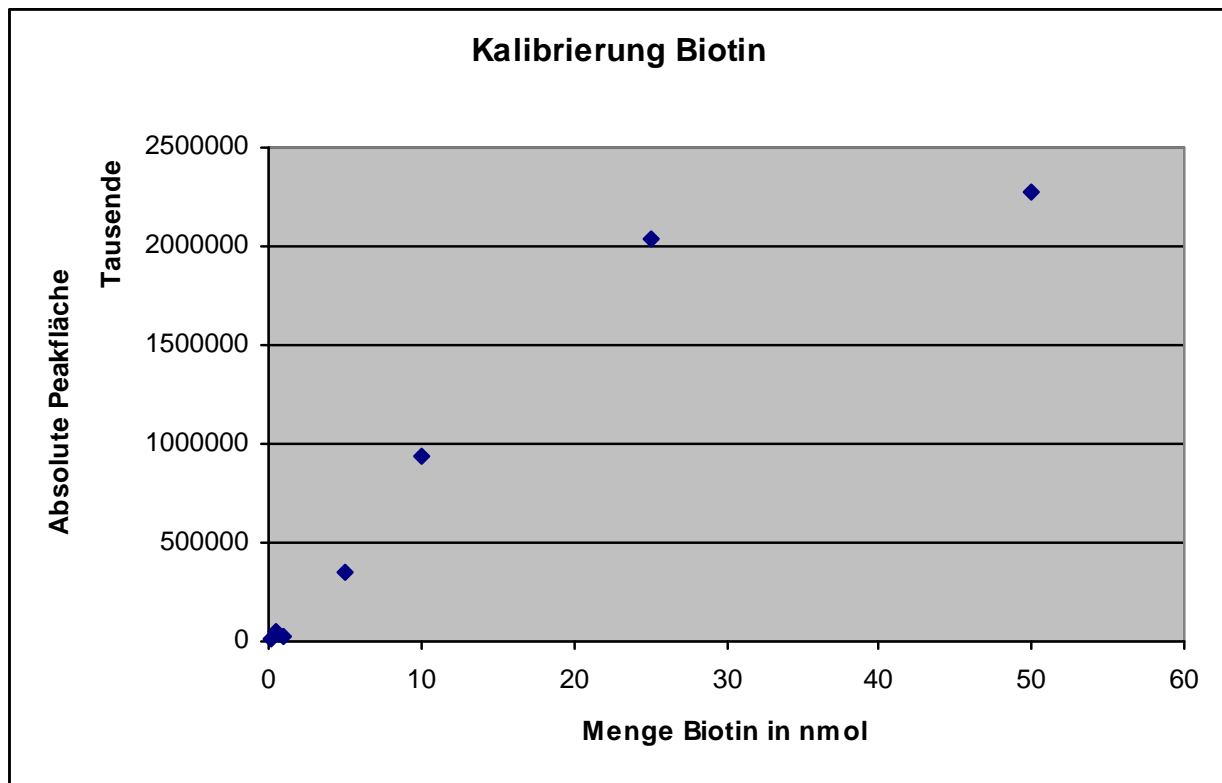
Für die Elution wurde zunächst dem Laufmittel 0,1% Ameisensäure zugesetzt, da schon ein kleine Veränderung des pH-Wertes hin zum Säuren einen gebundenen Liganden lösen kann. Da kein Biotin eluierte, wie die grüne Spur im Massenchromatogramm in Abbildung 73 zeigt, wurden Lösungsmittel zur Denaturierung des Streptavidins eingesetzt. Weder die Aufgaben von 50% Acetonitril (rote Spur), noch von 100% Acetonitril (blaue Spur) über den manuellen Injektor konnte Biotin eluieren. Erst die Zugabe von 10% Isopropanol brachte Erfolg. Nach 1,6 Minuten eluierte das Biotin, wie die schwarze Spur im Massenchromatogramm zeigt.





**Abbildung 73:** Massenchromatogramm der Elution des Biotins von der Streptavidin-POROS-Affinitätssäule, Laufmittel: 0,1% Ameisensäure, Flussgeschwindigkeit: 0,3 ml/min; von den denaturierenden Lösungen wurden jeweils 0,5 ml aufgegeben. Detektierte Masse bei 245,4 Da, Die Normalisierung des größten Peaks wurde mit  $5,56 \cdot 10^6$  angegeben. Die Peakfläche betrug 218489127

Für die Kalibrierung wurden folgende Mengen Biotin aufgegeben: 0,1 nmol, 0,5 nmol, 1 nmol, 5 nmol, 10 nmol, 25 nmol und 50 nmol in jeweils 10  $\mu$ l Wasser. Der Verlauf der Messpunkte der Kalibrierung zeigt an, dass es zu einer Sättigung kommt. Ab einer bestimmten Menge Substanz ist das Massenspektrometer nicht in der Lage einen noch größeren Peak anzuzeigen. Dann ist die Obergrenze der Menge an Ionen erreicht, die die Ionenfalle aufnehmen kann. Die Peaks werden regelrecht abgeschnitten. Ab einer Menge von 1 nmol ist die Untergrenze der Messbarkeit erreicht. Auch hier sind die Werte nicht mehr linear angeordnet, da hier die Empfindlichkeit des LCQ Deca nicht mehr ausreicht, um exakt genug zu messen. Die Massenpeaks des Biotins verschwinden in diesem Bereich im Untergrund.



**Abbildung 74:** Die absoluten Peakflächen aus dem Massenchromatogramm von 245,3 m/z aufgetragen gegen die eingesetzten Mengen Biotin in nmol. eingesetzte Mengen: 0,1 nmol, 0,5 nmol, 1 nmol, 5 nmol, 10 nmol, 25 nmol und 50 nmol in jeweils 10 µl Wasser.

Wird nur der lineare Bereich beachtet, so erhält durch lineare Regression die Geradengleichung

$$y = 9 \cdot 10^7 x + 3 \cdot 10^7$$

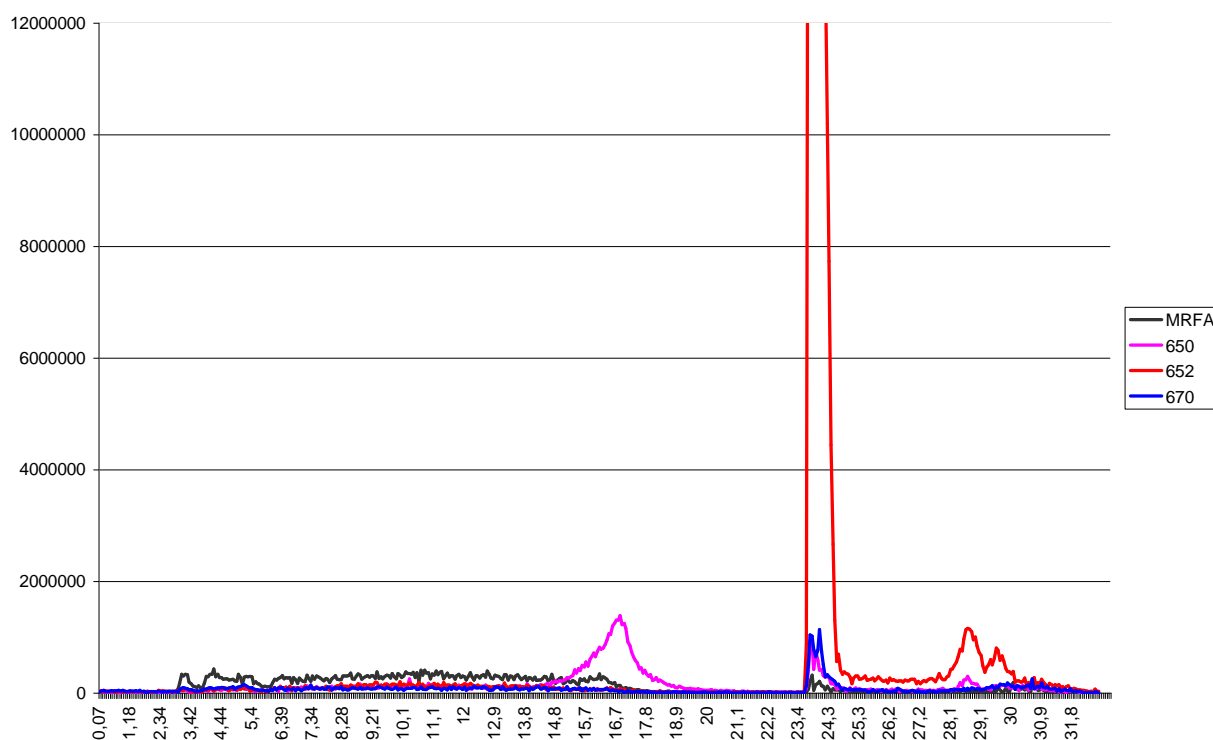
Mithilfe dieser Kalibrierung lassen sich Biotinmengen aus den Massenchromatogrammen des Auftrages und der Elution bestimmen.

Die errechnete Biotinmenge aus der Peakfläche des ersten Auftrages beträgt 10,6 nmol und die aus dem zweiten Auftrag 22,3 nmol. Das würde bedeuten, dass von den 2,5 µmol zunächst 99,9 % an die Säule gebunden hätten und im zweiten Schritt 99,1% des angebotenen Biotins gebunden hätten. Damit müssten insgesamt 4,96 µmol Biotin an der Streptavidin-POROS-Säule immobilisiert worden sein. Die Biotinmenge der Elution mit 10 % Isopropanol beträgt demnach: 2,1 nmol. Das würde bedeuten, dass lediglich 0,04% des Biotins eluiert sind.

In einer letzten Messung mit der Streptavidin-POROS-Säule wurden wurde noch mal versucht Biotin unter Einsatz von 0,5 ml 20% Isopropanol zu eluieren. Im Massenchromatogramm der Messung ist kein Peak zu erkennen, die Normalisierung des größten Peaks wird mit  $1,21 \cdot 10^5$  angegeben. Das bedeutet, dass lediglich Rauschen gemessen wurde.

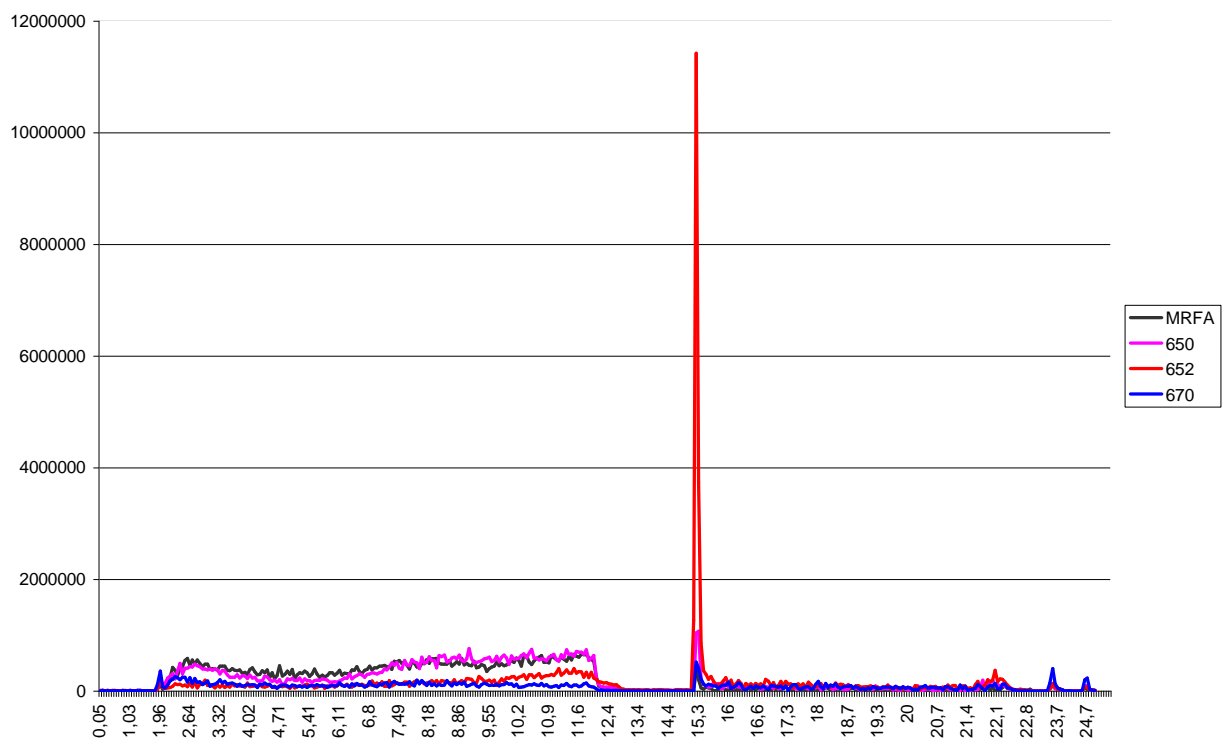
#### 4.3.2.2 Farnesyltransferase-Bisubstrat-Inhibitoren

Die Farnesyltransferase mit den Inhibitoren von M. Thutewohl war das erste Protein-Liganden-System, das ein tatsächlich auszutestendes System darstellte. Die Strukturen der verwendeten MT-Verbindungen finden sich im Anhang. Die Farnesyltransferase-POROS-Affinitätssäule (1mm\*20mm) wurde analog zur Streptavidinsäule und in der HPLC-MS mit manuellen Injektor betrieben. Die Aufgabe der Substanzen und Elutionsmittel erfolgte unter kontinuierlichem Fluss (50  $\mu$ /min) von 0,1 mM Ammoniumacetat. Abbildung 75 zeigt die Spuren von MRFA (524,3 m/z), MT650 (m/z), MT652 (m/z) und MT670(m/z) im Massenchromatogramm. MRFA ist das Peptid aus den Aminosäuren Methionin (M), Arginin (R), Phenylalanin (F) und Alanin (A), eine zum Tuning des ESI-Massenspektrometers eingesetzte Substanz, die keine spezifische Bindung für Farnesyltransferase besitzen sollte. Nach zwei Minuten Laufmittelfluss wurde das Substanzgemisch aus je 100  $\mu$ M von jeder Verbindung mit einem Volumen von 0,5 ml injiziert. Die mit Wasser verdünnte Substanzlösung enthält demnach 4% DMSO. In den Massenchromatogrammen (Abbildung 75) ist ein Anstieg der Signale der Substanzen bis auf ein Plateau zu erkennen, das bei etwa 16 Minuten wieder absinkt. Lediglich bei Substanz MT650 ist um die 17. Minute herum ein Peak zu erkennen. Nach der Aufgabe von 500  $\mu$ l 100% Acetonitril in der 22. Minuten ist bei allen vier Substanzen eine Elution bei 23,5 Minuten zu erkennen, wobei MRFA nur einen sehr schwachen Peak ergibt, MT650 und MT670 gleich stark. Etwa 10-mal größer ist jedoch der Peak von MT652. Die unterschiedlichen Peakhöhen könnten entweder von einer unterschiedlich guten Bindung an die Farnesyltransferase herrühren, was aber eher unwahrscheinlich ist, da im Durchfluss bei der Aufgabe der Substanzen nicht so große Unterschiede in den Peakhöhen zu erkennen waren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass MT652 besser ionisiert als die übrigen Substanzen.



**Abbildung 75:** Massenchromatogramme der Substanzen MRFA, MT650, MT652 und MT670 des Bindungsassays an der Farnesyltransferase-POROS-Säule. Auftrag von 100  $\mu\text{M}$  jeder Substanz in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$  bei 2 Minuten. Elution mit 0,5 ml 100% Isopropanol bei 22 Minuten. Laufmittel: 100  $\mu\text{M}$  Ammoniumacetat in Wasser. Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Bei der Wiederholung dieser Bindungsmessung mit einer BSA-POROS-Säule zeigte sich allerdings ein ähnliches Bild (Abbildung 76). Der Peak von MT652 ist beim Auftrag von 100% Acetonitril in der 15. Minute zwar nur halb so groß wie bei der Messung mit der Farnesyltransferase-POROS-Säule. Dies kann aber an eventuellen Resten von Salz in der Affinitätssäule liegen, die die Ionisation verschlechtern. Deutlich zu erkennen ist jedoch, dass hier eine starke unspezifische Bindung der Substanzen an ein beliebiges Protein oder das Säulenmaterial vorliegt und daher über die spezifische Bindung an Farnesyltransferase keine Aussage getroffen werden kann.

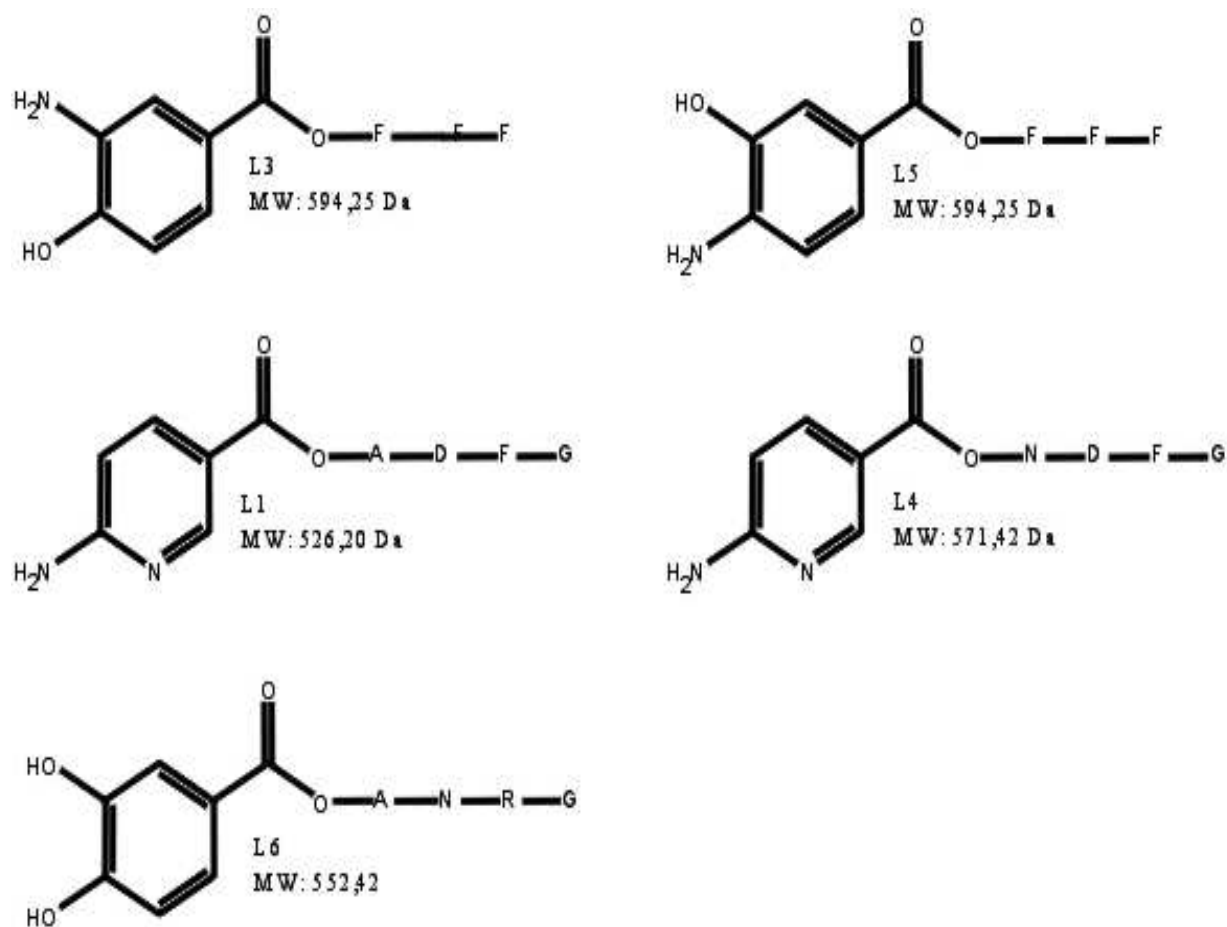


**Abbildung 76:** Massenchromatogramme der Substanzen MRFA, MT650, MT652 und MT670 des Bindungsassays an der BSA-POROS-Säule. Auftrag von 100  $\mu\text{M}$  jeder Substanz in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$  bei 2 Minuten. Elution mit 0,5 ml 100% Isopropanol bei 15 Minuten. Laufmittel: 100  $\mu\text{M}$  Ammoniumacetat in Wasser. Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Das bedeutet, dass diese Substanzen eine hohe unspezifische Bindung für Proteine bzw. Säulenmaterial besitzen. Auf weitere Messungen wurde daher verzichtet.

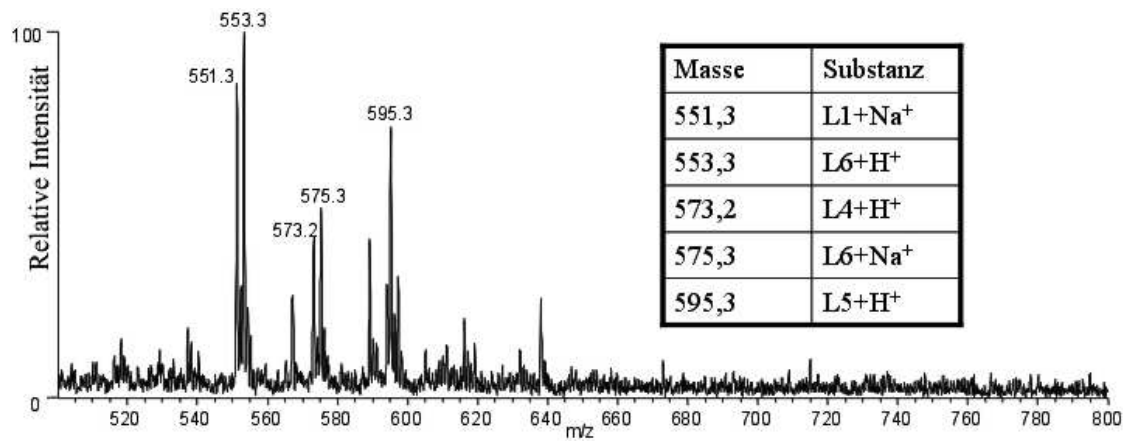
#### 4.3.2.3 Ras: GTPase Aktivatoren

In einer kleinen Auswahl wurden Peptide getestet, die die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras steigern sollten. [110] Diese drei bis vier Aminosäuren großen Peptide besitzen unterschiedliche Kopfstrukturen, um die Abspaltung des  $\gamma$ -Phosphats des GTP zu beschleunigen (siehe Abbildung 7). Die Verbindungen wurden freundlicherweise von Lars Kissau, AG Waldmann, zur Verfügung gestellt.



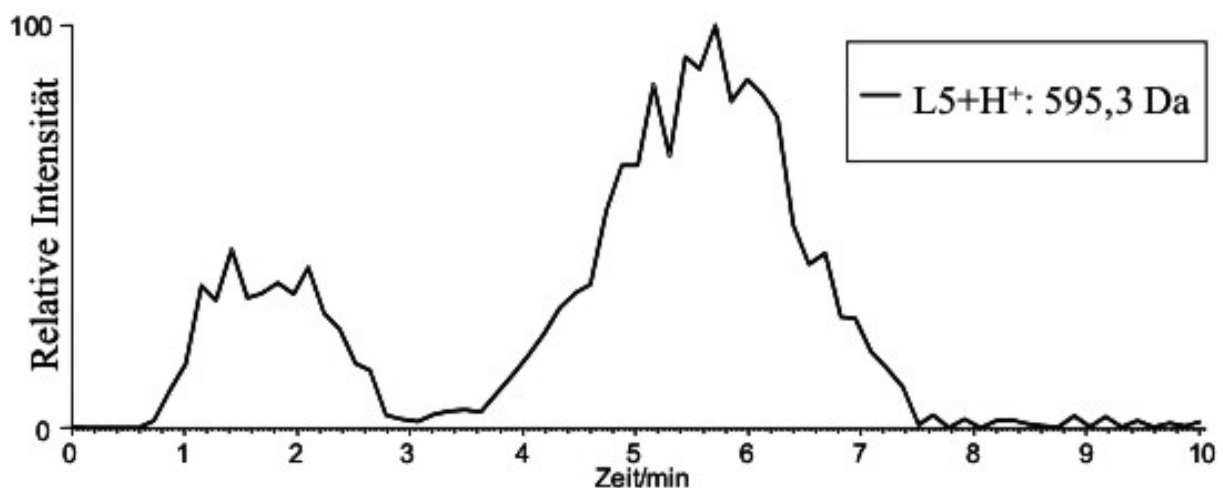
**Abbildung 77:** Strukturen der GTPase-Aktivatoren L1, L3, L4, L5 und L6, alle GTPase-Aktivatoren bestehen einer Peptideinheit und einer Kopfgruppe, die die Abspaltung des  $\gamma$ -Phosphats des am Ras gebundenen GTPs aktivieren soll 23 [110]

Diese Substanzen wurden als Gemisch zu je 0,5 nmol in wässriger Lösung mit 1 % DMSO (L1, L4, L5 und L6) (siehe Abbildung 9) auf die mit Ras-POROS gefüllte 1x20 mm Säule aufgetragen. Ebenso wurde die Bindung jedes Peptids an Ras einzeln getestet (0,5 nmol in wässriger Lösung mit 0,1 % DMSO). Die Beimengungen an DMSO rühren daher, dass zur Herstellung der Stocklösung der Substanzen diese in DMSO aufgenommen wurden. Allerdings konnte weder eine Verzögerung beim Auftrag festgestellt werden, noch ließen sich die Substanzen nach einem Auftrag von 100% Isopropanol messen.



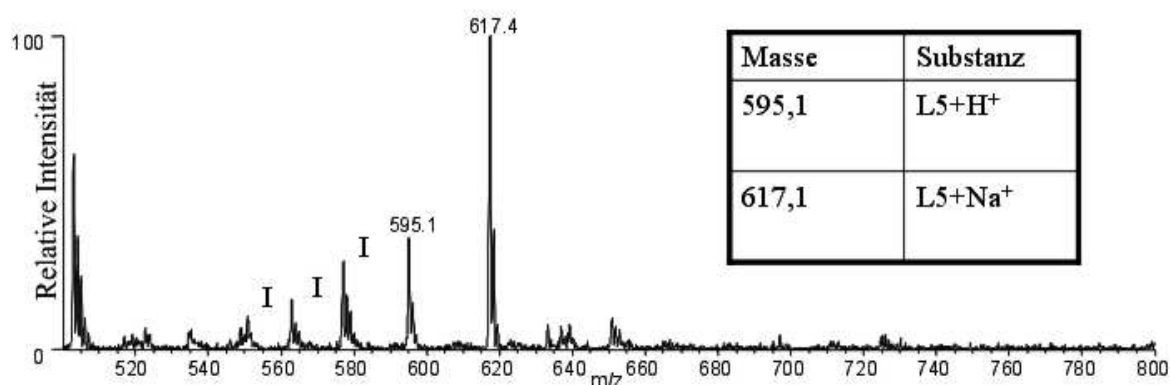
**Abbildung 78:** Massenspektrum des Durchflusses des Gemisches auf L1, L4, L5 und L6; Auftrag von 5 nmol Substanz in Wasser mit 1% DMSO gelöst auf eine Ras-POROS gefüllte 1x20mm Säule bei 50  $\mu$ l/min Laufpuffer

Bei L5 und L3, die die gleiche Masse besitzen und daher nicht gemeinsam in einem Gemisch aufgetragen werden konnten, ist eine Verzögerung gegenüber nicht-bindenden Substanzen durch Binden an das Ras-Protein im Durchfluss messbar (siehe Massenchromatogramm in Abbildung 79). Trotz weiteren Spülens mit dem Laufpuffer waren nach 7,5 min beide Substanzen nicht mehr im Massenspektrometer detektierbar. Sowohl die Verwendung von 100 mM Ammoniumsulfat, welches die Nukleotide vom Ras eluiert hatte, wie auch der Versuch diese Substanzen durch 25 nmol GDP zu verdrängen führte zu keiner im Massenspektrometer messbaren Elution der GTPase-Aktivatoren.



**Abbildung 79:** Massenchromatogramm des Auftrages von 5 nmol L5 in 1% DMSO/99% Wasser an Ras-POROS in 1x20 mm Säule gefüllt, 50 $\mu$ l/min Laufpuffer, aufgenommen über 10 min

Erst durch den Einsatz von 100% Isopropanol konnte die noch an das Ras gebundene Menge der Substanzen L3 und L5 durch Denaturierung des Proteins gelöst werden (siehe Abbildung 80).



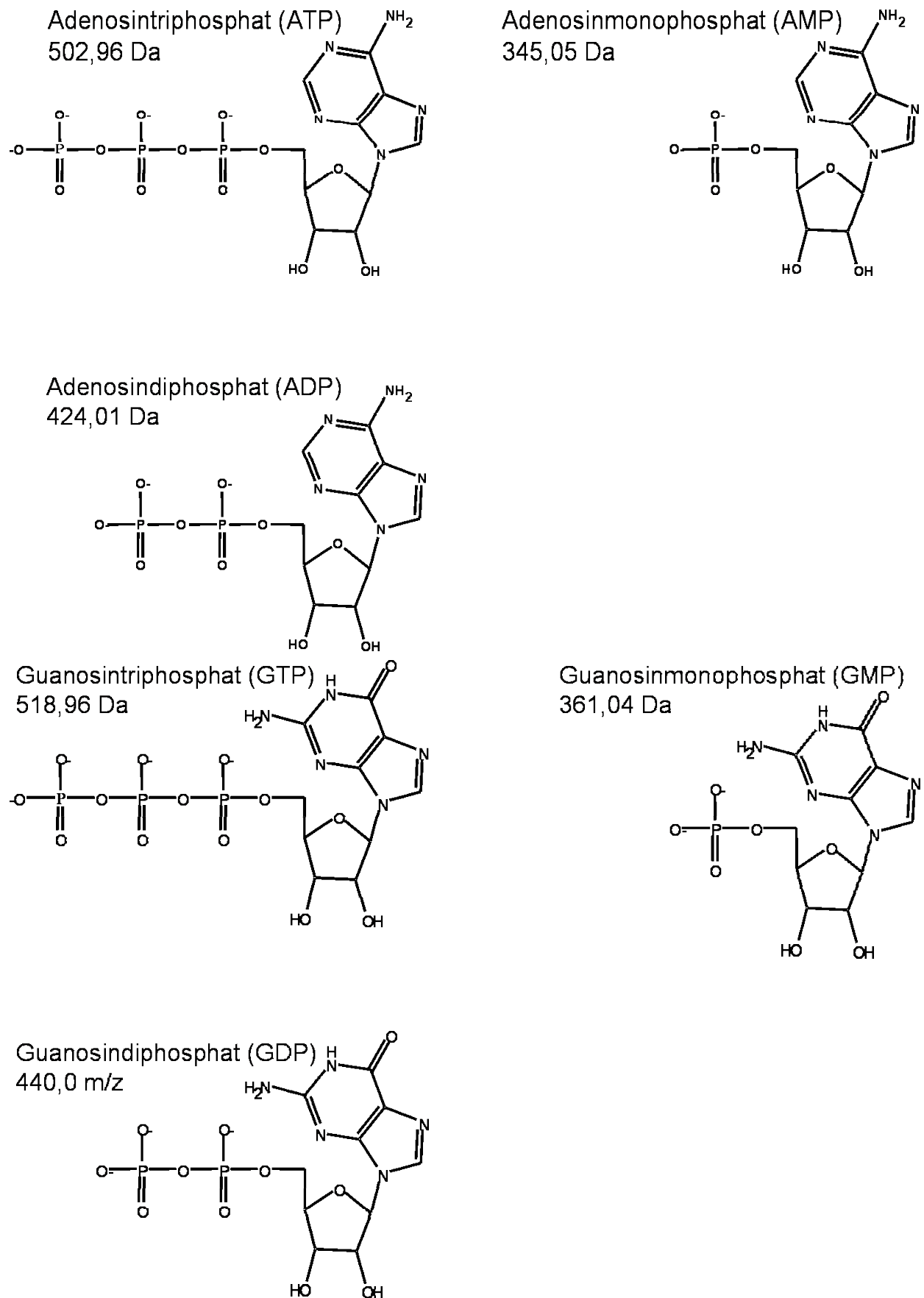
**Abbildung 80:** Massenspektrum der Elution des in Abb. 5 beschriebenen Substanzgemisches von dem immobilisierten Ras in der 1x20 mm Säule mit 50  $\mu$ l 100 % Isopropanol bei 50  $\mu$ l/min Laufpuffer; I: Untergrund aus Isopropanol

### 4.3.3 Eluierung durch Verdrängung

#### 4.3.3.1 Guanylatkinase: Nukleotide

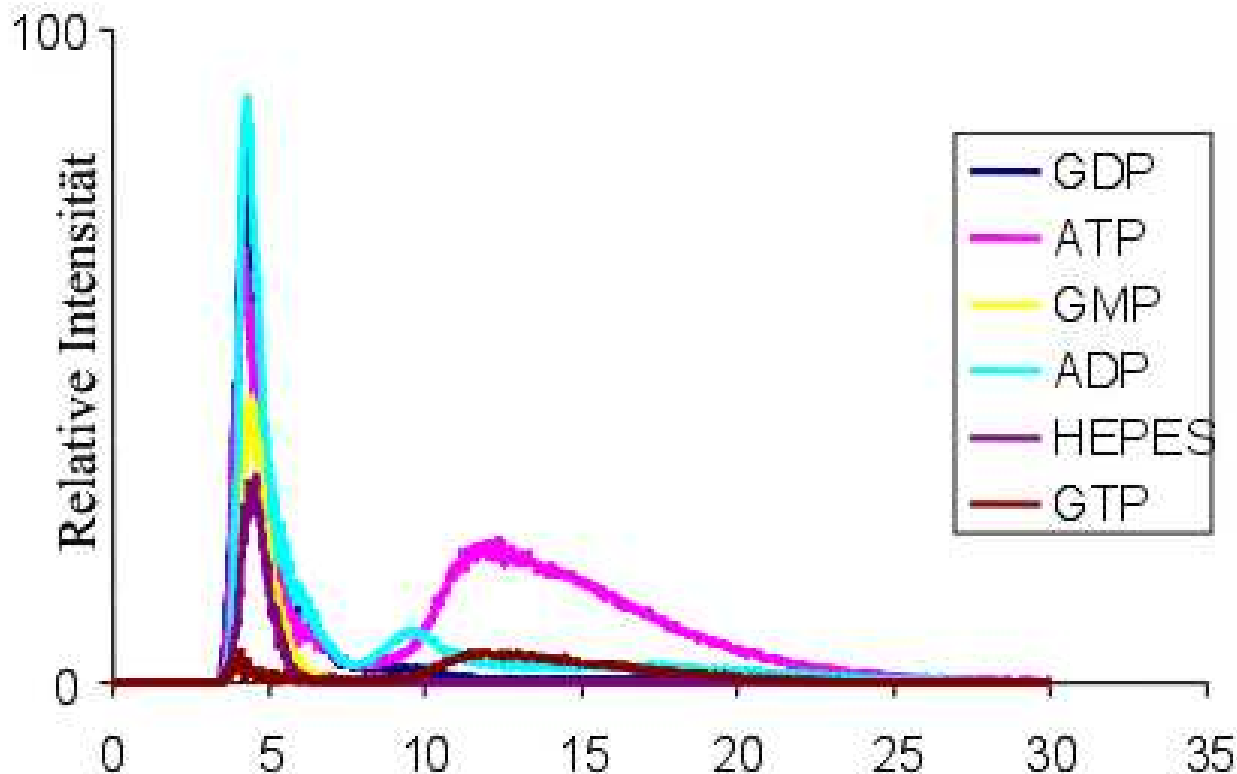
Die Guanylatkinase wurde nach Standard-Protokoll immobilisiert und das Säulenmaterial in eine 1 x 20 mm Säule gefüllt. Das entspricht etwa 3,5 nmol immobilisierter Guanylatkinase. HEPES wurde 100  $\mu$ M als Kontrolle eingesetzt, da es Guanylatkinase nicht bindet, aber ebenso wie die Nukleotide gut als negatives Ion im ESI-Massenspektrometer messbar ist. Versuche nach der Einzelaufgabe von 5-25 nmol GMP bzw. ATP gebundenen Liganden durch Denaturierung des Proteins mit bis zu 100mM Ammoniumacetat, 50% Ameisensäure oder 100% Acetonitril zu lösen waren erfolglos. Auch zeigte sich keine Verschiebung der Abdissoziation während des Auswaschens gegenüber der Kontrolle mit einer BSA-POROS gefüllten Säule der gleichen Größe. In der folgenden Abbildung 81 sind die Strukturen der eingesetzten Nukleotide dargestellt.





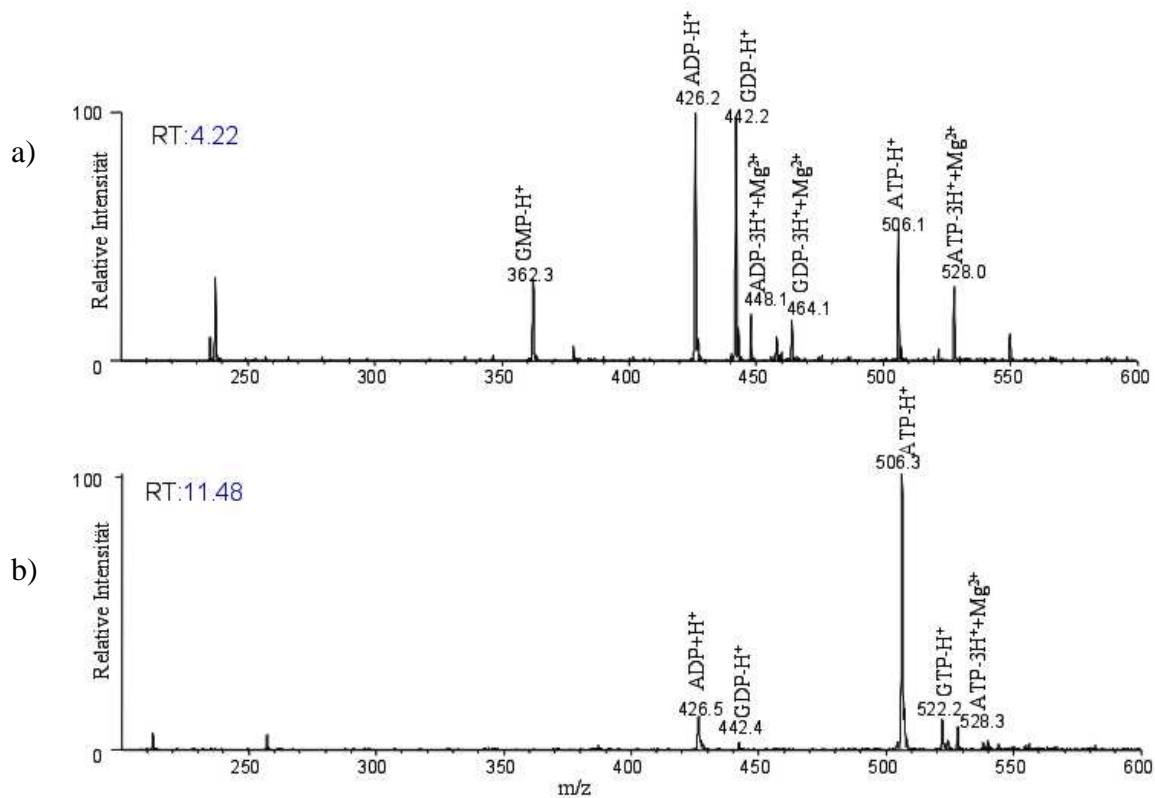
**Abbildung 81:** Strukturen der Guanosin- (unten) und Adenosinnukleotide (oben)

Nach einem Auftrag von je 12,5 nmol GMP und ATP auf die immobilisierte Guanylatkinase konnten alle Edukte (GMP und ATP) und Produkte (GDP, ADP und GTP) der Enzymreaktion zeitgleich im Massenspektrometer detektiert werden (siehe Abbildung 82).



**Abbildung 82:** Massenchromatogramm der Edukte der Enzymreaktion GMP und ATP, und der Produkte GDP, GTP und ADP an GMPKinase-POROS in einer 1 x 20 mm-Säule 50  $\mu$ l je 250  $\mu$ M GMP und ATP mit 100  $\mu$ M HEPES, 50  $\mu$ l/min Laufpuffer

Nach der ersten Elution von Nukleotiden konnten um etwa 7 Minuten verzögert eine zweite Erhöhung der Ionenmenge der Di- und Triphosphatnukleotide detektiert werden. Wobei zunächst die Diphosphatnukleotide gemeinsam eluierten, und dann die Triphosphatnukleotide gemeinsam von der Säule eluiert wurden. Die Massenspektren aus den zwei Phasen des Durchlaufs zeigten (vgl. Abbildung 83), dass die Di- und Triphosphatnukleotide in zwei Formen vorlagen, magnesiumumgebunden oder magnesiumfrei. Im Gegensatz zum magnesiumumgebundenen eluierte das magnesiumfreie Nukleotid zu einem späteren Zeitpunkt. Hierbei handelte es sich um eine echte Chromatographie durch das Säulenmaterial.



**Abbildung 83:** Massenspektren der Messung aus Abbildung 82 bei a) 4 min 22 und b) 11 min 48

Um eine Abschätzung über den Umsatz treffen zu können, muss die unterschiedliche Ionisierbarkeit der einzelnen Nukleotide miteinbezogen werden (siehe Tabelle 2). Zur Berechnung des Umsatzes wurden zunächst die im Massenchromatogramm bestimmten Flächen auf die Fläche von HEPES abgeglichen und dann die verminderte Ionisation von GMP, GDP, ADP und ATP im Vergleich mit GTP ausgeglichen. Das bedeutet, die Flächen einer Messung wurden zunächst durch die Fläche von HEPES aus derselben Messung dividiert, und dann mit dem Faktor multipliziert, um den sie gegenüber GTP schlechter ionisieren. Dieser Faktor wurde aus den Flächen von Massenchromatogrammen aus Testmessungen bestimmt. Mit Hilfe der ebenso umgerechneten Flächen aus der Kontrollmessung konnte so die Menge an Nukleotid in nmol bestimmt werden, wenn diese Fläche gleich der Gesamtfläche gesetzt wurde.

$$\text{Menge Nukleotid [nmol]} = \frac{\text{Fläche freigesetztes Nukleotid aus Guanylatkinase}}{\text{Fläche aufgetragenes Nukleotid [nmol]}} * \text{Menge aufgetragenes Nukleotid [nmol]}$$

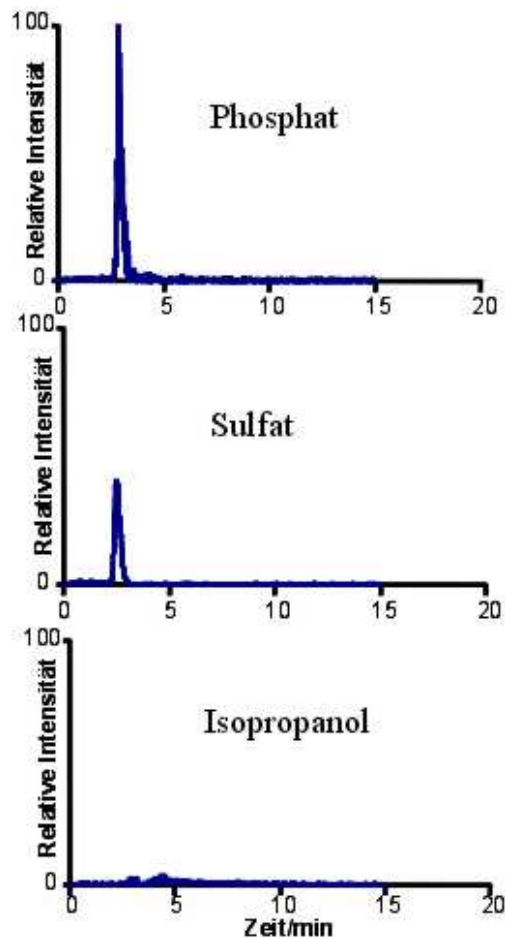
**Tabelle 6:** Vergleich der Ionisation von 12,5 nmol GMP, GDP, GTP, ADP und ATP, gemessen im negativen Ionenmodus im ESI.

12,5 nmol	GTP	GDP	GMP	ATP	ADP
% Ionenmenge verglichen mit 12,5 nmol GTP	100%	30,5%	32%	29%	4,4%

Danach wurden etwa 6,5 nmol des GMP zu GDP und etwa 3,5 nmol ATP zu ADP umgewandelt. Daraus ergibt sich eine Aktivität von etwa 2 units/mg Protein, das sind nur etwa 10% der Aktivität vor der Immobilisierung, die mit einem kolorimetrischen Assay zu Bestimmung der Guanylatkinase-Aktivität ermittelt wurde [71].

#### 4.3.3.2 Ras: Nukleotide

Das p21Ras(wt)-Protein wurde freundlicherweise von Robert Gail, MPI Dortmund, zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde nach dem Standard-Protokoll an dem POROS-Material immobilisiert und das Material in eine 1 x 100 mm Säule gefüllt. Versuche, die an das Ras gebundenen Nukleotide mit organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder Isopropanol zu eluieren, führten nicht zum Erfolg. Ebenso waren denaturierende Agenzien wie 6M Guanidiniumhydrochlorid oder heißes Wasser (95°C) unbrauchbar. Auch bis zu 100 mM Ammoniumacetat zeigte keine Wirkung, erst bis zu 100 mM Ammoniumphosphat und -sulfat waren erfolgreich (siehe Abbildung 84).



**Abbildung 84:** Elution von an Ras gebundenen GDP mit je 50  $\mu$ l verschiedenen Elutionsmitteln nach Beladung mit 50  $\mu$ l 500  $\mu$ M GDP; Phosphat: 100 mM Ammoniumphosphat, Sulfat: 100 mM Ammoniumsulfat, Isopropanol: 100% Isopropanol

Die Nukleotide wurden zu jeweils 25 nmol mit 50  $\mu$ l/min Laufpuffer auf das Protein in einer 1x100 mm bzw. 1x20 mm Säule (entspricht etwa einer Menge immobilisierten Ras' von etwa 48 nmol bzw. 9,6 nmol) gegeben. Bei beiden Proteinmengen konnte das Ras vollständig mit Nukleotid beladen werden. Phosphat und Sulfat verdrängten spezifisch die Nukleotide aus der Bindungsstelle am Ras-Molekül, dies galt sowohl für GTP/GDP wie auch für schwächer bindende Nukleotide wie ATP und GMP.

Zur Verdrängung von GTP durch GDP war es nötig, das Ras nach der Beladung mit 25 nmol GTP eine Stunde mit 25 nmol GDP bei RT zu inkubieren, um einen Nukleotidaustausch beobachten zu können. Eine Erhöhung der Temperatur brachten keine Steigerung des Nukleotidaustausches. Das schwächer bindenden ATP und GMP konnte bereits im Durchfluss durch das GDP verdrängt werden (Affinität GDP:  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ ; Affinität GMP und ATP:  $10^5 \text{ M}^{-1}$ )<sup>25</sup>. Um aber die verdrängte Konzentration von ATP und GMP durch GDP mit der verdrängte Konzentration von GTP durch GDP vergleichen zu können, wurden alle Experimente unter identischen Bedingungen wiederholt. Bei der Verdrängung von GTP durch GDP wurden Salze höchstens in einer Konzentration von 25 mM dem verdrängenden Nukleotid zugesetzt, da bei höheren Konzentrationen an Salz bereits ohne verdrängendes Nukleotid die Elution des Li-

ganden einsetzte. Um diese Experimente qualitativ bewerten zu können, musste die Ionisierbarkeit der Nukleotide bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen überprüft werden. Dazu wurden jeweils 25 nmol GTP bzw. GDP ohne Zusatz von Salzen und mit bis zu 500 mM Ammoniumsulfat und bis zu 100 mM Ammoniumphosphat als negative Ionen im Massenspektrometer gemessen. Die Ergebnisse sind der Aufstellung (siehe Tabelle 3) zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Unterschiedliche Ionisierung der Nukleotide verglichen mit GTP

<b>Ionisation im Vergleich zu salzfreien GTP</b>	<b>GTP</b>	<b>GDP</b>	<b>GMP</b>	<b>ATP</b>
Ohne Salzzusatz	100 %	30,5%	32%	29%
+100 mM Ammoniumphosphat	30%	18%	-	-
+100 mM Ammoniumsulfat	25%	12%	-	-

Zur Berechnung der Konzentration des verdrängten GTPs wurde die Signalunterdrückung (Tabelle 7) berücksichtigt.

$$\text{Menge Nukleotid [nmol]} = \frac{\text{Fläche freigesetztes Nukleotid aus Ras}}{\text{Fläche aufgetragenes Nukleotid [nmol]}} * \text{Menge aufgetragenes Nukleotid [nmol]}$$

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Verdrängungsexperimente dargestellt.

**Tabelle 8:** Verdrängung von 25 nmol GTP durch 25 nmol GDP mit und ohne Salzzusatz (je 1,25 µmol) verschiedenen Zusätzen und durch die Salze ohne GDP (je 5 µmol), im Vergleich dazu Verdrängung von je 25 nmol ATP und GMP durch 25 nmol GDP, an 48 nmol immobilisiertem Ras-Protein, bei RT

	<b>GDP</b>	<b>GDP+ Sulfat</b>	<b>GDP+ Phosphat</b>	<b>Sulfat</b>	<b>Phosphat</b>	<b>ATP</b>	<b>GMP</b>	<b>Puffer</b>
Mengen in nmol	0,133	0,233	0,136	0,185	0,27	12,01	2,5	0

An POROS gebundenes Ras war von dem Phänomen der Alterung betroffen. Es konnten etwa 400 Messungen mit dieser Säule durchgeführt werden, bevor ihre Ladungskapazität nachließ. Nach Überschreiten dieser Grenze konnte trotz mehrfacher Beladung mit Nukleotid (dreimal 50 µl 500 µM) kein Nukleotid mehr bei der Elution mit 100 mM Ammoniumsulfat oder Ammoniumphosphat gemessen werden.

Es war möglich eine Sulfatkonzentration von 25 mM zur Elution einzusetzen, niedrigere Konzentrationen wie 10, 5 und 1 mM zeigten keinen Effekt. Die Verdrängung von GTP durch GDP

wurde mit GDP in Wasser gelöst (ohne Zusatz) und GDP +25 mM Ammoniumsulfat getestet. Ammoniumphosphat wurde ebenfalls zur Elution erfolgreich eingesetzt.

0,5 mM GDP und 0,5 mM GTP mit einem Zusatz von 1mM Magnesiumacetat

Mit einem weiteren Salz, Ammoniumacetat, konnte hingegen keine Elution von Nukleotid erzielt werden.. Eine Veränderung der ionische Wechselwirkungen alleine reicht also nicht aus, zur Elution der Nukleotide aus dem aktiven Zentrum des Ras wird die Struktur von Sulfat oder Phosphat benötigt. Durch Denaturierungsversuche mit Isopropanol oder heißem Wasser konnte kein Nukleotid freigesetzt werden. Die Bindung des Nukleotids scheint so stark zu sein, bzw. die Bindungsstelle so geschützt, dass selbst ein zumindest teilweise erfolgte Denaturierung des Proteins nicht zur Dissoziation führt.

Die Ergebnisse zeigen, dass GTP durch GDP verdrängt werden kann, effektiver wird diese Verdrängung durch den Zusatz von Sulfat. Die beobachtete GTP-Elution ist aber nicht allein auf einen Salzeffekt zurückzuführen, bei der Elution mit Sulfat alleine wird weniger GTP verdrängt als mit GDP zusammen. Wobei Salz alleine immer noch mehr GTP freisetzt, als GDP alleine.

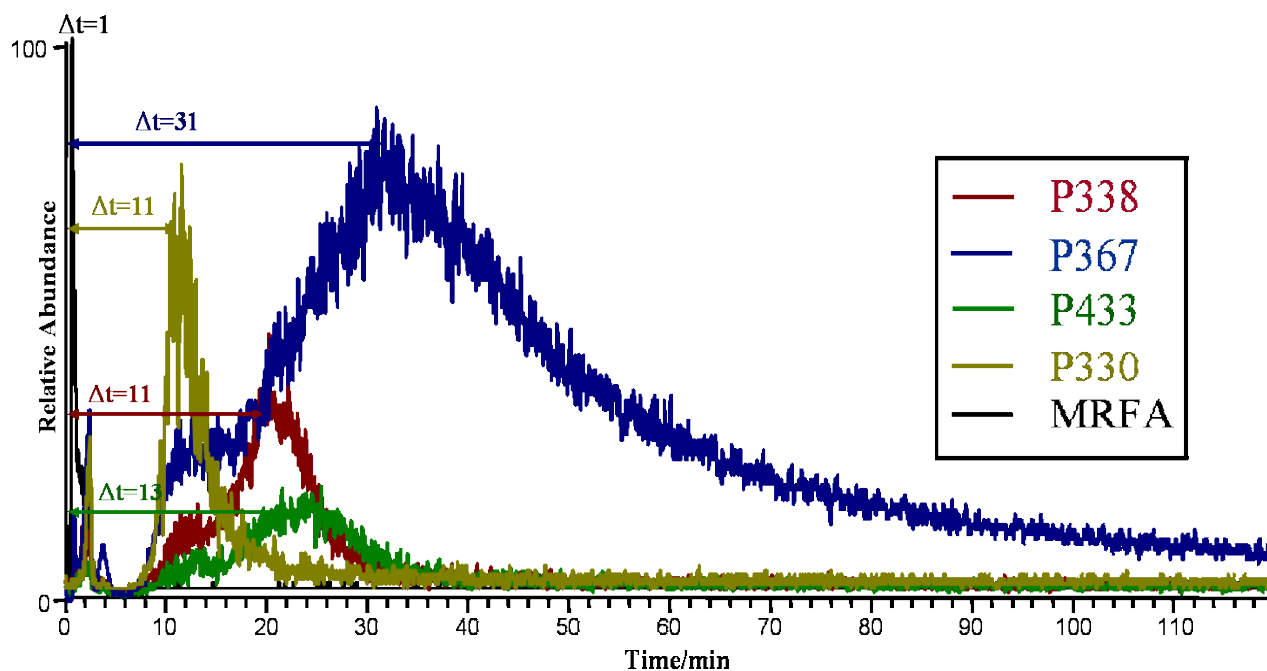
ATP und GMP werden stärker als GTP durch GDP verdrängt, wobei etwa GMP etwa doppelt so stark verdrängt wird wie ATP.

#### **4.3.4 Frontale Affinitätschromatographie gekoppelt mit ESI-MS**

##### **4.3.4.1 Packung der Säule**

Nach der Aufnahme des Spektrums der Mischung über die Gesamtzeit des HPLC-MS-Laufs wurden die Chromatogramme der einzelnen Massen gemeinsam dargestellt, siehe Abbildung 85. Das Peptid MRFA wurde der Mischung als Nichtbinder beigegeben. Es sollte nach der Totzeit eluieren. Das MRFA-Ion ist nach etwa einer Minute Laufzeit in dem in unten dargestellten Chromatogramm (in schwarz) zu messen. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min entspricht dies der Totzeit des Systems. Die im colometrischen Assay als Inhibitoren von Cdc25a ermittelten Verbindungen eluieren nach MRFA (Hauptpeak zwischen 11 und 31 Minuten nach MRFA. Die deutlich schwächeren Peaks, die bei MRFA zu messen sind, rühren wahrscheinlich von einem Überschuss an Liganden her, der beim Auftrag nicht an die Affinitätssäule gebunden hat.

Deutlich zu erkennen sind die „Schultern“, die angedeuteten Doppelpeaks bei drei der vier Chromatogrammen der aufgetragenen Verbindungen (P338, P367 und P433). Auch bei P330 ist der Doppelpeak andeutungsweise bei etwa 11,5 Minuten zu erkennen. Eine Erklärung dafür ist, dass sich bei selbst gepackten Säulen während des Gebrauchs das Säulenmaterial absetzen kann. Es entsteht eine Blase in der Säule, dadurch kommt es zu Doppelpeaks und ähnlichen Phänomenen in der Messung. Zu erkennen ist auch für jede der Substanzen bei etwa einer Minute ein sehr viel kleinerer Peak als die Peaks im späteren Verlauf des Massenchromatogramms. Bei diesem Peak handelt es sich um den überschüssigen Liganden, der keine freie Bindungsstelle mehr an der Affinitätssäule gefunden hat.



**Abbildung 85:** Massenchromatogramme der Verbindungen MRFA, P330, P338, P367 und P433 im Durchfluss der Cdc25a-POROS-Säule; 100  $\mu$ l Gemisch von je 100  $\mu$ M Substanz; Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu$ l/min; Laufmittel: 10  $\mu$ M Ammoniumacetat in Wasser.

#### 4.3.4.2 Cdc25A-Phosphatase-Inhibitoren

Die folgende Tabelle 33 zeigt eine Übersicht über die eingesetzten Cdc25-Inhibitoren, alles Substanzen aus der P-Reihe von Michael Manger. Die zugehörigen Strukturen finden sich im Anhang.

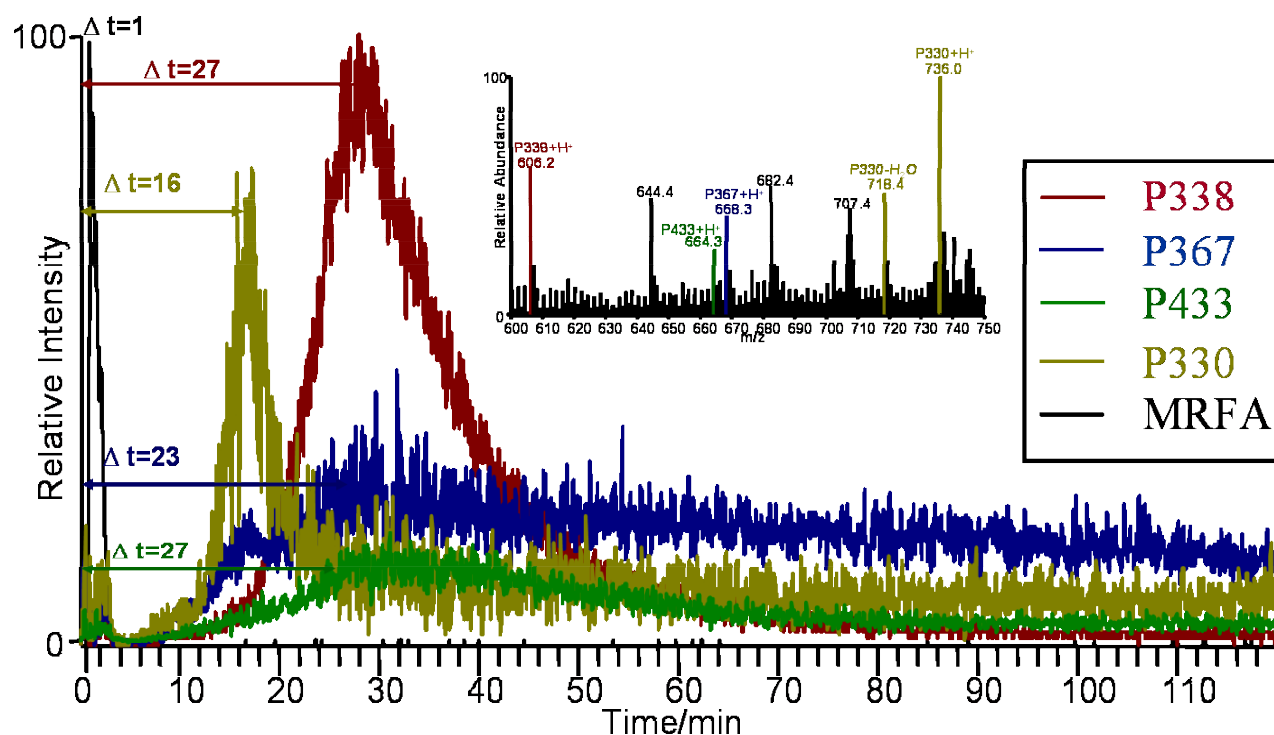
**Tabelle 9:** Übersicht über die eingesetzten Substanzen der P-Reihe mit ihren  $IC_{50}$ -Werten

Substanz	$IC_{50}$	Substanz	$IC_{50}$
<b>P318</b>	2,2 $\mu$ M	<b>P338</b>	1,8 $\mu$ M
<b>P327</b>	3,7 $\mu$ M	<b>P339</b>	2,7 $\mu$ M
<b>P328</b>	1,6 $\mu$ M	<b>P367</b>	1,9 $\mu$ M
<b>P329</b>	3,0 $\mu$ M	<b>P433</b>	17 $\mu$ M
<b>P330</b>	2,5 $\mu$ M	<b>P436</b>	> 100 $\mu$ M

Nach der Packung der Säule unter vierfachem Druck, zeigte sich eine deutliche Besserung der Elution im Chromatogramm (Abbildung 86: Massenchromatogramme der Verbindungen MRFA, P330, P338, P367 und P433 im Durchfluss einer unter vierfachem Druck gepackten Cdc25a-POROS-Säule; 100  $\mu$ l Gemisch von je 100  $\mu$ M Substanz; Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu$ l/min; Laufmittel: 10  $\mu$ M Ammoniumacetat in Wasser.). Außerdem wurde der Druck des Systems während der HPLC-MS-Messung mit der Affinitäts säule erhöht. Dazu wurde in das System ein Split eingebaut, der es erlaubte, die Säule mit einer Flussrate von 50  $\mu$ l/min pro Minute zu betreiben, während die Pumpe 0,5 ml/min pumpt. Zu-

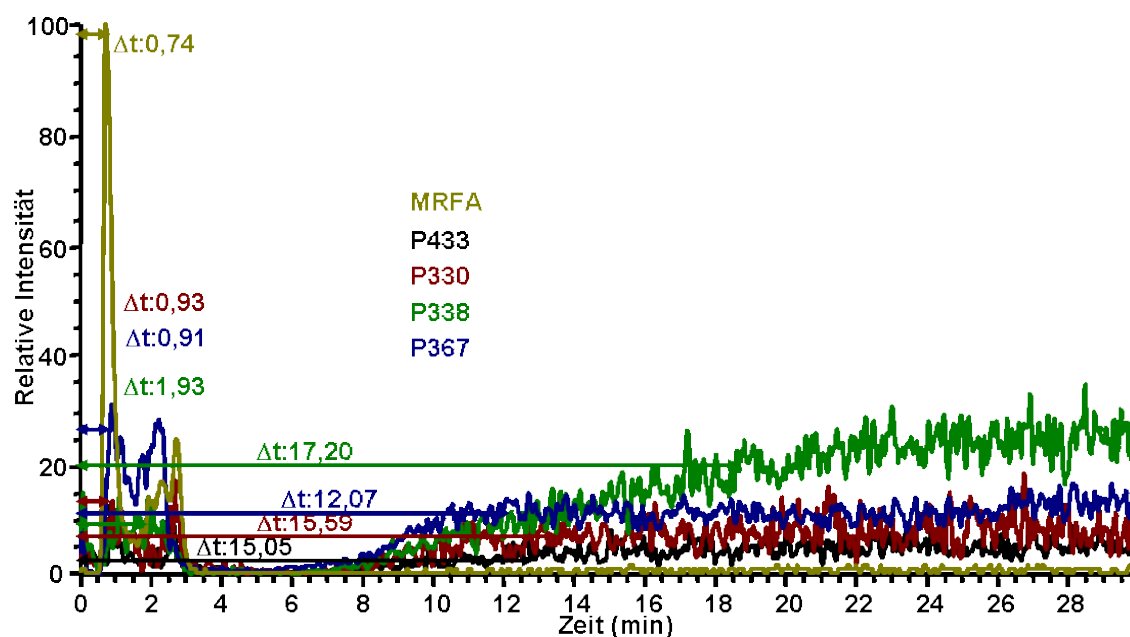


dem wurde durch diese Maßnahme die Flussgeschwindigkeit stabilisiert, denn laut Bedienungsanleitung von Hewlett-Packard ist die Flussgeschwindigkeit erst ab 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  zuverlässig stabil. Bei drei Substanzen sind die Doppelpeaks verschwunden, nur bei P367 ist weiterhin eine Schulter im Peak zu erkennen. Diese Stufe bei Substanz P367 ließe sich durch das Vorhandensein zweier Isomeren erklären, von denen eines stärker durch die Säule retardiert wird. (Auch in der Literatur werden derartige Beobachtungen beschrieben. [130] Die Bildung von Isomeren lässt sich bei den Verbindungen nicht völlig ausschließen, wobei sie nach der sich der Synthese anschließenden Aufreinigung monoisomerisch vorliegen, sich allerdings bei der Lagerung (auch bei 4°C) die Verbindungen zu einem anderem Isomer umlagern können.



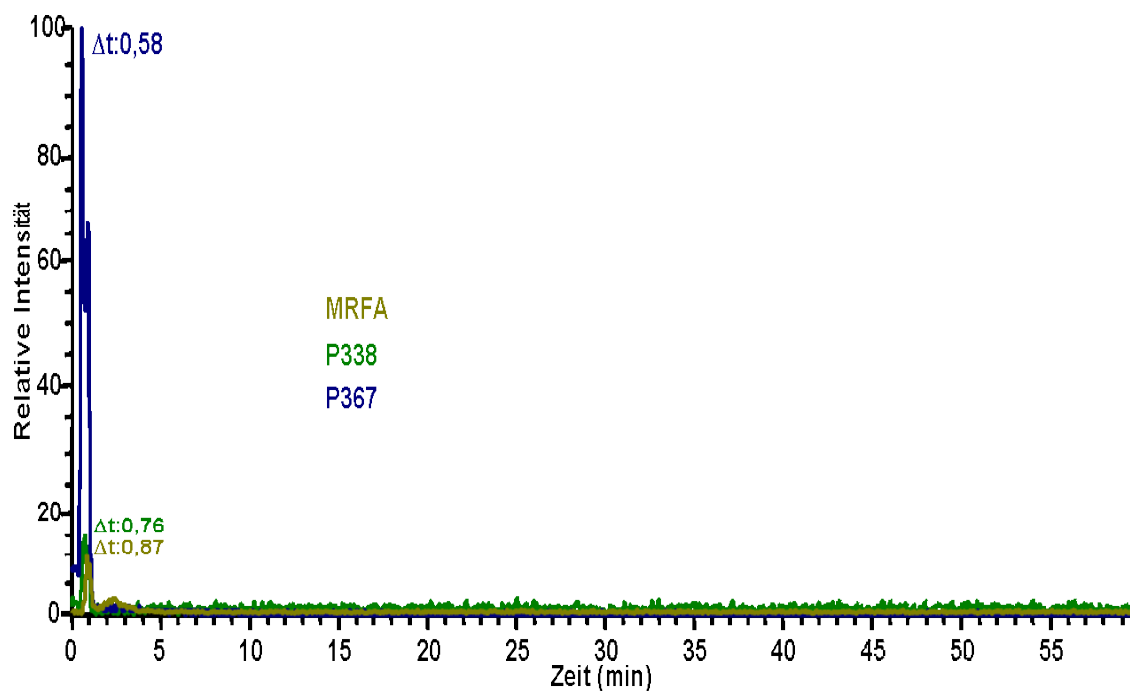
**Abbildung 86:** Massenchromatogramme der Verbindungen MRFA, P330, P338, P367 und P433 im Durchfluss einer unter vierfachem Druck gepackten Cdc25a-POROS-Säule; 100  $\mu\text{l}$  Gemisch von je 100  $\mu\text{M}$  Substanz; Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; Laufmittel: 10  $\mu\text{M}$  Ammoniumacetat in Wasser.

Zwei Kontrollexperimente wurden durchgeführt. Die 20 x 1 mm Säulen wurden mit BSA-beladenen POROS und mit Wasser-abgesättigten POROS befüllt. An dem BSA-beladenen POROS kommt es zu einer Verzögerung der vier gezeigten Substanzen, die sich allerdings nicht als scharfer Peak zeigt, sondern als „Schmier“. Auch gibt es viel mehr nicht verzögertes Material, das mit dem MRFA von der Säule eluiert. Durch Zugabe von Methanol lässt sich diese Verzögerung verringern. Durch 100 % Methanol können die an das BSA gebundenen Substanzen gelöst werden. Selbst weit über die erwartete Zeit hinaus zeigte sich keine weitere Elution der Substanzen P338 und P367 wie in Abbildung 87 zu sehen ist.



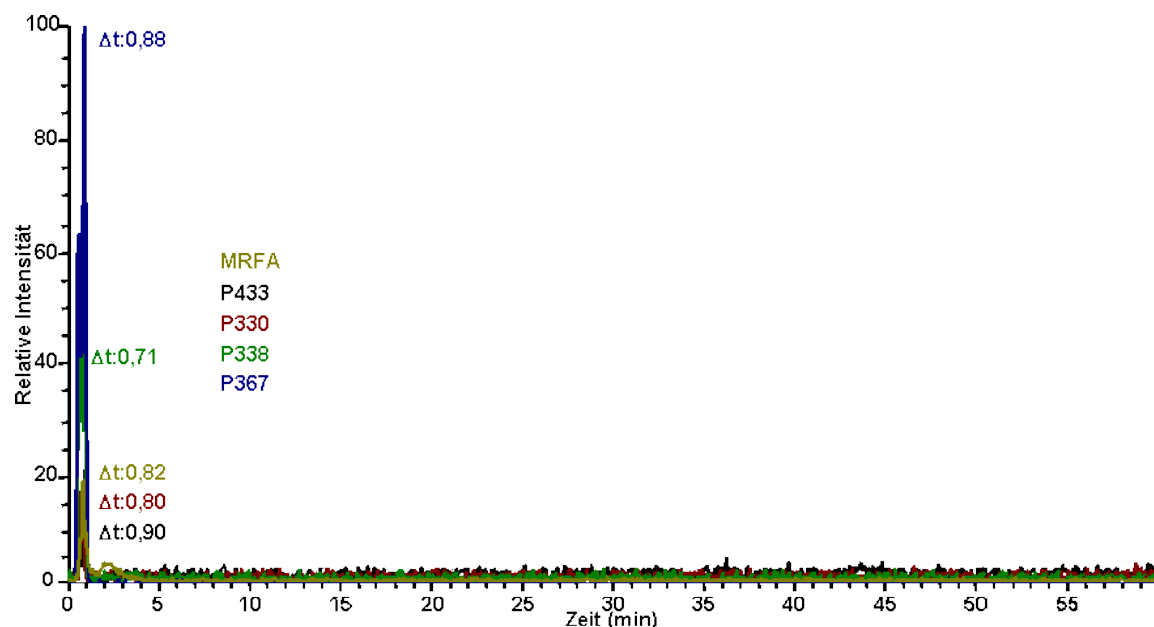
**Abbildung 87:** Massenchromatogramme der Verbindungen MRFA, P330, P338, P367 und P433 im Durchfluss einer unter vierfachem Druck gepackten BSA-POROS-Säule; 100  $\mu$ l Gemisch von je 100  $\mu$ M Substanz; Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu$ l/min; Laufmittel: 10  $\mu$ M Ammoniumacetat in Wasser.

Durch Zugabe von 50 % Methanol zum Laufmittel war es möglich die unspezifische Bindung zu verhindern. Es wurde eine Mischung der beiden Verbindungen aufgetragen, die stärkste Verzögerung an der BSA-Säule hatten, P338 und P367.



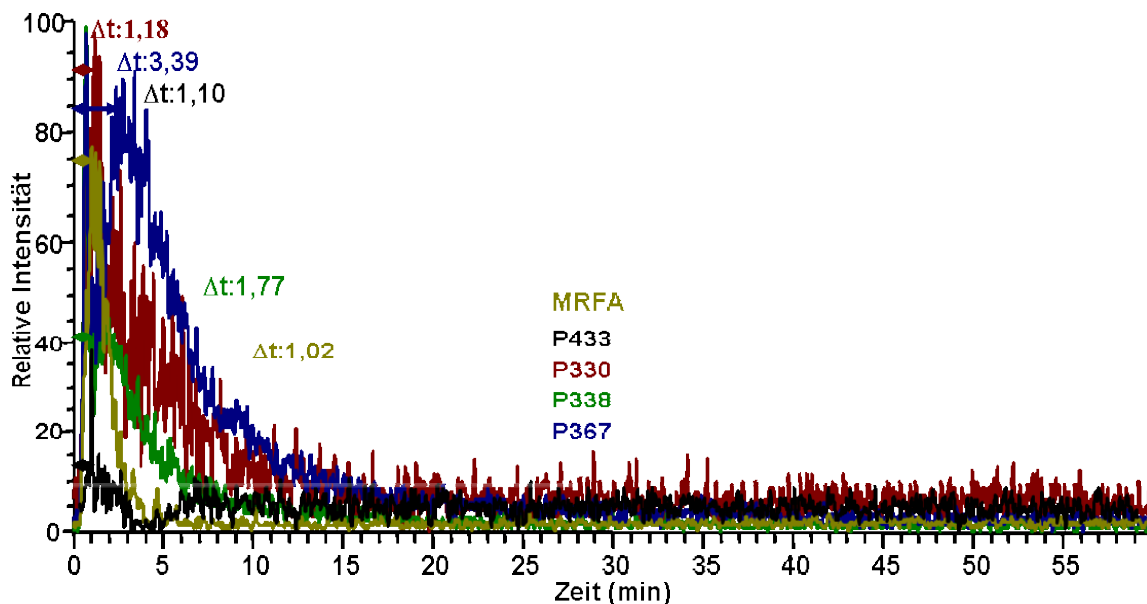
**Abbildung 88:** Massenchromatogramme der Verbindungen MRFA, P338 und P367 im Durchfluss einer unter vierfachem Druck gepackten BSA-POROS-Säule; 100  $\mu$ l Gemisch von je 100  $\mu$ M Substanz; Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu$ l/min; Laufmittel: 10  $\mu$ M Ammoniumacetat in Wasser/ 50 % Methanol.

Werden 100 % Methanol als Laufmittel eingesetzt, so eluieren alle Bestandteile der Mischung aus MRFA, P330, P338, P367 und P433 mit der Totzeit bei etwas unter einer Minute (siehe dazu Massenchromatogramm in Abbildung 89)



**Abbildung 89:** Massenchromatogramme der Verbindungen MRFA, P330, P338, P367 und P433 im Durchfluss einer unter vierfachem Druck gepackten BSA-POROS-Säule; 100  $\mu$ l Gemisch von je 100  $\mu$ M Substanz; Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu$ l/min; Laufmittel: 100 % Methanol.

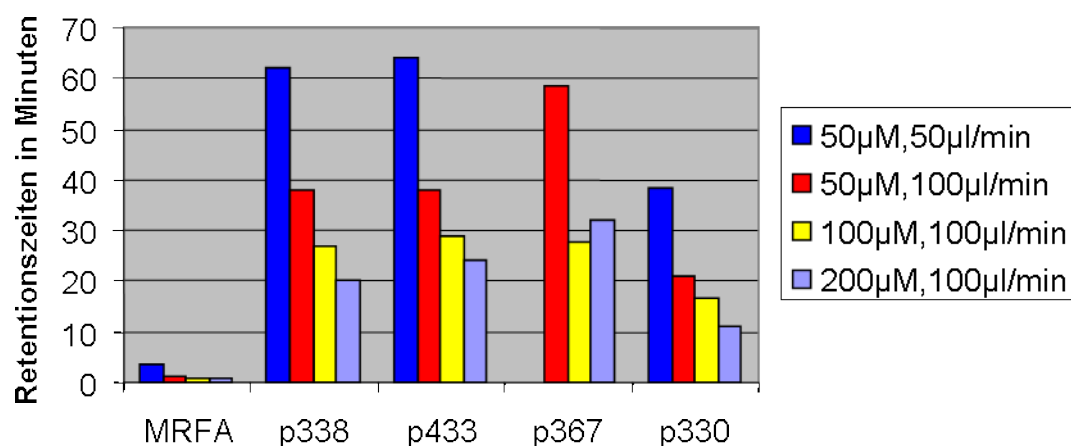
In Abbildung 90 wird ein Durchlauf mit einem Gemisch aus MRFA, P330, P338, P367 und P433 über eine Säule gezeigt, die nur mit Wasser abreagiertes POROS-EP enthielt. Zu erwarten wäre, dass keine der Substanzen an das Material bindet und somit alle Substanzen mit der Totzeit aus dem System eluieren sollten. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min liegt die Totzeit dieses Systems bei etwa einer Minute. Diese Totzeit wird wieder durch das MRFA markiert. Einige der Substanzen wechselwirken anscheinend mit dem POROS-EP, da eine Verzögerung zu beobachten ist. Dies ist bei P367, 3,39 Minuten, und in geringerem Maße bei P338, 1,77 Minuten, der Fall.



**Abbildung 90:** Massenchromatogramme der Verbindungen MRFA, P330, P338, P367 und P433 im Durchfluss einer unter vierfachem Druck gepackten proteinfreien POROS-Säule; 100  $\mu$ l Gemisch von je 100  $\mu$ M Substanz; Flussgeschwindigkeit: 50  $\mu$ l/min; Laufmittel: 10  $\mu$ M Ammoniumacetat in Wasser.

Anscheinend liegt bei einigen Substanzen ein Problem mit der Löslichkeit einiger Substanzen vor.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden in der Graphik in Abbildung 91 die Retentionszeiten der oben gezeigten Mischung als Balken aufgetragen.



**Abbildung 91:** Retentionszeiten der Mischung der Substanzen MRFA, P330, P338, P367 und P433 in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen und Flussgeschwindigkeiten

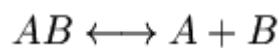
Mit den Frontalen Affinitäts Chromatogramm-Messungen ist auch eine Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  für die Cdc25a-Inhibitoren möglich. (s. Kasai und Oda [46])

Ausgangspunkt ist für die Herleitung der Berechnung der Dissoziationskonstante ist das Gleichgewichtssystem. In diesem ist die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Quotient zwischen dem Pro-

dukt von den Konzentrationen von Protein und Binder und der Konzentration des Protein-Binder-Komplexes

$$K_D = \frac{[\text{Protein}] \cdot [\text{Binder}]}{[\text{Protein} - \text{Binder}]}$$

Die Dissoziationskonstante ist in der Chemie und Biochemie ein Maß dafür, wie weit die Dissoziationsreaktion (also die Spaltung)



vorangeschritten ist, wenn sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Damit wird also angegeben auf welcher Seite sich das Gleichgewicht befindet, ob Protein und Binder eher dissoziiert ( $A + B$ ) oder undissoziiert ( $AB$ ) vorliegen. Je kleiner  $K_D$ , umso größer ist die Menge an undissoziierten Protein und Liganden, und umgekehrt, je größer  $K_D$  ist, umso größer ist die Menge an freiem Protein und freiem Liganden.

Im nachfolgenden wird der Binder als  $X$  bezeichnet, wobei  $[X]$  die Konzentration des Binders und  $[X]_0$  die Anfangskonzentration des Binders benennt.  $V$  ist das Volumen, bei dem der Binder eluiert,  $V_0$  ist das Totvolumen des Systems, bestimmt durch eine nicht-bindende Substanz.  $[X] \cdot (V - V_0)$  ist die Menge des spezifisch absorbierten Binders. Geteilt durch das Bettvolumen  $v$  der Säule erhält man die Konzentration des Liganden-Binder-Komplexes. Da die Konzentration des freien immobilisierten Proteins  $[B]$  der Differenz der Anfangskonzentration des Proteins  $[B]_0$  und der Konzentration des spezifisch absorbierten Binders entspricht, lässt sich folgenden Gleichung ableiten:

$$K_D = \frac{[X] \cdot [B]}{[XB]} = \frac{[X]_0 \{ [B]_0 - [A]_0 \cdot (V - V_0) / v \}}{[A]_0 \cdot (V - V_0) / v}$$

Das Produkt der Ausgangskonzentration und dem Bettvolumen der Säule gibt die Gesamtmenge des immobilisierten Liganden an. Daher lässt sich Formel (X) vereinfachen zu

$$V_x - V_0 = \frac{B_t}{[X]_0 + (K_D)_x}$$

wobei die Formel nach  $K_D$  aufgelöst werden kann

$$(K_D)_x = \frac{B_t}{V_x - V_0} - [X]_0$$

$B_t$  = Gesamtmenge an immobilisierten Liganden, das entspricht der dynamischen Bindungskapazität der Säule

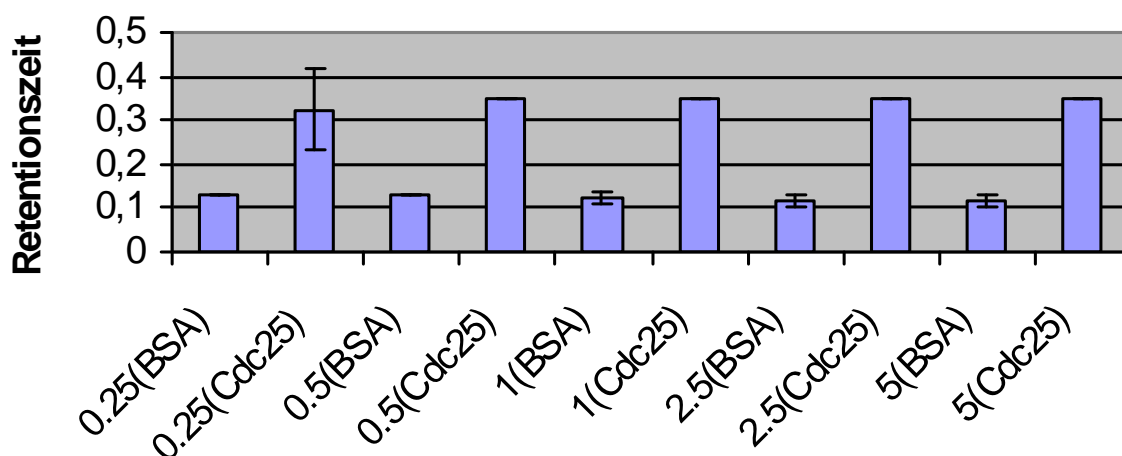
$X$  = Ligand

$K_D$  = Dissoziationskonstante des Liganden  $X$

Die Größe  $B_t$  steht für die dynamische Bindungskapazität der Proteinsäule. Um  $B_t$  zu bestimmen werden verschiedene Konzentrationen eines Liganden aufgetragen und seine korrigierten Eluti-

onsvolumina bestimmt. Analog zu einem Lineweaver-Burk-Plot wird  $([X]_0(V_x - V_0))^{-1}$  gegen  $[X]_0^{-1}$  aufgetragen.  $B_t$  liegt im Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der y-Achse.

Zunächst wurde kontrolliert, ob auch MRFA einer konzentrationsabhängigen Verzögerung in der Retentionszeit von der Säule liegt. In Abbildung 92 sind die Retentionszeiten von MRFA von einer Cdc25a-POROS-Säule und einer BSA-POROS-Säule bei verschiedenen eingesetzten Konzentrationen des Peptids dargestellt. Die auf die Säulen aufgegebenen Konzentrationen entsprachen einer Menge von 0,25  $\mu\text{mol}$ , 0,5  $\mu\text{mol}$ , 1  $\mu\text{mol}$ , 2,5  $\mu\text{mol}$  und 5  $\mu\text{mol}$ . Es sind keine innerhalb einer Säulenart starke Abweichungen der Retentionszeiten zu erkennen. Der Unterschied der Retentionszeiten unterhalb der zwei verschiedenen Säulen liegt wahrscheinlich daran, dass die Säulen handgepackt sind und es somit Abweichungen in der Packungsdichte geben kann, die die Retentionszeiten beeinflusst.

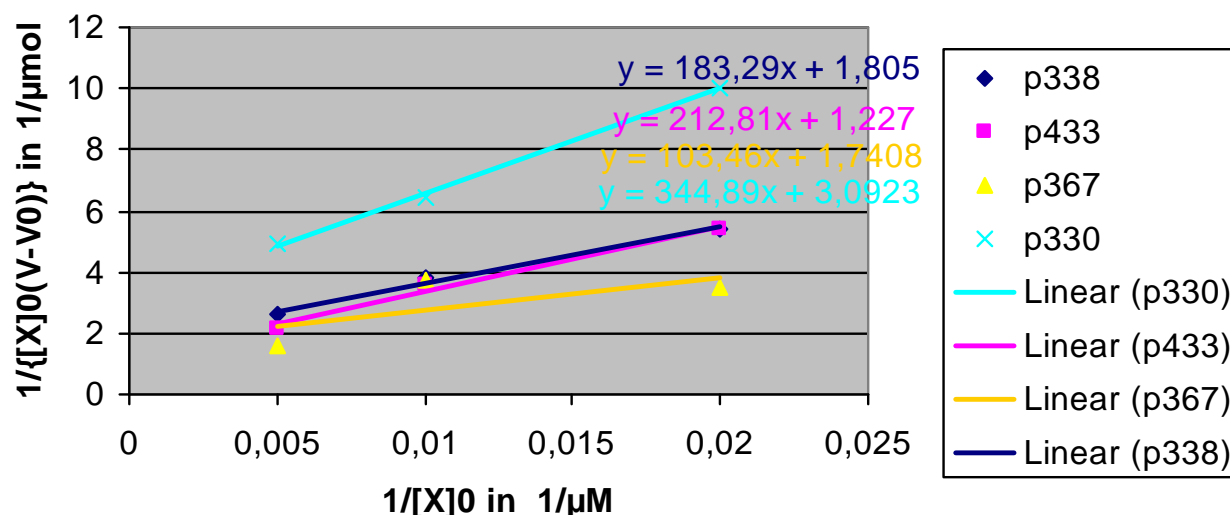


**Abbildung 92:** Die Retentionszeiten von MRFA von verschiedenen Säulenarten bei verschiedenen aufgetragenen Substanzmengen: jeweils rechts die BSA-POROS-Säule und jeweils links die Cdc25a-POROS-Säule. 0,25: 0,25  $\mu\text{mol}$ ; 0,5: 0,5  $\mu\text{mol}$ ; 1: 1  $\mu\text{mol}$ ; 2,5: 2,5  $\mu\text{mol}$ ; 5: 5  $\mu\text{mol}$

Nachdem sichergestellt war, dass MRFA diese konzentrationsabhängige Veränderung der Retentionszeit nicht zeigt, wurden für die vier Substanzen P330, P338, P367 und P433 die zur Bestimmung der Bindungskapazität der Säule nötigen Messungen durchgeführt. Dazu wurden von jeder Substanz Einzelmessungen mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  mit den Konzentrationen 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

Zunächst wurde das Elutionsvolumen der Substanzen aus den Retentionszeiten berechnet und durch Abzug des Totvolumens korrigiert.

In der Abbildung 93 zeigt den Auftrag der reziproken Werte der Konzentrationen von den Substanzen P330, P338, P367 und P433 gegen den reziproken Wert des Produktes aus der Konzentration gegen das korrigierte Elutionsvolumen. Mithilfe der Ausgleichsgeraden wird aus diesem Auftrag die Säulenkapazität und Dissoziationskonstante der jeweiligen Substanz bestimmt.



**Abbildung 93:** Diagramm zur Bestimmung der Säulenkapazität und der Dissoziationskonstanten. Aufgetragen sind die reziproken Werte der Konzentrationen  $[X]_0$  der Substanzen P330, P338, P367 und P433 gegen deren reziproken Werte von  $[X]_0(V-V_0)$ , wobei  $V_0$  das Totvolumen des Systems ist und  $V$  das Retentionsvolumen der Substanzen.

Die Gleichungen der Ausgleichsgeraden lauten:

Substanz	Geradengleichung
P330	$y = 183,29x + 1,805$
P338	$y = 212,81x + 1,227$
P367	$y = 103,46x + 1,7408$
P433	$y = 344,89x + 3,0923$

Der Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der y-Achse liefert nun die reziproken Werte der Bindungskapazität der Säule. Die durch die vier Substanzen ermittelten Werte sind in der nachstehenden Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Säulenkapazität  $B_t$  für vier der P-Substanzen [ $\mu\text{mol}$ ]

	P338	P433	P367	P330
$B_t$	0,55 $\mu\text{mol}$	0,81 $\mu\text{mol}$	0,57 $\mu\text{mol}$	0,32 $\mu\text{mol}$

Die Tabelle zeigt, dass die Werte für  $B_t$  zwischen 0,32  $\mu\text{mol}$  und 0,81  $\mu\text{mol}$  schwanken. Theoretisch müsste die Bindungskapazität für Säule bei jeder Messung gleich bleiben.

Auch sollte aufgrund der bei der Immobilisierung eingesetzten Proteinmenge und der POROS-Menge, die zur Befüllung der Säule benötigt wurde, sich nur etwa 0,3  $\mu\text{mol}$  Protein in der Affinitätssäule gebunden an POROS befinden. Diese Menge ergibt sich aus folgender Berechnung: Es wurden 4 mg Cdc25a auf 50 mg POROS 20 EP. Da die Säule unter einem vierfach höheren Druck gepackt wurde als die vorhergehenden Säulen konnte aufgrund der höheren Packungsdichte auch eine größere Menge POROS in die Säule (2 mm\*30 mm) gepackt werden. Das bedeutet, dass etwa 50 mg POROS in die Säule gefüllt werden konnten. Das entspricht insgesamt

einer Menge von etwa 0,3  $\mu\text{mol}$  Cdc25a. Der Beladungskapazität der Substanz P330 entspricht auch dieser groben Annahme von 0,3  $\mu\text{mol}$  Gesamtprotein an der Säule. Die restlichen Bindungskapazitäten liegen zwei- bis dreimal höher als die angenommenen Gesamtmenge immobilisierten Proteins.

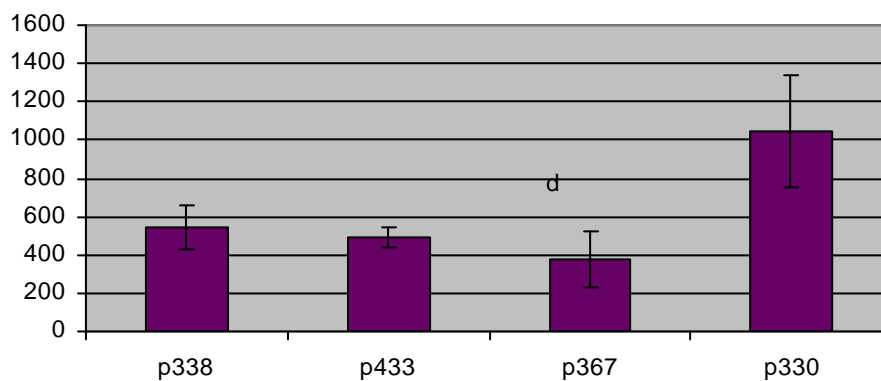
Und für ein Gemisch die errechneten  $K_D$ -Werte in  $\mu\text{M}$  (vgl. Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Säulenkapazität  $B_t$  für vier der P-Substanzen [ $\mu\text{mol}$ ]

	<b>P338</b>	<b>P433</b>	<b>P367</b>	<b>P330</b>
<b>50</b>	93,8	93,8	42,4618	216,43
<b>100</b>	103,3	88,9	99,54	240,16
<b>200</b>	76,7	28,97	-29,75	286,71

Im Gegensatz zum klassischen FAC-System wird nicht über einen längeren Zeitraum infundiert. Das hat mehrere Vorteile. Zum einen ist das System automatisierbar, da der Probenauftrag über den Autosampler und nicht mit Hilfe einer Spritze erfolgt. Die Auswaschzeiten verkürzen sich erheblich. Ein Lauf dauert etwa 120 Minuten, Auftrag, Elution und Auswaschen der restlichen Liganden werden während dieses Zeitraumes komplett abgeschlossen.

Aus den Säulenkapazitäten lassen sich die Dissoziationskonstanten vom Cdc25a für die Substanzen bestimmen (siehe Abbildung 94).



**Abbildung 94:** Mittelwerte der Dissoziationskonstanten aus einer zweiten Messung für P330, P338, P367 und P433 angegeben in  $\mu\text{M}$ .

Nach dem Einrichten des Finnigan LTQ-ESI-Massenspektrometers und dem Agilent 1100er HPLC-Systems wurden die FAC-MS für einige der Substanzen erneut durchgeführt. Diesmal wurden erheblich geringere Substanzkonzentrationen eingesetzt, da das LTQ durch die neuartige Konstruktion der Ionenfalle eine größere Sensitivität als das zuvor verwendete LCQ Deca besitzt. Um eine dennoch einen Ligandenüberschuss zu garantieren wurde das Cdc25a-beladene Säulenmaterial 1:1000 mit BSA-beladenem Säulenmaterial verdünnt.



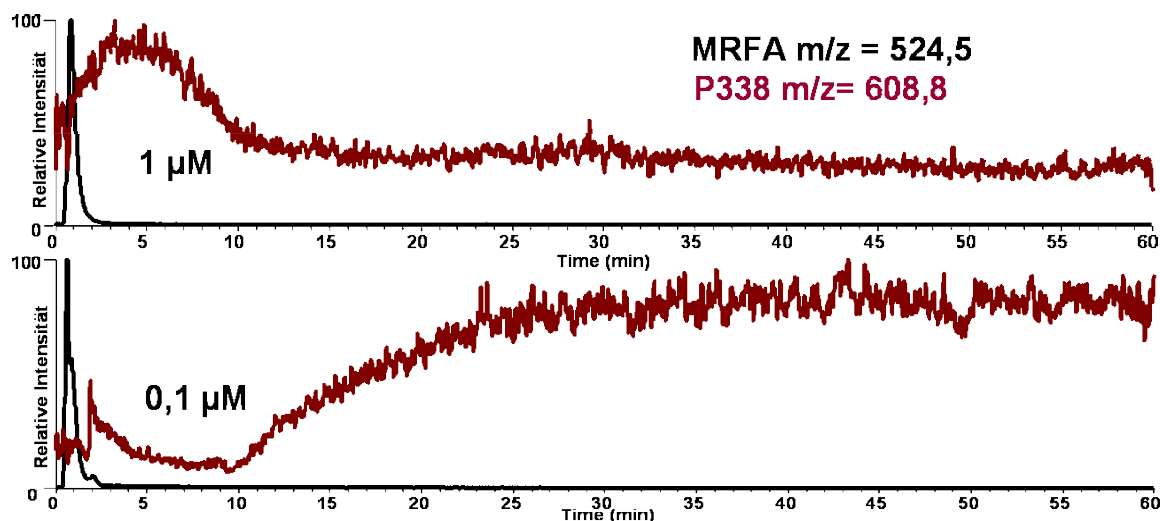


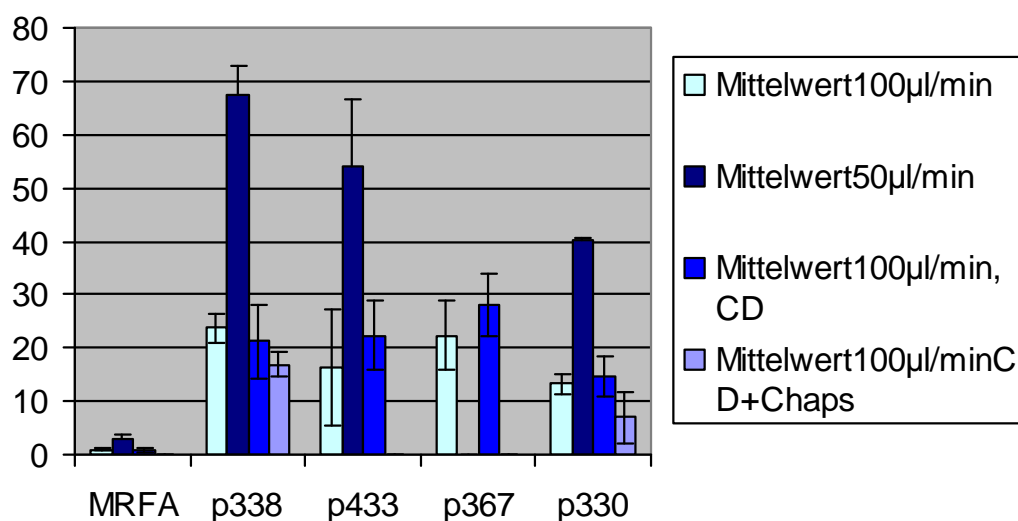
Abbildung 95: Massenchromatogramme von P338, oben: 100 µl 1 µM P338, unten 100 µl 0,1 µM P338

Aus den Messungen mit P338 wurden die für die Bestimmung der Bindungskapazität der Säule und der Dissoziationskonstante die relevanten Werte ermittelt und in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Werte für P338

C (µmol/L)	1/C (µmol/L) <sup>-1</sup>	V <sub>x</sub> µL	V <sub>x</sub> -V <sub>0</sub> µL	V <sub>x</sub> -V <sub>0</sub> L	1/C(V <sub>x</sub> -V <sub>0</sub> ) µmol <sup>-1</sup>
5	0,2	2000	1800	0,0018	111,11
25	0,04	1570	1370	0,00137	29,19
50	0,02	1240	1040	0,00104	19,23

Aufgrund der unspezifischen Bindung einer eingesetzter Substanzen an eine BSA-Säule und an unbeladenes POROS wurde die Löslichkeit der Verbindungen näher betrachtet. Diese Ergebnisse werden im nachfolgenden Kapitel 4.3.5 Löslichkeit beschrieben. Aufgrund der Erfahrungen aus den in diesem Kapitel gezeigten Versuchen, wurde dem Substanzgemisch Cyclodextrin beigelegt und als Vergleich ein sehr mildes Detergenz, Chaps, das nicht zur Denaturierung von Protein führt und auch keinen Einfluss auf die Massenspektrometrie hat. Die Retentionszeiten der Verbindungen im bereits beschriebenen Gemisch sind in Abbildung 96 zusammengefasst. Zu sehen sind jeweils die Mittelwerte für die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen bei 100 µl/min und 50 µl/min Flussgeschwindigkeit und die Mittelwerte der Retentionszeiten bei 100 µl/min Flussgeschwindigkeit unter Zusatz von Cyclodextrin bzw. Cyclodextrin und Chaps. Die Veränderungen der Retentionsgeschwindigkeiten um über die Hälfte bei Verringerung der Flussgeschwindigkeit um die Hälfte ist zu erwarten gewesen. Der Zusatz von Cyclodextrin zu der aufgegebenen Lösung der Verbindung hat keinen Einfluss auf die Retentionsgeschwindigkeiten der Substanzen. Eine zusätzliche Beimengung von Chaps zur der aufgetragenen Lösung verändert die Retentionszeiten ebenfalls nicht.



**Abbildung 96:** Mittelwerte der Retentionszeiten der Substanzen MRFA, P330, P338, P367 und P433 (je 50 µM in 100 µl wässriger Lösung) bei verschiedenen Flussgeschwindigkeiten und unter verschiedenen Zusätzen zu den Probelösungen. 100 µl/ml Flussgeschwindigkeit ohne Zusätze; 50 µl/min Flussgeschwindigkeit ohne Zusätze; 50 µl/min Flussgeschwindigkeit mit Cyclodextrin in der Probe; 50 µl/min Flussgeschwindigkeit mit Cyclodextrin und Chaps in der Probe

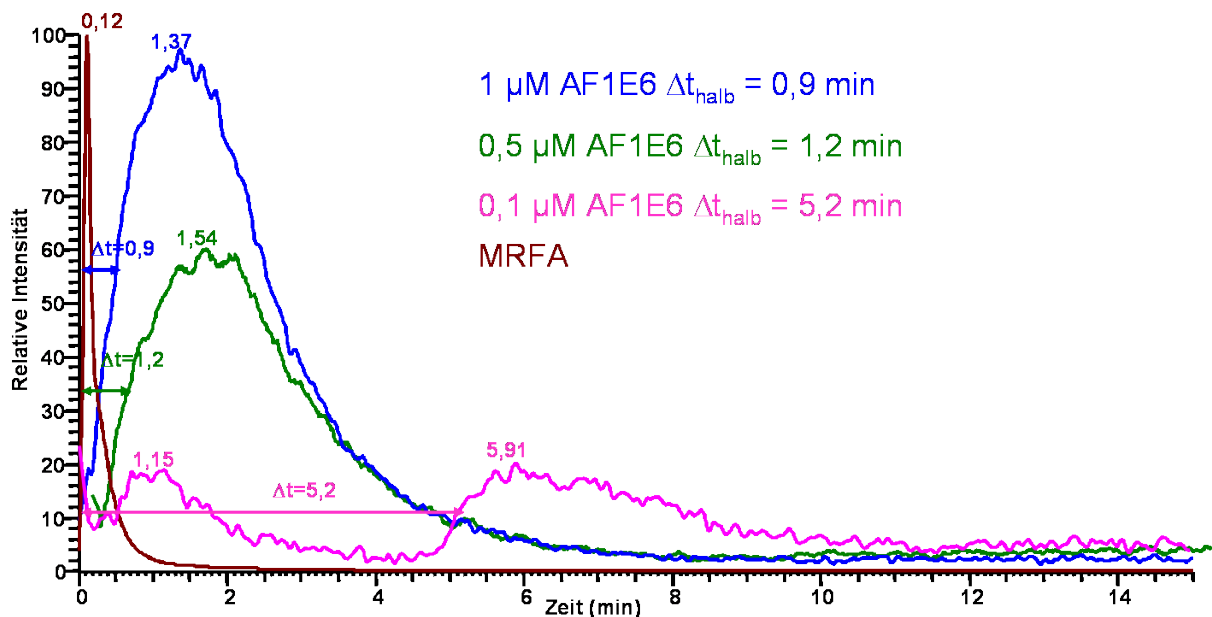
Vor dem erneuten Auftrag eines Liganden müssen alle im System vorhandenen Reste ausgespült worden sein. Einige Liganden erwiesen sich als so hartnäckig, dass Wasser allein nicht ausreichend war, um sie auszuspülen. Organische Lösungsmittel kamen nicht in Frage, da sie das Protein denaturieren, und damit in seiner Funktion beeinträchtigen können. Nach den Versuchen mit Cyclodextrin wurde eine wässrige 100 µM Cyclodextrinlösung alternativ eingesetzt. Bei einem Fluss von 50 µl/min wurden 100 µl dieser Lösung in 3 Minuten durchgespült, 5 Zyklen reichten in den meisten Fällen aus. Die Reste der Cyclodextrinlösung wurden anschließend durch Spülen mit Wasser entfernt.

#### 4.3.4.3 Phosphatase-Inhibitoren der AF-Reihe

Nach den FAC-Messungen mit den Phosphatase-Inhibitoren von Michael Manger, AG Waldmann, aus der P-Reihe, wurden weitere Phosphatase-Inhibitoren mittels FAC an Cdc25a vermessen. Hierzu wurden Substanzen der Arbeitsgruppe Fürstner, MPI Mühlheim, (AF-Reihe) und von Lars Wittenberg, AG Waldmann, (LW-Reihe) eingesetzt.

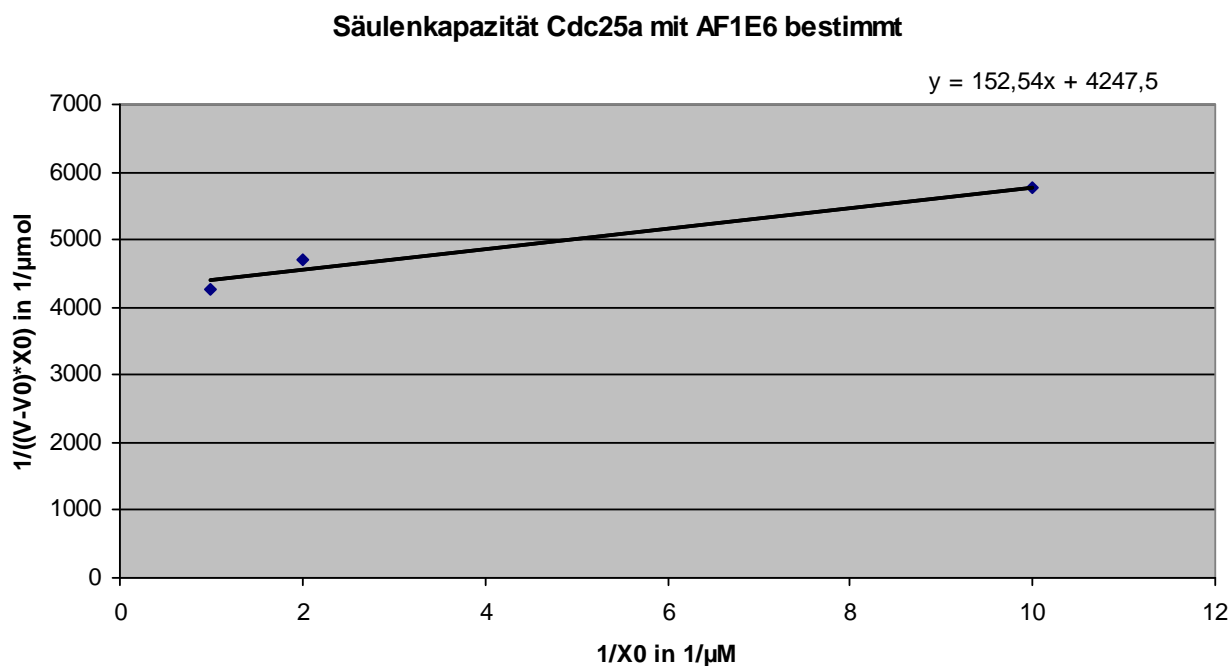
Konzentrationsabhängigkeit der Verzögerung einer Beispielsubstanz aus der AF-Reihe: AF1E6. Durch eine Explosion im benachbarten Destillenraum wurde die gesamte HPLC-MS-Anlage zerstört. Das Säulenmaterial war zum Glück von der Explosion nicht betroffen und konnte weiterverwendet werden. Wegen der dadurch nötigen Neuanschaffung wurden die nun nachfolgenden Messungen mit den Verbindungen der AF-Reihe und LW-Reihe auf dem LTQ von Thermo Finnigan durchgeführt. Zwei Substanzen, bei denen die Messungen der FAC einwandfrei funktioniert hatten werden in den nächsten Chromatogrammen vorgestellt und die Bestimmung ihres  $K_D$ -Wertes für Cdc25a gezeigt. Diese Massenchromatogramme wurden alle im MS/MS-Mode

ermittelt. Dadurch war eine Steigerung der Genauigkeit und Empfindlichkeit der Messungen möglich. Bei Messungen im MS/MS-Mode wird das Ion der Substanz in der Ionenfalle fragmentiert. Das Massenchromatogramm verfolgt dann die Intensität eines Fragments über den Zeitverlauf. Da das Fragmentierungsmuster für das Ion einer Verbindung charakteristisch ist, kann man sicher sein, dass es sich tatsächlich um das Massenchromatogramm der gesuchten Verbindung handelt und nicht um Untergrund im System.



**Abbildung 97:** Konzentrationsabhängigkeit der Verzögerung der Retentionszeiten von AF1E6 an einer Cdc25a-Säule. Je 50  $\mu\text{l}$  Probenaufgabe, MS/MS auf 289,3 Da

Zur Bestimmung der Säulenkapazität und der Dissoziationskonstante wurden die halbmaximalen Zeiten verwendet, da diese exakter aus den Diagrammen zu bestimmen sind. Dieses Verfahren wird in der Enzymkinetik öfters angewendet, z.B. bei der Bestimmung von Michaelis-Menten-Konstanten, da so exakter Werte für Enzymaktivitäten zu erhalten sind bei einer graphischen Bestimmung.



**Abbildung 98:** Diagramm zur Bestimmung der Bindungskapazität der Cdc25a-Affinitätssäule durch Messungen mit AF1E6

Mit diesen FAC-Messungen wurde analog zu dem oben beschriebenen Verfahren die Säulenkapazität der Cdc25a-Affinitätssäule bestimmt. Die Gleichung der Ausgleichsgeraden der Werte von AF1E6 lautet:

$$y = 152,54 * x + 4247,5 \mu\text{mol}^{-1}$$

Der Achsenabschnitt Ausgleichsgeraden mit  $y$  ergibt  $1/B_t$ . Wird  $x = 0$  gesetzt erhält man also den reziproken Wert für  $B_t$ :

$$B_t^{-1} = y = 4247,5 \mu\text{mol}^{-1} \text{ für } x = 0$$

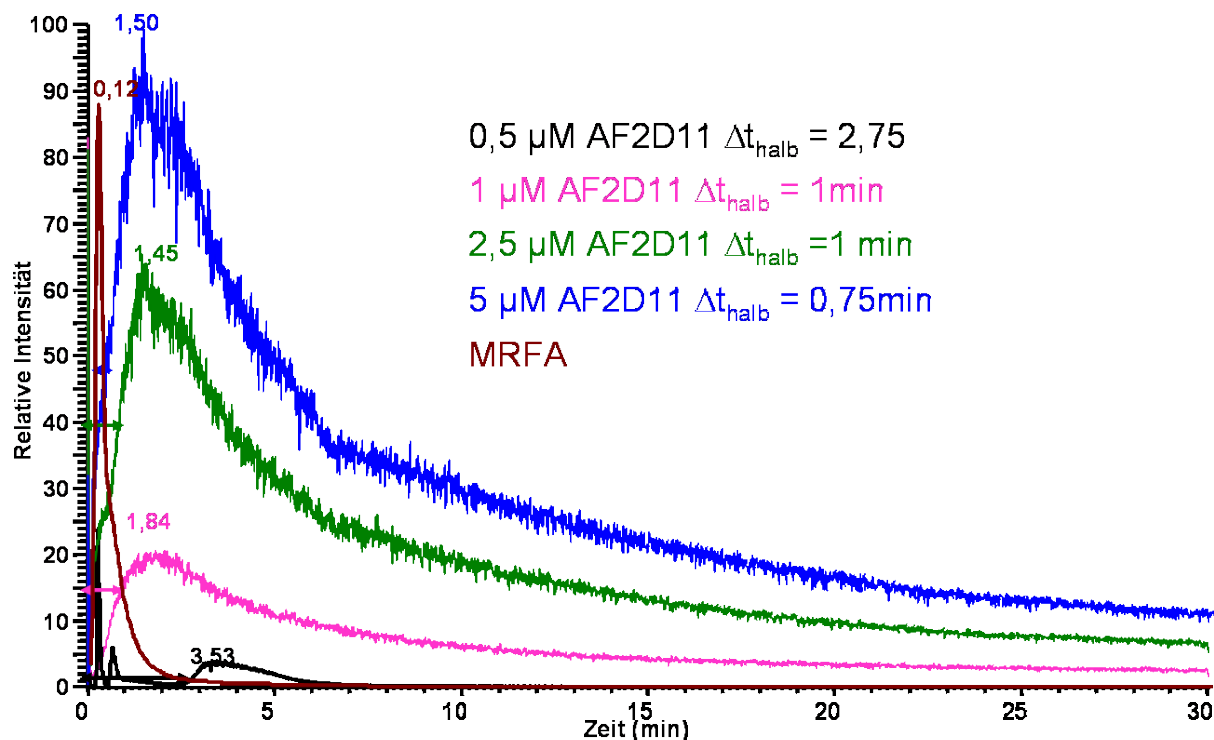
Damit ist  $B_t = (4247,5 \mu\text{mol}^{-1})^{-1} = 0,00023 \mu\text{mol}$  für AF1E6

Zur Berechnung von  $K_D$  wird  $y = 0$ . Damit ergibt sich

$$y = -1/K_D = -4247,5 \mu\text{mol}^{-1}/152,54 = -27,85 \mu\text{mol}^{-1}$$

Damit ist  $K_D = 0,036 \mu\text{mol}$  für die Substanz AF1E6

Eine weitere Substanz mit der die FAC sehr gut gelangen ist AF2D11. Auch bei dieser Verbindung wurden die Retentionszeiten für verschiedene Konzentrationen ermittelt. Die Massenchromatogramme sind in Abbildung 99 dargestellt. Hier ist eine Konzentrationsreihe der Substanz AF2D11 an einer Cdc25a-Säule dargestellt. Sie hat einen  $IC_{50}$  von und einen  $C \text{ Log } P$  von 1,7.



**Abbildung 99:** Konzentrationsabhängigkeit der Verzögerung der Retentionszeiten von AF2D11 an einer Cdc25a-Affinitätssäule, je 100 µl Probenaufgabe, alle Substanzen in Wasser; Massenchromatogramm vom ms/ms der Masse 219,10 Da bei 30% Fragmentierungsenergie, 204,1 Da, 0,3 ml/min

Mit diesen FAC-Messungen wurde analog zu dem oben beschriebenen Verfahren die Säulenkapazität der Cdc25a-Affinitätssäule bestimmt. Die Gleichung der Ausgleichsgeraden der Werte von AF2D11 lautet:

$$y = 3009,4 * x + 774,14 \mu\text{mol}^{-1}$$

Der Achsenabschnitt Ausgleichsgeraden mit  $y$  ergibt  $1/B_t$ . Wird  $x = 0$  gesetzt erhält man also den reziproken Wert für  $B_t$ :

$$B_t^{-1} = y = 774,14 \text{ für } x = 0$$

Damit ist  $B_t = (774,14 \mu\text{mol}^{-1})^{-1} = 0,0013 \mu\text{mol}$  für AF2D11

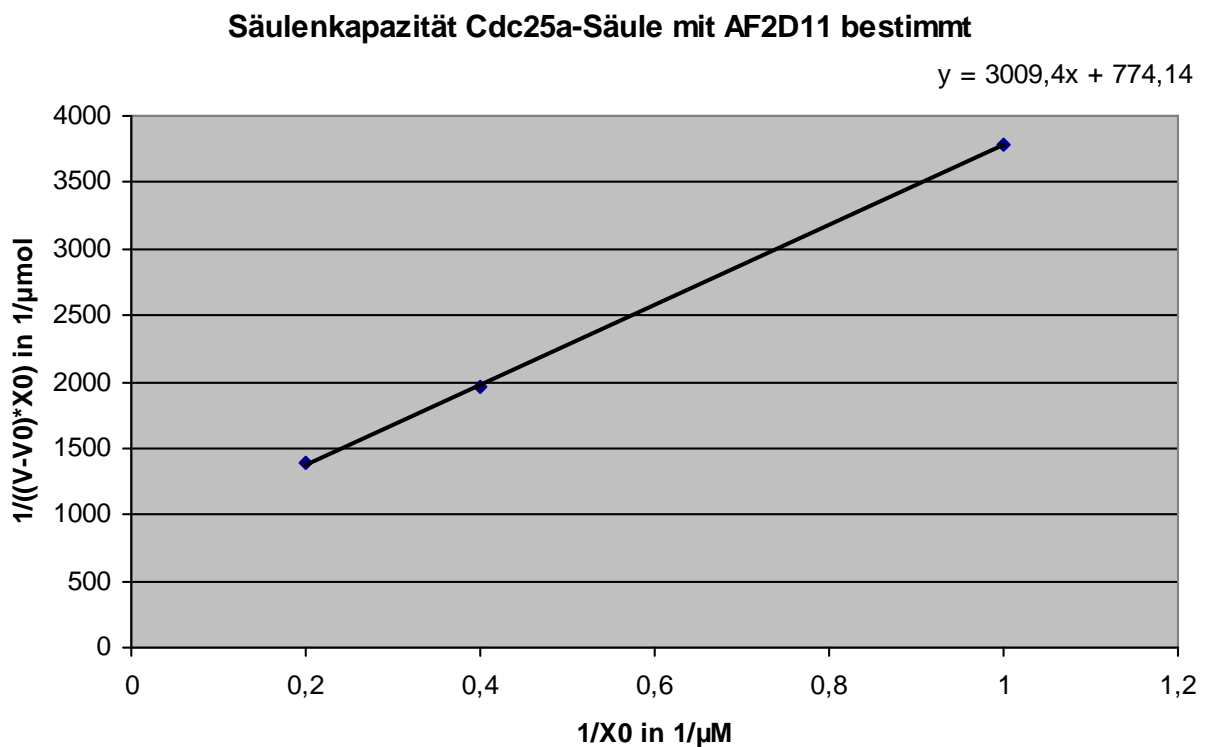
Zur Berechnung von  $K_D$  wird  $y = 0$ . Damit ergibt sich

$$y = -1/K_D = -774,14 \mu\text{mol}^{-1}/3009,4 = -0,26 \mu\text{mol}^{-1}$$

Damit ist  $K_D = 3,88 \mu\text{mol}$  für die Substanz AF2D11

Der Gleichung für die Ausgleichsgeraden ist der Wert für die Dissoziationskonstante zu entnehmen. Da der Wert für die Konzentration bei 0,5 µM sehr stark von der Ausgleichsgeraden abwich, wurde auf dessen Verwendung verzichtet.

Die  $B_t$ -Werte für die Cdc25a-Affinitätssäule, die für die Messungen mit den AF-Substanzen bestimmt wurden, unterscheiden sich massiv von den  $B_t$ -Werten für die Cdc25a-Affinitätssäule, die bei den P-Substanzen bestimmt wurden. Dies liegt daran, dass die Säulen für die Messungen mit dem wesentlich empfindlicheren LTQ verändert wurden. Das Cdc25a-POROS wurde mit BSA-POROS 1:1000 verdünnt. Sonst wäre es nicht möglich gewesen, die eingesetzten Ligandenkonzentrationen von einem Bereich zwischen 200 bis 50 µM auf 5 bis 0,1 µM zu reduzieren.



**Abbildung 100:** Bestimmung der Säulenkapazität, also der freien Bindungsstellen, einer mit Cdc25a-beladenen POROS befüllten Säule (1:1000 mit -BSA-POROS verdünnt)

Da  $B_t$  für die Säulenkapazität steht, lassen sich mithilfe des  $B_t$  dieser Affinitätsäule und den Retentionszeiten anderer Liganden die Dissoziationskonstanten dieser Liganden ermitteln, wenn sie auf genau dieser Säule gemessen wurden. Die Berechnung der  $K_D$ -Werte dieser Substanzen geschah analog zu den weiteren oben beschriebenen Berechnungen der Dissoziationskonstanten für die P-Substanzen nach:

$$(K_D)_x = \frac{B_t}{V_x - V_0} - [X]_0.$$

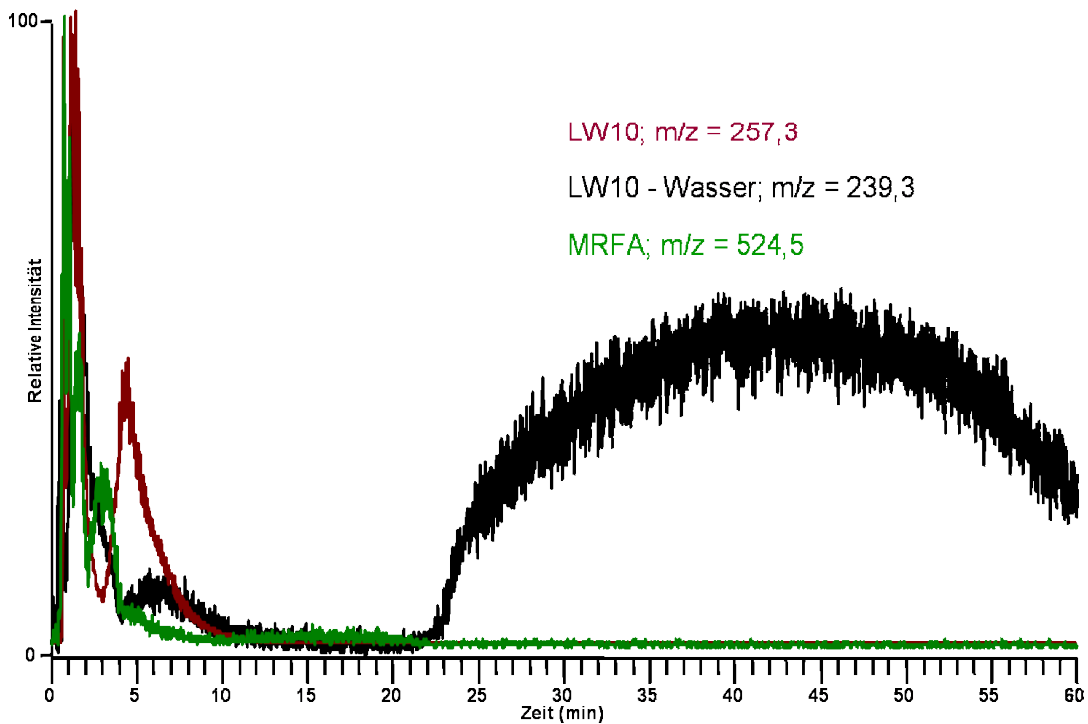
$[X]_0$  kann (laut Kasai et al) vernachlässigt werden, wenn  $K_D$  sehr viel größer ist als  $[X]_0$ . Dies trifft für die hier ermittelten Dissoziationskonstanten allerdings nicht zu. In der nachfolgenden Tabelle werden die Substanzen aufgeführt, für die eine Ermittlung der Dissoziationskonstante aufgrund der Ergebnisse der FAC sinnvoll war. Sinnvoll bedeutet in diesem Zusammenhang, ob es überhaupt eine Verzögerung der Retention dieser Substanzen aufgrund spezifischer Wechselwirkungen gab, die größer war als die Verzögerung verursacht durch unspezifische Wechselwirkungen.

**Tabelle 13:** Zusammenfassung der korrigierten Elutionsvolumina und der daraus bestimmten Dissoziationskonstanten für die BN- und AF-Substanzen.

Substanzen je 50µl 1µM Lösung	V <sub>x</sub> - V <sub>0</sub> in ml (unspezifische Bindung von BSA abgezogen)	V <sub>x</sub> - V <sub>0</sub> in Liter	K <sub>D</sub> µM
<b>BN 11290</b>	1,425	1,425 * 10 <sup>-3</sup>	(-0,094)
<b>BN 10871</b>	0,85	0,85 * 10 <sup>-3</sup>	0,5
<b>BN13131</b>	0,07	0,07 * 10 <sup>-3</sup>	17,4
<b>AF1F8</b>	0,22	0,22 * 10 <sup>-3</sup>	4,9
<b>AF2D11</b>	0,7	0,7 * 10 <sup>-3</sup>	0,8
<b>AF1D10</b>	1,02	1,02 * 10 <sup>-3</sup>	0,2
<b>AF1A11</b>	1,25	1,25 * 10 <sup>-3</sup>	0,03

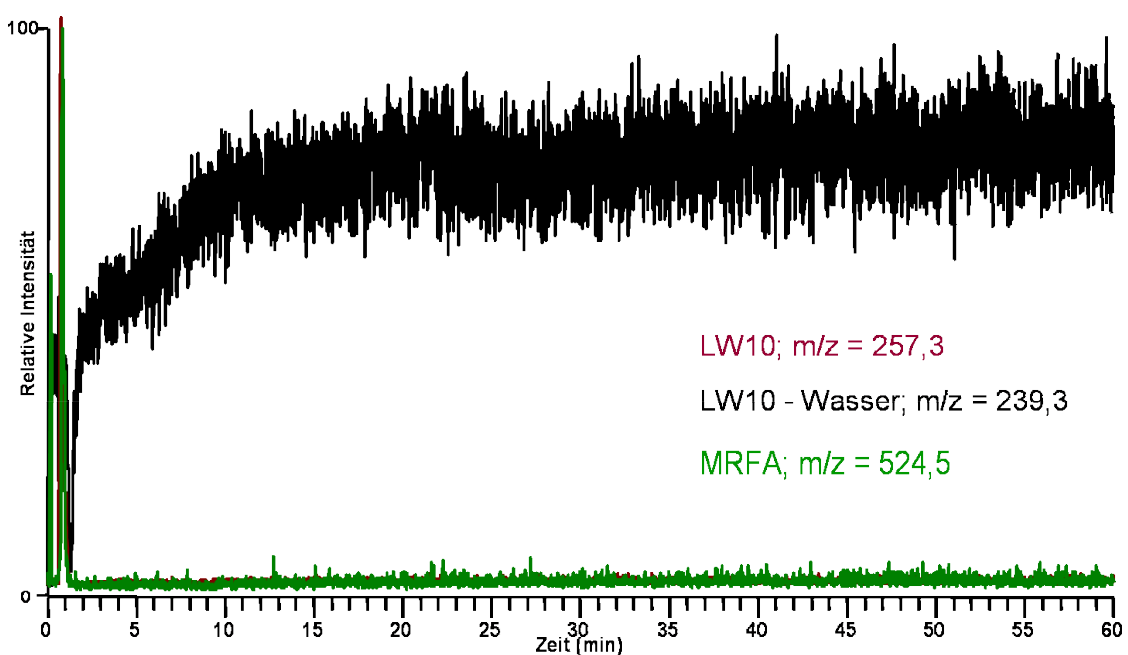
#### 4.3.4.4 Das „Sterben“ der Säule bei Cdc25a

Bei der Messung der Verbindung LW10 auf der Cdc25a-Affinitätssäule wurde ein Phänomen besonders gut sichtbar, das "Sterben" der Säule. "Sterben" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Säule für nachfolgende Messungen unbrauchbar wird, da keine Verzögerung der Retentionszeit einer Substanz mehr zu beobachten ist, obwohl die Substanz in einer vorhergehenden Messung eindeutig verzögert von der Säule eluiert ist. Dies wird an zwei aufeinanderfolgenden Messungen, die in Abbildung 101 und Abbildung 102 abgebildet sind, demonstriert. In Abbildung 101 sind die Massenchromatogramme von LW10+H<sup>+</sup> und LW10-H<sub>2</sub>O+H<sup>+</sup> und als Totvolumenmarker MRFA dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die Verzögerung der Elution von LW10 und seinem Zerfallsprodukt LW10-H<sub>2</sub>O. Damit lässt sich eine Dissoziationskonstante für diese Substanz bestimmen und somit eine Einordnung der Bindungsstärke vornehmen. Ein weiteres Phänomen ist die verstärkte Verzögerung des Zerfallsproduktes von LW10 in dieser Messung. Das Auftreten von inhibitorisch wirksamen Zerfallsprodukten ist jedoch ein weiteres Problem, das hier nicht vertieft erörtert werden soll.



**Abbildung 101:** 1. Auftrag von LW10 und MRFA: 50  $\mu$ l 5  $\mu$ M LW10 mit 1  $\mu$ M MRFA; 0,2 ml/min Fluss 0,1 mM Ammoniumacetat

Im zweiten Auftrag von LW10 auf dieselbe Cdc25a, erhielt man die Massenchromatogramme in Abbildung 102. LW10+H<sup>+</sup> verzögert überhaupt nicht mehr an dieser Affinitätsäule. Die Retentionszeit liegt genau auf der Retentionszeit des MRFA. Die Verzögerung von LW10-H<sub>2</sub>O+H<sup>+</sup> von etwa 25 Minuten auf 2 Minuten gesunken. Danach ist kein Absinken des Signals mehr zu beobachten. Dieser Binder ließ auch nicht mehr auswaschen. Auf weitere Messungen mit dieser Cdc25a-POROS-Säule wurde verzichtet.

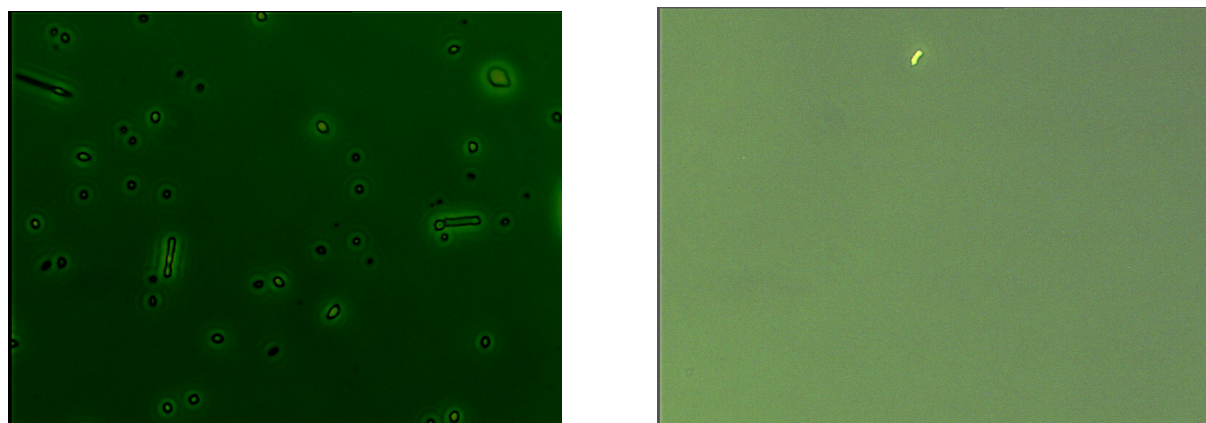


**Abbildung 102:** 2. Auftrag von LW10 und MRFA: 50  $\mu$ l 5  $\mu$ M LW10 mit 1  $\mu$ M MRFA; 0,2 ml/min Fluss 0,1 mM Ammoniumacetat

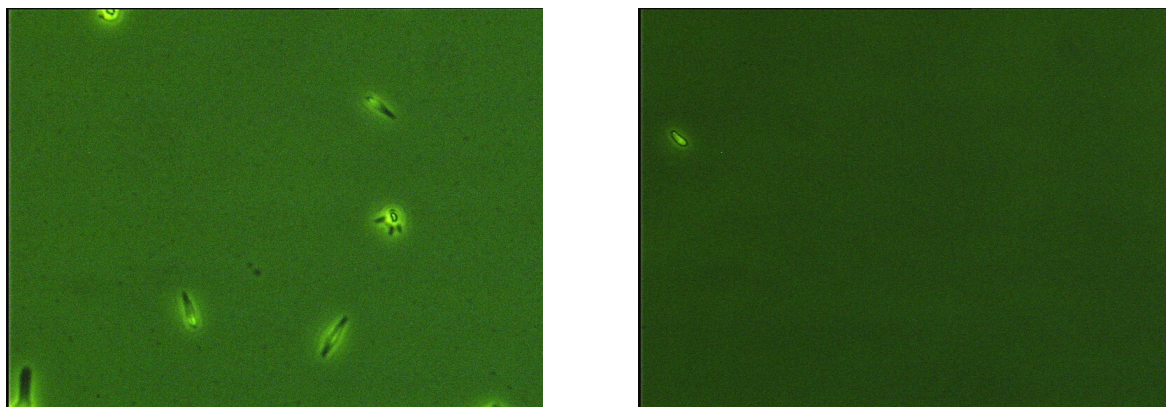


#### 4.4 DIE LÖSLICHKEIT DER EINGESETZTEN SUBSTANZEN

Ein Problem begleitete die gesamten Messungen: die teilweise geringe Löslichkeit der Substanzen in wässriger Umgebung. Eine Untersuchung der üblicherweise verwendeten 100  $\mu$ molaren Lösungen (99,9 % Wasser/0,1 % DMSO) mit dem Durchlichtmikroskop zeigte Kristallbildung in den Lösungen. Als Beispiel sind in Abbildungen 104 und 105 die mikroskopischen Aufnahmen zweier problematischer Verbindungen aus den FAC-Messungen der Cdc25a-Inhibitoren gezeigt. Unter der 40-fachen Vergrößerung eines Lichtmikroskops wurden die Kristalle, die sich beim Verdünnen der DMSO-Lösungen der eingesetzten Substanzen bildeten sichtbar. Durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln ließ sich die Anzahl der gefundenen Kristalle deutlich reduzieren. Da organische Lösungsmittel jedoch nicht für den Einsatz im FAC-MS in Betracht kamen, wurden Cyclodextrine Löslichkeitsvermittler getestet. Sie umschließen die Substanzen wie einen Käfig und disaggregieren so diese Verbindungen in Wasser. Die mikroskopischen Aufnahmen nach der äquimolaren Lösung der P-Substanzen P330 und P367 zeigen, dass die Anzahl an Kristallen deutlich reduziert werden konnte (vergleiche Abbildungen 104 und 105). Um die Substanzen mithilfe von Cyclodextrin- $\gamma$  in Lösung zu bringen wurde die 10 mM Stocklösung der Substanzen (in DMSO) 1:100 in einer 100  $\mu$ M Cyclodextrin- $\gamma$  Lösung (in Wasser) aufgenommen. Dadurch lagen Cyclodextrin und Substanz dann zu 100  $\mu$ M in Lösung vor und der DMSO-Anteil lag bei 1%. 100  $\mu$ M wurde als Konzentration gewählt, da dies die in der FAC-MS übliche Konzentration für die P-Substanzen war (mit dem Aufbau vor der Zerstörung der Geräte durch Explosion).



**Abbildung 103:** p330, wässrige Lösung 100  $\mu$ M aus DMSO, 40x; p330, 100  $\mu$ M in wässriger Lösung unter Zusatz von 100 $\mu$ M Cyclodextrin- $\gamma$



**Abbildung 104:** P367 100 µM wässrige Lösung ohne Cyclodextrin- $\gamma$       P367 100 µM wässrige Lösung mit 100 µM Cyclodextrin- $\gamma$

Die nachfolgende Tabelle 14 fasst die Ergebnisse aus der mikroskopischen Untersuchung der verdünnten Lösungen zusammen.

**Tabelle 14:** Anzahl der Kristalle aus der lichtmikroskopischen Untersuchung der wässrigen Lösungen der P-Substanzen

Konzentration Cyclodextrin	Kein Cyclodextrin	50 µM	100 µM
P330 Anzahl Kristall/Abbildung	47	1	1
P367 Anzahl Kristall/Abbildung	7	16	1
P338	17	0	1
P433	40	1	0

Auch die anderen Substanzen dieser Bibliothek kristallisierten in Wasser wieder aus. Eine Auswahl dieser wässrigen Lösungen wurde unter einem Mikroskop untersucht, ist hier aber nicht aufgeführt, da sie für die FAC-Messungen nicht mehr eingesetzt wurden.

Zur Beschreibung der Löslichkeit von Substanzen wird die Größe C Log P eingesetzt. Korrelation von C Log P zu den Elutionszeiten von der Säule

Die Ergebnisse der FAC-Messungen an den mit Cdc25a und BSA beladenen Affinitätsäulen, ließen die Frage aufkommen, ob die Retentionszeiten von anderen Faktoren abhängen, denn der spezifischen Bindung der Liganden an das aktive Zentrum eines Enzyms. Dazu werden verschiedene Eigenschaften der Liganden in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

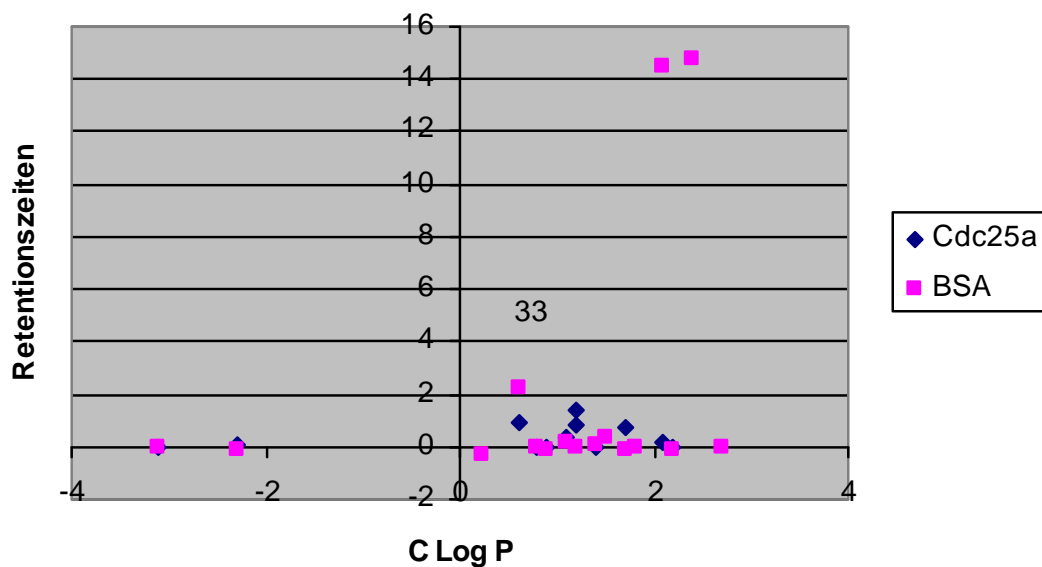
Die folgende Tabelle 15 bildete die Grundlage für die Korrelationsdiagramme. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen der AF-Reihe stammen aus der Veröffentlichung von Fürstner et al [102].

Tabelle 15: Übersicht: C Log Ps; Inhibierung Cdc25a; FAC-MS-Messungen

eingesetzte Substanzen	ClogP	IC50		IC50	%Inh Cd c25a	Mol weight	FAC	
		Cdc25a	PTP1B				VHR	Cdc25a/ml
<b>BN4001</b>	0,9				78,3	420,4	0	-0,082
<b>BN13129</b>	1,4				117	204,2	0,02	0,05
<b>BN13811</b>	-3,1				73,4	283,2	-0,03	0
<b>BN10871</b>	1,2				133,2	289,3	0,85	0
<b>BN13131</b>	-2,3				124,7	193,2	0,07	-0,11
<b>BN11290</b>	1,2				125,6	170,2	1,425	
<b>BN13423</b>	0,6				72,5	390,3	0,952	2,25
<b>BN13940</b>	0,8				102,4	317,3	0	0
<b>AF1D7</b>	2,4				99,1	184,2		14,75
<b>AF1F1</b>	2,7				135,2	184,1		0
<b>AF1F3</b>	2,2				78,4	200,1	0	-0,09
<b>AF1F8</b>	1,1				76,6	233,7	0,38	0,16
<b>AF1G1</b>	1,8				80,1	234,2		0
<b>AF1G2</b>	2,1				83,1	236,2	0,13	14,5
<b>AF1E3</b>	1,5				90,7	184,2		0,33
<b>AF2D11</b>	1,7	> 50 µM	>50 µM	>50 µM	98,6	218,2	0,7	-0,11
<b>AF2C11</b>	3,3	> 50 µM	46 µM	8 µM	69,8	272,3	MS nicht zu sehen	
<b>AF1B11</b>	0,23	> 50 µM	24 µM	41 µM	81,2	497,1		-0,34
<b>AF1G10</b>	2,7	> 50 µM	28 µM	39 mM	82,7	267,3	MS nicht zu sehen	
<b>AF1A10</b>	7,31	> 50 µM			k.a.	452,2	0	0,07
<b>AF1B10</b>	7,5	> 50 µM			k.a.	452,2	0;0,8	0;0,9;4,05
<b>AF1C10</b>	8,16	> 50 µM			k.a.	388,25	-0,1	-0,36
<b>AF1D10</b>	4,05	> 50 µM			k.a.	294,6	1,02	-0,56
<b>AF1E10</b>	8,16	40 µM	3,3 µM	4,9 µM	k.a.	380,1	0,02;0,82	-0,03
<b>AF1A11</b>	4,17	>50 µM	23 µM	28 µM	k.a.	398,2	-0,35	4,53
<b>AF1E6</b>	3,5	> 50 µM			k.a.	288,1	1,25	0
<b>P330</b>	7,4	2,5 µM			k.a.	735,5	16	15
<b>P338</b>	7,1	1,8 µM			k.a.	605,4	27	17
<b>P367</b>	8,4	1,9 µM			k.a.	667,4	23	12
<b>P433</b>	7,4	17 µM			k.a.	661,5	27	15

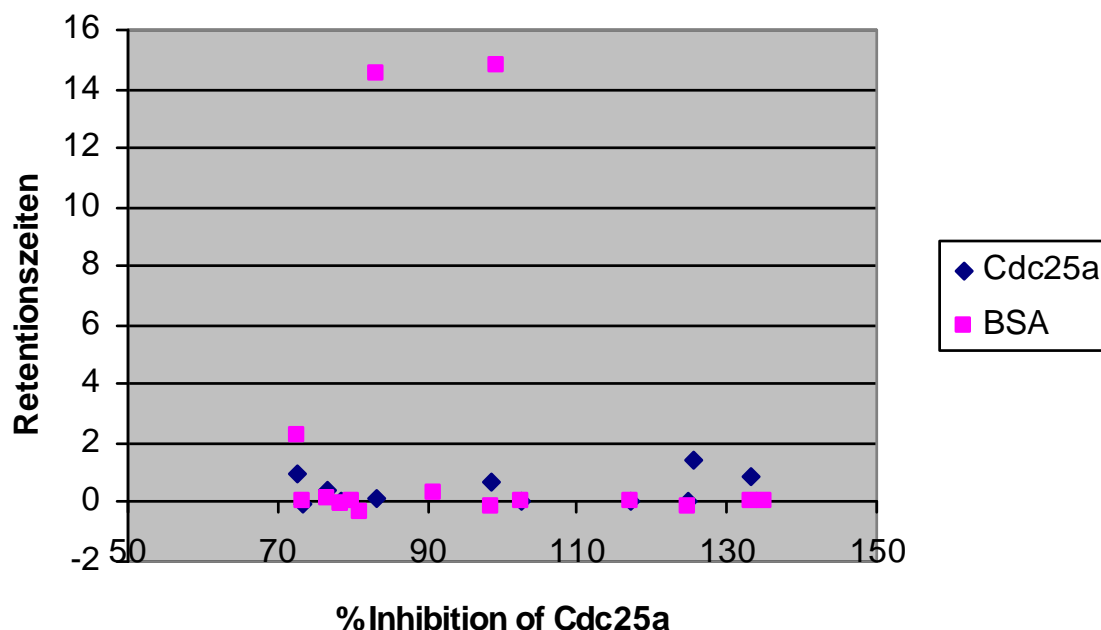
Im nächsten Diagramm (Abbildung 105) wird der C Log P mit den Retentionszeiten für die Substanzen von Analyticon und A. Fürstner korreliert. Bei diesen Substanzen ist die Retentionszeit

von der Cdc25a-Säule und von der BSA-Säule einigermaßen unabhängig vom C Log P. Lediglich zwei Substanzen besitzen bei einem C Log P von über zwei eine sehr viel höhere Retentionszeit von der Säule als alle anderen Substanzen. Bei der Cdc25a gibt es bei diesen Substanzen nur Retentionszeiten von höchstens 1,9 Minuten.



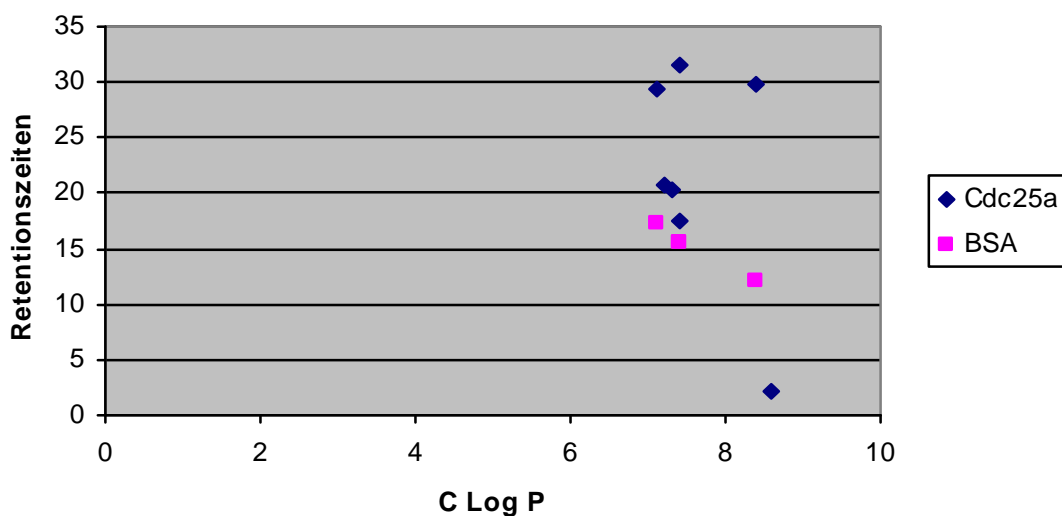
**Abbildung 105:** Korrelation des C Log Ps zu den Retentionszeiten von der Cdc25a-Säule verschiedener Substanzen der AF- und BN-Reihe (BN4001, BN13129, BN13811, BN10871, BN13131, BN11290, BN13423, BN13940, AF1D7, AF1F3, AF1F1, AF1F8, AF1G1, AF1G2, AF1E3, AF2D11, AF2C11, AF2B11, AF1G10)

Auch bei der Korrelation der prozentualen Inhibierung der enzymatischen Aktivität von Cdc25a mit der Retentionszeit gibt es keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen diesen Größen. Wieder sind die beiden Ausreisser zu erkennen.



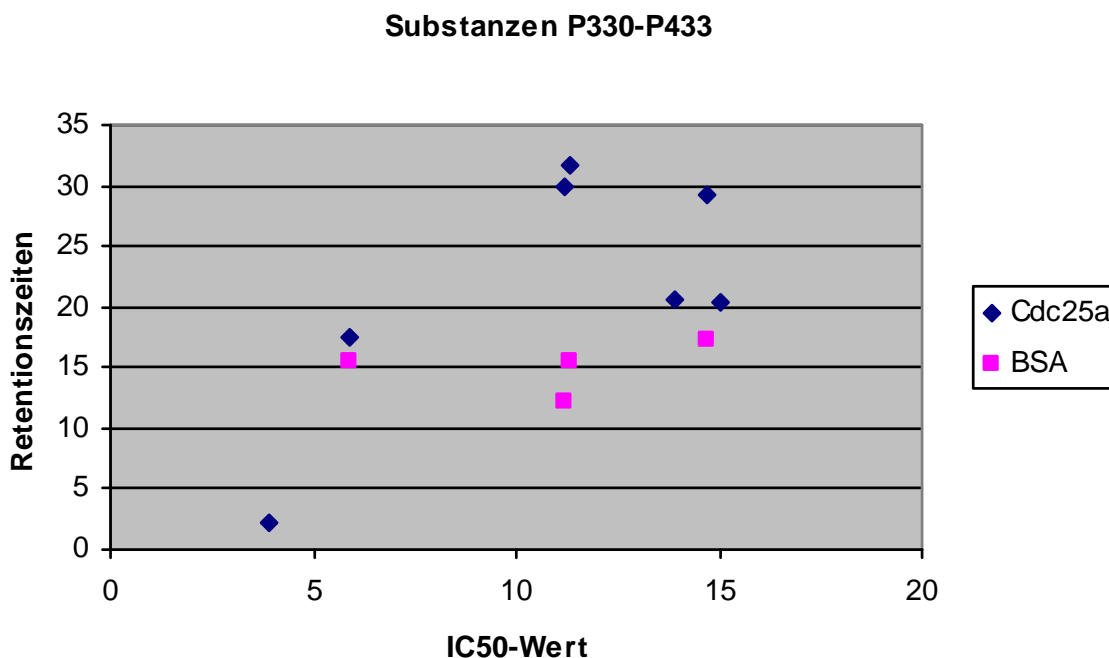
**Abbildung 106:** Korrelation der prozentualen Inhibierung zu den Retentionszeiten von der Cdc25a-Säule verschiedener Substanzen der AF- und BN-Reihe (BN4001, BN13129, BN13811, BN10871, BN13131, BN11290, BN13423, BN13940, AF1D7, AF1F3, AF1F1, AF1F8, AF1G1, AF1G2, AF1E3, AF2D11, AF2C11, AF2B11, AF1G10)

Die Korrelationsdiagramme für die Substanzen P330, P338, P367 und P433 wurden gesondert erstellt, da die FAC-MS Analysen auf einem anderen System erfolgten als für die vorhergehend genannten Substanzen, und die Retentionszeiten daher nicht vergleichbar sind. Bei der Korrelation der Retentionszeiten der P-Substanzen gegen deren C Log P zeichnet sich tatsächlich ein Zusammenhang ab. Je größer der C Log P, umso länger wird die Elution der Substanzen von den Säulen verzögert.



**Abbildung 107:** Korrelation des C Log P zur den Retentionszeiten der eingesetzten Substanzen P330, P338, P367, P433

Auch bei der Auftragung der  $IC_{50}$ -Werte gegen die Retentionszeiten ist ein Trend dahingehend erkennbar, dass mit steigenden Retentionszeiten der  $IC_{50}$ -Wert zunimmt. Dies gilt sowohl für die Retentionszeiten von der Cdc25a- wie auch von der BSA-Säule. Damit scheint es keinen Zusammenhang zwischen der Bindung an Cdc25a und der inhibierenden Wirkung der Substanzen zu geben.



**Abbildung 108:** Korrelation des C Log P zur den Retentionszeiten der eingesetzten Substanzen P330, P338, P367, P433

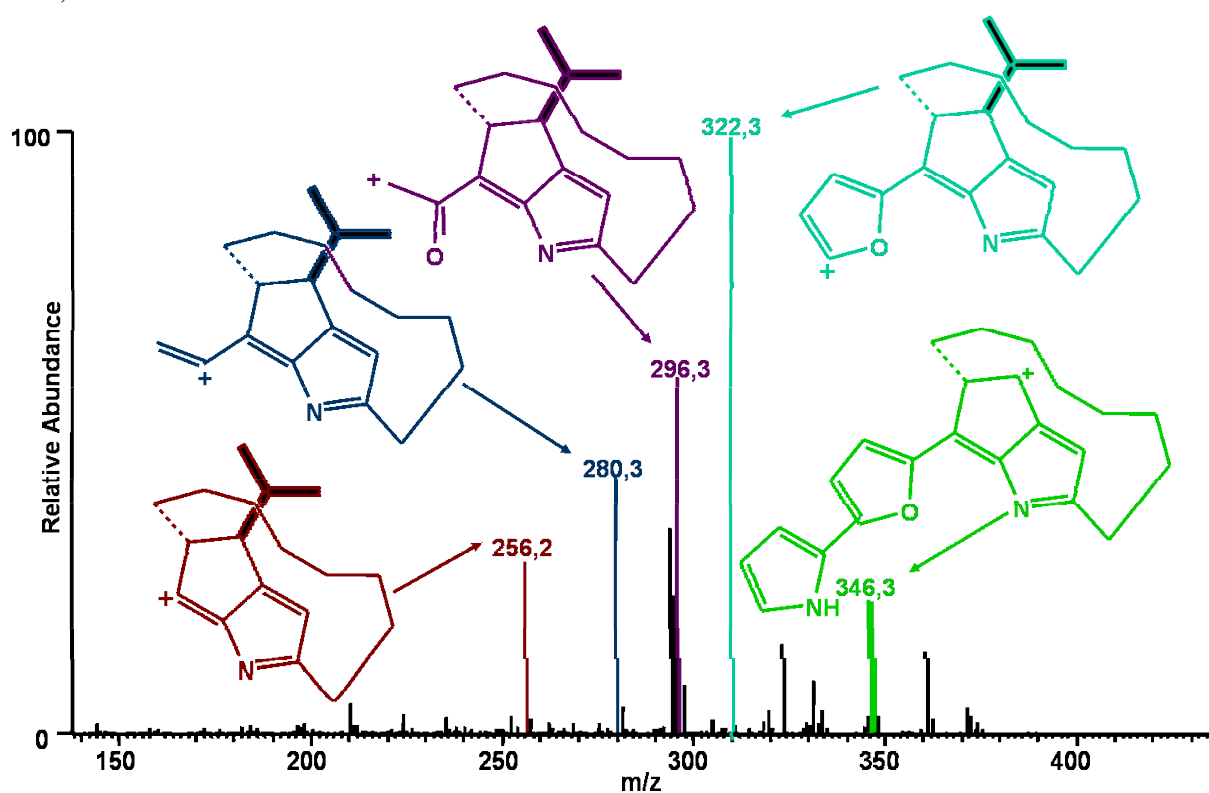
## 4.5 GEL-FILTRATIONS-ASSAYS

### 4.5.1 Gelfiltrationsassay nach S. Sauer

Eine Kontrolle der unspezifischen Bindung der nach Berlin verschickten Substanzen erfolgte auf MALDI-Oberflächen. Als Kontrollproteine wurden Casein und BSA auf die Goldoberfläche nach dem Mercaptopropionsäure-Protokoll immobilisiert. Von den Substanzen wurden pro Probenpunkt je 1  $\mu$ l 100 bzw. 50  $\mu$ M Lösung in Phosphatpuffer aufgegeben. In einem weiteren Versuch wurde eine Konzentrationsreihe von Vitamin K zu 500, 250, 100 und 50  $\mu$ M für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgegeben. Zusätzlich wurde überprüft, ob mit Vitamin K die spezifische Bindung im MALDI gemessen werden kann.

Zunächst erfolgte die Kalibrierung für die im Gelfiltrationsassay eingesetzten Substanzen. Lösungen der untersuchten Verbindungen zu 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M wurden in das HPLC-MS System mit Volumina von 10, 20 und 50  $\mu$ l (Jupiter C8) injiziert. Die HPLC Messungen wurden mit einem Gradienten von 30 – 90 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Xcalibur Quan Browser Software. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit und Genauigkeit wurden die Messungen wieder im MS/MS-Mode

durchgeführt. Das bedeutet, dass das Ion der Verbindung in der Ionenfalle fragmentiert wurde und dann das Fragmentierungsmuster aufgenommen wurde. Zur Erstellung des Massenchromatogramms wurde dann der Massenpeak eines Fragmentes herausgesucht und die Veränderung seiner Intensität über die Zeit dargestellt. Da das Fragmentierungsmuster für jede Verbindung individuell ist, kann sichergestellt werden, dass tatsächlich das Chromatogramm der gesuchten Verbindung aufgenommen wird und nicht der Untergrund aus dem HPLC-MS-System. Um feststellen zu können, welche Peaks im Fragmentierungsmuster der gesuchten zu sehen sind, wurden von jeder einzelnen Substanz vorab eine MS/MS-Messung durchgeführt. Die erhaltenen Massenpeaks wurden dann den möglichen Fragmenten zugeordnet. Abbildung 109 zeigt eine solches MS/MS für die Substanz AF1C10. Zu den größten Massenpeaks wurde eine mögliche Fragmentstruktur ermittelt. Für die Darstellung im Massenchromatogramm wurde für AF1C10 der Peak 322,3 aus dem MS/MS ermittelt.

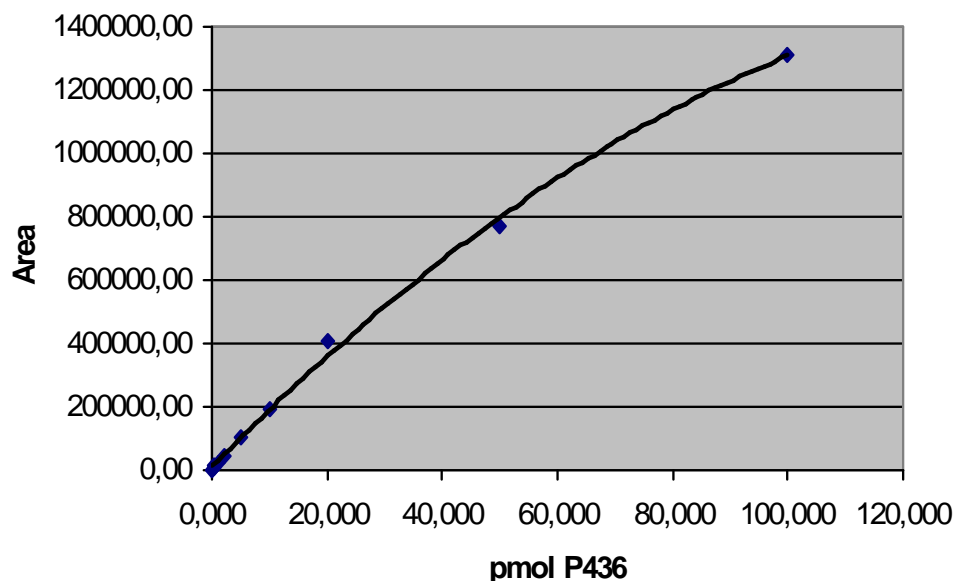


**Abbildung 109:** Fragmentierungsmuster von AF1C10 bei 35% Fragmentierungsenergie im LTQ

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse für diese erste Messung zusammengefasst. Es wurden sowohl die Binder- wie auch die Nichtbinderfraktion mit der HPLC-MS untersucht. Für den Gelfiltrationsassay wurden 10  $\mu$ l einer 2  $\mu$ M Lösung pro Probe eingesetzt; das entspricht einer Proteinmenge von 20 pmol. Für die Quantifizierung der Proben aus dem Assay müssen zunächst Kalibrierungsmessungen durchgeführt werden. Dazu werden pro Verbindung mehrere Messungen mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Es werden jeweils von jeder Lösung 10, 20 und 50  $\mu$ l über die Jupiter C8-Säule in der HPLC-MS gemessen. Eine Ausnahme bildete die 10  $\mu$ M Lösung, davon wurden nur 10  $\mu$ l aufgegeben. Die Messung erfolgte im MS/MS-Mode. Wichtig ist auch, dass die Lösungen frisch aus den Stocklösungen angesetzt werden, da etliche Verbindun-



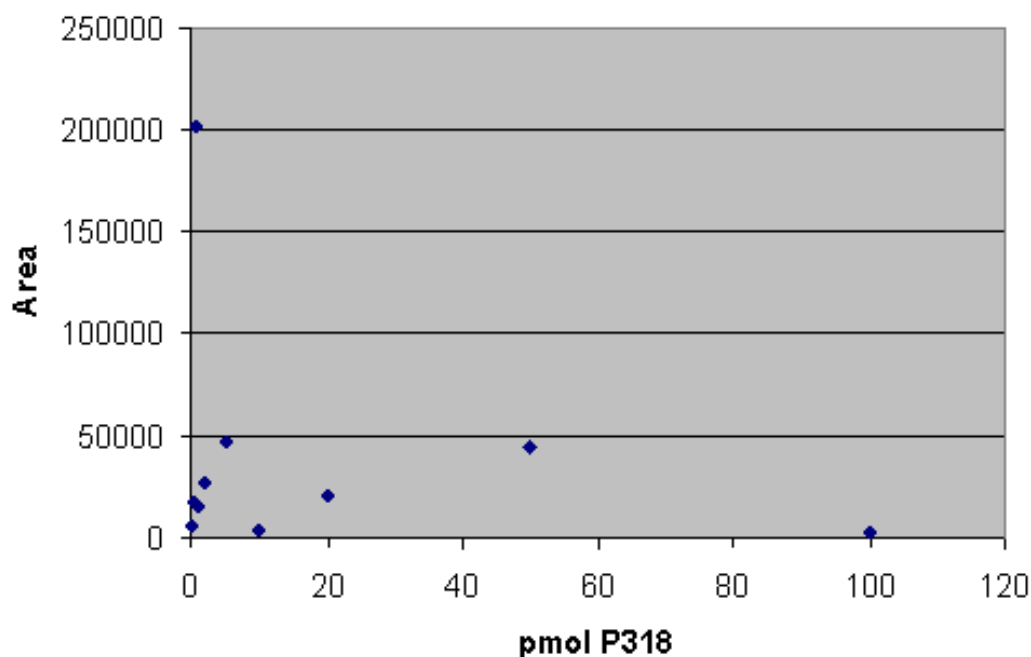
gen in wässriger Lösung aggregieren (siehe Kapitel zu Löslichkeit). Diese Daten wurden zusammen mit den Messungen der im Gelfiltrationsassay erhaltenen Daten im *Quan Browser* der *Xcalibur Software* ausgewertet. Diese Software erstellt automatisch ein Excel-Datenblatt mit den Peakflächen und den daraus berechneten Substanzmengen. Mithilfe dieser Excel-Datenblätter wurde die in Abbildung 110 gezeigte Kalibrierkurve erstellt. Diese Kurven dienen der Überprüfung der Kalibrierung. Sie sollten einer linearen Regression entsprechen. Die Abbildung 110 zeigt, dass die Kurven eher logarithmisch verlaufen, denn linear. Dies könnte daran liegen, dass bei höheren Substanzmengen das Signal gesättigt war. Das bedeutet, dass das Massenspektrometer, das Signal quasi abschneidet, und zwar an der Obergrenze der Messbarkeit.



**Abbildung 110:** Kalibrationskurve für P436

Diese leichte Abweichung vom Ideal der linearen Regression bei den Kalibrationen stellt jedoch eher ein vernachlässigbares Problem dar. Der Versuch die Substanz P318 in dem für den Gelfiltrationsassay nötigen Mengen zu messen wird in Abbildung 111 gezeigt. Es wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  zu 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{l}$  0,1  $\mu\text{M}$ , 0,25  $\mu\text{M}$  und 0,5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  wässriger Ligandenlösung über die Jupiter C8-Säule gemessen. Der Auftrag der Messungen der unterschiedlichen Menge an P318 gegen die Peakflächen des Massenchromatogramm ergeben keine Kalibrierkurve (Abbildung 111). Es ist immer wieder ein Anstieg des Signals über einige Messwerte zu erkennen, dann fällt das Signal von neuem ab, um wieder anzusteigen. Diese Anstiege sind korreliert mit dem verwendeten Volumen. Je größer das Probenvolumen, umso größer das Signal. Das lässt den Schluss zu, dass lediglich Verschmutzungen mit P318 im HPLC-System gemessen wurden, von dem mehr durch größere Probenvolumen gelöst wurden.





**Abbildung 111:** Kalibriermessungen für P318

Dem Prinzip dieses Tests folgend sollte sich umso mehr Substanz in der Binderfraktion befinden, je besser ein Ligand an ein Protein bindet. Die verbleibende Proteinmenge sollte dann in der Nichtbinderfraktion zu finden sein. Die gefundenen Mengen an Substanz in den beiden Fraktionen werden in Tabelle 16 zusammengefasst.

**Tabelle 16:** Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Gelfiltrationsassays

	<b>Nichtbinder</b>	<b>Binder</b>
<b>AF1C10</b>	0.101 $\mu\text{M}$	0.023 $\mu\text{M}$
<b>AF1H10</b>	0.172 $\mu\text{M}$	0.021 $\mu\text{M}$
<b>P436</b>	0.011 $\mu\text{M}$	0.028 $\mu\text{M}$
<b>P498</b>	0.505 $\mu\text{M}$	0.005 $\mu\text{M}$
<b>P503</b>	0.556 $\mu\text{M}$	0.011 $\mu\text{M}$
<b>P516</b>	0.226 $\mu\text{M}$	0.011 $\mu\text{M}$

Bei einer zweiten Durchführung des Gelfiltrationsassays mit anderen Substanzen der Arbeitsgruppe Fürstner wurde Casein als Kontrollprotein eingesetzt. Casein wurde dabei anstatt des Cdc25a verwendet. Um zu testen, ob das System einen Binder von einem Nichtbinder in einem Gemisch unterscheidet, wurden jeweils eine Substanz mit einem sehr kleinen  $\text{IC}_{50}$ -Wert und eine ohne inhibitorische Wirkung auf die Cdc25a-Phosphatase gemischt. Die Versuche wurden mit 48,4  $\mu\text{l}$  8  $\mu\text{M}$  Cdc25a und je 0,8  $\mu\text{l}$  Binder (100  $\mu\text{M}$ ) und Nichtbinder (100  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Das entspricht 80 pmol pro Probe. Die gefriergetrockneten Proben wurden in 8  $\mu\text{l}$  50% Methanol aufgenommen, die Endkonzentration sollte 10  $\mu\text{M}$  betragen.



**Tabelle 18:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Quantifizierung des zweiten Gelfiltrationsassays. Eingesetzte Substanzmenge: 50 pmol. Alle Angabe in pmol, n.m.: nicht messbar

Substanz [pmol]	Nichtbinder			Binder		
	Cdc25a	Casein	Wasser	Cdc25a	Casein	Wasser
<b>AF1B7</b>	0,025	0,023	0,023	0,025	0,028	0,025
<b>AF1B11</b>	0	0	0	0	0	0
<b>BN10871</b>	0,697	1,040	1,161	0,007	0,007	0,001
<b>BN13131</b>	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
<b>BN13129</b>	0,156	0,463	1,035	0,015	0	0,034
<b>BN4001</b>	34,667	32,663	24,871	30,933	19,322	19,583
<b>AF1E6</b>	0,844	1,15	1,313	0,643	0,777	0,471
<b>BN13423</b>	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.

Für den dritten Gelfiltrationsversuch wurden folgende die Binder-/Nichtbindergemische aus in dem Gelfiltrationsassay eingesetzt (Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Zusammenfassung der Ergebnisse des ersten Gelfiltrationsassays

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Binder</b>	LW9	LW10	LW11	LW12	LW18	LW30	LW46	LW47
<b>Nichtbinder</b>	AF1B11	AF1E6	BN13129	BN4001	AF1B11	AF1E6	BN13129	BN4001
	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>Binder</b>	LW48	LW61	AF1A11	AF1B10	AF1A10	AF1C10	AF1D10	AF1E10
<b>Nichtbinder</b>	AF1B11	AF1E6	BN13129	BN4001	AF1B11	AF1E6	BN13129	BN4001

Um die Empfindlichkeit des Gerätes zu zeigen, werden die Ergebnisse einiger Messungen dieser Proben nachfolgend detailliert - einschl. der zugehörigen Kalibrierkurven - dargestellt. Auch wird in diesen Diagrammen ein Problem der Quantifizierung gezeigt. Die Kalibrationskurven müssen bei jeder Messung mit durchgeführt werden, da minimalste Abweichung im Fluss nach jedem Neustart, die durch das HPLC-System gar nicht angezeigt werden, zu unterschiedlichen Peakflächen bei gleichen eingesetzten Mengen führen. Im nachfolgenden werden die Kalibrationen der Messungen gezeigt, die problematische Ergebnisse brachten.

Zunächst LW10, sowohl beim Einsatz von 2 µl der aufgenommenen Probe, als bei 5µl war es nicht möglich LW10 im Spektrum zu finden, obwohl im MS/MS-mode mit SIM gearbeitet wurde. Die Kalibrationskurve für diese Untersuchung hingegen zeigt eine einwandfreie Messung bei unter 10 pmol eingesetzter Substanzmenge (Abbildung 112).

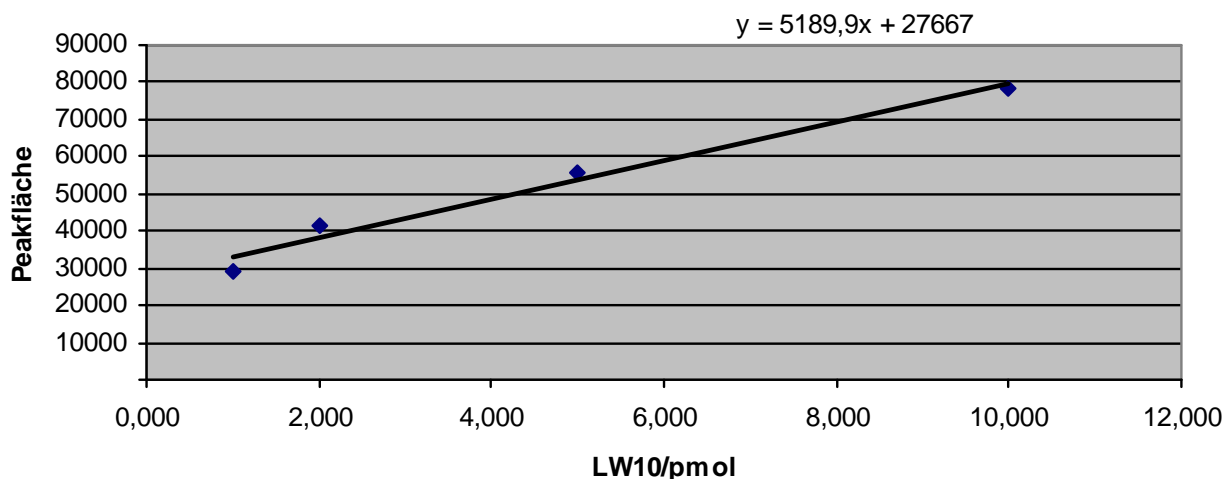


Abbildung 112: Kalibrierkurve LW10 für 20 pmol

Tabelle 20: Eingesetzt: 20 pmol, gefunden: Cdc25a und Wasser unter Messgrenze (1 pmol)

	Peakfläche	Errechnete pmol
<b>Cdc25a, Binder</b>	415	-5,251
<b>Cdc25a, Nichtbinder</b>	398	-5,254
<b>H2O; Binder</b>	189	-5,294
<b>H2O, Nichtbinder</b>	229	-5,287
<b>Blank 1</b>	310	-5,271

Bei AF1A10 war es kein Problem, die Substanz im Massenspektrometer zu detektieren. Allerdings konnte nicht die vollständige Menge an Substanz bei Einsatz von 5 µl wieder gefunden werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben, die bereits bei den ersten Messungen erläutert wurden. Nach den Ergebnissen dieser Messungen würde AF1A10 als Nichtbinder eingestuft werden, da sich in der Nichtbinderfraktion die meiste Substanz wieder findet. Auch die Wasserkontrolle zeigt erwartungsgemäß die Substanz in der Nichtbinderfraktion.

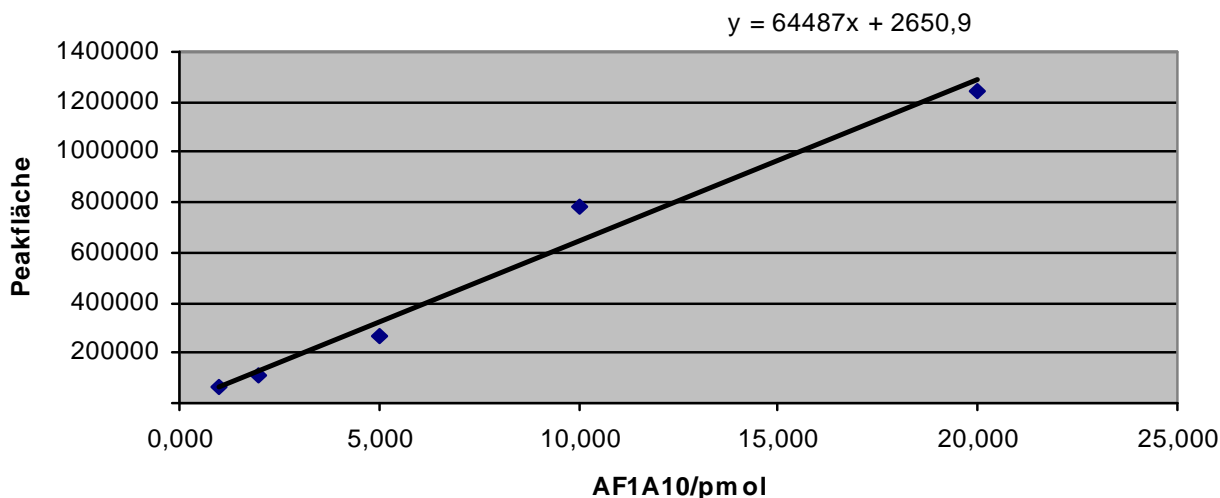
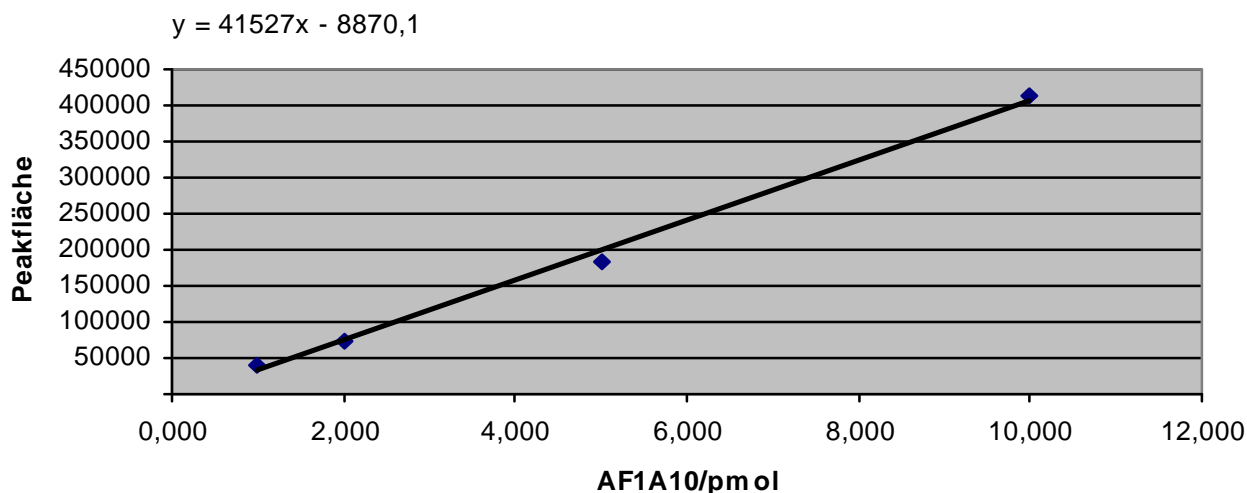


Abbildung 113: Kalibrierkurve AF1A10 für 50 pmol

**Tabelle 21:** Eingesetzt: 50 pmol; gefunden: Cdc25a: unter 1 pmol; Wasser: unter 5 pmol

	Peakfläche	Errechnete pmol
<b>Cdc25a, Binder</b>	3522	0,013513
<b>Cdc25a, Nichtbinder</b>	64633	0,961152
<b>H2O; Binder</b>	32912	0,469259
<b>H2O, Nichtbinder</b>	243996	3,742533
<b>Blank 1</b>	14015	0,176222

Das Problem offenbart die Messung mit 2 µl der AF1A10-Probe. Gemäß der Kalibrierung finden sich 4 pmol in der Binderfraktion der Wasserkontrolle. Die einzige Erklärung, warum dies nicht bei Einsetzen von 5 µl der Probe gefunden wurde, wäre, dass beim Auflösen der Probe in 50% Methanol nicht sofort die gesamte vorhandene Substanz gelöst wurde. Bei der zeitlich um einen Tag versetzten Messung könnte sich die Probe dann komplett gelöst haben. Trotzdem bliebe der Fund von Substanz in der Nichtbinderfraktion der Wasserkontrolle erklärungsbedürftig. Allerdings ist AF1A10 nicht die einzige Verbindung, bei der dieses Ergebnis gefunden wurde (siehe dazu auch die Messungen aus dem ersten Gelfiltrationsversuch).

**Abbildung 114:** Kalibrierkurve AF1A10 für 20 pmol**Tabelle 22:** Eingesetzt: 20 pmol, gefunden: Cdc25a: 0,7 pmol; Wasser: 4,3 pmol

	Peakfläche	Errechnete pmol
<b>Cdc25a, Binder</b>	123	0,21657
<b>Cdc25a, Nichtbinder</b>	12945	0,525326
<b>H2O; Binder</b>	161612	4,105326
<b>H2O, Nichtbinder</b>	1927	0,260005
<b>Blank 1</b>	11315	0,486068

Die Messungen mit AF1B10 zeigten die gleichen Schwierigkeiten wie die Messungen mit LW 10. Die Kalibrationsmessungen zeigten keinerlei Probleme bei der Detektion von AF1B10 in einem Mengenbereich von 0,5 bis 20 pmol.

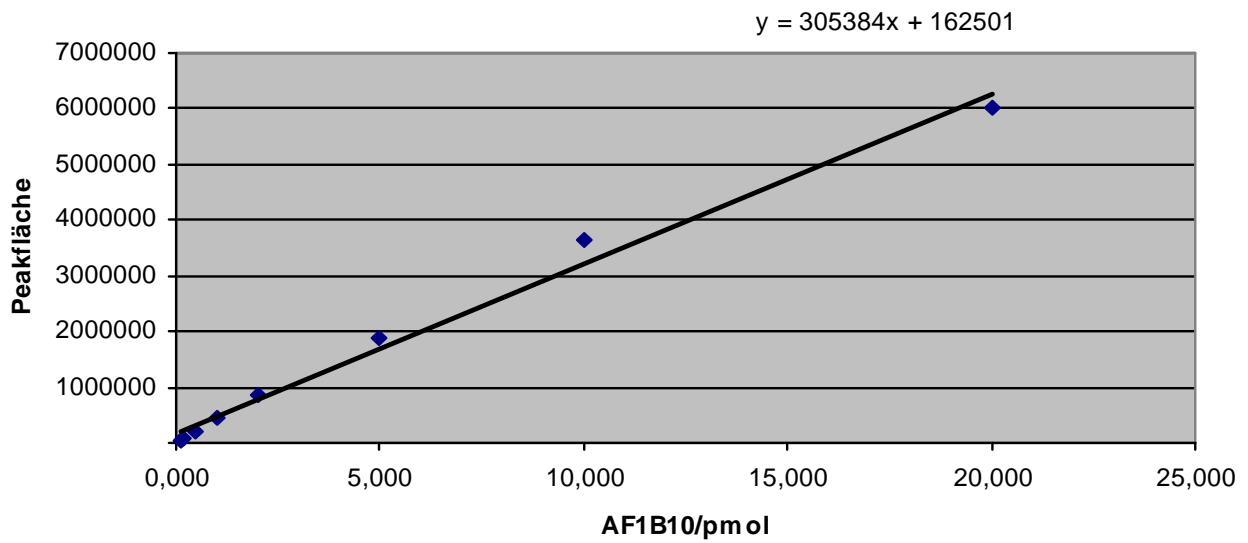


Abbildung 115: Kalibrierkurve AF1B10 für 50 pmol

Tabelle 23: Eingesetzt: 50 pmol, gefunden: Cdc25a: unter Messgrenze (1pmol); Wasser: 1,9 pmol

	Peakfläche	Errechnete pmol
<b>Cdc25a, Binder</b>	1743	-5,2642
<b>Cdc25a, Nichtbinder</b>	11091	-4,95808
<b>H2O; Binder</b>	55335	-3,50928
<b>H2O, Nichtbinder</b>	220928	1,913256
<b>Blank 1</b>	864	-5,29297

Für die Kalibration des kleineren eingesetzten Probenvolumens wurde ein kleinerer Mengenbereich verwendet. Drei Messpunkte von 1 bis 5 pmol sind nach den ausführlichen Kalibrationsmessungen in der ersten Messreihe ausreichend. Dort wurde bereits gezeigt, dass die Verbindung in einem genügend großen Mengenbereich sicher zu messen ist. Die erneute Kalibrationsmessung dient wie bereits erläutert der erhöhten Genauigkeit der Quantifizierung.

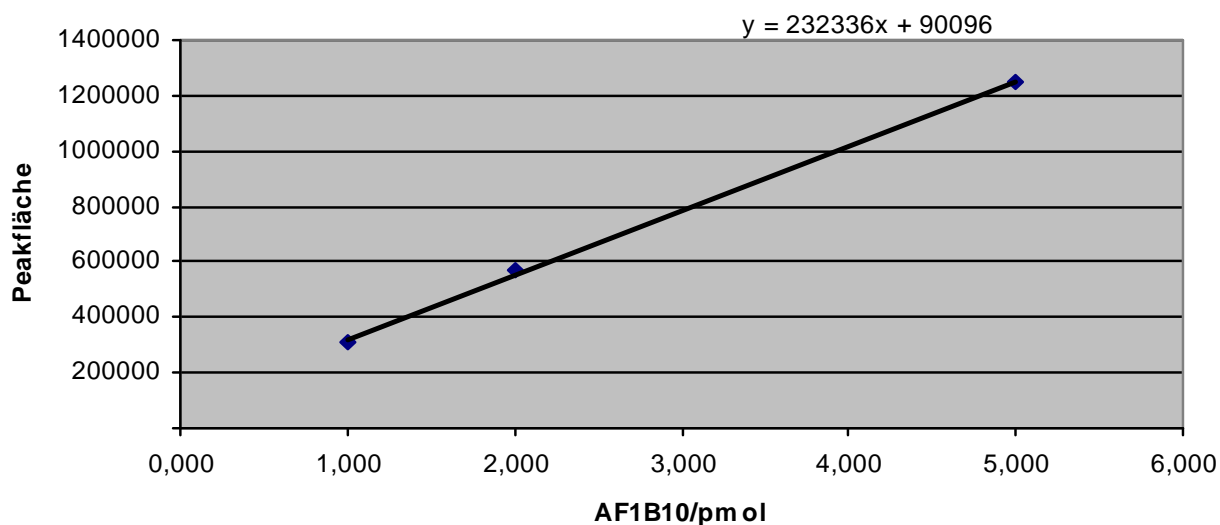


Abbildung 116: Kalibrierkurve AF1B10 für 20 pmol

Tabelle 24: Eingesetzt: 20 pmol, gefunden; unter Messgrenze (1 pmol)

	Peakfläche	Errechnete pmol
<b>Cdc25a, Binder</b>	1481	-0,38141
<b>Cdc25a, Nichtbinder</b>	11605	-0,33783
<b>H2O; Binder</b>	29165	-0,26226
<b>H2O, Nichtbinder</b>	320	-0,38641
<b>Blank 1</b>	164	-0,38708
<b>Blank 2</b>	1054	-0,38325

Die Verbindungen BN13129 und AF1E6 wurden als Nichtbinder eingestuft.

Die Kalibrationskurven für BN13129 und AF1E6 zeigen bei wieder einem leicht logarithmischen Verlauf. Dieses Phänomen wurde bereits bei der Kalibrationskurve zu dem ersten Gel-filtrationsassay und zu Messungen mit der Streptavidin-POROS-Säule beobachtet und erläutert.

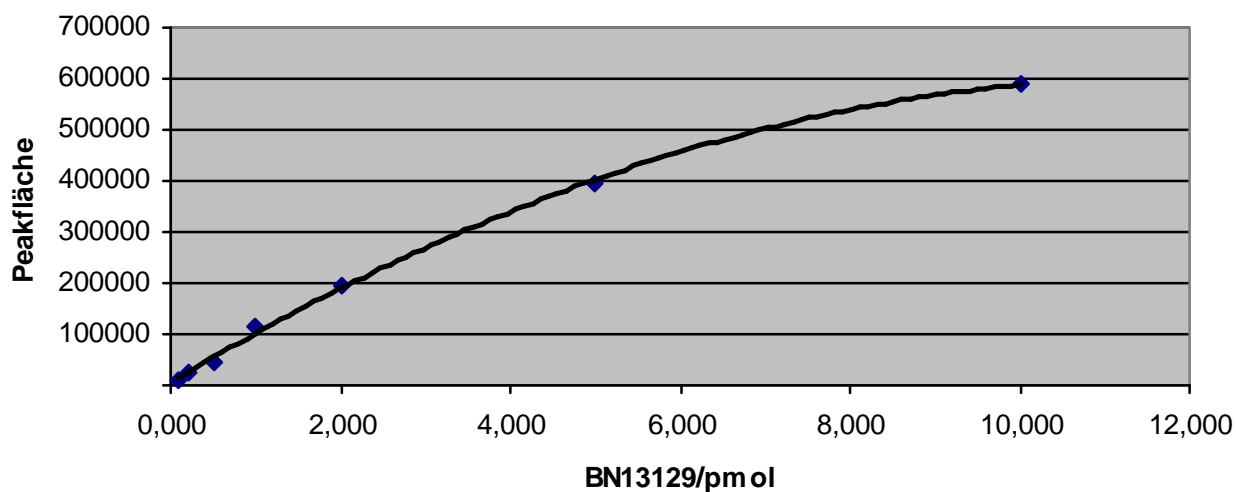
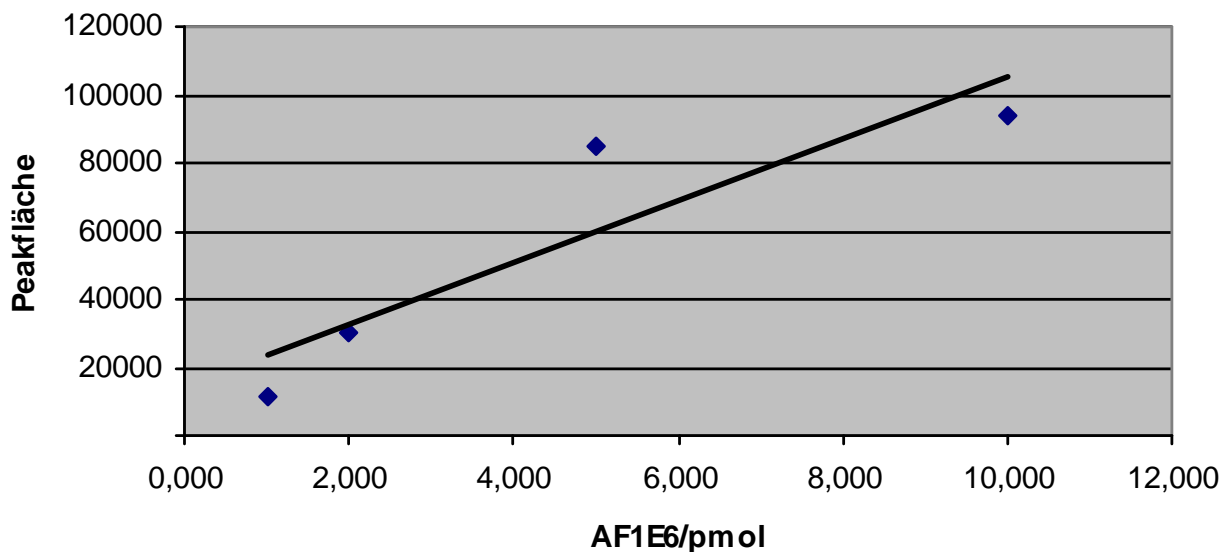


Abbildung 117: Kalibrierkurve BN13129 für 20 pmol

**Tabelle 25:** Eingesetzt: 20 pmol, gefunden: Cdc25a: 2 pmol; Wasser: 1,3 pmol

	<b>Peakfläche</b>	<b>Errechnete pmol</b>
<b>Cdc25a, Binder</b>	62906	0,598
<b>Cdc25a, Nichtbinder</b>	146898	1,508
<b>H2O; Binder</b>	13669	0,097
<b>H2O, Nichtbinder</b>	119619	1,204
<b>Blank 1</b>	13044	0,090

Auch bei AF1E6 taucht das Problem auf, dass sich 8 pmol von 20 pmol Substanz in der Binderfraktion der Wasserkontrolle wieder finden. Von den ursprünglich eingesetzte 20 pmol, konnten 16,6 pmol in der Cdc25a-Fraktion und 8,9 pmol in der Wasserkontrolle gefunden werden. Allerdings befand sich die Substanz bei der Wasserkontrolle komplett in der Binderfraktion, in der Nichtbinderfraktion hingegen war keine Substanz detektierbar. Dieses ist die einzige Probe, bei der die gefundene Substanzmenge mit der eingesetzten übereinstimmt, wenn man bedenkt, dass die Quantifizierung nicht perfekt ist, und Substanz beim zweiten Schritt verloren gehen kann, oder nicht alles an Substanz durch die Denaturierung des Proteins freigesetzt wird.

**Abbildung 118:** Kalibrierkurve AF1E6 für 20 pmol**Tabelle 26:** Eingesetzt: 20 pmol, gefunden: Cdc25a: 2 pmol; Wasser: 1,3 pmol

	<b>Peakfläche</b>	<b>Errechnete pmol</b>
<b>Cdc25a, Binder</b>	16178	0,20406
<b>Cdc25a, Nichtbinder</b>	165597	16,65419
<b>H2O; Binder</b>	95291	8,913943
<b>H2O, Nichtbinder</b>	9341	-0,54875
<b>Blank 1</b>	8092	-0,68622



In den Tabelle 27 und Tabelle 28 sind die Gemische, bei denen tatsächlich beide Substanzen detektiert werden konnten, paarweise dargestellt. Bei den Messungen konnten nicht alle Substanzen in den Binder- bzw. Nichtbinderfraktionen gefunden werden. LW 10 ist ebenso wie BN 4001 als Beispiel dafür aufgeführt, dass sie in einem Gemisch nicht massenspektrometrisch nach dem Gelfiltrationsassay bestimmbar waren, obwohl ihre Kalibrierkurven einwandfrei zu erstellen waren. AF1E6 konnte in der Nichtbinderfraktion gefunden werden, allerdings nur in der Probe mit dem Protein, in der Wasserkontrolle war AF1E6 nicht zu finden. Allerdings ließ sich AF1E6 bei der Messung des Volumens, das 50 pmol Gesamtmenge Substanz darstellen sollte, nicht mehr massenspektroskopisch in den Proben nachweisen. Bei den restlichen Substanzen konnte höchstens ein Anteil von etwa 20% der eingesetzten Menge wieder gefunden werden. Daher lassen sich keine Aussagen hinsichtlich der Bindung der Substanzen an Cdc25a treffen.

**Tabelle 27:** Eingesetzt: 20 pmol Gesamtmenge in Binder- und Nichtbinderfraktion

<b>Substanz</b>	<b>Nichtbinder</b>		<b>Binder</b>		
	<i>in pmol</i>	Cdc25a	Wasser	Cdc25a	Wasser
<b>LW10</b>		-0,1	-0,1	-0,1	-0,1
<b>AF1E6</b>		7,9	0,3	0,2	0,4
<b>AF1A10</b>		1	3,7	0,01	0,5
<b>AF1B10</b>		0,2	0,2	0,2	0,3
<b>BN4001</b>		-0,1	-0,01	-0,1	-0,02
<b>AF1D10</b>		1,5	3,9	2,5	1,2
<b>BN13129</b>		1,5	1,2	0,6	0,1

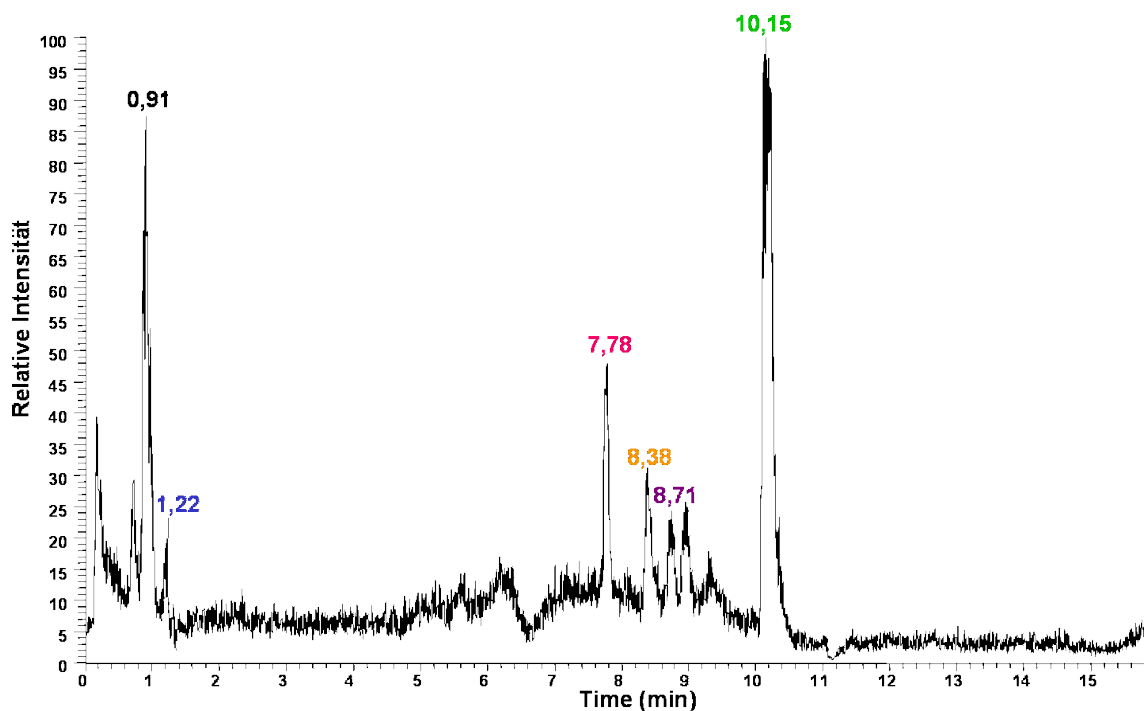
**Tabelle 28:** Eingesetzt: 50 pmol Substanzmenge in Binder- und Nichtbinderfraktion

<b>Substanz</b>	<b>Nichtbinder</b>		<b>Binder</b>		
	<i>in pmol</i>	Cdc25a	Wasser	Cdc25a	Wasser
<b>LW10</b>		-5,3	-5,3	-5,3	-5,3
<b>AF1A10</b>		0,5	0,3	0,2	4,1

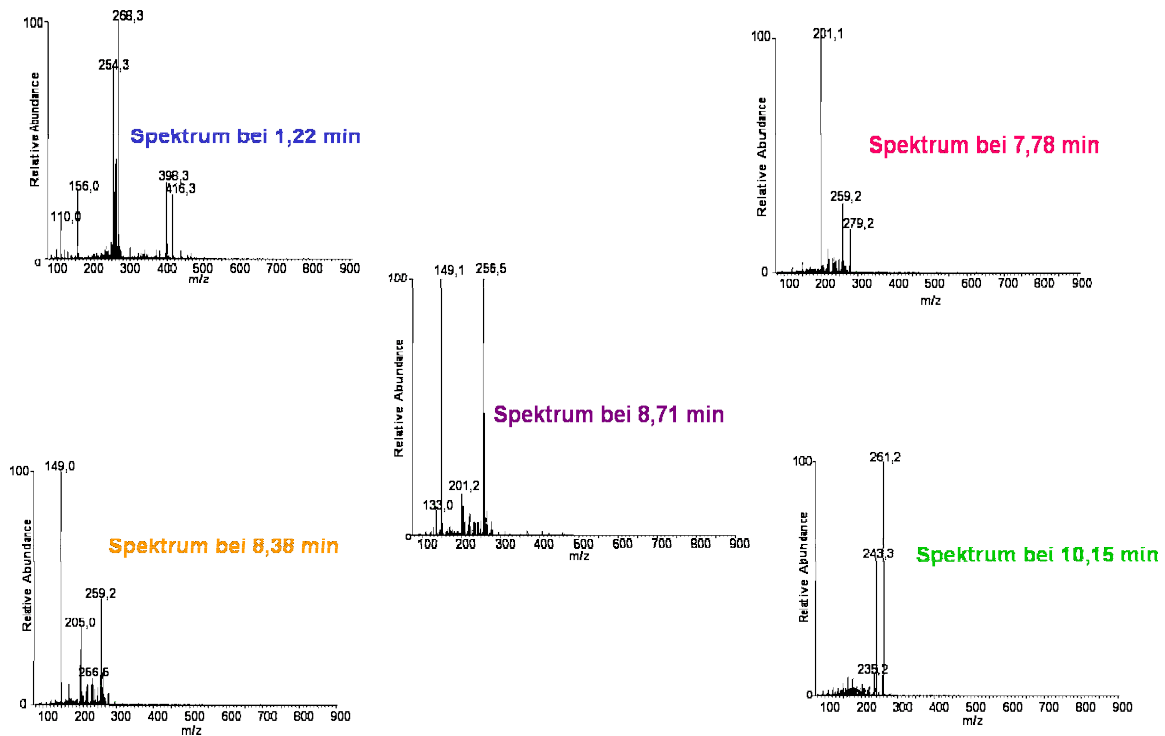
Als weitere Kontrolle wurde das von der Gruppe Sauer als Testsystem verwendete Glitazon und PPAR $\gamma$  gemessen. Eigentlich sollte Glitazon in der Nichtbinder-Fraktion der Wasserkontrolle und in der Binderfraktion des Experiments mit PPAR $\gamma$  zu finden sein. Für diesen Gelfiltrationsassay wurden 49  $\mu$ g PPAR $\gamma$  in 20 mM Tris/HCl mit 200 mM NaCl und 0,5 nmol Binder-/Nichtbinder in einem Volumen von 50  $\mu$ l eingesetzt. Der Binder der PPAR $\gamma$  ist Glitazon, 2-Chloro-5-Nitro-N-phenylbenzamid ( $m = 276,7$  Da), als Nichtbinder wurde  $\alpha$ -Cyano-hydroxyzimtsäuremethylester ( $m = 203,3$  Da), eine MALDI-Matrix, verwendet.

Hier werden die Wasserkontrollen der Experimente gezeigt, Glitazon sollte in der Nichtbinderfraktion zu finden sein, aber nicht in der Binderfraktion.

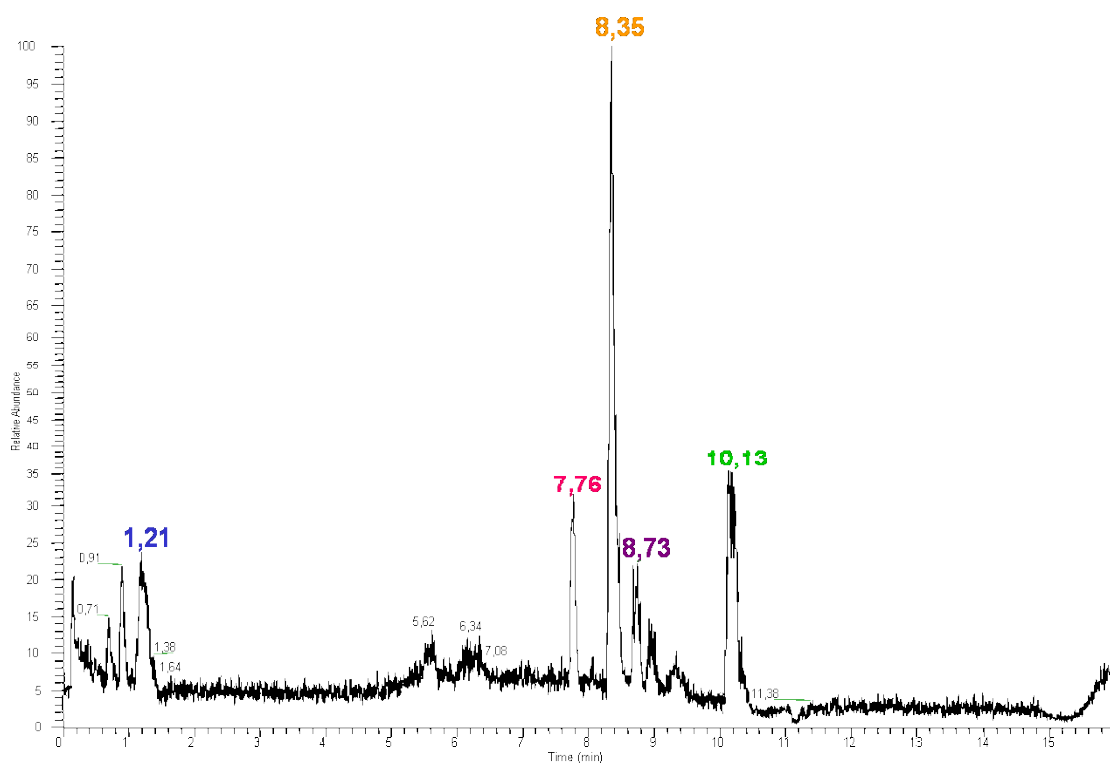
Zunächst wurde die Messung wie in den Experimenten vorher als MS/MS Messungen durchgeführt, um eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen. Beim MS/MS auf die theoretische Masse von Glitazon mit Wasserstoffproton, 277,7 Da (kein SIM), wurden im Chromatogramm sechs Peaks gefunden, die jeweils ein unterschiedliches MS/MS-Spektrum ergaben. Keines dieser Fragmentierungsmuster ließ sich der Struktur des Glitazons zuordnen. Das Bild war in der Binder- und Nichtbinderfraktion der Wasserkontrolle das Gleiche. Das legt den Schluss nahe, dass  $m/z$  277,7 ein Signal aus dem Untergrund des automatischen Probenaufgebers oder der Säule ist.



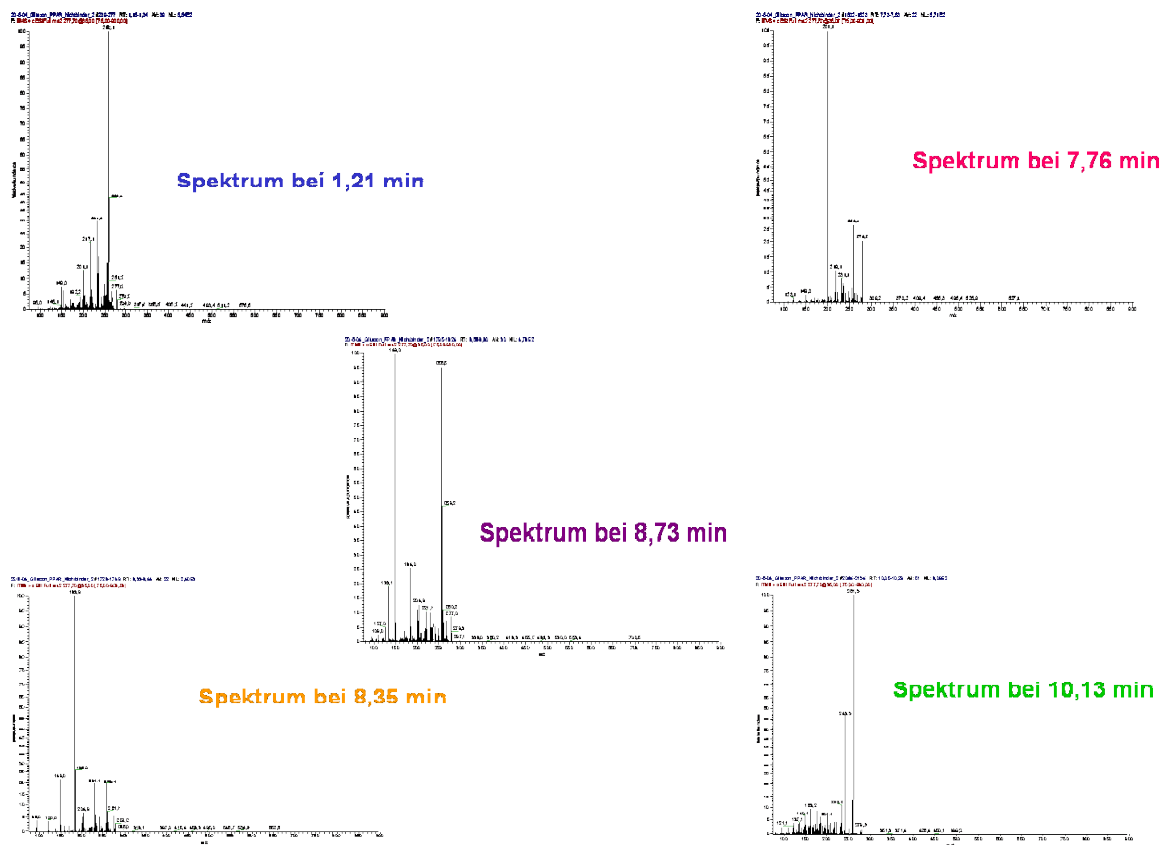
**Abbildung 119:** Chromatogramm Wasserkontrolle Glitazon Binderfraktion; 10  $\mu$ l von auf 10  $\mu$ M berechneter Elution (in 50 % Methanol aufgenommen); Gradient von 10 bis 90 % Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure, MS/MS auf 277,7  $m/z$ , kein SIM



**Abbildung 120:** Spektren Wasserkontrolle Glitazon Binderfraktion (Bedingungen siehe Abbildung Chromatogramm) MS/MS auf 277,7 m/z



**Abbildung 121:** Chromatogramm Wasserkontrolle Glitazon Nichtbinderfraktion; 10  $\mu$ l von auf 10  $\mu$ M berechneter Elution (in 50 % Methanol aufgenommen); Gradient von 10 bis 90 % Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure MS/MS auf 277,7 m/z, kein SIM



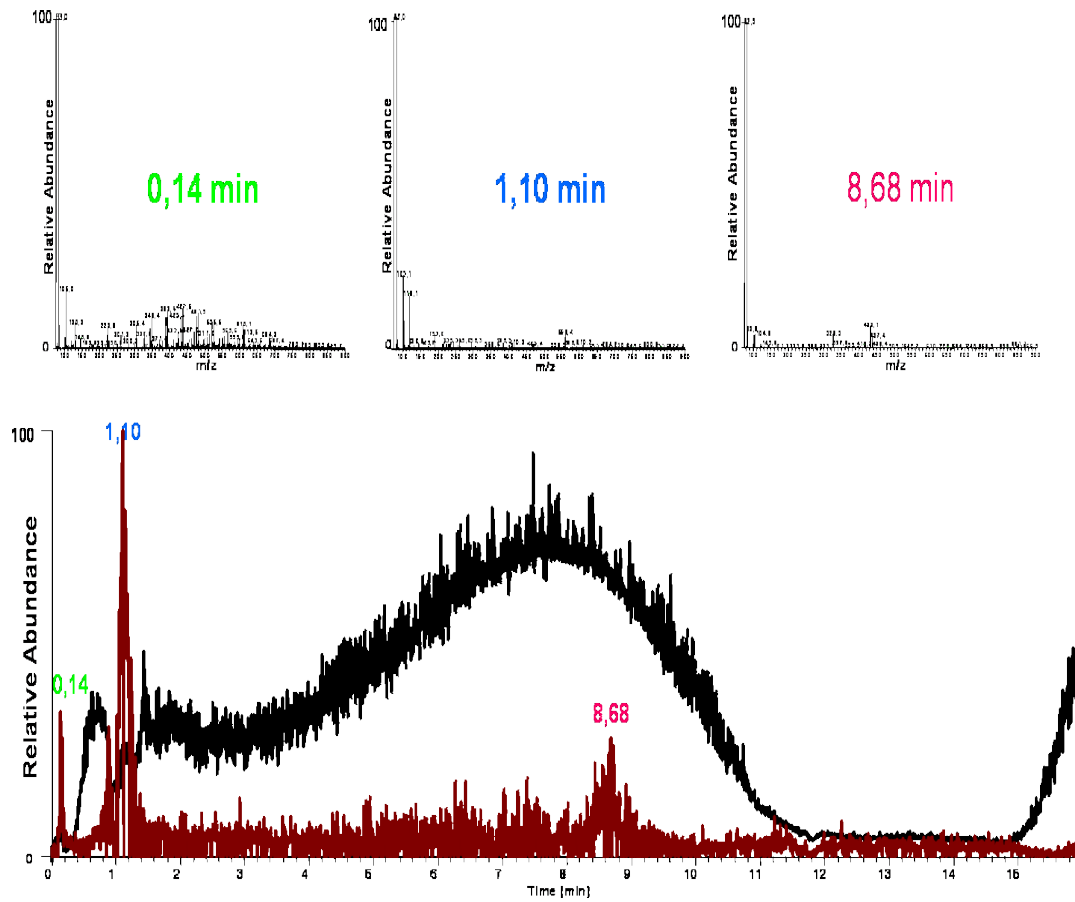


Abbildung 123: 22-6-04\_Wasser\_Glitazon\_Binder, schwarz: Base Peak, rot: Mass range bei 277,7 m/z

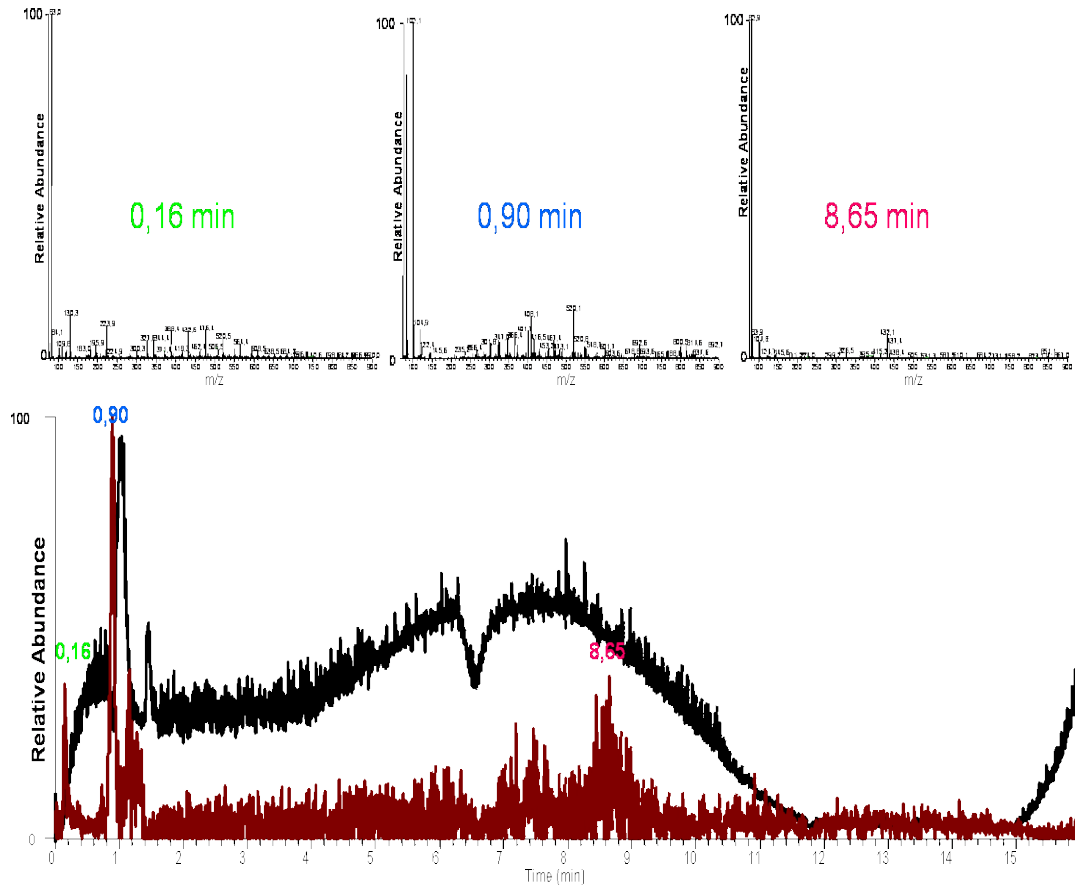


Abbildung 124: 22-6-04\_Wasser\_Glitazon\_Nichtbinder; Schwarz: Base Peak, rot: Mass range 277,7

### 4.5.2 Speed Screen

Mitarbeiter der Firma Novartis, Basel, haben ein Testsystem aufgebaut, das dem der Arbeitsgruppe Sauer ähnelt. An dieser Stelle einen herzlichen Dank an Herrn Zehender, der es ermöglichte, eine Auswahl von Substanz im Speed Screen mit Cdc25a zu testen. Nähere Angaben zur Durchführung von SpeedScreen sind in der Veröffentlichung von Muckenschnabel et al. [53] zu finden. Die untenstehende Tabelle 29 zeigt die von Herrn Zehender übermittelten Ergebnisse des SpeedScreens mit Cdc25a und den Substanzen von M. Manger und A. Fürstner. Leider gab es eine Beschränkung für die Anzahl der Substanzen, da die Zeit für die Messungen bei Novartis sehr begrenzt ist. Daher wurde versucht, eine große Bandbreite von Verbindungen einzusetzen, gekennzeichnet durch unterschiedliche C Log Ps, IC<sub>50</sub>-Werte und den Befunden aus dem Sauer-Assay und den FAC-Messungen.

Alle Substanzen im Speed Screen wurde jeweils dreimal vermessen. Es fand keine Quantifizierung statt, sondern die Frage der Bindung wurde nur mit ja/nein beantwortet. Dabei wurden die Substanzen P338 und P367 als Nichtbinder gefunden, die Substanz AF1B10 ist ein validierter Binder, der bei allen drei Messungen in der Proteinfraction vom Gelfiltrationsmaterial eluierte. Die Verbindung AF1C10 ist als möglicher Binder eingestuft, da sie in zwei von drei Analysen in der Proteinfraction gefunden wurde. Die Substanzen P433, AF1C11 und AF1A10 eluierten auch ohne Zusatz von Protein in der 1. Fraktion (also der Binderfraktion) von der Säule. Bei den restlichen Substanzen war eine Bewertung, ob sie Binder sind oder nicht schwierig, da die Massen dieser Substanzen nur im negative ion mode detektiert werden konnten. Diese Signale wurden zwar in der Binderfraktion gefunden, dennoch ließ sich hier keine konkrete Aussage treffen, da diese Substanzen in den Messungen in dieser Arbeit immer problemlos im positive ion mode zu messen waren.

**Tabelle 29:** Speed Screen Ergebnisse

Verbindung	Masse (Da)	C Log P	IC <sub>50</sub>	Masse (Da) im Negative mode	Abweichung
<b>P338</b>	605,80	7,1	1,8		
<b>P367</b>	667,80	8,4	1,9		
<b>P433</b>	663,80	7,4	14		
<b>P436</b>	645,80	8,6	>100		
<b>AF1B11</b>	452,22	0,23		461,40	10,18
<b>AF1C11</b>	406,30	7,3	45,6		
<b>AF1G11</b>	367,11	3,1			
<b>P327</b>	721,96	7,3	3,7		
<b>AF1H10</b>	327,22	6,7		373,20	46,98
<b>AF1E6</b>	288,29	1,8			
<b>AF1E10</b>	380,07	8,16	40,3		
<b>AF1D10</b>	294,63	4,05	34,6		

Verbindung	Masse (Da)	C Log P	IC <sub>50</sub>	Masse (Da) im Negative mode	Abweichung
AF1C10	388,25	8,16	82,3		
AF1B10	452,22	7,5	21,5		
AF1A10	452,22	7,31	27,6		
AF1A11	398,18	4,17	27,6	363,30	-33,88

Bedeutung der Farbunterlegung: keine Bindung; nur im Negative Mode gefunden; Verbindung geht durch SEC ohne Protein; Verbindung zweimal gefunden; validierter Binder

Auffallend ist, dass die beiden Substanzen (AF1C10 und AF1B10), die laut Speed Screen als Binder in Frage kommen, zwar hohe C Log Ps besitzen, aber auch relativ hohe IC<sub>50</sub>-Werte. P338 und P367 banden im FAC an die Säule, auch wenn sie stark „schmierten“.





# 5 Diskussion

## 5.1 MALDI-TOF BINDUNGSASSAY

### 5.1.1 Immobilisierung auf Goldträgern und Blattgold

Mit dem Streptavidin/Biotin-System konnten die aus der Literatur bekannten Ergebnisse wiederholt werden. Streptavidin/Biotin ist ein hoch affines System. Zudem besitzt Streptavidin vier Bindungsstellen für Biotin. Zum einen verbessert das die Chance einer Bindung an das Protein (sollte eine der Bindungsstellen sterisch gehindert sein, stehen drei weitere offen), zum anderen vervierfacht sich das Signal gegenüber einem Protein/Liganden-System, bei dem ein Ligandenmolekül ein Proteinmolekül bindet (wie dies bei der Bindung von Nukleotiden an Ras der Fall ist). Dennoch liegen schon in diesem optimalen Testsystem die Signalintensitäten der Ligandenmassen im Bereich der Signalintensitäten der Massen der Matrix. Bei dem Ras-System hat sich das Signal-Rausch-Verhältnis so weit verschlechtert, dass die Ergebnisse aus diesem Test immer eingehend einzeln betrachtet werden müssen und somit für ein schnelles Screening unbrauchbar sind. Das Hauptproblem aber liegt in der unspezifischen Absorption des Liganden an die Oberfläche. Spielt diese bei relativ starken Signalen, wie dem des Biotin-Signals, keine wesentliche Rolle (einfache Kontrollen ermöglichen es, das Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung zu ermitteln), so wird die unspezifische Bindung von Liganden bei schwachen Signalen ein Problem.

Die Messungen der Farnesyltransferase sind ein Beispiel für hohe unspezifische Bindung. Bei den eingesetzten Inhibitoren waren die Biotin-Signale bei Messungen von proteinfreien Oberflächen und Oberflächen mit kovalent gebundenen BSA nach dem Bindungsassay in etwa genauso groß wie die Biotin-Signale einer Farnesyltransferase-Oberfläche. Einzig bei MT 343 ließe sich das Signal, das durch die unspezifische Bindung entsteht, von dem Gesamtsignal abziehen, um das Signal für die spezifische Bindung zu erhalten. Allerdings war hier die Abweichung um den Mittelwert so groß, dass die Messungen als sehr unzuverlässig zu betrachten sind. Die Verbindungen dieser Bibliothek sind schlecht wasserlöslich. Ein Vergleich dieser Messergebnisse mit den  $IC_{50}$ -Werten, die aus einem Fluoreszenz-Aktivitätstest stammen [71], zeigt keinen Zusammenhang zwischen diesem  $IC_{50}$ -Wert und den Ergebnissen im Bindungsassay. Gerade die Substanz MT343, die das höchste Signal im Bindungsassay hatte, wurde nicht als Inhibitor im Fluoreszenztest identifiziert. Das Signal muss daher von unspezifischer Bindung an der Farnesyltransferase oder der Goldoberfläche stammen.

**Tabelle 30:** IC<sub>50</sub>-Werte der Farnesyltransferase-Inhibitoren

Substanz	IC <sub>50</sub> bei Farnesyltransferase
MT343	Kein Inhibitor
MT356	>50
MT355	36
MT650	13
MT652	10
MT656	6
MT670	>50
MT407	>50

Zudem ist die Kopplung über Dithio-bis-[succinimidylpropionsäure] nicht optimal. Der kurze Abstand zwischen Protein und Goldoberfläche, der durch das Kopplungsreagenz vorgegeben wird, limitiert die Anzahl an immobilisierten Proteinmolekülen[31]. Dadurch ist auch die Anzahl der spezifisch an das Enzym gebundenen Moleküle begrenzt, wovon die Stärke des Signals in der MALDI-Messung abhängt. Ab einer gewissen Untergrenze ist keine Messung mehr möglich, selbst wenn der Assay funktioniert.

Dazu ein paar Gedanken zur Messempfindlichkeit und Mengen gebundenen Proteins auf der Oberfläche: Da es sich bei der Proteinschicht auf der Oberfläche um einen Monolayer handelt, befindet sich weit weniger Probe auf der gleichen Fläche, als bei einer konventionellen Probe, bei der Analyt mit der Matrixlösung gemischt und aufgetragen wird. Die Fläche, auf die der Laser trifft, ist etwa  $5 * 10^{-4} \text{ cm}^2$  groß, was bei einem Molekül der Größe von Insulin  $4 * 10^{-7} \text{ mol/m}^2$  entspricht. Das bedeutet, dass sich in einer analysierten Monolayer-Probe 215000 Moleküle/ $\mu\text{m}^2$ , also  $0,4 \text{ amol}/\mu\text{m}^2$  befinden. Bei einer konventionell bereiteten Probe liegt die Anzahl der Moleküle auf dieser Fläche 10-100-mal höher (Angaben aus einem Vortrag von Bernhard Spengler, Gießen, vom 26.4.04 am MPI Dortmund).

Da die Goldträger von Applied Biosystems kostenintensiv und nicht wieder verwendbar sind, wurde der Umstieg auf andere Oberflächen getestet.

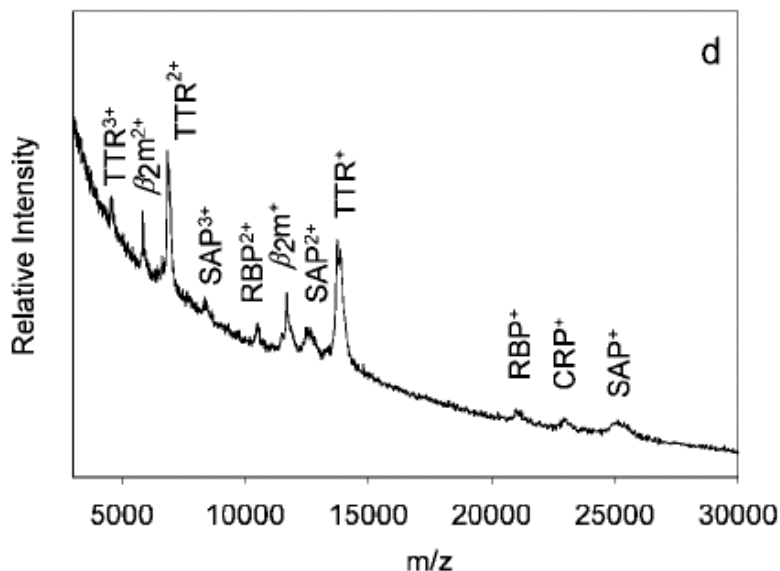
MRFA zeigt den Anteil an unspezifischer Bindung an der Oberfläche. Das MRFA selbst nicht an Cdc25a bindet haben die Ergebnisse der MS-FAC gezeigt, da MRFA lediglich mit der Verzögerung des Totvolumens von der Cdc25a-Säule eluiert.

Das beste Signal von Cdc25a war bei 0,5 mg/l anstatt bei größeren Konzentrationen festzustellen. Die Proteinmoleküle könnten sich gegenseitig auf der Oberfläche blockieren, wenn sie sich nach der Immobilisierung zu nahe kommen. Durch eine geringere Konzentration bei der Immobilisierung werden die Proteine im weiteren Abstand angebunden. Noch geringere Konzentrationen führen allerdings wieder zu niedrigerem Signal.

Der His-Tag am N-terminalen Ende sollte sich nicht störend auf die Immobilisierung des Cdc25a auswirken. Im Gegenteil, der Tag könnte sogar als eine Art Spacer wirken, damit eine aminhaltige Seitenkette einer Aminosäure der Oberfläche nicht zu nahe kommt. Dadurch wird vermieden, dass diese Seitenketten kovalent an die Oberfläche gebunden werden. Dies könnte zu einer Ver-

deckung der spezifischen Bindungsstelle des Proteins führen, was letztlich das Signal spezifischer Binder im Assay verringern würde.

Die als erfolgreich beschriebenen Versuche, Ligandenbindung an DTSP-immobilisiertem Protein im MALDI-TOF nachzuweisen, setzten in einem Fall immobilisierte Biotin-Antikörper ein und detektieren das gebundene Protein (hier Insulin) [22]. In einer anderen Arbeit wird das Lektin Concanavalin A an die Goldoberfläche gebunden und als Liganden Oligomannose 9 und Zuckerverbindungen aus *E. Coli* eingesetzt. [21] In beiden Fällen sind die Liganden gut wasserlöslich, was unspezifische Bindung an die Oberfläche herabsetzt. Ein Antikörper besitzt zwei Bindungsstellen für das Antigen, was die Chance auf Bindung eines Liganden erhöht. Auch Concanavalin A besitzt vier Bindungsstellen für Kohlenhydratverbindungen. Das hat zur Folge, dass die Signalintensität trotz der Größe von 102 kDa verbessert wird, da die Wahrscheinlichkeit, dass eine von vier Bindungsstellen nach einem Zusammenfallen des Enzyms auf der Oberfläche für den Liganden noch zu erreichen ist, sehr groß ist. Insgesamt sind es jedoch nur eine Handvoll Arbeiten, die überhaupt den Einsatz von MALDI in einem Bindungsassay beschreiben. Eine der neueren erfolgreichen Arbeiten mit einem Chip-basierten System für die Protein-Liganden-Bestimmung im MALDI-TOF wird von Nedelkov und Nelson beschrieben [103]. Dabei handelt es sich um einen BIACORE-Chip, der nach der Oberflächenplasmonresonanzmessung im MALDI-TOF ausgewertet wird. Bei den Bindern handelt es sich jedoch um die Proteine, während die Antikörper auf dem Chip immobilisiert sind. Betrachtet man die Spektren in dieser Arbeit, so liegt das Signal-Rausch-Verhältnis bei etwa 1:3. Gerade bei den Massen über 20 kDa ist es eher ein Erraten des Vorhandenseins eines bestimmten Analyten.



**Abbildung 125:** MALDI-TOF-Spektrum nach Nedelkov et al. [103]

Entscheidend ist jedoch, um welche Art von System es sich hier handelt, nämlich um einen Antikörper-Antigen-Bindungstest. In den Hochdurchsatzbindungstests mit den Substanzbibliotheken soll jedoch die Bindung eines kleinen Moleküls an ein Protein nachgewiesen werden und nicht die Bindung eines Proteins an einen Antikörper. Selbst die allerneueste Veröffentlichung

dieser Autoren [143] befasst sich wieder mit diesem System und stellt keine Möglichkeit dar, die für das Screening kombinatorisch erzeugter Bibliotheken einsetzbar wäre.

Die Immobilisierung von Protein an Goldoberflächen über MPA-SAM wurde bisher nur für die Fertigung von amperometrischen Enzymelektroden beschrieben [25,26,27]. Dabei wird eine elektrochemische Reduktion verfolgt, die durch das Auftreten eines Stroms gemessen werden kann. Diese Reduktion wird durch die Umsetzung des Substrats an einem Enzym hervorgerufen, daher spielt bei einer solchen Elektrode eine unspezifische Bindung, bei der kein spezifisches Produkt entsteht, eine untergeordnete Rolle. Bei der Durchführung des Bindungsassays mit Streptavidin-Biotin war das Problem der unspezifischen Bindung eher gering, Biotin wurde nur geringfügig an der unbehandelten Oberfläche gebunden. Das gemessene Signal war etwa 7mal kleiner als das Signal bei einem Assay auf 100µg/ml immobilisiertem Streptavidin. Die Durchführung des Bindungsassays mit MPA-SAM immobilisierter Cdc25a erbrachte zwar ein besseres Signal von wenigstens zwei Bindern (Abbildung 55) als die Immobilisierung von Cdc25a mit DTSP, aber sie wirkte nicht dem Problem der unspezifischen Bindung der P-Substanzen auf der Oberfläche entgegen. Die Höhe des Signals der P-Substanzen war abhängig von der aufgetragenen Menge bei unveränderter Proteinkonzentration, was nur von unspezifischer Bindung an der Oberfläche oder am Protein herrühren kann (Abbildung 56). Die Kontrolle mit einer Blattgold-Oberfläche, auf die BSA über MPA-SAM kovalent gebunden war, brachte hier endgültige Gewissheit. Es konnte die unspezifische Bindung der Substanz P367 und von MRFA auf der Oberfläche nachgewiesen werden (Abbildung 57). Bei einem großen Protein neigt auch das sonst wasserlösliche und damit unproblematische MRFA zur unspezifischen Bindung, jedoch ist diese viel geringer als bei den P-Substanzen. Allerdings war die unspezifische Bindung bei gleichen Waschprotokollen bei verschiedenen Messungen unterschiedlich, so dass es nicht möglich war, die unspezifische Bindung gegen die spezifische aufzurechnen und so Aussagen über die interessierenden Substanzen treffen zu können. Die unspezifische Bindung kann auch durch das verwendete Kopplungsreagenz begünstigt werden, wie Brockman et al beobachtet haben [104]. Nicht mit Protein abreagiertes DTSP, das an der Goldoberfläche gekoppelt ist, kann mit Wasser zu Carboxylgruppen reagieren. Positiv geladene Gruppen, wie die von primären Aminen, können dann mit den Carboxylgruppen in elektrostatische Wechselwirkungen treten. Das Problem könnte ebenfalls bei der Kopplung über MPA-Einzelschicht auftreten, da das MPA nach der Behandlung mit EDC und NHS auch mit einer Succinimidgruppe funktionalisiert wurde und somit dieselben Reaktionen eingehen kann wie DTSP. Diese Art der elektrostatischen Wechselwirkungen stört besonders in einem Affinitätstest mit Proteinen, deren N-Terminus ein primäres Amin darstellt.

### 5.1.2 Immobilisierung auf Nitrocellulose

Streptavidin-Biotin wird genutzt, um den Nachweis zu führen, dass prinzipiell Protein-gebundener Ligand von Nitrocellulose im MALDI detektiert werden kann. Die Immobilisierung von Protein erfolgt dabei über hydrophobe Wechselwirkungen [14]. Das beste Biotin-Signal (nach Normierung auf den Matrixpeak 273,3 Da) wurde bei einer Immobilisierung von 0,1

mg/ml Streptavidin erhalten. Höhere Streptavidin-Konzentrationen bei der Immobilisierung führten zu einer Abnahme des Signals, nicht zu einer Verstärkung. Wahrscheinlich wird durch zuviel gebundenes Protein die Aufnahme oder die Abgabe des Liganden Biotin sterisch gehindert. Ein weiterer Vorteil der geringen immobilisierten Proteinmengen ist die Vermeidung von unspezifischer Bindung. Auch wurde der Einfluss von zwei im Blotting beliebten Techniken zur Verbesserung der Benetzung der Nitrocellulosemembran und damit der Absorption von Protein untersucht. Dabei handelt es sich zum einen um die Beimengung von 20 % Methanol, zum anderen um den Zusatz von 0,1 % NP-40 zum Puffer. Methanol brachte gegenüber NP-40 die größere Signalausbeute beim Bindungsassay. Es wäre möglich, dass auf der Membran verbleibende Reste des NP-40 die Ionisation im MALDI-TOF unterdrücken. Durch Zusatz von 20% Methanol bzw. Detergenz wird die Oberflächenspannung des Wassers herabgesetzt. Dadurch wird die Benetzung der Nitrocellulosemembran mit der Proteinlösung verbessert, was zu einem Anstieg der Menge adsorbierten Proteins führt. Allerdings bleibt das erhaltene Signal nach einem Bindungsassay für die P-Substanzen hinter dem bei den Goldoberflächen erhaltenen Signal zurück (Abbildung 53).

Das nächste Problem war die hohe unspezifische Bindung von MRFA auf Cdc25a-behandelter Nitrocellulose. MRFA zeigte bei dem Durchflussassay mit einer Cdc25a-Affinitätssäule keine unspezifische Bindung. Wahrscheinlich bindet sogar schon das kurze Peptid MRFA wie ein größeres Protein über die hydrophoben Wechselwirkungen an die Nitrocellulosemembran. Dies wird bei hydrophoben Substanzen noch stärker gelten als für ein insgesamt wasserlösliches Protein. Im Western Blott wird ein unspezifisches Signal durch das Blockieren der freien Bindungsstellen der Membran mit BSA oder Magermilch vermieden. Allerdings könnten kleine Moleküle durch die Lücken zwischen den Proteinmolekülen gelangen und auf die Membranoberfläche treffen. Dies würde zu einer hohen unspezifischen Bindung von vielen schlecht wasserlöslichen Substanzen führen. Damit ist diese Oberfläche für einen Hochdurchsatzscreen von Substanzbibliotheken ungeeignet.

### 5.1.3 Immobilisierung auf Laserdruckerfolie

Eine weitere Möglichkeit sind nichtmetallische Materialien. Dazu gehören sowohl goldbedampfte Deckgläschen als auch bedruckte und goldbedampfte Laserdrucker-Folien. Diese Folien sind hitzebeständig und eignen sich somit für den Beschuss durch den Laser im MALDI. Hier bieten sich neben dem Einsatz als kostengünstiger Untergrund für die Immobilisierung von Proteinen noch andere Verwendungsmöglichkeiten. Für empfindliche Proben, die eine absolut saubere Oberfläche verlangen, sind diese Folien quasi als „Einweg“-Probenträger optimal. Der Graphit-aufdruck des Laserdruckers lässt sich zur Mustererzeugung und Leitfähigkeitsherstellung ausnutzen. Ein Bedampfen mit Gold ist nicht unbedingt notwendig. Es ist möglich, ein MALDI-Spektrum einer Substanz aufzunehmen, ohne die Folie zuvor durch Besputterung mit Gold oder Bedrucken mit Graphit leitfähig zu machen. Wahrscheinlich wird durch das Anlegen der Spannung von 20.000 Volt ein derart starkes Feld aufgebaut, dass es über die isolierende Schicht der Folie hinwegreicht und die Ionen beschleunigt werden. Es war möglich, bis zu 5 pmol Biotin in

DHB-Matrix zuverlässig auf der Laserdruckerfolie zu detektieren (Abbildung 66). Dies ist auch der Bereich, bis zu dem Biotin auf dem Metallprobenträger möglich ist.

Auf einen Einsatz von Deckgläschen wurde verzichtet, da diese bereits in der Arbeit von Alfonso et al. beschrieben waren [30] und im Verlauf der Arbeit weiteres „Nacharbeiten“ bekannter Ergebnisse für wenig sinnvoll erachtet wurde. Die Autoren benutzten zur Immobilisierung von biotinylierten Lektin Streptavidin-beschichtete Deckgläschen. Hier wurde der Ansatz aus der früheren Veröffentlichung weiterverfolgt [21]. Aber in den von Alonso und Fenselau gezeigten Spektren ist eine unspezifische Bindung auf der Glasoberfläche zu entdecken, die etwa einem Drittel des Signals aus dem Bindungsassay entspricht.

Die Immobilisierung des Proteins Cy5-Streptavidins auf Folie über Poly-L-Lysin zeigte sich in den Fluoreszenzmessungen als unregelmäßig (Abbildung 68). Am Rand des Auftrages sammelt sich das Protein, während es in der Mitte kaum ein messbares Fluoreszenzsignal gibt. Dies könnte daran liegen, dass die Benetzung der Folie mit der Proteinlösung unzureichend ist und es daher zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Lösung kommt. Erst ab einer Konzentration von 100 µg/ml in der Cy5-Streptavidinlösung war ein ausreichendes Signal festzustellen. Daher wurde in der Folge mit einer Proteinlösung von mindestens 100 µg/ml während der Immobilisierung gearbeitet. Allerdings konnte beim Testen von verschiedenen Streptavidin-Konzentrationen bei der Immobilisierung festgestellt werden, dass beim Bindungsassay mit Biotin mindestens eine Konzentration von 5mg/ml Protein nötig war, um eine Erhöhung des MALDI-Signals zu erhalten. Die Intensität der Signale nach dem Bindungsassay war allerdings stark schwankend, wie die Abweichungen im Balkendiagramm anzeigen (Abbildung 69). Dies lässt sich durch die unregelmäßige Immobilisierung des Proteins erklären, die, verbunden mit schwankenden Signalen, darauf hin deutet, dass sich bei der Bindung des Proteins keine Einzelschicht ausbildet. Eine weitere Schicht Protein könnte sich auf der ersten Schicht Protein anlagern und bei den Waschprozeduren im Bindungsassay mit gebundenen Liganden fortgespült werden, dies könnte die Unregelmäßigkeiten bei der Steigerung der Konzentration erklären. Die unspezifische Bindung des Biotins an die Laserdruckerfolie ist zwar vernachlässigbar, was diese Oberfläche als eine gute Alternative für die Errichtung des Assays wirken ließ. Allerdings waren die Ergebnisse mit Streptavidin-Biotin nicht reproduzierbar, wahrscheinlich aufgrund der bereits genannten Probleme und deren Ursachen. Subramanian et al. beschreiben, wie sie Proteine mithilfe von Poly-L-Lysin an Metallelektroden für den Glucoseumsatz eines Enzyms kovalent binden [32]. Eine weitere Publikation von Benitez und Jimenez setzt Poly-L-Lysin zur Kopplung von Polynukleotiden und einer Kinase auf Goldoberflächen in der Oberflächenplasmonresonanzmessung ein [105]. Dabei wurde auch beobachtet, dass die nativen Eigenschaften des Proteins erhalten bleiben, da es lediglich über elektrostatische und hydrophobische Wechselwirkung an das Poly-L-Lysin gebunden wird.

Die Verwendung eines Bubble-Jet Druckers wurde in der Literatur nur einmal für die Fabrikation von Microarrays beschrieben [106]. Dort wurde allerdings nicht Matrixlösung auf Plastikfolie gedruckt, sondern DNA-Lösung auf Hybridisierungsmembran. Zum einen ist DNA in Wasser besser löslich als die Matrixsubstanzen und wird daher in einem wässrigen System nicht so schnell ausfallen wie die Matrixsubstanzen. Zum anderen ist die Hybridisierungsmembran im

Gegensatz zur Laserdruckerfolie saugfähig. Daher wird es auf dieser Membran nicht zu einem Verschmieren kommen.

#### **5.1.4 Bewertung der Immobilisierungstechniken und Proteinarrays für eine MALDI-TOF-basierten Bindungsassay**

Andere Systeme, bei denen eine Auswertung der Bindung eines Liganden an ein Protein über MALDI-TOF erfolgt, verwenden keine Protein-Chips. Sondern sie immobilisieren das Protein z. B. an Beads [107,108] oder reinigen einen Protein-Liganden-Komplex aus der Lösung auf [109]. Eine Quantifizierung ist mit dem MALDI-TOF nicht möglich, da niemals die gesamte Probe ionisiert wird. Die in Kapitel 3.2.1 ermittelten normierten Peakflächen dienten lediglich einem qualitativen Vergleich der Messungen, um eine Verbesserung des Signals, das sich teilweise kaum vom Untergrund abhob, feststellen zu können. Daher ist die Normierung auf einen Matrix-peak durchaus zulässig, auch wenn hier keine sehr exakten Mengen für die Herstellung der Matrix verwendet wurden. Abgesehen davon, dass ein Standard zur Kalibration überflüssig war, hat er bei einem Einsatzversuch das gesuchte Signal unterdrückt. Da dieses Signal sich, wie bereits erwähnt, teilweise nur wenig vom Rauschen abhob, war es wichtig, weitere Verunreinigungen in der Probe zu vermeiden.

Streptavidin ist für den Assay eher ungeeignet. Das Problem liegt in der guten Bindung zum Biotin. Diese Tatsache und seine geringen Ansprüche an Puffersystem und Umgebung, macht es zwar zu einem idealen Testsystem für viele verschiedene Assays, hier aber stört diese Eigenschaft, da es schwierig ist, das Biotin wieder vom Streptavidin zu lösen. Zwar wird ein Teil des Proteins durch das organische Lösungsmittel in der Matrix denaturiert und das Biotin freigesetzt, aber zur vollständigen Denaturierung wären harschere Methoden vonnöten.

Nach N. Ramachandran [5] besitzen Proteinarrays das Problem, dass diese Arrays aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Proteine instabil sind. Es besteht auch die Möglichkeit, dass das Protein nicht nur mit der N-terminalen Aminogruppe an die Oberfläche bindet, sondern auch mit aminhaltigen Seitenketten binden kann. Deswegen werden Proteinarrays im Gegensatz zu DNA-Arrays nicht standardmäßig eingesetzt. Dadurch kann die Zugänglichkeit der Bindungsstelle für Liganden verringert werden. Allerdings konnten mit Arrays von kleinen Molekülen und Peptiden sehr gute Erfolge erzielt werden (Dissertation M. Köhn), da auch hier die Stabilitätsprobleme durch die Proteinstruktur entfallen. Für die Herstellung stabiler Proteinarrays muss ein hoher Aufwand betrieben werden [6]. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass jeder MALDI-TOF-Ligandenbindungstest sehr mühselig hinsichtlich unspezifischer Bindung geprüft werden muss. Zudem ermöglicht die schlechte Signalausbeute keine automatisierte Suche, da die Signale häufig nur schwer vom Rauschen zu unterscheiden sind. Dieser Schluss wird unterstützt durch die Tatsache, dass keines der seit den 90er Jahren vorgestellten Systeme zur Protein-Liganden-Bindung über immobilisierte Proteine und MALDI-MS weiter entwickelt wurde, bzw. größere Beachtung oder routinemäßigen Einsatz fand.

## 5.2 ESI-ASSAY

Für das Gelingen der Reaktion sind die beschriebenen Kupplungsbedingungen absolut notwendig. Die Reaktion von Epoxid mit den Aminogruppen läuft bei dem für das Protein nötigen relativ neutralen pH-Wert (pH 7,2) mit schlechter Ausbeute. Durch den Hochsalzpuffer kommt es zu einem Aussalzungseffekt des Proteins an den funktionellen Gruppen des Säulenmaterials und somit zu einer Konzentrationsverstärkung des Proteins an diesen Stellen. Die Proteine assoziieren an die Oberfläche des Affinitätsmaterial, wodurch die Effektivität der Reaktion erheblich erhöht wird [50].

### 5.2.1 Verdrängung der Liganden durch Denaturierung

#### 5.2.1.1 Streptavidin

Mit Streptavidin gelang der grundlegende Aufbau des Systems. In den ersten Experimenten zeigte sich, dass ein spezielles Denaturierungsmittel für das verwendete Protein gefunden werden muss, um den Liganden vom Protein zu lösen. Selbst bei organischen Lösungsmitteln gibt es Unterschiede. Zunächst wäre zu erwarten, dass 50% Acetonitril ausreichen würde, um Streptavidin zu eluieren. Aber sogar eine Konzentration von 100% Acetonitril reicht dazu nicht aus. Doch selbst mit Isopropanol konnte nicht das gesamte Biotin eluiert werden. Dies ergab ein erster Versuch der Quantifizierung. Mit der Quantifizierung ist jedoch vorsichtig umzugehen, da hier mehrerer Faktoren störenden Einfluss haben: Das ist zum einen der Messbereich des Massenspektrometers. Zu einer sinnvollen Quantifizierung dürfen bestimmte Substanzmengen weder unter- noch überschritten werden. In der Literatur [14] wird auch beschrieben, dass ein  $K_D$ -Wert kleiner als  $10^{-8}M$  bei einer Affinitätschromatographie die Bedingungen erschwert. Die Bindung kann dann nur unter denaturierenden und inaktivierenden Bedingungen gelöst werden. Dies kann erklären, warum nicht die gesamte Menge des Biotins eluiert werden kann. Die Struktur des Streptavidins könnte bei der Denaturierung dergestalt zusammenfallen, dass der Ligand sich nicht lösen kann.

#### 5.2.1.2 Farnesyltransferase

Wie schon bei den Messungen im MALDI-TOF-Bindungsassay konnte eine hohe unspezifische Bindung der Substanzen auf den Oberflächen des HPLC-MS-Systems und an den Proteinen fest-



gestellt werden. Die Ursachen dafür werden in der schlechten Wasserlöslichkeit der Substanzbibliothek liegen. Unter Einbeziehung der  $IC_{50}$ -Werte der Substanzen für Farnesyltransferase [71] kann man feststellen, dass die Substanz, von der die größte Menge sowohl an der Farnesyltransferase-POROS-Säule als auch an der BSA-POROS-Säule zurückgehalten wird, MT652, den kleinsten und somit besten  $IC_{50}$ -Wert besitzt. Eventuell könnte auch hier der inhibitorische Effekt durch eine aggregierende Wirkung hervorgerufen werden, auf die in Kapitel 5.2.4 in Bezug auf die promiskuen Inhibitoren hingewiesen wird.

**Tabelle 31:**  $IC_{50}$ -Werte der Farnesyltransferase-Inhibitoren

Substanz	$IC_{50}$ bei Farnesyltransferase
MT343	Kein Inhibitor
MT356	>50
MT355	36
MT650	13
MT652	10
MT656	6
MT670	>50
MT407	>50

### 5.2.1.3 Ras-GTPase-Aktivatoren

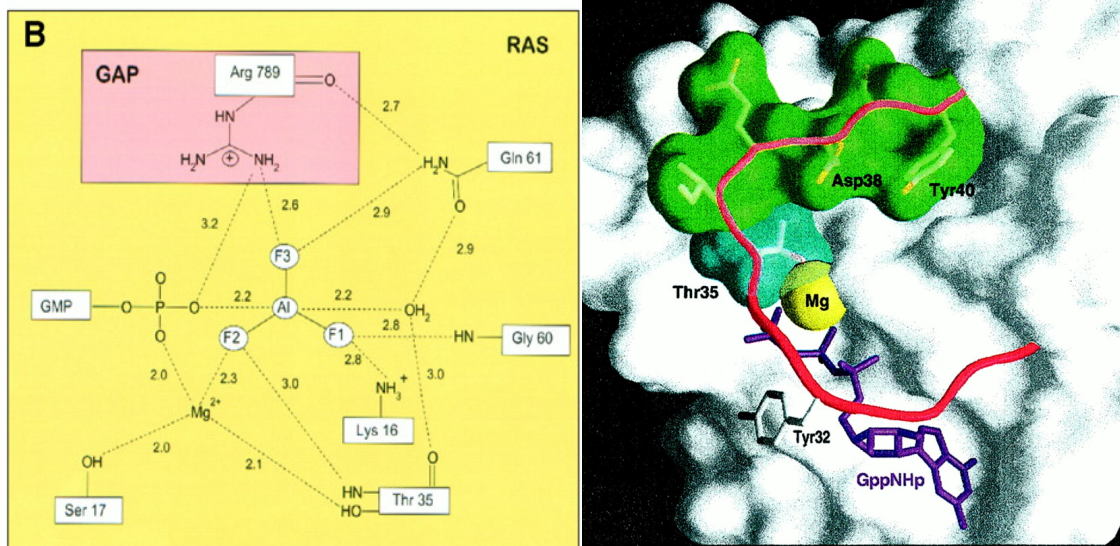
Ras besitzt eine schwache intrinsische GTPase-Aktivität, d.h. es spaltet das  $\gamma$ -Phosphat des gebundenen GTP ab und erreicht so wieder den inaktiven Zustand. Die GTPase-Aktivatoren sollten in der Bindungsstelle der eigentlichen Liganden des Ras, der Nukleotidbindungstasche, binden und durch ihre Kopfstruktur die Phosphatabspaltung beschleunigen. Die Liganden L3 und L5 sind Isomere. Sie hatten den gleichen Peptidkörper und unterschieden sich nur an der Stellung einer Hydroxylgruppe in ihrer Kopfstruktur (Abbildung 77: Strukturen der GTPase-Aktivatoren L1, L3, L4, L5 und L6, alle GTPase-Aktivatoren bestehen aus einer Peptideinheit und einer Kopfgruppe, die die Abspaltung des  $\gamma$ -Phosphats des am Ras gebundenen GTPs aktivieren soll [110]). Das erklärt ihr identisches Bindungsverhalten. Durch geeignete Elutionsmittel wird nicht eluierter Ligand vom Protein gelöst. In den hier gezeigten Experimenten ließen sich diese Substanzen nicht wie die natürlichen Liganden des Ras, die Nukleotide, durch spezifische Ionen wie Sulfat oder Phosphat wieder vom Protein lösen, noch konnten GDP oder GTP sie verdrängen. Erst eine Denaturierung des Ras mit organischem Lösungsmittel führte zu einer Elution der Liganden L3 und L5. Daraus folgt, dass diese Substanzen wahrscheinlich nicht in der Nukleotidbindungstasche des Ras binden, sondern an einer anderen Stelle des Proteins. Übereinstimmend dazu sind biologische Tests von R. Gail, wonach diese Substanzen keine GTPase-aktivierenden Effekt zeigen [110]. Zusammen mit den Bindungsstudien von Nukleotiden an Ras lässt sich folgern, dass die Stärke dieser Methode darin liegt, zwei verschiedene Arten von Bindern an das gleiche Protein unterscheiden zu können.

#### 5.2.1.4 Guanylatkinase

An diesem Beispiel konnte der Erhalt der enzymatischen Aktivität eines Proteins nach der Immobilisierung an das POROS-Material gezeigt werden. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von ATP und GMP zu ADP und GDP, um die für den Nukleinsäureaufbau benötigten Nukleotidtriphosphate zu erzeugen. Eine einfache Quantifizierung über die im Massenchromatogramm bestimmten Flächen ermöglichte eine Berechnung des Umsatzes von Edukt zu Produkt, also eine Bestimmung der Enzymaktivität. Verglichen mit dem Literaturwert besitzt dieses Enzym noch etwa 10% Aktivität [62]. Allerdings ist dies nur eine Abschätzung, da es sich um ein Durchflusssystem handelt und damit die exakten Einsatzmengen fehlen. Die gekoppelte Guanylatkinase konnte nicht zur Untersuchung von Kinetiken genutzt werden, da die Enzymreaktion zu schnell ablief.

#### 5.2.1.5 Ras-Nukleotide

Ras ist eines der entscheidenden Schalterproteine in der Regulation der Zellteilung und –differenzierung. [55] Seine Liganden sind die Nukleotide GTP/GDP (Affinität GDP:  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ ) und mit geringerer Affinität auch andere Nukleotide (Affinität GMP und ATP:  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ) [56]. Je nachdem, welches Nukleotid gebunden hat, befindet sich Ras im aktiven (GTP-gebundenen) oder inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand. Eine Aktivierung des Ras und somit eine Inangsetzung einer Signalkette, die letztendlich Zellwachstum und –differenzierung regelt, erfolgt durch den Austausch des GDP durch GTP. Beschleunigt wird dieser sehr langsame Austausch in der Zelle durch ein so genanntes GEF (Guanosid exchange factor)-Protein. Bei den natürlichen Liganden des Ras, den Nukleotiden (GTP/GDP), reichte eine einfache Denaturierung des Proteins mit Lösungsmittel, Säure oder anderen denaturierenden Agenzien nicht aus, um die Liganden vom Protein zu lösen. Hier kam mit spezifischen Salzen der Erfolg. Es handelt sich dabei nicht um eine Denaturierung der Bindungsstelle wie bei der Farnesyltransferase, sondern um eine echte Verdrängung der Liganden aus dem Protein. Ionen, wie das Sulfat und das Phosphat, die der Struktur des  $\gamma$ -Phosphat bzw.  $\beta$ -Phosphat des Nukleotids entsprechen, können durch den so genannten Platzhaltereffekt [111] den Liganden aus der Bindungsstelle lösen. Die Verdrängung von GTP durch GDP ließ sich nach Bereinigung der Flächenwerte durch Einbeziehung der unterschiedlichen Ionisation bei unterschiedlichen Salzgehalten quantifizieren. GDP alleine verdrängte die geringste Menge, ein Zusatz von Sulfat verdoppelte die verdrängte Menge an GTP. Nach Mistou et al. wird die Dissoziationsrate des GDP von p21Ras durch Ammoniumsulfat deutlich gesteigert, bei 20 mM etwa 20fach [112]. Die Abbildung zeigt die Wechselwirkung der endständigen Phosphatgruppe mit Arg 789 von Ras. Diese Position kann das Sulfation einnehmen, da eine ähnliche Struktur besitzt wie das Phosphation.



**Abbildung 126:** links: Wechselwirkungen des Nucleotids GMP in der active site; rechts: Lage des Nucleotidanalogs GppNHp in der Röntgenstrukturanalyse (Witinghofer, Scheffzek) [56]

Wie erwartet konnte Sulfat ohne GDP aber nicht mehr verdrängen als das Gemisch. Hier könnte schlicht alles GTP verdrängt worden sein, dass an dem immobilisierten Ras gebunden war. Der Zusatz von Phosphat schien zu keiner Steigerung des messbaren GTPs zu führen, während Phosphat alleine zu einer vermehrten Verdrängung führte. Eine Erklärung könnte in der unspezifischen Affinität von Phosphat zu Proteinen liegen. Das Phosphat könnte mit dem an das GDP gebundenen Magnesium ausfallen, anstatt in den Verdrängungsmechanismus bei gleichzeitigem Vorhandensein von GDP einzuwirken. Insgesamt sind die Mengen des verdrängten GTPs aufgrund seiner hohen Affinität (siehe oben) gering, sie betragen nur etwa 0,2 % der höchstmöglichen an Ras gebundenen Menge. Bei ATP und GMP beträgt dieser Prozentsatz etwa 50% bzw. 10%. Der Unterschied zwischen ATP und GMP lässt sich bei ähnlichen Affinitäten dadurch erklären, dass GMP bei der Aufgabe auf das Protein weniger freie Bindungsstellen besetzen konnte als ATP, und daher weniger GMP als ATP an Ras gebunden war. Allerdings ist die Tendenz gegenüber dem hochaffinen Ligand deutlich zu erkennen.

Bei Ras-Familienmitglied Ran\*mGDP [113] wurde beobachtet, dass der RCC1 katalysierte Nucleotidaustausch von mGDP durch nicht mant-markiertes GDP stark durch Sulfate inhibiert wird, nicht aber durch Mono- oder Polyphosphate. Zudem wird der nukleotidfreie Ran-RCC1-Komplex durch Sulfationen stabilisiert.

Zur Verdrängung durch Sulfat passt, dass die Bindung von Sulfat an die GTP bindenden Proteine gefunden wurde [111]. Nucleotidfreies Ras zeigt einen Shift von 98 Da in der Masse, der von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stammt, wie Isotopenaustausch-Experimente beweisen. Nach Mistou et al. [112] wird die Dissoziationsrate des GDP von p21 durch Ammoniumsulfat deutlich gesteigert, bei 20 mM Ammoniumsulfat etwa 20fach. Zusätzlich wird die Proteinaktivität des nukleotidfreien p21

durch EDTA und Ammoniumsulfat stabilisiert. Anstatt weniger Stunden ist das p21 so mehrere Tage stabil. Dies sind alles Hinweise darauf, dass die active site durch Sulfat besetzt wird, und das Ion so das Protein stabilisiert. (EDTA beschleunigt nur das Freisetzen von Nukleotid durch das Binden von  $Mg^{2+}$ , welches das Nukleotid stabilisiert.) GDP schützt p21 vor Hitzedenaturierung. Auch Sulfat könnte diesen schützenden Effekt haben, da die Säule auch nach Sulfat-Behandlung mindestens zwei Wochen bei RT einsatzfähig bleibt. Es ist zwar ein Alterungsprozess zu beobachten, jedoch dauert es bis zu vier Wochen, bis die Neubindung von Nukleotid an die Säule soweit nachgelassen hat, damit das eluierte Nukleotid zu gering ist, um das Signal noch deutlich zu erkennen.

Eine weitere Frage ist, welche Position das Sulfat in der Binding-Site einnehmen könnte. Eine Möglichkeit wäre die normalerweise vom  $\beta$ -Phosphat eingenommene Position [116]. Die Bindung von ATP ist ebenso wie die von GMP und Guanosin um sechs Größenordnungen schwächer. Bindet GDP an p21 mit einer Affinität von  $10^{11} M^{-1}$ , geschieht dies bei GMP nur mit einer Affinität von  $10^5 M^{-1}$ . Das  $\beta$ -Phosphat könnte durch die Interaktion mit dem Protein eine hochaffine Bindungsstelle für das Guanosin schaffen. In den Experimenten mit dem immobilisierten Ras ist ATP wesentlich leichter zu verdrängen als GTP. ATP wird bereits durch den Durchfluss von GDP verdrängt, während zur GTP-Verdrängung eine Inkubation von GDP auf der Säule von einer Stunde nötig ist.

Weiterhin wird in dieser Arbeit der Verdrängungseffekt erst ab 100 mM Ammoniumsulfat festgestellt, obwohl in der Literatur schon Effekte ab 5 mM beobachtet wurden [111]. Hier kommt wieder das Problem der Ionisierbarkeit zu tragen. Durch das Salz wird die Ionisierung gestört, im Spektrum erkennt man Salzcluster. Erst wenn der Effekt groß genug ist, also Nukleotid eluiert, liegt das Ligandensignal über denen der Salzcluster. So lässt sich auch erklären, warum man bei höheren Salzkonzentrationen keine stärkere Nukleotid elution beobachtet. Die Ionisierbarkeit verschlechtert sich proportional zum Salzgehalt. So scheint es, dass nicht mehr Nukleotid von der Säule eluiert. Durch Kalibrierung lässt sich dieser Effekt herausrechnen. Wird dies bedacht, so kann man tatsächlich den in konventionellen Experimenten beobachteten Effekt der gesteigerten Nukleotiddissoziation bei steigenden Sulfatkonzentrationen bestätigen.

Natürlich ist nicht auszuschließen, dass bei der Kupplung des Proteins an das epoxidierte POROS-Material durch das eingesetzte Natriumsulfat nukleotidfrei gewaschen wird. Aber wie bereits beschrieben, sollte das Sulfat das Ras stabilisieren, so dass die Inkubation bei RT über Nacht nicht zu einer Denaturierung des p21 führen sollte.

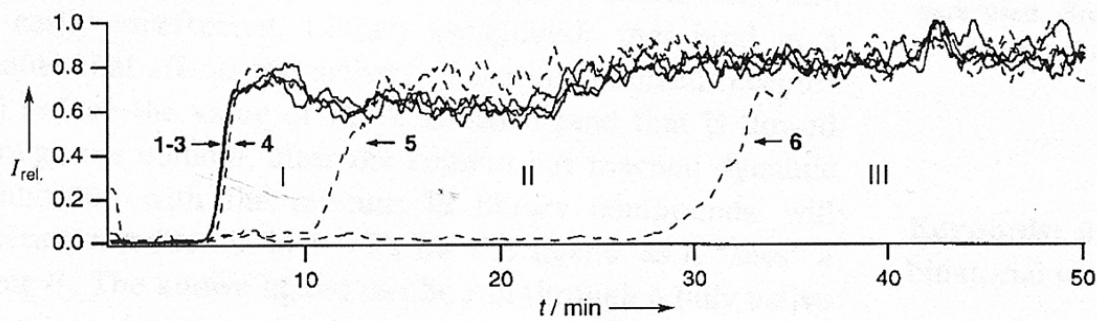
Ein weiterer Vorteil ist der geringe Verbrauch an Protein. Das an das Säulenmaterial gekoppelte Protein kann 4 Wochen lang bei RT verwendet werden. Bei einer Menge von einem mg Protein auf 50 mg Säulenmaterial, wobei etwa 10-15 mg Säulenmaterial zur Füllung einer 2cm (1mm Durchmesser) HPLC-Säule ausreichen, ist der Verbrauch an Protein damit verschwindend gering. Mit einem mg Protein lassen sich so etwa 1000 Messungen durchführen. Das eröffnet Möglichkeiten, Bindungsstudien an schwieriger zugänglichen Proteinen ohne großen Aufwand durchzuführen.

### 5.2.2 Frontale Affinitätschromatographie

Die Frontale Affinitätschromatographie erfuhr in dieser Arbeit eine erhebliche Modifikation. In den vorherigen Veröffentlichungen wurde ein fortdauernder Substanzauftrag beschrieben. Das bedeutet, dass nach dem Durchbruch der Substanz in der Elution von der Säule, die Substanzkonzentration bis zum Ende der Messung nicht mehr rückläufig ist. Dies hat verschiedene Nachteile. Zum einen ist der Substanzverbrauch dadurch sehr hoch. Wenn über eine Stunde hinweg eine 1  $\mu\text{M}$ -Substanzlösung in das System infundiert wird [24], bedeutet das selbst bei einer Flussrate von 8  $\mu\text{l}/\text{min}$  eine Substanzmenge von 400 pmol. Da in dieser Arbeit mit einer etwas größeren Säule gearbeitet wurde, musste die Flussgeschwindigkeit höher liegen. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  wären bereits 2 nmol Substanz verbraucht worden. Da die verwendeten Substanzen sehr wertvoll sind und für viele andere Tests eingesetzt werden (Zellassays, Bestimmung von  $\text{IC}_{50}$ -Werte), sind diese Mengen zuviel für eine FAC-Messung. Außerdem bedeutet eine größere Menge an Substanz auch eine größere Verunreinigung der Säule und des kompletten HPLC-MS-Systems, was wiederum zu verlängerten Spülzeiten führt. Der fortwährende Auftrag von Substanz musste auch über ein Syringe-System erfolgen und ständig beobachtet werden. Das Auftragen einer bestimmten Menge über den Autosampler hingegen, wie in dieser Arbeit beschrieben, geschah automatisch. Die Automatisierung des Probenauftrages und des Spülens von Säulen und HPLC-MS-System ermöglichten die Durchführung der langen FAC-Messungen über Nacht. Im Vergleich zum LCQ Deca konnte mit der LTQ noch empfindlicher gearbeitet werden, daher war eine Verringerung der eingesetzten Ligandenkonzentrationen möglich. Zudem konnten die Cdc25a-POROS-Säulen bei den meisten Verbindungen für etwa 20 Messungen verwendet werden, was einen ökonomischen Umgang mit dem Protein erlaubte, und somit eine weitere Kostenreduktion darstellte.

Verschiedene Aspekte im Aufbau des Systems beeinflussen die Messgenauigkeit. Die Säulen sind einerseits selbstgepackt, und andererseits mussten sie in ein behelfsmäßiges System, bestehend aus einem Loop, zum Aufbau des nötigen Drucks eingebaut werden. Das hat zur Folge, dass die Flussgeschwindigkeit nicht genau nachprüfbar ist, da die Flussgeschwindigkeit nicht ständig im Fluss kontrolliert werden konnte, sondern per Syringe nach dem Aufbau des FAC-Systems bestimmt werden musste. Dies führte zu einer Ungenauigkeit in der Einstellung der Flussgeschwindigkeit und damit zu Veränderungen der Retentionszeiten eines Liganden zwischen unterschiedlichen Messungen.

Im Unterschied zur klassischen FAC wurden in dem System in dieser Arbeit der Ligand nicht über die gesamte Messdauer infundiert, sondern eine exakte Substanzmenge in einem bestimmten Probevolumen über Autosampler aufgegeben. Durch das beständige Infundieren bleiben die gesamten Bindungsstellen am Protein durch den Liganden besetzt. Sobald der Gleichgewichtszustand erreicht ist, also soviel Ligand an die Proteine bindet, wie sich wieder löst, zeigt das Massenchromatogramm der Verbindung ein Plateau. In den bisherigen Arbeiten wurde das Erreichen dieses Plateaus zur Berechnung des Retentionsvolumens des Liganden verwendet.



**Abbildung 127:** Beispiel für eine FAC mit Plateau aus Schriemer 1998 [39]

Bei den FAC-Messungen in dieser Arbeit wird wegen der Aufgabe einer bestimmten Ligandenmenge kein fortdauerndes Plateau erreicht. Da aber der Ligand in einem sehr großen Überschuss gegenüber dem immobilisierten Enzym vorliegt (1-10 nmol Ligand gegenüber 20 pmol Enzym), ist vom Erreichen des Gleichgewichtszustand bei der Protein-Liganden-Bindung auszugehen, zumindest für einen kurzen Zeitraum. Beim Auftrag der Liganden werden zunächst die Substanzen, die keine Bindungsstelle an dem Protein in der Säule besitzen, kurz nach dem Totvolumen ausgespült. Auch an dieser Säule kommt zu einem Loslösen und Wiederbinden der beim Auftrag gebundenen Substanzen. Je stärker der Ligand an die das Protein bindet, umso stärker tendiert das Gleichgewicht hin zum gebundenen Zustand. Das würde bedeuten, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein mit der Zeit wieder gelöster Ligand sofort wieder bindet sehr groß ist. Je größer also die Menge an Liganden ist, die an das immobilisierte Protein gebunden ist, umso größer ist das Retentionsvolumen. Denn dieses Volumen ist das Volumen, das an dem Protein-Liganden-System vorbeifließt, bis sich der Ligand wieder löst. Da hier keine weiteren Reagenzien zur Veränderung der Bindungskapazität zugesetzt werden, ist die Ligandenbindung tatsächlich nur zeitabhängig. Damit ist das Produkt aus der Ausgangskonzentration der Substanz und dem Retentionsvolumen die Menge des spezifisch gebundenen Liganden. Die Dissoziationskonstante bestimmt sich nach

$$K_D = \frac{[Ligand] \cdot [Protein_{immobilisiert}]}{[Ligand Protein_{immobilisiert}]}$$

Damit muss bei der Abnahme von freiem Liganden durch Fortspülen das Gleichgewicht nachregulieren.

Zur Berechnung der Dissoziationskonstante mithilfe der Messdaten aus der FAC muss angenommen werden, dass das Menge des besetzten Proteins ausgedrückt werden kann durch

$$Protein_{besetzt} = [Ligand]_0 (V - V_0),$$

da die Menge an besetztem Protein der Menge an gebundenem Liganden entspricht.

Daher ergibt sich für das unbesetzte Protein

$$\text{Protein}_{\text{unbesetzt}} = [B]_0 - [A]_0 (V - V_0) / v,$$

wobei  $[B]_0$  die Menge an immobilisierten Liganden pro Bettvolumen ist; „ $v$ “ ist dabei das Bettvolumen der Säule. Somit ergibt sich als Gesamtgleichung

$$K_D = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} = \frac{[A]_0 \cdot \{[B]_0 - [A]_0 (V - V_0) / v\}}{[A]_0 (V - V_0) / v} = \frac{B_t}{V - V_0} - [A]_0$$

Um die Werte exakter bestimmen zu können wurde die Zeit der halbmaximalen Peakhöhe zur Berechnung der Dissoziationskonstanten eingesetzt.

Bei den Berechnungen von Bindungskapazität und Dissoziationskonstanten mithilfe der Befunde aus den Messungen der P-Substanzen traten Probleme auf. Das erste Problem präsentierte sich in Gestalt der Bindungskapazitäten. Die berechneten Werte der Bindungskapazitäten passten bei P338, P367 und P433 nicht zu der Schätzung, dass sich 0,3  $\mu\text{mol}$  immobilisiertes Protein in der Säule befinden. Lediglich die Bindungskapazität von P330 entspricht mit 0,32  $\mu\text{mol}$  dieser Annahme. Mehr als 0,3  $\mu\text{mol}$  Protein können sich keinesfalls an der Säule befinden, da diese Menge durch den Einsatz von 4 mg Cdc25a auf 50 mg POROS bei der Immobilisierung die höchstmögliche Menge begrenzt war. Auch beim Befüllen der Säule ließen sich durch das Aufgeben der POROS-Aufschlammung die eingefüllten POROS-Mengen recht gut abschätzen. Mit einem Molekulargewicht von etwa 59 kDa für Cdc25a liess sich daher die Stoffmenge an Cdc25a auf bis zu 0,3  $\mu\text{mol}$  abschätzen. Aber wie genau die FAC-Messungen sind, ist ohnehin schwer zu sagen. Die Bindungskapazität müsste bei allen vier Liganden den gleichen Wert aufweisen. Der Wert schwankt aber zwischen 0,32  $\mu\text{mol}$  und 0,81  $\mu\text{mol}$ . Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einem kann es sich um Messungenauigkeiten handeln, die durch Schwankungen in der Flussgeschwindigkeit hervorgerufen werden. Allerdings wurde ein Split eingerichtet, um kleine Flussraten bei höherem Druck mit stabilerer Geschwindigkeit zu erreichen. Viel größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass hier eine unspezifische Bindung der Substanzen an Cdc25a vorliegt. Dazu passt auch, dass die gefundenen Bindungskapazitäten über der Proteinhöchstmenge liegt, die sich in der Säule befinden kann. Eine unspezifische Bindung an das unbeladene POROS-Material ist eher gering, wie die Messungen in Abbildung 90 zeigen. Die Korrelation von  $C \log P$  der P-Substanzen gegen ihre Retentionszeiten von der Cdc25a-Säule (Abbildung 107) zeigt die Abhängigkeit der Bindung der Substanzen von ihrer Wasserlöslichkeit. Dazu passt auch, dass die Retentionszeiten sich nicht durch einen kleineren  $IC_{50}$ -Wert verlängern (Abbildung 108). Welche Schlüsse diese Befunde zulassen, wird in Abschnitt 5.2.4 näher erörtert.

Die Messungen der Retentionszeiten von MRFA bei unterschiedlichen aufgegebenen Konzentrationen des Peptids (siehe Abbildung 92) zeigt, dass MRFA nicht an die Affinitätssäule bindet. Würde MRFA binden, so müssten die unterschiedlichen Konzentrationen einen Einfluss auf die Retentionszeiten zeigen. MRFA eluiert es mit dem Totvolumen von der Säule, damit ist MRFA für Cdc25a die Substanz der Wahl, um als Kontrolle sowohl im HPLC-MS Bindungsassay, als auch im MALDI-Assay verwendet zu werden.

Die Substanzen der Firma Analyticon (BN-Reihe) und des Arbeitskreises Fürstner (AF-Reihe) besaßen i.A. weitaus geringere C Log P-Werte als die Substanzen der P-Reihe (vgl. Tabelle 15). Es konnten bei sieben der verwendeten Substanzen verzögerte Retentionszeiten beobachtet werden, die nach den Korrelationsdiagrammen unabhängig vom C Log P der Substanzen waren. Aus diesen Retentionsvolumina wurden auch Dissoziationskonstanten bestimmt (Tabelle 13). Allerdings besitzt keine der Substanzen, die eine Bindung an die Cdc25a-Säule zeigte, eine starke inhibitorische Wirkung auf die Cdc25a (Tabelle 15). In Gegenwart der Substanzen BN 11290, BN 10871 und BN 13131 zeigt sich sogar eine prozentuale Steigerung der Enzymaktivität. Die übrigen Substanzen senken die Enzymaktivität nur auf etwa 70% oder besitzen recht hohe IC<sub>50</sub>-Werte von etwa 30 µM. Alles in allem lässt sich daraus der Schluss ziehen, dass sich eine Bindung an die Affinitätssäule nicht unbedingt auf eine inhibitorische Wirkung der Substanzen zurückführen lässt. Die Substanzen könnten auch an einer anderen Stelle des Proteins binden, und daher verzögerte Retentionszeiten zeigen.

Die Bindungsstellen der Cdc25a-Affinitätssäule werden durch einige der aufgetragenen Substanzen nach und nach vergiftet. Sehr deutlich wurde dies bei dem Versuch, die Substanz LW10 mehr als einmal mit derselben Cdc25a-POROS-Säule im FAC/MS zu messen. Schon bei der zweiten Messung gelang es nicht mehr, eine Verzögerung der Retentionszeit zu beobachten (siehe dazu Abbildung 101 und Abbildung 102). Die Bindungsstellen des Cdc25a mussten also durch den Inhibitor blockiert sein. Auch durch mehrmaliges Waschen gelang es nicht, eine Veränderung der Retentionszeit zu beobachten, sprich die Bindungsstellen wieder frei zu spülen. Damit wurde die Affinitätssäule unbrauchbar. Es ist also anzunehmen, dass auch bei anderen Substanzen die Bindungsstellen nicht vollständig freigespült werden, wenn auch weniger dramatisch als bei LW10. Dies bedeutet eine Begrenzung der Lebensdauer der Säule. Diese ist jedoch nicht vorhersehbar, bei einigen Substanzen kann die Säule nach einem Lauf, bei anderen Substanzen erst nach dem 20. Lauf unbrauchbar sein. Diese Unwägbarkeit ist ein Problem bei der Automatisierung des FAC/MS-Systems.

Zhang et al. stellen nach ihren FAC/MS-Messungen mit Lektinen aus einem Pilz (*Polyporus squamosus*) und den bindenden Sialo-Oligosaccheriden fest, dass sie eine schnelle (10 Minuten pro Messungen) Methode in der Hand haben, Binder nach ihrer Bindungsstärke ordnen zu können, da eine K<sub>D</sub>-Bestimmung möglich ist [130]. Daraus schließen sie, dass eine Anwendung auf kombinatorische Substanzbibliotheken für verschiedene Zielproteine möglich sein soll. Allerdings verwendet diese Gruppe als Kontrolle eine Säule, bei der das Säulenmaterial lediglich durch Biotin abgesättigt wurde. Diese Säule ist vergleichbar mit der in dieser Arbeit verwendeten Säule, bei der das POROS-Material durch Wasser abreagiert wurde. Es werden keine Kontrollen mit einer Proteinsäule, wie BSA, durchgeführt, um so unspezifische Bindung an einer Proteinoberfläche feststellen zu können, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen. Erst die Versuche mit einer BSA-Säule zeigten wirklich drastische unspezifische Bindung einiger Substanzen, nicht hingegen mit einer proteinfreien Säule. In der Veröffentlichung von Rempel, in der die Bindung von Trisaccheriden an ein Lektin aus *Marasmius oreades* untersucht wird, sind keine Angaben über eine Kontrolle mit einer proteinfreien Säule zu finden [131]. Auch bei anderen Arbeiten sind die Kontrollexperimente nicht beschrieben [42]. Auch in anderen Veröffentlichungen, in denen der erfolgreiche Einsatz von FAC/MS beschrieben wird, kommen die Autoren zu



dem Schluss, dass die FAC/MS ein Instrument zur Hochdurchsatz-Analyse von Protein-Liganden-Bindung sei, siehe Chan et al [43] oder auch die Übersicht von Slon-Usakiewicz [134]. In der von Slon-Usakiewicz veröffentlichten Übersicht wird die FAC als ein wichtiges Instrument zur Ermittlung von Protein-Liganden-Bindung dargestellt. Betrachtet man die Veröffentlichung der letzten Jahre über erfolgreiche durchgeführte FAC- Messungen näher, so stellt sich heraus, dass immer nur gut wasserlösliche Liganden eingesetzt wurden. So beträgt der C Log P von den der D-Fucose ähnelnden Abequose-Epitopen [24, 39] - 2,4 und der C Log P des  $\beta$ -Galactopyranosids [43] -0,9. Bei den anderen beschriebenen Systemen werden Antikörper eingesetzt [45, 44], Oligosaccharidmischungen [38] oder wie in Slon-Usakiewicz eigener Arbeit bekannte wasserlösliche Kinase-Inhibitoren [134].

Dem widersprechen die Ergebnisse in dieser Arbeit. Sobald die zu testenden Liganden eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, lässt sich nur noch durch Kontrollexperimente zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung unterscheiden, und auch dies ist nur bedingt zuverlässig, da nicht unbedingt eine Aussage darüber zu treffen ist, wie groß die unspezifische Bindung am Zielprotein ist, wenn man ein anderes Protein zur Kontrolle einsetzen muss. Dabei ist es sehr wichtig, dass nicht nur mit einer proteinfreien Säule als Kontrolle gearbeitet wird, da die Substanzen unspezifische hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen mit der Oberfläche eines Proteins eingehen können. Diese unspezifische Bindung an einem Protein kann zu sehr großen Veränderungen in den Retentionszeiten führen, die nur noch schwerlich eine Unterscheidung zulassen zwischen den Retentionszeiten einer Säule mit dem Zielprotein und damit der spezifischen Bindung (vergleiche Abbildung 86 und Abbildung 87). Bei einer proteinfreien Kontrollsäule hingegen liessen sich die Verzögerung der Retentionszeit von den Retentionszeiten der Cdc25a-Säule problemlos subtrahieren und so die Werte korrigieren (vergleiche Abbildung 90). Zudem sind die Kontrollmessungen zeitaufwendig und kosten Substanz. Ein weiterer Faktor, der die Dauer der Messung in die Länge zieht, ist bei schlechtlöslichen Verbindungen das Auswaschen der Verbindung von der Säule und aus dem gesamten HPLC-MS-System. Dies kann, wie in dieser Arbeit, nach jeder Messung noch ein bis zwei Stunden andauern. Damit ist das FAC/MS-System, trotz seiner Möglichkeiten zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten, im Screening von Substanzbibliotheken auf das Einsatzgebiet gut wasserlöslicher Verbindungen beschränkt. Eine Alternative wäre, die interessierende Substanz an HPLC-Material zu immobilisieren, und dann verschiedene Proteine zur Bindung anzubieten und deren Elution im ESI-MS zu bestimmen.

### 5.2.3 Gelfiltrationsassay

Ein sehr interessanter Aspekt bei dem Gelfiltrationsassay von S. Sauer ist die Möglichkeit zur Quantifizierung. Diese Möglichkeit bestand zwar auch für die Versuche mit Guanylatkinase, aber bei weitem nicht so exakt, wie es mit dem Sauer-Assay möglich wäre. Allerdings liessen die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Proben aus dem Gelfiltrationsassay keine umfassende Quantifizierung zu.

### 5.2.3.1 Gelfiltrationsassay nach Sauer

Ein Problem der massenspektroskopischen Bindungsstudien ist die Quantifizierbarkeit. Die Ionisierung der untersuchten Liganden ist immer von der Struktur und der Eigenschaften der Liganden, aber auch von anderen in der Messlösung vorhandenen Substanzen (vor allem Ionen) abhängig, die gegebenenfalls die Ionisierung des Analyten unterdrücken können. Daher ist es unbedingt erforderlich, Blindmessungen durchzuführen, sowohl mit dem Analyten alleine, als auch vermischt mit den störenden Salzen. Durch die Aufnahme dieser Kalibriermessungen kann ein Faktor errechnet werden, um den sich die Ionisierung je nach Zusatzstoff verschlechtert. Dieser Faktor kann dann auf die Messungen angewendet werden, um diesen Fehler auszugleichen

Der leicht logarithmische Verlauf bei den Kalibrationen (siehe Abbildung 128) ist zu vernachlässigen bei der Auswertung. Sie rührt von einer Übersättigung der Ionenfalle des LTQ her. Die im Gelfiltrationsassay eingesetzten Substanzmengen lagen bei 20 pmol. Diese Menge befindet sich im unteren, linearen Bereich der Kalibrationskurve.

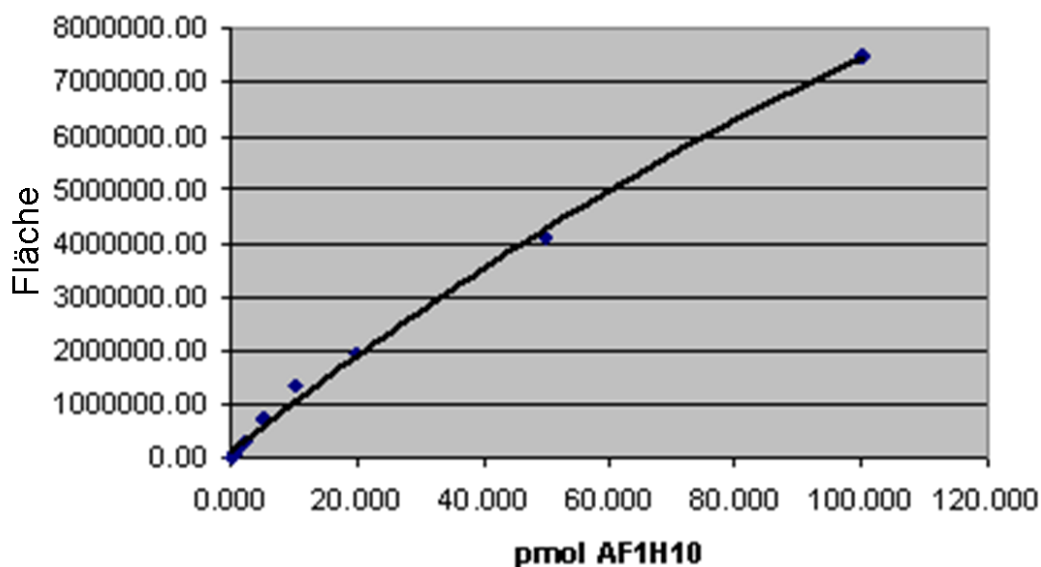


Abbildung 128: Kalibrationskurve der Substanz AF1H10 Jupiter C8, HPLC-MS im MS/MS Mode auf Massenpeak

Viel größere Probleme bereitete, dass etliche Substanzen über die HPLC-MS nicht zuverlässig zu messen waren, wie z.B. P318. Hier könnte eine Eigenschaft der Substanzen zu tragen kommen, die sich wie ein roter Faden durch alle Messungen zieht. Die schlechte Löslichkeit der Verbindungen in Wasser, also ihre hohe Hydrophobizität. Bei der Messung über die C8-Säule ist es möglich, dass diese Substanzen nicht von der Säule eluieren. Es ist auch vorstellbar, dass diese Verbindungen an anderer Stelle im HPLC-MS-System ausfallen und nicht mehr detektiert werden können.

Aber nicht nur die unzureichende Messbarkeit einiger Substanzen im HPLC-MS-System verhin-derte eine zuverlässige Quantisierung. Auch bei den HPLC-MS-Messungen der Binder- und

Nichtbinderfraktionen tauchten Fragen auf. Bei der dritten Messreihe mit dem Gelfiltrationsassay in Berlin wurden Substanzen der LW-Reihe und einige der AF-Reihe aufgrund ihrer  $IC_{50}$ -Werte als Binder eingesetzt. Im Vergleich dazu wurden drei Substanzen, die sich in der FAC/MS als Nichtbinder erwiesen hatten, und eine Binder-Substanz aus der FAC/MS als Nichtbinder eingesetzt. Etliche Substanzen der LW-Reihe erwiesen sich als problematisch in der ESI-MS-Messung. Jedoch gab es auch bei den Substanzen, die gut im ESI-MS zu messen waren, und von denen Kalibrationskurven erstellt worden sind, keine stimmigen Ergebnisse im Gelfiltrationsassay. Auch waren die Ergebnisse mit Substanzen, die bereits in der zweiten Messreihe eingesetzt wurden, wie AF1E6, AF1B11, BN13129 und BN4001, nicht reproduzierbar. Es ist auch erstaunlich, dass LW10, mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 8,4  $\mu\text{M}$  nach dem Gelfiltrationsassay, in keiner der Fraktionen wiederzufinden ist (Tabelle 32).

**Tabelle 32:**  $IC_{50}$ -Werte der LW-Substanzen bei Cdc25a in  $\mu\text{M}$  aus [85]

Substanz	$IC_{50}$ bei Cdc25a in $\mu\text{M}$
LW 9	26
LW 10	8,4
LW 11	1,6
LW 12	3,7
LW 18	7
LW 19	2
LW 30	6,5
LW 46	8,5
LW 47	6,4
LW 48	5,4
LW 61	<1

Bei der Suche nach Erklärungen für die gefundenen Ergebnisse gibt es verschiedene Ansatzpunkte. Zum einen wäre die Denaturierung bei 95°C zu betrachten. Cdc25a faltet sich aus 8 M Harnstoff problemlos wieder zurück. Dies könnte auch nach Hitzedenaturierung der Fall sein. Dann würde beim Abkühlen das Protein beginnen, sich zurückzufalten. Infolgedessen könnte der Ligand wieder an das renaturierte Protein binden.

Ein weiteres Problem könnte in der Wiederverwendung der Gelfiltrationssäulen liegen. Die Säulen wurden aus Kostengründen zweimal verwendet. Mit gut wasserlöslichen Substanzen, wie dem vorher zu Aufbau des Systems verwendeten Biotin-Oligomers, sollte das mehrfache Verwenden der Gelfiltrationssäulen kein Problem darstellen. Stärker hydrophobe Substanzen hingegen können die Bindungsstellen der Säulematerial besetzen und, wegen ihrer starken Wechselwirkungen, dort auch noch nach der Elution verweilen. Bei einem Neuauftrag von ungebundenem Ligand würde dieser dann nicht genug Bindungsstellen am Säulematerial finden. Das

würde dazu führen, dass Substanzen, die nicht ans Protein gebunden haben, nicht auf der Säule bleiben würden. Die Substanzen würden bereits beim Aufgeben auf die Säule mit den ans Protein gebundenen Verbindungen eluieren. Bei der massenspektrometrischen Auswertung würden sie dann in der Binder-Fraktion gefunden werden. Leider wurde der erste Waschschrift nach dem Probenauftrag verworfen, so dass nicht nachzuvollziehen ist, ob sich dort die gesuchten Substanzen finden lassen. In diesem Waschschrift könnte Substanz verloren gegangen sein. Das könnte erklären, dass bei der Wasserkontrolle in der Binderfraktion sehr viel mehr Substanz zu finden ist, als in der Nicht-Binderfraktion.

Weiterhin ist es möglich, dass Methanol nicht ausreicht, um die an die Gelfiltrationssäule gebundenen Phosphatase-Inhibitoren zu eluieren. Damit liesse sich der Verlust von Substanz in der Gesamtmenge aus Binder- und Nichtbinderfraktion erklären. Denn teilweise konnte keinerlei Substanz mehr in der HPLC-MS nachgewiesen werden, obwohl die Mengen von insgesamt 20 pmol hätten ausreichen sollen, um die Substanzen detektieren zu können. Die Messungen für die Kalibrierung ergeben, dass ein Nachweis der Substanzen im MS/MS-Mode bis teilweise 1 pmol möglich ist, für alle Substanzen aber wenigstens bis zu einer Untergrenze von 10 pmol gelingt. Doch auch Messungen der Proben im MS/MS-Mode, der die Messgenauigkeit und –empfindlichkeit erhöht, brachten keine besseren Ergebnisse. Einen weiteren Vorteil der MS/MS-Messung ist die Individualität des Zerschlagungsmusters. Durch den MS/MS-Mode konnte ausgeschlossen werden, dass bei den Messungen eine Verunreinigung im HPLC-System fälschlicherweise als gesuchte Substanz gemessen wird. Ein sehr kleines Signal lässt sich so vom Untergrund unterscheiden und kann damit besser sichtbar gemacht werden.

Aus all diesen Überlegungen heraus sollte die Quantifizierbarkeit der Cdc25a-Phosphatase-Inhibitoren mit diesem System in Frage gestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich über die Ergebnisse des Gelfiltrationstest nach S. Sauer Folgendes sagen: Im Test wurden sowohl Substanzen eingesetzt, die inhibitorisch auf Cdc25a wirken, als auch Substanzen, die keine Aktivität in den colorimetrischen Test zeigten. Hier wurden exemplarisch die Ergebnisse von Substanzen dargestellt, die ein gutes Signal im LTQ gaben, und von denen eine Kalibrierkurve aufgenommen werden konnte. Doch eine quantitative Abschätzung der Bindung war nicht möglich. In fast allen Messungen konnten die eingesetzten Mengen nicht annähernd wieder gefunden werden. Hier bieten sich mehrere Erklärungen an. Zunächst könnten die Substanzen an den Säulen oder den Wänden der Eppendorfgefäße unlösbar fest binden. Sowohl bei der Binder- als auch bei der Nichtbinderfraktion wurde mit Methanol eluiert. Eventuell reichte Methanol nicht aus, um die Substanzen von der Säule zu lösen. Das zweite Problem könnte der Waschschrift sein. Dabei könnten die gebundenen Stoffe abgelöst worden sein. Da diese Fraktion verworfen wurde, konnte nicht kontrolliert werden, ob sich in ihr Substanzen befinden. Das Protein in der Binderfraktion wurde laut Dr. S. Sauer mit Hilfe von SDS-PAGE nachgewiesen. Eine weitere offene Frage ist, ob die eingesetzten Substanzen die Denaturierung bei 95°C schadlos überstehen. Auch der Binder des Modellsystems für den Aufbau des Assays (PPAR $\gamma$ -Protein mit Glitazon) konnte in unserem Massenspektrometer nicht nachgewiesen werden. Daraus folgt, dass sich aus den Ergebnissen dieses Assays keine Aussagen über Bindung oder Nichtbindung der eingesetzten Substanzen am Zielprotein treffen lassen.

### 5.2.3.2 Speed Screen

Das Speed Screen-System ist ausdrücklich auf die qualitative Ermittlung der Bindung von Substanzen hin ausgelegt. Leider stehen keine massenspektrometrischen Messungen der Nichtbinderfraktionen zur Verfügung. Daher ist nicht nachzuvollziehen, ob sich eventuell die, nur im negative mode messbaren, Substanzen größtenteils in der Nichtbinderfraktion befinden, und ob sie dort dann tatsächlich zu detektieren wären. Eigentlich sollten Substanzen mit niedrigen  $IC_{50}$  Werten für Cdc25a Bindung an die Phosphatase zeigen. Die Verbindungen mit den niedrigsten  $IC_{50}$ -Werten, also die mit der besten Inhibitorwirkung auf die Phosphatase, P338 und P367, wurden im Speed Screen nicht als Binder gefunden. Auch in diesem Test wurden die Substanzen P433, AF1C11 und AF1A10 in der Binderfraktion der Kontrolle gefunden, d.h. sie eluieren in der Fraktion der großen Moleküle, obwohl kein Protein mit eingesetzt wurde. Daraus lässt sich folgern, dass diese Verbindungen nicht an das Gelfiltrationsmaterial binden. An den Strukturen der Substanzen ist nichts Auffälliges im Vergleich zu den Strukturen der anderen eingesetzten Verbindungen (vgl. Strukturen im Anhang) zu erkennen. Ihre C Log Ps sind mit Werten zwischen 7 und 9 sehr hoch, sie sollten daher weniger leicht ausgespült werden als ein Protein-Liganden-Komplex, bei dem das Protein die Löslichkeit des Liganden erhöht. Die Substanzen P338 und P367, die eine ähnliche Struktur und genauso große C Log P-Werte besitzen, interagieren mit dem Gelfiltrationsmaterial, wie ihre Einstufung als Nichtbinder verdeutlicht.

Etliche der eingesetzten Verbindungen konnten nur im negativen Ionenmodus gefunden werden. Zudem wurden einige Substanzen als detektiert angegeben, aber mit Abweichungen von über 40 Da. An dieser Stelle würde ich nicht von einer Detektion sprechen, sondern von einer Messung von Verunreinigungen aus dem HPLC-System. Die schlechte Messbarkeit der Substanzen steht im Widerspruch zu den von mir durchgeführten Messungen, bei denen ich diese Substanzen sehr gut im positiven Ionenmodus finden und auch Kalibrierkurven für die Quantifizierung erstellen konnte. Eventuell liegt es daran, dass das für den Speed Screen eingesetzte Massenspektrometer weniger empfindlich ist als das LTQ. Speed Screen ist mit einem LCQ Classic ausgestattet. Insgesamt sind daher auch die Aussagen aus dem Speed Screen nicht sehr befriedigend. Bis auf den Fund eines validierten Binders (AF1C10), eines möglichen Binders (AF1B10) und zweier Nichtbinder (P338, P367) liessen sich über die restlichen 12 eingesetzten Verbindungen keine Aussagen treffen.

Der Vergleich der Ergebnisse der FAC-MS-Analysen, des Gelfiltrationsassays von S. Sauer und Speed Screen erfolgt in Kap. 5.2.5

### 5.2.4 Löslichkeit und promiske Inhibitoren

Ein Problem begleitete die gesamten Messungen: Die teilweise geringe Löslichkeit der Substanzen in wässriger Umgebung. Bereits bei den Inhibitoren der Farnesyltransferase zeigte sich in den Elutionsprofilen, dass sich das „Auswaschen“ etlicher Substanzen problematisch gestaltete.

Im Folgenden wird daher das Löslichkeitsproblem näher beleuchtet. Ein Maß für die Löslichkeit von Verbindungen ist der C Log P.

Entscheidend für die Verwertung eines Inhibitors als mögliches Medikament ist seine Bioverfügbarkeit. Ein wichtiger Bestimmungswert für die Bioverfügbarkeit ist der C Log P. Zunächst steht das „C“ für „Calculated“, also „berechnet“ auf Deutsch. Dieser Wert wurde also mit Hilfe von Vorwissen über die Eigenschaften von Substanzen theoretisch ermittelt. Log P beschreibt das Verhältnis der Löslichkeit einer Verbindung in Octanol gegenüber ihrer Löslichkeit in Wasser (eingeführt in den 1960ern von Hansch und Fujita). „Log“ P, da von den 10er Potenzen ausgegangen wird. Ein Log P von 1 bedeutet somit, dass eine Substanz um 10:1 in Octanol besser löslich ist, als in Wasser. Bei einem negativen Log P dreht sich das Verhältnis um, d. h. ein Log P von -1 steht für 1:10 Octanol:Wasser; bei 0 ist das Verhältnis 1:1. Experimentell kann der Log P mit verschiedenen Methoden, wie wässriger Titration, Kolbenschüttelmethode oder HPLC bestimmt werden. Die Berechnungen des C Log Ps sind allerdings für die Einschätzung einer Substanz vollkommen ausreichend (Berechnung von C Log P siehe beispielsweise Leo et al [125]). Der Log P bestimmt die Aufnahmefähigkeit von Medikamenten (orale Absorption bei 1,8; intestinale Absorption bei 1,3) und ihre Darreichungsform (Injektion bei 0; oral zwischen 0 und 3; transdermal bei 3 bis 4, wobei dies schon sehr hohe Log Ps im medizinischen Bereich sind). Der Log P sollte so niedrig wie möglich sein. Die Abhängigkeit der Löslichkeit vom Log P wird durch folgende Formel dargestellt:

$$\text{Log P} = 6.5 - 0.89(\log S) - 0.015\text{mpt.}$$

Wobei S für die Löslichkeit in  $\mu\text{mol/l}$  in Wasser und mpt für den Schmelzpunkt in Kelvin steht. [91, 135]

Die in dieser Arbeit eingesetzten Verbindungen hatten teilweise enorm große C Log P. Für die Substanzen der P-Reihe werden sie in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

**Tabelle 33:** IC<sub>50</sub> und C Log P-Werte der P-Substanzen

Substanz	IC <sub>50</sub>	C Log P	Substanz	IC <sub>50</sub>	C Log P
<b>P318</b>	2,2 $\mu\text{M}$	7,2	<b>P338</b>	1,8 $\mu\text{M}$	7,1
<b>P327</b>	3,7 $\mu\text{M}$	7,3	<b>P339</b>	2,7 $\mu\text{M}$	7,0
<b>P328</b>	1,6 $\mu\text{M}$	7,2	<b>P367</b>	1,9 $\mu\text{M}$	8,4
<b>P329</b>	3,0 $\mu\text{M}$	8,6	<b>P433</b>	17 $\mu\text{M}$	7,4
<b>P330</b>	2,5 $\mu\text{M}$	7,4	<b>P436</b>	> 100 $\mu\text{M}$	k.a.

Die Stocklösungen liegen daher auch in DMSO vor, da diese Substanzen in 10 mM-Konzentration nicht anders zu lösen wären. Dies führte zur näheren Betrachtung der Löslichkeit dieser Substanzen in Wasser.

Eine Untersuchung der üblicherweise verwendeten 100  $\mu\text{molaren}$  Lösungen (99,9 % Wasser/0,1 % DMSO) mit dem Durchlichtmikroskop zeigte Kristallbildung in den Lösungen. Organische Lösungsmittel brachten zwar die Substanzen in Lösung, können aber das Protein denaturieren. Ebenso können Detergentien zwar die Löslichkeit der Substanzen verbessern, aber auch gleichzeitig die Oberfläche von Proteinen so verändern, dass die Bindungseigenschaften des Proteins für Inhibitoren sich verändern können. Cyclodextrine scheinen daher die geeigneten Löslich-

keitsvermittler. Diese zyklischen ( $\alpha$ -1,4)-verbundenen Oligosaccheride der  $\alpha$ -D-Glucopyranose besitzen einen relativ hydrophoben zentralen Hohlraum und eine hydrophile Oberfläche. Ihre äußere Form gleicht einem aufgeschnittenen Kegel. Am weitesten verbreitet sind  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin, aus sechs, sieben bzw. acht Glucopyranoseeinheiten bestehen. [136]. Die zu lösende, eher hydrophobe, Substanz lagert sich in den Hohlraum dieses Kegels ein. Durch die hydrophile Oberfläche lösen sich die Cyclodextrine mit den eingelagerten Substanzen in Wasser. Sie umschließen die Substanzen regelrecht wie ein Käfig und disaggregieren so diese Verbindungen in Wasser.

Die Oberflächen von Proteinen hingegen verändern die Cyclodextrine nicht [136]. Der Einsatz der Cyclodextrine zur Lösung der, in dieser Arbeit eingesetzten, besonders schwer löslichen P-Substanzen (C Log P zwischen +7 und +9) zeigte zumindest unter dem Mikroskop einen Erfolg. Die Kristalle waren nach der Behandlung mit Cyclodextrinen nicht mehr zu finden (siehe Kap. 4.3.10). Allerdings zeigten die durch Cyclodextrine erhaltenen Substanzlösungen keine Veränderung im Elutionsverhalten dieser Substanzen im FAC-MS (s. Kap 4.3.8). Die Substanzen sollten sich bei der Bindung an Cdc25a aus dem Cyclodextrin-Ring lösen. Die Cyclodextrine würden dann aus dem System ausgespült werden, so dass es beim Kontakt der schwer löslichen Verbindungen mit dem wässrigen Puffer zu einem Wiederausfallen der Substanzen kommen kann, und somit keine Veränderung im Elutionsverhalten beobachtet wird. Allerdings besteht noch eine weitere Möglichkeit, die hohe unspezifische Ligandenbindung in dem System zu erklären, außer der allgemeinen "Klebrigkeit" an Trägermaterial, Schläuchen oder Säulenwänden. Die Erklärung wäre eine unspezifische Bindung an die Proteine selbst. Dafür spricht das Ergebnis einer Kontrollmessung mit proteinfreiem Säulenmaterial (s. Kapitel 4.3.4.2). Dort ist zu erkennen, dass es nur zu einer geringen zeitlichen Verzögerung bei der Elution der Substanzen kommt gegenüber dem Totvolumen. Dabei wird die Substanz mit dem größten C Log P, P367 (C Log P 8,4) am längsten verzögert, die übrigen Substanzen reihen sich nach ihren C Log Ps auf. Diese Retentionszeiten sind allerdings immer noch sehr viel kleiner als die Retentionszeiten mit Cdc25a oder BSA. Wird P367 in der Kontrollmessung mit proteinfreiem POROS um 3 Minuten verzögert eluiert, so dauert es bei Cdc25a-POROS etwa 30 Minuten und bei BSA-POROS etwa 18 Minuten bis die Elution erfolgt. Dies wirft die Vermutung auf, dass es eine weitere Bindung an Proteine außerhalb der spezifischen Bindungsstelle bei diesen Substanzen gibt.

Zwei Befunde geben einen Hinweis darauf, dass es noch andere Inhibitionsmechanismen geben könnte, als den über die Anlagerung in das aktive Zentrum des Enzyms. Zum einen zeigte die Korrelation der Retentionszeiten der vier P-Substanzen mit den  $IC_{50}$ -Werten (siehe Abbildung 108), dass eine stärkere Bindung nicht unbedingt eine bessere inhibitorische Wirkung bedeutet, da es sich hierbei auch um unspezifische Bindung handeln kann. Ergänzt wird dieser Befund durch die Ergebnisse aus Speed Screen, wonach die Substanzen P338 ( $IC_{50} = 1,8$ ) und P367 ( $IC_{50} = 1,9$ ) keine Binder sind. In diesem Zusammenhang sind die Veröffentlichungen zu „promiskuen Inhibitoren“ interessant [138, 139, 140]. Durch die neuen Methoden des High-Throughput Screenings wurden Inhibitoren gefunden, die sich nicht-kompetitiv verhalten, kaum Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität aufweisen und geringe Spezifität zeigen. In diesen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass einige bekannte Inhibitoren für Kinasen auch in

der Struktur völlig unterschiedliche Enzyme inhibieren. Detergentien zeigen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung der Substanzen. Durch Einsatz der Detergentien unterhalb ihrer kritischen Micellenkonzentration wird die inhibitorische Wirkung verringert. Dies lässt den Schluss zu, dass die Wirkung der Verbindungen auf die Enzyme in einer Aggregation besteht. Ob dies für die eingesetzten Phosphatase-Inhibitoren auch zu trifft, wäre noch zu klären im Rahmen weiterer Reihenuntersuchungen der inhibitorischen Wirkungen. Dies gehörte aber nicht zu den Zielen dieser Arbeit, deshalb wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Die Überlegungen zu promiskuen Inhibitoren und ihrer Wirkung über Aggregation sollen dazu anstossen, sich Gedanken darüber zu machen, wie sinnvoll die Sortierung der Substanzen anhand ihrer Bindung in Hochdurchsatztests überhaupt ist. Ein solcher Bindungstest würde einen Inhibitor mit einer disaggregierenden Wirkung nicht ermitteln. Das weitaus größere Problem dieser Art von Hochdurchsatz-Assays hat sich wie ein roter Faden durch diese gesamte Arbeit gezogen. Die schlechte Löslichkeit in Wasser und die damit verbundenen unspezifischen Wechselwirkungen an Oberflächen sorgte immer wieder dafür, dass spezifische Bindungen der Substanzen an die Zielproteine nur schwer zu ermitteln war.

Bei der Durchführung von colorimetrischen Assays zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von Enzyminhibitoren lassen sich die Effekte der promiskuen Inhibitoren sehr einfach durch den Zusatz von geeigneten Detergentien umgehen. Nach Ryan ist bei Zusatz der Detergentien Chaps bzw. Tween zunächst eine Erhöhung der Enzymaktivität zu beobachten [140]. Proteine in wässriger Lösung können ab einer bestimmten Konzentration aggregiert vorliegen und damit die Bindungsstellen für Substrat bzw. Inhibitoren unzugänglich sein. Durch den Zusatz milder Detergentien ist eine Disaggregation der Proteine möglich. So werden mehr aktive Zentren in der Lösung frei zugänglich, was sich durch eine Steigerung der Enzymaktivität bemerkbar macht. Weiterhin sorgt der Zusatz von Detergentien auch dafür, dass promiske Inhibitoren, die über eine Aggregation der Proteine wirksam sind, ihre Wirkung auf die Aktivität der Enzyme nicht mehr entfalten können. Nun wäre es natürlich sinnvoll, Detergentien wie Chaps oder Tween, bzw. NP-40, auch den massenspektrometrischen Bindungsassays zuzusetzen. Damit würden nicht nur promiske Effekte ausgeschaltet werden, sondern auch hydrophobe Wechselwirkungen der Substanzen mit den Protein- und Säulenmaterialoberflächen verringert werden, was insgesamt zu einer Verkleinerung der unspezifischen Bindung führt. Ein Zusatz von Detergentien könnte also die Aussagekraft der Bindungsassays erhöhen.

Es ist aber nicht möglich, einer massenspektrometrischen Messung Detergentien in ausreichenden Mengen zuzusetzen, um die störenden Wechselwirkungen zwischen Inhibitoren und Proteinen zu unterdrücken. Bei der MALDI-Massenspektrometrie basiert die Ionisationsmethode auf der Kokristallisation von Analyten mit der MALDI-Matrix. Schon geringe Konzentrationen an Detergenz kann diese Kristallisation verhindern [14]. Auch in der ESI-Massenspektrometrie verändert ein Zusatz von Detergenz die Oberflächenspannung des Flüssigkeitstropfens derart, dass die Desolvatierung gestört wird [14]. Zudem erzeugen bei beiden massenspektrometrischen Methoden die geladenen Detergenzmoleküle selbst Signale in der Messung, welche die eigentlich gesuchten Signale überlagern können.



### 5.2.5 Zusammenfassung von FAC-MS, Gelfiltrationsassay nach Sauer und Speed Screen

Verschiedene Substanzen, die in den Enzymaktivitätsassays eine inhibitorische Wirkung zeigten, konnten nicht als Binder nachgewiesen werden. Zudem lieferten die Bindungstests unterschiedliche Ergebnisse. Die Substanz AF1C10 wurde in allen drei Tests eingesetzt. Die untere Grenze der Messbarkeit von AF1C10 im LTQ liegt bei 0,1 pmol im positiven Ionenmodus. Bei der Sauer-Methode konnte zum einen die ursprünglich eingesetzte Menge von 20 pmol nicht nachgewiesen werden, zum anderen wurde in Anwesenheit des Proteins die fünffach größere Menge an Substanz in der Nichtbinderfraktion gegenüber der Binderfraktion gefunden. SpeedScreen hingegen konnte diese Substanz als Binder identifizieren. Im FAC band AF1C10 nicht an die Säule. Trotz der Versuche soweit die Konzentration minimieren, bis die Verzögerung sichtbar ist. Der  $IC_{50}$ -Wert für Cdc25a der Verbindung liegt bei 82,3  $\mu$ M und deutet darauf hin, dass es sich nicht unbedingt um einen guten Binder handelt. Allerdings sind kaum weitere Aussagen aus dem Sauer-Essay zu treffen, da er zumindest bei den massenspektrometrischen Analysen in dieser Arbeit keine aussagekräftigen Ergebnisse brachte.

Interessant ist, dass zwei Binder aus dem FAC-MS-Analysen, P338 und P367, im Speed Screen als Nichtbinder eingestuft wurden, und das nach dem Nachweis inhibitorischer Wirkung im colorimetrischen Assay. Das kann darauf hindeuten, dass Speed Screen weniger empfindlich ist gegenüber unspezifischer Bindung als die FAC-MS mit einer Cdc25a-Affinitätssäule. Dies kann daran liegen, dass eine geringere Proteinkonzentration vorliegt, und dass unspezifische Bindung an dem Gelfiltrationsmaterial stattfinden kann, das in der Mikrotiterplatte zurückbleibt und somit die Substanzen nicht unbedingt an das Protein binden müssen. Die zweite Substanz, die nach dem Speed Screen als Binder in Frage kommt, ist AF1B10. Allerdings konnte bei AF1B10, trotz mehrfacher Messungen, nur einmal eine Verzögerung der Retentionszeit beobachtet werden in der FAC-MS: an der BSA-POROS-Säule. Diese Verzögerung lässt sich durch die schlechte Wasserlöslichkeit der Substanz erklären ( $C \log P = 7,5$ ). Die Messung der restlichen Substanzen im Speed Screen führten zu keinen auswertbaren Ergebnissen, so dass der Vergleich mit den Messungen aus der FAC-MS nicht möglich ist.

Insgesamt ist der Vergleich der drei Testsysteme also schwierig. Werden diese Testsysteme zur Vorsortierung von Substanzen eingesetzt, so würden bei den drei Systemen ganz unterschiedliche Substanzen als Binder näher untersucht, bzw. als Nichtbinder für weitere Tests verworfen werden. Dies würde aber bedeuten, dass entweder Substanzen sinnlos weitergemessen werden oder aber wertvolle, aktive Verbindungen für weitere Untersuchungen verloren gehen. Damit ist der Einsatz eines Hochdurchsatz-Bindungsassays zum Finden für die Forschung interessanter Substanzen zweifelhaft. Dies mag von industrieller Seite aus anders gesehen werden. Wenn Millionen von Substanzen gemessen werden, reicht es aus, wenn fünf Prozent der echten Inhibitoren tatsächlich zur Forschung genutzt werden können, auch wenn die anderen 95% der echten Inhibitoren verloren gehen. Fünf Prozent von einer Million wären immer noch 50.000 weiterverwertbare Verbindungen aus dieser Sicht. Dazu gibt es andere Ansichten, gerade wenn eine Substanzbibliothek in der Forschung mühsam synthetisiert wurde. Dann sollte es möglich sein, jede Substanz zuverlässig in möglichst kurzer Zeit zu bewerten. Daher sollten andere Screening-Methoden in Betracht gezogen werden, die tatsächlich die Aktivität der Substanz untersuchen.

Eine Möglichkeit des Screenings, die auch die Substanzen erfasst, deren inhibitorische Wirkung über einen anderen Mechanismus abläuft, als über die Besetzung der spezifischen Bindungsstelle, ist die Ermittlung der  $IC_{50}$ -Werte durch colorimetrische Assays. Dieses Testverfahren war vor wenigen Jahren noch äußerst aufwendig, da per Hand pipettiert werden musste, und so keine hohen Durchsätze an Tests möglich waren. Durch den Einsatz von Pipettierrobotern konnte dieses Problem beseitigt werden. Ein Roboter wie er zur Zeit im MPI Dortmund eingesetzt wird, erlaubt es, etwa 18000 Assays automatisiert in 24 Stunde durchzuführen (laut Aussage von PD Prinz). Auch halten sich die Kosten für die Enzyme in einem erträglichen Rahmen, da sie im Arbeitskreis expremiert werden und die eingesetzte Menge auf 354-well-Mikrotiterplatten äußerst gering sind.

Eine weitere Möglichkeit ist ein Zellaassay, wie der Path-Detect-Assay von Stratagene [141]. Dabei wird die Wirkung der Substanzen auf einen bestimmten Signaltransduktionsweg der Zelle ermittelt. Die Zelle produziert beim Anschalten der Gene, die durch diesen Signalweg zur Expression angeregt werden, gleichzeitig zu den üblichen Expressionprodukten noch Luciferase, deren Lumineszenz in Beisein eines Substrats ausgenutzt wird, um den Grad der Aktivierung dieser Signaltransduktionskaskade festzustellen. Dies erlaubt die Detektion möglicher durch die Substanzen beeinflusste Enzyme, die dann weiter analysiert werden können [141,142].

Schon diese beiden Beispiele zeigen auf, dass es zum einen schnell einsetzbare Alternativen zu einem Bindungsassays gibt, die im hohen Durchsatz die Bestimmung der inhibitorischen Wirkung einer Substanz bei einem interessierenden Enzym erlauben. Zum anderen gibt es auch die Möglichkeit, in einem relativ schnell durchführbaren Assay überhaupt erst mögliche Ziele für die neusynthetisierten Substanzen in der Zelle zu finden.

# 6 Zusammenfassung

Im Verlauf dieser Arbeit kristallisierte sich immer mehr heraus, dass ein Bindungsassay auf Basis von massenspektrometrischer Detektion der Liganden sich nicht für heterogene Substanzbibliotheken eignet. Die unterschiedlichen Bindungsassays, deren Detektionsprinzip auf MALDI-MS oder ESI-MS beruhte, lieferten teils widersprüchliche, teils durch unspezifische Bindung wertlose Ergebnisse.

Die meisten Zielproteine („Targets“) für die heutige Pharmaforschung sind regulatorische Proteine, deren Konzentration in der Zelle so gering ist, dass sie in einem artifiziellen System (beispielsweise in Bakterien) synthetisiert („exprimiert“) werden müssen. Für die vorliegende Arbeit wurde als Zielprotein die Protein-Phosphatase CDC25A in *E. coli* exprimiert, weil in der Abteilung Waldmann am Institut für molekulare Physiologie eine Substanzbibliothek von etwa 4000 potentiellen Phosphatase-Inhibitoren für die Etablierung eines Screening-Verfahrens zur Verfügung steht. Durch die Expressierung dieses Systems wurde es möglich, in diesem Arbeitskreis einen konventionellen, photometrischen Assay hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung von Verbindungen auf die Cdc25a-Phosphatase aufzubauen.

Dieses Protein stand im Mittelpunkt der Bindungsassays und wurde neben anderen Proteinen auf unterschiedliche Arten immobilisiert, zum einen an EPOXY-Beads für einen Affinitätsassay im HPLC-Elektrospraymassenspektrometrie-System. Zum anderen durch mehrere Techniken an unterschiedliche Oberflächen, um das Protein in einem MALDI-basierten Bindungstest einzusetzen.

Die Immobilisierung der Proteine im MALDI-Assay erfolgte zum einen auf kommerziell erwerblichen vergoldeten MALDI-TOF-Probentellern der Firma Bioperseptive mit DTSP-SAM und auf Blattgold mit MPA-SAM und anschließender Aktivierung durch EDC und NHS. Hier wurden die Proteine Streptavidin, Farnesyltransferase, Ras und Cdc25a mit ihren spezifischen Bindern getestet. Zum anderen wurden in der MALDI-Massenspektrometrie ungewöhnliche Oberflächen wie Laserdruckerfolie und Nitrocellulosemembran eingesetzt. Auf die Laserdruckerfolie wurden Streptavidin und Cdc25a über Poly-L-Lysin und Quervernetzung mit Glutaraldehyd gebunden. Streptavidin und Cdc25a wurden auf der Nitrocellulosemembran durch Absorption immobilisiert.

MALDI Massenspektrometrie wäre im Prinzip die Methode der Wahl, da sie rasch und kostengünstig durchzuführen ist. Allerdings waren die Probleme mit der unspezifischen Bindung von schlecht wasserlöslichen Substanzen an die Assay-Oberflächen gravierend. Die Messungen mussten einzeln hinsichtlich spezifischer und unspezifischer Bindung hin ausgewertet werden, was einen hohen zeitlichen Aufwand bedeutete. Gerade den zeitlichen Aufwand für die Einzelmessung und deren Auswertung gilt es in einem High-Troughput-System zu minimieren. Zudem

waren bei keiner der unterschiedlichen Immobilisierungstechniken die Ergebnisse nach dem Bindungsassay zuverlässig reproduzierbar. Daher kann ein MALDI-basierter Bindungstest kaum zu einem Routineeinsatz kommen. Erwartungen, die durch frühere Arbeiten [22, 21, 31, 104] geweckt wurden, diese Methode für das Screening verwenden zu können, wurden nicht bestätigt.

Die Immobilisierung an die EPOXY-Beads wurde erfolgreich überprüft durch SDS-PAGE der wiederabgelösten Proteine Ras und BSA. Experimente mit Guanylatkinase gebunden an die EPOXY-Beads zeigten eine Umwandlung von Substraten zu Produkten (GDP und ATP zu GTP und ADP). Die Guanylatkinase war demnach noch funktionstüchtig nach ihrer Modifizierung. Insgesamt konnte damit nachgewiesen werden, dass sich aktives Enzym in den Affinitätssäulen befand. Zur Elution von Bindern in dem ESI-MS-Bindungsassay wurden zwei Methoden eingesetzt: Die Denaturierung des Proteins, um starke Binder, wie Streptavidin, zu lösen, und die Verdrängung des Binders durch andere Liganden oder Salze.

Im Einzelnen wurden mit den ersten beiden Methoden des ESI-Assays folgende Proteine untersucht: Zunächst Streptavidin mit seinem Bindungspartner Biotin als positives System zum Aufbau des Assays. Dann folgten Farnesyltransferase mit möglichen Farnesyltransferase-Inhibitoren. Bei den weiteren Proteinen handelte es sich um GMPKinase und Ras, deren Bindungspartner die Nukleotide und auch GTPase-Aktivatoren sind. Hier konnten bei den Bindungsstudien von Nukleotiden und Ras bzw. Guanylatkinase Erfolge erzielt werden. Im Fall des Ras geschah die Elution der Nukleotide mit Salzen, im Fall der Guanylatkinase durch Verdrängung mit unterschiedlichen Nukleotiden. Die Farnesyltransferase mit ihren Inhibitoren stellte das erste problematische System dar, in dem sich unspezifische Bindung der Inhibitoren an einer BSA-POROS-Säule zeigte. Einige GTPase-Aktivatoren hingegen zeigten Bindung an die Ras-POROS-Säule und ließen sich durch Lösungsmittel eluieren.

Eine dritte Variante verzichtete auf das gezielte Eluieren der Liganden durch Denaturierung oder Verdrängung, die frontale Affinitätschromatographie (frontal affinity chromatography, FAC) gekoppelt an das ESI-MS. Neu war die Durchführung einer FAC ohne das ständige Infundieren von Substanz. Diese Form des HPLC-MS-Bindungsassays wurde mit der Phosphatase Cdc25a und ihren möglichen Inhibitoren durchgeführt. Die Bestimmung von Dissoziationskonstanten erfolgte unter Aufgabe eines bestimmten Volumens auf die Affinitätssäule. Dadurch konnte Material und Zeit gespart werden. Allerdings war die unspezifische Bindung einiger Substanzen, nachgewiesen an einer mit BSA-POROS beladenen Säule, so groß, dass diese Aussagen über die Bindungskonstanten für schlecht lösliche Substanzen unzuverlässig sind.

Eine weitere Variante eines massenspektrometrie-basierten Bindungsassays stellte der Gelfiltrationsassay mit direkt-gekoppelter (Speed Screen) oder anschließender Analyse der Fraktionen (S. Sauer) in der ESI-MS dar. Im Prinzip sollte durch den Gelfiltrationsassay von S. Sauer eine Quantifizierung der gebundenen bzw. nicht-gebundenen Substanzen möglich sein. Dies gelang jedoch nicht zuverlässig. ESI-Massenspektrometrie war zur Quantifizierung hier nicht geeignet, da sich nicht nur die Kalibration als schwierig und ungenau herausstellte, sondern weil viele der getesteten Substanzen schlecht wasserlöslich sind und somit als Spuren im System verblieben,

welche eine zuverlässige Quantisierung verhinderten. Es konnten keine sinnvollen Schlüsse aus den Messungen gezogen werden. Speed Screen sollte lediglich eine Aussage darüber treffen, ob ein Binder oder Nicht-Binder vorliegt. Es ergaben sich jedoch nur wenig verwertbare Ergebnisse, die dann auch noch im Widerspruch zu den Analysen in der FAC und den  $IC_{50}$ -Werten der Substanzen standen.

Es zeigte sich auch im ESI-MS-Assay, dass die meisten synthetisierten Verbindungen unserer Substanzbibliothek an recht unterschiedliche Proteine mit sehr ähnlicher Affinität binden. Dabei zeigte sich die generelle Grenze der Methode: Man kann bei Bindungsstudien nicht a priori zwischen spezifisch und unspezifisch gebundenen Substanzen unterscheiden. Die Unterscheidung wird entweder durch Vergleichsmessungen oder durch Kompetitionsbindungsstudien getroffen. Das ist von der Detektionsmethode (Massenspektrometrie, Radioaktivität, Fluoreszenz...) weitgehend unabhängig. Abhängig ist die unspezifische Bindung an Proteine dagegen von der Löslichkeit der Liganden in wässrigen Phasen.

Daher ist zu überlegen, wie sinnvoll der Einsatz solcher High-Troughput-Systeme für Protein-Liganden-Bindungen überhaupt ist. Drei verschiedene Affinitätsbindungstests, welche die Binder mittels HPLC-MS detektierten sollten, brachten zumeist wenig zuverlässige Ergebnisse. Dort, wo ein aussagekräftiges Ergebnis in allen Tests erzielt werden konnte, widersprachen sich FAC/MS, Sauer-Assay und Speed Screen. Besser wäre es, den Einfluss der Substanzen auf die Enzymaktivität zu messen. Durch Pipettierroboter wird ermöglicht, was zu Beginn der Arbeit noch sehr aufwendig schien. Viele einzelne Substanzen können nun hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung in kurzem Zeitraum getestet werden. Auch die Kosten für die Enzyme halten sich in einem gewissen Rahmen, wenn sie nicht kommerziell erworben werden müssen, sondern in der Arbeitsgruppe hergestellt werden. Auch neue Zellassays ermöglichen ein viel breiteres Spektrum der Aktivitätsbestimmung der Substanzen und sollten weiterausgebaut werden.



# 7 Literatur

- [1] Gish L.G. und Vachet R.W.: The basics of mass spectrometry in the twenty-first century (2003); *Nature Rev. Drug Disc.* 2; 140-150
- [2] Kassel D.B.: Combinatorial Chemistry and Mass Spectrometry in the 21st Century Drug Discovery Laboratory (2001); *Chem. Rev.* 101, 255-267
- [3] Triolo A., Altamura M., Cardinali F., Sisto A. and Maggi C.A.: Mass spectrometry and combinatorial chemistry: a short outline (2001); *J. Mass Spectrom.* 36, 1249-1259
- [4] Shin Y.G. and Breemen R.B.v.: Analysis and screening of combinatorial libraries using mass spectrometry (2001); *Biopharm. Drug Dispos.* 22, 353-372
- [5] Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, Eisenstein S, Rosen B, Lau AY, Walter JC, LaBaer J.: Self-assembling protein microarrays. *Science* 2004 Jul 2; 305(5680): 86-90
- [6] Ramachandran N, Hainsworth E, Demirkan G, LaBaer J.: On-chip protein synthesis for making microarrays, *Methods Mol Biol.* 2006; 328:1-14.
- [7] Thomson J.J.: On the Masses of the Ions in Gases at Low Pressures (1899); *Philosophical Magazine*, 48, 295, 547-567
- [8] Thompson J.J.: Rays of Positive Electricity (1911); *Phil. Mag.*, 6, 20, 752-67
- [9] Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis, (*Longmans, Green and Co. Ltd., London*, 1913 )
- [10] a)William Stephens presents concept of linear time-of-flight mass spectrometer (TOFMS) at American Physical Society meeting in Cambridge,MA [(1946). *Phys. Rev.*69, 691; (1946).*Bull. Am. Phys. Soc.* 21(2),
- [11] a)A.E. Cameron and D.F. Eggers publish first design and mass spectra for linear TOFMS in *Laboratory and Shop Notes* [(1948). *Rev. Sci. Instrum.* 19(9), 605-607.] b)A.E. Cameron and D.F. Eggers publish first design and mass spectra for linear TOFMS in *Laboratory and Shop Notes* [(1948). *Rev. Sci. Instrum.* 19(9), 605-607.]
- [12] S.A. Goudsmit presents concept of a magnetic field TOFMS in letter to the editor of the *Physical Review* [(1948). *Phys. Rev.* 74, 622-623.]
- [13] Karas M., Bachmann D., Bahr U. und Hillenkamp F.: Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds (1987); *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 78, 53-68
- [14] Lottspeich F., Zorbas H. (Hrsg.): *Bioanalytik*, Spektrum Verlag, Heidelberg
- [15] Fenn J.B, Mann M., Meng C.K., Wong S.F. und Whitehouse C.M.: Electrospray Ionisation for Mass Spectrometry of large Biomolecules (1989); *Science* 246 (4926), 64-71
- [16] Krone J.R., Nelson R.W., Dogruel D., Williams P. und Granzow R.: BIA/MS: Interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry (1997); *Anal. Biochem.* 244, 124-132
- [17] Nelson R. W. und Krone J.R.: Advances in surface plasmon resonance biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS) (1999); *J. Mol. Recognit.* 12, 77-93

- [18] Nelson R.W., Krone J.R., Bieber A.L. und Williams P.: Mass spectrometric immunoassay (1995); *Anal. Chem.* 67, 1153-1158
- [19] Schlüter H., Jankowski J., Rykl J., Thiemann J., Belgardt S., Zidek W., Wittmann B. und Pohl T.: Detection of protease activities with the mass-spectrometry-assisted enzyme-screening (MES) system (2003); *Anal Bioanal Chem* 377 : 1102–1107
- [20] Katz, E.Y. J. *Electroanal. Chem.* (1990) 291, 257-260
- [21] Bundy J. und Fenselau C: Lectin-based affinity capture for MALDI-MS analysis of bacteria (1999); *Anal. Chem.* 71, 1460-1463
- [22] Brockman A.H. und Orlando R.: Probe-immobilized affinity chromatography/mass spectrometry (1995); *Anal. Chem.* 67, 4581-4585
- [23] Neubert H., Jacoby E.S., Bansal S.S., Iles R.K., Cowan D.A. und Kicman A.T.: Enhanced affinity capture MALDI-TOF MS: orientation of an immunoglobulin G using recombinant protein G (2002); *Anal. Chem.* 74, 3677-3683
- [24] Schriemer D.C. und Li, L.: Combining avidin-biotin chemistry with matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry (1996); *Anal. Chem.* 68, 3382-3387
- [25] Campuzano S., Galvez R., Pedrero F., de Villena F.J.M. und Pingarron A: Determination of phenolic compounds with an amperometric tyrosinase biosensor based on a gold disk electrode modified with a self-assembled monolayer (2002); Poster, Euroanalytica, Dortmund, September 2002
- [26] Campuzano S., Pedrero F., de Villena F.J.M. und Pingarron A.: Lactulose bienzyme biosensors based on self-assembled monolayer modified electrodes (2003); *Electroanal.* 16 (17), 1385-1392
- [27] Campuzano S., Galvez R., Pedrero F., de Villena F.J.M. und Pingarron A: Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetra-thiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode (2001); *Electrochem. Soc.* 602, 2001-2018
- [28] Serra B., Jimenez S., Mena M.L., Reviejo A.J. und Pingarron J.M.: Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices for the construction of amperometric tyrosinase biosensors (2002); *Biosens. Bioelectron* 17 (3), 217-226
- [29] Koopmann J.O. und Blackburn J.: High affinity capture surface for matrix-assisted laser desorption/ionisation compatible protein microarrays (2003); *Rapid Comm. Mass Spect.* 17, 455-462
- [30] Alfonso, C. und Fenselau C.: Use of bioactive glass slides for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis: application to microorganisms (2003); *Anal. Chem.* 75, 694-697
- [31] Bundy J.L. und Fenselau C.: Lectin and carbohydrate affinity capture surfaces for mass spectrometric analysis of microorganisms (2001); *Anal. Chem.* 73, 751-757
- [32] Subramanian A., Kennel S.J., Oden P.I., Jacobsen K.B., Woodward J. und Doktycz M.J.: Comparison of techniques for enzyme immobilisation on silicon supports (1998); *Enz. Micro. Tech.* 24, 26-34
- [33] Sun S., Mo W., Ji Y. und Liu S.: Use of nitrocellulose films for affinity-directed mass spectrometry for the analysis of antibody/antigen interactions (2001); *Rapid Comm. Mass Spect.* 15, 1743-1764



- [34] Van Breemen R.B., Huang C.R., Nikolic D., Woodbury C.P., Zhao Y.Z. und Venton D.L.: Pulsed ultrafiltration mass spectrometry: a new method for screening combinatorial libraries (1997); *Anal. Chem.* 69, 2159-2164
- [35] Elswijk D.A van, Tjaden U.R., Greef J. van der und Irth H.: Mass spectrometry-based bioassay for the screening of soluble orphan receptors (2001); *Int. J. Mass Spectr.* 210/211, 625-636
- [36] Kircher V. und Parlar H.: Determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol from human salvia by tandem immunoaffinity chromatography-high-performance liquid chromatography (1996); *J. Chromat. B* 677, 245-255
- [37] Andrisano V., Bartolini M., Gotti R., Cavrini V. und Felix G.: Determination of inhibitors' potency ( $IC_{50}$ ) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column (2001); *J. Chromat. B* 753, 375-383
- [38] Zhang B., Palic M.M., Schriemer D.C., Alvarez-Manilla G.A., Pierce M. und Hindsgaul O.: Frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry for screening mixtures of enzyme inhibitors (2001); *Anal. Biochem.* 299, 173-182
- [39] Schriemer D.C., Bundle D.R., Li L. und Hindsgaul O.: Micro-scale frontal affinity chromatography with mass spectrometric detection: a new method for the screening of compound libraries (1998); *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 3383-3387
- [40] Zhang B., Palic M.M., Schriemer D.C., Alvarez-Manilla G., Pierce M. Und Hindsgaul O.: Frontal affinity chromatography coupled to mass spectrometry for screening mixtures of enzyme inhibitors (2001); *Anal. Biochem.* 299, 173-182
- [41] Arata Y., Hirabayashi J. und Kasai K.I.: Application of reinforced frontal affinity chromatography and advanced processing procedure to the study of the binding property of a *Caenorhabditis elegans* galectin (2001); *J. Chromat. A* 905, 337-343
- [42] Hirabayashi J., Arata Y. und Kasai K.I.: Reinforcement of frontal affinity chromatography for effective analysis of lectin-oligosaccharide interactions (2000); *J. Chromat. A* 890, 261-271
- [43] Chan N.W.C., Lewis D.F., Rosner P.J., Kelly M.A. und Schriemer D.C.: Frontal affinity chromatography-mass spectrometry assay technology for multiple stages of drug discovery: applications of a chromatographic biosensor (2003); *Anal. Biochem.* 319, 1-12
- [44] Zhu L., Chen L., Luo H. und Xu X.: Frontal affinity chromatography combined on-line with mass spectrometry: a tool for the binding study of different epidermal growth factor receptor inhibitors (2003); *Anal. Chem.* 75, 6388-6393
- [45] Luo H., Chen L., Li Z., Ding Z. und Xu X.: Frontal immunoaffinity chromatography with mass spectrometric detection: a method for finding active compounds from traditional Chinese herbs (2003); *Anal. Chem.* 75, 3994-3998
- [46] Kasai K., Oda Y., Nishikata M. und Ishii S.: Frontal affinity chromatography: Theory for its application to studies on specific interactions of biomolecules (1996); *J. Chromat. Biomedical Applications* 376, 33-47
- [47] Ng ES, Yang F, Kameyama A, Palic M.M., Hindsgaul O und Schriemer D.C.: High-throughput screening for enzyme inhibitors using frontal affinity chromatography with liquid chromatography and mass spectrometry. (2005), *Anal. Chem.* 77 (19), 6125-33
- [48] Schriemer D.C.: Biosensor alternative: frontal affinity chromatography. (2004) *Anal. Chem.* 76 (23), 440A-448A

- [49] Bio Perceptive POROS 20 EP Media Operating Instructions
- [50] Wheatley J.B. und Schmidt D.E. Jr.: Salt-induced immobilisation of affinity ligands onto epoxide-activated supports (1999); *J. Chromat. A* 849, 1-12
- [51] Blom K. F., Larsen B. S. und McEwen C. N.: Determining Affinity-Selected Ligands and Estimating Binding Affinities by Online Size Exclusion Chromatography/Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (1999); *J. Comb. Chem.*, 1, 82-90
- [52] Moy F.J. et al.: MS/NMR: A structure-based approach for discovering protein ligands and for drug design by coupling size exclusion chromatography. Mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy (2001); *Anal. Chem.* 73, 571-581
- [53] Muckenschnabel I., Falchetto R., Mayr L.M. und Filipuzzi I.: SpeedScreen: label-free liquid chromatography-mass spectrometry-based high-throughput screening for the discovery of orphan protein ligands (2004); *Anal. Biochem.* 324, 241-249
- [54] Green N.M.: Avidin and Streptavidin (1990); *Meth. Enzym.* 184, 51-58
- [55] Ehrhardt A., Ehrhardt G.R.A., Guo X. und Schrader J.W.: Ras and its relatives-job and networking keep an old family together (2002); *Exp. Hema.* 30, 1089-1106
- [56] Scheffzek K., Kabsch W., Schlichting I., Pai E.F., Lautwein A., Frech M., Wittinghofer A. and Goody R.: Crystallization and preliminary x-ray structure analysis of thermally unstable p21<sup>H-ras</sup> guanosine complexes (1994); *Acta Cryst. D* 50, 521-526
- [57] Vetter I.R. and Wittinghofer A.: The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions (2001); *Science*, 294, 1299-1304
- [58] Konrad
- [59] Hall, S. W., and Kühn, H. (1986) Purification and properties of guanylate kinase from bovine retinas and rod outer segments. *Eur. J. Biochem.* 161, 551-556.
- [60] Gaidarov, I. O., Suslov, O. N., and Abdulaev, N. G. (1993) Enzymes of the cGMP metabolism in bovine retina. I. Cloning and expression of the gene for guanylate kinase. *FEBS Lett.* 335, 81-84.
- [61] Gentry, D., Bengra, C., Ikehara, K., and Cashel, M. (1993) Guanylate kinase of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* 268, 14316-14321.
- [62] Agarwal K.C., Miech R.P. und Parks R.E.: Guanylate Kinase from human erythrocytes, hog brain and rat liver (1978); *Methods Enzymol.* 51, 483-490
- [63] Li, Y., Zhang, Y., and Yan, H. (1996) Kinetic and thermodynamic characterizations of yeast guanylate kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 28038-28044.
- [64] Liang P.H., Ko T.P. und Wang A.H.J.: Structure, mechanism and function of prenyltransferases (2002); *Eur. J. Biochem.* 269, 3339-3354
- [65] Stehle, T., and Schulz, G. E. (1992) Refined structure of the complex between guanylate kinase and its substrate GMP at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 224, 1127-1141.
- [66] Müller-Dieckmann, H. J., and Schulz, G. E. (1995) Substrate specificity and assembly of the catalytic center derived from two structures of ligated uridylate kinases. *J. Mol. Biol.* 246, 522-530.
- [67] Miech, R. P., and Parks, R. E. (1965) Adenosine triphosphate: guanosine monophosphate phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* 240, 351-357.

- [68] Woods, D. F., and Bryant, P. J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66, 451-464.
- [69] Wittinghofer A. und Waldmann H.: Ras - A molecular switch involved in tumor formation. (2000) *Angewandte Chemie International Edition* 39, 4192-4214
- [70] Thutewohl M., Kissau L., Popkirova B., Karaguni I.M. Nowak T., Bate M. Kuhlmann J. Müller O. und Waldmann H.: Solid-phase synthesis and biological evaluation of a Peptidocinnamin E library (2002); *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 19, 3616-3620
- [71] Thutewohl M.: Kombinatorische Festphasensynthese von Analoga des Farnesyltransferase-Inhibitors Peptidocinnamin E und deren biologische Evaluierung (2002), Dissertation, Universität Dortmund
- [72] Nilsson I., Draetta G. and Karsenti E: Activation of the phosphate activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G<sub>1</sub>/S transition (1994); *EMBO J.* 13, 4302-4310
- [73] Nilsson I., Clarke P.R., Marcote M.J., Karsenti E. and Draetta G.: Phosphorylation and activation of human cdc25C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis (1993); *EMBO J.* 12, 53-63
- [74] Nilsson I. und Hoffmann I.: Cell cycle regulation by Cdc25 phosphatase family (2000); *Prog. Cell Cyc. Res.* 4, 107-114
- [75] Zhao H., Watkins J.L. und Piwnic-Worms H.: Disruption of the Checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionising radiation-induced S and G<sub>2</sub> checkpoints (2002); *PNAS* 99, 23, 14795-14800
- [76] Jinno S.: Cdc25a is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle (1994); *EMBO J.* 13, 1549-1556
- [77] Mailand N., Podtelejnikov A.V., Groth A. Mann M., Bartek J. und Lukas J.: Regulation of G<sub>2</sub>/M events by Cdc25a through phosphorylation-dependent modulation of its stability (2002); *EMBO J.* 21, 21, 5911-5920
- [78] Morgan D.O.: Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors (1997); *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261-291
- [79] Fauman E.B., Cogswell J.P., Lovejoy B., Rocque W.J., Holmes W., Montana V.G., Piwnica-Worms H., Rink M.J. und Saper M.A.: Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25a (1998); *Cell*, 93, 617-625
- [80] McCain, D. F., Catrina I.E., Hengge, A. C. and Zhang Z.-Y.: The catalytic mechanism of Cdc25a Phosphatase; *J. Biol. Chem* (2002) Vol. 277, No. 13, 11190-11200
- [81] Lyon M. A., Ducruet A.P., Wipf P. und Lazo J.S.: Dual-specific phosphatases as targets for antineoplastic agents (2002); *Nature Rev. Drug Disc.* 1, 961-976
- [82] McCain D.F., Wu L., Nickel P., Kassack M.U., Kreimeyer A., Gagliardi A., Collins D.C. und Zhang Z.-Y.: Surinam derivatives as inhibitors and activators of protein-tyrosine phosphatases (2004); *J. Biol. Chem.* 279, 15, 14713-14725
- [83] Erdogan-Orhan I., Sener B., Rosa, S. De, Perez-Baz J., Lozach O., Leost M., Rakhilin S. und Meijer L.: Polyprenyl-hydroquinones and -furans from three marine sponges inhibit the cell cycle regulating phosphatase Cdc25a (2004); *Nat. Pro. Res.* 18, 1, 1-9

- [84] Manger M, Scheck M, Prinz H, von Kries JP, Langer T, Saxena K, Schwalbe H, Furstner A, Rademann J, Waldmann H: Discovery of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase A (MptpA) inhibitors based on natural products and a fragment-based approach. *Chem-biochem*. 2005 Oct;6(10):1749-53.
- [85] Dissertation Wittenberg, Universität Dortmund, 2004
- [86] Koch MA, Wittenberg LO, Basu S, Jeyaraj DA, Gourzoulidou E, Reinecke K, Odermatt A, Waldmann H. Compound library development guided by protein structure similarity clustering and natural product structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 30;101(48):16721-6. Epub 2004 Nov 17.
- [87] Wabnitz P.A. and Loo J.A.: Drug screening of pharmaceutical discovery compounds by micro-size exclusion chromatography/mass spectrometry (2002); *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 16, 85-91
- [88] Maniatis T., Sambrook, J, und Fritsch, E.F. *Molecular cloning: A laboratory manual*. (1989) Cold Spring Harb. Lab. Press.
- [89] Stoll V.S. und Blanchard J.S.: *Buffers: Principles and practice (1990)*; *Meth. Enzym*. 182, 24-38
- [90] Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem*. 72, 248-254: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
- [91] Bannerjee, Yalkowsky and Valvoni (1980) *Envir.Sci.Tech*. 14, 1227
- [92] Stoll V.S. und Blanchard J.S.: *Buffers: principles and practice (1990)*; *Meth. Enzymol*. 182, 24-38
- [93] Baratte, B. et al. (1992) *Anticancer Research* 12, 873-880: Screening for antimitotic Compounds using the cdc25 Tyrosine Phosphatase, an Activator of the Mitosis-Inducing p34cdc2/Cyclin Bcdc13 Protein Kinase
- [94] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 (1970); *Nature* 227, 680-685
- [95] Zimmerman K. K., Scholten J. D., Huang C. C., Fierke C. A. and Hupe, D. J.: High-level expression of rat farnesyl:protein transferase in Escherichia coli as a translationally coupled heterodimer; *Protein Expression and Purification (1998)* Vol. 14, 395-402
- [96] Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gel; (1996) *Anal. Chem*. 68 (5) 850
- [97] Wilm M. und Mann M.: Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. (1996) *Anal Chem*. 68, 1-8. [98] McCain D.F., Catrinias I.E, Hengge A.C. und Zhang Z.-Y.: The catalytic mechanism of Cdc25a phosphatase (2002); *J. Biol. Chem*. 277, 13, 11190-11200
- [99] Loukaci A., Le Saout I., Leclerc S., Damiens E., Meijer L., Debitus C. und Guyot M.: Coscinsulfate, a Cdc25a phosphatase inhibitor from the sponge coscinoderma mathewsi; (2001) *Bioorg. Med. Chem*. 9 (11), 3049-3054
- [100] Rudolph R., Epstein D. M., Parker L. und Eckstein J.: Specificity of natural and artificial substrates for human cdc25a (2001); *Anal. Biochem*. 289, 43-51

- [101] Eckstein J. W., Beer-Romero P. und Berdo I.: Identification of an essential acidic residue in cdc25 protein phosphatase and a general three-dimensional model for a core region in protein phosphatases (1996); *Protein Sci.* 5, 5-12
- [102] Fürstner A., Reinecke K., Prinz H. und Waldmann H.: The Core Structures of Roseophilin and the Prodigiosin Alkaloids Define a New Class of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors (2004) *ChemBioChem*, 5, 1575–1579
- [103] Nedelkov D. und Nelson R.W.: Design and use of multi-affinity surfaces in biomolecular interaction analysis–mass spectrometry (BIA/MS): a step toward the design of SPR/MS arrays; (2003), *J. Mol. Recognit.*, 16: 15–19
- [104] Brockman A.H. und Orlando R.: New immobilization chemistry for probe affinity mass spectrometry. (1996) 10 (13), 1688-1692
- [105] Benitez M.J. und Jimenez J.S.: A method of reversible biomolecular immobilization for the surface plasmon resonance quantitative analysis of interacting biological macromolecules; (2002) *Anal. Biochem.* 302, 161-168
- [106] Allain L.R., Askari M., Stokes D.L. und Vo-Dinh T.: Microarray sampling-platform fabrication using bubble-jet technology for a biochip system (2001); *Fresenius J. Anal. Chem.* 371, 146-150
- [107] Villanueva J., Philip J., Entenberg D., Chaparro C.A., Tanwar M.K., Holland E.C. und Tempst P.: Serum Peptide Profiling by Magnetic Particle-Assisted, Automated Sample Processing and MALDI-TOF Mass Spectrometry; (2004) *Anal. Chem.* 76, 1560-1570
- [108] Yaneva M. und Tempst P.: Affinity Capture of Specific DNA-Binding Proteins for Mass Spectrometric Identification; (2003) *Anal. Chem.* 75, 6437-6448
- [109] Nedelkov D., Tubbs K. A., Niederkofler E. E., Kiernan U. A. und Nelson R. W.: High-Throughput Comprehensive Analysis of Human Plasma Proteins: A Step toward Population Proteomics; (2004), *Anal. Chem.*, 76, 1733-1737
- [110] Kissau, L.: Kombinatorische Festphasensynthese und Molecular Modelling Studien von Inhibitoren und Aktivatoren Signal-transduzierender Enzyme; Dissertation, November 2002, Universität Dortmund
- [111] Prinz H., Lavie A., Scheidig A.J., Spangenberg O. and Manfred Konrad: Binding of nucleotides to guanylate kinase, p21<sup>ras</sup>, and nucleoside-diphosphate kinase studies by nano-electrospray mass spectrometry (1999); *J. biol. chem.* 274, No. 50, 35337-35342
- [112] Mistou M.Y., Cool R.H. and Parmeggiani A.: Effects of ions on the intrinsic activities of c-H-ras protein p21 (1992); *Eur. J. Biochem.* 204, 179-185
- [113] Renault L., Kuhlmann J., Henkel A. and Wittinghofer A.: Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1) (2001); *Cell*, 105, 245-255
- [114] Prinz H., Lavie A., Scheidig A.J., Spangenberg O. and Manfred Konrad: Binding of nucleotides to guanylate kinase, p21<sup>ras</sup>, and nucleoside-diphosphate kinase studies by nano-electrospray mass spectrometry (1999); *J. biol. chem.*, 274, 50, 35337-35342
- [115] Lenzen C., Cool R.H., Prinz H. Kuhlmann J. and Wittinghofer A.: Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25<sup>Mm</sup> (1998); *Biochemistry*, 37, 7420-7430

- [116] Scheffzek K., Kabsch W., Schlichting I., Pai E.F., Lautwein A., Frech M., Wittinghofer A. and Goody R.: Crystallization and preliminary x-ray structure analysis of thermally unstable p21<sup>H-ras</sup> guanosine complexes (1994); *Acta Cryst. D*, 50, 521-526
- [117] Fürstner A., Ruiz-Caro J., Prinz H. und Waldmann H.: Structure assignment, total synthesis and evaluation of the phosphate modulating activity of glucolipsin A (2004); *J. Org. Chem.*, 69, 459-467
- [118] Kar S., Lefterov I.M., Wang M., Lazo J.S., Scott C.N., Wilcox C.S. und Carr B.I.: binding and inhibition of Cdc25 phosphatases by Vitamin K analogues (2003); *Biochemistry* 42, 10490-10497
- [119] Brohm D., Philippe N., Metzger S., Bhargava A., Müller O., Lieb F. und Waldmann H.: Solid-phase synthesis of dysidiolide-derived protein phosphatase inhibitors (2002); *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13171-13178
- [120] Morgan D.O.: Principles of CDK regulation (1995); *Nature* 374, 131-134
- [121] Honda R., Ohba Y., Nagata A., Okayama H. und Yasuda H.: Dephosphorylation of human p34<sup>cdc2</sup> kinase of both Thr-14 and Tyr-15 by human Cdc25B phosphatase (1993); *FEBS Lett.* 318, 331-334
- [122] Sebastian B., Kakizuka A. and Hunter T.: Cdc25 M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15 (1993); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3521-3524
- [123] Galaktionov K.I., Beach D.: Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins (1991); *Cell* 67, 1181-1194
- [124] Köhn M. Dissertation: Immobilisierungsstrategien zur Herstellung von Peptid- und Wirkstoff-Arrays und deren Anwendung; Universität Dortmund 2005
- [125] Leo A.J. und Hoekman D.: Calculating log P(oct) with no missing fragments; The problem of estimating new interaction parameters (2000); *Perspec. Drug Dis. Des.* 18, 19-38
- [126] Bakhtiar R. und Nelson R.W.: Electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption ionization in mass spectrometry (2000); *Biochem. Pharm.* 59, 891-905
- [127] Franklin J. Moy, Kevin Haraki, Dominick Mobilio, Gary Walker, and Robert Powers, Keiko Tabei, Hui Tong, and Marshall M. Siegel: MS/NMR: A Structure-Based Approach for Discovering Protein Ligands and for Drug Design by Coupling Size Exclusion Chromatography, Mass Spectrometry, and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy *Anal. Chem.* 2001, 73, 571-581
- [128] Karl F. Blom, Barbara S. Larsen, and Charles N. McEwen: Determining Affinity-Selected Ligands and Estimating Binding Affinities by Online Size Exclusion Chromatography/Liquid Chromatography-Mass Spectrometry *J. Comb. Chem.* 1999, 1, 82-90
- [129] Li Y., Ogata Y., Freeze H. H., Scott C. R., Turecek F. und Gelb M. H.: Affinity capture and elution/electrospray ionization mass spectrometry assay of phosphomannomutase and phosphomannose isomerase for multiplex analysis of congenital disorders of glycosylation types Ia and Ib (2003); *Anal. Chem.* 75, 42-48
- [130] Zhang B., Palcic M.M., Mo H., Goldstein I.J. und Hindsgaul O.: Rapid determination of the binding affinity and specificity of the mushroom *Polyporus squamosus* lectin using frontal

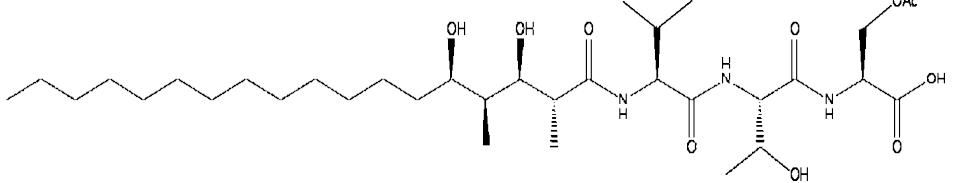
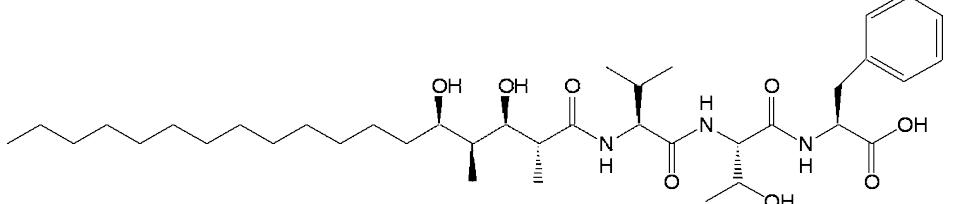
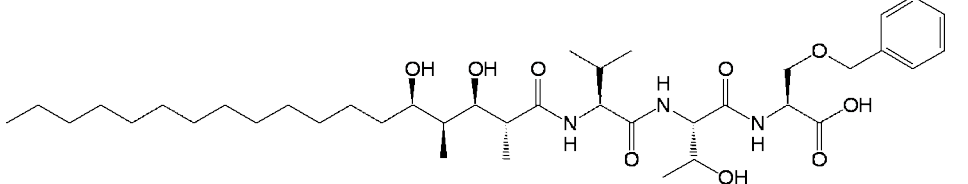
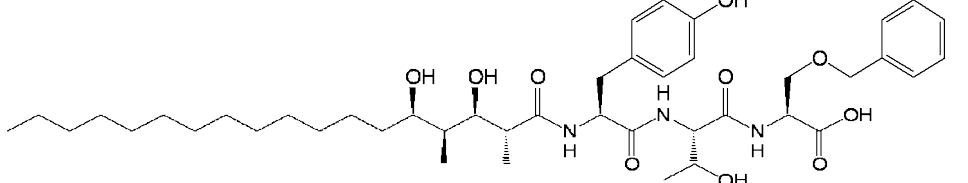
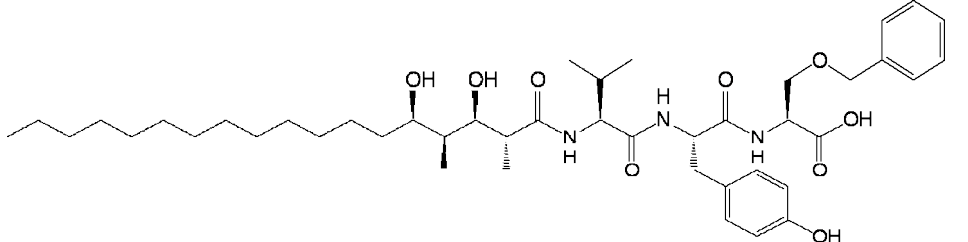
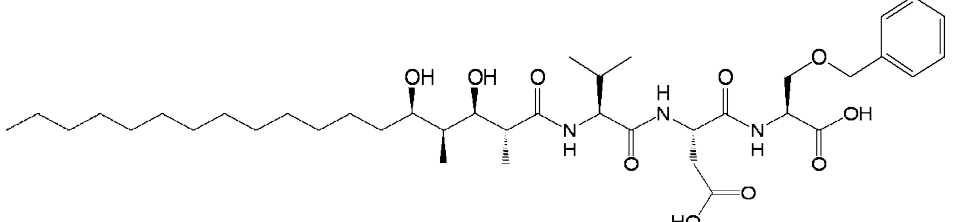
- affinity chromatography coupled to electrospray mass spectrometry (2001); *Glycobiology* 11, 2, 141-147
- [131] Rempel B.P., Winter H.C., Goldstein I.J. und Hindsgaul O.: Characterization of the recognition of blood group B trisaccharide derivatives by the lectin from *Marasmius oreades* using frontal affinity chromatography-mass spectrometry (2003) *Glycoconjugate Journal* 19, 175–180
- [132] Lee M.S. and Kerns E.H.: LC/MS applications in drug development (1999); *Mass Spectrom. Rev.* 18, 187-279
- [133] Hirabayashi J., Hashidate T., Arata Y., Nishi N., Nakamura T., Hirashim M., Urashima T., Oka T., Futai M., Muller W.E.G., Yagi F. und Kasai K.: Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography (2002); *Biochimica et Biophysica Acta* 1572, 232–254
- [134] Slon-Usakiewicz J., Ng W., Dai J.-R., Pasternak A. und Redden P.: Frontal affinity chromatography with MS detection (FAC-MS) in drug discovery (2005); *Drug disc. td.* 10 (6), 409-416
- [135] Bannerjej, Yalkowsky and Valvoni (1980) *Envir.Sci.Tech.* 14, 1227
- [136] Loftsson T. und Brewster M.E.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization (1996); *J. Pharm. Sci.* 85, 10, 1017-1025
- [137] Guernelli S., Lagana M.F., Mezzina E., Ferroni F., Siani G. und Spinelli D.: Supramolecular complex formation: A study of the interactions between  $\beta$ -cyclodextrin and some different classes of organic compounds by ESI-MS, surface tension measurements, and UV/Vis and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (2003); *Eur. J. Org. Chem.* 4765-4776
- [138] McGovern S.L. und Shoichet S.L.: Kinase Inhibitors: Not just for kinases anymore (2003); *J. Med. Chem.* 46, 1478-1483
- [139] McGovern S.L., Caselli E., Grigorieff N. und Shoichet B.K.: A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening (2002); 45, 1712-1722
- [140] Ryan A.J., Gray N.M., Lowe P.N. and Chung C.W.: Effect of detergent on “promiscuous” inhibitors (2003); *J. Med. Chem.* 46, 3448-3451
- [141] Stratagene Manual
- [142] Dissertation Tobias Voigt, Universität Dortmund, 2006
- [143] Nedelkov D, Tubbs KA, Nelson RW: Surface plasmon resonance-enabled mass spectrometry arrays; (2006) *Electrophoresis.* 2006 Aug 16; [Epub ahead of print]

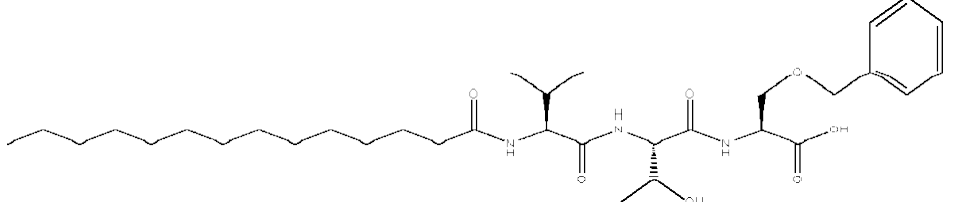
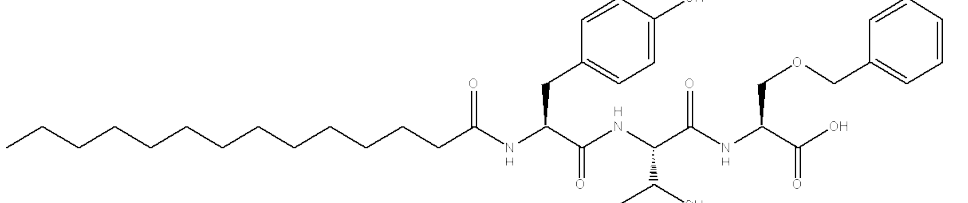
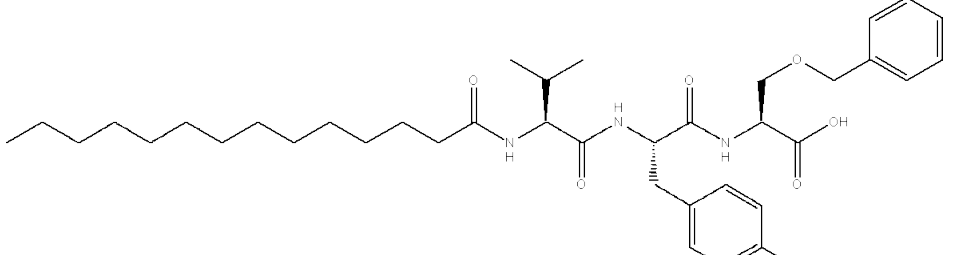
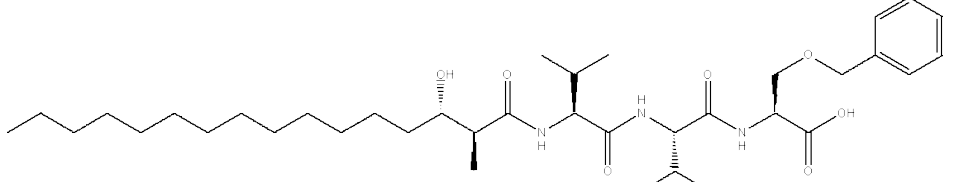
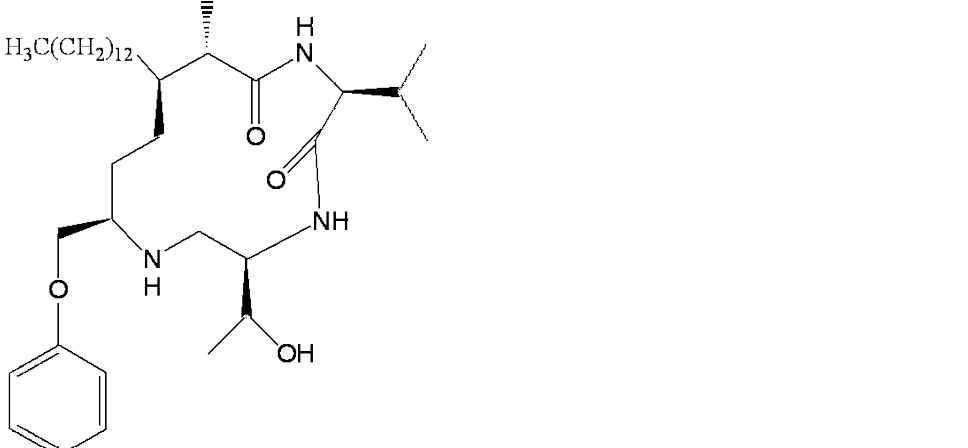


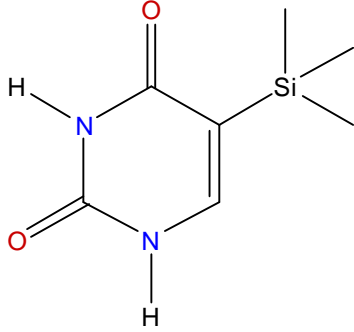
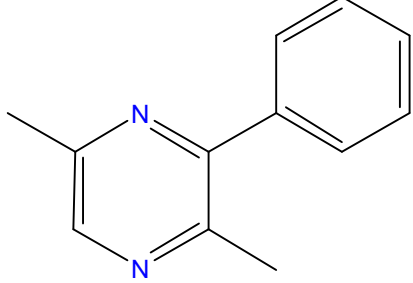
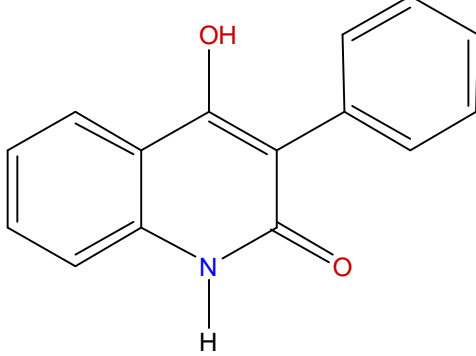
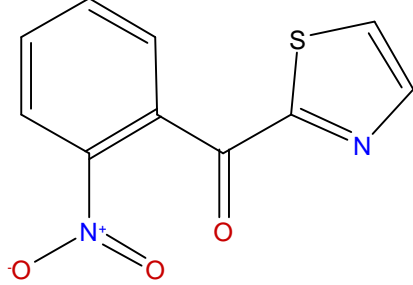


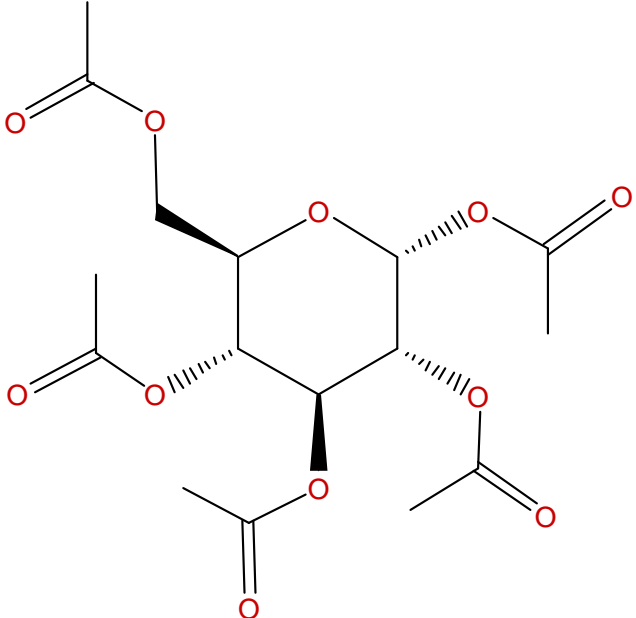
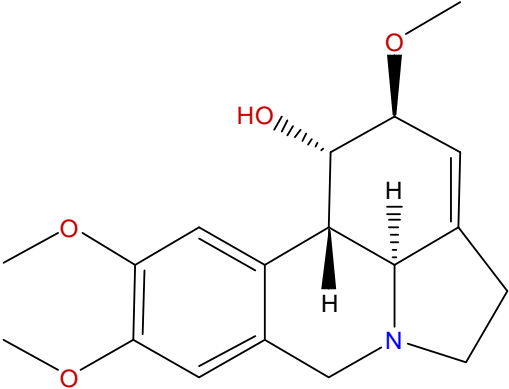
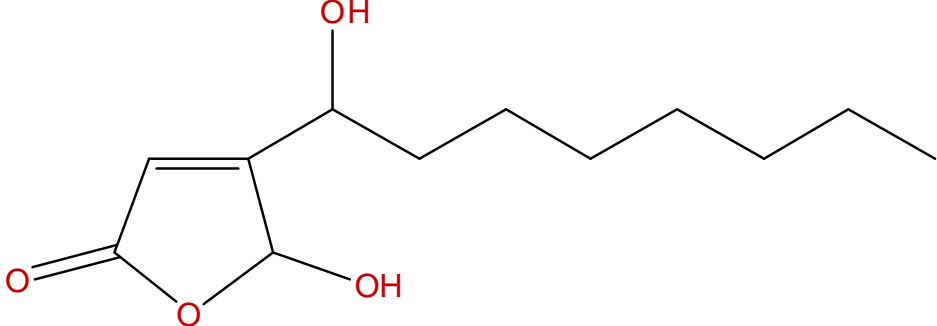
# Anhang

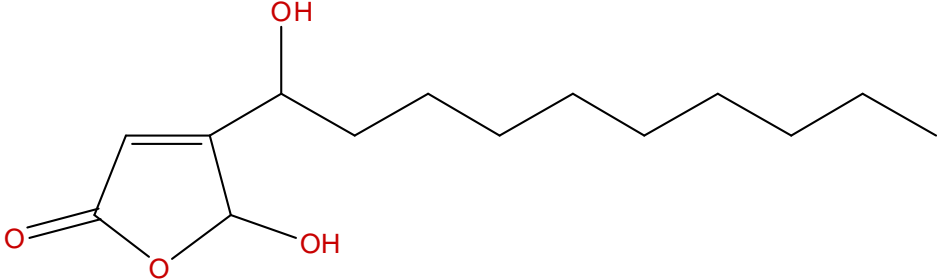
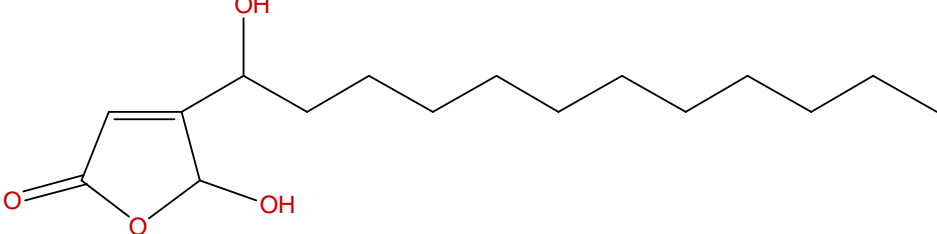
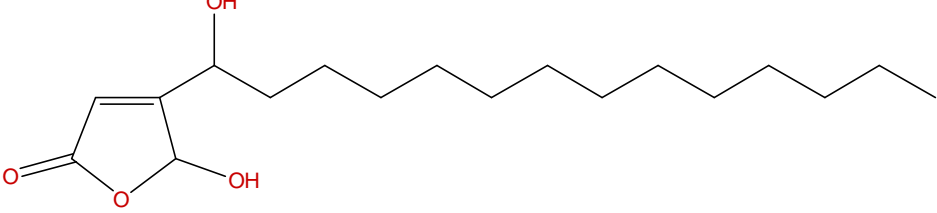
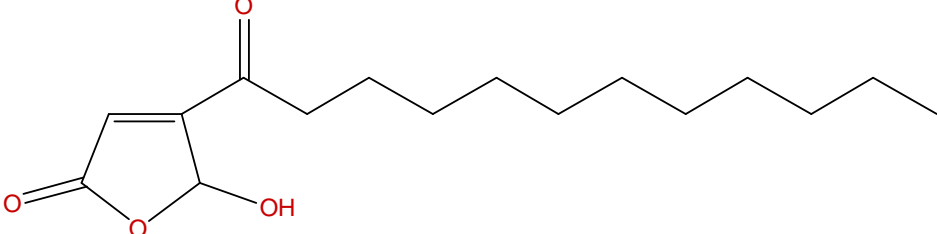
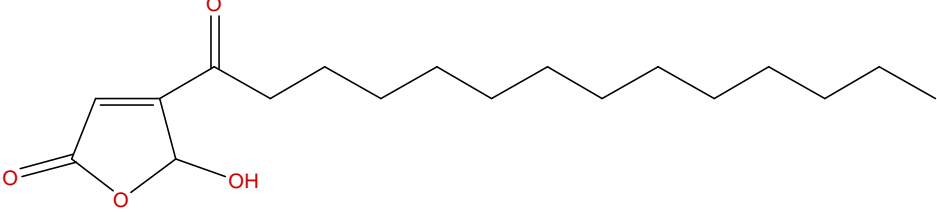
Die Strukturen der Substanzen

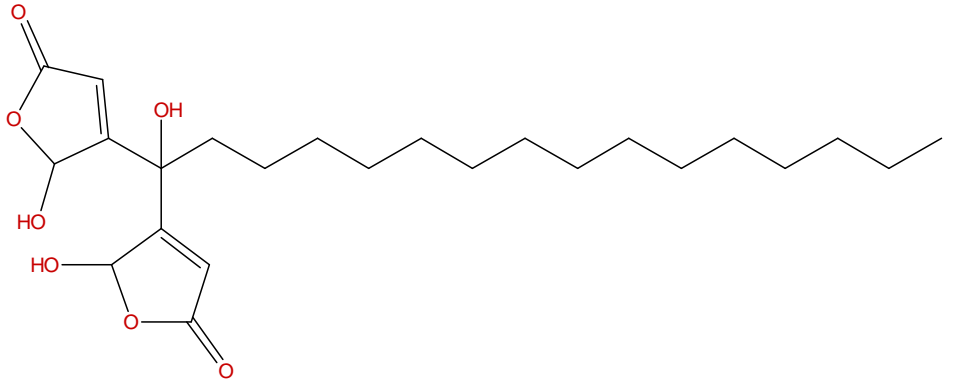
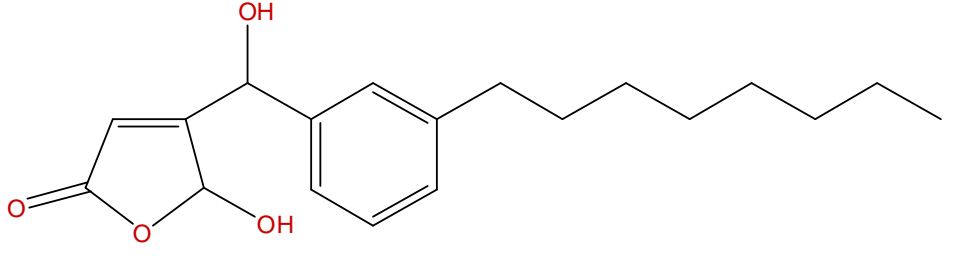
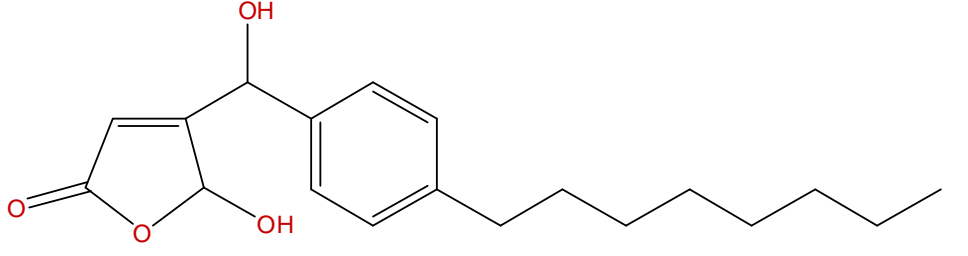
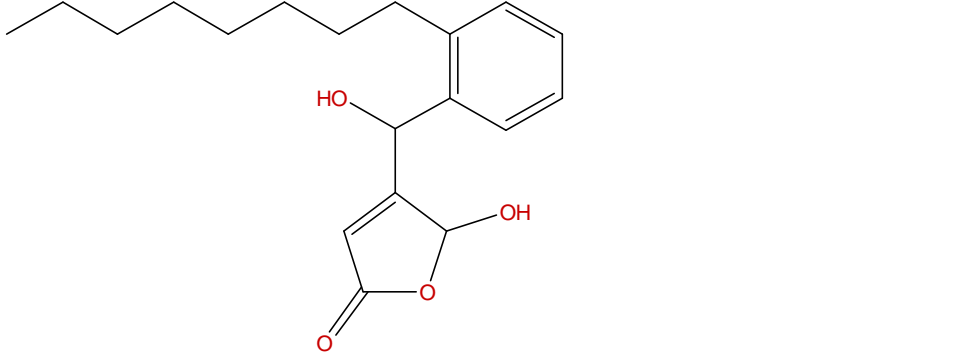
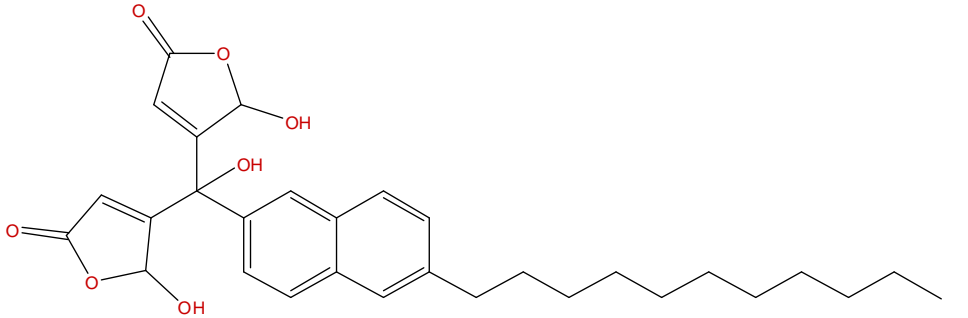
Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
P195		k.a.	673,45
P318		k.a.	691,48
P327		k.a.	721,49
P328		k.a.	785,48
P329		k.a.	783,50
P330		7,4	735,47

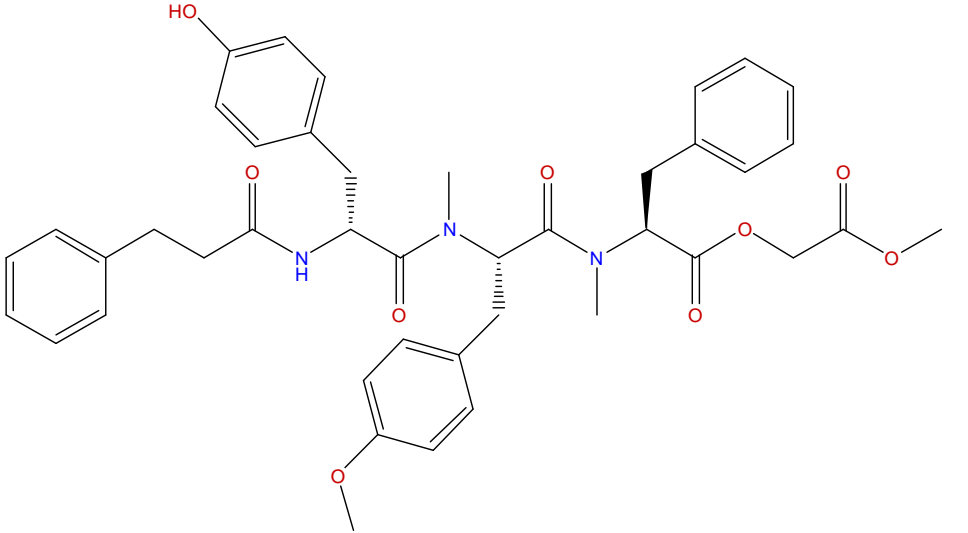
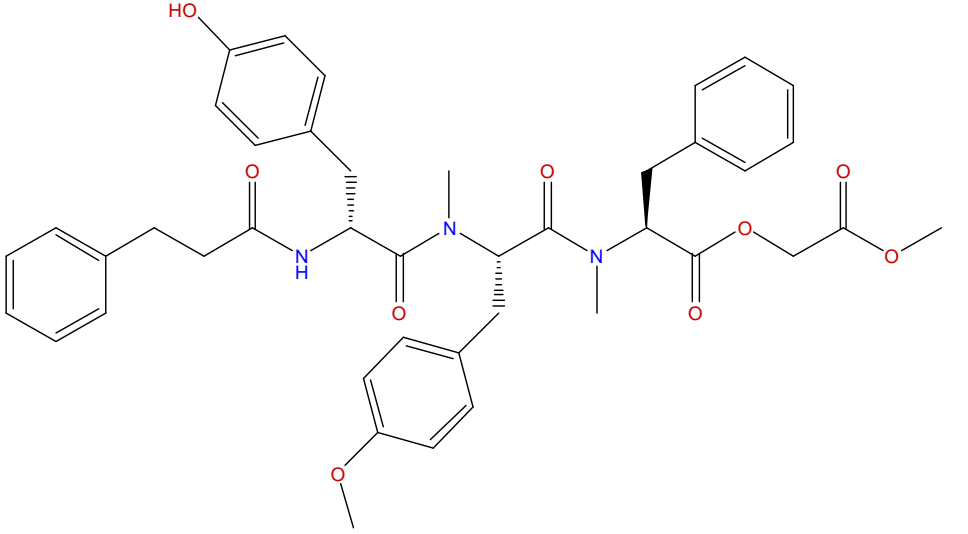
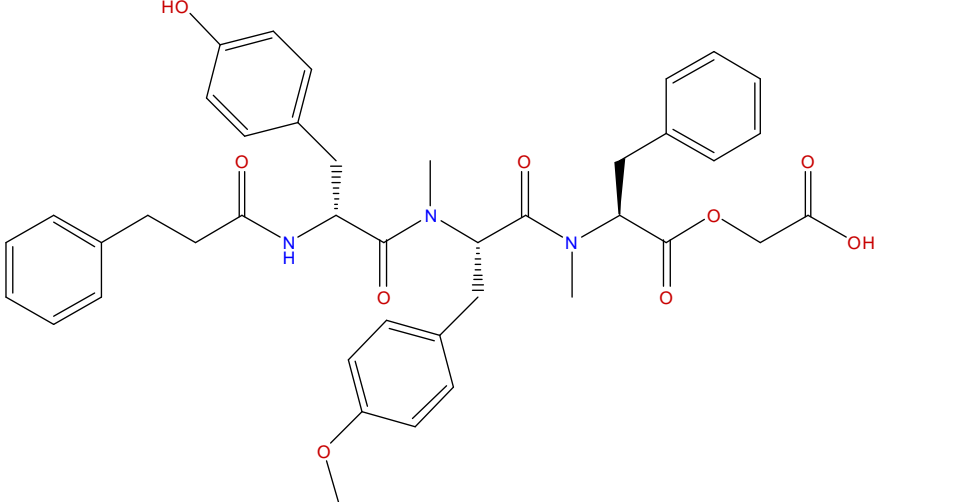
Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
P338		7,1	605,40
P339		k.a.	669,40
P367		8,4	667,42
P433		7,4	661,47
P436		k.a.	601,48

Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
AF1 E3	 <chem>C[Si](C)(C)c1cnc(=O)[nH]c1=O</chem>	1,5	184,07
AF1 D7	 <chem>Cc1cnc(C)c1-c2ccccc2</chem>	2,4	184,2
AF1 F3	 <chem>Oc1c2ccccc2n(c1=O)c3ccccc3</chem>	2,2	200,1
AF1 G1	 <chem>O=[N+]([O-])c1ccccc1C(=O)c2cc[nH]2</chem>	1,8	234,2

Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
BN1 3423		k.a.	390,3
BN1 3940		k.a.	317,3
LW 9		2,25	288,14

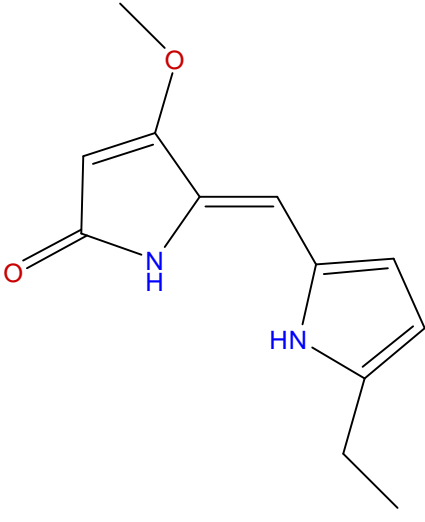
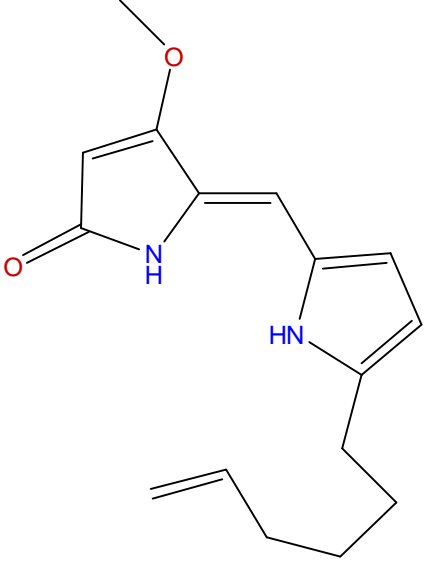
Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
LW 10		2,99	256,17
LW 11		3,82	284,2
LW 12		4,56	312,23
LW 18		3,65	282,18
LW 19		4,48	310,21

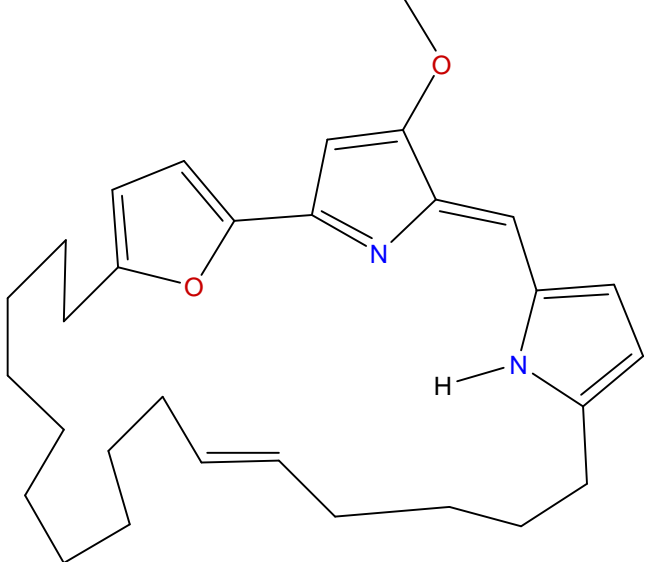
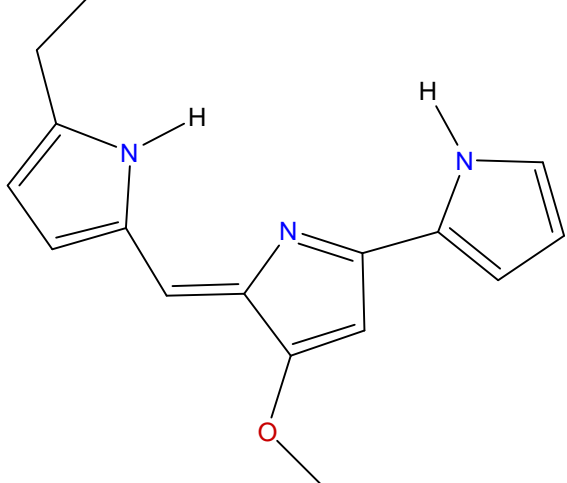
Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
LW 30		4,9	438,26
LW 46		4,38	318,18
LW 47		4,38	318,18
LW 48		4,38	318,18
LW 61		6,04	508,25

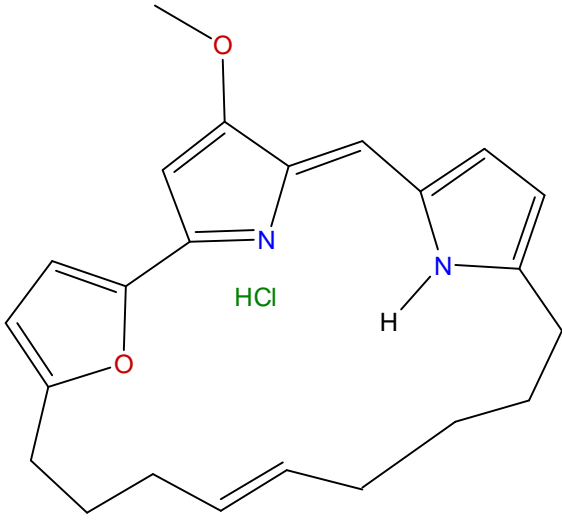
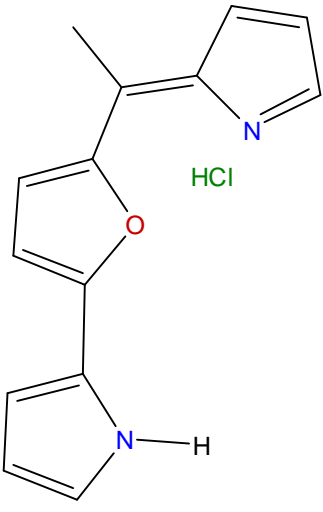
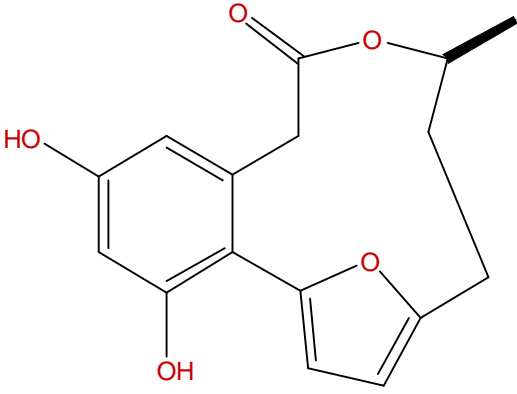
Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
MT3 43		k.a.	737.83 7
MT3 56		k.a.	735,35
MT3 55			723.81 1

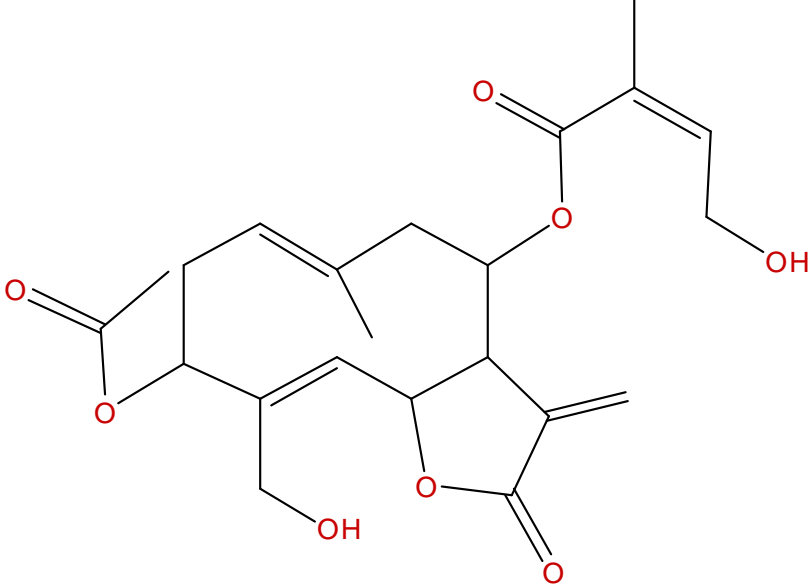
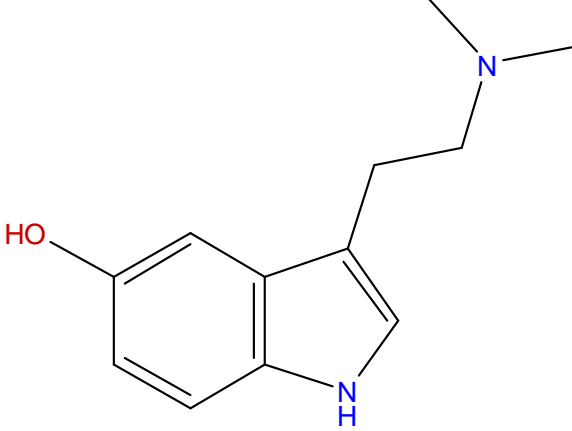
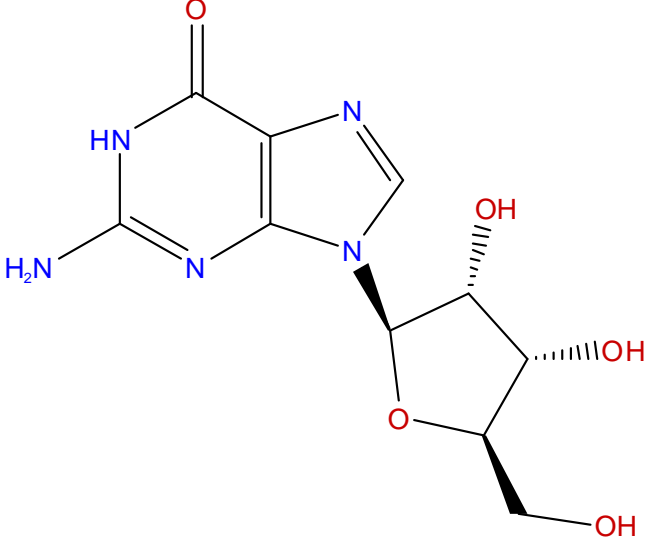


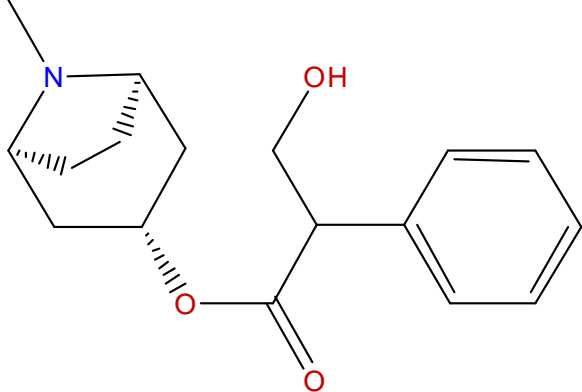
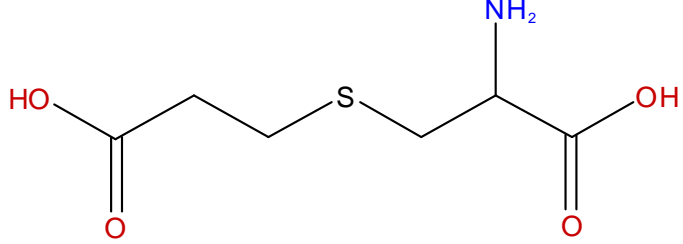
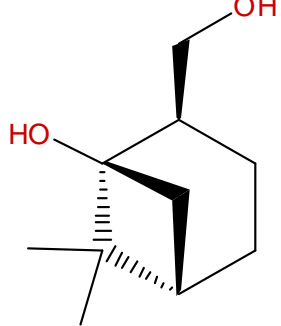
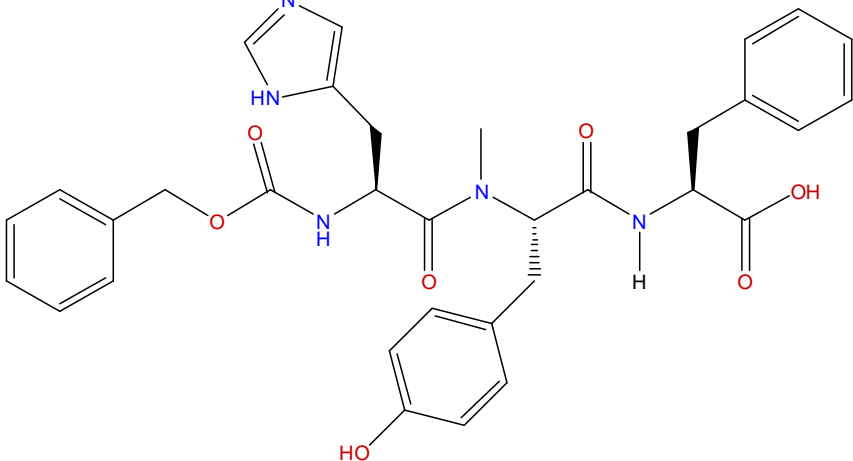


Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
AF2 D11	 <chem>COC1=CC(=O)NC=C1/C=C/C2=CN=C(C)C2</chem>	1,7	218,2
AF2 C11	 <chem>COC1=CC(=O)NC=C1/C=C/C2=CN=C(CCC=C)C2</chem>	3,3	272,3

Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
AF1 B11	 <p>The structure of AF1 B11 is a complex macrocyclic molecule. It features a central ring system with several fused and linked rings, including a pyrrole ring, a furan ring, and a long-chain ring. The structure is highly branched and contains multiple oxygen and nitrogen atoms. A methyl group is attached to one of the oxygen atoms. The nitrogen atom in the central ring is labeled with an 'H'.</p> <p>HCl</p>	0,23	497,1
AF1 G10	 <p>The structure of AF1 G10 is a smaller molecule consisting of three pyrrole rings. Two of the pyrrole rings are connected to a central pyrrole ring via a double bond. The central pyrrole ring has a methyl group attached to one of its carbon atoms. The nitrogen atoms in the pyrrole rings are labeled with an 'H'.</p>	2,7	267,3

Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
AF1 A11		4,17	398,2
AF1 E10		8,16	380,1
AF1 E6		1,94	288,1

Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
BN4 001		0,9	420,4
BN1 3129		1,4	204,2
BN1 3811		-3,1	283,2

Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
BN1 0871		1,2	289,3
BN1 3131			
BN1 1290			
MT6 50			613.66

Name der Substanz	Struktur	C log P	Exakte Masse in Da
MT6 52			667.79 4
MT6 56			705.75 6
MT4 07			625.71 4

# Danksagung

Eine Doktorarbeit entsteht immer nur durch die Hilfe vieler Beteiligten. Bei all diesen möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Bei PD Dr. Heino Prinz möchte ich mich für das interessante Thema und seine Betreuung und Unterstützung zu jedem Zeitpunkt der Arbeit bedanken.

Bei Prof. Herbert Waldmann möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Arbeit in seinem Arbeitskreis durchzuführen und für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Bei Dr. Petra Janning möchte ich mich für die vielen Ratschläge bei allen großen und kleinen Fragen rund um die Massenspektrometrie und die vielen gemeinsamen an den Massenspektrometern verbrachten Stunden bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojekts.

Ein besonderer Dank gilt allen, die mir ihre Substanzen zur Verfügung gestellt haben, da ich weiß wie wertvoll die eigene Arbeit ist. Da wären, Michael Scheck, Michael Manger, Lars Wittenberg und Prof. Fürstner für die Phosphatase-Inhibitoren, Michael Thutewohl für die Farnesyltransferaseinhibitoren, Lars Kissau für die GTPase-Aktivatoren.

Vielen Dank an Heike Rimpel für die Durchführung der colorimetrischen Phosphatase-Assays.

Vielen Dank an Dörte Goehrke für ihre Hilfe im Labor und die Zusammenarbeit.

Einen herzlichen Dank an Christine Nowak und Jürgen Kuhlmann für die Farnesyltransferase.

Vielen Dank an Prof. Manfred Konrad und seine Mitarbeiter für die Hilfe bei der Expression der Nukleotidkinasen in ihrem Labor.

Bei Ralf Seidel, Marion Hülseweh und allen Mitarbeitern im Labor von Prof. Goody möchte ich mich sehr herzlich für ihre Gastfreundschaft im Labor und ihre immerwährende Hilfestellung bei der Expression der Cdc25a-Phosphatase bedanken.

Vielen Dank an Robert Gail für die Ras-Proteine.

Bei Rolf Kalmbach möchte ich mich auch für seine Hilfe bei allen Fragen der Proteinexpression bedanken.

Dirk Pendzialek danke ich für die Zusammenarbeit in Labor und Büro, Eleni Gourzoulidou, Stefanie Schlummer, Svenja Röttger und Nicola Bisek für die gemeinsamen nachmittäglichen Teerunden.

Bei Tobias Voigt bedanke ich mich für die Versorgung mit kalten und warmen Getränken.

Vielen lieben Dank an Borianna Popkirova und Martin Kahms nicht nur für Farnesyltransferase und Ras-Protein, sondern besonders für ihre langwährende Freundschaft.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und die Zuversicht, die sie mir immer gegeben haben.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei meinem Mann, Daniel Ruff, für all seine Geduld und Unterstützung bei dieser Arbeit und vieles mehr, das wirklich umfassend zu beschreiben gar nicht in Worte zu fassen ist.





# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Geburtstag: 29.7.1976  
Geburtsort: Nürnberg  
Familienstand: verheiratet

## Ausbildung

- n 1983-1985 Volksschule München, Dom-Pedro-Platz 2, Grundschule 1
- n 1985–1987 Wegen Umzug Wechsel zur Katholischen Grundschule Gangelst II
- n 1987–1988 Bischöfliches Gymnasium St. Ursula, Geilenkirchen
- n 1988-1996 Wegen Umzug Wechsel zum Kreisgymnasium Heinsberg
- n 19. Juni 1996 Abitur am Kreisgymnasium Heinsberg
- n Juli / August 1998 Praktikum am Genetischen Institut der Universität Köln, Prof. Dörfler; Zusammenhang DNA-Polymorphismen und Chorea Huntington
- n 1. Oktober 1996 Aufnahme des Studiums der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
- n 9. Oktober 1998 Vordiplom der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
- n 8. Juni 2001: Diplom der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
- n 1. Juli 2001 bis 30. Juni .2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
- n 1. September 2004 bis 31. August 2005 Masterstudiengang Schulpädagogik und Didaktik Universität Göttingen
- n seit 01. November 2005 Referendariat für höheres Lehramt im Seminar Braunschweig