

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Untersuchung von Nukleosidtriphosphat Derivaten in zellulären
Testsystemen

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Samira Rezaie



Hamburg Bergedorf
am 28.November.2021

Gutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)

Gutachter: Dr. Bernhard Ellinger (Fraunhofer ITMP ScreeningPort)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Fraunhofer Instituts
für Translationale Medizin und Pharmakologie ITMP-ScreeningPort, Hamburg

Zusammenfassung

Mehr als 500 Kinasen mit verschiedenen konservierten katalytischen Domänen wurden bisher identifiziert und charakterisiert. Die von Kinasen katalysierte Phosphorylierung von Proteinen nutzt hierbei Adenosin-5'-Triphosphat als Kosubstrat und ist an einer Vielzahl biochemisch bedeutender und überlebenswichtiger Prozesse der Zelle beteiligt. Aufgrund ihres zentralen Mitwirkens an regulatorischen Prozessen im zellulären System, ist eine Fehlfunktion der Kinaseaktivität oftmals mit der Entstehung von Erkrankungen, insbesondere Krebserkrankungen, einhergehend. Die Entwicklung von Wirkstoffen bedarf der physiologischen Darstellung von Ursache und Wirkung solch maligner Prozesse. Bisher bekannte und eingesetzte Techniken zur Verfolgung der Aktivität von Proteinkinasen, sind radioaktive Markierungsstrategien durch Radioisotope, die Affinitätschromatographie, sowie die gelbasierte Visualisierung, unter Einsatz von spezifischen Antikörpern.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung γ -Phosphat modifizierter, neuartiger Nukleosidtriphosphat Derivate mit biologisch reversibler Maskierung, auf ihre Funktionalität zur kovalenten Markierung von Proteinkinasen, in zellulären Testsystemen. Dazu wurden im ersten Schritt Immunfluoreszenzanalysen zur Ermittlung der Zellpermeabilität der Derivate durchgeführt und die Effektivität der bioreversiblen Ladungsmaskierung getestet. Die Membrangängigkeit der Nukleosidtriphosphat Derivate wurde *in-vivo* in den Zellmodellen Hek293, A549, HepG2 und Caco-2 ermittelt. Bei verschiedenen Konzentrationen der Derivate konnte hierbei eine Membrangängigkeit nachgewiesen werden. Neben Untersuchungen der Membranpermeabilität, wurde die Zytotoxizität der Nukleosidtriphosphat Derivate, den ausgewählten Zellmodellen gegenüber ermittelt und verschieden intensives toxisches Verhalten der Derivate festgestellt.

Zur Untersuchung ATP-abhängiger Signaltransduktionsprozesse im zellulären Milieu, müssen die ATP-Derivate mit hoher Affinität an die Substrat-Bindungsstelle der Kinase binden. Hierzu wurde mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzresonanzenergietransferanalyse in Kompetitions-Untersuchungen, die Affinität eines nicht maskierten ATP-Derivates der MAP2K1 Proteinkinase gegenüber analysiert. Hierbei konnte eine Bindungsaffinität des Derivates der ausgewählten Kinasen gegenüber nachgewiesen werden. Mittels Immunoblot Verfahren wurde die Umsetzung der ATP-Derivate durch Proteine festgestellt. Im weiteren Verlauf des Projektes sollen Proteomanalysen zur eindeutigen Identifizierung biotinylierter Proteine innerhalb von Zelllysaten, durchgeführt werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Die Rolle von ATP innerhalb der Zelle	1
1.1.1 Intrazelluläre Signalweiterleitung	2
1.1.2 ATP-abhängige Transportprozesse	4
1.2 Proteinkinasen	7
1.2.1 Aktivität von Proteinkinasen	7
1.2.2 Klassifizierung von Proteinkinasen	7
1.2.3 Bindung von ATP	10
1.2.4 Inhibierung von Proteinkinasen	12
1.3 Zielsetzung	14
2. Material	15
2.1 Zelllinien	15
2.2 Modifizierte Nukleosidtriphosphat Derivate	15
2.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits	16
2.4 Kinase	17
2.5 Laborgeräte	18
2.6 Verbrauchsmaterialien	18
2.7 Antikörper	19
2.8 Software	19
3. Methoden	20
3.1 Zellkultur	20
3.1.1 Auftauen und Kultivieren von Zellen	20
3.1.2 Passagieren von Zellen	21
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl	22
3.1.4 Kryokonservierung von Zellen	22
3.2 Herstellung von Lysaten	23
3.3 Dot Blot	24
3.4 Western Blot	25

3.5	Ponceau S- Färbung.....	27
3.6	CellTiter-Glo Zellviabilitätsassay.....	27
3.7	Immunfluoreszenzanalyse	29
3.7.1	Mikroskopische Datenanalyse.....	30
3.8	TR-FRET Assay	31
4.	Ergebnisse	35
4.1	Immunfluoreszenzfärbung.....	35
4.1.1	Analyse von Hek293 Zellen.....	36
4.1.2	Analyse von A549 Zellen.....	42
4.1.3	Analyse HepG2 Zellen	47
4.1.4	Analyse Caco-2 Zellen	52
4.2	Ermittlung der Toxizität	58
4.2.1	Hek293 Zellen	59
4.2.2	A549 Zellen.....	61
4.2.3	HepG2 Zellen	62
4.2.4	Caco-2 Zellen	63
4.3	Immunoblot	65
4.3.1	Dot Blot.....	65
4.3.2	Western Blot.....	66
4.4	TR-FRET Untersuchungen.....	67
5.	Diskussion.....	70
5.1	Immunfluoreszenzanalyse	70
5.2	Ermittlung der Toxizität	75
5.3	Immunoblot	77
5.4	TR-FRET Untersuchungen.....	79
6.	Fazit und Ausblick	82
	Literaturverzeichnis.....	83
	Eidesstattliche Erklärung.....	89
	Anhang	I

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CTG	CellTiter-Glo
DED	Death Effector Domain
dest.	Destilliert
DISC	Death receptor-Induced Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Death Receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FADD	Fas Associated Death Domain
FAS	First Apoptotic Signal
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GDP	Guanosin-Diphosphat
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GTP	Guanosin-Triphosphat
Hek293 Zellen	Human embryonale Nieren 293 Zellen
HRP	Horseradish Peroxidase

IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
K _D	Dissoziationskonstante
KF	Kaliumfluorid
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MW	Mittelwert
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	revolution per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T	Tween20
TBS	Tris-Buffered Saline
TK	Tyrosin Kinase
TKL	Tyrosin Kinase Like
TR	Time Resolved (zeitaufgelöst)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	15
Tabelle 2: Modifizierte Nukleosidtriphosphat Derivate.....	15
Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Kits	16
Tabelle 4: Verwendete Kinase	17
Tabelle 5: Laborgeräte	18
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 7: Verwendete Antikörper.....	19
Tabelle 8: Softwares.....	19
Tabelle 9: Zusammensetzung des Kulturmediums	20
Tabelle 10: Reagenzien für die Zellpassage.....	21
Tabelle 11: Zusammensetzung des Kryomediums.....	22
Tabelle 12: Reagenzien für den Dot Blot.....	24
Tabelle 13: Reagenzien für den Western Blot	25
Tabelle 14: Lösungen und Reagenzien für die Immunfluoreszenzanalyse.....	29
Tabelle 15: Antikörper für die Immunfluoreszenzanalyse.....	29
Tabelle 16: Analytierte Zellkompartimente.....	30
Tabelle 17: FRET-Assay mit dem Eu-Kryptat.....	33
Tabelle 18: FRET-Assay mit dem Tb-Kryptat.....	34
Tabelle 19: FRET-Assay mit dem Tb-Kryptat und neuem Puffer	34
Tabelle 20: Verwendete Inhibitor Konzentration und ATP-Derivat Konzentration.....	34
Tabelle 21: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzergebnisse.....	57
Tabelle 22: Ermittelte IC ₅₀ -Werte	64
Tabelle 23: Expressionsverhalten der untersuchten Zelllinien	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Adenosin-5'-Triphosphat (ATP).....	1
Abbildung 2: Aufbau der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen	5
Abbildung 3: Kinombaum, Einteilung aller Proteinkinasen in Familien und Sub-Familien.	9
Abbildung 4: Struktureller Aufbau der ATP-Bindungstasche von Proteinkinasen	11
Abbildung 5: Chemische Struktur der verwendeten ATP-Analoga.....	16

Abbildung 6: Aufbau des Blotting-Tanks	25
Abbildung 7: ATP-abhängige Luciferase Reaktion.	28
Abbildung 8: Quantifizierung der Fluoreszenzintensität	31
Abbildung 9: Ablauf der Signalentstehung beim TR-FRET Assay.....	32
Abbildung 10: Immunfluoreszenzaufnahmen von Hek293 Zellen, nach der Inkubation mit dem ATP-Analogen ICPT- c_012.....	36
Abbildung 11: Fluoreszenzaufnahmen von Hek293 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_013 behandelt wurden.....	37
Abbildung 12: Fluoreszenzaufnahmen von Hek293 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_014 behandelt wurden.....	38
Abbildung 13: Fluoreszenzaufnahmen von Hek293 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_015 behandelt wurden.....	39
Abbildung 14: Fluoreszenzaufnahmen von A549 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_012 behandelt wurden.....	42
Abbildung 15: Fluoreszenzaufnahmen von A549 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_013 behandelt wurden.....	43
Abbildung 16: Fluoreszenzaufnahmen von A549 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_014 behandelt wurden.....	44
Abbildung 17: A549 Zellen nach Behandlung mit dem ATP-Analogen ICPT-c_015 (C18)..	46
Abbildung 18: Fluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_012 behandelt wurden.....	47
Abbildung 19: Fluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_013 behandelt wurden.....	48
Abbildung 20: Fluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_014 behandelt wurden.....	49
Abbildung 21: Fluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_015 behandelt wurden.....	50
Abbildung 22: Fluoreszenzaufnahmen von Caco-2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_012 behandelt wurden.....	52
Abbildung 23: Fluoreszenzaufnahmen von Caco-2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_013 behandelt wurden.....	53
Abbildung 24: Fluoreszenzaufnahmen von Caco-2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_014 behandelt wurden.....	54

Abbildung 25: Fluoreszenzaufnahmen von Caco-2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_015 behandelt wurden.....	55
Abbildung 26: Toleranz von Hek293 Zellen den ATP-Analoga gegenüber.....	59
Abbildung 27: Toleranz von A549 Zellen den ATP-Analoga gegenüber	61
Abbildung 28: Toleranz von HepG2 Zellen den ATP-Analoga gegenüber.....	62
Abbildung 29: Toleranz von Caco-2 Zellen den ATP-Analoga gegenüber.....	63
Abbildung 30: Dot Blot zum Nachweis der Bindung von ATP-Analoga an Proteine im Zelllysate.....	65
Abbildung 31: Western Blot zur Zuordnung der ATP- umsetzenden Proteine.	66
Abbildung 32: Ergebnisse der Kompetitions-Assays.....	68
Abbildung 33: Immunfluoreszenzaufnahmen von apoptotischen Zellen	76
Abbildung 34: Platte für die Immunfluoreszenzanalyse	I
Abbildung 35: Platte für die Toxizitätsanalyse	I
Abbildung 36: Ausgewählte Einstellungen für die Analyse der konfokalen Bildaufnahmen ..	II
Abbildung 37: Analyse der konfokalen Bildaufnahmen.....	III

1. Einleitung

1.1 Die Rolle von ATP innerhalb der Zelle

Das Nukleotid Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) ist die Hauptenergiequelle von metabolisch aktiven Zellen. Es besteht aus einer Stickstoffbase dem Adenin, dem Zucker Ribose und drei seriell gebundenen Phosphaten (Bonora et al., 2012).

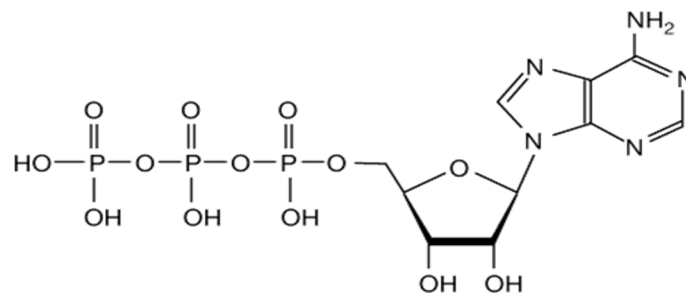


Abbildung 1: Chemische Struktur von Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)

Seit seiner Entdeckung 1929 durch den Biochemiker Karl Lohmann wurde die Freisetzung von ATP in einer Vielzahl an Zelllinien nachgewiesen (Langen and Hucho, 2008). Ein Großteil der ATP-Synthese erfolgt während der Zellatmung in den Mitochondrien. Dabei werden 32 ATP-Moleküle pro Glukose-Molekül synthetisiert (Chaudhry and Varacallo, 2021). Die Phosphatreste dieses Nukleosids werden über Phosphodiester-Bindungen miteinander verknüpft. Diese stellen überaus hochenergetische Bindungen dar, dessen elektronegative Ladung, eine abstoßende Kraft zwischen den Phosphatgruppen ausübt (Bonora et al., 2012; Dunn and Grider, 2021). ATP wird oftmals als Energiewährung der Zelle bezeichnet. Die Energie wird durch die Hydrolyse der Bindung zwischen dem α/β -Phosphat oder dem β/γ -Phosphat freigesetzt und kann enzymatisch an endergone Prozesse gekoppelt werden und diese thermodynamisch antreiben (Hammler et al., 2018). In den Phosphatbindungen bleibt eine große Energiemenge gespeichert. Durch enzymatische Hydrolyse können dem ATP Molekül ein oder zwei Phosphatreste abgespalten werden, wodurch Adenosindiphosphat (ADP) oder Adenosinmonophosphat (AMP) und freie organische Phosphatreste (P_i) freigesetzt werden (Dunn and Grider, 2021). Die Hydrolyse der Phosphoranhydridbindungen ist ein exergoner Prozess, die hierbei freiwerdende Energiemenge ist von Bedingungen innerhalb der Zellen

abhängig. Unter Standardbedingungen (1 M Konzentration für alle Moleküle, 25 °C und pH = 7,0) liegt der Wert der Gibbs-Energie Änderung (ΔG) zwischen -28 und -34 kJ/mol und ist abhängig von der Konzentration an Mg^{2+} -Kationen. Die Abhängigkeit von Magnesium-Ionen entsteht durch die stabilisierende Wirkung der positiv geladenen Ionen auf das ATP-Molekül. Die Hydrolyse von einem Mol ATP in lebenden Zellen, unter nicht standardisierten Bedingungen, liefert eine Energiemenge von etwa -57 kJ/mol (Rosing and Slater, 1972; Philips, 2015). Die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie wird in Kupplungsreaktionen zum Antrieb von energetisch unvorteilhaften Reaktionen mit dem gleichen Zwischenprodukt eingesetzt, da die Änderung der freien Enthalpie von aufeinanderfolgenden Reaktionen, additiv ist. ATP besitzt ein hohes Phosphorylübertragungspotenzial, dessen Maß die Änderung der freien Standardenthalpie (ΔG^0) ist (Rosing and Slater, 1972; Philips, 2015). Durch die Übertragung eines Phosphatrestes, wird die bei der exergonen Reaktion freiwerdende Energie, an die endergone Umsetzung des Substrates gekoppelt (Hoehn-Berlage et al., 1997). Die zelluläre ATP Konzentration liegt zwischen 1 bis 10 mM/L, mit einem ATP/ADP Verhältnis von 1000 (Zimmerman et al., 2011).

Die Spaltung des Triphosphats durch Hydrolyse liefert Energie, für eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Dazu gehören die Synthese von Proteinen, wie auch DNA/RNA, die Weiterleitung von Signalen, der Transport von Substanzen durch die Zellmembran, die Bereitstellung von Energie für Muskelkontraktionen, wie auch die synaptische Signalweiterleitung. Zur Regulation dieser Prozesse benötigen Zellen eine große Menge an ATP, sodass eine tägliche Hydrolyse von 100 bis 150 Mol ATP benötigt wird, um eine ausreichende Funktionalität der Zelle zu gewährleisten. Zur kontinuierlichen Versorgung der Zelle mit ATP, ist eine fortlaufende ATP-Produktion notwendig (Dunn and Grider, 2021; Khakh and Burnstock, 2009). Durch Hemmung der Glykolyse, wie auch durch die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette, kann der ATP-Gehalt innerhalb der Zelle stark beeinflusst werden.

1.1.1 Intrazelluläre Signalweiterleitung

Eine wichtige Rolle kommt dem ATP, insbesondere bei der intrazellulären Signalweiterleitung zu. Als Substrat einer sehr wichtigen Klasse von Enzymen, den Kinasen, welche ein Phosphat von ATP auf ein Zielprotein übertragen, spielt ATP dadurch eine essenzielle Rolle bei der Regulation einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen.

Wenn eine Kinase ein Zielprotein phosphoryliert, kann dadurch eine Signalkaskade ausgelöst werden, welche wiederum Auslöser einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie der Zell-Zell Interaktion, der Entstehung von Krankheiten oder der Immunsuppression ist. Die Adenin Untereinheit des ATPs bindet dabei an die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums der Kinase, während die Phosphatkette in Richtung der Substratbindungsstelle ragt. Eine räumliche Nähe des zu phosphorylierenden Proteins mit ATP, erleichtert erheblich die Übertragung des γ -Phosphats von ATP, auf die Hydroxylgruppe der Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Aminosäuren. Die Maskierung der natürlichen Hydroxylgruppe einer Aminosäure mit einem negativ geladenen Phosphatrest verursacht unter anderem eine Änderung der Proteinaktivität, was wiederum zu Änderungen innerhalb der Zelle führen kann. Die Aktivität von Kinasen wird dabei unter anderem durch Magnesiumionen reguliert, welche als Komplex mit ATP innerhalb der Zelle vorliegen und an das Phosphat-Sauerstoff-Zentrum des ATPs gebunden sind (Dunn and Grider, 2021; Shchemelinin et al., 2006).

Neben seiner Funktion als Substrat von Kinasen, kann ATP als ubiquitärer Auslöser intrazellulärer Botenstoffe fungieren. Zu diesen Botenstoffen zählen Hormone oder Lipidmediatoren. Den Lipidmediatoren kommt eine entzündungshemmende Funktion zuteil, da sie geschädigtes oder zerstörtes Gewebe, nach Eindringen von Krankheitserregern, regenerieren können (Stockert, 2020). Weitere Botenstoffe sind Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und eine Vielzahl von Enzymen.

Substanzen, welche extrazelluläre Signale in intrazelluläre Signale umwandeln, werden als Second Messenger bezeichnet. Der Empfang dieser extrazellulären Signale erfolgt über Rezeptoren auf der Membranoberfläche. Der Second Messenger *cyclic adenosine 3, 5'-monophosphate* (cAMP), ist ebenfalls aus ATP gebildet und reguliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse innerhalb der Zelle (Kamenetsky et al., 2006).

G-Protein gekoppelte Rezeptoren haben sieben Transmembrandomänen sowie eine α -, β - und γ - Untereinheit. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor, führt zur Aktivierung des Rezeptors, wodurch sich dessen Konformation ändert. Das an die α -Untereinheit gebundene Guanosin-Triphosphat (GTP) wird zu Guanosin-Diphosphat (GDP). Dies führt zum Ablösen der α -Untereinheit mit dem gebundenen GDP (Rosenbaum et al., 2009). Die Aktivierung des Rezeptors löst eine Reihe von Prozessen innerhalb der Zelle aus. Einer dieser Prozesse ist die Produktion von cAMP und die Freisetzung der Proteinkinase A (PKA). Hierfür bindet die α -Untereinheit des Rezeptors an das Enzym Adenylatzyklase, wodurch dieses aktiviert wird. Die

Adenylatzyklase ist ein dimeres, an die Plasmamembran assoziiertes Enzym, welches ATP zu cAMP umwandelt. Durch Abspaltung des Pyrophosphats, wird eine Veresterung zwischen der noch vorhandenen Phosphatgruppe und der 3'-OH-Gruppe der Ribose katalysiert (Maurice et al., 2003). Als Second Messenger hat cAMP unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle, wie die Aktivierung von Proteinkinasen, oder die Regulation der Funktion von Ionenkanälen. Das cAMP signalisiert unter anderem die Freisetzung von Calcium-Ionen durch die Aktivierung von transmembranen Calcium-Kanälen. Außerdem aktiviert es verschiedene Enzyme, wie die Proteinkinase A. Die aktivierte PKA, löst ihrerseits eine Reihe intrazellulärer Prozesse aus.

1.1.2 ATP-abhängige Transportprozesse

Die Zellmembran schützt und organisiert lebende Zellen. Die äußere Plasmamembran von Zellen reguliert den Transport, wie auch die Menge an Substanz, welche in die Zelle hineingelangen. Bei eukaryotischen Zellen besteht die Plasmamembran aus Phosphoglycerolipiden, Cholesterin und Proteinen. Die Lipiddoppelschicht beinhaltet integrale oder periphere Proteine, welche den Austausch zwischen Molekülen, wie auch Ionen der intrazellulären und extrazellulären Seite der Doppelschicht kontrollieren (Cooper, 2000).

Phospholipide sind amphiphile Moleküle, welche sowohl eine hydrophobe, wie auch eine hydrophile Seite aufweisen und das Grundgerüst der Lipiddoppelschicht bilden (Bargui et al., 2021). Sie bestehen aus Glycerin, zwei Fettsäuren und einem Phosphatrest. Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol, welcher das Rückgrat der Lipide bildet. Die Fettsäuren sind an der ersten und zweiten Hydroxylgruppe des Glycerins gebunden und ein Phosphatrest an der dritten Hydroxylgruppe. Der hydrophile Kopfteil des Lipids, mit dem negativ geladenen Phosphat und dem daran gebundenen Rest, ist nach außen gerichtet (Abb.2). Der hydrophobe Teil des Lipids, mit den unpolaren Fettschwänzen, ist in das Innere der Phospholipiddoppelschicht gerichtet. In wässriger Lösung ordnen sich Phospholipide spontan an. Cholesterin als weiteres Lipid, besteht aus vier verbundenen Kohlenstoffringen und ist im Inneren der Membran lokalisiert. Kohlenhydratketten aus bis zu 60 Monosacchariden, befinden sich auf der dem Extrazellulärraum zugewandten Seite und sind an Proteine oder Lipide gebunden (Cooper, 2000). Die Kohlenhydrate ermöglichen die Markierung und Erkennung von Zellen. Insbesondere das Immunsystem kann so, zwischen Körperzellen und fremden Zellen unterscheiden (Andrews and Corrotte, 2018; Cooper, 2000).

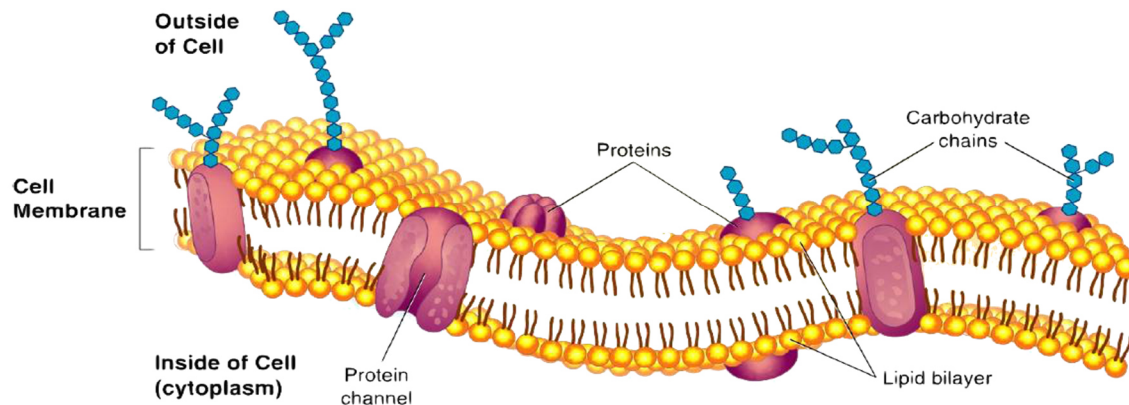


Abbildung 2: Aufbau der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen

Zu sehen ist die Phospholipiddoppelschicht mit den amphiphilen Phospholipiden sowie transmembrane und periphere Proteinen. Die Kohlenhydratketten sind an Proteine (Glykoproteine) oder Lipide (Glykolipide) gebunden, sie ermöglichen die Zell- Zell-Erkennung. Proteinkanäle ermöglichen den selektiven Stoffaustausch durch die Plasmamembran.

(Quelle: Escalante-Martinez et al., 2018)

Die Phospholipiddoppelschicht bildet eine gute Barriere zwischen dem Inhalt der Zelle, und den darin ablaufenden Prozessen und der Außenseite. Neben den Lipiden, sind außerdem Proteine ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran. Proteine, welche durch die Membran hindurchragen, werden Transmembranproteine genannt (Cooper, 2000; Watson, 2015).

Für die meisten Stoffe ist die Zellmembran undurchlässig. Ursache hierfür können die Größe oder die Ladung von Molekülen sein, jedoch auch der Aufbau der Plasmamembran der jeweiligen Zelllinie. Auf diese Weise wird der intrazelluläre Raum und darin ablaufende Prozesse kontrolliert und vor extrazellulären Einflüssen geschützt. Der selektive Stoffaustausch oder die Passage von in Wasser gelösten Molekülen durch die Membran, kann unter kontrollierten Bedingungen durch Kanäle, Transporter oder Pumpen ermöglicht werden. Wobei deren Funktionsweise und Häufigkeit innerhalb der Plasmamembran, wiederum von der Zelllinie abhängig ist (Yang and Hinner, 2015a).

ATPasen kommen in allen biologischen Membranen vor und können Ionen und andere Substanzen durch die Plasmamembran von Zellen transportieren. Die Energie dafür kommt aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und organischen Phosphat (P_i). Sie kommen in Pflanzen, Tieren und Bakterien vor und können in P-, V-, F- und ABC-Typ ATPasen unterteilt werden (Krishnan et al., 2020; Stokes and Nakamoto, 1994).

Von den membranständigen P-Typ ATPasen, gehört die Na^+/K^+ ATPase, zu den meist untersuchtesten ATPasen (Lingrel and Kuntzweiler, 1994). Im Extrazellularraum ist die

Konzentration an Natrium-Ionen höher und im Intrazellularraum, ist die Konzentration der Kalium-Ionen höher. Es entsteht ein Konzentrationsgradient durch die unterschiedliche Verteilung der Ionen auf beiden Seiten der Plasmamembran. Ohne Ionenpumpe würde es zum Ausgleich der Konzentrationen kommen und das negative Potential an der Membranoberfläche wäre nicht mehr vorhanden. Eine Weiterleitung von Reizen über Nervenzellen wäre somit nicht mehr möglich. Die Na^+/K^+ ATPase ist daher überaus wichtig zur Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und der damit verbundenen Weiterleitung von Aktionspotentialen. Bei dieser Reaktion binden drei Natrium-Ionen an die Bindungsstelle des Enzyms auf der Cytoplasma Seite. Es kommt zur Phosphorylierung des Enzyms durch ATP in Gegenwart von Mg^{2+} und einer damit einhergehenden Konformationsänderung des Enzyms (Lingrel and Kuntzweiler, 1994; Van Zoelen et al., 1982). Die Natriumbindungsseite des Enzyms dreht sich in Richtung Extrazellularraum. Die drei Natrium-Ionen werden freigesetzt. Mit hoher Affinität binden zwei Kalium-Ionen aus dem Extrazellularraum an diese Bindungsstelle. Das Enzym wird dephosphoryliert und ATP kann wieder gebunden werden. Es kommt zu einer erneuten Konformationsänderung des Enzyms, wodurch die Kalium-Ionen in die Zelle freigesetzt werden und der Prozess beginnt von neuem. Für jeden Zyklus wird ein ATP Molekül benötigt (Lingrel and Kuntzweiler, 1994; Van Zoelen et al., 1982). Durch den Transport von positiv geladenen Kationen, entsteht ein elektrochemischer Gradient über der Plasmamembran. Dieser Ionengradient ist essenziell für die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials von Zellen. Der Gradient wird außerdem für den Antrieb zahlreicher Transportprozesse genutzt, wie der Translokation von Glucose, Aminosäuren und anderen, für die Zelle lebensnotwendigen Nährstoffen. In Organen wie der Niere, reguliert die Na^+/K^+ ATPase die Flüssigkeitsresorption und die Elektrolytbewegungen durch die Ausbildung eines Ionengradienten auf Epithelmembranen (Lingrel and Kuntzweiler, 1994). Etwa 23 % des gesamten ATP-Verbrauchs gehen auf die Na^+/K^+ ATPase zurück (Lingrel and Kuntzweiler, 1994).

Die Hydrolyse von ATP liefert Energie für zahlreiche essenzielle Prozesse in Organismen und Zellen. Neben der intrazellulären Signalweiterleitung und dem Transport von Natrium- und Kalium-Ionen durch die Zellmembran, stellt ATP Energie für eine Vielzahl weiterer Prozesse bereit. Dazu gehören die Synthese von RNA und DNA, wie auch die Bereitstellung von Energie für die Muskelkontraktion. Die Ca^{2+} -Pumpe ist ein transmembranes Protein im endoplasmatischen Retikulum (Grover et al., 1985). Bei einer Muskelkontraktion werden Ca^{2+} -Ionen durch eine Ca^{2+} ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, in das Cytosol der Muskelzellen freigesetzt. Die Ca^{2+} ATPase befördert Calcium-Ionen entgegen dem

Konzentrationsgradienten, von ihrem Wirkort, wieder in das sarkoplasmatische Retikulum und bewirkt so das Abklingen der Kontraktion. Für zwei transportierte Calcium-Ionen wird ein ATP Molekül zu ADP und organischen Phosphat hydrolysiert (Toyoshima, 2009).

1.2 Proteinkinasen

1.2.1 Aktivität von Proteinkinasen

Proteinkinasen stellen die größte Proteinklasse im humanen Genom dar. Nach vollständiger Sequenzierung des Genoms konnten 518 Gene für Proteinkinasen und 20 Gene für Lipidkinasen identifiziert werden. Die Gesamtheit aller Gene, welche für Kinasen kodieren, machen etwa 1,7 % des menschlichen Genoms aus (Vulpetti and Bosotti, 2004a). Von diesen 518 Proteinkinasen sind 478 typische Kinasen, da sie in ihren katalytischen Domänen große Ähnlichkeit aufweisen. Die 40 weiteren Kinasen werden als atypische Proteinkinasen bezeichnet, welche sich in ihren Sequenzen von den typischen Kinasen unterscheiden, aber dennoch katalytisch aktiv sind (Manning et al., 2002).

Proteinkinasen sind in eukaryotischen Zellen, an allen Aspekten der Signalweiterleitung beteiligt. Diese umfassen die transmembrane Signalweiterleitung, Kontrolle während der Transkription und den zellulären Metabolismus (Goldsmith and Cobb, 1994). Dabei werden Signale aus dem extrazellulären Raum erkannt und über eine Signalkaskade innerhalb der Zelle, in eine zelluläre Antwort umgewandelt. Kinasen sind von großer Wichtigkeit bei der Weiterleitung von Signalen innerhalb der Zelle.

Die Proteinkinasen übertagen eine Phosphatgruppe von ATP, spezifisch das γ -Phosphat, auf die Hydroxylgruppe einer Aminosäure, wodurch sich die Aktivität des Substrates ändert. Dieser Prozess wird als Phosphorylierung bezeichnet. Die Phosphorylierung ist ein reversibler Prozess und kann durch das Enzym Phosphatase, rückgängig gemacht werden (Shchemelinin et al., 2006). Die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen ist ein intrazellulärer Mechanismus, mit welchem ein Austausch zwischen extrazellulären und intrazellulären Signalen ermöglicht wird.

1.2.2 Klassifizierung von Proteinkinasen

Proteinkinasen ähneln sich in Sequenz, Struktur und biochemischer Untereinheit. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten können sie in Klassen eingeteilt werden.

Die erste Klassifizierungsmöglichkeit von Kinasen, beschreibt ihre Zuordnung entsprechend dem phosphorylierten Aminosäurerest. Die zwei großen Gruppen welche hierbei unterschieden werden, sind Tyrosin Kinasen und Serin-Threonin Kinasen (Shchemelinin et al., 2006). Je nach Lokalisation, lassen sich die Tyrosin Kinasen außerdem in zwei Untergruppen unterteilen, den rezeptorgebundenen und den nicht-rezeptorgebundenen Tyrosin Kinasen. Rezeptorgebundene Tyrosin Kinasen sind transmembrane Kinasen, mit einer extrazellulären Domäne zur Bindung von Liganden, einer transmembranen Helix, einer intrazellulären Region, die eine Juxmembran-Domäne beinhaltet, einem C-Terminus und einer katalytisch aktiven intrazellulären Domäne. Nicht-rezeptorgebundene Tyrosin Kinasen besitzen hingegen keine transmembrane Domäne und sind im Cytosol, dem Nukleus und der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert (Du and Lovly, 2018). Rezeptorgebundene Tyrosin Kinasen können in zwei Konformationen vorkommen, der aktiven und der inaktiven Konformation. Die Bindung eines Liganden an die Kinasen aktiviert diese, wodurch eine Kette von intrazellulären Reaktionen ausgelöst wird. Dazu gehören unter anderem die SH2 und SH3 vermittelte Protein-Protein Interaktion und die Aktivierung von Signalenzymen, wie die Proteinkinase C (PKC), die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK), die Phospholipase C und die PI3-Kinase (Abella and Park, 2009; Schlessinger, 2000). Die beiden Gruppen der Proteinkinasen, Serin-Threonin und Tyrosin Kinasen weisen sehr große strukturelle und sequenzielle Homologien auf. Beide Gruppen besitzen sehr ähnliche katalytische Domänen, an welche das ATP bindet und die Phosphorylierung des Zielproteins erfolgt (Cheek et al., 2005).

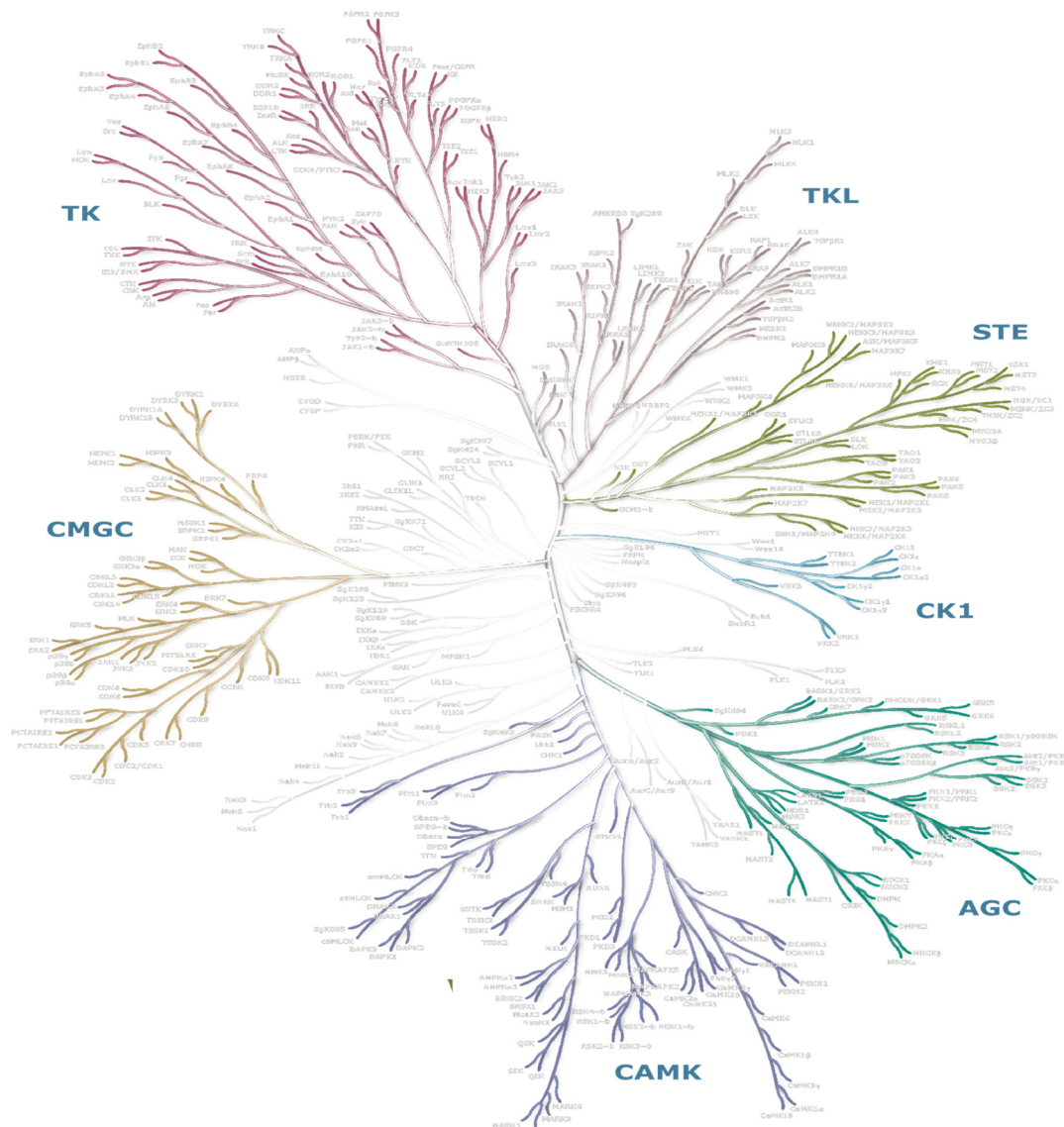


Abbildung 3: Kinombaum, Einteilung aller Proteinkinasen in Familien und Sub-Familien.

Die Einteilung der Proteinkinasen erfolgt auf Basis sequenzieller und struktureller Ähnlichkeiten.

(Quelle: www.kinase.com; <http://kinase.com/web/current/human/>, 11.10.2021)

Eine weitere Möglichkeit zur Klassifizierung von Kinasen, ist die Einteilung der Enzyme in Familien und Sub-Familien. Der Stammbaum in Abb.3 führt eine Einteilung der Proteinkinasen, entsprechend ihren sequenziellen oder strukturellen Ähnlichkeiten in die sieben Gruppen CK1 (Casein Kinase-1), CMGC (CDK, MAPK, GSK und CDK-like), TKL (*tyrosine kinase-like*), AGC (PKA, PKG, PKC), STE, TK (Tyrosinkinasen) und CAMK (*calmodulin-dependent kinases*), durch. Hierbei werden sowohl innerhalb einer Spezies wie auch Spezies übergreifend, Familien und Unterfamilien der Kinasen charakterisiert. Die Gruppen beschreiben 90 Familien und 145 Unterfamilien (Manning et al., 2002).

1.2.3 Bindung von ATP

Die katalytische Domäne von Kinasen besteht aus etwa 250 bis 300 Aminosäureresten (Hanks and Hunter, 1995). Zu den wichtigsten Funktionen dieser Domäne gehören die Bindung und Orientierung des ATPs in einen Komplex mit einem divalenten Kation, in der Regel Mg^{2+} oder Mn^{2+} . Gleichsam auch die Bindung und Orientierung des Substratkomplexes, wie auch die Übertragung des γ -Phosphats vom ATP-Donor auf die Hydroxylgruppe einer Aminosäure eines Akzeptor-Proteins (Hanks and Hunter, 1995).

Die katalytische Domäne besteht aus einer kleinen, N-terminalen Schleife und einer größeren, C-terminalen Schleife. Der N-Terminus besteht aus β -Faltblättern und einer langen α -Helix. Der C-Terminus besteht aus sechs α -Helices (Hanks and Hunter, 1995; Vulpetti and Bosotti, 2004a). Durch die Überlagerung der beiden Untereinheiten kommt es zur Ausbildung einer flexiblen *hinge* Region zwischen dem C- und N-Terminus (Kabsch and Holmes, 1995). Dieser Spalt, stellt das aktive Zentrum der Kinasen dar. Der N-Terminus bildet eine hydrophobe Tasche aus, an welche die Adenosin Untereinheit des ATPs, durch van der Waals Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen bindet, und besitzt außerdem zwischen dem β 1- und β 2-Faltblatt, drei konservierte Glycine. Diese Region wird als Glycin-reiche Schleife bezeichnet. Diese Glycin-reiche Schleife bindet an das α - und β -Phosphat des ATPs und spielt eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung (Vulpetti and Bosotti, 2004a). Die korrekte sterische Anordnung des ATPs, erfolgt durch ein konserviertes Lysin. Dieses bindet an das α - oder β -Phosphat unter Ausbildung einer Salzbrücke, mit dem Glutamat der α -Helix. Die korrekte räumliche Anordnung des ATPs unterstützt die Katalyse. Der C-Terminus ist stabiler als der N-Terminus und hauptsächlich α -Helikal. Die C-Schleife fungiert als Bindungsstelle für Substratproteine (Shchemelinin et al., 2006). Verschiedene Kinasen können oftmals strukturelle Ähnlichkeiten in der ATP-Bindungsstelle aufweisen, dennoch gibt es einige wichtige Unterschiede, sodass eine selektive Inhibierung der Kinasen möglich wird. Daher ist ein Verständnis über die Struktur und Funktion der Bindungstasche essenziell.

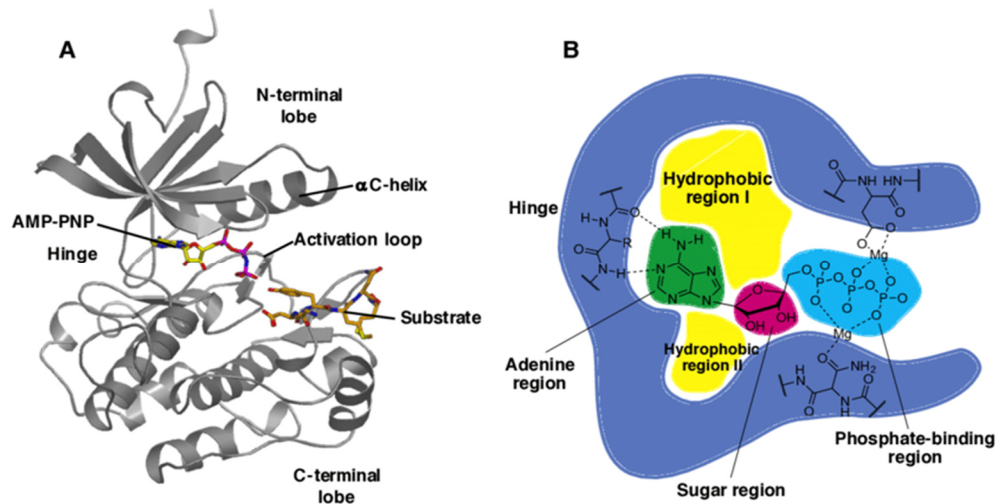


Abbildung 4: Struktureller Aufbau der ATP-Bindungstasche von Proteinkinasen. Zu sehen sind die N- und C- terminale Schleife der ATP-Bindungsstelle. Die Überlagerung der beiden Schleifen führt zur Ausbildung der *hinge* Region. Die Einteilung der Bindungstasche erfolgt in die Adenin-, Zucker-, und Phosphat-Region und zwei hydrophobe Regionen.

(Quelle: Macías, 2019)

Die ATP-Bindungstasche kann in fünf Regionen unterteilt werden, die Adenin-, Zucker- und Phosphat-Region sind hierbei für die Bindung von ATP wichtig (Abb.4). Die Adenin-Region ist eine hydrophobe Region. Der aromatische Adenin Ring des ATPs, geht hydrophobe Wechselwirkungen mit den fünf Regionen P2, P10, P13, P17 und P35 des N- und C-Terminus ein. Unter Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken bindet es an die *hinge region*. Daneben kommt es zusätzlich zu hydrophoben Wechselwirkungen des Adenin Rings, mit Aminosäuren im C- und N-Terminus (Vulpetti and Bosotti, 2004b).

Die Zuckerregion ist in den meisten Proteinkinasen hydrophil, außer bei der Proteinkinase EGFR (Shchemelinin et al., 2006). In der Zuckerregion ist die Ribose des ATPs über die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit einer der Hydroxylgruppen gebunden. Diese Untereinheit der Bindetasche hat einen sehr polaren Charakter, besitzt aber dennoch eine sehr große Variabilität. Über Wasserstoffbrückenbindungen wird das Phosphat des ATPs, an ein hoch konserviertes Lysin gebunden. Die Phosphatregion beinhaltet wichtige polare und hochkonservierte Untereinheiten. Zwei wichtige Sekundärstrukturen der Phosphatregion sind die Glycin-reiche Schleife und die α -Helix. Die Glycin-reiche Schleife des N-Terminus ist überaus flexibel und dessen Konformation, von der am aktiven Zentrum gebundenen Substanz, abhängig.

Die Bindetasche besitzt zwei weitere Regionen, die keine Wechselwirkung mit ATP eingehen. Die hydrophobe *buried region* und die dem Lösemittel zugewandte Region (*solvent accessible region*). Die hydrophobe Region ist sehr tief in der Proteinkinase lokalisiert und variiert in

Größe und Form bei verschiedenen Kinasen. Durch den Unterschied der hydrophoben Tasche bei unterschiedlichen Kinasen, können diese mit einer höheren Selektivität inhibiert werden. An die dem Lösemittel zugewandte Region bindet das ATP ebenfalls nicht. Unterschiede dieser Region zwischen Kinasen sind auf die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Glycin-Untereinheit zurückzuführen (Kornev and Taylor, 2010; Vulpetti and Bosotti, 2004a). Die ATP-Bindetaschen von Proteinkinasen, weisen alle strukturelle Ähnlichkeiten auf, sodass eine selektive Inhibition erschwert wird. Dennoch können Unterschiede in den einzelnen Regionen der Bindetasche, zur Erhöhung der Selektivität genutzt werden.

1.2.4 Inhibierung von Proteinkinasen

Proteinkinasen sind zentrale Signalproteine, die an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse durch posttranslationale Modifikation von Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Aminosäureresten, beteiligt sind. Die Weiterleitung von Signalen aus dem Extrazellularraum in die Zelle kann über eine, von Proteinkinasen ausgelöste, Signalkaskade gesteuert werden. Proteinkinasen sind beteiligt an zellulären Prozessen, wie der Apoptose, Differenzierung und Signaltransduktion. Ein Großteil der zellulären Proteine werden von Proteinkinasen posttranslational modifiziert.

Fehlfunktionen dieser regulatorischen Prozesse, ausgelöst durch Mutationen, Überaktivierung, Überexpression oder anderen äußeren Faktoren, können mit der Entstehung von Krankheiten, wie Krebs einhergehen (Kannaiyan and Mahadevan, 2018). Da Kinasen eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung, wie auch eine wichtige Komponente von kritischen Wachstumsfaktoren- und Differenzierungswegen sind, ist ihre Inhibierung im malignen Zustand, Bestandteil aktueller Forschung und Wirkstoffentwicklung. Zielgerichtete Wirkstoffe inhibieren spezifisch, fehlerhafte Moleküle. Niedermolekulare Inhibitoren binden an die ATP-Bindungsstelle der Proteinkinase und verhindern so, eine fortlaufende Phosphorylierung von Substratproteinen (Gao et al., 2013). Der 2001 von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassene, niedermolekulare Tyrosin-Kinase Inhibitor Imatinib (Gleevec), stellte den ersten eingeführten Inhibitor dieser Art vor. Gleevec wird zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt und bindet innerhalb der Zelle an die ATP-Bindetasche der Tyrosin Kinase Abl und hemmt dessen Aktivität (Lin et al., 2013). Der Erfolg des Inhibitors wurde zum Anstoß, bei der Entwicklung weiterer Inhibitoren, mit ähnlichen Wirkmustern. Im Jahr 1998 gelang Imatinib in die klinische Untersuchung, seitdem wurden mehrere hunderte Proteinkinase Inhibitoren entwickelt und getestet. Laut aktuellen Daten wurden von der FDA bisher 62 Kinase

Inhibitoren zugelassen, acht davon im Jahr 2020. Diese hemmen etwa 20 Proteinkinasen des menschlichen Kinoms (Roskoski, 2021). Weitere 16 niedermolekulare Inhibitoren wurden von anderen Einrichtungen zugelassen (Attwood et al., 2021). Von den 62 niedermolekularen Inhibitoren zielen 11 Serin-Threonin Kinasen ab, 13 blockieren nicht-rezeptorgebundene Tyrosin Kinasen, 35 blockieren rezeptorgebundene Tyrosin Kinasen und 3 sind gegen MEK1/2 Proteinkinasen gerichtet. Etwa 25 dieser zugelassenen Inhibitoren sind Multikinase-Inhibitoren, welche mehrere Kinasen gleichzeitig hemmen (Roskoski, 2021). Die Wirkungsweise von Multikinase-Inhibitoren kann zum einen vorteilhaft sein, da ihre therapeutische Wirksamkeit bei mehreren Kinasen angewandt werden kann. Gleichzeitig kann die unspezifische Inhibierung von anderen Proteinen nachteilige Nebeneffekte verursachen.

Etwa 110 Proteinkinasen bilden das Ziel aktueller Wirkstoffentwicklung. Gemeinsam mit Kinasen, welche bereits zugelassene Inhibitoren besitzen, machen sie nur 30 % des gesamten menschlichen Kinoms aus (Attwood et al., 2021). Aufgrund ähnlicher Strukturen und der geringen Selektivität, erwies sich die ATP-Bindungsstelle von Kinasen als potenzielles Angriffsziel, oftmals als problematisch. Die Funktion einer Vielzahl von Kinasen konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Entwicklung von Modulatoren zur Aufklärung der Funktionsweise dieser Proteine, ist folglich wichtig für das Verständnis von Krankheitsmechanismen und der damit verbundenen Wirkstoffentwicklung.

In der vorliegenden Arbeit wurden γ -Phosphat modifizierte, neuartige Nukleosidtriphosphat Derivate, mit biologisch reversibler Maskierung, auf ihre Fähigkeit zur Membranpermeabilität und Markierung von Proteinkinasen in zellulären Testsystemen untersucht. Durch die kovalente Modifikation des endständigen Phosphatrestes, durch das Anhängen einer lipophilen Gruppe, wurde die Ladung des γ -Phosphats maskiert, sodass eine Zellpermeabilität der Nukleosidtriphosphat Derivate ermöglicht werden sollte. Außerdem wurde ein Biotin Molekül an das γ -Phosphat angehängt, um eine Markierung von Phosphorylierungsprozessen, innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Auf diese Weise können Mechanismen der Signaltransduktion durch Proteinkinasen sichtbar gemacht werden. Die lipophile Maskiereinheit wird anschließend innerhalb der Zellen durch Carboxyesterasen oder Lipasen abgespalten und das biotinylierte Nukleosidtriphosphat Derivat liegt frei innerhalb der Zelle vor.

1.3 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Nukleosidtriphosphat Derivaten in zellulären Testsystemen. Die γ -Phosphat modifizierten, neuartigen Nukleosidtriphosphat Derivate, mit biologisch reversibler Maskierung (TriPPPro-Technologie) wurden von der AG Meier der Universität Hamburg bereitgestellt. Die reversible Maskierung sind Kohlenwasserstoffketten verschiedener Länge. Unter Einsatz ausgewählter, zellulärer Testsysteme, sollte eine Validierung dieser Technologie in physiologisch relevanten Zellmodellen erfolgen. Der Transfer von Biotin-markierten, γ -Phosphat modifizierten Nukleosidtriphosphat Derivaten in Lebendzellen, sollte mittels Immunfluoreszenzanalysen ermittelt werden. Hierdurch sollte ein Nachweis über die Zweckmäßigkeit der biologischen Ladungsmaskierung erhalten werden. In den vorliegenden Arbeiten wurde die Membrangängigkeit und Toxizität der ATP-Derivate im zellulären Milieu untersucht und quantifiziert. Umsetzbarkeit der ATP-Analoga und die Erfassung dieses Prozesses sollten mittels Immunoblot-Verfahren überprüft werden. Chemisch und strukturelle Stabilität der ATP-Derivate wurden unter chemisch- und pH-neutralen Bedingungen untersucht. Ein Erschließen von Mechanismen der Signaltransduktion durch Proteinkinasen, soll durch die ATP-Derivate ebenfalls ermöglicht werden, wobei eine ausreichende Affinität der Proteinkinase gegenüber dem Derivat, gegeben sein sollte. Deshalb sollte in einem ersten Versuch die Bindungsaffinität der ATP-Derivate der Kinase MAP2K1 gegenüber, mittels TR-FRET Analysen, identifiziert werden.

2. Material

2.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller	Ursprüngliches Gewebe	Lagerung
Hek293T	DMSZ (ACC305)	Human, embryonales Nierengewebe	-150 °C
A549	DSMZ (ACC107)	Human, Lungenkarzinom	-150 °C
Caco-2	DSMZ (ACC169)	Human, Dickdarm Adenokarzinom	-150 °C
HepG2	DSMZ (ACC180)	Human, Hepatoblastom	-150 °C

2.2 Modifizierte Nukleosidtriphosphat Derivate

Tabelle 2: Modifizierte Nukleosidtriphosphat Derivate

Bezeichnung	Markierung	Hersteller	Lagerung
ICPT-c_012	C9	AG Meier Universität Hamburg	-20 °C
ICPT-c_013	C12	AG Meier Universität Hamburg	-20 °C
ICPT-c_014	C15	AG Meier Universität Hamburg	-20 °C
ICPT-c_015	C18	AG Meier Universität Hamburg	-20 °C

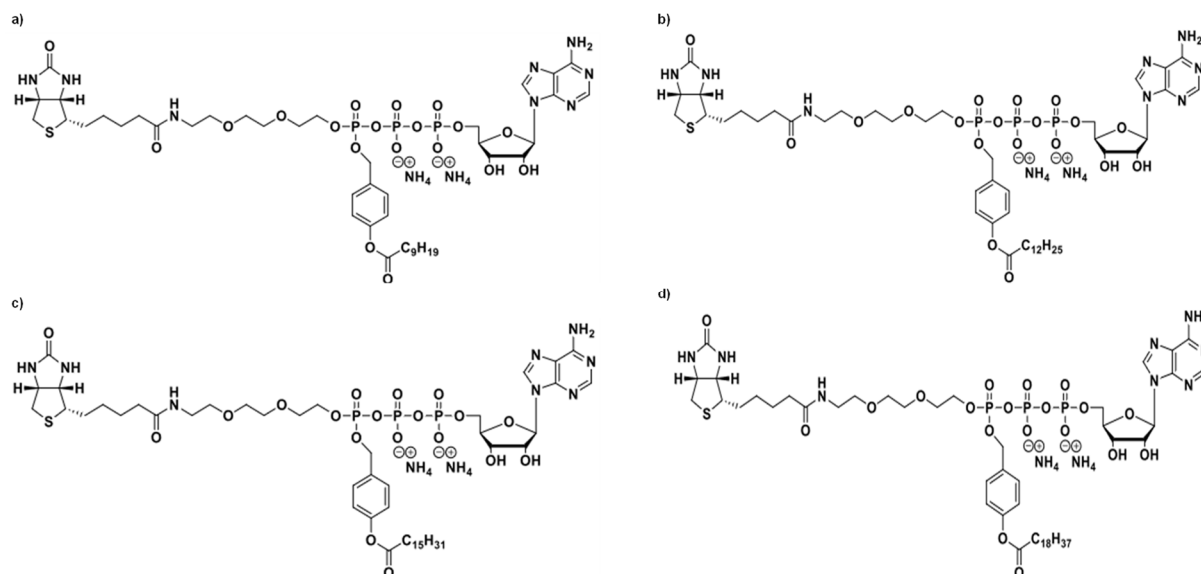


Abbildung 5: Chemische Struktur der verwendeten ATP-Analoga. a) ICPT-c_012 (C9), b) ICPT-c_013 (C12), c) ICPT-c_014 (C15), d) ICPT-c_015 (C18).

2.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Kits

Substanz	Hersteller	Land	Artikelnummer	Lagerung
Chemiluminescence Detection Reagent	Li-Cor	USA	926-95000	RT
DMEM High Glucose (4,5 g/L) w/o L - Glutamine, w/o Phenolrot	Lonza	Deutschland	DMEM-HXRXA	4 °C
Dulbecco's PBS(1x) w/o Ca & Mg w/o Phenolrot	Capricorn Scientific	Deutschland	PBS-1A	4 °C
Fetal Calf Serum (FCS)	Capricorn Scientific	Deutschland	FBS-12A	-20 °C
MOPS SDS Running Buffer	Thermo Fischer Scientific	USA	B0001	RT
Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific	USA	26620	-20 °C
Sample Reducing Agent	Thermo Fischer Scientific	USA	NP0009	RT

Material

TBS	Thermo Fischer Scientific	USA	28358	RT
Trypsin/EDTA (0,05 %) in DPBS (1x)	Capricorn Scientific	Deutschland	TRY-1B	4 °C
Tween® 20	Carl Roth	Deutschland	9127.1	RT
Western Blot Stripping Puffer	Thermo Fischer Scientific	USA	46430	RT
Western Blot Transfer Puffer	Thermo Fischer Scientific	USA	35045	RT
L-Glutamine	Capricorn Scientific	Deutschland	GLN-B	-20 °C
Penicillin/Streptomycin (100x)	Capricorn Scientific	Deutschland	PS-B	-20 °C
Methanol	Carl Roth	Deutschland	HN41.2	RT
Albumin Fraktion V	Carl Roth	Deutschland	8076.4	4 °C
Hoechst 33258	Thermo Fischer Scientific	USA	H3569	4 °C
Alexa Fluor 488	Invitrogen	USA	A21206	4 °C
CellMask™ Deep Red	Thermo Fischer Scientific	USA	H32721	4 °C
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega	USA	G7573	4 °C
Kinase-Biotin Binding Discovery Kit	Perkin Elmer Inc.	Deutschland	62KBD03PEA	-20 °C

2.4 Kinase

Tabelle 4: Verwendete Kinase

Bezeichnung	Hersteller	Land	Markierung	Lagerung
MAP2K1 Kinase	Antibodies-online GmbH	Deutschland	GST-Tag	-20 °C

2.5 Laborgeräte

Tabelle 5: Laborgeräte

Labornamen	Bezeichnung	Hersteller	Land
Blotting Kammer	XCell II™	Thermo Fisher Scientific	USA
Inkubator	HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific	USA
Lichtmikroskop	Mikroskop	VWR International	USA
Pipetten	2 bis 1000 µl	Gilson, Inc.	USA
Wasserbad	VWB12	VWR	Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 16R	Corning®	USA
Luminescence Imager	LAS4000mini	Cytiva	USA
Luminescence Reader	EnVision™ 2103	Thermo Fisher Scientific	USA
Sicherheitswerkbank	HERA safe HSP-12	Thermo Fisher Scientific	USA
Vortex-Apparat	Vortex Gene 2	Scientific Industries	USA
Zellzähler	Corning® Cell Counter CytoSmart™	CytoSmart Technologies	Niederlande
High Content Screening System	Opera® High Content Screening System	Perkin Elmer Inc.	USA

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer	Land
384- Well microplate	Corning	3824	USA
Cellstar-384	Greiner	781073	Deutschland

Material

CellCarrier- 384	PerkinElmer Inc.	6057302	USA
Filterpapier	Thermo Fisher Scientific	84783	USA
Kulturflasche 175 cm ²	Greiner Bio One	660160	Deutschland
Kulturflasche 25 cm ²	Greiner Bio One	690160	Deutschland
Kulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio One	658170	Deutschland
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf	0030120086	Deutschland
PVDF Membran	Carl Roth	T831.1	Deutschland
Serologische Pipetten	Starstedt	E4860	Deutschland
Proteingel 4-12 %	Thermo Fisher Scientific	NW04125BOX	USA
Nitrozellulose Membran	Thermo Fisher Scientific	1964178	USA

2.7 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Kolonialität	Hersteller	Artikelnummer
Alexa 488 anti mouse	Goat	Poly	Invitrogen	A11029
HRP Streptavidin		Poly	Elbasience	E-AB-1043

2.8 Software

Tabelle 8: Softwares

Bezeichnung	Hersteller	Version
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc. CA, USA	8.3.4
Columbus, Cellular Imaging and Analysis	PerkinElmer	2.9.0
Office	Microsoft Office	2013
ScienceCloud	Bovia	2021

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Die vorliegenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse S1, mit laminaren Luftstrom durchgeführt. Um eine eventuelle Kontamination der Zellen zu vermeiden, wurden sowohl die Arbeiten, wie auch die verwendeten Materialien, sterilen Voraussetzungen angepasst. Dazu wurden die Sicherheitswerkbank, sowie die verwendeten Substanzen und Materialien, vor dem Gebrauch mit Ethanol (70 %) abgesprüht.

3.1.1 Auftauen und Kultivieren von Zellen

Tabelle 9: Zusammensetzung des Kulturmediums

Kulturmedium	Lagerung
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (4,5 g/L Glukose)	4 °C
1x Penicillin/Streptomycin	-20 °C
2 mM L-Glutamin	-20 °C
10 % FCS	-20 °C

Zur Kultivierung wurden, die bei -150 °C gelagerten Zellen, aus dem Gefrierschrank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Das Röhrchen mit der Zellsuspension wurde mit Ethanol (70 %) abgesprüht und unter der Sicherheitswerkbank, in eine T75 Kulturflasche, in 14 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt (Gesamtvolumen 15 ml). Ein gleichmäßiges Verteilen der Zellsuspension, wurde durch vorsichtiges Schwenken der Kulturflasche gewährleistet. Da die Zellen in DMSO haltigen Kryomedium gelagert wurden, wurde nach 24 stündiger Inkubation, ein Medienwechsel durchgeführt und so das DMSO aus der Zellsuspension entfernt. Zum Erhalt der lebenden Zellen, wurde das Medium alle 48 Stunden gewechselt und die Zellen bis zum Erreichen einer Konfluenz von ~ 80 % in Kultur gehalten.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Tabelle 10: Reagenzien für die Zellpassage

Reagenzien	Lagerung
Phosphate buffered saline (PBS)	4 °C
Trypsin 0,05 %/ EDTA 0,02 %	4 °C
Kulturmedium	4 °C

Bei einer Konfluenz von $\sim 80\% - 90\%$ haben die Zellen die optimale Dichte pro Flächeneinheit zur Subkultivierung erreicht und werden passagiert. Da bei maximaler Ausbreitungsdichte oftmals ein Stillstand der Teilungsaktivität zu beobachten ist, wird ein Passagieren der Zellen notwendig. Die Verdünnung mittels Passagieren, gewährleistet demnach ein weiteres Wachstum der Zellen. Unter mikroskopischer Begutachtung wurde die Konfluenz der Zelle beurteilt und eine geeignete Verdünnung gewählt.

Dazu wurde das Kulturmedium zunächst mit einer Glaspipette abgesaugt, die Zellen wurden mit 8 ml PBS gewaschen und durch Trypsinieren mit 1,5 ml einer Trypsin/ EDTA Lösung (1,5 ml für eine T75 Flasche; 2,5 ml für eine T175 Flasche) im Inkubator bei 37 °C für 4-5 Minuten, vom Boden der Kulturflasche gelöst. Trypsin gehört zu den Endopeptidasen. Diese spalten je nach Erkennungssequenz Proteine an bestimmten Stellen. Auf diese Weise werden Proteine, die zur Aufrechterhaltung des Zellverbandes oder dem Anhaften an die Oberfläche benötigt werden, verdaut. EDTA ist ein Chelatbildner, welcher ebenfalls die Auflösung des Zellrasens unterstützt, da Integrine (Proteine, die Zell-Zell und Zell-Oberflächen Kontakte vermitteln) Calcium für ihre Funktion benötigen. Zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} , werden vom Chelatbildner Ethylendiamintetraacetat komplexiert. Die Trypsinierung wurde mit 8,5 ml Kulturmedium gestoppt. Der Hintergrund hierfür ist, dass das FCS im Kulturmedium Trypsininhibitoren enthält, sodass folglich die gleiche Menge FCS wie Trypsin benötigt wird. Bei 1,5 mL Trypsin wäre der Einsatz von 15 ml Kulturmedium notwendig, da dieses 10 % FCS enthält. Durch Auf- und Abziehen der Zellsuspension mit einer Pipette, wurden die Zellen vereinzelt. Schließlich wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 verdünnt und in eine neue Kulturflasche mit Kulturmedium überführt. Das Gesamtvolumen der T175 Flaschen beträgt 25 ml.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen entsprechend Abschnitt 3.1.2 von der Kulturflasche gelöst. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mittels Trypsin/EDTA Lösung trypsinisiert und anschließend in 10 ml Kulturmedium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl, wurden die Zellen in mehr Kulturmedium aufgenommen, als beim Passagieren der Zellen. Eine 1:1 Verdünnung der Zellen wurde hergestellt und 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Mit dem CytoSMART (Corning Cell Counter) wurde die Zellkonzentration ermittelt. Dabei wurden etwa vier Bilder mit dem Messgerät geschossen und der passende Bereich für die Zellgröße eingestellt. Zur Bestimmung der notwendigen Verdünnung wurde unter Berücksichtigung der ermittelten und gewollten Zellkonzentration ein Verdünnungsfaktor berechnet.

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{gemessene Zellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right]}{\text{gewollte Zellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right]} \quad (\text{Gl.1})$$

Dieser Verdünnungsfaktor wurde für die Aussaat der Zellen genutzt.

3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Tabelle 11: Zusammensetzung des Kryomediums

Kryomedium	Lagerung
90 % v/v FCS	-20 °C
10 % DMSO (99,9%)	RT

Für die Lagerung von Zellen bei -150 °C wurde ein Kryomedium, bestehend aus 10 % DMSO und 90 % FCS, hergestellt und verwendet. Dazu wurden die Zellen entsprechend Abschnitt 3.1.2 von der Kulturflasche abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, mit dem CytoSMART ermittelt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 71 g (500 rpm) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kryomedium resuspendiert. Die Zellen wurden unter Einbezug des Verdünnungsfaktors in einer Zellkonzentration zwischen 0,75 und 2·10⁶ Zellen pro ml verdünnt. Je 1 ml der verdünnten Zellsuspension wurde in Kryovials pipettiert und diese in eine Gefrierbox (CoolCell LX von Corning) gelegt. Zuvor wurden die Röhrchen mit Barcodes die den Zellnamen, die Passage, die Zellzahl, das Datum und den Hersteller enthielten, beklebt. Mit

einer Gefriertrate von $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro min gewährleistet die Gefrierbox von Corning ein gleichmäßiges Abkühlen und Einfrieren der Zellen. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in den $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefrierschrank überführt.

3.2 Herstellung von Lysaten

Im vorliegenden sollten Proteine aus Hek293 Zellen, mittels Ultraschallaufschluss aufgeschlossen werden. Das Wirkprinzip der mechanischen Lyse, basiert auf der Ausbildung von Kavitationsblasen. Die Blasen entstehen durch Druckunterschiede in Flüssigkeiten. Beim Zusammenfallen der Blasen werden hohe Geschwindigkeiten, mit entsprechend hohen Drücken erzeugt (Lippert et al., 2019). Zellen, welche sich in der Nähe befinden oder an diesem Vorgang beteiligt sind, erfahren große Scherkräfte, welche die Zellwand zerstören. Somit kommt es zur Freisetzung des Zellinhaltes. Je niedriger die Frequenz, umso größer sind die Kavitationsblasen. Die bei der Implosion übertragene Kraft wächst mit der Größe der Kavitationsblasen. Des Weiteren gilt, je größer die Amplitude der Schall-abgebenden Spitze, desto intensiver ist die Kavitation. Über die Amplitude wird auch die eingetragene Energie geregelt (Lippert et al., 2019). Durch die eingetragene Energie in die Suspension, kommt es zu einer Erwärmung der Suspension. Daher sollte die Probe, während des Aufschlusses, gekühlt werden.

Zur Herstellung, der für den Western Blot und Dot Blot benötigten Lysate wurden Hek293 Zellen in T175 Flaschen kultiviert und beim Erreichen einer Konfluenz von $\sim 80\%$ vom Boden der Kulturflasche gelöst. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen in PBS resuspendiert, drei Mal bei 200 g für 3 min zentrifugiert und das Zellpellet erneut in PBS resuspendiert. Entsprechend Abschnitt 3.1.3 wurde die Zellzahl ermittelt und $5\text{ Mio. Zellen pro ml}$ in Eppendorf Tubes pipettiert. Für das Lysieren wurden die Tubes einzeln, in ein mit Eis gefülltes Becherglas gelegt und die Sonotrode des Ultraschallgerätes, wurde vorsichtig in das Tube eingeführt. Diese sollte den Rand des Tubes nicht berühren. Bei einer Amplitude von 100% wurde sechs Mal, für 30 Sek. der Ultraschall ausgesendet. Anschließend wurden die Proben bei 21.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein anderes Tube pipettiert. Die Zelllysate wurden mit den zu untersuchenden ATP-Analoga mit einer Endkonzentration von $200\text{ }\mu\text{M}$, $50\text{ }\mu\text{M}$ und $25\text{ }\mu\text{M}$ behandelt. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei RT, bevor die Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, bis zur späteren Verwendung gelagert wurden.

3.3 Dot Blot

Tabelle 12: Reagenzien für den Dot Blot

Reagenzien	Zusammensetzung	Lagerung
TBS	TBS (10x)	RT
TBS-T	TBS (10x) Tween® 20 (0,01 %) destilliertes Wasser	RT
Blocking Puffer	BSA 5% TBS-T (10x)	RT

Beim Dot Blot wurden 5 μL , der mit ATP-Analoga behandelten Zelllysate, auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert und diese für einige Minuten angetrocknet. Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocking Puffer geblockt und anschließend zwei Mal mit TBS-T für 5 min gewaschen. Danach wurde das *horseradish peroxidase* (HRP) markierte Streptavidin, als sekundärer Antikörper auf die Membran gegeben. Dazu wurde der Antikörper 1:2000 in 10 ml Blockingpuffer verdünnt und vorsichtig auf die Membran pipettiert. Die Membran wurde für eine Stunde bei RT und lichtgeschützt geschüttelt. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper, wurde die Membran drei Mal mit TBS-T (1x15 min, 2x5 min) und einmal mit TBS (5 min) gewaschen. Zur Detektion der Proteine, wurde das Detektionsreagenz zu gleichen Anteilen aus zwei Lösungen zusammen pipettiert und auf die Membran gegeben. Die Lumineszenz wurde mit dem LAS4000mini detektiert. Ein weiterer Dot Blot wurde mit Proben durchgeführt, bei welchen keine vorherige Inkubation der Zelllysate mit den ATP-Analoga stattgefunden hatte. Hierzu wurden 5 μL der unbehandelten Zelllysate auf die Nitrozellulosemembran pipettiert und anschließend die Substanzen mit einer Endkonzentration von 200 μM , 50 μM und 25 μM auf die Membran gegeben. Es folgte das Blockieren im Blockingpuffer, sowie die Inkubation mit dem markierten Streptavidin.

3.4 Western Blot

Tabelle 13: Reagenzien für den Western Blot

Reagenzien	Zusammensetzung	Lagerung
Western Blot Transfer Puffer	Transfer Puffer (20x) destilliertes Wasser	RT
TBS-T	TBS (10x) Tween® 20 (0,01 %) destilliertes Wasser	RT
Blocking Puffer	BSA 5 % TBS-T (10x)	RT
MOPS SDS Laufpuffer	Laufpuffer (20x) destilliertes Wasser	RT

Für den Western Blot wurden Zelllysate mit einem SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch, entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, im anschließenden Blotting-Verfahren auf eine Membran überführt und mit einem proteinspezifischen Antikörper detektiert.

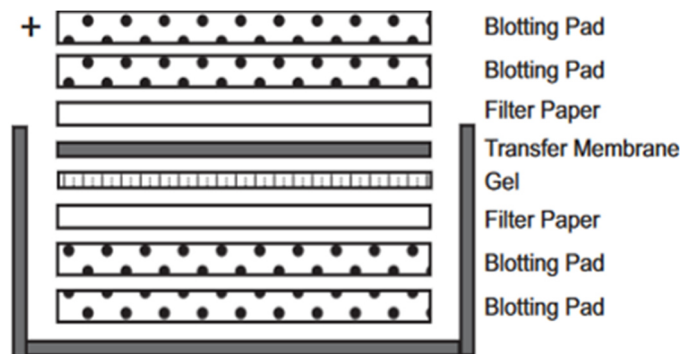


Abbildung 6: Aufbau des Blotting-Tanks

(Quelle: NuPage® Technical Guide by Thermofischer, 2021)

Die hierbei verwendete Membran, war eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, welches Proteine denaturiert. Das Detergens bindet an hydrophobe Teile der Proteine, wodurch sich die Moleküle entfalten und ihre Eigenladung effektiv überdeckt wird, sodass auf diese Weise Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Probenvorbereitung wurden die Proben, unter Anwesenheit von überschüssigen SDS, auf 95 °C erhitzt, wodurch erfolgreich Tertiär- und Sekundärstrukturen, durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen und Streckung der Moleküle, aufgelöst wurden und das Protein in seine Untereinheiten aufgetrennt wurde. Zum Aufspalten der Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen wurde DTT, eine reduzierende Verbindung, zugegeben (Auflösen der Quartärstruktur). Folglich wurden die

Proteine ausschließlich nach ihrer Größe (molare Masse) aufgetrennt. Bei der SDS-PAGE wurde ein zum Polyacrylamid-Gel, senkrecht gerichtetes, elektrisches Feld angelegt, wodurch die mit SDS beladenen und negativ geladenen Proteine, Richtung Anode (Plus-Pol) wandern. Jede Probe enthielt 18,5 μL der mit ATP-Analoga behandelten Lysate, 3 μL Sample Reducing Agent (10x) und 7,5 μl vom LDS Sample Puffer (4x). Es folgte die Denaturierung im Thermomixer, hierbei wurden die Proben auf 95 °C erhitzt und für 10 min bei 300 rpm geschüttelt. Als Trägermatrix wurden Polyacrylamidgele verwendet. Das Gel wurde zunächst aus der Verpackung ausgepackt, mit Wasser abgespült, der Kamm aus den Geltaschen entfernt und das Gel in die Gelkammer eingebaut. Die Elektrophorese Kammer wurde mit, aus einem Konzentrat hergestellten MOPS SDS Laufpuffer gefüllt und 10 μl des Markers wurden in die erste Tasche pipettiert. Von den Proben wurden jeweils 30 μl in die anderen Taschen pipettiert.

Bei zwei Gelen sollten diese nicht nach dem gleichen Schema pipettiert werden, sondern ein unsymmetrisches Pipettierschema angelegt werden. Dadurch wurde eine spätere Zuordnung erleichtert. Die Kammer wurde an die Stromversorgung angeschlossen und es wurden 200 V eingestellt. Bei RT liefen die Proteine für 45-60 min. Der Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgte unter Einsatz eines elektrischen Feldes. Das Blotting, welches die Überführung von Makromolekülen aus Trenngelen, auf eine immobilisierte Matrix beschreibt, erfolgte in Form eines „Wet-Transfers“. Hierfür wurden die Filter und Schwämme in Transferpuffer eingelegt. Zum Aktivieren der Membran wurde diese für 5 min in Methanol eingelegt und anschließend mit destilliertem Wasser sowie Transferpuffer für 5 min gewaschen. Für das Tank-Blotting wurden das Gel, die Membran, die Filterpapiere und die Schwämme entsprechend Abb. 6 in den Blotting-Tank eingebaut. Das innere des Tanks wurde mit Transferpuffer gefüllt und die Kammer mit destilliertem Wasser. Der Transfer erfolgte bei 30 V und 4 °C für eine Stunde. Nach dem Transfer wurde die Membran zwei Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Es folgt das Blockieren im Blocking-Puffer für eine Stunde. Dadurch wurden die proteinfreien Stellen der Membran mit einem, für den Antikörper nicht erkennbaren Protein blockiert, um eine unerwünschte Bindung weiterer Proteine an die Membran zu verhindern. Ungewollte Signale konnten so verhindert werden. Als Blocking-Puffer wurde eine 5%-ige BSA Lösung eingesetzt. Der Nachweis, von auf die Membran übertragenen Proteinen, erfolgte indirekt unter Einsatz des sekundären Antikörpers. Dazu wurden 5 ml des sekundären Antikörpers auf die Membran pipettiert. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde bei RT und lichtgeschützt geschüttelt. Nach Inkubation der Membran mit dem HRP markierten Streptavidin, wurde diese drei Mal für jeweils 5 min mit

PBS gewaschen. Zur Detektion der Proteine, wurde das Detektionsreagenz zu gleichen Anteilen aus zwei Lösungen zusammen pipettiert und auf die Membran gegeben. Die Lumineszenz wurde mit dem LAS4000mini detektiert.

3.5 Ponceau S- Färbung

Ponceau S ist ein Farbstoff, mit welchem Membranen angefärbt werden können und so Proteinbanden, vor der Behandlung mit dem primären und sekundären Antikörper, sichtbar gemacht werden. Die hierbei entstehende Färbung ist reversibel, sodass eine Beeinflussung der Membran für die nachfolgende Behandlung mit den Antikörpern, durch die Färbung, ausgeschlossen ist. Für den Western Blot wurde nach dem Transfer der Proteine auf die Membran, etwa 10 ml des roten Farbstoffes auf die Membran pipettiert. Die Membran wurde für 5 min auf dem Schüttler, bei RT geschüttelt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen, bis nur noch die roten Banden sichtbar waren. Für die Bildaufnahme wurde die PVDF- Membran beim Western Blot in eine Klarsichtfolie gelegt und eingescannt. Beim Dot Blot erfolgt die Färbung mit Ponceau S direkt nach der Probenaufgabe auf die Membran. Der weitere Ablauf war gleich, wie beim Western Blot. Nach der Färbung wurde die Membran drei Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen, bis alle roten Banden vollständig gewaschen wurden. Daraufhin konnte die Membran für den weiteren Ablauf verwendet werden.

3.6 CellTiter-Glo Zellviabilitätsassay

Mithilfe des Zellviabilitätsassays lässt sich die Toleranz der Zellen den zu testenden Substanzen gegenüber ermitteln. Das vorliegend verwendete Assaysystem ist ein von Promega entwickeltes, CellTiter-Glo Lumineszenz Zellviabilitätsassay. Das Assaysystem ermöglicht die Quantifizierung von metabolisch aktiven Zellen innerhalb einer Zellkultur, aufbauend auf der Konzentration an anwesendem ATP innerhalb der Probe. ATP ist in allen metabolisch aktiven Zellen in einem streng regulierten Konzentrationsbereich vorhanden und bindet vorliegend an die zugesetzte Luciferase, wodurch eine nachweisbare Lichtreaktion erzeugt wird. Hierzu werden die Zellen lysiert und das ATP wird anschließend zusammen mit D-Luziferin als weiteres Substrat in einer lichtemittierenden Reaktion umgesetzt. Bei Luciferasen handelt es sich um Enzyme, die zu den Oxidoreduktasen gehören. Das Enzym Luciferase katalysiert unter Anwesenheit von O_2 , ATP und Mg^{2+} die Oxidation von D-Luciferin in Mono-Oxyluciferin, AMP sowie anorganisches Phosphat und löst ein nachweisbares Lumineszenzsignal aus

(Abbildung 7). Das gemessene Lumineszenzsignal ist direkt proportional zur Konzentration an anwesendem ATP und somit zur Anzahl an vitalen Zellen.

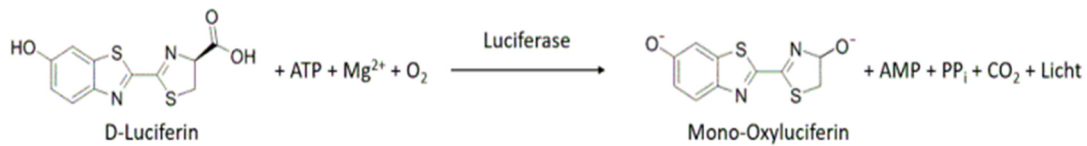


Abbildung 7: ATP-abhängige Luciferase Reaktion. Luciferase katalysiert die Oxidation von D-Luceferin zu Mono-Oxyluceferin. Das hierbei entstehende Lichtsignal ist direkt proportional zur ATP- Konzentration in der Probe und somit zur Anzahl an metabolisch aktiven Zellen in der Probe. (Quelle: Promega Corp., USA, 2021)

Zur Bestimmung der Viabilität der gewählten Zelllinien, den ATP- Analoga gegenüber, wurden 20 µl der Zellen, mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen pro Well, in eine Cellstar-384 Well Platte von Greiner ausgesät. Nach 24 stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit ausgewählten Konzentrationen der ATP-Derivate, für drei Stunden behandelt. Die Viabilität wurde anschließend mit dem CellTiter Glo-Assay ermittelt. Die Durchführung des Assays erfolgte laut Protokoll, dabei wurden 10 µl des CellTiter-Glo Puffers in jedes Well pipettiert und es folgte eine Inkubationszeit von 10 min im Dunkeln. Die Messung der Lumineszenz erfolgte mit dem EnVision HTS Microplate Reader von PerkinElmer Inc. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse wurden mit Excel 16.0 ausgewertet. Die prozentuale Viabilität wurde entsprechend der Gleichung 2 ermittelt. Visualisiert wurden die erhaltenen Daten mit GraphPad PRISM 9 Version 9.2.0.

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{x_i}{\text{Mittelwert}_{\text{High-Kontrolle}}} \cdot 100 \quad (\text{Gl.2})$$

x_i : Zahlenwert der Probe, Mittelwert_{High-Kontrolle}: Mittelwert der unbehandelten Proben.

3.7 Immunfluoreszenzanalyse

Tabelle 14: Lösungen und Reagenzien für die Immunfluoreszenzanalyse

Reagenz	Zusammensetzung	Lagerung
Fixierpuffer	PBS 0,1 % Triton X-100 3,7 % Formaldehyd/ PFA	RT, unter einem Abzug
PBS-T	PBS 0,1 % Tween-20	RT
Blockierpuffer	3 % Albumin PBS-T	RT
Hoechst 33258	Hoechst 33258 (1 µg/mL) in PBS-T 1:15.000 Verdünnung	4 °C, lichtgeschützt
CellMask™ Deep Red	CellMask™ Deep Red in PBS- T 1:5000 Verdünnung	4 °C

Tabelle 15: Antikörper für die Immunfluoreszenzanalyse

Antikörper	Wirt	Kolonialität	Hersteller	Artikelnummer	Verdünnung
Alexa 488 anti mouse	Goat	Poly	Invitrogen	A11029	1:2000

Die Immunfluoreszenzanalyse wurde zum Nachweis der Zelldurchlässigkeit der Substanzen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in eine 384-Well CellCarrier clear bottom Platte, mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Behandlung der Zellen, mit den entsprechenden Substanzkonzentrationen, mit einer Inkubationszeit von drei Stunden und einer Temperatur von 37 °C. Als Negativkontrolle wurden mit serumfreien Medium behandelte Wells betrachtet. Vor der Färbung wurden die Zellen für 15 min mit PBS gewaschen und mit Fixierpuffer unter dem Abzug, bei RT für 30 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut drei Mal mit PBS für 5 min gewaschen. Bis zur Durchführung der Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen bei 4 °C in PBS gelagert. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Zellen für 1 h bei RT mit 20 µL/Well Blockierlösung inkubiert. Nach dem Blockieren wurden die Zellen mit 20 µL pro Well Färbelösung behandelt. Die Färbelösung bestand aus einem

Alexa488 markierten, sekundären Antikörper (1:2000), Hoechst 33258 (1:15.000) und CellMask™ Deep Red (1:5000), welche in Blockierlösung verdünnt wurden.

Die Inkubationszeit während der Färbung betrug 1 h. Während dieses Zeitraumes wurden die Zellen im Dunkeln gelagert und anschließend drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen.

3.7.1 Mikroskopische Datenanalyse

Zur Analyse wurde das automatisierte High-Content Analyse System Operetta cLSM™ (PerkinElmer Inc.) eingesetzt, welches mit einem konfokalen Mikroskop ausgestattet ist. In den vorliegenden Arbeiten, wurden die Aufnahmen in einer 40x Vergrößerung aufgenommen. Die Auswertung sowie die quantitative Analyse der Ergebnisse, erfolgte mit der Columbus Software Version 2.9.0 (PerkinElmer Cellular Inc.).

Tabelle 16: Analysierte Zellkompartimente

Ziel	Reagenz	$\lambda_{ex/em}$ [nm]
Cytoplasma	CellMask™ Deep Red	635/690
Nucleus	Hoechst 33258	405/450
Biotin	Alexa488	488/520

Der Zellkern wurde mit Hoechst 33258 angefärbt und bei 405 nm detektiert. Das Cytoplasma der Zellen, wurde mit CellMask™ Deep Red angefärbt und bei einer Wellenlänge von 635 nm detektiert. Zum Nachweis der Anreicherung der Substanzen, in den verschiedenen Zellkompartimenten, wurden die Zellen mit dem Alexa Fluor 488 markierten, sekundären Antikörper behandelt und bei einer Wellenlänge von 488 nm nachgewiesen. Für jedes Well wurden 27 Felder ausgewählt von denen Aufnahmen getätigt wurden. Nach der Bildaufnahme, wurden die Aufzeichnungen auf die Columbus Software transferiert und es folgte die Datenanalyse. Zur Quantifizierung des Fluoreszenzsignals wurde die mittlere Alexa Fluor 488 Intensität pro Well im Cytoplasma, dem Nucleus, der Membranregion und in der gesamten Zelle ermittelt. Als Kontrolle wurde die Intensität, in den unbehandelten Zellen betrachtet.

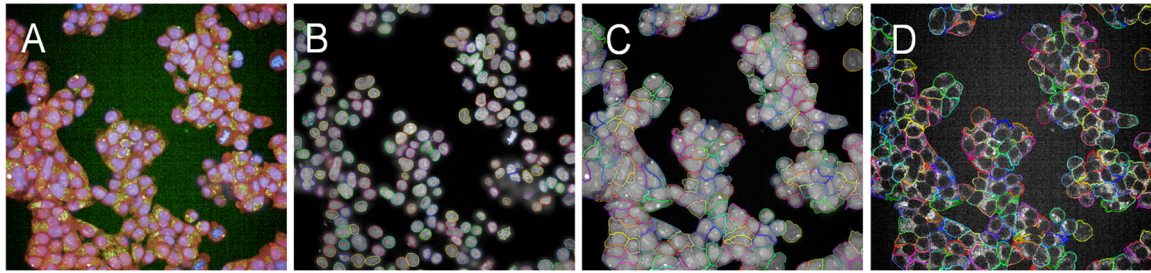


Abbildung 8: Quantifizierung der Fluoreszenzintensität.

Zur Bildanalyse wurde das Operetta cLSM™ und die Columbus Software Version 2.9.0 verwendet. A) Das Originalbild, welches mit dem Mikroskop aufgezeichnet wurde. B) Detektion des Nucleus. C) Detektion des Cytoplasmas. D) Kompartimentierung und Selektion der Membran Region.

Die Bildanalyse erfolgte entsprechend Abbildung 8. Dabei wurden zunächst die Zellkerne detektiert. Dazu wurde die Methode B der Columbus Software ausgewählt. Anschließend wurden Einstellungen zur Detektion des Cytoplasmas getätigt, bei welcher das CellMask™ Deep Red als Kanal ausgewählt und die Methode A eingestellt wurde. Mittels weiterer Einstellungen wurde die Alexa Fluor 488 Intensität, in der Membran Region und der gesamten Zelle ermittelt. Weitere Einstellungen der Columbus Software für die Analyse der mikroskopischen Bildaufnahmen sind dem Anhang zu entnehmen.

3.8 TR-FRET Assay

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), basiert auf der Annahme, dass Moleküle im angeregten Zustand strahlungsfrei Energie auf andere Moleküle im Grundzustand übertragen können. Zum Energietransfer kommt es dabei über Dipol-Dipol Wechselwirkungen (Förster, 1948). Das durch Licht angeregte, energieübertragende Molekül wird hierbei als Donor bezeichnet, während das energieempfangende Molekül als Akzeptor bezeichnet wird. Beim zeitaufgelösten Resonanz-Energie-Transfers werden Metalle der seltenen Erde, Lanthanoide, mit langlebiger Emissionsdauer als Donor Fluorophore verwendet. Während gewöhnlich Fluorophore eine Lebensdauer von Nanosekunden aufweisen, besitzen Lanthanoide eine Emissionsdauer von mehreren Mikrosekunden bis hin zu einigen Millisekunden. Im Cisbio-kit als Donatoren eingesetzte Lanthanoid-Fluorophore, sind Europium und Terbium. Bei der zeitaufgelösten (*time resolved* (TR))-FRET Analyse, erfolgt die Signalmessung nach einer kurzen lag-Phase, sodass Hintergrundsignale, ausgelöst durch Puffer, Proteine oder chemische Substanzen mit kurzlebiger Fluoreszenz, abklingen können und ausschließlich das Nutzsignal der langlebigen Lanthanoide gemessen wird (Degorce et al., 2009). Mit diesem Hintergrund weisen TR-FRET Assays hohe Beständigkeit Matrixeffekten mit kurzlebiger Fluoreszenz gegenüber auf. Ferner kann das Akzeptorsignal ins Verhältnis, mit

dem Signal des Donors gesetzt werden, sodass ein interner Standard entsteht, welcher einen Ausgleich optischer Störungen, ausgelöst durch die Anwesenheit von fluoreszierenden Substanzen, ebenso wie anderen Störkomponenten, ermöglicht. Ein wichtiges Kriterium für das Zustandekommen des FRETs ist, dass der Akzeptor im Emissionswellenbereich des Donors Energie aufnehmen kann. Die Emissionsbande des Donors sollte demnach die Adsorptionsbande des Akzeptors überlappen. Der Donor sollte eine hohe Quantenausbeute aufweisen, während der Akzeptor eine hohe Adsorption aufweist (Piston and Kremers, 2007; Yan, 2003). Ein weiteres wichtiges Kriterium ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Der FRET kommt nur dann zustande, wenn der Abstand zwischen zwei Molekülen geringer als 10 nm ist, sodass FRET-Assays oftmals zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen angewandt werden (Piston and Kremers, 2007). Die Effizienz des FRETs ist mit einer Potenz von sechs, von der Distanz zweier miteinander interagierender Biomoleküle abhängig (Gl.3).

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{[1+(r/R_0)^6]} \quad (\text{Gl.3})$$

Wobei r den Abstand zwischen Donor und Akzeptor angibt und der Förster Radius R_0 der Abstand ist, bei welchem die FRET-Effizienz bei etwa 50 % liegt. Der Förster Radius ist für jedes FRET-Paar spezifisch und kann aus den spektrometrischen Daten errechnet werden. Bei einem Abstand der Moleküle größer R_0 , ist die FRET-Effizienz nahe null, wohingegen bei einem Abstand kleiner R_0 die Effizienz nahe dem Maximum liegt (Piston and Kremers, 2007).

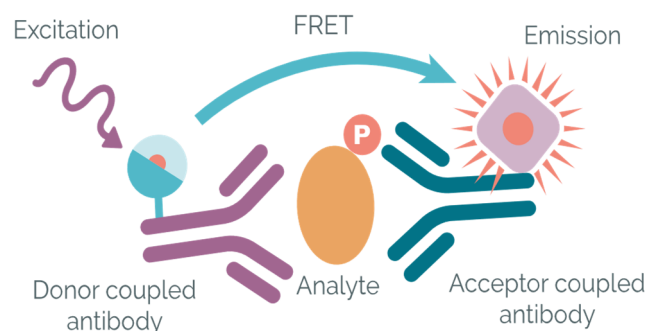


Abbildung 9: Ablauf der Signalentstehung beim TR-FRET Assay. Wenn Donor und Akzeptor miteinander interagieren, entsteht ein FRET-Signal. Die Anregung des Donors erfolgt bei 320 nm. Der Donor überträgt strahlungsfrei Energie auf den Akzeptor und dieser emittiert bei 665 nm. (Quelle: Cisbio, HTRF Assay Principle, 2021)

In den vorliegenden Arbeiten wurde das Kinase-Biotin Binding Discovery Kit von Cisbio (Perkin Elmer Inc.) verwendet. Das Lanthanoid Europium wurde hierbei als Eu^{3+} -Kation eingesetzt, welches in einem Kryptat eingebettet ist. Diese im Kryptat eingebettete Struktur verleiht dem Europium die Stabilität und somit die Langlebigkeit (Jia, 2008). Im Assay wurde

das Kryptat bei einer Wellenlänge von ~ 320 nm angeregt und emittierte bei einer Wellenlänge von ~ 615 nm über mehrere Millisekunden hinweg. Das GST-Eu-Kryptat war hierbei der Donor und ein d2 markierter Inhibitor, das Staurosporin-Red, der Akzeptor. Wenn beide Moleküle in räumliche Nähe zueinander gelangen, kann durch Anregung des Donors ein FRET-Signal auf den Akzeptor übertragen werden (Abb.9). Dadurch wird der Akzeptor angeregt und emittiert bei einer Wellenlänge von ~ 665 nm. Nach der Anregung wird mit dem EnVision von Perkin Elmer Inc. bei einer Wellenlänge ~ 320 nm und einem Delay von 50 ms simultan auf zwei Detektoren die Emission bei ~ 665 nm und ~ 615 nm gemessen.

Vorliegend wurden Kompetitions-Assays zum Nachweis der Bindungsaffinität der ATP-Analoga an die MAP2K1 Kinase eingesetzt. Bei der kompetitiven Inhibition bindet der Inhibitor ausschließlich an ein freies Enzym, nicht an ein Enzym-Substrat-Komplex. Es beschreibt die Bindung eines Enzyms an einen Liganden, welcher die katalytische Aktivität des Enzyms mindert oder vollständig inhibiert. Der Mechanismus wird als kompetitiv bezeichnet, weil der Inhibitor mit dem Substrat um die Bindung an die katalytische Domäne des Enzyms konkurriert. Durch das Blockieren der katalytischen Domäne des Enzyms, für das eigentliche Substrat, wird kein Produkt gebildet. Die kompetitive Hemmung ist reversibel und kann durch Erhöhung der Konzentration an Substrat aufgehoben werden, wodurch der Inhibitor von der Bindungsstelle verdrängt werden kann (Strelow et al., 2004).

Mithilfe des Kinase-Biotin Binding Discovery Kits von Cisbio sollte die Bindungsaffinität des unmaskierten ATP-Analogons an die Kinase MAP2K1, im Vergleich zum hochaffinen Inhibitor Staurosporin bestimmt werden. Dazu wurden im ersten Ansatz die in Tabelle 17 bis 19 beschriebenen Kompetitions-Assays entwickelt:

Tabelle 17: FRET-Assay mit dem Eu-Kryptat

Unspezifische Bindung	Totale Bindung
10 μ L Kinase Binding Buffer	5 μ L Kinase Binding Buffer
5 μ L GST-Eu-Kryptat	5 μ L GST-Eu-Kryptat
5 μ L Staurosporin-Red	5 μ L Staurosporin-Red
5 μ L ATP- Analogon	5 μ L ATP-Analogon
	5 μ L GST markierte Kinase

Im ersten Assay wurde mit dem Europium-Kryptat und dem im Kit enthaltenen Binding Buffer von Cisbio gearbeitet.

Tabelle 18: FRET-Assay mit dem Tb-Kryptat

Unspezifische Bindung	Totale Bindung
10 µL Kinase Binding Buffer	5 µL Kinase Binding Buffer
5 µL GST-Tb-Kryptat	5 µL GST-Tb-Kryptat
5 µL Staurosporin-Red	5 µL Staurosporin-Red
5 µL ATP-Analogon	5 µL ATP-Analogon
	5 µL GST markierte Kinase

In den weiteren Versuchen wurde eine Optimierung des Assays durchgeführt und das langlebige Lanthanoid Fluorophor Europium gegen Terbium ausgetauscht, um bessere Ergebnisse zu erzielen.

Tabelle 19: FRET-Assay mit dem Tb-Kryptat und neuem Puffer

Unspezifische Bindung	Totale Bindung
10 µL Kinase Binding Buffer (w/o KF)	5 µL Kinase Binding Buffer
5 µL GST-Tb-Kryptat	5 µL GST-Tb-Kryptat
5 µL Staurosporin-Red	5 µL Staurosporin-Red
5 µL ATP-Analogon	5 µL ATP-Analogon
	5 µL GST markierte Kinase

Zur Verbesserung des FRET-Signals, wurde ein alternativer Puffer ohne Kaliumfluorid (KF) eingesetzt.

Tabelle 20: Verwendete Inhibitor Konzentration und ATP-Derivat Konzentration

Inhibitor Konzentration [nM]						
31,25	10,42	3,47	1,16	0,39	0,13	0,044
Derivat Konzentration [µM]						
66						

Die in Tabelle 20 beschriebenen Inhibitor- und Derivat-Konzentrationen wurden in den Kompetitions-Assays verwendet.

Gleichung 4 wurde zur Berechnung der spezifischen Bindung verwendet:

$$\text{Totale Bindung} - \text{Unspezifische Bindung} = \text{Spezifische Bindung} \quad (\text{Gl.4})$$

4. Ergebnisse

4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Untersuchung der Zellpermeabilität von Biotin-markierten, γ -Phosphat modifizierten Nukleosidtriphosphat Derivaten in ausgewählten Zellmodellen, wurde die Immunfluoreszenzanalyse eingesetzt. Die Ermittlung geeigneter Bedingungen zur Nachverfolgung der Zelldurchlässigkeit der Derivate, wurde unter Einsatz verschiedener Ansätze ausprobiert. Die Internalisierungsuntersuchungen erfolgten unter Verwendung von 7, 22, 66, 200, 500 und 1000 μM des jeweiligen ATP-Analogons. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen ATP-Derivat wurden die Zellen fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der Einsatz von verschiedenen Konzentrationen ermöglichte Aussagen über die Effektivität der zellulären Aufnahme und der Toleranz der Zellen den Analoga gegenüber bei unterschiedlich hohen Konzentrationen. Auf diese Weise wurde eine Eingrenzung der einzusetzenden Konzentrationen ermöglicht. Durch die Membrangängigkeit der Analoga kommt es zu einer Ausbreitung der Substanzen innerhalb der Zelle und dadurch zu einer eventuellen Markierung von Kinasen und einer damit einhergehenden Möglichkeit zur Nachverfolgung ihrer Aktivität. Das richtige Zellmodell ist hierbei ein sehr wichtiger Aspekt, der ebenfalls betrachtet werden sollte. Um einen Vergleich über das Aufnahmeverhalten der getesteten Zellmodelle den Analoga gegenüber zu erhalten, wurden diese unter identischen Bedingungen behandelt. Es konnten Ergebnisse für die Zelllinien Hek293, A459, HepG2 und Caco-2 ermittelt werden.

4.1.1 Analyse von Hek293 Zellen

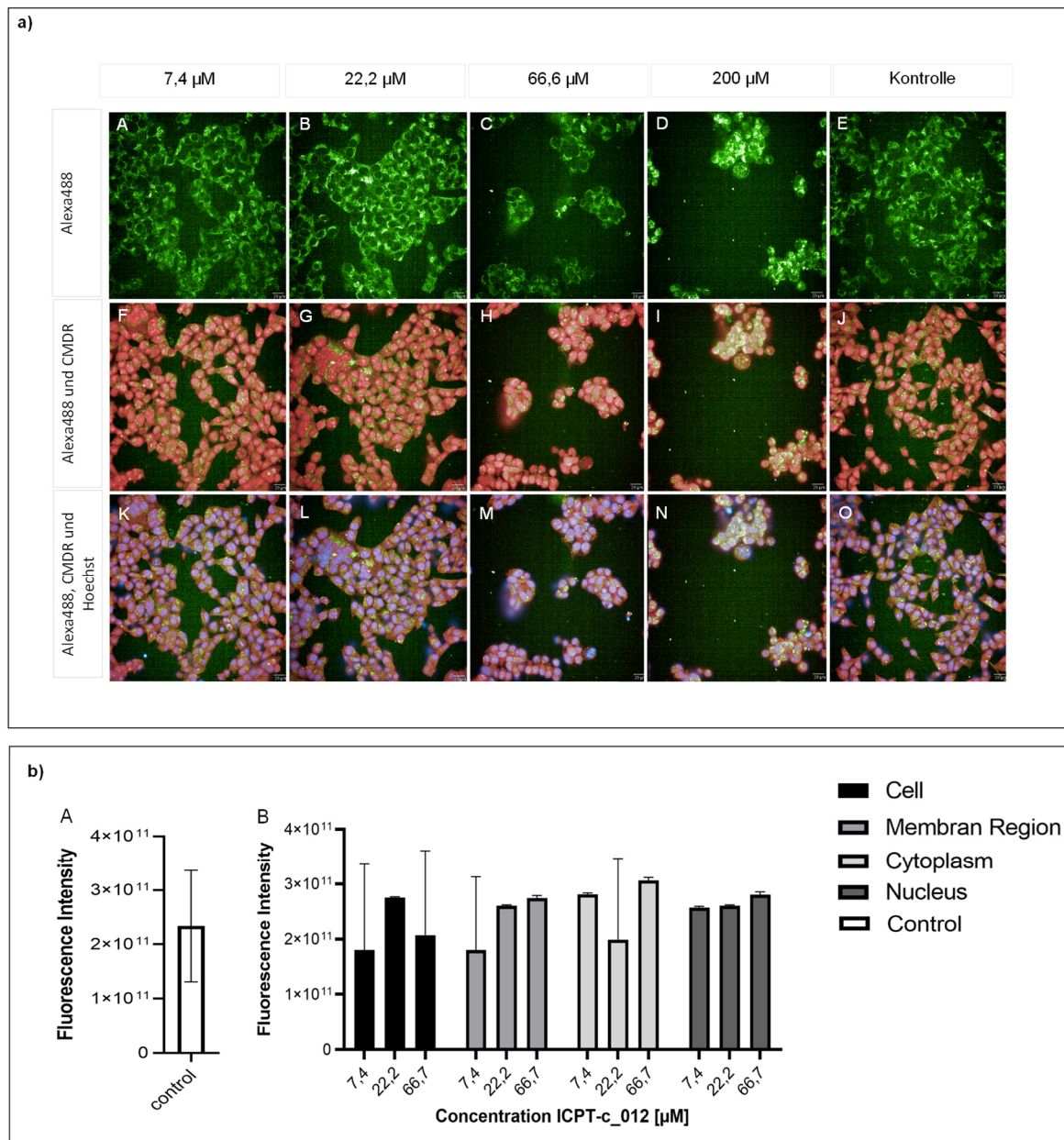


Abbildung 10: Immunfluoreszenzaufnahmen von Hek293 Zellen, nach der Inkubation mit dem ATP-Analogen ICPT-c_012. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

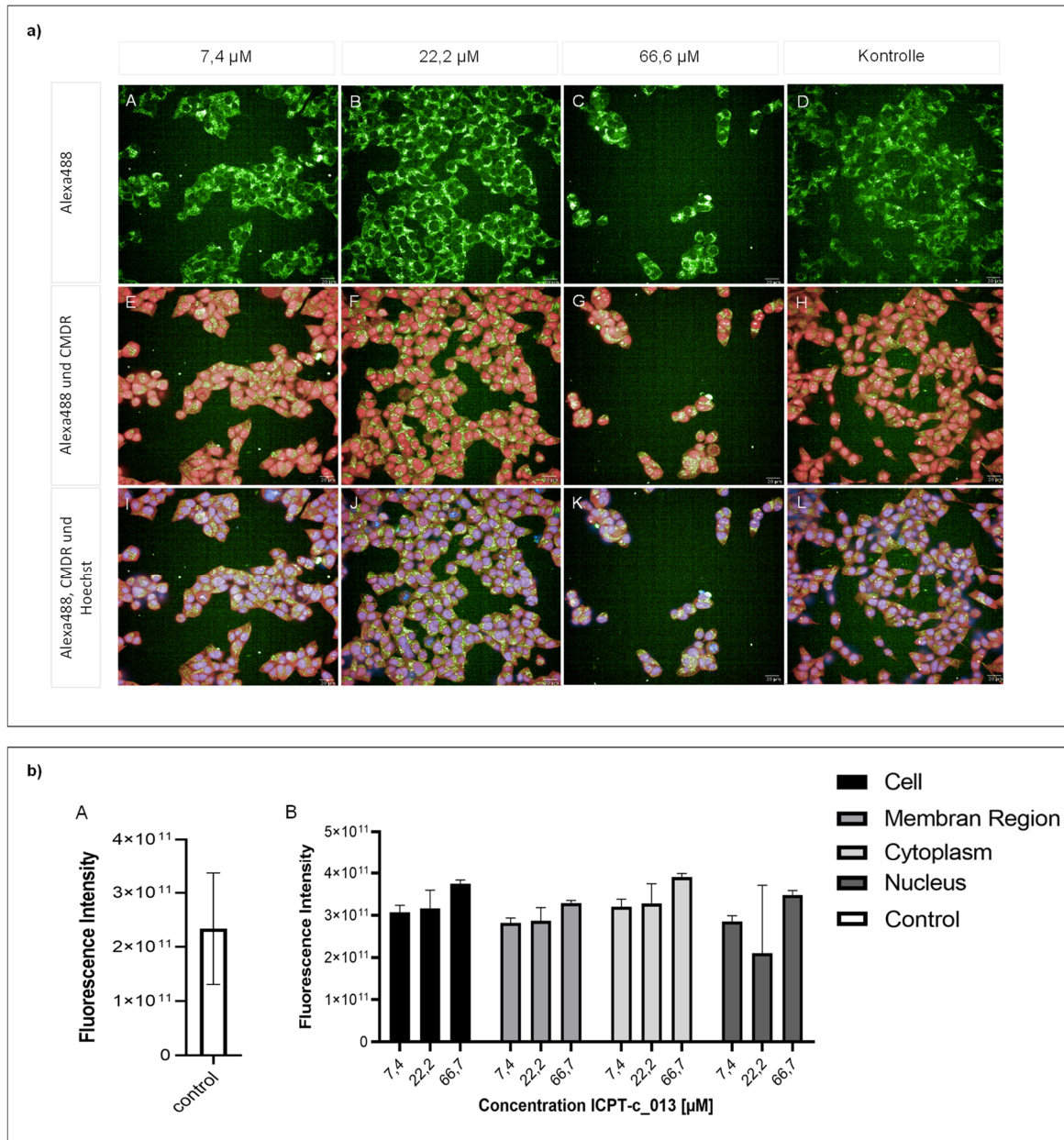


Abbildung 11: Fluoreszenzaufnahmen von Hek293 Zellen, welche mit dem ATP-Analagon ICPT-c_013 behandelt wurden a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

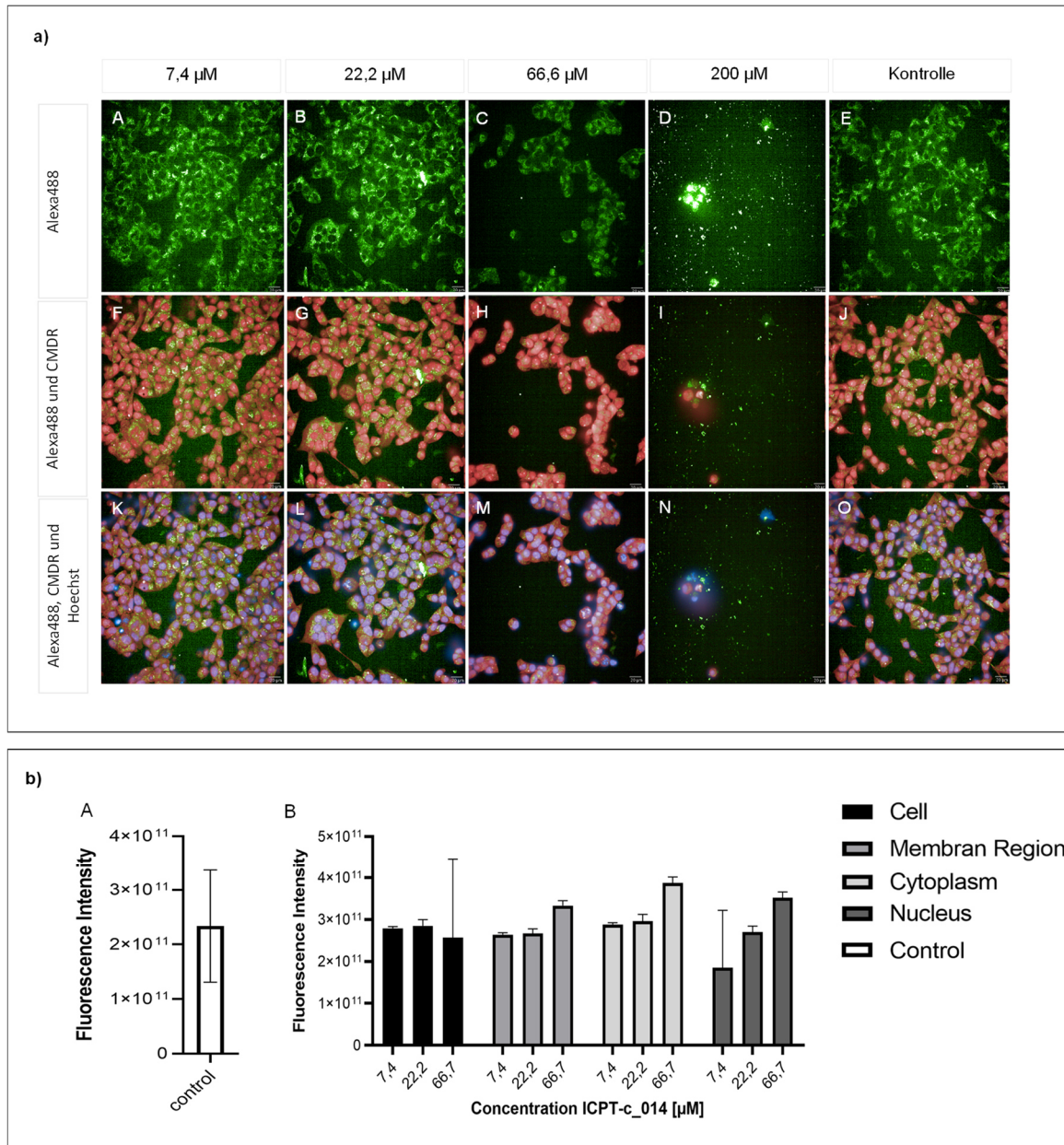


Abbildung 12: Fluoreszenzaufnahmen von Hek293 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_014 behandelt wurden a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

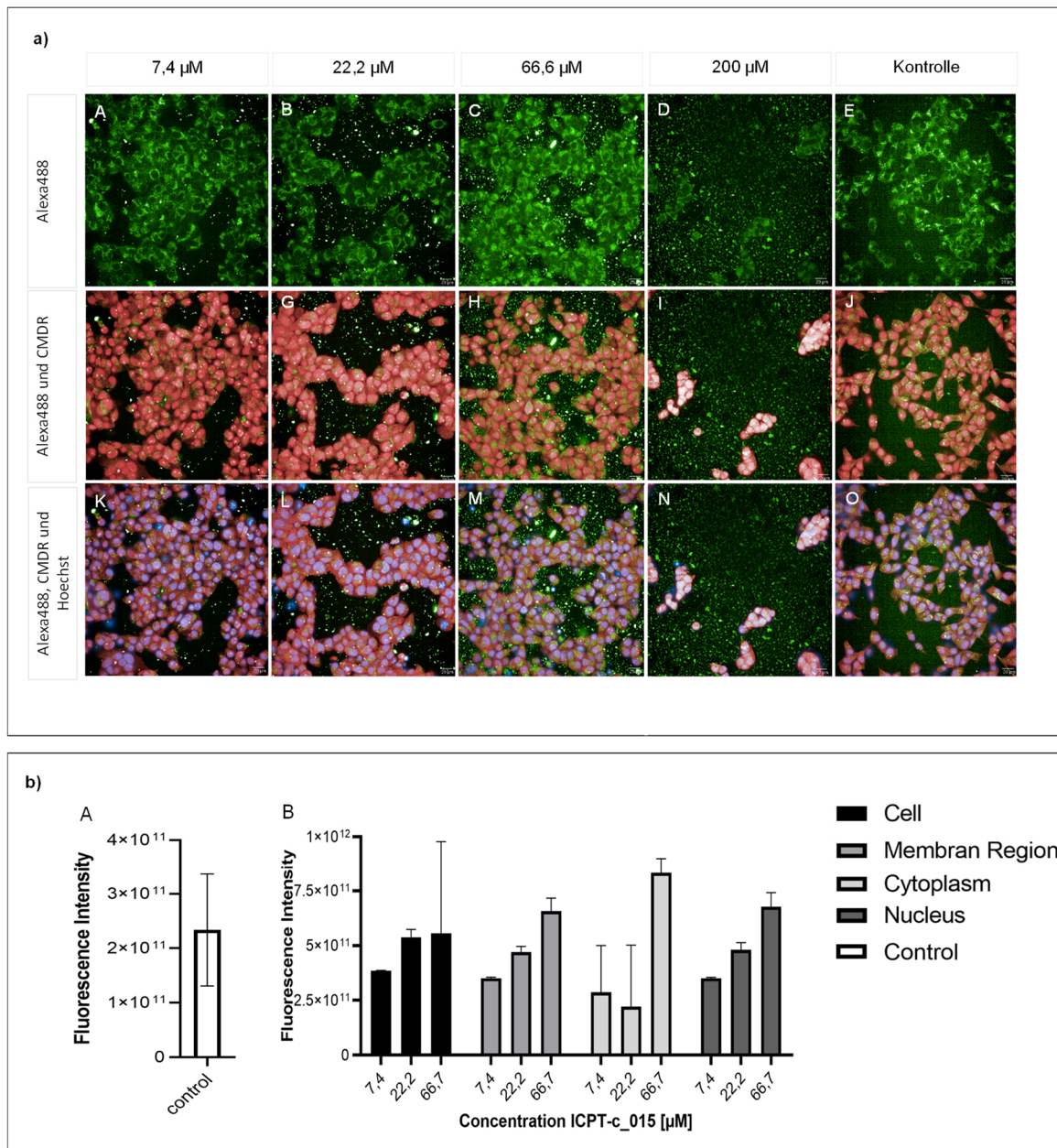


Abbildung 13: Fluoreszenzaufnahmen von Hek293 Zellen, welche mit dem ATP-Analogon ICPT-c_015 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Hek293 Zellen sind humane embryonale Nierenzellen (engl.: *human-embryonic-kidney*) (Simmons, 1990). Abbildung 10 zeigt die erhaltenen Mikroskopie Ergebnisse nach Behandlung von Hek293 Zellen mit dem ATP-Analogon ICPT-c_012 (C9). Den mikroskopischen Aufnahmen ist zu entnehmen, dass die Zellen bei der geringen Konzentration von 7,4 μM an Substanz, im Vergleich zu der Kontrolle, geringer fluoreszieren. Ab 22 μM wird die Substanz

besser in die Zelle aufgenommen und es ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität, in der gesamten Zelle nachweisbar (Abb.10b). Bei 66 μM fluoresziert das Cytoplasma am stärksten, wobei den mikroskopischen Aufnahmen entnommen werden kann, dass die Zellen ab dieser Konzentration beginnen, apoptotisches Verhalten aufzuweisen. Sie lösen sich unter diesen Umständen vom Well ab und werden weggeschwemmt. Die Ergebnisse der Fluoreszenzintensität ab 200 μM wurden nicht dargestellt, da die Hek293 Zellen bereits bei Konzentration um 66 μM beginnen abzusterben. Wenn Zellen in die Apoptose gehen, setzen sie autofluoreszierende Substanzen aus den Mitochondrien frei, wodurch es zu einer Verfälschung der Ergebnisse bei der Ermittlung der Fluoreszenzintensität kommen kann. Die Negativkontrolle zeigt unter Abwesenheit der ATP-Analoga keine hohe Autofluoreszenz. Nach Inkubation der Hek293 Zellen mit dem C9-Analogen, wurden demnach bei geringen Konzentrationen schwach fluoreszierende Signale detektiert und folglich mit steigenden Konzentrationen höhere Signale. Die Lokalisation des Signals erfolgte dabei insbesondere aus dem Cytoplasma. Es ist folglich ein Effekt der C9 Substanz, nach Eindringen in die Zelle erkennbar.

Abbildung 11 zeigt die erhaltenen mikroskopischen Ergebnisse nach Behandlung von Hek293 Zellen mit dem ATP-Analogen ICPT-c_013 (C12). Nach Behandlung der Zellen mit diesem ATP-Derivat, verhalten sich die Zellen sehr ähnlich, wie nach der Behandlung mit der Substanz C9. Es ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität, in der gesamten Zelle, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, erkennbar. Aus den konfokalen Bildaufnahmen ist bereits bei 66 μM ein stark toxischer Effekt dieser Substanz den Zellen gegenüber erkennbar (Abb.11a), wohingegen die Zellen nach Behandlung mit der Substanz C9, erst bei 200 μM eine solch stark sichtbare Reaktion zeigten. Dennoch war eine Lokalisation der Substanz innerhalb der Zellen bis zu Konzentrationen zwischen 20 und 60 μM möglich gewesen.

In Abbildung 12 sind die erhaltenen mikroskopischen Aufnahmen, nach Behandlung der Hek293 Zellen mit dem ATP-Analogen ICPT-c_014 (C15) zu sehen. Bei geringen Konzentrationen des ATP-Derivates sind ähnliche Ergebnisse, wie nach Behandlung mit den bisher beschriebenen Substanzen C9 und C12 zu erkennen. In Abbildung 12b lässt der Anstieg der Fluoreszenzintensität im Cytoplasma, bei Konzentrationen um 66 μM , auf eine dortige Anreicherung der Substanz schließen. Jedoch zeigen die konfokalen Ergebnisse bereits einen Beginn der Toxizität. Die Zellen, welche sich noch im jeweiligen Well befinden, fluoreszieren entsprechend besonders stark. Hintergrund hierfür ist, dass apoptotische Zellen in einem

solchen Zustand, verschiedene Substanzen innerhalb der Zelle freisetzen, unter anderem auch endogen biotinylierte Proteine aus den Mitochondrien, welche dann durch den sekundären Antikörper detektiert werden. Ein eindeutig konzentrationsabhängiges Verhalten des ATP-Analogons, ist demnach nicht sichtbar, da bereits bei 66 μM ein toxischer Effekt beginnt.

In Abbildung 13 sind die konfokalen Bildaufnahmen, sowie die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität, nach Behandlung von Hek293 Zellen mit dem ATP-Analogon ICPT- c_015 (C18) zu sehen. Es handelt sich hierbei um die lipophilste, zu testende Substanz, mit einer Kohlenstoffkette von 18 C-Atomen. Mit diesem Derivat lassen sich die Zellen sehr gut anfärben und in allen untersuchten Zellregionen ist ein ähnlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität nachweisbar. Die gemessene Fluoreszenzintensität bei diesem Analogon ist deutlich höher, als in der unbehandelten Kontrolle. Insbesondere das Cytoplasma zeigt bereits bei 66 μM einen hohen Gehalt an Substanz. Auch der Vergleich der Intensitätsergebnisse mit den Bildaufnahmen der Mikroskopie verdeutlicht, dass die Zellen bei der Konzentration um 66 μM im Alexa488 Kanal, deutlich intensiver fluoreszieren, als die Kontrolle. Bei höheren Konzentrationen als 66 μM ist die Substanz ähnlich wie die anderen bisher beschriebenen Substanzen toxisch. Außerdem konnte während der Arbeiten im Labor, ein Präzipitieren der Substanz beobachtet werden, was auch in den mikroskopischen Bildaufnahmen erkennbar ist (Abb.13). Dieser Umstand führt beim Anfärben der Zellen dazu, dass auch die ausgefallenen Partikel angefärbt werden. Das Resultat sind Bildaufnahmen mit nachweislich sehr vielen Hintergrundsignalen. Dennoch konnte eine spezifische Aufnahme des Derivates in die Zellen nachgewiesen werden.

4.1.2 Analyse von A549 Zellen

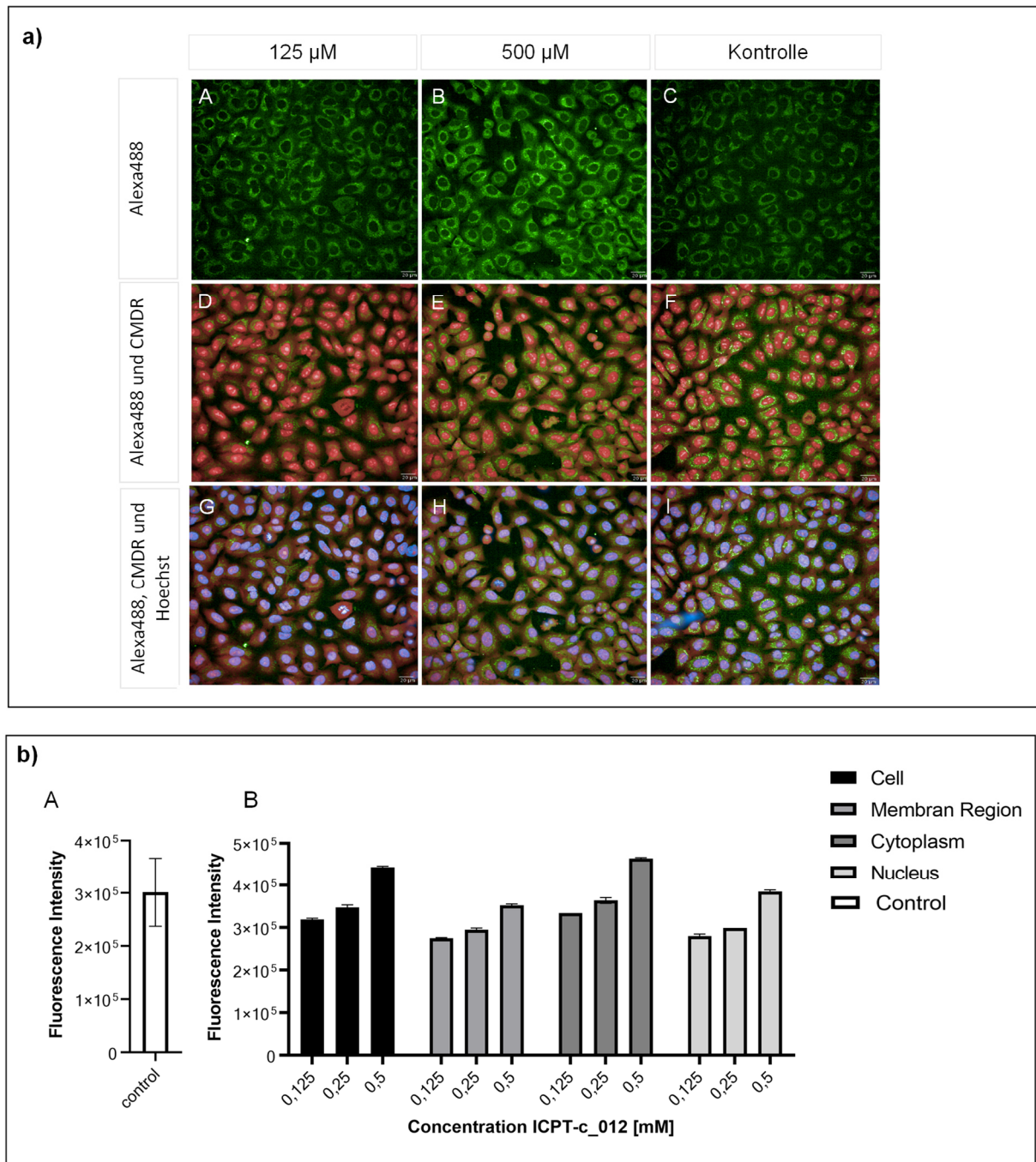


Abbildung 14: Fluoreszenzaufnahmen von A549 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_012 behandelt wurden.

a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μ m. b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

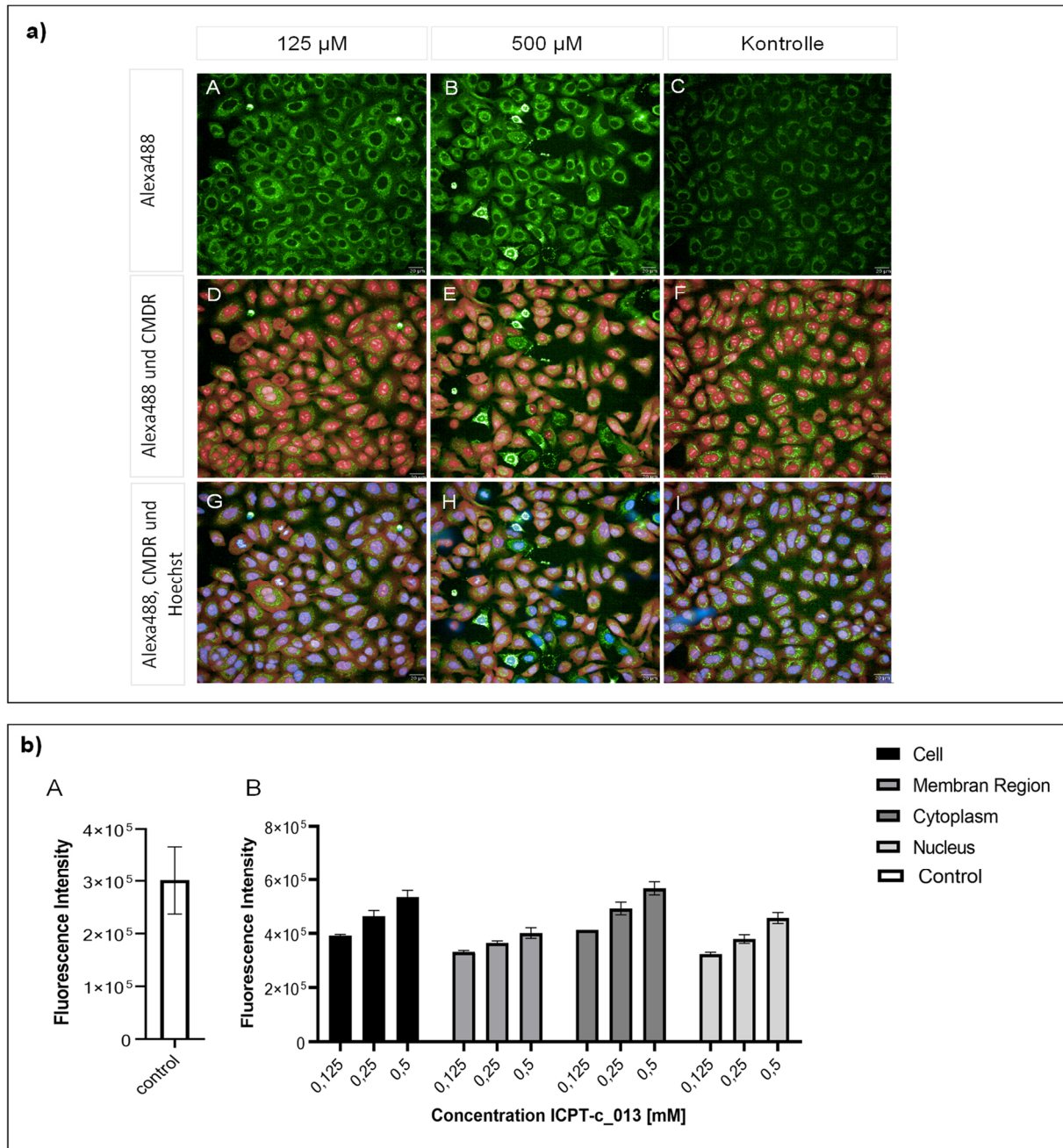


Abbildung 15: Fluoreszenzaufnahmen von A549 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_013 behandelt wurden.

a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μ m. b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

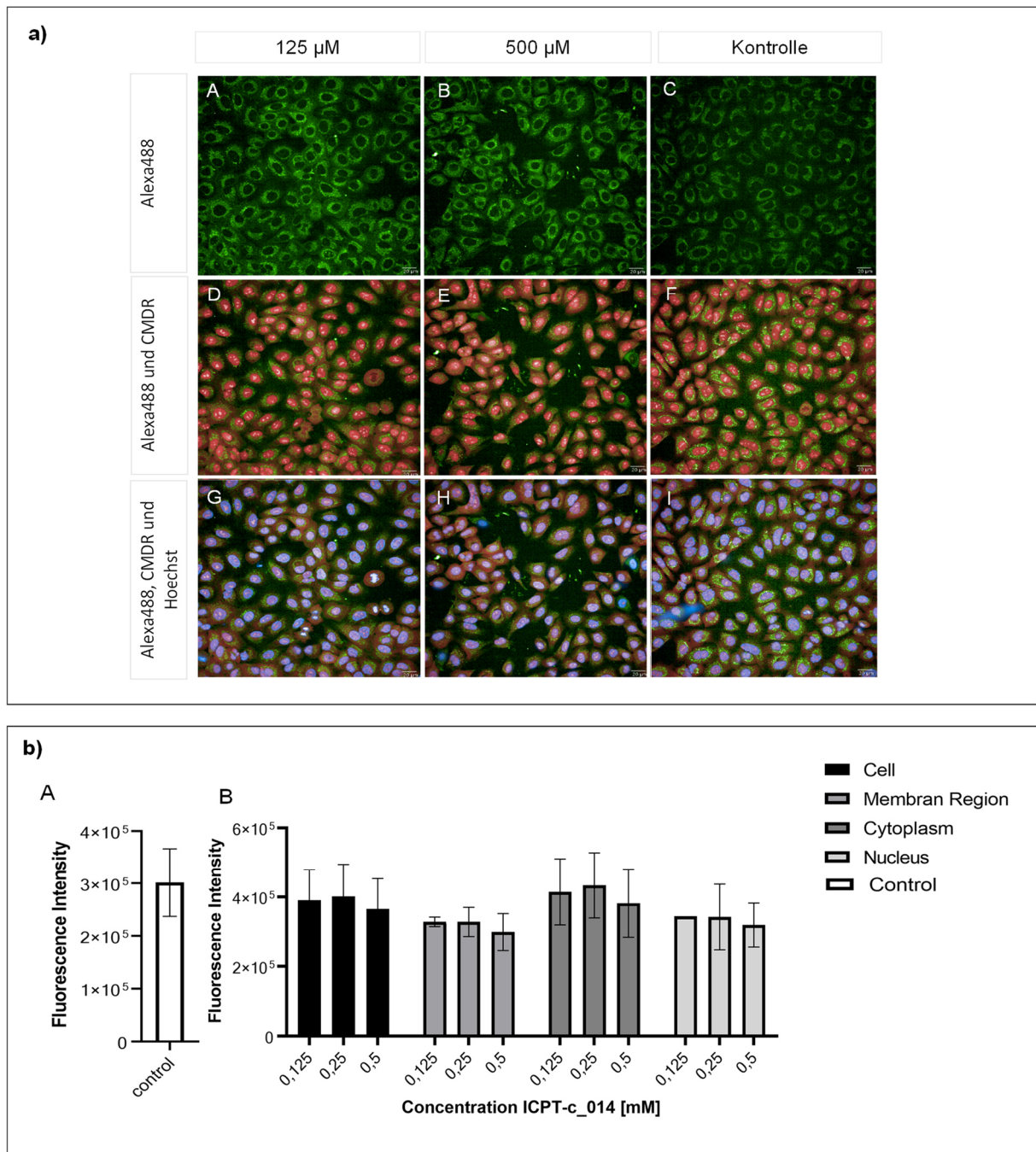


Abbildung 16: Fluoreszenzaufnahmen von A549 Zellen, welche mit dem ATP-Analogon ICPT-c_014 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

A549 Zellen sind humane Alveolarepithelzellen Typ II, welche aus dem Lungenkarzinom eines 58 Jahre alten Mannes etabliert wurden (Lieber et al., 1976). In Abbildung 14 sind die erhaltenen Bildaufnahmen der Mikroskopie, sowie die Quantifizierung der mittleren

Fluoreszenzintensität des Alexa Fluor 488 markierten, sekundären Antikörpers, in den ausgewählten Zellkompartimenten zu sehen.

Hierbei wurden A549 Zellen mit dem ATP-Analogon ICPT-c_012, mit einer Kohlenstoffkette von 9 C-Atomen behandelt. Die Internalisierungsuntersuchungen erfolgten unter Verwendung von 125, 250, 500, 1000 und 2000 μM des jeweiligen ATP-Derivates. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensität in den untersuchten Zellkompartimenten verdeutlicht eine wesentlich höhere Intensität in den behandelten Wells, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. In allen Zellkompartimenten ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität nachweisbar, insbesondere im Cytoplasma und im Zellkern. Eine ungewöhnlich hohe Anlagerung der Substanz in der Membran Region erfolgt nicht. Die A549 Zellen sind außerdem der Substanz gegenüber wesentlich robuster, im Vergleich zu den Hek293 Zellen. Selbst bei hohen Konzentrationen von 125 μM zeigen die Zellen eine hohe Beständigkeit der Substanz gegenüber. Substanzkonzentrationen von bis zu 500 μM können die Zellen tolerieren, ohne apoptotisches Verhalten aufzuweisen, sodass eine sehr gute dosisabhängige Färbung der Zellen erfolgt und eine Inkorporation des Analogons in die Zellen nachweisbar ist.

Abbildung 15 stellt die erhaltenen konfokalen Bildaufnahmen, wie auch die Intensitätsmessung in den, mit dem ATP-Analogon ICPT-c_013 behandelten, A549 Zellen dar. Im roten Kanal ist die Färbung des Cytoplasmas dargestellt. Dieser Kanal ermöglicht die Untersuchung der zellulären Verteilung des Analogons. Die Ergebnisse nach Behandlung der Zellen mit dieser Substanz sind ähnlich zu den vorherigen Ergebnissen. Auch bei diesem Analogon ist ein sehr guter spezifischer Anstieg in den untersuchten Zellkompartimenten zu erkennen, insbesondere im Cytoplasma. Die Fluoreszenzintensität steigt konzentrationsabhängig an und selbst bei hohen Konzentrationen von 500 μM sind noch genügend Zellen in den Wells vorhanden. Wobei intensiv leuchtende Bereiche bei 500 μM auf Zellen hindeuten können, welche beginnen apoptotisches Verhalten aufzuweisen.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der behandelten A549 Zellen mit dem ATP-Analogon ICPT- c_014 (C15). Den mikroskopischen Bildaufnahmen kann entnommen werden, dass diese Substanz, im Vergleich zu den beiden vorherig beschriebenen Substanzen, nicht konzentrationsabhängig von den Zellen aufgenommen wurde. Es wäre auch möglich, dass die konzentrationsabhängige Aufnahme bei dieser Substanz bei 125 μM eine Sättigung besitzt. Ein spezifischer Anstieg in den einzelnen Zellkompartimenten ist nicht sichtbar. Dennoch ist die Fluoreszenzintensität im Cytoplasma höher als in der Kontrolle, sodass eine Aufnahme der

Substanz ins Cytosol nachweisbar ist.

Für die Substanz C18 konnten keine mikroskopischen Aufnahmen in A549 Zellen erhalten werden, da diese Substanz bei hohen Konzentrationen sehr stark ausfällt. Bei einer Konzentration von 100 bis 200 μM sind die Zellen zwar noch nicht lysiert, aber die Substanz fällt so stark aus, dass die behandelten Zellen vom Detektor nicht erfasst werden können (Abb.17).

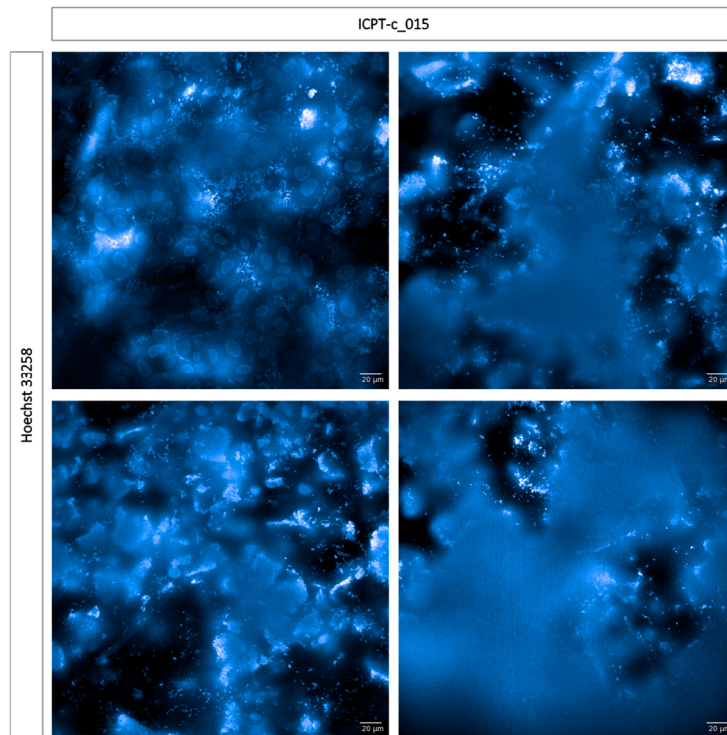


Abbildung 17: A549 Zellen nach Behandlung mit dem ATP-Analogon ICPT-c_015 (C18). Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 250 μM des ATP-Analogons behandelt und sind im Hoechst-Kanal dargestellt.

Auf den Zellen sind Präzipitate zu erkennen. Eine Bildanalyse wird durch das Ausfallen der Substanz sehr erschwert. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm .

In Abbildung 17 sind die A549 Zellen nach Behandlung mit dem ATP-Analogon ICPT-c_015 zu sehen. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 250 μM behandelt. Die mikroskopischen Bildaufnahmen zeigen große Präzipitate auf den Zellen, sodass ein Auszählen der Zellen, wie auch eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erschwert wurden. Durch die besonders fettige Konsistenz der Substanz war diese sehr schwer löslich im Medium. Das Präzipitieren des Analogons äußert sich in Kreuzreaktionen mit Farbstoffen in allen untersuchten Kanälen.

4.1.3 Analyse HepG2 Zellen

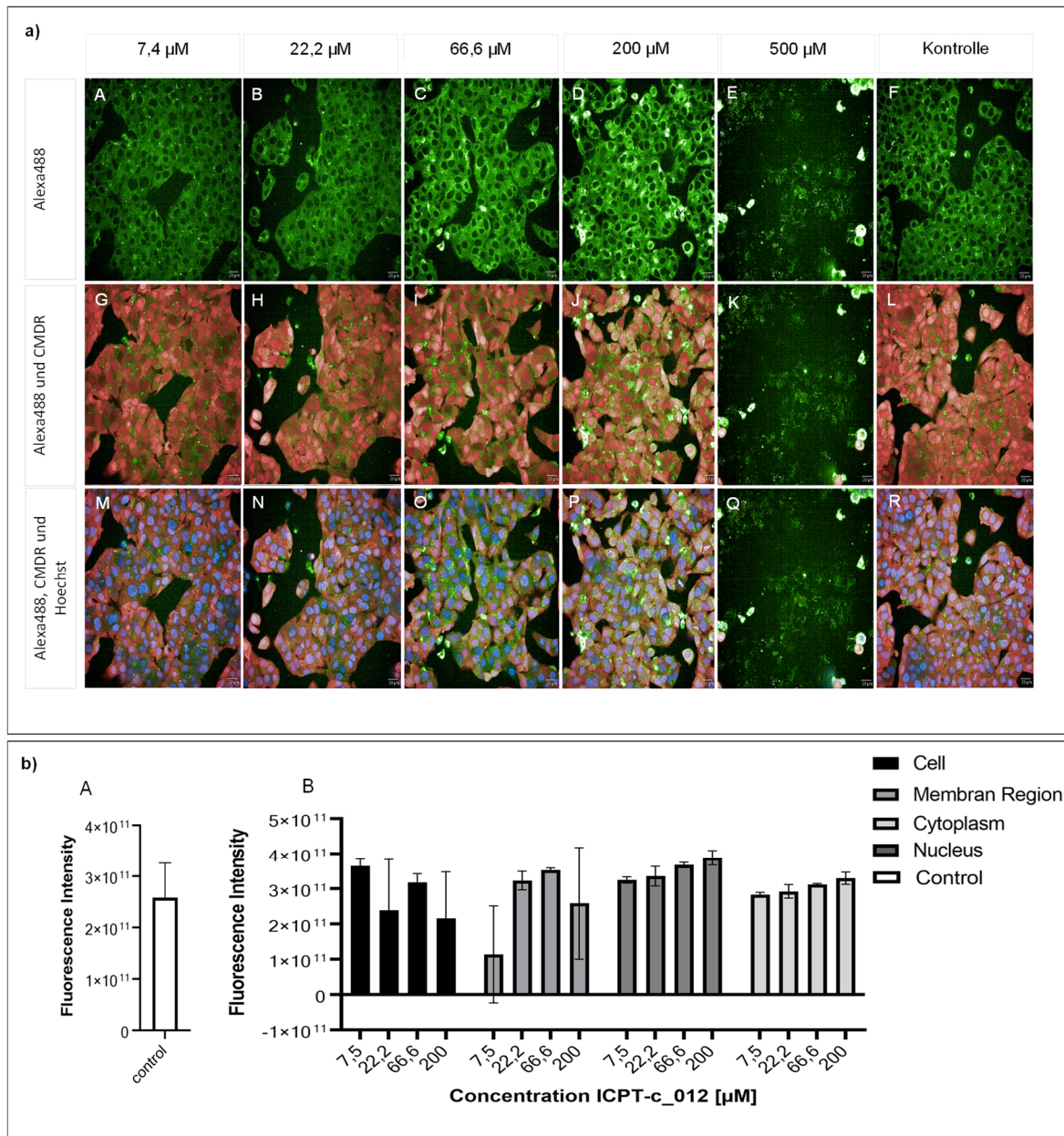


Abbildung 18: Fluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogon ICPT-c_012 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

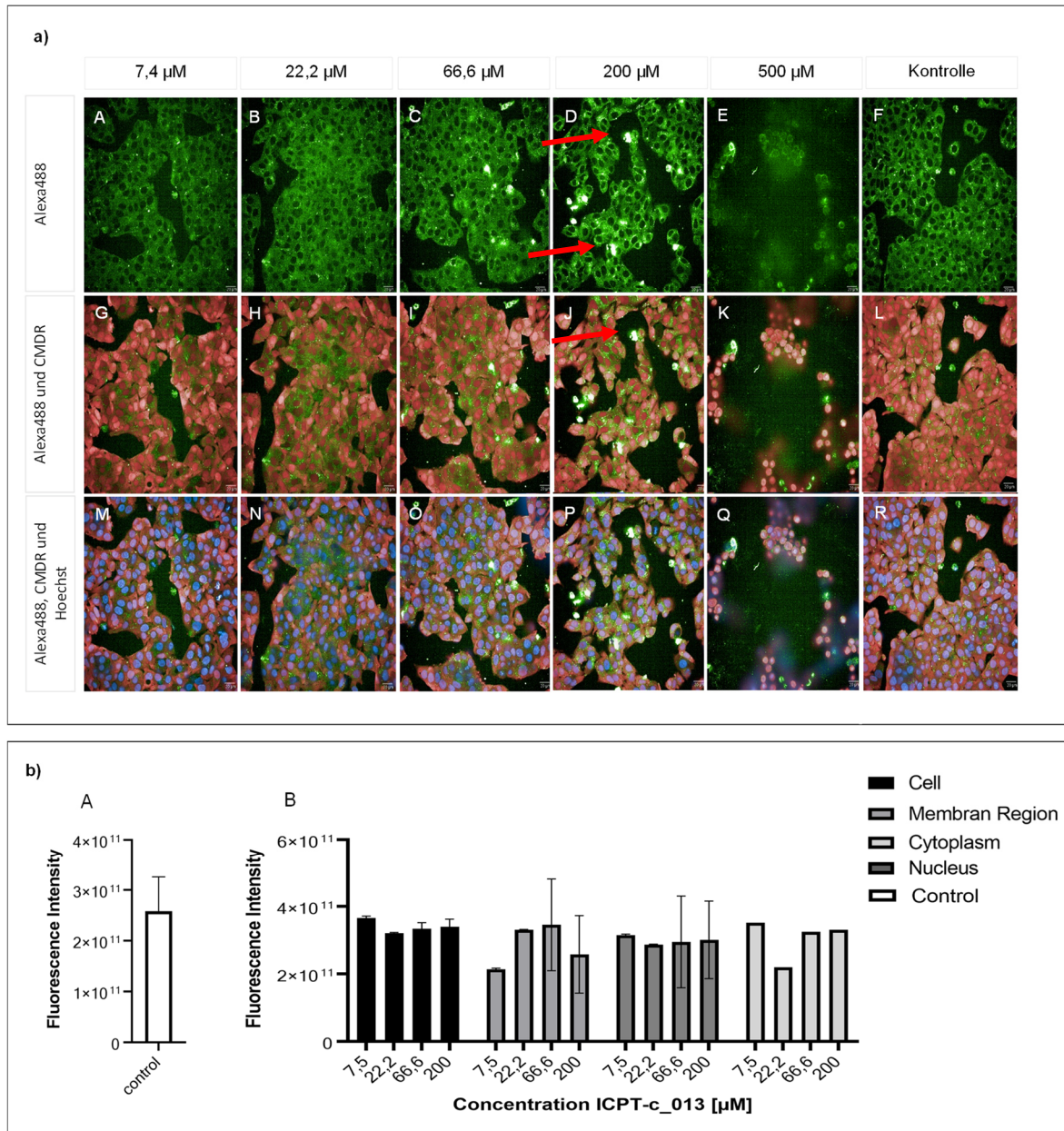


Abbildung 19: Fluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_013 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

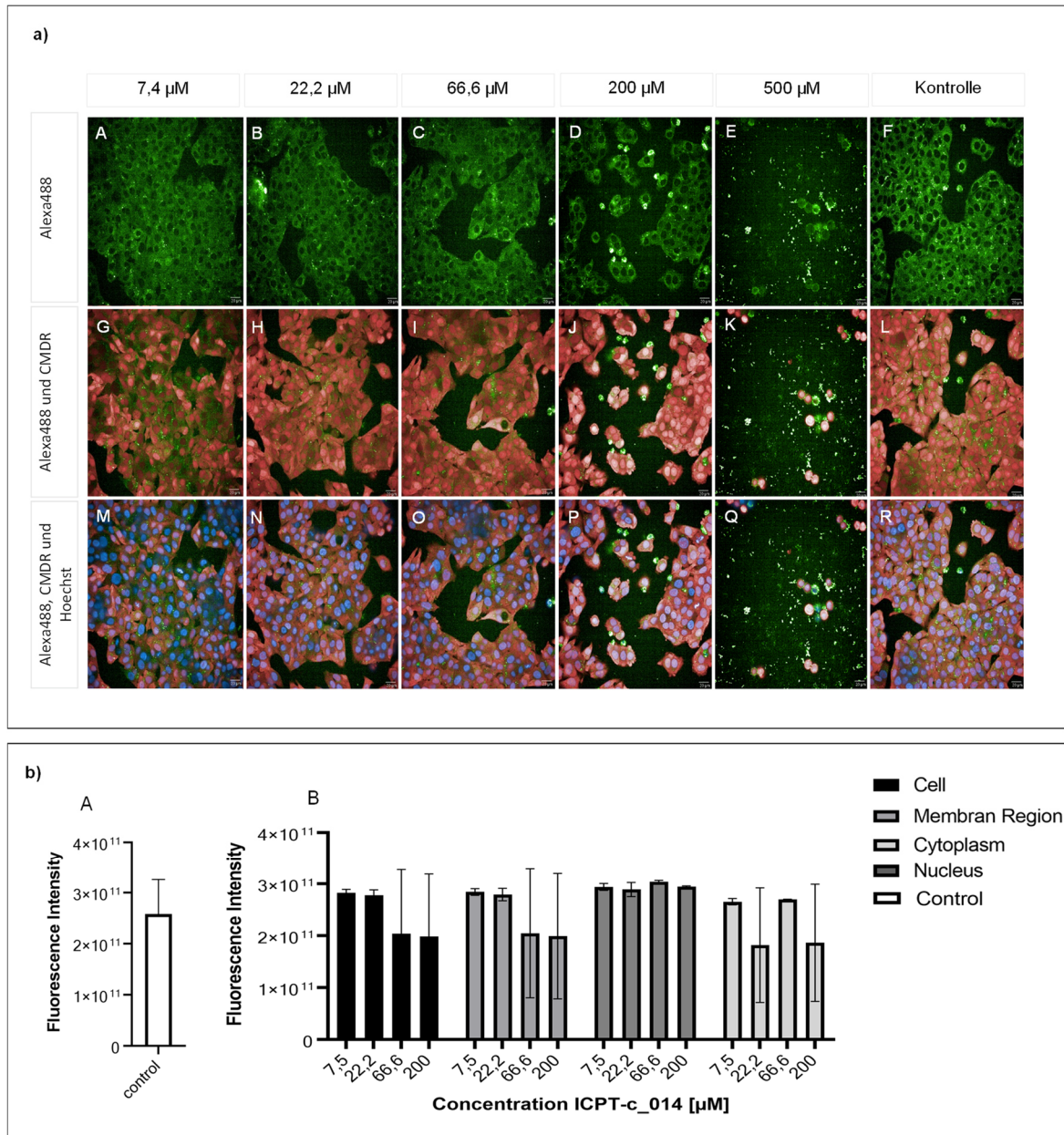


Abbildung 20: Fluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogon ICPT-c_014 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

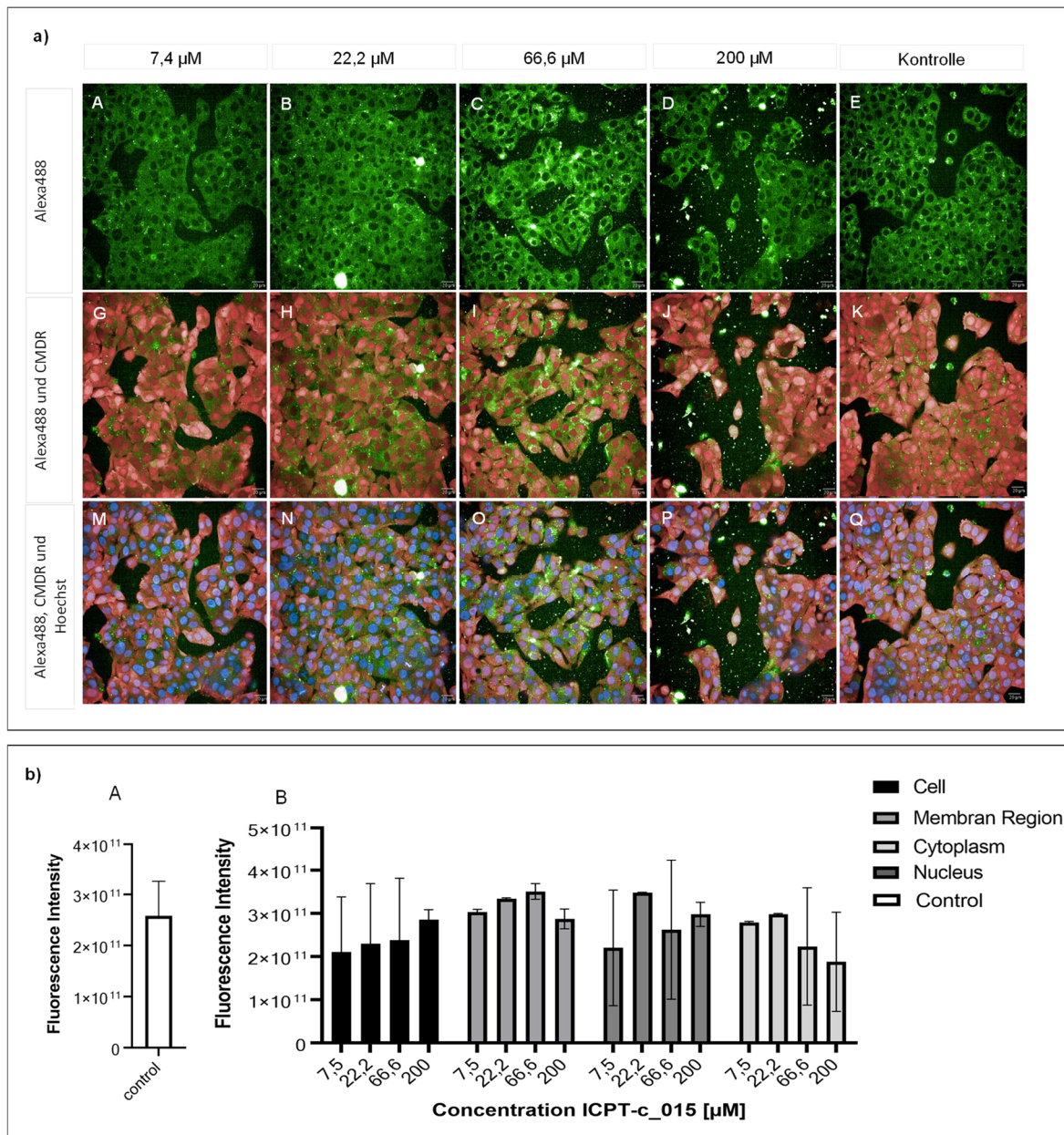


Abbildung 21: Fluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogon ICPT-c_015 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 µm. b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

In Abbildung 18 sind die erhaltenen Bildaufnahmen sowie die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität, nach Behandlung von HepG2 Zellen, mit dem ATP-Analogon ICPT- c_012 (C9), zu sehen. Auch bei diesen Zellen ist eine Zunahme der Alexa Fluor 488 Intensität in den untersuchten Zellkompartimenten, zu erkennen. Bis 66 µM an Substanz ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität im Cytoplasma zu beobachten. Ab 200 µM sind erste

apoptotische Zellen in den Wells erkennbar. Dies äußert sich auch im Anstieg der Fluoreszenzintensität. Bei 500 μM wurden die meisten apoptotischen Zellen bereits gewaschen. Bei geringen Konzentrationen ist insbesondere die Intensität im Cytoplasma nach Behandlung der Zellen mit diesem Analogon höher, als die Intensität der unbehandelten Kontrolle. Folglich konnte eine erfolgreiche Lokalisation der Substanz im Cytosol mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

In Abbildung 19 sind die konfokalen Bildaufnahmen der HepG2 Zellen nach drei stündiger Inkubation, mit der Substanz ICPT-c_013 (C12) zu sehen. Nach Behandlung der Zellen mit diesem ATP-Analogon ist den Bildaufnahmen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Alexa Fluor 488 Intensität zu entnehmen, wobei die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität in den Zellkompartimenten, diesen Ergebnissen widerspricht. Eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität im Cytoplasma, wie auch in der gesamten Zelle, wurde nicht detektiert. Die Membranregion fluoresziert hierbei genauso intensiv, wie das Cytoplasma. Ein eindeutig zuordnungsfähiger Effekt der Substanz war nicht nachweisbar. Bis 66 μM ist eine Toleranz der Zellen dieser Substanz gegenüber zu erkennen. Ab 200 μM sind erste apoptotische Zellen sichtbar. Die mit Pfeilen in der Abbildung 19 markierten, hellleuchtenden Punkte, deuten auf apoptotische Zellen hin, welche in diesem Zustand fluoreszierende Proteine innerhalb der Zelle freisetzen. Nach Behandlung der HepG2 Zellen mit dem ATP-Analogon C15 ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied, zu den vorherigen Ergebnissen nachweisbar. In Abbildung 20 ist zu sehen, dass die Zellen unter Einfluss dieses ATP-Analogons ebenfalls bei 200 μM beginnen, apoptotisches Verhalten aufzuweisen. Eine signifikant höhere, nachweisbare Fluoreszenzintensität im Cytoplasma, sowie in der gesamten Zelle, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, ist auch hier nicht sichtbar. Auch die Behandlung der HepG2 Zellen mit dem Analogon C18 liefert ähnliche Ergebnisse. Für die Substanz mit der längsten Kohlenstoffkette und somit die lipophilste Substanz konnte auch in diesem Zellmodell ein Präzipitieren der Substanz beobachtet werden, sodass konfokale Bildaufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop deutlich erschwert wurden. Das Ausfallen dieses Derivates konnte folglich in allen drei Zelllinien beobachtet werden.

4.1.4 Analyse Caco-2 Zellen

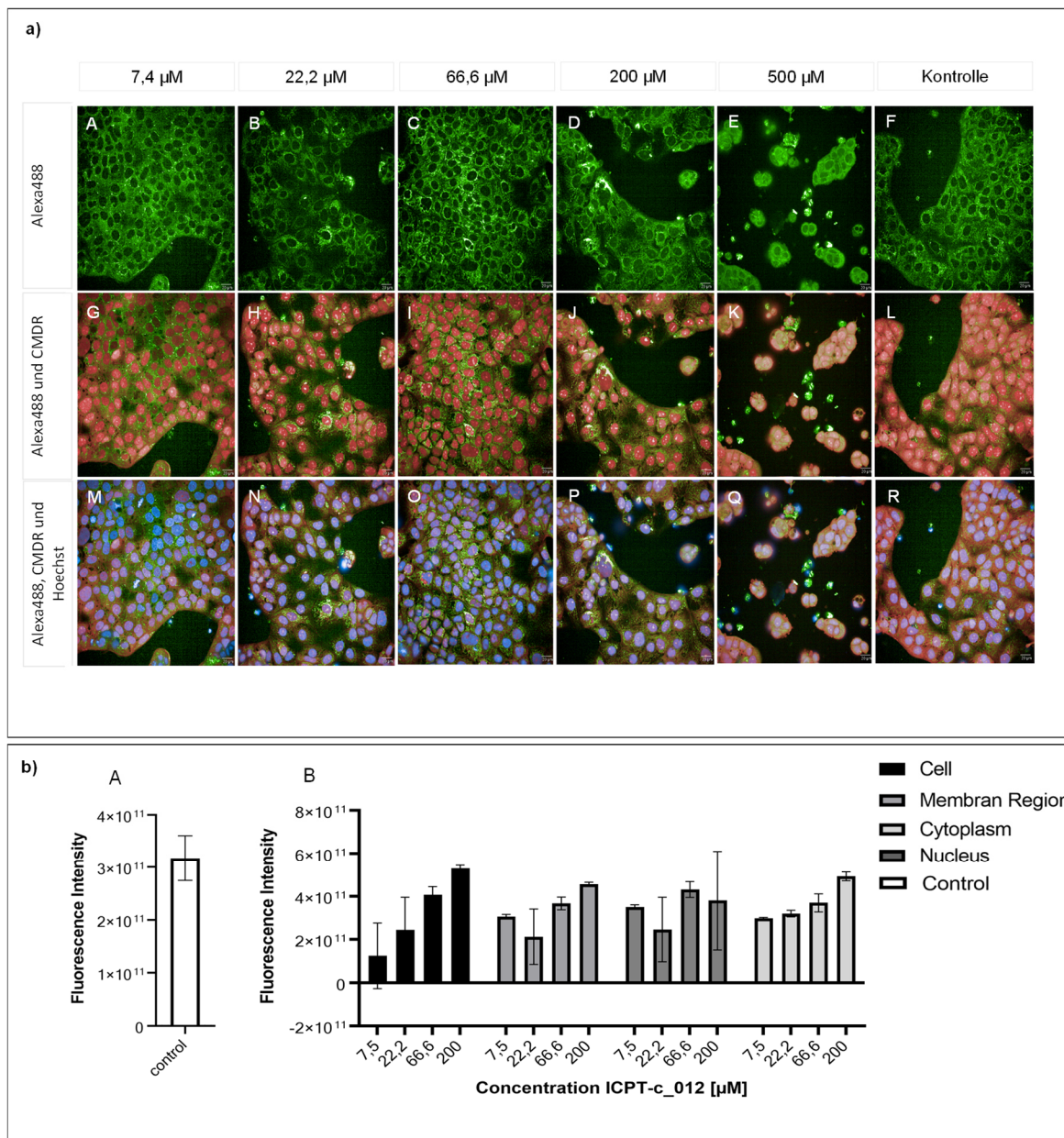


Abbildung 22: Fluoreszenzaufnahmen von Caco-2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogon ICPT-c_012 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

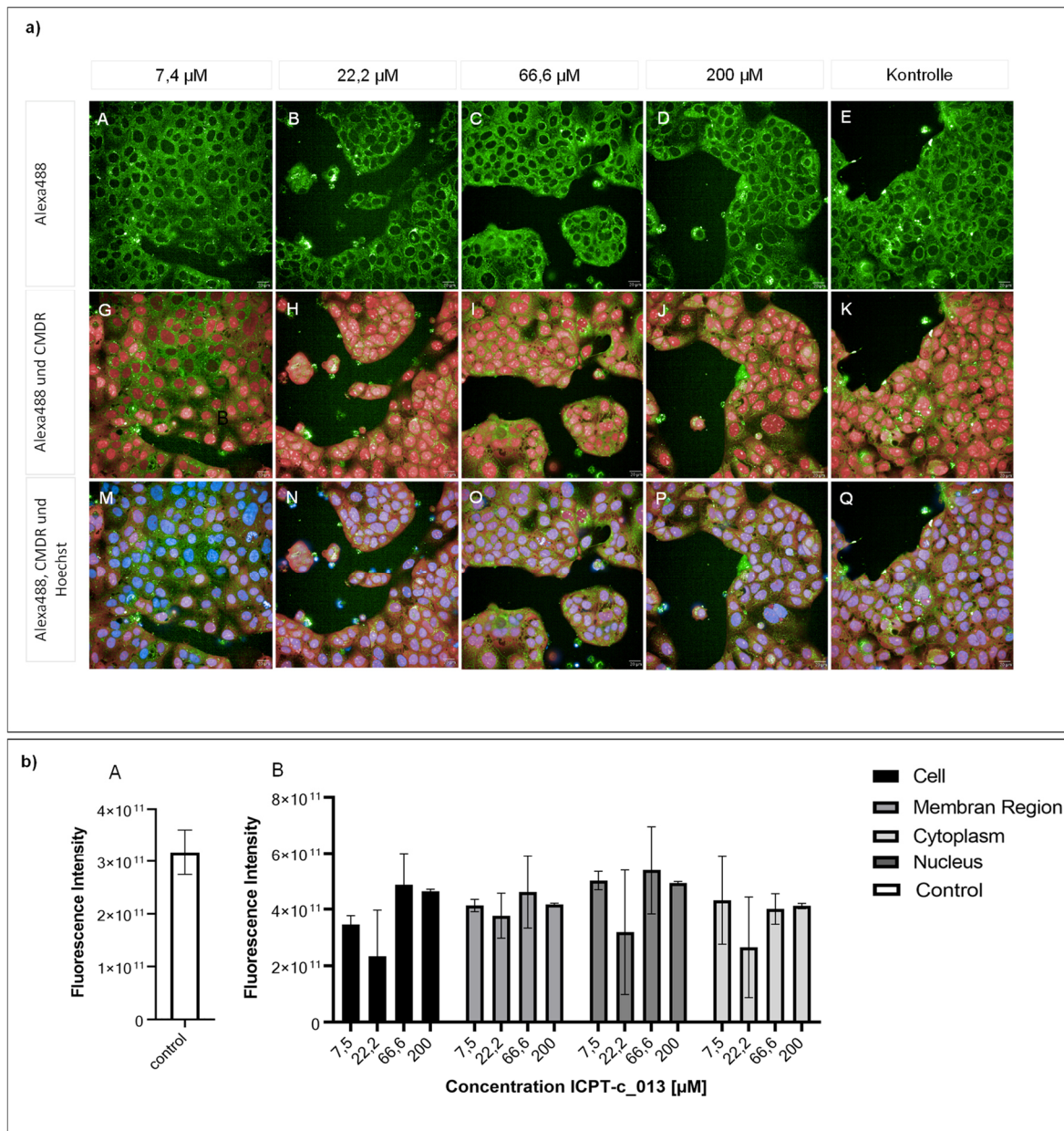


Abbildung 23: Fluoreszenzaufnahmen von Caco-2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_013 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

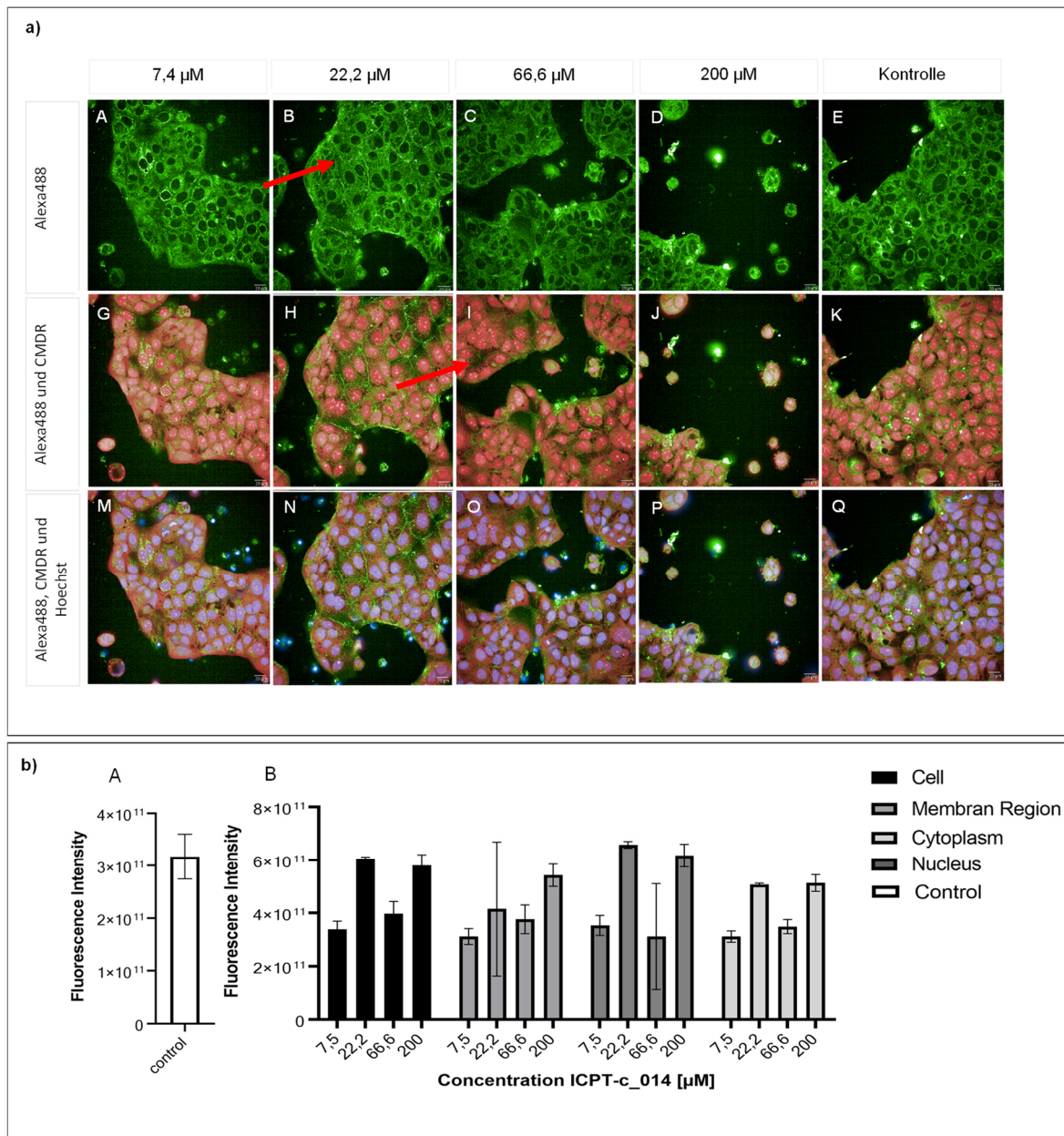


Abbildung 24: Fluoreszenzaufnahmen von Caco-2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogon ICPT-c_014 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

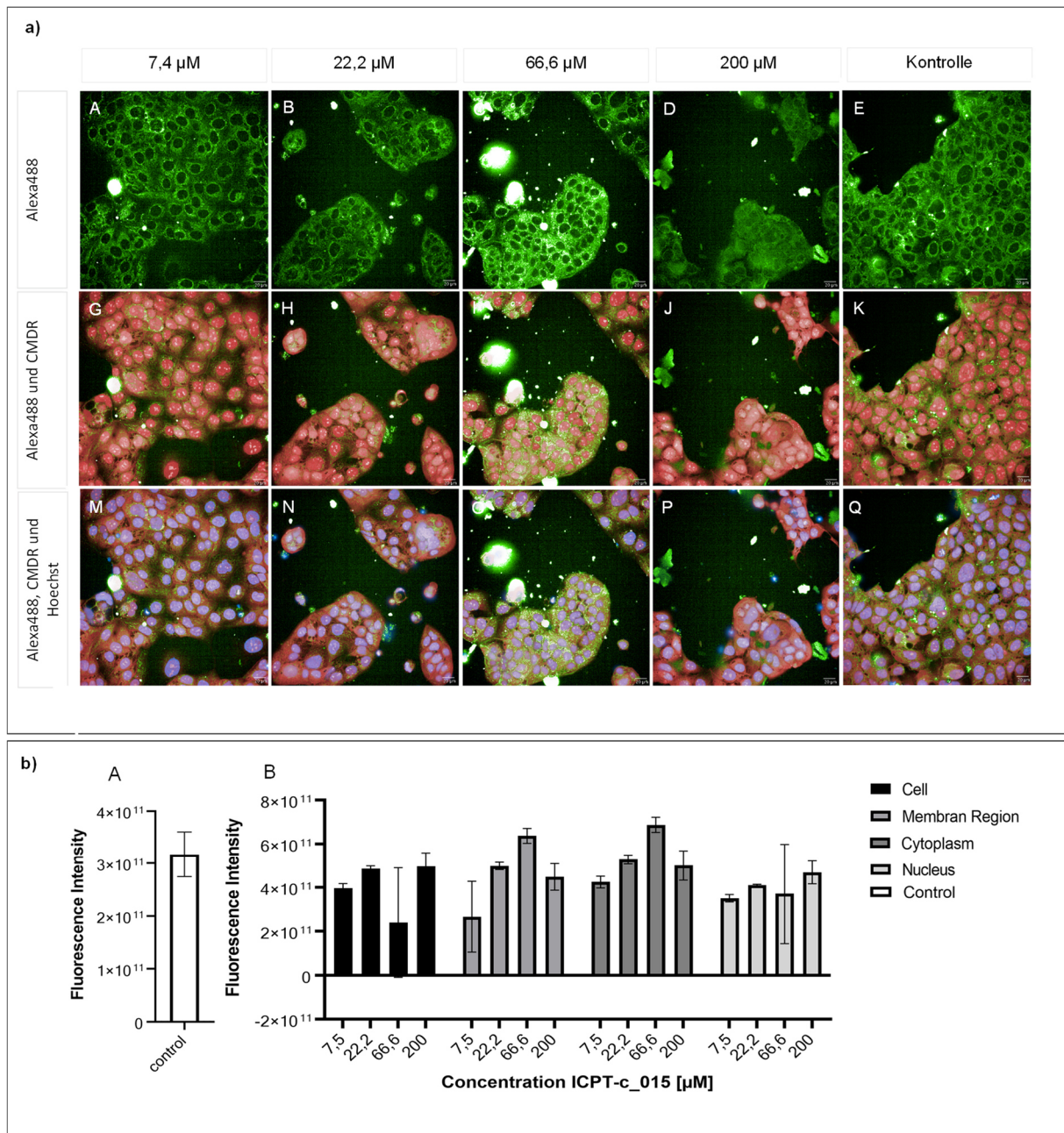


Abbildung 25: Fluoreszenzaufnahmen von Caco-2 Zellen, welche mit dem ATP-Analogen ICPT-c_015 behandelt wurden. a) Blau: Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt, Rot: Cytoplasma mit CellMask™ Deep Red angefärbt, Grün: Alexa Fluor 488 markierter sekundärer Antikörper. Die Aufzeichnungen wurden mit dem konfokalen Mikroskop bei einer 40x Vergrößerung getätigt. Maßstab 20 μm . b) Mittlere Fluoreszenzintensität in den behandelten Wells (Triplikate) im Vergleich zu der Kontrolle (A). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Caco-2 Zellen sind Darmepithel Zellen, welche aus einem 72 Jahre alten Mann etabliert wurden und oftmals bei Transportstudien eingesetzt werden (van Breemen and Li, 2005). Es handelt sich hierbei um ein sehr gutes Barrieremodell. Bei dieser Zelllinie, ist eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität, in den einzeln ausgewählten

Zellkompartimenten nicht so deutlich zu erkennen, wie beispielsweise in den A549 Zellen. Abbildung 22 zeigt eine nachweisbare Zunahme der Alexa Fluor 488 Intensität in der gesamten Zelle, nach Behandlung mit dem ATP-Analogon ICPT-c_012. Auch hier ist, wie in den anderen bisher beschriebenen Zelllinien, eine gute Toleranz der Zellen der Substanz gegenüber bis 66 μM zu beobachten. Ab 200 μM beginnen die Zellen apoptotisches Verhalten aufzuweisen, wobei sich der Zellrasen nur sehr schwer vom Well ablöst. Die Abbildung 23 zeigt das Verhalten der Zellen, nach Behandlung mit der Substanz ICPT-c_013. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität verdeutlicht, dass es hier nachweislich zu einer Zunahme der Intensität kommt, sowohl im Cytoplasma, wie aber auch in der Membranregion. Bei einer Anreicherung der Substanz in der Membranregion bleibt die Substanz folglich in der Membran stecken. In diesen Fall reichert sich die Substanz als inaktives Prodrug in der Membran an und ist für Kinasen nicht mehr zugänglich. Nach Behandlung der Caco-2 Zellen mit der Substanz ICPT-c_014, ist eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität zwischen den Substanzkonzentrationen 7 und 22 μM zu erkennen. Den Bildaufnahmen der Mikroskopie kann entnommen werden, dass bei 200 μM die meisten Zellen aus dem Well gewaschen wurden und nur noch sehr wenige abgelöste Zellklumpen vorhanden sind. Auch die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität bestätigt diesen Zustand der Zellen, da bei 200 μM die Intensität sehr hoch ansteigt. Bis zu 66 μM ist eine Toleranz der Zellen dieser Substanz gegenüber zu beobachten. Eine Behandlung der Caco-2 Zellen mit der Substanz ICPT-c_015 (C18) liefert ähnliche Ergebnisse, wie in den anderen untersuchten Zelllinien. Das Analogon reichert sich intensiv in der Membran Region an. Eine konzentrationsabhängige Aufnahme der Substanz in die Zelle ist aus der Quantifizierung der Fluoreszenzintensität nicht ersichtlich. Insgesamt sind die Laborarbeiten mit dieser Zelllinie als sehr schwierig zu bewerten. Beim Splitten müssen die Zellen mit einem Schaber vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden und durch einen Sieb mit einer Porengröße von 42 μm filtriert werden. Um eine Zellzahl von 10.000 Zellen pro Well aussäen zu können, waren mehrere Ansätze notwendig, da nach dem Splitten meist nicht genug Zellen gewonnen werden konnten.

Tabelle 21 stellt eine Zusammenfassung des Toxizitätsverhaltens der Nucleosidtriphosphat Derivate den getesteten Zelllinien gegenüber dar, sowie die Aufnahmefähigkeit dieser Zellmodelle den Derivaten gegenüber.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzergebnisse

Zelllinie	Markierung	Toxizität	Aufnahme	Anreicherung in die Membran
Hek293	C9	+	+	+/-
	C12	+	+++	+
	C15	++	++	-
	C18	+++	+	+++
Caco-2	C9	+	+	+
	C12	+	+	++
	C15	++	+	++
	C18	++	+	+++
A549	C9	+	++	-
	C12	+	+++	-
	C15	+	++	-
	C18	/	/	/
HepG2	C9	++	+	+/-
	C12	++	++	+/-
	C15	++	++	+
	C18	+++	+	++

Bei den Hek293 Zellen konnte nach der Behandlung mit dem ATP-Analogen ICPT-c_015 (C18) eine hohe Toxizität dieser Substanz den Zellen gegenüber festgestellt werden (+++). Für die Substanz C12, zeigten die Hek293 Zellen eine gute konzentrationsabhängige Aufnahme (+++). Aus den Immunfluoreszenzaufnahmen war insbesondere im Cytoplasma eine Anreicherung der Substanz sichtbar, auch die Fluoreszenzintensität war dort nachweislich höher, als in der Membran Region. Den konfokalen Bildaufnahmen für die Caco-2 Zellen konnte eine hohe Anreicherung der Substanzen in der Membran Region entnommen werden. Auch in den Ergebnissen der Fluoreszenzintensität, war eine oft ähnliche Intensität im Cytoplasma, wie auch in der Membran Region erkennbar. Die A549 Zellen zeigten bis zu Konzentrationen von 500 μM , kein apoptotisches Verhalten. Gleichzeitig konnte aus den

mikroskopischen Aufnahmen eine gute Internalisierung der Derivate, in die Zellen entnommen werden. Erst nach Anwendung hoher Konzentrationen von bis zu 1 mM, zeigten die Zellen erstes apoptotisches Verhalten. Nach Behandlung der Zellen mit der Substanz C12 lieferte die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität, einen sehr guten konzentrationsabhängigen Anstieg in der gesamten Zelle (+++). Eine Anreicherung der Analoga in der Zellmembran lag nicht vor. Die HepG2 Zellen wurden ebenfalls unter gleichen Bedingungen, wie die anderen bereits beschriebenen Zelllinien behandelt. Der Tabelle 21 kann eine ähnlich gute Aufnahme der Derivate durch die HepG2 Zellen im Vergleich zu den Hek293 Zellen entnommen werden. Auch eine gute Toleranz der Zellen den Derivaten gegenüber ist nachweisbar. Während die Hek293 Zellen bereits bei geringen Konzentrationen der Substanzen apoptotisches Verhalten zeigten, indem sie sich abrundeten und ihre natürliche Morphologie verloren, wiesen die HepG2 Zellen eine deutlich höhere Beständigkeit den Substanzen gegenüber auf (Tab.21). Eine leichte Anreicherung der Analoga mit einer Markierung von 9 und 12 C-Atomen in der Zellmembran der HepG2 Zellen, war nachweisbar (+/-).

4.2 Ermittlung der Toxizität

Zur Ermittlung der Toxizität der γ -Phosphat modifizierten Nukleosidtriphosphat Derivate, den ausgewählten Zelllinien gegenüber, wurde der CellTiter-Glo (CTG) Assay eingesetzt. Das vorliegend verwendete Assaysystem, ist ein von Promega entwickeltes, CellTiter-Glo Lumineszenz Zellviabilitätsassay, mit welchem die Toleranz der Zellen, den zu testenden Substanzen gegenüber, ermittelt werden konnte. Das Assaysystem ermöglicht die Quantifizierung von metabolisch aktiven Zellen innerhalb einer Zellkultur, aufbauend auf der Konzentration an anwesendem ATP innerhalb der Probe. Neben dem CellTiter-Glo Assay wurde die Toleranz der Zellen den ATP-Analoga gegenüber, ebenfalls durch die Mikroskopie ermittelt. Dabei wurde mit der Columbus Software von Perkin Elmer Inc. Version 2.9.0, die Anzahl an Zellkernen in den behandelten Wells ausgezählt und mit der unbehandelten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Es wurde ermittelt, ob die Zelllinien bei den getesteten Konzentrationen an Substanz, noch überlebensfähig waren. Dabei galt eine Viabilität der Zellen von ~80 % und somit eine Zytotoxizität der Substanzen von ~20 % als tolerierbar.

Als Kontrolle wurden mit Kulturmedium (100 % Viabilität) sowie mit 10 μ M Natriumselenit (Na_2SeO_3) behandelte Zellen betrachtet. Natriumselenit ist die anorganische Form des Spurenelementes Selen, mit potenzieller antineoplastischer Aktivität. In der Forschung wird es häufig als Quelle für Selen verwendet. Selenproteine sind unter anderem die Thioredoxin

Reduktase oder Glutathionperoxidase, ein antioxidatives Enzym, welches Hydrogenperoxid neutralisiert (Cantor et al., 1982). In hohen Konzentrationen ist das Spurenelement toxisch. Natriumselenit wurde in der Krebsforschung eingesetzt, wie auch in der Untersuchung der Zellproliferation. Außerdem erzeugt Natriumselenit Sauerstoffmoleküle, die ausschließlich Mitochondrien angreifen, es ändert das mitochondriale Membranpotential und kann so zur Apoptose beitragen (Sigma-Aldrich, 2021).

4.2.1 Hek293 Zellen

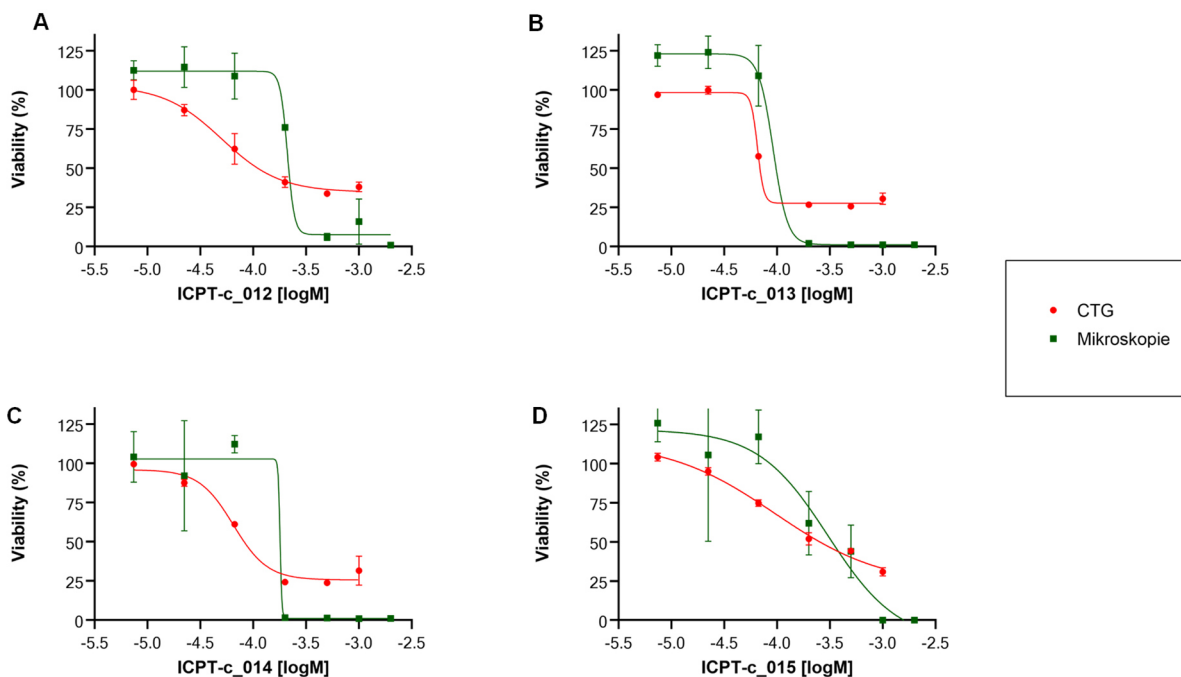


Abbildung 26: Toleranz von Hek293 Zellen den ATP-Analoga gegenüber. Die Viabilität wurde entsprechend dem von Promega vorgegebenen Protokoll ermittelt. Die vorliegenden Werte entsprechen den Mittelwerten (MW) \pm Standardabweichung (SD). Neben dem CellTiter-Glo wurde die Toleranz der Zellen, den ATP-Analoga gegenüber, ebenfalls mithilfe der Mikroskopie ermittelt. Dabei wurde mit der Columbus Software Version 2.9.0 die Anzahl an mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkernen in den behandelten Wells ausgezählt und mit der Kontrolle in den unbehandelten Wells ins Verhältnis gesetzt. Darstellung der prozentualen Viabilität in den Diagrammen A-D.

Abbildung 26 zeigt die Toleranz von Hek293 Zellen den ATP-Derivaten gegenüber. Den Diagrammen ist zu entnehmen, bis zu welcher Konzentration die Zellen die Substanzen tolerieren können, bevor sie in die Apoptose gehen. Aus den Daten des CellTiter-Glo Assays ist ersichtlich, dass ab einer Konzentration von 66 µM die Hek293 Zellen keine ausreichende Toleranz den Substanzen gegenüber aufweisen. Bei einer Konzentration von 200 µM sterben die Zellen bei allen vier Substanzen ab. Dieses Resultat, lässt sich auch mit den Ergebnissen

aus der Mikroskopie bestätigen. Die mittels Mikroskopie erhaltenen Toxizitätsdaten für die Hek293 Zellen, zeigen einen starken Abfall der Viabilität ab 66 μM , im Vergleich zu den CellTiter-Glo Daten. Grund hierfür ist, dass beim CellTiter-Glo die ATP-Konzentration im jeweiligen Well gemessen wird. Es wird folglich nicht berücksichtigt, in welchem Zustand sich die Zelle befindet, ob die detektierte Zelle im Well schwimmt oder adhärent ist, wird vom Assay nicht erkannt. Solange die Zelle noch ATP besitzt, wird sie bei der Messung erfasst. Mit diesem Wissen lässt sich auch erklären, weshalb die Messung der Viabilität beim CellTiter-Glo Assay, nicht auf 0 % gelangt. Bei der Mikroskopie werden solche Zellen während der Waschschrte mit PBS gewegewaschen, sodass der steile Sprung im Diagramm entsteht. Die Mikroskopie bestätigt, dass die Zellen bei der höchsten eingesetzten Konzentration an Substanz alle geschädigt sind. In einem solchen Zustand würden sich die Zellen bei längerer Inkubation nicht mehr teilen und auch vom Boden des Wells ablösen. Mit dem CellTiter-Glo Assay ist es möglich den Beginn solcher Effekte zu beobachten, wohingegen die Mikroskopie, weniger aufschlussreich ist. Im Vergleich zur Mikroskopie ist der von Promega entwickelte CellTiter-Glo Assay somit sensitiver und liefert mehr Datenpunkte. Für weitere Untersuchungen mit diesen Substanzen, sollten für Hek293 Zellen Konzentration unter 60 μM eingesetzt werden, da die Vitalität der Zellen bei höheren Konzentrationen, bereits nach drei stündiger Inkubation unter 80 % sinkt. Der Grenzwert für die einzusetzenden Substanzkonzentrationen bei Hek293 Zellen, sollte somit auf 60 μM festgelegt werden.

4.2.2 A549 Zellen

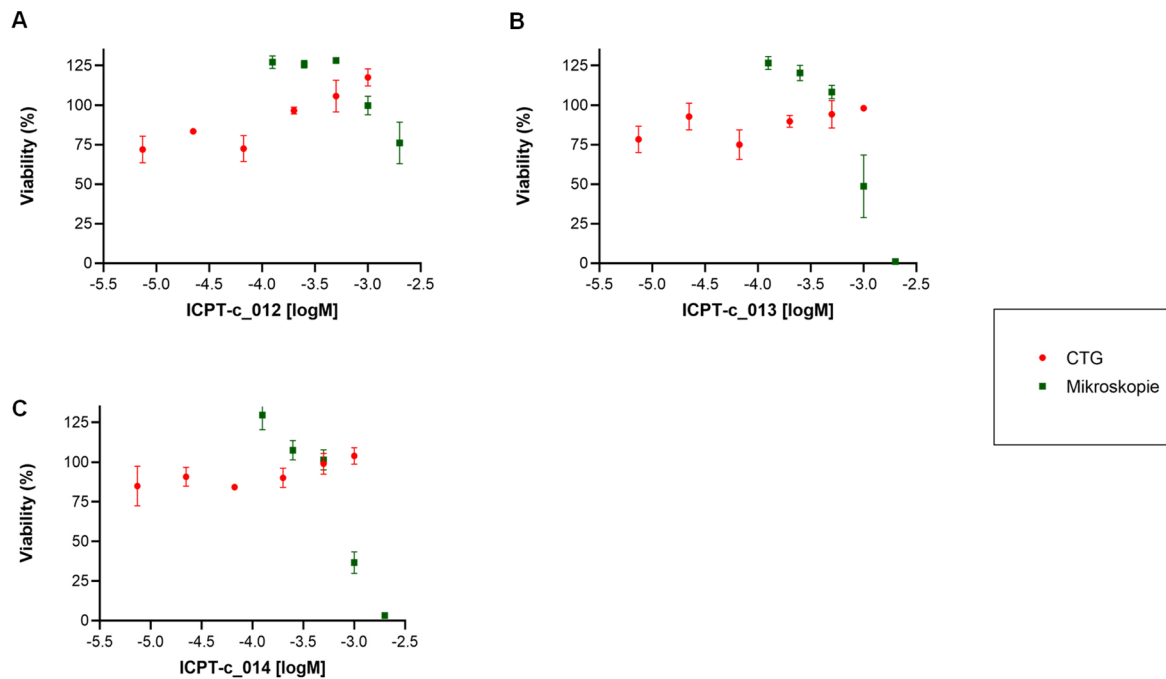


Abbildung 27: Toleranz von A549 Zellen den ATP-Analoga gegenüber. Die Viabilität wurde entsprechend dem von Promega vorgegebenen Protokoll ermittelt. Die vorliegenden Werte entsprechen MW +/- SD. Neben dem CellTiter-Glo wurde die Toleranz der Zellen, den ATP-Analoga gegenüber, ebenfalls mithilfe der Mikroskopie ermittelt. Dabei wurde mit der Columbus Software Version 2.9.0 die Anzahl an mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkernen, in den behandelten Wells ausgezählt und mit der Kontrolle in den unbehandelten Wells ins Verhältnis gesetzt. Darstellung der prozentualen Viabilität in den Diagrammen A-C.

Abbildung 27 zeigt die Toleranz von A549 Zellen den ATP-Derivaten gegenüber. Auch hier wurde die Viabilität mittels des CellTiter-Glo Assays sowie der Mikroskopie ermittelt. Der Abbildung 27 ist zu entnehmen, dass diese Zellen die Substanzen eindeutig besser tolerieren, als die Hek293 Zellen. Erst bei hohen Konzentrationen von 1-2 mM sind toxische Effekte zu beobachten. Für die Substanz ICPT-c_015, konnten für die A549 Zellen, keine mikroskopischen Daten ermittelt werden. Dieses Derivat ist ähnlich wie die anderen Derivate bei hohen Konzentrationen toxisch, gleichzeitig präzipitiert es aber auch bei hohen Konzentrationen, sodass ein Auszählen der Zellkerne erschwert wird.

4.2.3 HepG2 Zellen

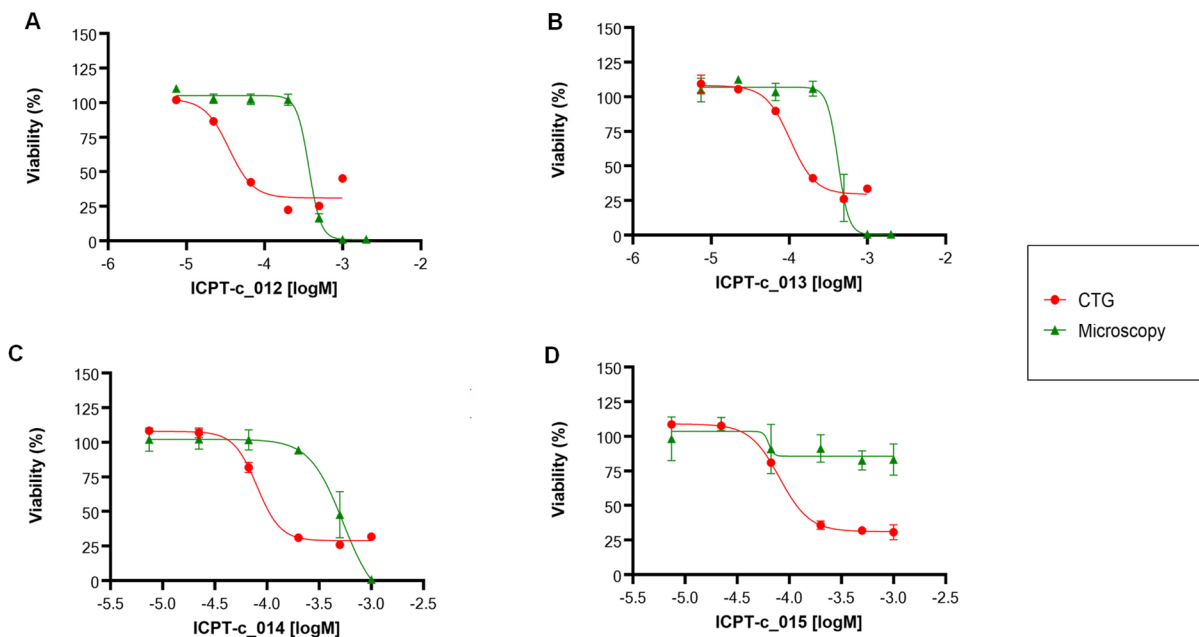


Abbildung 28: Toleranz von HepG2 Zellen den ATP-Analoga gegenüber. Die Viabilität wurde entsprechend dem von Promega vorgegebenen Protokoll ermittelt. Die vorliegenden Werte entsprechen MW \pm SD. Neben dem CellTiter-Glo wurde die Toleranz der Zellen, den ATP-Analoga gegenüber, ebenfalls mithilfe der Mikroskopie ermittelt. Dabei wurde mit der Columbus Software Version 2.9.0 die Anzahl an mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkernen, in den behandelten Wells ausgezählt und mit der Kontrolle in den unbehandelten Wells ins Verhältnis gesetzt. Darstellung der prozentualen Viabilität in den Diagrammen A-D.

In Abbildung 28 sind die erhaltenen Toxizitätsergebnisse des CellTiter-Glo Assays sowie der Mikroskopie dargestellt. Hierbei wurden HepG2 Zellen auf ihre Toleranz den ATP-Analoga gegenüber getestet. Bei dieser Zelllinie ist ähnlich, wie bei den anderen Zellmodellen zu erkennen, dass ab einer Substanzkonzentration von $66 \mu\text{M}$, die Zellen apoptotisches Verhalten aufweisen. Nach Behandlung der Zellen mit den Analoga C9, C12 und C15 zeigen die Substanzen generell ein ähnliches Verhalten wie die Hek293 Zellen, sowohl in der Mikroskopie, wie auch im CellTiter-Glo Assay. Auch hier sinken die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assays nie auf 0 %. Die mikroskopischen Daten sprechen wiederum dafür, dass die Zellen, Substanzkonzentrationen bis zu $200 \mu\text{M}$ tolerieren und ab höheren Konzentrationen, apoptotische Zellen weggeschwemmt werden. Die beiden Untersuchungsmethoden unterscheiden sich leicht in ihren Ergebnissen, während der CellTiter-Glo bereits bei $200 \mu\text{M}$ eine Viabilität unter 50 % angibt, widersprechen dem die Ergebnisse der Mikroskopie. Als Grund hierfür kann die höhere Sensitivität des CellTiter-Glo Assays im Vergleich zu der Mikroskopie genannt werden. Der CellTiter-Glo erkennt früh apoptotisches Verhalten der Zellen, während die

Mikroskopie erst nach dem Wegwaschen der Zellen, eine neue Zellzahl im jeweiligen Well zählt und somit Auskunft über die Viabilität liefert. Für die Substanz mit der längsten Kohlenstoffkette von 18 C-Atomen, kann aus den mikroskopischen Daten, keine eindeutige Zuordnung der Toleranz erkannt werden. Grund hierfür ist das Ausfallen der Substanz bei höheren Konzentrationen. Die Auswertung der konfokalen Bildaufnahmen wurde dadurch erheblich erschwert und teilweise sogar unmöglich. Dem CellTiter-Glo Assay ist allerdings für diese Substanz zu entnehmen, dass bereits ab 66 μM ein Abfall der Viabilität vorliegt. Auch die mikroskopischen Aufnahmen (Abb.21) zeigen hier bereits apoptotisches Verhalten der Zellen. Die hellleuchtenden Bereiche können auf apoptotische Zellen zurückgeführt werden.

4.2.4 Caco-2 Zellen

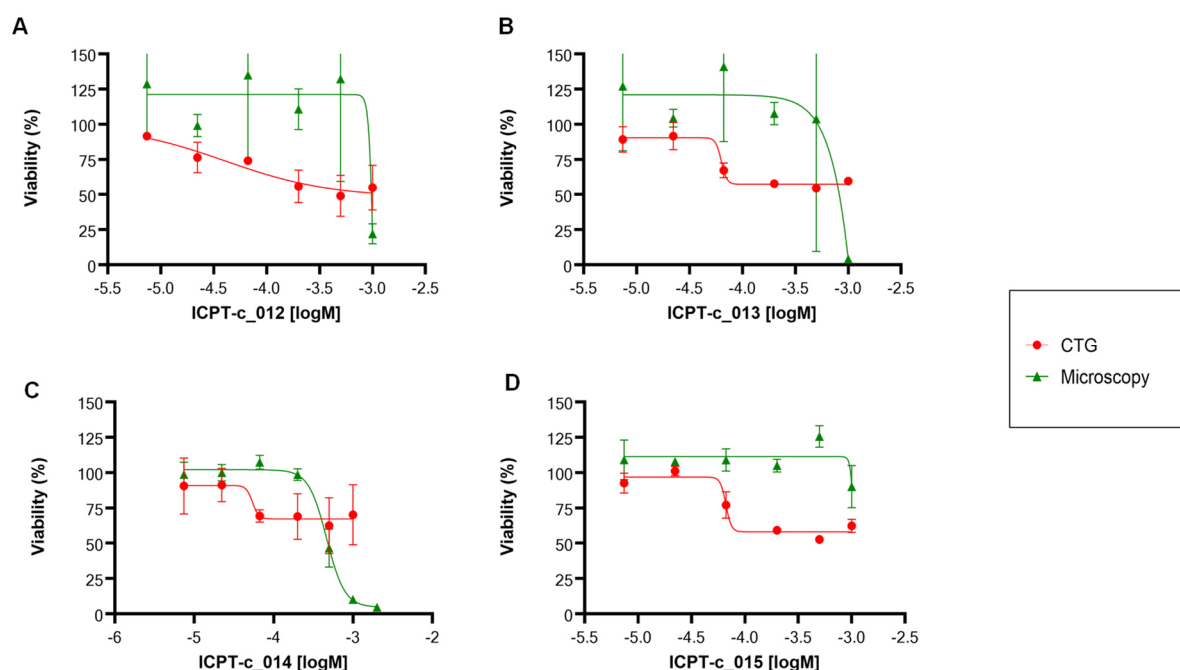


Abbildung 29: Toleranz von Caco-2 Zellen den ATP-Analoga gegenüber. Die Viabilität wurde entsprechend dem von Promega vorgegebenen Protokoll ermittelt. Die vorliegenden Werte entsprechen MW \pm SD. Neben dem CellTiter-Glo wurde die Toleranz der Zellen, den ATP-Analoga gegenüber, ebenfalls mithilfe der Mikroskopie ermittelt. Dabei wurde mit der Columbus Software Version 2.9.0 die Anzahl an mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkernen, in den behandelten Wells ausgezählt und mit der Kontrolle in den unbehandelten Wells ins Verhältnis gesetzt. Darstellung der prozentualen Viabilität in den Diagrammen A-D.

In Abbildung 29 sind die erhaltenen Toxizitätsergebnisse, nach Behandlung von Caco-2 Zellen mit den ATP-Derivaten zu sehen. Die Ergebnisse des Cell-Titer Glo Assays verdeutlichen, dass diese Zellen eine hohe Beständigkeit den Analoga gegenüber aufweisen. Auch bei hohen Konzentrationen an Derivat, sinkt die Viabilität der Zellen nur sehr gering ab. Auch die

mikroskopischen Daten veranschaulichen eine hohe Robustheit der Zellen. Für die Substanz C15 konnten vorliegend die besten Ergebnisse für diese Zelllinie erhalten werden. Eine Analyse dieser Daten liefert, dass auch hier Substanzkonzentrationen bis zu 66 μM sehr gut toleriert werden und erst bei der höchsten Konzentration von 2 mM, ein Zusammenbruch beobachtet werden kann.

Tabelle 22 stellt die erhaltenen IC_{50} -Werte nach Behandlung der untersuchten Zellmodelle mit den ATP-Derivaten dar. Die mittlere inhibitorische Konzentration entspricht der Konzentration, bei welcher die Hälfte der maximal möglichen Hemmung erreicht wird.

Tabelle 22: Ermittelte IC_{50} -Werte

Zelllinie	Markierung	IC_{50} CellTiter-Glo [μM]	IC_{50} Mikroskopie [μM]
Hek293	C9	50,3	210,3
	C12	65,29	91,89
	C15	64,72	179,4
	C18	95,23	303,7
Caco-2	C9	41,05	1036
	C12	63,26	4203
	C15	54,13	465
	C18	66,52	1361
A549	C9	-	-
	C12	-	-
	C15	-	-
	C18	-	-
HepG2	C9	35,05	369,5
	C12	103	419,7
	C15	80,07	536,1
	C18	80,69	63,53

Der Tabelle 22 können die Konzentrationen entnommen werden, bei denen die Zellen noch eine ausreichende Toleranz den Analoga gegenüber aufweisen, bevor sie in die Apoptose gehen. Aus der Tabelle ist eine höhere Sensitivität der Ergebnisse des CellTiter-Glo Assays im Vergleich zu der Mikroskopie zu erkennen. Die Hek293 Zellen können für alle Analoga Konzentrationen bis zu 60 μM tolerieren, bevor ihre Viabilität unter 50 % sinkt. Der Tabelle 22

kann den IC_{50} -Werten der mikroskopischen Ergebnisse der Hek293 Zellen entnommen werden, dass apoptotische Zellen erst bei rund $200 \mu\text{M}$ gewaschen wurden, sodass der berechnete IC_{50} -Wert hier höher ist, als der des CellTiter-Glo Assays. Für die Caco-2 Zellen kann eine hohe Toleranz der Zellen den Analoga gegenüber erkannt werden. Aus den IC_{50} -Werten der Mikroskopie ist ersichtlich, dass sich der Zellrasen nur sehr schwer ablöst und selbst bei hohen Konzentrationen der Analoga, viele Zellen im Well vorhanden sind. Die HepG2 Zellen zeigen ein ähnliches Verhalten den Derivaten gegenüber, wie die Hek293 Zellen. Der IC_{50} -Wert für die Ergebnisse des CellTiter-Glo Assays liegt hier bei rund $80 \mu\text{M}$. Für die A549 Zellen konnten keine IC_{50} -Werte ermittelt werden.

4.3 Immunoblot

4.3.1 Dot Blot

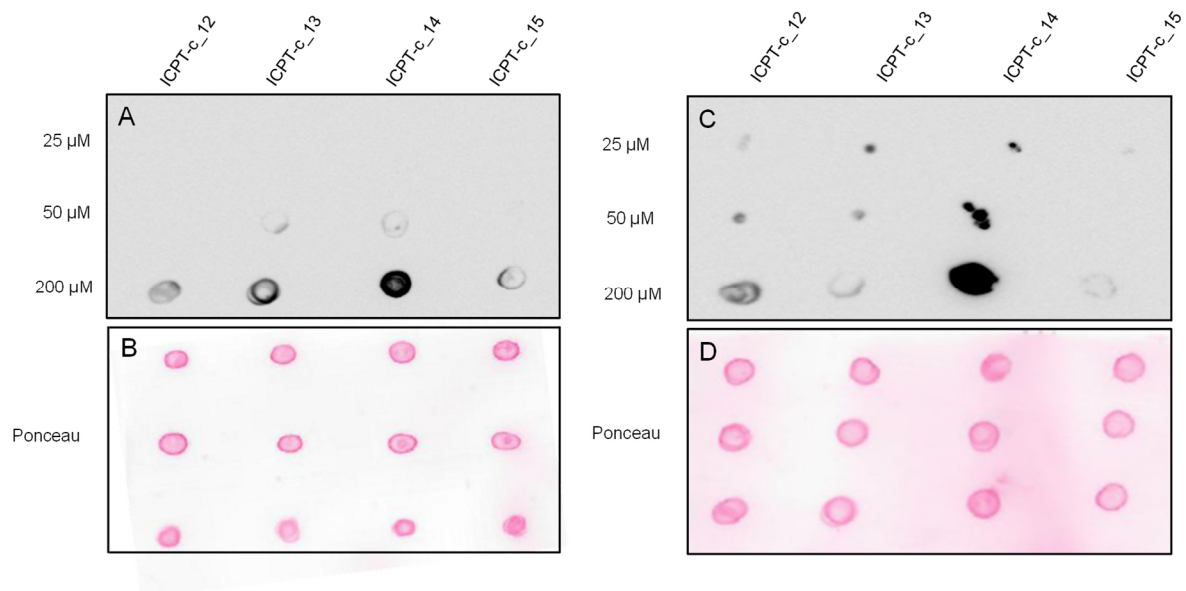


Abbildung 30: Dot Blot zum Nachweis der Bindung von ATP-Analoga an Proteine im Zelllysate.

Direkte Zugabe des Zelllysates und der ATP-Analoga auf die Nitrozellulosemembran. B) Ladungskontrolle mit Ponceau S. C) ATP-Analoga nach 30 min Inkubation mit dem Zelllysate, bei RT auf die Membran pipettiert. D) Ladungskontrolle mit Ponceau S.

Im ersten Dot Blot wurden das Zelllysate und die zu untersuchenden ATP-Analoga ohne vorherige Inkubation, direkt auf die Nitrozellulosemembran pipettiert. Hierbei wurde das Zelllysate mit Konzentrationen von 25 , 50 und $200 \mu\text{M}$ der ATP-Derivate versetzt. Anschließend wurde die Membran zur Ladungskontrolle mit Ponceau S für 5 min inkubiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und eingescannt. Der Abbildung 30A kann entnommen werden, dass nach der direkten Zugabe der Derivate, nur wenige Enzymreaktionen stattfanden und diese auf der

Membran nicht sichtbar sind. Bei der hohen Konzentration von 200 μM ist ein starker Effekt erkennbar. Insbesondere bei der Substanz, mit einer Kohlenstoffkette der Länge 15 (ICPT - c_014), ist der Punkt besonders intensiv. In Abbildung 30C sind die erhaltenen Lumineszenzaufnahmen der Proben zu sehen, welche vorher 30 min mit den ATP-Analoga, bei RT inkubiert wurden. Selbst geringe Konzentrationen des ATPs werden von den Kinasen als Substrat umgesetzt. Bei allen Proben lässt sich auf eine Umsetzung der ATP-Derivate, durch die im Zelllysate befindlichen Proteine schließen.

4.3.2 Western Blot

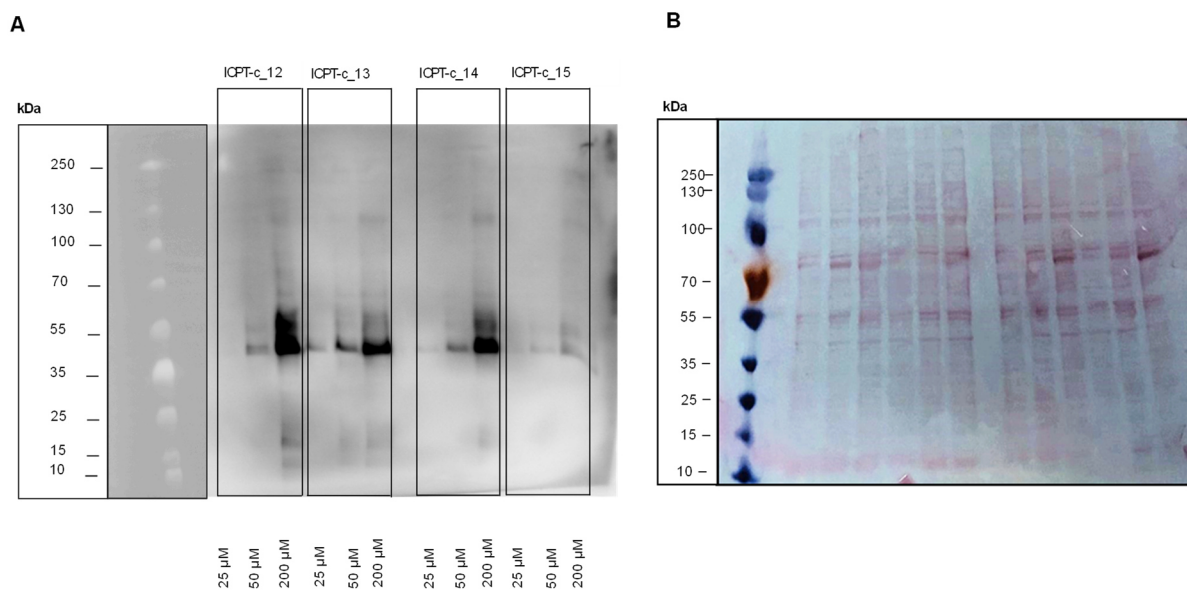


Abbildung 31: Western Blot zur Zuordnung der ATP- umsetzenden Proteine. A) Dargestellt sind alle vier zu testenden ATP-Analoga. Diese wurden mit Konzentrationen von 25, 50 und 200 μM in die Geltaschen pipettiert. Als sekundärer Antikörper wurde HRP markiertes Streptavidin eingesetzt. B) Ponceau S Färbung der Membran zur Ladungskontrolle.

Mit dem Dot Blot konnte verdeutlicht werden, dass die ATP-Analoga umgesetzt wurden und das γ -Phosphat an Proteine übertragen wurde. Eine Zuordnung der Proteine ist mit dem Dot Blot allerdings nicht möglich. Die Methode des Western Blots stellt eine Möglichkeit dar, um Aussagen über die substratumsetzenden Proteine treffen zu können. In Abbildung 31, ist die Lumineszenzaufnahme des durchgeführten Western Blots zu sehen. Die Proben wurden beginnend mit der kürzesten Kohlenstoffkette, sowie der geringsten Konzentration an ATP-Analoga, in die Geltaschen pipettiert. Mit der Ponceau S Färbung konnte die Ladungskontrolle durchgeführt werden. Die Färbung findet vor dem Blockieren, sowie der Inkubation mit dem sekundären Antikörper, dem HRP markierten Streptavidin statt, sodass mit der Ponceau S

Färbung gezeigt werden kann, welche Proteine, mit welcher Größe sich insgesamt in den Proben befinden (Abb.31B). Im Anschluss an die Ladungskontrolle wurde die Membran blockiert und mit dem sekundären Antikörper behandelt. Auf diese Weise können die Proteine identifiziert werden, an die das γ -Phosphat übertragen wurde (Abb.31A). Bei etwa 55 kDa ist bei den Derivaten ICPT-c_012, ICPT-c_013, ICPT-c_014, insbesondere bei der höchsten Konzentration von 200 μ M, eine dicke Bande zu erkennen. Schwache Banden sind auch bei der Konzentration von 50 μ M dieser ATP-Derivate nachweisbar. Für die Substanz ICPT-c_015 sind keine Banden sichtbar.

4.4 TR-FRET Untersuchungen

Mit den Immunfluoreszenzanalysen konnte eine Membrangängigkeit der Nukleosidtriphosphat Derivate in die ausgewählten Zellmodelle nachgewiesen werden. Mit Dot Blot und Western Blot Analysen wurde eine Umsetzung der Derivate und eine Übertragung des modifizierten γ -Phosphats auf Proteine festgestellt. Zur Ermittlung der Bindungsstärke der ATP-Derivate an Proteinkinasen, wurden TR-FRET Assays mit der Proteinkinase MAP2K1 herangezogen. Dieser Assay soll Ausschluss darüber liefern, wie hoch die Affinität der biotinylierten ATP-Analoga, der Proteinkinase gegenüber ist und ob diese γ -Phosphat modifizierten Nukleosidtriphosphat Derivate, für enzymatische Untersuchungen geeignet sind. Hierbei wurden Kompetitions-Assays zum Nachweis der Bindungsaffinität eingesetzt. Als ATP-Derivat wurde ein Analogon ohne Lipophilierung am terminalen Phosphat verwendet. Im zellulären Milieu wird die biologisch reversible, lipophile Maskierung der Nukleosidtriphosphat Derivate, durch Carboxyesterasen oder Lipasen abgespalten und das γ -Phosphat der ATP-Analoga, für Proteinkinasen zugänglich gemacht. In biochemischen Untersuchungen von Kinasen würde die Maskierung die Bindung des Nukleosidtriphosphat Derivates an Proteinkinasen inhibieren, sodass vorliegend ein unmaskiertes Analogon eingesetzt wurde. Als markierter und zu verdrängender Kinase-Inhibitor wurde Staurosporin ausgewählt. Die Konkurrenz des synthetischen Inhibitors mit dem ATP-Derivat um die katalytische Domäne der Kinase, wurde folglich untersucht.

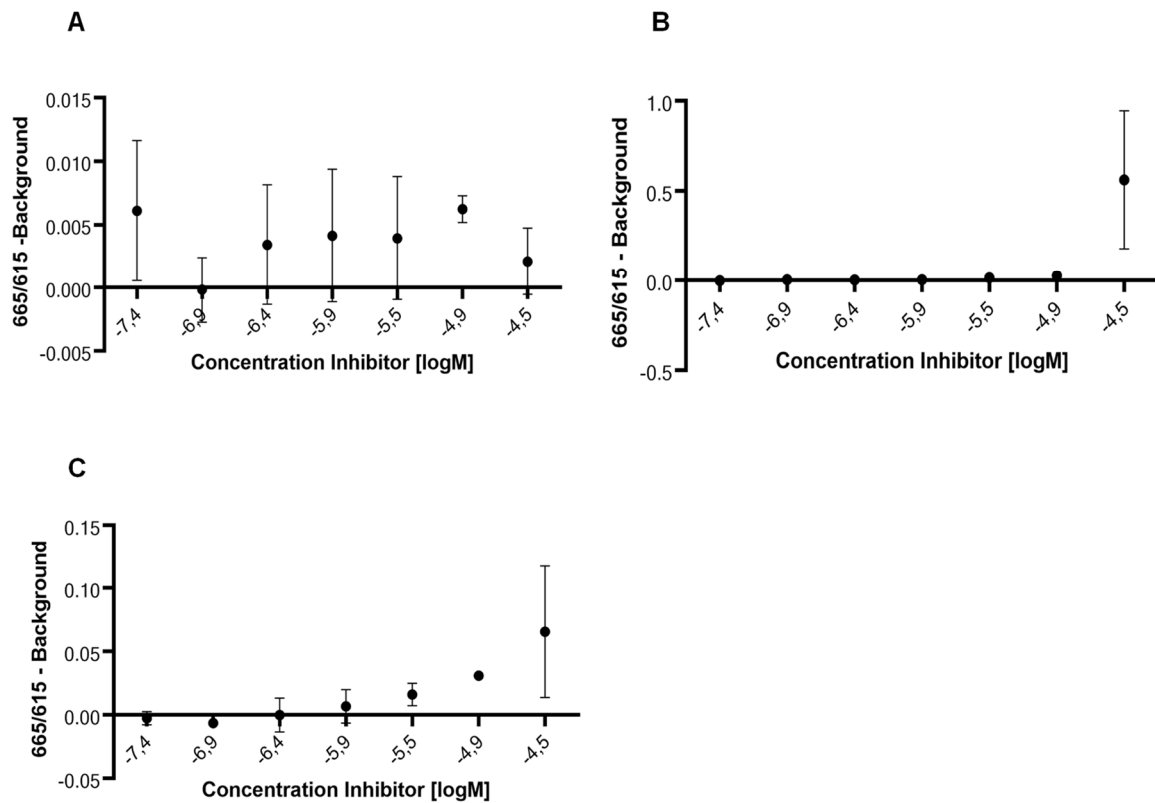


Abbildung 32: Ergebnisse der Kompetitions-Assays. A) Einsatz des Eu-Kryptats und dem Kinase-Puffer von Cisbio. B) Einsatz des Tb-Kryptats und dem Kinase-Puffer von Cisbio. C) Einsatz des Tb-Kryptats und dem alternativen Puffer ohne KF. Der Assay wurde entsprechend dem von Cisbio vorgegebenen Protokoll durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT, wurde das FRET-Signal mit dem EnVision von Perkin Elmer Inc. gemessen. Als ATP-Analogon wurde ein unmaskiertes, für biochemische Untersuchungen geeignetes, Derivat verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der GraphPad Prism Software Version 9.

Im Assay wurde das Eu-Kryptat bei einer Wellenlänge von ~ 320 nm angeregt und emittierte bei einer Wellenlänge von ~ 615 nm, über mehrere Millisekunden hinweg. Das GST-Eu-Kryptat ist hierbei der Donor und ein d2 markierter Inhibitor, das Staurosporin-Red, der Akzeptor. Wenn beide Moleküle in räumliche Nähe zueinander gelangen, kann durch Anregung des Donors, ein FRET-Signal auf den Akzeptor übertragen werden. In Abbildung 32A, sind die erhaltenen Fluoreszenzergebnisse nach Einsatz des Lanthanoids Europium, als energieübertragendes Molekül zu sehen. Hierbei wurde der von Cisbio zur Verfügung gestellte Kinase-Puffer verwendet. Eine ATP Endkonzentration von $66 \mu\text{M}$ wurde eingesetzt. Die verwendeten Konzentrationen des Inhibitors sind Tab.20 zu entnehmen. Aus den Ergebnissen in Abb.32A ist eine Verdrängung des Inhibitors Staurosporin, durch das ATP-Analogon nicht ersichtlich. Ein Rückgang des FRET-Signals wurde nicht detektiert. Die ATP-Analoga können nicht durch den Donor angeregt werden, sodass bei einem vorhandenen FRET-Signal davon ausgegangen werden kann, dass eine Verdrängung des Staurosporins aus der ATP-Bindetasche,

durch die ATP-Analoga nicht erfolgt ist.

Coates et al., konnte zeigen, dass Anionen wie Fluorid an Lanthanoid-Ionen binden, dabei mit Liganden des Europium-Komplexes konkurrieren und dadurch einen negativen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal in wässriger Lösung ausüben können. Das Kaliumfluorid im Cisbio Puffer wird benötigt um das Eu-Kryptat zu stabilisieren. Für die Stabilität des Tb-Kryptats ist Kaliumfluorid nicht zwingend notwendig. Daher wurde bei weiteren Versuchen das Tb-Kryptat statt des Eu-Kryptats eingesetzt, um eine effektivere Bindung zu erhalten.

In Abbildung 32B wurde das Lanthanoid Terbium, als energieübertragendes Molekül eingesetzt. Hierbei wurde ebenfalls der von Cisbio zur Verfügung gestellte Puffer verwendet. Bei geringen Konzentrationen des Staurosporins, ist das ATP-Analogon in der Lage die ATP-Bindetasche der Kinase effektiv zu besetzen (Abb.32B). Erst bei der höchsten eingesetzten Konzentration des Staurosporins wurde ein FRET-Signal detektiert.

Gleiches gilt auch für die Ergebnisse in Abbildung 32C, hierbei wurde ebenfalls das Tb-Kryptat verwendet, wobei ein alternativer Puffer eingesetzt wurde. Der neue Puffer enthält alle Bestandteile des von Cisbio zur Verfügung gestellten Puffers, bis auf das Kaliumfluorid. Abbildung 32C kann entnommen werden, dass eine Bindung der ATP-Analoga an die Proteinkinase erfolgt ist. Unter Anwesenheit von geringen Konzentrationen des Staurosporins, bindet das ATP-Analogon effektiv an das aktive Zentrum der Proteinkinase und verdrängt das Staurosporin. Das ATP-Analogon weist folglich eine Affinität der Proteinkinase gegenüber auf.

5. Diskussion

5.1 Immunfluoreszenzanalyse

In den vorliegenden Arbeiten wurde die Membranpermeabilität von vier verschiedenen Zellmodellen, den zu untersuchenden ATP-Analoga gegenüber getestet. Dabei wurden Hek293, A549, HepG2 und Caco-2 Zellen mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Für alle Zelllinien konnte nach Inkubation mit den vorliegenden Substanzen, eine Membrangängigkeit der Analoga, mit zunehmender Fluoreszenzintensität, in Abhängigkeit von der Konzentration nachgewiesen werden. Gleichsam konnte eine zellspezifische Präferenz in der Aufnahme der ATP-Analoga beobachtet werden.

Der Transport von Substanzen durch die Plasmamembran kann in aktiver oder passiver Form erfolgen. Beim passiven Transport wird keine Energiezufuhr benötigt. Es kommt hierbei zu einer freien Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten und auf beiden Seiten der Plasmamembran kommt es zum Konzentrationsausgleich einer Substanz (Yang and Hinner, 2015b). Der passive Transport kann entweder eine einfache Diffusion sein, bei welcher lipophile Moleküle die Lipiddoppelschicht an einer beliebigen Stelle frei passieren (Stillwell, 2016). Er kann allerdings auch in Form einer erleichterten Diffusion stattfinden. Die erleichterte Diffusion von Stoffen durch die Membran erfolgt schneller als die freie Diffusion und ist substratspezifisch. Bei dieser Form der Diffusion erfolgt der Transport von Substanzen durch die Membran mithilfe von Membrantransportproteinen und läuft ebenfalls spontan ab (Cooper, 2000). Hierbei wird zwischen der carriervermittelten Diffusion und der kanalvermittelten Diffusion unterschieden (Stillwell, 2016). Bei der carriervermittelten Diffusion binden Carrierproteine selektiv und spezifisch an Moleküle und transportieren diese entlang des Konzentrationsgradienten unter Konformationsänderungen durch die Biomembran. Kanalproteine sind wassergefüllte transmembrane Poren, welche sich öffnen und Moleküle durch die Lipiddoppelschicht transportieren (Yang and Hinner, 2015b).

Demnach können durch einfache Diffusion lipophile, ungeladene Moleküle die Membran frei passieren. In den vorliegenden Arbeiten konnten die ATP-Analoga durch die kovalente Modifikation des endständigen Phosphatrestes, in Form einer ladungsmaskierenden Gruppe, passiv durch die Zellmembran hindurch diffundieren, sodass eine effektive Zellpermeabilität der Nukleosidtriphosphat Derivate nachgewiesen wurde.

Neben der passiven Diffusion von Substanzen durch die Zellmembran, kann der Transport von Substanzen auch aktiv erfolgen. Beim aktiven Transport wird eine Substanz unter Verbrauch

von Energie, meist ATP, entgegen des Konzentrationsgradienten, mithilfe von Translokatoren durch die Membran gepumpt. Die häufigste Form dieses aktiven Transportes erfolgt mithilfe von ATPasen. Die in der Einleitung beschriebene Na^+/K^+ ATPase gehört hierbei zu der meist untersuchtesten Form dieser Enzyme (Lingrel and Kuntzweiler, 1994). ATPasen hydrolysieren ATP zu ADP und organischen Phosphat, wodurch Energie für den aktiven Transport von Substraten durch die Membran freigesetzt wird. Neben der einfachen Diffusion der ATP-Analoga, wäre eine aktive, durch Transporter unterstützte Diffusion der Analoga durch die Zellmembran ebenfalls möglich. Die Na^+/K^+ ATPase besteht aus je zwei α - und β -Untereinheiten (Béguin et al., 2000). Die α -Untereinheit kommt in vier Isoformen vor und die β -Untereinheit in drei Isoformen (Clausen et al., 2017). Die Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert. Die Funktion der β -Untereinheit konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden, sie spielt aber eine wichtige Rolle in der Faltung des Proteins und ist notwendig für die Expression des Enzyms (Clausen et al., 2017). Die Hydrolyse von ATP ist nicht von dieser Untereinheit abhängig (Béguin et al., 2000). Tabelle 23 stellt die verschiedenen Isoformen der α - und β -Untereinheiten dieser ATPase dar und veranschaulicht in welchen der vorliegend untersuchten Zelllinien sie exprimiert werden.

Tabelle 23: Expressionsverhalten der untersuchten Zelllinien

Untereinheit	Hek293	HepG2	Caco-2	A549
β -1	+	++	+++	+++
β -2	++	-	+	-
β -3	+++	+++	+++	++
α -1	+	++	++	+
α -2	-	-	-	-
α -3	+	-	+	+
α -4	-	-	-	-

Mithilfe des Human Protein Atlases konnte das Expressionsverhalten der untersuchten Zelllinien, für die verschiedenen Untereinheiten der Na^+/K^+ ATPase, untersucht werden. In Caco-2 und A549 Zellen wird diese Untereinheit sehr hoch exprimiert. Die β -2 Isoform wird hingegen nur in Hek293 Zellen sehr gut exprimiert. Die β -3 Isoform der ATPase wird in allen getesteten Zelllinien sehr hoch exprimiert. Die α -2 Untereinheit der ATPasen kommt in keiner der getesteten Zelllinien vor. Die α -1 Untereinheit wird hingegen in allen vorliegenden Zelllinien exprimiert. Das Enzym ist demnach vollständig mit der β -1 und α -1 Untereinheit in

allen vorliegend untersuchten Zelllinien vorhanden, sodass eine eventuell aktive Aufnahme der Analoga in diese Zelllinien, auch über diesen Transporter möglich wäre.

Bei den mikroskopischen Analysen kamen einige generelle Probleme bei allen Zelllinien wiederholt vor. Die γ -Phosphat modifizierten, neuartigen Nukleosidtriphosphat Derivate, wurden mit verschiedenen langen Modifikationen als maskierende Einheit hergestellt, wodurch Aussagen über die Auswirkung der Maskenlänge auf die Zellpermeabilität und dessen Eignung getroffen werden konnten. Eine Maskenlänge von 18 C-Atomen erwies sich allerdings in den vorliegenden Arbeiten als problematisch.

Durch den langen hydrophoben Schwanz, wird die Substanz unlöslich in Wasser. Stearinsäure ist eine gesättigte Fettsäure, bestehend aus einem Kohlenstoffgerüst mit 18 C-Atomen und wird sowohl aus tierischen, wie auch pflanzlichen Fetten gewonnen. Die Schmelztemperatur der Fettsäure beträgt 69 °C (Galvão et al., 2020; Germer and Storks, 1937). Die lange Kohlenstoffkette von 18 C-Atomen, liefert zwar eine hohe Lipophilie der Substanz und damit verbunden eine gute Durchlässigkeit durch die polare Zellmembran, jedoch fällt diese Substanz bei hohen Konzentrationen sehr stark aus. Dieses Verhalten der Substanz war reproduzierbar in allen getesteten Zelllinien. Bereits bei geringen Konzentrationen konnten bei allen Zelllinien Präzipitate auf den behandelten Zellen erkannt werden, sodass konfokale Bildaufnahmen erschwert wurden und in einigen Fällen sogar ausblieben. Die zunehmende Lipophilie, hervorgerufen durch die zunehmende Maskenlänge und die damit einhergehende bessere Permeabilität der Derivate, führte demnach zur Präzipitation der Verbindungen. Es handelt sich hierbei um eine gegenläufige Abhängigkeit dieser beiden Umstände. Es ist notwendig ein Gleichgewicht zu finden, zwischen Konzentrationen bei denen gute Ergebnisse erzielt werden können, aber andere Effekte, wie das Ausfallen der Substanzen ebenfalls berücksichtigt werden. Neben dem Ausfallen wurde außerdem ein Haftenbleiben der Substanz in der Zellmembran beobachtet. Eine Maskenlänge von 18 C-Atomen ist demnach nicht sehr gut geeignet, da die Derivate schwer löslich sind und bei Zugabe verklumpen, was eine gute Zellpermeabilität verhindert. Ausgehend von den vorliegend erhaltenen Ergebnissen, sollte dieses Analogon für weitere Untersuchungen für das Erschließen von Mechanismen der Signaltransduktion durch Proteinkinasen, nicht weiter in Betracht gezogen und ausgeschlossen werden.

Ein weiteres oft vorkommendes Problem war die Toxizität der Derivate. Bereits bei geringen Konzentrationen der Analoga, zeigten viele Zellen nach drei stündiger Inkubation, apoptotisches Verhalten. Apoptotische Zellen wurden während der Waschschrte zwischen dem Fixieren und dem Anfärben der Zellen oftmals gewaschen, sodass in den

mikroskopischen Bildaufnahmen nur leere Wells zu sehen waren.

Die konfokalen Aufnahmen wiesen außerdem große Hintergrundsignale auf. Ursache für das Vorkommen von Hintergrundsignalen könnte die Anwesenheit von endogenem Biotin in den Zellen sein. Die mitochondriale Matrix beinhaltet nämlich endogen biotinylierte Proteine. Biotin-gebundene Carboxylasen in menschlichen Zellen sind wichtige Regulatoren der Lipogenese und Gluconeogenese. Menschliche Zellen beinhalten vier dieser Carboxylasen. Die Pyruvat Carboxylase, die Propionyl-CoA Carboxylase und die 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase befinden sich alle drei in den Mitochondrien und die Acetyl-CoA Carboxylase, ist im Cytoplasma lokalisiert. Die Bindung von Biotin an diese Proteine, demnach der Biotinylierungsprozess, wird durch das Enzym Holocarboxylase-Synthase katalysiert (Hollinshead et al., 1997). Diese Proteine können zu unerwarteten Hintergrundsignalen bei der Detektion von Biotin-Streptavidin Komplexen in immunhistochemischen Untersuchungen führen. Die Interaktion zwischen Streptavidin und Biotin ist eine der stärksten in der Natur vorkommenden nicht-kovalenten Interaktionen. Die Assoziationskonstante dieser Protein-Ligand Interaktion liegt bei etwa 10^{15} und ist somit die höchste in der Biochemie bekannte Assoziationskonstante (Chivers et al., 2011). Die Bindung des kleinen Biotin Moleküls (Vitamin H/ Vitamin B₇) durch das bakterielle Protein Streptavidin (60 kDa) ist ein sehr wichtiges Werkzeug, bei der Untersuchung von Protein-Ligand Interaktionen. Mit vier Biotin-Bindungsstellen ist das Streptavidin in der Lage starke Komplexe mit einer oder mehreren biotinylierten Substanzen zu bilden (González et al., 1997). Die hohe Bindungsaffinität dieser beiden Moleküle, kann neben dem Nachweis der Derivate innerhalb der Zellen, auch als Ursache für Hintergrundsignale und einer Verfälschung der Fluoreszenzsignale betrachtet werden. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der vorliegenden Ergebnisse wäre der Einsatz von MitoTracker, einem Farbstoff mit welchem die Mitochondrien in Lebendzellen angefärbt werden können und dessen Akkumulation vom Membranpotential abhängig ist (Thermo Fisher Scientific). Auf diese Weise können Mitochondrien in der Bilderkennung erkannt und ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Problem bei der Aufnahme der Substanzen in die Zelle, besteht in der eventuellen Anwesenheit von sekretierten Lipasen. Die Funktion von Lipasen besteht im Abbau, der Aufnahme und Wiederherstellung von Fetten und Lipiden (Derewenda, 1994). Sie hydrolysieren die Esterbindung in Tri-, Di- und Monoacyl-glyceriden. Als ubiquitäres Enzym spielen Lipasen eine wichtige Rolle in allen Aspekten des Fettmetabolismus (Hide et al., 1992). Die Leber ist das primäre Organ für die Synthese und den Abbau von Plasmalipoproteinen.

Zusätzlich ist die Leber sehr wichtig bei der Synthese von Lipasen. Zwei der drei prinzipiellen Lipasen, welche im intravaskulären Lipoproteinmetabolismus eingebunden sind, werden von der Leber synthetisiert (Ameis et al., 1992). Eine dieser Lipasen ist die hepatische Lipase, welche von Hepatozyten synthetisiert, anschließend sezerniert und an die Oberfläche der Leber transportiert wird. Bei der hepatischen Triglycerid-Lipase handelt es sich um ein Glykoprotein, welches die Hydrolyse von Phospholipiden und Triglyzeriden synthetisiert. Sie fungiert demnach als lipolytisches (fettabbauendes) Enzym (Kuo et al., 2012). HepG2 Zellen sind aus Lebergewebe gewonnene Zellen, welche in der Lage sind die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reduktase und die Aktivität der hepatischen Triglycerid-Lipasen zu exprimieren (Knasmüller et al., 1998). Wenn HepG2 Zellen bereits Lipasen zum Abbau von Fetten sekretieren, können diese die Abspaltung der lipophilen Maske der ATP-Derivate verursachen, wodurch die Zellpermeabilität der Derivate verschlechtert oder sogar verhindert wird. In den vorliegenden Immunfluoreszenzaufnahmen konnte eine schlechtere Aufnahme der Analoga in diese Zellen beobachtet werden. Die HepG2 Zellen sind demnach kein gutes Zellmodell, um die Zellpermeabilität der maskierten ATP-Analoga zu untersuchen.

Insgesamt konnten die mikroskopischen Untersuchungen eine deutliche Internalisierung der Substanzen nachweisen. Mit den vorliegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die maskierten ATP-Analoga in der Lage sind, Zellmembranen zu durchqueren und sich konzentrationsabhängig innerhalb der Zelle anreichern. Für alle getesteten Zelllinien konnten zellspezifische Ergebnisse erhalten werden. Das Analogon C12 lieferte in allen getesteten Zelllinien gute Ergebnisse. Sowohl eine konzentrationsabhängige Anreicherung in den getesteten Zellmodellen war möglich, wie auch Immunfluoreszenzaufnahmen mit geringen Hintergrundsignalen. Auch die geringe Toxizität der Substanz konnte als vorteilhaft bewertet werden. Durch die Membrangängigkeit des Analogons kommt es zu einer Ausbreitung der Substanz innerhalb der Zelle und dadurch zu einer eventuellen Markierung von Kinasen und einer damit einhergehenden Möglichkeit zur Nachverfolgung ihrer Aktivität. Das richtige Zellmodell ist hierbei ein sehr wichtiger Aspekt, der ebenfalls betrachtet werden sollte. In den vorliegenden Immunfluoreszenzanalysen konnten die A549 Zellen als bestes Zellmodell identifiziert werden. Eine konzentrationsabhängige Aufnahme der Analoga, wie auch eine hohe Robustheit der Zellen den Substanzen gegenüber, konnte festgestellt werden.

In den vorliegenden Arbeiten wurden Triplikate von allen Konzentrationen der Substanzen gemacht. Aus allen detektierten Wells wurden 27 Felder ausgewählt, von denen der Detektor am konfokalen Mikroskop, eine Aufnahme machte. Es kann angenommen werden, dass auch

nach Behandlung der Zellen mit geringen Konzentrationen der Analoga, rund etwa 9000 Zellen in jedem Well enthalten waren, sodass ausreichend Zellen getestet wurden und fundierte Aussagen über das Verhalten des jeweiligen Zellmodells den Analoga gegenüber, getroffen werden konnten. Um eine intrazelluläre Weiterverarbeitung der Analoga durch Kinasen zu erreichen, wäre demnach das Analogon mit einer Kohlenstoffkette von 12 C-Atomen und die humanen Alveolarepithelzellen Typ II, die A549 Zellen nachweislich geeignet zur Entwicklung eines zellbasierten Assaysystems.

5.2 Ermittlung der Toxizität

In den vorliegenden Arbeiten wurde außerdem die Toxizität der ATP-Analoga den Hek293, A549, HepG2 und Caco-2 Zellen gegenüber untersucht. Für alle Zelllinien konnte nach Inkubation mit den vorliegenden Substanzen, ein apoptotisches Verhalten der Zellen, mit zunehmender Konzentration der Analoga, nachgewiesen werden. Apoptose ist ein genetisch programmierter und physiologischer Zustand des Zellsterbens, welcher durch Cystein Proteasen, den Caspasen, ausgelöst wird und sich mit biochemischen, wie auch morphologischen Änderungen der jeweiligen Zellen sichtbar macht. Caspasen bestehen aus drei Untereinheiten, einer kleinen Untereinheit (10-13 kDa), einer großen Untereinheit (17-21 kDa) und einer Amino-Terminalen Untereinheit (38-24 kDa). Nach Aktivierung der Caspasen assoziieren die großen Untereinheiten mit der kleinen und bilden so das aktive Zentrum aus (Barman et al., 2018; Fan et al., 2005). Zwei verschiedene Formen der Apoptose sind bisher bekannt, die intrinsische und die extrinsische Apoptose (Barman et al., 2018). Bei der extrinsischen Apoptose wird der Zelltod extrazellulär ausgelöst, wobei ein über den Fas-Rezeptor (*first apoptotic signal*), welcher auch als Todesrezeptor bezeichnet wird (*death receptor*), weitergeleitetes Signal Ausgangspunkt des Zelltodes ist. Ein Ligand (Fas-Ligand) bindet hierbei an den Rezeptor wodurch eine Signalkaskade innerhalb der Zelle ausgelöst wird, welche wiederum die Bindung des Adapterproteins FADD (*Fas associated protein with death domain*) verursacht. Dieses Protein komplexiert dann mit der Pro-Caspase-8, über ihre DED (*death effector domain*). Es kommt schließlich zur Bildung des Komplexes DISC (*death receptor-induced signaling complex*) (Barman et al., 2018). Die Pro-Caspase-8 wird zur aktiven Caspase-8 gespalten und wirkt hierbei als Initiatorcaspase. In Typ I-Zellen ist die Caspase-8 sehr aktiv, sie spaltet und aktiviert die Effektorcaspasen 3, 6 und 7, welche Zielproteine zerschneiden und die Apoptose auslösen (Vermeulen et al., 2005). In Typ II-Zellen ist die Aktivität der Caspase-8 nicht stark genug, sodass über den mitochondrialen Signalweg, die

Apoptose ausgelöst wird (Ndozangue-Touriguine et al.,2008). Morphologische Kennzeichen der Apoptose sind insbesondere das Abrunden und Schrumpfen der Zelle, Pyknose, dichtes Cytoplasma, blasenförmige Membranausstülpungen (*Blebbing*) und dichtgepackte zelluläre Organellen (Barman et al., 2018; Fan et al., 2005). Die Apoptose ist hierbei ein irreversibler Prozess.

Unter Einsatz von hohen Konzentrationen der Analoga konnten den mikroskopischen Aufnahmen, auf Apoptose zurückzuführende morphologische Änderungen der Zellen entnommen werden. Abbildung 33 stellt mikroskopische Aufnahmen vom apoptotischen Zustand der Zellen dar. Es handelt sich hierbei um Immunfluoreszenzaufnahmen von HepG2 Zellen, nach Behandlung mit dem ATP-Analogon ICPT-c_014 (C15), bei einer Konzentration von 200 μM .

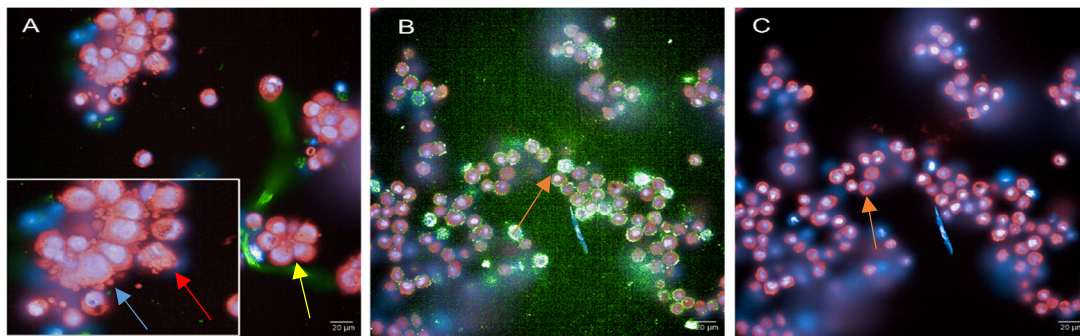


Abbildung 33: Immunfluoreszenzaufnahmen von apoptotischen Zellen. In A-C sind HepG2 Zellen nach Behandlung mit dem ATP-Analogon ICPT-c_014 bei einer Konzentration von 200 μM , zu sehen. Die Zellen sind stark abgerundet, kleine Blasen sind auf der Zelloberfläche zu sehen und die Zellen zerfallen in Apoptoskörperchen. Maßstab 20 μm .

Der Verlauf der Apoptose lässt sich mikroskopisch verfolgen. Die Pfeile markieren verschiedene Stadien der Apoptose. Es erfolgt zunächst ein Ablösen der Zellen vom Zellrasen. Die Zellen beginnen zu schrumpfen und auf der Zelloberfläche bilden sich zunehmend kleine Blasen (Abb. 33A, blauer Pfeil). Bei einer apoptotischen Zelle kommt es zu einer Verkürzung des Aktin-Zytoskeletts, ausgelöst durch eine Actomyosin-gesteuerte Kontraktion, welche zu einem Anstieg des intrazellulären Druckes führt (Charras, 2008). Da das Cytosol nicht sofort die Zelle verlassen kann, steigt der intrazelluläre Druck immer weiter an, bis schließlich der hohe Druck die Membran vom Aktin-Zytoskelett ablöst. Das Cytosol fließt dem Druckgradienten entsprechend, in den sich abgelösten Bereich der Membran (Charras, 2008). Durch den Anstieg der Cytosolmenge innerhalb der entstehenden Blase auf der Zelloberfläche, löst sich diese immer weiter ab. Lipide beginnen in die Blase hineinzugelangen. Schließlich veranlasst der Rückgang des Drucks, den Rückfluss des Cytosols in die Zelle (Charras, 2008). Während des Rückgangs des Cytosols, beginnen das Aktin-Zytoskelett und die Membran zu

verklumpen (Abb.33A, roter Pfeil). Die Zelle schrumpft immer weiter und zerfällt schließlich in Apoptosekörperchen (Abb.33A, gelber Pfeil). Die Apoptosekörperchen bleiben demnach weiterhin von der ursprünglichen Zellmembran eingeschlossen, sodass keine Inhalte des Cytoplasmas in das umliegende Medium gelangen. Im weiteren Verlauf schrumpfen die Apoptosekörperchen zunehmend, runden sich immer weiter ab und werden schließlich von Makrophagen phagozytiert und abgebaut. Der Inhalt der apoptotischen Zellen leuchtet intensiv (Abb. 33B). Die mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkerne werden ebenfalls kleiner und dichter (Abb. 33C).

Vorliegend war ein großer Unterschied im toxischen Verhalten der Substanzen nicht nachweisbar. Mit den ermittelten IC_{50} -Werten konnte eine höhere Sensitivität des CellTiter-Glo Assays im Vergleich zu der Mikroskopie ermittelt werden. Für die Zellmodelle Hek293, HepG2 und Caco-2 waren die ersten drei Konzentrationen von 7, 22 und 66 μM relativ ungiftig und ab höheren Konzentrationen wurden apoptotische Zellen detektiert. Bei den A549 Zellen konnten bei diesen Konzentrationen keine morphologischen, auf Apoptose zurückzuführenden Änderungen detektiert werden. Weder Blebbing, noch ein Abrunden der Zellen waren bei Konzentrationen bis zu 500 μM nachweisbar. Prinzipiell sind die A549 Zellen das bessere Zellmodell, da sie den zu testenden Substanzen gegenüber viel resilienter sind. Sowohl der CellTiter-Glo Assay, wie auch die Mikroskopie, veranschaulichten eine hohe Toleranz dieser Zellen den Analoga gegenüber. Insgesamt konnte auch mittels der Toxizitätsuntersuchungen eine Eignung dieser Zelllinie bestätigt werden. Die humanen Alveolarepithelzellen Typ II, die A549 Zellen wurden auch nach vorliegenden Untersuchungen, als geeignetes Zellmodell erwiesen.

5.3 Immunoblot

Vorliegend konnte mit den Dot Blot Ergebnissen ein Umsatz der ATP-Analoga durch Proteine innerhalb der Hek293 Lysate nachgewiesen werden. Bei der direkten Zugabe der Proben auf die Nitrozellulosemembran, ohne vorherige Inkubation der Zelllysate mit den ATP-Analoga, konnte nur die höchste Konzentration von 200 μM nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei vermutlich um die endogen biotinylierten Proteine, welche sich innerhalb der Zelle befinden und durch die Zugabe des Streptavidins, als sekundären Antikörper, detektiert wurden. Den Abbildungen 30C und D kann entnommen werden, dass bei einer vorherigen Inkubation der Zelllysate mit den Derivaten ein Umsatz des Substrates, auch bei geringen Konzentrationen stattfindet und auch nachweisbar ist. Nach einer Inkubationszeit von 30 min, erfolgt ein

Substratumsatz auch durch die in den Proben befindlichen Kinasen und ist auch bei geringen Konzentrationen von 25 μM nachweisbar. Der Stoffumsatz durch Kinasen ist somit zeitabhängig.

Die Banden im Western Blot bei etwa 55 kDa verdeutlichen, dass die ATP-Analoga nicht unspezifisch durch das Polyacrylamidgel laufen, sondern tatsächlich an Proteine binden. Unter Vergleich der beiden Bedingungen, der Ponceau S Färbung und der mit Antikörper behandelten Membran, ist eine konzentrationsabhängige Zunahme in der Bindung der ATP-Analoga an Proteine, bei 55 kDa ersichtlich. Mit den anderen Proteinen innerhalb der Proben findet keine Bindung statt. Die Lysate wurden mit gleichen Konzentrationen und unter gleichen Bedingungen behandelt. Bei allen Proben konnte ein Umsatz des ATP-Analogons erkannt werden, nur das Analogon ICPT-c_015 wurde nicht effizient umgesetzt. Dieses Analogon bietet somit eine gute Negativkontrolle, mit welcher eine Bindung der anderen Analoga an Proteine bestätigt werden konnte. Eine Zuordnung der Banden bei 55 kDa den endogen biotinylierten Proteinen der Mitochondrien, kann ausgeschlossen werden. Die biotungebundene Pyruvat Carboxylase in den Mitochondrien, hat ein Molekulargewicht von 120 kDa (Lim et al., 1988). Die Banden bei 55 kDa beruhen demnach nicht auf dieses Protein. Auch das biotungebundene, mitochondriale Enzym Propionyl-CoA Carboxylase hat ein Molekulargewicht von 74 kDa (Kalousek et al., 1980) und kann vorliegend ausgeschlossen werden. Die 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase ist ebenfalls ein mitochondriales Enzym und hat eine Länge von 720 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 80,5 kDa (Holzinger, 2001). Somit ist auch dieses Enzym größer als die nachgewiesenen Proteine bei 55 kDa. Das Enzym Acetyl-CoA Carboxylase ist ein cytoplasmatisches, biotungebundenes Enzym mit einem Molekulargewicht von 215 kDa (Goodson et al., 1984). Die Molekulargewichte aller endogen biotinylierten Proteine der Zelle können den sichtbaren Banden im Western Blot nicht zugeordnet werden. Folglich kann von einer tatsächlichen Umsetzung der ATP-Analoga durch Proteine in den Proben ausgegangen werden und somit von einer Übertragung des modifizierten γ -Phosphats auf Proteinkinasen.

Im weiteren Verlauf der Versuche sollen zur eindeutigen Einordnung der Banden bei 55 kDa den zugehörigen Proteinen gegenüber, Streptavidin Beads eingesetzt werden. Hierbei werden Streptavidin beschichtete *Magnetic beads*, mit hoher Bindungskapazität zur schnellen und selektiven Bindung von Biotinmolekülen eingesetzt. Das Streptavidin ist kovalent an die Beads gebunden und besitzt etwa vier Biotin-Bindungsstellen, an welche biotinylierte Proteine mit hoher Affinität binden können, sodass eine Aufreinigung von Proteingemischen ermöglicht

wird. Die Proben werden hierbei den Streptavidin-beschichteten *Magnetic beads* zur Bindung hinzugegeben. Die ausbleibenden Kohlenhydrat-Gruppen bei Streptavidin im Vergleich zu Avidin, resultieren in geringen unspezifischen Bindungen.

Bei einem solchen Versuch würden die Proben ohne Inkubation, mit denen mit einer Inkubationszeit von 30 min miteinander verglichen werden. Bei den Proben ohne Inkubation könnten auf diese Weise die endogen biotinylierten Proteine innerhalb der Mitochondrien als Kontrolle identifiziert werden. Bei den Proben mit einer Inkubationszeit von 30 min könnten neben den endogen biotinylierten Proteinen, auch alle anderen in der Probe befindlichen, biotinylierten Proteine kenntlich gemacht werden. Zur Charakterisierung und Quantifizierung der im Proteingemisch enthaltenen Proteine, könnte dann die unfokussierte (*shot-gun*) Proteomanalyse angewandt werden. Hierbei würden die Proteine zunächst durch Proteasen enzymatisch in kleinere Peptide zerlegt werden. Durch die enzymatische Spaltung der Proteine in kleinere Peptide, werden diese für die nachfolgende Massenspektrometrie zugänglicher gemacht. Es folgt die flüssigchromatographische Auftrennung des Peptidgemisches und anschließend die massenspektrometrische Analyse. Diese Analyse erfolgt über mehrere Schritte, bei welcher immer die intensivsten Signale getestet werden, was zur Trennung der Peptide innerhalb des Gemisches führt (McDonald and Yates, 2002; Schmidt et al., 2013). Die erhaltenen Ergebnisse könnten schließlich dem zugehörigen Protein, mittels Proteindatenbanken zugeordnet werden. Auf diese Weise wäre eine eindeutige Identifizierung der substratumsetzenden Proteine bei 55 kDa möglich. Diese Informationen könnten für weitere Untersuchungen, wie der Bestimmung der Bindungsaffinität der ATP-Analoga an diese Proteine herangezogen werden, wodurch eine Eingrenzung der zu untersuchenden und geeigneten Kinasen ermöglicht werden würde.

5.4 TR-FRET Untersuchungen

Ein Erschließen von Mechanismen der Signaltransduktion durch Proteinkinasen, sollte mittels vorliegender ATP-Derivate ermöglicht werden, wobei eine ausreichende Affinität der Proteinkinasen gegenüber, gegeben sein sollte. Vorliegend wurden zur Untersuchung der Bindungsaffinität der ATP-Analoga an ihre Zielenzyme, Kompetitions-Assays durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit der MAP2K1 Proteinkinase ausgeführt. Als synthetisch hergestellter Kinase-Inhibitor wurde Staurosporin eingesetzt. Bei Staurosporin handelt es sich um ein 1977 durch Omura et al., aus *Streptomyces staurosporeus* isoliertes mikrobielles Alkaloid, welches das weltweit erste seiner Art darstellte. Der Inhibitor hat neben seiner

antifungalen Eigenschaft, auch einen sehr hohen hypotensiven Effekt. Durch Tamaoki et al., konnte es 1986 als sehr effektiver Inhibitor der Protein Kinase C (PKC) mit einem IC_{50} von 2,7 nM, identifiziert werden. Staurosporin wurde in den darauffolgenden Jahren als überaus wirksamer, aber nicht spezifischer Inhibitor von Proteinkinasen, insbesondere den Tyrosin Kinasen bekannt. Neben seiner Fähigkeit zur Inhibierung der Aktivität von Kinasen, wurde außerdem ein überaus zytotoxischer Effekt dieses Inhibitors, auf Tumorzelllinien nachgewiesen. Aufgrund des unspezifischen Bindungsverhaltens des Inhibitors, wurde sein Einsatz in der Wirkstoffentwicklung stark eingedämmt (Ömura et al., 2018). Aktuell wird ein Zusammenhang des Staurosporins als Apoptose-Induktor diskutiert (Belmokhtar et al., 2001). In den vorliegenden Arbeiten, sollte das ATP-Analogon mit dem überaus wirksamen Staurosporin in Kompetitions-Assays, um die Bindung an die katalytische Domäne der MAP2K1 Kinase konkurrieren. Aus Untersuchungen der Inhibierung von Kinasen durch synthetisch hergestellte Inhibitoren, wurden die MEK-Kinasen als sensitive Kinasen bekannt (Gao et al., 2013). In den Studien von Gao et al. wurden im Jahr 2013, 234 aktive Kinasen aus allen Bereichen des menschlichen Kinoms gegen 158 nachweislich wirksame und spezifische niedermolekulare Inhibitoren getestet. Hierbei konnte eine Inhibierung der MAP2K1 Kinase durch neun Inhibitoren mit hoher Wirksamkeit ermittelt werden. Der für diese Kinase ermittelte Sensitivitätswert (engl. Sensitivity score) lag bei 0,057. Hierbei wurde die Gesamtzahl an Inhibitoren, welche die Kinasen mit hoher Wirksamkeit inhibieren, durch die Gesamtzahl an getesteten Inhibitoren dividiert. Vergleichsweise wurde für die Kinase Aurora-B ein Sensitivitätswert von 0,39 ermittelt, wodurch diese als überaus promiskuitive Kinase bekannt wurde. In den vorliegenden Kompetitions-Assays konnte eine Bindung des ATP-Analogons an die Proteinkinase MAP2K1, unter Anwesenheit des Inhibitors, festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 66 μ M des ATP-Analogons, war dieses in der Lage die ATP-Bindetasche der sensitiven Kinase effektiv zu besetzen und den promiskuitiven Inhibitor Staurosporin zu verdrängen. Somit besitzt das ATP-Analogon eine Bindungsaffinität für die ausgewählte Kinase, wodurch eine Nachverfolgung von Mechanismen der Signaltransduktion durch diese Kinase, ermöglicht werden kann. Vorliegend wurde eine ATP-Konzentration von 66 μ M eingesetzt, da diese Konzentration in den Immunfluoreszenzanalysen und Toxizitätsanalysen, als noch tolerierbar für die Zellen erwiesen wurde. Bei einer höheren Substratkonzentration könnte der kompetitive Inhibitor eventuell effektiver aus der Bindetasche der Kinase verdrängt werden. Wobei allerdings Hek293, HepG2 und Caco-2 Zellen, unter Einsatz höherer Konzentrationen, als Zellmodelle nicht mehr geeignet wären. Demgegenüber wurden in den

vorliegenden Arbeiten die A549 Zellen als Zellmodell mit hoher Resilienz den Analoga gegenüber identifiziert und würden demnach den Einsatz höherer Konzentrationen an Derivat gut tolerieren.

In Studien von Karaman et al. konnte für Staurosporin eine hohe Bindungsaffinität an die Proteinkinase MAP2K1 nachgewiesen werden. Hierbei wurden im Jahr 2008, 38 Kinase Inhibitoren gegen 317 Proteinkinasen getestet. Es wurden 21 Tyrosin Kinase Inhibitoren, 15 Serin-Threonin Kinase Inhibitoren, ein Lipidkinase Inhibitor, sowie Staurosporin eingesetzt. Alle getesteten Inhibitoren wurden mit einer Konzentration von 10 μM untersucht. Dabei konnten Zielkinasen der Inhibitoren identifiziert und die Dissoziationskonstanten (K_D) bestimmt werden. Innerhalb von 12.000 getesteten Kombinationen von niedermolekularen Inhibitoren und Kinasen, wurden etwa 3000 Bindungsinteraktionen ermittelt, mehr als 2000 Interaktionen mit einem K_D kleiner als 10 μM und 764 Interaktionen mit einem K_D kleiner als 100 nM. Für die MAP2K1 Kinase konnte Karaman et al. unter Einsatz des Inhibitors Staurosporin einen K_D von 21 nM nachweisen. Staurosporin weist demnach eine hohe Bindungsaffinität für diese Kinase auf. Um die Selektivität der getesteten Inhibitoren miteinander zu vergleichen, wurden in Karaman et al. außerdem Selektivitätswerte für die Inhibitoren ermittelt. Hierbei wurde die Anzahl an Kinasen, welche mit einer Dissoziationskonstante kleiner als 3 μM gebunden wurden, durch die Gesamtzahl an getesteten Kinasen (hier 290) dividiert. Für Staurosporin wurde ein Selektivitätswert von 0,87 ermittelt (253 Kinasen mit einem K_D <3 μM gebunden), wodurch Staurosporin als überaus promiskuitiver Inhibitor identifiziert wurde. Die hohe Bindungsaffinität des Staurosporins für die MAP2K1 Kinase, konnte auch mit den vorliegenden Verdrängungsuntersuchungen bestätigt werden. In den vorliegenden Arbeiten wurde ab einer Konzentration von 3,5 nM des Inhibitors das ATP-Analogon aus der ATP-Bindetasche der Kinase verdrängt. Unter Anwesenheit von geringen Konzentrationen des Staurosporins war es dem ATP-Analogon dennoch möglich gewesen die katalytische Domäne der Proteinkinase effektiv zu besetzen. Es kommt folglich, trotz der Anwesenheit des hochaffinen Inhibitors, zu einer nachweisbaren molekularen Wechselwirkung zwischen dem ATP-Analogon und der Proteinkinase, was als überaus vorteilhaft bewertet werden kann.

6. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels zellulärer Testsysteme γ -Phosphat modifizierte, neuartige Nukleosidtriphosphat Derivate, mit biologisch reversibler Maskierung, auf ihre Eignung zur kovalenten Markierung von Proteinkinasen untersucht werden. Hierbei konnte eine erfolgreiche Internalisierung und Freisetzung der γ -Phosphat modifizierten ATP-Derivate in vier Zellmodellen bestätigt werden. In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte die biologisch reversible Maskierung, zur Gewährleistung einer ausreichenden Membrangängigkeit der Derivate, als geeignet erwiesen werden. Zum Bewirken der Membrangängigkeit der Derivate war eine Maskenlänge von 12 Kohlenstoffatomen und die damit einhergehende Funktionalität der Ladungsmaskierung, nachweislich sehr gut geeignet. Das Analogon mit einer Kohlenstoffkette von 12 C-Atomen konnte vorliegend als effektivste Substanz identifiziert werden. Von den vier untersuchten Zelllinien konnten die A549 Zellen als effizientes Zellmodell mit der höchsten Resilienz den toxischen Einflüssen der Analoga gegenüber, sowie mit einer guten konzentrationsabhängigen zytoplasmatischen Aufnahme der C12-Substanz, ermittelt werden. Eine Bindung der biotinylierten ATP-Derivate an Proteinkinasen konnte mittels Immunoblot Untersuchungen experimentell bestätigt werden. Mit Hilfe von Western Blot Untersuchungen konnte eine Umsetzung der Analoga durch Proteine, mit einem Molekulargewicht von 55 kDa, festgestellt werden. Ein Erschließen von Mechanismen der Signaltransduktion durch Proteinkinasen sollte durch die ATP-Derivate ermöglicht werden, wobei eine ausreichende Bindungsaffinität der Proteinkinase gegenüber gegeben sein sollte. In FRET-Untersuchungen wurde die Affinität mit welcher Proteinkinasen die ATP-Analoga binden und das modifizierte γ -Phosphat zur Phosphorylierung weiterer Proteine nutzen untersucht. Hierbei konnte unter Anwesenheit des überaus affinen Proteinkinase Inhibitors Staurosporin, eine Affinität der ATP-Analoga der sensitiven Kinase MAP2K1 gegenüber, ermittelt werden. Im weiteren Verlauf des Projektes sollen Proteomanalysen zur eindeutigen Identifizierung der durch die ATP-Analoga biotinylierten Proteine durchgeführt werden. Auf diese Weise kann bei erneuter Untersuchung der Bindungsaffinität der ATP-Analoga an Proteinkinasen, eine Eingrenzung der einzusetzenden Kinasen durchgeführt werden, wodurch spezifische Aussagen getroffen werden können.

Literaturverzeichnis

- Abella, J.V., Park, M., 2009. Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 296, E973–E984. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90857.2008>
- Ameis, D., Greten, H., Schotz, M., 1992. Hepatic and Plasma Lipases. *Semin. Liver Dis.* 12, 397–402. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040409>
- Andrews, N.W., Corrotte, M., 2018. Plasma membrane repair. *Curr. Biol.* 28, R392–R397. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.034>
- Attwood, M.M., Fabbro, D., Sokolov, A.V., Knapp, S., Schiöth, H.B., 2021. Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 839–861. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00252-y>
- Bargui, R., Solgadi, A., Prost, B., Chester, M., Ferreiro, A., Piquereau, J., Moulin, M., 2021. Phospholipids: Identification and Implication in Muscle Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8176. <https://doi.org/10.3390/ijms22158176>
- Barman, J., Kumar, R., Saha, G., Tiwari, K., Dubey, V.K., 2018. Apoptosis: Mediator Molecules, Interplay with Other Cell Death Processes and Therapeutic Potentials. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 19, 644–663. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180821093239>
- Béguin, P., Hasler, U., Staub, O., Geering, K., 2000. Endoplasmic Reticulum Quality Control of Oligomeric Membrane Proteins: Topogenic Determinants Involved in the Degradation of the Unassembled Na,K-ATPase α Subunit and in Its Stabilization by β Subunit Assembly. *Mol. Biol. Cell* 11, 1657–1672. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.5.1657>
- Belmokhtar, C.A., Hillion, J., Ségal-Bendirdjian, E., 2001. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20, 3354–3362. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204436>
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J.M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Wieckowski, M.R., Pinton, P., 2012. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal.* 8, 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>
- Cantor, A.H., Moorhead, P.D., Musser, M.A., 1982. Comparative Effects of Sodium Selenite and Selenomethionine upon Nutritional Muscular Dystrophy, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, and Tissue Selenium Concentrations of Turkey Poults. *Poult. Sci.* 61, 478–484. <https://doi.org/10.3382/ps.0610478>
- Charras, G.T., 2008. A short history of blebbing. *J. Microsc.* 231, 466–478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02059.x>
- Chaudhry, R., Varacallo, M., 2021. Biochemistry, Glycolysis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Cheek, S., Ginalska, K., Zhang, H., Grishin, N.V., 2005. A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct. Biol.* 5, 6. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-5-6>
- Chivers, C.E., Koner, A.L., Lowe, E.D., Howarth, M., 2011. How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimeric tetramer. *Biochem. J.* 435, 55–63. <https://doi.org/10.1042/BJ20101593>
- Clausen, M.V., Hilbers, F., Poulsen, H., 2017. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease. *Front. Physiol.* 8, 371. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00371>

- Coates, J., Gay, E., Sammes, P.G., 1997. Anion effects on the luminescence of europium complexes. *Dyes Pigments* 34, 195–205. [https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(96\)00079-4](https://doi.org/10.1016/S0143-7208(96)00079-4)
- Cooper, G.M., 2000. Structure of the Plasma Membrane. *Cell Mol. Approach* 2nd Ed.
- Cooper, G.M., Cooper, G.M., 2000. *The Cell*, 2nd ed. Sinauer Associates.
- Degorce, F., Card, A., Soh, S., Trinquet, E., Knapik, G.P., Xie, B., 2009. HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery – A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Curr. Chem. Genomics* 3, 22–32. <https://doi.org/10.2174/1875397300903010022>
- Derewenda, Z.S., 1994. Structure and Function of Lipases, in: *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier, pp. 1–52. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60637-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60637-3)
- Du, Z., Lovly, C.M., 2018. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol. Cancer* 17, 58. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>
- Dunn, J., Grider, M.H., 2021. Physiology, Adenosine Triphosphate, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Escalante-Martinez, J.E., Morales-Mendoza, L.J., Calderon-Ramon, C., Romero Juarez, L.D., Santes Paredes, E., Garcia, J.V., Laguna-Camacho, J.R., Gonzalez-Rocha, S.N., Mejia-Sanchez, E., Garrido-Melendez, J., Lopez-Calderon, H., Martinez-Castillo, J., 2018. Fractional Derivatives modeling dielectric properties of biological tissue, in: 2018 IEEE XXV International Conference on Electronics, Electrical Engineering and Computing (INTERCON). Presented at the 2018 IEEE XXV International Conference on Electronics, Electrical Engineering and Computing (INTERCON), IEEE, Lima, pp. 1–3. <https://doi.org/10.1109/INTERCON.2018.8526460>
- Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S., Liang, J., 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 37, 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
- Förster, Th., 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 437, 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>
- Galvão, J.G., Santos, R.L., Lira, A.A.M., Kaminski, R., Sarmiento, V.H., Severino, P., Dolabella, S.S., Scher, R., Souto, E.B., Nunes, R.S., 2020. Stearic Acid, Beeswax and Carnuba Wax as Green Raw Materials for the Loading of Carvacrol into Nanostructured Lipid Carriers. *Appl. Sci.* 10, 6267. <https://doi.org/10.3390/app10186267>
- Gao, Y., Davies, S.P., Augustin, M., Woodward, A., Patel, U.A., Kovelman, R., Harvey, K.J., 2013. A broad activity screen in support of a chemogenomic map for kinase signalling research and drug discovery. *Biochem. J.* 451, 313–328. <https://doi.org/10.1042/BJ20121418>
- Germer, L.H., Storks, K.H., 1937. The Structure of Langmuir-Blodgett Films of Stearic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 23, 390–397.
- Goldsmith, E.J., Cobb, M.H., 1994. Protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 833–840. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(94\)90264-X](https://doi.org/10.1016/0959-440X(94)90264-X)
- González, M., Bagatolli, L.A., Echabe, I., Arrondo, J.L.R., Argaraña, C.E., Cantor, C.R., Fidelio, G.D., 1997. Interaction of Biotin with Streptavidin. *J. Biol. Chem.* 272, 11288–11294. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11288>
- Goodson, J., Pope, T.S., Allred, J.B., 1984. Molecular weights of subunits of acetyl CoA carboxylase in rat liver cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 694–699. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(84\)80089-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80089-3)
- Grover, A.K., Kwan, C.Y., Oakes, P.J., 1985. Calcium pump, high-affinity Ca²⁺-ATPase, and other ATPases in dog antrum smooth muscle plasma membrane. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 248, C449–C456. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1985.248.5.C449>

- Hammler, D., Marx, A., Zumbusch, A., 2018. Fluorescence-Lifetime-Sensitive Probes for Monitoring ATP Cleavage. *Chem. – Eur. J.* 24, 15329–15335. <https://doi.org/10.1002/chem.201803234>
- Hanks, S.K., Hunter, T., 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification1. *FASEB J.* 9, 576–596. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.8.7768349>
- Hide, W., Chan, L., Li, W., 1992. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J. Lipid Res.* 33, 167–178. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)41537-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)41537-8)
- Hoehn-Berlage, M., Hossmann, K.-A., Busch, E., Eis, M., Schmitz, B., Gyngell, M.L., 1997. Inhibition of Nonselective Cation Channels Reduces Focal Ischemic Injury of Rat Brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 534–542. <https://doi.org/10.1097/00004647-199705000-00007>
- Hogan, F., Mormede, S., Clark, P., Crane, M., 2004. Ultrasonic sludge treatment for enhanced anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 50, 25–32. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0526>
- Hollinshead, M., Sanderson, J., Vaux, D.J., 1997. Anti-biotin Antibodies Offer Superior Organelle-specific Labeling of Mitochondria over Avidin or Streptavidin. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 1053–1057. <https://doi.org/10.1177/002215549704500803>
- Holzinger, A., 2001. Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA: carboxylase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1299–1306. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.12.1299>
- Jia, Y., 2008. Current status of HTRF[®] technology in kinase assays. *Expert Opin. Drug Discov.* 3, 1461–1474. <https://doi.org/10.1517/17460440802518171>
- Kabsch, W., Holmes, K.C., 1995. The actin fold. *FASEB J.* 9, 167–174. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.2.7781919>
- Kalousek, F., Darigo, M.D., Rosenberg, L.E., 1980. Isolation and characterization of propionyl-CoA carboxylase from normal human liver. Evidence for a protomeric tetramer of nonidentical subunits. *J. Biol. Chem.* 255, 60–65. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)86263-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)86263-4)
- Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E.M., Levin, L.R., Buck, J., Steegborn, C., 2006. Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems. *J. Mol. Biol.* 362, 623–639. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.045>
- Kannaiyan, R., Mahadevan, D., 2018. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 18, 1249–1270. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1527688>
- Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., Faraoni, R., Floyd, M., Hunt, J.P., Lockhart, D.J., Milanov, Z.V., Morrison, M.J., Pallares, G., Patel, H.K., Pritchard, S., Wodicka, L.M., Zarrinkar, P.P., 2008. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* 26, 127–132. <https://doi.org/10.1038/nbt1358>
- Khakh, B.S., Burnstock, G., 2009. THE DOUBLE LIFE OF ATP. *Sci. Am.* 301, 84–92.
- Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A.T., 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 402, 185–202. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00297-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00297-2)
- Kornev, A.P., Taylor, S.S., 2010. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804, 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>

- Krishnan, A., Burroughs, A.M., Iyer, L.M., Aravind, L., 2020. Comprehensive classification of ABC ATPases and their functional radiation in nucleoprotein dynamics and biological conflict systems. *Nucleic Acids Res.* 48, 10045–10075. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa726>
- Kuo, Y.-T., Lin, T.-H., Chen, W.-L., Lee, H.-M., 2012. Alpha-lipoic acid induces adipose triglyceride lipase expression and decreases intracellular lipid accumulation in HepG2 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 692, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.07.028>
- Langen, P., Hucho, F., 2008. Karl Lohmann and the Discovery of ATP. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 1824–1827. <https://doi.org/10.1002/anie.200702929>
- Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* 17, 62–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910170110>
- Lim, F., Morris, C.P., Occhiodoro, F., Wallace, J.C., 1988. Sequence and domain structure of yeast pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 263, 11493–11497. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)37984-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37984-5)
- Lin, Y.-L., Meng, Y., Jiang, W., Roux, B., 2013. Explaining why Gleevec is a specific and potent inhibitor of Abl kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1664–1669. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214330110>
- Lingrel, J.B., Kuntzweiler, T., 1994. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269, 19659–19662. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32067-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32067-7)
- Lippert, T., Bandelin, J., Schleder, F., Drewes, J.E., Koch, K., 2019. Impact of ultrasound-induced cavitation on the fluid dynamics of water and sewage sludge in ultrasonic flatbed reactors. *Ultrason. Sonochem.* 55, 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.01.024>
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298, 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Maurice, D.H., Palmer, D., Tilley, D.G., Dunkerley, H.A., Netherton, S.J., Raymond, D.R., Elbatarny, H.S., Jimmo, S.L., 2003. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Activity, Expression, and Targeting in Cells of the Cardiovascular System. *Mol. Pharmacol.* 64, 533–546. <https://doi.org/10.1124/mol.64.3.533>
- McDonald, W.H., Yates, J.R., 2002. Shotgun Proteomics and Biomarker Discovery. *Dis. Markers* 18, 99–105. <https://doi.org/10.1155/2002/505397>
- MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes, n.d. 6.
- Natriumselenit BioReagent, suitable for cell culture, ≥98% | Sigma-Aldrich [WWW Document], n.d. URL <http://www.sigmaaldrich.com/> (accessed 10.22.21).
- Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., Bréard, J., 2008. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 76, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.016>
- Ōmura, S., Asami, Y., Crump, A., 2018. Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. *J. Antibiot. (Tokyo)* 71, 688–701. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0029-z>
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., Asuma, R., 1977. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 30, 275–282. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.30.275>
- Philips, R.M. & R., n.d. » How much energy is released in ATP hydrolysis? URL <http://book.bionumbers.org/how-much-energy-is-released-in-atp-hydrolysis/> (accessed 10.28.21).
- Piston, D.W., Kremers, G.-J., 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* 32, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.003>

- Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., Kobilka, B.K., 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>
- Rosing, J., Slater, E.C., 1972. The value of ΔG° for the hydrolysis of ATP. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 267, 275–290. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(72\)90116-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(72)90116-8)
- Roskoski, R., 2021. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacol. Res.* 165, 105463. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105463>
- Schlessinger, J., 2000. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103, 211–225. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00114-8)
- Schmidt, A., Picotti, P.A., Aebersold, R., n.d. *Proteomanalyse und Systembiologie* 4.
- Shchemelinin, I., Šefc, L., Nečas, E., 2006. Protein Kinases, Their Function and Implication in Cancer and Other Diseases 52, 21.
- Simmons, N., 1990. A cultured human renal epithelioid cell line responsive to vasoactive intestinal peptide. *Exp. Physiol.* 75, 309–319. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1990.sp003406>
- Stillwell, W., 2016. Membrane Transport. *Introd. Biol. Membr.* 423–451. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63772-7.00019-1>
- Stockert, K., 2020. Lipidmediatoren und ihre Rolle bei Entzündungen und Allergien. *Allergieprävention* 185–245. https://doi.org/10.1007/978-3-662-58140-7_6
- Stokes, D.L., Nakamoto, R.K., 1994. Structures of P-type and F-type ion pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90308-5](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90308-5)
- Strelow, J., Dewe, W., Iversen, Phillip W., Brooks, H.B., Radding, J.A., McGee, J., Weidner, J., 2004. Mechanism of Action Assays for Enzymes, in: Markossian, S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C.P., Baell, J., Chung, T.D.Y., Coussens, N.P., Dahlin, J.L., Devanarayan, V., Foley, T.L., Glicksman, M., Hall, M.D., Haas, J.V., Hoare, S.R.J., Inglese, J., Iversen, Philip W., Kales, S.C., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Saradjian, P., Sittampalam, G.S., Tarselli, M., Trask, O.J., Wang, Y., Weidner, J.R., Wildey, M.J., Wilson, K., Xia, M., Xu, X. (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., Tomita, F., 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipidCa⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 397–402. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90008-2)
- Toyoshima, C., 2009. How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1793, 941–946. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.008>
- van Breemen, R.B., Li, Y., 2005. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 1, 175–185. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>
- Van Zoelen, E.J.J., Tertoolen, L.G.J., Boonstra, J., Van Der Saag, P.T., De Laat, S.W., 1982. Effect of external ATP on the plasma membrane permeability and (Na⁺⁺K⁺)-ATPase activity of mouse neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 720, 223–234. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(82\)90045-3](https://doi.org/10.1016/0167-4889(82)90045-3)
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* 84, 627–639. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-1065-x>
- Vulpetti, A., Bosotti, R., 2004a. Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Il Farm.* 59, 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.farmac.2004.05.010>

- Vulpetti, A., Bosotti, R., 2004b. Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Il Farm.* 59, 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.farmac.2004.05.010>
- Watson, H., 2015. Biological membranes. *Essays Biochem.* 59, 43–69. <https://doi.org/10.1042/bse0590043>
- Yan, Y., 2003. Analysis of protein interactions using fluorescence technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 635–640. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.017>
- Yang, N.J., Hinner, M.J., 2015a. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1266, 29–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3
- Yang, N.J., Hinner, M.J., 2015b. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1266, 29–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3
- Zimmerman, J.J., von Saint André-von Arnim, A., McLaughlin, J., 2011. Cellular Respiration, in: *Pediatric Critical Care*. Elsevier, pp. 1058–1072. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07307-3.10074-6>

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Samira Rezahie

Hamburg, 28.November.2021

Anhang

	Caco-2						HepG2																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
A	12	12	12	14	14	14	10000	12	12	12	14	14	14	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
B	12	12	12	14	14	14	10000	12	12	12	14	14	14	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
C	12	12	12	14	14	14	10000	12	12	12	14	14	14	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
D	12	12	12	14	14	14	10000	12	12	12	14	14	14	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
E	12	12	12	14	14	14	10000	12	12	12	14	14	14	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
F	12	12	12	14	14	14	10000	12	12	12	14	14	14	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
G	12	12	12	14	14	14	10000	12	12	12	14	14	14	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
H	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
I	13	13	13	15	15	15	10000	13	13	13	15	15	15	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
J	13	13	13	15	15	15	10000	13	13	13	15	15	15	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
K	13	13	13	15	15	15	10000	13	13	13	15	15	15	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
L	13	13	13	15	15	15	10000	13	13	13	15	15	15	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
M	13	13	13	15	15	15	10000	13	13	13	15	15	15	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
N	13	13	13	15	15	15	10000	13	13	13	15	15	15	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
O	13	13	13	15	15	15	10000	13	13	13	15	15	15	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
P	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium

Abbildung 34: Platte für die Immunfluoreszenzanalyse

Layout der CellCarrier-384 Well Platte zur Behandlung der Zellen mit den ATP-Derivaten. Die Derivate wurden beginnend mit der kleinsten Konzentration in dreifach Bestimmungen in die Wells pipettiert. Die Zahlen 12-15 stehen für die Analoga ICPT-c_012, ICPT-c_013, ICPT-c_014 und ICPT-c_015. Vorliegend ist die Platte für die Behandlung von Caco-2 und HepG2 Zellen zu sehen. Die Hek293 und A549 Zellen wurden gleich behandelt.

	Caco-2						HepG2																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
B	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
C	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
D	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
E	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
F	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
G	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	12	12	10000	14	14	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
H	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
I	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
J	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
K	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
L	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
M	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
N	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
O	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	13	13	10000	15	15	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
P	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	Medium	Medium	Medium	Medium
								Na ₂ SeO ₃	Medium										Na ₂ SeO ₃	Medium				

Abbildung 35: Platte für die Toxizitätsanalyse.

Layout der Cellstar-384 Well Platte von Greiner zur Untersuchung der Toleranz der Zellen den ATP-Analoga gegenüber. Es wurden 10.000 Zellen pro Well ausgesät.

	Input	Method	Output
Find Nuclei	Channel: HOECHST 33258 ROI: None	Method: B	Output Population: Nuclei
Find Cytoplasm	Channel: CellMask Deep Red Nuclei: Nuclei Selected	Method: A	
Find Spots	Channel: Alexa488 ROI: Nuclei Selected ROI Region: Cell	Method: A	Output Population: Spots in whole cells
Select Cell Region	Population: Nuclei Selected	Method: Resize Region [%] Region Type: Membrane Region Outer Border: -5 % Inner Border: 5 %	Output Region: Membrane Region
Calculate Intensity Properties	Channel: Alexa488 Population: Nuclei Selected Region: Cell	Method: Standard Mean	Property Prefix: intensity Cell Alexa488
Calculate Intensity Properties	Channel: Alexa488 Population: Nuclei Selected Region: Membrane	Method: Standard Mean	Property Prefix: intensity Membran Region Alexa488
Calculate Intensity Properties	Channel: Alexa488 Population: Nuclei Selected Region: Membrane	Method: Standard Mean	Property Prefix: intensity Membrane Alexa488
Calculate Intensity Properties	Channel: Alexa488 Population: Nuclei Selected Region: Cytoplasm	Method: Standard Mean	Property Prefix: intensity Cytoplasm Alexa488
Calculate Intensity Properties	Channel: Alexa488 Population: Nuclei Selected Region: Nucleus	Method: Standard Mean	Property Prefix: intensity Nucleus Alexa488

Abbildung 36: Ausgewählte Einstellungen für die Analyse der konfokalen Bildaufnahmen. Die Analysen wurden mit der Columbus Software Version 2.9.0 durchgeführt.

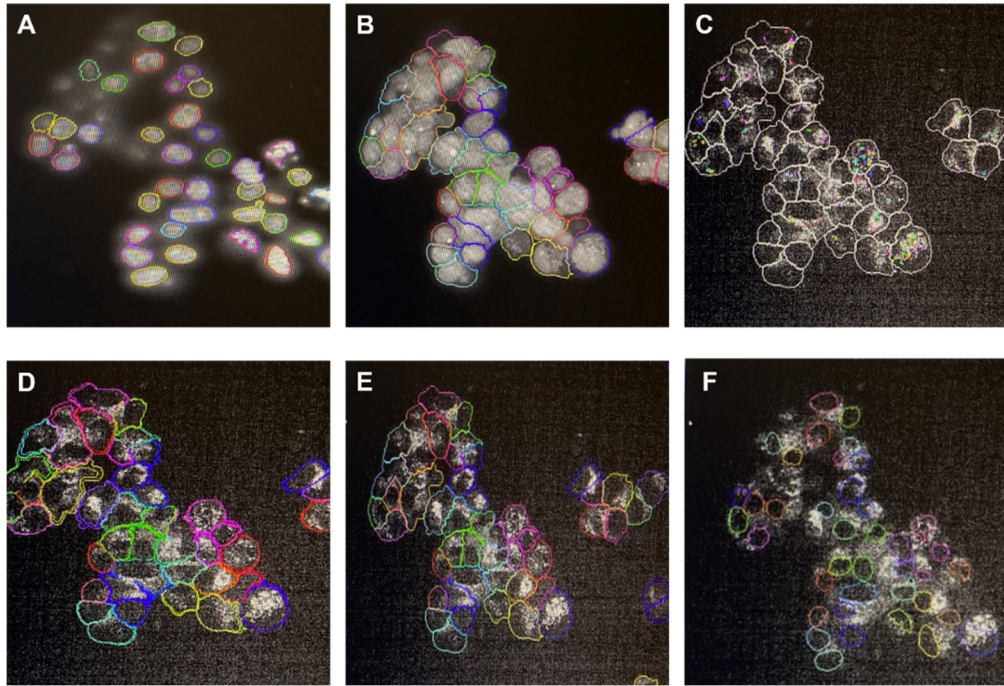


Abbildung 37: Analyse der konfokalen Bildaufnahmen. A) Detektion des Nucleus, B) Detektion des Cytoplasmas, C) Detektion von Spots in der Zelle, D) Kompartimentierung, Auswahl der Membran Region, E) Berechnung Alexa488 Intensität in der gesamten Zelle, F) Berechnung Alexa488 Intensität im Nucleus