

Identifizierung und Validierung von  
Proteinkinasen aus dem phytopathogenen Pilz  
*Ustilago maydis* als Zielproteine  
niedermolekularer Kinaseinhibitoren

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

Dissertation

von Diplombiologin  
Sandra Tückmantel  
aus Wuppertal

11. Januar 2011



Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage  
1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann  
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Schreier

Tag der mündlichen Prüfung:



meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2006 bis Dezember 2010 am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Daniel Rauh durchgeführt.

## Zusammenfassung

Zur Bekämpfung phytopathogener Pilze ist die kontinuierliche Suche nach neuen fungiziden Wirkstoffen unerlässlich: das Entstehen von Resistenzen führt häufig zum Wirkungsverlust bislang erfolgreicher Fungizide. Die Grundlage für diese Arbeit bildete die Evaluierung niedermolekularer Kinaseinhibitoren als neuartige Antimykotika, von denen die Klasse der N-substituierten Diaminopyrimidine in der Lage war, pilzliches Wachstum stark zu hemmen. Durch Profilierungsstudien gegen humane Proteinkinasen konnte gezeigt werden, dass eine Reihe verschiedener Kinasen von dieser Substanzklasse gehemmt werden, doch die pilzlichen Zielproteine waren vollkommen unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden weitere potenzielle Zielproteine der Diaminopyrimidine aus *U. maydis* mittels Affinitätschromatographie und anschließender massenspektrometrischer Analyse identifiziert. Die vier potenziellen Zielkinasen (ATG1, *UmGSK3*, Kpp2 und *UmAurora*) sollten als enzymatisch aktives Protein exprimiert und gereinigt werden, um ihre Hemmung durch biochemische Assays zu verifizieren. ATG1 konnte nicht in aktiver Form gereinigt werden. *UmAurora* konnte erst nach Identifizierung eines bislang unbekanntes Aktivators (*UmINCENP*) und Ko-Reinigung mit *UmINCENP*<sup>1424–1525</sup> als aktives Enzym gewonnen werden. *UmGSK3* und Kpp2 wurden von den verwendeten Diaminopyrimidinen nur schwach inhibiert, während die Aktivität von *UmAurora/UmINCENP* im niedrigen nanomolaren Bereich gehemmt wurde. *UmGSK3* sollte mit Hilfe eines chemo-genomischen Ansatzes unter Verwendung irreversibler Inhibitoren als Zielprotein validiert werden. Trotz des erfolgreichen Nachweises der Hemmung der Kinaseaktivität des modifizierten Proteins durch verschiedene irreversible Inhibitoren *in vitro* konnte diese Validierung auf Grund der Unwirksamkeit der Inhibitoren *in vivo* nicht abgeschlossen werden. Für *UmAurora* konnte durch Erzeugung einer konditionalen Knockdown-Mutante gezeigt werden, dass es sich um ein essentielles Protein handelt. Ferner zeigten

mikroskopische Analysen, dass die Repression der *UmAurora*-Transkription und die Behandlung mit Diaminopyrimidinen einen ähnlichen Phänotyp auslösen. Zusätzlich korreliert die *in vivo* Wirkung dieser Substanzen gut mit der Wirkung an *UmAurora in vitro*. Diese Befunde sind ein starker Hinweis darauf, dass es sich bei *UmAurora* um ein prominentes Zielprotein der Diaminopyrimidine handelt. Vergleichende Inhibitionsstudien an *UmAurora* und humanen Aurora Kinasen zeigten eine enge Korrelation der Inhibitionswerte; dennoch wurden Substanzen identifiziert, die Präferenz für *UmAurora* zeigen und als Ausgangspunkt für die Entwicklung Pilz-spezifischer Inhibitoren dienen könnten.



## Abstract

Fighting phytopathogenic fungi requires the continuous search for new antifungal agents: arising resistances commonly lead to loss of potency of so far successful fungicides. This study is based on the evaluation of small-molecule kinase inhibitors as novel antimycotics of which the class of N-substituted diaminopyrimidines were able to significantly reduce fungal growth. Profiling against protein human kinases revealed that numerous diverse kinases are being inhibited by this compound class. The fungal targets, however, were completely unknown. In this study potential target proteins of the diaminopyrimidines from *U. maydis* were identified using affinity chromatography with immobilized inhibitors and initially verified in biochemical assays. Of the four potential target kinases (ATG1, *UmGSK3*, Kpp2 and *UmAurora*), ATG1 could not be purified as active enzyme. *UmAurora* could only be obtained as an active kinase after identification of a formerly unknown activator protein (*UmINCENP*) and co-purification with *UmINCENP*<sup>1424–1525</sup>. *UmGSK3* and Kpp2 were only weakly inhibited by the compounds used in this study, while the activity of *UmAurora* was inhibited in the low nanomolar range. GSK3 was sought to be validated as target protein in a chemogenomic assay using irreversible inhibitors. Despite successful covalent bond formation of the inhibitors to the modified protein and subsequent inhibition of kinase activity *in vitro* the validation could not be completed due to ineffectiveness of the compounds *in vivo*. Using a conditional knockdown mutant, *UmAurora* could be shown to be an essential protein. Furthermore microscopic analyses revealed a similar phenotype for mutants with repressed *UmAurora* transcription and inhibitor-treated wild type cells. Additionally, the efficacy of diverse N-diaminopyrimidine compounds *in vivo* closely correlates to *UmAurora* inhibition *in vitro*. These findings are a strong indication that *UmAurora* is a prominent target of the diaminopyrimidines. Comparative analyses of *UmAurora* and human Aurora inhibition data show a close correla-

tion of  $IC_{50}$  values; however, compounds were identified that display preference towards *UmAurora* and could serve as a starting point for the development of novel fungus-specific inhibitors.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract</b>	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XVIII</b>
<b>Ankürzungsverzeichnis</b>	<b>XIX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Nahrungsmittelsicherung – eine der großen Herausforderungen der Zukunft . . . . .	1
1.2 Fungizide – eine Übersicht . . . . .	1
1.3 Resistenzentwicklung gegenüber Fungiziden . . . . .	3
1.4 Proteinkinasen - Schlüsselemente der Signaltransduktion . . . . .	4
1.5 Anomale Kinaseaktivität und Krankheit . . . . .	7
1.6 Proteinkinasen als Zielproteine . . . . .	8
1.7 Zielprotein-Identifizierung von Kinaseinhibitoren . . . . .	9
1.8 Validierung von Zielproteinen . . . . .	11
1.9 Kinaseinhibitoren als Fungizide . . . . .	13
1.10 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus . . . . .	14
1.11 Diaminopyrimidine als Fungizide . . . . .	16
1.12 Zielsetzung . . . . .	16
<b>2 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>19</b>
2.1 Identifizierung potenzieller Zielproteine in <i>U. maydis</i> . . . . .	19

2.1.1	Auswahl von Verbindungen für Affinitätschromatographie-Experimente . . . . .	20
2.1.1.1	<i>In vivo</i> Wirkung der gewählten Verbindungen . . . . .	21
2.1.1.2	<i>In vitro</i> Kinase-Selektivität der gewählten Verbindungen . . . . .	22
2.1.2	Herstellung der Affinitätsmatrix . . . . .	23
2.1.3	Verifizierung der Funktionalität der Matrix . . . . .	25
2.2	Anzucht von <i>U. maydis</i> für Affinitätschromatographie-Experimente . . . . .	26
2.2.1	Affinitätschromatographie mit immobilisierten Inhibitoren . . . . .	26
2.2.2	Identifizierung potenzieller Zielproteine . . . . .	29
2.3	Verifizierung der potenziellen Ziel-Proteinkinasen <i>in vitro</i> . . . . .	31
2.3.1	ATG1 – um06363 . . . . .	31
2.3.2	<i>UmGSK3</i> – um00560 . . . . .	32
2.3.3	Kpp2 – um03305 . . . . .	33
2.3.4	<i>UmAurora</i> – um10119 . . . . .	36
2.3.4.1	Expression und Aktivitätstest von MBP- <i>UmAurora</i> . . . . .	36
2.3.4.2	Identifizierung und Expression eines INCENP-Proteins von <i>U. maydis</i> . . . . .	38
2.3.4.3	Ko-Reinigung und Aktivitätstest eines <i>UmAurora/UmINCENP</i> <sup>1424–1575</sup> Komplexes . . . . .	39
2.4	Chemo-Genomische Validierung von <i>UmGSK3</i> als Zielprotein . . . . .	44
2.4.1	Heterologe Expression aktiver <i>UmGSK3</i> -Mutanten in <i>E. coli</i> . . . . .	46
2.4.2	<i>In vitro</i> Inhibitionsstudien mit irreversiblen Inhibitoren . . . . .	47
2.4.3	Homologe Expression von <i>UmGSK3-T131C</i> in <i>U. maydis</i> . . . . .	51
2.4.4	<i>In vivo</i> Inhibitionsstudien mit irreversiblen Inhibitoren . . . . .	54
2.4.4.1	Plattentest (in Flüssigkultur) . . . . .	54
2.4.4.2	Hemmhofest . . . . .	54
2.5	Auswirkungen von <i>UmAurora</i> -Repression auf <i>U. maydis</i> . . . . .	57
2.5.1	Herstellung einer konditionalen <i>UmAurora</i> -Knockdown-Mutante . . . . .	57
2.5.2	Letalität der konditionalen <i>UmAurora</i> -Knockdown-Mutation . . . . .	58
2.5.3	Antikörper-Nachweis der <i>UmAurora</i> -Repression . . . . .	60
2.5.4	Phänotyp der konditionalen <i>UmAurora</i> -Knockdown-Mutante . . . . .	62
2.5.5	Phänotyp von Inhibitor-behandelten Zellen . . . . .	63
2.6	Vergleichende Inhibitionsstudien . . . . .	65
2.6.1	Korrelation zwischen Wachstumshemmung und <i>UmAurora</i> -Inhibition . . . . .	66
2.6.2	Korrelation zwischen Inhibition von <i>UmAurora</i> und humanen Aurora Kinasen . . . . .	67
<b>3</b>	<b>Ausblick</b> . . . . .	<b>69</b>

<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>71</b>
4.1	Materialien	71
4.1.1	Geräte	71
4.1.1.1	Geräte für Proteinexpression, -reinigung und andere biologische Versuche	71
4.1.1.2	Geräte für Enzym-Assays	72
4.1.1.3	Geräte für chemische Experimente	72
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	72
4.1.3	Kits	73
4.1.4	Chemikalien	73
4.1.5	Medien zur Anzucht und Lagerung von <i>U. maydis</i>	74
4.1.6	Fertiglösungen -puffer und -medien	76
4.1.7	Elektrophorese-Größenstandards	76
4.1.8	Säulen und Säulenmaterial	76
4.1.9	Enzyme	76
4.1.10	Antikörper	77
4.1.11	Plasmide	77
4.1.11.1	<i>E. coli</i> Plasmide	77
4.1.11.2	Plasmide zum Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	78
4.1.12	Konstrukte zur Transformation in <i>U. maydis</i>	79
4.1.12.1	<i>UmAurora</i> -Deletionskonstrukte	79
4.1.12.2	GSK3-Mutationskonstrukte	80
4.1.13	Oligonukleotide	80
4.1.14	Sonden zum Nachweis der DNA	82
4.1.15	Software / Server	83
4.2	Stämme	83
4.2.1	Bakterienstämme	83
4.2.2	<i>U. maydis</i> -Stämme	83
4.3	Chemische Methoden	83
4.3.1	Immobilisierung von Inhibitoren	83
4.3.2	Nachweis der Immobilisierung	84
4.4	Mikrobiologische und genetische Methoden	84
4.4.1	<i>E. coli</i>	84
4.4.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	84
4.4.1.2	Bestimmung der Zelldichte bei <i>E. coli</i>	85
4.4.1.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	85
4.4.2	<i>Ustilago maydis</i>	85
4.4.2.1	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	85
4.4.2.2	Bestimmung der Zelldichte bei <i>U. maydis</i>	85
4.4.2.3	ED <sub>50</sub> -Bestimmung bei <i>U. maydis</i>	85
4.4.2.4	Repression des <i>crg1</i> -Promotors	86

4.4.2.5	Protoplastierung und Transformation von <i>U. maydis</i> . . . . .	86
4.4.2.6	Mikroskopie und Bildverarbeitung . . . . .	87
4.4.2.7	Immobilisierung der Zellen für Mikroskopieaufnahmen . . . . .	87
4.4.2.8	Zellwand-Färbung . . . . .	88
4.4.2.9	Zellkern-Färbung . . . . .	88
4.5	Molekularbiologische Methoden . . . . .	88
4.5.1	Handhabung von DNA . . . . .	88
4.5.1.1	Fällung . . . . .	88
4.5.1.2	Phenol/Chloroform-Extraktion . . . . .	89
4.5.1.3	Reinigung von PCR-Produkten und verdauten Fragmenten . . . . .	89
4.5.2	Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	89
4.5.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	89
4.5.2.2	DNA-Isolierung aus <i>U. maydis</i> . . . . .	89
4.5.3	Nachweis von DNA . . . . .	90
4.5.3.1	Transfer von DNA (Southern Blot) . . . . .	90
4.5.3.2	Spezifischer Nachweis immobilisierter DNA . . . . .	90
4.5.4	Klonierung mit Hilfe des Gateway®-Systems . . . . .	90
4.5.4.1	Klonierung in pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo® . . . . .	91
4.5.4.2	Klonierung in den Expressionsvektor pDESTMC2 . . . . .	91
4.5.5	Sequenzanalyse von DNA . . . . .	91
4.5.5.1	Sequenzierung . . . . .	91
4.5.5.2	Sequenzanalyse . . . . .	91
4.5.6	PCR . . . . .	92
4.5.6.1	Standard-PCR . . . . .	92
4.5.6.2	Gateway®-kompatible PCR . . . . .	92
4.5.6.3	Kolonie-PCR auf <i>U. maydis</i> Zellen . . . . .	93
4.5.6.4	Gerichtete PCR-Mutagenese . . . . .	93
4.6	Biochemische Methoden . . . . .	93
4.6.1	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	93
4.6.2	Fällung von Proteinen . . . . .	94
4.6.3	SDS-Gelelektrophorese von Proteinen . . . . .	94
4.6.4	Färbung von Proteingelen . . . . .	94
4.6.4.1	Färbung mit SimplyBlue™ SafeStain . . . . .	94
4.6.4.2	Färbung mit Coomassie . . . . .	94
4.6.4.3	Silberfärbung . . . . .	95
4.6.5	Transfer von Proteinen (Western Blot) . . . . .	95
4.6.6	Nachweis von immobilisierten Proteinen . . . . .	96
4.6.6.1	Chromogene Detektion . . . . .	96

---

4.6.6.2	Chemilumineszente Detektion . . . . .	96
4.6.7	Reinigung potenzieller Zielproteine mittels immobilisierter Inhibitoren . . . . .	97
4.6.8	Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse	98
4.6.9	Massenspektrometrische Analyse von Peptiden . . . . .	99
4.6.10	Überexpression und Reinigung von MBP-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i> . . . . .	99
4.6.11	TEV-Verdau von MBP-Fusionsproteinen . . . . .	100
4.6.12	Kinaseaktivitätstests . . . . .	100
4.6.12.1	Radioaktiver Assay . . . . .	100
4.6.12.2	Z'Lyte™ Kinase Assay Kit-Ser/Thr 9 Peptide . . .	103
4.6.12.3	IMAP Fluoreszenz-Polarisations-Assay . . . . .	105
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>109</b>
<b>A Sequenzen</b>		<b>121</b>
<b>B Danksagung</b>		<b>127</b>
<b>C Lebenslauf</b>		<b>129</b>





## Abbildungsverzeichnis

1.1	Weltweite Verkäufe von Fungiziden im Jahr 2003 und ihr Wirkmechanismus. . . . .	2
1.2	Die Hauptkomponenten des MAP-Kinase-Signalwegs. . . . .	4
1.3	Aufbau einer typischen Kinase. . . . .	5
1.4	Prinzip der Affinitätschromatographie. . . . .	11
1.5	Analog-sensitive Kinase-Mutante. . . . .	12
1.6	Strukturformeln von Fenpiclonil (a) und Phenylaminopyrimidinen vom Typ A (b). . . . .	14
1.7	Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> . . . . .	15
2.1	Strukturen der für die Zielprotein-Identifizierung verwendeten Verbindungen. . . . .	21
2.2	Modell einer typischen humanen Kinase im Komplex mit Verbindung <b>1</b> . . . . .	22
2.3	<i>In vivo</i> Inhibition von <i>U. maydis</i> durch die Verbindungen 1–4. . . . .	23
2.4	Inhibitionsprofile der Verbindungen <b>1</b> und <b>2</b> . . . . .	24
2.5	Kopplungsreaktion von <b>2</b> an NHS-aktivierte Sepharose. . . . .	24
2.6	Funktionalitätskontrolle der Inhibitormatrix. . . . .	26
2.7	Fermentation von <i>U. maydis</i> . . . . .	27
2.8	Silber-gefärbtes Gel des Vergleichs von Niedrig-Salz- und Hoch-Salz-Bedingungen. . . . .	28
2.9	Eluate dreier Affinitätschromatographie-Experimente. . . . .	29
2.10	Reinigung von MBP-ATG1. . . . .	31
2.11	Aufreinigung von MBP-Kpp2. . . . .	34
2.12	Kinetik von MBP-Kpp2. . . . .	36

2.13	Humane Aurora Kinase A im Komplex mit einem Diaminopyrimidin.	37
2.14	Radioaktiver MBP- <i>UmAurora</i> -Assay.	38
2.15	Sequenzabgleich von Pic1 aus <i>S. pombe</i> und um03367.	39
2.16	Kinetik von MBP- <i>UmAurora</i> /MBP- <i>UmINCENP</i> <sup>1424–1575</sup> mit verschiedenen IMAP-Substraten.	40
2.17	Reinigung von MBP-IPL1 alleine und MBP- <i>UmAurora</i> /MBP- <i>UmINCENP</i> <sup>1424–1575</sup> .	41
2.18	Gelfiltration (a) und dazugehöriges SDS-PAGE (b) des MBP- <i>UmAurora</i> /MBP- <i>UmINCENP</i> <sup>1424–1575</sup> -Komplexes.	42
2.19	Radioaktiver Assay des MBP- <i>UmAurora</i> /MBP- <i>UmINCENP</i> <sup>1424–1575</sup> -Komplexes.	42
2.20	Kinetiken des MBP- <i>UmAurora</i> /MBP- <i>UmINCENP</i> <sup>1424–1575</sup> -Komplexes mit dem IMAP®-Fluoreszenzpolarisationsassay.	43
2.21	Sensitivierte Kinase-Mutante.	45
2.22	Vergleich von <i>U. maydis</i> GSK3 mit EGFR.	46
2.23	Z'Lyte Assay der <i>UmGSK3</i> -Mutanten in verschiedenen Konzentrationen.	48
2.24	Chinazolin-Binde-Assay.	50
2.25	Strategie zum Einbringen der T131C-Mutation in <i>gsk3</i> .	52
2.26	Restriktionsverdau der PCR-Produkte der <i>GSK3</i> -Mutanten.	52
2.27	Southern Blot der <i>gsk3</i> -Mutanten.	53
2.28	Wachstumstest von Wildtyp und Mutanten mit <i>gsk3</i> -T131C.	54
2.29	Hemmhoftest der <i>UmGSK3</i> -Mutante mit RL11 und RL13.	55
2.30	Funktionsprinzip des induzierbaren <i>crg1</i> -Promotors.	57
2.31	Konstrukte zur Deletion der <i>UmAurora</i> .	58
2.32	Southern Blot zur Verifizierung der <i>UmAurora</i> -Mutanten.	59
2.33	Wachstum der konditionalen <i>UmAurora</i> -Mutante in Arabinose- und Glukose-haltigem Flüssigmedium.	60
2.34	Wachstum der konditionalen <i>UmAurora</i> -Mutante in Arabinose- und Glukose-haltigem Festmedium.	61
2.35	Western Blot der <i>UmAurora</i> -3×HA.	62
2.36	Phänotyp der konditionalen <i>UmAurora</i> -Mutante.	64
2.37	Phänotyp von Inhibitor-behandelten <i>U. maydis</i> Zellen.	65
2.38	Vergleichende Analyse von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Daten.	67
2.39	Vergleich der Inhibitionswerte der <i>UmAurora</i> mit humanen Aurora Kinasen.	68

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
ATG1	Autophagie 1
ATP	Adenosintriphosphat
Arkl	<i>aurora-related kinase 1</i> , Aurora-verwandte Kinase 1
Bcr	<u>breakpoint cluster region</u>
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
bp	Basenpaare
c-Abl	<i>V-abl</i> <u>A</u> belson murine leukemia viral oncogene homolog
Cbx <sup>R</sup>	Carboxin-Resistenz
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> , cyclin-abhängige Kinase
CML	chronische myeloische Leukämie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED <sub>50</sub>	Effektivdosis 50%
EGFR	<i>endothelial growth factor receptor</i> , Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
ErbB2	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
FDA	<u>United States Food and Drug Administration</u> , Behördliche Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten
GAK	Cyclin G-aktivierte Kinase

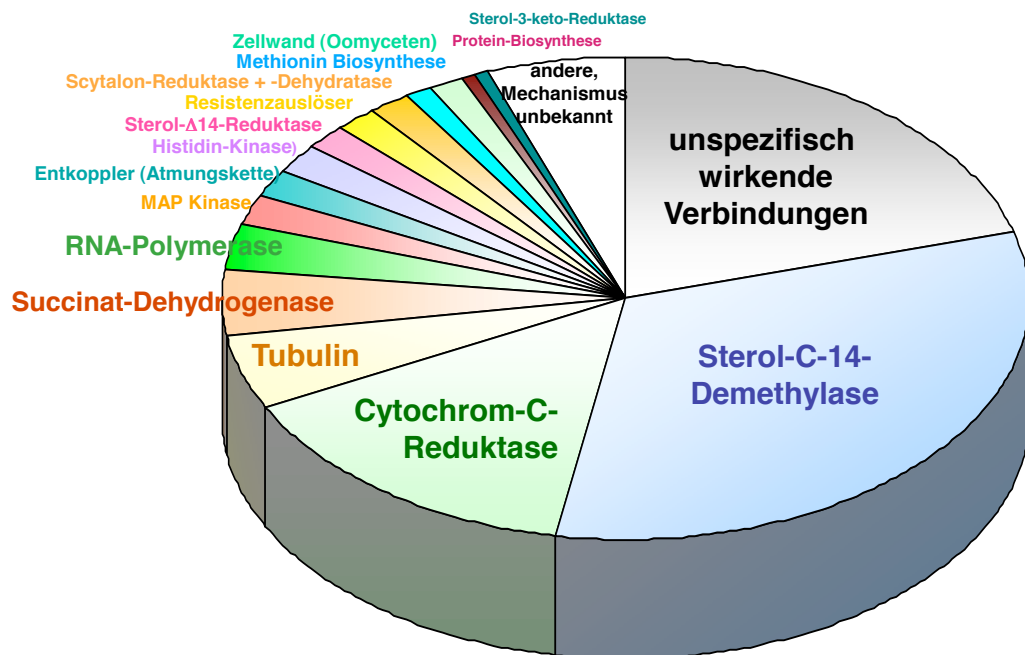
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hyg <sup>R</sup>	Hygromycin-Resistenz
IC <sub>50</sub>	<i>inhibitory concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
INCENP	inneres Centromer-Protein
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MAP Kinase	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MBP	Maltose-Bindeprotein
<i>M. grisea</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
MIPS	<i>Munich Information Center for Protein Sequences</i> , Müncher Informationszentrum für Proteinsequenzen
MS	Massenspektrometrie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Nr.	Nummer
NSY Medium	<i>Nutrient broth soytone yeast extract</i> Medium, in Kombination mit Glycerin Standard-Einfriermedium für <i>U. maydis</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , Blutplättchen-Wachstumsfaktor
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Src	<i>sarcoma kinase</i> , Sarkoma-Kinase
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i> , Markierung mit stabilen Isotopen von Aminosäuren in Zellkultur
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	über Nacht
<i>U. maydis</i>	<i>Ustilago maydis</i>
<i>UmAurora</i>	<i>Ustilago maydis</i> Aurora
<i>UmINCENP</i>	<i>Ustilago maydis</i> INCENP
Upm	Umdrehungen pro Minute

## 1.1 Nahrungsmittelsicherung – eine der großen Herausforderungen der Zukunft

Die Sicherung der Ernährung ist eine der großen Herausforderungen unserer Zeit. Eine wachsende Weltbevölkerung in Verbindung mit der Problematik des Klimawandels erfordert neue Strategien zur Steigerung des Ernteertrags (Rosegrant und Cline, 2003). Unter einer Vielzahl von Faktoren, die zu Ertragsminderung führen können, spielt der Befall mit phytopathogenen Organismen eine besondere Rolle: in den Jahren 2001 bis 2003 waren Pilze und Bakterien für 10% der Ernteverluste verantwortlich (Oerke, 2006). Allein in den Vereinigten Staaten führt der Befall mit phytopathogenen Organismen, in der Mehrzahl Pilze, zu Verlusten in Höhe von 21 Milliarden US-Dollar jährlich (Rossman, 2009). Zur Bekämpfung phytopathogener Pilze ist bereits eine Vielzahl an Fungiziden auf dem Markt. Allerdings kommt es häufig zu Resistenzen gegen langjährig eingesetzte Verbindungen (Brent und Hollomon, 2007), was eine kontinuierliche Suche nach neuen fungiziden Agenzien sowie bisher unbekanntem Zielproteinen erforderlich macht.

## 1.2 Fungizide – eine Übersicht

Weltweit werden aktuell etwa 150 verschiedene fungizide Verbindungen eingesetzt (Brent und Hollomon, 2007). Abbildung 1.1 gibt eine Übersicht der weltweit verkauften Fungizide im Jahr 2003 und ihre Wirkmechanismen. Die mit Abstand größte Bedeutung kommt Hemmern der Sterol-C-14-Demethylase zu, die einen essentiellen Schritt in der pilzlichen Sterolbiosynthese katalysiert (Lamb *et al.*, 2000). Einen ebenfalls großen Anteil machen Substanzen aus, die unspezifisch eine Vielzahl



**Abbildung 1.1: Weltweite Verkäufe von Fungiziden im Jahr 2003 und ihr Wirkmechanismus.** Der Gesamtumsatz beläuft sich auf etwa 6 Milliarden Euro. Quelle: Bayer CropScience Business Intelligence und Klaus Tietjen.

an Proteinen treffen, gefolgt von Inhibitoren der Cytochrom-C-Reduktase, eines Bestandteils der mitochondrialen Atmungskette.

Unspezifisch wirkende Fungizide werden seit vielen Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt; auf Grund der Vielzahl an getroffenen Proteinen kommt es bei dieser Gruppe äußerst selten zur Ausbildung von Resistenzen (Kuck und Gisi, 2007). Sie haben aber eine Reihe von Nachteilen, die den zusätzlichen Einsatz zielspezifischer Fungizide erfordern: wegen ihrer unspezifischen Wirkweise können sie nicht systemisch d.h. die ganze Pflanze durchdringend eingesetzt werden, da sie sonst auch die Pflanze schädigen würden. Sie können daher nur präventiv durch kontinuierliche äußere Behandlung der Pflanze verwendet werden. Ist der Pilz einmal in die Pflanze eingedrungen, kann die Infektion nur mit systemisch wirkenden Mitteln bekämpft werden. Diese Substanzen hemmen meist recht spezifisch ein einziges Protein der Pilze und schädigen nicht die Pflanze, allerdings kommt es hierbei verstärkt zu Resistenzbildung.

Wie Abbildung 1.1 zeigt, beschränkt sich der aktuelle Markt an fungiziden Wirkstoffen auf Inhibitoren einiger weniger Proteine. Dies unterstreicht, dass die Entwicklung neuer Fungizide nicht trivial ist. Dennoch macht Resistenzbildung gegen

herkömmliche Fungizide die Evaluierung neuer Zielproteine zunehmend notwendig.

### 1.3 Resistenzentwicklung gegenüber Fungiziden

Bis etwa 1970 waren nur wenige Fälle von Resistenz gegen Fungizide bekannt. Mit der Einführung systemischer Fungizide stieg jedoch nicht nur die Zahl der Resistenzen rapide an, es kam auch zu schnellerer Ausbildung von Resistenzen, in manchen Fällen innerhalb von zwei Jahren nach Markteinführung des Produkts. Tabelle 1.1 zeigt eine Reihe fungizider Substanzklassen und die Zeitspanne von Markteinführung bis zur Beobachtung von Resistenzbildung.

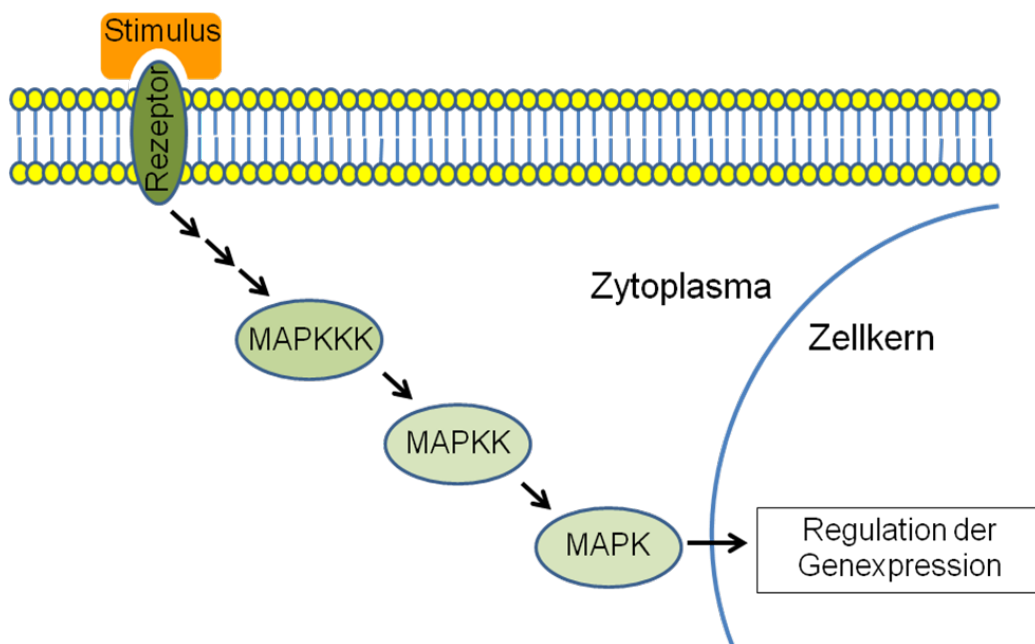
Fungizid-Klasse	erste Resistenzen in (Jahr)	Jahre kommerzieller Nutzung bis Resistenzbeobachtung	Wirkmechanismus
aromatische Kohlenwasserstoffe	1960	20	unspezifisch
organische Quecksilberverbindungen	1964	40	unspezifisch
Dodin	1969	10	unspezifisch
Benzimidazole	1970	2	Mitose ( $\beta$ -Tubulin-Zusammenbau)
2-Aminopyrimidine	1971	2	Purin-Metabolismus (Adenosin-Deaminase)
Phosphorothiolate	1976	9	Phospholipid-Biosynthese (Methyltransferase)
Phenylamide	1980	2	RNA-Synthese (RNA-Polymerase I)
Sterol-Demethylierungs-Hemmer	1982	7	Sterol-Biosynthese (Sterol-C14-Demethylase)
Carboxanilide	1985	15	Atmungskette (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase)
Phenylpyrrole	1998	4	Signaltransduktion (MAP Kinase)
Strobilurine	1998	2	Atmungskette (Ubichinol-Oxidase)
Anilinopyrimidine	2000	5	Methionin-Biosynthese (Cystathionin- $\gamma$ -Synthase)
Inhibitoren der Melanin-Biosynthese	2002	2	Melanin-Biosynthese (Dehydratase)

**Tabelle 1.1: Resistenzbildung gegenüber Fungiziden.** Die Tabelle zeigt eine Auswahl gebräuchlicher fungizider Substanzklassen, ihren Wirkmechanismus sowie die Dauer der kommerziellen Nutzung bis zur ersten Beobachtung von Resistenzen. Quellen: Kuck und Gisi (2007); Brent und Hollomon (2007).

Diese Daten verdeutlichen die Notwendigkeit der Identifizierung und anschließenden Evaluierung neuer Wirkstoffe und neuer Zielproteine. Eine interessante Klasse potenzieller Zielproteine sind Proteinkinasen. Phenylpyrrole sind bereits als fungizide Proteinkinase-Inhibitoren auf dem Markt, wodurch die generelle Eignung von Proteinkinasen als Ziele fungizider Wirkstoffe belegt wird. In den folgenden Kapiteln werden Proteinkinasen, Proteinkinase-Inhibitoren sowie deren Potenzial als Fungizide vorgestellt.

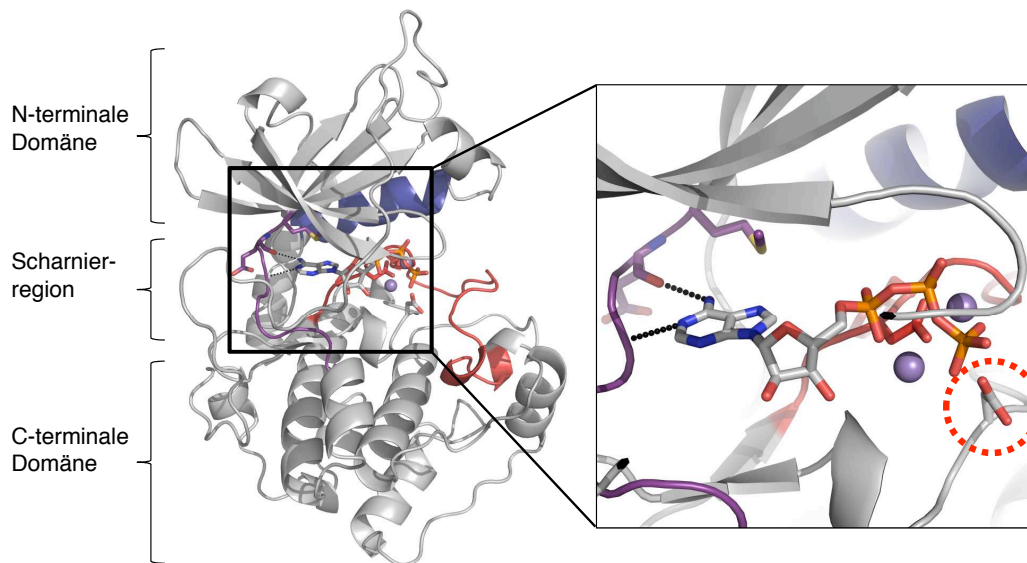
## 1.4 Proteinkinasen - Schlüsselemente der Signaltransduktion

Die Fähigkeit, die eigene Umgebung wahrzunehmen und in angemessener Weise darauf zu reagieren ist ein entscheidender Faktor für die Lebensfähigkeit aller Organismen. Ein einfaches Beispiel sind die gezielten Bewegungen von Bakterien hin zu einer vorteilhaften Umgebung und weg von nachteiligen Umgebungen. Zur Wahr-



**Abbildung 1.2: Die Hauptkomponenten des MAP-Kinase-Signalwegs.** Nach Interaktion eines externen Stimulus (z.B. Wachstumsfaktor, UV, Pheromon, Stresssignal) mit einem Rezeptorprotein erfolgt die Aktivierung einer MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), welche eine MAP Kinase Kinase (MAPKK) durch Phosphorylierung aktiviert, die wiederum eine MAP Kinase (MAPK) phosphoryliert. Diese letzte MAP Kinase reguliert über Transkriptionsfaktoren die Genexpression, um angemessen auf den Stimulus zu reagieren.





**Abbildung 1.3: Aufbau einer typischen Kinase.** Gezeigt ist die Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus Maus (PDB-Code 1ATP). Links eine Übersicht der gesamten katalytischen Untereinheit; rechts eine Detailansicht der ATP-Bindungstasche mit gebundenem Mangan-ATP. Mit dem Adeninring bildet ATP eine Wasserstoffbrücke zur Scharnierregion (violett) aus. Der Türsteherrest (hier Methionin) befindet sich im oberen Bereich der Scharnierregion. Die Aktivierungsschleife ist in rot gezeigt; die Helix C in blau. Unterhalb der Phosphatgruppen ist das katalytische Aspartat zu sehen (roter Kreis), die Mangan-Ionen sind als violette Sphären dargestellt.

nehmung externer Stimuli benötigen Zellen Rezeptoren, die das wahrgenommene Signal in das Zellinnere weiterleiten, wo es zu einer angemessenen Reaktion — in der Regel Änderungen in der Genexpression — kommt (Parkinson, 1993).

Diese Signaltransduktion geschieht in der Mehrzahl der Fälle durch eine Kette von Phosphorylierungsreaktionen; dieses Prinzip ist von einfachen Prokaryoten über Pflanzen bis zum Menschen hochkonserviert (Ulrich *et al.*, 2005; Elion *et al.*, 2005; Stone und Walker, 1995; Manning *et al.*, 2002a,b).

In Eu- und Archae-Bakterien erfolgt die Signaltransduktion vorwiegend mit Hilfe von Ein- oder Zwei-Komponenten-Systemen. Bei dem wohl evolutionär ältesten Ein-Komponenten-System befinden sich eine Histidin-Kinase und ein Antwortregulator auf einem Protein. Bei Wahrnehmung des Signals wird der Antwortregulator von der Kinase phosphoryliert, was zu einer Signalkaskade und letztendlich zur Reaktion auf das Signal führt. Bei dem etwas höher entwickelten Zwei-Komponenten-System liegen die Histidin-Kinase und der Antwortregulator als separate Proteine vor (Ulrich *et al.*, 2005). Eine weitere Art der Signaltransduktion in Bakterien ist eine Phosphorylierungskaskade über Kinasen, die Serine, Threonine

oder Tyrosine phosphorylieren. Während man lange Zeit davon ausging, dass diese Methode der Signalübertragung nur in Eukaryoten existiert, ist mittlerweile bekannt, dass sie auch in Prokaryoten vorkommt (Bakal und Davies, 2000; Grangeasse *et al.*, 2007).

In Pflanzen erfolgt die Signaltransduktion in den meisten Fällen über Serin/Threonin-Proteinkinasen. Diese Phosphorylierungsreaktion ist an der Wahrnehmung unterschiedlichster Signale wie z.B. Licht, Pathogenbefall, Hormone, Temperatur und Nährstoffe beteiligt. Wird diese Reaktion beispielsweise durch eine genetische Deletion der involvierten Proteinkinasen gestört, hat dies gravierende Folgen, was von schweren Wachstumsdefekten bis zum Tod des Organismus führen kann (Stone und Walker, 1995; Nakagami *et al.*, 2006).

Die Signalübertragung in Pilzen erfolgt sowohl über Histidin- als auch über Serin/Threonin-Proteinkinasen und ist auch hier an einer Vielzahl essentieller Prozesse, wie beispielsweise Morphogenese, Zellzyklus und Pathogenität beteiligt. Obwohl auch Phosphorylierung an Tyrosinresten beobachtet wurde, ist bisher noch keine pilzliche Kinase als echte Tyrosin-Kinase beschrieben worden (Dickman und Yarden, 1999).

Obwohl auch in Säugetieren Histidin-Kinasen beschrieben wurden, so gehören doch die bekanntesten und am besten untersuchten Proteinkinasen der Säugerzellen entweder zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen oder der Tyrosin-Kinasen (Besant und Attwood, 2005). Sie sind Teil einer Vielzahl an komplexen Signaltransduktionsketten, die auch untereinander vernetzt sind, um die jeweils korrekte Reaktion auf einen gegebenen Stimulus zu ermöglichen (Pawson und Nash, 2000). Ein Beispiel hierfür ist die gut untersuchte MAP Kinase-Kaskade (Abbildung 1.2 auf Seite 4): hierbei wird zunächst durch Bindung z.B. eines Wachstumsfaktors die Phosphorylierung der ersten Kinase in der Kaskade, eine MAP Kinase Kinase, ausgelöst. Diese wiederum phosphoryliert eine MAP Kinase Kinase, die Phosphatreste auf eine MAP Kinase überträgt, welche daraufhin ebenfalls durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren aktivieren, eine positive oder negative Rückkopplung auslösen oder Einfluss auf andere Signalwege nehmen kann (Davis, 1993).

Auch wenn man lange Zeit davon ausging, dass Signaltransduktion in Prokaryoten ausschließlich durch Histidin-Kinasen und in Eukaryoten durch Serin/Threonin- oder Tyrosin-Kinasen erfolgt, ist mittlerweile bekannt, dass sowohl eukaryotische Histidin-Kinasen als auch prokaryotische Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen existieren (Hanks und Hunter, 1995; Grangeasse *et al.*, 2007; Loomis *et al.*, 1997).

Serin/Threonin- und Tyrosin-Proteinkinasen sind durch eine hohe Konservierung ihrer homologen katalytischen Kinasedomänen charakterisiert. Alle Proteinkinasedomänen besitzen eine ähnliche Faltung: ein N-terminales Segment, das hauptsächlich eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufweist und ein größeres C-terminales Segment, das hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices besteht. Charakteristisch für Kinasen

sind außerdem die Aktivierungsschleife, die katalytische Schleife und das hoch konservierte DFG-Motiv, das sich in fast allen Kinasen wiederfindet und eine wichtige Rolle bei der korrekten Positionierung des  $\gamma$ -Phosphats des ATP spielt. Die Bezeichnung „katalytische Schleife“ leitet sich von der darin liegenden katalytischen Aminosäure (Aspartat) ab, die den Transfer des  $\gamma$ -Phosphats von ATP auf das Substrat katalysiert (Abbildung 1.3 auf Seite 5). Die Aktivierungsschleife blockiert im dephosphorylierten Zustand das aktive Zentrum des Enzyms, so dass die Substratbindung deutlich erschwert ist. Wird die Aktivierungsschleife phosphoryliert — dies kann durch Autophosphorylierung oder durch eine weitere Kinase geschehen — gibt sie das aktive Zentrum frei, wodurch die Aktivität der Kinase um mehrere Größenordnungen steigt (Rabiller *et al.*, 2010; Hanks und Hunter, 1995; Adams, 2003).

Die meisten der 518 Proteinkinasen des humanen Genoms gehören zu derselben Superfamilie und wurden von Manning *et al.* (2002a) hauptsächlich auf der Basis der Sequenz ihrer Kinasedomänen in acht Gruppen unterteilt. Bemerkenswert ist hierbei die Gruppe der Tyrosin-Kinasen: obwohl Tyrosin-Kinasen auch in Bakterien vorkommen (Cozzone, 2009), sind Rezeptor-Tyrosin-Kinasen fast ausschließlich auf Metazoa beschränkt (Levitzki und Gazit, 1995) — die einzige Ausnahme bildet eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase aus Choanoflagellaten, welche näher mit den Metazoa verwandt sind als beispielsweise Pilze oder Pflanzen (King und Carroll, 2001).

## 1.5 Anomale Kinaseaktivität und Krankheit

Gerade wegen der großen Bedeutung der Proteinkinasen für die Signaltransduktion ist eine strikte Kontrolle der Kinaseaktivität essentiell. Eine feine Regulation dieser Enzyme, beispielsweise durch Phosphatase-Aktivität und/oder Kompartimentierung, ist notwendig, damit Kinasen erst durch den korrekten Stimulus ihre Aktivität entfalten können. Mutationen, Überexpression oder Genumlagerungen können zum Verlust dieser Regulation und somit zu unkontrollierter Kinaseaktivität führen.

Dies ist im Menschen oft der Auslöser für schwere Krankheiten wie Krebs, Diabetes, neurologische und Autoimmun-Krankheiten (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Gschwind *et al.*, 2004; Meraldi *et al.*, 2004). Von den über 100 bekannten Protoonkogenen gehört ein großer Teil zur Gruppe der Tyrosin-Kinasen, deren Deregulation oft charakteristisch für bestimmte Krebsarten ist. So werden beispielsweise Amplifikationen von ErbB2 und EGFR oft in Tumoren von Brust- und Lungenkrebs gefunden, während die Mehrzahl der Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) das Genprodukt der BCR-Abl-Translokation trägt (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Die Amplifikation von ErbB2 beispielsweise führt zu einer höheren Dichte dieser Rezeptorkinase in der Zellmembran, wodurch es häufiger zur Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren mit anderen ErbB-Kinasen kommt. Durch

diese Dimerisierung kommt es zu einer stark erhöhten Kinaseaktivität von ErbB2, was zu gesteigerter Proliferation der Zelle sowie zur Repression von Apoptose führt. Zusätzlich sind in ErbB2 überexprimierenden Zellen die Mechanismen zur Inaktivierung der Kinaseaktivität wie Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes und Internalisierung und Abbau des Rezeptors deutlich verlangsamt (Harari und Yarden, 2000). Im Fall der BCR-Abl-Translokation kommt es zum Chromosomenbruch und zur anschließenden Fusion des BCR-Gens mit dem Abl-Onkogen. Abl kodiert für eine Tyrosinkinase, die durch die Fusion mit BCR konstitutiv aktiviert wird. BCR-Abl aktiviert Zellteilungsmechanismen und inhibiert Apoptose (Warmuth *et al.*, 1999; Amarante-Mendes *et al.*, 1998). Durch die Fusion mit BCR wird außerdem der Transport von Abl in den Zellkern verhindert, wo es anderenfalls Apoptose auslösen könnte (Vigneri und Wang, 2001).

## 1.6 Proteinkinasen als Zielproteine

Da deregulierte Proteinkinasen eine große Rolle bei der Entstehung von Krebs und anderen schweren Krankheiten spielen, kann ihre gezielte Inhibition entscheidend zu einem Therapieerfolg beitragen. Seit der Entdeckung von Staurosporin als nanomolarem Inhibitor von Protein Kinase C im Jahr 1986 besteht ein besonderes Interesse auch der pharmazeutischen Industrie an Proteinkinasen als Zielproteinen (Cohen, 2002; Tamaoki *et al.*, 1986).

So entwickelten beispielsweise Buchdunger *et al.* (1996) den Abl- und PDGF-Rezeptor-Kinasehemmer CPG 57148, der als Imatinib Mesylat unter dem Handelsnamen Gleevec im Mai 2001 von der FDA zur Behandlung von CML zugelassen wurde (Cohen, 2002). Neben Imatinib wird noch eine Reihe weiterer Kinaseinhibitoren — Sunitinib, Nilotinib, Dasatinib, Sorafenib, Lapatinib — zur Behandlung verschiedener Krebserkrankungen eingesetzt (Haouala *et al.*, 2009). Der Großteil dieser Verbindungen gehört zur Klasse der ATP-kompetitiven Kinaseinhibitoren. Diese Substanzen besetzen die ATP-Bindungsstelle der Kinase und bilden Wasserstoffbrücken zur sogenannten Scharnierregion aus, wodurch sie ATP imitieren. Da ein Großteil der Proteinkinasen gerade in diesem Bereich hochkonserviert ist, ist die Entwicklung spezifischer Inhibitoren eine Herausforderung: im Regelfall hemmen ATP-kompetitive Inhibitoren eine Reihe verschiedener Kinasen, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Obwohl es bereits einige hoch selektive, ATP-kompetitive Inhibitoren gibt (Karaman *et al.*, 2008), ist ihre Entwicklung nicht trivial. Aus diesem Grund wurde eine weitere Klasse von Kinaseinhibitoren entwickelt, die sogenannten allosterischen Inhibitoren. Diese binden außerhalb der ATP-Bindestelle in weniger konservierten Bereichen und können dadurch eine höhere Selektivität erreichen (Bogoyevitch und Fairlie, 2007).

Ein weiteres Problem bei der Entwicklung von Kinaseinhibitoren ist die Entstehung von Resistenzen: eine der bekanntesten Mutationen, die zu Resistenz führt, ist ein Aminosäureaustausch am sogenannten Türsteher-Rest (beispielsweise ein Austausch von Threonin zu Isoleucin in BCR-Abl), wodurch dieser mehr Raum einnimmt. Während die Bindung von ATP hierdurch für gewöhnlich nicht beeinträchtigt wird, kann es so durch verschiedene Mechanismen (Verlust einer essentiellen Wasserstoffbrücke, sterische Hinderung) zu Resistenz gegenüber dem Inhibitor kommen (Zhang *et al.*, 2009).

Als Zielproteine niedermolekularer Inhibitoren finden allerdings nicht nur humane Proteinkinasen Beachtung; auch Kinasen aus Pathogenen wie beispielsweise *Plasmodium falciparum*, dem Erreger von Malaria, sind interessante Zielproteine (Doerig und Meijer, 2007): Harmse *et al.* (2001) identifizierten Purvalanol-Verbindungen, die die Aktivität eukaryotischer CDK1/Cyclin B1 äußerst schwach inhibierten, während sie in der Lage waren, das Wachstum von *P. falciparum* im submikromolaren Bereich zu hemmen. Durch Studien von Knockaert *et al.* (2000) war bereits bekannt, dass das Zielprotein von Purvalanol in *P. falciparum* die Proteinkinase CK1 (Caseinkinase 1) ist. Dies demonstriert, dass das Konzept „Proteinkinasen als Zielproteine“ nicht auf den Bereich der Humanmedizin beschränkt ist, sondern auch zur Bekämpfung von Pathogenen erfolgreich eingesetzt werden kann.

## 1.7 Zielprotein-Identifizierung von Kinaseinhibitoren

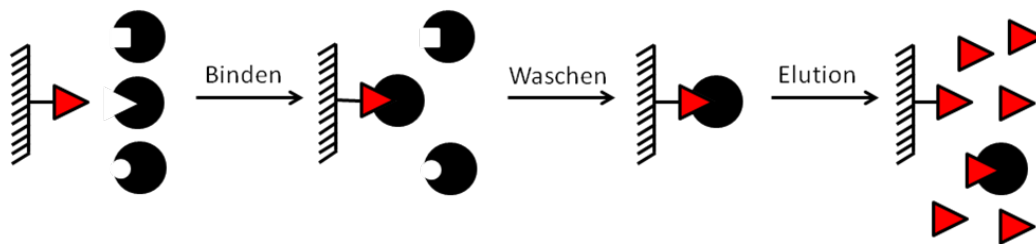
Zum vollständigen Verständnis der Wirkweise eines Inhibitors ist es notwendig, die von ihm gehemmten Proteine zu identifizieren. Die Kenntnis dieser Zielproteine eröffnet eine Reihe von Möglichkeiten: der genaue Bindungsmodus des Inhibitors kann über Computer-gestütztes Molekulardesign oder, im Idealfall, über Co-Kristallisation von Zielprotein und Inhibitor bestimmt werden. Dies ermöglicht die strukturbasierte Entwicklung weiterer, potenterer Verbindungen. Ebenso kann die Selektivität der Verbindung erhöht werden, da auch unerwünschte Nebenziele identifiziert werden, gegen deren Hemmung im weiteren Verlauf der Inhibitor-Entwicklung selektiert werden kann. Nicht zuletzt bietet die Identifizierung aller Zielproteine einer Verbindung die Chance, vollkommen neue Zielproteine zu finden, für welche spezifische Inhibitoren entwickelt werden können (Daub *et al.*, 2004).

Zur Identifizierung von Zielproteinen steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung, z.B. genetische Assays, Genexpressionsanalysen, biochemische Profilierung oder chemische Proteomik (Chan *et al.*, 2010). Genetische Assays wie Haploinsuffizienz- oder Überexpressions-Studien erfordern eine Bibliothek an Deletions- oder Überexpressions-Mutanten (Giaever *et al.*, 2004; Butcher *et al.*, 2006). Zur erfolgreichen Zielprotein-Identifizierung mit Hilfe von Gexpressionsanalysen ist eine Vielzahl an Expressionsprofilen zum Abgleich mit dem Profil Inhibitor-behandelter

Proben unerlässlich (Hughes *et al.*, 2000). Zur erfolgreichen Durchführung biochemischer Assays ist die Kenntnis zumindest der Klasse der Zielproteine notwendig. Im Fall von Kinaseinhibitoren können zwar interessante Verbindungen direkt in biochemischen Studien an einer Reihe von kommerziell erhältlichen, aktiven Proteinkinasen evaluiert werden; dies ist jedoch nicht nur mit erheblichem Arbeitsaufwand verbunden, es besteht auch das Risiko, dass die wirklichen Ziele keine Proteinkinasen sind oder nicht im Panel der getesteten Kinasen vorkommen (Daub, 2005). Darüber hinaus ist dieses Vorgehen nicht praktikabel, wenn der Fokus auf nicht humanen Enzymen liegt, die zum größten Teil nicht kommerziell verfügbar sind.

Um die intrazellulären Zielproteine einer Verbindung direkt aus Zellysaten zu isolieren und anschließend zu identifizieren, wurde eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, die im Wesentlichen alle auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie beruhen: bei der ursprünglichen Methode zur Zielprotein-Identifizierung wird der Inhibitor durch Anbringen eines Linkers so modifiziert, dass er an einer Matrix (z.B. Sepharose) immobilisiert werden kann. Durch Inkubation mit dem gewünschten Lysat, extensives Waschen und Elution mit der freien Verbindung (Abbildung 1.4) oder durch denaturierende Bedingungen und anschließende massenspektrometrische (MS) Analyse können die bindenden Proteine identifiziert werden. Wichtig ist hierbei eine adäquate Negativkontrolle (z.B. bei optisch aktiven Substanzen ein inaktives Enantiomer der aktiven Verbindung), um unspezifische Binder bei der Auswertung ausschließen zu können (Leslie und Hergenrother, 2008). Mit dieser Methodik lassen sich allerdings keine Aussagen über die Affinität der identifizierten Proteine zu der immobilisierten Verbindung machen; daher wurde sie zu verschiedenen Ansätzen weiterentwickelt, welche eine quantitative Analyse der potenziellen Zielproteine erlauben.

Durch die Zugabe von essentiellen Aminosäuren, die stabile Isotopen wie  $^{13}\text{C}$  tragen, lassen sich die Proteine einer Probe markieren (Ong *et al.*, 2009, SILAC). So können Proben von zwei unterschiedlichen Experimenten vereint und in der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse miteinander verglichen werden. Neben SILAC gibt es ebenfalls die Möglichkeit der Markierung von Proteinen (Isotopen-kodierter Affinitäts-Anhang, ICAT) oder Peptiden (isobarer Anhang für relative und absolute Quantifizierung, iTRAQ), um diese in einem MS-Experiment zu vereinen. Hierdurch kann die Affinität einzelner Proteine zu unterschiedlichen Verbindungen quantitativ miteinander verglichen werden. Spezifisch bindende Proteine aus dem Affinitäts-Experiment mit Inhibitor sollten in der MS-Analyse ein deutlich stärkeres Signal im Vergleich zur negativen Kontrolle aufweisen als unspezifische Binder. Anhand des Verhältnisses dieser Signale (Inhibitor:Kontrolle) lassen sich spezifisch bindende Proteine von unspezifischen Bindern unterscheiden (Rix und Superti-Furga, 2009). Die Verwendung von SILAC in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen an freiem Inhibitor im Zellysate erlaubt sogar



**Abbildung 1.4: Prinzip der Affinitätschromatographie.** Durch Kopplung eines Liganden (rotes Dreieck), beispielsweise eines Inhibitors, an Sepharose-Kügelchen entsteht die Affinitätsmatrix. Mit dieser Matrix wird Zelllysate inkubiert, um die Bindung der Zielproteine zu ermöglichen. Unspezifisch gebundene Proteine werden herunter gewaschen und potentielle Zielproteine durch Zugabe von freiem Liganden kompetitiv eluiert.

die Bestimmung des  $IC_{50}$  und der Dissoziationskonstanten eines Inhibitors (Sharma *et al.*, 2009).

Mit Hilfe von Affinitätschromatographie identifizierten beispielsweise Brehmer *et al.* (2005) zusätzliche Zielproteine des EGFR-Hemmers Gefitinib, der zur Behandlung von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) eingesetzt wird. In dieser Studie wurden neben EGFR eine Reihe weiterer Kinasen gefunden, die teilweise eine ähnlich gute Inhibition durch Gefitinib aufweisen wie EGFR. Rix *et al.* (2007) konnten durch Affinitätschromatographie mit immobilisierten Derivaten der zugelassenen BCR-Abl-Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib weitere Zielproteine dieser Verbindungen identifizieren. Durch diese Studie wurde die Rezeptortyrosinkinase DDR1 als zusätzliches Zielprotein des ansonsten BCR-Abl-spezifischen Inhibitors Nilotinib bekannt. Zusätzlich wurde mit der Oxidoreduktase NQO2 das erste Zielprotein von Imatinib und Nilotinib gefunden, das keine Proteinkinase ist. Da bereits gezeigt werden konnte, dass der Knockdown von NQO2 zu reduzierter Zellteilung führen kann (Buryanovskyy *et al.*, 2004), trägt die Hemmung von NQO2 möglicherweise zum antiproliferativen Effekt von Imatinib und Nilotinib bei. Dies ist nur ein Beispiel, das verdeutlicht, dass die Kenntnis aller Zielproteine einer Verbindung hilfreich für die Weiterentwicklung von Kinaseinhibitoren ist, da negative oder positive Nebeneffekte erklärt und/oder vorhergesagt werden können sowie weitere potenziell interessante Zielproteine bekannt werden.

## 1.8 Validierung von Zielproteinen

Im Anschluss an die Identifizierung ist es für die Validierung eines potenziellen Zielproteins notwendig, die tatsächliche Interaktion von Inhibitor und Zielprotein nachzuweisen. Gerade im Fall von humanen Proteinkinasen ist dies oft leicht zu realisieren, da die meisten dieser Kinasen kommerziell erhältlich sind und ihre



**Abbildung 1.5: Analog-sensitive Kinase-Mutante.** Durch Verkleinerung des Türsteher-Restes in der ATP-Bindungstasche können Kinasen für sterisch anspruchsvolle Inhibitoren sensitiviert werden. Der Inhibitor hat durch die Verkleinerung des Türsteher-Restes ausreichend Platz in der ATP-Bindungstasche. So kann er an die sensitivierte Kinase, nicht aber an Wildtyp-Kinasen binden.

Hemmung durch eine gegebene Verbindung in enzymatischen Tests nachgewiesen werden kann. Die Validierung über *in vitro* Studien ist allerdings nur eingeschränkt aussagefähig, da eine Vielzahl von Faktoren die Wirkung einer Substanz *in vivo* beeinflussen können und dadurch nicht eindeutig geklärt werden kann, ob die Hemmung einer einzelnen Kinase, wie sie *in vitro* nachgewiesen wurde, für einen beobachteten Phänotyp verantwortlich ist. Zunächst einmal werden für gewöhnlich *in vivo* mehrere Ziele getroffen, so dass der Phänotyp in den meisten Fällen durch eine Vielzahl an Faktoren ausgelöst wird. Ebenso könnte eine biochemische validierte Zielkinase *in vivo* aus verschiedenen Gründen nur äußerst schwach inhibiert werden: zum einen könnte die Substanz nur schlecht zellgängig sein oder durch Transporter aus der Zelle geschleust werden, zum anderen könnten hohe zelluläre ATP-Konzentrationen die Wirkung ATP-kompetitiver Inhibitoren deutlich abschwächen. Auch die Deletion einer Kinase spiegelt ihre Hemmung nur unzureichend wider, da Zellen den Verlust einer Kinase oft über redundante Signalwege kompensieren können. Darüber hinaus besitzen Kinasen oft weitere, von ihrer Kinase-Aktivität unabhängige Funktionen, die durch eine Deletion entfallen, aber bei Hemmung der Kinase-Aktivität unberührt bleiben (Knight und Shokat, 2005).

Um die Hemmung einer einzelnen Kinase durch einen Inhibitor *in vivo* realisieren zu können, werden sogenannte sensitivierte Kinasen eingesetzt: in der zu untersuchenden Kinase wird die sogenannte Türsteher-Aminosäure in der ATP-Bindungstasche durch einen kleineren Rest (typischerweise Glycin oder Alanin) ersetzt, um die Bindung eines sperrigen Inhibitors zu erlauben. Dieser sperrige Inhibitor erhält Selektivität für die mutierte Kinase, da er sich in die vergrößerte ATP-Bindungstasche einfügen kann, was bei Wildtyp-Kinasen durch sterische Hinderung nicht möglich ist (Abbildung 1.5). Durch diesen Ansatz ist es möglich, die



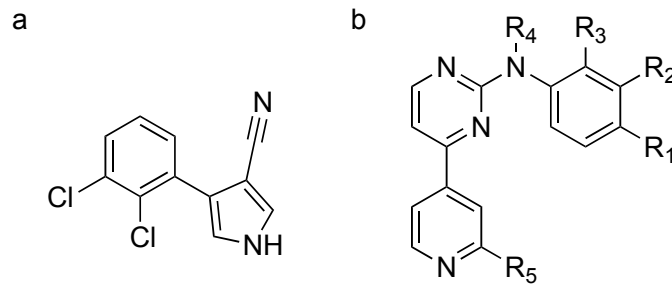
Hemmung einer einzelnen Kinase durch niedermolekulare Inhibitoren *in vivo* zu untersuchen und mit einem Phänotyp zu korrelieren (Bishop *et al.*, 2001).

## 1.9 Kinaseinhibitoren als Fungizide

Da Proteinkinasen und die Signalkaskaden, an denen sie beteiligt sind, entscheidend für das Überleben der Zelle oder des ganzen Organismus sein können, führt nicht nur eine durch Mutationen entstandene Fehlregulation zu Krankheit oder Tod, sondern auch die gezielte Inhibition essentieller Kinasen.

Während beim Menschen das Augenmerk auf der Inhibition deregulierter Kinaseaktivität zur Heilung von Krankheiten liegt (Cohen, 2002), können Pilze wie z.B. *Neurospora crassa* durch Hemmung ihrer normalen Kinaseaktivität bekämpft werden (Pillonel, 2005). So inhibiert beispielsweise das Fungizid Fenpiclonil (Abbildung 1.6), ein Phenylpyrrol, eine Proteinkinase aus dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* mit einem  $IC_{50}$  von 2  $\mu$ M; ferner konnte bei verschiedenen Vertretern der Phenylpyrrole eine deutliche Korrelation zwischen fungizider Wirksamkeit und Hemmung dieser Kinase *in vitro* gezeigt werden, was ein starkes Indiz dafür ist, dass es sich hierbei tatsächlich um das Zielprotein von Fenpiclonil handelt. Mit dieser Entdeckung wurden die ersten Fungizide bekannt, deren Wirkung auf der Hemmung von Proteinkinasen beruht (Pillonel und Meyer, 1997). Das oben erwähnte Prinzip der Wirkungsumkehr (vom Heilmittel zur Schädlingsbekämpfung) wird am Beispiel des cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors CPG 60474 besonders deutlich: CPG 60474 wurde als ATP-kompetitiver Inhibitor humaner cyclin-abhängiger Kinasen entwickelt, um die unkontrollierte Zellteilung bei Tumoren einzudämmen (Ruetz *et al.*, 2003). Da cyclin-abhängige Kinasen nicht nur im Menschen, sondern auch in Pilzen eine essentielle Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus haben, wurde die Wirkung von Phenylaminopyrimidinen, zu denen CPG 60474 gehört, auf das Wachstum von *Neurospora crassa* untersucht (Pillonel, 2005). Dabei wurde gefunden, dass Phenylaminopyrimidine vom Typ A (Abbildung 1.6) das Wachstum von *N. crassa* im nanomolaren Bereich hemmen können und dass ihre Wirkung am Pilz signifikant mit der Wirkung an der isolierten cyclin-abhängigen Kinase CDK-1 aus Seestern korreliert.

Zusätzliche Experimente mit Affinitätschromatographie an immobilisierten Inhibitoren zeigten, dass beide bekannten cyclin-abhängigen Kinasen aus *N. crassa* an ein funktionales Derivat binden, während sie in einem Experiment mit einem deutlich weniger aktiven Derivat nicht identifiziert werden konnten. Obwohl in den meisten Fällen die Wirkung verschiedener Phenylaminopyrimidine an CDK-1 aus Seestern gut mit der biologischen Wirksamkeit am Pilz korreliert, ist dies nicht zwangsläufig der Fall. Idealerweise sollten daher neue potenzielle Fungizide an den entsprechenden Kinasen aus Pilzen getestet werden — auch um eine möglichst



**Abbildung 1.6: Strukturformeln von Fenpiclonil (a) und Phenylaminopyrimidinen vom Typ A (b).** In fungizid aktiven Phenylaminopyrimidinen vom Typ A sind R1, R3 und R4 typischerweise Wasserstoffatome, R2 ist ein Cl. R5 ist variabel und kann aus aromatischen oder aliphatischen Resten bestehen.

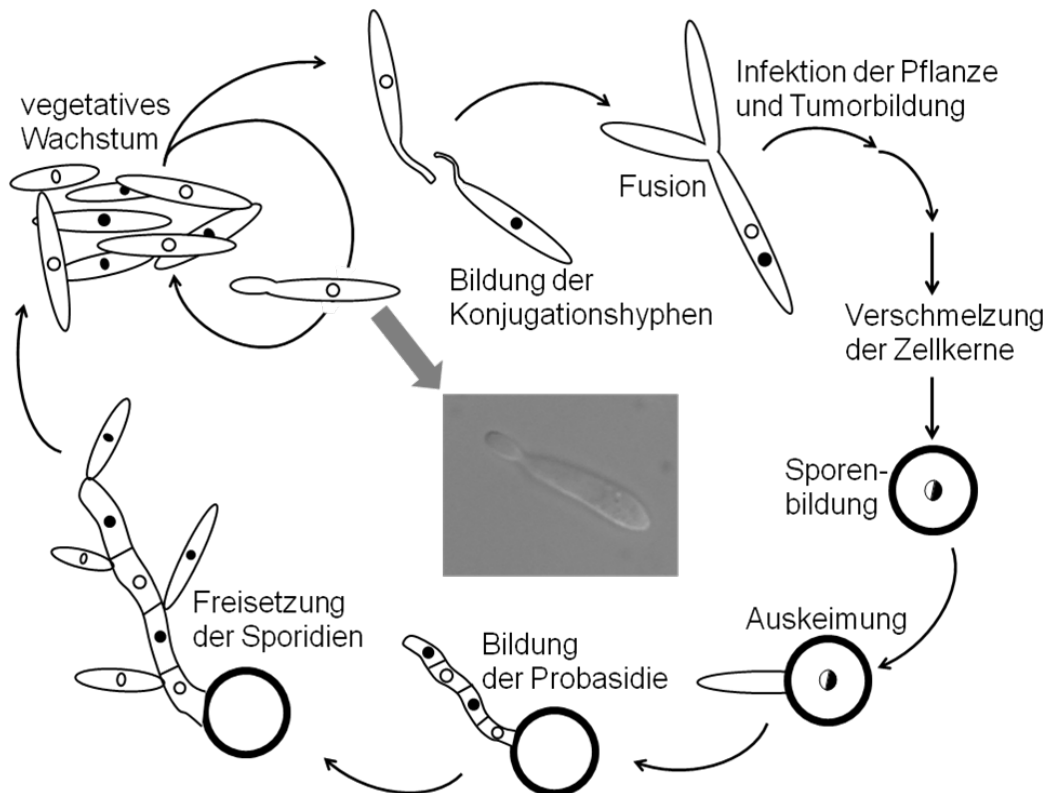
hohe Selektivität zu Gunsten pilzlicher Kinasen zu gewährleisten und negative Auswirkungen auf andere Organismen zu minimieren.

## 1.10 *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Aufgrund der hohen Zahl und extremen Vielfalt an Organismen ist die Konzentration auf einige ausgewählte Organismen, sogenannte Modellorganismen, zur Erforschung prinzipieller Mechanismen sinnvoll. Modellorganismen zeichnen sich in der Regel durch leichte Kultivierbarkeit, geringe Größe und kurze Generationszeiten aus; je nach Problemstellung können weitere Vorteile wie z.B. leichte genetische Manipulierbarkeit hinzukommen. Im Reich der etwa 80.000 bekannten Pilze hat sich der Erreger des so genannten Maisbeulenbrandes, *Ustilago maydis*, als ein Modellorganismus für phytopathogene Pilze durchgesetzt (Hedges, 2002; Basse und Steinberg, 2004; Bölker, 2001).

*U. maydis* ist ein dimorphes Pathogen: seine haploiden Sporidien vermehren sich durch Knospung, leben saprophytisch und sind nicht pathogen; durch Fusion zweier kompatibler Zellen entsteht ein Dikaryon, das filamentös wächst und für seine weitere Entwicklung von der Wirtspflanze abhängig ist. Symptom des Befalls einer Maispflanze mit *U. maydis* ist die Ausbildung von Tumoren, die an allen grünen Teilen der Pflanze auftreten können und in denen sich das Pilzmycel entwickelt. Zum Ende der pathogenen Phase werden aus den Tumoren diploide Teliosporen freigesetzt, welche durch Wind verbreitet werden und unter günstigen Bedingungen auskeimen. Während der Keimung findet die Meiose unter Bildung haploider Sporidien statt, wodurch der Lebenszyklus von *U. maydis* abgeschlossen ist (Bölker, 2001, Abbildung 1.7).

Als Modellorganismus bietet *U. maydis* eine Reihe von Vorteilen: in der haploiden Phase lässt der Pilz sich leicht unter Laborbedingungen anziehen. In Schüttelkul-



**Abbildung 1.7: Lebenszyklus von *U. maydis*.** Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Knospung. Auf der Pflanze kommt es zur Ausbildung von Konjugationshyphen zwischen kompatiblen Sporidien und zur anschließenden Zellfusion. Darauf folgen die Infektion der Pflanze und die Bildung von Tumoren, in welchen sich das Pilzmyzel vermehrt und es zur Verschmelzung der Zellkerne kommt, worauf die Bildung der Sporen erfolgt. Unter günstigen Bedingungen keimen diese aus und es kommt zur Freisetzung der haploiden Sporidien, womit der Lebenszyklus abgeschlossen ist. Mitte: lichtmikroskopische Aufnahme eines knospenden Sporidiums.

tur hat er eine recht kurze Verdopplungszeit von etwa zwei Stunden; auf Agarplatten bildet er distinkte, *E. coli*-ähnliche Kolonien. Mutationen oder Deletionen lassen sich leicht über homologe Rekombination einführen und über Resistenzmarker selektieren (Bölker, 2001; Steinberg und Perez-Martin, 2008; Brachmann *et al.*, 2004). Einen großen Fortschritt in der Forschung an *U. maydis* stellt die vollständige Sequenzierung seines Genoms dar, wodurch umfangreiche Informationen über Zahl und Verteilung der Gene und der daraus entstehenden Proteine verfügbar wurden: das Genom von *U. maydis* enthält 6.902 Protein-kodierende Gene; hiervon wurden etwa 100 Translationsprodukte als Proteinkinasen vorhergesagt (Kämper *et al.*, 2006, Peter Schreier, persönliche Mitteilung). Von diesen Proteinkinasen sind einige gut untersucht (Andrews *et al.*, 2000; Banuett und Herskowitz, 1994; Brachmann *et al.*, 2003; Dürrenberger *et al.*, 1998; Leveleki *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 1999), während über die Funktion der Mehrzahl nur auf Grund ihrer Homologie zu bereits bekannten Kinasen aus anderen Organismen Hypothesen aufgestellt werden können. Auch zur Erforschung der Wirkung von Kinaseinhibitoren auf Pilze wird — unter anderem — *U. maydis* als Modellorganismus eingesetzt, um anhand dieses Modells fungizide Wirkstoffe gegen phytopathogene Pilze entwickeln zu können.

## 1.11 Diaminopyrimidine als Fungizide

N-substituierte Diaminopyrimidine sind eine Klasse niedermolekularer Verbindungen, die als Inhibitoren humaner Kinasen beschrieben wurden (Mesguiche *et al.*, 2003; Lum *et al.*, 2008; Argiriadi *et al.*, 2010; Gozalbes *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde gefunden, dass sie fungizide Wirkung aufweisen (Patent WO/2008/107096). Man geht zwar davon aus, dass es sich bei dem pilzlichen Zielprotein ebenfalls um eine oder mehrere Proteinkinase(n) handelt, doch die genauen Zielproteine sind bisher unbekannt.

## 1.12 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Proteinkinasen aus *U. maydis*, die von Modellverbindungen N-substituierter Diaminopyrimidine gehemmt werden. Es sollte untersucht werden, ob der fungizide Effekt dieser Substanzen auf die schwache Hemmung einer Vielzahl an Kinasen zurückzuführen ist oder ob es ein prominentes Zielprotein gibt, dessen Hemmung alleine zu den beobachteten Wachstumsdefekten führt. Hierzu sollten zunächst potenzielle Zielkinasen mittels Affinitätschromatographie mit immobilisierten Inhibitoren und darauf folgender massenspektrometrischer Analyse identifiziert und heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Nach anschließender Reinigung sollte die Hemmung der gefundenen Proteinkinasen

durch die verwendete Substanz *in vitro* gezeigt werden, um sie als Zielproteine zu verifizieren. Neben der Identifizierung neuer Zielkinasen sowie ihrer biochemischen und biologischen Validierung sollte weiterhin eins der gefundenen Zielproteine, *UmGSK3*, mit Hilfe eines chemo-genomischen Ansatzes *in vivo* validiert werden. Es sollte eine analog-sensitive Mutante der *UmGSK3* erzeugt werden, welche selektiv von einer Klasse irreversibler, sterisch anspruchsvoller Inhibitoren gehemmt wird. Der Nachweis der Inhibition an der Mutante - sowie der Wirkungslosigkeit der Inhibitoren am Wildtyp-Enzym - sollte zunächst an heterolog exprimierter und gereinigter *UmGSK3* erfolgen. Im Anschluss sollte ein *U. maydis* Stamm erzeugt werden, der an Stelle der Wildtyp *UmGSK3* die analog-sensitive *UmGSK3*-Mutante exprimiert. Eine Wachstumshemmung dieses Stamms durch die zuvor evaluierten Inhibitoren (bei gleichzeitiger Wirkungslosigkeit am Wildtyp-Stamm) wäre einzig auf die Inhibition der *UmGSK3* zurückzuführen, womit diese als Zielprotein *in vivo* validiert wäre.



## Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Identifizierung potenzieller Zielproteine der Diaminopyrimidine in *U. maydis*

Zur erfolgreichen Zielprotein-Identifizierung von niedermolekularen Verbindungen können verschiedene Methoden wie chemisch-genetische oder biochemische Profilierung sowie chemische Proteomik verwendet werden (Chan *et al.*, 2010, und Abschnitt 1.7 auf Seite 9). Alle diese Methoden haben sowohl Vor- als auch Nachteile und erfordern gewisse Voraussetzungen: Eine chemisch-genetische Analyse erfordert die Erzeugung von Knock-Out-Stämmen und ein Vergleich der durch den Knock-Out sowie durch Inhibitor-Behandlung hervorgerufenen Phänotypen. Da aber gerade Kinasen oft essenziell für das Überleben eines Organismus sind, wäre es nicht möglich, für jede der etwa 100 *Ustilago* Kinasen einen lebensfähigen Knock-Out-Stamm zu erzeugen. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass ein genetischer Knock-Out nicht zwangsläufig denselben Phänotyp hervorruft wie die biochemische Inhibition des Zielproteins (Knight und Shokat, 2005). Eine biochemische Profilierung eines Inhibitors ist im Fall von humanen Kinasen einfach und schnell durchführbar und wird von einer Reihe von Firmen als Dienstleistung angeboten. Da aber die größte Zahl der Kinasen aus *U. maydis* bisher nicht beschrieben wurde, ist diese Methode hier nicht anwendbar.

Die praktikabelste Möglichkeit der Zielprotein-Identifizierung in einem weniger gut untersuchten System als beispielsweise *H. sapiens* oder *S. cerevisiae* ist die chemische Proteomik, da hierfür weder Mutantenstämme noch eine große Zahl kommerziell verfügbarer Proteine benötigt werden. Einzige Voraussetzung ist eine Vorstellung vom Bindemodus des Inhibitors, um eine geeignete Stelle für die Immobilisierung zu finden. Eine weitere Verbesserung dieser Methode ist die Verwendung der stabilen Isotopen-Markierung durch Aminosäuren in Zellkultur (stable

isotope labeling by amino acids in cell culture, kurz SILAC). Diese Markierung erlaubt die Kombination der Eluate zweier oder mehrerer Affinitätschromatographie-Experimente in einer MS-Analyse und somit eine quantitative Auswertung. Eine nachträgliche Markierung der Proteine oder Peptide wäre ebenfalls möglich (Rix und Superti-Furga, 2009); allerdings war eine quantitative Analyse aus zeitlichen und organisatorischen Gründen nicht durchführbar. Da bereits zahlreiche humane Zielproteine von Kinaseinhibitoren erfolgreich durch Verwendung immobilisierter Inhibitoren identifiziert werden konnten (Daub, 2005), wurde diese Methode auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

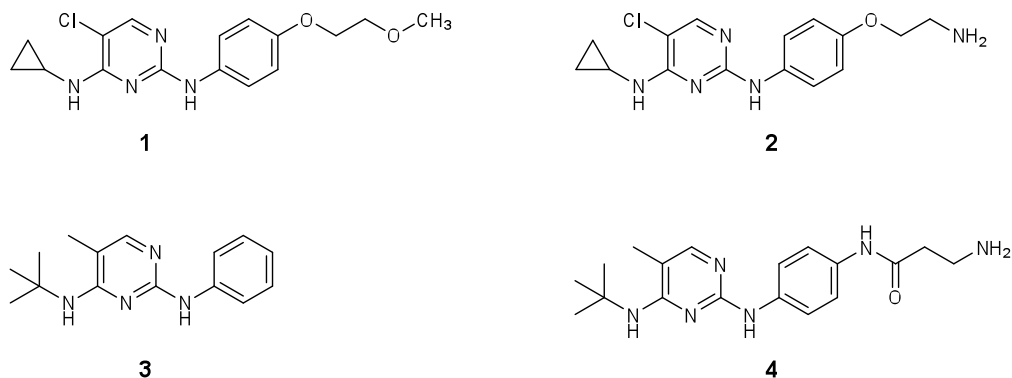
### 2.1.1 Auswahl von Verbindungen für Affinitätschromatographie-Experimente

Zur erfolgreichen Durchführung von Affinitätschromatographie-Experimenten mit immobilisierten Inhibitoren ist es vorteilhaft, den Bindungsmodus der Substanzen zu kennen; die Stelle der Immobilisierung muss so gewählt sein, dass keine essenziellen Interaktionen mit dem Zielprotein gestört werden und dass die Verbindung zur Affinitätsmatrix ("Linker") aus der Inhibitor-Bindestelle heraus weist. Anderenfalls wäre keine Bindung des immobilisierten Inhibitors mehr möglich. Modelle von Diaminopyrimidinen im Komplex mit humanen Kinasen geben Aufschluss über den Bindungsmodus und erlauben die Auswahl einer geeigneten Kopplungsstelle. Unter einer Vielzahl von Diaminopyrimidinen wurde eine Verbindung (**1**, Abbildung 2.1) gefunden, die das Wachstum von *U. maydis* mit einem  $ED_{50}$  von  $21,8 \pm 6,1$  mg/l hemmt und bereits einen kurzen Linker-Rest trägt. Ein Modell von **1** im Komplex mit einer typischen humanen Kinase zeigt die Orientierung der Substanz in der Kinase und deutet darauf hin, dass eine Kopplung am Linker-Rest nicht zum Verlust der Bindefähigkeit führt (Abbildung 2.2 auf Seite 22).

Ein Derivat dieser Verbindung (**2**, Abbildung 2.1), das am Ende des Linkers statt einer Methoxygruppe eine Aminogruppe trägt, wurde zur Kopplung ausgewählt, da sich Verbindungen mit primären Aminogruppen leicht an kommerziell verfügbare Matrices wie beispielsweise NHS-aktivierte Sepharose koppeln lassen. Da auf Basis des Kinase-Inhibitor-Modells davon ausgegangen wurde, dass der Methoxy-Rest aus der ATP-Bindungstasche heraus weist, sollte eine Derivatisierung an dieser Position keinen Einfluss auf die Bindung haben.

Um unspezifisch an die Affinitätsmatrix bindende Proteine von der Analyse ausschließen zu können, wurde als negative Kontrolle eine Verbindung gewählt (**3**), die, ausgehend von Kinase-Inhibitor-Modellen sowie *in vivo* Daten, eine wesentlich schlechtere Bindung an das Zielprotein aufweisen sollte (Jörg Greul, Bayer Crop-Science AG Monheim, persönliche Mitteilung). Ein Derivat dieser Verbindung (**4**)





**Abbildung 2.1: Strukturen der für die Zielprotein-Identifizierung verwendeten Verbindungen.** 1: *In vivo* wirksame Verbindung; 2: Derivat von Verbindung 1 mit Aminogruppe für Immobilisierung; 3: inaktive Kontrollverbindung; 4: Derivat der Kontrollverbindung mit Aminogruppe für Immobilisierung.

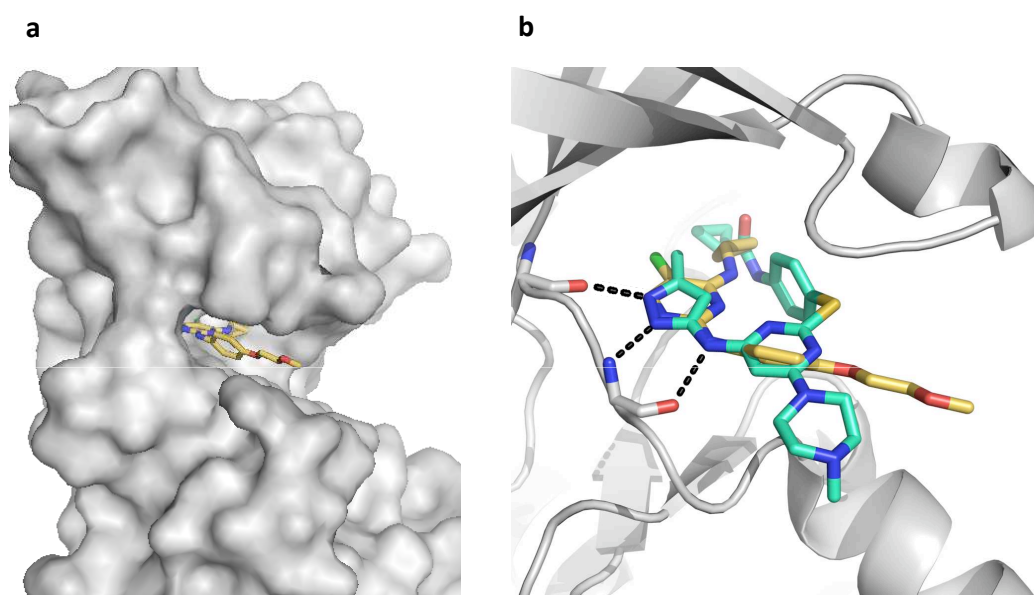
trägt einen Linker an der gleichen Position wie Verbindung 2 (Abbildung 2.1). Dies ermöglicht eine Kopplungsreaktion analog zu der von Verbindung 2.

### 2.1.1.1 *In vivo* Wirkung der gewählten Verbindungen

Um den hemmenden Effekt von 2–4 auf pilzliches Wachstum im Vergleich zu 1 zu untersuchen, wurden die Verbindungen in einem Plattentest an *U. maydis* getestet.

Während 1 in der Lage war, das Pilzwachstum mit einem  $ED_{50}$  von  $21,8 \pm 6,1$  mg/l zu hemmen, ließ sich bei Konzentrationen  $\leq 50$  mg/L keine Auswirkung der übrigen Inhibitoren feststellen. Der Wirkungsverlust in 2 ist damit zu erklären, dass die endständige Aminogruppe unter neutralen Bedingungen, wie sie im Nährmedium vorliegen, eine positive Ladung trägt und daher die Verbindung nur schlecht zellgängig ist (Abbildung 2.3 auf Seite 23). Auf die Bindung der Zielproteine hat dies vermutlich keine Auswirkungen, was in einer *in vitro* Profilierung dieser Verbindung gezeigt werden konnte (siehe nächstes Kapitel).

Die negative Kontrolle 3 sowie ihr Derivat 4 zeigten erwartungsgemäß keine hemmende Wirkung *in vivo* (Abbildung 2.3 auf Seite 23). Die Eigenschaften von Verbindung 3 (geringes Molekulargewicht, keine geladenen Reste unter neutralen Bedingungen) weisen darauf hin, dass das Molekül sehr gut zellgängig ist. Daher wurde davon ausgegangen, dass die beobachtete Wirkungslosigkeit auf eine signifikant schlechtere Hemmung des gesuchten Zielproteins bzw. der gesuchten Zielproteine in *U. maydis* zurückzuführen ist.



**Abbildung 2.2: Modell einer typischen humanen Kinase im Komplex mit Verbindung 1.** Es wurden Modellierungsstudien mit verschiedenen humanen Kinasen durchgeführt; exemplarisch gezeigt ist hier das Modell basierend auf der Ko-Kristall-Struktur von humaner Aurora A im Komplex mit VX-680 (PDB-Code 3E5A), einem ATP-kompetitiven Inhibitor, der ebenfalls einen Cyclopropyl-Rest trägt und ein Pyrimidin-Gerüst besitzt. Die Methoxygruppe weist aus der ATP-Bindungstasche heraus, was die Derivatisierung an dieser Stelle ohne Hinderung der Kinasebindung ermöglichen sollte (Modellierungsstudien: Oliver Gutbrod, Bayer CropScience AG, Monheim). (a) Oberfläche der Aurora A im Komplex mit 1; (b) Detailansicht der ATP-Bindungstasche mit Verbindungen 1 (gelb) und VX-680 (cyan).

### 2.1.1.2 *In vitro* Kinase-Selektivität der gewählten Verbindungen

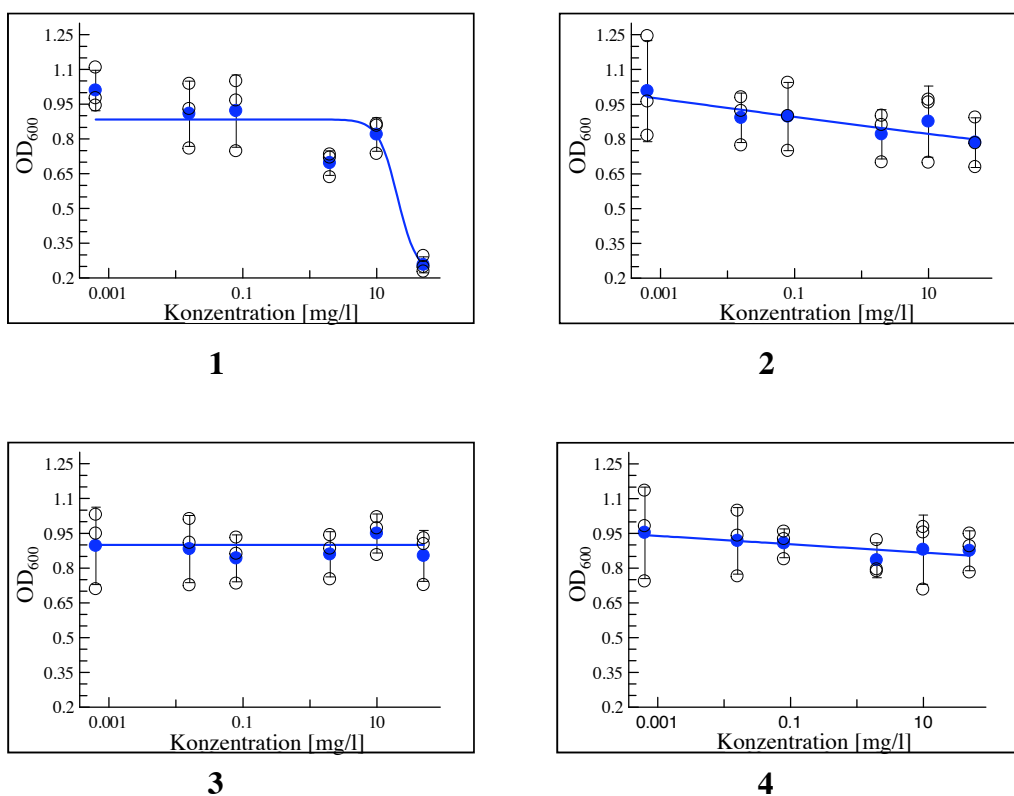
Um einen Eindruck der Selektivität von 1 und 2 zu gewinnen, wurden diese Verbindungen in einem radioaktiven Filterassay bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  gegen 114 humane Kinasen getestet (Kinase Profilierungs-Service der Universität Dundee, UK). Beide Substanzen zeigen keine Selektivität gegenüber einer bestimmten Klasse von Kinasen, sondern scheinen eher unspezifisch die meisten Kinasen zu hemmen (Abbildung 2.4 auf Seite 24).

Der Austausch der endständigen Methoxygruppe gegen eine Aminogruppe führt nicht zu einer geringeren Wirksamkeit von 2, sondern bewirkt in einigen Fällen sogar eine stärkere Hemmung der Kinasen im Vergleich zu 1. Dies weist darauf hin, dass es in einigen Kinasen zu einer Interaktion mit dem (geladenen) endständigen Rest des Inhibitors kommen kann. Da aber durch das Anbringen der Amino-Gruppe in keinem Fall eine Verminderung der Wirksamkeit beobachtet

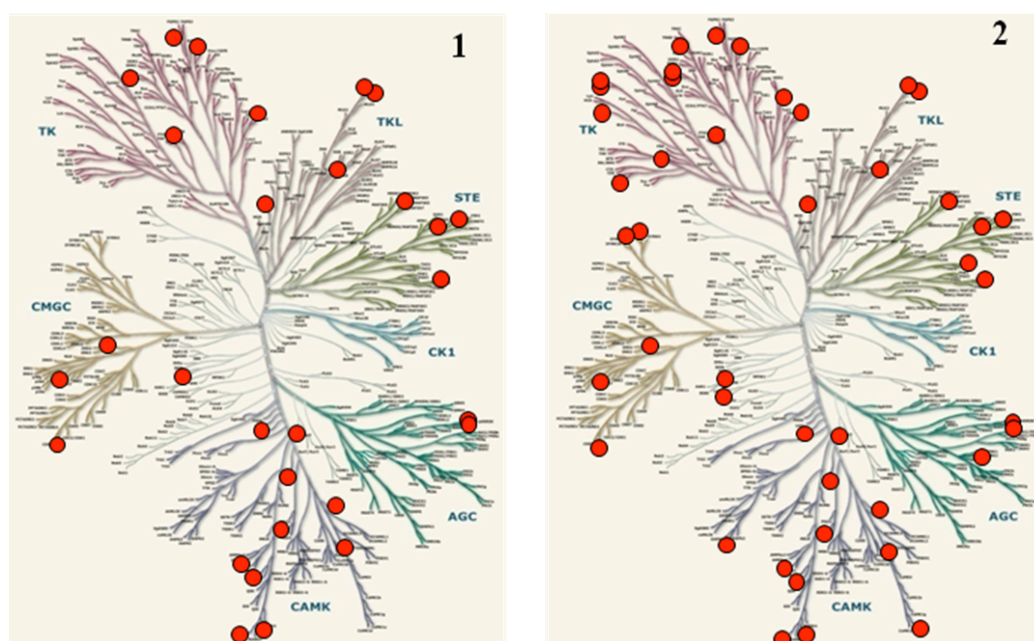
wurde, sollte auch die Kopplung an eine Matrix (und damit die Entfernung der Ladung an dieser Stelle) nicht die Bindung der Zielproteine von **1** beeinträchtigen.

### 2.1.2 Herstellung der Affinitätsmatrix

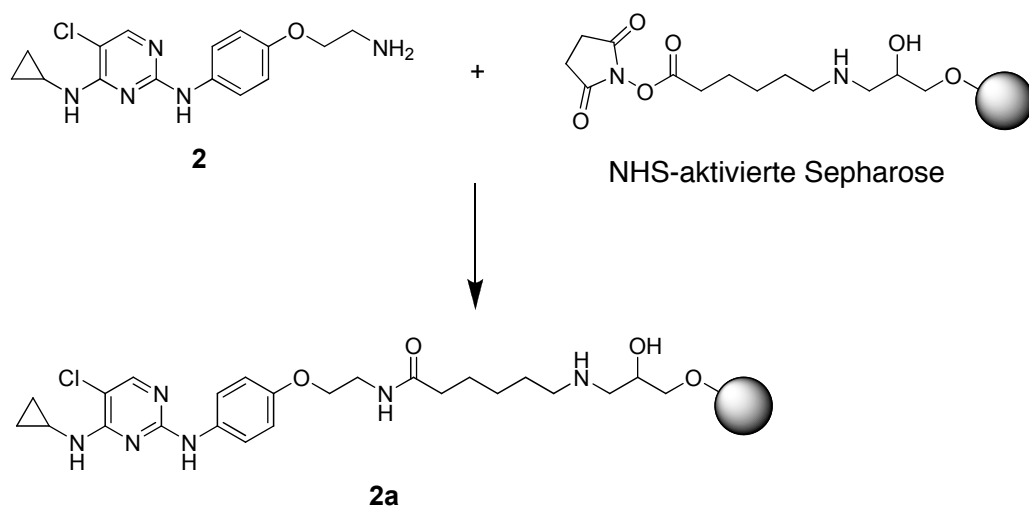
Zur Immobilisierung von Verbindungen ist eine Reihe von Matrizes mit verschiedenen funktionellen Gruppen kommerziell verfügbar. Auf Grund der schlechten Löslichkeit der Verbindungen **2** und **4** in wässriger Lösung sollte eine Matrix verwendet werden, die eine Kopplung in 100% DMSO erlaubt. Da am Beispiel eines strukturell ähnlichen Cdk2-Inhibitors bereits gezeigt wurde, dass in NHS (N-Hydroxysuccinimid)-aktivierter Sepharose die Kopplung in 100% DMSO möglich ist (Lolli *et al.*, 2003), wurde diese Sepharose zur Herstellung der Inhibitor-Affinitätsmatrix ausgewählt. Die Verbindungen **2** und **4** wurden unter Freisetzung der NHS-Gruppe an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt (Abbildung 2.5). Das Fortschreiten der Reaktion wurde mittels HPLC-Messung verfolgt. Da das Spektrum von



**Abbildung 2.3:** *In vivo* Inhibition von *U. maydis* durch die Verbindungen 1–4. Dosis-Wirkungskurven für *U. maydis* mit den angegebenen Verbindungen. Die logarithmische Inhibitor-Konzentration wurde gegen die  $OD_{600}$  nach drei Tagen Wachstum aufgetragen.



**Abbildung 2.4: Inhibitionsprofile der Verbindungen 1 und 2.** Die Verbindungen wurden an 114 humanen Proteinkinasen *in vitro* getestet. Beide Verbindungen sind eher unspezifische Kinaseinhibitoren. Rote Kreise zeigen Kinasen, die bei 10 µM Inhibitorkonzentration  $\leq 10\%$  Aktivität aufweisen. Der Kinasebaum wurde von Manning *et al.* (2002b) übernommen und adaptiert.



**Abbildung 2.5: Kopplungsreaktion von 2 an NHS-aktivierte Sepharose.** Die Kopplung erfolgt durch einen nukleophilen Angriff der primären Amino-Gruppe von Verbindung 2 auf die Carbonyl-Gruppe der NHS-aktivierten Sepharose unter Abgang der NHS-Gruppe.

NHS vollständig vom Spektrum des Lösemittels (DMSO) überlagert wurde, konnte nicht die Freisetzung von NHS, sondern lediglich die Abnahme der Konzentration an freiem Inhibitor gemessen werden. Hieraus wurde die Inhibitor-Konzentration auf den Sepharose-Kügelchen berechnet; sie betrug etwa 7 mM für **2** und 11 mM für **4**.

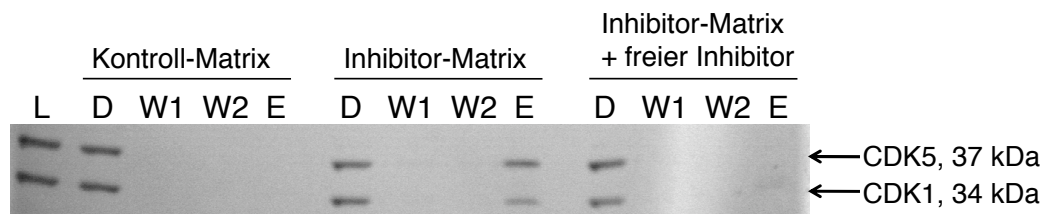
### 2.1.3 Verifizierung der Funktionalität der Matrix

Um die Funktionalität der Inhibitor-Matrix zu überprüfen, sollte gezeigt werden, dass sie in der Lage ist, Kinasen zu binden, welche mit freiem Inhibitor eluiert werden können. Da Diaminopyrimidine bereits als Inhibitoren der humanen CDKs beschrieben sind (Mesguiche *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2006) und gezeigt wurde, dass N-substituierte Diaminopyrimidine mit sehr hoher Ähnlichkeit zu **1** die humane CDK2 im mikromolaren Bereich inhibieren (Peter Schreier, persönliche Mitteilung), wurde davon ausgegangen, dass auch die homologe Kinase aus *U. maydis*, CDK1, von dieser Substanzklasse gehemmt wird. Um die Bindung der CDK1 an die Affinitätsmatrix nachzuweisen, wurde *Ustilago* Zellysats mit Inhibitor-Kügelchen inkubiert, gewaschen und gebundene Proteine durch Aufkochen in Probenpuffer eluiert. Als Kontrolle wurde ein Experiment mit Inhibitor-freien Kügelchen durchgeführt sowie ein Ansatz mit Inhibitor-Kügelchen unter Zugabe der freien Verbindung **2** in einer finalen Konzentration von 2 mM, was die Bindung an die Matrix reduzieren sollte. Ein Antikörper gegen die PSTAIRE-Sequenz der humanen CDK2 detektiert ebenfalls *U. maydis* CDK1 und CDK5 (Garcia-Muse *et al.*, 2004; Castillo-Lluva *et al.*, 2007) und wurde daher zum Nachweis dieser Kinasen verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass Inhibitor-freie Kügelchen weder CDK1 noch CDK5 binden, während beide Kinasen im Eluat der Inhibitor-Matrix detektiert werden konnten. Durch Zugabe der freien, konkurrierenden Verbindung **2** wurde die Bindung von CDK1 stark reduziert und die von CDK5 verhindert (Abbildung 2.6).

Dies bestätigt nicht nur die Annahme, dass die Derivatisierung an der gewählten Stelle nicht zum Verlust von Inhibitor-Protein-Interaktionen führt, es zeigt auch, dass der Abstand zwischen immobilisiertem Inhibitor und Sepharose ausreichend groß ist, die Proteinbindung zu erlauben. Um letzteres zu gewährleisten, müssen oft verschiedene Linker und Linkerlängen evaluiert werden (Sato *et al.*, 2010). Da aber hier bereits die erfolgreiche Bindung an die Affinitätsmatrix (und keine Bindung an die Kontrollmatrix) von Vertretern der Klasse der potenziellen Zielproteine nachgewiesen werden konnte, war diese Evaluierung nicht mehr notwendig.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es sich hier um eine spezifische Interaktion von Matrix und Kinase handelt: bei einer unspezifischen Interaktion wäre ein konkurrierender Inhibitor nicht in der Lage, die Bindung zu verhindern. Demzufolge konnte die hergestellte Affinitätsmatrix für Experimente zur Zielprotein-Identifizierung verwendet werden.



**Abbildung 2.6: Funktionalitätskontrolle der Inhibitor-Matrix.** Mittels eines PSTAIRE-Antikörpers wurden sowohl CDK1 als auch CDK5 in Lysat von *U. maydis* detektiert. Während beide Kinasen von Inhibitor-Matrix eluiert wurden, konnten sie im Eluat der Inhibitor-freien Matrix nicht detektiert werden. Die Zugabe von freiem Inhibitor reduzierte die CDK1-Bindung sehr stark, während CDK5 im Eluat nicht mehr nachweisbar war. L: Lysat, D: Durchfluss, W: Waschfraktionen, E: Eluat.

## 2.2 Anzucht von *U. maydis* für Affinitätschromatographie-Experimente

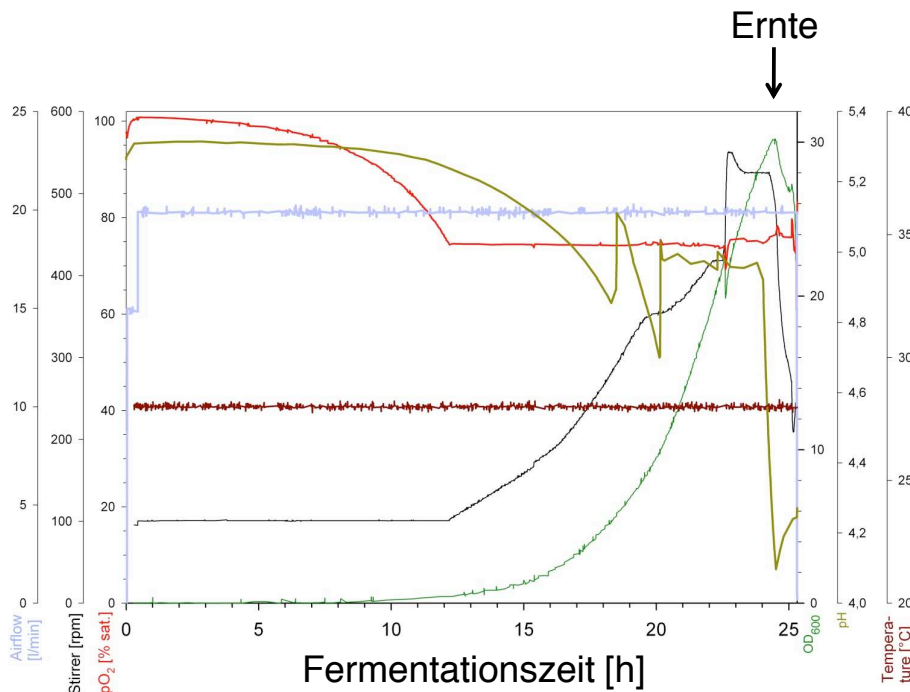
Für Affinitätschromatographie-Experimente sollte Material einer exponentiell wachsenden *U. maydis* Flüssigkultur verwendet werden, da davon ausgegangen wurde, dass die größtmögliche Zahl an Proteinen während dieser Phase exprimiert wird. Dies birgt zwar das Risiko, dass Proteine, die nur während bestimmter Phasen des Lebenszyklus wie beispielsweise Paarung oder Pflanzeninfektion exprimiert werden (Basse *et al.*, 2000), nicht im verwendeten Material enthalten sind; da aber Verbindung 1 das Wachstum von *Ustilago* in Flüssigkultur inhibiert, konnte davon ausgegangen werden, dass sich die wichtigsten Zielproteine in Flüssigkulturen von *U. maydis* befinden.

Um eine große Menge Zellen zu erhalten, wurde *U. maydis* in einem 100 Liter Fermenter (Walter Weichel, Bayer Technology Services, Leverkusen) angezogen. Hierbei wurde der Sauerstoffgehalt gemessen und bei  $\geq 75\%$  gehalten, wodurch eine ungewöhnlich hohe Zelldichte erreicht werden konnte: bei  $OD_{600} \approx 30$  befanden sich die Zellen noch in der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 2.7), während sie unter Standard-Laborbedingungen bei einer  $OD_{600} \approx 1-2$  in die stationäre Wachstumsphase übergehen (Ho *et al.*, 2007; Gage *et al.*, 2001).

Die Zellen wurden bei  $OD_{600} \approx 30$  geerntet und in Aliquots à ca. 20 g bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.1 Affinitätschromatographie mit immobilisierten Inhibitoren

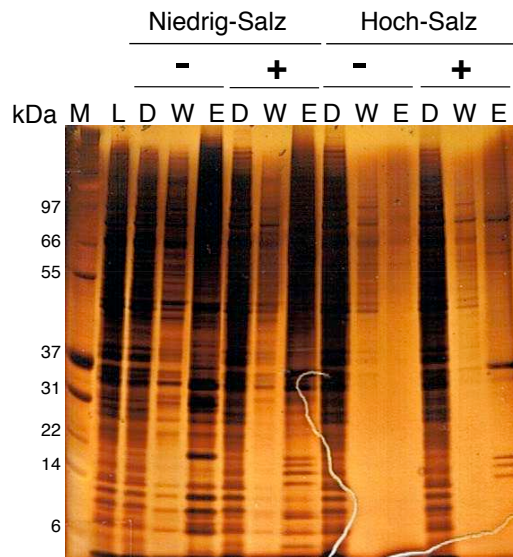
Die Affinitätschromatographie-Experimente wurden auf Basis des Protokolls von Godl *et al.* (2003) durchgeführt. Hierzu wurde ein Pellet aus ca. 20 g Zellmaterial resuspendiert und in einem Hochdruck-Homogenisator aufgeschlossen. Das Zelly-



**Abbildung 2.7: Fermentation von *U. maydis*.** Während der Fermentation wurden folgende Parameter gemessen und grafisch gegen die Zeit aufgetragen: Luftfluss (blau), Upm des Rührers (schwarz), Sauerstoffgehalt (rot), OD<sub>600</sub> (grün), pH-Wert (oliv) und Temperatur (dunkelrot). Die Kurve der OD<sub>600</sub> zeigt, dass die Kultur sich zum Zeitpunkt der Ernte noch in der exponentiellen Wachstumsphase befand (Durchführung: Walter Weichel, Bayer Technology Services, Leverkusen).

Das Erntesat wurde abzentrifugiert, um Zelltrümmer und unlösliche Proteine abzutrennen, und zu der in Aufschlusspuffer äquilibrierten Affinitätsmatrix gegeben. Da Godl *et al.* (2003) zeigten, dass eine hohe Salzkonzentration während der Bindung die Anzahl unspezifisch an die Matrix gebundener Proteine deutlich reduziert, wurde ein Vergleichsexperiment mit 150 mM NaCl bzw. 1,15 M NaCl während der Bindung durchgeführt. Während in den Eluaten der Niedrig-Salz-Proben eine große Zahl an Proteinen und kein signifikanter Unterschied zwischen der negativen Kontrolle und dem Experiment mit Inhibitor-Matrix beobachtet wurden, war die Zahl der Proteine in den Eluaten der Hoch-Salz-Proben stark reduziert. Im Eluat der Inhibitor-Matrix wurden distinkte Banden beobachtet, die nicht im Eluat der Kontroll-Matrix zu sehen waren (Abbildung 2.8). Daher wurde in den folgenden Experimenten das *Ustilago*-Lysat nach dem Aufschluss auf eine finale NaCl-Konzentration von 1,15 M eingestellt. Um auch wenig abundante Proteine in ausreichender Menge für die spätere Identifizierung anreichern zu können, wurde für die Affinitäts-Experimente eine große Menge an Protein eingesetzt:

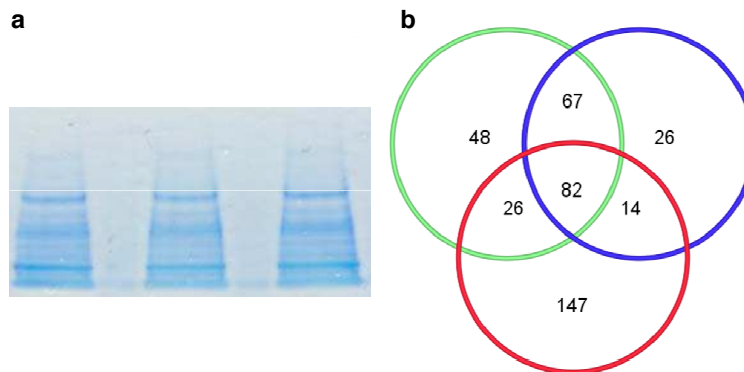




**Abbildung 2.8: Silber-gefärbtes Gel des Vergleichs von Niedrig-Salz- und Hoch-Salz-Bedingungen.** 25  $\mu$ l Sepharose-Kügelchen mit (+) oder ohne (-) Inhibitor wurden mit jeweils 2 mg *U. maydis* Lysat mit 150 mM NaCl oder 1,15 M NaCl drei Stunden inkubiert und anschließend drei Mal entsprechend mit Niedrig-Salz oder Hoch-Salz-Puffer gewaschen und gebundene Proteine durch Erhitzen in 4X LDS Sample Buffer (Invitrogen) eluiert. Unter Niedrig-Salz-Bedingungen eluierte sowohl von Inhibitor- als auch von Kontroll-Matrix eine große Menge offensichtlich unspezifisch gebundener Proteine. Unter Hoch-Salz-Bedingungen war die unspezifische Bindung an die Kontroll-Matrix stark reduziert, während im Eluat der Inhibitor-Matrix einige deutlich angereicherte Banden zu erkennen waren. Daher wurde mit Hoch-Salz-Bedingungen weiter gearbeitet. M: Mark12 Größenstandard (Invitrogen), L: Lysat, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, E: Eluat.

Jeweils 60 mg lösliches Protein wurde zu 25  $\mu$ l Inhibitor-Matrix gegeben und etwa 2 h bei 4°C rotiert, um der Ausbildung der Kinase-Inhibitor-Bindung ausreichend Zeit einzuräumen. Anschließend wurden die Kügelchen gewaschen und gebundene Proteine durch Zugabe von 0,5 mM der jeweiligen freien Substanz (2 bzw. 4) sowie 10 mM ATP und 20 mM MgCl<sub>2</sub> während einer 2-stündigen Inkubation eluiert. Da es sich bei den Diaminopyrimidinen um ATP-kompetitive Inhibitoren handelt, sollten ATP und MgCl<sub>2</sub> die Elution erleichtern (Godl *et al.*, 2003). Die langen Inkubationszeiten wurden gewählt, um der Kinase-Inhibitor-Bindung ausreichend Zeit einzuräumen, so dass während der Inkubation schnell und unspezifisch gebundene Proteine von spezifischen Bindern verdrängt werden können. Auch die Elution fand über einen längeren Zeitraum statt, um auch hoch affin bindende Proteine, die möglicherweise nur langsam von der Matrix dissoziieren, eluieren zu können.





**Abbildung 2.9: Eluate dreier Affinitätschromatographie-Experimente.** (a) Coomassiegefärbte Gelspuren dreier Eluate. Jeweils die gesamte Spur wurde ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. (b) Venn-Diagramm der identifizierten potenziellen Zielproteine. Von insgesamt 410 unterschiedlichen identifizierten Proteinen wurden 82 in allen drei unabhängigen Experimenten gefunden. Die restlichen Proteine wurden als unspezifische Binder betrachtet.

Die Eluate wurden mit Methanol gefällt (Wessel und Flügge, 1984), in LDS-Probenpuffer resuspendiert, erhitzt und mittels SDS/PAGE etwa 10–15 min bei 200 V aufgetrennt. Die Proteine blieben somit recht konzentriert, was die spätere Vorbereitung für die MS-Analyse erleichterte. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, gesamte Gelspuren ausgeschnitten (Abbildung 2.9a), in drei Stücke unterteilt und durch einen tryptischen in-Gel-Verdau für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Anschließend wurden die Peptide von Petra Janning und Andreas Brockmeyer (Max-Planck-Institut, Dortmund) mittels nano-HPLC/MS/MS analysiert und identifiziert.

### 2.2.2 Identifizierung potenzieller Zielproteine

Um möglichst strikte Kriterien anzulegen, wurden nur Proteine als potenzielle Zielproteine in Betracht gezogen, die in drei unabhängigen Experimenten mit Inhibitor-Matrix und in keinem von drei unabhängigen Experimenten mit Kontroll-Matrix gefunden wurden. In drei Experimenten mit Inhibitor-Matrix (beladen mit **2**) wurden insgesamt 410 unterschiedliche Proteine identifiziert, von denen 82 in allen drei Ansätzen gefunden wurden (Abbildung 2.9b). 55 dieser Proteine wurden in mindestens einem von drei Ansätzen mit Kontroll-Matrix (beladen mit **4**) gefunden und daher nicht in die Auswertung einbezogen. So besteht zwar die Gefahr, ein Zielprotein zu übersehen; allerdings wird aber auch die Wahrscheinlichkeit reduziert, einen unspezifischen Binder als Zielprotein zu betrachten. So wurden 27

MIPS Annotation	MIPS/NCBI	Referenzen
related to APG1 - essential for autophagocytosis	um06363/ XP_762510.1	Nadal und Gold (2010)
probable glycogen synthase kinase 3 alpha	um00560/ XP_756707.1	
MAP kinase Kpp2	um03305/ XP_759452.1	Müller <i>et al.</i> (1999)
probable IPL1 - ser/thr protein kinase	um10119/ XP_756618.1*	

**Tabelle 2.1: Potenzielle Zielkinasen.** Unter 27 potenziellen Zielproteinen befanden sich (die oben aufgelisteten) vier Proteinkinasen, wovon zwei bereits in der Literatur beschrieben wurden. Alle diese Kinasen sind von der MIPS Datenbank annotiert. Um06363 ist von MIPS als „related to APG1“ annotiert, wird aber in der Publikation von Nadal und Gold (2010) als ATG1 bezeichnet und wird daher im Folgenden ebenfalls als ATG1 aufgeführt. Für um10119 gibt es von MIPS und NCBI unterschiedliche Aussagen über Vorhandensein eines Introns und über die Gesamtlänge des Proteins; \*: ungültig laut MIPS.

potenzielle Zielproteine identifiziert, unter denen sich vier Proteinkinasen befanden (Tabelle 2.1).

Die restlichen potenziellen Ziele setzten sich hauptsächlich aus abundanten Proteinen wie beispielsweise ribosomale Proteine sowie aus hypothetischen Proteinen unbekannter Funktion zusammen. Da die Selektivitätsprofile der Verbindungen **1** und **2** (Abschnitt 2.1.1.2 auf Seite 22) darauf hinweisen, dass es sich um Kinaseinhibitoren handelt und N-substituierte Diaminopyrimidine bereits als Kinaseinhibitoren beschrieben wurden (Mesguiche *et al.*, 2003; Lum *et al.*, 2008; Argiriadi *et al.*, 2010; Jani *et al.*, 2010), ist das wahrscheinlichste Ziel in *U. maydis* ebenfalls eine Kinase; daher wurde der weitere Fokus auf diese Proteinklasse gerichtet.

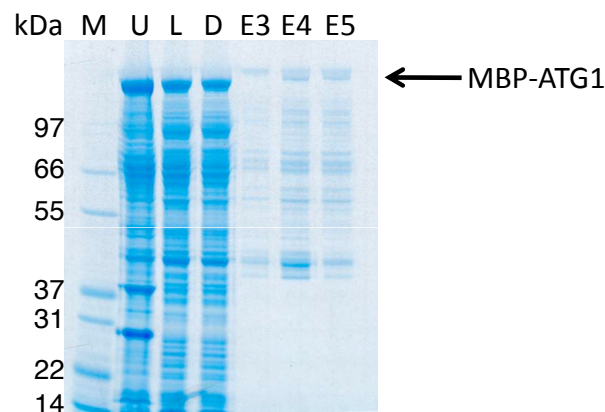
Trotz der starken Hinweise auf Proteinkinasen als wichtigste Zielproteine der N-substituierten Diaminopyrimidine ist es nicht auszuschließen, dass sich unter den übrigen identifizierten Proteinen ein prominentes Zielprotein dieser Verbindungen befindet. So identifizierten beispielsweise Rix *et al.* (2007) die Oxidoreduktase NQO2 als zusätzliches Zielprotein der als Kinasehemmer bekannten Verbindungen Imatinib und Nilotinib. Da aber kaum Informationen über die identifizierten potenziellen Zielproteine aus *U. maydis* vorliegen und keines der Proteine in aktiver Form für Inhibitionsstudien bezogen werden kann, würde eine biochemische Verifizierung aller dieser Proteine einen erheblichen Aufwand erfordern, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

## 2.3 Verifizierung der potenziellen Ziel-Proteinkinasen *in vitro*

Um nachzuweisen, dass die identifizierten Proteinkinasen tatsächlich von den verwendeten Verbindungen gehemmt werden, sollten sie heterolog in *E. coli* exprimiert, als aktives Protein gereinigt und in Inhibitionsstudien eingesetzt werden.

### 2.3.1 ATG1 – um06363

ATG1 ist das Protein des Autophagie-Gens *atg1*, welches zuerst von Nadal und Gold (2010) beschrieben wurde. Autophagie ist ein Degradations-Prozess, der es eukaryotischen Zellen erlaubt, Proteine und Organellen abzubauen und wiederzuverwerten; dieser Prozess findet in den sogenannten Autophagosomen statt (Reggiori und Klionsky, 2002). Die Expression von ATG1 in *U. maydis* ist für die Akkumulation dieser Autophagosomen notwendig. *Atg1*-Deletionsmutanten bilden im Gegensatz zum Wildtyp unter Kohlenhydrat-Mangel keine normalen Autophagosomen aus und haben eine geringere Überlebensrate. Außerdem scheint ATG1 eine Rolle bei der Zellteilung von *U. maydis* zu spielen: während Wildtyp-Zellen für gewöhnlich nur eine apikale Knospe ausbilden, wurde in *Atg1*-Deletionsmutanten auch laterale Knospung beobachtet (Nadal und Gold, 2010). Trotz dieser Defekte zeigten die Deletionsmutanten keine Wachstumshemmung auf Vollmedium, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass der wachstumshemmende Effekt der N-substituierten Dia-



**Abbildung 2.10: Reinigung von MBP-ATG1.** Coomassie-gefärbtes Gel der Fraktionen der Reinigung. Sowohl in der unlöslichen als auch in der löslichen Fraktion ist eine starke MBP-ATG1-Bande zu erkennen. Die Eluate der Reinigung zeigen nur eine sehr schwache Bande zusammen mit vielen Verunreinigungen. M: Mark12 Größenstandard (Invitrogen); U: unlösliche Fraktion; L: lösliche Fraktion; D: Durchfluss; E: Eluate.

minopyrimidine auf eine Inhibition von ATG1 zurückzuführen ist. Da es aber durchaus plausibel ist anzunehmen, dass die Wirkung der Verbindungen durch einen additiven Effekt ausgelöst wird, sollte ATG1 biochemisch auf Inhibition durch die Diaminopyrimidine untersucht werden. Zur Expression in *E. coli* wurde der gesamte Leserahmen von ATG1 nach Herstellerangaben in den Vektor pENTR™/TEV/D-TOPO® (Invitrogen) und anschließend in pDESTMC2 kloniert, so dass das Protein mit einem N-terminalen MBP-Anhang in *E. coli* BL21(DE3)pLysE exprimiert werden konnte. Die Klonierung in die pENTR™-Vektoren des Gateway-Systems von Invitrogen erlaubt die schnelle Umklonierung in eine Vielzahl verschiedener Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Anhängen mittels Rekombination homologer Bereiche in beiden Vektoren. Erfahrungsgemäß wurde aber bei der Expression von Kinasen die höchste Ausbeute an löslichem Protein mit einem N-terminalen MBP-Anhang erzielt, weshalb dieser auch hier verwendet wurde.

Obwohl sich nach Expression in *E. coli* bei 16°C etwa ein Drittel des exprimierten Fusionsproteins in der löslichen Fraktion befand, konnte wiederholt kein intaktes MBP-ATG1 gereinigt werden, da das Protein während der Reinigung abgebaut wurde (Abbildung 2.10). Die gleiche Beobachtung wurde ebenfalls für das Homolog aus *M. grisea* gemacht (Christoph Braun, Bayer CropScience AG Monheim, persönliche Mitteilung). Möglicherweise ist eine geringe Stabilität ein Charakteristikum der ATG1-Proteine. Dies könnte bei der Kontrolle der Autophagozytose hilfreich sein, da beispielsweise die durch Nährstoffmangel ausgelöste Autophagozytose bei Wiederverfügbarkeit von Nährstoffen möglichst schnell beendet werden sollte, um den Abbau der zelleigenen Reserven zu begrenzen. Eine geringe Stabilität der beteiligten Proteine könnte zum schnellen Anhalten dieses Vorgangs beitragen.

### 2.3.2 UmGSK3 – um00560

Um00560 aus *U. maydis* wurde in der Literatur noch nicht beschrieben, besitzt aber eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit zu bekannten GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) Proteinkinasen und wird daher von MIPS als GSK3 annotiert. Bei einer BLAST Suche nach weiteren GSK3 Homologen in *U. maydis* wurde nur um00560 als signifikanter Treffer gefunden, daher wird dieses Protein als einzige GSK3 in *U. maydis* betrachtet.

GSK3 Homologe wurden in allen bisher untersuchten Eukaryoten gefunden (Woodgett, 2001) und nehmen äußerst vielfältige Aufgaben in der Zelle wahr: humane GSK3 $\beta$  spielt beispielsweise eine Rolle in der Glykogen-Biosynthese, in der Wnt-Signaltransduktionskette, Proteinsynthese, Proliferation und Differenzierung, weshalb es auch als Zielprotein zur Behandlung verschiedener Krankheiten Beachtung gefunden hat (Frame und Cohen, 2001). In *S. cerevisiae* gibt es vier Homologe zur humanen GSK3 $\beta$ , die vermutlich aus Genduplikationen hervorgegangen sind. Zwei dieser Homologe spielen eine essenzielle Rolle in der Mitose bzw. während

des Wachstums bei suboptimalen Temperaturen und übertragen verschiedenste Signale wie beispielsweise Nährstoffe und Stress, während die anderen beiden Homologe redundante Funktionen einnehmen und daher nicht essenziell sind (Kassir *et al.*, 2006). In *U. maydis* wurde bereits beobachtet, dass Deletionsmutanten dieser Kinase nicht lebensfähig sind (I. Flor-Parra & J. Pérez-Martin, CNB Madrid, persönliche Mitteilung). Daher ist es plausibel anzunehmen, dass *UmGSK3* Inhibition zu Letalität führen kann.

Der gesamte Leserahmen von *UmGSK3* war bereits analog zu ATG1 über pENTR™/TEV/D-TOPO® in pDEST17 (Invitrogen) kloniert (Peter Schreier, persönliche Mitteilung), als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein exprimiert und unter Abspaltung des His<sub>6</sub>-Anhangs aufgereinigt worden. Rekombinante *UmGSK3* zeigte Aktivität im kommerziell erhältlichen Z'Lyte™-Test für humane GSK3 (Invitrogen). Optimale Enzym-, ATP- und Substrat-Konzentration sowie Reaktionsdauer waren von Christian Grütter (Chemical Genomics Centre, Dortmund) bestimmt worden: 0,15 ng/μl *UmGSK3*, 3 μM ATP, 0,75 μM Peptidsubstrat bei 20–30 min Vorinkubation von Enzym und Inhibitor und 40 min Reaktionsdauer. Darauf aufbauend konnten die IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen 1–4 bestimmt werden (Tabelle 2.2). *UmGSK3* wurde von 1 und 2 nur schwach inhibiert, während es von den negativen Kontroll-Verbindungen im gemessenen Bereich nicht inhibiert wurde. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Inhibitionsdaten für das humane Homolog, GSK3β, überein, welches in der Profilierungsstudie gegen humane Kinasen ebenfalls im mikromolaren Bereich gehemmt wurde. Da Verbindung 1 das Wachstum von *U. maydis* mit einem ED<sub>50</sub> von 21,8 mg/l inhibiert, was etwa 65 μM entspricht, ist es unwahrscheinlich, dass *UmGSK3* ein wichtiges Zielprotein dieser Substanz ist, da die Wirkung direkt am Zielprotein deutlich stärker sein sollte als die Wirkung am gesamten Organismus (Sams-Dodd, 2005). Um den beobachteten ED<sub>50</sub> mit der Inhibition der untersuchten Kinase erklären zu können, sollte also die Kinase *in vitro* deutlich stärker inhibiert werden als der Pilz *in vivo*.

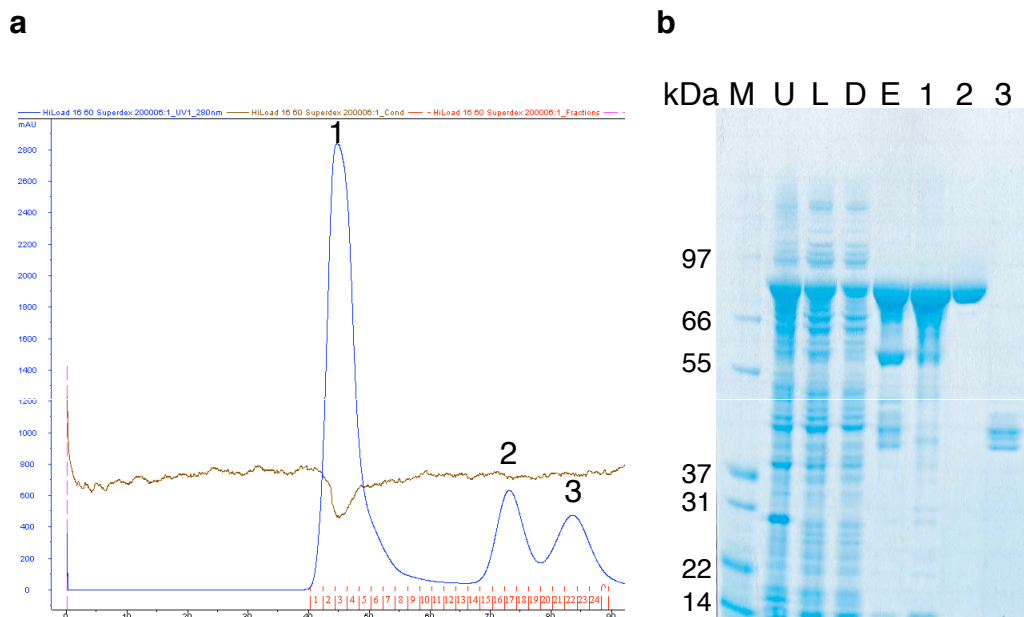
Da die Deletion von *UmGSK3* letal ist, könnte es dennoch ein interessantes fungizides Zielprotein darstellen. Daher sollte *UmGSK3* in einem chemo-genomischen Ansatz als solches validiert werden, in der Hoffnung, bessere Inhibitoren für diese Kinase finden zu können.

### 2.3.3 Kpp2 – um03305

Die Proteinkinase Kpp2 aus *U. maydis* wurde bereits von Müller *et al.* (1999) und Mayorga und Gold (1999) beschrieben: sie ist an der Paarung und der Pathogenese von *U. maydis* beteiligt. Kpp2 ist die letzte Kinase einer MAP Kinase-Kaskade und reguliert die Pheromonantwort über den Transkriptionsfaktor Prf1 (Müller *et al.*, 2003).

Verbindung	IC <sub>50</sub> [μM]		
	<i>Um</i> GSK3	Kpp2	<i>Um</i> Aurora/ <i>Um</i> INCENP <sup>1424–1575</sup>
<b>1</b>	23,4±9	33,9± 15,7	0,0088±0,0059
<b>2</b>	29,9±8,8	7,5± 2,9	0,0155 ±0,0043
<b>3</b>	>50	36,9±20,3	0,1038 ±0,0387
<b>4</b>	>50	>50	0,1149 ±0,0927
Staurosporin	0,33±0,27	1,0± 0,5	0,0021 ±0,0003

**Tabelle 2.2:** IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen 1-4 an *Um*GSK3, Kpp2 und *Um*Aurora/*Um*INCENP<sup>1424–1575</sup>. Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen. Staurosporin, ein potenter, unspezifischer Kinaseinhibitor (Karaman *et al.*, 2008), wurde als positive Kontrolle verwendet.

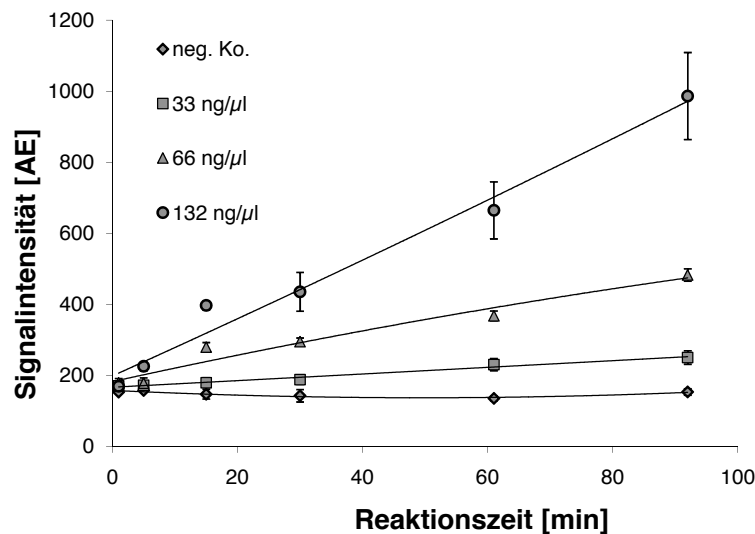


**Abbildung 2.11: Aufreinigung von MBP-Kpp2.** (a) Chromatogramm der Gelfiltration von MBP-Kpp2. (b) Coomassie-gefärbtes Gel der Fraktionen der MBP-Kpp2-Reinigung. Der überwiegende Teil von MBP-Kpp2 bestand aus oligomerem Protein, etwa 20% lag in monomerer Form vor und konnte über die Gelfiltration abgetrennt werden. M: Mark12 Größenstandard (Invitrogen); U: unlösliche Fraktion; L: lösliche Fraktion; D: Durchfluss; E: Eluate der Affinitätschromatographie; 1: oligomeres MBP-Kpp2; 2: monomeres MBP-Kpp2; 3: Verunreinigungen.

Kpp2-Deletionsmutanten zeigen eine etwa 20-fach reduzierte Fusion der Konjugationshyphen sowie einen kompletten Verlust der Pheromonantwort, so dass Paarung nur stattfinden kann, wenn Kolonien zweier kompatibler Stämme zufällig miteinander in Berührung kommen. Dieser deutliche Phänotyp war allerdings nur während der Paarung zu beobachten: haploide Deletionsmutanten zeigen weder in Morphologie noch in Wachstumsrate einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp (Mayorga und Gold, 1999). Obwohl diese Befunde ein Hinweis darauf waren, dass Kpp2 ebenfalls kein Hauptziel der untersuchten Inhibitoren ist, sollte die Kinase in aktiver Form gereinigt und ihre Hemmung durch die Verbindungen 1–4 bestimmt werden.

Kpp2 lag bereits in voller Länge im Vektor pENTR201\_Kpp2.1a vor (Peter Schreier, persönliche Mitteilung) und wurde mit geeigneten Primern aus diesem amplifiziert und ebenfalls über pENTR™/TEV/D-TOPO® in pDESTMC2 kloniert. Nach Expression in *E. coli* bei 16°C konnte MBP-Kpp2 aufgereinigt werden. Das Fusionsprotein lag zu etwa 80% als Oligomer und 20% als Monomer vor, welches mittels Gelfiltration isoliert werden konnte (Abbildung 2.11). Wie bereits publiziert (Müller *et al.*, 2003) war Kpp2 in der Lage, in einem radioaktiven Test basisches Myelinprotein zu phosphorylieren. Die  $K_m$ -Werte für ATP und Substrat wurden drei- bzw. zwei-mal unabhängig bestimmt und lagen bei  $81 \pm 24 \mu\text{M}$  bzw.  $3,6 \pm 2,5 \text{ mM}$ . Anschließend folgte eine Enzymkinetik, um die optimale Konzentration und Reaktionsdauer zu bestimmen. Auch nach 90 min Reaktionsdauer war noch keine Sättigungsphase zu erkennen (Abbildung 2.12). Es wurde eine Reaktionszeit von 40 min, eine Enzymkonzentration von 100 ng/ $\mu\text{l}$ , eine Substratkonzentration von 5,3 mM und eine ATP-Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  für die  $\text{IC}_{50}$ -Bestimmungen gewählt. Auch die Kinaseaktivität von Kpp2 wurde von den verwendeten Inhibitoren nur schwach im mikromolaren Bereich gehemmt (Tabelle 2.2), was die Vermutung bestätigte, dass es sich hierbei nicht um ein wichtiges Zielprotein der Diaminopyrimidine handelt.

Interessanterweise wurde Kpp2 durch Verbindung 2 deutlich stärker gehemmt als durch 1, ein Phänomen, was bereits für einige humane Kinasen beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 2.1.1.2 auf Seite 22). Möglicherweise liegt hier ein anderer Bindungsmodus vor. Es ist einerseits vorstellbar, dass die Aminogruppe von 2 mit einer Aminosäure am Rand der ATP-Bindungstasche interagiert, andererseits ist es auch denkbar, dass 2 eine völlig andere Orientierung in der Kinase einnimmt, so dass die Aminogruppe im Inneren der ATP-Bindungstasche liegt (vgl. Abbildung 2.13 auf Seite 37, Tari *et al.* (2007)). Dieser Bindemodus kann jedoch auf keinen Fall in Verbindung mit der Affinitätsmatrix eingegangen werden, da der Linker über die Aminogruppe gekoppelt wird. Zur Bestätigung dieser Vermutung wäre die Strukturaufklärung eines Kpp2-Inhibitor-Komplexes notwendig.



**Abbildung 2.12: Kinetik von MBP-Kpp2.** Um die optimale Reaktionsdauer und Enzymkonzentration zu bestimmen, wurde eine Kinetik mit unterschiedlichen Konzentrationen an MBP-Kpp2 durchgeführt. Auch nach 90 min Reaktionsdauer war keine Sättigung zu erkennen.

### 2.3.4 *UmAurora* – um10119

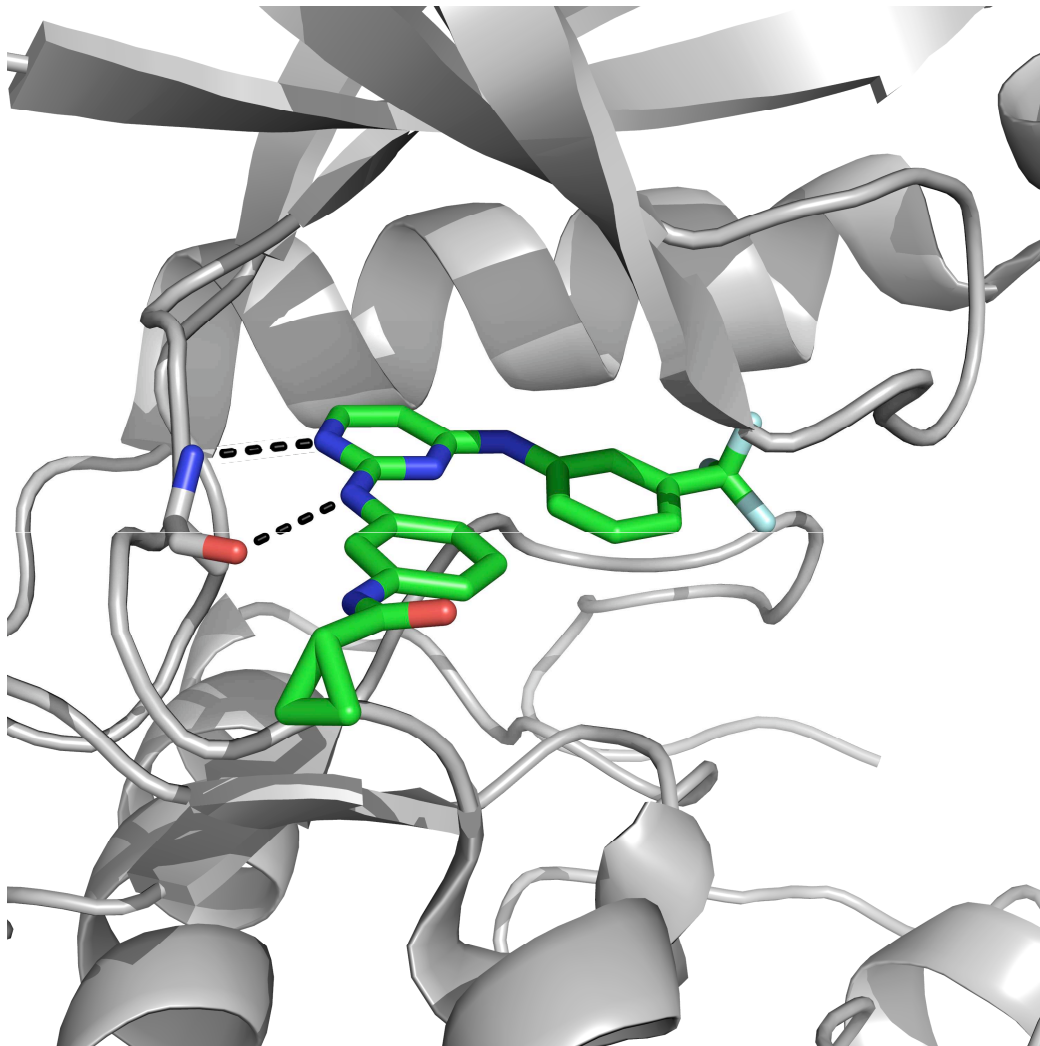
#### 2.3.4.1 Expression und Aktivitätstest von MBP-*UmAurora*

Das identifizierte Protein um10119 wurde auf Basis von hoher Sequenzhomologie zu anderen IPL1/Aurora Kinasen, beispielsweise aus *S. pombe* und Mensch, als Aurora Kinase eingeordnet (vgl. Tabelle 2.1 auf Seite 30).

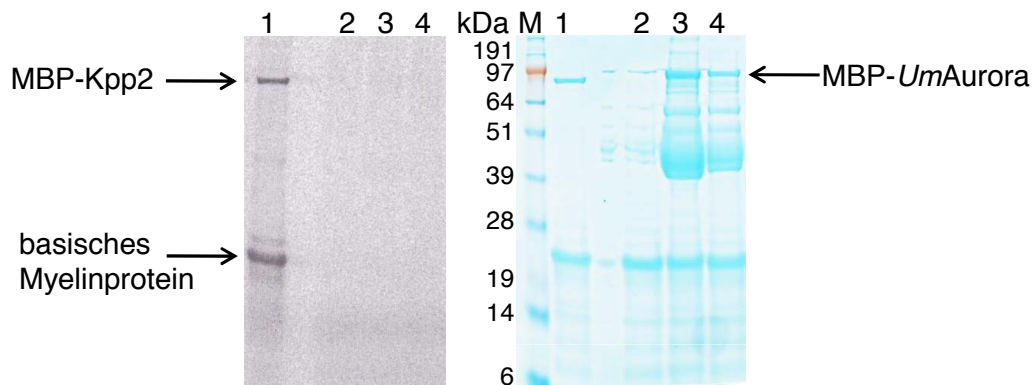
Aurora Kinasen spielen eine essenzielle Rolle bei der Segregation der Chromosomen und anschließenden Zellteilung. Ein Verlust ihrer Funktion hat schwerwiegende Effekte zur Folge, die durch ungleichmäßige Verteilung der Chromosomen hervorgerufen werden (Bischoff und Plowman, 1999). Erhöhte Expression von humanen Aurora Kinasen wurde in unterschiedlichen Tumoren, wie z.B. der Brust, der Blase oder der Bauchspeicheldrüse, beobachtet (Katayama *et al.*, 2003). Durch diese Befunde wurden Aurora Kinasen als Zielproteine in der Krebstherapie interessant (Keen und Taylor, 2004): die Erforschung niedermolekularer Aurora-Inhibitoren resultierte in der Entwicklung von VX-680 (siehe auch Abbildung 2.2 auf Seite 22), dem ersten Aurora-Inhibitor, der in klinischen Studien zur Behandlung unterschiedlicher Krebsarten, wie z.B. NSCLC, akute myeloische Leukämie und CML, evaluiert wurde (Bebbington *et al.*, 2009; Gautschi *et al.*, 2006).

Während in Metazoa drei verschiedene Isoformen der Aurora Kinase vorkommen (A, B und C), gibt es in Hefen wie *S. cerevisiae* oder *S. pombe* nur eine Aurora Kinase (Honda *et al.*, 2003). Die Aurora Kinase aus diesen Hefen interagiert mit





**Abbildung 2.13: Humane Aurora Kinase A im Komplex mit einem Diaminopyrimidin.** Im vorliegenden Kinase-Inhibitor-Komplex wurde ein neuartiger Bindemodus eines Diaminopyrimidins beobachtet, in dem der Cyclopropyl-Rest aus der ATP-Bindungstasche hinausweist. PDB-Code: 2NP8.



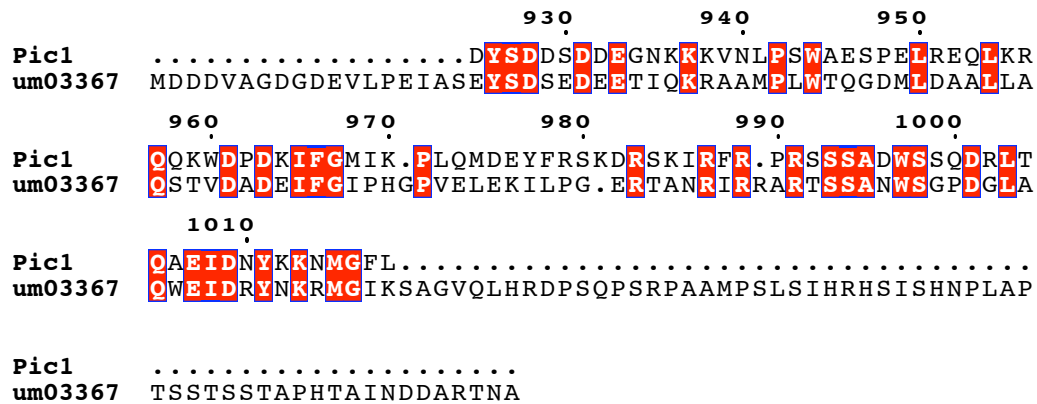
**Abbildung 2.14: Radioaktiver MBP-UmAurora-Assay.** Die Kinaseaktivität von MBP-UmAurora wurde in einem radioaktiven Assay mit basischem Myelinprotein als Substrat untersucht. Als positive Kontrolle wurde MBP-Kpp2 eingesetzt. Während bei MBP-Kpp2 starke Auto- und Substratphosphorylierung nachgewiesen werden konnte, zeigte MBP-UmAurora keinerlei Kinaseaktivität. M: SeeBlue Plus2 Größenstandard (Invitrogen); 1: positive Kontrolle (MBP-Kpp2); 2: negative Kontrolle (ohne Enzym); 3: MBP-UmAurora; 4: MBP-UmAurora, 1:3 verdünnt.

und wird aktiviert von einem sogenannten INCENP-Protein (inneres Centromer-Protein), welches auch für volle Aktivität *in vitro* benötigt wird. Dennoch konnte sowohl für Aurora aus *S. cerevisiae* als auch aus *S. pombe* Kinaseaktivität ohne Beteiligung des INCENP-Aktivators gezeigt werden (Leverson *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2001).

Auch UmAurora wurde über pENTR™/TEV/D-TOPO® in pDESTMC2 kloniert und als MBP-Fusion bei 16°C üN exprimiert. MBP-UmAurora konnte als lösliches Protein gereinigt werden und wurde an verschiedenen Substraten getestet: an keinem der drei Substrate des kommerziell erhältlichen HTRF® Kinease Assays™ für Serin/Threonin-Kinasen (Cisbio Bioassays) konnte eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Ebenso war das Protein nicht in der Lage, die Substrate für humane Aurora Kinasen des IMAP® Fluoreszenzpolarisations-Assays, Kemptide und PKA-tide (Molecular Devices), zu phosphorylieren. Auch in einem radioaktiven Assay mit basischem Myelinprotein konnte keine Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 2.14).

#### 2.3.4.2 Identifizierung und Expression eines INCENP-Proteins von *U. maydis*

Das engste Homolog von UmAurora, Ark1 aus *S. pombe* (Petersen *et al.*, 2001), ist eine Aurora B Kinase. Da für Aurora B Kinasen aus verschiedenen Organismen gezeigt wurde, dass sie für volle Aktivität die Interaktion mit einem Aktivatorprotein (inneres Centromer-Protein, kurz INCENP) benötigen (Kang *et al.*, 2001; Honda

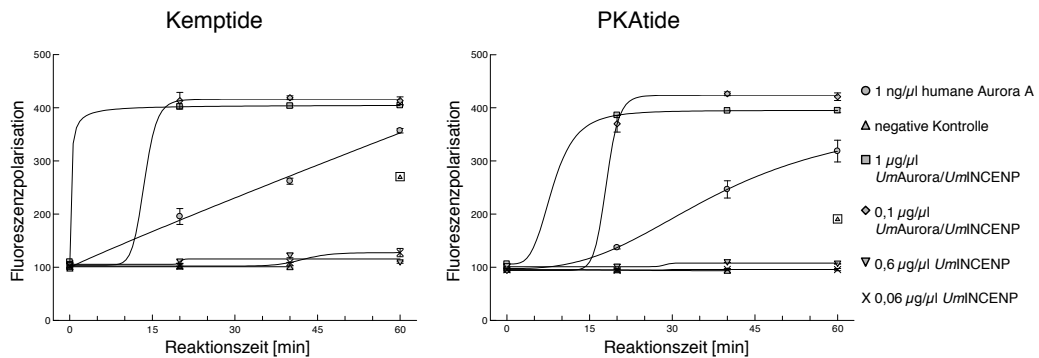


**Abbildung 2.15: Sequenzabgleich von Pic1 aus *S. pombe* und um03367.** Aminosäuren 925–1018 von *S. pombe* Pic1 wurden mit um03367 abgeglichen. Am C-Terminus von um03367 wurde ein homologer Bereich identifiziert.

*et al.*, 2003; Sessa *et al.*, 2005), wurde eine BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1990) mit der INCENP/Pic1 Sequenz aus *S. pombe* (Leverson *et al.*, 2002) gegen die *U. maydis* Datenbank (NCBI) durchgeführt, um potenzielle INCENP-Proteine in *U. maydis* zu identifizieren. Als äußerst schwach homologes Protein wurde um03367 (NCBI Akzession XP\_759514) identifiziert: die Sequenzabdeckung zu Pic1 betrug 9%, innerhalb derer 41% der Aminosäuren identisch waren (E-Wert:  $2 \times 10^{-14}$ ). Da aber ein kleiner Bereich am C-Terminus von um03367 als INCENP-Domäne vorhergesagt wird (NCBI, Suche nach konservierten Domänen), wurde dieses Protein als potenzielles INCENP in Erwägung gezogen. Ein ClustalW Sequenzvergleich (Thompson *et al.*, 1994) von um03367 und der INCENP-Domäne von *S. pombe* Pic1 zeigte einige konservierte Aminosäuren im C-terminalen Bereich von um03367 (Abbildung 2.15). Die erste dieser konservierten Aminosäuren ist Tyr926 in Pic1 bzw. Tyr1424 in um03367. Da die Aminosäuren 925–972 von *S. pombe* Pic1 notwendig und hinreichend für die Bindung der Aurora Kinase sind (Leverson *et al.*, 2002), wurden die Aminosäuren 1424–1575 von um03367, nachfolgend als *UmINCENP*<sup>1424–1575</sup> bezeichnet, kloniert und analog zu *UmAurora* als MBP-Fusion exprimiert. Obwohl die konservierten Aminosäuren der INCENP-Region sich nur bis Aminosäure 1671 erstrecken, wurde der gesamte Bereich bis zum Stop-Codon kloniert, um keine potenziell notwendigen Aminosäuren auszulassen.

### 2.3.4.3 Ko-Reinigung und Aktivitätstest eines *UmAurora/UmINCENP*<sup>1424–1575</sup> Komplexes

Da die Bindung von INCENP eine Konformationsänderung der Aurora Kinase induziert (Sessa *et al.*, 2005), wurden separat exprimierte MBP-*UmAurora* und

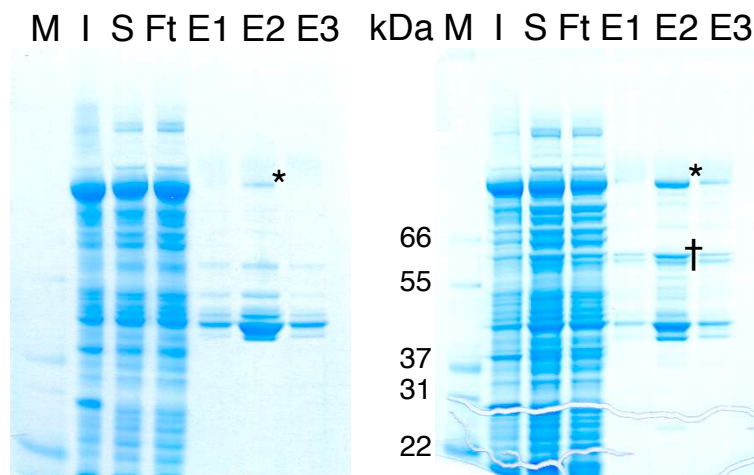


**Abbildung 2.16: Kinetik von MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> mit verschiedenen IMAP-Substraten.** Der Komplex aus MBP-UmAurora und MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> war in der Lage, beide IMAP-Substrate für humane Aurora Kinasen zu phosphorylieren. Als Negativ-Kontrolle wurde MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> alleine eingesetzt. Als weitere negative Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym; als positive Kontrolle wurde humane Aurora A verwendet.

MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> bereits vor dem Zellaufschluss vereinigt und gemeinsam gereinigt, um der Konformationsänderung genügend Zeit einzuräumen. Der gereinigte Komplex aus MBP-UmAurora und MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> war in der Lage, sowohl basisches Myelinprotein als auch die Substrate für humane Aurora Kinasen, PKAtide und Kemptide, in IMAP® Fluoreszenzpolarisations-Assays zu phosphorylieren (Abbildung 2.16). Dieses Ergebnis wurde durch eine Wiederholung von Reinigung und Aktivitätstests als vollkommen unabhängiges Experiment bestätigt. Somit wurde sowohl ein bisher unbekanntes INCENP-Protein aus *U. maydis* identifiziert als auch die Identität der UmAurora Kinase bestätigt. Ferner wurde die erste Aurora Kinase beschrieben, die ohne INCENP-Bindung keinerlei Aktivität *in vitro* zeigt.

Interessanterweise resultiert die Ko-Reinigung von MBP-UmAurora und MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> in einer höheren Ausbeute an löslichem MBP-UmAurora, was darauf hindeutet, dass das Aktivatorprotein auch bei der korrekten Faltung der Kinase eine Rolle spielt (Abbildung 2.17).

Um die Bildung eines Komplexes aus Aktivator und Kinase nachzuweisen, wurde das Gemisch aus gereinigter MBP-UmAurora und MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, von welcher beide Proteine gemeinsam eluierten. Von der Gelfiltrationssäule eluierten weiterhin ein Oligomer aus MBP-UmAurora und MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>, MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> alleine sowie MBP (Abbildung 2.18 auf Seite 42). Alle Fraktionen der Gelfiltration wurden in einem radioaktiven Assay auf Aktivität getestet. Zusätzlich wurden separat gereinigtes MBP-UmAurora und MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> einzeln und als Mischung

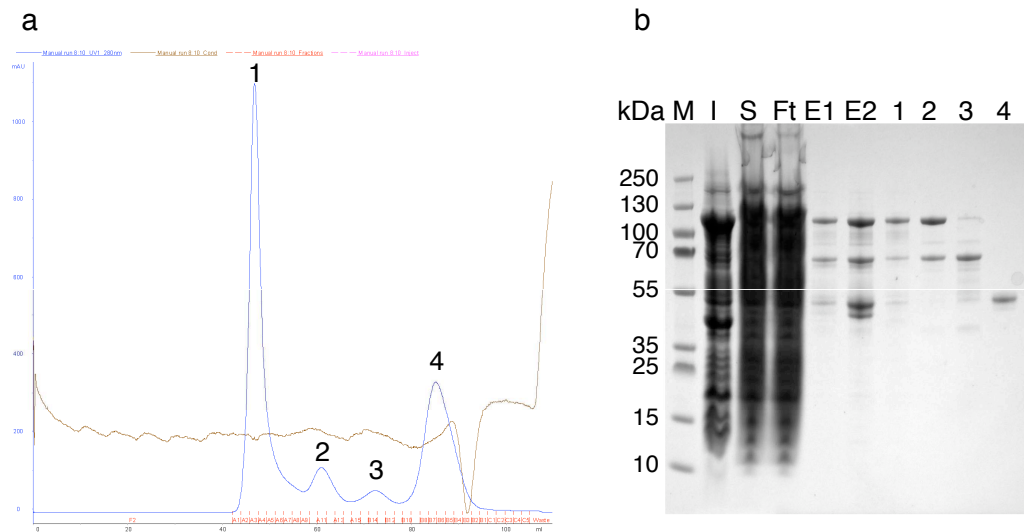


**Abbildung 2.17: Reinigung von MBP-IPL1 alleine und MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>.** Bei Aufarbeitung derselben Expressionskultur von MBP-UmAurora gemeinsam mit MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> konnte ein wesentlich höherer Anteil an löslicher MBP-UmAurora gewonnen werden (rechts) als bei separater Reinigung (links). M: Mark12 Größenstandard (Invitrogen); I: unlösliche Fraktion; S: lösliche Fraktion; Ft: Durchfluss; E: Eluate der Affinitätssäule; \*: MBP-UmAurora; †: MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>.

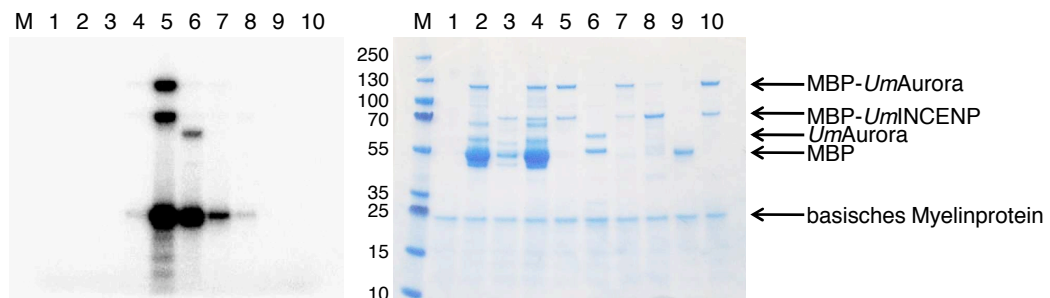
im Assay sowie eine Probe des Komplexes nach Abspaltung des MBP-Anhangs untersucht.

Wie bereits zuvor gezeigt war MBP-UmAurora nicht in der Lage, basisches Myelinprotein zu phosphorylieren. Ebenso zeigte MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> alleine keine Kinaseaktivität. Wurden separat gereinigte MBP-UmAurora und MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> erst im Assay-Ansatz zusammengegeben, ließ sich eine schwache Substrat- und Auto-Phosphorylierung beobachten. Der MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplex hingegen bewirkte eine starke Phosphorylierung sowohl des Substrats als auch der Kinase und des Aktivators. Auch nach Abspaltung des MBP-Anhangs war die Kinase aktiv und konnte das Substrat phosphorylieren, wohingegen das oligomere Eluat der Gelfiltration nur sehr schwache Kinaseaktivität aufwies. Wie erwartet zeigte das von der Gelfiltrationssäule eluierte MBP keinerlei Kinaseaktivität; ebenso wurde keinerlei Phosphorylierung durch den aktiven MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplex in einem MgCl<sub>2</sub>-freien Ansatz beobachtet (Abbildung 2.19).

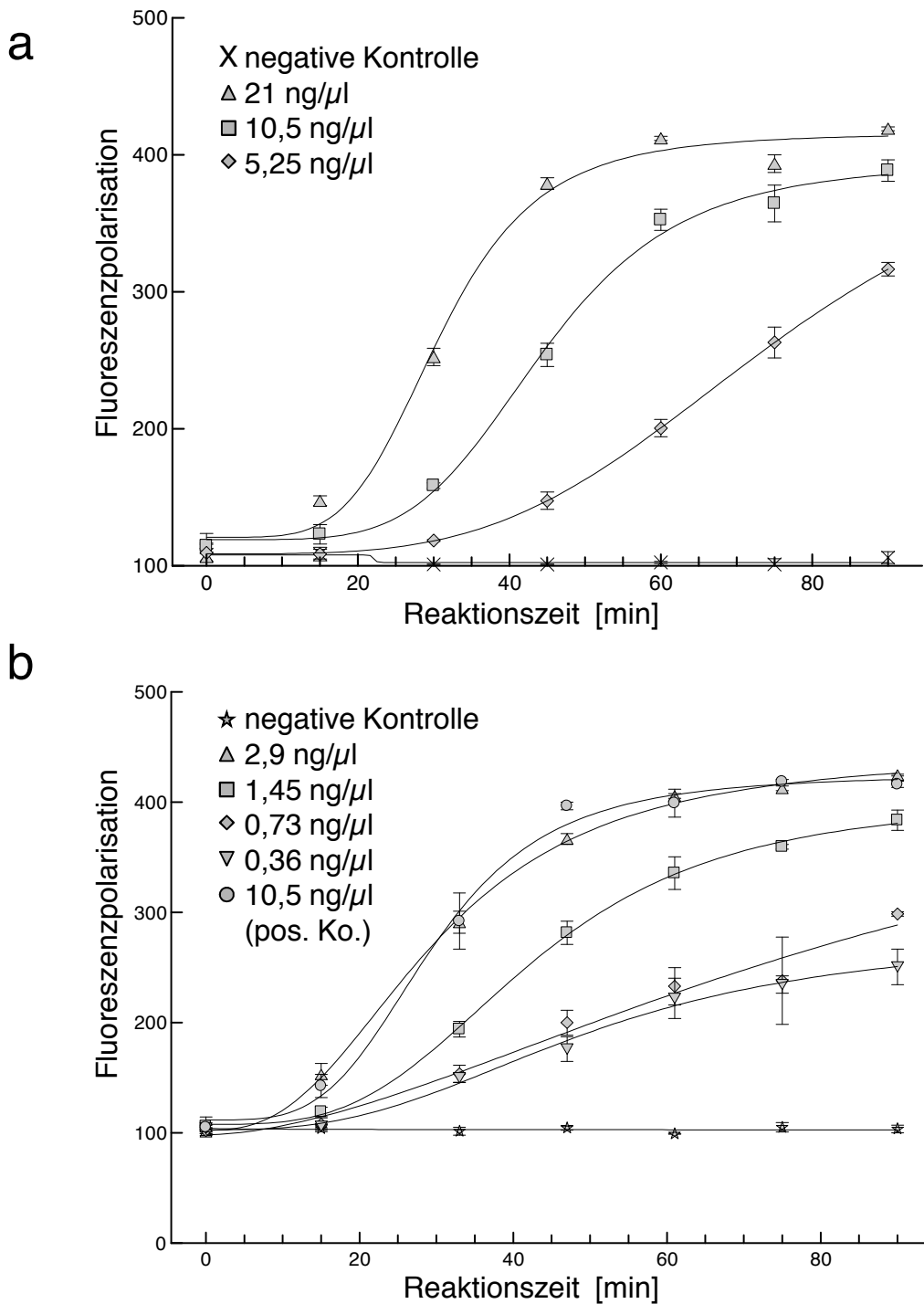
Der gereinigte Komplex aus Kinase und Aktivator wurde zur Bestimmung des ATP- $K_M$ -Wertes sowie der optimalen Enzymkonzentration in den IMAF<sup>®</sup> Fluoreszenzpolarisations-Assay eingesetzt. Der ATP- $K_M$ -Wert wurde insgesamt viermal (dreimal für die erste, einmal für die zweite Reinigung) unabhängig zu jeweils zwei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und betrug  $32,6 \pm 6,4 \mu\text{M}$ . Die



**Abbildung 2.18: Gelfiltration (a) und dazugehöriges SDS-PAGE (b) des MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplexes.** M: PageRuler Plus Größenstandard (Fermentas); I: unlösliche Fraktion; S: lösliche Fraktion; Ft: Durchfluss der Affinitätsäule; E: Eluate der Affinitätsäule; 1: erster Peak der Gelfiltration; 2: zweiter Peak der Gelfiltration; 3: dritter Peak der Gelfiltration; 4: vierter Peak der Gelfiltration. Der erste Peak enthält einen oligomeren MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplex, während im zweiten Peak der Komplex als Monomer vorliegt. Der dritte Peak enthält MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> alleine und der vierte Peak MBP.



**Abbildung 2.19: Radioaktiver Assay des MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplexes.** M: PageRuler Plus Größenstandard (Fermentas); 1: Ansatz ohne Enzym; 2: MBP-UmAurora; 3: MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>; 4: separat gereinigte MBP-UmAurora und MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>; 5: ko-gereinigter MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplex; 6: TEV-Verdau des Komplexes; 7: Oligomer der Gelfiltration; 8: MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup> der Gelfiltration (verunreinigt mit einer kleinen Menge MBP-UmAurora); 9: MBP der Gelfiltration; 10: ko-gereinigter MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplex in MgCl<sub>2</sub>-freiem Puffer.



**Abbildung 2.20: Kinetiken des MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplexes mit dem IMAP®-Fluoreszenzpolarisationsassay.** Der MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>-Komplex wurde in verschiedenen Konzentrationen über 90 min getestet. (a) Komplex der ersten Reinigung ohne Gelfiltration, (b) Komplex der zweiten Reinigung mit Gelfiltration (nur monomerer Komplex).

optimale Enzymkonzentration wurde durch Kinetiken mit verschiedenen Enzymkonzentrationen bestimmt und wurde so gewählt, dass die Reaktion im linearen Bereich verlief. Diese optimale Enzymkonzentration lag für den Komplex der ersten Reinigung (ohne anschließende Gelfiltration) bei etwa 10,5 ng/μl und für den Komplex der zweiten Reinigung (mit anschließender Gelfiltration) zwischen 1,45 und 2,9 ng/μl (Abbildung 2.20). Dieser Unterschied ist damit zu erklären, dass der zweite Komplex durch die anschließende Gelfiltration deutlich reiner war und keinen oligomeren (und damit vermutlich inaktiven) Komplex mehr enthielt.

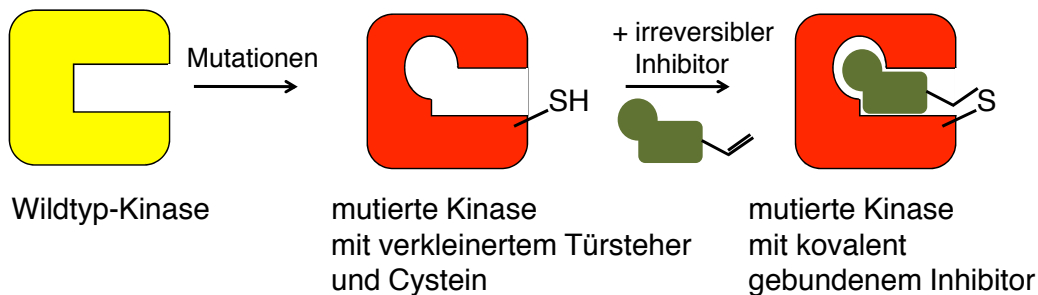
Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden bei einer ATP-Konzentration von 35 μM, einer Substratkonzentration von 100 nM und einer Enzymkonzentration von 10,5 bzw. 2 ng/μl bestimmt. Die optimale Reaktionszeit (ca. 40-50 min) wurde jeweils durch eine Kinetik mit derselben Enzymlösung bestimmt, die auch in der späteren Messung eingesetzt wurde. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden dreimal mit dem Komplex der ersten Reinigung und zur Bestätigung der Messwerte einmal mit dem Komplex der zweiten Reinigung bestimmt (Tabelle 2.2 auf Seite 34). Die Aktivität des MBP-*UmAurora*/MBP-*UmINCENP*<sup>1424-1575</sup>-Komplexes wurde von allen getesteten Verbindungen im niedrigen nanomolaren Bereich gehemmt. Obwohl auch die als Negativ-Kontrollen konzipierten Verbindungen **3** und **4** eine deutliche Inhibition ausübten, waren sie doch etwa 10fach schwächer als die aktiven Verbindungen **1** und **2** (Tabelle 2.2 auf Seite 34). Ursprünglich war davon ausgegangen worden, dass die Verbindungen **3** und **4** keine kinasemhemmende Wirkung zeigen würden, da sie im Zelltest vollkommen inaktiv waren. Bei genauerer Betrachtung der *in vivo* Daten (Abbildung 2.3 auf Seite 23) fällt allerdings auf, dass eine 10fach schwächere Inhibition in diesem Test nicht detektiert werden kann: der ED<sub>50</sub> für **1** liegt bei 21,8 mg/l, die höchste Konzentration bei 50 mg/l. Ein ED<sub>50</sub> von etwa 200 mg/l wäre also nicht sichtbar. Ferner ist durch die Verwendung eines nur etwa 10fach weniger potenten Inhibitors als negative Kontrolle eine stringente Analyse gegeben, da hierdurch weniger spezifisch gebundene Zielproteine ausgeschlossen werden können (Tanaka *et al.*, 2005).

Auf Grund dieser Befunde wurde die *UmAurora* Kinase als potenzielles, spezifisches Zielprotein der Diaminopyrimidine betrachtet. In der weiteren Arbeit wurden die Auswirkungen einer reduzierten *UmAurora*-Aktivität auf *U. maydis* sowie die Korrelation zwischen *UmAurora*-Inhibition und Wachstumshemmung untersucht.

## 2.4 Chemo-Genomische Validierung von *UmGSK3* als Zielprotein

Obwohl der Verlust des *gsk3*-Gens zu Letalität in *U. maydis* führt (I. Flor-Parra & J. Pérez-Martin, CNB Madrid, persönliche Mitteilung), bedeutet dies nicht zwangsläu-



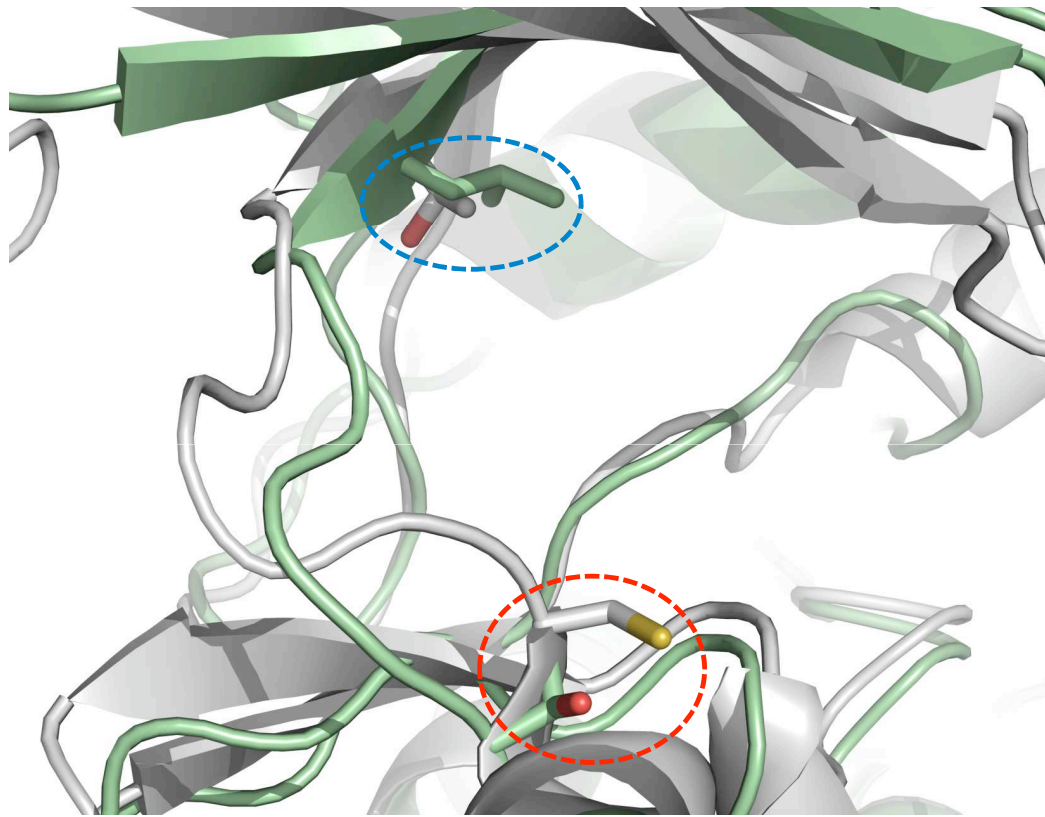


**Abbildung 2.21: Sensitivierete Kinase-Mutante.** Durch Verkleinerung des Türsteher-Restes sowie durch Einbringen einer Cystein-Mutation am Rand der ATP-Bindungstasche können Kinasen für irreversible und zugleich sterisch anspruchsvolle Inhibitoren sensitiviert werden. Der Inhibitor kann eine kovalente Bindung mit der mutierten Kinase eingehen und hat durch die Verkleinerung des Türsteher-Restes ausreichend Platz in der ATP-Bindungstasche. So kann er an die sensitivierte Kinase, nicht aber an Wildtyp-Kinasen binden.

fig, dass eine zielgerichtete Hemmung der Kinaseaktivität von *Um*GSK3 ebenfalls letal ist. Der Phänotyp der Letalität kann beispielsweise auch durch den Verlust von Interaktionen ausgelöst werden, die nicht in Verbindung mit der Kinaseaktivität des Proteins stehen (Knight und Shokat, 2005).

Um *Um*GSK3 biochemisch als Zielprotein zu validieren, musste eine Methode gewählt werden, mit der *Um*GSK3 hoch selektiv *in vivo* inhibiert werden konnte, so dass der observierte Phänotyp lediglich auf die Inhibition der *Um*GSK3-Aktivität zurückzuführen ist. Um eine selektive Hemmung der *Um*GSK3 zu ermöglichen, wurde ein chemo-genetischer Ansatz gewählt: durch die Mutation zweier Aminosäuren wird die Kinase für eine bestimmte Inhibitor-Klasse sensitiviert, die Wildtyp-Kinasen nicht hemmt: einerseits wird der Türsteher-Rest so verkleinert, dass auch sterisch anspruchsvolle Substanzen gebunden werden können, andererseits wird ein Cystein am Rand der ATP-Bindungstasche eingefügt, welches auf Grund seiner Umgebung besonders nucleophil ist und daher leicht eine kovalente Bindung mit dem Elektrophil eines irreversiblen Inhibitors eingehen kann (Abbildung 2.21). So lassen sich die Auswirkungen der biochemischen Kinase-Hemmung *in vivo* beobachten. Dieses Prinzip der Hemmung einer sensitivierten Kinase mit zwei Selektivitätselementen wurde von Blair *et al.* (2007) erfolgreich am Beispiel einer sensitivierten Src-Doppelmutante demonstriert. Durch Verkleinerung des Türstehers und Einbringen des Cysteins sollte analog *Um*GSK3 für sperrige, irreversible Inhibitoren sensitiviert werden, was eine selektive Hemmung ausschließlich dieser Kinase ermöglichen sollte.

Ein strukturbasierter Sequenzvergleich von *U. maydis* GSK3 mit humanem EGFR, für welches die ersten irreversiblen Inhibitoren entwickelt wurden (Fry *et al.*, 1998; Blair *et al.*, 2007) zeigt, dass der Türsteher-Rest in *U. maydis* GSK3



**Abbildung 2.22: Vergleich von *U. maydis* GSK3 mit EGFR.** Zur Identifizierung des Türsteherrestes und der Cysteinposition wurde ein struktureller Sequenzvergleich von *U. maydis* GSK3 und EGFR durchgeführt. EGFR (grau, PDB-Code 2RGP), *U. maydis* GSK3 (grün), blau: Türsteherrest, rot: Cysteinposition für die Bindung irreversibler Inhibitoren.

Leu125 entspricht. Die Position für das einzubringende Cystein am Rand der ATP-Bindungstasche entspricht Thr131 (Abbildung 2.22). Ein Sequenzvergleich von *UmGSK3* und den übrigen bekannten Kinasen aus *U. maydis* zeigt, dass keine andere Kinase an dieser Position ein Cystein besitzt (Analyse durchgeführt von Klaus Tietjen und Catherine Sirven, Bayer CropScience AG, Monheim). Hierdurch sollte eine hohe Selektivität der irreversiblen Inhibitoren zugunsten der mutierten *UmGSK3* gewährleistet sein.

#### 2.4.1 Heterologe Expression aktiver *UmGSK3*-Mutanten in *E. coli*

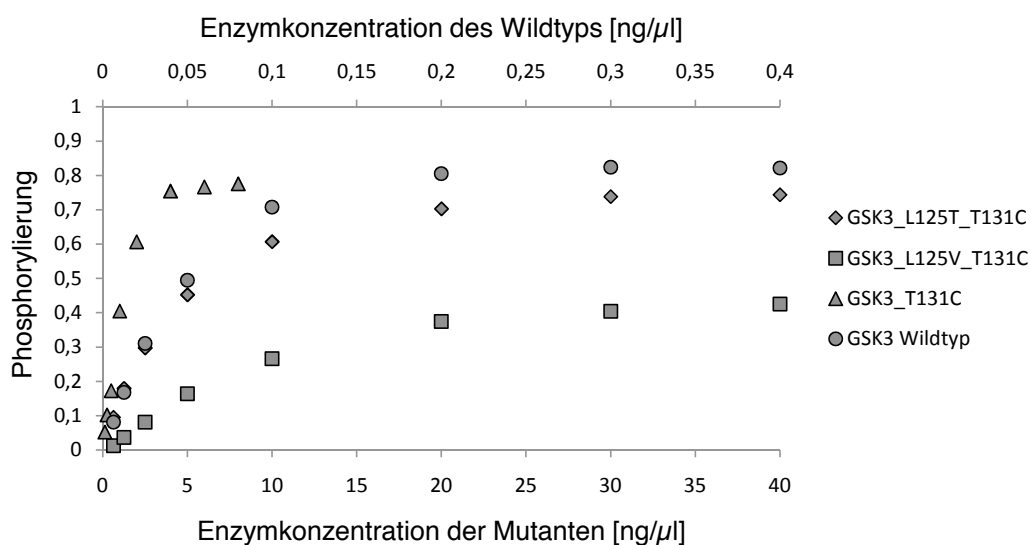
Um die Hemmung der *UmGSK3*-Mutante durch irreversible Inhibitoren im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen, sollte die Mutante zunächst in *E. coli* exprimiert werden, um sie in *in vitro* Inhibitionsstudien einsetzen zu können. Hierzu wurde

mittels PCR auf *UmGSK3* im pENTR™/TEV-Vektor Leu125 zu Gly und Thr131 zu Cys mutiert und analog zur Wildtyp-Kinase in pDEST17 kloniert. Es wurden sowohl die Einzelmутanten *UmGSK3*-L125G und *UmGSK3*-T131C als auch die Doppelmутante *UmGSK3*-L125G-T131C erzeugt. Alle Konstrukte wurden wie die Wildtyp-Kinase mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Anhang in *E. coli* exprimiert, dennoch konnte kein lösliches, aktives Protein gewonnen werden. Darauf wurden die Mutanten in pDESTMC2 kloniert, um sie mit N-terminalem MBP-Anhang zu exprimieren. Aus allen Expressionskulturen konnte lösliches Fusionsprotein gewonnen werden, wovon aber nur die Einzelmутante *UmGSK3*-T131C Aktivität zeigte. Die Türsteher-Mutante mit der L125G-Mutation zeigte keine Aktivität. Ferner wurde in eine weitere *UmGSK3*-Mutante, der eine Schleife unbekannter Funktion fehlte, die aber ansonsten normale Kinaseaktivität zeigte, eine L125A-Mutation eingebracht, was ebenfalls zum Funktionsverlust des Proteins führte (durchgeführt von Karin Harren, Bayer Crop-Science AG, Monheim). Um dennoch eine aktive Türsteher-Mutante zu erhalten, wurde L125 zu Threonin bzw. Valin mutiert. Diese Aminosäuren sind zwar größer als Glycin oder Alanin, nehmen aber weniger Raum ein als Leucin. Beide Mutanten konnten als MBP-Fusionsproteine gereinigt und erfolgreich auf Kinaseaktivität getestet werden. Zur Erzeugung einer aktiven Doppelmутante wurde anschließend die T131C-Mutation in beide Einzelmутanten eingebracht. Die so erzeugten Doppelmутanten *UmGSK3*-L125T-T131C und *UmGSK3*-L125V-T131C wurden unter Abspaltung des Anhangs über Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt und auf Aktivität getestet. Beide Doppelmутanten zeigten weniger als 1% Restaktivität im Vergleich zum Wildtyp. Auch die *UmGSK3*-T131C Einzelmутante zeigte gegenüber dem Wildtyp nur etwa 4% Restaktivität (Abbildung 2.23).

Für die spätere Erzeugung eines *U. maydis* Stamms mit mutierter *UmGSK3* zur Validierung *in vivo* ist es wichtig, dass die einzubringende Mutation keine schweren Wachstumsdefekte auslöst: das mutierte Gen wird über homologe Rekombination in das Genom eingebaut. Über Selektionsmarker kann zwar auf erfolgreiche Rekombinationsereignisse selektiert werden, aber die genaue Stelle der Rekombination kann nicht beeinflusst werden. Es ist also entscheidend, dass das Rekombinationsereignis zufällig die Mutation mit einschließt. Da befürchtet wurde, dass es nicht möglich sein wird, eine Mutante zu isolieren, die eine 100fach weniger aktive *UmGSK3* trägt, wurde entschieden, mit der *UmGSK3*-Cystein-Einzelmутante weiter zu arbeiten.

#### 2.4.2 *In vitro* Inhibitionsstudien mit irreversiblen Inhibitoren

Um eine geeignete Verbindung für die Validierung zu identifizieren, wurde der IC<sub>50</sub> verschiedener irreversibler Inhibitoren an *UmGSK3* Wildtyp und *UmGSK3*-T131C mittels des Z'Lyte™-Kinase-Assays bestimmt. Zum Vergleich wurden auch die IC<sub>50</sub>-Werte zweier reversibler Inhibitoren bestimmt. Während beide reversiblen Inhibitoren keinerlei hemmenden Effekt auf Wildtyp oder Mutante ausübten, wurden



**Abbildung 2.23: Z'Lyte Assay der *Um*GSK3-Mutanten in verschiedenen Konzentrationen.** Sowohl die *Um*GSK3-T131C-Einzelmutante als auch die *Um*GSK3-L125T-T131C- und die *Um*GSK3-L125V-T131C-Doppelmutante zeigten Kinaseaktivität. Diese war jedoch gegenüber dem Wildtyp stark reduziert.

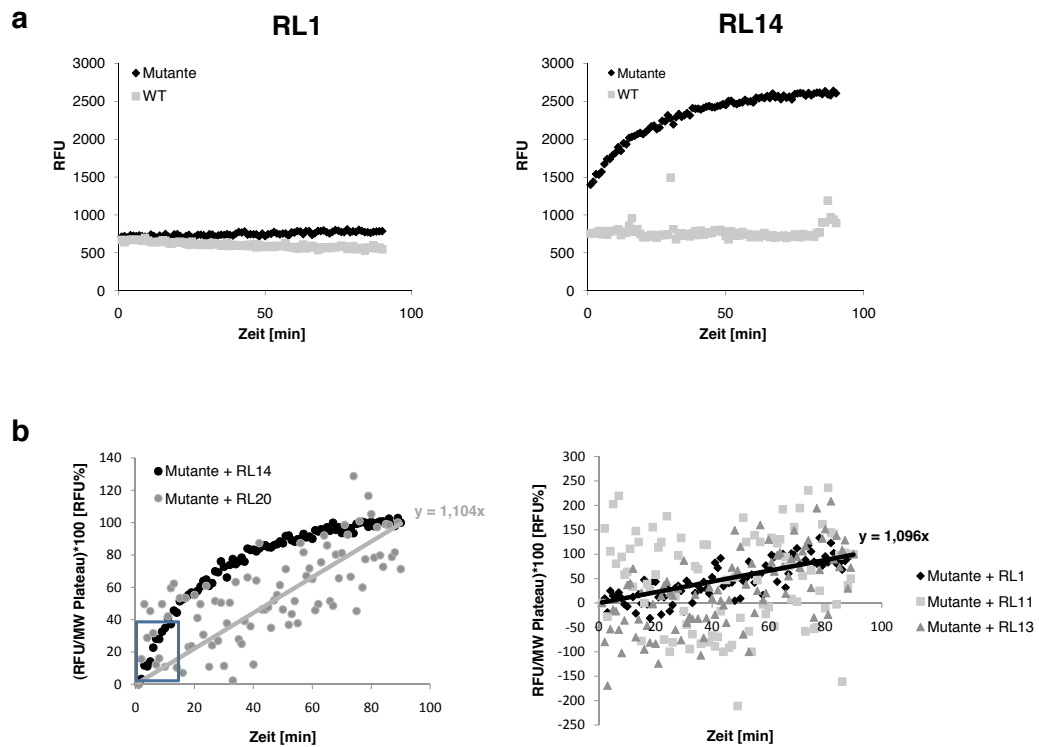
mehrere irreversible Inhibitoren identifiziert, die die Mutante im niedrigen mikromolaren Bereich hemmten, während für den Wildtyp keine Inhibition  $\leq 50 \mu\text{M}$  beobachtet wurde (Tabelle 2.3). Die Kontrolle durch die reversiblen Gegenstücke zeigt, dass der hemmende Effekt tatsächlich der Interaktion zwischen reaktiver Endgruppe der Verbindungen und dem eingeführten Cystein geschuldet ist.

Um den Unterschied zwischen Hemmung der Wildtyp *Um*GSK3 und der mutierten *Um*GSK3 durch die irreversible Inhibitoren weiter zu verdeutlichen, wurde ein Assaysystem verwendet, welches auf der intrinsischen Fluoreszenzerhöhung von Chinazolinen bei der Bildung einer kovalenten Bindung beruht (Klüter *et al.*, 2010). Hierzu wurden Kinase und Inhibitor in einem molaren Verhältnis von 5:1 gemischt und die Änderung der Fluoreszenz über 90 min aufgezeichnet.

Für alle Inhibitoren, die an der Mutante einen signifikant niedrigeren  $\text{IC}_{50}$  gegenüber dem Wildtyp zeigten, konnte mittels des fluoreszenzbasierten Chinazolin-Assays eine Fluoreszenzerhöhung der Inhibitoren bei Inkubation mit der *Um*GSK3-Mutante nachgewiesen werden. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass es tatsächlich zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen irreversible Inhibitoren und *Um*GSK3-Mutante kommt. Trotz der sehr ähnlichen  $\text{IC}_{50}$ -Werte gab es in diesem Assay allerdings starke Abweichungen: während die irreversible Bindung von RL14 an die Kinase sehr schnell erfolgte, lagen die Fluoreszenzwerte der restlichen Verbindungen an der Mutante nur unwesentlich über der Wildtyp-Kontrolle (Abbildung 2.24 auf Seite 50). Aus diesem Grund konnte die initiale Reaktionsge-

Inhibitor	R	Typ	<i>Um</i> GSK3-T131C	<i>Um</i> GSK3 Wildtyp
RL6-RL20				
RL23				
RL26				
RL6		reversibel	> 50	> 50
RL7		reversibel	> 50	> 50
<b>RL1</b>		irreversibel	7,3 ± 4,7	> 50
RL2		irreversibel	> 50	24,6 ± 10,2
RL3		irreversibel	22,9 ± 7,3	48,8 ± 3,3
RL10		irreversibel	> 50	> 50
<b>RL11</b>		irreversibel	3,1 ± 1,9	> 50
RL12		irreversibel	> 50	34,8 ± 10,3
<b>RL13</b>		irreversibel	2,1 ± 1,9	> 50
<b>RL14</b>		irreversibel	1,3 ± 0,8	40,4 ± 32,2
<b>RL20</b>		irreversibel	3,6 ± 3	> 50
RL23		irreversibel	> 50	29,9 ± 17,2
RL26		irreversibel	> 50	> 50

**Tabelle 2.3: IC<sub>50</sub> Werte verschiedener reversibler und irreversibler Kinaseinhibitoren an *Um*GSK3 Wildtyp und T131C-Mutante.** Die Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei bzw. drei Wiederholungen (für Werte > 20 μM bzw. < 20 μM), die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die fett gedruckten Inhibitoren zeigten eine deutliche Präferenz für *Um*GSK3-T131C. Die Verbindungen wurden von Haridas Rode, Chemical Genomics Centre, Dortmund, zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 2.24: Chinazolin-Binde-Assay.** (a) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzänderung bei Inkubation von RL1 und RL14 mit Wildtyp- bzw. Mutanten-*UmGSK3*. Während bei Wildtyp-*UmGSK3* keine Erhöhung der Fluoreszenz zu beobachten war, stiegen die Werte über 90 min bei der Mutante leicht (RL1) bzw. stark (RL14) an. (b) Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit. Zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit wurde der obere Sättigungsbereich der Kurven auf 100% festgelegt und die übrigen Datenpunkte ins Verhältnis hierzu gesetzt. Aus dem linearen Anfangsbereich konnte die initiale Steigung ermittelt werden, welche der initialen Reaktionsgeschwindigkeit entspricht. Je größer diese Geschwindigkeit desto reaktiver ist der Inhibitor. Da der Sättigungsbereich nur bei RL14 erreicht wurde, konnte nur für diese Verbindung die initiale Reaktionsgeschwindigkeit berechnet werden; sie betrug 3,4 RFU%/min. Bei RL1 und RL20 war ein deutlicher linearer Trend zu erkennen. Da hier allerdings nicht die Sättigung erreicht wurde, lässt sich über die initiale Reaktionsgeschwindigkeit nur aussagen, dass sie unter 1,1 RFU%/min liegt. Die Werte von RL11 und RL13 streuten so stark, dass zwar ein Anstieg der Fluoreszenz, aber keine deutliche Linearität erkennbar war.

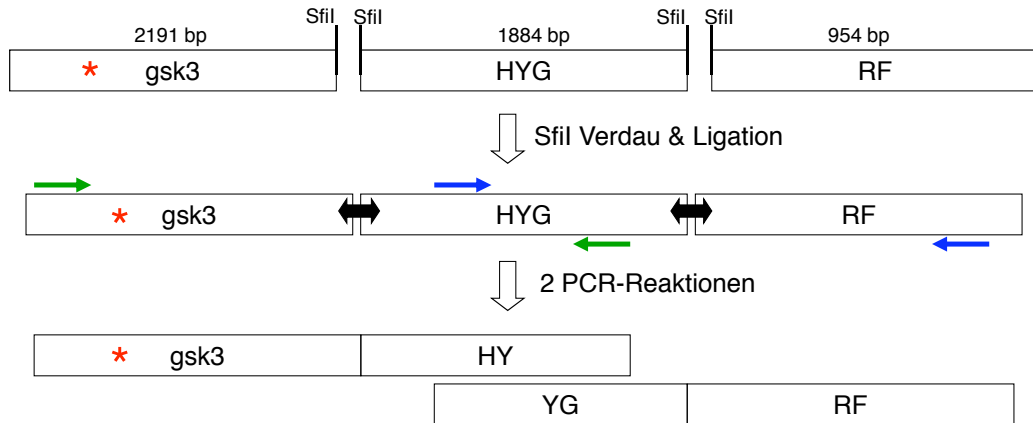
schwindigkeit, welche ein Maß für die Reaktivität eines Inhibitors ist, nur für RL14 ermittelt werden und lag bei 3,4 RFU%/min bzw. 0,06 RFU%/sek (Abbildung 2.24). Im Vergleich zu der initialen Reaktionsgeschwindigkeit der Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen RL14 und der cSrc-S345C-Mutante, welche bei über 0,5 RFU%/sek liegt (Klüter *et al.*, 2010), erfolgt die Ausbildung der Bindung zwischen RL14 und *UmGSK3*-T131C sehr langsam. Die übrigen Inhibitoren reagierten noch deutlich langsamer mit der *UmGSK3*-Mutante. Einerseits ist eine recht schnelle Bindung vorteilhaft für spätere *in vivo* Experimente, da somit die Wahrscheinlichkeit von Abbau- oder Transportprozessen verringert ist, andererseits weist die Geschwindigkeit auf eine hohe Reaktivität hin, was zu unerwünschten Interaktionen mit Cystein-Resten anderer Proteine führen könnte.

### 2.4.3 Homologe Expression von *UmGSK3*-T131C in *U. maydis*

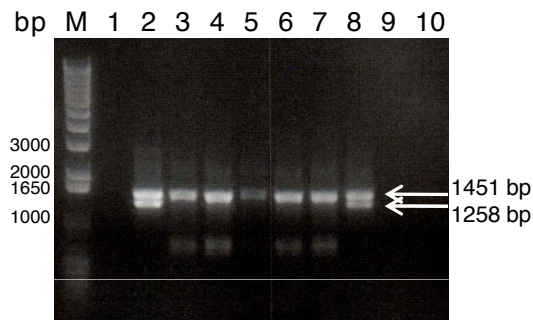
Um *UmGSK3* als Zielprotein zu validieren, muss die selektive Inhibition der *UmGSK3* *in vivo* erfolgen. Hierzu wurde ein haploider *U. maydis* Stamm erzeugt, der anstelle der Wildtyp-*UmGSK3* eine *UmGSK3* mit dem Aminosäureaustausch T131C exprimiert. Um diesen Stamm zu erzeugen, wurde die Methode der homologen Rekombination angewendet (Kämper, 2004).

Zunächst wurde die Mutation mittels gezielter Mutagenese in das Plasmid pRU11\_gsk3 (José Pérez-Martín, CNB Madrid, persönliche Mitteilung), welches die vollständige genomische *gsk3*-Sequenz trägt, eingebracht. Dieses Plasmid diente als Templat einer PCR, in der 2191 Basenpaare der *gsk3* amplifiziert wurden, so dass sowohl die Stelle der Mutation als auch die gesamte *gsk3*-Sequenz 3' davon im PCR-Produkt enthalten waren. Zusätzlich wurde am 3'-Ende des Produkts eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym SfiI eingefügt. Außerdem wurde ein 954 Basenpaare großes Fragment der rechten Flankenregion der *gsk3* aus genomischer DNA amplifiziert, welches am 5'-Terminus eine SfiI-Schnittstelle trug. Nach SfiI-Verdau beider Produkte konnten sie mit einer ebenfalls SfiI-verdauten Hygromycin-Resistenzkassette ligiert werden. Trotz erfolgreicher Ligation konnte die Kassette nicht per PCR amplifiziert werden; daher wurde die sogenannte „Split-Marker“-Technik eingesetzt, bei der zwei Fragmente mit überlappenden Selektionsmarker-Bereichen einzeln amplifiziert und gemeinsam transformiert werden (de Hoogt *et al.*, 2000, Abbildung 2.25).

Nach PEG-vermittelter Transformation in Protoplasten von *U. maydis* 521 (haploid) wurde die Integration der Resistenzkassette mittels PCR überprüft. Da die Rekombination an jeder beliebigen Stelle der homologen Bereiche stattfinden kann, gab es keine Möglichkeit der Selektion auf Mutanten, die die T131C-Mutation in ihr Genom aufgenommen hatten. Dennoch konnten die Mutanten per PCR und anschließendem Restriktionsverdau auf das Vorhandensein der Mutation überprüft werden, da der Basenaustausch zum Verlust einer BsmAI-Restriktionsschnittstelle



**Abbildung 2.25: Strategie zum Einbringen der T131C-Mutation in *gsk3*.** In einem ersten PCR-Schritt wurden die Fragmente *gsk3* (mit T131C-Mutation), HYG und RF so amplifiziert, dass sie nach einem SfiI-Verdau miteinander ligiert werden konnten. Darauf folgten zwei separate PCR-Reaktionen zur Amplifikation zweier Fragmente, die in der Hygromycin-Resistenzkassette überlappen. Diese Fragmente wurden zur Transformation in *U. maydis* eingesetzt. HYG: Hygromycin-Resistenzkassette, RF: rechte (genomische) Flanke von *gsk3*. \*T131C-Mutation.

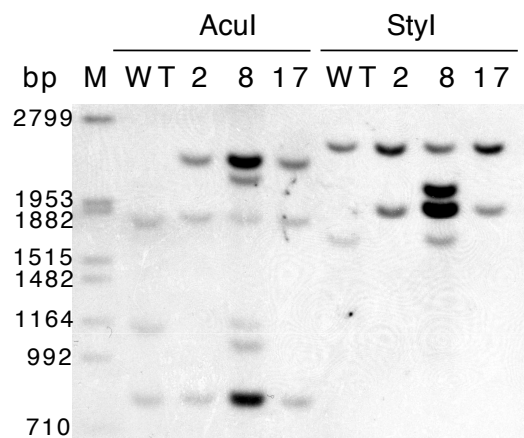


**Abbildung 2.26: Restriktionsverdau der PCR-Produkte der GSK3-Mutanten.** Da bei erfolgreichem Einbringen der T131C-Mutation eine BsmAI-Schnittstelle aus der *gsk3* entfernt wird, konnte über PCR der *gsk3* mit anschließendem BsmAI-Verdau das Vorhandensein dieser Mutation nachgewiesen werden. Die verdauten PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Gezeigt sind die Proben 1-10, die Proben 2 und 8 zeigen das korrekte Verdauungsmuster (Fragmente von 1258 und 1451 bp). Die übrigen Proben zeigen das Verdauungsmuster für Wildtyp-*gsk3*. M: 1Kb Plus DNA Größenstandard (Invitrogen).



führt. Wie bereits auf Grund der geringen Kinaseaktivität der *UmGSK3*-Cystein-Mutante vermutet worden war, konnten unter 63 analysierten Transformanden nur vier gefunden werden, die das korrekte Verdauemuster für die Mutation zeigten (Abbildung 2.26) und daher sequenziert wurden. Drei dieser Proben wiesen Mutationen auf, welche aber entweder nicht zu einem Aminosäureaustausch führten oder nicht im kodierenden Bereich der *gsk3* lagen. Eine der Proben konnte aus Qualitätsgründen nicht vollständig sequenziert werden und wurde daher verworfen.

Um zusätzliche Integrationsereignisse im Genom auszuschließen, wurde ein Southern Blot der drei erfolgreich sequenzierten Transformanden mit einer *gsk3*-spezifischen Sonde durchgeführt (Abbildung 2.27). Der Southern Blot zeigt, dass zwei der Mutanten (Nr. 2 und Nr. 17) die *gsk3*-T131C korrekt und singular in das Genom integriert haben, während Mutante Nr. 8 eine zusätzliche Kopie der *UmGSK3* enthält. Dies ist in *U. maydis* nicht ungewöhnlich, da DNA auch durch nicht-homologe Rekombinationsereignisse in das Genom integriert werden kann (Brachmann *et al.*, 2004). Möglicherweise wurde das *gsk3*-Wildtyp-Gen an anderer Stelle wieder eingebaut, nachdem es durch erfolgreiche Rekombination an seinem natürlichen Locus von der Mutante ersetzt worden war. Somit wurde Mutante Nr. 8 verworfen und mit den Mutanten Nr. 2 und Nr. 17 weiter gearbeitet. Bei der Anzucht der Mutanten war kein signifikanter Wachstumsdefekt gegenüber dem Wildtyp zu beobachten.



**Abbildung 2.27: Southern Blot der *gsk3*-Mutanten.** Wildtyp- und Mutanten-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *AcuI* bzw. *StyI* verdaut, aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Detektion wurde eine *gsk3*-spezifische Sonde eingesetzt. Die Mutanten 2 und 17 zeigten das korrekte Bandenmuster einer singulären Integration, während Mutante 8 zusätzliche Banden aufwies. M: DIG-markierter Größenstandard; WT: Wildtyp; 2, 8 und 17: Mutanten.

#### 2.4.4 *In vivo* Inhibitionsstudien mit irreversiblen Inhibitoren

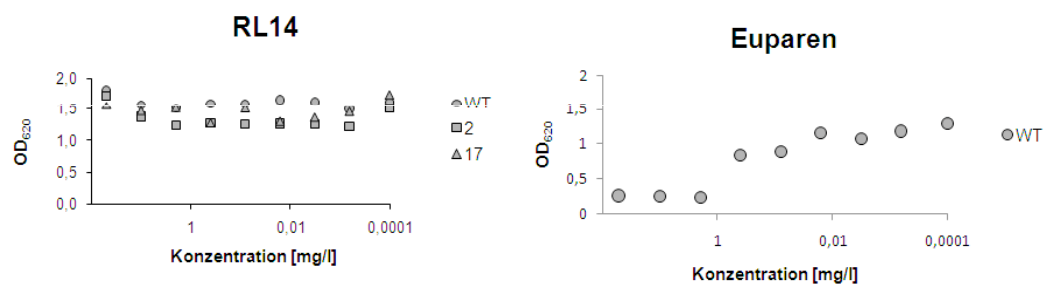
Trotz verschiedenster Wachstumstests, sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkultur, von Mutante und Wildtyp in Anwesenheit der irreversiblen Inhibitoren konnte keine signifikant stärkere Hemmung des Mutantenwachstums im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden.

##### 2.4.4.1 Plattentest (in Flüssigkultur)

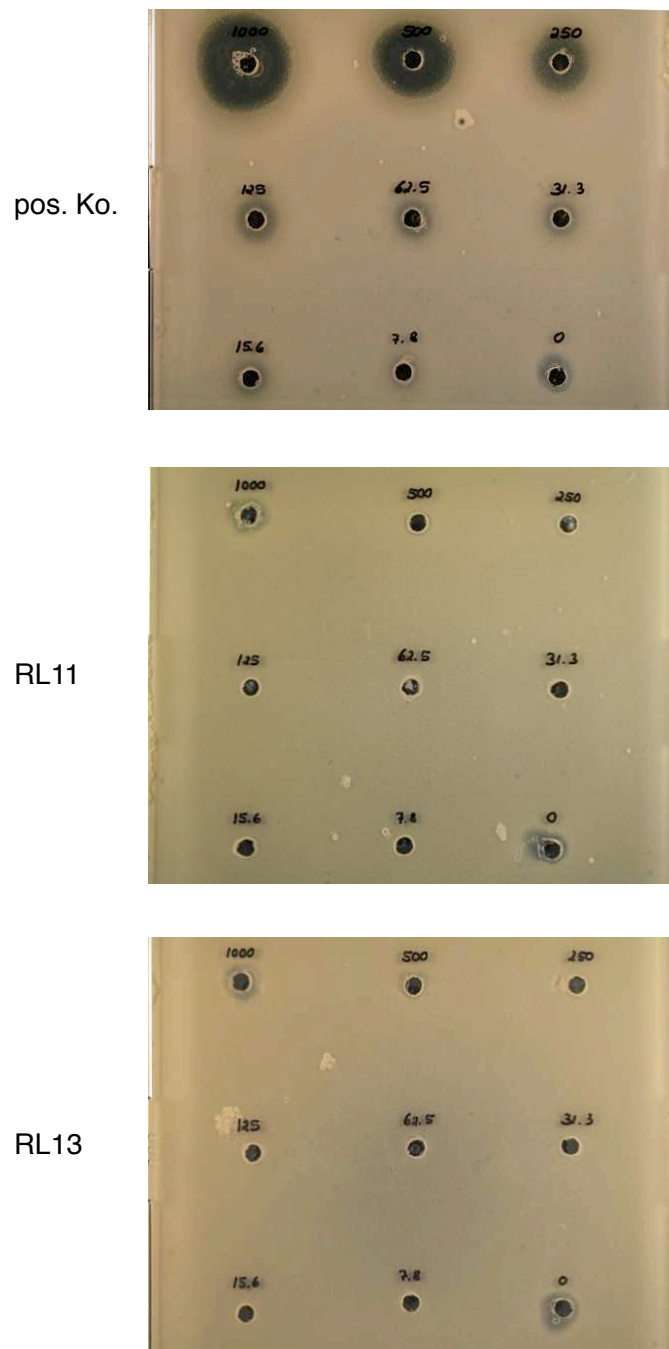
Der Plattentest in Flüssigkultur ist die Standard-Methode, um Hemmwerte verschiedener Verbindungen an Pilzkulturen zu bestimmen. Hierzu wird die gemessene optische Dichte gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen, um den  $ED_{50}$ -Wert zu bestimmen. ÜN-Kulturen von *U. maydis* Wildtyp und Mutanten Nr. 2 und Nr. 17 wurden in 96-well Platten zusammen mit verschiedenen Konzentrationen der zuvor *in vitro* getesteten Chinazolin-Inhibitoren (Tabelle 2.3 auf Seite 49, außer RL26) inkubiert. Nach dreitägigem Wachstum bei 20°C wurde die optische Dichte bei 620 nm bestimmt. Auch bei der höchsten Konzentration von 50 mg/l (dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 300 g/mol einer Konzentration von etwa 170  $\mu$ M) konnte keine Wachstumshemmung bei Wildtyp oder Mutanten beobachtet werden (Abbildung 2.28).

##### 2.4.4.2 Hemmhofstest

Eine Alternative zum Plattentest in Flüssigkultur ist der Hemmhofstest. Hier können höhere Konzentrationen der Inhibitor-Lösungen eingesetzt werden, die in den Pilz-haltigen Agar diffundieren. Zur Durchführung des Hemmhofstests wurden Kulturen von *U. maydis* Wildtyp und Mutante Nr. 2 in handwarmem, Agar-haltigen



**Abbildung 2.28: Wachstumstest von Wildtyp und Mutanten mit gsk3-T131C.** Wildtyp und Mutanten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an irreversiblen Inhibitoren getestet. Exemplarisch ist die optische Dichte nach drei Tagen Wachstum mit verschiedenen RL14-Konzentrationen gezeigt. Der Verlauf entspricht den Ergebnissen der Wachstumstests mit den restlichen Verbindungen. Als positive Kontrolle wurde das wirksame Fungizid Euparen eingesetzt.



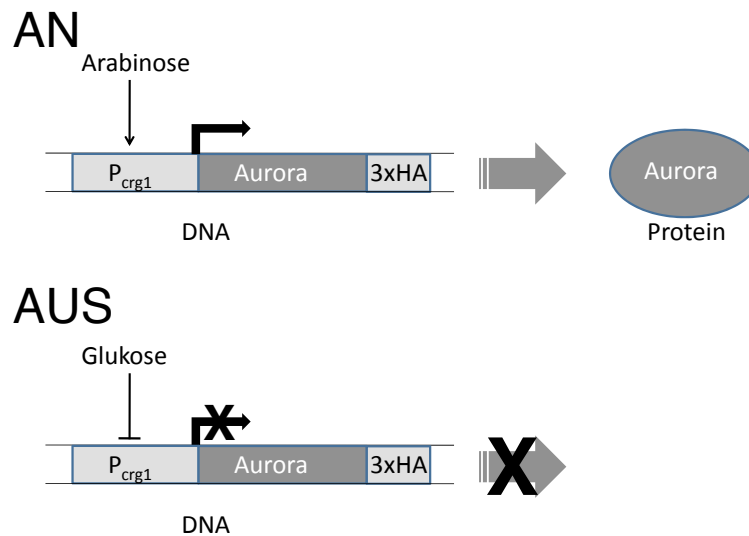
**Abbildung 2.29: Hemmhofstest der *UmGSK3*-Mutante mit RL11 und RL13.** Verschiedene Konzentrationen der Inhibitoren (1000–0 mg/l) wurden in ausgestanzte Löcher in Ustilago-haltigem Agar gegeben. Während die positive Kontrolle einen deutlichen Hemmhof in den höchsten Konzentrationen aufwies, war weder bei RL11 noch bei RL13 ein größerer Hemmhof als in der Lösemittelkontrolle zu erkennen.

Medium verdünnt und in eine Plastikschale gegossen. Nach dem Festwerden des Agars wurden Löcher hinein gestanzt, in welche anschließend Inhibitor-Lösung mit RL11 bzw. RL13 (höchste Konzentration in 100% Ethanol, Verdünnungen in H<sub>2</sub>O) gefüllt wurde. Die Schale wurde üN bei 28°C inkubiert und am darauffolgenden Tag wurden die Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt. Als positive Kontrolle wurde ein stark fungizid wirkendes Diaminopyrimidin eingesetzt, welches am mutmaßlichen Zielprotein (*Ustilago UmAurora*) einen *in vitro* IC<sub>50</sub> von  $1 \pm 0,5$  nM aufweist.

Bei der höchsten Konzentration der positiven Kontrolle von 1000 mg/L (dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 300 g/mol einer Konzentration von etwa 3 mM) war ein deutlicher Hemmhof von 41 mm Durchmesser sichtbar, während die Hemmhöfe bei 1000 mg/L RL11 bzw. RL13 etwa die gleiche Größe wie die der Ethanol-Kontrolle aufwiesen (Abbildung 2.29). Hierbei war in den höchsten Konzentrationen allerdings zu beobachten, dass RL11 und RL13 ausfielen. Daher war eine Erhöhung der Konzentration auf Grund der schlechten Löslichkeit von RL11 und RL13 nicht möglich.

Ein potenzieller Grund für die fehlende Wirkung *in vivo* kann schlechte Zellgängigkeit sein. Allerdings konnte die Wirkung dieser Verbindungen an Mutanten von *S. pombe* bereits gezeigt werden (Koch *et al.*, in Vorbereitung), was für gute Zellgängigkeit spricht. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass die Substanzen in einen anderen Organismus wie *U. maydis* deutlich schlechter oder gar nicht hineingelangen. Weitere Gründe können ein schneller zellulärer Abbau dieser Verbindungen sowie unspezifische Reaktionen mit anderen zellulären Cysteinen sein. Die wahrscheinlichste Ursache allerdings ist die zu niedrige Konzentration der Inhibitoren in Kultur: die Verbindungen wirken *in vitro* mit einem IC<sub>50</sub> im mikromolaren Bereich.

In früheren Experimenten mit sensitivierter c-Src-Doppelmutante (Glycin-Türsteher und Cystein-Mutation) wurde ein nanomolarer Inhibitor der Mutante identifiziert; um aber eine gute Hemmung in Zellkultur nachzuweisen, mussten Konzentrationen im hohen nanomolaren bis niedrigen mikromolaren Bereich eingesetzt werden (Blair *et al.*, 2007). Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass Pilze im Gegensatz zu Säugerzellen eine Zellwand besitzen, die sie zusätzlich vor toxischen Substanzen schützt (Nitiss und Wang, 1988). Es ist also durchaus möglich, dass ein *in vivo* Effekt der irreversiblen Chinazoline auf die *UmGSK3*-Mutante erst bei Konzentrationen im millimolaren Bereich zu sehen wäre. Ein Test bei solch hohen Konzentrationen ist auf Grund der geringen Löslichkeit der Verbindungen nicht möglich. Um *UmGSK3* doch noch über diese Methode als Zielprotein zu identifizieren, wäre es vermutlich notwendig, die Doppelmutante (Türsteherrest + Cystein) zu erzeugen, um eine stärkere Wirkung der Inhibitoren zu erzielen. Das Gelingen des Experiments ist allerdings auf Grund der geringen Aktivität der Doppelmutante fraglich.



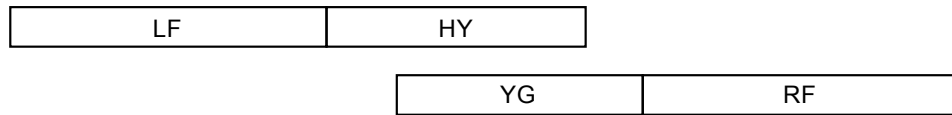
**Abbildung 2.30: Funktionsprinzip des induzierbaren *crg1*-Promotors.** Bei Zugabe von Arabinose wird die Expression von *UmAurora* mit 3xHA-Anhang induziert, während sie bei Zugabe von Glukose reprimiert wird.

## 2.5 Auswirkungen von *UmAurora*-Repression auf *U. maydis*.

Da *UmAurora* Kinase als potenzielles Hauptziel der N-substituierten Diaminopyrimidine identifiziert wurde, sollten die Auswirkungen einer Repression der *UmAurora*-Expression auf das Wachstum von *U. maydis* untersucht werden. Weder die Erzeugung eines haploiden noch eines diploiden Deletions-Stammes waren erfolgreich, da nach Transformation mit dem Deletionskonstrukt keine Transformanten anwuchsen. Daher wurde mit dem konditionalen *crg1*-Promotor gearbeitet, welcher durch Glukose reprimiert und durch Arabinose induziert wird (Bottin *et al.*, 1996). Ziel war die Erzeugung eines *Ustilago* Stammes, der ausschließlich *UmAurora* unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors exprimiert und einen 3xHA-Anhang trägt, was eine Detektion über anti-HA-Antikörper erlaubt (Abbildung 2.30).

### 2.5.1 Herstellung einer konditionalen *UmAurora*-Knockdown-Mutante

Zunächst wurde der gesamte offene Leserahmen von *UmAurora* in den Vektor pHA-Hyg kloniert, welcher einen 3xHA-Anhang trägt (Regine Kahmann, MPI Marburg, persönliche Mitteilung). Hieraus wurde *UmAurora*-3xHA herausgeschnitten und hinter den *crg1*-Promotor des Vektors pRU11 kloniert. Dieser Vektor trägt neben



**Abbildung 2.31: Konstrukte zur Deletion der *UmAurora*.** LF: linke Flanke der genomischen *UmAurora*; HY: erste 2/3 der Hygromycin-Resistenzkassette; YG: letzte 2/3 der Hygromycin-Resistenzkassette; RF: rechte Flanke der genomischen *UmAurora*.

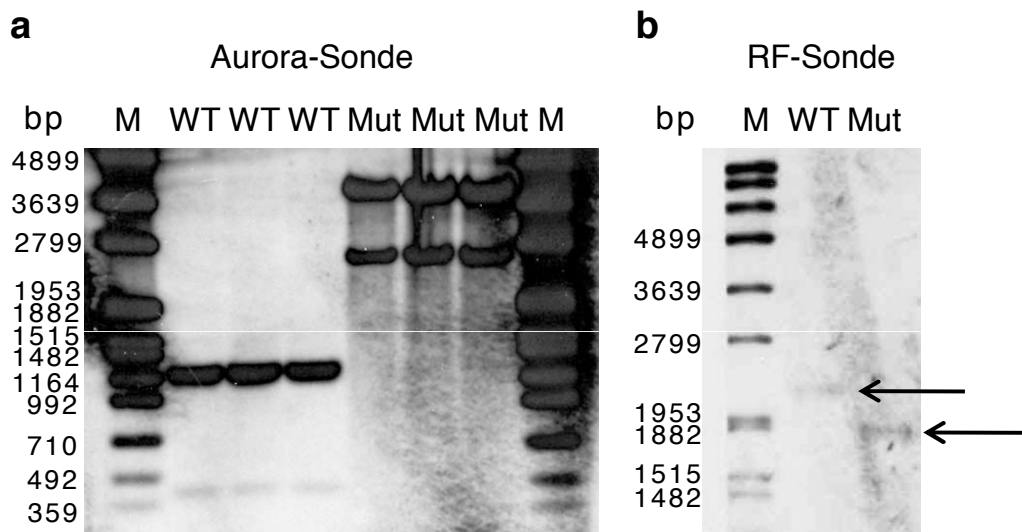
dem *crg1*-Promotor zwei Antibiotikaresistenzgene (Carboxin und Ampicillin) sowie einen nos-Terminator zur Beendigung der Transkription (Brachmann *et al.*, 2001).

Der fertige Vektor pRU11\_ *UmAurora*\_3xHA wurde in den haploiden Ustilago Stamm 521 transformiert. Gewachsene, Carboxin-resistente Transformanden wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von *UmAurora* hinter dem *crg1*-Promotor überprüft. Es wurde eine positive Kolonie identifiziert, von welcher Protoplasten hergestellt wurden. Die Protoplasten wurden—analog zur Herstellung der *UmGSK3-T131C*-Mutante—mit zwei Konstrukten zur Deletion von *UmAurora* unter dem natürlichen Promotor transformiert (Abbildung 2.31).

Carboxin- und Hygromycin-resistente Transformanden wurden auf Arabinose-haltigem Medium ausplattiert, um die *UmAurora*-Expression zu induzieren. Die Deletion der natürlichen *UmAurora* wurde mittels PCR auf DNA der Transformanden überprüft. Insertion von  $P_{crg1}:UmAurora$  und Deletion der natürlichen *UmAurora* wurden zusätzlich per Southern Blot mit einer *UmAurora*- und einer RF-Sonde bestätigt (Abbildung 2.32).

## 2.5.2 Letalität der konditionalen *UmAurora*-Knockdown-Mutation

Um zu untersuchen, ob die Expression von *UmAurora* essenziell in *U. maydis* ist, wurde zunächst der zuvor erzeugte Mutanten-Stamm mit induzierbarer *UmAurora* in Arabinose-haltigem Medium angezogen. Anschließend wurde die Kultur halbiert, beide Hälften geerntet, in H<sub>2</sub>O gewaschen und eine Hälfte in Arabinose-, die andere Hälfte in Glukose-haltigem Medium zu einer OD<sub>600</sub> von 0,04 resuspendiert. Zweimal 5 µl jeder Probe wurden auf Arabinose- bzw. Glukose-haltiges Medium aufgetropft und bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde jede Probe der Resuspension auf drei Kolben aufgeteilt und bei 28°C geschüttelt. Durch Messung der OD<sub>600</sub> zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das Wachstum in Flüssigkultur verfolgt. Als Kontrolle wurde der entsprechende Wildtyp-Stamm ebenso behandelt wie die Mutante.



**Abbildung 2.32: Southern Blot zur Verifizierung der *UmAurora*-Mutanten.** M: DIG-markierter Größenstandard (Roche); WT: Wildtyp; Mut: konditionale *UmAurora*-Mutante. (a) Die DNA wurde mit BsaAI verdaut und mit einer Sonde gegen Aurora hybridisiert. Auf Grund vorheriger Probleme wurden die Proben jeweils dreimal aufgetragen. (b) Die DNA wurde mit PshAI verdaut und mit einer Sonde gegen die rechte Flanke (RF) der *UmAurora* hybridisiert. Beide Blots zeigen das korrekte Verdauemuster.

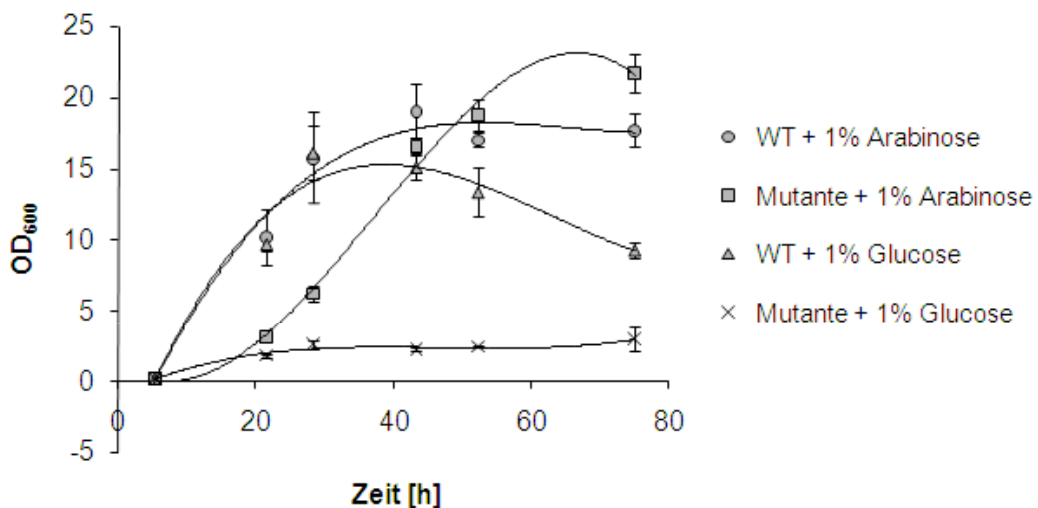
In Flüssigkultur ließ sich während der ersten 22 h nur ein deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ausmachen: während der Wildtyp eine  $OD_{600}$  von etwa 10 erreichte, lag die Mutante in Arabinose- bzw. Glukose-haltigem Medium bei einer  $OD_{600}$  von etwa 3 bzw. 2. Nach 28 h war bereits ein Unterschied zwischen Mutante in Arabinose und Mutante in Glukose erkennbar: die  $OD_{600}$  in Arabinose lag etwa 2,5-mal höher. Nach 52 h Inkubation in Flüssigkultur hatte die in Arabinose wachsende Mutante die optische Dichte der Wildtyp-Kontrollen erreicht, während kein weiteres Wachstum der Mutante in Glukose mehr stattgefunden hatte. Auf das Wachstum des Wildtyps hatte die Gabe von Arabinose bzw. Glukose keinen Einfluss (Abbildung 2.33). Das langsamere Anwachsen der Aurora-Mutante in Arabinose ist vermutlich auf eine fehlerhafte Regulation der *UmAurora* Expression zurückzuführen: normalerweise unterliegt die Expression von Aurora Kinasen strikten Regulationsmechanismen, so dass das Gen nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus abgelesen wird (Kimura *et al.*, 1997; Rustici *et al.*, 2004). Durch den Austausch des natürlichen Promotors gegen den *crg1*-Promotor ist diese Regulation höchstwahrscheinlich gestört oder nicht mehr vorhanden. Dennoch waren Mutanten-Zellen unter induzierenden Bedingungen in der Lage zu wachsen. Überführte man allerdings diese Zellen in Glukose-haltiges Flüssigmedium, stellten sie ihr Wachstum nach etwa 24 Stunden ein. Diese Verzögerung ist damit zu erklären, dass sich zum

Zeitpunkt des Mediumwechsels sowohl noch bereits exprimierte *UmAurora* als auch noch Reste von Arabinose in den Zellen befinden, so dass diese noch einige Zeit weiter wachsen können.

Das Wachstum auf Festmedium wurde nach 53 bzw. 72 h fotografisch dokumentiert. Während der Wildtyp sowohl auf Arabinose- als auch auf Glukose-haltigem Medium gut anwuchs, zeigte die Mutante auf Arabinose einen leichten Wachstumsdefekt. Ferner konnte kein Wachstum der Mutante auf Glukose festgestellt werden (Abbildung 2.34). Diese Versuche demonstrieren, dass die Expression von *UmAurora* essenziell für das Wachstum von *U. maydis* ist und *UmAurora* daher mit großer Wahrscheinlichkeit ein Zielprotein darstellt. Zur endgültigen Validierung als solches wäre der oben vorgestellte Ansatz der chemo-genetischen Validierung die eleganteste Methode. Aus Zeitgründen konnte dies leider nicht realisiert werden.

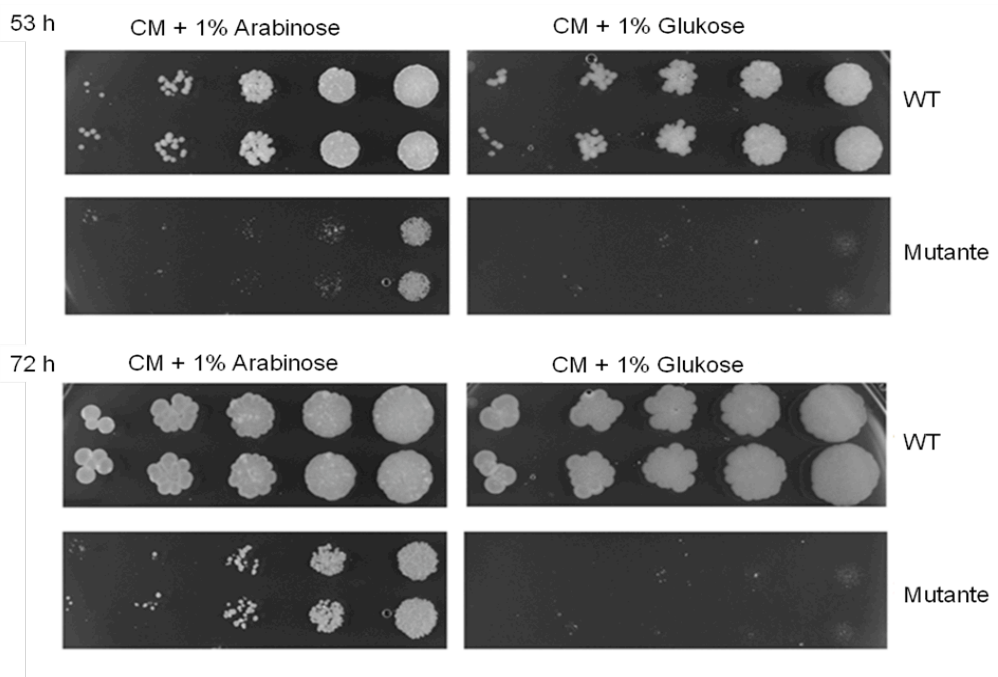
### 2.5.3 Antikörper-Nachweis der *UmAurora*-Repression

Um die Repression von *UmAurora* in Glukose-haltigem Medium nachzuweisen, wurde die zeitabhängige Abnahme von *UmAurora* mit Hilfe eines Antikörpers verfolgt. Da *UmAurora* zusammen mit einem 3×HA-Anhang in pRU11 kloniert worden war, ließ sich das Fusionsprotein mit einem anti-HA-Antikörper detektieren.



**Abbildung 2.33: Wachstum der konditionalen *UmAurora*-Mutante in Arabinose- und Glukose-haltigem Flüssigmedium.** Wildtyp und Mutante wurden in Arabinose-haltigem Medium angezogen. Anschließend wurden die Kulturen aufgeteilt und in Arabinose- bzw. Glukose-haltigem Medium inkubiert. Der Wildtyp zeigte keine Präferenz für Arabinose oder Glukose, während die Mutante in Glukose nur schlecht wuchs und ab 28 h kein weiteres Wachstum zu beobachten war. Die in Arabinose wachsende Mutante zeigte zwar eine leichte Wachstumsverzögerung, erreichte aber nach 43 h die optische Dichte der Wildtyp-Kulturen.

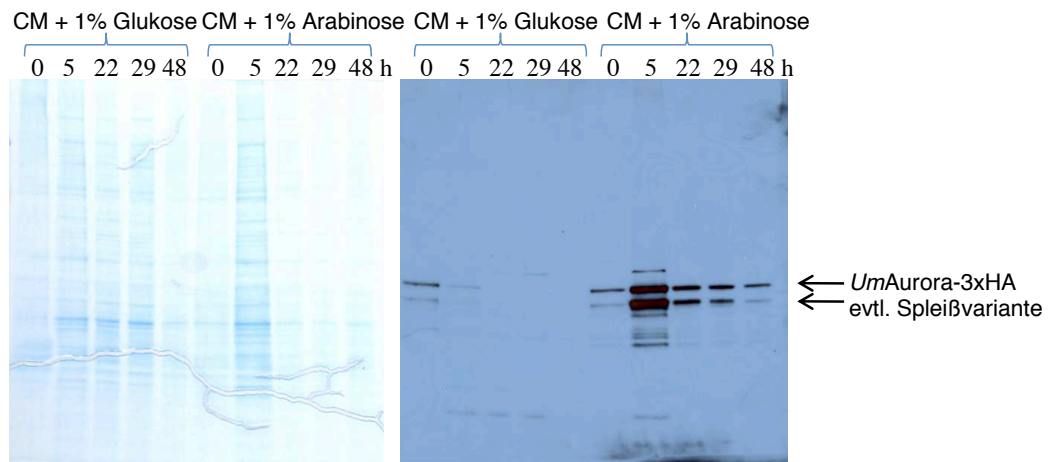




**Abbildung 2.34: Wachstum der konditionalen *UmAurora*-Mutante in Arabinose- und Glukose-haltigem Festmedium.** Wildtyp und Mutante wurden in Arabinose-haltigem Medium angezogen. Anschließend wurden die Kulturen aufgeteilt und in Arabinose- bzw. Glukose-haltigem Medium resuspendiert. Von jeder Probe wurde eine Verdünnungsreihe (jeweils fünffache Verdünnung) hergestellt und von dieser je zweimal 5  $\mu$ l auf Arabinose- bzw. Glukose-haltiges Festmedium aufgetropft. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert und das Wachstum fotografisch dokumentiert. Während die Mutante in Arabinose nur einen leichten Wachstumsdefekt zeigte, konnte keinerlei Wachstum der Mutante in Glukose beobachtet werden.

Eine Zeitreihe von Wachstum der Mutante in Arabinose bzw. Glukose zeigt ein konstantes *UmAurora*-Niveau in Zellen aus Arabinose-haltigem Medium, während *UmAurora* aus Zellen in Glukose-haltigem Medium bereits nach 29 h nicht mehr detektierbar war. Dies entspricht recht genau dem Zeitpunkt des beobachteten Wachstumsstopps der Mutante in Glukose-haltigem Medium (Abschnitt 2.5.2 auf Seite 58) und bestätigt die Vermutung, dass das Wachstum unter reprimierenden Bedingungen durch bereits gebildete *UmAurora* zunächst fortgeführt werden kann. Nach Abbau dieser Reserven ist kein weiteres Wachstum mehr möglich.

Interessanterweise wurde von dem Antikörper neben einigen unspezifischen Banden eine zweite Bande unterhalb der erwarteten *UmAurora*-Bande detektiert, die sich in Glukose bzw. Arabinose analog zu *UmAurora* verhält (Abbildung 2.35).



**Abbildung 2.35: Western Blot der *UmAurora-3×HA*.** Von einer in Arabinose bzw. Glukose wachsenden Kultur der konditionalen *UmAurora*-Knockdown-Mutante wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, in Probenpuffer aufgekocht und auf ein Gel aufgetragen. Links: Coomassie-gefärbtes Gel nach dem Blot; rechts: chemilumineszentes Signal des zweiten Antikörpers. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und *UmAurora-3×HA* mittels eines anti-HA-Antikörpers detektiert. Nach 22 h Stunden Wachstum in Glukose war keine *UmAurora* detektierbar, während sie bei Wachstum in Arabinose zu allen Zeitpunkten nachweisbar war. Interessanterweise detektiert der Antikörper neben der erwarteten Bande eine weitere, kleinere Bande, was auf eine Spleißvariante hinweisen könnte. Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt eine recht gleichmäßige Beladung.

Die Größe der Bande entspricht recht genau der vom Broad Institut ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/ustilago\\_maydis/](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/ustilago_maydis/)) vorhergesagten *U. maydis UmAurora*, welche aber von der MIPS Datenbank als ungültig verworfen und von einer längeren Version ersetzt wurde. Die laut MIPS ungültige Version enthält ein Intron, wodurch sich der Leserahmen verschiebt und die Translation früher terminiert wird. Daher ist das vom Broad Institut vorhergesagte Protein etwa 4 kD kleiner. Möglicherweise sind beide Vorhersagen korrekt und es handelt sich hier um Spleißvarianten von *UmAurora*. Diese Vermutung müsste durch weitere Versuche bestätigt werden.

#### 2.5.4 Phänotyp der konditionalen *UmAurora*-Knockdown-Mutante

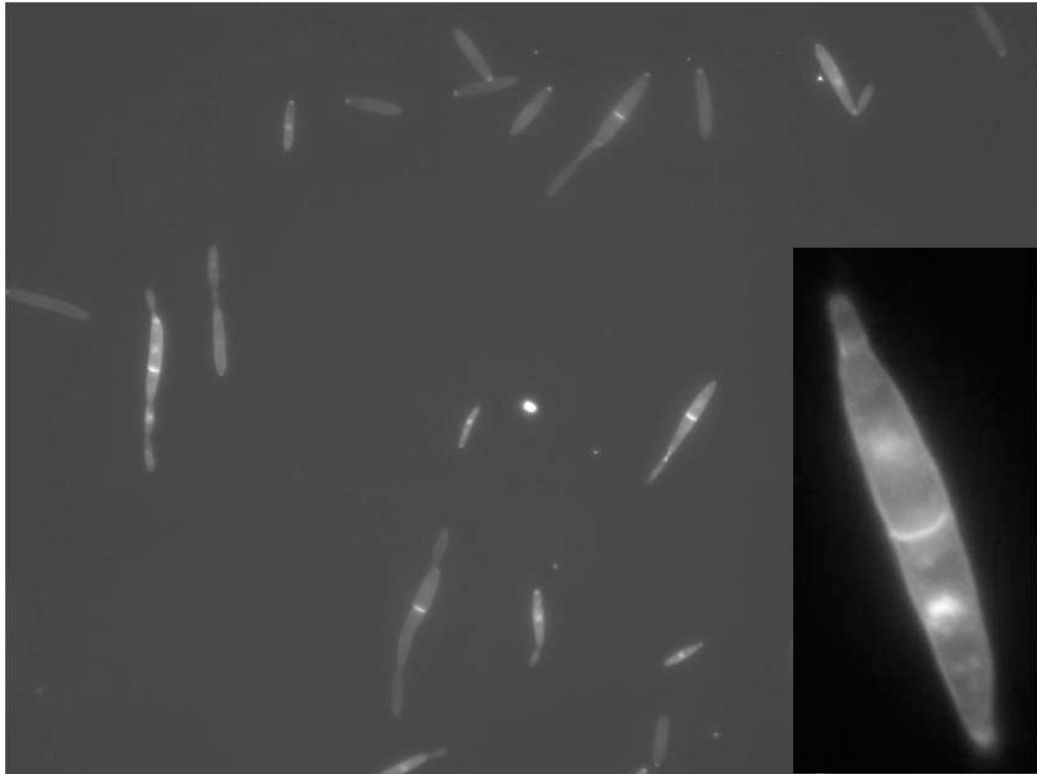
Zur Untersuchung des Phänotyps des *UmAurora*-Knockdowns wurde die Mutante in Arabinose-haltigem Medium angezogen, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in Glukose-haltigem Medium zu einer finalen OD<sub>600</sub> von etwa 0,3 resuspendiert.

Die Zellen wurden weitere 4 h bei 28°C geschüttelt. Danach wurden sie geerntet und die Zellwände mit Calcofluor sowie die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Der Phänotyp der Zellen wurde mikroskopisch untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp wiesen die Zellen der *UmAurora*-reprimierten Mutanten deutliche Charakteristika auf: 40% der Zellen besaßen ein ungewöhnliches Mittelseptum und 23% zeigten bipolare Knospung, während dies in Wildtyp-Zellen nur zu jeweils 3% auftrat. Da auf jeder Seite des Mittelseptums ein Zellkern vorlag, schien es nicht zu Defekten bei der Chromosomentrennung gekommen zu sein (Abbildung 2.36). Im Gegensatz hierzu führt der Verlust der Aurora-Kinase-Aktivität in Hefen wie *S. cerevisiae* und *S. pombe* zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Schwesterchromatiden (Biggins *et al.*, 1999; Levenson *et al.*, 2002). Interessanterweise aber wurde die verstärkte Ausbildung von Mittelsepten, die 40% Aurora-Knockdown-Zellen zeigten, ebenfalls in Aurora-Mutanten von *S. pombe* beobachtet: bei Expression einer dominant-negativen, kinase-inaktiven Aurora-Mutante bildeten auch hier etwa 40% der Zellen ein Mittelseptum bei normaler Segregation der Chromosomen aus (Levenson *et al.*, 2002). Während also die *S. pombe* Aurora Kinase sowohl an Chromosomensegregation als auch an der Zellteilung beteiligt ist, scheint *UmAurora* lediglich eine Rolle bei der Cytokinese zu spielen.

### 2.5.5 Phänotyp von Inhibitor-behandelten Zellen

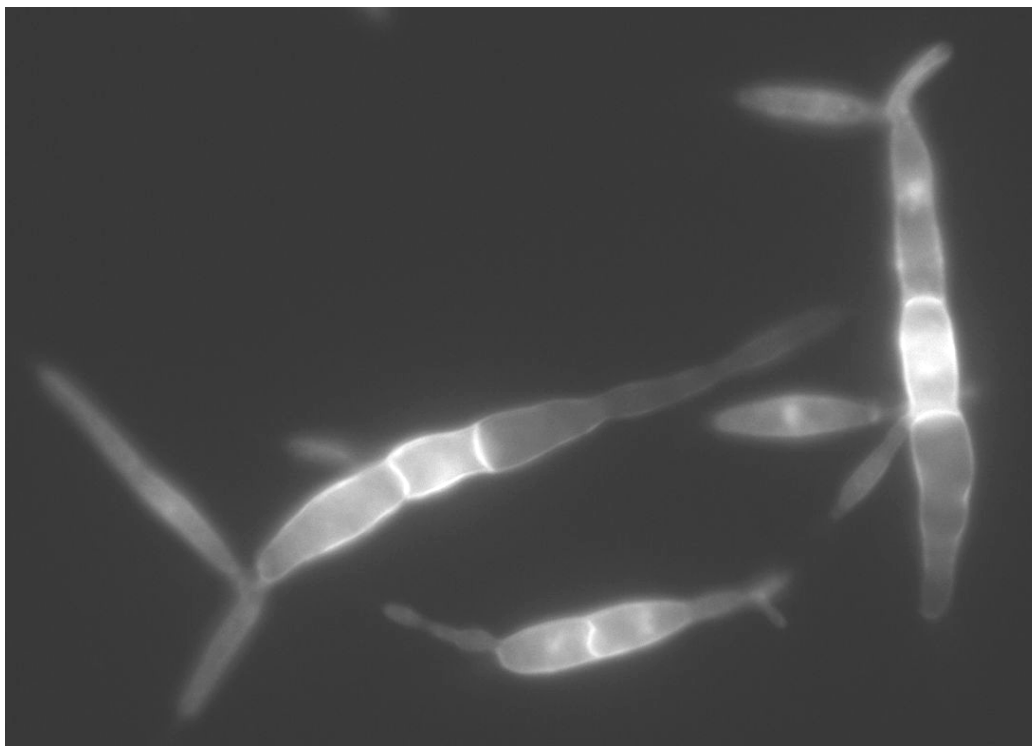
Zur Untersuchung der Auswirkungen der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren auf den Phänotyp von *U. maydis* wurden Wildtyp-Zellen wie im vorigen Abschnitt beschrieben angezogen, gewaschen und resuspendiert. Den Kulturen wurde 50 µM der Verbindung **1** bzw. **2** zugesetzt und sie wurden ebenfalls 4 h bei 28°C geschüttelt und anschließend mikroskopisch mit Hilfe von Calcofluor- und DAPI-Färbung untersucht. Auch hier waren verstärkte Bildung eines (oder mehrerer) Mittelseptums (bzw. -septen) sowie bipolares Wachstum zu beobachten. Zusätzlich kam es bei einigen Zellen zu einer multiplen Knospung (Abbildung 2.37 auf Seite 65).

Während die Ausbildung eines Mittelseptums sowie bipolares Wachstum sowohl in Inhibitor-behandelten als auch in *UmAurora*-reprimierten Zellen sichtbar waren, wurde multiple Knospung nur in ersteren beobachtet (Tabelle 2.4 auf Seite 66). Diese Gemeinsamkeiten sind ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei *UmAurora* um ein Zielprotein dieser Verbindungen handelt. Die Ausbildung multipler Knospen, die ausschließlich bei Inhibitor-behandelten Zellen beobachtet wurde, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass außer *UmAurora* noch eine Reihe weiterer Proteine gehemmt werden, von denen bisher nur Kpp2 und *UmGSK3* bekannt sind. Auf Grund des Selektivitätsprofils der Verbindungen **1** und **2** (Abschnitt 2.1.1.2 auf Seite 22) kann man davon ausgehen, dass noch eine Reihe weiterer Kinasen inhibiert wird, welche in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden konnten.



**Abbildung 2.36: Phänotyp der konditionalen *UmAurora*-Mutante.** Die konditionale *UmAurora*-Knockdown-Mutante wurde zunächst in Arabinose-haltigem Medium angezogen, geerntet und in Glukose-haltigem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden 4 h bei 28°C inkubiert, bevor sie mit Calcofluor und DAPI gefärbt und mikroskopisch untersucht wurden. Es wurde eine vermehrte Ausbildung von Mittelsepten sowie Ausknospung auf jeder Seite (bipolares Wachstum) der noch durch das Septum verbundenen Zellen beobachtet. Die DAPI-Färbung zeigte einen Zellkern auf jeder Seite des Septums, so dass offensichtlich kein Defekt in der Chromosomentrennung vorlag.

Interessanterweise rief auch Verbindung **2**, die bei Konzentrationen bis zu 50 mg/l (ca. 170  $\mu$ M) keine deutliche Wachstumshemmung zeigt (vgl. Abschnitt 2.1.1.1 auf Seite 21), die gleichen Anomalien wie **1** hervor (Tabelle 2.4 auf Seite 66). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der  $ED_{50}$  von Verbindung **1** bei 21,8 mg/l und die maximale Inhibitor-Konzentration im Test bei 50 mg/l liegen. Falls also **2** das Wachstum nur geringfügig schwächer inhibiert, wäre es in diesem Test nicht detektierbar. Um diesen Befund der Mikroskopie zu erklären, müsste eine  $ED_{50}$ -Bestimmung für Verbindung **2** mit höherer Inhibitorkonzentration durchgeführt werden.



**Abbildung 2.37: Phänotyp von Inhibitor-behandelten *U. maydis* Zellen.** Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der *U. maydis* Wildtyp analog zur *UmAurora*-Mutante angezogen, geerntet und resuspendiert. Zusätzlich wurden 50  $\mu$ M der Verbindungen **1** bzw. **2** sowie 0,5% DMSO als Lösemittelkontrolle zugefügt. Während die DMSO-Kontrolle kaum Anomalien aufwies, wurden sowohl bei **1** als auch bei **2** deutlich ausgeprägte Wachstumsdefekte sichtbar: ebenso wie bei der *UmAurora*-Knockdown-Mutante kam es zu häufiger Ausbildung eines Mittelseptums und zu bipolarem Wachstum. Außerdem wurde multiple Knospung an einem Ende der Zellen beobachtet. Es wurden keine Unterschiede zwischen mit **1** bzw. **2** behandelten Zellen beobachtet.

## 2.6 Vergleichende Inhibitionsstudien

Ein zusätzliches Indiz, ob es sich bei *UmAurora* um ein relevantes Zielprotein der N-substituierten Diaminopyrimidine handelt, ist eine gute Korrelation zwischen der Wachstumshemmung von *U. maydis in vivo* und der *UmAurora*-Hemmung *in vitro*. Zum Vergleich von humaner Aurora zu *UmAurora*-Inhibition wurde der  $IC_{50}$  verschiedener Diaminopyrimidine an *UmAurora* sowie an humaner Aurora A und B bestimmt.

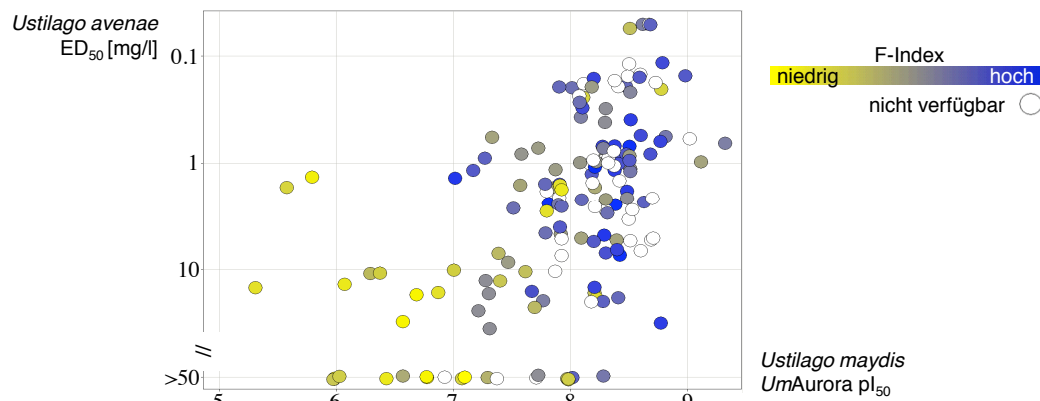
n	WT+LM	WT+LM+	WT+LM+	P <sub>crg1</sub> :
	100	50 µM 1 90	50 µM 2 100	UmAurora Mutante 100
unauffällig	94%	50%	52%	60%
Mittelseptum	3%	18%	20%	40%
bipolares Wachstum	3%	32%	22%	23%
multiple Knospung	2%	36%	26%	3%

**Tabelle 2.4: Quantifizierung der beobachteten Anomalien.** Zur Quantifizierung der beobachteten Anomalien wurden jeweils 100 Zellen (bei Verbindung 1: 90 Zellen) auf die entsprechenden Merkmale untersucht. Zum besseren Vergleich wurden auch die Merkmale der konditionalen *UmAurora*-Knockdown-Mutante in die Analyse aufgenommen. LM: Lösemittel, 0,5% DMSO; n: Anzahl gezählter Zellen.

### 2.6.1 Korrelation zwischen Wachstumshemmung und *UmAurora*-Inhibition

Für die Erzeugung von *in vivo* Inhibitionsdaten im Hochdurchsatzverfahren wird *Ustilago avenae*, ein enger Verwandter von *U. maydis* eingesetzt. Daher gibt es leider (außer für Verbindungen 1–4) keine Daten zur Wachstumshemmung von *U. maydis*. Da aber beide Pilze zur selben Gattung gehören, wird eine hinreichende Ähnlichkeit vorausgesetzt, um die Inhibitionsdaten miteinander zu vergleichen. Verfügbare *in vivo* Inhibitionswerte für *U. avenae* wurden mit der *in vitro* Inhibition von *U. maydis* *UmAurora* verglichen. Ebenso wurde der sogenannte F-Index in die Analyse aufgenommen. Hierbei handelt es sich um ein Integral, welches sich aus der Hemmung verschiedenster Pilze (sowohl Basidiomyceten als auch Ascomyceten) in Plattentests und auf Pflanzen zusammensetzt (H. Rieck, Th. Pötter, M.E. Beck, Bayer CropScience AG Monheim, unpubliziert).

Die graphische Auswertung (Abbildung 2.38) zeigt bis auf wenige Ausnahmen eine deutliche Korrelation zwischen der Inhibition von *UmAurora* und der Wachstumshemmung von *U. avenae*. Ebenso korreliert die *UmAurora*-Hemmung gut mit der Wirkung gegen Pilze im Allgemeinen (F-Index). Die Verbindungen, die *UmAurora* schwach, aber *U. avenae* recht stark inhibieren, werden als "Ausreißer" betrachtet, da auch ihr F-Index und damit ihre Wirkung gegen andere Pilze sehr niedrig ist. Die Mehrzahl der Verbindungen, die *UmAurora* gut hemmen, aber keine Wirkung an *U. avenae* zeigen, hat einen niedrigen F-Index, was ein Hinweis darauf sein kann, dass diese Substanzen schlecht zellgängig sind, durch Metabolisierung in der Zelle (beispielsweise Oxidation) unwirksam werden oder schnell über Transportprozesse ausgeschieden werden. Insgesamt zeigt der Trend aber, dass potente Inhibitoren der *UmAurora* in der Regel auch das pilzliche Wachstum gut hemmen. Auch dies ist ein Indiz dafür, dass *UmAurora* ein wichtiges Zielprotein ist



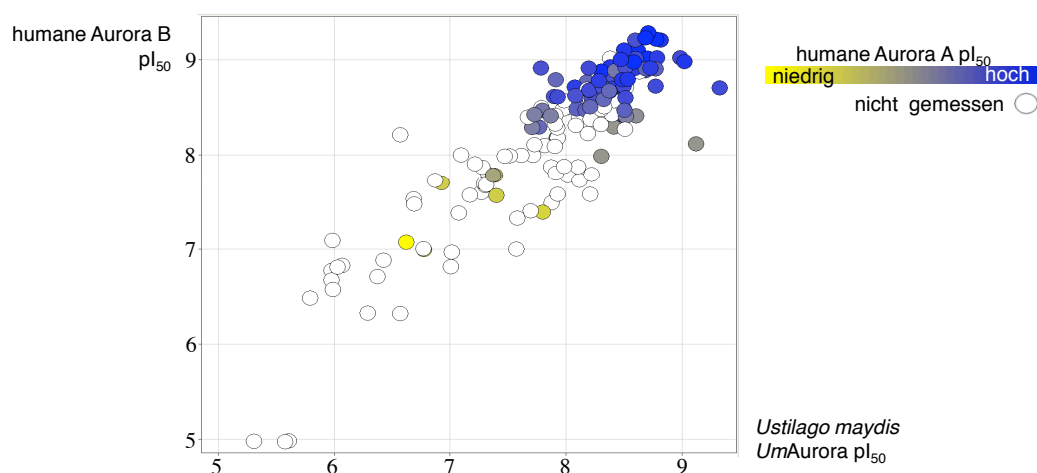
**Abbildung 2.38: Vergleichende Analyse von *in vitro* und *in vivo* Daten.** Die *in vitro* Wirkung verschiedener Diaminopyrimidine (als Kreise dargestellt) an *UmAurora* wurde mit der *in vivo* Wirkung an dem engen Verwandten *U. avenae* sowie mit der *in vivo* Wirkung an verschiedenen Pilzen (F-Index) verglichen. Trotz einiger Ausreißer ist eine recht gute Korrelation zu erkennen, was sowohl darauf hinweist, dass es sich bei *UmAurora* tatsächlich um ein Zielprotein der Diaminopyrimidine handelt als auch den Schluss zulässt, dass ebenfalls die Aurora Kinasen aus anderen Pilzen Ziele dieser Verbindungsklasse sind.  $pI_{50} = -\log(IC_{50})$ .

bzw. wahrscheinlich sogar das Zielprotein, dessen Hemmung für den Wachstumsdefekt verantwortlich ist.

### 2.6.2 Korrelation zwischen Inhibition von *UmAurora* und humanen Aurora Kinasen

Auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit gerade in der ATP-Bindungstasche zwischen humanen Aurora-Kinasen und *UmAurora* wurde eine gute Korrelation der  $IC_{50}$ -Werte erwartet. Um diese Korrelation der  $IC_{50}$ -Werte an humanen Aurora-Kinasen und *UmAurora* zu demonstrieren und möglicherweise Verbindungen zu identifizieren, die Selektivität zu Gunsten von *UmAurora* zeigen, wurden die  $IC_{50}$ -Werte einer Reihe verschiedener N-substituierter Diaminopyrimidine an humaner Aurora A und B sowie *UmAurora* bestimmt.

Mit Hilfe der graphischen Auswertung (Abbildung 2.39) lässt sich die starke Korrelation zwischen *UmAurora*- und humaner Aurora-Hemmung deutlich erkennen. Dies ist insofern problematisch, als dass ein zukünftiges Fungizid deutlich reduzierte Toxizität gegenüber Menschen und im besten Fall auch gegenüber anderen Organismen im Vergleich zu Pilzen aufweisen muss. Normalerweise können toxische Effekte erst in den biochemischen Studien nachfolgenden Experimenten bestimmt werden. Hier aber besteht die Gelegenheit, durch Messung der  $IC_{50}$ -Werte der hu-



**Abbildung 2.39: Vergleich der Inhibitionswerte der *UmAurora* mit humanen Aurora Kinasen.** Auf Grund einer hohen Sequenzhomologie zwischen der Kinasedomäne der *UmAurora* und der humanen Aurora Kinasen wurde vermutet, dass es eine gute Korrelation der Inhibitionsdaten geben sollte. Dies wurde durch Bestimmung der Inhibitionswerte einiger Diaminopyrimidine an *UmAurora* und den humanen Aurora Kinasen A und B bestätigt. Dennoch wurden Verbindungen identifiziert, die eine leichte Präferenz zu Gunsten der *UmAurora* aufwiesen.  $pI_{50} = -\log(IC_{50})$ .

manen Aurora mögliche Toxizität bereits durch biochemische Tests vorherzusagen und sich auf solche Verbindungen zu konzentrieren, die Selektivität zugunsten der *Ustilago* Aurora zeigen. Die Mehrzahl der bisher getesteten Verbindungen zeigte keine Selektivität zu Gunsten der *UmAurora*; allerdings wurden zwei Substanzen gefunden, die *UmAurora* deutlich stärker hemmen als die humanen Aurora Kinasen. Da die Messungen bisher nur einmal durchgeführt wurden, müsste dieser Versuch wiederholt werden. Wenn sich jedoch der Befund bestätigt, könnte eine Analyse dieser Verbindungen mit Hilfe von Kinase-Inhibitor-Modellen zur Identifikation von wichtigen Strukturelementen führen, die den Inhibitoren eine Präferenz zu Gunsten der *UmAurora* – oder sogar zu Gunsten pilzlicher Kinasen im Allgemeinen – verleihen können.

Auf Grund einer zu geringen Ausbeute an *UmAurora* konnten keine Versuche zur Kristallisation dieser Kinase durchgeführt werden; stattdessen wurde die Struktur der humanen Aurora A im Komplex mit Verbindung **1** von Jeffrey Simard und Christian Grütter (Chemical Genomics Centre, Dortmund) gelöst. Diese Studie bestätigt den vorhergesagten Bindungsmodus und liefert wertvolle Informationen für ein strukturbasiertes Design zukünftiger Inhibitoren.



In dieser Arbeit wurden vier Proteinkinasen als potenzielle Zielproteine der fungizid gut wirksamen Stoffklasse der N-substituierten Diaminopyrimidine in dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis* identifiziert. Da gezeigt werden konnte, dass Diaminopyrimidine eine Reihe verschiedenster humaner Kinasen hemmen, ist es plausibel anzunehmen, dass durch weitere Affinitätschromatographie-Experimente zusätzliche Zielproteine gefunden werden könnten. Da die endständige Amino-Gruppe der *para*-gelinkerten Verbindung 2 mit einigen Proteinkinasen zu interagieren scheint, würden analoge Experimente mit Verbindungen, die einen Linker in *meta*-Position tragen, möglicherweise das Spektrum an potenziellen Zielproteinen erweitern. Ebenso wäre eine quantifizierende massenspektrometrische Analyse der Proben hilfreich: so könnte leichter zwischen spezifisch und unspezifisch bindenden Proteinen unterschieden werden und eventuell zusätzliche Zielproteine aufgefunden werden. Dies würde auch zeigen, ob es sich bei den gefundenen Proteinen, die keine Kinasen sind, um unspezifische oder spezifische Binder handelt.

Da es sich bei *UmAurora* um ein bedeutendes Zielprotein der hier untersuchten Diaminopyrimidin-Derivate handelt, ist eine nähere Untersuchung lohnenswert. Um diese Kinase endgültig als Zielprotein niedermolekularer Verbindungen zu validieren, wäre ein chemo-genetischer Ansatz und Verwendung einer sensitivierten Kinasemutante die eleganteste Lösung. Die neu gewonnenen Erkenntnisse über *UmAurora* bieten die Chance einer rationalen Weiterentwicklung fungizider Substanzen. Da neue Fungizide eine möglichst geringe Toxizität insbesondere gegenüber Menschen aufweisen sollten, ist es notwendig, Pilz-spezifische Verbindungen zu entwickeln. Um Ansatzpunkte für die Entwicklung solcher selektiver Inhibitoren zu finden, wäre ein strukturbasierter Vergleich von humaner Aurora und *UmAurora* hilfreich. So identifizierte Unterschiede in der ATP-Bindungstasche sollten beim rationalen Design neuer Verbindungen berücksichtigt werden, um einen Pilz-spezifischen Inhibitor zu entwickeln. Idealerweise sollte eine Röntgen-

Kristallstruktur von *UmAurora* im Komplex mit einem der Diaminopyrimidin-Inhibitoren Aufschluss darüber geben, wie Selektivität und Wirkung verbessert werden können. Eine Konzentration auf strukturelle Unterschiede in Kombination mit vergleichenden *in vitro* Inhibitionsstudien an humaner und *Ustilago Aurora* bietet die Chance, einen Pilz-spezifischen Kinaseinhibitor zu finden, der einmal als Fungizid auf den Markt gebracht werden kann.

## Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

##### 4.1.1.1 Geräte für Proteinexpression, -reinigung und andere biologische Versuche

Autoklav Vakulab HP	Münchener Medizin Mechanik GmbH (Planegg, GER)
Avanti J-20 XP mit Rotor JA-20	Beckman Coulter (Krefeld, GER)
Brutschrank	Heraeus (Hanau, GER)
Elektrophoresesystem XCELL Sure-Lock®	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
FPLC-System Äkta	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Geldokumentationssystem Alpha-Imager	Biozym (Hessisch Oldendorf, GER)
Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex-C50	Avestin (Ottawa, ON, CAN)
Inkubationsschüttler Multitron	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
J-6B Zentrifuge mit Rotor JS-4.2	Beckman Coulter (Krefeld, GER)
Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
Optima L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld, GER)
PCR-Maschine DNA Engine PTC-200	MJ Research (Watertown, MA, USA)
Photometer Eppendorf Biophotometer	Eppendorf (Hamburg, GER)
Pipetten Pipetman Einkanalpipette (0,2–2,0 µl, 1,0–10 µl, 2–20 µl, 20–100 µl, 50–200 µl, 200–1000 µl)	Gilson (Middleton, WI, USA)

Sonifizierer Sonifier 250	Branson (Danbury, CT, USA)
Sterilbank	Beck & Thies GmbH (Langenfeld, GER)
Stromgeber EPS 200	Pharmacia Biotech, jetzt GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, GER)
Tischzentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, GER)
Tischzentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, GER)

#### 4.1.1.2 Geräte für Enzym-Assays

FLA-3000 Scanner & Phosphorbildplatten	Fujifilm (Minato, Tokio, Japan)
Matrix Impact2 elektronische Mehrkanalpipette (2-125 µl, 1,0-30 µl, 0,5-12,5 µl)	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
Tecan Safire2™	Tecan (Crailsheim, GER)
Tecan Ultra	Tecan (Crailsheim, GER)

#### 4.1.1.3 Geräte für chemische Experimente

HPLC HP 1090	Hewlett-Packard (Böblingen, GER)
--------------	----------------------------------

Alle weiteren Geräte entsprachen dem üblichen Laborstandard.

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Alufolie (klebend) Thermowell™	Corning (New York NY, USA)
Blotting Papier 3MM	Whatman (Maidstone, Kent, UK)
Foto-Chemikalien (Entwickler und Fixierer)	AGFA (Düsseldorf, GER)
GF/P30-Filtermatte	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Hybond ECL Nitrocellulose Membran	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Küvetten, Plastik	Sarstedt (Nümbrecht, GER)
Küvetten, UV	Eppendorf (Hamburg, GER)
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche (Indianapolis, IN, USA)
Matrix Pipettenspitzen (12,5 µl, 30 µl, 125 µl)	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)

Matrix Reagenz Reservoirs	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
Mikrotiterplatten 384 well (100 µl)	Greiner Bio-One (Solingen, GER)
Mikrotiterplatten 384 well (20 µl)	Greiner Bio-One (Solingen, GER)
Mikrotiterplatten 96 deep well	Greiner Bio-One (Solingen, GER)
Nylonmembran, positiv geladen	Roche (Indianapolis, IN, USA)
Pipettenspitzen (0,1-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl)	Brand (Wertheim, GER)
Sterilfilter Minisart (0,45 µm und 0,22 µm)	Sartorius (Göttingen, GER)
Steri-Top Filtereinheit	Millipore (Billerica, MA, USA)
Zellophanfolie DryEase® Mini Cellophane	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Zentrifugenfiltereinheit Amicon Ultra MWCO 10000 und 30000	Millipore (Billerica, MA, USA)

### 4.1.3 Kits

DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Roche (Indianapolis, IN, USA)
DryEase® Mini-Gel Drying Systems	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo® Cloning Kit	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Plasmidpräparation Wizard Plus SV Miniprep Kit	Promega (Madison, WI, USA)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden, GER)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, GER)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, GER)
Z'-LYTE Kinase Assay Kit Ser/Thr 9 Peptide	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
IMAP® Kinase Assay Kit mit TAMRA-Kemptide und FAM-PKAtide	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)

### 4.1.4 Chemikalien

Agar	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, GER)
BactoPepton	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Calcofluor White	Megazyme (Bray, Irland)
Casaminosäuren	US Biological (Swampscott, MA, USA)
Hygromycin	HyClone (Logan, UT, USA)
LB Medium Kapseln	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)

Magermilchpulver	US Biological (Swampscott, MA, USA)
Novozym 234	Calbiochem (La Jolla, CA, USA)
Potato Dextrose Broth	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth (Karlsruhe, GER)

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Merck, Roche und Sigma-Aldrich bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit Millipore-H<sub>2</sub>O hergestellt.

#### 4.1.5 Medien zur Anzucht und Lagerung von *U. maydis*

##### **YEPS<sub>I</sub>-Medium modifiziert nach Tsukuda *et al.* (1988)**

10 g Hefeextrakt  
10 g Pepton  
10 g Saccharose  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

##### **PD-Medium**

24 g Potato Dextrose Broth  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

##### **CM Vollmedium** (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)

1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
2,5 g Casaminosäuren  
0,5 g DNA  
1 g Hefeextrakt  
10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)  
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren: 20 ml 50% (w/v) Glucose- oder 33 ml 30% (w/v) Arabinose-  
Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

##### **Salz-Lösung** (Holliday, 1974)

16 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
4 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
8 g KCl  
4 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O  
1,32 g CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

8 ml Spurenelement-Lösung (s. unten)  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**Spurenelement-Lösung** (Holliday, 1974)

60 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
140 mg MnCl<sub>2</sub> × 4 H<sub>2</sub>O  
400 mg ZnCl<sub>2</sub>  
40 mg NaMoO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O  
100 mg FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O  
40 mg CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**Vitamin-Lösung** (Holliday, 1974)

100 mg Thiamin  
50 mg Riboflavin  
50 mg Pyridoxin  
200 mg Kalziumpantothenat  
500 mg p-Aminobenzoessäure  
200 mg Nikotinsäure  
200 mg Cholinchlorid  
1000 mg myo-Inositol  
Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**Regenerationsagar** (Schulz *et al.*, 1990)

a) Top-Agar:

1,5 % (w/v) Agar  
1 M Sorbitol  
in YEPS<sub>L</sub>-Medium

b) Bottom-Agar:

wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum.

**NSY-Glycerin** (Einfriermedium)

8 g Nutrient Broth  
1 g Hefeextrakt  
5 g Saccharose  
800 ml 87 % Glycerin  
mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

Für Festmedien wurde Agar in einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Me-

dienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml).

#### 4.1.6 Fertiglösungen -puffer und -medien

20X SSC	Invitrogen
Blue Juice 10X Gelladepuffer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Gel-Dry <sup>TM</sup> Drying Solution	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Mops-Puffer, 20X	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE <sup>®</sup> LDS Sample Buffer, 4X	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE <sup>®</sup> Transfer Buffer, 20X	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
SimplyBlue <sup>™</sup> SafeStain	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
TAE-Puffer, 50X	MWG Biotech (Ebersberg, GER)
TE-Puffer pH 8,0	Qiagen (Hilden, GER)
Western Blotting Luminol Reagenz	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
S.O.C. Medium	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

#### 4.1.7 Elektrophorese-Größenstandards

##### DNA

1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled	Roche (Indianapolis, IN, USA)

##### Protein

SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Mark12 Unstained Standard	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PageRuler Plus	Fermentas (St. Leon Rot, GER)

#### 4.1.8 Säulen und Säulenmaterial

NHS-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Affinitätssäule MBP Trap HP	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Gelfiltrationssäule; HiLoad 1 6/60, Superdex 200	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)

#### 4.1.9 Enzyme

Aurora A, human	Millipore (Billerica, MA, USA)
Aurora B, human	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
UmAurora, <i>Ustilago maydis</i>	diese Arbeit



Gateway® LR Clonase® Enzymmix	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
UmGSK3, <i>Ustilago maydis</i>	Bestand (CGC – AG Rauh)
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen (Hilden, GER)
Kpp2, <i>Ustilago maydis</i>	diese Arbeit
Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
<i>Pfu</i> -Turbo DNA Polymerase	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Restriktinsendonukleasen	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Roche (Indianapolis, IN, USA), SibEnzyme (Academtown, Russland)
T4-DNA-Ligase	Roche (Indianapolis, IN, USA)
TEV-Protease	Bestand (CGC – AG Rauh)
Trypsin	Roche (Indianapolis, IN, USA)

#### 4.1.10 Antikörper

anti-HA, polyklonal, aus Kaninchen	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
anti-PSTAIRe, polyklonal, aus Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
anti-Kaninchen, aus Ziege	Santa Cruz Biotechnology
Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugat	(Santa Cruz, CA, USA)

#### 4.1.11 Plasmide

##### 4.1.11.1 *E. coli* Plasmide

###### Ausgangsplasmide

pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo (Klonierungsvektor, Invitrogen)	Resistenz Kan <sup>R</sup>
pDESTMC2 (erlaubt die Expression eines Fusionsproteins mit N-terminalem MBP-Anhang und TEV-Schnittstelle, hervorgegangen aus pMAL-c2X (NEB) und Gateway®-kompatibel gemacht; P. Schreier, persönliche Mitteilung)	Amp <sup>R</sup>

###### In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_Kpp2	Kan <sup>R</sup>
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_ATG1	Kan <sup>R</sup>
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_INCENP <sup>1424–1575</sup>	Kan <sup>R</sup>
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_GSK3_T131C	Kan <sup>R</sup>
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_GSK3_L125G	Kan <sup>R</sup>
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_GSK3_L125T	Kan <sup>R</sup>

pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_GSK3_L125V	Kan <sup>R</sup>
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_GSK3_L125G_T131C	Kan <sup>R</sup>
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_GSK3_L125T_T131C	Kan <sup>R</sup>
pENTR <sup>TM</sup> /TEV/D-Topo_GSK3_L125V_T131C	Kan <sup>R</sup>
pDESTMC2_Kpp2	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_ATG1	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_INCENP <sup>1424–1575</sup>	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_UmAurora	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_GSK3_T131C	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_GSK3_L125G	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_GSK3_L125T	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_GSK3_L125V	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_GSK3_L125G_T131C	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_GSK3_L125T_T131C	Amp <sup>R</sup>
pDESTMC2_GSK3_L125V_T131C	Amp <sup>R</sup>

#### 4.1.11.2 Plasmide zum Arbeiten mit *U. maydis*

##### Ausgangsplasmide

pBS-hhn	(Kämper, 2004) enthält eine 1,9 kb Hygromycin-Resistenzkassette als <i>Sfi</i> I-Fragment
pRU11	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001) enthält das <i>GFP</i> -Gen unter der Kontrolle des 3,5 kb-Fragmentes des <i>crg1</i> -Promotors und des <i>nos</i> -Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette
pRU11_gsk3	(J. Pérez-Martín, CNB Madrid, persönliche Mitteilung) enthält das <i>gsk3</i> -Gen unter der Kontrolle eines 3,5 kb-Fragments des <i>crg1</i> -Promotors und des <i>nos</i> -Terminators sowie eine Carboxin-Resistenzkassette)
pHA-Hyg	(R. Kahmann, MPI Marburg, persönliche Mitteilung) enthält einen 3xHA-Anhang und eine Hygromycin-Resistenzkassette)

**In dieser Arbeit hergestellte Plasmide**

pHA-Hyg_UmAurora	Dieses Plasmid wurde hergestellt, um <i>UmAurora</i> zusammen mit dem 3xHA-Anhang klonieren zu können. Hierzu wurde <i>UmAurora</i> per PCR mit den Oligonukleotiden Eco_Nde_IPL1fo und AbsI_IPL1rev aus DNA amplifiziert. Diese Oligonukleotide sind so gewählt, dass das PCR-Produkt 5' eine EcoRI und eine NdeI-Schnittstelle trägt sowie 3' eine AbsI-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde über EcoRI und AbsI in pHA-Hyg kloniert.
pRU11_UmAurora_3xHA	Dieses Plasmid dient der homologen Rekombination von <i>P<sub>crgI</sub>:UmAurora-3xHA</i> in den <i>ip</i> -Locus von <i>U. maydis</i> und ermöglicht damit die Expression von <i>UmAurora-3xHA</i> unter der Kontrolle des <i>crgI</i> Promotors. pRU11 <i>UmAurora-3xHA</i> ist ein pRU11-Derivat, in dem das <i>GFP</i> -Gen durch <i>UmAurora-3xHA</i> ersetzt wurde. <i>UmAurora-3xHA</i> wurde über NdeI und MauBI aus pHA-Hyg-UmAurora ausgeschnitten und in pRU11 kloniert.
pRU11_gsk3_T131C	Dieses Plasmid trägt die genomische <i>gsk3</i> mit der Punktmutation T131C und dient als Templat der PCR zur Herstellung des Transformationskonstrukts <i>gsk3LB-HY</i> . Die Mutation wurde mit Hilfe des „Site-directed Mutagenesis Kits“ (Stratagene) über die Oligonukleotide T131Cfor und T131Crev eingeführt.

**4.1.12 Konstrukte zur Transformation in *U. maydis*****4.1.12.1 *UmAurora*-Deletionskonstrukte**

Ein 1291 bp Fragment der linken Flanke wurde aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden IPL1\_LBfor und IPL1\_LBrev amplifiziert. IPL1\_LBrev trägt am 3' Ende eine *Sfi*I-Schnittstelle.

Außerdem wurde ein 1187 bp Fragment der rechten Flanke aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden IPL1\_RBfor und IPL1\_RBrev amplifiziert. IPL1\_RBfor trägt am 5' Ende eine *Sfi*I-Schnittstelle.

Durch einen Restriktionsverdau mit *Sfi*I wurde die Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn ausgeschnitten und üN mit den beiden PCR-Produkten ligiert.

**Ipl1-LB-HY**

Linke Flanke mit den ersten 2/3 der Hygromycin-Resistenzkassette. Ipl1-LB-HY (2248 bp) wurde aus der vorangegangenen Ligation mit den Oligonukleotiden IPL1\_LBnested und NLC38 amplifiziert.

**Ipl1-YG-RB**

Rechte Flanke mit den letzten 2/3 der Hygromycin-Resistenzkassette. Ipl1-YG-RB

(2217 bp) wurde aus der vorangegangenen Ligation mit den Oligonukleotiden NLC37 und IPL1\_RBnested amplifiziert.

#### 4.1.12.2 GSK3-Mutationskonstrukte

Ein 2191 bp Fragment der *gsk3*, das die T131C-Punktmutation trägt, wurde mit den Oligonukleotiden Gsk3LB1neu und Gsk3LB2neu amplifiziert. Gsk3LB2neu trägt am 3' Ende eine *Sfi*I-Schnittstelle.

Außerdem wurde ein 954 bp Fragment der rechten Flanke aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden Gsk3RB1neu und Gsk3RB2neu amplifiziert. Gsk3RB1neu trägt am 5' Ende eine *Sfi*I-Schnittstelle.

Durch einen Restriktionsverdau mit *Sfi*I wurde die Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn ausgeschnitten und üN mit den beiden PCR-Produkten ligiert.

##### Gsk3-LB-HY

Linke Flanke mit den ersten 2/3 der Hygromycin-Resistenzkassette. Gsk3-LB-HY (3229 bp) wurde aus der vorangegangenen Ligation mit den Oligonukleotiden Gsk3LB1neu und NLC38 amplifiziert.

##### Gsk3-YG-RB

Rechte Flanke mit den letzten 2/3 der Hygromycin-Resistenzkassette. Gsk3-YG-RB (2279 bp) wurde aus der vorangegangenen Ligation mit den Oligonukleotiden NLC37 und Gsk3RB2neu amplifiziert.

Das erfolgreiche Einbringen der Mutation wurde durch Sequenzierung eines PCR-Produkts auf genomischer DNA überprüft.

#### 4.1.13 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert, die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5' - in Richtung 3'-Ende angegeben.

Oligonukleotide zur Sequenzierung von in pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-Topo<sup>®</sup> klonierten PCR-Produkten:

##### **M13-FP**

TGT AAA ACG ACG GCC AGT

##### **M13-RP**

CAG GAA ACA GCTA TGA CC

Oligonukleotide zur Klonierung von ATG1:

##### **UmAPG1for**

CAC CAT GTC CAA AAG CTC GAC AGG TC

##### **UmAPG1rev**

CTA GGG AGA CTC GGT TCG GC

Oligonukleotide zur Klonierung von Kpp2:

**UmKpp2for**

CAC CAT GTC ACA TGC CCA CGG A

**UmKpp2rev**

TCA ACG CAT GAT CTC GTT ATA AAT CA

Oligonukleotide zur Klonierung, Deletion und Analyse von *UmAurora*:**AbsI\_IPL1rev**

GCT GCC TCG AGG GAC TGA ATT TTG CCA CGA GAC G

**Eco\_Nde\_IPL1fo**

CAC CGG GCC CCA TAT GGA GTC GCA GCT CGC CAA CT

**EcoRI\_IPL1rev**

ATC GAA TTC TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT

**IPL1intern**

ACG CCC AAT GCC CAC AGG TCT ACT

**IPL1\_KO-3'ctrl**

TGA CGA GGA TGC GAC AGG ACG AA

**IPL1\_LBfor**

GCT TTG CGG GGG CGA TTA CAT

**IPL1\_LBnested**

ACC GTT CTG TTT TCC AAG TTT

**IPL1\_LBrev**

CAC GGC CTG AGT GGC CGA CGG TTA TAC GTG TGA GGC A

**IPL1\_RBfor**

GTG GGC CAT CTA GGC CTC CTT GTT ACT CGC ACC CTT CTC T

**IPL1\_RBnested**

AAG GCC AAT GAA GAC CAA GCA GTT

**IPL1\_RBrev**

GCT TTG TAC CCG CCG CTT CC

**NdeI\_IPL1for**

CCC CAT ATG GAG TCG CAG C

**NLC37**

GGA TGC CTC CGC TCG AAG TA

**NLC38**

CGT TGC AAG ACC TGC CTG AA

**pRU1IFP**

TGT CGG CAT CGG TCA ACT TTT

Oligonukleotide zur Klonierung von *UmINCENP*<sup>1424–1575</sup>:**caccINCENPfo**

CAC CTA CTC GGA CTC GGA AGA CGA AGA GA

**UmINCENPprevmS**

CTA AGC ATT TGT ACG AGC GTC G

Oligonukleotide zur Klonierung, Deletion, Mutagenese und Analyse von *UmGsk3*:

**Gsk3LB1neu**

CAT CGT TCC GCT GCT GCC CAA TC

**Gsk3LB2neu**

CAC GGC CTG AGT GGC CAC CCA GAT AGC GTT TTC GGC TTC ACC

**Gsk3RB1neu**

GTG GGC CAT CTA GGC CTA GGG ATG TTT GAC GAG GAG TTG G

**Gsk3RB2neu**

CTG CTT GCT CTG ACC CGC TCT C

**hhn5-II**

GCG ACG CAA TCG TCC GAT CCG G

**UmGsk3\_5'ctrl**

TTA CCG GCC AAT CTC GCA TCA TCC

**UmGsk3\_5'UPSTR**

GAG CAG CAA AAC ACG CAT AAG GTC

**T131Cfor** (Mutationsstelle unterstrichen)

GAA TAC GTG CCA GAG TGC GTC TAC CGC GCC TCG C

**T131Crev** (Mutationsstelle unterstrichen)

GCG AGG CGC GGT AGA CGC ACT CTG GCA CGT ATT C

#### 4.1.14 Sonden zum Nachweis der DNA

UmAurora	1425 bp PCR-Produkt aus pDESTMC2_UmAurora verwendete Oligonukleotide: NdeI_IPL1for und AbsI_IPL1rev
rechte Flanke von Um-Aurora	1187 bp PCR-Produkt aus genomischer <i>U. maydis</i> DNA; verwendete Oligonukleotide: IPL1_RBfor und IPL1_RBrev
Hyg <sup>R</sup>	466 bp PCR-Produkt aus pBS-hhn; verwendete Oligonukleotide: NLC37 und NLC38
Gsk3	2882 bp PCR-Produkt aus genomischer DNA des Stammes 521 gsk3_T131C; verwendete Oligonukleotide: UmGsk3_5'UPSTR und hhn5-II (bindet in Hyg <sup>R</sup> )

Alle PCR-Produkte wurden nach den Herstellerangaben des „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“ (Roche) mit DIG markiert und zur Detektion verwendet.

### 4.1.15 Software / Server

RSCB PDB (Protein Data Bank)	by Rutgers & UCSD <a href="http://www.rcsb.org">www.rcsb.org</a>
BioWorks 3.1 Software	Thermo Scientific, USA
Expasy (Expert Protein Analysis System)	<a href="http://www.expasy.ch">www.expasy.ch</a> by SIB (swiss institute for bioinformatics)
MIPS <i>Ustilago maydis</i> Datenbank	<a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago">http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago</a>
NCBI (Pubmed)	National Center for Biotechnology (Information, Bethesda MD, USA)
XL fit	IDBS (Guildford Surrey, UK)

## 4.2 Stämme

### 4.2.1 Bakterienstämme

OneShot® TOP10, chemisch kompetente <i>E. coli</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
OneShot® BL21(DE3)pLysE, chemisch kompetente <i>E. coli</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

### 4.2.2 *U. maydis* -Stämme

#### Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
518	<i>a2 b2</i>	-	Kronstad und Leong (1989)
521	<i>a1 b1</i>	-	Kronstad und Leong (1989)

#### In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz
521 gsk3_T131C	<i>a1 b1 gsk3T131C</i>	Hyg <sup>R</sup>
521 PcrG1:UmAurora-3xHA	<i>a1 b1 ipr[PcrG1:UmAurora-3xHA]ips</i>	Cbx <sup>R</sup>
521 ΔUmAurora PcrG1:UmAurora3xHA	<i>a1 b1 ΔUmAurora ipr[PcrG1:UmAurora3xHA]ips</i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>

## 4.3 Chemische Methoden

### 4.3.1 Immobilisierung von Inhibitoren

NHS-aktivierte Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) wurde nach Angaben des Herstellers mit 1 mM kalter HCl gewaschen. Anschließend wurde etwa 1 ml Matrix

mit 500  $\mu\text{l}$  [15 mg/ml] Inhibitor in DMSO vermischt und etwa 4 h bei RT getaumelt. Anschließend wurde der Ansatz  $\mu\text{N}$  bei 4°C inkubiert, um eine möglichst hohe Kopplungsrate zu erzielen. Nach der Kopplung wurde die Matrix dreimal mit 1 ml DMSO gewaschen und danach 6 h bei RT in 0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3 blockiert. Danach wurden die Kügelchen nach folgendem Schema gewaschen:  
3x 1 ml 0,1 M Tris-Cl, 0,5 M NaCl, pH 8,0  
3x 1 ml 0,1 M Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0  
Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die fertige Matrix wurde in 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

### 4.3.2 Nachweis der Immobilisierung

Der Nachweis der Kopplungsreaktion erfolgte über die Messung des Gehalts an verbleibendem freiem Inhibitor mittels HPLC. Nach verschiedenen Zeitpunkten während der Kopplung wurden 3  $\mu\text{l}$  des Überstands entnommen und 1:30 in DMSO verdünnt, wovon jeweils 10  $\mu\text{l}$  für die HPLC-Analyse verwendet wurden. Die Trennung erfolgte auf dem Gerät HP 1090 (Hewlett-Packard) mit einer Nucleosil 120-5 C<sub>18</sub> Säule (Macherey-Nagel) nach folgendem Protokoll:

Dauer des Laufes: 25 min; Start: 10 % ACN für 1 min, Gradient in 12 min auf 40 % ACN, in 2 min auf 100 % ACN; Flussrate: 1 ml/min. Es wurden die Lösungsmittelgemische ACN + 0,1 % TFA sowie H<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA verwendet.

Aus der HPLC-Messung konnten Rückschlüsse auf die verbleibende Menge an freiem Inhibitor und somit indirekt auch auf die Menge an immobilisiertem Inhibitor gezogen werden.

## 4.4 Mikrobiologische und genetische Methoden

### 4.4.1 *E. coli*

#### 4.4.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von LB Festmedien angeimpft. Je nach enthaltenem Plasmid wurden als Selektionsmarker Kanamycin [50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ], Ampicillin [100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] und/oder Chloramphenicol [34  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] zugesetzt. Glycerinkulturen wurden durch Zugabe von 15% f.c. Glycerin zur Flüssigkultur erzeugt und bei -80°C gelagert.



#### 4.4.1.2 Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Biophotometer (Eppendorf) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 1,0 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### 4.4.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit etwa 100 ng DNA pro 50 µl Zellen vermischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 sec bei 42°C im Wasserbad, gefolgt von einer 2-minütigen Inkubation auf Eis. Es wurden 250 µl S.O.C. Medium zu den Zellen gegeben und diese 1 h bei 37°C und 200 Upm inkubiert, bevor sie auf Antibiotikahaltigem LB-Festmedium ausplattiert und bei 37°C inkubiert wurden.

### 4.4.2 *Ustilago maydis*

#### 4.4.2.1 Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Glycerinkulturen wurden durch Zugabe von 50% NSY-Glycerinmedium zur Flüssigkultur angelegt und bei -80°C gelagert. Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

#### 4.4.2.2 Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Biophotometer (Eppendorf) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 1,0 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

#### 4.4.2.3 ED<sub>50</sub>-Bestimmung bei *U. maydis*

Der ED<sub>50</sub> Wert ist die Konzentration einer Verbindung, bei der das Wachstum von *U. maydis* in Flüssigkultur zu 50% gehemmt wird. Verbindungen für ED<sub>50</sub>-Bestimmungen wurden in Methanol + 4 g/l PS16 (ein Alkylarylpolyglykoether

der Bayer AG) zu 666,67facher Endkonzentration gelöst. 15 µl jeder Verbindung in sieben Konzentrationen wurden in eine 96-well Platte überführt und bei RT getrocknet, bis die Flüssigkeit vollständig verdampft war. Flüssigkulturen von *U. maydis* in Potato Dextrose Medium wurden auf eine  $OD_{600} \sim 0,1$  eingestellt und 200 µl dieser Suspension in jede Kavität der Platte gefüllt. Die Kulturen wurden 3 Tage bei 20°C, 600 Upm und 80% Luftfeuchte inkubiert. Anschließend wurde die OD bei 600 nm bestimmt und gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen. Als positive Kontrolle wurde Euparen (Bayer) verwendet, als negative Kontrolle Methanol + PS 16 ohne Inhibitor. Aus der gemessenen  $OD_{600}$  wurde der  $ED_{50}$ -Wert von Labor Benting (Bayer CropScience AG, Monheim) bestimmt.

#### 4.4.2.4 Repression des *crg1*-Promotors

Übernachtskulturen wurden unter induzierenden Bedingungen in CM-Flüssigmedium + 1% Arabinose angezogen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Eppendorf Zentrifuge 5810 R), mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in CM + 1% Glukose bzw. 1% Arabinose (Kontrolle) zu einer  $OD_{600}$  von 0,04 (für Wachstumstest) oder 0,2 (für Western Blot Analyse) resuspendiert. Die Proben wurden gedrittelt und weiter bei 28°C, 200 Upm geschüttelt. Währenddessen wurde das Wachstum über Messung der optischen Dichte verfolgt sowie Proben für die Western Blot Analyse entnommen. Außerdem wurden von jeder Probe 2x 5µl auf Arabinose- bzw. Glukose-haltiges CM-Festmedium aufgetropft und bei 28°C inkubiert. Das Wachstum wurde nach 2 und 3 Tagen photographisch dokumentiert.

#### 4.4.2.5 Protoplastierung und Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde 50 ml frischem YEPS<sub>L</sub>-Flüssigkultur angesetzt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis maximal  $OD_{600} = 1,0$ ) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.500Upm, 10 min, 4°C, Eppendorf Zentrifuge 5810 R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 5 mg/ml Novozym 234 resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (etwa 15-20 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10 minütige Zentrifugation pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang zweimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3 - 4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit ca. 3-5 µg (maximal aber 10 µl) linearisierter Plasmid-DNA oder PCR-Produkt und 1 µl [15 mg/ml] Heparin-Lösung für etwa 40 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 20 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 7 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien auf Antibiotikum-haltigen Platten vereinzelt. Potentielle Transformanden wurden mittels Kolonie-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert.

#### SCS

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
sterilfiltriert

#### STC

10 mM Tris-Cl, pH 7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol  
sterilfiltriert

#### STC/PEG

10 g PEG4000 in 15 ml STC

#### 4.4.2.6 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 40-, 63- und 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit numerischer Apertur 1,4 verwendet. Für die DAPI (Calcofluor-Färbung)-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- bzw. Emissionsspektrum eingesetzt: 365 nm und >397 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCDKamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden als TIFF-Dateien abgespeichert und mit Adobe Photoshop (Version 7.0) bearbeitet (Bildausschnitt, Kontrast, Helligkeit).

#### 4.4.2.7 Immobilisierung der Zellen für Mikroskopieaufnahmen

Etwa 50 µl einer 2% wässrigen Lösung von Low-Melting-Agarose (37°C; Sigma) wurden auf einen Objektträger gegeben und mit einem zweiten Objektträger bedeckt. Nach wenigen Minuten wurde der obere Objektträger entfernt, *U. maydis* Zellen

aus Flüssigkultur auf die festgewordene Agarose getropft und mit einem Deckglas bedeckt.

#### 4.4.2.8 Zellwand-Färbung

Zum Anfärben der Zellwand wurde Calcofluor White (Megazyme) verwendet, welches neu gebildetes Zellwandmaterial färbt (Mitchison und Nurse, 1985). Es wurde in Konzentrationen von 2 µg/ml zugegeben. Die Zellen wurden anschließend einmal in Wasser gewaschen und im Lichtmikroskop mit DAPI-Filtersatz betrachtet.

#### 4.4.2.9 Zellkern-Färbung

Zum Anfärben der Zellkerne wurden die Zellen 5 min mit 0,5 µg/ml DAPI in PBS inkubiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen.

#### PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

## 4.5 Molekularbiologische Methoden

Standardtechniken, wie z.B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

### 4.5.1 Handhabung von DNA

#### 4.5.1.1 Fällung

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierfür wurden zur Probe 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und das 2,5-fache Volumen an kaltem Ethanol zugegeben, gemischt und für 1 h bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (13000 Upm, 4°C, Eppendorf Zentrifuge 5417 R) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet getrocknet und in einem kleinen Volumen Wasser oder TE-Puffer gelöst.

#### 4.5.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen DNA-Lösungen durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) entfernt. Die Probe wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (13000 Upm, 4°C, Eppendorf Zentrifuge 5417 R) und Überführung der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß. Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert.

#### 4.5.1.3 Reinigung von PCR-Produkten und verdauten Fragmenten

Bestand das PCR-Produkt aus einer singulären Bande, wurde es mittels des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Unsaubere PCR-Produkte und verdaute Fragmente wurden über ein Agarose-Gel aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt.

### 4.5.2 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 4.5.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte – je nach benötigter Menge DNA - mittels des Wizard Plus SV Miniprep Kits (Promega) oder des Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Plasmid-DNA wurde mit H<sub>2</sub>O eluiert und bei -20°C gelagert.

#### 4.5.2.2 DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Dabei wurden 2 ml einer Übernachtskultur in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium zusammen mit etwa 100 µl Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (10000 Upm, RT, Eppendorf Zentrifuge 5417 R), der Überstand abgegossen und das Pellet in 200 µl Lysispuffer und 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) aufgenommen. Die Proben wurden für 4 min auf höchster Stufe gevortext. Nach Phasentrennung (13000 Upm, 5 min, RT, Zentrifuge 5417 R) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und erneut mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, 10 sec gevortext und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl Ethanol vermischt und zentrifugiert (13000 Upm, 2 min, RT, Zentrifuge 5417 R). Das resultierende Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 20 µl TE gelöst (30 min, 50°C).

**Ustilago-Lysispuffer**

50 mM Tris-Cl, pH 7,5

50 mM EDTA

1 % (w/v) SDS

**4.5.3 Nachweis von DNA****4.5.3.1 Transfer von DNA (Southern Blot)**

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (20X SSC) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende positiv geladene Nylonmembran (Roche).

Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 10 min in 0,2 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 30 min in Denaturierungspuffer und danach für weitere 30 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht.

**Denaturierungspuffer**

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

**Neutralisierungspuffer**

1 M Tris-HCl

1,5 M NaCl

pH 7,4

**4.5.3.2 Spezifischer Nachweis immobilisierter DNA**

Der Nachweis der DNA erfolgte mittels des „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kits II“ (Roche) nach Angaben des Herstellers.

**4.5.4 Klonierung mit Hilfe des Gateway®-Systems**

Zu exprimierende Gene wurden mittels des Gateway®-Systems (Invitrogen) zunächst in pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-Topo® kloniert. Von dort aus können sie durch ho-

mologe Rekombination in eine Vielzahl unterschiedlicher Expressionsvektoren kloniert werden.

#### 4.5.4.1 Klonierung in pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-Topo<sup>®</sup>

In *E. coli* zu exprimierende Gene wurden zunächst aus genomischer DNA amplifiziert und nach Herstellerangaben in pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-Topo<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert. Die korrekte Klonierung der PCR-Produkte wurde durch Restriktionsverdau und anschließende Sequenzierung mit den Oligonukleotiden M13-FP und M13-RP nachgewiesen.

#### 4.5.4.2 Klonierung in den Expressionsvektor pDESTMC2

Korrekt sequenzierte Gene in pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-Topo wurden mittels homologer Rekombination in pDESTMC2 kloniert. Dies geschah mit Hilfe des Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>®</sup> Enzym-Mixes (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

### 4.5.5 Sequenzanalyse von DNA

#### 4.5.5.1 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Korrekte Klonierung von PCR-Produkten in pENTR<sup>TM</sup>/TEV/D-Topo<sup>®</sup> wurde mit den Oligonukleotiden M13-FP und M13-RP nachgewiesen.

#### 4.5.5.2 Sequenzanalyse

**DNAS<sup>®</sup> Lasergene Seqbuilder:** Zum Editieren und Annotieren von DNA Sequenzen sowie zur Erstellung von Sequenzkarten und virtuellem Klonieren.

**DNAS<sup>®</sup> Lasergene EditSeq:** Zur Translation von DNA-Sequenzen, zur Berechnung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punkte von Proteinen.

**DNAS<sup>®</sup> Lasergene PrimerSelect:** Zur Auswahl von Oligonukleotiden für PCR-Reaktionen und zur Berechnung der Anlagerungstemperatur.

**DNAS<sup>®</sup> Lasergene SeqMan:** Zur Analyse von Sequenzierungs-Daten und zum Abgleich mit DNA-Sequenzen.

**BLAST2:** Zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken (Altschul *et al.*, 1990, 1997).

**ClustalW:** Zum Vergleich und aneinander Anpassen (Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen (Thompson *et al.*, 1994).

## 4.5.6 PCR

### 4.5.6.1 Standard-PCR

Für Standard-PCR-Ansätze wurde das HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) verwendet. Der Master Mix ist 2x konzentriert und enthält 0,1 U/ $\mu$ l HotStarTaq DNA Polymerase, 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 400  $\mu$ M jedes dNTPs. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10–50 ng Templat-DNA und 0,2  $\mu$ M jedes Oligonukleotids; die Ansätze wurden in einem Volumen von 25  $\mu$ l nach folgendem Schema durchgeführt:

1. 95°C – 15 min
2. 94°C – 30 sec
3. X°C – 30 sec
4. 72°C – 1 min/kb Länge des PCR-Produkts.
5. 72°C – 10 min

Schritt 2–5  $\times$  30–35.

Hierbei ist X die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide, welche sich aus Länge und GC-Gehalt ergibt.

### 4.5.6.2 Gateway®-kompatible PCR

Bei der Klonierung mit Hilfe des Gateway®-Systems dürfen keine DNA Polymerasen benutzt werden, die überhängende Nukleotide an das PCR-Produkt anfügen. Daher wurde hierfür die *Pfu*-Turbo DNA Polymerase (Stratagene) verwendet. Außerdem muss das 5' Oligonukleotid die Sequenz CACC am 5'-Ende tragen, um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen.

Bei Verwendung der *Pfu*-Turbo DNA Polymerase wurden 1,25 U Polymerase pro Ansatz (50  $\mu$ l) verwendet. Die Oligonukleotide lagen in einer finalen Konzentration von 0,2  $\mu$ M und die dNTPs in einer finalen Konzentration von 250  $\mu$ M vor. Das Protokoll entsprach dem Ansatz der Standard-PCR bis auf eine kürzere initiale Denaturierung (4 min statt 15 min).



#### 4.5.6.3 Kolonie-PCR auf *U. maydis* Zellen

In dieser Methode werden Zellen der Transformanden zum Platzen gebracht und so genomische DNA freigesetzt, die nun als Matrize für die PCR dient: Eine *U. maydis*-Kolonie wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl QuickExtract Plant DNA Extraction Solution (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI, USA) vermischt. Der Ansatz wurde 6 min auf 65°C und anschließend 2 min auf 98°C erhitzt. 3 µl dieser Lösung wurden als Templat in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Im Fall von *gsk3* wurden die PCR-Analysen so durchgeführt, dass die Oligonukleotide (UmGsk3\_5'ctrl und hhn5-II) im *gsk3*-Lokus 5' der Mutation sowie in der *Hyg<sup>R</sup>*-Kassette binden. Zusätzlich konnte durch einen Restriktionsverdau des PCR Produkts die Mutation von Thr131 zu Cys nachgewiesen werden. Anschließend wurden die Kandidaten durch Southern-Analyse bestätigt.

Der Stamm 521 P<sub>*crg1*</sub>:UmAurora-3xHA wurde mit Oligonukleotiden überprüft, die im *crg1*-Promotor und in UmAurora binden (pRU11FP und IPL1intern). Die Deletion von UmAurora wurde mit Oligonukleotiden, die außerhalb des UmAurora-Lokus binden, überprüft (IPL1\_LBfor und IPL1\_KO-3'ctrl). Hierbei entstehen unterschiedlich große Banden in Wildtyp bzw. Mutante. Anschließend wurden die Kandidaten durch Southern-Analyse bestätigt.

#### 4.5.6.4 Gerichtete PCR-Mutagenese

Die gerichtete PCR-Mutagenese wurde nach den Herstellerangaben des Kits „Site-directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) durchgeführt. Hierzu wurden zwei Oligonukleotide benötigt, die die gleiche Sequenz aufweisen, aber in entgegengesetzter Richtung weisen. In der Mitte dieser Oligonukleotide liegt die gewünschte Mutation. Als Templat wird ein Plasmid eingesetzt (hier: pRU11\_ *gsk3*), welches die genomische Sequenz des zu mutierenden Gens enthält. Zum Einbringen der T131C-Mutation in *gsk3* wurden die Oligonukleotide T131Cfor und T131Crev verwendet.

## 4.6 Biochemische Methoden

### 4.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Proteinbestimmung beruht auf der Absorptionsänderung des Farbstoffes Coomassie-Blau bei Anlagerung an Arginin und hydrophobe Aminosäurereste (Bradford, 1976).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Protein Assay Dye Reagent Konzentrat (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) verwendet. Um eine gebrauchsfertige Lösung zu erhalten, wurden 200 µl dieser Lösung mit 795 µl H<sub>2</sub>O vermischt. Anschließend wurden 5 µl der Proteinprobe zugegeben, in einer Küvette vermischt

und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Vor der Messung von Proteinproben wurde eine Eichreihe mit verschiedenen Konzentrationen an BSA erstellt. Anhand dieser Eichreihe wurde die Konzentration der gemessenen Proteinlösung berechnet.

#### 4.6.2 Fällung von Proteinen (Wessel und Flügge, 1984)

Es wurden 4 Probenvolumen Methanol zugegeben, gevortext und 10 sec bei 9000 x g zentrifugiert. 1 Probenvolumen Chloroform wurde zugegeben, gevortext und 10 sec bei 9000 x g zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 3 Probenvolumen H<sub>2</sub>O, gutes Vortexen, und eine 1- minütige Zentrifugation bei 9000 x g. Die obere Phase (Proteine befanden sich in der Interphase) wurde abgenommen und verworfen. Es wurden drei Probenvolumen (bezüglich des Ausgangsvolumens) Methanol zugeben, gut gemischt und 2 min bei 9000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet luftgetrocknet.

#### 4.6.3 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Zunächst wurden die Proteine mit  $\frac{1}{4}$  Vol 4X NuPAGE<sup>®</sup> LDS Sample Buffer (Invitrogen) und 10 mM DTT versetzt und anschließend 10 min auf 70°C erhitzt. Proteinproben wurden standardmäßig über 4-12% Bis-Tris-Gradientengele (Invitrogen) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1X MOPS, hergestellt aus einem 20X MOPS-Puffer (Invitrogen), verwendet. Der Gellauf wurde 1 h bei 200 V in einer XCELL SureLock<sup>®</sup>-Kammer (Invitrogen) durchgeführt.

#### 4.6.4 Färbung von Proteingelen

##### 4.6.4.1 Färbung mit SimplyBlue™ SafeStain

Die Gele wurden nach Herstellerangaben mit SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) gefärbt und mit H<sub>2</sub>O entfärbt. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe des DryEase<sup>®</sup> Mini-Gel Drying Systems (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers zwischen zwei Cellophan-Folien getrocknet.

##### 4.6.4.2 Färbung mit Coomassie

Zur Detektion wurden die Proteine zunächst für 45 min in einem Coomassie-Färbegrad gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend in einem Entfärbegrad entfernt. Dazu wurde das Gel in Entfärbelösung eingelegt und in einer Mikrowelle kurz erhitzt. Anschließend wurde das Entfärbegrad konstant geschwenkt und die Entfärbelösung in circa einstündigen Abständen mehrfach ausgetauscht.

**Färbelösung**

0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R-250  
40 % (v/v) Ethanol  
10 % (v/v) Essigsäure

**Entfärbelösung**

10 % (v/v) Ethanol  
5 % (v/v) Essigsäure

**4.6.4.3 Silberfärbung**

Eine sensitivere Alternative zur Färbung mit Coomassie ist die Silberfärbung. Hierzu wurde das Gel zunächst 3x 15 min in Fixierlösung inkubiert, 4x 2 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und 2 min in 1,5% Glycerin imprägniert. Anschließend wurde das Gel in 50 ml Färbelösung (35% Lösung A, 65% Lösung B) geschüttelt, bis die gewünschte Bandenintensität erreicht war. Die Färbung wurde durch Inkubation in Stopplösung beendet. Das Gel wurde wie in Kapitel 4.6.4.1. beschrieben getrocknet.

**Fixierlösung**

45% Methanol  
10% Essigsäure  
Lösung A  
5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**Lösung B**

2 g/l Ammoniumnitrat  
2 g/l Silbernitrat  
10 g/l Wolframatokieselsäure  
0,5% Formaldehyd

**Stopplösung**

50 mM EDTA pH 8,0

**4.6.5 Transfer von Proteinen (Western Blot)**

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (XCell II™ Blot Module CE Mark, Invitrogen) auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, GE Healthcare) transferiert. Dazu wurden zunächst fünf Schwammkissen (Invitrogen), zwei Stücke Whatman-Papier und die Membran in 1X Western Transfer Puffer, hergestellt aus 20X NuPAGE® Transfer Buffer (Invitrogen), getränkt.

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Schwammkissen; ein Whatman-Papier, das Gel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, zwei Schwammkissen.

Das Blot-Modul wurde in die Elektrophoresekammer XCELL SureLock® eingespannt und die Proteine durch Anlegen der Spannung (1 h, 20 V) auf die Membran transferiert.

## 4.6.6 Nachweis von immobilisierten Proteinen

### 4.6.6.1 Chromogene Detektion

Der chromogene Nachweis (von CDK1 und CDK5) wurde mittels des WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Rabbit (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als erster Antikörper wurde anti-PSTAIRE (polyklonal, aus Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt; als zweiter Antikörper das Ziege-anti-Kaninchen-IgG des Kits, welche das Enzym alkalische Phosphatase trägt. Dieses Enzym setzt das farblose chromogene Substrat (BCIP/NBT) innerhalb weniger Minuten zu einer gefärbten Bande um.

### 4.6.6.2 Chemilumineszente Detektion

Zum Nachweis von *UmAurora* wurde die chemilumineszente Detektion verwendet. Hierzu wurde die Membran nach dem Blot 2x 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und 30-60 min bei RT in TBST + 5% Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wurde sie 1:1000 mit dem ersten Antikörper (anti-HA, Sigma), 1:1000 verdünnt in TBST, bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x 5 min in TBST gewaschen, bevor der zweite Antikörper (HRP-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen), 1:1000 verdünnt in TBST, zugegeben und 45 min bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran 3x 5 min in TBST und 1x 5 min in TBS gewaschen. Zur Detektion wurde frisch angesetztes Luminol Reagenz (Santa Cruz Biotechnology) zugegeben, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Film zur chemilumineszenten Detektion (Roche) belichtet und dieser zur Entwicklung 1 min in Entwickler und 1 min in Fixierer geschwenkt.

**TBS(T)**

10 mM Tris-Cl, pH 7,4  
150 mM NaCl  
(0,05% Tween-20)

**Luminol Reagenz**

1 Vol Lösung A  
1 Vol Lösung B

**4.6.7 Reinigung potenzieller Zielproteine mittels immobilisierter Inhibitoren**

Ein Pellet aus 20 g Zellpellet (Nassgewicht) von *Ustilago maydis* 518 (fermentiert bei Bayer Technology Services, geerntet bei  $OD_{600} = 30$ ) wurde in 50 ml HEPES-Lysepuffer 1 + 0,2 mM DTT + Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette + PhosStop Phosphatase Inhibitor Tablette (beide von Roche) resuspendiert und durch mehrere Durchgänge im Hochdruck-Homogenisator EmulsiFlex C50 abgeschlossen. Anschließend wurde 1 h bei 30000 rpm, 4°C, zentrifugiert (Optima L-90K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter). Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt mit Bradford bestimmt. Das komplette Lysat wurde mit 4 M NaCl auf eine Endkonzentration von 1,15 M NaCl eingestellt.

25 µl Inhibitormatrix wurde mit 3x 500 µl HEPES-Lysepuffer 1 inkl. 1 M NaCl äquilibriert.

60 mg Lysat wurden zu 25 µl Matrix gegeben und ~ 2 h im Kühlraum rotiert. Anschließend wurde der Überstand (=Durchfluss) abgenommen und die Matrix 2x 5 min mit HEPES-Lysepuffer 1 inkl. 1 M NaCl und 1x 5 min mit HEPES-Lysepuffer 2 gewaschen. Danach wurden 100 µl Elutionspuffer (HEPES-Lysepuffer 2 + 0,5 mM freier Inhibitor + 2,5% DMSO + 10 mM ATP + 20 mM  $MgCl_2$ ) zugegeben, ~ 2 h im Kühlraum rotiert und der Überstand (=Eluat) abgenommen.

**HEPES Lysepuffer 1**

50 mM HEPES pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,5 % Triton X-100  
10 % Glycerin  
1 mM EDTA  
10 mM  $Na_4P_2O_7$

**Hepes-Lysepuffer 2**

20 mM Hepes pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,25 % Triton X-100  
1 mM EDTA  
1 mM EGTA

**4.6.8 Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse**

Die Proteinproben wurden gefällt (Wessel und Flügge, 1984) und in 20 µl 1x LDS Sample Buffer (Invitrogen) + 10 mM DTT gelöst, 10 min auf 70°C erhitzt und auf ein SDS-Gel (4-12% Bis-Tris, Invitrogen) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte ca. 15 min bei 200 V. Anschließend wurde das Gel mit SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) gefärbt. Die angefärbte Spur wurde in 3 etwa gleich große Stücke unterteilt und die Stücke mit einem Skalpell zerkleinert.

Die zerkleinerten Banden wurden 30 min in 200 µl Waschlösung 1 bei 37°C, 1000 Upm, geschüttelt. Anschließend wurden die Gelstücke 15 min in 200 µl Waschlösung 2 bei 37°C geschüttelt. Die Waschlösung wurde entfernt und die Gelstücke in 100 µl Reduktionslösung 45 min bei 37°C geschüttelt. Danach wurde die Reduktionslösung entfernt und die Stücke wurden in 100 µl Alkylierungslösung 60 min bei RT im Dunkeln geschüttelt.

Anschließend wurde 2x mit 200 µl Waschlösung 2 für 15 min gewaschen, bevor das Gel durch Zugabe von 10 µl Acetonitril 10 min dehydriert wurde. Das Acetonitril wurde entfernt und die Gelstücke wurden 10 min im Abzug getrocknet. Danach wurden 10-15 µl Verdaulösung zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Stücke mit Verdaulösung ohne Trypsin vollständig bedeckt und der Ansatz über Nacht bei 30°C geschüttelt. Nach dem Verdau wurden die Ansätze 30 min auf Eis im Ultraschallbad inkubiert, der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Zu jedem Ansatz wurden 30 µl Acetonitril pipettiert, 10 min inkubiert und der Überstand mit dem ersten (aus dem Ultraschallbad) vereinigt. Die so isolierten Peptide wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zur MS-Analyse kalt gelagert.

**Waschlösung 1**

25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O/Acetonitril 3:1

**Waschlösung 2**

25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}$ /Acetonitril 1:1

**Reduktionslösung**

50 mM DTT in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

**Alkylierungslösung**

55 mM Iodacetamid in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

**Verdauungslösung**

0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Trypsin in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

**4.6.9 Massenspektrometrische Analyse von Peptiden**

Peptide wurden am MPI Dortmund von Petra Janning und Andreas Brockmeyer mittels nano-HPLC/MS/MS analysiert und identifiziert. Zur Trennung wurde eine Ultimate 3000 nano-HPLC (Dionex) verwendet. Für die Durchführung der MS- und MS/MS-Experimente wurde ein Orbitrap Massenspektrometer mit einer LTQ XL linearen Ionenfalle (Thermo Electron Corporation) verwendet. Zur Proteinidentifikation wurden die Daten mittels der NCBI Inr Datenbank (Version 20090127) analysiert.

**4.6.10 Überexpression und Reinigung von MBP-Fusionsproteinen aus *E. coli***

Die Expression der MBP-Fusionsproteine erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysE, der mit den entsprechenden pDESTMC2-Derivaten transformiert worden war. Aus einer Vorkultur wurde 1 l LB-Flüssigmedium (+ 0,2% Glukose, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin, 34  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chloramphenicol) angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von etwa 0,4 bei 37°C kultiviert. Danach wurde die Kultur bei 16°C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von etwa 0,7 weiter geschüttelt, worauf die Expression mit 0,4 mM IPTG induziert wurde. Die Expression erfolgte  $\bar{u}$ N (ca. 20 h) bei 16°C. Die Zellen wurden geerntet (4000 Upm, 4°C, J-6B Zentrifuge mit Rotor JS-4.2) und aufgearbeitet oder bei -80°C gelagert.

Zur Aufarbeitung wurden die Zellen in 10 ml/l Expressionskultur Puffer A + 87,5 U/ml DNase I, 95  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Lysozym, 21 mM  $\text{MgCl}_2$  und Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) resuspendiert und durch Sonifikation aufgeschlossen. Das Lysat wurde 30 min bei 13000 Upm, 4°C, abzentrifugiert (Avanti J-20 XP mit Rotor JA-20) und der Überstand durch einen 0,45  $\mu\text{M}$ -Filter filtriert.

Der so geklärte Überstand wurde mit 1 ml/min auf eine MBP Trap HP Affinitätssäule geladen. Anschließend wurde die Säule mit Puffer A gewaschen, bis kein

Protein mehr durch UV-Messung detektiert werden konnte. Gebundenes Protein wurde in 0,75 ml Fraktionen mit Puffer B eluiert. Protein enthaltende Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit einer Amicon Ultra Zentrifugenfiltereinheit (MWCO 30000) auf etwa 2 ml aufkonzentriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 200, GE Healthcare) geladen und die Proteine mit Puffer A + 5% Glyzerin (*UmAurora*) bzw. Puffer C (Kpp2) in 2 ml Fraktionen eluiert, um sie so weiter aufzureinigen. Elutionsfraktionen, die im Elutionsprofil ein singuläres Proteinsignal für monomeres Fusionsprotein ergaben, wurden vereinigt, auf etwa 1-2 ml aufkonzentriert, mit 20% Glyzerin (finale Konzentration) versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

**Puffer A**

20 mM Tris-Cl pH 7,5  
200 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1 mM DTT

**Puffer B**

Puffer A + 10 mM Maltose

**Puffer C**

50 mM Tris-Cl, pH 7,5  
200 mM NaCl  
10% Glyzerin  
2 mM DTT

**4.6.11 TEV-Verdau von MBP-Fusionsproteinen**

MBP-Fusionsproteine wurden durch Zugabe von etwa 1 µg TEV-Protease auf 10 µg Fusionsprotein und Inkubation üN bei 4°C verdaut.

**4.6.12 Kinaseaktivitätstests****4.6.12.1 Radioaktiver Assay****Kpp2**

Dieser Assay wurde zur Bestimmung der IC<sub>50</sub> Werte an Kpp2 verwendet und beruht auf der Übertragung der γ-Phosphatgruppe von ATP auf ein Substrat. Wird ATP verwendet, dessen γ-Phosphatgruppe radioaktiv markiert ist, geht diese Markierung auf das Substrat über. Nach Entfernung des radioaktiv markierten ATPs



lassen sich die radioaktiven Signale des Substrats bestimmen. Als Substrat wurde basisches Myelinprotein verwendet, da bereits gezeigt wurde, dass Kpp2 dieses phosphorylieren kann (Müller *et al.*, 2003).

Zur Durchführung des Assays wurden zunächst in einer 384-well-(20 µL)-Platte zusammengegeben:

5 µl 5× Assaypuffer  
5 µl 5% DMSO bzw. Inhibitor in 5% DMSO  
5 µl 100 ng/µl MBP-Kpp2 in Verdünnungspuffer  
10 µl ATP/Substrat-Mischung

**5× Assaypuffer**

100 mM Hepes pH 7,5  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM EGTA  
1 mM DTT  
250 µM β-Glycerophosphat

**Verdünnungspuffer**

20 mM Hepes pH 7,5  
20 mM MgCl<sub>2</sub>

**ATP/Substrat-Mischung**

250 µg/ml basisches Myelinprotein  
200 µM ATP  
0,05 µCi/µl [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP  
0,01% Tween-20

Dieser Ansatz wurde etwa 1 h bei RT inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 3% Phosphorsäure abgestoppt wurde. 10 µl des Ansatzes wurden auf eine GF/P30-Filtermatte (PerkinElmer) transferiert und die Filtermatte 3x 5 min mit 0,75% Phosphorsäure gewaschen, um unverbrauchtes ATP zu entfernen. Anschließend wurde die Filtermatte kurz in Methanol gewaschen und bei RT getrocknet.

Zur Detektion der radioaktiven Signale wurde eine Phosphorbildplatte aufgelegt und etwa 90 min bei RT inkubiert, wobei die radioaktiven Signale auf diese Platte übertragen wurden. Anschließend wurde die Platte zur Detektion der radioaktiven Signale mit dem FLA-3000 Scanner (FujiFilm) gescannt. Die Signale wurden mit Hilfe des Programms AIDA Image Analyzer quantifiziert. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Programm XL-fit.

Jeder Datenpunkt wurde in Doppelbestimmung ermittelt; als negative Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym.

### *Kinetik*

Um die optimale Reaktionszeit und Enzymkonzentration zu bestimmen, wurde eine Kinetik mit verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt.

*ATP- $K_M$ -Wert-Bestimmung* Der ATP- $K_M$ -Wert gibt die ATP-Konzentration an, bei der die Reaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit verläuft. Ist die ATP-Konzentration zu hoch, werden ATP-kompetitive Inhibitoren verdrängt und es ist keine akkurate  $IC_{50}$ -Bestimmung möglich. Daher sollte eine  $IC_{50}$ -Bestimmung in der Nähe des ATP- $K_M$ -Wertes durchgeführt werden.

Hierzu wurde eine Reihe von ATP-Konzentrationen bei gleichbleibender Enzymkonzentration getestet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms XL-Fit durch Auftragen der ATP-Konzentration gegen die Signalstärke und das Anlegen einer Michaelis-Menten-Kurve.

### *Substrat- $K_M$ -Wert-Bestimmung*

Die Bestimmung des Substrat- $K_M$ -Werts ist nicht so entscheidend wie die ATP- $K_M$ -Wert-Bestimmung. Sie wurde dennoch durchgeführt, um ein möglichst gutes Signal/Rauschen-Verhältnis zu erreichen. Hierzu wurde die Substrat-Konzentration variiert. Die Auswertung erfolgte analog zur ATP- $K_M$ -Wert-Bestimmung.

### *$IC_{50}$ -Bestimmung*

Zur Bestimmung der Inhibitorkonzentration, bei der die Enzymreaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft, wurden die Inhibitoren in 7 Konzentrationen von 0,4–50  $\mu\text{M}$  (finale Konzentration) in den Assay eingesetzt. Als positive Kontrolle diente ein Ansatz ohne Inhibitor, als negative Kontrolle ein Ansatz ohne Enzym. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms XL-Fit durch Auftragen der Inhibitor-Konzentration gegen die Signalstärke und das Anlegen einer Dosis-Wirkungs-Kurve.

### **UmAurora**

Zum Nachweis der Aktivität des MBP-UmAurora/MBP-UmINCENP<sup>1424–1575</sup>-Komplexes wurde ebenfalls ein radioaktiver Assay verwendet. Zur Durchführung des Assays wurden zunächst in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengegeben:

12,5  $\mu\text{l}$  2 $\times$ Mastermix

12,5  $\mu\text{l}$  Enzymlösung

Bei der Zugabe des Enzyms wurde darauf geachtet, dass in jedem Ansatz die gleiche Mengen von Kinase bzw. Aktivator vorlag. Enzymlösungen wurden in 1X Kinasepuffer + 1 mM DTT verdünnt.

**2X Mastermix**

100 ng/μl basisches Myelinprotein  
100 μM ATP  
0,08 μCi/μl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP  
1 mM DTT  
in 1X Kinasepuffer

**10X Kinasepuffer**

500 mM Hepes pH 7,5  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM EGTA  
0,1% Brij-35

**10X Kinasepuffer ohne MgCl<sub>2</sub>**

500 mM Tris-Cl, pH 8.5  
10 mM EGTA  
0.1% Brij-35

Die Ansätze wurden etwa 45 min bei RT inkubiert, anschließend 25 μl mit SDS-Probenpuffer vermischt und 5 min auf 95°C erhitzt. Je 20 μl Probe wurde auf ein 4-12% Bis-Tris-Gel (Invitrogen) aufgetragen und 35 min bei 200 V in 1X MES-Puffer aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt und etwa 50 min gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe des Typhoon Trio 9500 Scanners (Amersham Biosciences).

**1× MES-Puffer**

50 mM MES  
50 mM Tris-Cl  
0,1% SDS  
1 mM EDTA  
pH 7,3

**4.6.12.2 Z'Lyte™ Kinase Assay Kit-Ser/Thr 9 Peptide**

Dieser Assay wurde zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte an *Um*GSK3 verwendet und nutzt ein am N- und C-Terminus fluorophormarkiertes Peptid, das von der getesteten Kinase phosphoryliert wird. In einer nachfolgenden Detektionsreaktion wird dem Ansatz Chymotrypsin zugesetzt, welches das nicht phosphorylierte Peptid spaltet. Dadurch kann zwischen den beiden an das Peptid geknüpften Fluorophoren kein FRET gemessen werden, woraus sich der Phosphorylierungsgrad und somit die Enzymaktivität bestimmen lässt. Der Assay enthielt zwei Kontrollen, die für

jeden Versuch mitbestimmt wurden. Als Positivkontrolle (100 % Phosphorylierung) wurde ein präphosphoryliertes Peptid eingesetzt. Die Negativkontrolle (0 % Phosphorylierung) enthielt Peptid und Kinase, aber kein ATP. Optimale Reaktionsdauer, Enzym-, Substrat- und ATP-Konzentration waren für GSK3 WT von Christian Grütter bestimmt worden.

Zur Durchführung des Assays wurden in einer schwarzen 384-well-(100 µL)-Platte zusammengegeben:

5 µl Enzym/Inhibitor-Mix  
 5 µl Peptid/ATP-Mix  
*Inkubation 40 min bei RT*  
 5 µl Entwicklungsreagenz  
*Inkubation 45 min bei RT*  
 5 µl Stopreagenz

#### **Enzym/Inhibitor-Mix**

47,5 µl 0,3 ng/µl *Um*GSK3 WT bzw. 2 ng/µl *Um*GSK3-T131C-Mutante  
 2,5 µl Inhibitorlösung in DMSO  
 Inkubation ca. 20 (ATP-kompetitive Inhibitoren) bzw. 60 (irreversible Inhibitoren) min bei RT

#### **Peptid/ATP-Mix**

1,5 µM Ser/Thr 9 Peptid  
 6 µM 10 mM ATP  
 in 1X Z'Lyte™-Kinasepuffer

Die Messung der Signale wurde im Safire2 Mikrotiterplattenfluorimeter mit den folgenden Messparametern durchgeführt:

Parameter	Einstellung
Anregungswellenlänge	400 nm
Anregungsbandbreite	12 nm
Emissionswellenlänge	445 nm & 520 nm
Emissionsbandbreite	12 nm
Integrationszeit	40 µs
Anzahl Messungen	1
Verstärkung (gain)	60
z-Position	12620 µm

Die bei den Wellenlängen 445 nm und 520 nm gemessenen Fluoreszenzwerte wurden dividiert ( $\frac{\lambda_{445}}{\lambda_{520}}$ ) und der prozentuale Anteil an phosphoryliertem Peptid (% P) mit folgender Gleichung berechnet:

$$\%P = \frac{\frac{\lambda_{445}}{\lambda_{520}} \times \lambda_{520(100\%)} - \lambda_{445(100\%)}}{(\lambda_{445(0\%)} - \lambda_{445(100\%)}) + \frac{\lambda_{445}}{\lambda_{520}} \times (\lambda_{520(100\%)} - \lambda_{520(0\%)})}$$

*Kinetik* Um die optimale Enzymkonzentration zu bestimmen, wurde eine Kinetik mit verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt.

*ATP- und Substrat-Konzentration*

Die optimalen ATP- und Substrat-Konzentrationen für *UmGSK3* WT waren von Christian Grütter bestimmt worden und wurden für die Vermessung von *UmGSK3-T131C* übernommen.

*IC<sub>50</sub>-Bestimmung*

Zur Bestimmung der Inhibitorkonzentration, bei der die Enzymreaktion mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft, wurden die Inhibitoren in 8 Konzentrationen von 0 – 100 µM (finale Konzentration) für die Vermessung der ATP-kompetitiven Inhibitoren bzw. von 0 – 50 µM für die Vermessung der irreversiblen Inhibitoren in den Assay eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms XL-Fit durch Auftragen der Inhibitor-Konzentration gegen die Signalstärke und das Anlegen einer Dosis-Wirkungs-Kurve.

#### 4.6.12.3 IMAP Fluoreszenz-Polarisations-Assay

Der IMAP Fluoreszenz-Polarisations-Assay (Molecular Devices) beruht auf der spezifischen, hoch affinen Interaktion zwischen Phosphatgruppen und trivalenten Metallionen. Durch die Kinasereaktion wird ein fluoreszentes Substrat phosphoryliert, welches daraufhin von den in der Stop-Lösung enthaltenen Metall-Kügelchen spezifisch gebunden wird. Durch diese Interaktion erhöht sich die Fluoreszenzpolarisation, was die Bestimmung der Kinaseaktivität ermöglicht.

Zur Durchführung des Assays wurden in einer 384-well Platte zusammengegeben:

3,5 µl Inhibitor in 4% DMSO bzw. 4% DMSO

3,5 µl Enzymlösung

7 µl ATP/Substrat

Inkubation bei RT je nach Enzym

40 µl Stoplösung

Inkubation bei RT 30 min

**Enzymlösung**

Enzym (Konzentration je nach Kinase) in Complete Reaction Buffer

**ATP/Substrat**

ATP (Konzentration je nach Kinase)  
200 nM FAM-PKAtide oder TAMRA-Kemptide  
in Complete Reaction Buffer

**Complete Reaction Buffer**

1 Vol 5X IMAP Reaction Buffer (Molecular Devices)  
4 Vol H<sub>2</sub>O  
1 mM DTT  
0,01 % Tween-20

**Stoplösung**

1/400 Vol Progressive Binding Reagent (Molecular Devices)  
in Progressive Binding Buffer A (Molecular Devices)

Die Messung der Fluoreszenzpolarisation wurde im Tecan Ultra Mikrotiterplattenfluorimeter mit den folgenden Messparametern durchgeführt:

Parameter	Einstellung
Anregungswellenlänge	485 nm
Emissionswellenlänge	535 nm
Integrationszeit	40 $\mu$ s
Anzahl Messungen	3
Verstärkung (gain)	82
z-Position	8800 $\mu$ m

Finale Enzym- und ATP-Konzentrationen sowie Reaktionsdauer für verschiedene Aurora-Kinasen:

Kinase	Enzymkonzentration	ATP-Konzentration	Reaktionsdauer
UmAurora	2 ng/ $\mu$ l	35 $\mu$ M	50 min
humane Aurora A	0,25 ng/ $\mu$ l	10 $\mu$ M	60 min
humane Aurora B	0,24 ng/ $\mu$ l	35 $\mu$ M	55 min

**Kinetik**

Um die optimale Enzymkonzentration zu bestimmen, wurde eine Kinetik mit verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt.

*ATP- $K_M$ -Wert-Bestimmung*

Es wurde eine Reihe von ATP-Konzentrationen bei gleichbleibender Enzymkonzentration getestet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms XL-Fit durch Auftragen der ATP-Konzentration gegen die Signalstärke und das Anlegen einer Michaelis-Menten-Kurve.

*Substrat- $K_M$ -Wert-Bestimmung*

Die Bestimmung des Substrat- $K_M$ -Werts ist für den IMAF Assay laut Herstellerangaben nicht möglich, da eine Veränderung der Substratkonzentration zu erheblichen Schwankungen des Signals führt. Der Assay sollte immer bei 100 nM finaler Substratkonzentration durchgeführt werden.

*IC<sub>50</sub>-Bestimmung*

Zur Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Werts wurden die Inhibitoren in 7 Konzentrationen von 0,00064 – 10  $\mu$ M (finale Konzentration) in den Assay eingesetzt. Als negative Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym, als positive Kontrolle ein Ansatz ohne Inhibitor. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms XL-Fit durch Auftragen der Inhibitor-Konzentration gegen die Signalstärke und das Anlegen einer Dosis-Wirkungs-Kurve.

Zur Verdünnung der Inhibitoren in DMSO wurde ein Biomek NX<sup>P</sup> (Beckman Coulter, Krefeld, GER) verwendet, zur Verdünnung der Inhibitoren in H<sub>2</sub>O und zum Übertrag in Assay-Platten ein CyBi<sup>TM</sup>-Well (CyBio, Jena, GER) und zur Zugabe der Stopplösung ein MultiDrop 384 (Beckman Coulter, Krefeld, GER).





## Literaturverzeichnis

Adams, J. A. (2003), Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model?, *Biochemistry*, 42(3), 601–7.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, und D. J. Lipman (1990), Basic local alignment search tool, *J Mol Biol*, 215(3), 403–10.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, und D. J. Lipman (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389–402.

Amarante-Mendes, G. P., C. Naekyung Kim, L. Liu, Y. Huang, C. L. Perkins, D. R. Green, und K. Bhalla (1998), Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3, *Blood*, 91(5), 1700–5.

Andrews, D. L., J. D. Egan, M. E. Mayorga, und S. E. Gold (2000), The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth, *Mol Plant Microbe Interact*, 13(7), 781–6.

Argiriadi, M. A., *et al.* (2010), 2,4-Diaminopyrimidine MK2 inhibitors. Part I: Observation of an unexpected inhibitor binding mode, *Bioorg Med Chem Lett*, 20(1), 330–3.

Bakal, C. J., und J. E. Davies (2000), No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria, *Trends Cell Biol*, 10(1), 32–8.

- Banuett, F., und I. Herskowitz (1989), Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(15), 5878–82.
- Banuett, F., und I. Herskowitz (1994), Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle, *Genes Dev*, 8(12), 1367–78.
- Basse, C. W., und G. Steinberg (2004), *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity, *Mol Plant Pathol*, 5(2), 83–92.
- Basse, C. W., S. Stumpferl, und R. Kahmann (2000), Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation, *Mol Cell Biol*, 20(1), 329–39.
- Bebbington, D., *et al.* (2009), The discovery of the potent aurora inhibitor MK-0457 (VX-680), *Bioorg Med Chem Lett*, 19(13), 3586–3592.
- Besant, P. G., und P. V. Attwood (2005), Mammalian histidine kinases, *Biochim Biophys Acta*, 1754(1-2), 281–90.
- Biggins, S., F. F. Severin, N. Bhalla, I. Sassoon, A. A. Hyman, und A. W. Murray (1999), The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast, *Genes Dev*, 13(5), 532–44.
- Bischoff, J. R., und G. D. Plowman (1999), The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis, *Trends Cell Biol*, 9(11), 454–9.
- Bishop, A. C., O. Buzko, und K. M. Shokat (2001), Magic bullets for protein kinases, *Trends Cell Biol*, 11(4), 167–72.
- Blair, J. A., *et al.* (2007), Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics, *Nat Chem Biol*, 3(4), 229–38.
- Blume-Jensen, P., und T. Hunter (2001), Oncogenic kinase signalling, *Nature*, 411(6835), 355–65.
- Bogoyevitch, M. A., und D. P. Fairlie (2007), A new paradigm for protein kinase inhibition: blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding, *Drug Discov Today*, 12(15-16), 622–33.
- Bottin, A., J. Kaemper, und R. Kahmann (1996), Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*, *Mol Gen Genet*, 253(3), 342–52.

- Brachmann, A., G. Weinzierl, J. Kämper, und R. Kahmann (2001), Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*, *Mol Microbiol*, 42(4), 1047–63.
- Brachmann, A., J. Schirawski, P. Müller, und R. Kahmann (2003), An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*, *EMBO J*, 22(9), 2199–210.
- Brachmann, A., J. König, C. Julius, und M. Feldbrügge (2004), A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*, *Mol Genet Genomics*, 272(2), 216–26.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248–54.
- Brehmer, D., *et al.* (2005), Cellular targets of gefitinib, *Cancer Res*, 65(2), 379–82.
- Brent, K., und D. Hollomon (2007), *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?*, FRAC Monograph No. 1, 2 ed., GCPE.
- Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Mueller, B. J. Druker, und N. B. Lydon (1996), Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative, *Cancer Res*, 56(1), 100–4.
- Buryanovsky, L., Y. Fu, M. Boyd, Y. Ma, T. C. Hsieh, J. M. Wu, und Z. Zhang (2004), Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol, *Biochemistry*, 43(36), 11,417–26.
- Butcher, R. A., B. S. Bhullar, E. O. Perlstein, G. Marsischky, J. LaBaer, und S. L. Schreiber (2006), Microarray-based method for monitoring yeast overexpression strains reveals small-molecule targets in TOR pathway, *Nat Chem Biol*, 2(2), 103–9.
- Bölker, M. (2001), *Ustilago maydis*—a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence, *Microbiology*, 147(Pt 6), 1395–401.
- Castillo-Lluva, S., I. Alvarez-Tabares, I. Weber, G. Steinberg, und J. Perez-Martin (2007), Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family, *J Cell Sci*, 120(Pt 9), 1584–95.
- Chan, J. N., C. Nislow, und A. Emili (2010), Recent advances and method development for drug target identification, *Trends Pharmacol Sci*, 31(2), 82–8.

- Chu, X. J., *et al.* (2006), Discovery of [4-Amino-2-(1-methanesulfonylpiperidin-4-ylamino)pyrimidin-5-yl](2,3-difluoro-6-methoxyphenyl)methanone (R547), a potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor with significant *in vivo* antitumor activity, *J Med Chem*, 49(22), 6549–60.
- Cohen, P. (2002), Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?, *Nat Rev Drug Discov*, 1(4), 309–15.
- Cozzone, A. J. (2009), Bacterial tyrosine kinases: novel targets for antibacterial therapy?, *Trends Microbiol*, 17(12), 536–43.
- Daub, H. (2005), Characterisation of kinase-selective inhibitors by chemical proteomics, *Biochim Biophys Acta*, 1754(1-2), 183–90.
- Daub, H., K. Godl, D. Brehmer, B. Klebl, und G. Müller (2004), Evaluation of kinase inhibitor selectivity by chemical proteomics, *Assay Drug Dev Technol*, 2(2), 215–24.
- Davis, R. J. (1993), The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway, *J Biol Chem*, 268(20), 14,553–6.
- de Hoogt, R., W. H. Luyten, R. Contreras, und M. D. De Backer (2000), PCR- and ligation-mediated synthesis of split-marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruption in *Candida albicans*, *Biotechniques*, 28(6), 1112–6.
- Dickman, M. B., und O. Yarden (1999), Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi, *Fungal Genet Biol*, 26(2), 99–117.
- Doerig, C., und L. Meijer (2007), Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases., *Expert Opin Ther Targets*, 11(3), 279–290.
- Dürrenberger, F., K. Wong, und J. W. Kronstad (1998), Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(10), 5684–9.
- Elion, E. A., M. Qi, und W. Chen (2005), Signal transduction. Signaling specificity in yeast, *Science*, 307(5710), 687–8.
- Frame, S., und P. Cohen (2001), GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery, *Biochem J*, 359(Pt 1), 1–16.
- Fry, D. W., *et al.* (1998), Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 12,022–12,027.

- Gage, M. J., J. Bruenn, M. Fischer, D. Sanders, und T. J. Smith (2001), KP4 fungal toxin inhibits growth in *Ustilago maydis* by blocking calcium uptake, *Mol Microbiol*, 41(4), 775–85.
- Garcia-Muse, T., G. Steinberg, und J. Perez-Martin (2004), Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity, *J Cell Sci*, 117(Pt 3), 487–506.
- Gautschi, O., P. C. Mack, A. M. Davies, P. N. Lara, und D. R. Gandara (2006), Aurora kinase inhibitors: a new class of targeted drugs in cancer., *Clin Lung Cancer*, 8(2), 93–98.
- Giaever, G., *et al.* (2004), Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(3), 793–8.
- Godl, K., *et al.* (2003), An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 15,434–9.
- Gozalbes, R., L. Simon, N. Froloff, E. Sartori, C. Monteils, und R. Baudelle (2008), Development and experimental validation of a docking strategy for the generation of kinase-targeted libraries, *J Med Chem*, 51(11), 3124–32.
- Grangeasse, C., A. J. Cozzone, J. Deutscher, und I. Mijakovic (2007), Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology, *Trends Biochem Sci*, 32(2), 86–94.
- Gschwind, A., O. M. Fischer, und A. Ullrich (2004), The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, 4(5), 361–70.
- Hanks, S. K., und T. Hunter (1995), Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification, *FASEB J*, 9(8), 576–96.
- Haouala, A., *et al.* (2009), Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(22), 1982–96.
- Harari, D., und Y. Yarden (2000), Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer, *Oncogene*, 19(53), 6102–14.
- Harmse, L., R. van Zyl, N. Gray, P. Schultz, S. Leclerc, L. Meijer, C. Doerig, und I. Havlik (2001), Structure-activity relationships and inhibitory effects of various purine derivatives on the in vitro growth of *Plasmodium falciparum*., *Biochem Pharmacol*, 62(3), 341–348.

- Hedges, S. B. (2002), The origin and evolution of model organisms, *Nat Rev Genet*, 3(11), 838–49.
- Ho, E. C., M. J. Cahill, und B. J. Saville (2007), Gene discovery and transcript analyses in the corn smut pathogen *Ustilago maydis*: expressed sequence tag and genome sequence comparison, *BMC Genomics*, 8, 334.
- Hoffman, C. S., und F. Winston (1987), A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*., *Gene*, 57(2-3), 267–272.
- Holliday, R. (1974), *Ustilago maydis*, vol. 1, pp. 575–595, Springer.
- Honda, R., R. Körner, und E. A. Nigg (2003), Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis, *Mol Biol Cell*, 14(8), 3325–41.
- Hughes, T. R., *et al.* (2000), Functional discovery via a compendium of expression profiles, *Cell*, 102(1), 109–26.
- Jani, J. P., *et al.* (2010), PF-03814735, an orally bioavailable small molecule aurora kinase inhibitor for cancer therapy, *Mol Cancer Ther*, 9(4), 883–94.
- Kang, J., I. M. Cheeseman, G. Kallstrom, S. Velmurugan, G. Barnes, und C. S. Chan (2001), Functional cooperation of Dam1, Ipl1, and the inner centromere protein (INCENP)-related protein Sli15 during chromosome segregation, *J Cell Biol*, 155(5), 763–74.
- Karaman, M. W., *et al.* (2008), A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity, *Nat Biotechnol*, 26(1), 127–32.
- Kassir, Y., I. Rubin-Bejerano, und Y. Mandel-Gutfreund (2006), The *Saccharomyces cerevisiae* GSK-3 beta homologs, *Curr Drug Targets*, 7(11), 1455–65.
- Katayama, H., W. R. Brinkley, und S. Sen (2003), The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis., *Cancer Metastasis Rev*, 22(4), 451–464.
- Keen, N., und S. Taylor (2004), Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents., *Nat Rev Cancer*, 4(12), 927–936.
- Kimura, M., S. Kotani, T. Hattori, N. Sumi, T. Yoshioka, K. Todokoro, und Y. Okano (1997), Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1, *J Biol Chem*, 272(21), 13,766–71.

- King, N., und S. B. Carroll (2001), A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: molecular insights into early animal evolution, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26), 15,032–7.
- Klüter, S., *et al.* (2010), Characterization of irreversible kinase inhibitors by directly detecting covalent bond formation: a tool for dissecting kinase drug resistance., *Chembiochem*, 11(18), 2557–2566.
- Knight, Z. A., und K. M. Shokat (2005), Features of selective kinase inhibitors, *Chem Biol*, 12(6), 621–37.
- Knockaert, M., *et al.* (2000), Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors., *Chem Biol*, 7(6), 411–422.
- Koch, A., H. B. Rode, S. Hauf, und D. Rauh (in Vorbereitung), Selective and irreversible targeting of the Aurora kinase by chemical genetics, *Chemical Genetics*.
- Kronstad, J. W., und S. A. Leong (1989), Isolation of two alleles of the b locus of *Ustilago maydis*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(3), 978–82.
- Kuck, K., und U. Gisi (2007), *FRAC Mode of Action Classification and Resistance Risk of Fungicides*, vol. 2, pp. 415–432, 1 ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kämper, J. (2004), A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*, *Mol Genet Genomics*, 271(1), 103–10.
- Kämper, J., *et al.* (2006), Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*, *Nature*, 444(7115), 97–101.
- Lamb, D. C., D. E. Kelly, T. C. White, und S. L. Kelly (2000), The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase causes drug resistance through reduced affinity, *Antimicrob Agents Chemother*, 44(1), 63–7.
- Leslie, B. J., und P. J. Hergenrother (2008), Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents, *Chem Soc Rev*, 37(7), 1347–60.
- Leveleki, L., M. Mahlert, B. Sandrock, und M. Bölker (2004), The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*, *Mol Microbiol*, 54(2), 396–406.
- Leverson, J. D., H. K. Huang, S. L. Forsburg, und T. Hunter (2002), The Schizosaccharomyces pombe aurora-related kinase Ark1 interacts with the inner centromere protein Pic1 and mediates chromosome segregation and cytokinesis, *Mol Biol Cell*, 13(4), 1132–43.

- Levitzki, A., und A. Gazit (1995), Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development, *Science*, 267(5205), 1782–8.
- Lolli, G., *et al.* (2003), Inhibitor affinity chromatography: profiling the specific reactivity of the proteome with immobilized molecules, *Proteomics*, 3(7), 1287–98.
- Loomis, W. F., G. Shaulsky, und N. Wang (1997), Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes, *J Cell Sci*, 110 ( Pt 10), 1141–5.
- Lum, C., *et al.* (2008), 2,5-Diaminopyrimidines and 3,5-disubstituted azapurines as inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), *Bioorg Med Chem Lett*, 18(12), 3578–81.
- Manning, G., G. D. Plowman, T. Hunter, und S. Sudarsanam (2002a), Evolution of protein kinase signaling from yeast to man, *Trends Biochem Sci*, 27(10), 514–20.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, und S. Sudarsanam (2002b), The protein kinase complement of the human genome, *Science*, 298(5600), 1912–34.
- Mayorga, M. E., und S. E. Gold (1999), A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence, *Mol Microbiol*, 34(3), 485–97.
- Meraldi, P., R. Honda, und E. A. Nigg (2004), Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility, *Curr Opin Genet Dev*, 14(1), 29–36.
- Mesguiche, V., *et al.* (2003), 4-Alkoxy-2,6-diaminopyrimidine derivatives: inhibitors of cyclin dependent kinases 1 and 2, *Bioorg Med Chem Lett*, 13(2), 217–22.
- Müller, P., C. Aichinger, M. Feldbrügge, und R. Kahmann (1999), The MAP kinase *kpp2* regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*, *Mol Microbiol*, 34(5), 1007–17.
- Müller, P., G. Weinzierl, A. Brachmann, M. Feldbrügge, und R. Kahmann (2003), Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade, *Eukaryot Cell*, 2(6), 1187–99.
- Nadal, M., und S. E. Gold (2010), The autophagy genes *ATG8* and *ATG1* affect morphogenesis and pathogenicity in *Ustilago maydis*, *Mol Plant Pathol*, 11(4), 463–78.



Nakagami, H., H. Soukupova, A. Schikora, V. Zarsky, und H. Hirt (2006), A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis, *J Biol Chem*, 281(50), 38,697–704.

Nitiss, J., und J. C. Wang (1988), DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(20), 7501–5.

Oerke, E.-C. (2006), Crop losses to pests, *Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43.

Ong, S. E., *et al.* (2009), Identifying the proteins to which small-molecule probes and drugs bind in cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(12), 4617–22.

Parkinson, J. S. (1993), Signal transduction schemes of bacteria, *Cell*, 73(5), 857–71.

Pawson, T., und P. Nash (2000), Protein-protein interactions define specificity in signal transduction, *Genes Dev*, 14(9), 1027–47.

Petersen, J., J. Paris, M. Willer, M. Philippe, und I. M. Hagan (2001), The *S. pombe* aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation, *J Cell Sci*, 114(Pt 24), 4371–84.

Pillonel, C. (2005), Evaluation of phenylaminopyrimidines as antifungal protein kinase inhibitors, *Pest Manag Sci*, 61(11), 1069–76.

Pillonel, C., und T. Meyer (1997), Effect of Phenylpyrroles on Glycerol Accumulation and Protein Kinase Activity of *Neurospora crassa*, *Pesticide Science*, 49(3), 229–236.

Rabiller, M., M. Getlik, S. Klüter, A. Richters, S. Tückmantel, J. R. Simard, und D. Rauh (2010), Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases, *Arch Pharm (Weinheim)*, 343(4), 193–206.

Reggiori, F., und D. J. Klionsky (2002), Autophagy in the eukaryotic cell, *Eukaryot Cell*, 1(1), 11–21.

Rix, U., und G. Superti-Furga (2009), Target profiling of small molecules by chemical proteomics, *Nat Chem Biol*, 5(9), 616–24.

Rix, U., *et al.* (2007), Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets, *Blood*, 110(12), 4055–63.

Rosegrant, M. W., und S. A. Cline (2003), Global food security: challenges and policies, *Science*, 302(5652), 1917–9.

- Rossman, A. (2009), The impact of invasive fungi on agricultural ecosystems in the United States, *Biol Invasions*, 11, 97–107.
- Ruetz, S., D. Fabbro, J. Zimmermann, T. Meyer, und N. Gray (2003), Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors, *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 3(1), 1–14.
- Rustici, G., *et al.* (2004), Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle, *Nat Genet*, 36(8), 809–17.
- Sambrook, T., J. Fritsch, und E. F. Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sams-Dodd, F. (2005), Target-based drug discovery: is something wrong?, *Drug Discov Today*, 10(2), 139–47.
- Sato, S., A. Murata, T. Shirakawa, und M. Uesugi (2010), Biochemical target isolation for novices: affinity-based strategies, *Chem Biol*, 17(6), 616–23.
- Schulz, B., F. Banuett, M. Dahl, R. Schlesinger, W. Schafer, T. Martin, I. Herskowitz, und R. Kahmann (1990), The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif, *Cell*, 60(2), 295–306.
- Sessa, F., M. Mapelli, C. Ciferri, C. Tarricone, L. B. Areces, T. R. Schneider, P. T. Stukenberg, und A. Musacchio (2005), Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin, *Mol Cell*, 18(3), 379–91.
- Sharma, K., C. Weber, M. Bairlein, Z. Greff, G. Keri, J. Cox, J. V. Olsen, und H. Daub (2009), Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts, *Nat Methods*, 6(10), 741–4.
- Steinberg, G., und J. Perez-Martin (2008), *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology, *Trends Cell Biol*, 18(2), 61–7.
- Stone, J. M., und J. C. Walker (1995), Plant protein kinase families and signal transduction, *Plant Physiol*, 108(2), 451–7.
- Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, und F. Tomita (1986), Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>++</sup>dependent protein kinase, *Biochem Biophys Res Commun*, 135(2), 397–402.
- Tanaka, M., *et al.* (2005), An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small molecules, *PLoS Biol*, 3(5), e128.

Tari, L. W., I. D. Hoffman, D. C. Bensen, M. J. Hunter, J. Nix, K. J. Nelson, D. E. McRee, und R. V. Swanson (2007), Structural basis for the inhibition of Aurora A kinase by a novel class of high affinity disubstituted pyrimidine inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett*, 17(3), 688–91.

Thompson, J. D., D. G. Higgins, und T. J. Gibson (1994), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res*, 22(22), 4673–80.

Tsukuda, T., S. Carleton, S. Fotheringham, und W. K. Holloman (1988), Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*, *Mol Cell Biol*, 8(9), 3703–9.

Ulrich, L. E., E. V. Koonin, und I. B. Zhulin (2005), One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes, *Trends Microbiol*, 13(2), 52–6.

Vigneri, P., und J. Y. Wang (2001), Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase, *Nat Med*, 7(2), 228–34.

Warmuth, M., S. Danhauser-Riedl, und M. Hallek (1999), Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies, *Ann Hematol*, 78(2), 49–64.

Wessel, D., und U. I. Flügge (1984), A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal Biochem*, 138(1), 141–3.

Woodgett, J. R. (2001), Judging a protein by more than its name: GSK-3, *Sci STKE*, 2001(100), re12.

Zhang, J., P. L. Yang, und N. S. Gray (2009), Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, *Nat Rev Cancer*, 9(1), 28–39.





## Sequenzen

### MBP-*UmAurora*

Molekulargewicht: 98293 Dalton

Isoelektrischer Punkt: 8,7

MKTEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGP  
DIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSILYNK  
DLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKD  
VGVDNAGAKAGLTFLVDLIKXKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSK  
VNYGVTVLPTFKGQSPKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLG  
AVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEA  
LKDAQTNSSNNNNNNNNNNNLGIEGRISELSTSLYKKAGSAAVLEENLYFQGSFTMESQL  
ANLHLDGGSTADLKQGSRPSHAQASHGNRHVHPTNSSLRPLAPSSSIASNMGINMGVNM  
QHFNRLAASSTGLTNPNSIAQGMSRAAQPLNGSRPSTQQQPTQAHIKSRPPSVAGGLN  
AAAGPSYRPAAPAAQSTKQPASAGSAVASVDLGRYDGGGLERDEARGRRGTMQFDPLTL  
SADAGKQHPPTRVWVSLKDFEMGRPLGKGFGRVYVVRTRAAPNKGYYIALKCMYKNEL  
VENKVEKQLRREIEIQMNLRHPHILRLHGYFHDEGRVFLMIEFAGRGELYKLMNKLHDR  
RFEEKVAATYIAQMADALSYLHSHKHVIHRDIKPENLLGIKGLKIGDFGWSVHAPGNR  
RQTLCGTLDYLPPEMVNQEHDKAVDLWALGVLCYEFLEGVPPFEELNAPAGTYKRIN  
NIDFKIPRHSPEAADLVKALLKKKPPDRLPLTKVLRHPWIMKYDPDACRRASRGKIQ

**MBP-UmINCENP<sup>1424-1575</sup>**

Molekulargewicht: 62150 Dalton

Isoelektrischer Punkt: 5,3

MKTEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGP  
 DIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNK  
 DLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDIKD  
 VGVNDNAGAKAGLTFLVLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTS  
 KVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPL  
 GAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTV  
 EALKDAQTNSSNNNNNNNNNNNLGIEGRISELSTSLYKKAGSAAVLEENLYFQGSFTYSD  
**SEDEETIQKRAAMPLWTQGDMLDAALLAQSTVDADEIFGIPHGPVELEKILPGERTANRI**  
**RRARTSSANWSGPDGLAQWEIDRYNKRMGIKSAGVQLHRDPSQPSRPAAMPSTSIHRHS**  
**ISHNPLAPTSSTSTAPHTAINDDARTNA**

**MBP-Kpp2**

Molekulargewicht: 86473 Dalton

Isoelektrischer Punkt: 5,6

MKTEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGP  
 DIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYN  
 KDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGGYDI  
 KDVGVDNAGAKAGLTFLVLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNID  
 TSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDK  
 PLGAVALKSYEEELAKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTV  
 DEALKDAQTNSSNNNNNNNNNNNLGIEGRISELSTSLYKKAGSAAVLEENLYFQGSFTMS  
**HAHGQQPNHSTTFKVGETYKVVVVGEGAYGVVCSAIHVPSSSRVAIKKITPFDHSMFC**  
**LRTLREIKLLRHFNHENIISILDIVKPDYDSFSEVYLIQELMETDMHRVIRTQELSDDHCQ**  
**YFIYQTLRGLKALHSAQVLHRDLKPSNLLNANCDLKICDFGLARSANQPEAEGTGFMT**  
**YVATRWRAPPEIMLTFKEYTKAIDVWSVGCILAEMLAGKPLFPGRDYHHQLSLTLEILGT**  
**PSLDDFYAITSTRSDYIRALPFRKRRNLSLMFPNANPLAVDLMEKCLTFSPRKRTVEEAL**  
**AHPYLEPYHDPEDPTAEPLDPSFFDFDYCKEQLSRSELKRLIYNEIMR**

**MBP-*Um*GSK3-T131C**

Molekulargewicht: 91075 Dalton

Isoelektrischer Punkt: 6,2

MKTEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGP  
 DIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYN  
 KDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENKDYDI  
 KDVGVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNID  
 TSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDK  
 PLGAVALKSYYEELAKDPRIAAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTV  
 DEALKDAQTNSSSSNNNNNNNNNLGIEGRISELSTSLYKKAGSAAAVLEENLYFQGSFTMS  
 NAPLNGVKNLPLDDPNKVIKVLASDGKTGEQREIAYTNCKVIGNGSFGVVFQAKLVSQG  
 SEPAEGSSKESDEVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRIVKHPNVVDLKAFFYSNGDKKDEVFL  
 NLVLEYVPEcVYRASRHYAKLKQTMPMLLIKLYMYQLLRSLAYIHSIGICHRDIKPQNLLL  
 DPPSGVLKLIDFGSAKILIAGEPNVSYICSRYYRAPELIFGATNYTTNIDIWSTGCVMAELM  
 QGQPLFPGESGIDQLVEIHKVLGTPSREQIKTMNPNYMEHKFPQIRPHPFKSVFRPRTPPD  
 AIDLISRLLEYTPSARLTAIEALCHPFFDELRTGEARMPNGRELPLFNWTKEELSVRPDLIS  
 RLVPOHAEAEELSRGIDVHNFQPIPLESLKVTLD

**His-*Um*GSK3**

Molekulargewicht: 49789 Dalton

Isoelektrischer Punkt: 8,0

MSYYHHHHHHLESTSLYKKAGSAAAVLEENLYFQGSFTMSNAPLNGVKNLPLDDPNKVIK  
 VLASDGKTGEQREIAYTNCKVIGNGSFGVVFQAKLVSQSEPAEGSSKESDEVAIKKVLQ  
 DKRFKNRELQIMRIVKHPNVVDLKAFFYSNGDKKDEVFLNLVLEYVPETVYRASRHYAK  
 LKQTMPMLLIKLYMYQLLRSLAYIHSIGICHRDIKPQNLLDPPSGVLKLIDFGSAKILIAG  
 EPNVSYICSRYYRAPELIFGATNYTTNIDIWSTGCVMAELMQGQPLFPGESGIDQLVEIHK  
 VLGTPSREQIKTMNPNYMEHKFPQIRPHPFKSVFRPRTPPD AIDLISRLLEYTPSARLTAIE  
 ALCHPFFDELRTGEARMPNGRELPLFNWTKEELSVRPDLISRLVPQHAEAEELSRGIDV  
 HNFQPIPLESLKVTLD

**DNA-Sequenz von pDESTMC2**

CCGACACCATCGAATGGTGCAAAACCTTCGCGGTATGGCATGATAGCGCCGGAAGAGAGTCAATTCAGGGTGGTGAATGTGAAACCAGTAACGTTATACGATGTCGAGAGTATGCGGGT  
 GTCTCTTATCAGACCGTTTCCGCGTGGTGAACAGGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAAACCGGGAAGTGAAGCGCGATGGCGGAGCTGAATTACATTCCCAACCGGTGGCACAACA  
 ACTGGCGGGCAAAACAGTGGTGTGATTGGCGTTGCCACCTCCAGTCTGGCCCTGCACGCGCGTCGCAAAATGTCGCGGGGATTAATCTCGCGCCGATCAACTGGGTGCCAGCGTGGTGG  
 TGTGATGGTAGAACGAAGCGCGGTGAAGCCCTGTAAGCGCGGTGCACAATCTCTCGCGCAACCGGTCAGTGGGCTGATCATAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTG  
 GAAGTCGCTGCACTAATGTTCCGCGGTTATTCTTGATGTCTGTGACCAGACCCCATCAACAGTATTATTTCTCCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGAGCATCTGTCGCATT  
 GGGTCACCAGCAAAATCGCGCTTTAGCGGGCCCAATAAGTCTGTCTCGCGCGTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCGGATAGCGGAACGGGAAG

GCGACTGGAGTGCCATGTCGGTTTTCAACAAACCATGCAAAATGCTGAATGAGGGCATCGTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGGCAATGGGGCCATTACC  
GAGTCCGGGTCGCGTGGTGGGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTTATATCCCGCGTTAACCCACATCAAACAGGATTTTCGCTGCTGGGGCAAAAC  
CAGCGTGGACCGCTTCTGCAACTCTCTCAGGCCAGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCGCTCACTGGTGAAAAGAAAAACCACCTGGCGCCAATACGCAACCGCCTCTCCCC  
GCGCGTTGGCCGATTATTAAATGCAGTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTATTAGGCACAATTCTCATGTTGAC  
AGTTATCATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGAGGTCGTAATCACTGCATAATCGTGTGCTCAAGGCGCACTCCCG  
TTCTGGATAATGTTTTTGGCCGACATATAACGGTTCTGGCAAAATTTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGAAATTTGTGAGCGGATAACAATTTAC  
ACAGAAAACAGCAGCTCGTTAGTGTTTTACAGGACCTTCCACCAACAGGACCATAGATTATGAAAACTGAAGAAGTTAACTGGTAATCTGATTAAACGGGATAAAGGCTATAACGG  
TCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAAAGATACCGGAATTAAGTCAACCGTTGAGCATCCGGATAAACTGGAAGAGAAATTTCCACAGTTGGCGCAACTGGCGATGGCCCTGACATTA  
TCTTCTGGCCACAGCCGTTTGGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTGGCTGAAATCACCCCGGCAAAAGCGTTCCAGGCAAGCTGTATCCGTTTACTGGGATGCCCTACGTTACAAC  
GGCAAGCTGATGCTTACCCGATCGCTGTGAAGGCTTATCGCTGATTTATAACAAGATCTGCTGCCGAACCCGCAAAAACTGGGAAGAGATCCCGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGC  
GAAAGTTAAGAGCGCGTGTATTCAACCTGCAAGAACCGTACTTACCTGGCGCTGATGCTGCTGAGCGGGTTATGCGTTCAAGTATGAAAAAGGCAAGTACGACATTAAGACGTTGG  
GCTGGATAACGCTGGCGGAAAGCGGCTGACCTTCTGGTTGACCTGATTAACCAACACACATGAATGCAGACACCGATTACTCCATCGCAGAAGTGCCTTAATAAAGCGGAAACA  
GCGATGACCATCAACGGCCCGTGGCATGGTCCAAACATCGACACCAGCAAGTGAATTAATGGTAAACGCTACTGCCGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCTGGTGGCGTCTGAG  
CGCAGGTATTAACCGCCGACTCGGAACAAAGAGCTGGCAAAAGAGTCTCTGAAAATATCTGCTGACTGATGAAGGCTGGAAGCGGTTAATAAAGCAAAACCGCTGGGTGCCGTAGCGC  
TGAAGTCTTACGGAAGAGTTGGGAAAGATCCAGTATTGCCGCCACATGGAAGACCCGAGAAAGTGAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCGCTTCTCGTATGCGCTGCGT  
ACTGCGTGATCAACCGCCGAGCGTCTGACTGATGAGCCCTGAAAGACGCGCAGACTAATTCGAGCTGGAACAACAACAATAACAACAACCTCGGGATCGAGGG  
AAGGATTCAGAATTATCAACAAGTTTGTACaaaaGCTGAACGAGAAACGTAATGATATAAATATCAATATATAAATAGATTTTGCATAAAAAACAGACTACATAAATCTGTAAAA  
CACAAATATCCAGTCACTATGGCGCCGCTTAGGCACCCCGAGTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATGTGTGGATTTTGAAGTTAGGATCCGGCGAGATTTTTCAGGAGCTAAGG  
AAGTAAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCAACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAAGCATTTCAGTCACTGCTCAATGTACCTATAACCGACCGCTTACG  
CTGGATATACGGCTTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAAATAGCACAAAGTTTTATCCGGCTTTTATTCACATTTCTGCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATCCGATGCGAATGAAAGA  
CGGTGAGCTGGTATATGGGATAGTGTCAACCGTTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTTTCATGCTCTGGAGTGAATACCAAGCAGATTTCCGGCAGTTTCTACACATAT  
ATTCGCAAGATGGCGTGTTCAGGTGAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGTTTATGAGAATATGTTTTTCTGCTCAGCCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTTG  
GCCAATATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTCCACATGGGCAAAATATTACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTATCATGCGCTGCTGATGGCTTCCATGT  
CGCGAGAATGCTTAATGAATTAACAAGTACTCGGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAAAGATCTGGATCCGGCTTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGCTATTTGCGCGCTGATTTTGGC  
GTATAAGAATATATACTGATATGTATACCGAAGTATGTCAAAAGAGGTGCTGTATGAAGCAGCTATTACAGTGACAGTTGACAGCGACAGTATCAGTTGCTCAAGGCATATATGATGT  
CAATATCTCGCTGTGTAAGCACAAACATGCAGAATGAAGCCCGTCTGCTGCGCCGAAACGCTGGAAGCGGAAATCAGGAAGGGATGGTGAAGTGGCGGTTTTATTGAAATGAACG  
GCTCTTTGCTGACGAGAACAGGACTGGTGAATGCAGTTAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGACCGTTATCGTCTGTTTGGATGTACAGAGTATATTATGACACGCGCCGGCG  
ACGGATGGTATCCCCCTGGCCAGTGACGCTGCTGTCAGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTACCAGGTTGTCATATCGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCAACCGATATGGCCAGTG  
TGCCGGTCTCGTTATCGGGGAAGAAAGTGGCTGATCTAGCCACCCGCAAAATGACATCAAAACCGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAAATGTCAGGCTCCCTTATACACAGCCAG  
TCTGCAAGTGACCATAGTACTGGATATGTTGTGTTTTACAGTATTATGCTGCTGTTTTTATGCAAAATCTAATTAATATATGATATTTATATCATTTTACGTTTCTCGTTCAGctt  
tcttGTACAAAGTGGTATAGCTTGGCACTGGCCGCTGTTTTACAACGCTGACTGGGAAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATCGCTTGCAGCACATCCCCCTTGGCCAGCTGGCGT  
AATAGCGAAGAGGCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTCGCGAGCCTGAATGGCGAATGGCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGATAAGATTTTCAGCTGATACAGATTAATCAGA  
ACGCAGAAAGCGCTGATAAAAACAGAAATTTGCCTGGCGGAGTAGCGCGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCAACTCAGAAGTGAACGCGTAGCCCGATGGTATGTTGGGCTCTCCCC  
ATCGGAGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAGACTGGGCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCCGCGG  
AGCGGATTTGAACCTGGCAAGCAACGCGCGGAGGTTGGCGGACGAGCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAAATGAAGCAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTAC  
AAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATTCAAAATGATATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAAGATGAGTATTCACACTTTCCGTTG  
TCGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTGGGTGCACAGTGGGTTACATCGAACTGGAT  
CTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCGCCGAAGAACGTTCTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTGTGACGCGGGCAAGGCAACT  
CGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTGGTACTCACCAGTCAACAGAAAGACTCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTTGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATA  
ACACTGGGCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAATGGGGATCATGTAACCTGCTGATGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCC  
ATACAAAACGAGCGCTGACACCAGTGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGGCAAACTATTAACCTGGCAACTACTTACTAGCTTCCCGCAACAATAATAGACTGGATGGAGGG



GGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTA  
AGCCCTCCCCTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCGCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTT  
TACTCATATATACTTTAGATTGATTTACCCCGTTGATAATCAGAAAAGCCCCAAAAACAGGAAGATTGTATAAGCAAATATTTAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTA  
AATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTGTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACT  
ATTAAGAAACGTGGACTCCAAAGTCAAAGGGGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATC  
GGAACCTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGGAAAGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGTGGCAAGTGTAGGGTCCAGC  
CTGCGCTAACACCACACCCCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGTGTTTTCGTTCC  
ACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGAT  
CAAGAGTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAATGGCTTACGACAGCGCAGATACCAAAATAGTCTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTAC  
ATACCTCGCTCTGTAATCTGTTACAGTGGTCTGCTCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGG  
GTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAAGTACAGCTGAGTATGAGAAAGCCCAAGCTTCCCGAAGGGGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGC  
GGCAGGTCGAAACAGGAGCGCACAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGG  
GGGGCGGAGCCTATGGAACCGCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGCTTGTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTA  
CCGCTTTGAGTAGTGTATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGAAAGCGCGCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATT  
TCACACCGCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTGTGATCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTATGGCTGCGCCCGACACCCGCCAACACCC  
GCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGTGCATGTGTCAGAGTTTTTACCGTATCACCGAAACGGCGAGGAGCT  
CCGTAAGCTCATCAGCGTGGTCTGACGCGATTACAGATGTCTGCTGTTTCAATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGT  
TAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTTGTAGCTCCGTGTAAGGGGAATTTCTGTTTATGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGGATGCTCAGATACGGGTTACTGTATGATG  
AACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGTAACAACTGGCGGTATGGATGCGGGGGACACAGAAAAAATCACTCAGGTCATGCCAGCGCTCGTTAATACAGATGTAGTGTTC  
CAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCGATGAGATCCGAAACATAATGTGTCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTAAGAAACACGAAACCGAAGACCATCATGTGTTGCTCAGGT  
CGCAGACGTTTTGACGAGCAGTCTGCTTCAAGTTCGCTGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGC  
GCACCCGTGGCCAGGACCAACGCTGCCGAAAT





## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich während meiner Arbeit begleitet und unterstützt haben und ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Herbert Waldmann dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit unter seiner Leitung in einer Kooperation zwischen dem Chemical Genomics Centre und Bayer CropScience durchzuführen.

Meinem Gruppenleiter am CGC, Prof. Dr. Daniel Rauh, danke ich für die interessante Aufgabenstellung des GSK3-Projekts, die stete Unterstützung meiner Arbeit, die Vermittlung wertvoller Kontakte innerhalb des Max-Planck-Instituts sowie für die Korrektur der schriftlichen Fassung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer bei Bayer CropScience, Prof. Dr. Peter Schreier. Ihm danke ich für die interessante Aufgabenstellung des Projekts der Target-Identifizierung, für sehr viel Unterstützung und Motivation, hervorragende Betreuung und vor allem für die Freiheit, meine eigenen Ideen zu verfolgen.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollegen von Bayer CropScience bedanken, die mir stets eine große Hilfe waren: Ich danke Dr. Michael Beck dafür, dass er - auf Seite von Bayer CropScience - meine Arbeit in dieser Kooperation ermöglicht hat und Dr. Klaus Stenzel dafür, dass ich einen großen Teil meiner Arbeit in seiner Abteilung durchführen konnte. Ein großer Dank gebührt ebenfalls Dr. Jörg Greul, der die Diaminopyrimidin-Inhibitoren zur Verfügung gestellt hat und stets ein offenes Ohr für chemische Fragen hatte. Dr. Oliver Gutbrod danke ich für die Erstellung der Strukturmodelle im Komplex mit Inhibitoren. Bei Dr. Klaus Tietjen und Dr. Christoph Braun möchte ich mich für stete Hilfsbereitschaft und zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen bedanken. Ich danke außerdem Dr. Jörg Freigang und Christian Krebs für ihre Hilfe bei Fragen zur Proteinaufreinigung sowie Ulf Steffens für hochwertige Fotografie-Aufnahmen. Dr. Jürgen Benting und seinen Mit-

arbeitern Brigitte Schultes, Rolf Hechler und Bettina Faust sei für die Bereitstellung der *in vivo* Daten gedankt. Ich danke auch Catherine Sirven und Frank Maiwald für bioinformatische Unterstützung bei der Auswertung der Affinitätschromatographie-Experimente.

Ein großer Dank geht an alle Kollegen aus dem 2. OG Biologie Fungizide bei Bayer CropScience für ihre stete Hilfsbereitschaft bei großen und kleinen Problemen, insbesondere aber an Edith Dederichs und Nina Schwinum für ihre Unterstützung (besonders in der Anfangsphase), hilfreiche Diskussionen, viele gute Tipps und nicht zuletzt sehr viel Spaß im Laboralltag. Ohne euch hätte es nur halb so viel Spaß gemacht.

Auf Seiten des Max-Planck-Instituts möchte ich mich besonders bei Dr. Petra Janning und Andreas Brockmeyer für die schnelle und sorgfältige Messung und Analyse der Peptide bedanken. Ebenfalls gilt mein großer Dank meinen Kollegen vom CGC, insbesondere Dr. Christian Grütter für so manche Hilfe bei HPLC, FPLC und Kinaseassays und Dr. Haridas Rode für die Bereitstellung der irreversiblen Inhibitoren. Christian, Haridas, Jeff, Sabine, Ralf, Vijay, Zhizhou, Matthäus, André, Beate, Matthias, Hoang, Trang: it was great!

Ebenso danke ich Prof. Dr. Regine Kahmann und Dr. Patrick Berndt vom MPI Marburg für die große Unterstützung bei den Mikroskopie-Aufnahmen und die Bereitstellung der Vektoren zur Herstellung der Aurora-Knockdown-Mutante.

Armin danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und das Setzen dieser Arbeit sowie für Geduld, Liebe und Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte und die mir meine Laufbahn ermöglicht haben. Ich verdanke euch viel mehr als auf diesen Seiten Platz finden könnte.



## Lebenslauf

### Sandra Tückmantel

Geburtsdatum, -ort 02. Oktober 1981, Wuppertal  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulische Ausbildung

1988-1992 Katholische Grundschule Remscheid-Lüttringhausen  
1992-2001 Leibniz-Gymnasium Remscheid  
06/2001 Allgemeine Hochschulreife

### Akademische Laufbahn

10/2001-05/2006 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Studium der Biologie  
10/2003 Vordiplom Biologie  
08/2005–05/2006 Anfertigung der Diplomarbeit an der Universität Bonn, AG Prof. Bartels, Thema: "Analysis of gene expression in different *Lindernia* species during dehydration"  
05/2006 Diplom Biologie  
11/2006–12/2010 Anfertigung der Doktorarbeit am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Daniel Rauh zum Thema „Identifizierung und Validierung von Proteinkinase aus dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis* als Zielproteine niedermolekularer Kinaseinhibitoren“

Dortmund, 11. Januar 2011



Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, Januar 2011

(Sandra Tückmantel)