

Analyse ligandeninduzierter Konformationsänderungen von Proteinen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Svenja Mayer-Wrangowski

aus Waiblingen

Dortmund 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2010 bis Juli 2015 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund sowie im Fachbereich Chemische Biologie der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Konformationelle Plastizität von Proteinen.....	1
1.2 Kernrezeptoren.....	3
1.2.1 Struktureller Aufbau der Kernrezeptoren.....	3
1.2.2 Estrogenrezeptor	5
1.2.3 Strukturelle Grundlagen der Estrogenrezeptor-Aktivität	8
1.2.4 Der Estrogenrezeptor in der Wirkstoff-Forschung	12
1.3 Proteinkinasen.....	14
1.3.1 Kinaseinhibitoren	17
2 Motivation und Zielsetzung	19
3 Detektion von Konformationsänderungen im Estrogenrezeptor	21
3.1 Assay Prinzip.....	21
3.2 Exkurs: Fluoreszenz und Solvatochromie.....	22
3.3 Estrogenrezeptor-Konstrukte.....	25
3.4 Heterologe Expression der hER β LBD-Konstrukte	29
3.5 Aufreinigung und Markierung der hER β LBD-Konstrukte.....	30
3.5.1 Aufreinigung der hER β LBD-Konstrukte mittels FPLC	30
3.5.2 Übersicht der Aufreinigung aller hER β LBD-Konstrukte	33
3.5.3 Fluorophor-Markierung der hER β LBD-Konstrukte	36
3.6 Strukturelle Analyse mittels Circular dichroismus-Spektroskopie	43
3.7 Etablierung des FLiN Assays im Mikrotiterplattenformat	48
3.7.1 Auswahl eines geeigneten LBD-Konstrukts.....	48
3.7.2 Auswahl eines alternativen Fluorophors.....	72
3.8 Assay Validierung.....	78
3.8.1 Kompetitiver Bindungsassay PolarScreen™	80

3.8.2	Untersuchung der Signal-Stabilität.....	83
3.9	Kinetische Bindungsstudien.....	84
3.10	Zusammenfassung und Ausblick.....	89
4	Strukturbiologische Untersuchungen an Kinasen	93
4.1	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen.....	93
4.2	p38 α Mitogen-aktivierte Proteinkinase.....	95
4.3	Heterologe Expression und Aufreinigung von p38 α MAPK.....	99
4.4	Strukturbiologische Untersuchungen an p38 α MAPK.....	102
5	Zusammenfassung	109
6	Abstract.....	111
7	Publikationen	113
8	Material und Methoden.....	115
8.1	Generelle Anmerkungen.....	115
8.1.1	Geräte.....	115
8.1.2	Verbrauchsmaterialien und Zubehör	117
8.1.3	Bakterienstämme.....	118
8.1.4	Proteine und Reagenzien für biochemische Untersuchungen	118
8.1.5	Testverbindungen.....	118
8.2	Plasmide	119
8.2.1	Mutagenese-PCR.....	119
8.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	120
8.2.3	DNA-Sequenzierung.....	120
8.3	Proteinexpression	121
8.3.1	hER β LBD-Konstrukte.....	121
8.3.2	p38 α MAP-Kinase	121
8.4	Proteinaufreinigung	122
8.4.1	Vorbemerkungen	122
8.4.2	hER β LBD-Konstrukte.....	122

8.4.3	Fluorophor-Markierung von hER β LBD	123
8.4.4	p38 α MAP-Kinase	124
8.5	Biochemische Charakterisierung.....	125
8.5.1	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	125
8.5.2	Tryptischer Verdau	126
8.5.3	Massenspektrometrie	127
8.5.4	Kompetitiver ER Bindungsassay (PolarScreen™)	128
8.6	FLiN-Assay.....	132
8.6.1	Messung von Fluoreszenzspektren in Mikrotiterplatten.....	132
8.6.2	K_d -Messungen in Mikrotiterplatten.....	134
8.6.3	FLiN-Messungen in Küvetten.....	135
8.7	Strukturbiologische Untersuchungen.....	137
8.7.1	Kristallisation	137
8.7.2	Röntgenbeugungsexperimente und Strukturlösung.....	137
9	Literaturverzeichnis.....	139
10	Anhang.....	153
10.1	Protein-Sequenzen.....	153
10.1.1	p38 α MAP-Kinase (p38 α wt)	153
10.1.2	hER β LBD-Konstrukte.....	153
10.2	PCR-Primer	157
10.3	ESI-MS Experimente.....	158
10.4	MS/MS Analyse der Markierungspositionen	159
10.5	FLiN-Daten	160
	Danksagung.....	165
	Eidesstattliche Erklärung.....	167

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Angström (= 10^{-10} m)
Abl	Abelson Kinase
Ac	Acrylodan
AF	Aktivierungsfunktion (<i>activation function</i>)
Akt	Proteinkinase B
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
β-OG	<i>n</i> -Octyl-β-D-Glucopyranosid
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CD	Circulardichroismus
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CML	Chronische myeloische Leukämie
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DES	Diethylstilbestrol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
DUSP	Dual-spezifische Phosphatase (<i>dual-specificity phosphatase</i>)
E2	17β-Estradiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ER	Estrogenrezeptor

ERE	<i>estrogen response element</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLiN	<i>Fluorescent Labels in Nuclear receptors</i>
FUL	Fulvestrant
FP	Fluoreszenzpolarisation
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GEN	Genistein
GPR30	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H12	Helix 12 (in der Ligandenbindungsdomäne von Kernrezeptoren)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSP	Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>)
IC_{50}	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (<i>insulin-like growth factor</i>)
IL-1 β	Interleukin-1 β
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K_d	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung
k_{off}	Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante
k_{on}	Assoziations-Geschwindigkeitskonstante
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MR	molekularer Ersatz (<i>molecular replacement</i>)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NIR	<i>near-infrared</i>
NR	Kernrezeptor (<i>nuclear receptor</i>)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OHT	4-Hydroxytamoxifen
<i>P</i>	Polarisation
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase)
PKC	Proteinkinase C
QA	Quantenausbeute
RAL	Raloxifen
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SANS	<i>small-angle neutron scattering</i>
SAXS	<i>small-angle X-ray scattering</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Größenausschluss (<i>size-exclusion</i>)
SERD	<i>selective estrogen receptor down-regulator</i>
SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i>

SERSM	<i>selective estrogen receptor subtype-specific modulator</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
SRC	<i>steroid receptor coactivator</i>
TAM	Tamoxifen
TB	<i>terrific broth</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
THC	5,11- <i>cis</i> -diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol (<i>R,R</i> -Enantiomer)
T_M	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-mono- <i>[p</i> -(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether
U	<i>unit</i>
v	Volumen
WF	Wachstumsfaktor
WFR	Wachstumsfaktorrezeptor
wt	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Konformationelle Plastizität von Proteinen

Ein Großteil aller physiologischer Prozesse geht auf die Konformationsänderung eines Proteins durch posttranslationale Modifikationen oder die Komplex-Bildung zwischen einem Protein und einem Liganden zurück, wobei diese Liganden andere Proteine, Peptide, niedermolekulare chemische Verbindungen, Metalle oder Ionen sein können.^[1] Konformationsänderungen von Proteinen reichen von kleinen Änderungen durch Umlagerung flexibler Seitenketten sowie/oder des Peptid-Rückgrats, bis hin zu globalen Strukturänderungen durch partielle Entfaltung oder Neufaltung sowie Neuorientierung von Domänen. Über die unterschiedlichen Konformationen eines Proteins werden vielzählige regulatorische Eigenschaften kontrolliert. Hierzu zählen, neben der enzymatischen Aktivität, auch verschiedenste nicht-katalytische Funktionen, wie Gerüstfunktionen in Proteinkomplexen, die Regulation der subzellulären Lokalisation, die Vermittlung von DNA-Bindung, die Ausübung allosterischer Effekte auf andere Proteine sowie die Konkurrenz um Proteinbindung.^[2] Daher ist die gezielte Stabilisierung distinkter Konformationen eines Proteins mit Hilfe niedermolekularer Liganden für die Entwicklung neuer Wirkstoffe von großer Bedeutung, da sich hierdurch zelluläre Signalwege auf vielfältige Weise beeinflussen lassen.

Obwohl nicht-katalytische Eigenschaften oft essentielle Funktionen darstellen, wird vor allem die Rolle von Enzymen in der Wirkstoff-Forschung traditionell auf deren katalytische Aktivität reduziert.^[2] So liegt der Fokus bei der Adressierung von Proteinkinasen, welche Schlüsselfunktionen in vielen zellulären Signalwegen einnehmen, meist auf der Kontrolle katalytischer Aktivität durch Substrat-kompetitive Inhibitoren, die das aktive Zentrum blockieren. Konformations-selektive Kinaseinhibitoren können aber auch durch allosterische, nicht-katalytische Mechanismen Effekte auf die Signalweiterleitung ausüben. Liganden der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPKs) Erk2 und p38 α sind beispielsweise in der Lage, nicht-katalytische Funktionen dieser Enzyme zu kontrollieren. So können konformations-selektive Inhibitoren, die im aktiven Zentrum von Erk2 binden, verschiedene Orientierungen der Aktivierungsschleife stabilisieren und über einen allosterischen Regulationsmechanismus zusätzlich die Aktivität von MAPK Phosphatasen, wie DUSP6 (*dual-specificity phosphatase 6*), inhibieren oder deren Phosphatase-Aktivität erhöhen.^[3] Auch die Serin-Threonin-Kinase Akt, welche eine zentrale Rolle bei der Proliferation und dem Überleben von Zellen spielt, besitzt wichtige nicht-katalytische, therapeutisch relevante Funktionen. So sind

katalytisch inaktive Akt-Mutanten über ihre regulatorische PH-Domäne in der Lage, das Überleben von Tumorzellen zu fördern und somit Wirkstoffresistenzen zu vermitteln.^[4]

Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung konformationeller Plastizität in der Wirkstoff-Entwicklung stellen Liganden der Kernrezeptoren dar. Diese Rezeptoren liegen in einem dynamischen Gleichgewicht einer Vielzahl verschiedener aktiver oder inaktiver Konformationen vor. Durch die Bindung niedermolekularer Liganden lässt sich das Gleichgewicht durch Stabilisierung bestimmter Konformationen beeinflussen. Dadurch können diese Liganden einen agonistischen oder antagonistischen Effekt auf die Aktivität des Rezeptors ausüben.^[5]

Die Analyse der komplexen Regulationsmechanismen von Proteinen in ihren vielfältigen Konformationen, mittels strukturbiologischer und funktioneller Untersuchungen, sowie die Entwicklung und Anwendung geeigneter Testsysteme zur gezielten Detektion von Konformationsänderungen in Proteinen, sind wichtige Voraussetzungen für die zukünftige Entwicklung innovativer Wirkstoffe, wie allosterische Liganden, die die Signalweiterleitung unabhängig von katalytischen Funktionen kontrollieren.^[6] Solche Liganden bieten eine Reihe von Vorteilen, wie beispielsweise eine verbesserte Selektivität und Verweildauer am Protein. Daher besitzen sie ein hohes Potential für die Entwicklung von Wirkstoffen mit verbessertem therapeutischen Profil und reduzierten Nebenwirkungen.^[7]

1.2 Kernrezeptoren

Die Kernrezeptoren (*nuclear receptors*, NRs) bilden mit derzeit 48 bekannten Vertretern im menschlichen Genom die größte Proteinsuperfamilie der Transkriptionsfaktoren.^[8] Im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren, stehen sie unter der Kontrolle kleiner lipophiler Liganden, wie beispielsweise Steroidhormone, die an die Rezeptoren binden und diese aktivieren können. Die aktivierten Rezeptoren binden meist als homo- oder hetero-Dimere an sogenannte *response elements* innerhalb der Promotor-Region ihrer Ziel-Gene und regulieren die Transkription durch Rekrutierung spezifischer Koregulatorproteine, des Transkriptions-Initiationskomplexes oder der RNA Polymerase II.^[9] Die Einteilung der NRs in verschiedene Gruppen erfolgt, basierend auf der chemischen Ähnlichkeit ihrer Liganden, in Steroidrezeptoren, RXR-Heterodimere Rezeptoren sowie *Orphan*-Rezeptoren (Waisen-Rezeptoren), deren Liganden bisher nicht identifiziert werden konnten.^[10]

NRs kontrollieren eine Reihe physiologischer Prozesse, wie die Embryonalentwicklung, Organ-Physiologie, Zelldifferenzierung und Homöostase.^[11] Neben diesen wichtigen Funktionen sind NRs auch an pathologischen Prozessen, wie Diabetes, Krebs, Asthma, rheumatoide Arthritis oder Hormonresistenz beteiligt.^[12] NRs stellen daher wichtige Zielmoleküle in der Wirkstoff-Entwicklung für eine Vielzahl therapeutischer Anwendungsgebiete dar. Thiazolidindione, die den PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma) aktivieren, werden beispielsweise zur Behandlung von Typ-2-Diabetes eingesetzt, während Estrogenrezeptor Antagonisten bei der Prävention und Behandlung von Brustkrebs Verwendung finden.^[13]

1.2.1 Struktureller Aufbau der Kernrezeptoren

Trotz ihrer vielfältigen Funktionen und Wirkmechanismen, besitzen Kernrezeptoren einen evolutionär konservierten modularen Aufbau.^[14] Sie bestehen meist aus einer einzelnen Polypeptidkette, die in vier bis fünf Domänen eingeteilt ist (Abbildung 1.2.1-B): die N-terminale A/B-Domäne, die C- oder DNA-Bindungsdomäne (DBD), die Scharnierregion (D-Domäne) sowie die C-terminale E/F- oder Ligandenbindungsdomäne (LBD). Diese Domänen sind funktionell eigenständig, können sich aber gegenseitig beeinflussen.^[15] Isolierte Domänen, vor allem die DBD und LBD, wurden für viele NRs strukturell charakterisiert.^[16] Erste Röntgenkristallstrukturen eines vollständigen DNA-gebundenen Rezeptor-Dimers mit einem Koaktivatorpeptid konnten bisher für das PPAR γ -RXR α -Heterodimer (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma-Retinoid-X-Rezeptor alpha)^[17] und das HNF-4 α -Homodimer (Hepatozyten-Kern-Faktor 4 alpha)^[18] gelöst werden.

Zusammen mit mehreren, aus SAXS- (*small-angle X-ray scattering*), SANS- (*small-angle neutron scattering*) und Elektronenmikroskopie-Experimenten gewonnenen Lösungsstrukturen, zeigen sie die komplexen Interaktionen zwischen den einzelnen Domänen (Abbildung 1.2.1-A).

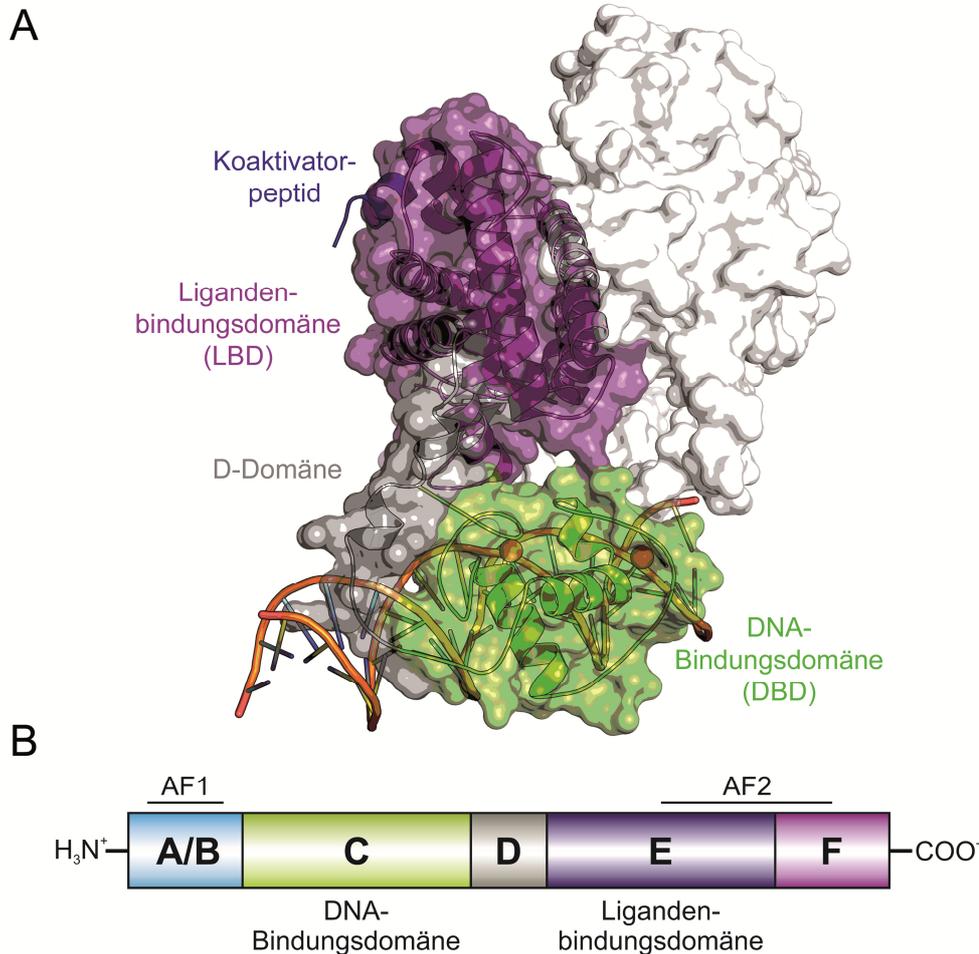


Abbildung 1.2.1 A) Röntgenkristallstruktur des, an DNA gebundenen, PPAR γ -RXR α -Heterodimers mit Koaktivatorpeptid (PDB-Eintrag: 3DZY). Die Oberfläche von RXR α ist weiß dargestellt. Die verschiedenen NR-Domänen sind in PPAR γ farblich hervorgehoben: DNA-Bindungsdomäne (grün) mit zwei Zink-Ionen (rote Kugeln), Scharnierregion (D-Domäne, grau) und Ligandenbindungsdomäne (violett) mit gebundenem Koaktivatorpeptid (blau). Die N-terminale A/B-Domäne konnte aufgrund ihrer hohen Flexibilität nicht in der Kristallstruktur aufgelöst werden. **B)** Schematische Darstellung der NR-Domänen. Die N-terminale A/B-Domäne enthält die Aktivierungsfunktion 1 und sorgt für eine konstitutive Transkriptionsaktivität der Rezeptoren. Die zentrale DNA-Bindungsdomäne (C) wird über eine Scharnierregion (D) mit der Ligandenbindungsdomäne, welche die Aktivierungsfunktion 2 enthält, verbunden. Einige Rezeptoren besitzen darüber hinaus eine N-terminale F-Domäne, deren Funktion bisher nicht vollständig geklärt ist.^[19]

Die variable N-terminale A/B-Domäne ist sowohl in ihrer Länge, als auch in ihrer Sequenz zwischen den einzelnen NRs kaum konserviert. Die meisten A/B-Domänen enthalten eine ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion 1 (AF1), die in einigen Fällen ein starker

Aktivator der Transkription ist. Die AF1 kann mit anderen Domänen des Rezeptors oder regulatorischen Proteinen interagieren und ein- und ausgehende Signale, manchmal auch in Kooperation mit Signalen, die den Rezeptor über die LBD, die Scharnierregion und die DBD regulieren, weiterleiten.^[20] Darauf folgt eine zentrale, stark konservierte DBD, über die der Rezeptor an spezifische DNA-Erkennungssequenzen binden kann.^[21] Diese bestehen üblicherweise aus Abfolgen zweier hexamerer Sequenzen (*direct*, *inverted* oder *everted repeat*), die durch wenige Nukleobasen voneinander getrennt sind. Die DBD besteht aus etwa 70–80 Aminosäuren (AS) und enthält zwei Zinkfinger-artige Module. Über die α -Helix des ersten Moduls erfolgt die sequenzspezifische Erkennung der DNA, während über das zweite Modul die Homo- oder Heterodimerisierung der DBDs erfolgen kann.^[22] Die flexible und wenig konservierte Scharnierregion verknüpft die DBD mit der LBD. In vielen NRs enthält sie eine Kernlokalisationssequenz und ist ein Angriffspunkt für posttranslationale Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Sumoylierung.^[23] Außerdem scheint sie die DNA-Bindung, Stabilität und intrazelluläre Lokalisation der Rezeptoren zu beeinflussen.^[24]

Die C-terminale konservierte LBD vermittelt die Ligandenbindung, die Rezeptor-Dimerisierung, die Translokation in den Zellkern und die Transaktivierung der Genexpression. Sie besteht aus 12 α -Helices (H1–H12), die in drei antiparallelen Ebenen zu einer Sandwich-Struktur angeordnet sind.^[25] Die LBDs der nicht-Steroidrezeptoren sowie des Estrogenrezeptors enthalten eine Dimerisierungsoberfläche, die von H9 und H10 sowie der Schleifenregion zwischen H7 und H8 gebildet wird.^[26]

Die Bindung kleiner lipophiler Moleküle in der Ligandenbindungstasche führt zu Konformationsänderungen innerhalb der Helix 12 (H12), welche maßgeblich an der Regulation der Transkriptions-Aktivität des Rezeptors beteiligt sind. Zusammen mit H3–H5, bildet die angewinkelte H12 die Oberfläche der Aktivierungsfunktion 2 (AF2) aus, über die der Rezeptor mit Koregulatorproteinen interagiert und so die Gentranskription steuert (siehe auch Abbildung 1.2.3, Seite 9). Für die meisten Kernrezeptoren ist AF2 die haupt-Aktivierungsfunktion.^[9, 27]

1.2.2 Estrogenrezeptor

Bereits in den 1960er Jahren konnte mit der Entdeckung des Estrogenrezeptors alpha (ER α , Kernrezeptor-Unterfamilie 3, Gruppe A, Mitglied 1, NR3A1)^[28] nachgewiesen werden, dass die biologischen Effekte von Estrogenen über einen Rezeptor vermittelt werden.^[29] Erst 1996 wurde mit dem Estrogenrezeptor beta (ER β , Kernrezeptor-Unterfamilie 3, Gruppe A, Mitglied 2, NR3A2)^[30] ein zweiter, in menschlichem Gewebe exprimierter Subtyp des ER identifiziert.

Die ERs stehen unter Kontrolle der Estrogene, vor allem des Steroidhormons 17 β -Estradiol (E2), und regulieren grundlegende physiologische Prozesse in unterschiedlichen Organsystemen. ER α wird vor allem in den Brustdrüsen, der Gebärmutter, den Eierstöcken (Thekazellen), den Knochen, den männlichen Reproduktionsorganen (Hoden und Nebenhoden), der Prostata (Stroma), der Leber und dem Fettgewebe exprimiert. ER β findet sich hingegen hauptsächlich in der Prostata (Epithelium), der Blase, den Eierstöcken (Granulosazellen), dem Darm, dem Fettgewebe und den Zellen des Immunsystems. In Zellen des Zentralnervensystems und Herzkreislaufsystems werden beide Rezeptoren gleichermaßen exprimiert.^[31]

NRs unterliegen einem ständigen Lokalisations-Wechsel zwischen Cytoplasma und Zellkern, wobei der ER, sowohl mit gebundenem Liganden als auch in ligandenfreiem Zustand hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist.^[32] Der ligandenfreie, inaktive Rezeptor liegt als monomeres Protein im Komplex mit mehreren Hitzeschockproteinen (*heat shock proteins*, HSPs) vor.^[33] Die Bindung von E2 in die Ligandenbindungstasche innerhalb der LBD bewirkt die Dissoziation der HSPs und führt zur Konformationsänderung der H12. Dabei wird die Ligandenbindungstasche von H12 verschlossen und der Rezeptor bildet Homodimere (ER α -ER α oder ER β -ER β) über seine LBD- und DBD-Oberflächen aus. Die Rezeptor-Dimere erkennen und binden an *estrogen response elements* (EREs) innerhalb der Promotorregion ihrer Zielgene und steuern damit die Transkription (Abbildung 1.2.2). Nach der Rekrutierung eines zentralen Koaktivators an den aktiven Rezeptor, werden weitere Ko-Koaktivatoren, wie die p300/CBP Histon-Acetyltransferase, die CARM1 Methyltransferase und die Ubiquitin-Ligasen UbC und UbL, rekrutiert und ein Multienzymkomplex ausgebildet. Dieser DNA-ER-Koaktivator-Komplex führt für die Transkription notwendige Reaktionen, wie Chromatin-Umstrukturierungen, durch Methylierung und Acetylierung, durch. Die einzelnen Komponenten können sich gegenseitig modifizieren, um eine Dissoziation vom Komplex, gefolgt von Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau, zu bewirken. Dadurch wird nach Vollendung der Aufgabe der Komplex für weitere Interaktionen mit anderen Koaktivatoren frei. Auf diese Weise kommt es zu einer geordneten, aber dynamischen Abfolge von Zusammenlagerung und Auflösung des Komplexes, die zur Transkription der Zielgene führt.^[34]

Über viele Jahre galt dieser klassische genomische Mechanismus als einziger Effekt, der durch die Bindung von Estrogenen an den ER vermittelt wird. Darüber hinaus kann der ER aber auch über Protein-Protein Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren an AP-1-, SP1- und NF κ B-Bindungsstellen,^[35] ohne direkte Bindung an EREs, die Genexpression modulieren. Ein kleiner Anteil des ER ist außerdem über S-Palmitoylierung und Myristoylierung sowie Interaktionen mit Membranproteinen an die Zellmembran assoziiert.^[36] Zusammen mit

einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPR30) ist der ER damit auch an nicht-genomischen Effekten von Estrogenen beteiligt. Diese Effekte treten innerhalb von Sekunden bis Minuten und damit deutlich schneller als die klassische genomisch vermittelte Wirkung, ein. Sie werden über die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, wie dem Mitogen-aktivierte Proteinkinase/Proteinkinase C (MAPK/PKC)- oder dem Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)-Weg, vermittelt.^[36]

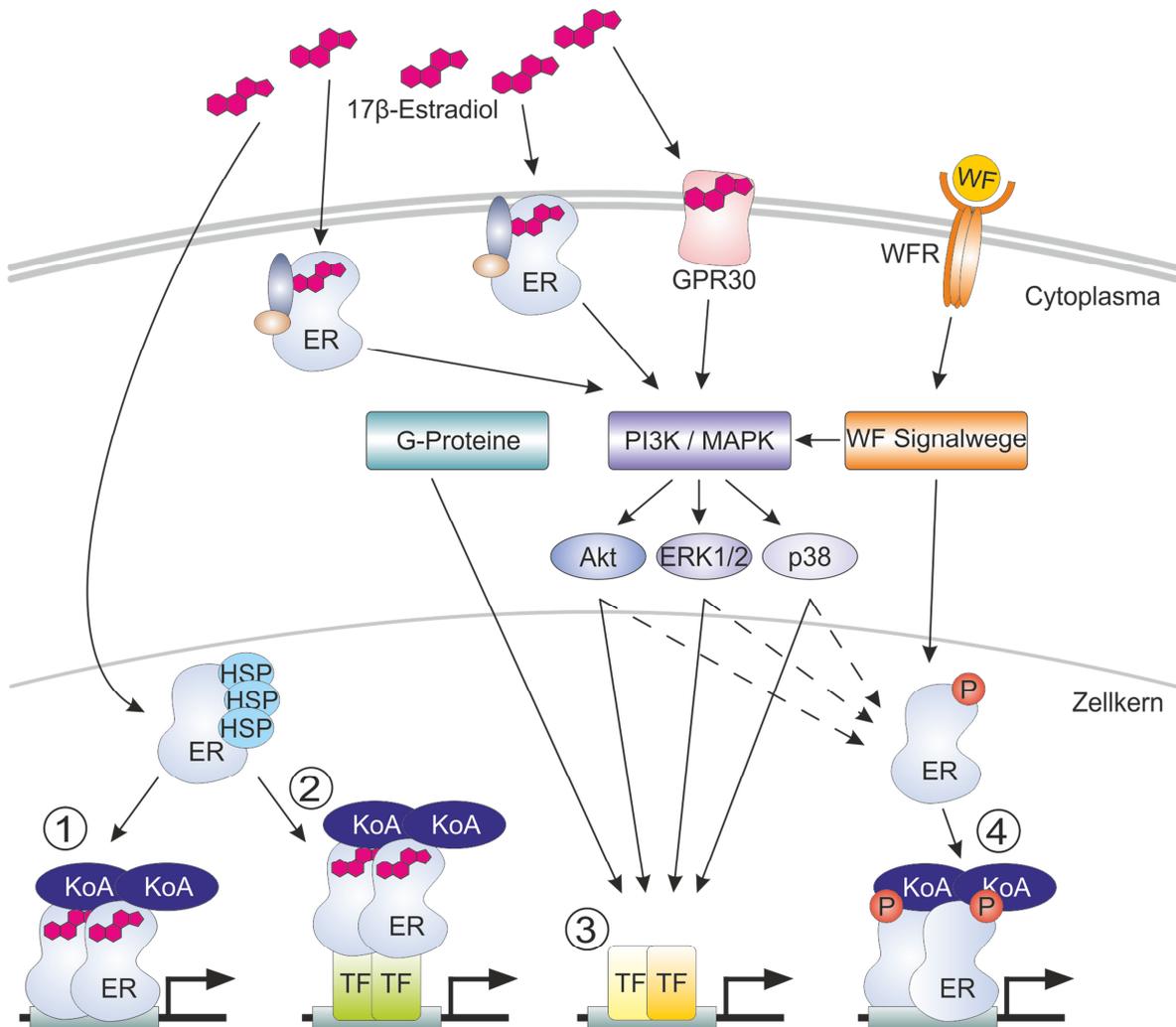


Abbildung 1.2.2 Schematische Darstellung der Estrogen-vermittelten Signalweiterleitung. 1.) Klassischer genomischer Mechanismus: Durch die Bindung von E2 wird der ER aktiviert, bindet als Dimer an EREs in der Promotorregion seiner Zielgene und aktiviert durch Rekrutierung von Koaktivatoren die Transkription. 2.) Nicht-ERE-abhängiger genomischer Mechanismus: Der ligandenaktivierte ER bindet über Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren an Promotorregionen, die keine EREs enthalten und führt so zur Aktivierung der Transkription. 3.) Nicht-genomische Estrogen-Signalwege: Membranassoziierte ERs und GPR30 können PI3K/Akt- oder PKC/MAPK-Signalwege aktivieren. 4.) Ligandenunabhängiger Signalweg: Verschiedene Wachstumsfaktoren sind über ihre Signalwege in der Lage, den ER durch MAPK- oder PI3K/Akt-vermittelte Phosphorylierung in Abwesenheit von Liganden zu aktivieren.^[37] (HSP: Hitzeschockprotein; KoA: Koaktivatoren; P: Phosphat; TF: Transkriptionsfaktor; WF: Wachstumsfaktor; WFR: Wachstumsfaktorrezeptor).

Neben diesen Estrogen-abhängigen Wirkmechanismen kann der ER durch Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1), TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor β) und EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) oder den Wnt/ β -Catenin Signalweg ligandenunabhängig stimuliert werden. Diese Aktivierung geschieht durch direkte Interaktion mit den Wachstumsfaktoren oder durch MAPK und PI3K/Akt vermittelte Phosphorylierung des ER.^[37]

1.2.3 Strukturelle Grundlagen der Estrogenrezeptor-Aktivität

Die Gene von ER α und ER β codieren für zwei 595^[38] und 530^[39] Aminosäuren große Proteine, die eine hohe Sequenzhomologie von 97 % in ihrer DBD und 59 % in ihrer LBD aufweisen.^[15c, 40] Die A/B- sowie die D-Domänen sind mit 27 % und 26 % Sequenzidentität hingegen kaum konserviert. Die Ligandenbindungstaschen in der LBD von ER α und ER β unterscheiden sich nur in zwei Positionen (Leu384 α →Met336 β und Met421 α →Ile373 β),^[41] wobei röntgenkristallographische Untersuchungen darauf hindeuten, dass die Ligandenbindungstasche von ER β kleiner und enger ist. Aufgrund der geringen Unterschiede ihrer LBDs, weisen beide Rezeptoren sehr ähnliche Ligandenbindungsprofile auf.^[31, 42] Trotzdem ist die Entwicklung subtyp-selektiver Liganden möglich.^[31, 43] Im Gegensatz zu ER α besitzt ER β , vermutlich aufgrund seiner verkürzten A/B-Domäne, keine AF1 Aktivität.

Strukturbiologische Untersuchungen des ER zeigen, welchen charakteristischen Einfluss verschiedene Liganden auf die Konformation des Rezeptors ausüben und wie diese mit den pharmakologischen Eigenschaften der Liganden zusammenhängen (Abbildung 1.2.3). Die Orientierung der C-terminalen H12 innerhalb der LBD bestimmt maßgeblich, ob der ER in einem aktiven oder inaktiven Zustand vorliegt und wird daher oft auch als „molekularer Schalter“ bezeichnet. Die Bindung eines Agonisten an den ER führt zur Stabilisierung einer angewinkelten H12, welche den Liganden in seiner Bindungstasche einschließt. Diese Orientierung von H12 beruht nicht auf direkter Interaktion mit dem Liganden, sondern wird durch Interaktionen des Liganden mit der Bindungstasche induziert. Durch die Umlagerung vervollständigt H12 eine von H3, H4 und H5 ausgebildete flache hydrophobe Bindungstasche auf der Oberfläche der LBD.^[42] Diese ligandenabhängige Transaktivierungsfunktion (AF2) vermittelt die Rekrutierung von Koaktivatorproteinen (Abbildung 1.2.3-B).^[25, 27a, 44] Die Bindung der Koaktivatorproteine an die AF2 erfolgt über ein α -helikales LXXLL-Motiv, wobei L für Leucin und X für eine beliebige Aminosäure steht.^[45] Die Bindung zwischen der LBD und dem Koaktivator wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Oberfläche der Tasche sowie H-Brücken zwischen dem Peptid-Rückgrat des LXXLL-Motivs und dem konservierten Lysin, am C-terminalen Ende von H3, und Glutamat in H12, welche eine sogenannte

Ladungsklammer (*charge clamp*) ausbilden, stabilisiert.^[42, 46] Koaktivatorproteine besitzen oft mehrere LXXLL-Motive die kooperativ oder unkooperativ binden können. In biochemischen und genetischen Untersuchungen wurde eine Vielzahl an Koregulatoren identifiziert, die Großteils an die LBD binden,^[47] wie beispielsweise die p160/SRC (*steroid receptor coactivator*) Koaktivator Proteinfamilie.^[48]

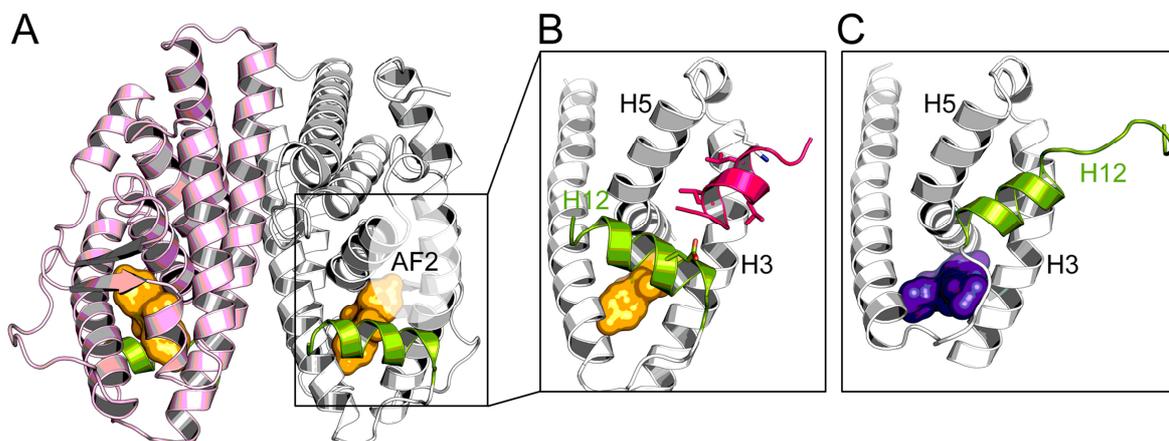


Abbildung 1.2.3 Strukturelle Grundlage der Kontrolle der ER-Aktivität durch Agonisten und Antagonisten. **A)** ER α LBD-Dimer mit dem gebundenen Agonisten Diethylstilbestrol (PDB-Eintrag: 3ERD). Durch die Bindung eines Agonisten kommt es zur Ausbildung der AF2, über die der Rezeptor Koaktivatorproteine rekrutieren kann. **B)** Vergrößerte Darstellung der Ligandenbindungstasche/AF2-Region der ER α LBD mit gebundenem Agonisten Diethylstilbestrol (PDB-Eintrag: 3ERD). Der Agonist (orange) bindet in der Ligandenbindungstasche der LBD, welche durch die angewinkelte H12 (grün) verschlossen wird. Dadurch bildet H12 zusammen mit H3–H5 die AF2 aus, über die ein NR-Box Koaktivatorpeptid mit LXXLL-Motiv (pink) bindet. **C)** ER α LBD mit gebundenem Antagonisten 4-Hydroxytamoxifen (PDB-Eintrag: 3ERT). Der Antagonist (violett) bindet in dieselbe Ligandenbindungstasche und verhindert mit seiner langen Seitenkette, dass H12 die Tasche verschließt. H12 liegt nun gestreckt vor und besetzt die AF2. Die Rekrutierung von Koaktivatoren wird dadurch verhindert.

Bei der Bindung eines Antagonisten wird, meist aus sterischen Gründen, das Anwinkeln der H12 und die Ausbildung der AF2 verhindert. Die Helix nimmt daraufhin eine alternative Konformation ein, legt sich in die von H3–H5 gebildete hydrophobe Tasche und verhindert dadurch die Bindung von Koaktivatorproteinen (Abbildung 1.2.3-C). Diese Neuorientierung von H12 kann außerdem die Rekrutierung von Korepressorproteinen unterstützen, welche zusätzlich zur Unterdrückung der Transkriptionsaktivität beitragen.^[27c]

Diverse Komplexstrukturen beider ERs mit verschiedenen Liganden und Koaktivatorpeptiden geben Einblicke in das dynamische Gleichgewicht verschiedener Rezeptorkonformationen. Liganden stabilisieren bestimmte Konformationen des Rezeptors, wodurch das Gleichgewicht zu einem definierten funktionellen Zustand verschoben wird (Abbildung 1.2.4).

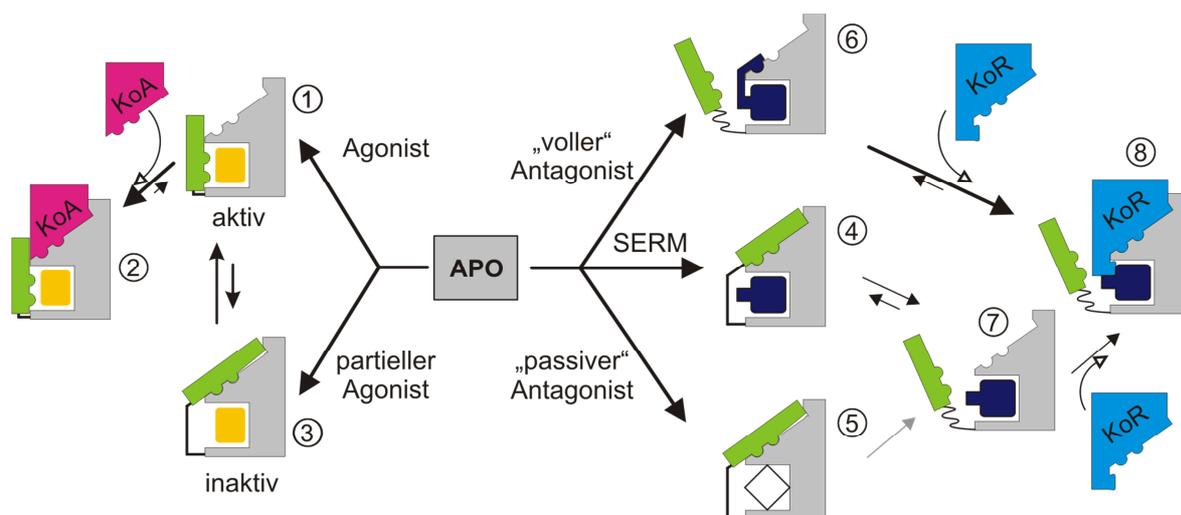


Abbildung 1.2.4 Schematische Darstellung des Gleichgewichts bekannter konformationeller Zustände der ER LBD. Liganden stabilisieren verschiedene Orientierungen der H12 (grün) relativ zur LBD (grau) und regulieren dadurch die Aktivität des Rezeptors. Bei der Bindung eines Agonisten (gelb) verschließt H12 die Ligandenbindungstasche (1). Eine aktive Konformation wird stabilisiert, die die Rekrutierung von Koaktivatorproteinen (KoA, pink) an die AF2 ermöglicht (2). Bindet ein partieller Agonist in der Ligandenbindungstasche der LBD, kommt es durch eine suboptimale Orientierung von H12 zu einer leichten Begünstigung einer inaktiven, gegenüber einer aktiven Konformation. Durch Anwesenheit eines Koaktivators, kann das Gleichgewicht auf die aktive Seite verschoben werden (3). Antagonisten verhindern, dass H12 die Ligandenbindungstasche verschließt und so die AF2 ausbildet. Bei klassischen SERMs (4) verhindert eine lange Seitenkette die aktive Orientierung der H12. Agonisten ohne sterisch anspruchsvolle Seitenketten können über einen passiven Mechanismus durch nicht-optimale Kontakte mit der Bindungstasche verhindern, dass H12 diese verschließt und so eine inaktive Konformation stabilisieren (5). „Volle“ Antagonisten besitzen eine sehr lange Seitenkette, die aus der Bindungstasche herausragt und einen Teil der AF2 Region besetzt. H12 ist nicht mehr an die LBD assoziiert und sowohl die AF2- als auch die AF1-Aktivität des Rezeptors werden blockiert (6). Für die Rekrutierung von Korepressorproteinen (KoR, blau) (8), müssen H3 und H5 zugänglich sein. Die Verdrängung von H12 (7) begünstigt die Interaktion mit dem ER. (Abbildung angepasst nach Pike *et al.*, 2006)^[5]

Unabhängig von der Art des gebundenen Liganden, lagern sich die ER LBDs über eine durch H8/H11 generierte Interaktionsfläche zu Dimeren mit einer ähnlichen Struktur zusammen.^[27a, 49] Liganden, wie das natürliche Steroidhormon E2 (PDB-Eintrag: 1A52)^[27a, 50] oder der nicht-steroidale Agonist Diethylstilbestrol (DES, PDB-Eintrag: 3ERD),^[51] stabilisieren die aktive Konformation des Rezeptors, in der H12 die Ligandenbindungstasche verschließt. Dadurch begünstigen sie die Bindung von Koaktivatorproteinen an AF2.

Partielle Agonisten, wie das Phytoestrogen Genistein (GEN),^[41] sind nicht in gleichem Umfang wie volle Agonisten in der Lage, das Gleichgewicht auf die Seite der aktiven Konformation zu verschieben, sondern erhöhen die Affinität des Rezeptors zu Koaktivatoren nur geringfügig. Bei der Bindung eines partiellen Agonisten, kommt es durch eine suboptimale Orientierung der H12 nur zu einer leichten Stabilisierung einer inaktiven gegenüber einer aktiven Konformation (ERβ-GEN-Komplex: PDB-Eintrag: 1QKM). Beide Grenzkonformationen sind

weiterhin zugänglich, so dass in Anwesenheit eines Koaktivators das Gleichgewicht zur agonistischen, aktiven Konformation verschoben wird (ER β -GEN-SRC1-1-Komplex: PDB-Eintrag: 1X7J).

Demgegenüber begünstigen antagonistische Liganden die Interaktion des ER mit Korepressorproteinen. Man unterscheidet dabei zwischen „vollen“ Antagonisten (antagonistische Wirkung gegenüber AF1 und AF2), wie ICI 164,384,^[49] und SERMs (*selective estrogen receptor modulators*), wie Raloxifen (RAL), Tamoxifen (TAM) und 4-Hydroxytamoxifen (OHT).^[27a, 41, 51] SERMs sind eine Gruppe synthetischer ER Liganden mit gewebespezifischem, aktivierendem oder deaktivierendem, pharmakologischen Effekt. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind im Einzelnen nicht vollständig verstanden, scheinen aber von einer gewebespezifischen Aktivierung des ER über andere Regionen/Mechanismen, wie AF1, unterschiedlichen Expressionsprofile und posttranslationalen Modifikationen der Koregulatorproteine und des Rezeptors in verschiedenen Geweben sowie zelltypabhängigen Chromatin-Strukturen herzuführen.^[52]

Traditionelle SERMs, wie RAL und OHT, bestehen aus einem phenolischen Pharmakophor, der die Steroid-Struktur von E2 imitiert, sowie einer variablen, basischen Seitenkette. Die Bindung erfolgt ähnlich zu E2 in der Ligandenbindungstasche der LBD (PDB-Einträge: 1QKN und 3ERT). Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit H3 und H11 sowie einer Interaktion der basischen Gruppe mit Asp351/Asp303 (ER α /ER β) ragt die Seitenkette aus der Tasche heraus. Dadurch kann H12 die Ligandenbindungstasche nicht verschließen und nimmt eine gestreckte „autoinhibierende“ Konformation ein, bei der H12 die AF2 Region belegt und die Rekrutierung von Koaktivatoren verhindert (Abbildung 1.2.3-C und Abbildung 1.2.4-(4)).^[27a, 51] Gleichzeitig unterstützen SERMs, wie OHT und RAL, die Bindung von Korepressoren an den ER *in vivo*.^[53] Diese Interaktionen sind bisher aber kaum strukturell untersucht. Korepressorpeptide scheinen, ähnlich wie die H12 in Komplexstrukturen mit klassischen SERMs, an die AF2 zu binden.^[54] Eine Voraussetzung dafür ist die Zugänglichkeit von H3-H5. Durch die Verdrängung von H12 wird die Bindung weiter begünstigt.^[55]

Neben dem klassischen SERM-Mechanismus konnte auch ein passiver Antagonismus, mit einem Liganden ohne sperrige Seitenkette, beobachtet werden. Der passive Antagonist THC (5,11-*cis*-diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol) kann viele der üblichen günstigen Kontakte mit der Ligandenbindungstasche nicht herstellen und induziert eine teils ungeordnete Struktur in der Tasche. Hierdurch kann H12 nicht in der aktiven Orientierung über der Tasche stabilisiert werden. Das Gleichgewicht wird so weit zu einer inaktiven, gestreckten Konformation verschoben, dass die aktive Orientierung praktisch nicht mehr zugänglich ist. Der ER β -THC-Komplex (PDB-Eintrag: 1L2J) induziert dabei eine ähnliche Orientierung der H12 wie ein partieller Agonist.^[56]

Die Bindung eines „vollen“ Antagonisten, wie ICI 164,384, inaktiviert sowohl AF1 als auch AF2. Durch eine verlängerte Seitenkette verhindert der Ligand sowohl die Bindung von H12 an die AF2-Region, als auch das Abknicken über der Ligandenbindungstasche. H12 ist nicht mehr stabil an die LBD assoziiert und der Rezeptor ist für Korepressorproteine zugänglich (PDB-Eintrag: 1HJ1).^[49]

1.2.4 Der Estrogenrezeptor in der Wirkstoff-Forschung

Durch ihre hohe therapeutische Relevanz waren hormon-regulierte Signalwege schon vor der Identifizierung der NRs Gegenstand medizinischer Forschung und stellen bis heute wichtige Ziele mit großem Potential für die Wirkstoff-Entwicklung dar. Estrogene spielen eine zentrale Rolle für die Entwicklung des weiblichen Fortpflanzungssystems. Sie regulieren das Wachstum und die Funktion des Brustgewebes, der Gebärmutter und der Eierstöcke, wobei ein erhöhter Estrogenspiegel die Entstehung von Krebserkrankungen begünstigen kann. Der ER ist daher ein wichtiger Angriffspunkt für die Behandlung oder Prävention von Brustkrebs. Außerdem ist der Rezeptor ein Zielmolekül für die Behandlung von Erkrankungen, die durch einen Estrogenmangel hervorgerufen werden, wie Osteoporose, Hitzewallungen und koronarer Herzkrankheit bei Frauen in oder nach der Menopause. Der Estrogen-Signalweg kann sowohl indirekt, durch den Einsatz von Aromatasehemmern, die die Estrogen-Biosynthese blockieren,^[57] als auch mit Verbindungen, die den ER direkt adressieren, beeinflusst werden.

Tamoxifen (Nolvadex®, ICI Pharmaceuticals, jetzt AstraZeneca) wurde ursprünglich als Mittel zur Empfängnisverhütung entwickelt und ist ein SERM der ersten Generation. 1977 war Tamoxifen das erste von der FDA zugelassene zielgerichtete Therapeutikum zur Behandlung von metastasierendem Brustkrebs^[58] und gilt auch heute noch als Standardtherapie bei ER-positivem Brustkrebs.^[59] Tamoxifen selbst hat eine geringe Affinität zum ER. Die antiestrogene Wirkung *in vivo* wird von den primären und sekundären Hauptmetaboliten 4-Hydroxytamoxifen und Endoxifen (4-Hydroxy-*N*-desmethyl-Tamoxifen) hervorgerufen, welche eine hohe Affinität zu ER α und ER β haben und die E2-induzierte Proliferation humaner Brustkrebszellen inhibieren.^[60] Aufgrund seiner estrogenen, beziehungsweise agonistischen Wirkung in anderen Geweben, erhöht Tamoxifen das Risiko für die Entstehung von Endometriumkarzinomen und Thromboembolien, wodurch die maximale Behandlungsdauer auf fünf Jahre begrenzt ist.^[61] Das Benzothiophenderivat Raloxifen (Evista®, ELI LILLY AND COMPANY)^[58] ist ein SERM der zweiten Generation mit estrogener Wirkung im Knochen- und antiestrogener Wirkung im Brustgewebe und der Gebärmutter. Raloxifen ist für die Therapie und Prophylaxe von postmenopausaler Osteoporose sowie zur

Senkung des Brustkrebsrisikos zugelassen und führt, im Gegensatz zu Tamoxifen, nicht zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Endometriumkarzinomen.^[62] Neben diesen Verbindungen wurden eine Reihe weiterer SERMs zur Behandlung oder Prophylaxe verschiedener Indikationen, beispielsweise von Osteoporose oder Hitzewallungen bei postmenopausalen Frauen, zugelassen oder befinden sich in klinischen Studien.^[63]

Fulvestrant (Faslodex®, ICI Pharmaceuticals, jetzt AstraZeneca) ist ein 7α -Alkylamid E2-Analogon, das zur Wirkstoffgruppe der SERDs (*selective estrogen receptor down-regulators*) gehört.^[64] Bei diesen Verbindungen handelt es sich um „volle“ Antagonisten des ER, die eine ausschließlich antiestrogene Wirkung im gesamten Körper aufweisen.^[65] SERDs sind in der Lage, die proliferativen Effekte der Estrogene in Tumorzellen vollständig zu unterdrücken.^[66] In klinischen Studien zeigte Fulvestrant eine gute Verträglichkeit sowie ähnliche Wirksamkeit wie Tamoxifen und ist als *Second-Line* Therapie bei fortgeschrittenem Brustkrebs zugelassen.^[67] Der Komplex eines SERDs mit dem ER ist immer noch in der Lage an EREs zu binden, jedoch sind sowohl AF1 als auch AF2 inaktiviert. Die Bindung eines SERDs beeinträchtigt den Transport des neu synthetisierten ER in den Zellkern^[68] und induziert Änderungen in der Proteinfaltung, die für eine effektive Ubiquitinierung und damit einen schnellen Abbau des Rezeptors sorgen.^[69] Weitere „volle“ Antagonisten mit verbesserter oraler Bioverfügbarkeit befinden sich derzeit in klinischen Studien, wie der ER α Antagonist TAS-108, der die Rekrutierung von Korepressorproteinen unterstützt, ohne AF1 zu aktivieren oder die DNA-Bindung zu beeinflussen.^[70]

Ein tiefgehendes Verständnis der Wirkmechanismen verschiedener ER Liganden bietet die Chance zur Entwicklung neuer SERMs oder Substanzkombinationen mit verbesserten pharmakologischen Profilen, die eine optimale Behandlung mit stark reduzierten Nebenwirkungen ermöglichen. Ein idealer SERM hätte eine antagonistische Wirkung in der Gebärmutter und den Brustdrüsen und besitzt gleichzeitig die positive estrogene Wirkung auf Herz-Kreislauforgane, Knochengewebe sowie das Zentralnervensystem.^[71] SERMs der ersten und zweiten Generation wurden vor allem auf Grundlage ihrer gewebe selektiven Aktivitätsprofile entwickelt. Ein neuer Ansatz stellt die Entwicklung Subtyp-Spezifischer ER Liganden dar (SERSMs, *selective estrogen receptor subtype-specific modulators*), die die unterschiedlichen Expressionsprofile und Transkriptionsaktivitäten von ER α und ER β nutzen, um die gewünschte Wirkung in einem bestimmten Gewebe zu erzielen und Nebenwirkungen zu minimieren.^[72] In diesem Zusammenhang sind vor allem selektive ER β Agonisten von Interesse, beispielsweise bei der Prävention oder Therapie von Prostatakarzinomen im Frühstadium, benigner Prostatahyperplasie,^[73] kolorektalen Karzinomen,^[74] Pleuramesotheliomen,^[75] Stoffwechselstörungen^[76] oder menopausalen Symptomen.^[77]

1.3 Proteinkinasen

Die Familie der Proteinkinasen stellt eine weitere wichtige Klasse an Zielmolekülen für die moderne Wirkstoff-Entwicklung dar. Sie macht mit ihren bis heute bekannten 538 Mitgliedern etwa 2 % des menschlichen Genoms aus.^[78] Im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Kernrezeptoren, besitzen Proteinkinasen eine enzymatische Aktivität und katalysieren die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxyl-Gruppe einer Aminosäureseitenkette (Serin, Threonin oder Tyrosin) ihrer Substratproteine. Dadurch können sie wichtige Eigenschaften, wie die Struktur, Aktivität oder Lokalisation ihrer Substrate beeinflussen und nehmen eine Schlüsselrolle in der zellulären Signaltransduktion ein. Proteinkinasen besitzen eine flexible Struktur, die in einem dynamischen Gleichgewicht einer Vielzahl konformationeller Zustände vorliegen kann und deren Aktivität über komplexe Mechanismen reguliert wird. Aufgrund ihrer bedeutenden Funktionen, führen Fehler in der Regulation von Proteinkinasen oft zu Störungen in der Kontrolle grundlegender zellulärer Prozesse, wie der Proliferation, der Differenzierung und des Metabolismus. Solch schwerwiegende Veränderungen sind in vielen Fällen essentiell an der Entstehung verschiedener Erkrankungen, wie Diabetes, Krebs, rheumatoider Arthritis oder Autoimmunerkrankungen beteiligt.^[79]

Obwohl die posttranslationale Phosphorylierung von Proteinen schon 1954 nachgewiesen werden konnte, dauerte es noch Jahrzehnte, bis ihre physiologische Relevanz und die Bedeutung von fehlregulierter Proteinphosphorylierung für die Entstehung diverser Erkrankungen erkannt wurde.^[80] Ein Meilenstein für die Kinaseforschung stellte 1976 die Entdeckung des ersten zellulären Proto-Onkogens *src*, welches für die Tyrosinkinase Src (*sarcoma*) codiert, durch J. Michael Bishop und Harold E. Varmus, dar.^[81] Mit Hilfe der genetischen Information eines onkogenen Retrovirus, gelang ihnen die Identifikation von wachstumskontrollierenden, zellulären Proto-Onkogenen in zahlreichen Organismen. Ihre Entdeckung, die später mit dem Nobelpreis in Physiologie und Medizin ausgezeichnet wurde, legte die Grundlage für das moderne Verständnis über die Transformation gesunder Zellen in Krebszellen und die Entstehung von Tumor-Erkrankungen. Die Verknüpfung von unkontrollierter Zellproliferation mit fehlregulierter Kinaseaktivität begründete einen Wendepunkt in der Tumorthherapie und ermöglichte erstmals die rationale Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe, welche 2001 zur Zulassung des ersten therapeutischen Kinaseinhibitors (Imatinib, Glivec®) für die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie führte.^[82]

Ein weiterer Meilenstein war die 1991 gelöste Kristallstruktur der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), welche erstmals den konservierten Aufbau der katalytischen Domäne

(Kinase-Domäne) einer Proteinkinase zeigte (Abbildung 1.3.1).^[83] Diese setzt sich aus einer N-terminalen Subdomäne, bestehend aus fünf β -Faltblättern und einer α -Helix (Helix α C), sowie einer vorwiegend α -helikalen C-terminalen Subdomäne zusammen. Zwischen den Domänen, die über eine flexible Scharnierregion miteinander verbunden sind, liegt das aktive Zentrum mit einer vorderen Tasche, die für die Bindung des Kofaktors ATP und die Katalyse verantwortlich ist, sowie einer dahinter liegenden hydrophoben Tasche.^[84] Die Bindung von ATP wird über Wasserstoffbrücken zwischen der Adenin-Einheit und dem Amid-Rückgrat der Scharnierregion stabilisiert.

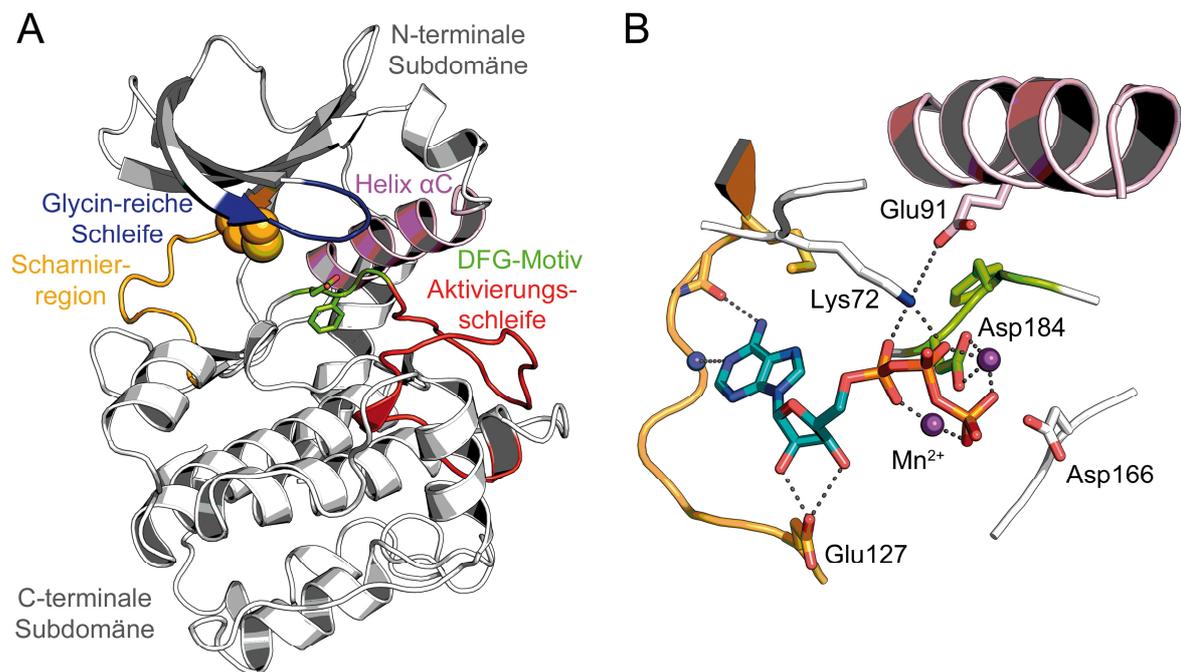


Abbildung 1.3.1 **A)** Röntgenkristallstruktur der konservierten katalytischen Domäne einer Proteinkinase am Beispiel von PKA (PDB-Eintrag: 1ATP). **B)** ATP wird im aktiven Zentrum, zwischen der N- und C-terminalen Subdomäne, gebunden und über ein komplexes Wasserstoffbrückennetzwerk sowie durch Koordination an zwei Mn^{2+} -Ionen für den Transfer der γ -Phosphatgruppe auf ein Proteinsubstrat präorganisiert. (Um die Koordination der Triphosphatereinheit detailliert untersuchen zu können, wurden, abweichend von den physiologischen Bedingungen, Mg^{2+} gegen Mn^{2+} -Ionen im Proteinkristall ausgetauscht).^[83]

Am Übergang von der Scharnierregion zur N-terminalen Subdomäne befindet sich der sogenannte Türsteherrest (*gatekeeper residue*). Diese Aminosäure begrenzt durch ihre Größe und Polarität die Zugänglichkeit der ATP-Bindetasche sowie einer hydrophoben Subtasche im hinteren Bereich des aktiven Zentrums. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Bindung klassischer Kinaseinhibitoren und ist daher oft für die Entstehung klinisch relevanter Wirkstoffresistenzen verantwortlich. Einfache Punktmutationen eines kleinen Türsteherrests zu einer räumlich anspruchsvolleren, hydrophoben Aminosäure (wie

beispielsweise die Substitution von Thr gegen Ile oder Met), führen oft zu sterischer Abstoßung zwischen Türsteher und Inhibitor und resultieren im Verlust der inhibitorischen Aktivität.^[85]

Die flexible Glycin-reiche Schleife in der N-terminalen Subdomäne, die das konservierte Aminosäuremotiv GXGXΦG (G: Gly; X: beliebige AS; Φ: meist Tyr oder Phe) enthält, stabilisiert die α- und β-Phosphatgruppen des ATP-Moleküls über ionische Wechselwirkungen. Ihre Konformation wird durch die Anwesenheit von Liganden sowie den Aktivierungszustand der Kinase-Domäne bestimmt. Die Konformation der Aktivierungsschleife, welche das konservierte DFG-Motiv (Asp-Phe-Gly) enthält, ist in vielen Kinasen essentiell für die Regulation der katalytischen Aktivität und wird oft durch Phosphorylierung kontrolliert.^[86] Die Einführung einer Phosphatgruppe innerhalb der Aktivierungsschleife führt zur Umlagerung und Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen den Seitenketten des DFG-Motivs, der Helix αC und der Aktivierungsschleife, welches eine katalytisch aktive Konformation stabilisiert. Alternativ kann die Konformation der Aktivierungsschleife auch über Interaktion mit Wassermolekülen,^[87] Ionen,^[88] negativ geladenen Aminosäureseitenketten^[89] oder Protein-Protein-Interaktionen reguliert und stabilisiert werden.^[90] In der aktiven Konformation (*DFG-in*), ist die Phe-Seitenkette in Richtung der Helix αC orientiert und besetzt eine hydrophobe Tasche, während Asp in Richtung des aktiven Zentrums zeigt. Die Triphosphateinheit aus ATP wird über Interaktionen mit einem konservierten Lys (Lys72 in PKA) und Koordination an zwei Mg²⁺-Ionen optimal für den Transfer orientiert, welche wiederum über Interaktionen mit Glu aus der Helix αC (Glu91 in PKA) und Asp aus dem DFG-Motiv stabilisiert werden. Die koordinative Bindung an die Mg²⁺-Kofaktoren schirmt die negative Ladung ab und ermöglicht zusammen mit Asp166, als katalytische Base, den nukleophilen Angriff und damit den Transfer der γ-Phosphatgruppe auf das Substratprotein.^[91] In der katalytisch inaktiven Konformation (*DFG-out*) nimmt die Aktivierungsschleife eine alternative Orientierung ein. Dabei liegt das Phenylalanin des DFG-Motivs um etwa 180° gedreht vor und verhindert durch seine räumlich anspruchsvolle Seitenkette die Bindung von ATP. Die Seitenkette des Aspartat-Rests zeigt vom aktiven Zentrum weg, wodurch eine effektive Koordination der Triphosphateinheit verhindert wird. Durch Umlagerung der Aktivierungsschleife wird außerdem eine hydrophobe Tasche im hinteren Bereich des aktiven Zentrums generiert. In einigen Kinasen, wie EGFR und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), wird die katalytische Aktivität durch einen alternativen allosterischen Mechanismus über die Orientierung der Helix αC reguliert, die in einer aktiven Konformation in Richtung des aktiven Zentrums orientiert ist.^[92] Das hydrophobe Rückgrat (*hydrophobic spine*) stellt einen weiteren regulatorischen Mechanismus dar, der Interaktionen zwischen den Subdomänen ermöglicht.

Es besteht aus einer Gruppe hydrophober Aminosäuren im Inneren der Kinase-Domäne (nicht lösungsmittlexponiert), die wie ein Rückgrat beide Subdomänen durchspannen und eine flexible Verbindung für die Interdomänen-Kommunikation darstellen. Die Zusammenlagerung des regulatorischen Rückgrats (R-Rückgrat) geschieht üblicherweise in einer definierten Abfolge an Ereignissen, die in der Ausbildung der aktiven Kinase-Konformation resultieren. Das zweite, sogenannte katalytische Rückgrat (C-Rückgrat), wird erst nach der Bindung des Kofaktors ATP komplettiert.^[93]

1.3.1 Kinaseinhibitoren

Vor allem in der Tumorthherapie haben sich Kinaseinhibitoren, aufgrund günstiger Eigenschaften, wie einer verringerten Toxizität verglichen mit klassischen Zytostatika, zu wichtigen Werkzeugen entwickelt. Derzeit besitzen fast 30 Kinaseinhibitoren eine Arzneimittelzulassung der FDA für die Behandlung verschiedener Indikationen. Basierend auf ihren Bindungsmodi, werden niedermolekulare Kinaseinhibitoren in Typ I-, Typ II-, Typ III-, Typ IV- sowie kovalente Inhibitoren klassifiziert.

Klassische Typ I Inhibitoren binden ATP-kompetitiv im aktiven Zentrum von Proteinkinasen und adressieren üblicherweise die aktive *DFG-in* Konformation. Sie imitieren die Bindung der Adenin-Gruppe von ATP, bilden Wasserstoffbrückenbindungen zum Proteinerückgrat der Scharnierregion aus und verhindern so die Bindung des natürlichen Kofaktors an die Kinase.^[94] Typ I-Inhibitoren finden heute vielfach Anwendung in der Tumorthherapie, beispielsweise bei der Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie (CML) (Dasatinib, Sprycel®), von Nierenzellkarzinomen und gastrointestinalen Stromatumoren (Sunitinib, Sutent®) oder von nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinomen (Erlotinib, Tarceva®).

Typ II-Inhibitoren binden im aktiven Zentrum einer Proteinkinase, stabilisieren im Gegensatz zu den Typ I-Inhibitoren aber die katalytisch inaktive *DFG-out* Konformation. Sie bilden Kontakte zur Scharnierregion aus und belegen zusätzlich die, nur in der *DFG-out* Konformation zugängliche, hydrophobe (quasi „allosterische“) Tasche im hinteren Bereich des aktiven Zentrums.^[95] Die Konformationsänderungen, die für die Bindung dieser Inhibitoren notwendig sind, unterliegen einer kinetischen Kontrolle, wodurch sich die Verweildauer dieser Inhibitoren an ihren Zielproteinen verlängern kann.^[96] Beispiele für Typ II-Inhibitoren in der therapeutischen Anwendung sind Imatinib (Glivec®), das zur Behandlung von CML eingesetzt wird, oder Sorafenib (Nexavar®) zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms und Nierenzellkarzinomen.

Typ III-Inhibitoren adressieren ausschließlich die, in der katalytisch inaktiven *DFG-out* Konformation ausgebildete, hydrophobe Tasche und verfügen über keine Kontakte zur

Scharnierregion. Ihre Bindung wird meist über Wasserstoffbrückenbindungen zur Helix αC und dem DFG-Motiv stabilisiert.^[95a] Substituierte Pyrazolharnstoff-Inhibitoren von p38 α ^[97] oder der MEK1/MEK2-Inhibitor CI-1040^[98] sind Beispiele für diese Inhibitor-Klasse, die in der therapeutischen Anwendung keine bedeutende Rolle spielen, sondern meist als Ausgangspunkt für die Entwicklung potenter Typ-II Inhibitoren dienen.

Allosterische Typ IV-Inhibitoren binden abseits des aktiven Zentrums und kontrollieren die Aktivität ihrer Zielkinase über verschiedene Mechanismen, beispielsweise durch Beeinflussung der Interaktion mit regulatorischen Domänen, Rekrutierung anderer Proteine oder durch internen *cross-talk*, der Konformationsänderungen induziert.^[96b] Aufgrund ihres einzigartigen Wirkmechanismus sind Typ IV-Inhibitoren eine besonders attraktive Inhibitor-Klasse, die eine hohe Selektivität verspricht. Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung von Typ IV-Inhibitoren ist eine allosterische Tasche, die an der Kontrolle der katalytischen Aktivität einer Kinase beteiligt ist, wie beispielsweise die Myristoyl-Tasche der Abelson Kinase (Abl). Liganden, die in dieser Tasche binden, können sowohl einen aktivierenden Effekt, wie DPH, als auch einen inhibierenden Effekt, wie GNF-2, auf Abl ausüben.^[99]

Kovalente Inhibitoren besitzen ein reaktives Elektrophil und können nach der initialen reversiblen Bindung an die Kinase eine zusätzliche irreversible, kovalente Bindung zu einer benachbarten nukleophilen Aminosäureseitenkette, in der Regel ein Cystein, ausbilden. Die kovalente Bindung verhindert die Dissoziation des Inhibitors und führt zu einer langen Verweildauer, bis zum Abbau und der Neubildung des Zielproteins. Durch die lange Verweildauer am Zielprotein sowie eine verkürzte Verweildauer an anderen Proteinen, die nicht über einen entsprechenden Cystein-Rest in räumlicher Nähe zur Bindungsstelle für die Ausbildung einer kovalenten Bindung verfügen, besitzen kovalente Inhibitoren eine temporäre Selektivität (*temporal target selectivity*).^[96b] Durch ihre verringerte *off-target* Toxizität und den verlangsamten Abbau, verfügen kovalente Inhibitoren oft über eine gute *in vivo* Wirksamkeit und haben das Potential, klinisch relevante Wirkstoffresistenzen, die bei der Behandlung mit klassischen Inhibitoren auftreten, zu umgehen. Derzeit befinden sich mit Rociletinib (CO-1686) und AZD9291 erste kovalente EGFR-Inhibitoren zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms in klinischen Studien, die selektiv die klinisch relevante Türsteher-Resistenzmutante T790M adressieren.^[100]

2 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Der Estrogenrezeptor, der zur Familie der Kernrezeptoren gehört, spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation vieler physiologischer Prozesse, aber auch bei der Entstehung von Erkrankungen, wie Diabetes, Krebs, oder rheumatoider Arthritis, und stellt damit einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Wirkstoff-Forschung dar. Strukturbiologische Untersuchungen am Estrogenrezeptor im Komplex mit verschiedenen Liganden, die einen aktivierenden oder inaktivierenden Effekt auf den Rezeptor ausüben, konnten wertvolle Informationen über den molekularen Wirkmechanismus dieser Verbindungen, sowie für das Design neuer Wirkstoffe liefern. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die durch einen Liganden stabilisierte Konformation des Rezeptors entscheidend für seinen physiologischen Effekt ist. Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung neuer Liganden des Rezeptors, die im Gegensatz zu konventionellen *in vitro* Assay-Systemen, in der Lage sind, Konformationsänderungen in der LBD des ER zu detektieren, sind für die Wirkstoff-Entwicklung daher von besonderem Interesse. Ein solches System wäre ein wertvolles Werkzeug zur schnellen und kostengünstigen Identifizierung neuer Liganden mit einem bestimmten physiologischen Effekt und könnte zur Entwicklung neuer Wirkstoffe mit einem verbesserten therapeutischen Profil sowie reduzierten Nebenwirkungen beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein hochdurchsatzfähiger fluoreszenzbasierter direkter Bindungsassay entwickelt werden, der in der Lage ist, spezifische Konformationsänderungen im Estrogenrezeptor β zu detektieren und so zwischen der Bindung von Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten zu differenzieren.

Basierend auf strukturbiologischen Daten des ER im Komplex mit verschiedenen Liganden, sollten dazu zunächst geeignete Protein-Konstrukte für eine Verwendung im Assay entworfen werden. Zur Herstellung der Protein-Konstrukte sollten geeignete Protokolle für die heterologe Expression in *Escherichia coli* und die Aufreinigung der Proteine entwickelt werden. Nach der biochemischen Charakterisierung der hergestellten Proteine, sollten diese zur Etablierung des Assays verwendet werden. Dafür sollten zunächst geeignete Testverbindungen ausgewählt werden, die die verschiedenen Konformationen des Rezeptors stabilisieren. Mit Hilfe dieser Testverbindungen, sollte anschließend ein geeignetes Protein-Konstrukt sowie ein geeigneter Fluorophor für den Einsatz im Assay ausgewählt werden. Nach einer Optimierung der Puffer-Bedingungen sollten die Ergebnisse mit einem orthogonalen Assay-System validiert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob mit dem entwickelten Assay-System auch kinetische Bindungsstudien durchgeführt werden können.

In einem zweiten Projekt sollte die Bindung verschiedener Kinaseinhibitoren an die p38 α Mitogen-aktivierte Kinase analysiert werden. Röntgenkristallographische Untersuchungen vermitteln ein räumliches Bild der Struktur eines Proteins mit atomarer Auflösung. Diese Strukturmodelle liefern entscheidende Informationen über Funktion und Regulation eines Proteins sowie Protein-Ligand-Wechselwirkungen und stellen einen integralen Bestandteil der modernen Wirkstoff-Entwicklung dar. Besonders für das Verständnis der Wirkung sowie für die chemische Optimierung neuer Wirkstoffkandidaten, ist die strukturbio-logische Untersuchung des Bindungsmodus von Liganden an ihrem Zielprotein hilfreich. Daher sollten verschiedene Verbindungen im Komplex mit p38 α MAPK kristallisiert und mit Hilfe der erhaltenen Röntgenkristallstrukturen der Bindungsmodus im aktiven Zentrum der Kinase analysiert werden.

3 DETEKTION VON KONFORMATIONSÄNDERUNGEN IM ESTROGENREZEPTOR

3.1 Assay Prinzip

Der hier entwickelte direkte Bindungsassay mit Fluoreszenzmarkierungen an Kernrezeptoren (*Fluorescent Labels in Nuclear receptors*, FLiN) nutzt einen solvatochromen Fluorophor als Sensor für die Dynamik des ER. Dadurch ist der FLiN-Assay in der Lage, spezifische Konformationsänderungen, die mit der Ligandenbindung an die LBD des ER einhergehen, zu detektieren und aufgrund der jeweils stabilisierten Konformation zwischen Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten zu unterscheiden. Diese Assay-Technologie wurde ursprünglich für das Hochdurchsatz-Screening nach Typ-II und Typ-III Kinaseinhibitoren für cSrc und p38 α etabliert und konnte seither erfolgreich weiterentwickelt und auf andere Proteine übertragen werden.^[101]

Das Assay-Prinzip beruht auf der Einführung eines reaktiven Cystein-Rests in der flexiblen Region des Zielproteins (im Fall des ER im Bereich der H12) mittels zielgerichteter Mutagenese sowie dem Austausch aller weiteren oberflächenexponierten Cystein-Reste aus dem Protein gegen andere Aminosäuren. Das so erhaltene Protein-Konstrukt kann daraufhin spezifisch mit einem Cystein-reaktiven solvatochromen Fluorophor markiert werden. Kommt es nun zu Konformationsänderungen durch die Bindung eines Liganden, erfährt der Fluorophor eine Veränderung der Polarität seiner unmittelbaren Umgebung, welche sein Emissionsspektrum beeinflusst. Durch Quantifizierung der Veränderungen des Emissionsspektrums kann so die Bindungsaffinität eines Liganden direkt untersucht werden. Im Gegensatz zu klassischen, aktivitätsbasierten Assay-Systemen, können damit spezifisch Verbindungen detektiert werden, die eine bestimmte Konformation des Zielproteins stabilisieren.

3.2 Exkurs: Fluoreszenz und Solvatochromie

Fluoreszenz bezeichnet die Emission von Licht, meist im Bereich des sichtbaren Spektrums, beim Übergang eines Elektrons aus einem angeregten Zustand in den Grundzustand (Abbildung 3.2.1). Organische Fluorophore verfügen üblicherweise über ein konjugiertes Netzwerk delocalisierter Elektronen. Durch die Absorption von Photonen einer bestimmten Energie, kann ein solches Elektron aus seinem Grundzustand (S_0) in eine der Schwingungsebenen eines angeregten Singulett-Zustands (S_1 , S_2) angehoben werden. Durch innere Umwandlung und Schwingungsrelaxation verliert das System an Energie und gelangt in den niedrigsten S_1 -Schwingungszustand, bevor es strahlungslos oder durch Aussenden von Photonen (Fluoreszenz) in den Grundzustand zurückkehrt. Durch die Energiedifferenz zwischen Anregung und Emission, ist die Wellenlänge des emittierten Lichts größer als die Anregungswellenlänge. Diese Differenz zwischen Anregungs- und Emissions-Maximum wird auch als Stokes-Verschiebung (*Stokes shift*) bezeichnet. Die eigentliche Emission der Photonen erfolgt ähnlich schnell wie die Absorption (10^{-15} s); durch eine bestimmte Verweildauer im angeregten Zustand, beträgt die Fluoreszenzlebensdauer jedoch 10^{-10} bis 10^{-7} s. Einen Spezialfall stellt die Phosphoreszenz dar, bei der ein angeregtes Elektron durch *inter-system crossing* vom Singulett- in einen Triplett-Zustand (T_1) übergeht. Die $T_1 \rightarrow S_0$ Relaxation stellt einen prinzipiell verbotenen Übergang dar, der durch Spin-Bahn Kopplung aber trotzdem stattfinden kann. Dadurch kann sich die Lebensdauer der Phosphoreszenz auf mehrere Sekunden erhöhen.^[102]

Auf Fluoreszenz basierende Techniken zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität aus. Durch den Einsatz geeigneter Fluorophore, deren Fluoreszenz-Charakteristika durch physikalische und chemische Parameter wie pH-Wert, Druck, Temperatur, Viskosität, Ionen oder Lösungsmittelpolarität beeinflusst werden, können diese außerdem wertvolle Informationen über ihre Mikroumgebung liefern. Aufgrund dieser Eigenschaften haben sich Fluoreszenz-basierte Techniken zu zentralen Methoden für die Untersuchung der Struktur und Dynamik lebender Systeme entwickelt. Die Einsatzfelder reichen von der Hochdurchsatz-durchmusterung von Substanzbibliotheken in der Wirkstoff-Forschung bis zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie. Viele der dabei eingesetzten Methoden basieren auf grundlegenden photophysikalischen Prinzipien, wie dem Förster-Resonanz-energietransfer (FRET), der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) oder der Fluoreszenzpolarisation (FP).

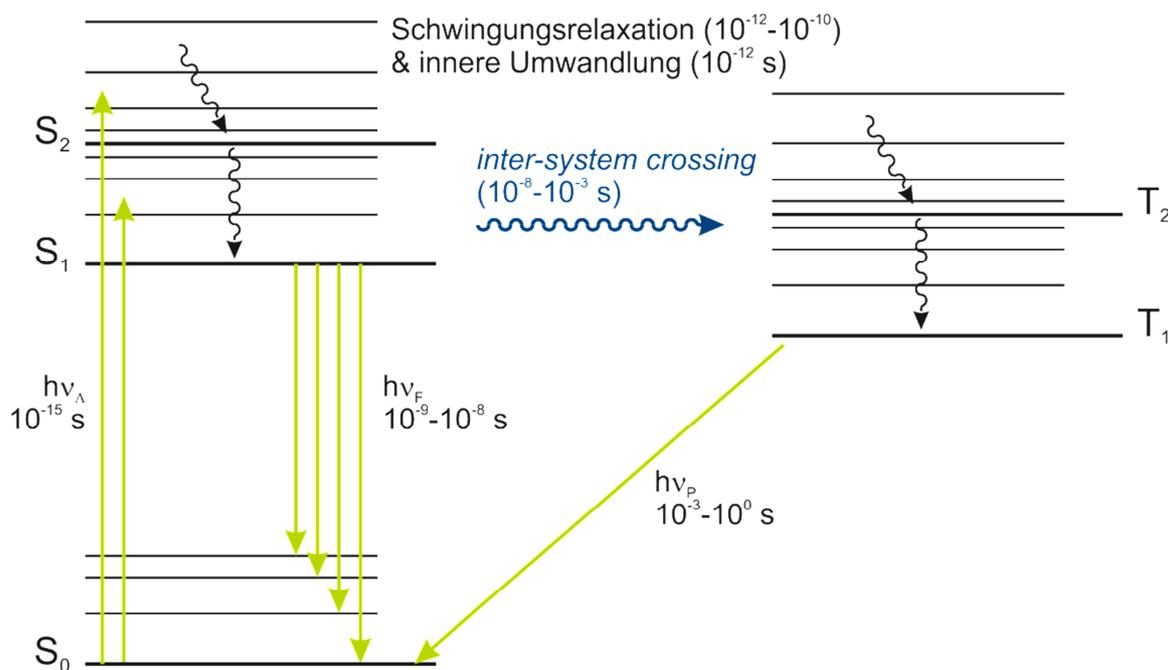


Abbildung 3.2.1 Perrin-Jablonski Diagramm. Durch Absorption von Photonen geeigneter Energie, gelangt ein Elektron aus seinem Grundzustand in einen angeregten Singulett-Zustand. Nach der schnellen, strahlungslosen Schwingungsrelaxation und inneren Umwandlung, kann das System wieder in seinen Grundzustand übergehen. Die Emission von Photonen beim $S_1 \rightarrow S_0$ Übergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Der Übergang von S_1 nach T_1 durch *inter-system crossing* führt zu einem Spin-verbotenen $T_1 \rightarrow S_0$ Übergang und damit zu langsamerer Relaxation, die als Phosphoreszenz bezeichnet wird.^[102]

Solvatochrome Fluorophore eignen sich besonders gut als Sondenmoleküle zur Untersuchung biomolekularer Interaktionen und Dynamik, da ihre Emissionseigenschaften, wie die Fluoreszenzlebensdauer, die Emissionswellenlänge und die Quantenausbeute von der Polarität ihrer unmittelbaren Umgebung stark beeinflusst werden. Sie können Informationen über Konformationsänderungen eines Proteins oder über Protein-Protein Interaktionen liefern, sofern diese mit einer Änderung der lokalen Lösungsmittel-Sphäre einhergehen.^[103]

Beim Übergang aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand ändert sich das Dipolmoment solvatochromer Fluorophore, wodurch die Emissionseigenschaften von der Polarität der Mikroumgebung beeinflusst werden (Abbildung 3.2.2). Durch Absorption eines Photons geeigneter Energie, wird der Fluorophor in einen angeregten Singulett-Zustand angehoben ($S_0 \rightarrow S_1$). Dies führt zu einer ausgeprägten Änderung des Dipolmoments; im hier dargestellten Beispiel nimmt das Dipolmoment zu. Die Moleküle in der polaren Lösungsmittelhülle richten ihre Dipole innerhalb von Pikosekunden neu aus, was aufgrund des größeren Dipolmoments des Fluorophors in einer stärker geordneten Lösungsmittelsphäre resultiert. Durch diese Lösungsmittel-Relaxation sinkt das Energieniveau des S_1 -Zustandes, gleichzeitig wird der S_0 -Zustand destabilisiert und in seiner Energie angehoben.

Relaxiert das System nun wieder in den Grundzustand, wird ein Photon deutlich geringerer Energie (= größerer Wellenlänge) emittiert, als bei der Anregung aufgenommen wurde. Diese sogenannte positive Solvatochromie, bei der es zu einer bathochromen Verschiebung (rot-Verschiebung) des Emissionsspektrums kommt, ist umso stärker ausgeprägt, je polarer das Lösungsmittel ist. Vor allem in polaren protischen Lösungsmitteln, wie wässrigen Puffersystemen, wird die Energiedifferenz des $S_1 \rightarrow S_0$ Übergangs stark verringert. Dadurch wird die konkurrierende strahlungsfreie thermische Relaxation begünstigt und die Fluoreszenz-Quantenausbeute verringert.^[103] Neben der positiven Solvatochromie, existiert auch die negative Solvatochromie, bei der mit zunehmender Lösungsmittelpolarität eine hypsochrome Verschiebung (blau-Verschiebung) des Emissionsspektrums beobachtet werden kann.

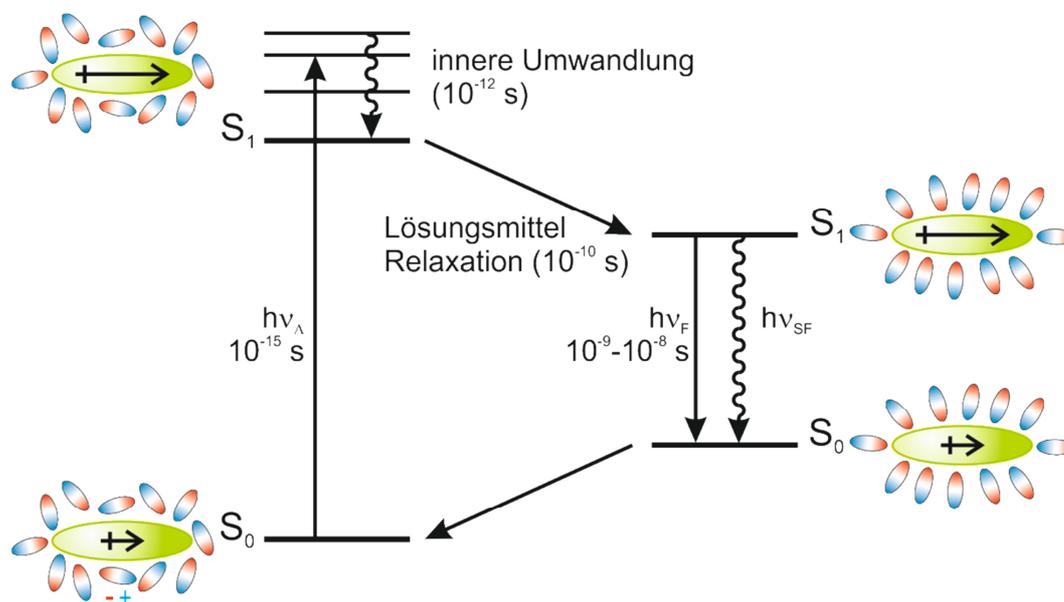


Abbildung 3.2.2 Perrin-Jablonski Diagramm solvatochromer Fluorophore. Der Fluorophor ist als grünes Oval dargestellt. Der schwarze Pfeil repräsentiert sein elektrisches Dipolmoment. Die rot-blauen Ovale stellen die polare Lösungsmittelsphäre des Fluorophors dar, wobei „-/+“ das negative/positive Ende des Dipols anzeigen.^[103]

3.3 Estrogenrezeptor-Konstrukte

Für die Etablierung des FLiN-Assays wurden zunächst, basierend auf bekannten Röntgenkristallstrukturen des ER, verschiedene Protein-Konstrukte des Rezeptors entworfen, die im Folgenden hergestellt, charakterisiert und im Assay getestet werden sollten.

Der humane ER β (hER β) ist ein 59 kDa großes Protein (530 Aminosäuren), das aus funktionell eigenständigen Domänen aufgebaut ist. Für die Entwicklung des FLiN-Systems wurden Estrogenrezeptor-Konstrukte gewählt, die aus der isolierten Ligandenbindungsdomäne (Aminosäuren 260–502) bestehen. Diese ist über ihre Konformationsänderungen maßgeblich für die Regulation der Rezeptoraktivität verantwortlich und lässt sich effizient in *Escherichia coli* heterolog exprimieren. Die unterschiedlichen Konformationen der LBD bei der Bindung verschiedener Klassen an Liganden sind strukturell gut charakterisiert. Je nach Art des Liganden, nimmt die C-terminale H12 in der LBD eine gestreckte oder angewinkelte Orientierung ein und reguliert so die Rekrutierung von Koregulatorproteinen und die Aktivität des Rezeptors. Um diese Konformationsänderungen bei der Ligandenbindung untersuchen zu können, sollte innerhalb oder in der Nähe der flexiblen H12, ein solvatochromer Fluorophor kovalent über einen Cystein-Rest in die hER β LBD-Konstrukte eingeführt werden.

Cystein-Seitenketten eignen sich aufgrund ihrer spezifischen Reaktivität mit Thiol-selektiven Elektrophilen, wie Maleimiden oder α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen (Michael-Akzeptoren), gut für die kovalente Modifikation von Proteinen. Da Cysteine zu den seltensten proteinogenen Aminosäuren zählen (nur 1.37 % der Aminosäuren aller Proteine in der UniProt-Datenbank sind Cysteine),^[104] können sie gut zur spezifischen Markierung an ausgewählten Positionen eingesetzt werden. Für die Markierung wird anstelle der natürlichen Aminosäure an der gewünschten Position mittels zielgerichteter Mutagenese ein Cystein-Rest eingeführt. Um mehrfach-Markierungen zu vermeiden, müssen außerdem alle weiteren Cystein-Reste, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden und potentielle Angriffspunkte in der Markierungsreaktion darstellen, gegen alternative Aminosäuren ausgetauscht werden. Bei der Untersuchung von Konformationsänderungen mit umgebungssensitiven Fluorophoren, dürfen die für die selektive Markierung in das Protein eingeführten Mutationen sowie die eigentliche kovalente Modifikation mit dem Fluorophor, keinen negativen Effekt auf die Faltung oder Funktion des untersuchten Proteins ausüben. Außerdem sollte die konformationelle Plastizität sowie die Ligandenbindung durch die Modifikationen nicht beeinträchtigt werden. Gleichzeitig muss die Markierungsposition so gewählt werden, dass ein eingeführter Fluorophor bei der Konformationsänderung des Proteins eine Änderung in seiner Mikroumgebung erfährt. Da sich die Auswirkungen

einzelner Modifikationen auf die Struktur und Funktion eines Proteins nicht abschätzen lassen, können geeignete Modifikationen für eine solche Fluorophor-Markierung nur empirisch, meist durch Testen einer Reihe potentiell geeigneter Protein-Konstrukte, ermittelt werden.^[103]

Basierend auf Röntgenkristallstrukturen der LBD im Komplex mit verschiedenen Liganden, welche die konformationelle Plastizität des Rezeptors widerspiegeln (PDB-Einträge: 2YLY, 2FSZ, 1QKN und 1X7B), wurden potentiell für das FLiN-System geeignete hER β LBD-Konstrukte entworfen. Dabei wurden vier mögliche Markierungspositionen ausgewählt, an denen jeweils ein Cystein-Rest eingeführt werden sollte. Die Markierungspositionen liegen innerhalb der H12 (Asp486, Leu489, Asn493) oder, wie das schon in der Wildtyp Sequenz vorhandene Cys478, in der Schleifenregion zwischen H11 und H12 (Abbildung 3.3.1). Durch Strecken oder Abknicken der H12 bei der Ligandenbindung kommt es in diesem Bereich zu Konformationsänderungen, die eine Änderung der Umgebungspolarität hervorrufen und daher für den FLiN-Ansatz geeignet schienen. Die Seitenketten der gewählten Positionen sind in den zugrundeliegenden Kristallstrukturen sowohl in der aktiven, als auch in der inaktiven Konformation des Rezeptors lösungsmittlexponiert, so dass genug Raum für die kovalente Modifikation mit einem Fluorophor vorhanden sein und die Faltung des Proteins nicht beeinträchtigt werden sollte.

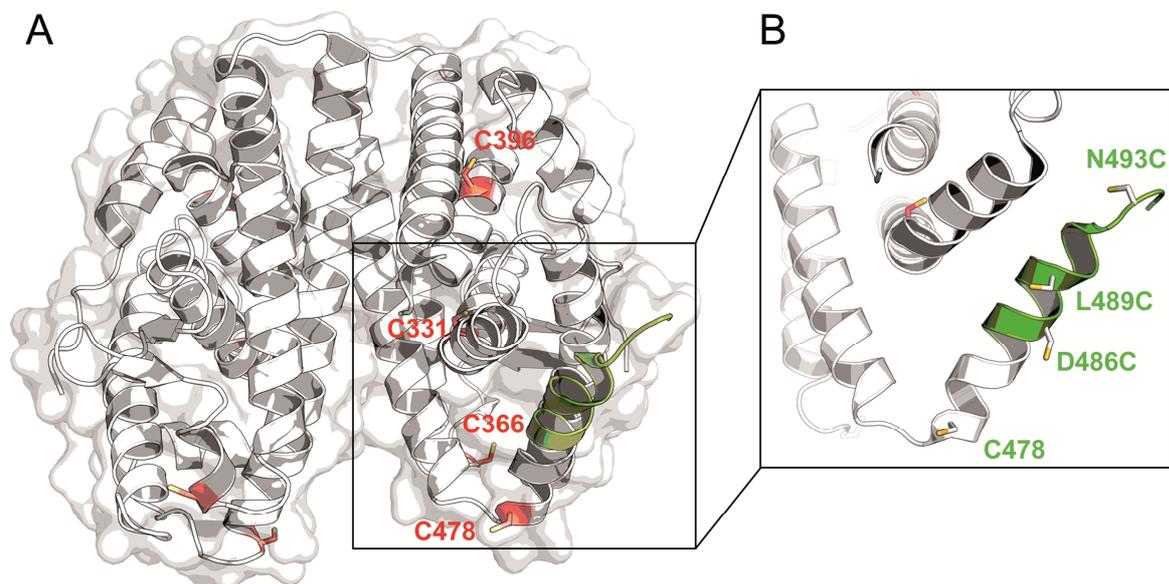


Abbildung 3.3.1 Konstruktdesign für FLiN-Experimente. **A)** Die Wildtyp hER β LBD (hier als Dimer gezeigt; PDB-Eintrag: 2YLY) enthält vier Cysteine pro Monomer (rot hervorgehoben), wobei Cys331 und Cys396 im Inneren des Proteins verborgen und für eine kovalente Modifikation potentiell unzugänglich sind. **B)** Basierend auf Kristallstrukturen der ER β LBD in der aktiven und inaktiven Konformation, wurden vier mögliche Positionen für die Fluorophor-Markierung gewählt und an diesen mittels zielgerichteter Mutagenese Cystein-Reste eingeführt (Markierungspositionen: C478, D486C, L489C und N493C).

Die Wildtyp hER β LBD-Sequenz enthält vier Cystein-Reste (Cys331, Cys366, Cys396 und Cys478), von denen zwei (Cys331 und Cys396) im Inneren der LBD verborgen und daher voraussichtlich nicht für eine kovalente Modifikation mit dem Fluorophor zugänglich sind. Um eine mehrfache Fluorophor-Markierung an den natürlich vorkommenden Cystein-Resten zu vermeiden, wurden verschiedene FLiN-Konstrukte hergestellt, in denen entweder alle vier, oder nur die beiden oberflächenexponierten Cystein-Reste (Cys366 und Cys478), basierend auf einem Sequenz-Alignment verwandter LBD-Sequenzen aus einer BLAST-Analyse,^[105] substituiert wurden (C331S, C366S, C396T, C478L; Abbildung 3.3.2). Neben den Mutanten, wurde auch die Wildtyp hER β LBD im FLiN-Assay getestet, da diese schon über ein geeignetes Cystein (Cys478) verfügt. Das Auftreten einer Mehrfachmarkierung, voraussichtlich an Cys366, ist in der Wildtyp-Sequenz jedoch möglich.

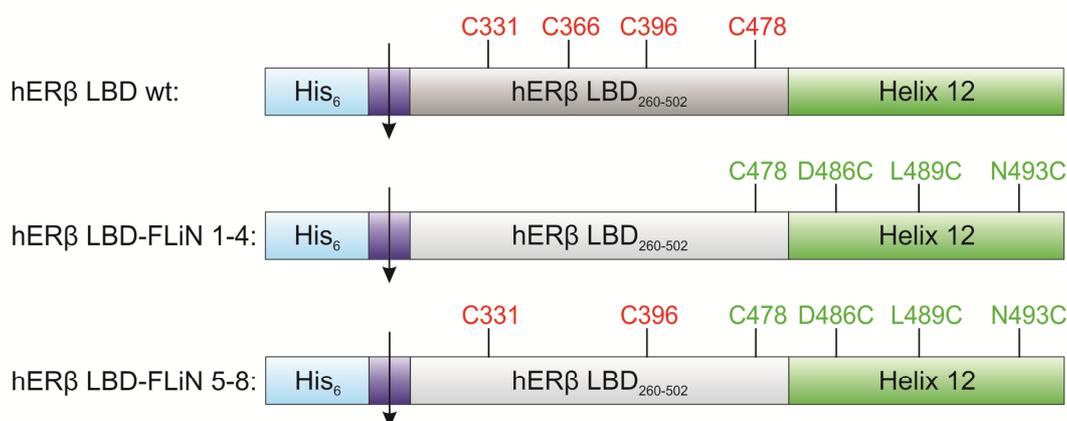


Abbildung 3.3.2 Schematische Darstellung der für die FLiN-Experimente verwendeten hER β LBD-Konstrukte. Alle Konstrukte besitzen einen N-terminalen His₆-Tag, gefolgt von einer Thrombin-Schnittstelle. Alle natürlich vorkommenden Cystein-Reste sind rot markiert; die für die Markierung eingeführten Cystein-Reste sind grün hervorgehoben.

Alle hier verwendeten hER β LBD-Konstrukte wurden mit Hilfe des Vektors pET-15b in *E. coli* exprimiert und tragen einen N-terminalen His₆-Tag, welcher über eine Thrombin-Schnittstelle von den LBD-Konstrukten abgetrennt werden kann. Die einzelnen Konstrukte wurden, ausgehend von hER β LBD wt (Wildtyp) und hER β LBD-mut (C331S, C366S, C396T, C478L), durch zielgerichtete Mutagenese hergestellt. Die erhaltenen Konstrukte wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft.

Tabelle 3.3.1. Übersicht aller hergestellten hER β LBD-Konstrukte (*Homo sapiens* ER β LBD₂₆₀₋₅₀₂).

hERβ LBD-Konstrukt (Plasmid)	Mutationen & Markierungsposition	MW (ohne Start-Methionin) / MW ohne Affinitäts-Tag
wt (pMW05)	Wildtyp, <u>C478</u>	29566.8 Da / 27815.9 Da
mut (pMW06)	C331S, C366S, C396T, C478L	29542.7 Da / 27791.8 Da
FLiN 1 (pMW08)	C331S, C366S, C396T, <u>C478</u>	29532.6 Da / 27781.8 Da
FLiN 2 (pMW09)	C331S, C366S, C396T, C478L, <u>D486C</u>	29530.7 Da / 27779.8 Da
FLiN 3 (pMW10)	C331S, C366S, C396T, C478L, <u>L489C</u>	29532.6 Da / 27781.8 Da
FLiN 4 (pMW11)	C331S, C366S, C396T, C478L, <u>N493C</u>	29531.7 Da / 27780.8 Da
FLiN 5 (pMW12)	C366S, <u>C478</u>	29550.7 Da / 27799.9 Da
mut 2 (pMW13)	C366S, C478L	29560.7 Da / 27809.9 Da
FLiN 6 (pMW14)	C366S, C478L, <u>D486C</u>	29548.8 Da / 27797.9 Da
FLiN 7 (pMW15)	C366S, C478L, <u>L489C</u>	29550.7 Da / 27799.9 Da
FLiN 8 (pMW16)	C366S, C478L, <u>N493C</u>	29549.8 Da / 27798.9 Da

3.4 Heterologe Expression der hER β LBD-Konstrukte

Die hER β LBD-Konstrukte wurden in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Ausgehend von publizierten Expressionsbedingungen, wurden zunächst Testexpressionen für alle Konstrukte im 50 mL Maßstab, gefolgt von einem Aufreinigungsschritt über eine 1 mL Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule und einer Analyse mittels SDS-PAGE und *Coomassie Brilliant Blue* (CBB)-Färbung, durchgeführt.^[106] Für jedes Konstrukt wurden drei Klone getestet und zur Optimierung der Bedingungen die Menge an IPTG, die Temperatur sowie die Dauer der Proteinexpression variiert. Außerdem wurde der Einfluss der Zugabe des ER-Liganden E2 bei der Induktion analysiert, da die Bindung eines Liganden die Stabilität der neu synthetisierten LBDs erhöhen kann (Abbildung 3.4.1).^[106] Bei einer erfolgreichen Expression wurde in der Analyse mittels SDS-PAGE für die hergestellten Konstrukte eine deutliche Bande im Bereich von etwa 29 kDa im Eluat der Affinitätschromatographiesäule erwartet. Für alle Konstrukte wurden so geeignete Bedingungen ermittelt, mit denen die verschiedenen LBDs, jedoch in unterschiedlichen Ausbeuten, löslich exprimiert werden konnten.

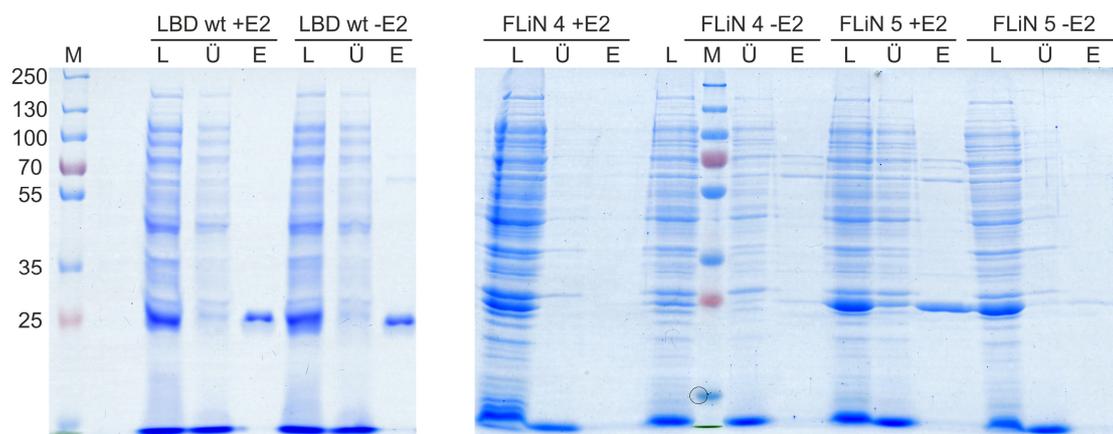


Abbildung 3.4.1 Beispielhafte SDS-Gele der Testexpression zur Analyse des Einflusses von E2 auf die Proteinexpression von hER β LBD wt, hER β LBD-FLiN 4 und -FLiN 5. Die hER β LBD-Konstrukte besitzen ein Molekulargewicht von etwa 29 kDa (L: gesamtes Zell-Lysat; Ü: löslicher Überstand nach Zentrifugation; E: Eluat; M: Protein-Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder).

3.5 Aufreinigung und Markierung der hER β LBD-Konstrukte

Die Aufreinigung aller verwendeten hER β LBD-Konstrukte erfolgte mittels Affinitätschromatographie über einen N-terminalen His₆-Tag, welcher optional über eine Thrombin-Schnittstelle abgespalten werden konnte.

Zunächst wurden alle Konstrukte mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie via FPLC aufgereinigt, direkt (ohne Abspaltung des His₆-Tags) gegen Markierungspuffer dialysiert und optional mit einem Fluorophor markiert. Über einen abschließenden Größenausschlusschromatographieschritt, konnten die jeweiligen Fluorophor-markierten sowie nicht-markierten hER β LBD-Konstrukte in monomerer Form und hoher Reinheit erhalten werden. Um den Einfluss des His₆-Affinitäts-Tags auf den FLiN-Assay zu untersuchen, wurde dieser außerdem in späteren Versuchen für einige hER β LBD-Konstrukte nach dem ersten Affinitätschromatographie-Schritt über die Thrombin-Schnittstelle abgespalten und das Protein weiter gereinigt. Alle Aufreinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung analysiert.

Stellvertretend für alle untersuchten hER β LBD-Konstrukte ist im Folgenden die Aufreinigung von hER β LBD-FLiN 7 unter Abspaltung des His₆-Tags und die anschließende Fluorophor-Markierung gezeigt.

3.5.1 Aufreinigung der hER β LBD-Konstrukte mittels FPLC

Schon nach dem ersten Aufreinigungsschritt mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie, konnte das Zielprotein in hoher Reinheit erhalten werden. Das entsprechende SDS-Gel zeigt für alle gesammelten Eluatfraktionen eine ausgeprägte Bande im erwarteten Bereich um etwa 30 kDa (Abbildung 3.5.1).

Die Fraktionen wurden vereinigt, dialysiert und zur Abspaltung des Affinitäts-Tags über Nacht mit Thrombin inkubiert. Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, dass das Zielprotein zu etwa 50 % gespalten wurde (Abbildung 3.5.2). Zur Abtrennung der verbliebenen, nicht-gespaltenen Proteine sowie des freien His₆-Tags, wurde der Affinitätschromatographieschritt wiederholt, wobei das gespaltene Protein im Durchfluss und der Waschfraktion gesammelt wurde. Nicht gespaltenes Protein wurde an die Säule gebunden und mit Imidazol eluiert (Abbildung 3.5.2).

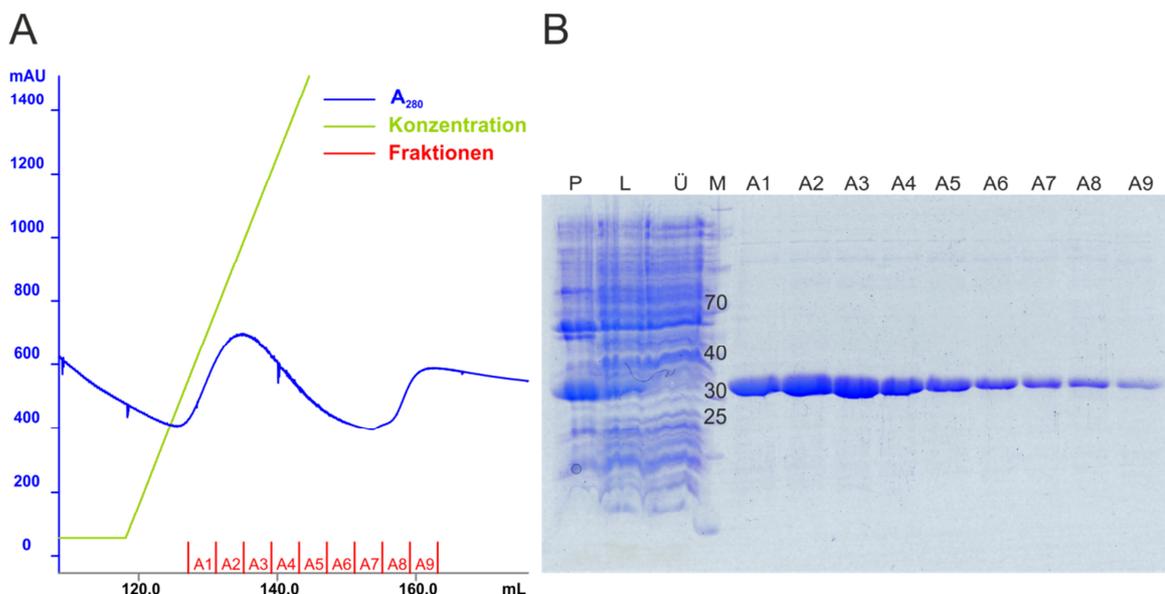


Abbildung 3.5.1 A) Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie für hERβ LBD-FLiN 7 vor Abspaltung des His₆-Tags (blau: UV-Absorption bei 280 nm; grün: Elutionspuffer-Konzentration in % (≙ Imidazol-Gradient)). **B)** Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Das Zielprotein hat ein Molekulargewicht von 29.6 kDa (P: Zellpellet; L: Zellysate; Ü: löslicher Überstand nach Zellaufschluss; A1–A9: Eluatfraktionen; M: Protein-Marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder; das Molekulargewicht ist in kDa angegeben).

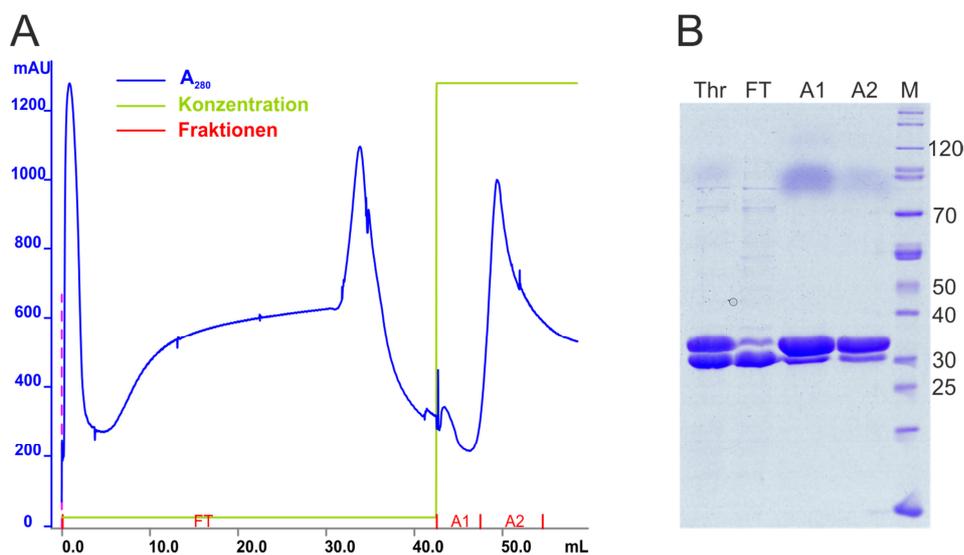


Abbildung 3.5.2 A) Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie für hERβ LBD-FLiN 7 nach Abspaltung des His₆-Tags mit Thrombin. Der Durchfluss und die Waschfraktion (FT) wurden gesammelt und weiter gereinigt (blau: UV-Absorption bei 280 nm; grün: Elutionspuffer-Konzentration in %). **B)** Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Das Zielprotein hat nach der Abspaltung des His₆-Tags ein Molekulargewicht von 27.8 kDa. Etwa 50 % des Gesamtproteins wurde von Thrombin gespalten. Das hERβ LBD-Konstrukt ohne Affinitäs-Tag konnte zu einem großen Teil von nicht-gespaltenem Protein abgetrennt werden. (Thr: Gesamtprotein nach Spaltung mit Thrombin; FT: Durchfluss und Waschfraktion der Ni-Säule; A1+A2: Eluatfraktionen (Schlagelution mit 500 mM Imidazol); M: Protein-Marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder; das Molekulargewicht ist in kDa angegeben).

Das zugefügte Thrombin wurde mittels Affinitätschromatographie über eine Benzamidinsäule aus der Proteinlösung entfernt. Die gesammelten Durchfluss- und Waschfraktionen enthielten überwiegend das gespaltene Zielprotein. Eine erhebliche Menge an Zielprotein wurde jedoch unspezifisch an die Säule gebunden und konnte nur durch Elution unter denaturierenden Bedingungen, zusammen mit anderen höhermolekularen Verunreinigungen, von der Säule gewaschen werden (Abbildung 3.5.3).

Die so erhaltenen Proteine wurden im Folgenden entweder direkt über eine Größenausschlusschromatographie gereinigt, um verbliebene Verunreinigungen abzutrennen und das Zielprotein in monomerer Form zu erhalten, oder für die Verwendung im FLiN-Assay zuvor mit einem Fluorophor modifiziert. Das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von hER β LBD-FLiN 7 nach der Markierung mit Acrylodan, ist stellvertretend für alle Konstrukte in Abbildung 3.5.8 auf Seite 38 gezeigt.

Mittels ESI-MS wurde das aufgereinigte Protein analysiert (Abbildung 3.5.4) und die Identität sowie eine hohe Reinheit bestätigt. Die strukturelle und funktionelle Integrität der gereinigten LBD-Konstrukte wurde mittels CD-Spektroskopie (siehe Abschnitt 3.6) und einem Fluoreszenzpolarisations-Assay analysiert (siehe Abschnitt 3.8.1).

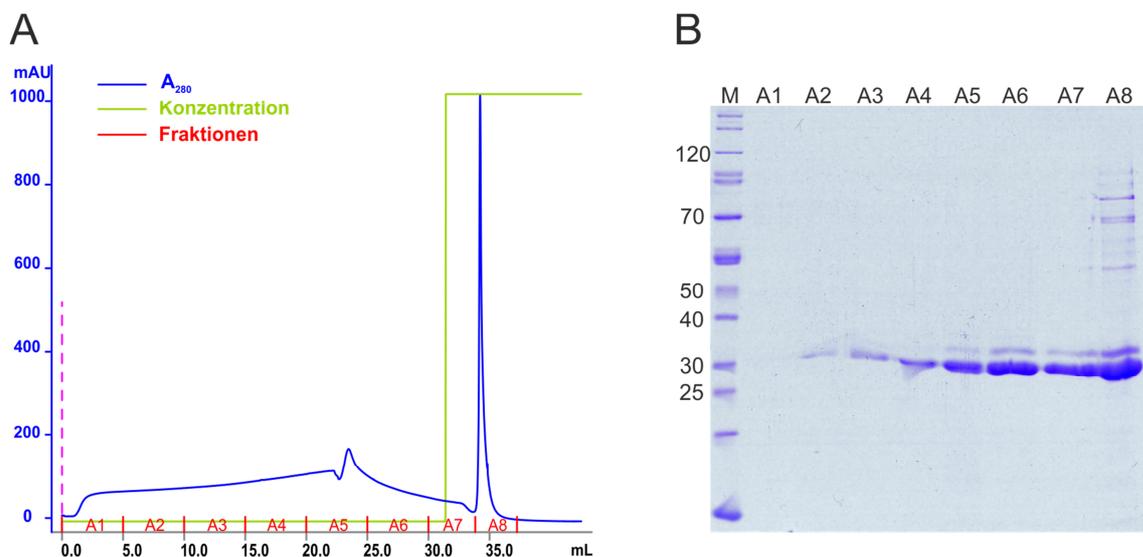


Abbildung 3.5.3 **A)** Chromatogramm der Aufreinigung über eine Benzamidinsäule für hER β LBD-FLiN 7 (blau: UV-Absorption bei 280 nm; grün: Elutionspuffer-Konzentration in %). **B)** Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Das Zielprotein hat ein Molekulargewicht von 27.8 kDa. Die Durchfluss- und Waschfraktionen (A1–A6) enthalten überwiegend das gespaltene Zielprotein. (A1–A8: Gesammelte Fraktionen; M: Protein-Marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder; das Molekulargewicht ist in kDa angegeben).

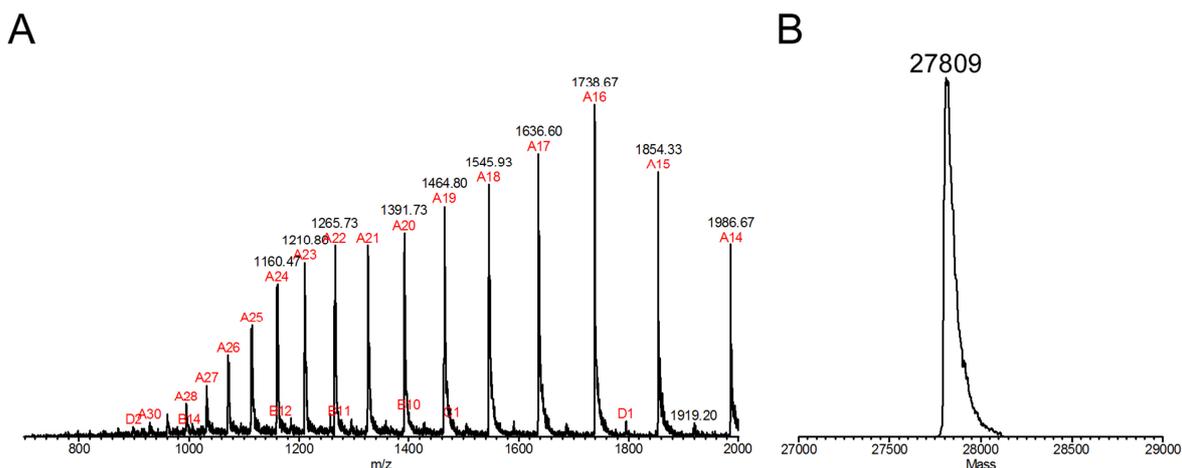


Abbildung 3.5.4 **A)** ESI-MS Analyse der Aufreinigung von hER LBD-FLiN 7. **B)** Mit MagTran 1.02 dekonvolutiertes Massenspektrum (die Masse ist in Da angegeben). Die berechnete Masse für hERβ LBD-FLiN 7 nach Abspaltung des Affinitäts-Tags beträgt 27799.4 Da.

3.5.2 Übersicht der Aufreinigung aller hERβ LBD-Konstrukte

Analog zur oben beschriebenen Proteinaufreinigung, konnten alle hERβ LBD-Konstrukte (mit oder ohne Affinitäts-Tag) in Ausbeuten von 4–15 mg pro Liter Expressionskultur erhalten werden. Abbildung 3.5.5 zeigt eine Übersicht der SDS-PAGE Analyse für alle aufgereinigten hERβ LBD-Konstrukte (die erwartete Masse der Konstrukte liegt bei etwa 29 kDa). Die Konstrukte konnten überwiegend in hoher Reinheit erhalten werden. Für einige Konstrukte sind geringe Verunreinigungen im Bereich von 50–100 kDa sowie 10 kDa auf dem Gel zu erkennen.

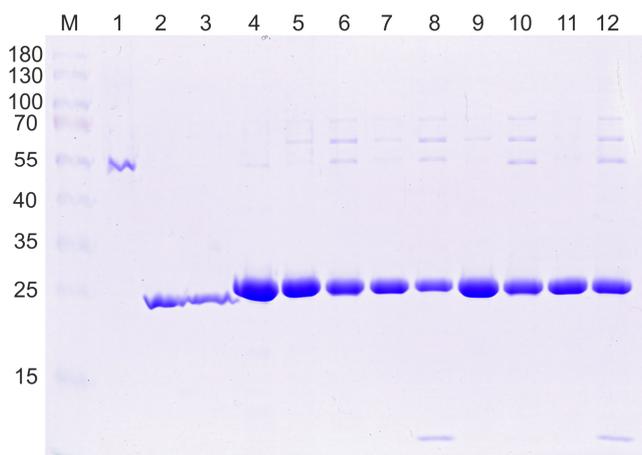


Abbildung 3.5.5 Analyse der gereinigten hERβ LBD-Konstrukte mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. M: Protein-Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (das Molekulargewicht ist in kDa angegeben); 1: hERβ wt Volllänge (Invitrogen); 2: hERβ LBD wt ohne His₆-Tag; 3: hERβ LBD-FLiN 7 ohne His₆-Tag; 4: hERβ LBD wt; 5: hERβ LBD-FLiN 1; 6: hERβ LBD-FLiN 2; 7: hERβ LBD-FLiN 3; 8: hERβ LBD-FLiN 4; 9: hERβ LBD-FLiN 5; 10: hERβ LBD-FLiN 6; 11: hERβ LBD-FLiN 7; 12: hERβ LBD-FLiN 8.

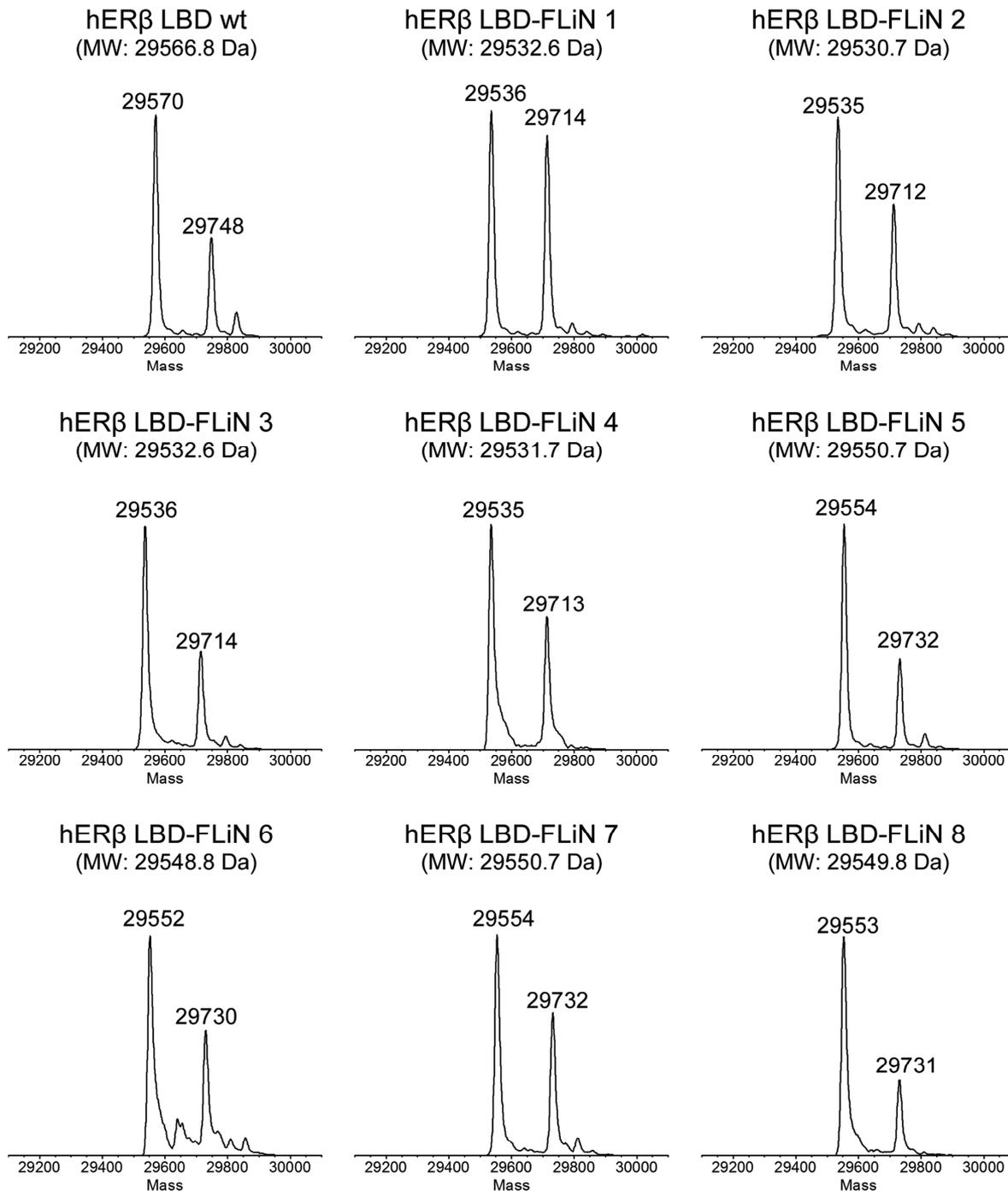


Abbildung 3.5.6 Übersicht der dekonvolvierten ESI-MS Spektren zur Analyse der gereinigten hERβ LBD-Konstrukte (nicht fluorophor-markierte Konstrukte mit His₆-Affinitäts-Tag). Alle Massen sind in Da angegeben. Das für die jeweiligen Konstrukte berechnete Molekulargewicht ohne N-terminales Met ist in Klammern angegeben.

Zusätzlich wurde die Identität der aufgereinigten hERβ LBD-Konstrukte mittels ESI-MS überprüft (Abbildung 3.5.6). Die massenspektroskopischen Untersuchungen bestätigten die erfolgreiche Aufreinigung und hohe Reinheit der Protein-Präparationen. Die

dekonvolutierten Massenspektren zeigen jeweils einen ausgeprägten Peak im erwarteten Massenbereich von 29536–29570 Da. Die Abweichung der experimentell bestimmten Massen vom berechneten Molekulargewicht (ohne N-terminalen Methionin-Rest) für die verschiedenen Konstrukte, lag für alle Messungen im Bereich von 3–4 Da. Diese entspricht der erwarteten Messungenauigkeit von etwa 0.01 %. Die Abspaltung des N-terminalen Methionin-Restes ist eine der häufigsten Protein-Modifikationen, die überwiegend kotranslational durch Aminopeptidasen erfolgt und auch bei heterolog in *E. coli* exprimierten Proteinen beobachtet wird. Sie erfolgt nicht immer vollständig, wobei die Effizienz durch die auf das N-terminale Met folgenden Aminosäuren bestimmt wird.^[107]

Die Spektren aller hER β LBD-Konstrukte mit His₆-Tag enthielten außerdem einen zweiten Massenpeak, der immer 178 Da über der erwarteten Proteinmasse lag. Dieser zusätzliche Peak konnte nach der Entfernung des His₆-Tags nicht mehr beobachtet werden (vergleiche Abbildung 3.5.4, Seite 33 und Abbildung 3.5.6). Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine posttranslationale Modifikation der N-terminalen Tag-Sequenz, die bei der heterologen Expression verschiedener, mit dem N-Terminus Gly-Ser-Ser-His₆-versehener, Proteine in *E. coli* beobachtet werden konnte. Diese entsteht durch Acylierung der α -Aminogruppe des Proteins mit 6-Phosphoglucono-1,5-lacton und anschließender Dephosphorylierung über eine Phosphatase.^[108]

3.5.3 Fluorophor-Markierung der hER β LBD-Konstrukte

Die Strukturen und Eigenschaften der für FLiN verwendeten Fluorophore sind in Abbildung 3.5.7 und Tabelle 3.5.1 zusammengefasst. Für den Einsatz im FLiN-Assay sind potentiell Fluorophore geeignet, die über eine hohe Quantenausbeute, eine möglichst große Stokes-Verschiebung sowie über eine ausgeprägte Solvatochromie, also eine deutliche Änderung des Dipolmoments beim Übergang aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand, verfügen. Außerdem sollten die Fluorophore ein möglichst geringes Molekulargewicht aufweisen, um Konformationsänderungen des Proteins nicht zu beeinträchtigen. Fluorophore mit einer Absorption und Emission im Bereich größerer Wellenlängen von 500 nm–700 nm, eignen sich aufgrund ihrer geringen Interferenz mit der Eigenfluoreszenz vieler organischer Moleküle besonders gut für den Einsatz in Screening-Systemen. PyMPO besitzt wie auch Acrylodan (Ac) ein starkes Dipolmoment und reagiert auf steigende Lösungsmittelpolarität mit einer ausgeprägten bathochromen Verschiebung. Die symmetrischen Xanthane Atto 565, Atto 610 und Texas Red besitzen einen schwach ausgeprägten positiven Solvatochromismus, während der Cyanin-Farbstoff DY-647 über einen schwachen negativen Solvatochromismus, also eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsspektrums mit zunehmender Lösungsmittelpolarität, verfügt.^[109] Trotz des schwächer ausgeprägten Solvatochromismus, sind auch diese Fluorophore potentiell für die Detektion von Konformationsänderungen in Proteinen geeignet.^[101f, 109]

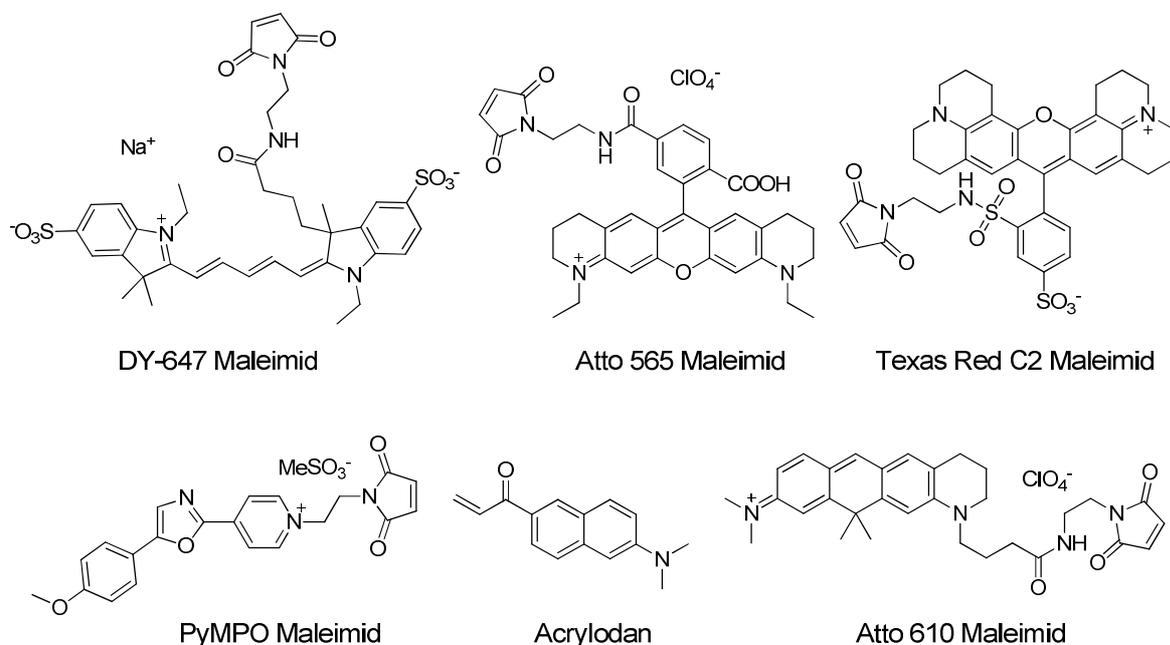


Abbildung 3.5.7 Im FLiN-Assay getestete Cystein-reaktive Fluorophore.

Tabelle 3.5.1 Eigenschaften der für den FLiN-Assay verwendeten Fluorophore.

	$\lambda_{\text{ex,max}}^A / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em,max}}^A / \text{nm}$	Quantenausbeute	$\Delta\text{MW}^B / \text{Da}$
Acrylodan	386	470	0.18 ^C (abs.)	225
Atto 565	563	592	0.90 ^D (abs.)	634
Atto 610	615	634	0.70 ^D (abs.)	514
DY-647	653	682	0.26 ^D (abs.)	764
PyMPO	412	561	0.46 ^E (rel.)	376
Texas Red	595	651	0.09 ^F (rel.)	729

^A Anregungs- und Emissions-Maximum (Herstellerangaben). ^B Massenzunahmen des Proteins bei einfacher Markierung mit dem Fluorophor. ^C Acrylodan-Mercaptoethanol-Konjugat in Wasser.^[110] ^D QA in wässriger Lösung (Herstellerangaben). ^E QA in Wasser (pH 1.0) mit Quininsulfat in 5 M H₂SO₄ als Standard (QA = 0.55).^[111] ^F Texas Red-Transferrin-Konjugat in wässriger Lösung mit Sulforhodamin 101 als Standard.^[112]

Zur Auswahl eines für den FLiN-Assay geeigneten hER β LBD-Konstrukts, wurden zunächst alle aufgereinigten Konstrukte mit dem Fluorophor Acrylodan markiert und auf ihr Verhalten im FLiN-Assay getestet. Acrylodan wurde für die Etablierung des Assays ausgewählt, da dieser Fluorophor bei zunehmender Lösungsmittelpolarität eine deutliche bathochrome Verschiebung seines Emissionsspektrums aufweist. Außerdem handelt es sich bei Acrylodan um einen relativ kleinen Fluorophor, der schon mehrfach erfolgreich für die Detektion von Konformationsänderungen in verschiedenen Proteinen eingesetzt werden konnte.^[101a, 101d, 101e, 113] Im Zuge der Assay-Optimierung sollten, mit Atto 565, Atto 610, DY-647, PyMPO und Texas Red, fünf weitere Fluorophore mit einem geeigneten Protein-Konstrukt für den Einsatz im FLiN-Assay getestet werden. Diese Fluorophore eignen sich potentiell gut für den Einsatz in einem Screening-System, da sie über ein Absorptions- und Emissions-Maximum bei höheren Wellenlängen verfügen.

Die Markierung der verschiedenen hER β LBD-Konstrukte erfolgte durch Inkubation mit einem 1.1-fach molaren Überschuss an Fluorophor im Dunkeln auf Eis für 3–15 h. Um die Nukleophilie des reaktiven Cystein-Thiols zu erhöhen, wurde die Reaktion bei pH 7.2 durchgeführt. Überschüssige freie Fluorophore wurden durch Zugabe von DTT gequencht und die markierten FLiN-Konstrukte mittels Größenausschlusschromatographie von freiem Fluorophor und oligomeren Proteinaggregaten abgetrennt. Das Chromatogramm zeigte für alle Konstrukte einen Hauptpeak, dessen Retentionsvolumen den monomeren LBD-Konstrukten (ca. 30 kDa) zugeordnet werden konnte (Abbildung 3.5.8). Zusätzlich wurde für alle Konstrukte ein kleiner Peak im Ausschlussvolumen der Säule beobachtet, der oligomere Proteinaggregate enthielt. Die Fraktionen des Monomer-Peaks wurden vereinigt, auf 70–150 μM konzentriert, in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung der Markierungsreaktion wurden alle

hER β LBD-Konstrukte anschließend mittels ESI-MS analysiert. So sollte sichergestellt werden, dass die Markierung erfolgreich war und überprüft werden, wie viele Cystein-Reste in den jeweiligen Konstrukten modifiziert wurden. Eine Übersicht der Analyse der mit Acrylodan modifizierten hER β LBD-Konstrukte, ist in Abbildung 3.5.9 dargestellt. Die entsprechenden Analysen der Markierung mit allen weiteren Fluorophoren sind im Anhang zu finden (Abbildung 10.3.1, Seite 158).

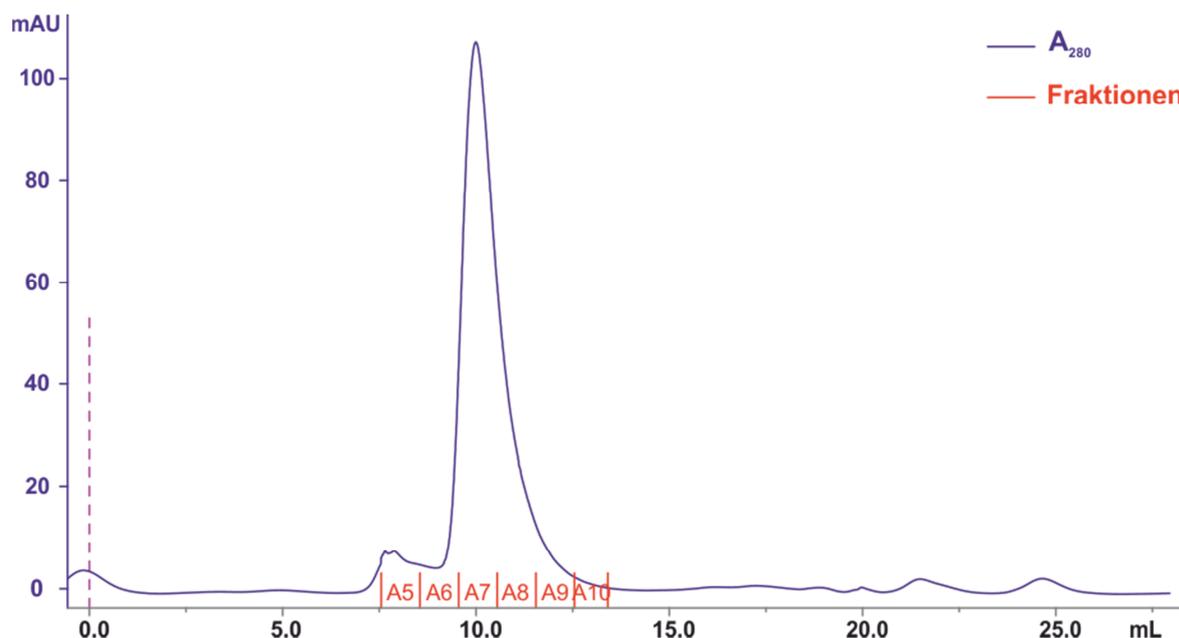


Abbildung 3.5.8 Typisches Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie der hER β LBD-Konstrukte (hier am Beispiel von hER β LBD-FLiN 7 nach der Markierung mit Acrylodan dargestellt). Die Größenausschlusschromatographie diente der Abtrennung des monomeren markierten Proteins (Fraktionen A7–A9) von überschüssigem Fluorophor aus der Markierungsreaktion sowie von oligomeren Proteinaggregaten (Fraktion A5–A6).

Für alle LBD-Konstrukte konnte die Modifikation mit Acrylodan über die Massenzunahme von 225 Da, verglichen mit den nicht-modifizierten LBD-Konstrukten, nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 3.5.6, Seite 34 und Abbildung 3.5.9, Seite 39). Abhängig von der Markierungsposition konnten Unterschiede in der Effizienz der Reaktion beobachtet werden. Die Konstrukte hER β LBD-FLiN 2, FLiN 4, FLiN 6 und FLiN 8 wurden annähernd vollständig mit dem Fluorophor modifiziert. Diese Konstrukte verfügen über die Markierungspositionen D486C (FLiN 2 und FLiN 6) und N493C (FLiN 4 und FLiN 8), welche besonders gut für die Modifikation zugänglich zu sein scheinen. Für die anderen Konstrukte verlief die Markierung weniger effizient, wobei auf Grundlage der ESI-MS Daten davon ausgegangen werden konnte, dass alle Konstrukte mindestens zu etwa 50 % markiert wurden und damit potentiell in den FLiN-Experimenten eingesetzt werden können.

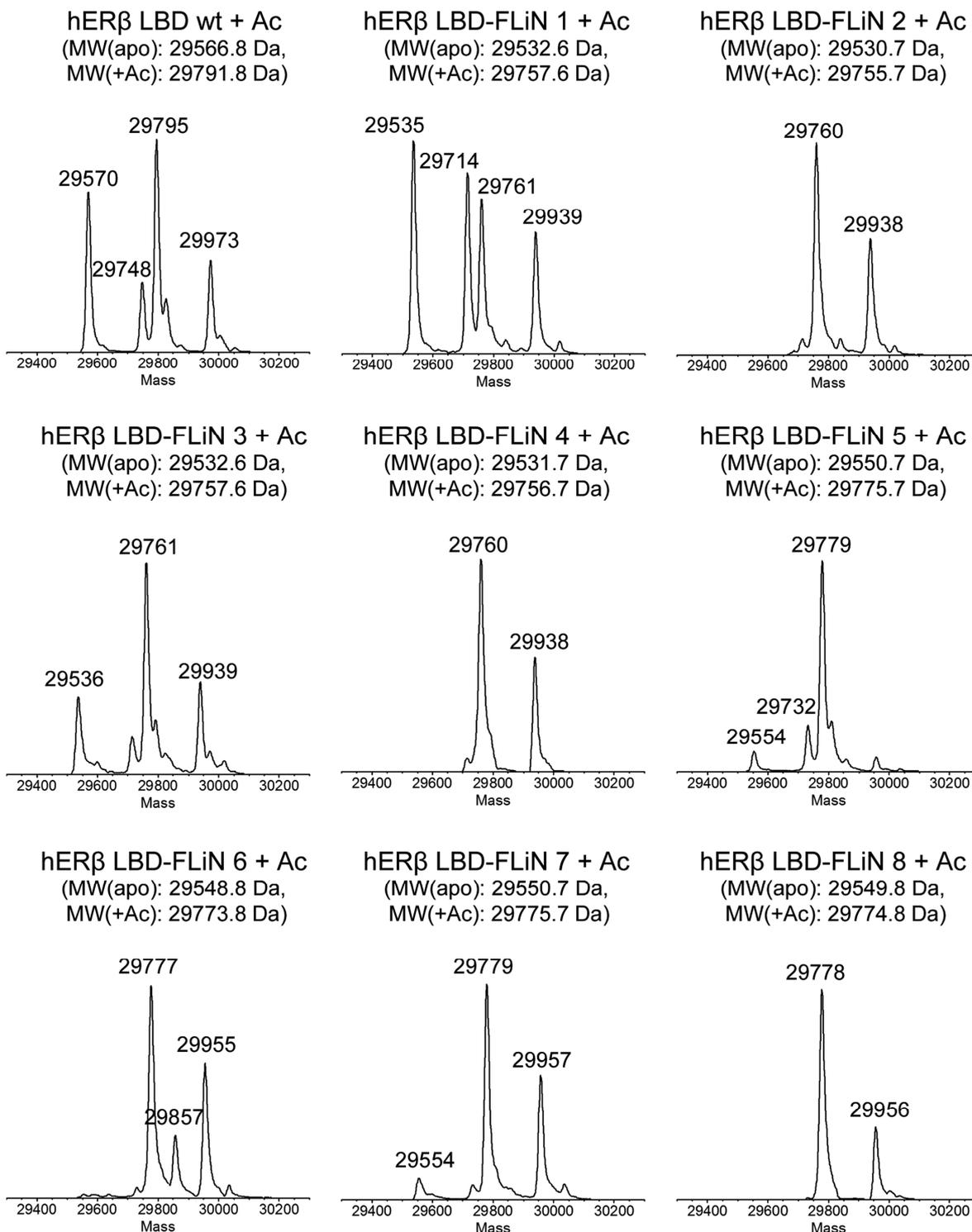


Abbildung 3.5.9 Übersicht der dekonvolvierten ESI-MS Spektren zur Analyse der Fluorophor-Markierung aller hERβ LBD-Konstrukte mit Acrylodan (Konstrukte mit Affinitäts-Tag). Alle Massen sind in Da angegeben. Der Massenzuwachs für eine einfache Markierung mit Acrylodan (Ac) beträgt 225 Da. Das für die jeweiligen Konstrukte berechnete Molekulargewicht vor (apo) und nach Markierung mit Acrylodan (+Ac) (jeweils ohne N-terminales Met) ist in Klammern angegeben.

In den dekonvolvierten ESI-MS Spektren der mit Acrylodan modifizierten hER β LBD-Konstrukte (mit Affinitäts-Tag), sind jeweils mehrere Massenspezies zu erkennen. Durch die Modifikation mit Acrylodan verschieben sich die beiden Peaks der apo-Spektren jeweils um die für eine einfache Modifikation mit Acrylodan erwartete Masse von 225 Da. Bei einer unvollständigen Modifikation sind außerdem noch beide apo-Peaks im Spektrum zu erkennen, die je nach Intensität teilweise von den neuen Signalen überlagert werden. Eine mehrfache Modifikation an verschiedenen Cystein-Resten, die einen Massenzuwachs um ein Vielfaches von 225 Da zur Folge hätte, konnte für kein Konstrukt in den ESI-MS Experimenten beobachtet werden. Mehrfach-Modifikationen könnten trotzdem vorliegen, aber aufgrund ihrer geringeren Häufigkeit unter der Nachweisgrenze der hier durchgeführten Massenspektrometrie-Experimente liegen. Außerdem konnte aufgrund der ESI-MS Untersuchungen an den modifizierten LBD-Konstrukten keine Aussagen über die tatsächliche Markierungsposition getroffen werden. Zur genauen Untersuchung der tatsächlich modifizierten Cystein-Reste, wurden alle mit Acrylodan markierten hER β LBD-Konstrukte mit Trypsin verdaut. Die Analyse der erhaltenen Peptid-Fragmente mittels HPLC und gekoppelter MS/MS sowie einem anschließenden Datenbankabgleich zur Identifizierung der Fragmente, wurde von Dr. Petra Janning am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 3.5.2 zusammengefasst. Die Markierung eines Cystein-Restes galt dann als erfolgreich nachgewiesen, wenn das entsprechende modifizierte Peptid-Fragment mindestens einmal in der Probe identifiziert werden konnte. Dadurch lassen sich die einzelnen Markierungspositionen identifizieren, es kann aber keine Aussage über die Häufigkeit der gefundenen Modifikation getroffen werden.

Für die Konstrukte hER β LBD wt sowie FLiN 1–6, konnte eine 99.6 %ige Sequenzabdeckung erreicht werden, wobei nur eine Aminosäure (das N-terminale Met) nicht nachgewiesen werden konnte. Für die Konstrukte FLiN 7 und FLiN 8 konnte eine Sequenzabdeckung von lediglich 93.2 % bzw. 82.2 % erreicht werden. Für diese Konstrukte konnten die Peptide, die C331 (in FLiN 7) bzw. C331 und L489C (in FLiN 8) enthalten, nicht in den Proben identifiziert werden (die komplette Darstellung der detektierten Sequenzbereiche für alle untersuchten Konstrukte ist in Tabelle 10.4.1, Seite 159 zu finden).

Tabelle 3.5.2 Identifizierung der modifizierten Cystein-Reste nach der Markierung aller hER β LBD-Konstrukte mit Acrylodan mittels MS/MS nach einem tryptischen Verdau. Alle in den verschiedenen Konstrukten vorhandenen Cystein-Reste sind in Klammern aufgeführt, wobei die gewünschte Markierungsposition unterstrichen ist. Gefundene Acrylodan-Modifikationen sind rot in der Sequenz des entsprechenden Peptid-Fragments markiert.

Konstrukt	Sequenz-abdeckung	modifizierte Cystein-Reste	Peptid-Fragmente
hERβ LBD wt + Ac (C331, C366, C396, <u>C478</u>)	99.6 %	C396, C478	LQHKEYL <u>C</u> VK, <u>C</u> KNVVPVYD LL EMLNAHVLRG
hERβ LBD-FLiN 1 + Ac (<u>C478</u>)	99.6 %	C478	<u>C</u> KNVVPVYD LL EMLNAHVLR
hERβ LBD-FLiN 2 + Ac (<u>D486C</u>)	99.6 %	C486	NVVPVY <u>C</u> LLLEMLNAHVLRG
hERβ LBD-FLiN 3 + Ac (<u>L489C</u>)	99.6 %	C489	NVVPVYD LL <u>C</u> EMLNAHVLRG
hERβ LBD-FLiN 4 + Ac (<u>N493C</u>)	99.6 %	C493	NVVPVYD LL EML <u>C</u> AHVLRG
hERβ LBD-FLiN 5 + Ac (C331, C396, <u>C478</u>)	99.6 %	C478	<u>C</u> KNVVPVYD LL EMLNAHVLRG
hERβ LBD-FLiN 6 + Ac (C331, C396, <u>D486C</u>)	99.6 %	C486	NVVPVY <u>C</u> LLLEMLNAHVLRG
hERβ LBD-FLiN 7 + Ac (C331, C396, <u>L489C</u>)	93.2 %	C396, C489	LQHKEYL <u>C</u> VK, NVVPVYD LL <u>C</u> EMLNAHVLRG
hERβ LBD-FLiN 8 + Ac (C331, C396, <u>N493C</u>)	82.2 %	-	-

Mit Ausnahme von hER β LBD-FLiN 8, konnte für alle untersuchten LBD-Konstrukte die Acrylodan-Modifikation an der gewünschten Position nachgewiesen werden. Für hER β LBD-FLiN 8 wurde aufgrund der unvollständigen Sequenzabdeckung das potentiell modifizierte Peptid-Fragment nicht detektiert. In den vorangegangenen ESI-MS Analysen konnte aber eine eindeutige Markierung von hER β LBD-FLiN 8 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.5.9, Seite 39). Die MS/MS Analysen an hER β LBD-FLiN 4 (das auch an N493C markiert werden sollte) zeigen, dass die gewünschte Markierungsposition generell für die Modifikation zugänglich ist.

Für die Konstrukte hER β LBD wt sowie hER β LBD-FLiN 7 konnte neben der gewünschten Modifikation eine zusätzliche Markierung an C396 nachgewiesen werden. In der Kristallstruktur von hER β LBD liegt dieser Cystein-Rest im Inneren des Proteins verborgen, weshalb er für Modifikationen schlecht zugänglich sein sollte. Bei diesen Proben könnte es vor oder während der Markierungs-Reaktion zur Entfaltung eines Teils der Proteine

gekommen sein, wodurch C396 markiert werden konnte. Die Analyse der Sekundärstruktur des mit Acrylodan markierten FLiN 7-Konstrukts lieferte keine Hinweise auf deutliche Veränderungen der Proteinfaltung (siehe Abschnitt 3.6). In anderen Konstrukten (FLiN 5, FLiN 6 und FLiN 8) konnte die Modifikation an C396 nicht nachgewiesen werden. Es wurde daher vermutet, dass diese Modifikation auch bei hER β LBD wt und hER β LBD-FLiN 7 nur einen geringen Anteil der Moleküle betraf. Entgegen der Erwartungen, konnte für kein Konstrukt eine zusätzliche Modifikation an C366 beobachtet werden, obwohl dieser Cystein-Rest an der Proteinoberfläche liegt.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der ESI-MS und LC-ESI-MS/MS Analysen für alle hER β LBD-Konstrukte eine Modifikation mit Acrylodan nachgewiesen und für die Mehrzahl der Konstrukte die gewünschte Markierungsposition identifiziert werden.

3.6 Strukturelle Analyse mittels Circular dichroismus-Spektroskopie

Um den Einfluss der Mutationen auf die Struktur der aufgereinigten hER β LBD-Konstrukte zu untersuchen, wurden diese mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) analysiert. Das *far-UV* CD-Spektrum (Wellenlängenbereich zwischen 190 nm und 240 nm) enthält Informationen über den Gehalt der Sekundärstrukturelemente von Proteinen in Lösung, wie α -Helices, β -Faltblätter und *Random Coil*-Strukturen, und eignet sich damit zur Beurteilung der Faltung und Stabilität eines Proteins.^[114]

Alle Spektren wurden in 20 mM NaH₂PO₄-Puffer bei 20 °C aufgenommen. Für jedes der untersuchten Konstrukte wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Von den erhaltenen Daten wurde das Puffersignal subtrahiert und die Elliptizität der mittleren relativen Molekülmasse der Peptidmonomere (θ_{MR}) berechnet. Die gemittelten Spektren mit Standardabweichung für die Wildtyp hER β LBD sowie alle FLiN-Konstrukte, sind in Abbildung 3.6.1 und Abbildung 3.6.2 dargestellt.

Das CD-Spektrum von hER β LBD wt entspricht Literaturdaten und besitzt mit einem Absorptions-Maximum bei 192 nm sowie zwei -Minima bei 208 nm und 222 nm charakteristische Signale für Proteine mit einem hohen Gehalt an α -helikalen Strukturen.^[115] Für die anderen LBD-Konstrukte wurden vergleichbare CD-Spektren erhalten. Es konnte kein signifikanter Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Sekundärstruktur der LBD-Konstrukte beobachtet werden. Um außerdem den Einfluss der Modifikation mit einem Fluorophor auf die Faltung zu untersuchen, wurde das Konstrukt hER β LBD-FLiN 7, vor und nach der Markierung mit Acrylodan, untersucht (Abbildung 3.6.2-B und C).

Ausgehend von den gemessenen Spektren wurde der Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturelemente in den untersuchten LBD-Konstrukten berechnet (Abbildung 3.6.3). Für die meisten Konstrukte wurde dabei, wie aufgrund struktureller Untersuchungen an der LBD erwartet, ein hoher Gehalt an α -helikalen Strukturen und zu einem kleineren Teil *Random Coil* und β -Turn Strukturen ermittelt.

Die Wildtyp hER β LBD sowie die Konstrukte FLiN 1 (C331S, C366S, C396T, C478), FLiN 5 (C366S, C478) sowie FLiN 7 (C366S, C478L, L489C) ohne und mit Acrylodan-Markierung, besitzen einen vergleichbar hohen Anteil an α -helikalen Strukturen. Die Modifikation mit Acrylodan hatte keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des hER β LBD-Konstrukts FLiN 7. Für die Konstrukte FLiN 2 (C331S, C366S, C396T, C478L, D486C), FLiN 4 (C331S, C366S, C396T, C478L, N493C), FLiN 6 (C366S, C478L, D486C) und FLiN 8 (C366S, C478L, N493C) wurde ein deutlich verringerter Anteil α -helikaler Strukturen und ein Anstieg an ungeordneten *Random Coil* Strukturen im Vergleich zur Wildtyp hER β LBD ermittelt. In

diesen FLiN-Konstrukten wurde ein Cystein-Rest an Position 486 oder 493 in der H12 eingeführt. Mutationen an diesen Positionen scheinen die Sekundärstruktur der LBD, eventuell durch eine veränderte Struktur oder die Entfaltung der H12, zu beeinflussen. Außerdem kann ein Einfluss der weiteren in diese Konstrukte eingeführten Mutationen auf die Sekundärstruktur nicht ausgeschlossen werden.

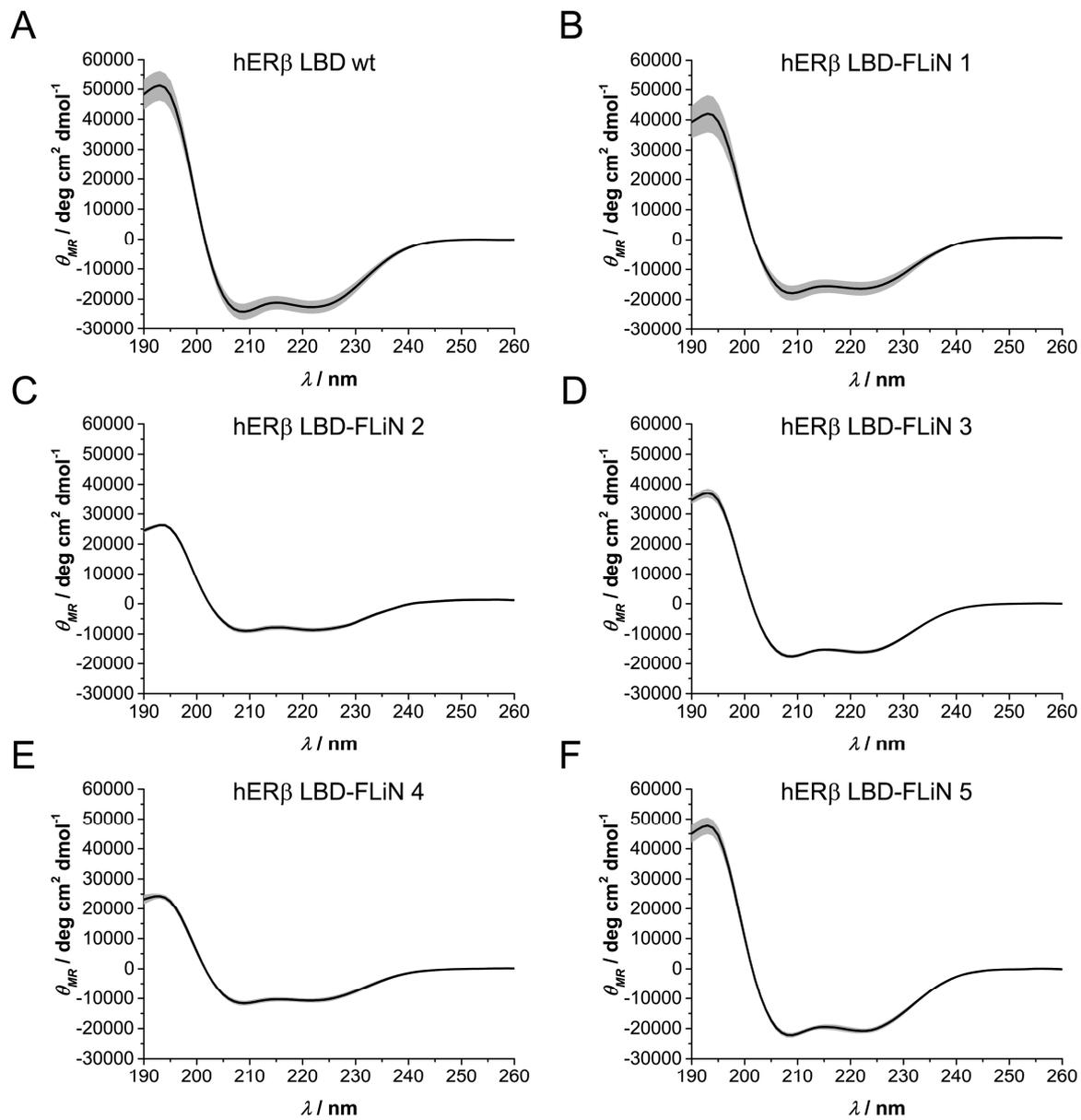


Abbildung 3.6.1 CD-Spektren verschiedener hER β LBD Konstrukte. **A)** Wildtyp **B)** FLiN 1 (C331S, C366S, C396T, C478) **C)** FLiN 2 (C331S, C366S, C396T, C478L, D486C) **D)** FLiN 3 (C331S, C366S, C396T, C478L, L489C) **E)** FLiN 4 (C331S, C366S, C396T, C478L, N493C) **F)** FLiN 5 (C366S, C478). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen nach Hintergrundkorrektur (schwarze Linie) sowie die zugehörige Standardabweichung (graue Fläche).

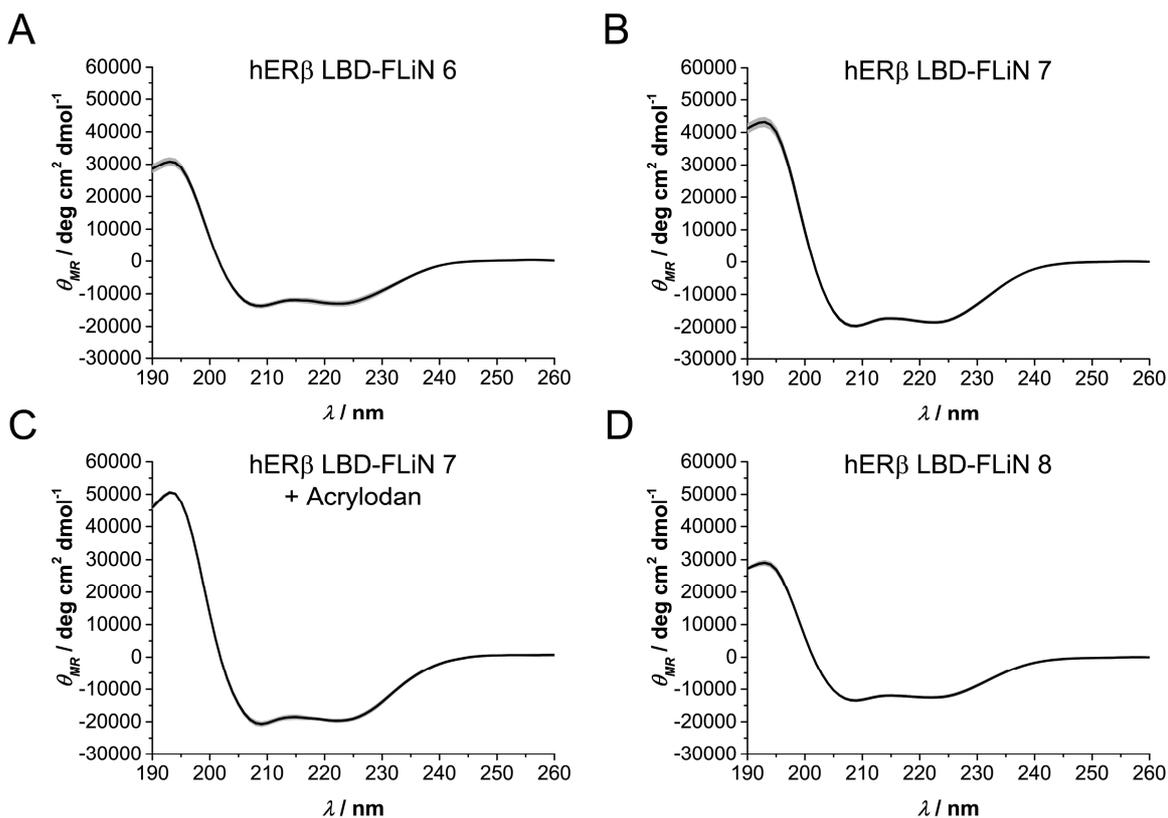


Abbildung 3.6.2 CD-Spektren verschiedener hERβ LBD Konstrukte. **A)** FLiN 6 (C366S, C478L, D486C) **B)** FLiN 7 (C366S, C478L, L489C) **C)** FLiN 7 (C366S, C478L, L489C) mit Acrylodan-Markierung **D)** FLiN 8 (C366S, C478L, N493C). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen nach Hintergrundkorrektur (schwarze Linie) sowie die zugehörige Standardabweichung (graue Fläche).

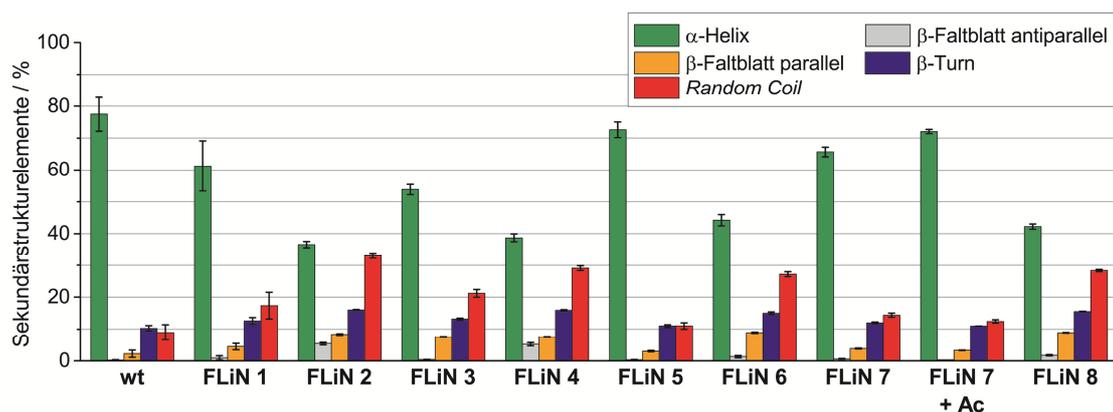


Abbildung 3.6.3 Anteil der Sekundärstrukturelemente der einzelnen hERβ LBD-Konstrukte. Für jedes Konstrukt wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt und jeweils der Sekundärstrukturgehalt mit CDNN^[116] berechnet. Gezeigt sind die daraus gemittelten Werte mit Standardabweichung.

Mittels CD-Spektroskopie lässt sich neben der Sekundärstruktur auch die Stabilität eines Proteins untersuchen. Die Entfaltung eines Proteins kann direkt über Änderungen des CD-Signales beim Verlust seiner Sekundärstruktur beobachtet werden. Zur Untersuchung der

thermischen Stabilität, wurden für die Wildtyp ER β LBD sowie die FLiN Konstrukte 5 und 7 CD-Spektren über einen Temperaturbereich von 20–85 °C aufgenommen (Abbildung 3.6.4). Über die charakteristischen CD-Signale bei 208 nm und 222 nm kann der Gehalt an α -helikalen Strukturen eines Proteins abgeschätzt werden.^[117] Damit eignet sich das Signal bei 222 nm zur Beurteilung der thermischen Stabilität der überwiegend aus α -Helices bestehenden LBD-Konstrukte.

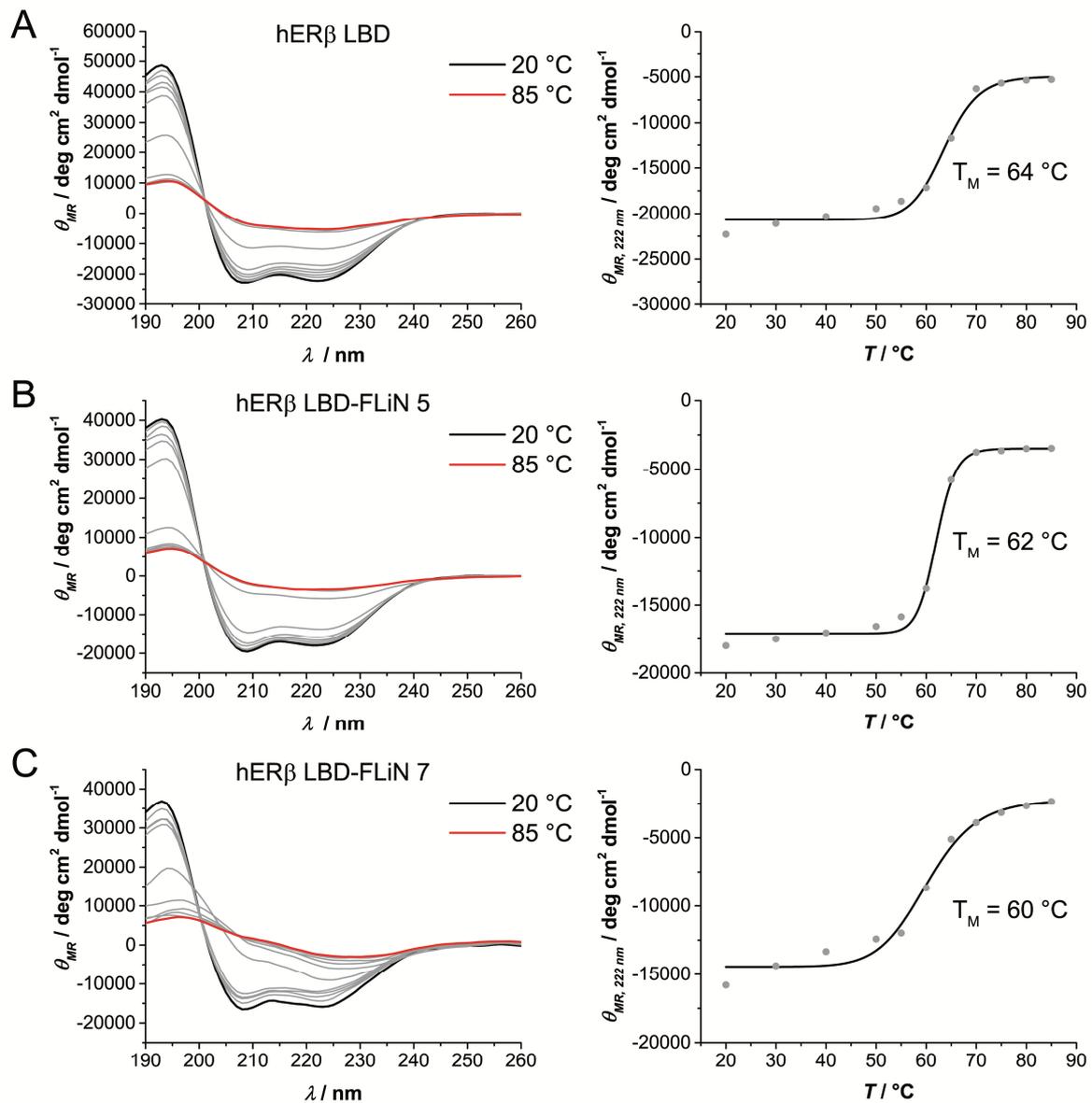


Abbildung 3.6.4 CD-Spektren bei thermischer Entfaltung der LBDs und daraus ermittelte Schmelzkurven für **A)** Wildtyp hER β LBD **B)** hER β LBD FLiN 5 und **C)** hER β LBD FLiN 7.

Zur Ermittlung der Schmelztemperatur (T_M), bei der die untersuchten Konstrukte zu 50 % entfaltet vorliegen, wurde das Signal bei 222 nm gegen die Temperatur aufgetragen. Der Wendepunkt der resultierenden Schmelzkurven entspricht dabei der T_M . Die so ermittelten

Schmelztemperaturen lagen im Bereich von 60–64 °C, wobei die eingeführten Mutationen in den FLiN-Konstrukten keinen deutlichen Einfluss auf die thermische Stabilität ausüben. Die für die hergestellten LBD-Konstrukte ermittelten Schmelztemperaturen, liegen im Bereich bekannter Werte für die LBDs von hER α und hER β .^[118] Die Schmelztemperaturen der entsprechenden volllänge Rezeptoren liegen mit $T_M(\text{hER}\alpha) = 39\text{ °C}$ und $T_M(\text{hER}\beta) = 40\text{ °C}$ etwa 20 °C unter denen der isolierten LBDs.^[119]

Durch ihre hohe Stabilität sind die hier analysierten FLiN-Konstrukte potentiell sehr gut für den Einsatz in einem Assay-System geeignet. So sollte es auch bei längeren Inkubationszeiträumen sowie bei Durchführung des Assays bei Raumtemperatur nicht zu einem Verlust des Signals durch Denaturierung der Proteine kommen.

3.7 Etablierung des FLiN Assays im Mikrotiterplattenformat

3.7.1 Auswahl eines geeigneten LBD-Konstrukts

Zur Etablierung des FLiN-Assays sollte zunächst ein geeignetes LBD-Konstrukt ausgewählt und mit diesem im Folgenden die Assay-Bedingungen optimiert werden. Dazu wurden alle aufgereinigten Konstrukte mit dem umgebungssensitiven Fluorophor Acrylodan markiert und ihr Verhalten im FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat analysiert. Als Testverbindungen wurden fünf strukturell biologisch charakterisierte ER-Liganden ausgewählt, die unterschiedliche Konformationen der LBD stabilisieren (Abbildung 3.7.1): 17 β -Estradiol (E2), Diethylstilbestrol (DES), Tamoxifen (TAM), Raloxifen (RAL) und 4-Hydroxytamoxifen (OHT). Die gewählten Testverbindungen binden in die Ligandenbindungstasche innerhalb der LBD und besitzen eine hohe Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich zum Rezeptor. Der natürliche Ligand E2 sowie DES zählen zur Gruppe der Rezeptor-Agonisten. Diese Verbindungen stabilisieren eine angewinkelte Konformation der C-terminalen H12 und damit eine transkriptions-aktive Form des Rezeptors. Die Testverbindungen RAL, TAM und OHT zählen zur Klasse der SERMs, die eine gestreckte Konformation der H12 stabilisieren. Im ligandenfreien Zustand befindet sich die H12 in einem Gleichgewicht einer Vielzahl möglicher Orientierungen. Durch die Bindung eines Liganden kommt es zur Stabilisierung einer bestimmten Konformation und damit zu einer Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts. Dabei verändert sich die Polarität in der direkten Umgebung des, an verschiedenen Positionen im Bereich der H12 eingebrachten, Fluorophors. Diese Veränderungen beeinflussen das Emissionsspektrum des Fluorophors, welches als Signal des FLiN-Assays ausgelesen wird und zur Detektion der Ligandenbindung dienen soll. Um den Assay für die gezielte Suche nach neuen Liganden einsetzen zu können, sollte ein ideales FLiN-Konstrukt in der Lage sein, die verschiedenen Testverbindungen mit ihren unterschiedlichen Bindungsmodi detektieren zu können. Diese unterscheiden sich jedoch nicht nur basierend auf der Einteilung in Agonisten und Antagonisten/SERMs. Auch innerhalb dieser Liganden-Gruppen besitzen verschiedene Verbindungen individuelle Bindungsmodi, die zu geringen Unterschieden in der Konformation der H12 führen. Außerdem sollte das gewählte Konstrukt ein sensibles und stabiles Assay-Signal produzieren.

Durch Messung der Emissionsspektren der mit Acrylodan markierten FLiN-Konstrukte bei verschiedenen Konzentrationen, wurde die Proteinkonzentration im Assay auf 190 nM festgelegt. Bei dieser Proteinkonzentration konnte für alle Konstrukte ein Signal guter Intensität im Mikrotiterplattenformat detektiert werden.

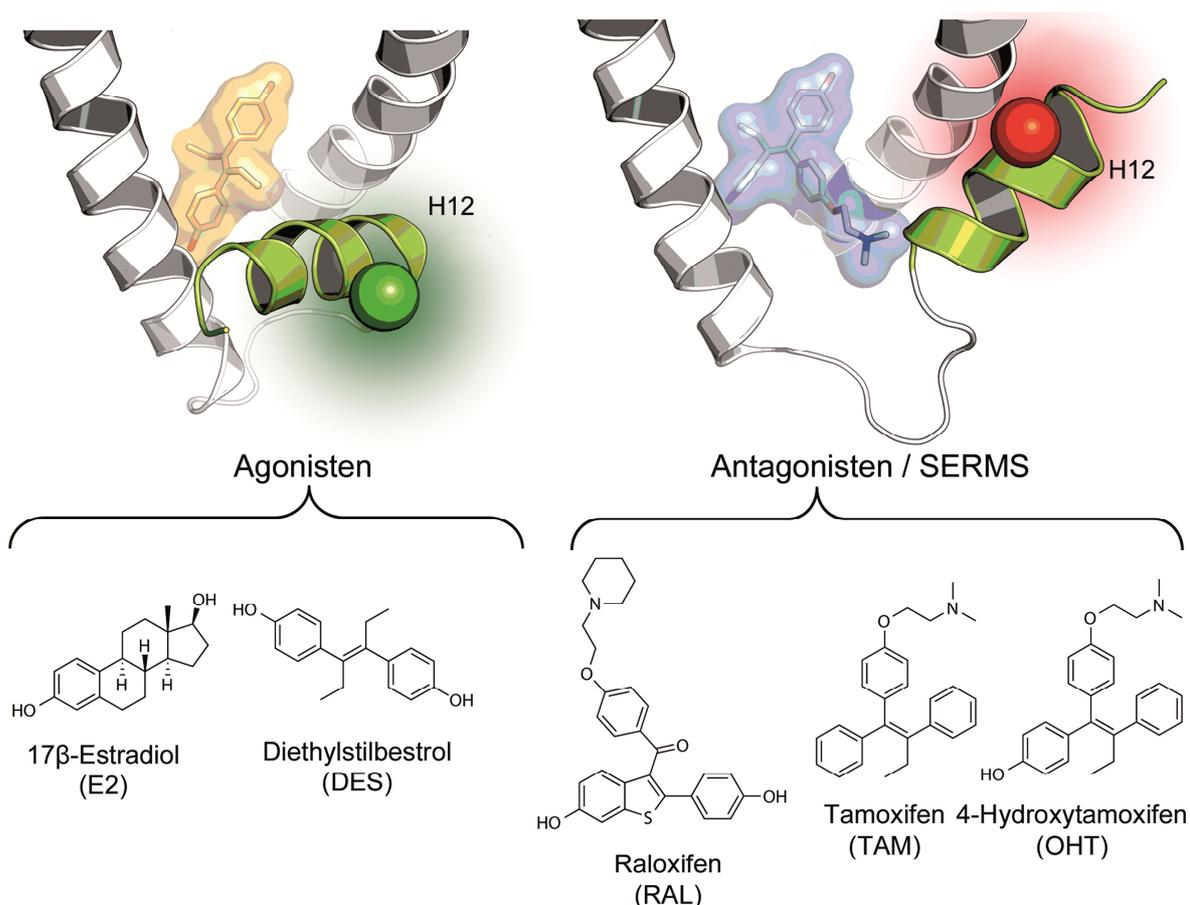


Abbildung 3.7.1 Schematische Darstellung des FLiN-Assay Prinzips sowie der für die Etablierung des Assays gewählten Testverbindungen. Mittels zielgerichteter Mutagenese wurde ein Cystein-Rest innerhalb der C-terminalen H12 (grün) eingeführt und mit einem umgebungssensitiven Fluorophor (grüne bzw. rote Kugel) markiert. Bei der Bindung eines Rezeptor-Agonisten oder -Antagonisten, wird die H12 in unterschiedlichen Konformationen stabilisiert. Dies geht mit Veränderungen der Polarität in der Mikroumgebung des Fluorophors einher, welche dessen Emissionsspektrum beeinflussen.

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen FLiN-Konstrukte in der Lage sind, Konformationsänderungen bei der Ligandenbindung zu detektieren, wurden sie jeweils mit einer Verdünnungsreihe aller Testverbindungen oder 1 % DMSO als Negativkontrolle in 384-well Mikrotiterplatten für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend das Emissionsspektrum der mit Acrylodan markierten FLiN-Konstrukte im Bereich von 410 nm bis 560 nm ausgelesen. Da viele organische Verbindungen Licht im Bereich des Absorptionsmaximums von Acrylodan bei 386 nm absorbieren, kann das Assay-Signal, vor allem bei höheren Konzentrationen, durch die intrinsische Fluoreszenz der Testverbindung überlagert werden. Eine geringe Eigenfluoreszenz der Testverbindungen wirkt sich jedoch nicht störend auf fluoreszenzbasierte Assay-Systeme aus, da diese durch Messung des Hintergrundsignals für die einzelnen Verbindungen vor der Auswertung von den experimentellen Daten subtrahiert werden kann.^[120] Um den Einfluss auf das Assay-

Signal beurteilen zu können, wurde die intrinsische Fluoreszenz der verwendeten Testverbindungen bei den im Assay verwendeten Konzentrationen analysiert (Abbildung 3.7.2). Dabei konnte selbst bei der höchsten im Assay eingesetzten Konzentration (20 μM) keine signifikante Eigenfluoreszenz detektiert werden. Bis auf RAL, war für keine der Verbindungen eine Veränderung des Signals im Vergleich zu reinem Puffer-Signal zu erkennen. Auch für RAL war die ermittelte Eigenfluoreszenz, im Vergleich zum Acrylodan-Spektrum der markierten LBDs, zu vernachlässigen. Das sowohl für Puffer, als auch für die Testverbindungen beobachtete Maximum im Bereich von 440–450 nm, entspricht dem Raman-Peak des wässrigen Puffer-Systems, der bei etwa 3400–3600 cm^{-1} niedrigerer Energie als die der Anregungswellenlänge lokalisiert ist. Dieses Signal tritt bei allen Fluoreszenz-emissionsmessungen mit einer konstanten Verschiebung zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge auf und wird durch inelastische Streuung des Anregungslichts mit dem Lösungsmittel verursacht. Da die Testverbindungen über keine bzw. eine zu vernachlässigende Eigenfluoreszenz verfügen und das Assay-Signal nicht beeinflussen, sind im Folgenden nur die gemessenen Spektren ohne Hintergrundkorrektur gezeigt. Trotzdem wurde in allen Experimenten das Hintergrundsignal der verwendeten Verbindungen gemessen und dessen Einfluss auf die berechneten Bindungskonstanten analysiert.

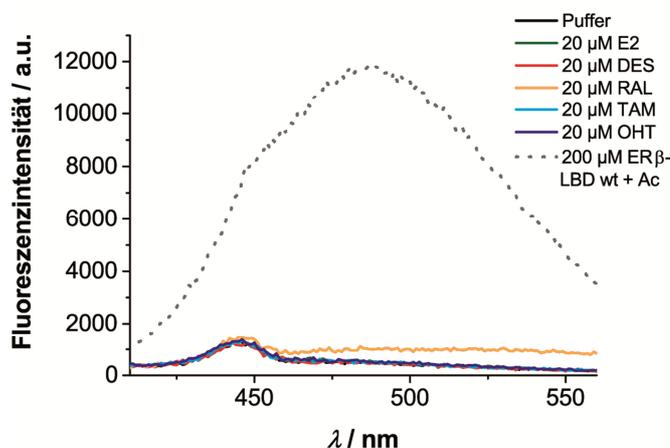


Abbildung 3.7.2 Gemessene Hintergrund-Fluoreszenz der gewählten Testverbindungen bei der höchsten Konzentration im Assay (20 μM) im Vergleich zum Emissionsspektrum des Acrylodan-markierten FLiN-Konstrukts.

Obwohl die vier untersuchten Positionen für die Fluorophor-Markierung in räumlicher Nähe zueinander liegen, reagierten die verschiedenen FLiN-Konstrukte sehr unterschiedlich auf die Zugabe der Testverbindungen (siehe Abbildung 3.7.3 bis Abbildung 3.7.11). Neben dem Einfluss der Markierungsposition, hatten auch die übrigen Mutationen einen Einfluss auf das detektierte Signal. Die in diesen Experimenten teilweise zu beobachtenden Schwankungen in der Gesamtintensität konnten nicht immer auf einen direkten Einfluss der Testverbindungen

zurückgeführt werden, sondern wurden auch durch leichte Abweichungen der Gesamtproteinmenge in den verschiedenen Kavitäten der Mikrotiterplatte sowie durch weitere Effekte, wie das Auftreten von *Photobleaching* im Verlauf längerer Messungen, verursacht. Anhand der spezifischen Änderungen der Emissionsspektren bei Zugabe der verschiedenen Testverbindungen, wurden geeignete Emissionswellenlängen für die Analyse der Bindungsaffinitäten gewählt.

Die Konstrukte hER β LBD wt sowie FLiN 1 und FLiN 5 wurden alle an dem natürlich in der LBD des Rezeptors vorkommenden Cystein-Rest C478 am Übergang zur H12 mit Acrylodan markiert. Das Emissionsspektrum dieser Konstrukte im ligandenfreien apo-Zustand (mit 1 % DMSO als Negativkontrolle) besaß ein Maximum im Bereich von 485–490 nm sowie eine kleine Schulter im Bereich von 450 nm, welche durch Überlagerung mit dem Puffer-Signal entstand. Für hER β LBD wt konnte bei Zugabe von E2 eine bathochrome Verschiebung des Spektrums um 5 nm sowie ein Anstieg der Intensität beobachtet werden. Bei Zugabe des Agonisten DES, wurde eine bathochrome Verschiebung um 10 nm zusammen mit einem starken Anstieg der Intensität beobachtet. Diese bathochrome Verschiebung wird nach der Modell-Vorstellung bei Fluorophoren mit positivem Solvatochromismus durch einen Anstieg der Polarität in der unmittelbaren Umgebung verursacht. Die SERMs OHT und TAM bewirkten eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums um 40 nm, was auf eine besser vom Lösungsmittel abgeschirmte Orientierung hindeutet. Bei Zugabe von RAL wurde keine signifikante Änderung des Spektrums beobachtet. Ähnlich dazu wurde mit dem Konstrukt FLiN 1 eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsspektrums um 35 nm bei Zugabe von OHT und TAM detektiert; RAL hatte auch hier keinen signifikanten Effekt. Dies spricht dafür, dass die durch RAL stabilisierte Konformation im Vergleich zum apo-Gleichgewichtszustand (in diesen FLiN-Konstrukten und unter den gewählten Reaktionsbedingungen), zu keiner ausgeprägten Veränderung der Polarität in der direkten Umgebung des Fluorophors führt. Die Zugabe von DES führte zu einer Intensitätszunahme bei 485 nm, während E2 eine bathochrome Verschiebung um 15 nm bewirkte. Mit dem FLiN Konstrukt 5 konnte bei Zugabe von DES eine hypsochrome Verschiebung um 5 nm, verbunden mit einem Anstieg der Intensität und für E2 eine bathochrome Verschiebung um 5 nm detektiert werden. Die Zugabe von OHT und TAM bewirkte analog zu den anderen Konstrukten eine hypsochrome Verschiebung um 40 nm. Außerdem konnte hier eine weniger stark ausgeprägte hypsochrome Verschiebung um 5 nm bei Zugabe von RAL beobachtet werden.

Die Konstrukte hER β LBD-FLiN 2 und -FLiN 6 besitzen beide die Markierungsposition D486C innerhalb der H12 und zeigten ein ähnliches Verhalten im FLiN-Assay. In der ligandenfreien apo-Form besaß das Acrylodan-Emissionsspektrum von FLiN 2 ein globales Maximum bei etwa 525 nm sowie eine Schulter im Bereich von 450 nm. Bei der Zugabe von E2 und RAL

konnte keine deutliche Änderung des Spektrums beobachtet werden. Bei Zugabe des Agonisten DES und der SERMs TAM und OHT trat eine unterschiedlich stark ausgeprägte hypsochrome Verschiebung des Spektrums auf. Diese betrug für TAM und OHT etwa 20 nm, für DES 65 nm und korrelierte in beiden Fällen mit einer weniger Lösungsmittel-exponierten Orientierung des Fluorophors im Vergleich zum Gleichgewichtszustand, wobei dieser Effekt bei der Stabilisierung einer angewinkelten Konformation von H12 stärker ausgeprägt war. Das apo-Spektrum von FLiN 6 besaß ein globales Maximum bei 515 nm sowie ein lokales Maximum im Bereich von 450 nm. Auch hier war für DES eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums um 60 nm zusammen mit einer ausgeprägten Intensitätszunahme zu beobachten. Für RAL und TAM sowie OHT konnte eine hypsochrome Verschiebung um 20 nm bis 30 nm gemessen werden. Der natürliche Agonist E2 bewirkte keine Änderung des Signals.

In die Sequenzen der hER β LBD Konstrukte FLiN 3 und FLiN 7 wurde an Position 489 ein Cystein-Rest für die Fluorophor-Markierung eingeführt. Im ligandenfreien apo-Zustand besaß das Emissionsspektrum der beiden Konstrukte ein Maximum im Bereich von 450 nm sowie eine Schulter bei 478 nm. Für das Konstrukt FLiN 3 konnte bei Zugabe der SERMs RAL, TAM und OHT eine bathochrome Verschiebung des Spektrums um 30–45 nm beobachtet werden. Die Zugabe von DES hatte einen Anstieg der Intensität und eine hypsochrome Verschiebung zur Folge, wobei eine Schulter im Bereich von 430 nm zu beobachten war. Auch bei Zugabe zunehmender Konzentrationen an E2, konnte scheinbar ein Anstieg der Intensität beobachtet werden, welcher aber das Resultat starker Intensitätsschwankungen im Verlauf der Messung war. Diese konnten auch bei den, über die Platte verteilten, DMSO-Kontrollen beobachtet werden und deuten auf eine geringere Stabilität des Konstrukts hin. Das Konstrukt FLiN 7 lieferte hingegen ein stabiles Signal. Hier konnte bei Zugabe von E2 kein deutlicher Effekt beobachtet werden. Für DES wurde eine leichte hypsochrome Verschiebung, verbunden mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 451 nm, detektiert. RAL, TAM und OHT bewirkten bei zunehmender Konzentration eine bathochrome Verschiebung des Acrylodan-Emissionsspektrums, wobei sich die Schulter bei 478 nm zu einem neuen Maximum bei 490–500 nm, verbunden mit einer Intensitätsabnahme, verschob.

Für das Konstrukt FLiN 8, in welches ein Cystein an Position 493 für die Fluorophor-Markierung eingebracht wurde, konnte als einziges Konstrukt keine signifikante Änderung des Emissionsspektrums bei der Zugabe der Testverbindungen detektiert werden. Dies könnte auch auf eine Markierung mit Acrylodan an einer falschen Position zurückgeführt werden. So konnte für das Konstrukt FLiN 8 zwar die Modifikation mit dem Fluorophor gezeigt werden, die gewünschte Markierungsposition konnte in den vorangegangenen MS/MS-Experimenten jedoch nicht bestätigt werden.

Das Konstrukt FLiN 4 besitzt dasselbe Cystein an Position 493, alle weiteren Cystein-Reste wurden jedoch aus dem Konstrukt entfernt. Das ligandenfreie apo-Spektrum von FLiN 4 zeigte ein Maximum bei etwa 500 nm sowie eine kleine Schulter im Bereich von 450 nm. Während bei der Zugabe des Agonisten E2 auch keine signifikante Änderung des Spektrums zu beobachten war, konnte hier bei zunehmenden Konzentrationen des Agonisten DES eine Intensitätszunahme bei 451 nm beobachtet werden. Auch für die Verbindungen TAM und OHT wurde ein Anstieg der Intensität bei 451 nm sowie eine hypsochrome Verschiebung des Maximums um 10–15 nm beobachtet. Für RAL konnte eine Abnahme der Intensität bei 500 nm und eine Zunahme bei 451 nm beobachtet werden.

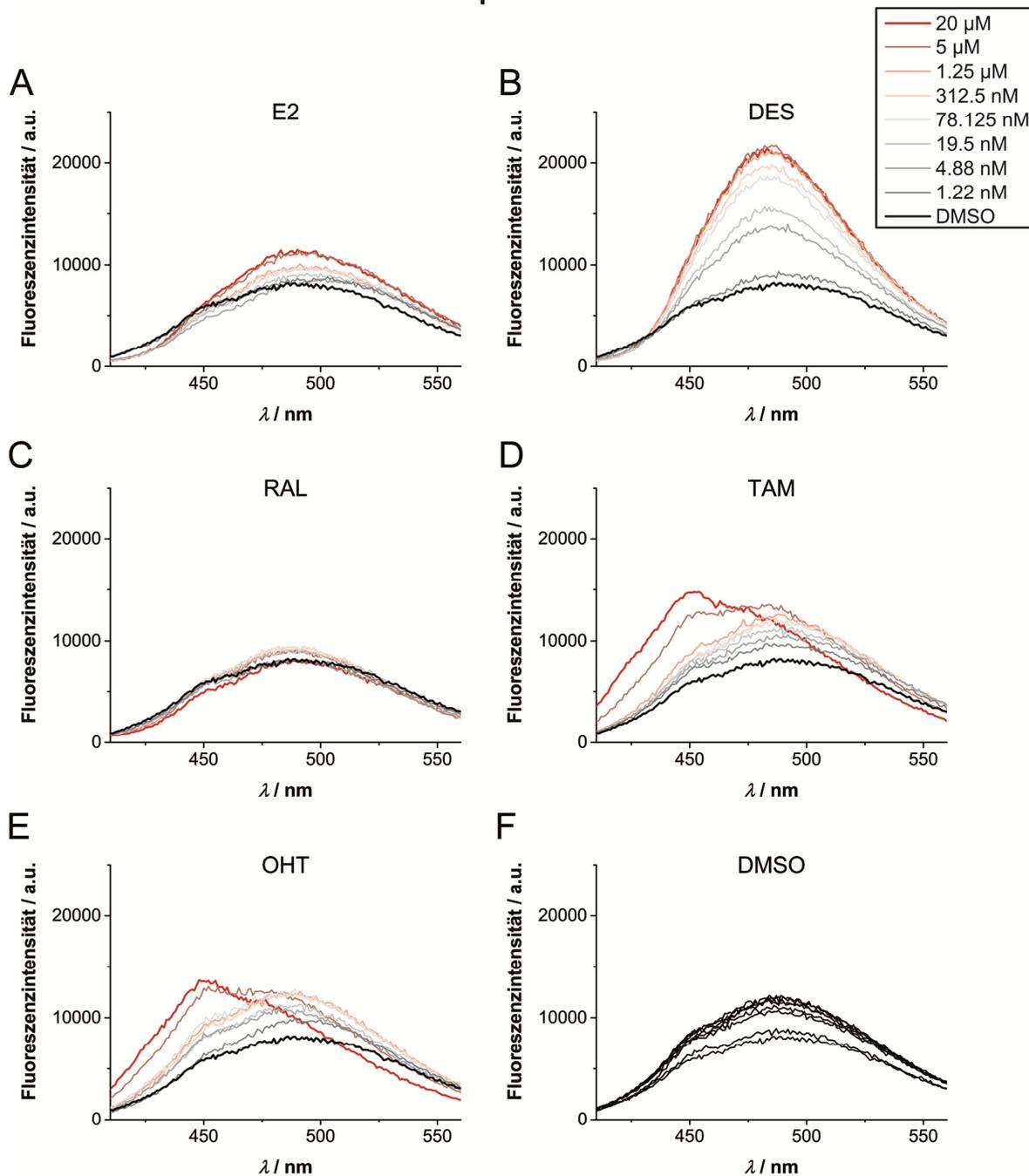
hER β LBD wt

Abbildung 3.7.3 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD wt mit Acrylodan-Markierung an Position C478 ($\lambda_{\text{ex}} = 386$ nm) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A)** 17 β -Estradiol, **B)** Diethylstilbestrol, **C)** Raloxifen, **D)** Tamoxifen, **E)** 4-Hydroxytamoxifen sowie **F)** acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

hERβ LBD-FLiN 1

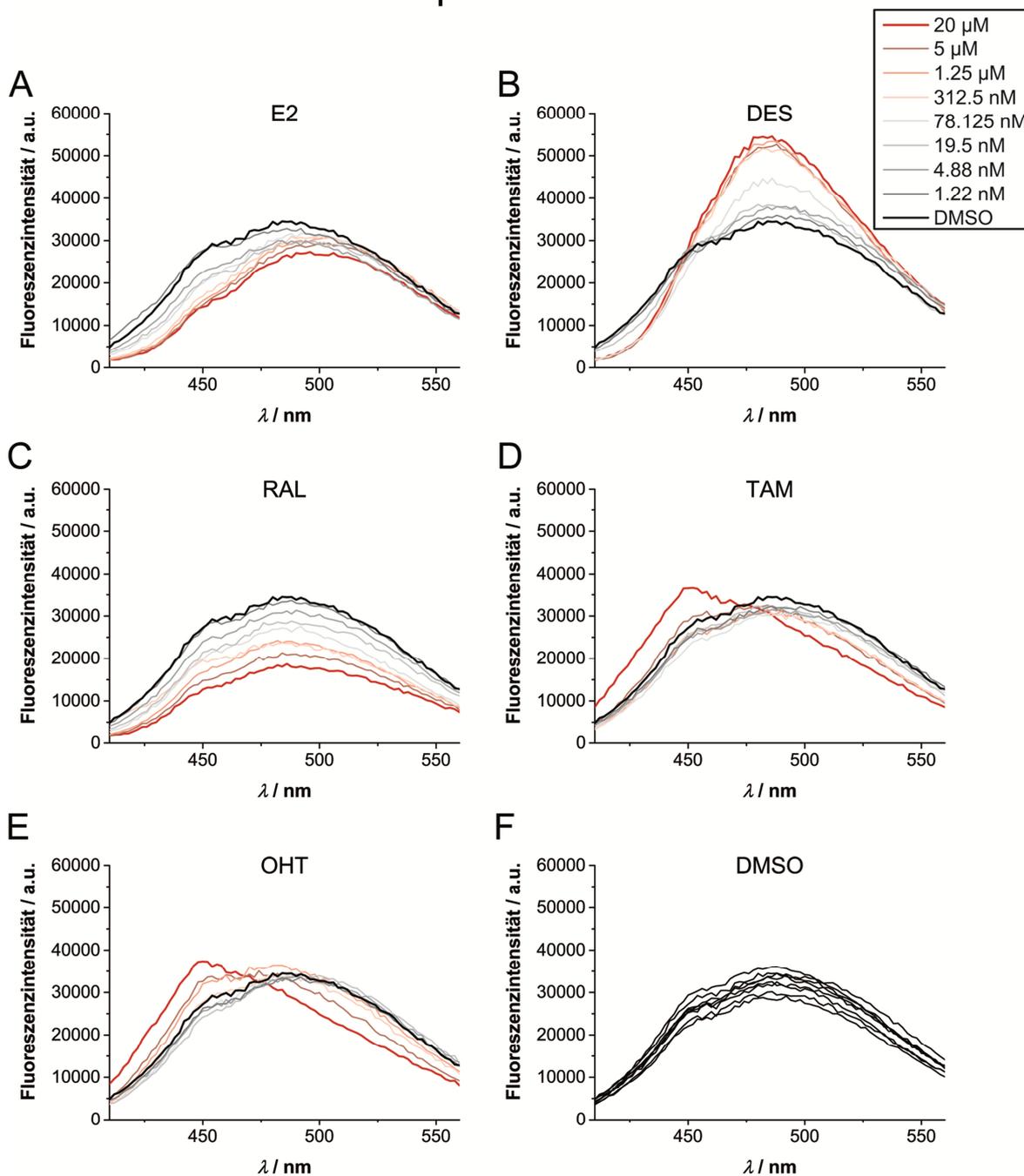


Abbildung 3.7.4 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hERβ LBD-FLiN 1 mit Acrylodan-Markierung an Position C478 ($\lambda_{ex} = 386$ nm) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A)** 17β-Estradiol, **B)** Diethylstilbestrol, **C)** Raloxifen, **D)** Tamoxifen, **E)** 4-Hydroxytamoxifen sowie **F)** acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte, verteilte 1 % DMSO-Kontrollen.

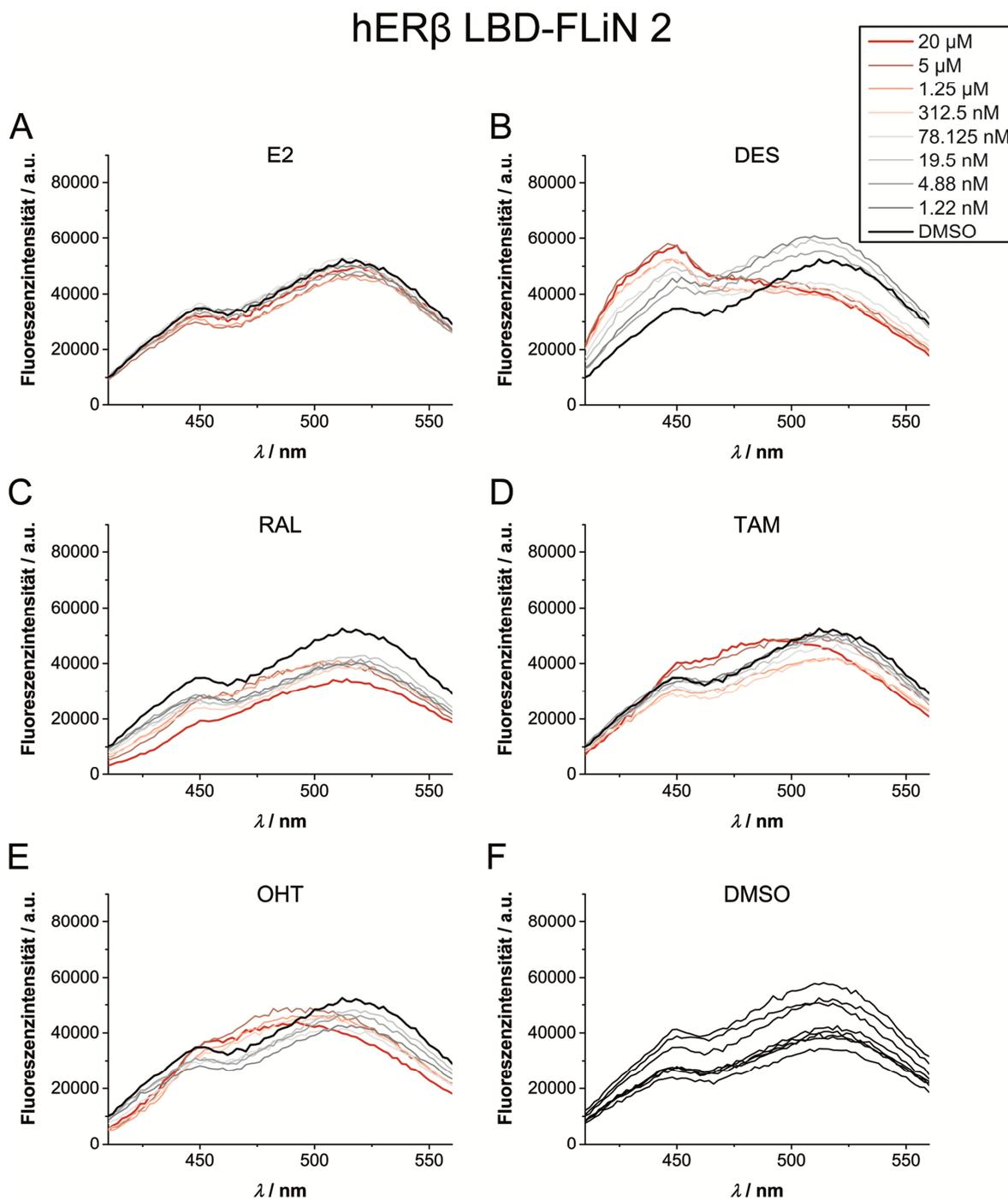


Abbildung 3.7.5 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 2 mit Acrylodan-Markierung an Position D486C ($\lambda_{\text{ex}} = 386 \text{ nm}$) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A**) 17 β -Estradiol, **B**) Diethylstilbestrol, **C**) Raloxifen, **D**) Tamoxifen, **E**) 4-Hydroxytamoxifen sowie **F**) acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

hERβ LBD-FLiN 3

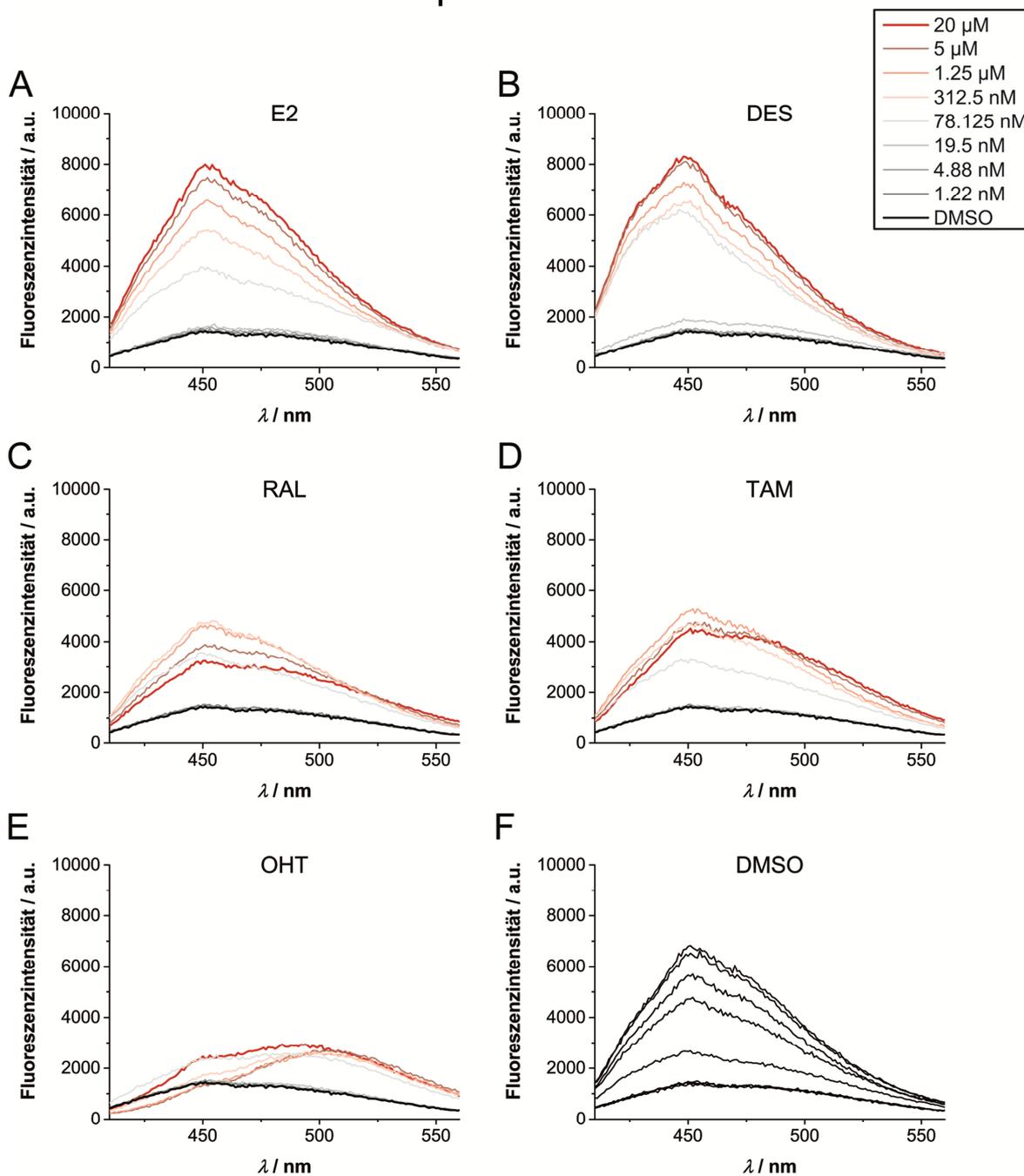


Abbildung 3.7.6 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hERβ LBD-FLiN 3 mit Acrylodan-Markierung an Position L489C ($\lambda_{ex} = 386 \text{ nm}$) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A**) 17β-Estradiol, **B**) Diethylstilbestrol, **C**) Raloxifen, **D**) Tamoxifen, **E**) 4-Hydroxytamoxifen sowie **F**) acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

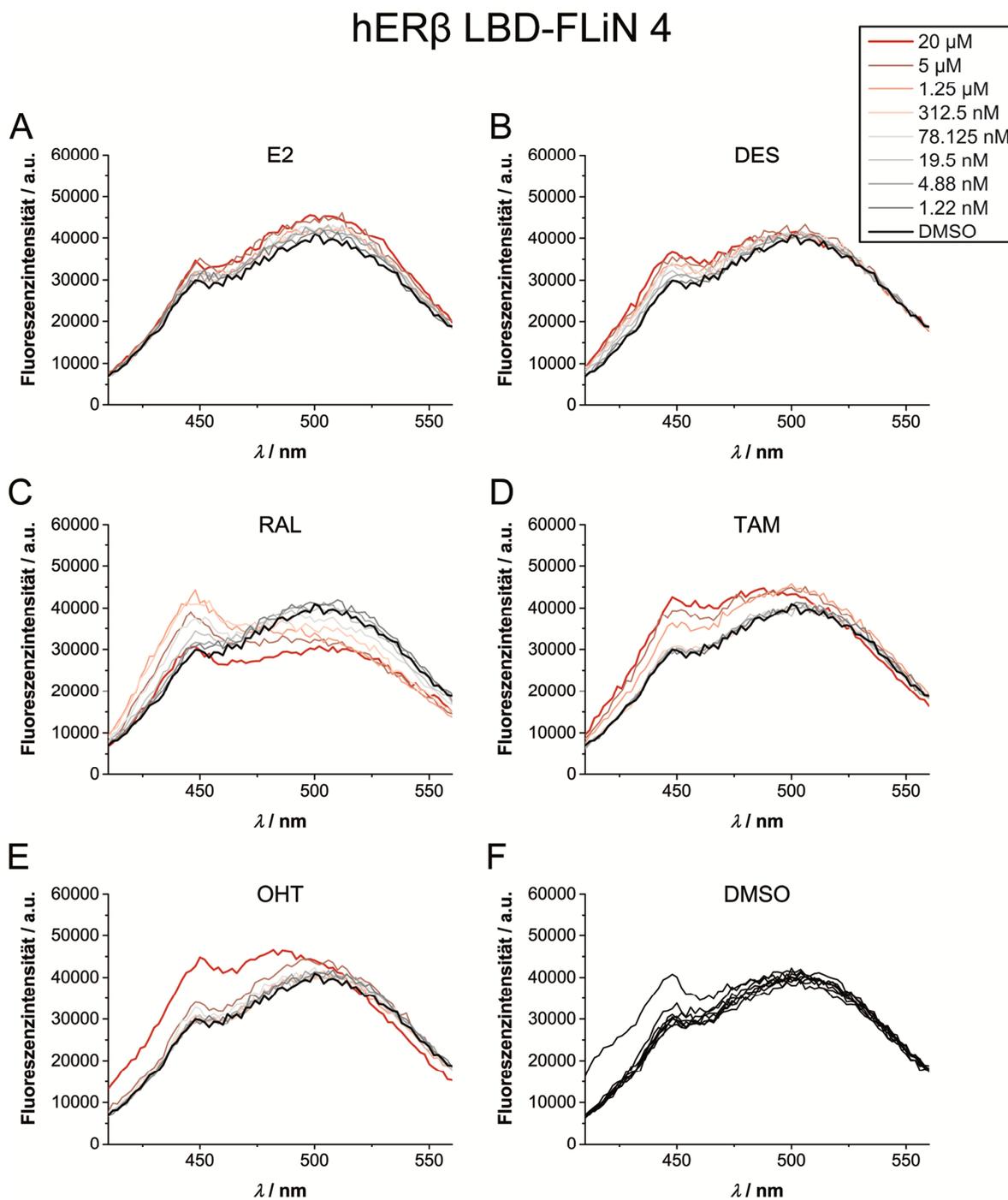


Abbildung 3.7.7 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 4 mit Acrylodan-Markierung an Position N493C ($\lambda_{\text{ex}} = 386 \text{ nm}$) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A**) 17 β -Estradiol, **B**) Diethylstilbestrol, **C**) Raloxifen, **D**) Tamoxifen, **E**) 4-Hydroxytamoxifen sowie **F**) acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

hER β LBD-FLiN 5

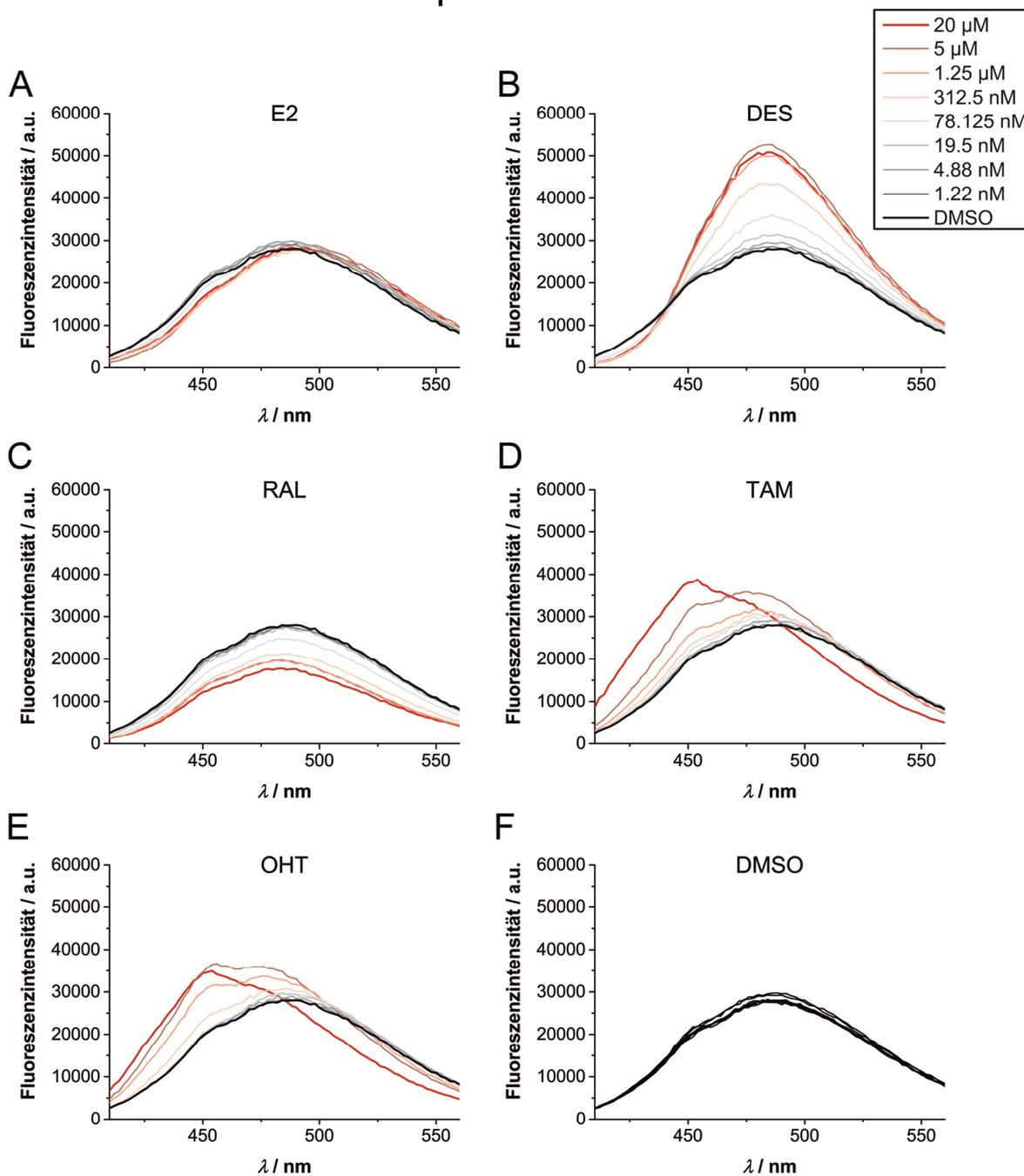


Abbildung 3.7.8 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 5 mit Acrylodan-Markierung an Position C478 ($\lambda_{ex} = 386$ nm) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A**) 17 β -Estradiol, **B**) Diethylstilbestrol, **C**) Raloxifen, **D**) Tamoxifen, **E**) 4-Hydroxytamoxifen sowie **F**) acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

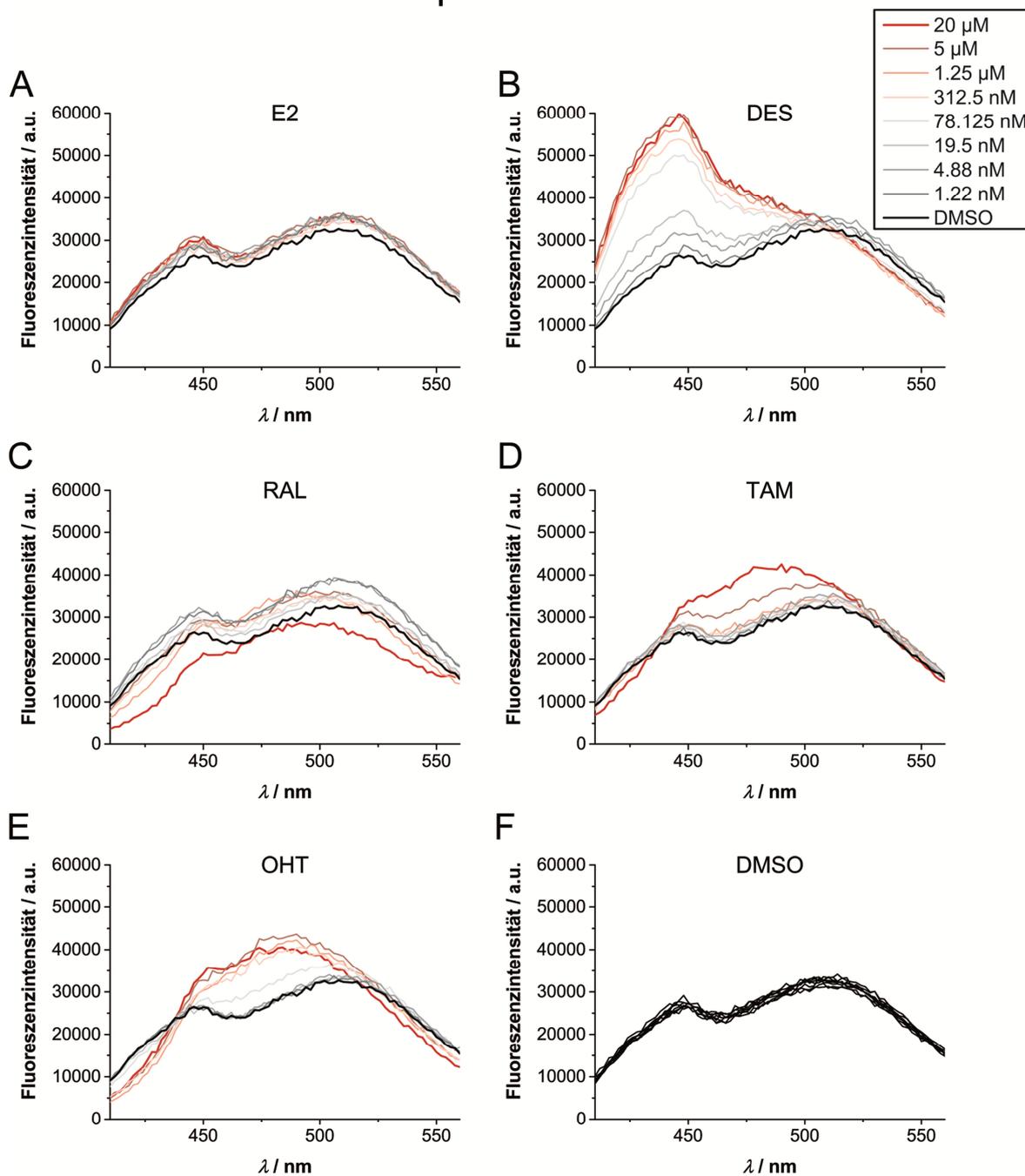
hER β LBD-FLiN 6

Abbildung 3.7.9 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 6 mit Acrylodan-Markierung an Position D486C ($\lambda_{\text{ex}} = 386$ nm) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A**) 17 β -Estradiol, **B**) Diethylstilbestrol, **C**) Raloxifen, **D**) Tamoxifen, **E**) 4-Hydroxytamoxifen sowie **F**) acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

hERβ LBD-FLiN 7

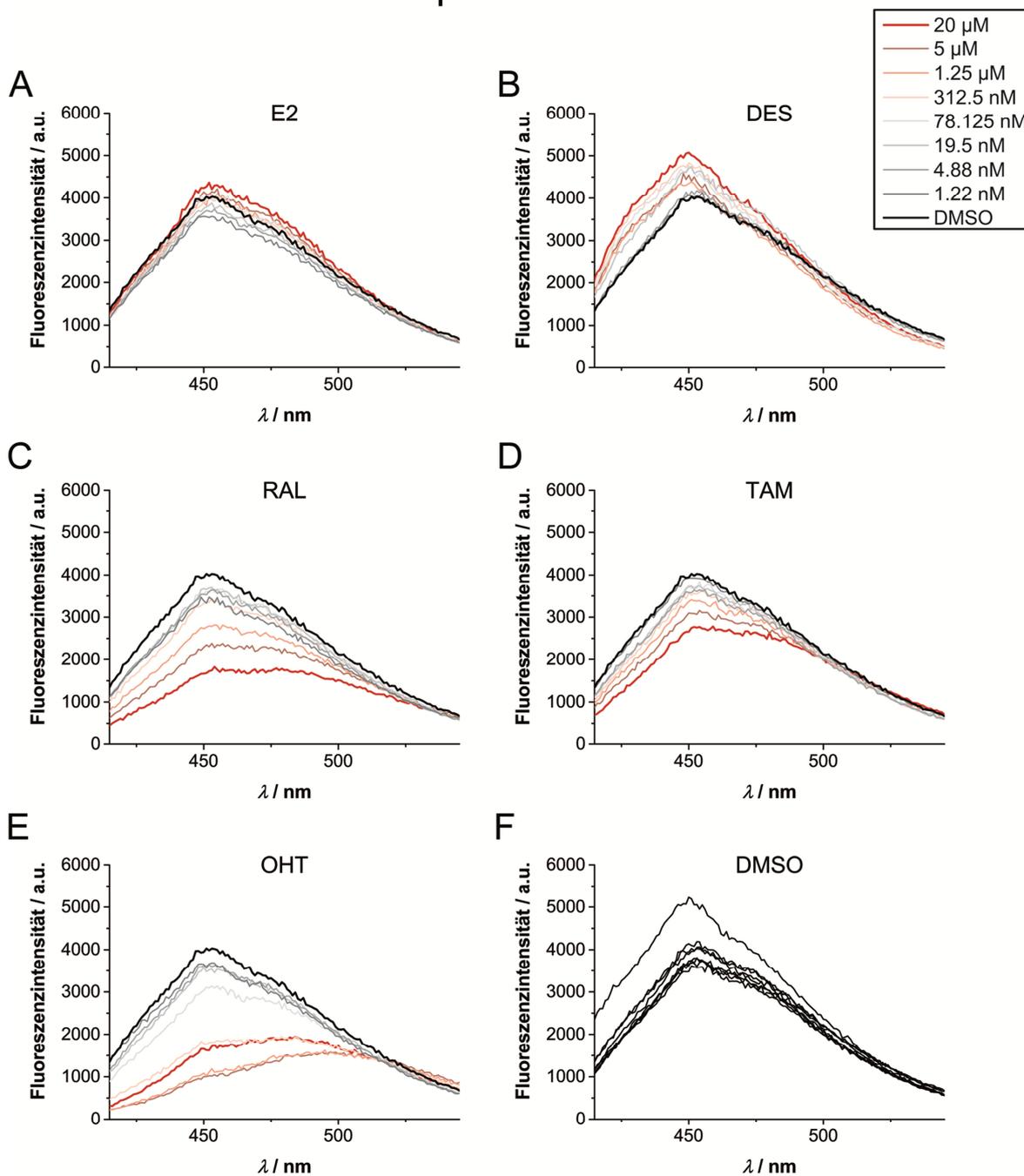


Abbildung 3.7.10 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hERβ LBD-FLiN 7 mit Acrylodan-Markierung an Position L489C ($\lambda_{ex} = 386 \text{ nm}$) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A)** 17β-Estradiol, **B)** Diethylstilbestrol, **C)** Raloxifen, **D)** Tamoxifen, **E)** 4-Hydroxytamoxifen sowie **F)** acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

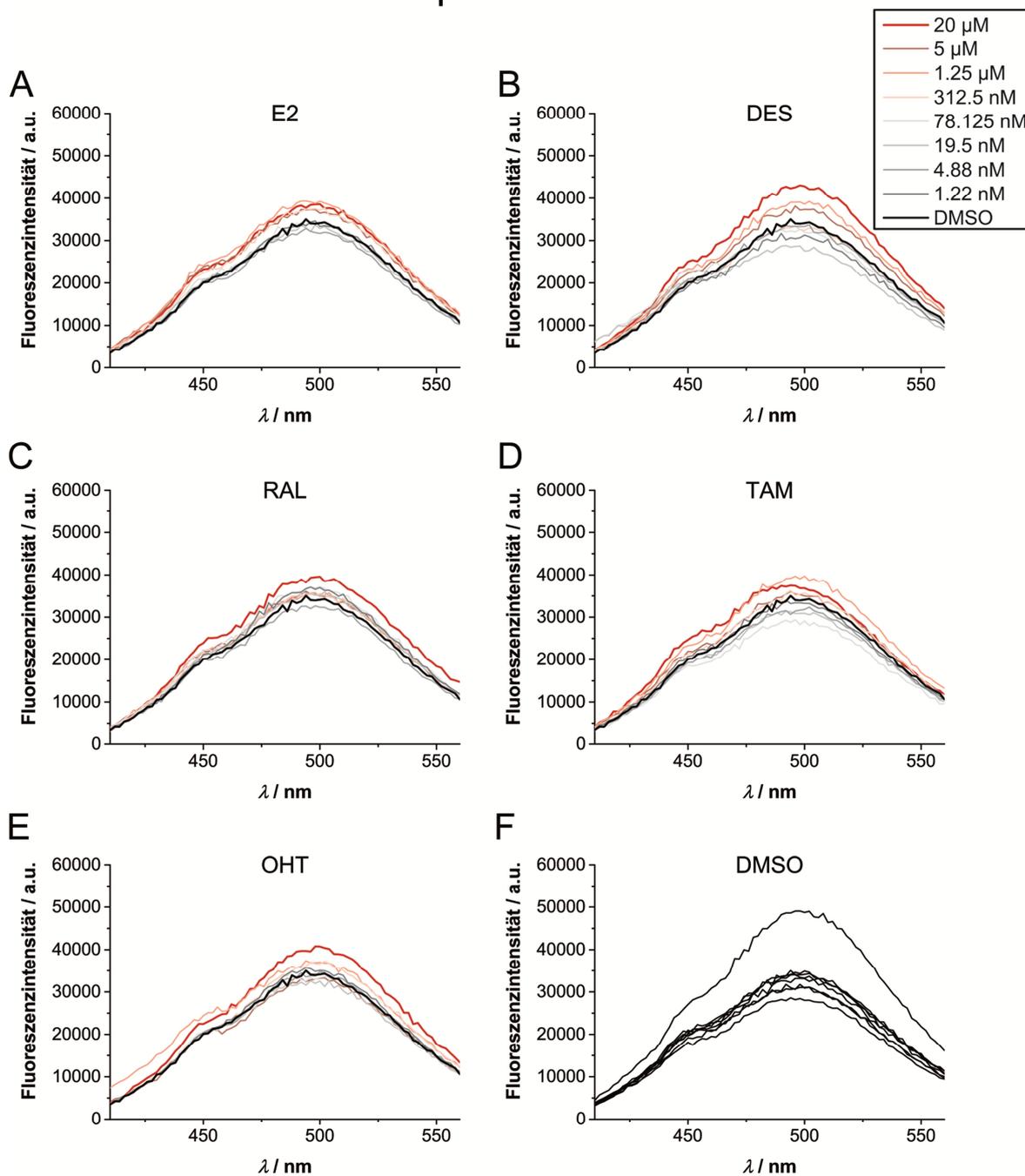
hER β LBD-FLiN 8

Abbildung 3.7.11 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 8 mit Acrylodan-Markierung an Position N493C ($\lambda_{\text{ex}} = 386$ nm) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A**) 17 β -Estradiol, **B**) Diethylstilbestrol, **C**) Raloxifen, **D**) Tamoxifen, **E**) 4-Hydroxytamoxifen sowie **F**) acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten wurden die FLiN-Konstrukte mit einer Verdünnungsreihe der Testverbindungen im Konzentrationsbereich von 1.2 nM–20 μ M inkubiert und, basierend auf den zuvor ermittelten Änderungen der Emissionsspektren, die Fluoreszenzintensität bei zwei Wellenlängen ausgelesen. Dadurch konnte die Messdauer pro

Mikrotiterplatte (384 Datenpunkte) auf etwa 10 min verkürzt werden (im Vergleich dazu liegt die Messdauer pro Platte beim Auslesen ganzer Emissionsspektren bei etwa 4 h), womit der Assay auch im Hochdurchsatzformat eingesetzt werden kann. Außerdem konnten so störende Effekte, wie das Auftreten von *Photobleaching* oder Verdunstungseffekte, die bei der zeitintensiven Messung ganzer Emissionsspektren das Signal beeinträchtigen können, auf ein Minimum reduziert und eine gerätebedingt höhere Messgenauigkeit erzielt werden. Zur Quantifizierung der Verschiebung des Emissionsspektrums bei der Bindung der Liganden an den Rezeptor, wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei den gewählten Wellenlängen (je nach Konstrukt $I_{445\text{ nm}}/I_{478\text{ nm}}$, $I_{451\text{ nm}}/I_{478\text{ nm}}$ und/oder $I_{520\text{ nm}}/I_{451\text{ nm}}$) für die verschiedenen Ligandenkonzentrationen berechnet. Dies diente zusätzlich der Normierung des gemessenen Signals, womit Schwankungen in der Signalintensität, beispielsweise durch Abweichungen der Proteinmengen in den einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte, ausgeglichen werden konnten. Durch Auftragung des gewählten Signals gegen die logarithmische Ligandenkonzentration, wurden Dosis-Wirkungskurven erhalten (Abbildung 3.7.12 und Abbildung 3.7.13; aus Übersichtsgründen sind nur die Kurven ohne Hintergrundkorrektur gezeigt). Durch fitten an einen sigmoidalen Kurvenverlauf, konnte daraus der K_d -Wert für die untersuchten Testverbindungen ermittelt werden. Die Dissoziationskonstante K_d entspricht der Ligandenkonzentration im Gleichgewicht, bei der 50 % der Rezeptormoleküle besetzt sind.

Die unterschiedlichen Signaländerungen, die bei der Ligandenbindung detektiert wurden, spiegeln die Unterschiede der, durch die Testverbindungen stabilisierten, Konformation des ER wider. Dabei waren nicht alle getesteten LBD-Konstrukte gleichermaßen für die Detektion aller Liganden geeignet. Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Qualität und Robustheit der mit einem Assay-System generierten Daten, ist der Z' -Faktor. Dieser vergleicht, über Messungen mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle, die maximale Änderung des Assay-Signals mit den zugehörigen Standardabweichungen. Assay-Systeme mit einem $Z' \geq 0.5$ gelten im allgemeinen als sehr robust und gut für den Einsatz im Hochdurchsatz-Format geeignet.^[121] Zur Evaluierung der mit den verschiedenen FLiN-Konstrukten generierten Daten, wurde das jeweils gewählte FLiN-Signal für die Negativkontrolle (1 % DMSO) sowie die Positivkontrollen (20 μM DES oder 20 μM OHT, als Vertreter für die unterschiedlichen Konformationen der H12) in jeweils acht Messungen bestimmt. Aus dem Mittelwert der Positivkontrolle (μ_p) und Negativkontrolle (μ_n) sowie den zugehörigen Standardabweichungen (σ_p und σ_n), wurde nach folgender Formel der Z' -Faktor berechnet:

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (1)$$

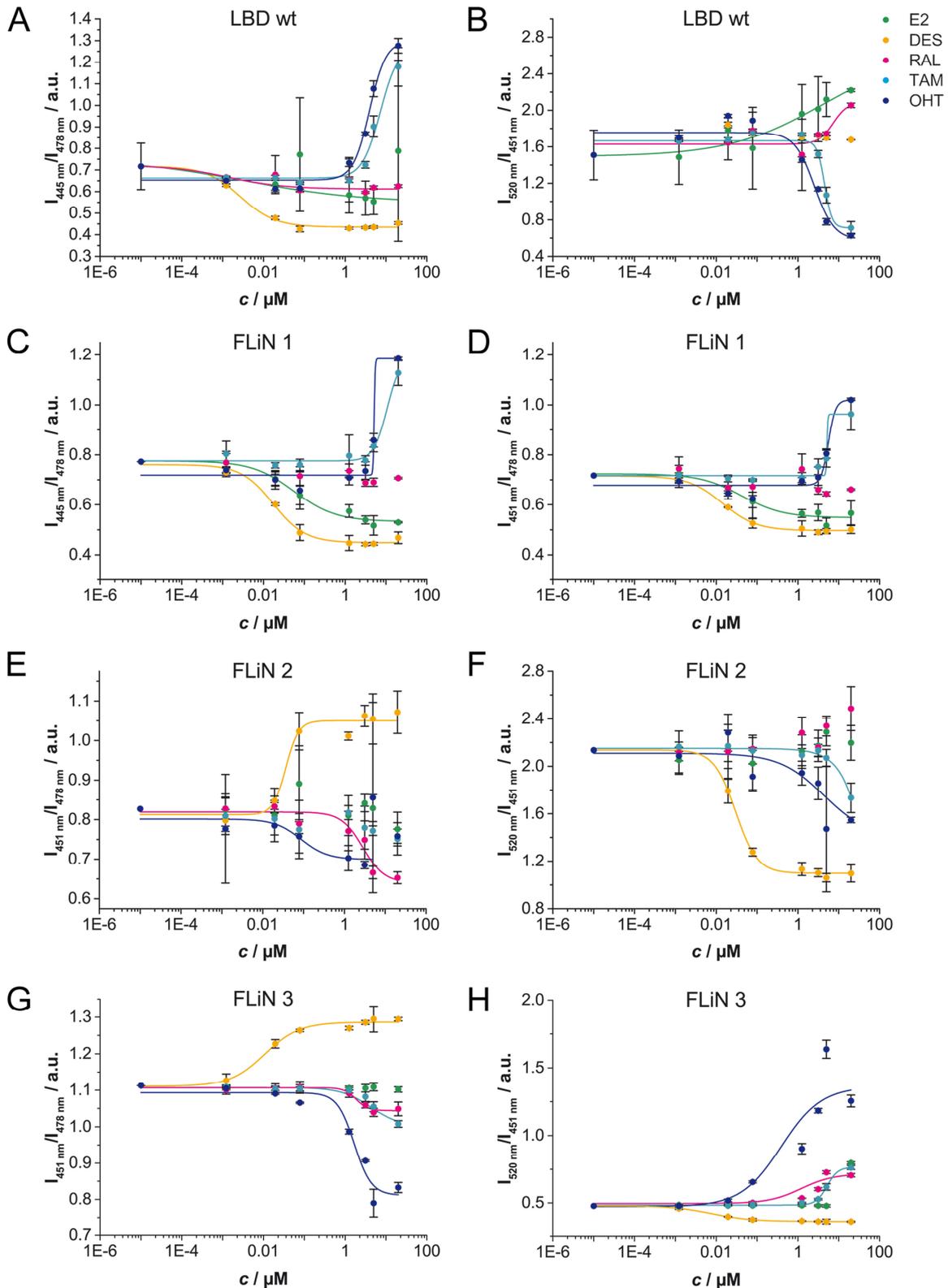


Abbildung 3.7.12 Bestimmung von Bindungsaffinitäten mit den verschiedenen Acrylodan-markierten hERβ LBD-FLiN Konstrukten im Mikrotiterplattenformat. Durch Auftragung des FLiN-Signals (Mittelwert aus drei Datenpunkten) gegen die Ligandenkonzentration, konnte ein K_d -Wert für die untersuchten Testverbindungen ermittelt werden. Gezeigt sind die, mit verschiedenen Signalen erhaltenen, Dosis-Wirkungs-Kurven für die Konstrukte **A) & B)** hERβ LBD wt; **C) & D)** FLiN 1; **E) & F)** FLiN 2; **G) & H)** FLiN 3.

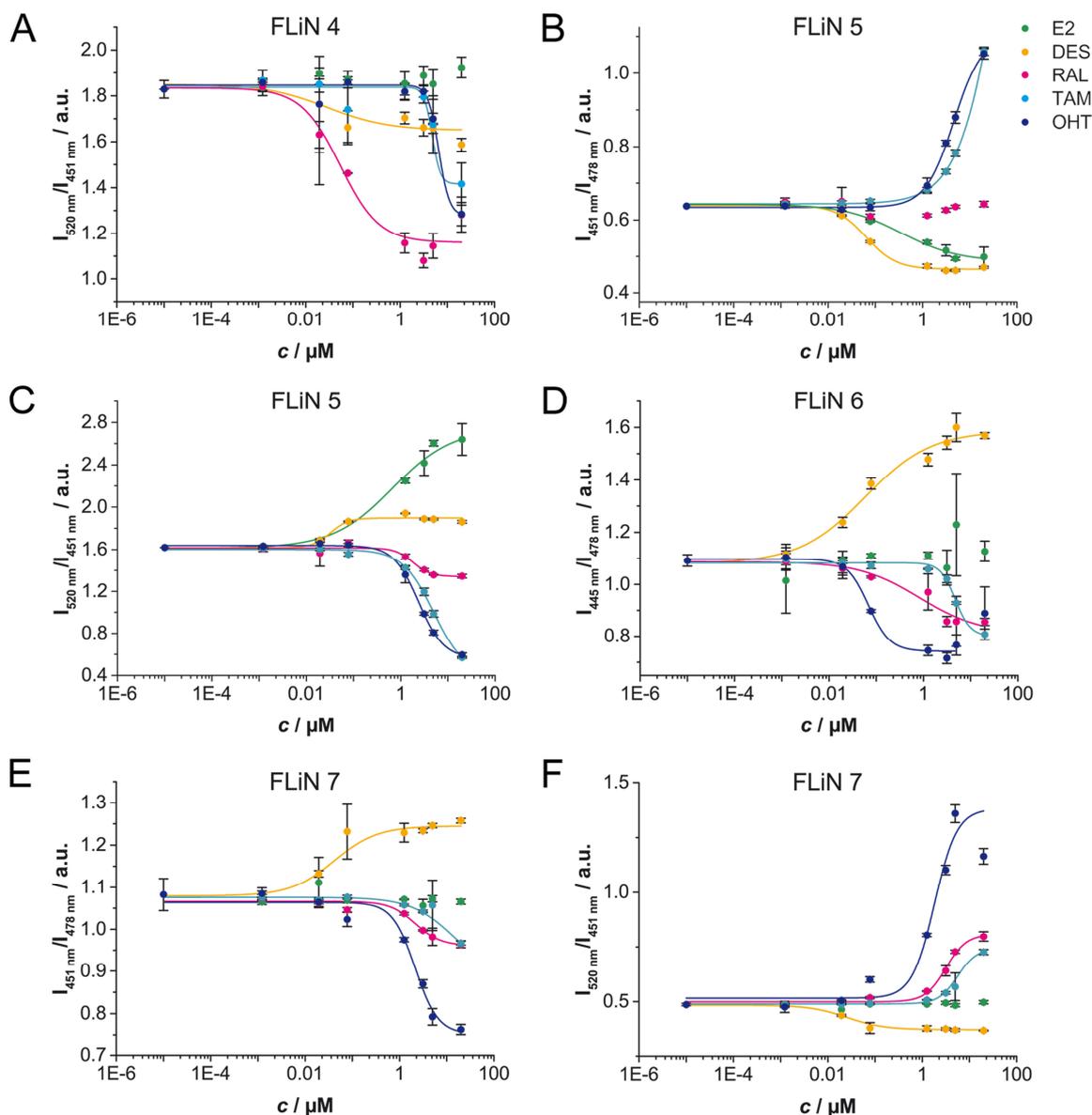


Abbildung 3.7.13 Bestimmung von Bindungsaffinitäten mit den verschiedenen Acrylodan-markierten hER β LBD-FLiN Konstrukten im Mikrotiterplattenformat. Durch Auftragung des FLiN-Signals (Mittelwert aus drei Datenpunkten) gegen die Ligandenkonzentration, konnte ein K_d -Wert für die untersuchten Testverbindungen ermittelt werden. Gezeigt sind die, mit verschiedenen Signalen erhaltenen, Dosis-Wirkungs-Kurven für die Konstrukte **A)** FLiN 4; **B) & C)** FLiN 5; **D)** FLiN 6; **E) & F)** FLiN 7.

Eine Übersicht der Ergebnisse der FLiN-Experimente mit allen hER β LBD-Konstrukten (markiert mit Acrylodan) ist in Tabelle 3.7.1 und Tabelle 3.7.2 dargestellt. Sowohl die K_d -Werte, als auch der Z' -Faktor wurden für alle Datensätze jeweils ohne und nach Korrektur mit der gemessenen Hintergrundfluoreszenz bestimmt, um deren Einfluss auf das Signal bewerten zu können. Wie aufgrund der Messung der Eigenfluoreszenz der Testverbindungen schon erwartet wurde, konnte für Konstrukte, die über eine gute Signalqualität verfügen, kein

signifikanter Einfluss durch das Hintergrundsignal auf das Ergebnis des Assay-Systems festgestellt werden.

In den vorangegangenen Messungen der Emissionsspektren (Abbildung 3.7.3 bis Abbildung 3.7.11), konnten unterschiedliche Veränderungen bei der Bindung der einzelnen Testverbindungen beobachtet werden, was auf die Stabilisierung unterschiedlicher Konformationen der H12 zurückgeführt wurde. Um den FLiN-Assay auch für das Hochdurchsatz-Screening nach neuen ER Liganden einsetzen zu können, muss über das gewählte Assay-Signal die Detektion der verschiedenen Liganden und damit verschiedener Änderungen des Spektrums, möglich sein. Idealerweise sollte mit dem gewählten LBD-Konstrukt über das Assay-Signal außerdem eine einfach zu interpretierende Aussage bezüglich der stabilisierten Konformation des Rezeptors getroffen werden können.

Sowohl in der detektierten Signaländerung bei der Bindung der Testverbindungen als auch in der Robustheit des gemessenen Signals, konnten große Unterschiede zwischen den einzelnen FLiN-Konstrukten beobachtet werden. Mit Ausnahme des Konstrukts FLiN 8, konnte für alle anderen Konstrukte mit den meisten Testverbindungen eine konzentrationsabhängige Signaländerung gemessen werden. Für die Konstrukte hER β LBD FLiN 1, FLiN 2, FLiN 3, FLiN 5, FLiN 6 und FLiN 7 konnten geeignete Assay-Signale gewählt werden, bei denen die Richtung der Signaländerung bei zunehmender Ligandenkonzentration mit der stabilisierten Orientierung der H12 korreliert werden konnte. Beispielsweise wurde bei Auftragung des Signals $I_{520\text{ nm}}/I_{451\text{ nm}}$ für das Acrylodan-markierte Konstrukt FLiN 5 bei der Bindung der Agonisten E2 und DES ein Anstieg des Signals beobachtet, während bei der Bindung der SERMs RAL, TAM und OHT ein abfallendes Signal erhalten wurde.

Da die Änderungen des Emissionsspektrums bei der Bindung aller Testverbindungen unterschiedlich ausfielen, war nicht jedes gewählte Assay-Signal optimal für die Detektion aller Liganden geeignet. Beispielsweise konnte mit dem Konstrukt hER β LBD wt über das Signal $I_{520\text{ nm}}/I_{451\text{ nm}}$ die Änderung des Emissionsspektrums bei der Bindung von DES nicht abgebildet werden ($Z' < 0$); für die Bindung von OHT wurde hingegen ein gutes Signal erhalten ($Z' = 0.66$, $K_d = 220\text{ nM}$). Durch Auslesen des Signals $I_{445\text{ nm}}/I_{478\text{ nm}}$ konnte die Bindung von DES ($Z' = 0.75$, $K_d = 3\text{ nM}$) sowie OHT ($Z' = 0.56$) mit einer ausreichenden Signalqualität detektiert werden. Die dabei ermittelte Bindungsaffinität für OHT lag mit einem $K_d = 5455\text{ nM}$ nun aber deutlich höher als zuvor. Das Assay-Signal für FLiN im Mikrotiterplattenformat stellt daher einen Kompromiss dar, bei dem die stabile Detektion verschiedenster Liganden sowie die Unterscheidung der jeweiligen Bindungsmodi im Vordergrund stehen. Eine solche Unterscheidung und damit eine Beurteilung des voraussichtlichen physiologischen Effektes eines Liganden kann mit anderen *in vitro* Assay-Systemen zur Charakterisierung von ER Liganden nicht getroffen werden. Die auf diese Weise mit dem FLiN-Assay im

Mikrotiterplattenformat ermittelten K_d -Werte, spiegeln trotzdem den allgemeinen Affinitätstrend für die verschiedenen Testverbindungen wider (siehe Abschnitt 3.8.1 für einen Vergleich der FLiN-Ergebnisse mit einem orthogonalen Assay-System). Eine exaktere Bestimmung des K_d -Werts mit FLiN ist über individuelle Messungen im Küvetten-Format möglich (siehe Abschnitt 3.9).

Um der unterschiedlich stark ausgeprägten Signaländerungen bei der Beurteilung der ermittelten K_d -Werte Rechnung zu tragen, wurde anhand der Daten der Dosis-Wirkungskurven für jede K_d -Bestimmung der zugehörige Z' -Faktor berechnet (basierend auf jeweils drei Datenpunkten für 1 % DMSO und 20 μ M Ligand). Die in den Tabellen dargestellten K_d -Werte aus allen Experimenten, sind basierend auf dem Z' -Faktor des jeweiligen Experiments farbig codiert (schwarz: solide Daten, für die ein Z' -Faktor ≥ 0.5 ermittelt wurde; grau: $0.25 \leq Z' < 0.5$; rot: unzureichende Datenqualität mit $Z' < 0.25$).

Zusammenfassend lieferten die LBD-Konstrukte, aus denen alle Cystein-Reste entfernt wurden, Daten mit einer geringeren Robustheit. Mit Z' -Werten unter 0.5 für die meisten Testverbindungen, waren die Konstrukte FLiN 1, FLiN 2 und FLiN 4 nicht für den Einsatz in einem Hochdurchsatz-Assay geeignet. Konstrukte, aus denen nur die beiden Oberflächen-Cysteine entfernt wurden, erzielten eine deutlich bessere Signalstabilität. Dies lässt vermuten, dass vor allem die Mutationen im Inneren des Proteins einen negativen Effekt auf die Faltung, Stabilität und/oder Funktionalität ausüben. Diese Beobachtung deckt sich mit den Sekundärstrukturanalysen, bei denen für diese Konstrukte eine Abnahme des LBD-typischen α -helikalen Charakters beobachtet wurde. Zur Unterscheidung der verschiedenen Orientierungen der H12, waren die Markierungspositionen C478 (FLiN 5) sowie L489C (FLiN 3 und FLiN 7) am besten geeignet, wobei die stabilsten Signale mit den Konstrukten FLiN 7 und FLiN 5 erhalten wurden. Mit FLiN 7 und dem Signal $I_{520 \text{ nm}}/I_{451 \text{ nm}}$ konnten die höchsten Z' -Werte mit 0.78 für DES und 0.87 für OHT erhalten werden. Das Konstrukt FLiN 5 lieferte über das Signal $I_{520 \text{ nm}}/I_{451 \text{ nm}}$ auch robuste Daten. Zudem konnte hier die Bindung von E2, jedoch mit einem unerwartet hohen K_d , detektiert werden ($K_d = 233 \text{ nM}$, $Z' = 0.51$). Aufgrund dieser Ergebnisse wären beide Konstrukte für den Einsatz im FLiN-Assay geeignet. Für die weiteren Experimente wurde beispielhaft das Konstrukt FLiN 7 gewählt.

Tabelle 3.7.1 Ergebnisse der FLiN-Experimente im Mikrotiterplattenformat mit allen, mit Acrylodan markierten, hERβ LBD Konstrukten (Teil 1).

Konstrukt	Änderung Fluoreszenzspektrum	Signal	Z'				K _d / nM			
			DES	OHT	E2 ^A	DES ^A	RAL ^A	TAM ^A	OHT ^A	
hERβ LBD wt (C478)	DES: 10 nm rot-Verschiebung + Intensitätszunahme OHT: 40 nm blau-Verschiebung	I _{520 nm} /I _{451 nm} I _{445 nm} /I _{478 nm}	< 0 (< 0) ^B	0.66 (0.66) ^B	285 (-) ^B	- (-) ^B	91 (265) ^B	3952 (2785) ^B	220 (106) ^B	
hERβ LBD-FLiN 1 (C331S, C366S, C396T, C478)	DES: Intensitätszunahme OHT: 35 nm blau-Verschiebung	I _{451 nm} /I _{478 nm} I _{520 nm} /I _{451 nm}	0.44 (0.36) ^B	0.26 (0.36) ^B	70 (65) ^B	14 (13) ^B	68 (188) ^B	5503 (5366) ^B	13414 (14060) ^B	
hERβ LBD-FLiN 2 (C331S, C366S, C396T, C478L, D486C)	DES: 65 nm blau-Verschiebung OHT: 20 nm blau-Verschiebung	I _{520 nm} /I _{451 nm} I _{445 nm} /I _{478 nm}	0.43 (0.42) ^B	0.66 (0.64) ^B	80 (87) ^B	12 (11) ^B	120 (154) ^B	3819 (3804) ^B	1902 (8672) ^B	
hERβ LBD-FLiN 3 (C331S, C366S, C396T, C478L, L489C)	DES: blau-Verschiebung OHT: 45 nm rot-Verschiebung	I _{520 nm} /I _{451 nm} I _{445 nm} /I _{478 nm}	0.47 (0.45) ^B	0.13 (0.07) ^B	- (-) ^B	28 (23) ^B	2341 (1178) ^B	8518 (6485) ^B	550 (1217) ^B	
hERβ LBD-FLiN 4 (C331S, C366S, C396T, C478L, N493C)	DES: Intensitätszunahme OHT: 15 nm blau-Verschiebung + Intensitätszunahme	I _{451 nm} /I _{478 nm} I _{520 nm} /I _{451 nm}	0.48 (0.48) ^B	0.68 (0.43) ^B	- (-) ^B	14 (15) ^B	573 (746) ^B	3650 (3673) ^B	507 (491) ^B	
			< 0 (< 0) ^B	< 0 (< 0) ^B	- (-) ^B	74 (52) ^B	567 (613) ^B	806 (-) ^B	82 (25) ^B	
			0.61 (0.60) ^B	0.58 (0.58) ^B	- (-) ^B	10 (10) ^B	1480 (983) ^B	4089 (4157) ^B	598 (389) ^B	
			0.42 (0.44) ^B	0.55 (0.39) ^B	- (-) ^B	30 (-) ^B	62 (16) ^B	6600 (2600) ^B	6367 (6088) ^B	

^A Farbcodierung: Z' aus Dosis-Wirkungskurven (aus Signal bei 1 % DMSO und 20 μM Ligand; je 3 Messpunkte) rot: < 0.25, grau: 0.25–0.5, schwarz: > 0.5

^B Werte in Klammern wurden mit demselben Datensatz nach Hintergrundkorrektur ermittelt.

Tabelle 3.7.2 Ergebnisse der FLiN-Experimente im Mikrotiterplattenformat mit allen, mit Acrylodan markierten, hERβ LBD Konstrukten (Teil 2).

Konstrukt	Änderung Fluoreszenzspektrum	Signal	Z'				K _d / nM			
			DES	OHT	E2 ^A	DES ^A	RAL ^A	TAM ^A	OHT ^A	
hERβ LBD-FLiN 5 (C366S, C478)	DES: 5 nm blau-Verschiebung + Intensitätszunahme OHT: 40 nm blau-Verschiebung	I _{451 nm} /I _{478 nm}	0.83 (0.85) ^B	0.88 (0.89) ^B	156 (152) ^B	65 (53) ^B	- (-) ^B	1190 (1174) ^B	742 (733) ^B	
hERβ LBD-FLiN 6 (C366S, C478L, D486C)	DES: 60 nm blau-Verschiebung + Intensitätszunahme OHT: 30 nm blau-Verschiebung	I _{520 nm} /I _{451 nm} I _{445 nm} /I _{478 nm}	0.6 (0.57) ^B	0.85 (0.90) ^B	233 (236) ^B	39 (26) ^B	432 (422) ^B	1491 (1174) ^B	831 (733) ^B	
hERβ LBD-FLiN 7 (C366S, C478L, L489C)	DES: blau-Verschiebung + Intensitätszunahme bei 451 nm OHT: 20 nm rot-Verschiebung + Intensitätsabnahme	I _{451 nm} /I _{478 nm} I _{520 nm} /I _{451 nm}	0.26 (0.25) ^B	0.53 (0.53) ^B	- (-) ^B	32 (30) ^B	823 (339) ^B	3924 (2833) ^B	719 (682) ^B	
hERβ LBD-FLiN 8 (C366S, C478L, N493C)	keine Änderung detektiert	-	-	-	-	-	-	-	-	

^A Farbcodierung: Z' aus Dosis-Wirkungskurven (aus Signal bei 1 % DMSO und 20 μM Ligand; je 3 Messpunkte) rot: < 0.25, grau: 0.25–0.5, schwarz: > 0.5

^B Werte in Klammern wurden mit demselben Datensatz nach Hintergrundkorrektur ermittelt.

Für die Etablierung des FLiN-Assays wurde eine bekannte Pufferzusammensetzung als Startbedingung gewählt (FLiN-Puffer 1: 20 mM HEPES, 10 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v) Ethylenglycol, 0.01 % (v/v) Triton X-100, pH 8.0 + 1 mM DTT). Dieser Puffer entspricht der aus dem kompetitiven PolarScreen™ Assay für ER β bekannten Bedingung. Im Zuge der Assay-Optimierung wurden eine weitere, für fluoreszenzbasierte Bindungsassays bekannte, Pufferzusammensetzung getestet (FLiN-Puffer 2: 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5) und der Einfluss des verwendeten Reduktionsmittels untersucht. Dafür wurden die Experimente zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten sowie des Z' -Faktors mit allen Testverbindungen unter Verwendung der verschiedenen Puffersysteme mit dem Acrylodan-markierten LBD-Konstrukt FLiN 7 wiederholt (Tabelle 3.7.3). Dabei wurde bei Verwendung des FLiN-Puffers 1 kein Effekt des Reduktionsmittels auf die Resultate beobachtet. Der Wechsel des Puffersystems hatte einen geringfügigen Einfluss auf die Form des Emissionsspektrums von Acrylodan. Im apo-Zustand besaß das Spektrum ein Maximum bei 451 nm sowie ein weiteres lokales Maximum bei 478 nm (Abbildung 3.7.14), welches bei Verwendung von FLiN-Puffer 1 nur als kleine Schulter erkennbar war. Die Verwendung der verschiedenen Puffer hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die, für die Testverbindungen DES, RAL, TAM und OHT, ermittelten Bindungsaffinitäten sowie die Robustheit der Daten. Durch einen Wechsel auf den FLiN-Puffer 2 konnte nun aber auch die Bindung von E2 durch eine Zunahme der Intensität bei 451 nm detektiert werden. Diese Intensitätszunahme war bei Verwendung des FLiN-Puffers 1 ohne Zusatz eines Reduktionsmittels deutlich ausgeprägt, während die Zugabe der Reduktionsmittel DTT oder TCEP das Signal so stark minimierte, dass keine robusten Daten mehr erhalten werden konnten. Da die Verwendung der Reduktionsmittel keinen positiven Effekt auf die Ergebnisse des FLiN-Assays hatte, wurde in allen weiteren Experimenten der FLiN-Puffer 2 ohne Zusatz eines Reduktionsmittels verwendet.

Tabelle 3.7.3 Test verschiedener Pufferbedingungen im FLiN-Assay (hER β LBD-FLiN 7 mit Acrylodan).

	FLiN-Puffer 1			FLiN-Puffer 2		
	+ 1 mM DTT	+ 1 mM TCEP	-	+ 1 mM DTT	+ 1 mM TCEP	-
K_d(E2)	kein Signal	kein Signal	kein Signal	11 nM	74 nM	70 nM
Z'(E2)	< 0	< 0	< 0	0.16	0.25	0.53
K_d(DES)	21 nM	15 nM	39 nM	3 nM	14 nM	11 nM
Z'(DES)	0.78	0.50	0.73	0.70	0.87	0.82
K_d(OHT)	502 nM	602 nM	- ^A	945 nM	600 nM	516 nM
Z'(OHT)	0.87	0.60	- ^A	0.94	0.97	0.85

^A Verbindung nicht vermessen.

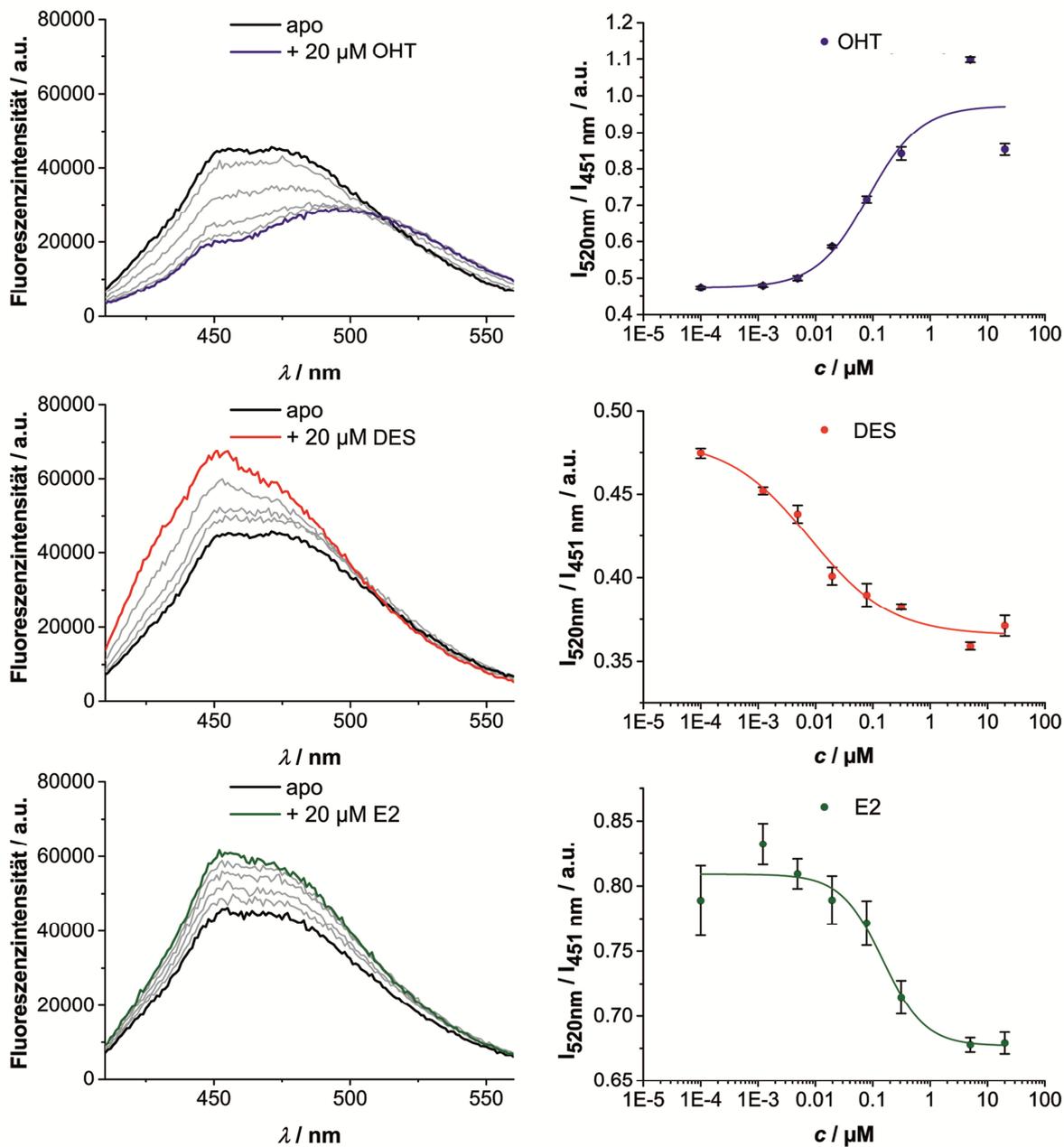


Abbildung 3.7.14 Für OHT, DES und E2 ermittelte Emissionsspektren und Dosis-Wirkungskurven mit dem Acrylodan-markierten hER β LBD-Konstrukt FLiN 7 unter Verwendung des FLiN-Puffers 2 ohne Zusatz eines Reduktionsmittels.

3.7.2 Auswahl eines alternativen Fluorophors

Das Absorptionsmaximum von Acrylodan im Bereich von 386 nm stellt, wie bereits erwähnt, einen Nachteil für den Einsatz in fluoreszenzbasierten Assay-Systemen in einem Hochdurchsatz-Screening dar. Eine Reihe typischer Wirkstoffklassen verfügt über planare Ringstrukturen mit mehreren konjugierten aromatischen Systemen, die oft bei kleineren Wellenlängen (350–450 nm) absorbieren. Durch eine starke Eigenfluoreszenz der Verbindungen, kann es sowohl zu FRET-Effekten zwischen der Testverbindung und dem eingesetzten Fluorophor, als auch zur Überlagerung des Assay-Signals kommen. Dies kann zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen und die Analyse bestimmter Verbindungsklassen mit dem Assay-System beeinträchtigen. Da nur sehr wenige niedermolekulare organische Verbindungen über eine intrinsische Fluoreszenz im Bereich um/über 600 nm verfügen, bietet sich die Verwendung von *near-infrared* (NIR) Fluoreszenz in bioanalytischen Testsystemen, wie Hochdurchsatz-Assays, an. Fluorophore, die im roten Bereich des Lichts absorbieren, besitzen weitere günstige Eigenschaften, wie ein stark reduziertes Hintergrundsignal, welches bei niedrigeren Anregungswellenlängen im Wesentlichen durch elastische Streuung (Rayleigh Streuung), inelastische Streuung (Raman Streuung) sowie Fluoreszenz durch Verunreinigungen, wie Staubpartikel, verursacht wird. Es existieren jedoch nur wenige Fluorophore der NIR-Region, die in wässrigen Lösungen eine gute Quantenausbeute besitzen und an Biomoleküle, wie Proteine, konjugiert werden können. Eine Gruppe dieser Fluorophore sind Cyanin-Farbstoffe, zu denen auch DY-647 gehört.

Um verschiedene Fluorophore auf ihre Eignung im FLiN-Assay zu testen, wurde das zuvor ausgewählte Konstrukt hER β LBD-FLiN 7 mit den Fluorophoren PyMPO, Atto 565, Atto 610, Texas Red und DY-647 markiert und Fluoreszenzspektren nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen aller Testverbindungen aufgenommen. Die jeweiligen Resultate für die Verbindungen DES und OHT, als Beispiel für unterschiedliche Konformationen des Rezeptors, sind in Abbildung 3.7.15 und Abbildung 3.7.16 dargestellt. Die Ergebnisse aller Experimente sind im Anhang zu finden (siehe Abbildung 10.5.1 bis Abbildung 10.5.5). Mit keinem der Fluorophore konnte ein Hintergrundsignal durch Eigenfluoreszenz des Puffers oder der Testverbindungen detektiert werden, weshalb eine Korrektur der Daten nicht notwendig war.

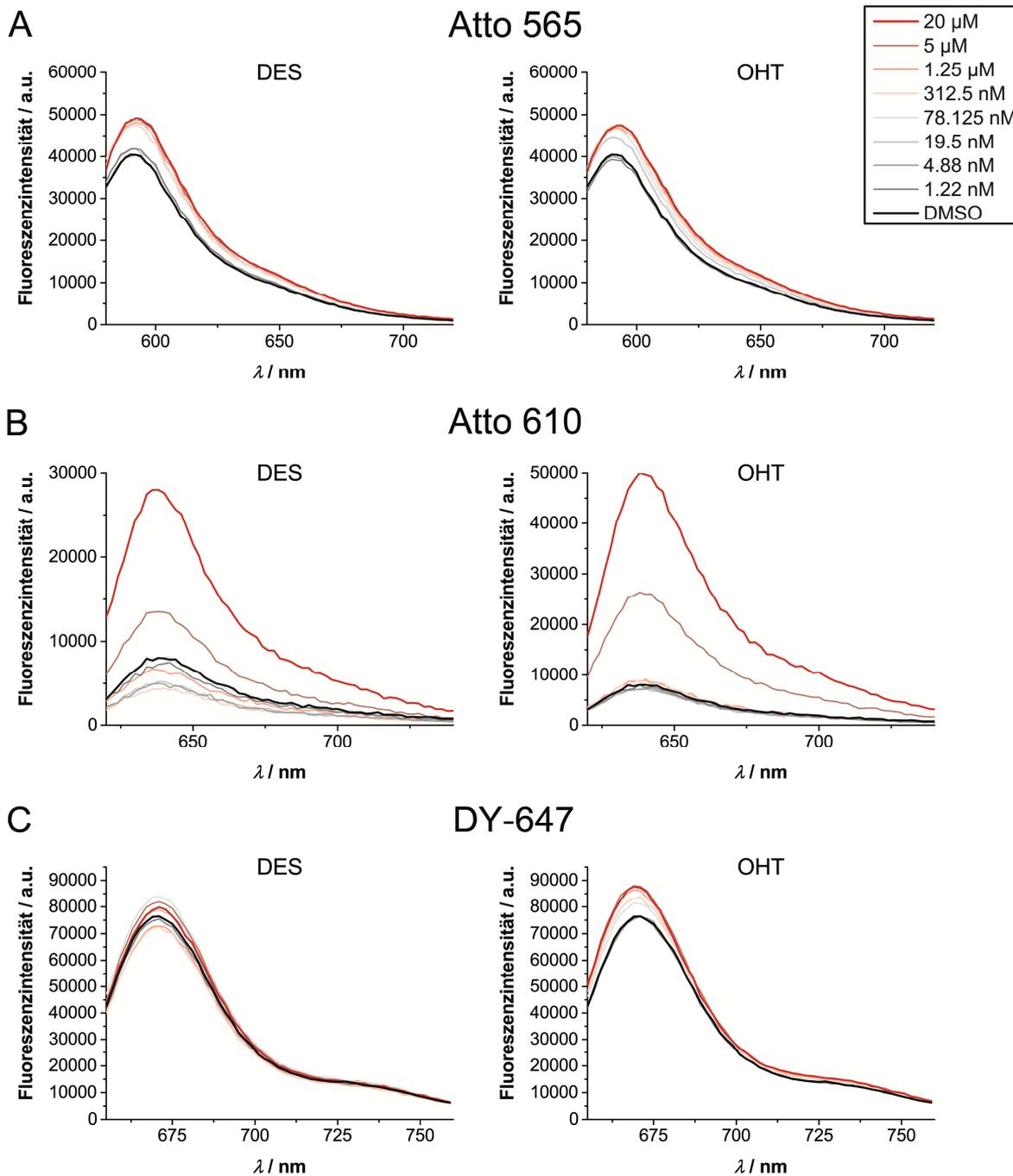


Abbildung 3.7.15 Test alternativer Fluorophore für den Einsatz im FLiN-Assay. Gezeigt sind Fluoreszenzspektren von hERβ LBD-FLiN 7, markiert mit **A)** Atto 565 ($\lambda_{ex} = 559$ nm), **B)** Atto 610 ($\lambda_{ex} = 606$ nm) und **C)** DY-647 ($\lambda_{ex} = 640$ nm), nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen des ER-Agonisten Diethylstilbestrol oder des SERM 4-Hydroxytamoxifen.

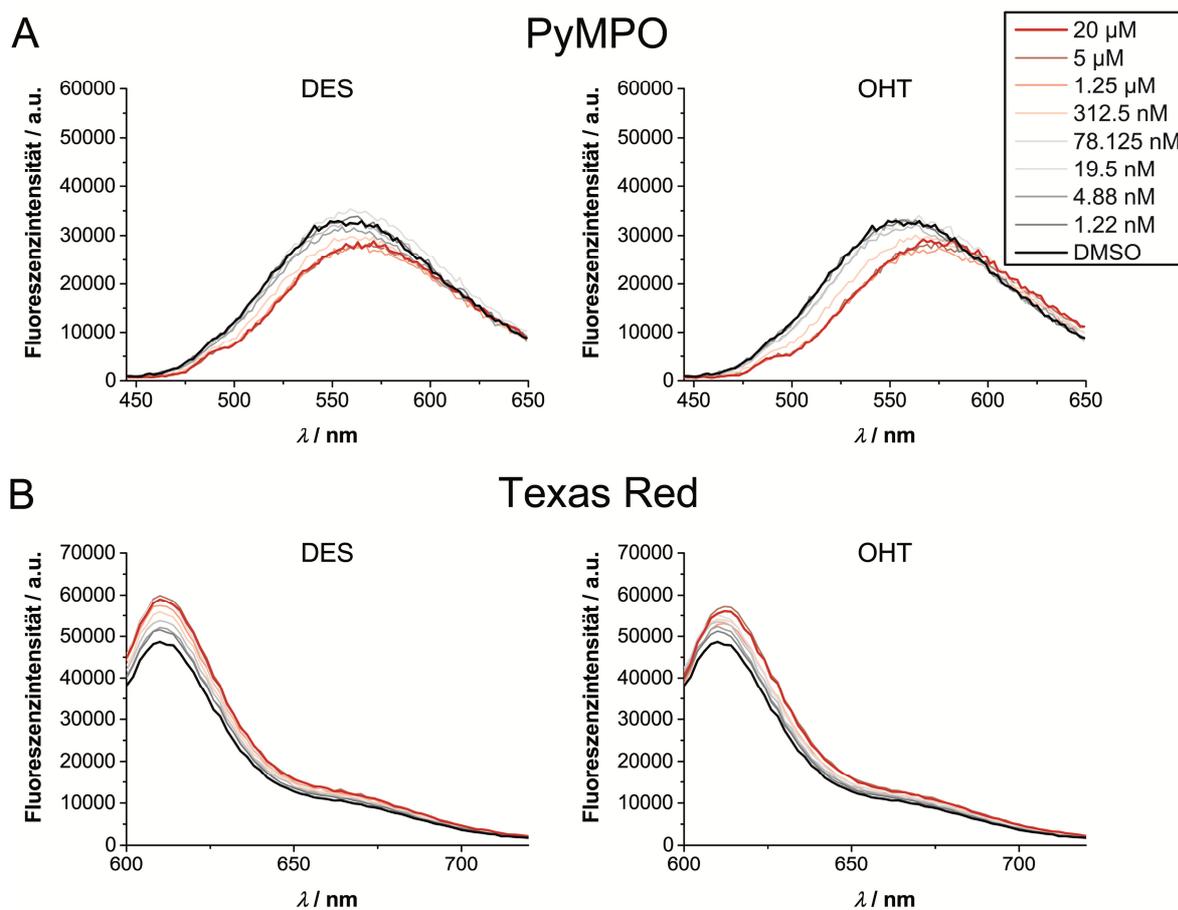


Abbildung 3.7.16 Test alternativer Fluorophore für den Einsatz im FLiN-Assay. Gezeigt sind Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 7, markiert mit **A**) PyMPO ($\lambda_{\text{ex}} = 419 \text{ nm}$) und **B**) Texas Red ($\lambda_{\text{ex}} = 586 \text{ nm}$), nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen des ER-Agonisten Diethylstilbestrol oder des SERM 4-Hydroxytamoxifen.

Die verschiedenen Fluorophore zeigten eine unterschiedliche Reaktion in den FLiN-Experimenten. Während für Atto 565 und Texas Red bei Zugabe aller Testverbindungen eine geringe bathochrome Verschiebung um 2 nm beziehungsweise 4 nm beobachtet werden konnte, wurde für DY-647 nur bei Zugabe von OHT eine hypsochrome Verschiebung um 4 nm und damit ein positiver Solvatochromismus beobachtet. Atto 610 reagierte bei Zugabe von E2, DES und OHT mit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. PyMPO, das wie Acrylodan über ein starkes Dipolmoment verfügt und damit potentiell gut für die Detektion von Konformationsänderungen geeignet ist, reagierte mit einer bathochromen Verschiebung um 10–20 nm sowie Änderungen der Intensität auf die verschiedenen Testverbindungen. Zur Quantifizierung der Verschiebung der Emissionsspektren, wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten am Maximum zur Wellenlänge bei halb-maximaler Intensität, oder das Verhältnis bei den Wellenlängen halb-maximaler Intensität rechts und links des Maximums berechnet.

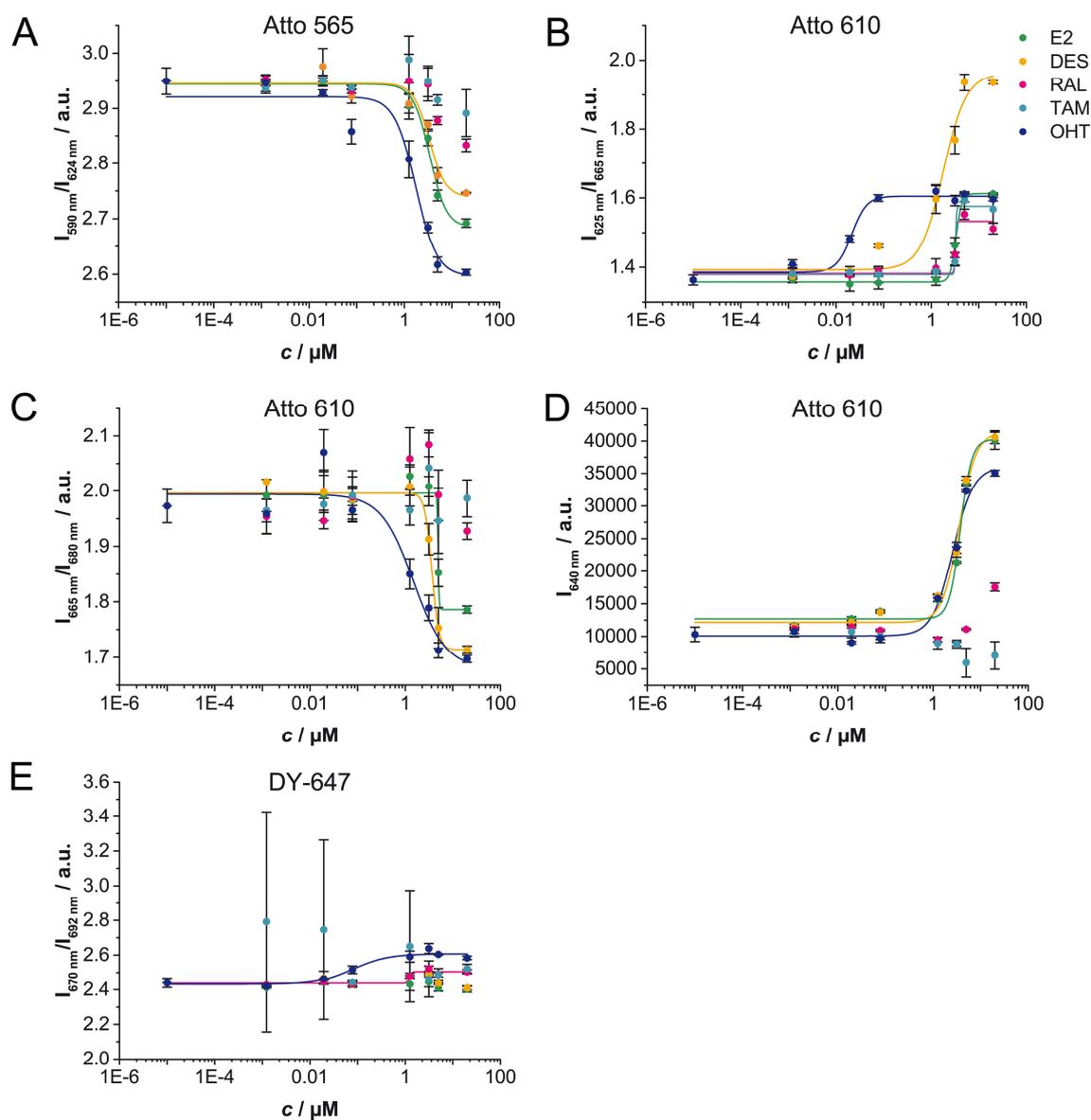


Abbildung 3.7.17 Dosis-Wirkungs-Kurven, aufgenommen mit hER β LBD-FLiN 7, markiert mit den Fluorophoren: **A)** Atto 565, Signal: $I_{590\text{ nm}}/I_{624\text{ nm}}$; **B)** Atto 610, Signal: $I_{625\text{ nm}}/I_{665\text{ nm}}$; **C)** Atto 610, Signal: $I_{665\text{ nm}}/I_{680\text{ nm}}$; **D)** Atto 610, Signal: $I_{640\text{ nm}}$; **E)** DY-647, Signal: $I_{670\text{ nm}}/I_{692\text{ nm}}$.

Durch Auftragung des Signals wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erhalten (Abbildung 3.7.17 und Abbildung 3.7.18), aus denen die Bindungsaffinitäten und der Z' -Faktor bestimmt wurden (Tabelle 3.7.4). Im Gegensatz zum zuvor verwendeten Fluorophor Acrylodan, war es mit keinem der Fluorophore möglich, mit Hilfe des ausgelesenen Signals eine einfach zu interpretierende Aussage über den Bindungsmodus der Liganden zu treffen.

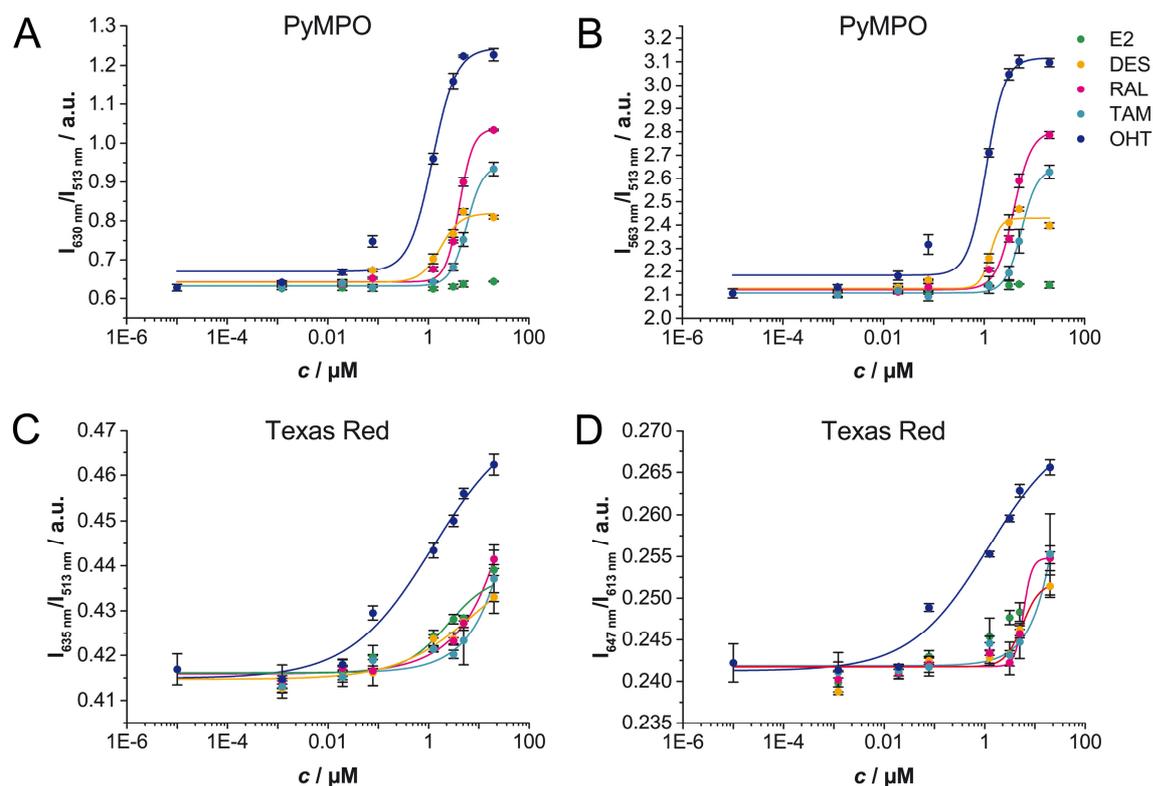


Abbildung 3.7.18 Dosis-Wirkungs-Kurven, aufgenommen mit hER β LBD-FLiN 7, markiert mit den Fluorophoren: **A)** PyMPO, Signal: $I_{630\text{ nm}}/I_{513\text{ nm}}$; **B)** PyMPO, Signal: $I_{563\text{ nm}}/I_{513\text{ nm}}$; **C)** Texas Red, Signal: $I_{635\text{ nm}}/I_{513\text{ nm}}$; **D)** Texas Red, Signal: $I_{647\text{ nm}}/I_{613\text{ nm}}$.

Bis auf PyMPO besitzen die getesteten Fluorophore kein ausgeprägtes Dipolmoment, wodurch die geringen Änderungen ihres Emissionsspektrums erklärt werden können. Diese Fluorophore besitzen durch ihre Absorptions- und Emissionswellenlängen günstige Eigenschaften für den Einsatz in einem Hochdurchsatz-Screening. Aufgrund der sehr schwachen Reaktion auf die Polarität ihrer Umgebung, waren sie aber nicht in der Lage, die verschiedenen Konformationen des ER abzubilden. PyMPO reagierte, wie erwartet, mit unterschiedlichen Änderungen des Emissionsspektrums auf die verschiedenen Testverbindungen. Aufgrund der Form des Emissionsspektrums, konnten sich diese Änderungen aber nicht, wie bei Acrylodan, über ein Signal quantifizieren lassen, das zusätzlich in der Lage ist, die Konformationen zu unterscheiden. Das Absorptionsmaximum von PyMPO liegt mit 419 nm nur 33 nm über dem von Acrylodan und damit noch in einem Bereich, in dem auch niedermolekulare organische Verbindungen absorbieren. Damit stellte die Verwendung von PyMPO keinen Vorteil im Assay dar. Acrylodan konnte somit als für den FLiN-Assay am besten geeigneter Fluorophor bestätigt werden.

Tabelle 3.7.4 Übersicht der Ergebnisse für hER LBD-FLiN 7, markiert mit verschiedenen Fluorophoren.

Fluorophor	λ_{ex}	Änderung Fluoreszenzspektrum	Z'				K_d / nM			
			Signal	DES	OHT	E2 ^A	DES ^A	RAL ^A	TAM ^A	OHT ^A
Atto 565	559 nm	2 nm rot-Verschiebung	$I_{590 \text{ nm}}/I_{624 \text{ nm}}$	0.63	0.64	2007	887	4329	-	395
Atto 610	606 nm	Intensitätszunahme	$I_{625 \text{ nm}}/I_{665 \text{ nm}}$	0.82	0.69	1417	439	1297	1935	19
			$I_{665 \text{ nm}}/I_{680 \text{ nm}}$	0.88	0.88	4594	1954	-	-	373
			$I_{640 \text{ nm}}$	0.63	0.81	2740	1652	-	-	917
DY-647	640 nm	2 nm blau-Verschiebung (Antagonisten)	$I_{670 \text{ nm}}/I_{692 \text{ nm}}$	< 0	0.25	-	-	262	-	75
PyMPO	419 nm	10–20 nm rot-Verschiebung	$I_{630 \text{ nm}}/I_{513 \text{ nm}}$	0.69	0.85	-	418	2855	6109	268
			$I_{563 \text{ nm}}/I_{513 \text{ nm}}$	0.93	0.94	-	361	2256	5811	228
Texas Red	586 nm	4 nm rot-Verschiebung (Antagonisten)	$I_{635 \text{ nm}}/I_{613 \text{ nm}}$	0.18	0.52	129	564	529	157	203
			$I_{647 \text{ nm}}/I_{613 \text{ nm}}$	< 0	0.90	977	1293	7550	9191	209

^A Farbcodierung: Z' aus Dosis-Wirkungskurven (aus Signal bei 1 % DMSO und 20 μM Ligand; je 3 Messpunkte) **rot**: < 0.25, grau: 0.25–0.5, schwarz: > 0.5

3.8 Assay Validierung

Das mit Acrylodan markierte hER β LBD-FLiN 7 Konstrukt war nach der Optimierung der Pufferbedingungen in der Lage, alle Testverbindungen mit einer guten Signalqualität zu detektieren. Der FLiN-Assay war außerdem in der Lage, über das detektierte Signal die Testverbindungen, basierend auf der von ihnen stabilisierten aktiven oder inaktiven Konformation der LBD, zu unterscheiden. Die Möglichkeit, verschiedene Konformationen des Rezeptors zu differenzieren, unterscheidet den FLiN-Assay von anderen *in vitro* Assay-Systemen für den ER.

Die mit FLiN ermittelten K_d -Werte waren über drei individuelle Proteinpräparationen, mit jeweils unabhängiger Proteinexpression, Aufreinigung und Markierung des Konstrukts, konsistent. Außerdem konnte kein negativer Einfluss des His₆-Affinitäts-Tags auf den FLiN-Assay beobachtet werden. Die für die Testverbindungen gemessenen Bindungsaffinitäten und Z' -Faktoren, lagen für das Konstrukt-FLiN 7 mit und ohne His₆-Affinitäts-Tag im gleichen Bereich. Die Ergebnisse der FLiN-Experimente für die Testverbindungen sind in Tabelle 3.8.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.8.1 Übersicht der mittels FLiN bestimmten Bindungsaffinitäten. Gezeigt sind die, mit dem Konstrukt hER β LBD-FLiN 7-Acrylodan (mit sowie ohne His₆-Tag), ermittelten K_d -Werte ($I_{520\text{ nm}}/I_{451\text{ nm}}$).

FLiN 7	$K_d(\text{E2})$	$K_d(\text{DES})$	$K_d(\text{RAL})$	$K_d(\text{TAM})$	$K_d(\text{OHT})$	$Z'(\text{DES})^B$	$Z'(\text{OHT})^B$
+ His ₆	88 ± 22 nM ^A	15 ± 5 nM ^A	1.3 ± 0.7 μM ^A	3.5 ± 2 μM ^A	474 ± 310 nM ^A	0.75 ± 0.05 ^B	0.81 ± 0.09 ^B
- His ₆	112 nM	13 nM	1.25 μM	1.22 μM	502 nM	0.73	0.82

^A (n = 4); ^B (n = 5).

Da konventionelle *in vitro* Assay-Systeme zur Charakterisierung der Ligandenbindung an den ER auf Konkurrenzexperimenten mit einem radioaktiv- oder fluoreszent-markierten Liganden beruhen, wurden bisher keine K_d -Daten für die Testverbindungen DES, RAL, TAM und OHT publiziert, mit denen die FLiN-Ergebnisse verglichen werden können. Lediglich für die Bindung von radioaktiv-markiertem E2 an hER β wurden K_d -Werte im Bereich von 0.4 nM bis 2 nM publiziert.^[43, 122] In Untersuchungen mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie), wurden für die Bindung an die hER α LBD K_d -Werte von 0.009 nM für DES, 220 nM für TAM und 18 nM für OHT bestimmt.^[123] Die mit FLiN ermittelten K_d -Werte lagen damit deutlich höher, spiegelten aber den gleichen Trend in den Affinitäten der verschiedenen Verbindungen wider. Zur genaueren Validierung der FLiN-

Daten, wurden diese im Folgenden mit den Ergebnissen eines orthogonalen Assay-Systems, das auf der Verdrängung eines fluoreszenten ER-Liganden durch die Testverbindungen basiert, verglichen (siehe Abschnitt 3.8.1).

Außerdem wurde überprüft, ob der FLiN-Assay in der Lage ist, weitere Verbindungen (neben den zur Etablierung des Assays eingesetzten Testverbindungen) zu detektieren. Dazu wurde mit den zuvor festgelegten FLiN-Bedingungen die Bindung des „vollen“ Rezeptorantagonisten Fulvestrant (FUL) untersucht (Abbildung 3.8.1). Dieser Antagonist verfügt über eine lange Seitenkette, die aus der Ligandenbindungstasche herausragt und ein Abknicken der H12 verhindert. Daher sollte für die Bindung von FUL eine ähnliche Signaländerung wie für die Bindung von OHT beobachtet werden. Die Zugabe steigender Konzentrationen an FUL führte, wie erwartet, zu einer bathochromen Verschiebung des Emissionsspektrums. Bei Auftragung des Signals ($I_{520\text{ nm}}/I_{451\text{ nm}}$) gegen die Ligandenkonzentration, konnte der, für Verbindungen die eine inaktive Konformation der LBD stabilisieren, charakteristische Anstieg des Assay-Signals beobachtet werden. Aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf wurde der K_d von FUL zu $269 \pm 46\text{ nM}$ bestimmt. Auch für FUL wurden bisher keine K_d -Werte in der Literatur beschrieben. Der IC_{50} für die Bindung von FUL an hER β wt Volllänge liegt bei etwa 7.0–44.1 nM und damit etwas niedriger, als der mit FLiN ermittelte K_d .^[124]

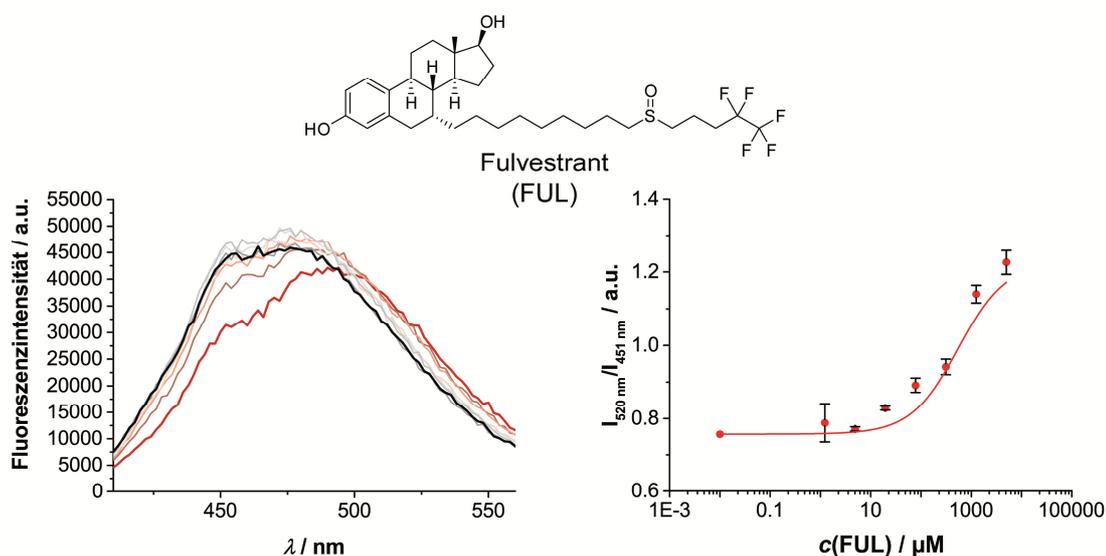


Abbildung 3.8.1 Untersuchung der Bindung von FUL mit dem FLiN-Assay. Steigende Konzentrationen an FUL führten zu einer bathochromen Verschiebung des Emissionsspektrums (links). Dosis-Wirkungs-Kurve für die Bindung von FUL (rechts).

3.8.1 Kompetitiver Bindungsassay PolarScreen™

Der PolarScreen™-Assay diente als orthogonales System zur Überprüfung der Ergebnisse des FLiN-Assays. Außerdem wurde mit Hilfe des PolarScreen™-Assays der Einfluss der Mutationen auf die Aktivität der hER β LBD-Konstrukte untersucht. Der kompetitive Bindungsassay nutzt ein fluoreszent markiertes *Tracer*-Molekül, das in die Bindungstasche der LBD bindet und durch konkurrierende Liganden verdrängt werden kann. Die Freisetzung des *Tracers* wird durch Messung seiner Polarisation (P) detektiert, wobei der dabei ermittelte IC_{50} -Wert der Konzentration des konkurrierenden Liganden entspricht, bei der 50 % der spezifisch gebundenen *Tracer*-Moleküle verdrängt werden (Abbildung 3.8.2).

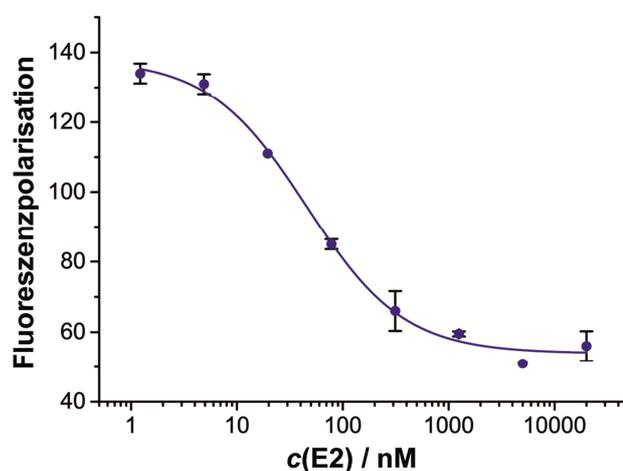


Abbildung 3.8.2 Beispielhafte Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung des IC_{50} -Werts von E2 bei der Bindung an hER β LBD-FLiN 7 mit dem PolarScreen™-Assay. Die gemessene Polarisation des *Tracers* ist gegen die logarithmische Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Ligandenkonzentration am Wendepunkt des sigmoidalen Kurvenverlaufs entspricht dem IC_{50} .

Alle aufgereinigten hER β LBD-Konstrukte waren in der Lage, den *Tracer* zu binden. Sie besaßen jedoch, je nach Konstrukt, eine fünf- bis zehnfach geringere Affinität zum *Tracer*-Molekül, als der Wildtyp Volllänge-Rezeptor (siehe auch Tabelle 8.5.1, Seite 131). Dies deutet auf eine verringerte Anzahl „aktiver“, für die Ligandenbindung zugänglicher, LBD-Moleküle in der Proteinpräparation im Vergleich zur Gesamtproteinmenge hin. Solche Schwankungen der Rezeptoraktivität, die durch verschiedene Proteinpräparationen sowie unterschiedliche Mutanten entstehen, sind für rekombinante ER-Konstrukte bekannt.^[125] Für den Einsatz im PolarScreen™-Assay sowie im FLiN-Assay hat dies keinen nachteiligen Effekt. Die Bindung der Testverbindungen an alle aufgereinigten LBD-Konstrukte konnte über die Messung einer Dosis-Wirkungskurve, bei der die Verdrängung des *Tracers* bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen gemessen wurde, bestätigt werden (Tabelle 3.8.2). Alle Konstrukte waren in

der Lage, die Testverbindungen zu binden, wobei in einigen Fällen, aufgrund größerer Abweichungen der Messwerte, kein IC_{50} -Wert berechnet wurde (die initialen Messungen mit allen Konstrukten wurden nur einmal in einer Zweipunkt-Bestimmung durchgeführt).

Tabelle 3.8.2 Übersicht der mit dem PolarScreenTM-Assay bestimmten IC_{50} -Werte sowie Literaturdaten.

hER β -Konstrukt	IC_{50} / nM				
	E2	DES	RAL	TAM	OHT
Volllänge wt^A	18 ± 2	15 ± 0	73 ± 23	132 ± 94	18 ± 2
LBD wt^B	45 ± 22	33 ± 19	72 ± 48	392 ± 98	64 ± 6
LBD-FLiN 7^B	51 ± 7	34 ± 13	157 ± 72	180 ± 94	127 ± 74
LBD-FLiN 1^C	957	916	497	3236	220
LBD-FLiN 2^C	2811	- ^D	- ^D	2543	2034
LBD-FLiN 3^C	1785	949	506	3905	3260
LBD-FLiN 4^C	- ^D	440	214	- ^D	- ^D
LBD-FLiN 5^C	447	60	653	- ^D	880
LBD-FLiN 6^C	- ^D	257	981	1801	351
LBD-FLiN 8^C	81	324	325	500	327
Literaturwerte für hERβ	0.12–16.7 ^[43, 122b, 124a, 126]	0.05–3.5 ^[43, 122b, 126a]	4.3–44 ^[126-127]	0.5–206 ^[43, 122b, 126a, 127]	0.04–26 ^[43, 122b, 128]

Die angegebenen Mittelwerte wurden aus ^A zwei oder ^B drei unabhängigen Experimenten, mit jeweils durchgeführten zweifach-Bestimmungen berechnet.

^C Experimente wurden einmal als zweifach-Bestimmung durchgeführt.

^D Die Bindung wurde detektiert; der IC_{50} wurde aufgrund einer zu großen Standardabweichung in der zweifach-Bestimmung nicht berechnet.

Das letztlich im FLiN-Assay eingesetzte LBD-Konstrukt FLiN 7 wurde mit dem PolarScreenTM-Assay genauer charakterisiert und die Ergebnisse mit denen der Wildtyp hER β LBD sowie des Wildtyp hER β Volllänge und Literaturdaten verglichen (Tabelle 3.8.2). Dabei wurden für die isolierten LBDs im Vergleich zum Volllänge-Rezeptor etwas höhere IC_{50} -Werte ermittelt. Für den Volllänge-Rezeptor ermittelte IC_{50} -Werte lagen in etwa im Bereich bisher publizierter relativer Bindungsaffinitäten für hER β . Die in der Literatur beschriebenen IC_{50} -Werte weichen jedoch teilweise deutlich voneinander ab, was vermutlich auf den Einsatz verschiedenster Assay-Systeme und Protein-Konstrukte zurückgeführt werden kann.

Generell besaßen die isolierten LBDs eine geringere Affinität zu den Testverbindungen als der Volllänge-Rezeptor. Zwischen der Wildtyp LBD und dem Konstrukt FLiN 7 konnten hingegen keine signifikanten Abweichungen in den IC_{50} -Werten gemessen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die in dieses FLiN-Konstrukt eingeführten Mutationen keinen störenden Effekt auf die Bindung der Testverbindungen ausüben. Die für den Volllänge-Rezeptor sowie die LBDs ermittelten IC_{50} -Werte lagen im nanomolaren Bereich und spiegelten den generell in der Literatur beschriebenen Affinitäts-Trend wider.

Ein direkter Vergleich der IC_{50} -Werte mit den K_d -Werten des FLiN-Assays ist nicht möglich, da der IC_{50} im Gegensatz zum K_d kein direktes Maß für die Affinität eines Liganden darstellt. Trotzdem sind die, für das Konstrukt FLiN 7 sowie die Wildtyp LBD ermittelten, IC_{50} -Werte ein Anhaltspunkt für die Beurteilung der FLiN-Daten. Die mit dem FLiN-Assay ermittelten K_d -Werte von 88 ± 22 nM für E2, 15 ± 5 nM für DES, 1.3 ± 0.7 μ M für RAL, 3.5 ± 2 μ M für TAM und 474 ± 310 nM für OHT, lagen deutlich über den mit dem selben Konstrukt gemessenen IC_{50} -Werten, folgten aber dem allgemeinen Affinitäts-Trend. Unterschiede in den ermittelten Affinitäten können durch die Verwendung eines anderen Assay-Systems verursacht werden, liegen aber auch in der Auswahl des für den FLiN-Assay gewählten Signals begründet. Wie in Abschnitt 3.7.1 dargelegt, wurde bei der Auswahl des ausgelesenen FLiN-Signals ein Kompromiss gewählt, bei dem die stabile Detektion und Differenzierung der verschiedenen Konformationen der H12 im Vordergrund stand. Aufgrund der unterschiedlichen Änderungen im Emissionsspektrum bei der Bindung verschiedener Liganden, konnte nicht für jeden Liganden eine optimale Bestimmung der genauen Bindungsaffinität über ein Signal erfolgen. Bei Messungen im Küvettenformat, die individuell analysiert wurden, konnten auch mit FLiN K_d -Werte für OHT und DES erhalten werden, die im Bereich der ermittelten IC_{50} -Werte lagen (siehe Abschnitt 3.9).

Damit konnte der FLiN-Assay als hochdurchsatzfähiges Testsystem validiert werden. Der Assay ist in der Lage, die von den Liganden stabilisierte aktive oder inaktive Konformation der LBD zu unterscheiden und liefert einen Anhaltspunkt für die Bindungsaffinität der so gefundenen Liganden. Für eine genauere Untersuchung der Bindungsaffinitäten sollten die in einem Screening identifizierten und validierten Liganden zusätzlich durch FLiN-Messungen im Küvettenformat sowie einem orthogonalen Assay, wie dem hier verwendeten PolarScreen™-Assay, analysiert werden.

3.8.2 Untersuchung der Signal-Stabilität

Zur Untersuchung der Langzeit-Stabilität des FLiN-Assays, wurde das FLiN Konstrukt 7 in einer Mikrotiterplatte mit Verdünnungsreihen der Testverbindungen DES und OHT versetzt und das Assay-Signal nach unterschiedlichen Inkubationszeiten ausgelesen. Um *Photobleaching*- und Verdunstungs-Effekte zu minimieren, erfolgte die Inkubation der Mikrotiterplatte zwischen den einzelnen Messungen im Dunkeln bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer. Aus den erhaltenen Daten wurden jeweils der K_d sowie Z' bestimmt (Tabelle 3.8.3).

Dabei war die standardmäßig für den FLiN-Assay gewählte Inkubationszeit von 30 min ausreichend, um einen Gleichgewichtszustand bei der Ligandenbindung zu erreichen. Längere Inkubationszeiten hatten keinen Effekt auf die bestimmten K_d -Werte. Außerdem war das Assay-Signal auch bei längerer Inkubation der Platte stabil. Bis zu einer Inkubationsdauer von 6.5 h konnten keine signifikanten Veränderungen der ermittelten Bindungsaffinitäten sowie der Robustheit der Daten festgestellt werden. Die in diesem Zeitraum beobachteten Abweichungen lagen im Bereich üblicher Schwankungen zwischen einzelnen Messungen. Erst in der letzten Messung nach 21 h, konnte eine Zunahme der Schwankungen des, für die Bindung von DES, detektierten Signals festgestellt werden, wodurch sich der ermittelte Z' auf 0.64 verringerte. Der Z' entsprach damit aber immer noch den Kriterien eines robusten Testsystems. Für OHT konnte kein Einfluss auf die Robustheit der Daten beobachtet werden, der ermittelte K_d lag nach 21 h aber deutlich höher als zu Beginn der Messung. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Assay-Signal über eine sehr gute Stabilität verfügt, womit eine gute Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus unterschiedlichen Experimenten gegeben ist, selbst wenn konstante Inkubationszeiten nicht exakt eingehalten werden können.

Tabelle 3.8.3 Untersuchung der Langzeit-Stabilität des FLiN-Assay-Signals ($I_{520\text{ nm}}/I_{451\text{ nm}}$) mit hER β LBD-FLiN 7 und Markierung mit Acrylodan.

	0.5 h	1.5 h	2.5 h	3.5 h	6.5 h	21 h
K_d(DES)	13 nM	5 nM	5 nM	6 nM	5 nM	11 nM
Z'(DES)	0.73	0.89	0.87	0.86	0.89	0.64
K_d(OHT)	160 nM	164 nM	180 nM	197 nM	195 nM	362 nM
Z'(OHT)	0.85	0.95	0.92	0.94	0.93	0.92

3.9 Kinetische Bindungsstudien

Fluoreszenzbasierte Bindungsassays eignen sich nicht nur zur Messung von Bindungsaffinitäten, sondern konnten in der Vergangenheit auch erfolgreich für die Untersuchung der Bindungskinetik eines Liganden eingesetzt werden.^[101a] Die Assoziations- und Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten (k_{on} und k_{off}) beschreiben die Geschwindigkeit der Bildung und des Zerfalls des Komplexes eines Rezeptors (R) mit einem Liganden (L) (Gleichung 2) und können weiteren Aufschluss über die beobachtete Affinität eines Liganden liefern ($K_d = k_{off}/k_{on}$).



Üblicherweise werden Bindungskinetiken mit Hilfe weiterer Techniken, wie beispielsweise der SPR-Spektroskopie, untersucht, für die spezielle Messinstrumente benötigt werden. Mit Hilfe eines direkten Bindungsassays, können Bindungskinetiken hingegen ohne zusätzlichen experimentellen Aufwand direkt in einer Küvette mit einem Fluoreszenzspektrophotometer ermittelt werden. Dafür werden zeitaufgelöste Messungen der Änderung der Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Wellenlänge bei der Zugabe eines Liganden durchgeführt. Die Voraussetzung für eine solche Messung ist das Auftreten einer deutlichen Änderung der Intensität im gemessenen Emissionsspektrum bei der Ligandenbindung.

Zunächst wurde untersucht, ob der entwickelte FLiN-Assay auch für die Messung von Bindungskinetiken eingesetzt werden kann (Abbildung 3.9.1). Aufgrund der ausgeprägten Änderungen im Emissionsspektrum bei der Zugabe eines Agonisten oder Antagonisten, wurde auch für die kinetischen Studien das mit Acrylodan markierte hER β LBD-FLiN 7 Konstrukt gewählt. Eine steigende Ligandenkonzentration führte bei Messungen im Küvettenformat zu einer ausgeprägten Abnahme der Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{em} = 460$ nm für OHT (beziehungsweise zu einer Zunahme bei $\lambda_{em} = 440$ nm für DES). In einer zeitaufgelösten Messung bei $\lambda_{em} = 460$ nm führte die Zugabe von OHT zu einer langsamen Abnahme der Fluoreszenzintensität, die durch Umlagerung der H12 bei der Bindung des Liganden an den Rezeptor hervorgerufen wird. Dieser Prozess konnte durch die Zugabe eines Überschusses an nicht-markierter Wildtyp hER β LBD vollständig umgekehrt werden. Dies deutet darauf hin, dass sich die H12 nach der Freisetzung des Liganden wieder in den ursprünglichen Gleichgewichtszustand umlagert. Durch die Zugabe eines Überschusses Lysozym als Negativkontrolle zum OHT-LBD-Komplex, konnte keine Freisetzung des Liganden erzielt werden. Dies lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um einen

spezifischen Bindungsprozess handelt. Auch die Zugabe von 1 % DMSO oder Lysozym zum freien Rezeptor, hatten keinen Einfluss auf die gemessene Intensität.

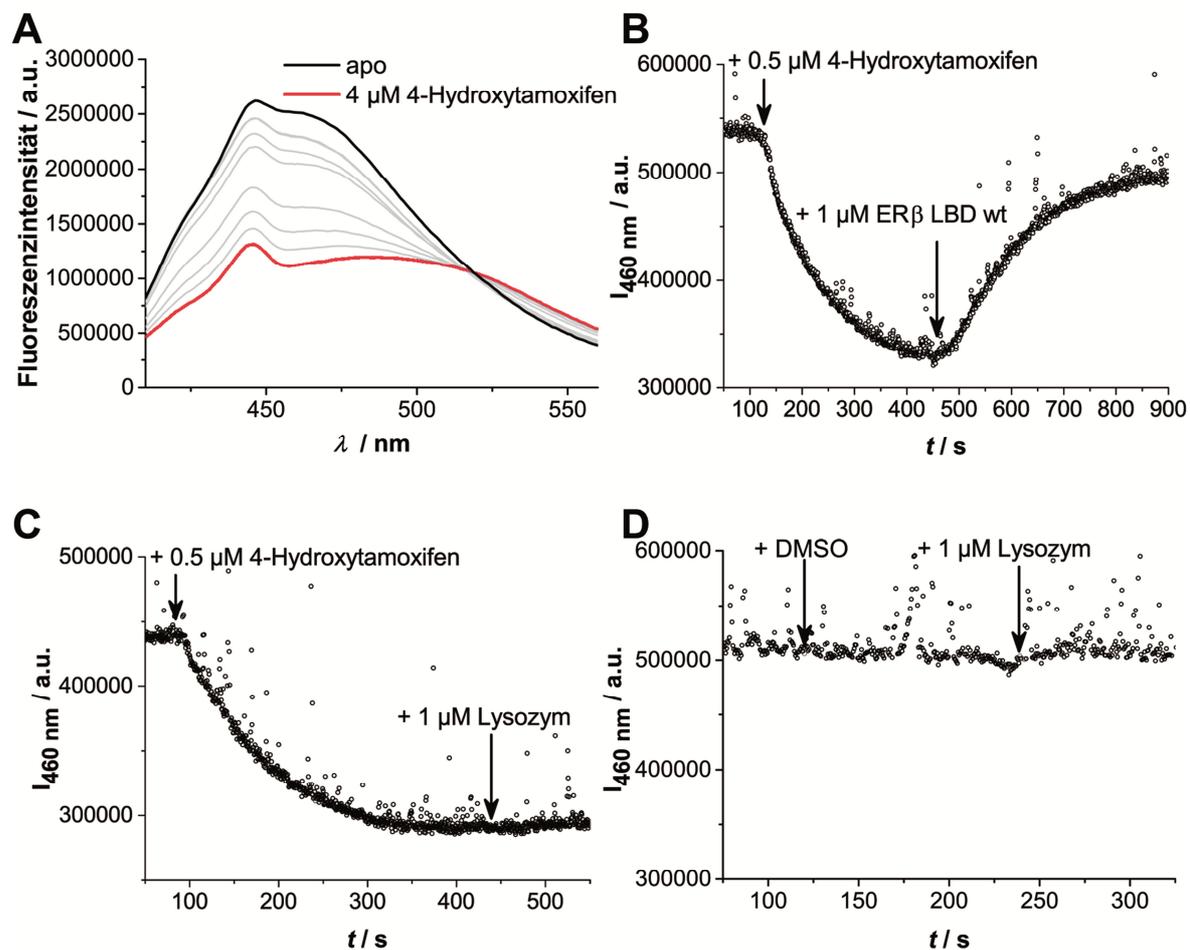


Abbildung 3.9.1. Untersuchung der Assoziation und Dissoziation von Liganden durch zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität von hER β LBD-FLiN 7-Acrylodan im Küvettenformat mit einem Fluoreszenzspektrophotometer. **A)** Die Zugabe steigender Konzentrationen an OHT führte zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 460 nm. **B)** Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{em} = 460$ nm. Bei Zugabe von OHT konnte eine langsame Assoziation an den Rezeptor beobachtet werden, die durch die Zugabe eines Überschusses an unmarkierter hER β LBD wt vollständig umgekehrt werden konnte. **C)** Die Zugabe von Lysozym als Negativkontrolle führte nicht zur Freisetzung des Liganden. **D)** Kontrolleexperiment: Die Zugabe von 1 % DMSO sowie Lysozym hatte keinen Einfluss auf die gemessene Fluoreszenzintensität. Die beobachteten Schwankungen der gemessenen Fluoreszenzintensität in allen zeitaufgelösten Messungen kann auf die Ausbildung kleiner Luftblasen in der Küvette zurückgeführt werden, welche bei der konstanten Durchmischung der Probe mit einem Rührfisch während der Messung auftreten.

Im Folgenden sollten mit den Liganden DES und OHT, die kinetischen Parameter k_{on} und k_{off} für einen typischen Agonisten des ER und einen SERM ermittelt werden. Die Geschwindigkeitskonstanten können über die Messung der Bindungskinetik bei Zugabe unterschiedlicher Ligandenkonzentrationen bestimmt werden. Dazu wird der gemessene Verlauf der Fluoreszenzintensität bei der Zugabe des Liganden an einen exponentiellen

Zerfall erster Ordnung (Gleichung 3) gefittet und so die jeweils beobachtete Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung (k_{obs}) ermittelt.

$$y(t) = y_0 + A \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} \quad (3)$$

y_0 = y-Achsenabschnitt

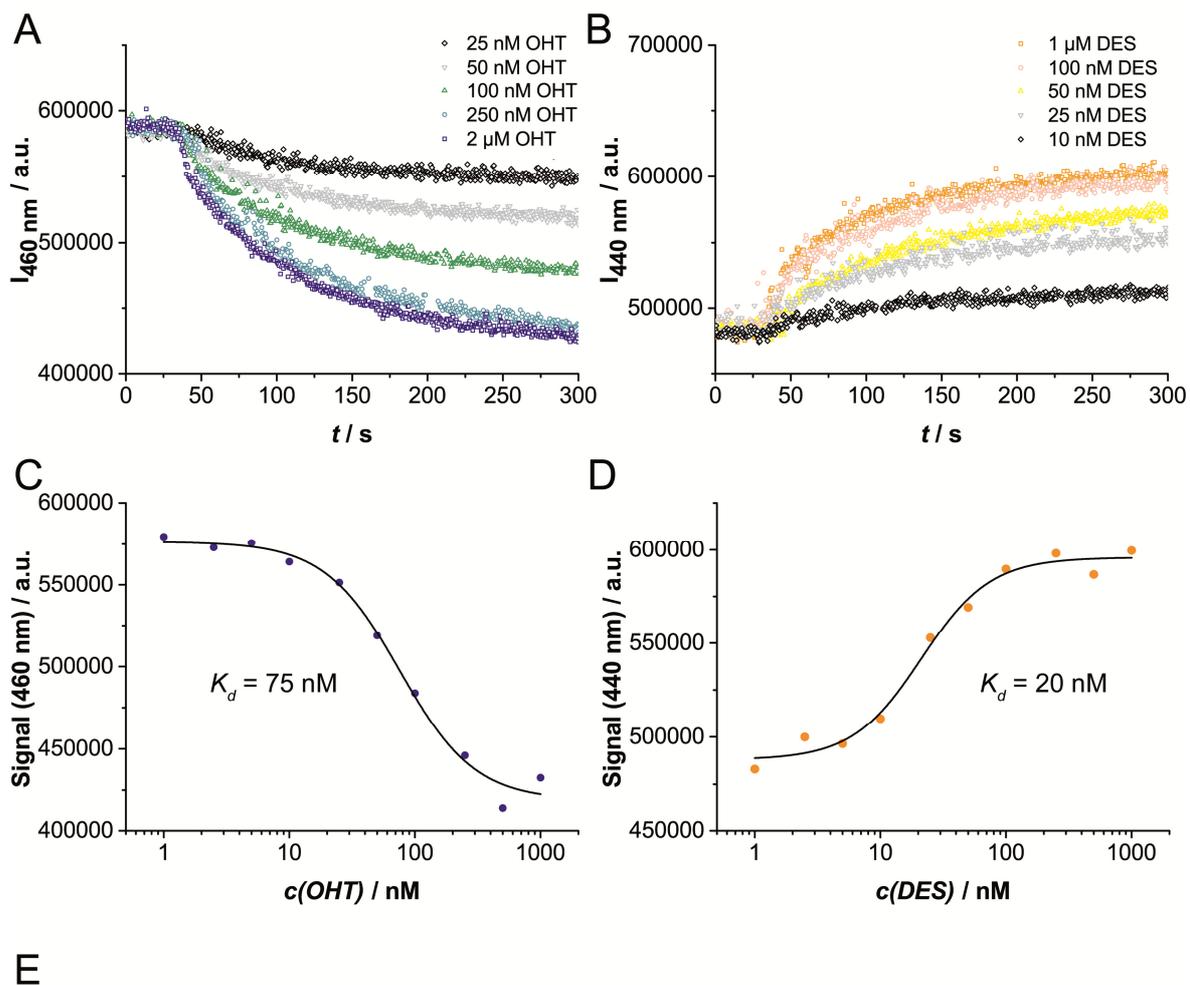
A = Amplitude

t = Zeit (in s)

Durch Auftragung von k_{obs} gegen die Ligandenkonzentration ($[L]$), lässt sich ein Modell für die Ligandenbindung an den Rezeptor ermitteln. Für ein einfaches, statisches Schlüssel-Schloss-Bindungsmodell (siehe Gleichung 2) ist k_{obs} eine lineare Funktion der Ligandenkonzentration, deren Steigung und y-Achsenabschnitt k_{on} und k_{off} entsprechen:^[96b, 129]

$$k_{obs} = k_{off} + k_{on} \cdot [L] \quad (4)$$

Zur kinetischen Charakterisierung der Testverbindungen OHT und DES, wurden Messungen bei einer Proteinkonzentration von 50 nM und Ligandenkonzentrationen von 1 μ M, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM, 5 nM, 2.5 nM und 1 nM durchgeführt (Abbildung 3.9.2-A/-B). Die Kurven zeigten den erwarteten Intensitätsanstieg bei Zugabe von DES und die Abnahme der Intensität bei Zugabe von OHT, wobei für kleine Ligandenkonzentrationen die beobachtete Signaländerung zu gering war, um ausgewertet werden zu können. Es konnte jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit der so ermittelten k_{obs} -Werte beobachtet werden. Diese lagen für alle getesteten Ligandenkonzentrationen bei $0.0135 \pm 0.0010 \text{ s}^{-1}$ für OHT und $0.0144 \pm 0.0022 \text{ s}^{-1}$ für DES (Abbildung 3.9.2-E) und deuten auf eine langsame Assoziation der Verbindungen an den Rezeptor hin. Vergleichbare kinetische Untersuchungen für hER β wurden bisher nicht publiziert. SPR-Analysen mit hER α konnten jedoch bei der Bindung von Rezeptor-Antagonisten eine langsame Assoziation zeigen.^[123] Eine mögliche Erklärung für die beobachtete langsame Bindung, könnte ein mehrstufiger Bindungsprozess sein. Das oben erwähnte statische Modell der Rezeptor-Liganden-Interaktion ist oft nicht ausreichend geeignet, die Prozesse bei der Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor zu beschreiben. Die Mehrzahl aller Bindungsprozesse zwischen einem affinen Liganden und seinem Rezeptor verlaufen über konformationelle Anpassung, vor allem im Bereich der Ligandenbindungstasche, welche kinetisch kontrolliert über einen *induced fit*-Mechanismus oder durch konformationelle Selektion erfolgt.^[96b] Bei FLiN erfolgt die Messung der Bindungskinetik über die Beobachtung der Umlagerung von H12, welche das detektierte Signal verursacht. Die initiale Bindung der Liganden an den ER könnte also durchaus konzentrationsabhängig erfolgen. Der für das gemessene Signal geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist aber die darauf folgende konformationelle Adaption der H12, welcher nur langsam erfolgt. Dieses Modell der konformationellen Selektion bei der Ligandenbindung an den ER konnte auch in früheren Studien bestätigt werden.^[130]



Ligand	Konzentration									
	1 μM	500 nM	250 nM	100 nM	50 nM	25 nM	10 nM	5 nM	2.5 nM	1 nM
OHT ^A	0.01522	0.01214	0.01320	0.01393	0.01289	0.01341	0.01334	- ^B	- ^B	- ^B
DES ^A	0.01851	0.01439	0.01588	0.01530	0.01201	0.01189	0.01355	0.01405	- ^B	- ^B

^A k_{obs} / s^{-1} , ^B kein messbares Signal

Abbildung 3.9.2 Kinetische Charakterisierung von **A)** OHT und **B)** DES im Küvettenformat. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle Messungen dargestellt. Durch Auftragung der Fluoreszenzintensität am Endpunkt der Kinetik-Messungen gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration, konnten K_d -Werte für **C)** OHT und **D)** DES zu 75 nM und 20 nM bestimmt werden. **E)** Übersicht der, aus den Kinetik-Messungen ermittelten, k_{obs} -Werte für verschiedene Ligandenkonzentrationen.

Über das gemessene Signal am Endpunkt der kinetischen Analyse, konnte durch Auftragung gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration der K_d -Wert zu 75 nM für OHT und zu 20 nM für DES ermittelt werden (Abbildung 3.9.2-C/-D). Diese lagen im Bereich der zuvor ermittelten IC_{50} -Werte sowie von Literaturwerten. Der FLiN-Assay reagiert bei Messungen in Küvetten damit sensitiver als im Mikrotiterplattenformat, was durch das individuell angepasste Assay-Signal zu erklären ist. Eine generell höhere Sensitivität bei Messungen in

Küvetten gegenüber Mikrotiterplatten konnte aber auch schon für andere fluoreszenzbasierte direkte Bindungsassays beobachtet werden.^[101b, 101e]

3.10 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, mit dem FLiN-Assay ein hochdurchsatzfähiges Testsystem zu entwickeln, das über einen solvatochromen Fluorophor in der Lage ist, spezifische Konformationsänderungen in der LBD des humanen ER β zu detektieren. Im Gegensatz zu konventionellen hochdurchsatzfähigen *in vitro* Assay-Systemen, eignet sich der FLiN-Assay damit zum Screening nach neuen Rezeptor-Liganden, die eine aktive oder inaktive Konformation des Rezeptors stabilisieren.

Basierend auf Röntgenkristallstrukturen des Rezeptors sowie einer BLAST-Analyse, wurden verschiedene Konstrukte der hER β LBD, die einen Cystein-Rest zur selektiven Markierung mit einem Fluorophor in der Nähe der flexiblen H12 tragen, entworfen und mittels zielgerichteter Mutagenese hergestellt. Diese LBD-Konstrukte wurden heterolog in *E. coli* exprimiert, mittels FPLC aufgereinigt und ihre Aktivität und Faltung mit einem kompetitiven Bindungsassay sowie mittels CD-Spektroskopie überprüft. Alle LBD-Konstrukte wurden mit dem solvatochromen Fluorophor Acrylodan markiert und systematisch auf ihre Eignung als Sensoren für ligandeninduzierte Konformationsänderungen analysiert. Mit hER β LBD-FLiN 5 und -FLiN 7 konnten zwei Konstrukte ermittelt werden, die in der Lage waren, die Testverbindungen mit guter Signalqualität zu detektieren und verschiedene Bindungsmodi über die Änderung des Assay-Signals zu unterscheiden. Zur Optimierung des Assays wurden verschiedene Pufferbedingungen sowie der Einsatz weiterer Fluorophore für das Konstrukt hER β LBD-FLiN 7 getestet. Der resultierende FLiN-Assay besaß eine sehr gute Signalqualität und Reproduzierbarkeit und eignet sich zur Unterscheidung verschiedener Bindungsmodi, zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten sowie für den Einsatz im Hochdurchsatz-Screening. Des Weiteren konnten mit dem hier entwickelten FLiN-System kinetische Bindungsstudien im Küvetten-Format durchgeführt werden.

Subtyp-selektive ER Liganden sind für die Entwicklung neuer Wirkstoffgenerationen mit verbessertem therapeutischen Profil sowie reduzierten Nebenwirkungen von besonderem Interesse. Da derzeit nur wenige Verbindungen mit moderater Subtyp-Selektivität bekannt sind, besteht ein hoher Bedarf an selektiven Liganden. Selektive hER β Agonisten stellen beispielsweise potentielle Wirkstoffkandidaten für die Prävention oder Therapie verschiedener Erkrankungen, wie Prostatakarzinomen im Frühstadium, kolorektalen Karzinomen, Stoffwechselstörungen oder menopausalen Symptomen, dar.^[74, 76-77] Durch den Einsatz des hier entwickelten FLiN-Assays in einem Hochdurchsatz-Screening könnten neue Ligandenstrukturen identifiziert werden, die die aktive oder inaktive Konformationen des ER stabilisieren. Der FLiN-Assay stellt dafür ein besonders einfaches und kostengünstiges System dar, mit dem schnell und gezielt Liganden identifiziert werden können, die als

Startpunkt für die weitere chemische Optimierung zu Wirkstoffkandidaten mit einem gewünschten therapeutischen Effekt dienen. Trotzdem besitzen die Ergebnisse eines biochemischen *in vitro* Assays, wie FLiN, nur eine limitierte Aussagekraft bezüglich der oft komplexen biologischen Effekte eines Liganden, welche von verschiedenen weiteren Faktoren beeinflusst werden. So führt die Stabilisierung verschiedener Konformationen des Rezeptors durch verschiedene Liganden zu einzigartigen Interaktionsprofilen zwischen dem Rezeptor und seinen Koregulatorproteinen. Die unterschiedlichen Expressionsprofile sowie posttranslationalen Modifikationen der Koregulatorproteine und des Rezeptors in verschiedenen Geweben, können an gewebespezifischen, aktivierenden oder deaktivierenden Effekten eines Liganden beteiligt sein. Unterschiede im Aufbau der Promotorregionen sowie zelltypabhängige Chromatin-Strukturen an den verschiedenen Zielgenen, führen außerdem zu genspezifischen Effekten eines Liganden.^[52b] Daher ist es wichtig, die in einem Screening neu identifizierten Liganden, nach einer zusätzlichen biochemischen Validierung mit Hilfe eines orthogonalen Assay-Systems, auch auf ihre Wirkung in biologischen Systemen zu analysieren.

Im Zuge zukünftiger Optimierung und Weiterentwicklung des FLiN-Systems, sollte der Einsatz weiterer alternativer Fluorophore im Assay untersucht werden, da die intrinsische Fluoreszenz bestimmter Verbindungsklassen deren Analyse mittels FLiN beeinträchtigen und zu falsch positiven Ergebnissen führen kann.^[101f] Diese Schwierigkeiten lassen sich durch Verwendung von Fluorophoren mit Absorptionsmaxima über 550–600 nm umgehen, da nur wenige niedermolekulare organische Verbindungen über eine intrinsische Fluoreszenz in diesem Bereich verfügen. Diese Fluorophore besitzen jedoch aufgrund ihres großen delokalisierten π -Elektronensystems meist geringe Quantenausbeuten in wässrigen Pufferlösungen sowie einen sehr schwach ausgeprägten Solvatochromismus. So ist es bisher nicht gelungen, einen für FLiN geeigneten Fluorophor zu identifizieren, der ein Absorptionsmaximum in Bereichen über 550 nm besitzt und mit ausreichender Sensitivität auf die verschiedensten Konformationsänderungen in der LBD reagiert sowie diese differenzieren kann. Um einen möglichst guten Kompromiss aus hoher Anregungswellenlänge und Sensitivität zu erreichen, könnten weitere bekannte solvatochrome Fluorophore, wie beispielsweise Merocyanine oder Oxazin-Derivate, im FLiN-Assay getestet werden.^[131]

Da die meisten Mitglieder der Kernrezeptoren hauptsächlich über die Bindung niedermolekularer Liganden an ihre Ligandenbindungsdomäne und die damit verbundenen Konformationsänderungen in ihrer Aktivität reguliert werden, kann vermutet werden, dass sich das hier für hER β entwickelte FLiN-System auch auf andere Kernrezeptoren übertragen und für die gezielte Suche nach neuen Liganden einsetzen lässt. Insbesondere für die Waisen-

Rezeptoren (*Orphan*-Rezeptoren) wäre die Anwendung der FLiN-Technologie von besonderem Interesse. Die Waisen-Rezeptoren stellen eine Gruppe der Kernrezeptoren dar, die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit zu bekannten Kernrezeptoren identifiziert und kloniert werden konnten, für die aber bisher keine Liganden bekannt sind. Die Identifizierung solcher Liganden bietet ein großes Potential für die Entdeckung und Untersuchung bisher unbekannter regulatorischer Systeme sowie für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten.^[10, 132] Hier sind direkte Bindungs-Assays, wie FLiN, von großem Nutzen, da diese im Gegensatz zu üblichen kompetitiven Assay-Systemen keine bereits bekannten Liganden als Sondenmoleküle benötigen.

4 STRUKTURBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN KINASEN

4.1 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Strukturbiologische Untersuchungen mittels Röntgenkristallographie, ermöglichen die Darstellung einzelner Moleküle, wie DNA oder Proteinen, mit atomarer Auflösung. Die Röntgenkristallographie gibt Einblicke in die Struktur und Funktion von Proteinen und trägt maßgeblich zum Verständnis von Protein-Ligand-Wechselwirkungen bei. Sie legte die Grundlage für das rationale, strukturbasierte Wirkstoffdesign und ist daher eine essentielle Methode in der modernen, zielgerichteten Wirkstoff-Entwicklung.

Um Proteine oder andere Moleküle auf atomarer Ebene darstellen zu können, benötigt man eine Lichtquelle mit einer Wellenlänge in der Größenordnung einzelner Atomabstände. Für zwei Kohlenstoffatome in einer Einfachbindung liegen diese bei etwa 1.5 \AA (0.15 nm) und damit im Größenbereich der Röntgenstrahlung. Die Beugung von Röntgenstrahlung an einem einzelnen Molekül ist jedoch sehr schwach, da ein Großteil der Strahlung vom Molekül zurückgehalten oder in seiner Bahn nicht beeinflusst wird. Aus diesem Grund werden Röntgenstrukturanalysen an Proteinkristallen durchgeführt. Diese bestehen aus einer sich regelmäßig wiederholenden Gitteranordnung von Molekülen mit gleicher Orientierung. Jedes Molekül im Kristall beugt die Röntgenstrahlung in der gleichen Art und Weise, so dass sich die Strahlen zu einem detektierbaren Signal addieren.

Proteinkristalle können durch kontrollierte, langsame Präzipitation aus einer sehr reinen, hoch konzentrierten Proteinlösung unter geeigneten Bedingungen, die die Denaturierung der Proteine verhindern, erhalten werden. Dazu wird ein Tropfen der wässrigen Proteinlösung mit Kristallisationslösung versetzt, welche ein Fällungsmittel enthält. Durch langsames Verdampfen des Wassers aus dem Tropfen, z.B. mit der Dampfdiffusionsmethode, erhöht sich die Konzentration an Protein und Fällungsmittel, wodurch das Protein langsam über seine Löslichkeitsgrenze geführt wird (Abbildung 4.1.1). Ob bei diesem Prozess ein Proteinkristall oder ein amorphes Präzipitat entsteht, wird durch viele Parameter, wie Proteinkonzentration, Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke, bestimmt.

Zur Aufnahme eines Datensatzes für die Röntgenstrukturanalyse, wird ein Proteinkristall in einem monochromatischen Röntgenstrahl rotiert und die gebeugte Röntgenstrahlung mit Hilfe eines Detektors erfasst. Die so generierten Diffraktogramme enthalten ein Beugungsmuster aus regelmäßig angeordneten Reflexen unterschiedlicher Intensität, deren Abstände Informationen über die Symmetrie des Proteinkristalls enthalten. Den Reflexen werden, über die Indizes h , k und l , Koordinaten im reziproken Raum des Diffraktionsmusters

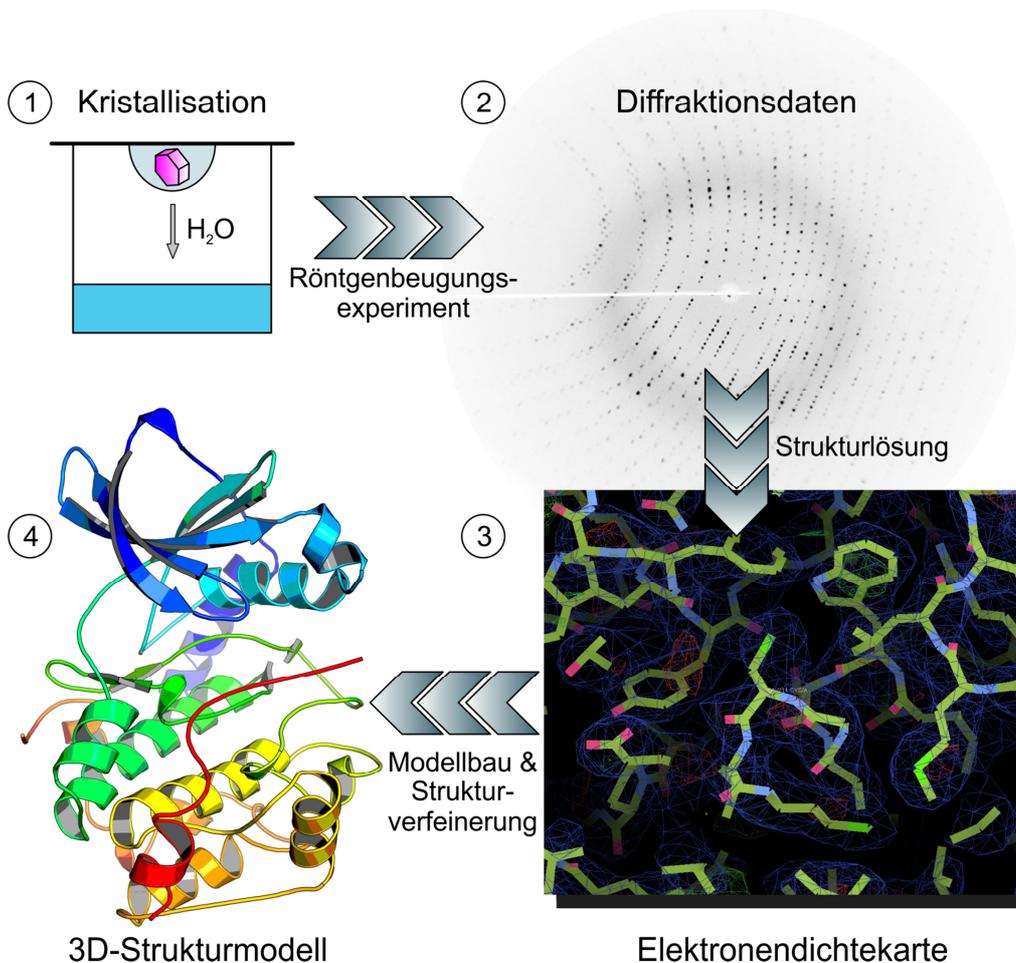


Abbildung 4.1.1 Vom Protein zur Röntgenkristallstruktur: 1.) Aus hochreinen Proteinlösungen können unter geeigneten Bedingungen mit Hilfe der Dampfdiffusionsmethode Proteinkristalle erhalten werden. 2.) In Röntgenbeugungsexperimenten werden Diffraktionsbilder des Proteinkristalls aufgenommen. 3.) Die Diffraktionsdaten werden indiziert, skaliert und integriert. Über indirekte Methoden, wie den molekularen Ersatz, werden die Modellphasen gelöst und eine Elektronendichtekarte des Proteins berechnet. 4.) Durch Einbau der bekannten Aminosäuresequenz in die Elektronendichtekarte und mehrere Verfeinerungsschritte, wird ein finales dreidimensionales Strukturmodell des Proteins erzeugt.

zugeordnet (Indizierung). Gleiche Reflexe auf verschiedenen Diffraktionsbildern werden integriert und die gemessenen Intensitäten skaliert.

Hinter jedem gemessenen Reflex steht ein Strukturfaktor (\vec{F}_{hkl}). Dieser entspricht der Überlagerung vieler individueller Wellen, die jeweils durch Beugung der Strahlung an einem Atom in der Elementarzelle entstehen. Der Zusammenhang zwischen den Diffraktionsdaten und der Elektronendichteverteilung in der Elementarzelle ist durch eine Fourier-Transformation gegeben:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \vec{F}(hkl) \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (5)$$

wobei $\rho(xyz)$ die Elektronendichtverteilung und damit die Form eines Moleküls, in Abhängigkeit der kartesischen Koordinaten x , y und z beschreibt; V ist das Volumen der Elementarzelle. Die Intensität der Reflexe ist proportional zum Betragsquadrat des Strukturfaktors ($I_{hkl} \propto |\vec{F}_{hkl}|^2$), wodurch die Strukturfaktoramplitude bekannt ist, jedoch nicht die Phase. Die Phaseninformation lässt sich nur über indirekte Methoden, wie den molekularen Ersatz (MR), bestimmen. Bei diesem werden vorläufige Phaseninformationen über eine Rotations- und Translationssuche mit Hilfe einer verwandten Struktur als Templat generiert. Aus den so ermittelten Daten kann durch eine Fourier-Transformation eine Elektronendichtekarte berechnet werden, in die, im Zuge der Dateninterpretation, ein dreidimensionales Strukturmodell mit der bekannten Aminosäure-Sequenz des untersuchten Moleküls eingepasst wird. Das Strukturmodell wird schrittweise verfeinert und jeweils zur Berechnung einer neuen Elektronendichtekarte mit verbesserten Modellphasen herangezogen, bis die Qualität des Modells nicht weiter verbessert werden kann. Die Qualität des Strukturmodells kann mit Hilfe verschiedener Parameter beurteilt werden. Der sogenannte R-Wert entspricht der mittleren Abweichung von gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden und sollte im endgültigen Modell nicht höher als etwa 25 % sein. Außerdem sollten die Bindungslängen und Bindungswinkel des Modells innerhalb bekannter Standardwerte liegen.^[133]

4.2 p38 α Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Die p38 α Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) spielt, sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Translations-Ebene, eine Schlüsselrolle in der Regulation der Biosynthese proinflammatorischer Zytokine, wie dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interleukin-1 β (IL-1 β).^[134] Erhöhte TNF- α - und IL-1 β -Spiegel werden mit der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, in Verbindung gebracht.^[135] Die Produktion dieser Zytokine lässt sich mit niedermolekularen p38 α MAPK Inhibitoren effektiv unterdrücken. Daher sind selektive p38 α Inhibitoren von großem Interesse für die Entwicklung neuer Entzündungshemmer. Außerdem wird in aktuellen Studien auch die Rolle von p38 α MAPK bei der Entstehung von Krebserkrankungen, der Angiogenese und der Apoptose untersucht.^[136] In diesem Kontext sind hoch selektive und potente p38 α MAPK Inhibitoren wertvolle Werkzeuge für die Untersuchung der komplexen MAPK-Signalwege. Obwohl mehrere p38 α MAPK Inhibitoren als klinische Kandidaten, hauptsächlich für die Behandlung rheumatoider Arthritis, entwickelt wurden, konnte bisher keine der Verbindungen bis in späte klinische Phasen gebracht werden und eine Marktzulassung erreichen.^[137] Derzeit

befinden sich, mit PH-797804 (Pfizer) zur Behandlung chronisch obstruktiver Lungenkrankung^[138] und BMS-582949 (Bristol-Myers Squibb) zur Behandlung rheumatoider Arthritis,^[139] zwei p38 α MAPK Inhibitoren in klinischen Studien.

Ein Nachteil vieler bekannter p38 α MAPK Inhibitoren stellt ihr ATP-kompetitiver Bindungsmodus dar, der aufgrund der hoch konservierten Struktur der ATP-Bindungs tasche zu einer geringen Selektivität gegenüber anderen Proteinkinasen führt. Aufgrund mangelnder Selektivität eignen sich viele bekannte p38 α MAPK Inhibitoren, wie SB203580 und BIRB796, nicht als Werkzeuge zur Untersuchung der Rolle des MAPK-Signalwegs bei der Entstehung verschiedener Krankheitsprozesse.^[140] Trotz guter *in vitro* Aktivität, besitzen viele p38 α MAPK Inhibitoren oft nur eine geringe Wirksamkeit in physiologisch relevanten Assay-Systemen, wie beispielsweise Vollbluttests, die die Zytokin-Produktion messen.^[141] Zum Erreichen wirksamer Plasmakonzentrationen *in vivo* wird oft eine hohe Dosierung benötigt, wodurch es zu Toxizität aufgrund von *off-target* Effekten kommen kann.^[142] Gründe für die verringerte *in vivo* Wirksamkeit der Inhibitoren können die hohe zelluläre ATP-Konzentration oder das oft sehr hohe Molekulargewicht der Verbindungen (>500 Da) sein.^[143] Diese Probleme unterstreichen den Bedarf an selektiven und potenten p38 α MAPK Inhibitoren für die Entwicklung neuer Wirkstoffe sowie als Werkzeuge für molekularbiologische Untersuchungen.

Ausgehend von einem *in vitro* Screening einer kleinen Bibliothek starrer Inhibitor-Grundgerüste, entwickelte die Arbeitsgruppe um Prof. Stefan Laufer in Tübingen den p38 α MAPK Inhibitor Skepinon-L (Abbildung 4.2.1).^[143b, 144] Skepinon-L basiert auf einem Dibenzoxepinon-Grundgerüst und war der erste ATP-kompetitive niedermolekulare p38 α MAPK Inhibitor, der über eine außerordentlich hohe Selektivität gegenüber anderen Proteinkinasen sowie eine gute *in vivo* Wirksamkeit verfügte. Der Inhibitor nutzt mit dem räumlich weniger anspruchsvollen Thr-Türsteherrest und dem sogenannten Glycin-*flip* in der Scharnierregion zwei strukturelle Eigenheiten der p38 α MAPK aus, um eine hohe Selektivität gegenüber anderen Kinasen zu generieren. Außerdem trägt das starre Inhibitor-Grundgerüst, welches die gegenseitige konformationelle Anpassung von Kinase und Inhibitor (*induced fit*) einschränkt, zu einer verbesserten Selektivität bei.^[143b] Die p38 α MAPK besitzt einen Glycin-Rest (Gly110) innerhalb ihrer Scharnierregion, der aufgrund seiner Flexibilität eine ligandeninduzierte Rotation, den Glycin-*flip*, durchführen kann. Durch diese Umlagerung tauschen der Carbonyl-Sauerstoff und die NH-Gruppe des Glycins ihre Orientierung, wodurch der Inhibitor eine zweite Wasserstoffbrückenbindung zum Proteinrückgrat ausbilden kann (Abbildung 4.2.1). Inhibitoren, die diesen *flip* induzieren, verlieren deutlich an Aktivität, wenn der entsprechende Glycin-Rest gegen ein Aspartat ausgetauscht wird, welches nicht mehr in der Lage ist, den *flip* durchzuführen.^[145] Die Adressierung des Glycin-*flips* kann die

Selektivität eines Inhibitors deutlich erhöhen, da nur 46 der über 500 Proteinkinasen ein Glycin an dieser Position in der Scharnierregion tragen. Von diesen Kinasen verfügen wiederum nur drei über ein Threonin an der Türsteherposition, welches, wie im Fall von Skepinon-L, als zusätzliche Selektivitätsdeterminante ausgenutzt werden kann. Der kleine Türsteherrest toleriert die Bindung direkt linear verknüpfter aromatischer Ringsysteme, die eine komplementäre Interaktionsfläche mit der Scharnierregion ausbilden, und ermöglicht die Adressierung der hydrophoben Region I, die hinter dem Türsteherrest liegt.^[146]

Ausgehend von Skepinon-L wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Laufer verschiedene Derivate synthetisiert.^[143a, 147] Durch die Einführung größerer hydrophober Gruppen, sollte zusätzlich die hydrophobe „allosterische“ Tasche, die nur in der inaktiven *DFG-out* Konformation von p38 α MAPK zugänglich ist, adressiert werden. Diese Typ II-Inhibitoren sollten die inaktive Konformation der Kinase stabilisieren, wodurch sie weniger leicht von ATP verdrängt werden können. Durch die nötigen strukturellen Anpassungen bei der Bindung, besitzen Typ II-Inhibitoren außerdem langsamere Assoziations- und Dissoziationsraten und haben eine höhere Verweildauer am Zielprotein, wodurch ihre Aktivität bei niedrigen Konzentrationen steigt.^[96a, 101b] Die Einführung verschiedener hydrophiler Gruppen, die in Richtung der lösungsmittlexponierten Region neben der hydrophoben Region II zeigen, konnte die Löslichkeit verbessern und gleichzeitig die inhibitorische Aktivität in Vollbluttests erhalten. Die Kristallstruktur von Skepinon-L zeigte, dass der A-Ring des Dibenzoxepinons keine entscheidenden Kontakte zum Protein eingeht. Um dessen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität zu untersuchen, wurde der A-Ring entfernt, wobei die resultierenden Benzosuberone eine ähnliche Aktivität wie die Dibenzoxepinone aufwiesen.^[143a, 147]

Um den Bindungsmodus der Skepinon-L Derivate zu überprüfen, sollten die Verbindungen **1**, **2** und **3** (Abbildung 4.2.1) im Komplex mit p38 α MAPK kokristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Die Verbindungen **1**, **2** und **3** besitzen den gleichen hydrophoben Phenyl-Substituenten, welcher die allosterische Bindungstasche adressieren und einen Typ II-Bindungsmodus induzieren sollte. Während aus Verbindung **1** der A-Ring des Dibenzoxepinon-Gerüsts von Skepinon-L entfernt wurde, besitzen Verbindung **2** und **3** ein Dibenzoxepinon-Gerüst mit verschiedenen lösungsvermittelnden Gruppen. Außerdem sollte mit Hilfe des p38 α MAPK A-loop FLiK-Assays die Bindungskinetik von Verbindung **3** analysiert werden.^[101b]

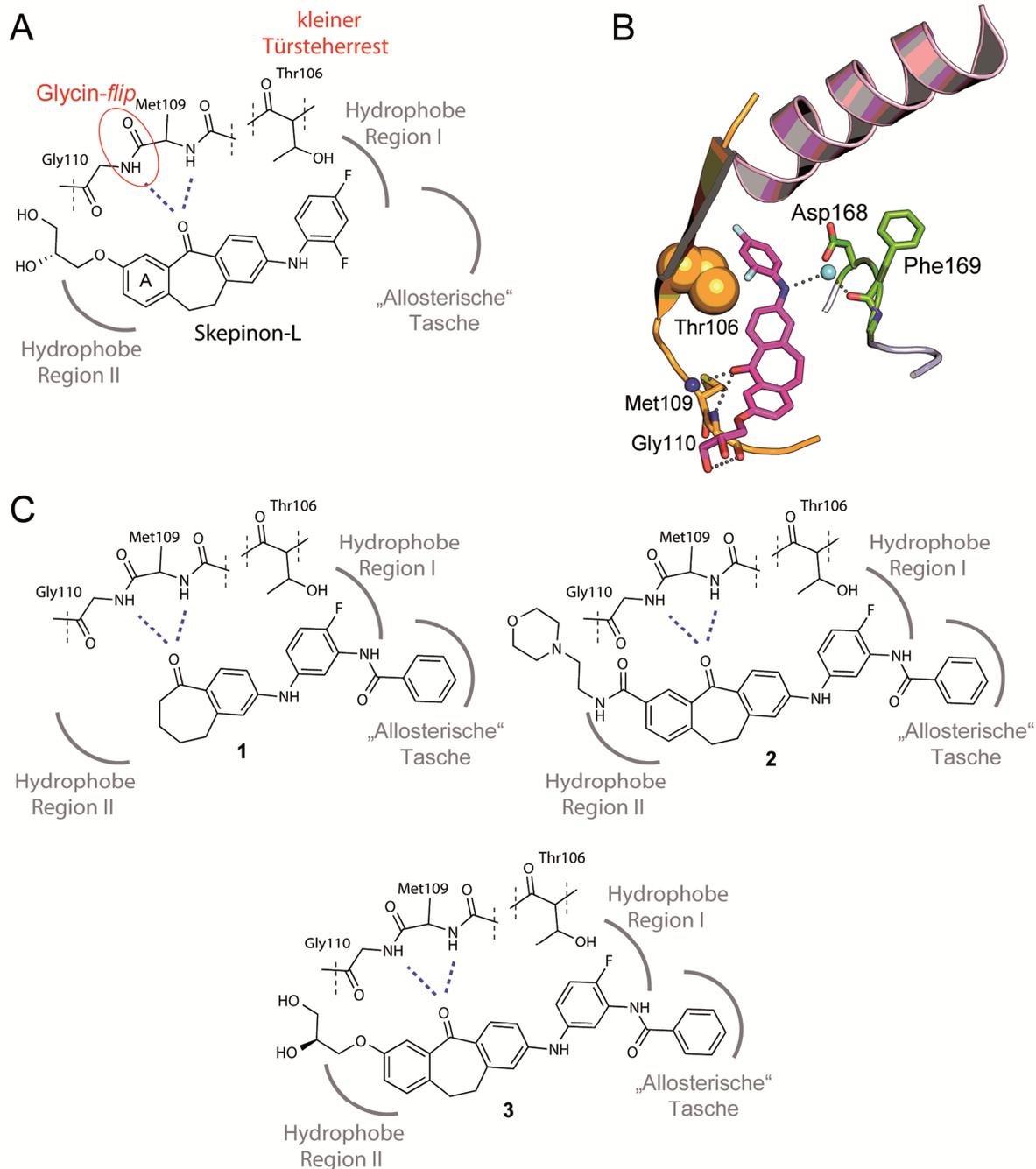


Abbildung 4.2.1 **A)** Schematische Darstellung des Bindungsmodus von Skepinon-L im aktiven Zentrum von p38α MAPK. **B)** Röntgenkristallstruktur von p38α MAPK im Komplex mit Skepinon-L (PDB-Eintrag: 3QUE). Skepinon-L induziert den Glycin-*flip* und bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den NH-Gruppen von Met109 und Gly110 aus. Das sekundäre Amin von Skepinon-L bindet über eine Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücke an die Carbonylgruppe in der Hauptkette von Phe169. Eine weitere Wasserstoffbrücke wird zwischen der terminalen OH-Gruppe der 2,3-Dihydroxypropoxy-Einheit und der Carbonylgruppe der Hauptkette von Gly110 ausgebildet. **C)** Antizipierter Bindungsmodus der Skepinon-L Derivate **1**, **2** und **3**. Der tatsächlich ausgebildete Bindungsmodus dieser Verbindung sollte strukturbiologisch untersucht werden.

4.3 Heterologe Expression und Aufreinigung von p38 α MAPK

Für die strukturbiologische Untersuchung wurde p38 α heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels FPLC aufgereinigt. Dazu wurden die Zellen lysiert und p38 α über einen N-terminalen His₆-Tag mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 4.3.1). Nach der Abspaltung des His₆-Affinitäts-Tags mit Thrombin und Dialyse, erfolgte die weitere Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie und Größenausschlusschromatographie (Abbildung 4.3.2 und Abbildung 4.3.3). Die Reinheit der gesammelten Proteinfractionen wurde jeweils mittels SDS-PAGE überprüft und geeignete Fraktionen für weitere Aufreinigungsschritte vereinigt. Nach der Größenausschlusschromatographie, wurde eine Proteinlösung mit monomerer p38 α MAPK in hoher Reinheit erhalten. Die Proteinlösung wurde auf 14.3 mg/mL konzentriert und direkt für die Kristallisationsexperimente weiter verwendet. Die Proteinausbeute nach der Aufreinigung lag bei etwa 8 mg pro Liter Kulturlösung.

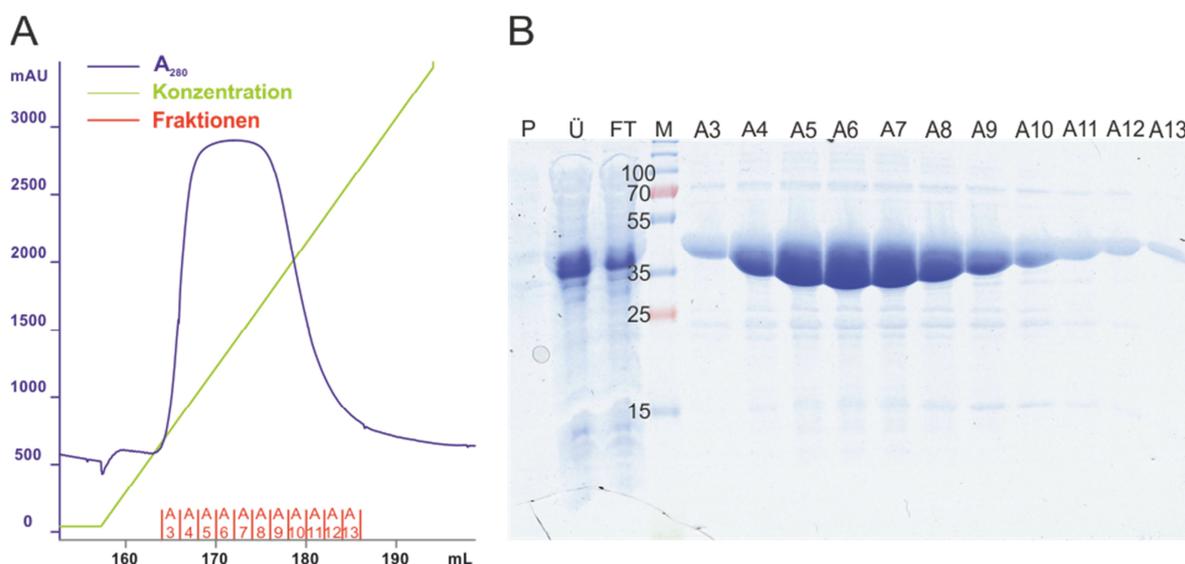


Abbildung 4.3.1 A) Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie für p38 α MAPK (blau: UV-Absorption bei 280 nm; grün: Elutionspuffer-Konzentration in % (\cong Imidazol-Gradient)). **B)** Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Das Zielprotein besaß ein Molekulargewicht von 44.4 kDa (P: Pellet; Ü: löslicher Überstand nach Zellaufschluss; FT: Durchfluss und Waschfraktion; A1–A13: Eluatfraktionen; M: Protein-Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; das Molekulargewicht ist in kDa angegeben).

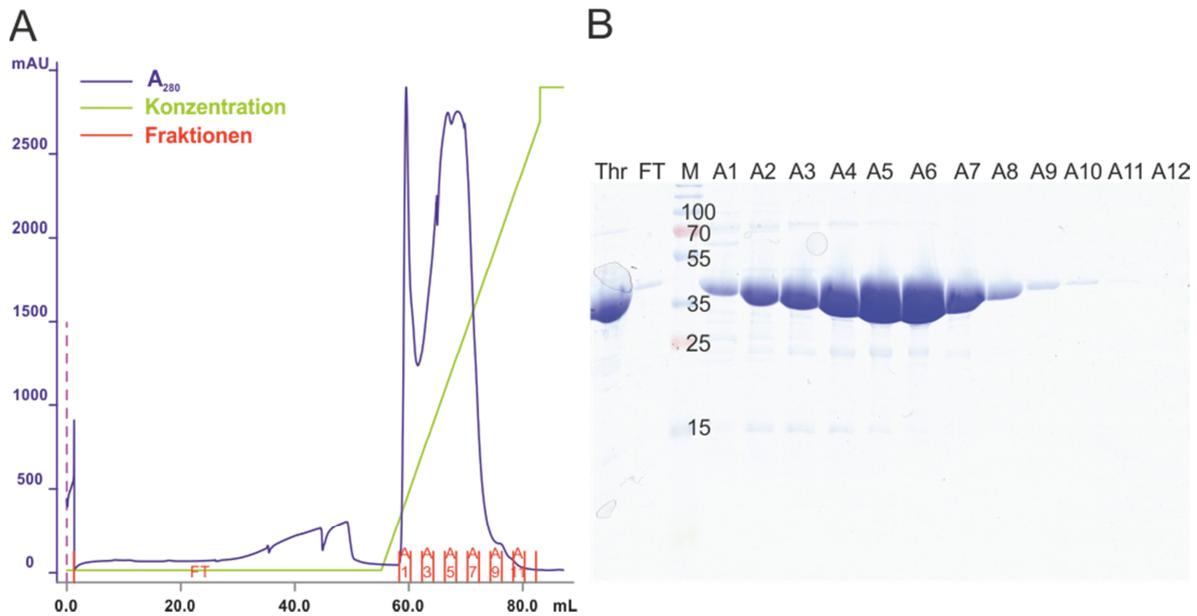


Abbildung 4.3.2 A) Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie für p38 α MAPK (blau: UV-Absorption bei 280 nm; grün: Elutionspuffer-Konzentration in % (\cong NaCl-Gradient)). **B)** Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Das Zielprotein besaß nach der Abtrennung des His₆-Tags ein Molekulargewicht von 41.4 kDa (Thr: Proteinlösung nach Spaltung mit Thrombin; FT: Durchfluss und Waschfraktion; A1–A12: Eluatfraktionen; M: Protein-Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; das Molekulargewicht ist in kDa angegeben).

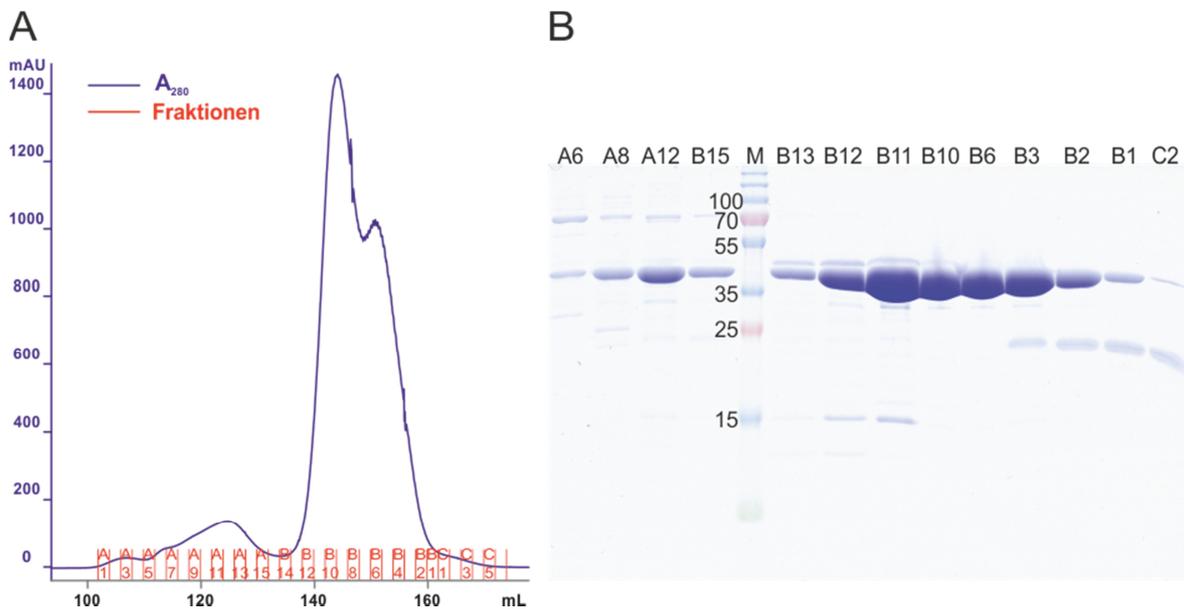


Abbildung 4.3.3 A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie für p38 α MAPK (blau: UV-Absorption bei 280 nm). **B)** Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Das Zielprotein besaß nach der Abtrennung des His₆-Tags ein Molekulargewicht von 41.4 kDa (A6–C2: Eluatfraktionen; M: Protein-Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; das Molekulargewicht ist in kDa angegeben). Die Fraktionen B10–B6 enthielten kaum Verunreinigungen und wurden vereinigt.

Die Identität und Reinheit der aufgereinigten p38 α MAPK wurde mittels ESI-MS nachgewiesen (Abbildung 4.3.4). Das erhaltene Massenspektrum enthielt einen Hauptpeak bei 41448 Da, der mit der berechneten Masse für p38 α MAPK von 41443 Da übereinstimmt (die erwartete Massenabweichung bei der Messung beträgt etwa 0.01 %). Außerdem wurde ein zweiter, kleinerer Peak bei 41527 Da beobachtet, der vermutlich einer einfach phosphorylierten Proteinspezies entspricht, welche durch Autophosphorylierung der Kinase entstehen kann (der Massenzuwachs bei Einführung einer Phosphatgruppe beträgt 80 Da).

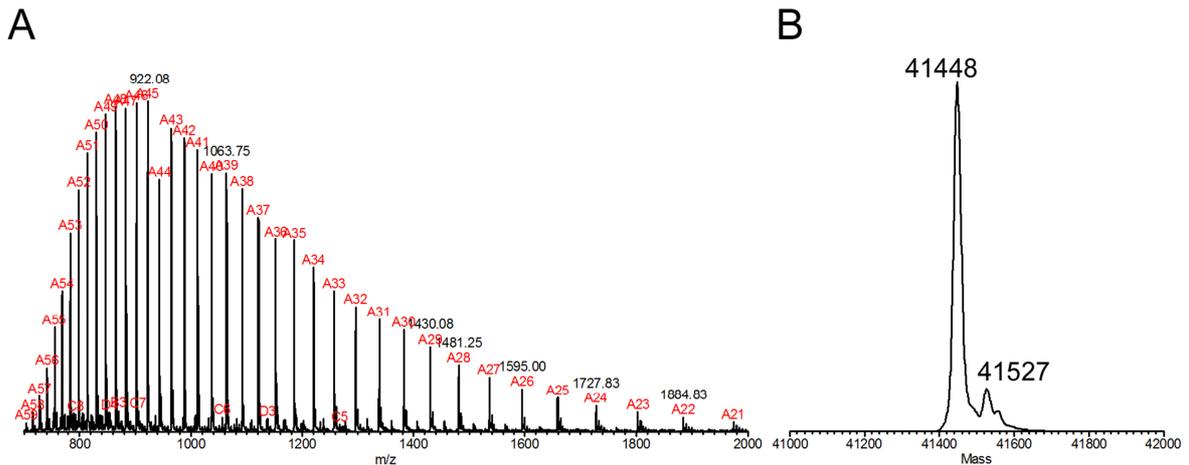


Abbildung 4.3.4 A) ESI-MS Spektrum von p38 α MAPK. **B)** Dekonvolutes Massenspektrum (die Massen sind in Da angegeben). Der Hauptpeak stimmt mit der für p38 α MAPK berechneten Masse von 41443 Da überein. Ein zweiter Peak bei 41527 Da kann der einfach phosphorylierten p38 α MAPK zugeordnet werden.

4.4 Strukturbiologische Untersuchungen an p38 α MAPK

Zur Untersuchung des Bindungsmodus der Verbindungen **1**, **2** und **3**, wurden diese mit p38 α MAPK im hängenden Tropfen kokristallisiert. Unter Kristallisationsbedingungen mit 100 mM MES pH 6.0–6.3, 22–27 % (v/v) PEG4000 und 50 mM *n*-Octyl- β -D-Glucopyranosid (β -OG) konnte innerhalb von zwei bis sieben Tagen das Wachstum langer, nadelförmiger Proteinkristalle beobachtet werden (Abbildung 4.4.1).

Die p38 α MAPK Komplexstrukturen mit dem Benzosuberone **1** und den Dibenzoxepinonen **2** und **3** konnten mit einer Auflösung von 2.4 Å, 2.1 Å und 2.2 Å gelöst werden. Alle Proteinkomplexe kristallisierten in einer orthorhombischen Elementarzelle ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) mit der Raumgruppe $P2_12_12_1$ (primitive Zentrierung mit drei senkrecht aufeinander stehenden Schraubenachsen). Die Elementarzellen enthielten jeweils ein monomeres p38 α MAPK Protein. Detaillierte Informationen zur Verfeinerung sowie Ramachandran-Statistiken der gelösten Komplexstrukturen finden sich in Tabelle 4.4.1 auf Seite 108.

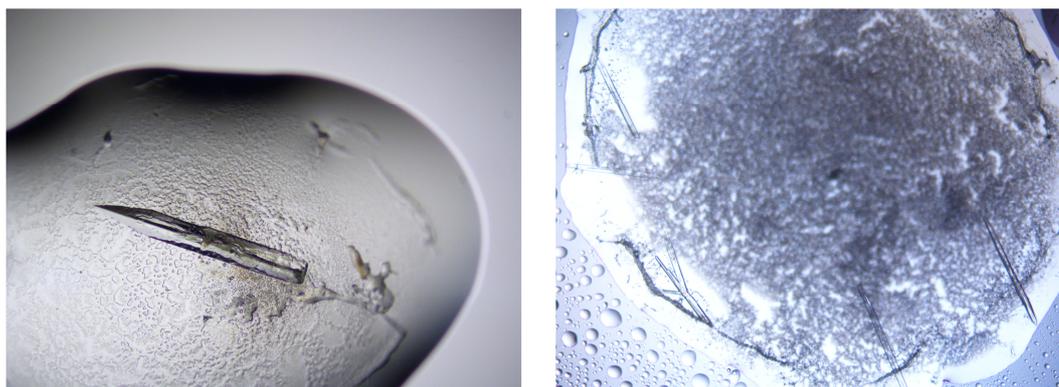


Abbildung 4.4.1 Typische Form der p38 α MAPK Proteinkristalle. Neben der Ausbildung von Proteinpräzipitat kam es nach zwei bis sieben Tagen zum Wachstum langer, nadelförmiger Protein-Kokristalle.

Neben der Bindung des Benzosuberone-Inhibitors **1** im aktiven Zentrum von p38 MAPK, kann die Bindung von zwei β -OG Detergenz-Molekülen aus der Kristallisationslösung in einer lipophilen Bindungstasche, mit bisher ungeklärter Funktion, innerhalb der C-terminalen Subdomäne beobachtet werden (Abbildung 4.4.2, PDB-Eintrag: 3UVQ).^[147] Die Benzosuberone-Einheit induziert den charakteristischen Glycin-*flip* und bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amid NH-Gruppen von Met109 und Gly110 in der Scharnierregion aus. Wie auch bei Skepinon-L, nutzt die Fluorophenyl-Einheit den kleinen Thr-Türsteherrest aus und bindet in die hydrophobe Region I. Die, über ein Amid verknüpfte, Phenyl-Gruppe des Liganden wird zwischen den Seitenketten von Glu71 aus der Helix α C und

Asp168 aus dem DFG-Motiv eingebettet und kann *face-to-edge* Wechselwirkungen^[148] mit Phe169 des DFG-Motivs eingehen.

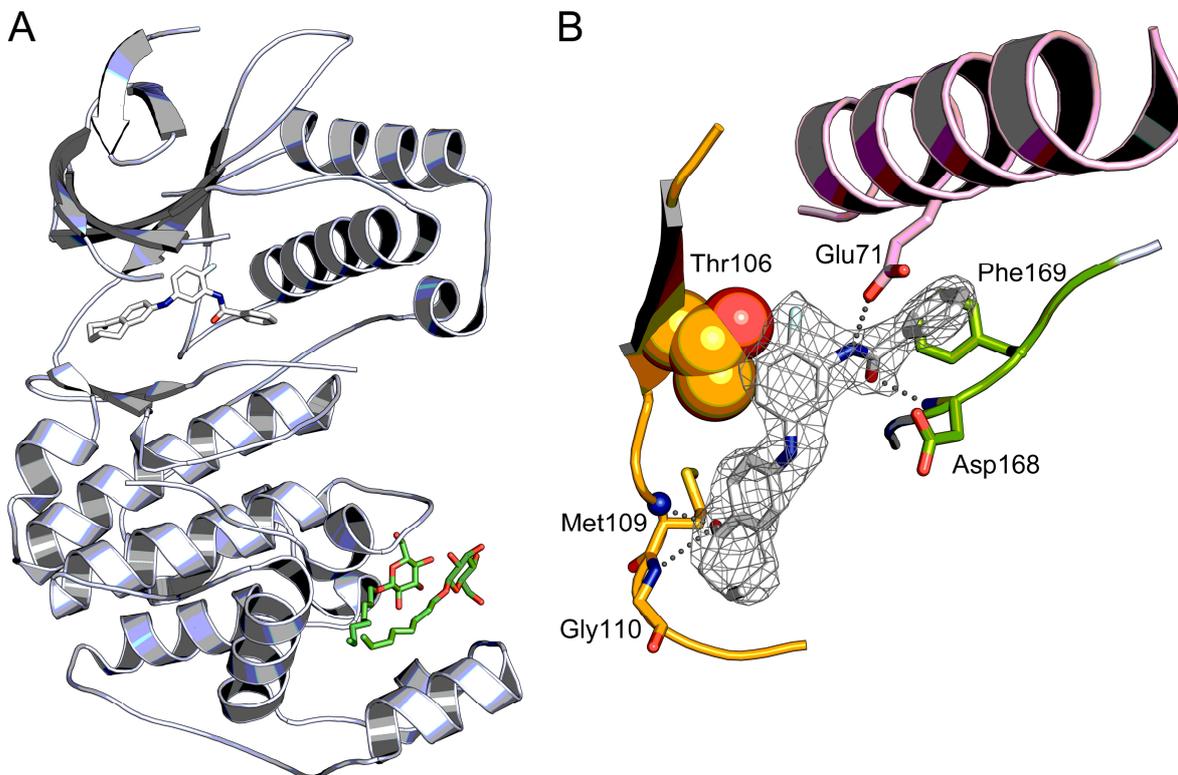


Abbildung 4.4.2 A) Röntgenkristallstruktur von p38 α MAPK im Komplex mit dem Benzosuberone-Inhibitor **1** (PDB-Eintrag: 3UVQ). Der Inhibitor (weiß) bindet im aktiven Zentrum der Kinase. Zusätzlich sind zwei β -OG Detergenz-Moleküle (grün) aus der Kristallisationslösung in einer lipophilen Bindungstasche in der C-terminalen Subdomäne gebunden. **B)** Detailansicht der Inhibitorbindung im aktiven Zentrum. Die experimentell ermittelte ($2F_o - F_c$) Elektronendichte des Liganden ist bei 1σ konturiert. Der Inhibitor induziert den Glycin-*flip*, wodurch er zwei Wasserstoffbrückenbindungen zur Scharnierregion ausbilden kann (graue gepunktete Linien), und stabilisiert hauptsächlich die aktive *DFG-in* Konformation der Kinase.

Die Carbonylgruppe des Amids bildet eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu Asp168 aus dem DFG-Motiv aus, während die NH-Gruppe des Amids das konservierte Glu71 aus der Helix α C kontaktiert. Obwohl der Benzosuberone-Inhibitor **1** im Proteinkristall hauptsächlich die aktive *DFG-in* Konformation der p38 α MAPK stabilisiert, gibt die im Bereich des DFG-Motivs ermittelte Elektronendichte Hinweise auf eine hohe strukturelle Flexibilität und das Vorliegen einer Doppelkonformation der Aktivierungsschleife. Dies deutet darauf hin, dass der Inhibitor in einem bestimmten Maße auch in der Lage ist, einen Typ II-Bindungsmodus einzunehmen und eine inaktive *in-between* Konformation zu stabilisieren, wobei in dieser zusätzlich ein β -OG Molekül in der allosterischen Tasche gebunden ist. Ein solcher Bindungsmodus, bei dem das DFG-Motiv in einer Übergangskonformation zwischen *DFG-in* und *DFG-out* vorliegt, kann auch bei Skepinon-L beobachtet werden (PDB-Eintrag: 3QUE). Die

inaktive *in-between* Konformation zeigte eine deutlich geringere Besetzung im Kristall und der Einbau einer Doppelkonformation im Zuge der Strukturverfeinerung konnte kein eindeutiges Ergebnis liefern. Aus diesem Grund wurde ausschließlich die klar definierte *DFG-in* Konformation in das Strukturmodell eingefügt.

Die Verbindungen **2** und **3** unterscheiden sich nur in ihren lösungsmittlexponierten Gruppen. Verbindung **2** verfügt an dieser Position über einen Morpholin-Substituenten, während Verbindung **3**, wie die Ausgangsverbindung Skepinon-L, eine 2,3-Dihydroxypropoxy-Gruppe trägt. Beide Inhibitoren nehmen den gleichen Bindungsmodus im aktiven Zentrum von p38 α MAPK ein (Abbildung 4.4.3 und Abbildung 4.4.4).

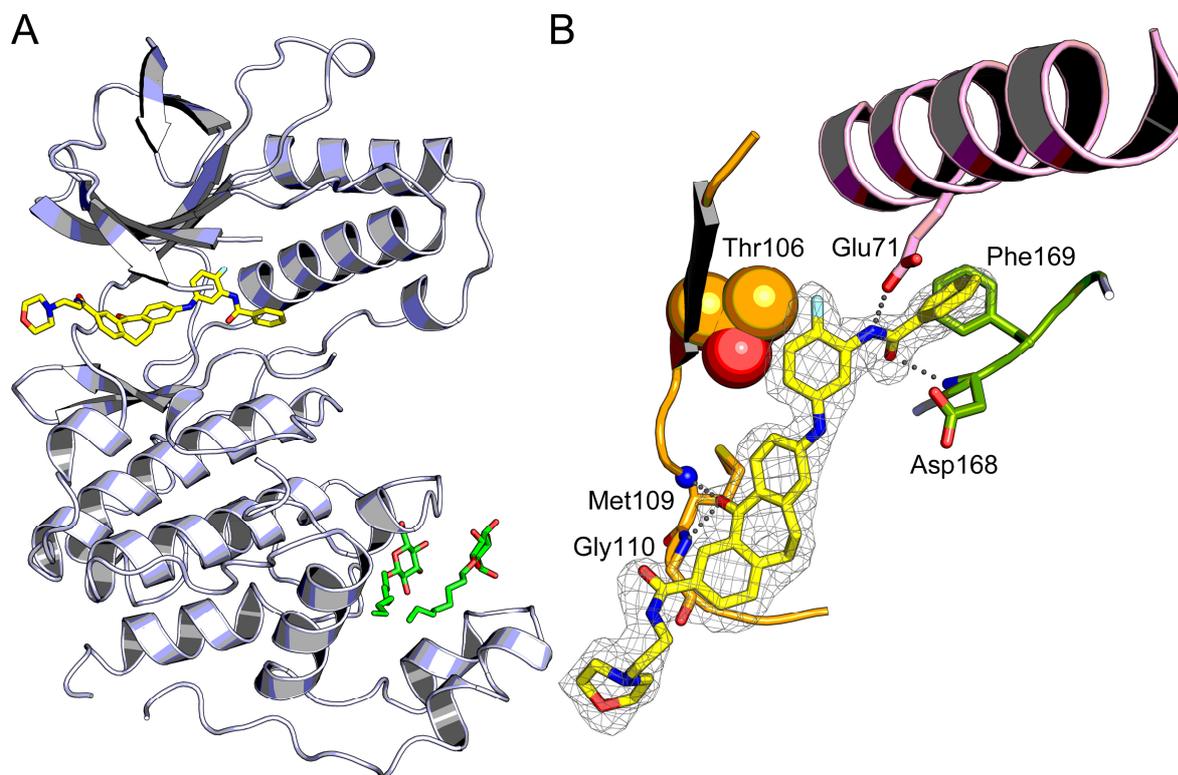


Abbildung 4.4.3 A) Röntgenkristallstruktur von p38 α MAPK im Komplex mit Verbindung **2**. Der Dibenzoexepinon-Inhibitor (gelb) bindet im aktiven Zentrum der Kinase. Zusätzlich sind zwei β -OG Detergenz-Moleküle (grün) aus der Kristallisationslösung in einer lipophilen Bindungstasche in der C-terminalen Subdomäne gebunden. **B)** Detailansicht der Inhibitorbindung im aktiven Zentrum. Die experimentell ermittelte (*2Fo-Fc*) Elektronendichte des Liganden ist bei 1σ konturiert. Das Dibenzoexepinon-Grundgerüst des Inhibitors bildet zwei Wasserstoffbrücken (grau gepunktete Linien) zu Met109 und Gly110 aus und induziert den Glycin-*flip*. Die Kinase befindet sich in der aktiven *DFG-in* Konformation. Der lösungsvermittelnde Morpholin-Substituent ragt aus dem aktiven Zentrum heraus.

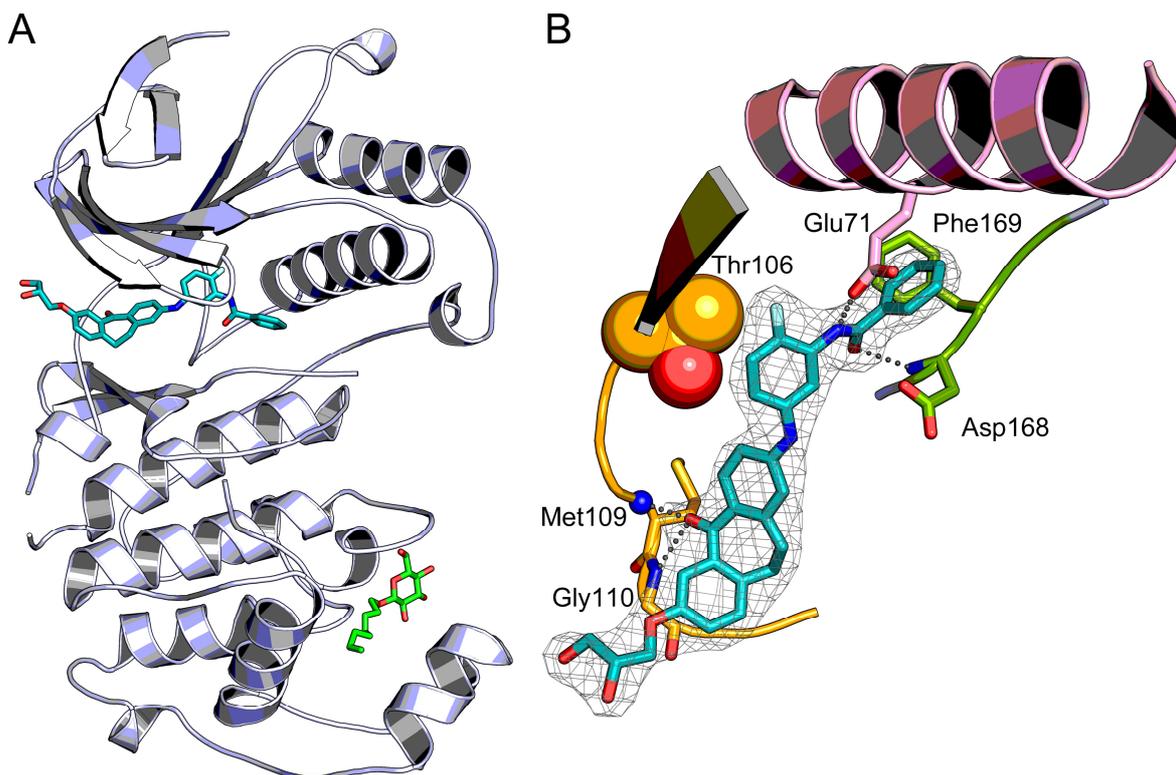


Abbildung 4.4.4 A) Röntgenkristallstruktur von p38 α MAPK im Komplex mit Verbindung **3** (PDB-Eintrag: 3UVP). Der Dibenzoxepinon-Inhibitor (türkis) bindet im aktiven Zentrum der Kinase. Zusätzlich ist ein β -OG Detergenz-Molekül (grün) aus der Kristallisationslösung in einer lipophilen Bindungstasche in der C-terminalen Subdomäne gebunden. **B)** Detailansicht der Inhibitorbindung im aktiven Zentrum. Die experimentell ermittelte ($2Fo-Fc$) Elektronendichte des Liganden ist bei 1σ konturiert. Das Dibenzoxepinon-Grundgerüst induziert den Glycin-*flip* und bildet zwei Wasserstoffbrücken (grau gepunktete Linien) zur Scharnierregion aus. Die Kinase befindet sich in der aktiven *DFG-in* Konformation. Die lösungsvermittelnde 2,3-Dihydroxypropoxy-Gruppe ragt aus dem aktiven Zentrum heraus.

Die Dibenzosuberoneinheit induziert den Glycin-*flip* und ermöglicht die Ausbildung zweier Wasserstoffbrückenbindungen zum Proteinerückgrat in der Scharnierregion über Met109 und Gly110. Die Fluorophenyl-Gruppe adressiert die hydrophobe Region I hinter dem Thr-Türsteherrest und die Carbonylgruppe des Amids bildet eine Wasserstoffbrücke zur Hauptkette von Asp168 aus dem DFG-Motiv aus. Die NH-Gruppe des Amids bindet über eine Wasserstoffbrücke an Glu71 aus der Helix αC . Wie auch bei Verbindung **1**, ist die Phenyl-Gruppe in **2** und **3** zwischen den Seitenketten von Glu71 und Asp168 eingebettet und so orientiert, dass *face-to-edge* Interaktionen mit der Seitenkette von Phe169 ausgebildet werden können. Die Substituenten am A-Ring des Dibenzoxepinons adressieren zusätzlich die hydrophobe Region II und die lösungsmittlexponierte Morpholin- oder Dihydroxypropoxy-Gruppe ragt aus dem aktiven Zentrum heraus. Im Gegensatz zu Skepinon-L, kann die 2,3-Dihydroxypropoxy-Gruppe aufgrund einer leicht veränderten Orientierung in **3** keine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Proteinerückgrat von

Gly110 ausbilden. Die Komplexstrukturen von p38 α MAPK mit **2** und **3** weisen zusätzliche Elektronendichte auf, die auf das Vorliegen einer alternativen *in-between* Konformation der Aktivierungsschleife im Proteinkristall hindeutet. Aufgrund der geringeren Besetzung dieser Konformation, war es aber auch hier nicht möglich, eine eindeutig definierte Doppelkonformation in das Strukturmodell einzubauen.

Zur Untersuchung der Bindung von Verbindung **3** wurden FLiK-Experimente mit einem in der Aktivierungsschleife fluoreszent markierten p38 α MAPK-Konstrukt, wie von Simard *et al.* beschrieben, durchgeführt.^[101a] Das A-loop FLiK-System ist in der Lage, ligandeninduzierte Konformationsänderungen der Aktivierungsschleife bei der Bindung von Typ II- und Typ III-Kinaseinhibitoren zu detektieren. Mittels FLiK konnte eine Konformationsänderung der Aktivierungsschleife bei der Zugabe von Verbindung **3** detektiert und ein K_d von 17 nM bestimmt werden (Abbildung 4.4.5). Der bestimmte K_d liegt in der Größenordnung der mit anderen Assay-Systemen bestimmten Aktivität von **3** ($IC_{50}(\textit{in vitro}$ Aktivität) = $0.001 \pm 0 \mu\text{M}$ und $IC_{50}(\textit{Vollbluttest}) = 0.280 \pm 0.041 \mu\text{M}$).^[143a] Zusätzlich wurde mittels FLiK die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} für **3** zu $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt. Im Vergleich dazu liegt der, mit dem gleichen Assay-System bestimmte, k_{on} -Wert des bekannten reinen Typ II-Inhibitors BIRB796 bei $4.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.^[101a] Die Assoziation von **3** an p38 α MAPK erfolgt damit 1000-fach schneller und ist untypisch für einen reinen Typ II-Bindungsmodus. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Verbindung **3** nur teilweise in der Lage ist, einen Typ II-Bindungsmodus zu induzieren.

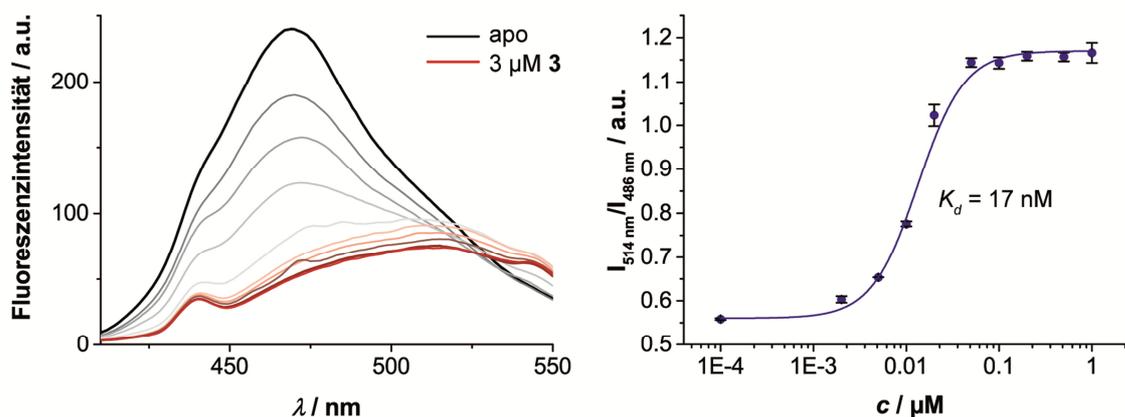


Abbildung 4.4.5 p38 α MAPK A-loop FLiK-Experiment mit Verbindung **3**. Die Zugabe steigender Inhibitor-Konzentrationen führte zu einer Intensitätsabnahme und bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums (links). Durch Auftragung des gemessenen Fluoreszenzintensitäts-Verhältnisses $I_{514 \text{ nm}}/I_{486 \text{ nm}}$ gegen die Ligandenkonzentration konnte der K_d für **3** zu 17 nM bestimmt werden (rechts).

Zusammenfassend konnte für die untersuchten Verbindungen **1**, **2** und **3** kein eindeutiger Typ-II Bindungsmodus, bei dem ausschließlich die *DFG-out* Konformation stabilisiert wird,

nachgewiesen werden. Wie erwartet, hatte die Entfernung des A-Rings von Skepinon-L in **1** keinen Einfluss auf den Bindungsmodus. So ist Verbindung **1** immer noch in der Lage, den charakteristischen Glycin-*flip* zu induzieren. Die zusätzliche Adressierung der hydrophoben Region II und die Einführung geeigneter lösungsmittlexponierter Gruppen, wie in **2** und **3**, konnte allerdings die Affinität der Inhibitoren erhöhen und hatte einen positiven Effekt auf die Löslichkeit und damit auf die Aktivität der Verbindungen in physiologisch relevanten Vollbluttests.^[143a, 147]

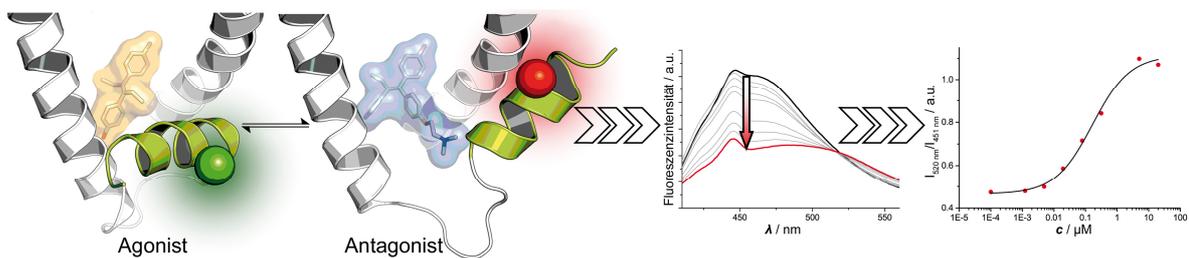
Tabelle 4.4.1. Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung für die p38 α MAPK Komplexstrukturen.^A

	p38α_1 (3UVP)	p38α_2	p38α_3 (3UVQ)
Datensammlung			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle			
a, b, c (Å)	64.00, 68.80, 74.80	66.07, 69.75, 74.73	66.09, 74.29, 77.73
α ; β ; γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Auflösung (Å)	50.0–2.4 (2.5–2.40) ^A	50.0–2.1 (2.2–2.1) ^A	50.0–2.2 (2.30–2.20) ^A
R _{meas} (%)	9.3 (41.2)	7.7 (40.2)	4.3 (34.1)
I/ σ I	15.43 (3.95)	21.65 (6.09)	33.23 (5.15)
Vollständigkeit (%)	99.8 (99.6)	99.99 (100.0)	99.7 (100.0)
Redundanz	5.19 (4.59)	6.51 (6.67)	5.06 (5.29)
Verfeinerung			
Auflösung	48.63–2.40	47.97–2.10	49.39–2.20
Anzahl an Reflexen	13405	19713	18972
R _{work} / R _{free}	21.5 / 29.7	21.5 / 27.0	23.6 / 31.8
Anzahl an Atomen			
Protein	2692	2637	2720
Ligand / Ion	69	84	59
Wasser	50	60	55
B-Faktoren			
Protein	37.2	27.7	53.6
Ligand	37.3	27.5	53.7
Wasser	38.3	33.5	50.5
RMS Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0.014	0.016	0.015
Bindungswinkel (°)	1.488	1.881	1.545
Struktur (PDB-Eintrag)	(3UVP)	-	(3UVQ)
Wellenlänge (Å)	0.978600	1.000000	1.000000
Temperatur	90 K	90 K	90 K
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA
Ramachandran-Auftragung: Seitenketten in			
bevorzugten Regionen	87.7 %	96.56 % ^B	89.3 %
zusätzlich erlaubten Regionen	11.3 %	3.44 % ^B	10.0 %
generell erlaubten Regionen	1.0 %	-	0.7 %
unerlaubten Regionen	0.0 %	0.0 % ^B	0.0 %

^AZur Lösung der p38 α -Komplexstrukturen wurden Diffraktionsdaten eines Einzelkristalls verwendet. Die Werte in Klammern beziehen sich jeweils auf die höchste Auflösungsschale.

^BWerte wurden mit WinCoot 0.7 berechnet.

5 ZUSAMMENFASSUNG

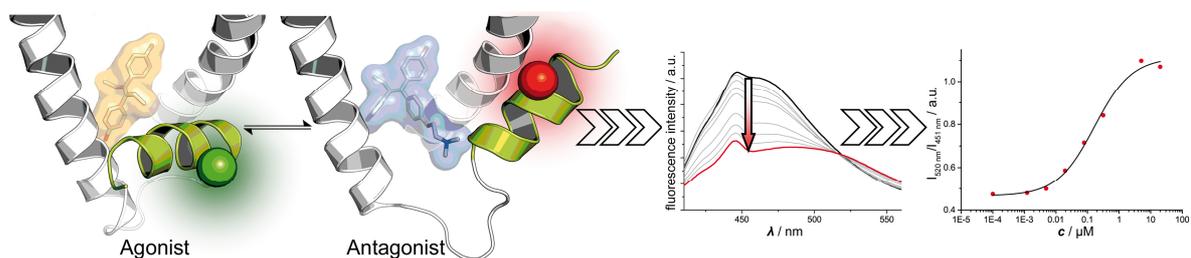


Der Estrogenrezeptor gehört zur Proteinfamilie der Kernrezeptoren. Diese ligandenkontrollierten Transkriptionsfaktoren regulieren spezifisch die Transkription ihrer Zielgene. Die Aktivität der Kernrezeptoren wird durch die Bindung kleiner lipophiler Liganden, wie Steroidhormone oder therapeutische Wirkstoffe, reguliert, welche an die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors binden und Konformationsänderungen induzieren. Dadurch wird die Interaktion des Rezeptors mit einer Vielzahl an Koregulatorproteinen sowie der DNA kontrolliert. Kernrezeptoren spielen bei der Vermittlung einer Vielzahl physiologischer Prozesse, aber auch bei der Entstehung von Erkrankungen, wie Diabetes, Krebs, Asthma oder Hormonresistenz, eine entscheidende Rolle und stellen daher interessante Zielstrukturen für die moderne Wirkstoff-Forschung dar. In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung des fluoreszenzbasierten direkten Bindungsassays FLiN (*Fluorescent Labels in Nuclear receptors*) beschrieben, der in der Lage ist, spezifische Konformationsänderungen in der Ligandenbindungsdomäne des humanen Estrogenrezeptors beta zu detektieren. Der FLiN-Assay basiert auf der Einführung eines Cystein-Rests innerhalb der flexiblen Helix 12 in der Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors und anschließender Modifikation mit einem Thiol-reaktiven solvatochromen Fluorophor. Durch die Bindung agonistischer oder antagonistischer Liganden werden unterschiedliche Konformationen der Helix 12 stabilisiert, wodurch es zu Veränderungen in der Polarität der Mikroumgebung des Fluorophors kommt. Diese Veränderungen verursachen unterschiedliche Verschiebungen des Emissionsspektrums des Fluorophors, anhand derer die verschiedenen Konformationen unterschieden werden können und sich Bindungsaffinitäten der Liganden ermitteln lassen. Zur Etablierung des FLiN-Assays wurden in einem strukturbasierten Ansatz verschiedene Proteinkonstrukte der Ligandenbindungsdomäne entworfen, heterolog exprimiert, aufgereinigt, mit einem Fluorophor modifiziert und ihre Eignung als Sensoren für die unterschiedlichen Konformationsänderungen des ER analysiert. Nach einer Optimierung des Assays, bei der unterschiedliche Fluorophore und Puffersysteme getestet wurden, wurden die Ergebnisse des FLiN-Assays mit Hilfe eines orthogonalen Assay-Systems validiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der FLiN-Assay für den Einsatz im Hochdurchsatzformat geeignet ist und, im Gegensatz zu anderen

hochdurchsatzfähigen *in vitro* Testsystemen, zur gezielten Suche nach neuen Liganden die eine aktive oder inaktive Konformation des Rezeptors stabilisieren, eingesetzt werden kann. Zusätzlich wurden zeitaufgelöste FLiN-Messungen zur Analyse der Kinetik der Ligandenbindung an den Estrogenrezeptor durchgeführt.

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes wurde die Bindung verschiedener Inhibitoren an die p38 α MAP-Kinase mit Hilfe des direkten Bindungsassays FLiK sowie strukturebiologischer Studien analysiert. Dabei wurden Komplexkristallstrukturen der Kinase mit einem Benzosuberone-Inhibitor (**1**) sowie zwei Dibenzoxepinon-Verbindungen (**2** und **3**) generiert. Die Inhibitoren induzierten einen, für diese Verbindungsklasse charakteristischen, Glycin-*flip* innerhalb der Scharnierregion. Sowohl die strukturebiologischen Untersuchungen als auch die Analyse mittels FLiK zeigten, dass die untersuchten Inhibitoren jedoch nicht in der Lage waren, einen reinen Typ-II Bindungsmodus zu induzieren.

6 ABSTRACT



The estrogen receptor belongs to the nuclear receptors, a protein family of ligand-dependent multidomain transcription factors that specifically regulate the expression of their target genes. The activity of NRs is under control of lipophilic small-molecule ligands, like hormones and drugs, that bind to the ligand-binding domain of the receptor, where they account for conformational changes and interactions with a variety of transcriptional co-regulator proteins and DNA. Nuclear receptors play a fundamental role in the control of physiological functions. Moreover, they are involved in pathological processes, such as diabetes, cancer, asthma, and hormone resistance syndromes. Therefore, they are important targets for current drug discovery efforts. This thesis describes the development of FLiN (Fluorescent Labels in Nuclear receptors), a fluorescence-based direct binding assay that can monitor conformational changes within the ligand-binding domain of the human estrogen receptor β . The assay technology is based on the introduction of a cysteine residue within the flexible helix 12 in the ligand-binding domain of the receptor and subsequent labeling with a thiol-reactive solvatochromic fluorophore. Binding of agonistic or antagonistic ligands stabilizes distinct conformations of helix 12 and leads to changes in the polarity of the micro-environment of the fluorophore. These changes translate into alterations of the emission spectrum that can be used to distinguish different conformations and to determine binding affinities of the ligands. In order to establish the FLiN-assay, a series of protein constructs of the receptors' ligand-binding domain was designed in a structure-guided approach. The protein constructs were produced by heterologous expression, purified, labelled with a solvatochromic fluorophore and their suitability to report on conformational changes was assessed. After optimization of buffer-conditions and testing of different fluorophores, the results of FLiN were validated with an orthogonal assay system. The FLiN assay produces robust data, suitable for high-throughput screening, and allows for screening for new scaffolds that are able to stabilize active or inactive conformations of the receptor, which is not possible with conventional competition assay systems. Furthermore, time-resolved FLiN-measurements were used to monitor the kinetics of ligand-binding to the receptor.

Within the framework of a cooperation project, the binding of different inhibitors to p38 α MAP kinase was analyzed using the FLiK-direct binding assay and structural biology studies. Three crystal structures of the kinase in complex with a benzosuberone (**1**) and two dibenzoxepinone inhibitors (**2** and **3**) were solved, revealing a characteristic binding mode with an induction of the so-called glycine-flip within the hinge region that provides selectivity over other protein kinases. Structural biology studies and FLiK-measurements both showed that the compounds were not able to stabilize a complete type II binding mode.

7 PUBLIKATIONEN

- [1] **Mayer-Wrangowski, S. C.**; Rauh, D. Monitoring Ligand-Induced Conformational Changes for the Identification of Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *14*, 4379–82.
- Mayer-Wrangowski, S. C.**; Rauh, D. Detektion ligandeninduzierter Konformationsänderungen im Östrogenrezeptor. *Angew Chem* **2015**, *14*, 4454–57.
- [2] Fischer, S.; Wentsch, H. K.; **Mayer-Wrangowski, S. C.**; Zimmermann, M.; Bauer, S. M.; Storch, K.; Nieß, R.; Koeberle, S. C.; Grütter, C.; Böckler, F. M.; Rauh, D.; Laufer, S. A. Dibenzosuberones as p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors with low ATP competitiveness and outstanding whole blood activity. *J Med Chem* **2013**, *1*, 241–53.
- [3] Grütter, C.; Simard, J. R.; **Mayer-Wrangowski, S. C.**; Schreier, P. H.; Perez-Martin, J.; Richters, A.; Getlik, M.; Gutbrod, O.; Braun, C. A.; Beck, M. E.; Rauh, D. Targeting GSK3 from *Ustilago maydis*: Type-II Kinase Inhibitors as Potential Antifungals. *ACS Chemical Biology* **2012**, *7*, 1257–67.
- [4] **Mayer-Wrangowski, S.**; Rauh, D. Symbiose aus Chemie und Medizin – zielgerichtet gegen Krebs. *BIOspektrum* **2012**, *18*, 376–79.
- [5] Martz, K. E.; Dorn, A.; Baur, B.; Schattel, V.; Goettert, M. I.; **Mayer-Wrangowski, S. C.**; Rauh, D.; Laufer, S. A. Fragment-Based Approach to Novel p38 α Inhibitors: Targeting the Hinge Glycine Flip and the Activation Loop. *J Med Chem* **2012**, *17*, 7862–74.

8 MATERIAL UND METHODEN

8.1 Generelle Anmerkungen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien und Reagenzien zur Herstellung von Pufferlösungen von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US), Alfa Aesar (Ward Hill, MA, US), Acros Organics (Teil von Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), Serva (Heidelberg, DE) und Carl Roth (Karlsruhe, DE) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Alle Agarplatten und Medien wurden von der ZE Biotechnologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund bezogen.

Zur Darstellung von Proteinstrukturen wurde PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC verwendet.

8.1.1 Geräte

CD-Spektropolarimeter:	J-715 Spectropolarimeter, JASCO, Gross-Umstadt, DE
Dispergierer:	T18 basic Ultra-Turrax, IKA, Staufen, DE
Fluoreszenzspektrophotometer:	Fluoromax-4 Spectrofluorometer, HORIBA, Kyoto, Japan JASCO FP-6500 Spektrofluorimeter, JASCO Analytical Instruments, Essex, UK
FPLC Systeme:	ÄKTA pure, GE Healthcare, Uppsala, SE ÄKTAexplorer, GE Healthcare, Uppsala, SE
Gelelektrophoresesystem:	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, US
Hochdruckhomogenisator:	M-110L Microfluidizer Materials Processor, Microfluidics, Wastwood, MA, US
Inkubator:	Incubator Shaker Series I26, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, US Temperier-Lagerschrank IPS750, memmert, Schwabach, DE
LC-MS Systeme:	UltiMate™ 3000 RSLCnano System, Dionex, Sunnyvale, CA, US; Standard Coated SilicaTip Emitter, 360 µm OD, 20 µm ID, 10 µm Tip ID, 10.5 cm, New Objective, Woburn, MA, US;

	Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US; Nanospray Flex Ion Source, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
	1100 HPLC-System, Agilent, Santa Clara, CA, USA mit Finnigan LCQ Advantage Max, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA oder LTQ XL™ Linear Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
Mikrotiterplatten-Lesegerät:	Infinite M1000, Tecan, Männedorf, CH
Plattenschüttler:	MixMate, Eppendorf, Hamburg, DE
Thermocycler:	TPersonal, Biometra GmbH, Göttingen, DE
Thermoschüttler:	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, DE
Ultraschallbad:	Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, PA, US
Ultraschalldesintegrator:	Digital Sonifier, BRANSON ULTRASCHALL, Dietzenbach, DE
Umwälzthermostat:	Polystat cc2, Huber, Offenburg, DE F12-ED, Julabo, Seelbach, DE
Spektrophotometer:	BioPhotometer plus, Eppendorf Research, Hamburg, DE NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
Vakuumkonzentrator:	Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifugen & Rotoren:	Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, DE Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, DE Centrifuge 5702R, Eppendorf, Hamburg, DE Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, DE Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US SA-600 Fixed Angle Rotor, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US FiberLite F8-6x1000y, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US

8.1.2 Verbrauchsmaterialien und Zubehör

Dialysekassette:	Slide-A-Lyzer MWCO10000, life technologies, Carlsbad, CA, US
Dialyseschlauch:	Spectra/Por MWCO 12–14 kDa, Spectrumlabs, Breda, NL
Entsalzungssäulen:	Sephadex 25 PD-10, GE Healthcare, Uppsala, SE Polyacrylamide Spin Desalting Columns, life technologies, Carlsbad, CA, US
FPLC-Säulen:	HiTrap Benzamide FF, GE Healthcare, Uppsala, SE HiTrap Q FF, GE Healthcare, Uppsala, SE HiLoad 26/60 Superdex 75, GE Healthcare, Uppsala, SE HiLoad 16/60 Superdex 75, GE Healthcare, Uppsala, SE Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare, Uppsala, SE
HPLC-Säulen:	Acclaim PepMap RSLC C18, 2 μm , 100 \AA , 75 μm ID \times 25 cm, nanoViper, Dionex, Sunnyvale, CA, US Acclaim PepMap100 C18, 5 μm , 100 \AA , 300 μm ID \times 5 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, US Vydac® 214TP5215 C4, GRACE, Columbia, MD, US
Küvetten:	Rotilabo®-Einmal-Küvette, PS, 4.5 mL, Carl Roth, Karlsruhe, DE UV-transparente Einmal-Küvette, Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikrotiterplatten:	MICROPLATTE, 384 well, small volume, med. binding, schwarz, Greiner BIO-ONE, Frickenhausen, DE MICROPLATTE, 384 well, med. binding, big volume, weiß, Greiner BIO-ONE, Frickenhausen, DE
Säulenmaterial:	Ni-NTA Superflow, Qiagen, Hilden, DE
Kristallisationsplatten:	EasyXtal 24-Well Tool X-Seal, Qiagen, Hilden, DE
Zentrifugeneinheit:	Amicon Ultra-4/-15, 10 kDa, Merck Millipore, Billerica, MA, US

8.1.3 Bakterienstämme

Escherichia coli BL21 (DE3), Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, DE

Escherichia coli XL10 Gold, Stratagene, La Jolla, CA, US

8.1.4 Proteine und Reagenzien für biochemische Untersuchungen

Benzonase Nuclease, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit, life technologies, Carlsbad, CA, US

DpnI, New England BioLabs, Ipswich, MA, US

DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen, Hilden, DE

hERβ wt Volllänge, life technologies, Carlsbad, CA, US

Lysozym, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, life technologies, Carlsbad, CA, US

PageRuler™ Unstained Protein Ladder, life technologies, Carlsbad, CA, US

PfuUltra II Fusion HS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US

PolarScreen™ ER Beta Competitor Assay Kit Red, life technologies, Carlsbad, CA, US

QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden, DE

Thrombin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

Trypsin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

8.1.5 Testverbindungen

Die Identität und Reinheit der verwendeten Testverbindungen wurde mittels GC-MS oder LC-MS überprüft.

17β-Estradiol, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

Diethylstilbestrol, CAYMAN Chemical, Ann Arbor, MI, US

Fulvestrant, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

Raloxifen, CAYMAN Chemical, Ann Arbor, MI, US

Tamoxifen, CAYMAN Chemical, Ann Arbor, MI, US

(Z)-4-Hydroxytamoxifen, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

8.2 Plasmide

Die Expressionsvektoren für die Proteinkonstrukte hER β LBD wt (UniProtKB^[149] Eintrag: Q92731.2, Aminosäuren 260–502) sowie die Mutante hER β LBD-mut (C331S, C366S, C396T, C478L), in der alle vier natürlich vorkommenden Cystein-Reste ersetzt wurden, wurden von GeneArt (life technologies, Carlsbad, US) erworben. Beide Gene wurden für die Expression in *E. coli* Codon-optimiert, über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI in den Vektor pET-15b eingefügt und tragen einen N-terminalen His₆-Tag gefolgt von einer Thrombin-Schnittstelle. Basierend auf diesen beiden Konstrukten, wurden alle weiteren hier verwendeten hER β LBD FLiN Konstrukte mittels Mutagenese-PCR generiert.

Das Proteinkonstrukt p38 α wt kodiert für die humane p38 α MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase 14 Isoform 1, UniProtKB Eintrag: Q16539-1, Aminosäuren 2-360) mit N-terminalem His₆-Tag gefolgt von einer Thrombin-Schnittstelle im Vektor pNFG. Das Plasmid befand sich bereits im Bestand der AG Rauh.

Die Protein-Sequenzen aller verwendeten Konstrukte sind im Anhang aufgeführt.

8.2.1 Mutagenese-PCR

Zur gezielten Einführung von Fluorophoren, wurden verschiedene hER β LBD FLiN-Konstrukte mittels zielgerichteter Mutagenese generiert. Dazu wurden, mit einer Mutagenese-PCR, an den gewünschten Positionen Cystein-Reste in das hER β LBD Gen eingeführt und/oder vorhandene Cystein-Reste in der Sequenz gegen andere Aminosäuren ersetzt.

Die Zusammensetzung der Mutagenese-PCR Ansätze ist Tabelle 8.2.1 zu entnehmen. Die Sequenzen aller verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 10.2.1). Die Mutagenese-PCR wurde, wie in Tabelle 8.2.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde die Templat-DNA durch Zugabe von 1 U Restriktionsendonuklease DpnI und Inkubation für 3 h bei 37 °C entfernt. Chemisch kompetente *E. coli* XL10 Gold Zellen wurden mit 1 μ L des Reaktionsansatzes transformiert und die Mutanten auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/mL Ampicillin (Amp) selektiert.

Tabelle 8.2.1. Reaktionsansatz Mutagenese-PCR.

10x PfuUltra II Puffer ^A	5 µL
dNTP-Mix (je 25 mM)	1 µL
Templat DNA	150-300 ng
Primer 1 (10 pmol/µL)	1 µL
Primer 2 (10 pmol/µL)	1 µL
Quick-Change Solution ^A	1 µL
<i>PfuUltra</i> II Fusion HS DNA Polymerase ^A	1 µL
ddH ₂ O	auf 50 µL auffüllen

^A (Agilent Technologies)

Tabelle 8.2.2. Temperaturzyklus für Mutagenese-PCR.

Anzahl Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	<i>Hot start</i>	95 °C	3 min
	Denaturierung	95 °C	30 s
30	<i>Annealing</i>	57 °C	30 s
	Elongation	72 °C	105 s
1	Elongation	72 °C	10 min
1	-	4 °C	∞

8.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIASpin Miniprep Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus *E. coli* XL10 Gold isoliert. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

8.2.3 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben unter Verwendung der Primer T7 und T7 term durchgeführt. Die Proben wurden anschließend mit dem DyeEx™ 2.0 Spin Kit (Qiagen) aufgereinigt und von der ZE Biotechnologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund analysiert.

8.3 Proteinexpression

8.3.1 hER β LBD-Konstrukte

Chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden mit den verschiedenen Plasmiden (mit hER β LBD wt und den FLiN-Konstrukten) transformiert und auf LB Agarplatten mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp selektiert. Die Expression wurde in TB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp durchgeführt. Dazu wurde eine Vorkultur über Nacht bei 37 °C, 150 rpm inkubiert und damit die Hauptkultur (2–4 L) inokuliert. Diese wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1.0–1.2 bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in einem Eisbad auf etwa 16 °C gekühlt und die Proteinexpression durch Zugabe von 0.2–0.4 mM IPTG (sowie optional 10 μM E2) induziert. Die Zellen wurden für weitere 15–18 h bei 15 °C und 150 rpm inkubiert, mittels Zentrifugation (20 min, 5000 rpm, 4 °C) sedimentiert und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

8.3.2 p38 α MAP-Kinase

p38 wt wurde in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen heterolog exprimiert. Dazu wurden chemisch kompetente Zellen mit dem p38 wt-Plasmid transformiert und auf LB Agarplatten mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp selektiert. Die Expression erfolgte in 6 L LB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp. Eine 150 mL Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert und damit die Hauptkultur inokuliert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert. Dann wurde die Kultur im Eisbad auf 18 °C gekühlt und die Proteinexpression durch Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 18–20 h bei 18 °C, 150 rpm inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (20 min, 5000 rpm, 4 °C) und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

8.4 Proteinaufreinigung

8.4.1 Vorbemerkungen

Alle folgenden Aufreinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der FPLC-Systeme ÄKTA pure und ÄKTAexplorer (GE Healthcare). Alle Pufferlösungen wurden vor ihrer Verwendung filtriert (0.2 µm). Die Reinheit und Identität der aufgereinigten Proteine wurde mittels SDS-PAGE^[150] und Färbung mit CBB sowie ESI-MS überprüft. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm mit einem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) oder BioPhotometer plus (Eppendorf) unter Verwendung der, für die einzelnen Proteine berechneten, molaren Extinktionskoeffizienten^[151] bestimmt.

8.4.2 hERβ LBD-Konstrukte

Zellyse. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄), 370 mM NaCl, 40 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0) resuspendiert, dispergiert und durch 10–12 Zyklen mit einem Hochdruckhomogenisator lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (45 min, 25000 rpm, 4 °C) abgetrennt.

Affinitätschromatographie. Der lösliche Überstand wurde filtriert (0.22 µm) und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.5 mL/min auf eine, mit Lysepuffer äquilibrierte, 10 mL Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow, Qiagen) geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Lysepuffer entfernt und die spezifisch gebundenen LBD-Konstrukte mit einem linearen Gradienten von 0–100 % Elutionspuffer (PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄), 370 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0) über 40 min eluiert. Die hERβ LBD enthaltenden Fraktionen des Hauptelutionspeaks wurden vereinigt und mit Hilfe einer Zentrifugeneinheit (Amicon Ultra, MWCO 10 kDa, Millipore) eingengt.

Die so erhaltenen Proteine wurden anschließend entweder mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt, direkt mit einem Fluorophor modifiziert oder der His₆-Affinitäts-Tag abgespalten.

Abspaltung des His₆-Affinitäts-Tags. Die vereinigten Fraktionen wurden dreimal für 1–2 h gegen Markierungspuffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7.4) dialysiert (MWCO 12–15 kDa). Anschließend wurde Thrombin zugegeben (1 U pro 100 µg Protein) und für 16–18 h auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von nicht-geschnittenem Protein

und freiem His₆-Tag, wurde die Proteinlösung nochmals über eine, mit Markierungspuffer äquilibrierte, 10 mL Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow, Qiagen) gereinigt. Der Durchfluss und die Waschfraktion, welche das gespaltene Protein enthielten, wurden gesammelt und vereinigt. Zur Entfernung von Thrombin aus der Proteinlösung, wurde diese anschließend über eine, mit Markierungspuffer äquilibrierte, 2 mL HiTrap Benzamidine FF-Säule (GE Healthcare) gereinigt. Dabei wurden wieder der Durchfluss sowie die Waschfraktion gesammelt und vereinigt.

Die so erhaltenen ERβ LBD-Konstrukte wurden anschließend mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt oder direkt mit den verschiedenen Fluorophoren markiert.

Größenausschlusschromatographie. Zur Abtrennung von Proteinaggregaten, wurden die hERβ LBD-Konstrukte mittels Größenausschlusschromatographie (HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade oder HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade, GE Healthcare) aufgetrennt. Dazu wurde die Probe auf ein für die verwendete Säule geeignetes Volumen eingengt (Amicon Ultra, MWCO 10 kDa, Millipore) und über die, mit ER-SE Puffer (20 mM TRIS, 25 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 0.05 % (w/v) β-OG, 1 mM DTT, pH 7.5) äquilibrierte Säule, mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min aufgetrennt. Fraktionen mit monomeren hERβ LBDs wurden vereinigt, mit einer Zentrifugeneinheit (Amicon Ultra, MWCO 10 kDa, Millipore) auf 50–150 μM eingengt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

8.4.3 Fluorophor-Markierung von hERβ LBD

Die hERβ LBD-Konstrukte wurden an einem oberflächenexponierten Cystein-Rest mit verschiedenen Cystein-reaktiven Fluorophoren markiert. Dazu wurden 1.1 Äquivalente Fluorophor (gelöst in DMSO oder DMF) in Markierungspuffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7.2) vorgelegt. Dann wurden die gereinigten hERβ LBD-Konstrukte zugegeben und auf Eis, im Dunkeln für 2–16 h inkubiert. Die finale Konzentration an DMSO oder DMF in der Reaktionslösung lag unter 0.5 %. Durch Zugabe von 1 mM DTT wurde überschüssiger Fluorophor abgefangen. Die Probe wurde eingengt (Amicon Ultra, MWCO 10 kDa, Millipore). Eventuell während der Markierungsreaktion entstandenes Präzipitat wurde durch Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Freier Fluorophor sowie oligomere Proteinaggregate wurden mittels Größenausschlusschromatographie über eine, mit ER-SE Puffer äquilibrierte, Säule (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare) von den markierten Proteinen abgetrennt. Die markierten hERβ LBD-Konstrukte wurden auf 30–150 μM konzentriert (Amicon Ultra, MWCO 10 kDa, Millipore), in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

8.4.4 p38 α MAP-Kinase

Für die Lyse der Zellen wurde das Pellet in dreifachem Überschuss Puffer NA (50 mM TRIS, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0) resuspendiert, Lysozym (0.5 mg/mL) und Benzonase (100 U/mL) zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde homogenisiert und die Zellen mit einem Hochdruckhomogenisator (10 Zyklen) durch Scherung lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden mittels Zentrifugation (45 min, 25000 rpm, 4 °C) abgetrennt und der lösliche Überstand filtriert (0.22 μ m).

Ni-Affinitätschromatographie. Das Zellysate wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.5 mL/min auf einer, mit Puffer NA äquilibrierten, 20 mL Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow, Qiagen) immobilisiert und mit Puffer NA gewaschen, um ungebundene Proteine abzutrennen. p38 α wurde anschließend mit einem linearen Imidazol-Gradienten von 0–100 % Puffer NB (50 mM TRIS, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.0) über 40 min eluiert und in 4 mL Fraktionen gesammelt.

Dialyse und Abspaltung des Affinitäts-Tags. Die proteinenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und dreimal für 1 h gegen Dialysepuffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.0) dialysiert (MWCO 12–15 kDa). Zur Abspaltung des Polyhistidin-Tags wurden 0.2 U Thrombin pro mg Protein zugegeben, über Nacht bei 4 °C inkubiert und dabei entstandenes Präzipitat durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C) entfernt.

Anionenaustauschchromatographie. Die Proteinlösung wurde eingeeengt (Amicon Ultra, MWCO 10 kDa, Millipore) und fünffach mit Puffer QA (25 mM HEPES, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.0) verdünnt. Das Protein wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.5 mL/min an eine äquilibrierte 2 mL Anionenaustauschermatrix (HiTrap Q FF, GE Healthcare) gebunden und mit Puffer QA gewaschen. Anschließend wurde p38 α mit einem linearen Gradienten von 0–100 % Puffer QB (25 mM HEPES, 1 M NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0) über 40 min eluiert und in 2 mL Fraktionen gesammelt.

Größenausschlusschromatographie. Um oligomere Proteinaggregate abzutrennen, wurde die Proteinlösung über eine, mit Puffer SE (20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.1) äquilibrierte, Größenausschlusschromatographiesäule (HiLoad 26/60 Superdex 75, GE Healthcare) gereinigt und das Eluat in 1 mL Fraktionen gesammelt. Fraktionen, die die monomere p38 α MAP-Kinase enthielten, wurden vereinigt. Die Proteinlösung wurde auf 14 mg/mL konzentriert (Amicon Ultra, MWCO 10 kDa, Millipore), direkt für Kristallisationsexperimente verwendet oder in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

8.5 Biochemische Charakterisierung

8.5.1 Circular dichroismus-Spektroskopie

Zur Untersuchung der Proteinfaltung und der Stabilität, wurden mittels CD-Spektroskopie der Sekundärstrukturgehalt sowie die Schmelztemperatur der hergestellten hER β LBD-Konstrukte bestimmt.

Dazu wurden die aufgereinigten hER β LBD-Konstrukte über Proteinentsalzungssäulen (Sephadex 25 PD-10, GE Healthcare oder Polyacrylamide Spin Desalting Columns, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben in CD-Puffer (20 mM NaH₂PO₄, pH 7.7) umgepuffert und die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Konzentration der Proben lag im Bereich von 5–60 μ M.

Die CD-Spektren wurden mit einem J-715 Spectropolarimeter (JASCO) und einer wasser-temperierten, zylindrischen QS Quarzküvette mit 0.01 cm oder 0.1 cm Schichtdicke (Hellma Analytics) aufgenommen. Die Küvetten wurden über einen Umwälzthermostat (polystat cc2, Huber) auf 20 °C temperiert. Für eine Messung wurden jeweils 5 *Scans* aufgenommen und gemittelt (260–190 nm, 1 nm Schritte, Scangeschwindigkeit 100 nm/min, *continuous scanning mode*). Die Spektren wurden mit der Spectra Manager Software (JASCO) ausgewertet. Dazu wurde von jedem Spektrum zunächst das Hintergrundsignal (CD-Puffer) abgezogen und die Elliptizität der mittleren relativen Molekülmasse der Peptidmonomere $[\theta]_{MR}$ ($\frac{\text{deg}\cdot\text{cm}^2}{\text{dmol}}$) nach folgender Gleichung berechnet, wobei θ_λ die molare Elliptizität bei der Wellenlänge λ (deg), d die Schichtdicke der Küvette (cm), c die Proteinkonzentration (mol/L) und n die Anzahl der Aminosäuren im Protein ist.

$$[\theta]_{MR} = \frac{\theta_\lambda}{10 \cdot (n - 1) \cdot d \cdot c} \quad (6)$$

Die Spektren wurden mit der Savitzky-Golay Methode^[152] geglättet (*convolution width*: 15). Der Gehalt an Sekundärstrukturelementen wurde mit dem Programm CDNN^[116] auf Grundlage von 13 Basis-Spektren berechnet.

Zur Untersuchung der Stabilität der hER β LBD Konstrukte, wurden CD-Spektren in einem Temperaturbereich von 20–85 °C aufgenommen. Die Küvette wurde dazu in konstanten Zeitabständen in 5–10 °C Schritten erhitzt und vor Aufnahme der Spektren jeweils 2 min äquilibriert. Von den erhaltenen Spektren wurden die, im gleichen Temperaturbereich durchgeführten Referenzmessungen (CD-Puffer) abgezogen und die Elliptizität, wie oben beschrieben, berechnet. Durch Auftragung der Elliptizität bei 222 nm ($\theta_{MR, 222nm}$) gegen die

Temperatur, konnten Schmelzkurven erhalten werden. Zur Abschätzung der Schmelztemperatur, wurde der Kurvenverlauf mit Origin 9.1 (Scientific Graphing and Analysis Software, OriginLab Corp.) an einen sigmoidalen zwei-Phasen-Kurvenverlauf gefittet (Gleichung 7), wobei der Wendepunkt x_0 der Schmelztemperatur (T_M) entspricht, bei der das Protein zu 50 % entfaltet vorliegt.

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}})} \quad (7)$$

A_1 = Startwert

A_2 = Endwert

x_0 = Wendepunkt

dx = Weite (Änderung in x, die zu signifikantester Änderung in y korrespondiert)

8.5.2 Tryptischer Verdau

Zur Überprüfung der Markierungspositionen, wurden die fluorophormarkierten hER β LBD FLiN-Konstrukte nach einem tryptischen Verdau mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Alle hierfür verwendeten Lösungsmittel hatten einen *LC-MS grade*-Reinheitsgrad. Die Lösungen wurden direkt vor ihrer Verwendung frisch angesetzt.

Für den tryptischen Verdau wurden jeweils 30 pmol der gereinigten und mit Fluorophor markierten hER β LBD FLiN-Konstrukte mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %iges Gel).^[150] Die Proteinbanden wurden mit Färbelösung (0.3 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 0.3 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) MeOH) angefärbt und die Gele über Nacht in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) EtOH) entfärbt. Die Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, zerkleinert und anschließend mit jeweils 200 μ L Waschlösung-I (3:1-Mischung aus 25 mM NH_4HCO_3 :Acetonitril) für 30 min bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Waschlösung-I wurde entfernt, 200 μ L Waschlösung-II (1:1-Mischung aus 25 mM NH_4HCO_3 :Acetonitril) zugegeben und für 15 min bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Waschlösung-II wurde gegen 100 μ L Reduktionslösung (50 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 -Lösung gelöst) ausgetauscht und 45 min bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Reduktionslösung wurde entfernt, 100 μ L Alkylierungslösung (55 mM Iodacetamid in 25 mM NH_4HCO_3 -Lösung gelöst) zugegeben und eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Alkylierungslösung wurde entfernt, zweimal für 15 min bei RT mit Waschlösung-II gewaschen und die Waschlösung entfernt. Durch Zugabe von 10 μ L Acetonitril wurden die Gelproben für 10 min dehydriert, die Flüssigkeit abgenommen und danach 10 min bei RT getrocknet. Zu den Gelstücken wurde jeweils 15 μ L Verdauungslösung (1:9-Mischung aus 0.1 μ g/ μ L Trypsin in 10 mM HCl:25 mM NH_4HCO_3) zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 20 μ L 25 mM NH_4HCO_3

wurden die Proben über Nacht bei 30 °C geschüttelt und die Reaktion durch Zugabe von 3.5 µL 10 % Trifluoressigsäure (TFA) in H₂O gestoppt. Die Proben wurden für 30 min bei 0 °C im Ultraschallbad behandelt und der Überstand abgenommen. Die Gelstücke wurden in 30 µL Acetonitril ausgequetscht und die Überstände vereinigt. Nach Trocknen der Proben in einem Vakuumkonzentrator, wurden diese bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

8.5.3 Massenspektrometrie

8.5.3.1 Analyse von Peptiden aus dem tryptischen Verdau

Die Proben des tryptischen Verdaus wurden von Dr. Petra Janning am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund vermessen und ausgewertet.

Die Analyse der Proben erfolgte mit einem Nano-(U)HPLC System mit Vorsäulen-Entsalzung (UltiMate™ 3000 RSLCnano system, Dionex), ausgestattet mit einer nano-HPLC Säule (Acclaim PepMap RSLC C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm ID × 25 cm, nanoViper, Dionex), einer Vorsäulen-Kartusche (Acclaim PepMap100 C18, 5 µm, 100 Å, 300 µm ID × 5 mm, Dionex) und einem nano-spray Emitter (Standard Coated SilicaTip™ Emitter, 360 µm OD, 20 µm ID, 10 µm Tip ID, 10.5 cm, New Objective), gekoppelt an ein Hochleistungs-Massenspektrometer für hochauflösende Messungen von Peptid-Massen und MS/MS Analysen (Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific) mit einer nano-spray Ionenquelle (Nanospray Flex Ion Source, Thermo Fisher Scientific)

Die Proben wurden aufgetaut, in 20 µL 0.1 % TFA in H₂O gelöst, für 15 min bei RT im Ultraschallbad behandelt und direkt vor der Analyse zentrifugiert (1 min, 15000 x g). Jeweils 3 µL Probe wurde in eine Vorsäulen-Kartusche injiziert und mit 0.1 % TFA in Wasser als Eluent bei einer Flussgeschwindigkeit von 30 µL/min über 5 min entsalzt. Die Proben wurden für die Analyse von der Vorsäule auf eine nano-HPLC Säule geladen.

Bei einer Flussgeschwindigkeit von 300 nL/min und einer Säulentemperatur von 40 °C, wurden die Proben mit einem Gradienten-Zyklus aus Lösungsmittel A (0.1 % (v/v) Ameisensäure in H₂O) und Lösungsmittel B (0.1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril) aufgetrennt. Dazu wurde ein linearer Gradient von 5–30 % Lösungsmittel B über 95 min durchgeführt. Danach wurde die Säule mit einem linearen Gradienten auf 60 % Lösungsmittel B über 5 min, gefolgt von 95 % Lösungsmittel B über weitere 5 min und anschließend konstanten Bedingungen über 5 min gewaschen. Das System wurde anschließend wieder auf die Startbedingung gesetzt und für 14 min äquilibriert. Während des gesamten Gradienten-Zyklus wurde eine typische *top 10 shotgun* Proteomics Methode zur MS und MS/MS Analyse angewendet. Für die *full scan* MS Experimente wurde der m/z-Massenbereich von 300 bis 1650 mit einer Auflösung von 70000 gescannt. Für die

anschließenden MS/MS Experimente wurden bis zu zehn HCD (*high energy collision dissociation*) MS/MS scans mit einer Auflösung von 17500 des intensivsten, mindestens doppelt geladenen Ions, durchgeführt.

Die gewonnenen Daten wurden mit MaxQuant ausgewertet.^[153] Die Spektren wurden gegen eine Datenbank mit den gesuchten Protein-Sequenzen sowie einer Kontaminations-Datenbank, mit einer *False Discovery Rate* (FDR) von 1 % auf Peptid- und Protein-Ebene unter Verwendung einer *Decoy*-Datenbank zur Bestimmung der FDR, analysiert. Bei der Datenbankanalyse wurden oxidierte Methioninreste, N-terminale Acetylierung von Proteinen, Carbamidomethylierung von Cystein-Resten und die Acrylodan-Markierung von Cystein-Resten als mögliche variable Modifikationen verwendet.

8.5.3.2 Analyse von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse der Proteine erfolgte mit einem 1100 HPLC-System (Agilent), gekoppelt an ein Massenspektrometer (Finnigan LCQ Advantage Max oder LTQ XL linear ion trap, Thermo Fisher Scientific) mit einer standard Elektrospray-Ionenquelle.

Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 30 °C mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.21 mL/min über 25 min über eine Vydac® 214TP C4 HPLC Säule (Abmessungen: 150 x 2.1 mm, Partikelgröße: 6 µm, GRACE). Jeweils 10 µL Proteinlösung wurden mit 80 % Lösungsmittel A (0.1 % TFA in H₂O) / 20 % Lösungsmittel B (0.1 % TFA in Acetonitril) über 5 min auf die Säule geladen und anschließend mit einem linearen Gradienten auf 30 % A über 10 min aufgetrennt. Die Säule wurde mit 10 % A (linearer Gradient über 2 min, anschließend 2 min konstant) gewaschen und wieder auf die Startbedingung äquilibriert (linearer Gradient auf 80 % A / 20 % B über 1 min, anschließend für 5 min konstant). Für die MS Experimente wurde während des gesamten Gradienten der m/z-Massenbereich von 700–2000 gescannt.

Die Auswertung und Dekonvolutierung der Massenspektren wurde mit Xcalibur 2.0.7 und MagTran 1.02^[154] oder ProMass Deconvolution 2.8 (Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt.

8.5.4 Kompetitiver ER Bindungsassay (PolarScreen™)

8.5.4.1 Grundlagen

Die *IC*₅₀-Werte der Testverbindungen für die verschiedenen ER Konstrukte wurden mit dem PolarScreen™ ER Beta Red Assay (life technologies) bestimmt. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven Bindungs-Assay, der auf der Detektion der Verdrängung eines fluoreszenten Liganden (*Fluormone-Tracer*) mittels Fluoreszenzpolarisation (FP) beruht (Abbildung 8.5.1). Dabei wird der Rezeptor zusammen mit dem *Tracer* sowie den zu untersuchenden

Testverbindungen inkubiert. Die Testverbindungen konkurrieren mit dem fluoreszenten *Tracer* um die Bindung in der Ligandenbindungstasche der LBD und können den *Tracer* vom Rezeptor verdrängen. Durch die Freisetzung des *Tracers* verringert sich die gemessene Polarisation, da dieser frei in Lösung schneller rotieren kann. Kommt es zu keiner Verdrängung des *Tracers* durch die Testverbindungen, wird durch die langsamere Rotation hingegen eine hohe Polarisation gemessen. Die relative Bindungsaffinität einer Testverbindung lässt sich so über die Änderungen der gemessenen Polarisation, in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der Testverbindung bestimmen.

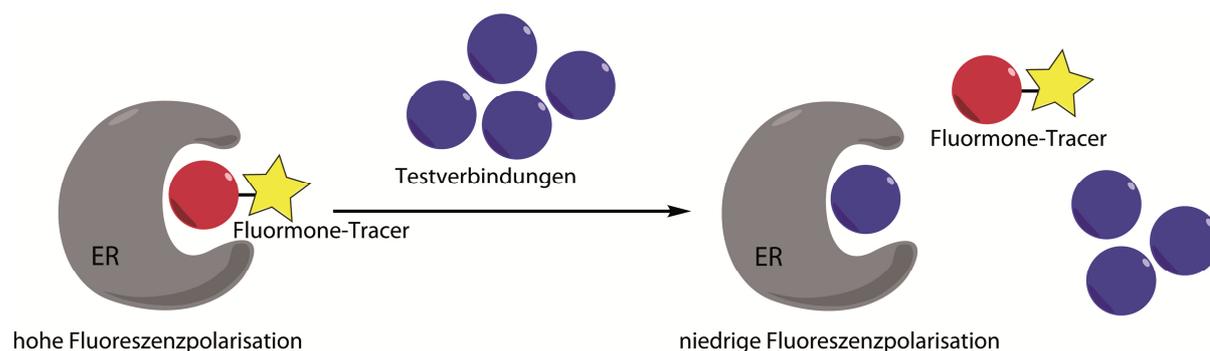


Abbildung 8.5.1. Schematische Darstellung des kompetitiven FP-Bindungsassays PolarScreen™ ER Beta Red.

8.5.4.2 IC_{50} -Messungen

Der PolarScreen™ ER Beta Red Assay (life technologies) wurde in schwarzen Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten und einem Kavitätvolumen von 25 μ L (black, small volume, round well, flat bottom, med. binding, 384 microtiter plates, Greiner BIO-ONE) durchgeführt und die Fluoreszenzpolarisation mit einem Infinite M1000 (Tecan) Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Alle aufgereinigten hER β LBD-Konstrukte wurden mit dem Assay charakterisiert und mit hER β wt Volllänge (life technologies) verglichen.

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der Testverbindungen für die verschiedenen hER β -Konstrukte, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Verbindungen in DMSO hergestellt. Die Verbindungen wurden dann 1:50 in ER Red Assaypuffer (20 mM HEPES, 10 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v) Ethylenglycol, 0.01 % (v/v) Triton X-100, 2 mM DTT, pH 8.0) vorverdünnt und 10 μ L in die Mikrotiterplatte überführt. Im Anschluss wurden 10 μ L des *Fluormone-Tracer*/ER-Komplexes (2.8 nM Fluormone EL Red Tracer, mit der zuvor bestimmten Konzentration der verschiedenen hER β LBD-Konstrukte (Tabelle 8.5.1, Seite 131) in Assaypuffer) zugegeben und für 2 h bei RT in einer Feuchtekammer im Dunkeln inkubiert. Die finale DMSO Konzentration im Assay betrug 1 %. Die Messung der Fluoreszenzpolarisation erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm (5 nm

Bandbreite) und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (20 nm Bandbreite). Zuvor wurde der Gerätefaktor (G) mit einer Fluorescein-Lösung zu 0.95 bestimmt. Aus den gemessenen Intensitäten der parallelen (I_{\parallel}) und perpendicularen Strahlung (I_{\perp}), konnte die Polarisation (P) nach folgender Gleichung ermittelt werden.

$$P = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}} \quad (8)$$

Durch graphische Auftragung der gemessenen Polarisation gegen die logarithmische Ligandenkonzentration, wurde ein sigmoidaler Kurvenverlauf erhalten. Durch Fitting der Daten an Gleichung 9 mit der Software *XLfit for Excel* (IDBS), konnte der IC_{50} -Wert für die Testverbindungen bestimmt werden. Dieser entspricht der Ligandenkonzentration am Wendepunkt der Kurve und gibt in einem Konkurrenzexperiment die Konzentration des Liganden an, bei der 50 % der spezifischen Bindung des *Tracers* verdrängt werden.

$$f(c_{L,0}) = T + \frac{B}{1 + \left(\frac{c_{L,0}}{IC_{50}}\right)^H} \quad (9)$$

$c_{L,0}$ = Ligandenkonzentration (total) T = obere Asymptote B = untere Asymptote

IC_{50} = Ligandenkonzentration bei halbmaximaler Verdrängung H = Hill-Koeffizient

8.5.4.3 Bestimmung der geeigneten Protein-Konzentration

Die Menge an aktivem Rezeptor kann zwischen verschiedenen Proteinpräparationen sowie den unterschiedlichen hER β LBD-Konstrukten variieren und korreliert nicht mit der Konzentration an Gesamtprotein in der Lösung. Außerdem kann die optimale Proteinkonzentration im PolarScreen™-Assay von dem verwendeten Mikrotiterplatten-Lesegerät abhängen. Daher wurde, vor der Charakterisierung der LBD-Konstrukte mit den Testverbindungen, für alle getesteten hER β -Konstrukte eine geeignete Proteinkonzentration im Assay nach Herstellerangaben bestimmt.

Dazu wurde die Polarisation des freien *Fluormone-Tracers* (1.4 nM in Assaypuffer) als minimales FP-Assay Signal sowie die Polarisation in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der verschiedenen hER β -Konstrukte (maximales FP-Assay Signal) bestimmt. Aus den Daten wurde der Z'-Faktor^[121] für den Assay nach folgender Gleichung mit μ_p = Mittelwert der Positivkontrolle (*Tracer* + ER), μ_n = Mittelwert der Negativkontrolle (freier *Tracer*), σ_p = Standardabweichung der Positivkontrolle (*Tracer* + ER) und σ_n = Standardabweichung der Negativkontrolle (freier *Tracer*) berechnet. Die

Proteinkonzentration im Assay wurde so gewählt, dass der Z'-Faktor über 0.5 lag (Tabelle 8.5.1).

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (10)$$

Tabelle 8.5.1. Konzentration der verschiedenen hER β -Konstrukte im PolarScreen™-Assay.

Protein	Konzentration im Tracer/ER-Mix	Konzentration im Assay
hERβ wt Volllänge	176.4 nM	88.2 nM
hERβ LBD (pMW05)	1000 nM	500 nM
hERβ LBD-FLiN1 (pMW08)	1000 nM	500 nM
hERβ LBD-FLiN2 (pMW09)	2000 nM	1000 nM
hERβ LBD-FLiN3 (pMW10)	2000 nM	1000 nM
hERβ LBD-FLiN4 (pMW11)	1000 nM	500 nM
hERβ LBD-FLiN5 (pMW12)	2000 nM	1000 nM
hERβ LBD-FLiN6 (pMW14)	2000 nM	1000 nM
hERβ LBD-FLiN7 (pMW15)	2000 nM	1000 nM
hERβ LBD-FLiN8 (pMW16)	2000 nM	1000 nM

8.6 FLiN-Assay

Die FLiN-Assay Experimente wurden sowohl in Mikrotiterplatten, zur Messung von Fluoreszenzspektren und zur Bestimmung von K_d -Werten im Hochdurchsatzformat, als auch in Küvetten, für die Messung von Bindungskinetiken und Fluoreszenzspektren, durchgeführt.

8.6.1 Messung von Fluoreszenzspektren in Mikrotiterplatten

Um zu untersuchen, wie sich die verschiedenen hER β LBD-Konstrukte im FLiN Assay verhalten, wurden Fluoreszenzspektren der markierten LBD-Konstrukte ohne sowie in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Testverbindungen in schwarzen Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten und einem Kavitätvolumen von 25 μ L (black, small volume, round well, flat bottom, med. binding, 384 microtiter plates; Greiner BIO-ONE) aufgenommen. Dazu wurden die fluorophormarkierten FLiN-Konstrukte in FLiN-Puffer auf 200 nM verdünnt. Zwei verschiedene Puffersysteme wurden in den Experimenten getestet:

FLiN-Puffer 1: 20 mM HEPES, 10 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v) Ethylenglycol, 0.01 % (v/v) Triton X-100, pH 8.0 (\pm 1 mM DTT oder 1 mM TCEP)

FLiN-Puffer 2: 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5 (\pm 1 mM DTT oder 1 mM TCEP)

Von allen zu untersuchenden Testverbindungen wurde eine DMSO-Verdünnungsreihe angefertigt und diese nochmals 1:5 im entsprechenden FLiN-Puffer vorverdünnt. Jeweils 9.5 μ L des verdünnten FLiN-Konstrukts wurden der Mikrotiterplatte vorgelegt und 0.5 μ L der vorverdünnten Testverbindungen zugegeben, was einer Proteinkonzentration von 190 nM und einer DMSO-Konzentration von 1 % im Assay entsprach. Als Negativkontrolle diente 1 % DMSO. Das Hintergrundsignal wurde analog mit einer Mischung aus 9.5 μ L FLiN-Puffer mit 0.5 μ L der Testverbindungen ermittelt. Zur Durchmischung wurden die Platten sofort für 30 s bei 1200 rpm auf einem Orbitalschüttler (MixMate, Eppendorf) geschüttelt und anschließend in einer Feuchtekammer im Dunkeln für 30 min bei RT inkubiert. Die Messung der Fluoreszenzspektren erfolgte mit einem Infinite M1000 (Tecan) Mikrotiterplatten-Lesegerät. Die dafür ermittelten Geräteeinstellungen sind Tabelle 8.6.1 zu entnehmen.

Tabelle 8.6.1. Übersicht der Geräteparameter des Infinite M1000 (Tecan) für die Messung von FLiN-Spektren.

Parameter	Wert
Messmethode	<i>Fluorescence Top Reading</i>
λ_{ex} Acrylodan (Bandbreite)	386 nm (5 nm)
λ_{ex} Atto 565 (Bandbreite)	559 nm (5 nm)
λ_{ex} Atto 610 (Bandbreite)	606 nm (5 nm)
λ_{ex} DY-647 (Bandbreite)	640 nm (5 nm)
λ_{ex} PyMPO (Bandbreite)	419 nm (5 nm)
λ_{ex} Texas Red (Bandbreite)	586 nm (5 nm)
λ_{em} Acrylodan (Bandbreite)	410 nm–560 nm (10 nm)
λ_{em} Atto 565 (Bandbreite)	580 nm–720 nm (10 nm)
λ_{em} Atto 610 (Bandbreite)	618 nm–740 nm (10 nm)
λ_{em} DY-647 (Bandbreite)	655 nm–760 nm (10 nm)
λ_{em} PyMPO (Bandbreite)	445 nm–650 nm (10 nm)
λ_{em} Texas Red (Bandbreite)	600 nm–720 nm (10 nm)
Schrittweite	1 nm–2 nm
Gain	für jede Platte optimiert
Anzahl Flashes	50
Flash Frequenz	100 Hz
Integrationszeit	20 μs
Z-Position	24466 μm

8.6.2 K_d -Messungen in Mikrotiterplatten

Die Bestimmung von K_d -Werten für die Testverbindungen in Mikrotiterplatten erfolgte wie unter Kapitel 8.6.1 für die Messung von Fluoreszenzspektren beschrieben. Anstelle des gesamten Fluoreszenzspektrums wurde hier jedoch nur die Fluoreszenzintensität bei einzelnen Wellenlängen ausgelesen (Tabelle 8.6.2).

Tabelle 8.6.2. Übersicht der Geräteparameter des Infinite M1000 (Tecan) für FLiN K_d -Messungen.

Parameter	Wert
Messmethode	<i>Fluorescence Top Reading</i>
λ_{ex} Acrylodan (Bandbreite)	386 nm (5 nm)
λ_{ex} Atto 565 (Bandbreite)	559 nm (5 nm)
λ_{ex} Atto 610 (Bandbreite)	606 nm (5 nm)
λ_{ex} DY-647 (Bandbreite)	640 nm (5 nm)
λ_{ex} PyMPO (Bandbreite)	419 nm (5 nm)
λ_{ex} Texas Red (Bandbreite)	586 nm (5 nm)
λ_{em} Acrylodan (Bandbreite)	445 nm (10 nm)
	451 nm (10 nm)
	478 nm (10 nm)
	520 nm (10 nm)
λ_{em} Atto 565 (Bandbreite)	590 nm (10 nm)
	624 nm (10 nm)
λ_{em} Atto 610 (Bandbreite)	625 nm (10 nm)
	640 nm (10 nm)
	665 nm (10 nm)
	680 nm (10 nm)
λ_{em} DY-647 (Bandbreite)	670 nm (10 nm)
	692 nm (10 nm)
λ_{em} PyMPO (Bandbreite)	513 nm (10 nm)
	563 nm (10 nm)
	630 nm (10 nm)
λ_{em} Texas Red (Bandbreite)	613 nm (10 nm)
	635 nm (10 nm)
	647 nm (10 nm)
Gain	für jede Platte optimiert
Anzahl Flashes	50
Flash Frequenz	100 Hz
Integrationszeit	20 μs
Z-Position	24466 μm

Der Z' -Faktor des Assays wurde mit DMSO als Negativkontrolle sowie 20 μM der Testverbindungen als Positivkontrollen bestimmt (siehe Gleichung 1, Abschnitt 3.7.1). Zur Ermittlung der Bindungsaffinitäten der Testverbindungen wurde das jeweils gewählte Assay-Signal gegen die logarithmisch dargestellte Ligandenkonzentration aufgetragen und der K_d durch fitten an einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Gleichung 11) bestimmt.

$$(c_{L,0}) = T + \frac{B}{1 + \left(\frac{c_{L,0}}{K_d}\right)^H} \quad (11)$$

$c_{L,0}$ = Ligandenkonzentration (total) T = obere Asymptote

B = untere Asymptote

K_d = Gleichgewichtsdissoziationskonstante

H = Hill-Koeffizient

8.6.3 FLiN-Messungen in Küvetten

Die FLiN-Messungen in Küvetten wurden mit einem Fluoromax-4 Spectrofluorometer (HORIBA), das mit einem Umlaufthermostat (F12-ED, Julabo) zur Temperierung der Proben ausgestattet war, aufgenommen. Alle Messungen wurden bei 20 °C in 4.5 mL Polystyrol Einmal-UV-Küvetten (Carl Roth) durchgeführt. Das mit Acrylodan markierte Konstrukt hER β LBD-FLiN 7 wurde in FLiN-Puffer 2 (ohne Reduktionsmittel) auf 50 nM verdünnt und jeweils 3 mL der Proteinlösung in eine Küvette gegeben.

Zur Messung von Fluoreszenzspektren und K_d -Werten, wurden die Testverbindungen in DMSO verdünnt und schrittweise zu dem Rezeptor gegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Probe gut durchmischt, für 5 min im Dunkeln bei 20 °C inkubiert und ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen (Parameter siehe Tabelle 8.6.3). Die Gesamtkonzentration an DMSO in der Probe nach der letzten Zugabe an Testverbindung lag unter 1.5 %. Die gemessenen Rohdaten wurden mit gerätespezifischen Faktoren korrigiert, um Abweichungen in der Sensitivität des Systems über den Messbereich auszugleichen und die Daten aus jeweils drei akkumulierten Spektren wurden gemittelt.

Tabelle 8.6.3. Übersicht der Geräteparameter des Fluoromax-4 Spectrofluorometers für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren in Küvetten.

Parameter	Wert
λ_{ex} (Bandbreite)	386 nm (4 nm)
λ_{em} (Bandbreite)	410 nm–560 nm (3 nm)
Integrationszeit	0.1 s
Schrittweite	1 nm
Akkumulierte Spektren	3

Zur Untersuchung der Bindungskinetik wurden zeitaufgelöste Messungen bei einer konstanten Emissionswellenlänge durchgeführt. Die Wellenlänge wurde dabei so gewählt, dass bei Zugabe eines Agonisten oder Antagonisten möglichst große Änderungen des Signals auftreten. Jeweils 3 mL einer 50 nM Proteinlösung (s.o.) wurden zusammen mit einem Mini-Rührfisch in eine Küvette gegeben. Die gesamte Messung wurde unter konstantem Rühren der Probe durchgeführt. Die Testverbindungen wurden in DMSO vorverdünnt und die Messung gestartet (siehe Tabelle 8.6.4). Nach dem Erreichen eines stabilen Ausgangs-Signals (nach ca. 30–60 s) wurden die Testverbindungen über einen speziellen Probenzugang im Dunkeln in die Küvette gegeben, um die Assoziation mit dem Rezeptor zu verfolgen. Nach Einstellung eines Gleichgewichtszustandes (konstantes Signal), wurde, durch Zugabe von 1 μM nicht-fluorophormarkierter hER β LBD wt und Messung bis zum erneuten Erreichen eines Gleichgewichtszustandes, die Dissoziation vom Rezeptor untersucht. Die Konzentration an DMSO in der Küvette lag bei allen Messungen zwischen 0.1 % und 1 %.

Tabelle 8.6.4. Übersicht der Geräteparameter des Fluoromax-4 Spectrofluorometers für die Aufnahme von zeitaufgelösten FLiN-Messungen in Küvetten.

Parameter	Wert
λ_{ex} (Bandbreite)	386 nm (4 nm)
λ_{em} (Bandbreite)	460 nm (3 nm) für OHT 440 nm (3 nm) für DES
Integrationszeit	0.1 s
Messintervall	0.5 s

8.7 Strukturbiologische Untersuchungen

8.7.1 Kristallisation

Zur Ausbildung des Protein–Inhibitor-Komplexes wurde 1 mM Inhibitor mit 14 mg/mL p38 α MAPK (in 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.1) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Eventuell entstandenes Proteinpräzipitat sowie unlöslicher Inhibitor wurde durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 13000 rpm, 4 °C). Die Ko-Kristalle wurden durch Mischung von 1.5 μ L Protein–Inhibitorlösung mit jeweils 0.5 μ L Reservoirlösung (100 mM MES pH 6.0–6.3, 22–27 % (v/v) PEG4000, 50 mM β -OG) mit der Dampfdiffusionsmethode im hängenden Tropfen in EasyXtal Kristallisationsplatten bei 20 °C innerhalb einer Woche erhalten. Die nadelförmigen Kristalle wurden für einige Sekunden in eine cryogene Lösung (Reservoirlösung mit 25 % (v/v) PEG400) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

8.7.2 Röntgenbeugungsexperimente und Strukturlösung

Die Diffraktionsdaten wurden am Synchrotron des Paul Scherrer Instituts (SLS, Villingen, Schweiz) mit der PX10SA Röntgenquelle mit einer Röntgenstrahlwellenlänge von ~ 1 Å aufgenommen. Die erhaltenen Datensätze wurden mit XDS^[155] und XSCALE^[155] prozessiert und skaliert.

Die p38 α -Inhibitor Komplexstrukturen wurden durch molekularen Ersatz mit PHASER^[156] unter Verwendung einer publizierten p38 α MAPK Templatstruktur (PDB-Eintrag: 3QUE)^[143b] gelöst. Für alle gelösten Strukturen befand sich ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Das erhaltene Model wurde mit CNS^[157] und REFMAC5^[158] verfeinert. Das Strukturmodel wurde mit COOT^[159] an die Elektronendichte angepasst und final mit REFMAC5 verfeinert. Die Topologiedaten der Inhibitoren wurden mit dem Dundee PRODRG2 Server^[160] generiert. Anschließend wurden die erhaltenen Strukturen mit PROCHECK^[161] oder COOT analysiert. Detaillierte Informationen zur Verfeinerung und Ramachandran-Statistiken sind in Abschnitt 4.4 aufgeführt.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahmad, E.; Rabbani, G.; Zaidi, N.; Khan, M. A.; Qadeer, A.; Ishtikhar, M.; Singh, S.; Khan, R. H. Revisiting ligand-induced conformational changes in proteins: essence, advancements, implications and future challenges. *J Biomol Struct Dyn*, **2013**, 31, 630-48.
2. Rauch, J.; Volinsky, N.; Romano, D.; Kolch, W. The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal*, **2011**, 9, 23.
3. a) Rodriguez, J. Crespo, P. Working without kinase activity: phosphotransfer-independent functions of extracellular signal-regulated kinases. *Sci Signal*, **2011**, 4, re3; b) Hari, S. B.; Merritt, E. A.; Maly, D. J. Conformation-selective ATP-competitive inhibitors control regulatory interactions and noncatalytic functions of mitogen-activated protein kinases. *Chem Biol*, **2014**, 21, 628-35.
4. Vivanco, I.; Chen, Z. C.; Tanos, B.; Oldrini, B.; Hsieh, W. Y.; Yannuzzi, N.; Campos, C.; Mellinshoff, I. K. A kinase-independent function of AKT promotes cancer cell survival. *Elife*, **2014**, 3.
5. Pike, A. C. Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **2006**, 20, 1-14.
6. Tong, M. Seeliger, M. A. Targeting conformational plasticity of protein kinases. *ACS Chem Biol*, **2015**, 10, 190-200.
7. Fang, Z.; Grütter, C.; Rauh, D. Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploiting exclusive structural features. *ACS Chem Biol*, **2013**, 8, 58-70.
8. Xiao, X.; Wang, P.; Chou, K. C. Recent progresses in identifying nuclear receptors and their families. *Curr Top Med Chem*, **2013**, 13, 1192-200.
9. Helsen, C. Claessens, F. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol Cell Endocrinol*, **2014**, 382, 97-106.
10. Shi, Y. Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov Today*, **2007**, 12, 440-5.
11. a) Novac, N. Heinzl, T. Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **2004**, 3, 335-46; b) Bonet, M. L.; Ribot, J.; Felipe, F.; Palou, A. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci*, **2003**, 60, 1311-21.
12. a) Wang, K. Wan, Y. J. Nuclear receptors and inflammatory diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*, **2008**, 233, 496-506; b) Shao, W. Brown, M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*, **2004**, 6, 39-52; c) Hansen, M. K. Connolly, T. M. Nuclear receptors as drug targets in obesity, dyslipidemia and atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs*, **2008**, 9, 247-55; d) Staudinger, J. L. Lichti, K. Cell signaling and nuclear receptors: new opportunities for molecular pharmaceuticals in liver disease. *Mol Pharm*, **2008**, 5, 17-34.
13. a) Yki-Jarvinen, H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*, **2004**, 351, 1106-18; b) Howell, S. J.; Johnston, S. R.; Howell, A. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **2004**, 18, 47-66.
14. a) Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **1995**, 83, 835-9; b) Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol*, **1996**, 3, 529-36; c) Germain, P.; Staels, B.; Dacquet, C.; Spedding, M.; Laudet, V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, **2006**, 58, 685-704.

15. a) Deegan, B. J.; Bhat, V.; Seldeen, K. L.; McDonald, C. B.; Farooq, A. Genetic variations within the ERE motif modulate plasticity and energetics of binding of DNA to the ERalpha nuclear receptor. *Arch Biochem Biophys*, **2011**, 507, 262-70; b) Meijsing, S. H.; Elbi, C.; Luecke, H. F.; Hager, G. L.; Yamamoto, K. R. The ligand binding domain controls glucocorticoid receptor dynamics independent of ligand release. *Mol Cell Biol*, **2007**, 27, 2442-51; c) Margeat, E.; Bourdoncle, A.; Margueron, R.; Poujol, N.; Cavailles, V.; Royer, C. Ligands differentially modulate the protein interactions of the human estrogen receptors alpha and beta. *J Mol Biol*, **2003**, 326, 77-92.
16. a) Claessens, F.; Gewirth, D. T. DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem*, **2004**, 40, 59-72; b) Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci*, **2001**, 26, 384-90.
17. Chandra, V.; Huang, P.; Hamuro, Y.; Raghuram, S.; Wang, Y.; Burris, T. P.; Rastinejad, F. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, **2008**, 456, 350-6.
18. Chandra, V.; Huang, P.; Potluri, N.; Wu, D.; Kim, Y.; Rastinejad, F. Multidomain integration in the structure of the HNF-4alpha nuclear receptor complex. *Nature*, **2013**, 495, 394-8.
19. a) Farboud, B.; Privalsky, M. L. Retinoic acid receptor-alpha is stabilized in a repressive state by its C-terminal, isotype-specific F domain. *Mol Endocrinol*, **2004**, 18, 2839-53; b) Ruff, M.; Gangloff, M.; Wurtz, J. M.; Moras, D. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res*, **2000**, 2, 353-9.
20. a) Wärnmark, A.; Treuter, E.; Wright, A. P.; Gustafsson, J. A. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol*, **2003**, 17, 1901-9; b) Lavery, D. N.; McEwan, I. J. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J*, **2005**, 391, 449-64.
21. a) Helsen, C.; Kerkhofs, S.; Clinckemalie, L.; Spans, L.; Laurent, M.; Boonen, S.; Vanderschueren, D.; Claessens, F. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. *Mol Cell Endocrinol*, **2012**, 348, 411-7; b) van de Wijngaert, D. J.; Dubbink, H. J.; van Royen, M. E.; Trapman, J.; Jenster, G. Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. *Mol Cell Endocrinol*, **2012**, 352, 57-69.
22. a) Luisi, B. F.; Xu, W. X.; Otwinowski, Z.; Freedman, L. P.; Yamamoto, K. R.; Sigler, P. B. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, **1991**, 352, 497-505; b) Schwabe, J. W.; Chapman, L.; Finch, J. T.; Rhodes, D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, **1993**, 75, 567-78.
23. a) Clinckemalie, L.; Vanderschueren, D.; Boonen, S.; Claessens, F. The hinge region in androgen receptor control. *Mol Cell Endocrinol*, **2012**, 358, 1-8; b) Anbalagan, M.; Huderson, B.; Murphy, L.; Rowan, B. G. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal*, **2012**, 10, e001.
24. a) Daniel, A. R.; Gaviglio, A. L.; Czaplicki, L. M.; Hillard, C. J.; Housa, D.; Lange, C. A. The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention. *Mol Endocrinol*, **2010**, 24, 2126-38; b) Tanner, T. M.; Denayer, S.; Geverts, B.; Van Tilborgh, N.; Kerkhofs, S.; Helsen, C.; Spans, L.; Dubois, V.; Houtsmuller, A. B.; Claessens, F.; Haelens, A. A 629RKLKK633 motif in the hinge region controls the androgen receptor at multiple levels. *Cell Mol Life Sci*, **2010**, 67, 1919-27.
25. Wurtz, J. M.; Bourguet, W.; Renaud, J. P.; Vivat, V.; Chambon, P.; Moras, D.; Gronemeyer, H. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol*, **1996**, 3, 87-94.

26. Bourguet, W.; Ruff, M.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*, **1995**, 375, 377-82.
27. a) Brzozowski, A. M.; Pike, A. C.; Dauter, Z.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Engstrom, O.; Ohman, L.; Greene, G. L.; Gustafsson, J. A.; Carlquist, M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **1997**, 389, 753-8; b) Parker, M. G. White, R. Nuclear receptors spring into action. *Nat Struct Biol*, **1996**, 3, 113-5; c) Heldring, N.; Pawson, T.; McDonnell, D.; Treuter, E.; Gustafsson, J. A.; Pike, A. C. Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors. *J Biol Chem*, **2007**, 282, 10449-55.
28. Green, S.; Walter, P.; Kumar, V.; Krust, A.; Bornert, J. M.; Argos, P.; Chambon, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, **1986**, 320, 134-9.
29. Jensen, E. V. Jordan, V. C. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res*, **2003**, 9, 1980-9.
30. Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**, 93, 5925-30.
31. Paterni, I.; Granchi, C.; Katzenellenbogen, J. A.; Minutolo, F. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*, **2014**.
32. a) Htun, H.; Holth, L. T.; Walker, D.; Davie, J. R.; Hager, G. L. Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell*, **1999**, 10, 471-86; b) Stenoien, D. L.; Mancini, M. G.; Patel, K.; Allegretto, E. A.; Smith, C. L.; Mancini, M. A. Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol*, **2000**, 14, 518-34.
33. Echeverria, P. C. Picard, D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim Biophys Acta*, **2010**, 1803, 641-9.
34. Lonard, D. M. O'Malley, B. W. The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell*, **2006**, 125, 411-4.
35. a) Webb, P.; Nguyen, P.; Valentine, C.; Lopez, G. N.; Kwok, G. R.; McInerney, E.; Katzenellenbogen, B. S.; Enmark, E.; Gustafsson, J. A.; Nilsson, S.; Kushner, P. J. The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol*, **1999**, 13, 1672-85; b) Webb, P.; Lopez, G. N.; Uht, R. M.; Kushner, P. J. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol*, **1995**, 9, 443-56; c) Porter, W.; Saville, B.; Hoivik, D.; Safe, S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol*, **1997**, 11, 1569-80; d) Sun, G.; Porter, W.; Safe, S. Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex. *Mol Endocrinol*, **1998**, 12, 882-90; e) Safe, S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm*, **2001**, 62, 231-52; f) Galien, R. Garcia, T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res*, **1997**, 25, 2424-9.
36. Cheskis, B. J.; Greger, J. G.; Nagpal, S.; Freedman, L. P. Signaling by estrogens. *J Cell Physiol*, **2007**, 213, 610-7.
37. Roman-Blas, J. A.; Castaneda, S.; Largo, R.; Herrero-Beaumont, G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther*, **2009**, 11, 241.
38. Kumar, V.; Green, S.; Stack, G.; Berry, M.; Jin, J. R.; Chambon, P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, **1987**, 51, 941-51.

39. Ogawa, S.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Hiroi, H.; Orimo, A.; Hosoi, T.; Ouchi, Y.; Muramatsu, M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **1998**, 243, 122-6.
40. Gustafsson, J. A. Estrogen receptor beta - a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*, **1999**, 163, 379-83.
41. Pike, A. C.; Brzozowski, A. M.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Thorsell, A. G.; Engstrom, O.; Ljunggren, J.; Gustafsson, J. A.; Carlquist, M. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J*, **1999**, 18, 4608-18.
42. Pike, A. C.; Brzozowski, A. M.; Hubbard, R. E. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2000**, 74, 261-8.
43. Kuiper, G. G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, **1997**, 138, 863-70.
44. Darimont, B. D.; Wagner, R. L.; Apriletti, J. W.; Stallcup, M. R.; Kushner, P. J.; Baxter, J. D.; Fletterick, R. J.; Yamamoto, K. R. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev*, **1998**, 12, 3343-56.
45. Heery, D. M.; Kalkhoven, E.; Hoare, S.; Parker, M. G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, **1997**, 387, 733-6.
46. Nolte, R. T.; Wisely, G. B.; Westin, S.; Cobb, J. E.; Lambert, M. H.; Kurokawa, R.; Rosenfeld, M. G.; Willson, T. M.; Glass, C. K.; Milburn, M. V. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, **1998**, 395, 137-43.
47. a) Horwitz, K. B.; Jackson, T. A.; Bain, D. L.; Richer, J. K.; Takimoto, G. S.; Tung, L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol*, **1996**, 10, 1167-77; b) Freedman, L. P. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell*, **1999**, 97, 5-8; c) Xu, L.; Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev*, **1999**, 9, 140-7.
48. McKenna, N. J.; Lanz, R. B.; O'Malley, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, **1999**, 20, 321-44.
49. Pike, A. C.; Brzozowski, A. M.; Walton, J.; Hubbard, R. E.; Thorsell, A. G.; Li, Y. L.; Gustafsson, J. A.; Carlquist, M. Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. *Structure*, **2001**, 9, 145-53.
50. Tanenbaum, D. M.; Wang, Y.; Williams, S. P.; Sigler, P. B. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**, 95, 5998-6003.
51. Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **1998**, 95, 927-37.
52. a) McDonnell, D. P.; Connor, C. E.; Wijayarathne, A.; Chang, C. Y.; Norris, J. D. Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators. *Recent Prog Horm Res*, **2002**, 57, 295-316; b) Kremoser, C.; Albers, M.; Burris, T. P.; Deuschle, U.; Koegl, M. Panning for SNUReMs: using cofactor profiling for the rational discovery of selective nuclear receptor modulators. *Drug Discov Today*, **2007**, 12, 860-9.
53. a) Lavinsky, R. M.; Jepsen, K.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Mullen, T. M.; Schiff, R.; Del-Rio, A. L.; Ricote, M.; Ngo, S.; Gemsch, J.; Hilsenbeck, S. G.; Osborne, C. K.; Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G.; Rose, D. W. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor

- recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1998**, 95, 2920-5;
- b) Shang, Y.; Hu, X.; DiRenzo, J.; Lazar, M. A.; Brown, M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*, **2000**, 103, 843-52; c) Shang, Y.; Brown, M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*, **2002**, 295, 2465-8.
54. Xu, H. E.; Stanley, T. B.; Montana, V. G.; Lambert, M. H.; Shearer, B. G.; Cobb, J. E.; McKee, D. D.; Galardi, C. M.; Plunket, K. D.; Nolte, R. T.; Parks, D. J.; Moore, J. T.; Klierer, S. A.; Willson, T. M.; Stimmel, J. B. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature*, **2002**, 415, 813-7.
55. a) Jung, D. J.; Lee, S. K.; Lee, J. W. Agonist-dependent repression mediated by mutant estrogen receptor alpha that lacks the activation function 2 core domain. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 37280-3; b) Webb, P.; Nguyen, P.; Kushner, P. J. Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. *J Biol Chem*, **2003**, 278, 6912-20.
56. Shiau, A. K.; Barstad, D.; Radek, J. T.; Meyers, M. J.; Nettles, K. W.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A.; Agard, D. A.; Greene, G. L. Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. *Nat Struct Biol*, **2002**, 9, 359-64.
57. Goss, P. E. Emerging role of aromatase inhibitors in the adjuvant setting. *Am J Clin Oncol*, **2003**, 26, S27-33.
58. Maximov, P. Y.; Lee, T. M.; Jordan, V. C. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Curr Clin Pharmacol*, **2013**, 8, 135-55.
59. Strasser-Weippl, K.; Goss, P. E. Advances in adjuvant hormonal therapy for postmenopausal women. *J Clin Oncol*, **2005**, 23, 1751-9.
60. a) Johnson, M. D.; Zuo, H.; Lee, K. H.; Trebley, J. P.; Rae, J. M.; Weatherman, R. V.; Desta, Z.; Flockhart, D. A.; Skaar, T. C. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*, **2004**, 85, 151-9; b) Lim, Y. C.; Desta, Z.; Flockhart, D. A.; Skaar, T. C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol*, **2005**, 55, 471-8; c) Lim, Y. C.; Li, L.; Desta, Z.; Zhao, Q.; Rae, J. M.; Flockhart, D. A.; Skaar, T. C. Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **2006**, 318, 503-12.
61. a) Perez, E. A. Safety profiles of tamoxifen and the aromatase inhibitors in adjuvant therapy of hormone-responsive early breast cancer. *Ann Oncol*, **2007**, 18 Suppl 8, viii26-35; b) Melnikow, J.; Kuenneth, C.; Helms, L. J.; Barnato, A.; Kuppermann, M.; Birch, S.; Nuovo, J. Chemoprevention: drug pricing and mortality: the case of tamoxifen. *Cancer*, **2006**, 107, 950-8.
62. a) Ettinger, B.; Black, D. M.; Mitlak, B. H.; Knickerbocker, R. K.; Nickelsen, T.; Genant, H. K.; Christiansen, C.; Delmas, P. D.; Zanchetta, J. R.; Stakkestad, J.; Gluer, C. C.; Krueger, K.; Cohen, F. J.; Eckert, S.; Ensrud, K. E.; Avioli, L. V.; Lips, P.; Cummings, S. R. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA*, **1999**, 282, 637-45; b) Delmas, P. D.; Bjarnason, N. H.; Mitlak, B. H.; Ravoux, A. C.; Shah, A. S.; Huster, W. J.; Draper, M.; Christiansen, C. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med*, **1997**, 337, 1641-7; c) Howell, A.; Anderson, A. S.; Clarke, R. B.; Duffy, S. W.; Evans, D.; Garcia-Closas, M.; Gescher, A. J.; Key, T. J.; Saxton, J. M.; Harvie, M. N. Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res*, **2014**, 16, 446; d) Barrett-Connor, E.; Mosca, L.; Collins, P.; Geiger, M. J.; Grady, D.; Kornitzer, M.;

- McNabb, M. A.; Wenger, N. K.; Raloxifene Use for The Heart (RUTH) Trial Investigators. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*, **2006**, 355, 125-37.
63. a) Pinkerton, J. V.; Thomas, S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2014**, 142, 142-54; b) Peterson, G. M.; Naunton, M.; Tichelaar, L. K.; Gennari, L. Lasofoxifene: selective estrogen receptor modulator for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ann Pharmacother*, **2011**, 45, 499-509; c) DeGregorio, M. W.; Zerbe, R. L.; Wurz, G. T. Ospemifene: a first-in-class, non-hormonal selective estrogen receptor modulator approved for the treatment of dyspareunia associated with vulvar and vaginal atrophy. *Steroids*, **2014**, 90, 82-93.
64. Robertson, J. F. Faslodex (ICI 182, 780), a novel estrogen receptor downregulator - future possibilities in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2001**, 79, 209-12.
65. Howell, A.; Osborne, C. K.; Morris, C.; Wakeling, A. E. ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer*, **2000**, 89, 817-25.
66. a) Howell, A.; DeFriend, D. J.; Robertson, J. F.; Blamey, R. W.; Anderson, L.; Anderson, E.; Sutcliffe, F. A.; Walton, P. Pharmacokinetics, pharmacological and anti-tumour effects of the specific anti-oestrogen ICI 182780 in women with advanced breast cancer. *Br J Cancer*, **1996**, 74, 300-8; b) Wakeling, A. E.; Bowler, J. Steroidal pure antiestrogens. *J Endocrinol*, **1987**, 112, R7-10.
67. a) Howell, A.; Robertson, J. F.; Quaresma Albano, J.; Aschermannova, A.; Mauriac, L.; Kleeberg, U. R.; Vergote, I.; Erikstein, B.; Webster, A.; Morris, C. Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol*, **2002**, 20, 3396-403; b) Howell, A.; Robertson, J. F.; Abram, P.; Lichinitser, M. R.; Elledge, R.; Bajetta, E.; Watanabe, T.; Morris, C.; Webster, A.; Dimery, I.; Osborne, C. K. Comparison of fulvestrant versus tamoxifen for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women previously untreated with endocrine therapy: a multinational, double-blind, randomized trial. *J Clin Oncol*, **2004**, 22, 1605-13; c) Osborne, C. K.; Pippen, J.; Jones, S. E.; Parker, L. M.; Ellis, M.; Come, S.; Gertler, S. Z.; May, J. T.; Burton, G.; Dimery, I.; Webster, A.; Morris, C.; Elledge, R.; Buzdar, A. Double-blind, randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: results of a North American trial. *J Clin Oncol*, **2002**, 20, 3386-95.
68. Dauvois, S.; White, R.; Parker, M. G. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci*, **1993**, 106 (Pt 4), 1377-88.
69. a) Gibson, M. K.; Nemmers, L. A.; Beckman, W. C., Jr.; Davis, V. L.; Curtis, S. W.; Korach, K. S. The mechanism of ICI 164,384 antiestrogenicity involves rapid loss of estrogen receptor in uterine tissue. *Endocrinology*, **1991**, 129, 2000-10; b) Dauvois, S.; Danielian, P. S.; White, R.; Parker, M. G. Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1992**, 89, 4037-41; c) DeFriend, D. J.; Howell, A.; Nicholson, R. I.; Anderson, E.; Dowsett, M.; Mansel, R. E.; Blamey, R. W.; Bundred, N. J.; Robertson, J. F.; Saunders, C. Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res*, **1994**, 54, 408-14; d) Carlson, R. W. The history and mechanism of action of fulvestrant. *Clin Breast Cancer*, **2005**, 6 Suppl 1, S5-8; e) Wu, Y. L.; Yang, X.; Ren, Z.; McDonnell, D. P.; Norris, J. D.; Willson, T. M.; Greene, G. L. Structural basis for an unexpected mode of SERM-mediated ER antagonism. *Mol Cell*, **2005**, 18, 413-24.
70. Yamamoto, Y.; Wada, O.; Takada, I.; Yogiashi, Y.; Shibata, J.; Yanagisawa, J.; Kitazato, K.; Kato, S. Both N- and C-terminal transactivation functions of DNA-bound ER α are blocked by a novel synthetic estrogen ligand. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**, 312, 656-62.

71. Jordan, V. C. Selective estrogen receptor modulation: a personal perspective. *Cancer Res*, **2001**, 61, 5683-7.
72. Meegan, M. J. Lloyd, D. G. Advances in the science of estrogen receptor modulation. *Curr Med Chem*, **2003**, 10, 181-210.
73. McPherson, S. J.; Hussain, S.; Balanathan, P.; Hedwards, S. L.; Niranjana, B.; Grant, M.; Chandrasiri, U. P.; Toivanen, R.; Wang, Y.; Taylor, R. A.; Risbridger, G. P. Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2010**, 107, 3123-8.
74. a) Hartman, J.; Edvardsson, K.; Lindberg, K.; Zhao, C.; Williams, C.; Strom, A.; Gustafsson, J. A. Tumor repressive functions of estrogen receptor beta in SW480 colon cancer cells. *Cancer Res*, **2009**, 69, 6100-6; b) Weige, C. C.; Allred, K. F.; Allred, C. D. Estradiol alters cell growth in nonmalignant colonocytes and reduces the formation of preneoplastic lesions in the colon. *Cancer Res*, **2009**, 69, 9118-24.
75. Pinton, G.; Thomas, W.; Bellini, P.; Manente, A. G.; Favoni, R. E.; Harvey, B. J.; Mutti, L.; Moro, L. Estrogen receptor beta exerts tumor repressive functions in human malignant pleural mesothelioma via EGFR inactivation and affects response to gefitinib. *PLoS One*, **2010**, 5, e14110.
76. Mauvais-Jarvis, F.; Clegg, D. J.; Hevener, A. L. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr Rev*, **2013**, 34, 309-38.
77. a) Stovall, D. W. Pinkerton, J. V. MF-101, an estrogen receptor beta agonist for the treatment of vasomotor symptoms in peri- and postmenopausal women. *Curr Opin Investig Drugs*, **2009**, 10, 365-71; b) Grady, D.; Sawaya, G. F.; Johnson, K. C.; Koltun, W.; Hess, R.; Vittinghoff, E.; Kristof, M.; Tagliaferri, M.; Cohen, I.; Ensrud, K. E. MF101, a selective estrogen receptor beta modulator for the treatment of menopausal hot flashes: a phase II clinical trial. *Menopause*, **2009**, 16, 458-65.
78. Schwartz, P. A. Murray, B. W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg Chem*, **2011**, 39, 192-210.
79. a) Cohen, P. Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*, **2002**, 1, 309-15; b) Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*, **2009**, 9, 28-39; c) Blume-Jensen, P. Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **2001**, 411, 355-65.
80. Burnett, G. Kennedy, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem*, **1954**, 211, 969-80.
81. Stehelin, D.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M.; Vogt, P. K. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, **1976**, 260, 170-3.
82. a) U.S. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/>; b) Druker, B. J.; Guilhot, F.; O'Brien, S. G.; Gathmann, I.; Kantarjian, H.; Gattermann, N.; Deininger, M. W.; Silver, R. T.; Goldman, J. M.; Stone, R. M.; Cervantes, F.; Hochhaus, A.; Powell, B. L.; Gabrilove, J. L.; Rousselot, P.; Reiffers, J.; Cornelissen, J. J.; Hughes, T.; Agis, H.; Fischer, T.; Verhoef, G.; Shepherd, J.; Saglio, G.; Gratwohl, A.; Nielsen, J. L.; Radich, J. P.; Simonsson, B.; Taylor, K.; Baccarani, M.; So, C.; Letvak, L.; Larson, R. A.; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **2006**, 355, 2408-17.
83. Knighton, D. R.; Zheng, J. H.; Ten Eyck, L. F.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M. Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, **1991**, 253, 414-20.
84. a) Huse, M. Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*, **2002**, 109, 275-82; b) Kornev, A. P. Taylor, S. S. Defining the conserved internal architecture of a

- protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, **2010**, 1804, 440-4; c) Rabiller, M.; Getlik, M.; Klüter, S.; Richters, A.; Tückmantel, S.; Simard, J. R.; Rauh, D. Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)*, **2010**, 343, 193-206.
85. a) Liu, Y.; Shah, K.; Yang, F.; Witucki, L.; Shokat, K. M. A molecular gate which controls unnatural ATP analogue recognition by the tyrosine kinase v-Src. *Bioorg Med Chem*, **1998**, 6, 1219-26; b) Michalczyk, A.; Klüter, S.; Rode, H. B.; Simard, J. R.; Grütter, C.; Rabiller, M.; Rauh, D. Structural insights into how irreversible inhibitors can overcome drug resistance in EGFR. *Bioorg Med Chem*, **2008**, 16, 3482-8; c) Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Janne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G.; Halmos, B. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, **2005**, 352, 786-92.
86. Adams, J. A. Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry*, **2003**, 42, 601-7.
87. Tarricone, C.; Dhavan, R.; Peng, J.; Areces, L. B.; Tsai, L. H.; Musacchio, A. Structure and regulation of the CDK5-p25(nc5a) complex. *Mol Cell*, **2001**, 8, 657-69.
88. Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S. M.; Yeo, M.; Good, V. M.; Thompson, V.; Dale, T. C.; Pearl, L. H. Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J*, **2003**, 22, 494-501.
89. Longenecker, K. L.; Roach, P. J.; Hurley, T. D. Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. *J Mol Biol*, **1996**, 257, 618-31.
90. Jeffrey, P. D.; Russo, A. A.; Polyak, K.; Gibbs, E.; Hurwitz, J.; Massague, J.; Pavletich, N. P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, **1995**, 376, 313-20.
91. Zheng, J.; Trafny, E. A.; Knighton, D. R.; Xuong, N. H.; Taylor, S. S.; Ten Eyck, L. F.; Sowadski, J. M. 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **1993**, 49, 362-5.
92. a) Zhang, X.; Gureasko, J.; Shen, K.; Cole, P. A.; Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, **2006**, 125, 1137-49; b) Jura, N.; Endres, N. F.; Engel, K.; Deindl, S.; Das, R.; Lamers, M. H.; Wemmer, D. E.; Zhang, X.; Kuriyan, J. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*, **2009**, 137, 1293-307.
93. Hu, J.; Ahuja, L. G.; Meharena, H. S.; Kannan, N.; Kornev, A. P.; Taylor, S. S.; Shaw, A. S. Kinase regulation by hydrophobic spine assembly in cancer. *Mol Cell Biol*, **2015**, 35, 264-76.
94. Backes, A.; Zech, B.; Felber, B.; Klebl, B.; Muller, G. Small-molecule inhibitors binding to protein kinases. Part I: exceptions from the traditional pharmacophore approach of type I inhibition. *Expert Opin Drug Discov*, **2008**, 3, 1409-25.
95. a) Backes, A.; Zech, B.; Felber, B.; Klebl, B.; Muller, G. Small-molecule inhibitors binding to protein kinase. Part II: the novel pharmacophore approach of type II and type III inhibition. *Expert Opin Drug Discov*, **2008**, 3, 1427-49; b) Liu, Y.; Gray, N. S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol*, **2006**, 2, 358-64.
96. a) Copeland, R. A.; Pompliano, D. L.; Meek, T. D. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov*, **2006**, 5, 730-9; b) Copeland, R. A. Conformational adaptation in drug-target interactions and residence time. *Future Med Chem*, **2011**, 3, 1491-501.

97. Pargellis, C.; Tong, L.; Churchill, L.; Cirillo, P. F.; Gilmore, T.; Graham, A. G.; Grob, P. M.; Hickey, E. R.; Moss, N.; Pav, S.; Regan, J. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol*, **2002**, 9, 268-72.
98. Ohren, J. F.; Chen, H.; Pavlovsky, A.; Whitehead, C.; Zhang, E.; Kuffa, P.; Yan, C.; McConnell, P.; Spessard, C.; Banotai, C.; Mueller, W. T.; Delaney, A.; Omer, C.; Sebolt-Leopold, J.; Dudley, D. T.; Leung, I. K.; Flamme, C.; Warmus, J.; Kaufman, M.; Barrett, S.; Tecle, H.; Hasemann, C. A. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol*, **2004**, 11, 1192-7.
99. a) Adrian, F. J.; Ding, Q.; Sim, T.; Velentza, A.; Sloan, C.; Liu, Y.; Zhang, G.; Hur, W.; Ding, S.; Manley, P.; Mestan, J.; Fabbro, D.; Gray, N. S. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat Chem Biol*, **2006**, 2, 95-102; b) Khateb, M.; Ruimi, N.; Khamisie, H.; Najajreh, Y.; Mian, A.; Metodieva, A.; Ruthardt, M.; Mahajna, J. Overcoming Bcr-Abl T315I mutation by combination of GNF-2 and ATP competitors in an Abl-independent mechanism. *BMC Cancer*, **2012**, 12, 563; c) Yang, J.; Campobasso, N.; Biju, M. P.; Fisher, K.; Pan, X. Q.; Cottom, J.; Galbraith, S.; Ho, T.; Zhang, H.; Hong, X.; Ward, P.; Hofmann, G.; Siegfried, B.; Zappacosta, F.; Washio, Y.; Cao, P.; Qu, J.; Bertrand, S.; Wang, D. Y.; Head, M. S.; Li, H.; Moores, S.; Lai, Z.; Johanson, K.; Burton, G.; Erickson-Miller, C.; Simpson, G.; Tummino, P.; Copeland, R. A.; Oliff, A. Discovery and characterization of a cell-permeable, small-molecule c-Abl kinase activator that binds to the myristoyl binding site. *Chem Biol*, **2011**, 18, 177-86.
100. a) Walter, A. O.; Sjin, R. T.; Haringsma, H. J.; Ohashi, K.; Sun, J.; Lee, K.; Dubrovskiy, A.; Labenski, M.; Zhu, Z.; Wang, Z.; Sheets, M.; St Martin, T.; Karp, R.; van Kalken, D.; Chaturvedi, P.; Niu, D.; Nacht, M.; Petter, R. C.; Westlin, W.; Lin, K.; Jaw-Tsai, S.; Raponi, M.; Van Dyke, T.; Etter, J.; Weaver, Z.; Pao, W.; Singh, J.; Simmons, A. D.; Harding, T. C.; Allen, A. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. *Cancer Discov*, **2013**, 3, 1404-15; b) Steuer, C. E.; Khuri, F. R.; Ramalingam, S. S. The next generation of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in the treatment of lung cancer. *Cancer*, **2014**.
101. a) Simard, J. R.; Getlik, M.; Grütter, C.; Pawar, V.; Wulfert, S.; Rabiller, M.; Rauh, D. Development of a fluorescent-tagged kinase assay system for the detection and characterization of allosteric kinase inhibitors. *J Am Chem Soc*, **2009**, 131, 13286-96; b) Simard, J. R.; Grütter, C.; Pawar, V.; Aust, B.; Wolf, A.; Rabiller, M.; Wulfert, S.; Robubi, A.; Klüter, S.; Ottmann, C.; Rauh, D. High-throughput screening to identify inhibitors which stabilize inactive kinase conformations in p38alpha. *J Am Chem Soc*, **2009**, 131, 18478-88; c) Simard, J. R.; Klüter, S.; Grütter, C.; Getlik, M.; Rabiller, M.; Rode, H. B.; Rauh, D. A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nat Chem Biol*, **2009**, 5, 394-6; d) Schneider, R.; Becker, C.; Simard, J. R.; Getlik, M.; Bohlke, N.; Janning, P.; Rauh, D. Direct binding assay for the detection of type IV allosteric inhibitors of Abl. *J Am Chem Soc*, **2012**, 134, 9138-41; e) Schneider, R.; Beumer, C.; Simard, J. R.; Grütter, C.; Rauh, D. Selective detection of allosteric phosphatase inhibitors. *J Am Chem Soc*, **2013**, 135, 6838-41; f) Schneider, R.; Gohla, A.; Simard, J. R.; Yadav, D. B.; Fang, Z.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D. Overcoming compound fluorescence in the FLiK screening assay with red-shifted fluorophores. *J Am Chem Soc*, **2013**, 135, 8400-8.
102. Valeur, Bernard, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, FRG, **2001**, p. 34-71.
103. Loving, G. S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotechnol*, **2010**, 28, 73-83.
104. UniProtKB/Swiss-Prot protein knowledgebase release 2014_10 statistics. <http://web.expasy.org/docs/relnotes/relstat.html> (09.11.2014)

105. Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **1997**, 25, 3389-402.
106. Möcklinghoff, S.; van Otterlo, W. A.; Rose, R.; Fuchs, S.; Zimmermann, T. J.; Dominguez Seoane, M.; Waldmann, H.; Ottmann, C.; Brunsveld, L. Design and evaluation of fragment-like estrogen receptor tetrahydroisoquinoline ligands from a scaffold-detection approach. *J Med Chem*, **2011**, 54, 2005-11.
107. a) Jankiewicz, U.; Bielawski, W. The properties and functions of bacterial aminopeptidases. *Acta Microbiol Pol*, **2003**, 52, 217-31; b) Xiao, Q.; Zhang, F.; Nacev, B. A.; Liu, J. O.; Pei, D. Protein N-terminal processing: substrate specificity of *Escherichia coli* and human methionine aminopeptidases. *Biochemistry*, **2010**, 49, 5588-99.
108. Geoghegan, Kieran F.; Dixon, Henry B. F.; Rosner, Philip J.; Hoth, Lise R.; Lanzetti, Anthony J.; Borzilleri, Kris A.; Marr, Eric S.; Pezzullo, Linda H.; Martin, LeRoy B.; LeMotte, Peter K.; McColl, Alexander S.; Kamath, Ajith V.; Stroh, Justin G. Spontaneous α -N-6-Phosphogluconoylation of a "His Tag" in *Escherichia coli*: The Cause of Extra Mass of 258 or 178 Da in Fusion Proteins. *Anal Biochem*, **1999**, 267, 169-84.
109. Fang, Z., **2013**, *Development of a Conformation-Sensitive Assay for the Detection of Inter-Domain Interactions Mediated by Allosteric Akt Inhibitors*. Dr. rer. nat. Thesis, TU Dortmund: Dortmund (Deutschland).
110. Prendergast, F. G.; Meyer, M.; Carlson, G. L.; Iida, S.; Potter, J. D. Synthesis, spectral properties, and use of 6-acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene (Acrylodan). A thiol-selective, polarity-sensitive fluorescent probe. *J Biol Chem*, **1983**, 258, 7541-4.
111. Diwu, Z.; Chen, C. S.; Zhang, C.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. *Chem Biol*, **1999**, 6, 411-8.
112. Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W. Y.; Haugland, R. P. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem*, **1999**, 47, 1179-88.
113. de Lorimier, R. M.; Smith, J. J.; Dwyer, M. A.; Looger, L. L.; Sali, K. M.; Paavola, C. D.; Rizk, S. S.; Sadigov, S.; Conrad, D. W.; Loew, L.; Hellinga, H. W. Construction of a fluorescent biosensor family. *Protein Sci*, **2002**, 11, 2655-75.
114. Kelly, S. M.; Price, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci*, **2000**, 1, 349-84.
115. Brandt, M. E.; Vickery, L. E. Cooperativity and dimerization of recombinant human estrogen receptor hormone-binding domain. *J Biol Chem*, **1997**, 272, 4843-9.
116. Böhm, G.; Muhr, R.; Jaenicke, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng*, **1992**, 5, 191-5.
117. Barrow, C. J.; Yasuda, A.; Kenny, P. T.; Zagorski, M. G. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol*, **1992**, 225, 1075-93.
118. a) Möcklinghoff, S., **2010**, *Modulating the Nuclear Receptor-Cofactor Interaction - Characterization and Inhibition*. Ph.D. Thesis, Technische Universiteit Eindhoven: Eindhoven (Niederlande); b) Ferrero, V. E.; Pedotti, M.; Chiado, A.; Simonelli, L.; Calzolari, L.; Varani, L.; Lettieri, T. Rational modification of estrogen receptor by combination of computational and experimental analysis. *PLoS One*, **2014**, 9, e102658.
119. Nair, S. K.; Thomas, T. J.; Greenfield, N. J.; Chen, A.; He, H.; Thomas, T. Conformational dynamics of estrogen receptors alpha and beta as revealed by intrinsic tryptophan fluorescence and circular dichroism. *J Mol Endocrinol*, **2005**, 35, 211-23.

120. Simard, J. R.; Rauh, D. Fluorescence labels in kinases: a high-throughput kinase binding assay for the identification of DFG-out binding ligands. *Methods Mol Biol*, **2012**, 800, 95-117.
121. Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen*, **1999**, 4, 67-73.
122. a) Jisa, E.; Dornstauder, E.; Ogawa, S.; Inoue, S.; Muramatsu, M.; Jungbauer, A. Transcriptional activities of estrogen receptor alpha and beta in yeast properties of raloxifene. *Biochem Pharmacol*, **2001**, 62, 953-61; b) Parker, G. J.; Law, T. L.; Lench, F. J.; Bolger, R. E. Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays. *J Biomol Screen*, **2000**, 5, 77-88.
123. Rich, R. L.; Hoth, L. R.; Geoghegan, K. F.; Brown, T. A.; LeMotte, P. K.; Simons, S. P.; Hensley, P.; Myszk, D. G. Kinetic analysis of estrogen receptor/ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**, 99, 8562-7.
124. a) Zhao, L.; Jin, C.; Mao, Z.; Gopinathan, M. B.; Rehder, K.; Brinton, R. D. Design, synthesis, and estrogenic activity of a novel estrogen receptor modulator - a hybrid structure of 17beta-estradiol and vitamin E in hippocampal neurons. *J Med Chem*, **2007**, 50, 4471-81; b) Blizzard, T. A.; DiNinno, F.; Chen, H. Y.; Kim, S.; Wu, J. Y.; Chan, W.; Birzin, E. T.; Yang, Y. T.; Pai, L. Y.; Hayes, E. C.; DaSilva, C. A.; Rohrer, S. P.; Schaeffer, J. M.; Hammond, M. L. Estrogen receptor ligands. Part 13: Dihydrobenzoxathiin SERAMs with an optimized antagonist side chain. *Bioorg Med Chem Lett*, **2005**, 15, 3912-6; c) Miller, C. P.; Jirkovsky, I.; Tran, B. D.; Harris, H. A.; Moran, R. A.; Komm, B. S. Synthesis and estrogenic activities of novel 7-thiosubstituted estratriene derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, **2000**, 10, 147-51.
125. Hurth, K. M.; Nilges, M. J.; Carlson, K. E.; Tamrazi, A.; Belford, R. L.; Katzenellenbogen, J. A. Ligand-induced changes in estrogen receptor conformation as measured by site-directed spin labeling. *Biochemistry*, **2004**, 43, 1891-907.
126. a) Harris, H. A.; Bapat, A. R.; Gonder, D. S.; Frail, D. E. The ligand binding profiles of estrogen receptors alpha and beta are species dependent. *Steroids*, **2002**, 67, 379-84; b) Fang, J.; Akwabi-Ameyaw, A.; Britton, J. E.; Katamreddy, S. R.; Navas, F. III.; Miller, A. B.; Williams, S. P.; Gray, D. W.; Orband-Miller, L. A.; Shearin, J.; Heyer, D. Synthesis of 3-alkyl naphthalenes as novel estrogen receptor ligands. *Bioorg Med Chem Lett*, **2008**, 18, 5075-7.
127. Wallace, O. B.; Lauwers, K. S.; Jones, S. A.; Dodge, J. A. Tetrahydroquinoline-based selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Bioorg Med Chem Lett*, **2003**, 13, 1907-10.
128. Renaud, J.; Bischoff, S. F.; Buhl, T.; Floersheim, P.; Fournier, B.; Halleux, C.; Kallen, J.; Keller, H.; Schlaeppli, J. M.; Stark, W. Estrogen receptor modulators: identification and structure-activity relationships of potent ERalpha-selective tetrahydroisoquinoline ligands. *J Med Chem*, **2003**, 46, 2945-57.
129. Copeland, Robert A., *Enzymes*, John Wiley & Sons, Inc., **2002**, p. 76-108.
130. Carlson, K. E.; Choi, I.; Gee, A.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A. Altered ligand binding properties and enhanced stability of a constitutively active estrogen receptor: evidence that an open pocket conformation is required for ligand interaction. *Biochemistry*, **1997**, 36, 14897-905.
131. a) Sherman, D. B.; Pitner, J. B.; Ambroise, A.; Thomas, K. J. Synthesis of thiol-reactive, long-wavelength fluorescent phenoxazine derivatives for biosensor applications. *Bioconjug Chem*, **2006**, 17, 387-92; b) Zhu, J.; Pei, D. A LuxP-based fluorescent sensor for bacterial autoinducer II. *ACS Chem Biol*, **2008**, 3, 110-9; c) Toutchkine, A.; Kraynov, V.; Hahn, K.

- Solvent-sensitive dyes to report protein conformational changes in living cells. *J Am Chem Soc*, **2003**, 125, 4132-45.
132. Shi, Y. Orphan nuclear receptors, excellent targets of drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen*, **2006**, 9, 683-9.
133. Rhodes, Gale, *Crystallography Made Crystal Clear - A Guide for Users of Macromolecular Models, Vol. 3*, Academic Press, Burlington, **2006**.
134. Lee, J. C.; Laydon, J. T.; McDonnell, P. C.; Gallagher, T. F.; Kumar, S.; Green, D.; McNulty, D.; Blumenthal, M. J.; Heys, J. R.; Landvatter, S. W.; et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, **1994**, 372, 739-46.
135. Yong, H. Y.; Koh, M. S.; Moon, A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, **2009**, 18, 1893-905.
136. a) Wagner, E. F.; Nebreda, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*, **2009**, 9, 537-49; b) Xie, N.; Li, H.; Wei, D.; LeSage, G.; Chen, L.; Wang, S.; Zhang, Y.; Chi, L.; Ferslew, K.; He, L.; Chi, Z.; Yin, D. Glycogen synthase kinase-3 and p38 MAPK are required for opioid-induced microglia apoptosis. *Neuropharmacology*, **2010**, 59, 444-51; c) Veillat, V.; Carli, C.; Metz, C. N.; Al-Abed, Y.; Naccache, P. H.; Akoum, A. Macrophage migration inhibitory factor elicits an angiogenic phenotype in human ectopic endometrial cells and triggers the production of major angiogenic factors via CD44, CD74, and MAPK signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab*, **2010**, 95, E403-12.
137. Norman, P. Investigational p38 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Investig Drugs*, **2015**, 24, 383-92.
138. MacNee, W.; Allan, R. J.; Jones, I.; De Salvo, M. C.; Tan, L. F. Efficacy and safety of the oral p38 inhibitor PH-797804 in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised clinical trial. *Thorax*, **2013**, 68, 738-45.
139. Liu, C.; Lin, J.; Wroblewski, S. T.; Lin, S.; Hynes, J.; Wu, H.; Dyckman, A. J.; Li, T.; Wityak, J.; Gillooly, K. M.; Pitt, S.; Shen, D. R.; Zhang, R. F.; McIntyre, K. W.; Salter-Cid, L.; Shuster, D. J.; Zhang, H.; Marathe, P. H.; Doweiko, A. M.; Sack, J. S.; Kiefer, S. E.; Kish, K. F.; Newitt, J. A.; McKinnon, M.; Dodd, J. H.; Barrish, J. C.; Schieven, G. L.; Leftheris, K. Discovery of 4-(5-(cyclopropylcarbamoyl)-2-methylphenylamino)-5-methyl-N-propylpyrrolo[1,2-f][1,2,4]triazine-6-carboxamide (BMS-582949), a clinical p38alpha MAP kinase inhibitor for the treatment of inflammatory diseases. *J Med Chem*, **2010**, 53, 6629-39.
140. Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*, **2008**, 26, 127-32.
141. Goldstein, D. M.; Gabriel, T. Pathway to the clinic: inhibition of P38 MAP kinase. A review of ten chemotypes selected for development. *Curr Top Med Chem*, **2005**, 5, 1017-29.
142. a) Cohen, S. B.; Cheng, T. T.; Chindalore, V.; Damjanov, N.; Burgos-Vargas, R.; Delora, P.; Zimany, K.; Travers, H.; Caulfield, J. P. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **2009**, 60, 335-44; b) Hill, R. J.; Dabbagh, K.; Phippard, D.; Li, C.; Suttman, R. T.; Welch, M.; Papp, E.; Song, K. W.; Chang, K. C.; Leaffer, D.; Kim, Y. N.; Roberts, R. T.; Zabka, T. S.; Aud, D.; Dal Porto, J.; Manning, A. M.; Peng, S. L.; Goldstein, D. M.; Wong, B. R. Pamapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor: preclinical analysis of efficacy and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther*, **2008**, 327, 610-9.

143. a) Fischer, S.; Wentsch, H. K.; Mayer-Wrangowski, S. C.; Zimmermann, M.; Bauer, S. M.; Storch, K.; Niess, R.; Koeberle, S. C.; Grütter, C.; Boeckler, F. M.; Rauh, D.; Laufer, S. A. Dibenzosuberones as p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors with low ATP competitiveness and outstanding whole blood activity. *J Med Chem*, **2013**, 56, 241-53; b) Koeberle, S. C.; Romir, J.; Fischer, S.; Koeberle, A.; Schattel, V.; Albrecht, W.; Grütter, C.; Werz, O.; Rauh, D.; Stehle, T.; Laufer, S. A. Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *Nat Chem Biol*, **2012**, 8, 141-3.
144. Laufer, S. A.; Ahrens, G. M.; Karcher, S. C.; Hering, J. S.; Niess, R. Design, synthesis, and biological evaluation of phenylamino-substituted 6,11-dihydro-dibenzo[b,e]oxepin-11-ones and dibenzo[a,d]cycloheptan-5-ones: novel p38 MAP kinase inhibitors. *J Med Chem*, **2006**, 49, 7912-5.
145. Fitzgerald, C. E.; Patel, S. B.; Becker, J. W.; Cameron, P. M.; Zaller, D.; Pikounis, V. B.; O'Keefe, S. J.; Scapin, G. Structural basis for p38alpha MAP kinase quinazolinone and pyridol-pyrimidine inhibitor specificity. *Nat Struct Biol*, **2003**, 10, 764-9.
146. Lee, M. R.; Dominguez, C. MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. *Curr Med Chem*, **2005**, 12, 2979-94.
147. Martz, K. E.; Dorn, A.; Baur, B.; Schattel, V.; Goettert, M. I.; Mayer-Wrangowski, S. C.; Rauh, D.; Laufer, S. A. Targeting the hinge glycine flip and the activation loop: novel approach to potent p38alpha inhibitors. *J Med Chem*, **2012**, 55, 7862-74.
148. Hunter, C. A.; Singh, J.; Thornton, J. M. Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *J Mol Biol*, **1991**, 218, 837-46.
149. Protein knowledgebase (UniProtKB). <http://www.uniprot.org/uniprot/>
150. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-5.
151. ExPASy ProtParam. <http://web.expasy.org/protparam/>
152. Savitzky, Abraham; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal Chem*, **1964**, 36, 1627-39.
153. a) Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, **2008**, 26, 1367-72; b) Cox, J.; Neuhauser, N.; Michalski, A.; Scheltema, R. A.; Olsen, J. V.; Mann, M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*, **2011**, 10, 1794-805.
154. Zhang, Z.; Marshall, A. G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom*, **1998**, 9, 225-33.
155. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr*, **1993**, 26, 795-800.
156. Read, R. J. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **2001**, 57, 1373-82.
157. Brunger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; DeLano, W. L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J. S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T.; Warren, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **1998**, 54, 905-21.
158. Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **1997**, 53, 240-55.

159. Emsley, P. Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **2004**, 60, 2126-32.
160. Schuttelkopf, A. W. van Aalten, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **2004**, 60, 1355-63.
161. Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr*, **1993**, 26, 283-91.

10 ANHANG

10.1 Protein-Sequenzen

10.1.1 p38 α MAP-Kinase (p38 α wt)

Mitogen-aktivierte Proteinkinase 14 (p38 α MAP-Kinase) aus *Homo sapiens* (UniProtKB-Eintrag: Q16539-1), Aminosäuren 2-360

Vektor: pNFG, mit His₆-Affinitäts-Tag und Thrombin-Schnittstelle (^)

MW / ohne Affinitäts-Tag: 44437.8 Da / 41443.3 Da

MGSSHHHHHSFITSLYKKAGFLVPR^GSQERPTFYRQELNKTIWEVPERYQNLSPVSGAYGSVC
AAFDTKTGLRVAVKKLSRPFQSIHAKRTYRELRLKHKHENVIGLLDVFTPARSLEEFNDVYLV
THLMGADLNNIVKCQKLTDDHVQFLIYQILRGLKYIHSADIHRDLKPSNLAVNEDCELKILDFGL
ARHTDDEMTGYVATRWYRAPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAELLTGRTLFPGTDHIDQLKLILR
LVGTPGAELLKKISSESARNYIQSLTQMPKMNANVFIGANPLAVDLLEKMLVLDSDKRITAAQAL
AHAYFAQYHDPDDEPVADPYDQSFESRDLLIDEWKSLTYDEVISFVPPPLDQEEMES

10.1.2 hER β LBD-Konstrukte

Ligandenbindungsdomäne des Estrogenrezeptors β aus *homo sapiens* (UniProtKB-Eintrag: Q92731.2), Aminosäuren 260-502

Vektor: pET-15b (Schnittstellen: *NdeI/BamHI*), mit His₆-Affinitäts-Tag und Thrombin-Schnittstelle (^)

Alle eingeführten Mutationen sind **hervorgehoben** und die Fluorophor-Markierungsposition ist **rot** markiert.

hER β LBD wt (pMW05)

hER β LBD₂₆₀₋₅₀₂

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29566.8 Da / 27815.9 Da

MGSSHHHHHSGLVPR^GSHMLDALSPQLVLTLLLEAEPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLTKLAD
KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLESCWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKC
VEGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYLCVKAMILNNSMYPLVTATQDADSSRKLHLLNAVTD
ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGMEHLLNMK**Q**KNVVPVYDLLLEMLNAHVLR
G*

hERβ LBD-mut (pMW06)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C331S, C366S, C396T, C478L

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29542.7 Da / 27791.8 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR[^]GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLES SWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELK LQHKEYL TVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKL A HLLNAVTD
 ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLM LLSHVRHASNKGMEHLLNMK LKNVVPVYDLLLEMLNAHVLR
 G*

hERβ LBD-FLiN 1 (pMW08)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C331S, C366S, C396T, L478C

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29532.6 Da / 27781.8 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR[^]GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLES SWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELK LQHKEYL TVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKL A HLLNAVTD
 ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLM LLSHVRHASNKGMEHLLNMK CKNVVPVYDLLLEMLNAHVLR
 G*

hERβ LBD-FLiN 2 (pMW09)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C331S, C366S, C396T, C478L, D486C

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29530.7 Da / 27779.8 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR[^]GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLES SWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELK LQHKEYL TVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKL A HLLNAVTD
 ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLM LLSHVRHASNKGMEHLLNMK LKNVVPVY CLLLEMLNAHVLR
 G*

hERβ LBD-FLiN 3 (pMW10)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C331S, C366S, C396T, C478L, L489C

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29532.6 Da / 27781.8 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR[^]GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLES SWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELK LQHKEYL TVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKL A HLLNAVTD
 ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLM LLSHVRHASNKGMEHLLNMK LKNVVPVYDLL CEMLNAHVLR
 G*

hERβ LBD-FLiN 4 (pMW11)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C331S, C366S, C396T, C478L, N493C

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29531.7 Da / 27780.8 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR[^]GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRP SAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLESSWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELKQHQKEYLTVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKLHLLNAVTD
 ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGMEHLLNMKLKNVVPVYDILLEMLCAHVLR
 G*

hERβ LBD-FLiN 5 (pMW12)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C366S

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29550.7 Da / 27799.9 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR[^]GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRP SAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLESCWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELKQHQKEYLCVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKLHLLNAVTD
 ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGMEHLLNMKCKNVVPVYDILLEMLNAHVLR
 G*

hERβ LBD-mut 2 (pMW13)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C366S, C478L

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29560.7 Da / 27809.9 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR[^]GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRP SAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLESCWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELKQHQKEYLCVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKLHLLNAVTD
 ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGMEHLLNMKLKNVVPVYDILLEMLNAHVLR
 G*

hERβ LBD-FLiN 6 (pMW14)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C366S, C478L, D486C

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29548.8 Da / 27797.9 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR[^]GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRP SAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMI SWAKKIPGFVELSLFDQVRLLESCWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELKQHQKEYLCVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKLHLLNAVTD
 ALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGMEHLLNMKLKNVVPVYCLLEMLNAHVLR
 G*

hERβ LBD-FLiN 7 (pMW15)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C366S, C478L, L489C

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29550.7 Da / 27799.9 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR^GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLLESCWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELKQLQKEYLCVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKL AHLLNAVTD
 ALVWVIKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGMEHLLNMKLKNVVPVYDLLCEMLNAHVLR
 G*

hERβ LBD-FLiN 8 (pMW16)hERβ LBD₂₆₀₋₅₀₂ C366S, C478L, N493C

MW (ohne Start-Methionin) / ohne Affinitäts-Tag: 29549.8 Da / 27798.9 Da

MGSSHHHHHHSSGLVPR^GSHMLDALSPEQLVLTLLLEAEPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLTKLAD
 KELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLLESCWMEVLMGLMWRSIDHPGKLIFAPDLVDRDEGKS
 VEGILEIFDMLLATTSRFRELKQLQKEYLCVKAMILLNSSMYPLVTATQDADSSRKL AHLLNAVTD
 ALVWVIKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGMEHLLNMKLKNVVPVYDLLLEMCAHVLR
 G*

10.2 PCR-Primer

Tabelle 10.2.1. Primer und Templat DNA für Mutagenese-PCR.

hER β LBD-Konstrukt	Primer-Sequenz	Templat DNA
FLiN1	5'-CTGCTGAACATGAAATGCAAAAATGTTGTGCCGG-3' 5'-CCGGCACAACATTTTTGCATTTTCATGTTCCAGCAG-3'	hER β LBD-mut
FLiN2	5'-GTTGTGCCGGTTTATTGCCTGCTGCTGGAAATGC-3' 5'-GCATTTCCAGCAGCAGGCAATAAACCGGCACAAC-3'	hER β LBD-mut
FLiN3	5'-GTTTATGACCTGCTGTGCGAAATGCTGAATGC-3' 5'-GCATTCAGCATTTTCGCACAGCAGGTCATAAAC-3'	hER β LBD-mut
FLiN4	5'-GCTGCTGGAAATGCTGTGTGCCCATGTTCTGCG-3' 5'-CGCAGAACATGGGCACACAGCATTTCCAGCAGC-3'	hER β LBD-mut
FLiN5	5'-CGTGATGAAGGTAAAAGCGTTGAAGGCATCCTGG-3' 5'-CCAGGATGCCTTCAACGCTTTTACCTTCATCAGC-3'	hER β -LBD wt
mut2	5'-CTGCTGAACATGAAACTCAAAAATGTTGTGCCGG-3' 5'-CCGGCACAACATTTTTGAGTTTCATGTTCCAGCAG-3'	hER β -LBD-FLiN5
FLiN6	5'-GTTGTGCCGGTTTATTGCCTGCTGCTGGAAATGC-3' 5'-GCATTTCCAGCAGCAGGCAATAAACCGGCACAAC-3'	hER β LBD-mut2
FLiN7	5'-GTTTATGACCTGCTGTGCGAAATGCTGAATGC-3' 5'-GCATTCAGCATTTTCGCACAGCAGGTCATAAAC-3'	hER β LBD-mut2
FLiN8	5'-GCTGCTGGAAATGCTGTGTGCCCATGTTCTGCG-3' 5'-CGCAGAACATGGGCACACAGCATTTCCAGCAGC-3'	hER β LBD-mut2

Tabelle 10.2.2. Sequenzierungsprimer.

Bezeichnung	Primer-Sequenz	T _M / °C
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	53.2
T7 term	5'-CTATTATTGCTCAGCGG-3'	54.5

10.3 ESI-MS Experimente

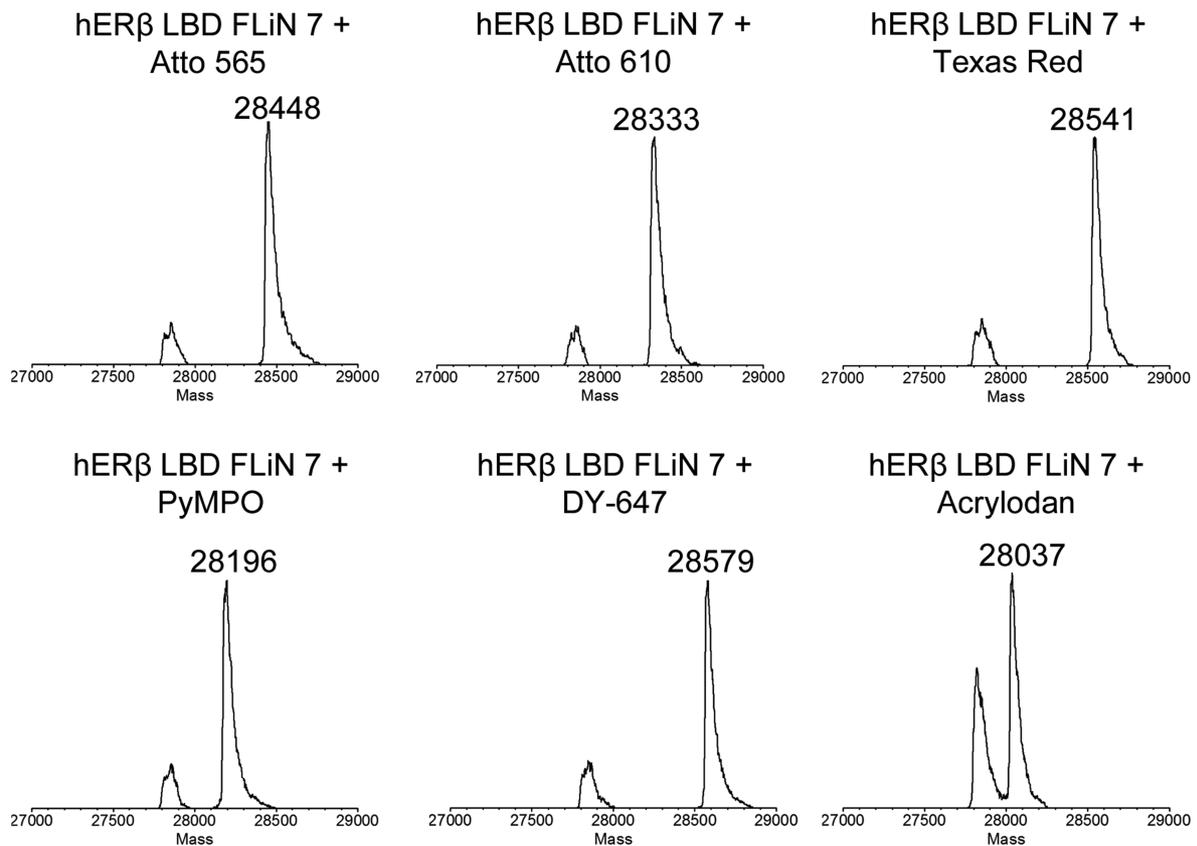


Abbildung 10.3.1 ESI-MS Analyse der Markierung von hERβ LBD-FLiN 7 (ohne His₆-Tag) nach der Markierung mit allen, im FLiN-Assay getesteten, Fluorophoren (alle Massen sind in Da angegeben). Der Massenzuwachs für eine einfache Markierung beträgt 633 Da für Atto 565, 513 Da für Atto 610, 729 Da für Texas Red, 376 Da für PyMPO, 764 Da für DY-647 und 225 Da für Acrylodan. Eine einfache Markierung des Zielproteins mit allen Fluorophoren konnte nachgewiesen werden; Mehrfachmarkierungen wurden nicht beobachtet.

10.4 MS/MS Analyse der Markierungspositionen

Tabelle 10.4.1 ESI-MS/MS Analyse der, mit Acrylodan markierten, hERβ LBD-Konstrukte nach einem tryptischen Verdau. Hellgrau markierte Sequenzbereiche konnten nicht detektiert werden. Alle Cysteine sind gelb hinterlegt, die mit Acrylodan modifizierten Cysteine sind zusätzlich rot markiert.

hERβ LBD wt	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLLS C WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGK C VEGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYL C VKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK C KNVVPVYD L LLEMLNAHVLRG
hERβ LBD- FLiN 1	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLL S WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGKS V EGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYLTVKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK C KNVVPVYD L LLEMLNAHVLRG
hERβ LBD- FLiN 2	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLL S WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGKS V EGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYLTVKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK L KNVVPVY D LLEMLNAHVLRG
hERβ LBD- FLiN 3	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLL S WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGKS V EGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYLTVKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK L KNVVPVYD L L C EMLNAHVLRG
hERβ LBD- FLiN 4	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLL S WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGKS V EGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYLTVKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK L KNVVPVYD L LLEML C AHVLRG
hERβ LBD- FLiN 5	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLL S WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGKS V EGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYL C VKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK C KNVVPVYD L LLEMLNAHVLRG
hERβ LBD- FLiN 6	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLL S WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGKS V EGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYL C VKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK L KNVVPVY D LLEMLNAHVLRG
hERβ LBD- FLiN 7	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLL S WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGKS V EGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYL C VKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK L KNVVPVYD L L C EMLNAHVLRG
hERβ LBD- FLiN 8	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLDALSPEQLVLTLEAEPHVLISRPSAPFTEASMMMS LTKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLL S WMEVLMGLMWRSIDHPGKLI FAPDLVDRDEGKS V EGILEIFDMLLATTSRFRELKLQHKEYL C VKAMILLNSSMYPLVT ATQDADSSRKLHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLMLLSHVRHASNKGM EHLN MK L KNVVPVYD L LLEML C AHVLRG

10.5 FLiN-Daten

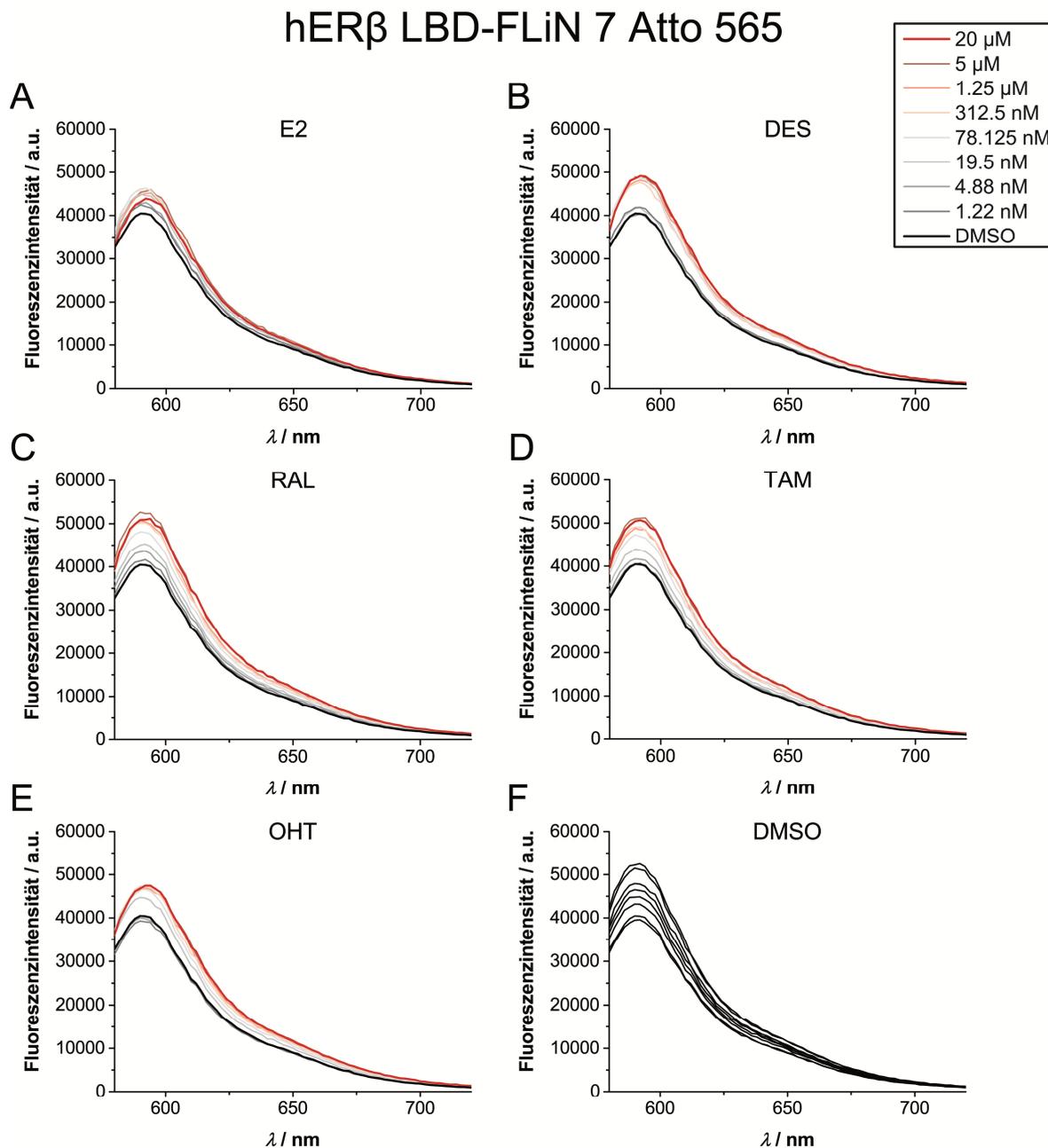


Abbildung 10.5.1 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 7 mit Atto 565-Markierung ($\lambda_{\text{ex}} = 559$ nm) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A**) 17 β -Estradiol, **B**) Diethylstilbestrol, **C**) Raloxifen, **D**) Tamoxifen, **E**) 4-Hydroxytamoxifen sowie **F**) acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

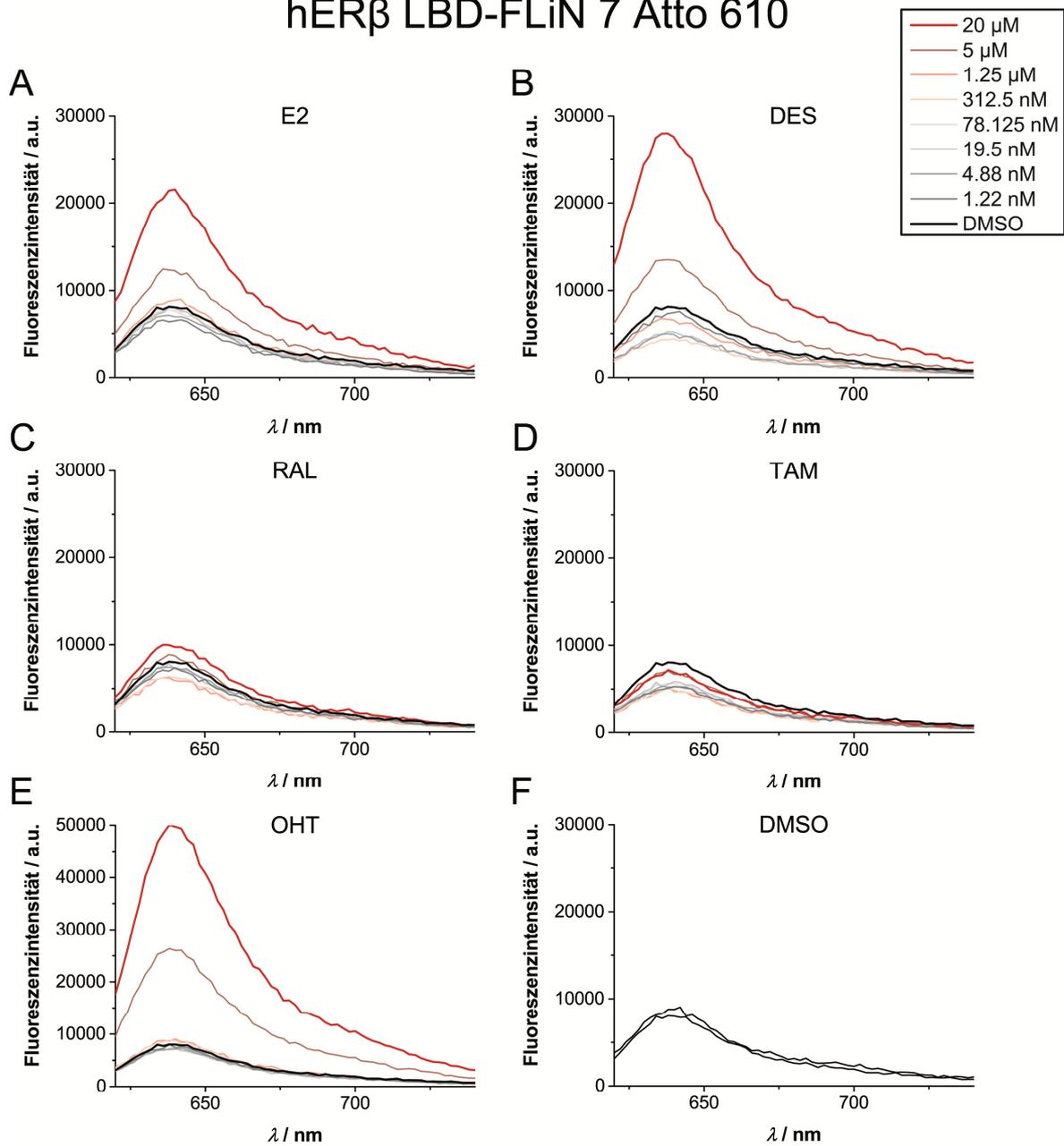
hER β LBD-FLiN 7 Atto 610

Abbildung 10.5.2 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 7 mit Atto 610-Markierung ($\lambda_{\text{ex}} = 606 \text{ nm}$) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A)** 17 β -Estradiol, **B)** Diethylstilbestrol, **C)** Raloxifen, **D)** Tamoxifen, **E)** 4-Hydroxytamoxifen sowie **F)** zwei unabhängige 1 % DMSO-Kontrollen.

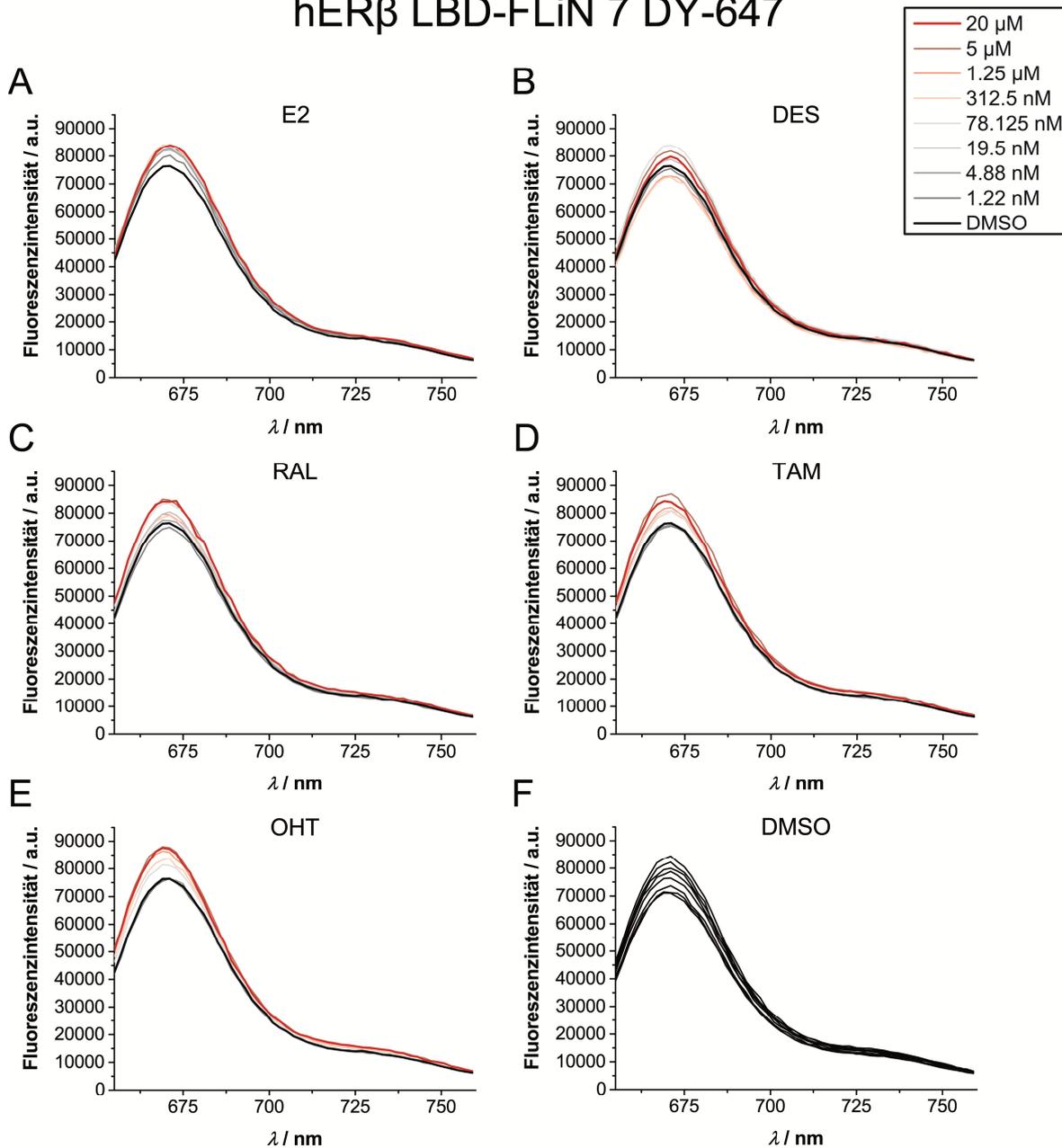
hER β LBD-FLiN 7 DY-647

Abbildung 10.5.3 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 7 mit DY-647-Markierung ($\lambda_{\text{ex}} = 640 \text{ nm}$) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A)** 17 β -Estradiol, **B)** Diethylstilbestrol, **C)** Raloxifen, **D)** Tamoxifen, **E)** 4-Hydroxytamoxifen sowie **F)** acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

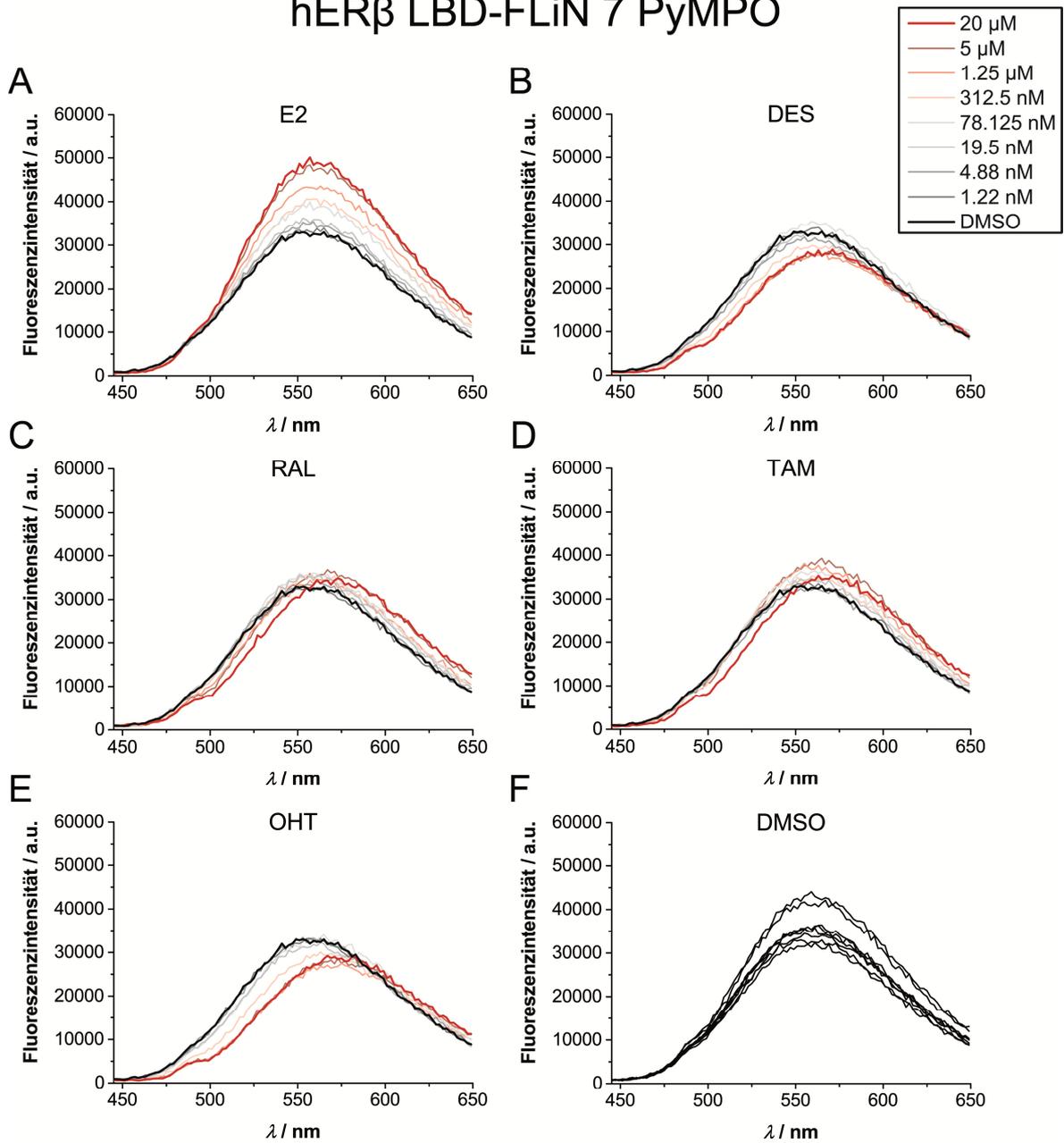
hER β LBD-FLiN 7 PyMPO

Abbildung 10.5.4 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 7 mit PyMPO-Markierung ($\lambda_{\text{ex}} = 419 \text{ nm}$) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A)** 17 β -Estradiol, **B)** Diethylstilbestrol, **C)** Raloxifen, **D)** Tamoxifen, **E)** 4-Hydroxytamoxifen sowie **F)** acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

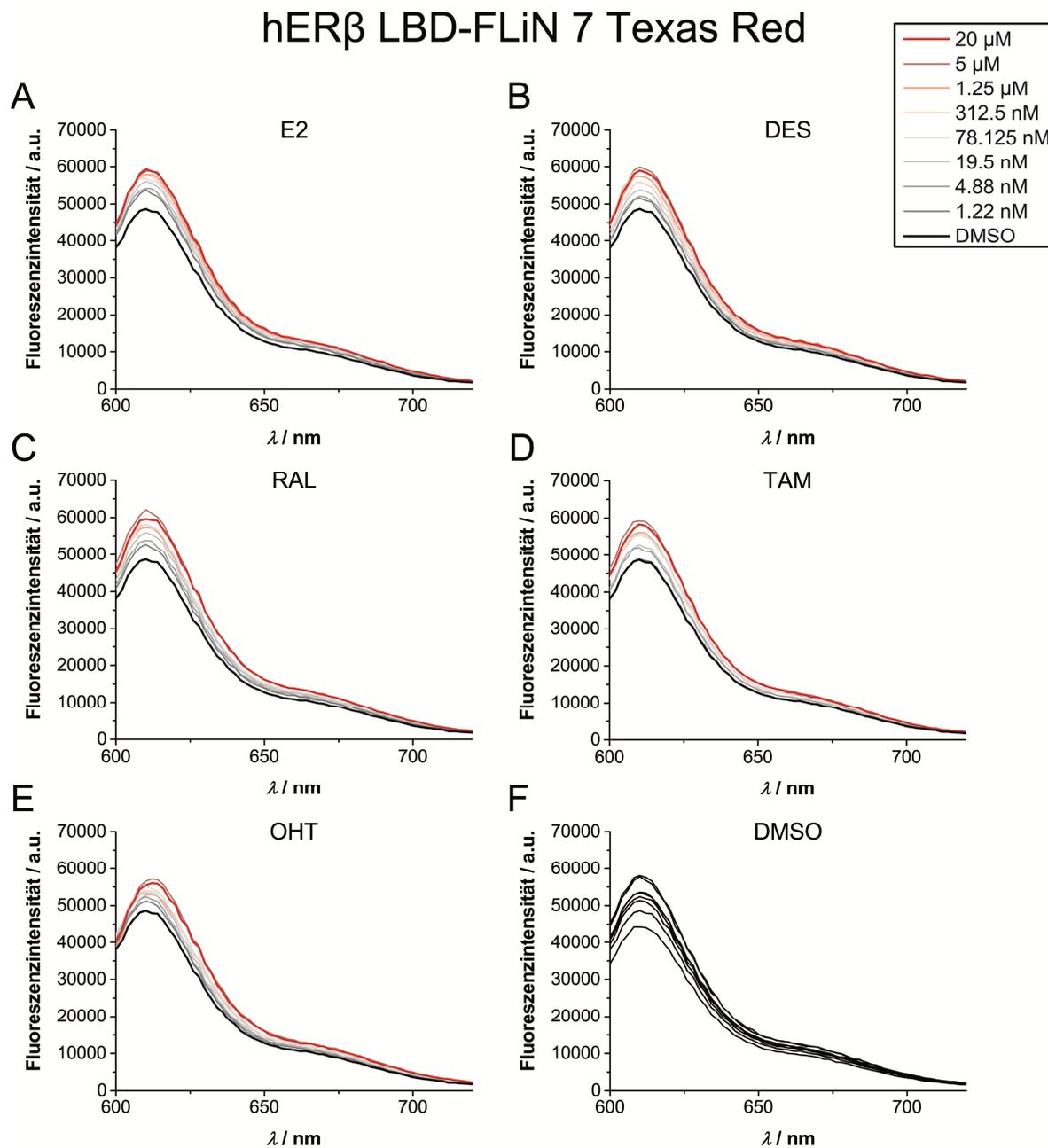


Abbildung 10.5.5 FLiN-Assay im Mikrotiterplattenformat. Fluoreszenzspektren von hER β LBD-FLiN 7 mit Texas Red-Markierung ($\lambda_{\text{ex}} = 586$ nm) nach Zugabe steigender Konzentrationen an **A)** 17 β -Estradiol, **B)** Diethylstilbestrol, **C)** Raloxifen, **D)** Tamoxifen, **E)** 4-Hydroxytamoxifen sowie **F)** acht unabhängige, über die Mikrotiterplatte verteilte, 1 % DMSO-Kontrollen.

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh für die interessante Aufgabenstellung sowie die engagierte Betreuung während meiner Promotion bedanken. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Winter meinen Dank für die Übernahme des Koreferats aussprechen.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Personen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben: Angefangen mit Christian Grütter für seine Unterstützung bei der Röntgenkristallographie. Bei André Richters und Zhizhou Fang bedanke ich mich für die vielen hilfreichen Gespräche, die meine Arbeit oft voran gebracht haben. Besonderer Dank geht an Simone Eppmann und Andreas Arndt für die tatkräftige Unterstützung und große Hilfsbereitschaft bei der Laborarbeit. Meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der AG Rauh danke ich für die allzeit gute Arbeitsatmosphäre sowie die schöne Zeit, die wir auch außerhalb des Labors bei geselligen Abenden oder beim gemeinsamen Squash-spielen zusammen verbracht haben. Besonders herzlicher Dank geht dabei an André Richters, Christian Becker, Julian Engel, Steven Smith und Zhizhou Fang.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Petra Janning und Andreas Brockmeier für die Unterstützung bei allen Fragen zum Thema Massenspektroskopie sowie für die Durchführung der MS/MS Analysen. Dank geht auch an Dr. Ingrid Vetter und Georg Holtermann, die mir bei theoretischen und praktischen Fragen zur Röntgenkristallographie immer weiterhelfen konnten. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Zentralen Einrichtung Biotechnologie am Max-Planck-Institut Dortmund für die Bereitstellung der Nährmedien und die Analyse der DNA-Sequenzierungen. Ich danke Dr. Katrin Weise für die Anleitung bei der Durchführung der CD-Spektroskopie-Messungen sowie Prof. Dr. Claus Czeslik für hilfreiche Diskussionen.

André Richters und Matthias Haase möchte ich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Anmerkungen danken.

Für seine bedingungslose Unterstützung und den Zuspruch während der Promotion möchte ich mich bei meinem Freund Matthias bedanken, der auch in schwierigen Phasen immer zu mir gehalten hat. Der größte Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, ohne deren großzügige Unterstützung mein Studium und die Promotion nicht möglich gewesen wären.

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Mayer-Wrangowski, Svenja

Name, Vorname
(Surname, first name)

118993

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund, 11.10.2015

Ort, Datum
(Place, date)



Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Analyse ligandeninduzierter Konformationsänderungen von Proteinen

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Dortmund, 11.10.2015

Ort, Datum
(Place, date)



Unterschrift
(Signature)