

Enzymatische und phänotypische Untersuchung von niedermolekularen Ste20-like Kinase Inhibitoren

Bachelorarbeit

Milena Kalmer

Matrikelnummer 2102559

Studiengang Biotechnologie

Fakultät Life Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Vorgelegt am 12.09.2016

Gutachter:

Prof. Dr. Oliver Ullrich

Dr. Bernhard Ellinger

Diese Arbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Fraunhofer-Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME ScreeningPort

Erklärung

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

Milena Kalmer

Hamburg, den 12.09.2016

Inhalt

Erklärung.....	I
Inhalt	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Arteriosklerose	1
1.1.1 Fokale Adhäsionen	2
1.1.2 LIM domain binding (Ldb) 2 in Arteriosklerose	3
1.2 Ziel dieser Arbeit.....	4
1.3 Chemotaxis-Assay	5
1.3.1 Chemotaxis allgemein	5
1.3.2 Verschiedene Migrationsassay-Formate	6
1.3.3 IncuCyte	8
1.3.4 Genutze THP-1-Zellen	9
1.4 FRET -Assay.....	12
1.5 CellTiter-Glo Viabilitätsassay	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Enzymatische Untersuchungen	15
2.1.1 PerkinElmerSet	15
2.1.2 HTRF KinEASE-STK-Set	17
2.2 Migrationsassay	19
2.2.1 Zellkultur.....	19
2.2.2 Beschichtung der Platten.....	20
2.2.3 Aussäen und Differenzierung der Zellen	22
2.2.4 Hinzufügen von Chemokin/Medien-Wechsel	23
2.2.5 Auswertung	25
2.2.6 Dosis-Wirkungskurven der Inhibitoren	27

2.3 Toxizitätstest Inhibitoren	28
3 Ergebnisse	31
3.1 Enzymatische Untersuchung.....	31
3.1.1 PerkinElmerSet	31
3.1.2 HTRF KinEASE-STK-Set	31
3.2 Migrationsassay	33
3.2.1 Differenzierung.....	33
3.2.2. Verschiedene Zellkonzentrationen.....	34
3.2.3 Migrationsverhalten	35
3.2.4 Verschiedene Beschichtungen	37
3.2.5 Verschiedene Chemokine.....	38
3.2.6 Bestimmung der Toxizität der Inhibitoren	39
3.2.7 Inhibition der Migration durch die getesteten Inhibitoren.....	41
4 Diskussion	45
4.1 Enzym.....	45
4.2 Differenzierung	46
4.3 Experimentell bestimmter Wert für EC ₅₀ von C5a	47
4.4 Weitere Anwendung der Verfahren	49
4.5 Fazit.....	51
Literaturverzeichnis.....	53
Anhang	56

Abkürzungsverzeichnis

A	Akzeptor
ADP	Adenosindiphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
ATH	AT1-46 Homologie Domäne
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CCR2	C-C Chemokine Receptor Type 2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C5a	Komplementkomponente C5a
C5aR	C5a Receptor
C5L2	G Protein-gekoppelter Rezeptor 77
D	Donor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EC ₅₀	Mittlere Effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
Eu	Europium-basiertes Chelat
FA	Fokale Adhäsionen
FCS	Fetal Calf Serum
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
IC ₅₀	Mittlere Inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin
K _m	Michaelis-Menten Konstante
Ldb	LIM Binding Domain

LPL	Lipoprotein Lipase
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaOH	Natronlauge
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
P/S	Penicillin/Streptomycin
Q	Glutamin
RT	Raumtemperatur
SLK	Ste20-like Kinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TR-FRET	Time Resolved Förster Resonanz Energie Transfer
w	With
w/o	Without

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Boyden-Kammer. Die Zellen werden auf einer porösen Membran ausgesät und migrieren entlang des Chemokingradienten in die untere Kammer. Messung durch Anfärben der Zellen auf der Unterseite der Membran oder Fluoreszenz-Farbstoffe. Quelle: (Kramer et al. 2013).....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wund-Heilungs-Assay. In konfluente Zellen wird z.B. mit einer Pipettenspitze eine „Wunde“ gekratzt. Beobachtet wird die Migration der Zellen in die zellfreie Region. Quelle: (Kramer et al. 2013)	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellausschluss-Assays. Hier wird bei dem Aussäen mit Hilfe eines Silikonstoppers eine zellfreie Zone kreiert. Bei Entfernung des Stempels migrieren die Zellen. Quelle: (Kramer et al. 2013).....	7
Abbildung 4: Aufbau einer IncuCyte-Platte. A Deckel, B Insert-Platte mit Wells, in die die Zellen gegeben werden, auf der Unterseite mit einer porösen Membran verschlossen, C Reservoir-Platte, welche das Chemokin enthält. Quelle: (Essen BioScience 2016b)	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung des FRET-Systems von PerkinElmer. Dargestellt ist die Phosphorylierung des Peptids durch die Kinase sowie die anschließende Bindung des Antikörpers. Quelle: (Caron et al. 2006)	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Luciferase Reaktion. Hier ist die spezielle Reaktion des CellTiter-Glo Reagenzes dargestellt. Quelle: (Promega 2015)	14
Abbildung 7: Aufnahme von undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen im Phasenkontrastmikroskop. Links: Undifferenzierte, kugelförmige THP-1 Zellen auf Matrigel. Rechts: Differenzierte THP-1 Zellen auf Matrigel. Differenzierung durch die Zugabe von 5 ng/ml PMA induziert. Es sind deutliche morphologische Unterschiede zwischen den undifferenzierten und den differenzierten THP-1-Zellen zu erkennen.....	33
Abbildung 8: Verschiedene THP-1 Zellzahlen auf Matrigel. Von der Software erkannte Zellen sind orange dargestellt. Getestet wurde, welche Zellzahl für das Migrationsassay geeignet ist.	34
Abbildung 9: Differenzierte THP-1 Zellen auf einer porösen Membran im Phasenkontrastmikroskop. Zellen auf der Oberseite der Membran sind orange dargestellt. Zellen auf der Unterseite der Membran sind grün dargestellt. Die Poren sind in türkis markiert. Links: 1 Stunde nach Zugabe des Chemokins in das Reservoir-Well befinden fast keine Zellen auf der Unterseite der Membran. Rechts: Das selbe Well nach 24 Stunden, deutlich zu erkennen ist, dass die Anzahl an Zellen auf der Unterseite der Membran angestiegen ist.....	35
Abbildung 10: Reaktion der THP-1 Zellen auf verschiedene Chemokine. Die undifferenzierten Zellen reagieren auf das Chemokin MCP-1 (1 µg/ml), die differenzierten Zellen lassen sich durch C5a (135 nM) stimulieren.	36

Abbildung 11: Fibronectin-Beschichtung (5µg/ml ohne BSA) mit Phasenkontrastmikroskop aufgenommen, 10x Objektiv. Fokussiert wurde die Unterseite der Membran. Zellen auf der Oberseite der Membran sind verschwommen zu erkennen. Die Poren in der Membran sind türkis markiert. Um einige Poren sind unebene Strukturen zu erkennen.	37
Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve von beiden Chemokinen. Auf der Y-Achse ist die Veränderung der Fläche, die die Zellen einnehmen, aufgetragen, während auf der X-Achse der dekadische Logarithmus der Konzentration des Chemokins abgebildet ist. Links ist die Zunahme der Zellen auf der Unterseite der Membran zu sehen. Rechts abgebildet ist die Veränderung der Zellen auf der Oberfläche der Membran.	38
Abbildung 13: Toxizität der niedermolekularen Inhibitoren auf undifferenzierte THP-1-Zellen. Viabilität der Zellen 24 Stunden nach Zugabe der Substanzen mit CellTiterGlo durch Messung der Lumineszenz bestimmt. Der IC ₅₀ von K20043659 beträgt 11,3 µM und der IC ₅₀ von K20044749 beträgt 4,0 µM.....	40
Abbildung 14: Toxizität der niedermolekularen Inhibitoren auf die differenzierten THP-1 Zellen. Viabilität wurde nach 24 Stunden mit CellTiter-Glo bestimmt. Der IC ₅₀ von K20043659 beträgt 21,6 µM und der IC ₅₀ von K20044749 beträgt 16,2 µM	40
Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurven der Inhibitoren im Migrationsassay mit differenzierten THP-1 Zellen. Bei beiden Kurven ist ein oberes und ein unteres Plateau angedeutet. Der hier bestimmte IC ₅₀ für K20043659 beträgt 977 nM und der IC ₅₀ für K20044749 beträgt 16 nM	42
Abbildung 16: Dosis-Wirkungskurven der beiden Inhibitoren im Migrationsassay mit undifferenzierten Zellen. Für K20043659 lässt sich kein plausibler IC ₅₀ bestimmen. Die Werte streuen hier so sehr, dass die Software versucht einen Kurvenverlauf darin zu erkennen. Der rote Punkt entspricht toten, nicht migrierten Zellen. Bei K20044749 lässt sich deutlich eine Inhibition der Migration erkennen. Der hier bestimmte IC ₅₀ beträgt 1,8 µM.....	43
Abbildung 17: Undifferenzierten Zellen mit Inhibitor; links: die undifferenzierten THP-1 Zellen bei der Zugabe des Inhibitors; rechts: Dieselben Wells 24 Stunden nach Zugabe des Inhibitors. Die Zellen sind wesentlich kleiner und wirken als hätten sie sich zusammen gezogen; Dieser Vorgang kann im Migrationsassay mit Migration verwechselt werden, werden nur die reinen Werte betrachtet.	43
Abbildung 18: Dosis-Wirkungskurve von C5a. in blau eingezeichnet ist der vom Programm bestimmte EC ₅₀ . In grün dargestellt ist ein alternativer EC ₅₀ , wenn davon ausgegangen wird, dass die Steigung keine höheren Werte erreicht als hier dargestellt.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Alle mit dem Testsystem von PerkinElmer getesteten Konditionen	17
Tabelle 2: Alle mit dem HTRF KinEASE-STK-Set getesteten Konditionen	18
Tabelle 3: Verschiedene getestete Fibronectin-Konzentrationen zur verbesserten Adhärenz der Zellen ..	20
Tabelle 4: Verschiedene getestete Zellkonzentrationen im Migrationsassay	23
Tabelle 5: Getestete Chemokin-Konzentrationen	25
Tabelle 6: Getestete Konzentrationen im Migrationsassay	28
Tabelle 7: Getestete Inhibitor-Konzentrationen im Viabilitätsassay	29
Tabelle 8: Differenz der Steigung der Zunahme bzw. Abnahme der von Zellen bedeckten Fläche zwischen Positiv- und Negativ- Kontrolle. Für beide Zelltypen ist die Matrigel-Beschichtung besser geeignet.	38
Tabelle 9: Abbildung der mittleren effektiven Konzentration der beiden genutzten Chemokine; Abgebildet ist der Literaturwert im Gegensatz zum experimentell bestimmten Wert.	39
Tabelle 10: Darstellung der IC ₅₀ -Werte der Inhibitoren für das Enzym und die Toxizität auf Zellen; Bei den Werten für das Enzym handelt es sich um Literaturwerte; die IC ₅₀ -Werte für die Toxizität wurden experimentell bestimmt.	41

Zusammenfassung

Arteriosklerose gehört zu den am meisten verbreiteten Todesursachen weltweit, da es die Hauptursache für Myokardinfarkte und Schlaganfälle ist. Bisherige Therapien setzen an der Reduzierung der Risikofaktoren an, während es noch keine Therapien gibt, um z.B. die transendotheliale Migration von Monozyten und Makrophagen zu hemmen. In dieser Migration begründet sich die Entstehung der arteriosklerotischen Plaques. Die Inhibierung der Ste20-like Kinase (SLK) stellt eine Möglichkeit dar diesen Prozess zu unterbrechen. Aus diesem Grund wurden zwei Inhibitoren der SLK in einem enzymatischen und einem phänotypischen Screen untersucht und deren Auswirkung auf die Migration der Zellen genauer studiert.

Für die enzymatische Untersuchung sollte ein Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)-System etabliert werden, was gescheitert ist. Als Modell zur Untersuchung der Migration von Monozyten und Makrophagen wurden THP-1 Zellen in ihrem nativen sowie differenzierten Zustand genutzt. Dafür wurde ein abgewandeltes Boyden-Kammer-Assay eingesetzt. Zur Optimierung dieses Assays wurden die Beschichtung der Membran, Konzentration von Chemokinen, Zelldichte und Inhibitor-Toxizität genauer untersucht.

Unter Einfluss des Inhibitors wurde die Migration der Zellen teilweise gehemmt. Interessanterweise zeigten die Inhibitoren teilweise verschiedene Effekte auf beide Zelltypen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die SLK als verheißungsvoller Ansatzpunkt zur Entwicklung therapeutischer Mittel genutzt werden kann.

1 Einleitung

1.1 Arteriosklerose

Arteriosklerose gehört mit ca. 17,5 Millionen Toten jährlich, die etwa 31 % aller weltweiten, krankheitsbedingten Todesfälle ausmachen, zu den häufigsten Todesursachen. Rund 80% aller durch Arteriosklerose verursachten Todesfälle sind auf einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall zurückzuführen, die aus der Arteriosklerose resultieren (World Health Organisation Reviewed June 2016). Hierbei formen sich in den Arterien Plaques, welche sich im Laufe der Zeit ablösen können und durch die Arterien in wichtige, kleinere Blutgefäße, wie zum Beispiel Herz- oder Hirngefäße gelangen, wobei diese verstopfen können.

In der westlichen Welt hat die Todesrate aufgrund der Bekämpfung von Risikofaktoren in den letzten Jahren deutlich abgenommen. Allerdings setzt eine Therapie nach wie vor hauptsächlich an der Reduzierung dieser Risikofaktoren an, statt die direkten Auswirkungen wie z.B. die transendotheliale Migration von Makrophagen zu beeinflussen (Shang et al. 2014).

Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine chronisch-fortschreitende Entzündung von Blutgefäßen, die Resultat eines Ungleichgewichts im Lipid-Metabolismus ist. Auf diesen Entzündungsvorgang folgt eine Reaktion des Immunsystems, bei der es sich um die Akkumulation von Makrophagen in den betroffenen Bereichen handelt. Diese Immunantwort führt jedoch nicht zu einer Heilung, sondern zu einer Verschlechterung, da die Makrophagen die Lipide aufnehmen und dadurch erst die Plaque-Bildung beginnt (Moore, Sheedy & Fisher 2013).

Die Plaque-Bildung wird durch eine Immunantwort induziert, die durch die Retention von cholesterol-reichen, Apolipoprotein-B-enthaltenden Lipoproteinen in anfälligen Bereichen der arteriellen Blutgefäße hervorgerufen wird. Lipoproteine können diversen Veränderungen wie z.B. Oxidation, enzymatischer und nicht-enzymatischer Spaltung und Aggregation unterzogen werden. Dadurch können pro-entzündliche Moleküle entstehen, welche das darüber liegende Endothelium aktivieren. Die darauffolgende Immunantwort besteht in der Rekrutierung von Monozyten in das Subendothel, welche sich dort zu Makrophagen differenzieren. Diese können sowohl die „normalen“ als auch die

1 Einleitung

modifizierten Lipoproteine aufnehmen. Durch diese Aufnahme entwickeln sich die Makrophagen zu Schaumzellen, da sie die Lipide selbst nur unzureichend abbauen können. Sie verbleiben in Plaques und treiben so die Progression der Krankheit voran (ebd.).

Makrophagen, die in Arteriosklerose-Plaques akkumulieren, haben nur noch eine verminderte Möglichkeit zu wandern, wodurch sie die Entzündung nicht weiter hemmen können und die Läsionen weiter fortschreiten. Die komplexen Plaques ziehen weitere Zellen des Immunsystems an, da die Makrophagen in diesem Stadium viele Chemokine, Cytokine, Entzündungsmediatoren und Matrix-degradierende Proteasen sekretieren. Sterbende Makrophagen geben ihren Lipid-Inhalt an die Umgebung ab, was zu einem Pro-Thrombose-Kern führt, der Schlüssel-Komponente instabiler Plaques. Diese Pro-Thrombose-Kerne tragen zur Gefahr des Ablösens bei und verursachen intravaskuläre Blut-Klumpen, die einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall auslösen können (ebd.).

Viele verschiedene Zelltypen z.B. Endothelzellen, Monozyten, dendritische Zellen, Lymphozyten und glatte Muskelzellen spielen in der Bildung arteriosklerotischer Plaques eine Rolle. Allerdings ist die Rolle der Schaumzellen so zentral in der Pathologie der Krankheit, dass der Fokus lange auf dem Verständnis der Rekrutierung der Monozyten lag. Durch einen Stopp der Monozyten-Einwanderung soll die Bildung von Plaques verhindert werden.

In der Inhibition der transendothelialen Einwanderung der Monozyten und Makrophagen findet sich auch der Ansatzpunkt für diese Arbeit wieder. Hierbei ist speziell die Hemmung der SLK interessant, da sie ein Schlüsselenzym für Apoptose, Proliferation, Migration und die Entwicklung und die Reparatur von Gewebe notwendig ist (Al-Zahrani, Baron & Sabourin 2013). Vor allem die Funktion des Enzyms in der Migration der Monozyten und Makrophagen ist in dieser Arbeit von Interesse.

1.1.1 Fokale Adhäsionen

Für die Migration der Zellen ist ein zyklisches Anheften der Zellvorderseite und Ablösen der Zellrückseite, während die Mitte der Zelle darüber transportiert wird, ein sehr wichtiger Vorgang. Dieser Vorgang wird durch Fokale Adhäsionen (FA) vermittelt und

1 Einleitung

benötigt Energie um die Kraft zu generieren, die für die Translokation der Zelle in eine bestimmte Richtung notwendig ist (Quizi et al. 2013). Die FA stellen zelluläre Verankerungen auf Extrazellulären Matrizen (ECM) dar (Zamir, Geiger 2001). Sie bestehen aus vielen verschiedenen Proteinen zu denen Zytoskelett-Proteine, Tyrosin-Kinasen, Serin/Threonin-Kinasen, Modulatoren von GTPasen, Tyrosin-Phosphatasen und anderen Enzymen sowie Proteoglycane, Glycosaminglycan-Rezeptoren und viele anderen Molekülen gehören. Die Bindung an die ECM erfolgt über transmembrane Integrin-Proteine. Diese bestehen aus einer extrazellulären Domäne, welche spezifisch an Liganden binden kann, einer transmembranen Domäne und einer cytosolischen Domäne. Diese Proteine dienen der intrazellulären Weiterleitung von Signalen und ermöglichen die Kopplung der Aktinfilamente über sogenannte Adapterproteine.

Zu diesen Adapterproteinen gehört auch Paxillin. Paxillin ist Bestandteil der FA und co-lokalisiert mit der SLK bei der Migration von Zellen. Die SLK phosphoryliert dabei Paxillin am Serin 250, wodurch sich der FA-Komplex löst und sich die Zelle bewegt (Quizi et al. 2013).

1.1.2 LIM domain binding (Ldb) 2 in Arteriosklerose

Die SLK ist eine Serin/Threonin-Kinase, die am Carboxylende über eine AT1-46 Homologie Domäne (ATH) verfügt (Storbeck et al. 2009). An dieser befindet sich die LIM- Domäne (Bach 2000). LIM Domänen sind Protein-Protein Interaktionsmotive, die in vielen Proteinen vorhanden sind. Sie bestehen aus Cystein- und Histidin-reichen Abschnitten mit einem Zinkfinger. An diese LIM Domäne binden die Transkriptions-Cofaktoren Ldb1 und Ldb2. Beide fungieren als Regulatoren der SLK und sowohl eine Über-Expression als auch eine Reduktion der Ldb hat eine Aktivierung der SLK zur Folge (Storbeck et al. 2009).

Genom-Studien von Patienten mit Herzkrankheiten zeigen eine Verbindung von Ldb2 mit dem Ausmaß der Krankheiten. Aus den Studien ergibt sich, dass das Risiko für koronare und karotide Krankheiten der Arterien vererbbar ist und mit den Genen für transendotheliale Migration von Leukozyten korreliert. Weiterhin zeigt sich, dass eine Hemmung der LIM Domäne des Enzyms zu einer deutlichen Hemmung des gesamten Enzyms führt (Shang et al. 2014).

1.2 Ziel dieser Arbeit

Als Vorarbeit zu diesem Projekt wurden Inhibitoren der SLK entwickelt, die die LIM-Domäne des Enzyms binden. Diese Inhibitoren wurden von einem Projektpartner einem ersten Aktivitätstest unterzogen. Die zwei aktivsten dieser niedermolekularen Inhibitoren sollen in dieser Arbeit mit einem weiteren enzymatischen Testsystem und einem Migrationsassay auf die Inhibition der Migration, eine SLK vermittelte Reaktion nach Chemokinstimulation, untersucht werden.

Das Enzym soll zur Bestätigung der Inhibition durch die entwickelten Inhibitoren in einem alternativen Testsystem untersucht werden. Hierfür wird ein FRET System ausgewählt. Es soll zunächst die Enzymaktivität nachgewiesen werden, mit anschließender Untersuchung der Michaelis-Menten Konstante (K_m) von Adenosintriphosphat (ATP) und dem genutzten Substrat sowie der Dimethylsulfoxid (DMSO) -Toleranz und der Bestimmung der Dosis-Wirkungskurven der beiden untersuchten Inhibitoren.

Um weiterhin den Einfluss der Inhibitoren auf die transendotheliale Migration von Monozyten und Makrophagen zu untersuchen, soll ein Migrationsassay mit einem abgewandelten Boyden-Kammer-Assay etabliert werden. Das Migrationsassay soll mit THP-1 Zellen im nativen und im differenzierten Zustand, durch Stimulation mit jeweils geeignetem Chemokin, durchgeführt werden. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um ein häufig genutztes System zur Untersuchung von Monozyten und Makrophagen. Zur Optimierung des Migrationsassays, muss eine geeignete Beschichtung der Membran, auf welcher die Zellen adhären sollen, ausgewählt werden. Weiterhin musste ein passendes Chemokin gefunden sowie die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) der Chemokine bestimmt werden, um diese sinnvoll in dem Testsystem einsetzen zu können. Außerdem soll die Toxizität der Inhibitoren bestimmt werden. Im letzten Schritt sollen dann Dosis-Wirkungskurven der beiden Inhibitoren im Migrationsassay aufgenommen werden.

1.3 Chemotaxis-Assay

1.3.1 Chemotaxis allgemein

Bei der Chemotaxis handelt es sich um den Vorgang der gerichteten Zellmigration aufgrund eines extrazellulären Stimulus (Christen, Jaussi & Benoit 2016).

Die Zellen können durch Rezeptoren Gradienten oder Chemokine detektieren und sich entlang dieser bewegen. Makrophagen können, als wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems, durch diesen Mechanismus Bakterien identifizieren und diese durch Phagozytose aufnehmen. Außerdem können T-Zellen sich durch chemotaktische Reize zu entzündetem Gewebe bewegen. Chemotaxis ist deshalb ein wesentlicher Bestandteil der Immunantwort. Die Migration von Zellen des Immunsystems wird maßgeblich über transmembrane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt. Auch die beiden hier genutzten Chemokine binden an GPCRs. Durch die Bindung an die Rezeptoren kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Signalübermittlungskaskade in Gang gebracht wird. Über die Aktivierung eines G-Proteins, *second messenger* und verschiedene Proteinkinasen wird das Signal zur Zielstruktur weitergeleitet(Christen, Jaussi & Benoit 2016).

Chemokine werden in verschiedene Untergruppen unterteilt. Für die Einteilung ist die Aminosäuresequenz am Aminoende des Proteins ausschlaggebend. Hierbei ist die Anordnung der zwei konservierten Cysteine entscheidend. Sind diese direkt nebeneinander angesiedelt, handelt es sich um ein CC-Chemokin. Befindet sich eine andere Aminosäure zwischen ihnen, handelt es sich um ein CXC-Chemokin (Rink, Kruse & Haase 2015). Weiterhin existieren C-Chemokine und CX3C-Chemokine(Yoshie, Matsushima 2015). Bei dem hier zur Stimulierung von Monozyten genutzten Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1) handelt es sich um ein CC-Chemokin, welches auch unter dem Namen CCL2 bekannt ist.

Das Chemokin C5a, welches in dieser Arbeit zur Stimulation der Makrophagen genutzt wird, ist ein C-Chemokin und Bestandteil des Komplementsystems. Das Komplementsystem ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems und beinhaltet über 60 verschiedene Komponenten. Seine Aktivierung führt zu einer Komplementkaskade,

dessen Aktivierung von Makrophagen durch C5a Bestandteil der Abwehr von Krankheitserregern ist (Rink, Kruse & Haase 2015). Zur Untersuchung der Chemotaxis werden Migrationsassays genutzt.

1.3.2 Verschiedene Migrationsassay-Formate

Es existieren verschiedene Migrationsassay-Verfahren, von denen einige gängige im Folgenden vorgestellt werden.

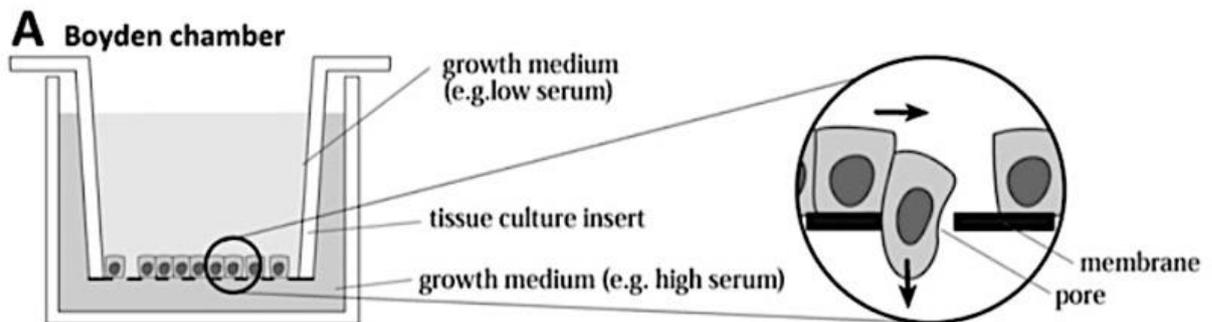


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Boyden-Kammer. Die Zellen werden auf einer porösen Membran ausgesät und migrieren entlang des Chemokingradienten in die untere Kammer. Messung durch Anfärben der Zellen auf der Unterseite der Membran oder Fluoreszenz-Farbstoffe. Quelle: (Kramer et al. 2013)

Weit verbreitet ist das Boyden-Kammer-Assay (Kramer et al. 2013). Hierbei wird in der Regel die Antwort von Leukozyten auf Chemokine untersucht. Bei diesem Prinzip migrieren Zellen durch eine poröse Membran zwischen Kammern, die mit Medium bzw. Chemokin gefüllt sind. Die Größe der Poren wird hierbei abhängig von der Größe der Zellen gewählt (Kramer et al. 2013). In Abbildung 1 ist das Boyden-Kammer-Assay schematisch dargestellt.

Die Zellen werden in der oberen Kammer ausgesät und migrieren in die untere Kammer, welche das Chemokin enthält. Um die migrierten Zellen zu detektieren, können verschiedene Verfahren angewandt werden. So können die Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert und angefärbt werden, was eine Quantifizierung der migrierten Zellen ermöglicht. Des Weiteren können Zellen z.B. mit fluoreszenz-Farbstoffen markiert werden und somit kann die Detektion direkt auf der Membran durch die Fluoreszenzintensität erfolgen.

Entscheidend für dieses Assay ist ein stabiler Gradient zwischen dem oberen und dem unteren Reservoir.

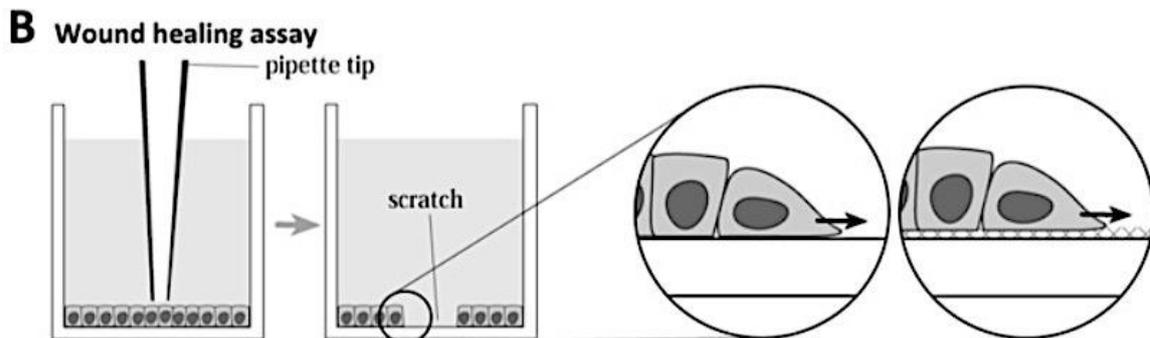


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wund-Heilungs-Assay. In konfluente Zellen wird z.B. mit einer Pipettenspitze eine „Wunde“ gekratzt. Beobachtet wird die Migration der Zellen in die zellfreie Region. Quelle: (Kramer et al. 2013)

Das Wund-Heilungs-Assay/Scratch-Assay ist ein weiteres, häufig genutztes Format, welches in Abbildung 2 schematisch dargestellt ist. Hierbei wird eine Oberfläche mit konfluenten Zellen gekratzt, wodurch eine „Wunde“ entsteht. Im einfachsten Fall wird dazu ein Kratzer mit einer Pipettenspitze herbeigeführt. Die anschließende Zellmigration kann hierbei mit dem Mikroskop beobachtet werden und die Bewegung der Zellen mit der Abnahme der Größe der Wunde gemessen werden. Vorteile dieses Verfahrens sind der einfache und robuste Aufbau und die einfache Auslesung sowie Analyse. Nachteile sind die variierende Breite der Wunde sowie aufgewirbelte Zellen, die sich in der Wunde absetzen und so das Ergebnis verfälschen können. Auch das Abkratzen der Beschichtung und die Verletzung von Zellen, welche direkt an der Wunde angesiedelt sind, können sich nachteilig auswirken. Ein weiterer wesentlicher Nachteil für eine Anwendung in dieser Arbeit ist das Fehlen eines Gradienten, da die Migration in dessen Richtung erfolgen soll.

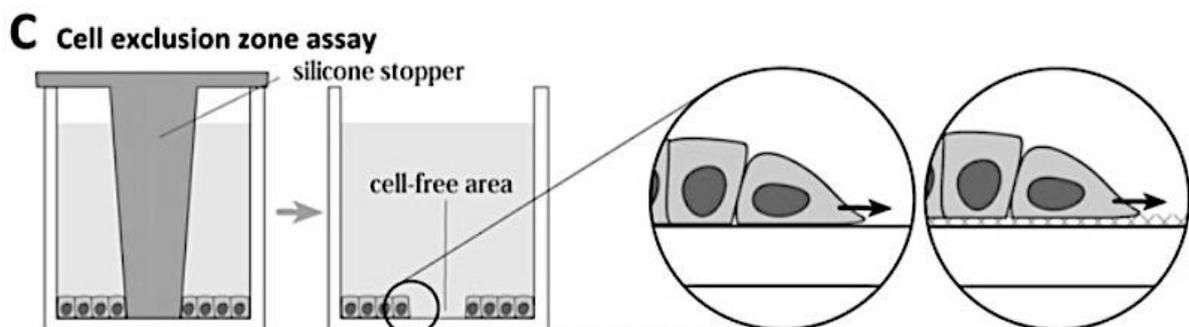


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellausschluss-Assays. Hier wird bei dem Aussäen mit Hilfe eines Silikonstoppers eine zellfreie Zone kreiert. Bei Entfernung des Stempels migrieren die Zellen. Quelle: (Kramer et al. 2013)

1 Einleitung

Ein drittes Assay-Format ist der Zell-Ausschluss-Zonen-Assay, was in Abbildung 3 schematisch dargestellt ist. Hierbei werden bereits beim Aussäen der Zellen zellfreie Zonen kreiert, indem durch einen vorher im Well platzierten Silikonstopper das Besiedeln bestimmter Bereiche verhindert wird. Dieser wird vor dem Aussäen in den Wells platziert und verhindert so, dass der gesamte Boden des Wells mit Zellen beschichtet wird. Um das Assay zu starten wird der Stopper entfernt und die Migration der Zellen in den zellfreien Bereich kann beobachtet werden. Im Gegensatz zum Wund-Assay existiert hier nicht die Gefahr der verschieden-großen zellfreien Areale und der Verletzung der Zellen. Allerdings stellt auch hier das Fehlen eines Gradienten einen deutlichen Nachteil dar.

1.3.3 IncuCyte

Bei dem IncuCyte System von EssenBioscience handelt es sich um eine abgewandelte Version der Boyden-Kammer, welches zur Analyse der Migration von Zellen des Immunsystems genutzt werden kann. Im Gegensatz zur klassischen Boyden-Kammer, bei der die Detektion der Zellen über Anfärben erfolgt, werden hier in regelmäßigen Abständen ungefärbte Phasenkontrastbilder von dem Well aufgenommen, wodurch mit dem Programm IncuCyteZOOM die Zellen beobachtet werden können. Dadurch kann, im Gegensatz zur klassischen Boyden-Kammer, bei der nur der Endpunkt bestimmt werden kann, eine kontinuierliche Messung erfolgen.

Die hier genutzten Platten bestehen aus einer Reservoir-Platte und einer Insert-Platte. Der Aufbau der Platten ist in Abbildung 4 zu sehen. Die beiden Platten sind durch eine Membran mit genau 96 8 µm großen Poren verbunden, durch die Zellen migrieren können. Auf der Oberseite der Membran werden die Zellen ausgesät, während sich darunter in der Reservoir-Platte das Chemokin befindet, zu welchem sich die Zellen zu bewegen.

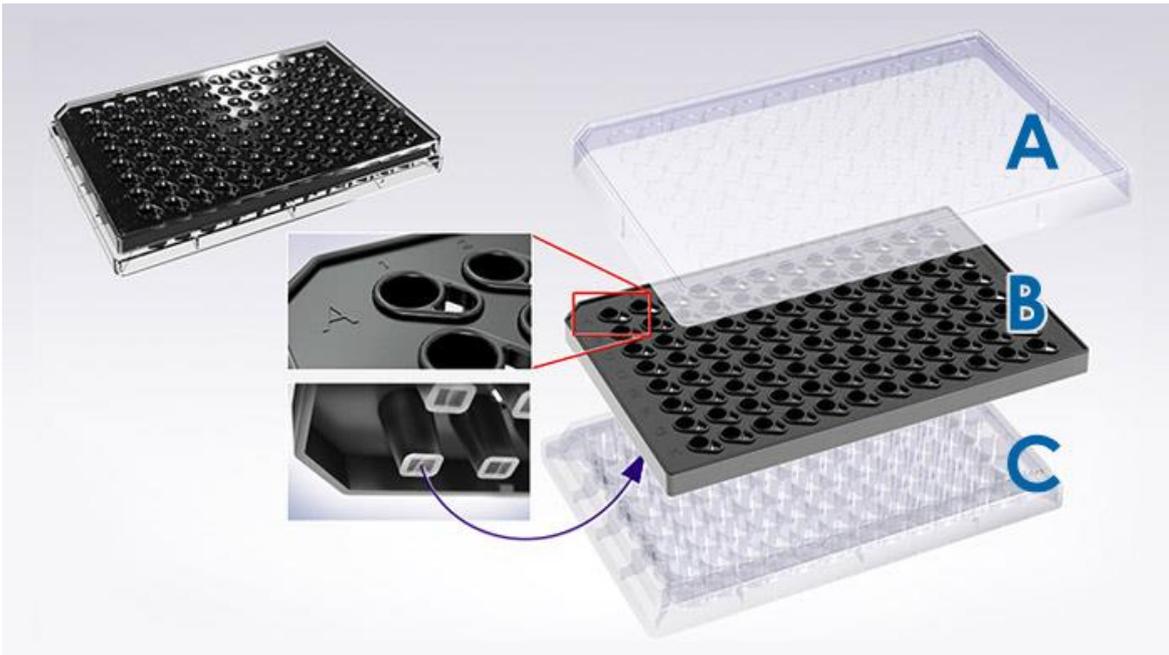


Abbildung 4: Aufbau einer IncuCyte-Platte. A Deckel, B Insert-Platte mit Wells, in die die Zellen gegeben werden, auf der Unterseite mit einer porösen Membran verschlossen, C Reservoir-Platte, welche das Chemokin enthält. Quelle: (Essen BioScience 2016b)

Durch regelmäßige Aufnahmen der Wells mit einem 10x Objektiv von der Unterseite der Membran können Veränderungen der Positionen der Zellen wahrgenommen werden. Mit Hilfe eines digital-unterstützten Phasenkontrasts wird gleichzeitig sichergestellt, dass eine genaue Lokalisation der Zellen auf der Ober- oder Unterseite der Membran erfolgt. Der IncuCyte bestimmt dann die Veränderung der Zellzahl und der Zellfläche auf der Oberseite und der Unterseite der Membran.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch mit THP-1-Zellen durchgeführt, welche in ihrer differenzierten Form Makrophagen stark ähneln. Damit diese Makrophagen-ähnliche Zellen auf der Membran adhären können, muss diese mit Fibronectin beschichtet werden. In dieser Arbeit soll die Migration der Monozyten und der Makrophagen unter Einfluss von SLK-Inhibitoren beobachtet werden.

1.3.4 Genutzte THP-1-Zellen

Bei den THP-1-Zellen handelt es sich um Monozyten, die zu den Leukozyten gehören. Sie sind humane Leukämie-Zellen, welche ursprünglich von einem 1-jährigen Jungen gewonnen wurden. Bei dieser bestimmten Art von Leukämie findet die Differenzierung

1 Einleitung

der Monozyten zu Makrophagen nicht mehr wie gewohnt statt, weshalb die Differenzierung in Makrophagen künstlich induziert werden kann (Auwerx 1991).

Die Differenzierung der THP-1 Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen kann durch die Behandlung mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) induziert werden. Nach der Differenzierung sind sie den humanen Makrophagen sehr ähnlich und können deshalb gut als Modell für die Untersuchung des Verhaltens von Makrophagen genutzt werden.

Zu den Funktionen von Phagozyten, zu denen sowohl Makrophagen als auch Monozyten gezählt werden, gehört die Phagozytose, ein wichtiger Abwehrmechanismus des Immunsystems (Auwerx 1991).

Phagozyten reagieren auf eine einzigartige Weise auf extrazelluläre Reize. Sie spielen eine zentrale Rolle in Infektionsvorgängen, der Anpassung von Immunantworten und Entzündungen im weitesten Begriff. Sie können mit extrazellulären Molekülen interagieren, diese aufnehmen und metabolisieren. Außerdem zeigen sie auch Interaktionen mit anderen Zellen des Immunsystems, z.B. den Lymphozyten. Hier dienen sie als Antigen präsentierende Zellen, welche einen wichtigen Schritt darstellen, um eine humorale Immunantwort auszulösen (Auwerx 1991).

Monozyten wandern ohne Infektionsherd in verschiedene, zufällige Gewebe und differenzieren dort zu Makrophagen. Wenn eine Entzündung entsteht, werden die Monozyten durch Chemokine aktiviert und wandern in das betroffene Gewebe ein. Die künstlich induzierte Differenzierung durch PMA führt zu einem vergleichbaren Phänotyp, die Proliferation stoppt und es kann eine erhöhte Adhärenz beobachtet werden. Diese Makrophagen-ähnlichen Zellen gleichen den Makrophagen in der Expression von Membran-Antigenen wie z.B. CD-14, CD36, TLR-2, und CR3(Chanput, Mes & Wichers 2014) Weiterhin gleichen die differenzierten THP-1 Zellen den Makrophagen im Bezug auf die Chemokin-Produktion, da sie z.B. Interleukin 1 (IL-1), Tumornekrosefaktor (TNF) (Daigneault et al. 2009) und IL-8 (Lund et al. 2016) sekretieren. Außerdem exprimieren sie Enzyme für den Lipid-Metabolismus, wie die Lipoprotein Lipase (LPL) (Auwerx 1991) und zeigen deutliche Ähnlichkeit in den morphologischen Charakteristiken.

1 Einleitung

Aus diesem Grund stellen sie ein wertvolles Modell zur Untersuchung der Mechanismen von Makrophagen dar. Weiterhin stellen sie ein Modell zur Untersuchung der Makrophagen-Differenzierung dar, in der untersucht wird wie die Regulierung der Makrophagen-spezifischen Gene stattfindet bis hin zu Untersuchung der Beteiligung der Makrophagen im Krankheitsverlauf von Arteriosklerose.

1.4 FRET -Assay

Bei dem FRET handelt es sich um eine strahlungsfreie Energieübertragung zwischen zwei Molekülen mit verschiedenen Emissionsspektren. Hierbei ist die räumliche Nähe der beiden Moleküle und der überlappende Bereich des Emissionsspektrums des Donor und des Absorptionsspektrums des Akzeptors entscheidend (Clegg 2009).

Bei einem FRET-System wird ein Donor (D) bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert bei einer für diesen D spezifischen Wellenlängenspektrum. Die Energie wird auf den Akzeptor (A) übertragen, wodurch dieser im Bereich seines Emissionsspektrums emittiert. Damit dieser Vorgang funktioniert, muss das Emissionsspektrum von D mit dem Absorptionsspektrum von A überlappen. Entscheidend für das Assay ist die Entfernung zwischen A und D, da diese bei der Gleichung für die übertragene Energie in der 6. Potenz eingeht. Weiterhin muss die Zerfallsrate des angeregten Zustandes des D geringer sein als die Transferrate, da sonst nur sehr wenig Energie übertragen wird. Weitere wichtige Faktoren sind das überlappende Integral der Spektren, die Quantenausbeute des D, der Brechungsindex des umgebenden Mediums sowie der Orientierungsfaktor der Interaktionen zwischen den Dipolen der Fluorophore von A und D (Gryczynski, Gryczynski & Lakowicz 2005).

Bei dem LANCE Ultra TR-FRET-System von PerkinElmer handelt es sich um ein homogenes Interaktionsassay bei dem die Interaktionen zwischen zwei markierten Bindungspartnern detektiert wird (Caron et al. 2006).

Hierbei dient als Donor ein Europium-basiertes Chelat (Eu), welches bei einer Wellenlänge von 320 nm oder 340 nm angeregt wird. Es besitzt ein schmales, sehr lange stabiles Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 615 nm, wodurch der Akzeptorfarbstoff, das ULight, angeregt wird und bei einer Wellenlänge von 665 nm emittiert (Caron et al. 2006).

Bei dem ULight handelt es sich um ein patentiertes, lichtstabiles Molekül zur Markierung von Peptiden und anderer kleiner Moleküle.

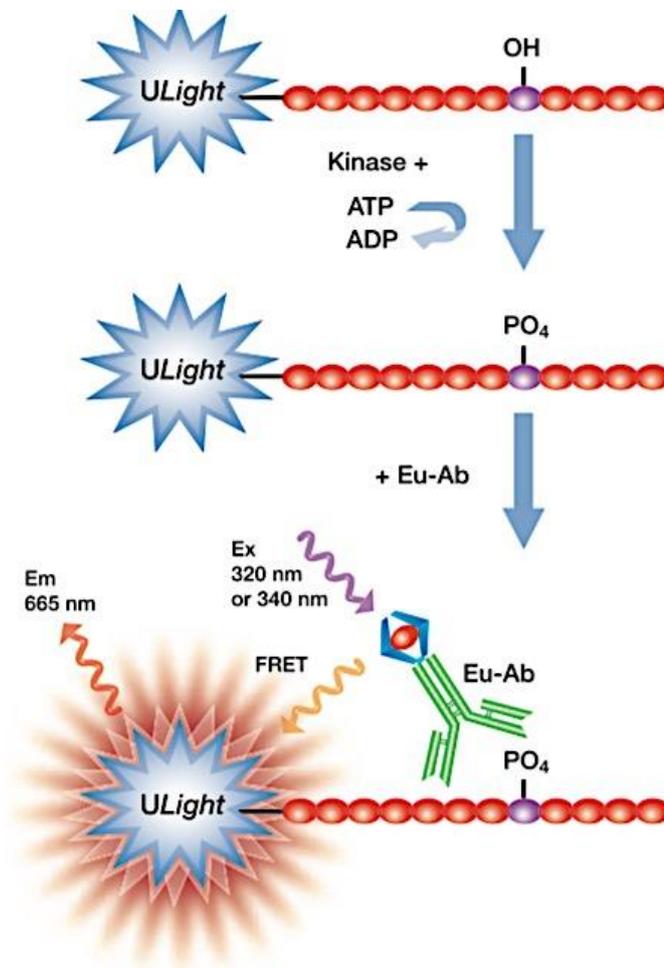


Abbildung 5: Schematische Darstellung des FRET-Systems von PerkinElmer. Dargestellt ist die Phosphorylierung des Peptids durch die Kinase sowie die anschließende Bindung des Antikörpers. Quelle: (Caron et al. 2006)

Bei dem Assay wird, wie in Abbildung 5 dargestellt, das ULight-markierte Substrat von der Kinase phosphoryliert. Im nächsten Schritt bindet dann der als Donor fungierende, Europium markierte, Anti-phospho-Substrat Antikörper an das phosphorylierte Peptid, wodurch Eu-Chelat-Donor und ULight-Akzeptor in räumliche Nähe gelangen. Durch Anregung des Eu findet nun der Energietransfer auf das ULight statt und es kann die Emission bei 665 nm gemessen werden.

Bei dem HTRF KinEASE Discovery Set von CisBio handelt es sich ebenfalls um ein FRET-Assaysystem (Cisbio Bioassays 2009). Hierbei stehen 3 verschiedene biotinylierte Substrate zur Verfügung, um ein möglichst breites Spektrum an Kinasen abzudecken. Nach der Phosphorylierung des Substrates mit der Kinase, werden der Eu^{3+} -Kryptat-markierte Anti-phospho-Antikörper und Streptavidin-XL665 zugegeben. Beide binden an das phosphorylierte Substrat und durch die räumliche Nähe kommt es zum Energietransfer zwischen dem Eu-Kryptat als Donor und dem Streptavidin-XL665 als

Akzeptor. Das Eu-Kryptat emittiert bei einer Wellenlänge von 620 nm, während das Streptavidin-XL665 bei einer Wellenlänge von 665 nm emittiert.

1.5 CellTiter-Glo Viabilitätsassay

Mit dem CellTiter-Glo Testsystem kann die Viabilität der Zellen bestimmt werden. Hier wird die Korrelation zwischen der Viabilität der Zellen und dem Gehalt an vorhandenem ATP in den Zellen ausgenutzt (Promega 2015).

ATP als universeller Energieträger ist in allen metabolisch aktiven Zellen in einem streng regulierten Konzentrationsbereich vorhanden und bindet an die hier zugesetzte Luciferase, wodurch in einer chemischen Reaktion Licht entsteht. Damit dies geschieht muss die Zelle lysiert werden. Danach bindet das ATP, dessen Gehalt proportional zur Menge der lebenden Zellen ist, an die Luciferase und wird zusammen mit Luciferin in Licht, anorganisches Phosphat, AMP und Oxyluciferin umgesetzt. Die Reaktion ist in Abbildung 6 präsentiert. Es handelt sich hierbei also um eine indirekte Messung der Viabilität, die durch die Proportionalität zwischen ATP und Zellzahl zustande kommt (Promega 2015).

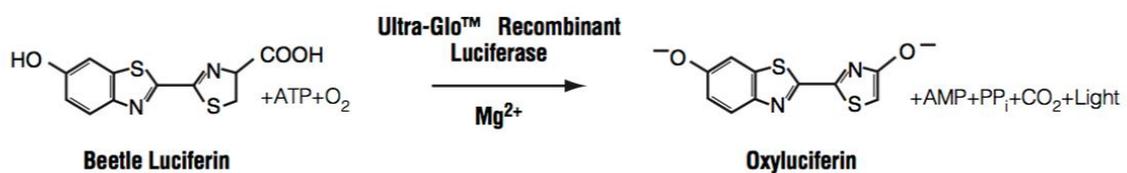


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Luciferase Reaktion. Hier ist die spezielle Reaktion des CellTiter-Glo Reagenzes dargestellt. Quelle: (Promega 2015)

2 Material und Methoden

2.1 Enzymatische Untersuchungen

Bei der enzymatischen Untersuchung der SLK Inhibitoren wurden zwei verschiedene Testkits geprüft. Bei dem ersten handelt es sich um ein Testkit von PerkinElmer, bei dem das markierte Substrat von dem Enzym phosphoryliert wird. Im nächsten Schritt findet dann eine spezifische Antikörperbindung mit einem markierten Primärantikörper an das phosphorylierte Substrat statt, wodurch ein FRET Signal entsteht

Auch bei dem zweiten getesteten Testsystem handelt es sich um ein FRET-System, jedoch wurden hier drei verschiedene Substrate getestet, mit denen viele verschiedene Kinasen entdeckt werden können. Hierbei wird zunächst das Substrat phosphoryliert und im zweiten Schritt binden sowohl Donor als auch Akzeptor an das phosphorylierte Substrat.

2.1.1 PerkinElmerSet

Lösungen und Medien

Kinase	1. Getestete Kinase: 0,2 mg/ml 2. Getestete Kinase: 0,1 mg/ml
ULight-Peptid	PerkinElmer Histon H3 Thr3/Ser10 Peptide 200 nM
Antikörper	LANCE Ultra Eu-anti-P-Histone H3 Ser10 625 nM
5x Kinase-Puffer	250 mM HEPES 50 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 10 mM DTT 0,05 % Tween pH = 7,5, eingestellt mit 1M NaOH
ATP	Stocksolutions 100 µM; 1 M
Stoplösung	40 mM EDTA in LANCE Detection buffer
β-Glycerophosphat	Stocksolution 1,25M

2 Material und Methoden

Die Versuche zur Untersuchung der Enzymaktivität wurden in weißen 384-Well Platten durchgeführt. Zunächst wurden hier wie von PerkinElmer empfohlen die OptiPlate von PerkinElmer genutzt.

Pro Well wurden 5 μl der Enzymlösung hinzugefügt. Dabei muss die Lösung die doppelte Konzentration der gewünschten Endkonzentration haben. Danach wurden in jedes Well 2,5 μl der auf 200 nM verdünnten ULight-Peptid Lösung gegeben. Es ergibt sich dadurch eine Endkonzentration 50 nM im Well. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,5 μl ATP gestartet. Danach wurde die Platte mit einem Seal abgedeckt und für eine Stunde inkubiert.

Nach 1 Stunde wurden 5 μl der 40 mM Stop-Lösung hinzugegeben. Es folgten 5 Minuten Inkubation. Nach der Zugabe von 5 μl der auf 8 nM verdünnten Antikörper-Lösung folgte nach Abdeckung der Platte eine weitere Stunde Inkubation. Es ergibt sich dadurch eine Endkonzentration von 2 nM Antikörper im Well. Zum Schluss wurde die Messung mit dem EnVision durch eine Anregung bei 320 nm und Messung bei 615 nm und 665 nm durchgeführt. Aus diesen Messwerten wurde ein Verhältnis gebildet, mit dem die Signalstärke bestimmt werden konnte.

Mit dem PerkinElmer-Testkit wurde eine Enzymtitration mit beiden geprüften Enzymbatches durchgeführt. Dabei wurden Enzymkonzentrationen im Bereich von 5 ng/ μl -0 ng/ μl geprüft. Als Negativ-Kontrolle wurde die Probe ohne Enzym genutzt. Hier wurden alle sonstigen Komponenten hinzugefügt.

Des Weiteren wurden verschiedene ATP-Konzentrationen sowie verschiedene ATP-Batches geprüft. Die geprüften ATP-Konzentrationen betragen: 2,5 M, 250 μM und 25 μM . Der Versuch wurde mit und ohne Zusatz von 12,5 mM β -Glycerophosphat zum Enzympuffer durchgeführt. Weiterhin wurden Platten von Greiner und Corning geprüft. Die Inkubation des Enzyms wurde bei Raumtemperatur (RT) sowie bei 37 °C durchgeführt.

Außerdem wurde mit diesem Testkit auch eine Dosis-Wirkungskurve der beiden Inhibitoren aufgenommen. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe der Inhibitoren in DMSO auf einer LabCyte Platte hergestellt. Von beiden Inhibitoren wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe mit 11 Messwerten hergestellt, die für K200043659 bei 40 μM und für

2 Material und Methoden

K20044749 bei 6 μM startet. Diese Konzentrationen entsprechen etwa dem 4-fachen IC_{50} des Wertes, den der Kooperationspartner für das Enzym ermittelt hat. 100 nl des Inhibitors wurden dafür mit dem Echo in die leere Assayplatte übertragen. Danach werden wie beschrieben die anderen Komponenten hinzugefügt.

Alle getesteten Konditionen für dieses System sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Alle mit dem Testsystem von PerkinElmer getesteten Konditionen

Enzymkonzentration in $\text{ng}/\mu\text{l}$					
5,0	2,5	1,3	0,6	0,3	0,0
ATP-Konzentrationen					
2,5 M	250 μM	25 μM			
Temperaturen					
37°C			RT		
β -Glycerophosphat					
12,5 mM			0 mM		

2.1.2 HTRF KinEASE-STK-Set

Lösungen und Medien

HTRF Kinease-STK-Set:

5-fach konzentrierter Kinasepuffer

HTRF Detection Buffer

STK-Antibody-Cryptate

STK Substrat 1 50 μM , gelöst in 1 x Kinasepuffer

STK Substrat 2 50 μM , gelöst in 1 x Kinasepuffer

STK Substrat 3 50 μM , gelöst in 1 x Kinasepuffer

Sa-XL665 16,67 μM , gelöst in HTRF Detection Buffer

Kinase 1. Getestete Kinase: 0,2 mg/ml

2. Getestete Kinase: 0,1 mg/ml

ATP Stocksolutions 100 μM ; 1 M

Die Versuche wurden in einer weißen 384-Well-Platte von Greiner sowie einer weißen 384-Well-Platte von Corning durchgeführt.

2 Material und Methoden

Pro Well wurden 4 μl Kinase-Puffer hinzugefügt. Danach wurden 2 μl der Kinase-Lösung, welche die fünffache Konzentration der Endkonzentration im Well hatte, hinzugefügt. Die Endkonzentration des Enzyms im Well betrug 8 ng/ml. Außerdem mussten die Substrate in die Wells gegeben werden. Alle drei Substrate hatten eine Anfangskonzentration von 50 μM , wodurch sich eine Endkonzentration von 10 μM im Well ergab. Weiterhin wurden 2 μl ATP dazugegeben um die Reaktion zu starten. Die ATP-Lösung wurde in der fünffachen Endkonzentration zugegeben. Auch hier wurden als Negativ-Kontrollen Wells, in die keine Kinase zugegeben wurde, genutzt.

Nach 30 Minuten Inkubation wurden 5 μl der Antikörperlösung sowie der Streptavidinlösung hinzugegeben und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Antikörperlösung enthielt hierbei EDTA, was durch das Komplexieren der Mg^+ zu einem Abbruch der enzymatischen Reaktion führte. Anschließend folgte die Messung mit dem EnVision bei einer Anregung bei 320 nm und einer Messung bei 615 nm und 665 nm. Aus dem Verhältnis der beiden Messwerte konnte die Enzymaktivität abgelesen werden.

Die Versuche mit diesem Testkit wurden bei einer Enzymkonzentration von 8 ng/ μl mit beiden Batches Enzym durchgeführt. Es wurden verschiedene Batches ATP bei verschiedenen ATP-Konzentrationen getestet. Die hier getesteten ATP-Konzentrationen betragen 2 mM und 20 mM. Dieser Versuch wurde mit und ohne Zugabe von 12,5 mM β -Glycerophosphat getestet. Weiterhin wurde auch hier die enzymatische Reaktion bei RT und bei 37 °C durchgeführt.

Die hier getesteten Konditionen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Alle mit dem HTRF KinEASE-STK-Set getesteten Konditionen

Enzym	
8 ng/ml	
ATP	
2 mM	20 mM
Temperaturen	
37°C	RT
β-Glycerophosphat	
12,5 mM	0 mM

2.2 Migrationsassay

2.2.1 Zellkultur

Lösungen und Medien

Kulturmedium	RPMI1640 w Pheno IRed
	+ 25 mM HEPES
	+ 10 % FCS
	+ 1 % P/S
	+ 1 % Q

Bei den THP-1-Zellen handelt es sich um nicht adhären wachsende Zellen. Nach den Empfehlungen von American Type Culture Collection (ATCC) wurde eine Zellkonzentration von 2 bis 8×10^5 Zellen pro ml erhalten. Um die Zellzahl zu bestimmen wird der Sceptor 2.0 von Millipore mit 60 μm -Sensor genutzt.

Dafür wurde ca. 1 ml der Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen und in ein Reaktionsgefäß gefüllt. In dieses Reaktionsgefäß wurde der Sensor getaucht, bis dieser anzeigt, dass genug Suspension aufgesogen wurde. Der Sceptor bestimmte daraufhin die Zellzahl pro ml. Damit konnte der Verdünnungsfaktor berechnet werden. Die benötigte Menge der Suspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gefüllt und 5 min bei RT bei 184 x g und langsamen Abbremsen zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert. So wurden die Zellen weiterhin bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zur Vermeidung von Kontaminationen mussten alle durchgeführten Arbeitsschritte der Zellkultur sowie des Migrationsassays unter einer Sterilwerkbank durchgeführt werden

2.2.2 Beschichtung der Platten

2.2.2.1 Fibronectin-Beschichtung

Lösungen und Medien

Fibronectin	Stocksolution 0,5 mg/ml
PBS	Dulbecco's PBS w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red
BSA	35 % in 0,85 % NaCl

Zur Zelladhäsion der differenzierten THP-1-Zellen benötigen diese Fibronectin. Aus diesem Grund wird die Membran der Platten von beiden Seiten mit Fibronectin beschichtet. Dafür wird das Fibronectin in PBS verdünnt. Wie im Protokoll der Firma EssenBioscience vorgeschlagen, wurden hier verschiedene Fibronectin-Konzentrationen mit und ohne BSA getestet. Die verschiedenen getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 3 abgebildet:

Tabelle 3: Verschiedene getestete Fibronectin-Konzentrationen zur verbesserten Adhärenz der Zellen

Fibronectin ($\mu\text{g/ml}$)	BSA (%)
5	-
25	-
50	-
5	0,1
25	0,1
50	0,1

Das Fibronectin wurde in PBS verdünnt, welches vorher auf 37 °C aufgewärmt wurde. Es lag in einer Stocklösung mit einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ vor. Um zu den verschiedenen Beschichtungs-Konzentrationen zu gelangen, mussten die Verdünnungen der Stocklösung mit PBS hergestellt und wenn erforderlich BSA zugesetzt werden.

Pro Well wurden 170 μl Coatingflüssigkeit benötigt. Hiervon wurden zunächst 150 μl in die Reservoir-Plate gegeben. Zur Vermeidung der Entstehung von Luftblasen wurde dies

2 Material und Methoden

revers pipettiert. Danach wurde das Insert eingesetzt. Hierbei war entscheidend, dass beide Platten schräg gehalten werden, damit Luftblasen, die beim Einsetzen zwischen den beiden Platten entstehen, zur Seite entweichen können. Nach dem Einsetzen wurde das Insert mit 20 µl Coating-Flüssigkeit gefüllt. So musste die Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur ruhen.

Die verschiedenen Coating-Konditionen wurden mit den differenzierten Zellen getestet. Die undifferenzierten Zellen wurden nur mit einer Fibronektinkonzentration von 5 µg/ml ohne BSA getestet.

2.2.2.2 Matrigel-Coating

Lösungen und Medien

Matrigel	Stocksolution 8 mg/ml
Coatingmedium	RPMI1640 w Phenol Red + 25 mM HEPES + 10 % charcoal-stripped heat-inactivated FCS + 1 % P/S
FCS	Hitzeinaktivierung von Aktivkohle-gefiltertem FCS 30 Minuten bei 56°C

Damit auch die nicht-differenzierten THP-1-Zellen sich auf der Membran absetzen und sich darauf bewegen können, muss die Membran mit Matrigel beschichtet werden. Dieses Matrigel ist nur zwischen 0 und 10 °C flüssig und polymerisiert sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren Temperaturen (Corning Incorporated 2012). Deshalb war es hier wichtig, dass alle genutzten Materialien gekühlt genutzt werden.

Das Matrigel wurde, wie von EssenBioscience vorgeschlagen, mit dem Coating-Medium auf eine Konzentration von 50 µg/ml verdünnt.

150 µl des gekühlten Coatings wurden in die Reservoir-Platte gegeben. Entscheidend war, dass sowohl die genutzten Pipettenspitzen sowie das Reservoir gekühlt vorlagen. Nach

2 Material und Methoden

Für die undifferenzierten Zellen wurde der zellfreie Überstand nach dem Zentrifugieren entnommen und das Zellpellet in Assaymedium resuspendiert. 60 µl dieser Zellsuspension wurden nach der Entnahme der Coating-Flüssigkeit bzw. des PBS jedem Insert-Well hinzugefügt.

Um eine geeignete Zellkonzentration für die Auswertung zu finden, wurden verschiedene Zellkonzentrationen, die in Tabelle 4 abgebildet sind, getestet.

Tabelle 4: Verschiedene getestete Zellkonzentrationen im Migrationsassay

Zellen	Anzahl der Zellen pro Well		
Differenziert	2500		
Nicht-Differenziert	1000	3000	5000

Die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen-ähnlichen Zellen fand direkt in den Insert-Wells nach der Beschichtung der Wells statt. Hierfür wurde das Zellpellet nach dem Zentrifugieren in dem Differenzierungsmedium in einer Konzentration von $4,167 \cdot 10^4$ Zellen pro ml resuspendiert.

Von dieser Zellsuspension wurden 60 µl pro Insert-Well revers in die Insert-Wells gegeben. Hierbei war wichtig, dass die Zellsuspension langsam am Rand des Wells herabläuft, damit das Coating nicht beschädigt oder von der Membran abgewaschen wurde. Außerdem wurde ein berühren der Membran durch Pipettenspitzen vermieden, da dies das Coating zerstören würde. Die Platte wurde dann zunächst ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Zellen auf der Membran absetzen und gleichmäßig verteilen konnten. Danach wurde die Platte bei 37 °C und 5% CO₂ für 48 Stunden inkubiert bis die Differenzierung abgeschlossen war.

2.2.4 Hinzufügen von Chemokin/Medien-Wechsel

Lösungen und Medien

Assaymedium RPMI1640 w Phenol Red
 + 25 mM HEPES
 + 0,5 % charcoal-stripped heat-inactivated FCS
 + 1 % P/S

2 Material und Methoden

C5a	in H ₂ O gelöst, Stockkonzentration 1,35 µM
MCP-1	in H ₂ O gelöst, Stockkonzentration 100 µg/ml

Um die Migration der Zellen zu starten, musste in den Reservoir-Wells die Chemokinlösung hinzugefügt werden. Zu diesem Zweck wurde in jedes Well der Reservoir-Platte 200 µl der Chemokinlösung gefüllt. Dies erfolgte durch reverses Pipettieren. Zur Herstellung der gewünschten Chemokin-Lösung wurde die Stocklösung der Chemokine mit Assaymedium verdünnt.

Bei den differenzierten THP-1 Zellen musste, bevor der Versuch gestartet wurde, das Differenzierungsmedium durch Assaymedium ersetzt werden. Hierbei wurde das Differenzierungsmedium mit einer Pipettenspitze abgesogen. Danach wurden 60 µl vorgewärmtes Assaymedium pro Well durch vorsichtiges, reverses Pipettieren hinzugefügt. Das Medium musste sehr langsam den Wells hinzugefügt werden, damit Zellen und Coating nicht abgewaschen werden.

Um Herauszufinden, welcher Zelltyp auf welches Chemokin reagiert, wurden beide Zelltypen mit beiden Chemokinen getestet. Dafür wurden die Chemokine zunächst in sterilem, kaltem Wasser gelöst und eine Stock-Lösung hergestellt. MCP-1 wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml gelöst, während C5a in einer Konzentration von 1,35 µM gelöst wurde. Die Konzentrationen der Stock-Lösungen orientierten sich hierbei an den Literaturwerten (Essen BioScience 2016a) der EC₅₀ der beiden Chemokine und stellen deren 100-fachen Wert des EC₅₀ dar.

Die Verdünnung der Chemokine wurde dann in Assaymedium vorgenommen. Um zu untersuchen, welche Chemokine welchen Zelltyp stimuliert, wurde eine 1:100 Verdünnung von MCP-1 (1 µg/ml) und eine 1:10 Verdünnung von C5a (135 µM) hergestellt.

Zur Bestimmung der EC₅₀-Werte beider Chemokine wurden Verdünnungsreihen dieser getestet. Dabei wurde die Startkonzentration für MCP-1 auf 10 µg/ml festgelegt. Da für den Literaturwert des EC₅₀ des Chemokins ein Bereich von 1-1000 ng/ml angegeben ist

2 Material und Methoden

und nach Möglichkeit eine vollständig ausgebildete Dosis-Wirkungskurve zu sehen sein sollte, wurde entschieden eine 1:10 Verdünnungsreihe mit 6 Messpunkten aufzunehmen.

Für C5a wurde als höchste Konzentration 135 nM gewählt, da eine höher konzentrierte Lösung aufgrund der Konzentration der Stock-Lösung nicht möglich war. Für dieses Chemokin wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit 6 Messpunkten bei einer 1:4 Verdünnung des Chemokins aufgenommen. Die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 5 zu finden.

Die Verdünnung der Chemokine fand in 1,5 ml Reaktionsgefäßen statt. Um den Versuch zu starten, wurde die Chemokin-Lösung in die Reservoir-Platte überführt und die Inset-Platte eingesetzt. Auch hier musste revers pipettiert werden um die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden.

Tabelle 5: Getestete Chemokin-Konzentrationen

MCP-1 [$\mu\text{g/ml}$]	C5a [nM]
10	135
1	33,8
0,1	8,4
0,01	2,1
0,001	0,5
0,0001	0,1

Danach wurde die Platte in den IncuCyte eingesetzt und nach 15 Minuten Kondenswasser, welches an der Unterseite der Platte entstand, mit einem trockenen Tuch abgewischt, um die Messung zu starten.

2.2.5 Auswertung

Um die Migration der Zellen zu beobachten wurden alle 30 Minuten Bilder der Wells aufgenommen. Dabei wurden jeweils zwei Bilder von jeden Well erstellt. Auf einem Bild wurde die Oberseite der Membran fokussiert, während auf dem anderen die Unterseite der Membran fokussiert wurde. Auf der Grundlage dieser Bilder erfolgte dann die Auswertung.

Für die undifferenzierten THP-1 Zellen wurde hier die Fläche auf der Oberseite der Membran, welche mit Zellen bedeckt war, beobachtet. Die Software IncuCyte ZOOM

2 Material und Methoden

2016A detektierte hierbei die Zellen auf der Oberfläche der Membran und bildete ein Verhältnis zum ersten gemessenen Wert, damit die Werte untereinander vergleichbar blieben. Bei den undifferenzierten THP-1 Zellen kann hierbei nur die Oberfläche der Membran beobachtet werden, da die Zellen nicht adhärent wachsen und sobald diese durch die Poren migrieren, auf den Boden des Reservoir-Wells sinken.

Für die differenzierten Zellen ist vor allem die Unterseite der Membran von Interesse, da die Zellen adhärent sind und deshalb auf der Unterseite der Membran haften. Hier wurde die von Zellen besetzte Fläche auf der Unterseite der Membran aufgenommen. Dieser Wert wird durch das Bilden eines Verhältnisses mit dem ersten gemessenen Wert der Oberseite der Membran normiert.

Damit die Software Zellen und Hintergrund voneinander unterscheiden konnte, musste ein sinnvolles Verhältnis zwischen den Zellen und Hintergrund beim Erstellen einer Maske gefunden werden. Diese Maske wurde mit Hilfe von Bildern, die während der Messung entstanden sind, erstellt.

In diesen Versuchen wurden zwei verschiedene Masken für die differenzierten und die undifferenzierten Zellen erstellt. Da die differenzierten Zellen wesentlich größer als die undifferenzierten waren, wurden letztere teilweise nicht von der Maske für die differenzierten Zellen erkannt. Des Weiteren wertete die Maske für undifferenzierte Zellen zu viel des Hintergrundes als Zellen aus, um eine sinnvolle Analyse für die differenzierten Zellen durchführen zu können.

Aus den Messwerten ergab sich eine Gerade, die den Verlauf der Zu- oder Abnahme der mit Zellen bedeckten Flächen auf der Ober- oder Unterseite der Membran zeigte. Für die Auswertung wurde dann die Steigung dieser Geraden über eine Zeit von 20 Stunden bestimmt. Diese Steigung wurde dann zur Bestimmung von der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) und EC_{50} genutzt.

2.2.6 Dosis-Wirkungskurven der Inhibitoren

Lösungen und Medien

Assaymedium	RPMI1640 w Phenol Red + 25 mM HEPES + 0,5 % charcoal-stripped heat-inactivated FCS + 1 % P/S
Inhibitoren	K20043659, gelöst in DMSO, Stockkonzentration 20 mM K20044749, gelöst in DMSO, Stockkonzentration 10 mM

Um die Wirkung der SLK-Inhibitoren auf die Migration der Zellen zu testen, wurde der Inhibitor im Migrationsassay untersucht. Hierfür wurde der Inhibitor sowohl dem Insert- als auch in dem Reservoir-Well hinzugefügt.

Für die undifferenzierten Zellen wurde die Zellsuspension auf Reaktionsgefäße aufgeteilt, in denen die Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Dafür wurde dem ersten Reaktionsgefäß der Inhibitor zugegeben und dann eine bestimmte Menge in das nächste Reaktionsgefäß übertragen. In diesem Versuch wurde von beiden Inhibitoren eine 1:2 Verdünnungsreihe mit 11 Messpunkten hergestellt. Die Start-Konzentrationen wurden hierbei nach der Toxizitätsbestimmung der Inhibitoren bestimmt. Für K20043659 wurde eine Start-Konzentration von 12,5 μM gewählt, während für K20044749 eine Startkonzentration von 3,75 μM genutzt wurde. Die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Nachdem die Verdünnungsreihe in der Zellsuspension hergestellt wurde, wurden nach kurzen Invertieren 60 μl dieser den Insert-Wells hinzugefügt. Für die Reservoir-Wells wurde die Verdünnungsreihe in der MCP-1-Lösung (1 $\mu\text{g/ml}$) hergestellt und nach der Inkubation von 60 Minuten bei Raumtemperatur in die Reservoir-Wells hinzugefügt.

Für die differenzierten THP-1 Zellen wurde zunächst die Differenzierung wie in 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die Verdünnungsreihe des Inhibitors wurde hier in Assaymedium und der C5a-Lösung (33,8 nM) durchgeführt. Nach der abgeschlossenen Differenzierung wurde das Differenzierungsmedium vorsichtig abgenommen und durch das Assaymedium mit dem Inhibitor ersetzt. Dann wurden die Reservoirwells mit dem in

2 Material und Methoden

der Chemokinlösung enthaltenem Inhibitor gefüllt und der Versuch gestartet. Hier wurde ein Konzentrationsbereich analog zu den undifferenzierten THP-1 Zellen gewählt.

Tabelle 6: Getestete Konzentrationen im Migrationsassay

K20043659 [μM]	K20044749 [μM]
12,5	3,75
6,25	1,875
3,13	0,938
1,56	0,469
0,78	0,234
0,39	0,117
0,20	0,059
0,10	0,029
0,05	0,015
0,02	0,007
0,01	0,004

2.3 Toxizitätstest Inhibitoren

Lösungen und Medien

Assaymedium	RPMI1640 w Phenol Red + 25 mM HEPES + 0,5 % charcoal-stripped heat-inactivated FCS + 1 % P/S
Differenzierungsmedium	RPMI1640 w Phenol Red + 25 mM HEPES + 10 % charcoal-stripped heat-inactivated FCS + 1 % P/S + 5 ng/ml PMA + 0,1 % 2-ME
Inhibitoren	K20043659, gelöst in DMSO, Stockkonzentration 20 mM K20044749, gelöst in DMSO, Stockkonzentration 10 mM
CellTiter-Glo Reagenz	CellTiter-Glo-Substrat gelöst in CellTiter-Glo-Puffer

2 Material und Methoden

Um die Toxizität der Inhibitoren zu testen, wurden die Zellen in derselben Konzentration wie in dem Migrationsassay in einer weißen 384-Wellplatte ausgesät. Die Zellsuspensionen wurden wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben hergestellt und je nachdem, ob die differenzierten oder undifferenzierten Zellen genutzt werden sollten, in Assaymedium oder in Differenzierungsmedium hergestellt. Pro Well wurden 20 µl der Zellsuspension mit einer Konzentration von $4,167 \times 10^4$ Zellen pro ml hinzugefügt.

Bei den undifferenzierten THP-1 Zellen wurde die Verdünnungsreihe direkt in den Wells hergestellt. Dafür wurde die gewünschte Menge des Inhibitors den ersten Wells hinzugefügt und mit einer Mehrkanalpipette wurde die Verdünnung in den Wells mit der Zellsuspension hergestellt. In diesem Versuch wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe in Triplikaten hergestellt. Als Startkonzentration von K20043659 wurde 200 µM und für K20044749 30 µM gewählt. Diese Konzentrationen entsprechen in etwa dem 20-fachen des IC₅₀ des Enzyms. Es wurden die in Tabelle dargestellten Konzentrationen getestet:

Tabelle 7: Getestete Inhibitor-Konzentrationen im Viabilitätsassay

K20043659 [µM]	K20044749 [µM]
200,00	30,00
100,00	15,00
50,00	7,50
25,00	3,75
12,50	1,88
6,25	0,94
3,13	0,47
1,56	0,23
0,78	0,12
0,39	0,06
0,20	0,03

Für die differenzierten THP-1 Zellen wurden 20 µl der Zellsuspension in Differenzierungsmedium den Wells hinzugefügt und die Platte 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 Stunden wurde in Assaymedium die Verdünnungsreihe in Reaktionsgefäßen hergestellt. Das Differenzierungsmedium wurde durch das Assaymedium mit Inhibitor ersetzt. Um das Differenzierungsmedium zu entfernen, wird die Platte vorsichtig auf einem sterilen Tuch ausgeklopft. Dafür wird ein Papiertuch mit

2 Material und Methoden

70%-igen Ethanol behandelt und unter der Sterilwerkbank getrocknet. Nach dem Ausklopfen des Mediums, wurde pro Well 20 μ l der Inhibitorlösung vorsichtig mit einer Pipette, so dass die Zellen nicht vom Boden des Wells abgewaschen wurden, hinzugefügt. Als Positivkontrolle dienten hier unbehandelte Zellen, denen Assaymedium statt Inhibitor zugegeben wurde.

Nach 24h Inkubation mit dem Inhibitor wurde mit Hilfe einer Mehrkanal-Pipette 10 μ l das CellTiter-Glo-Reagenz pro Well hinzugefügt. Um das CellTiter-Glo-Reagenz herzustellen musste zunächst das CellTiter-Glo-Substrat im CellTiter-Glo-Puffer gelöst werden. Das Reagenz konnte aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden, wodurch wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden wurde. Nach der Zugabe des Reagenzes, musste die Platte 10 Minuten im Dunkeln inkubiert werden. In dieser Zeit wurden die Zellen lysiert und die Luciferase setzte das ATP der Zellen in Licht um. Die Messung der Lumineszenz erfolgte mit Hilfe des EnSpire (PerkinElmer).

Zur Berechnung der prozentualen Viabilität wurden die unbehandelten Zellen als 100 % genutzt und damit die relative Viabilität der Zellen berechnet. Mit Hilfe der Triplikate konnte die Standardabweichung der Werte bestimmt werden. Zur Bestimmung des IC₅₀ wurde die prozentuale Viabilität gegen den dekadischen Logarithmus der Inhibitorkonzentration abgebildet. Bei einer Viabilität von 50% ist der IC₅₀ erreicht. Zur Auswertung wird die Software Graphpad Prism (GraphPad Software Inc.) genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Enzymatische Untersuchung

3.1.1 PerkinElmerSet

Die hier untersuchten Inhibitoren wurden bereits von einer anderen Projektgruppe auf ihre Inhibition der SLK untersucht. Hier soll die Untersuchung nach einem anderen Testsystem stattfinden und der IC_{50} der Inhibitoren erneut bestimmt werden.

Dafür wird zunächst eine Aktivität des Enzyms gemessen. Dies wurde mit einem Testsystem von PerkinElmer geprüft. Hierbei überträgt die Kinase eine Phosphatgruppe auf das Substrat, wodurch ein FRET-Signal entsteht.

Es wurden zwei verschiedene Batches SLK getestet sowie verschiedene Batches und Konzentrationen ATP. Es konnte keine Aktivität der Enzyme festgestellt werden. Bei einer Kontrolle wurden auch Dosis-Wirkungskurven der Inhibitoren aufgenommen, welche zeigten, dass K20043659 zusätzlich fluoresziert und somit die Signalstärke mit der Abnahme der Konzentration des Inhibitors sinkt.

Abschließend kann festgestellt werden, dass das Testset von PerkinElmer nicht für den Nachweis der Aktivität dieses Enzyms geeignet ist.

3.1.2 HTRF KinEASE-STK-Set

Der Nachweis einer Aktivität wurde weiterhin mit dem HTRFKinEASE-STK-Set geprüft, bei dem drei verschiedene Substrate geprüft werden und somit sehr viele verschiedene Kinasen detektiert werden können.

Bei der Untersuchung des Enzyms mit dem HTRFKinEASE-STK-Set werden drei verschiedene Substrate getestet. Bei keinem der Substrate lässt sich eine Aktivität des Enzyms feststellen. Auch mit der Veränderung der ATP-Konzentration und -Batch oder dem Zusatz von β -Glycerophosphat kann keine Aktivität des Enzyms detektiert werden. Weiterhin ändert auch die Inkubation bei 37 °C dieses Ergebnis nicht.

Es wurde festgestellt, dass auch dieses Testkit nicht für die Messung der Aktivität der SLK geeignet ist. Für das Fehlen der Aktivität sind mehrere Ursachen denkbar, jedoch wurden

3 Ergebnisse

alle Reagenzien von mindestens zwei unterschiedlichen Herstellern bestellt und es wurden auch generalisierte Testsysteme, welche die Aktivität verschiedener Serin/Threonin Kinasen detektieren können, verwendet. Eine ausführliche Literaturrecherche ergab neben β -Glycerolphosphat ebenfalls keine weiteren Additive, die die Enzymaktivität beeinflussen. Gegenwärtig steht die Arbeitsgruppe in engem Kontakt zu Kooperationspartnern um dieses Problem zu lösen.

3.2 Migrationsassay

3.2.1 Differenzierung

Bei der Differenzierung ist es das Ziel nicht-adhärenente Monozyten zu adhärenenten Makrophagen-ähnlichen Zellen zu differenzieren. Indikator für eine funktionierende Differenzierung können die zunehmende Adhärenz sowie morphologische Veränderungen der Zellen sein.

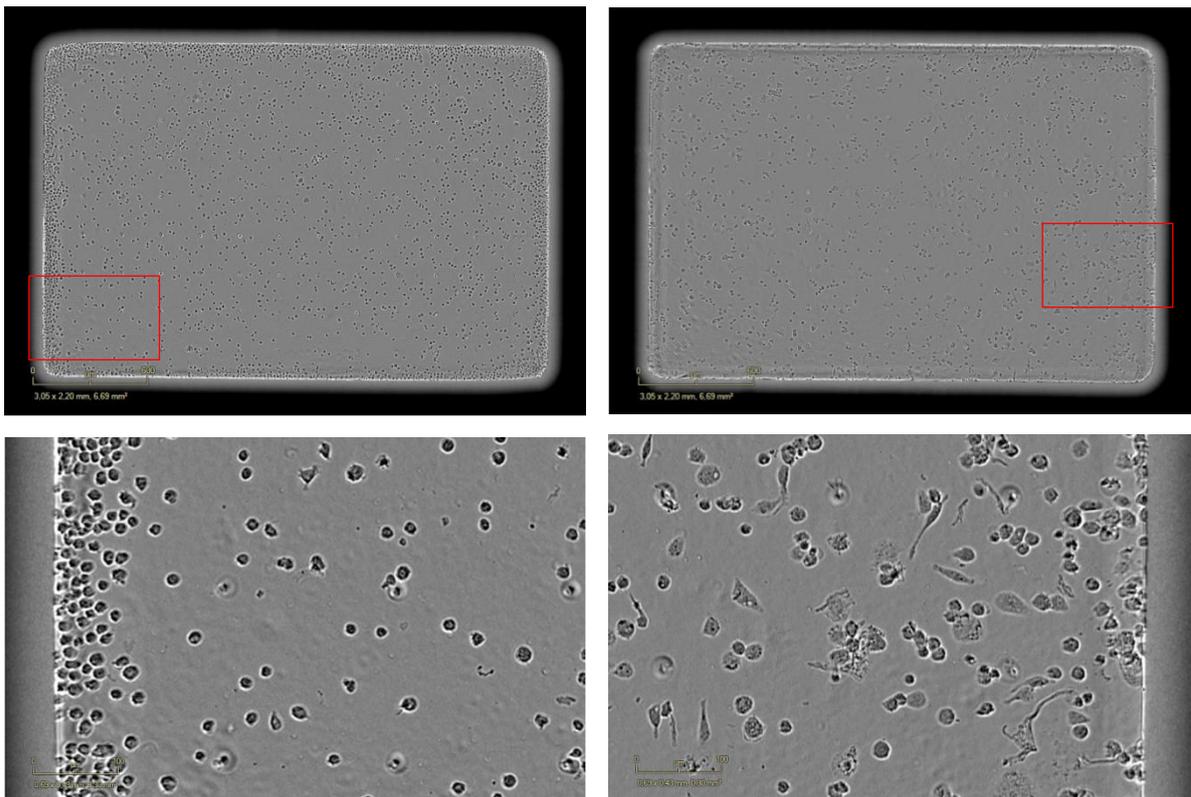


Abbildung 7: Aufnahme von undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen im Phasenkontrastmikroskop. Links: Undifferenzierte, kugelförmige THP-1 Zellen auf Matrigel. Rechts: Differenzierte THP-1 Zellen auf Matrigel. Differenzierung durch die Zugabe von 5 ng/ml PMA induziert. Es sind deutliche morphologische Unterschiede zwischen den undifferenzierten und den differenzierten THP-1-Zellen zu erkennen.

Wie in Abbildung 7 zu sehen, sind 48h nach der Zugabe von PMA deutliche morphologische Veränderungen der Zellen zu sehen. Auf den linken Bildern sind die undifferenzierten THP-1-Zellen abgebildet. Diese sind kugelförmig und wachsen nicht adhärenent, setzen sich allerdings nach einiger Zeit auf dem Boden ab. Auf dem unteren Bild ist deutlich zu erkennen, dass alle Zellen rund sind. Außerdem fällt auf, dass sich mehr Zellen am Rand des Wells befinden als in der Mitte. Dies ist eine Beobachtung, welche sich bei der Betrachtung anderer Wells bestätigt und die mit der Konfektion des Mediums zu tun hat.

Im Gegensatz dazu zeigen die Makrophagen-ähnlichen differenzierten THP-1 Zellen deutliche Unterschiede. Zum einen ist die zunehmende Adhärenz ein deutlicher Indikator für eine funktionierende Differenzierung. Zum anderen sind klare morphologische Unterschiede zu sehen wie die abgeflachte, ausgebreitete, teilweise längliche Form der Zellen. Diese Zellen sind deutlich gleichmäßiger verteilt und neigen nicht dazu, sich am Rand des Wells zu sammeln.

3.2.2. Verschiedene Zellkonzentrationen

Damit die Software IncuCyte ZOOM 2016A (Essen BioSciences Ltd.) die Zellen auf der Membran auch als solche erkennt, muss eine geeignete Zellzahl ausgewählt werden. Sind zu viele Zellen auf der Membran, kann das Programm nicht mehr mit Sicherheit feststellen, ob es sich um Zellen oder den Hintergrund handelt. Dadurch kann es zu Problemen bei der Auswertung kommen.

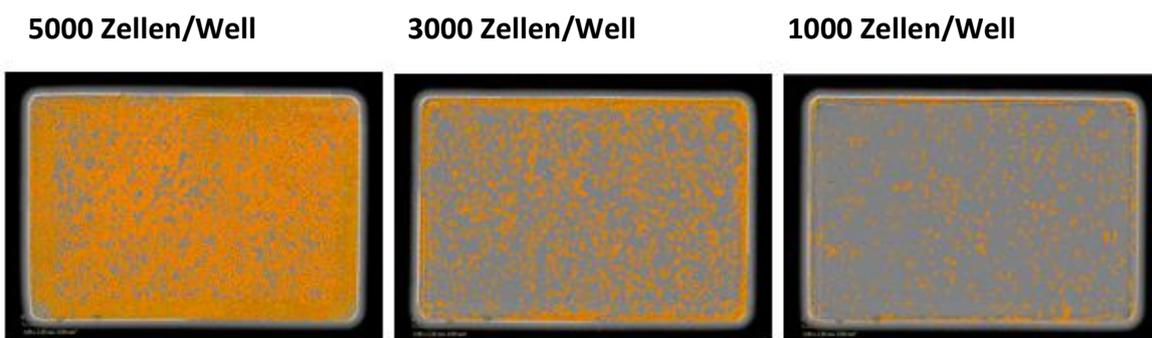


Abbildung 8: Verschiedene THP-1 Zellzahlen auf Matrigel. Von der Software erkannte Zellen sind orange dargestellt. Getestet wurde, welche Zellzahl für das Migrationsassay geeignet ist.

In Abbildung 8 sind die verschiedenen getesteten Zellzahlen zu sehen. Hierbei sind die von der Software erkannten Zellen orange dargestellt. Bei einer Konzentration von 5000 Zellen/Well ist fast das ganze Well orange, da fast die komplette Membran mit Zellen bedeckt ist. Dies führt bei der Auswertung zu Problemen, da die Zellen nicht mehr als einzelne erkannt werden, sondern als eine große Fläche. Sowohl bei einer Konzentration von 3000 Zelle/Well als auch bei einer Konzentration von 1000 Zellen pro Well kann eine sinnvolle Analyse von dem System durchgeführt werden. Allerdings ist die Differenz von Positiv- und Negativ-Kontrolle bei einer Konzentration von 1000 Zellen/Well so gering, dass sich auch diese Konzentration als ungeeignet erweist. Aus diesen Gründen wurde entschieden weitere Versuche bei einer Zell-Konzentration von 3000 Zellen pro Well durchzuführen.

3 Ergebnisse

Bei den differenzierten THP-1 Zellen wurden keine verschiedenen Konzentrationen getestet. Hier wurde die in der Application Note vorgeschlagene 2500 Zellen pro Well genutzt, da sich diese Zellkonzentration als sinnvoll erwiesen hat.

3.2.3 Migrationsverhalten

Die Migration der differenzierten Makrophagen-ähnlichen Zellen wird mit Hilfe der Bestimmung der von Zellen besetzten Fläche auf der Unterseite der Membran bestimmt. Dafür wird alle 30 Minuten ein Bild von dem Well aufgenommen und die Software bestimmt welche der Zellen auf der Oberseite und welche auf der Unterseite der Membran sitzen.

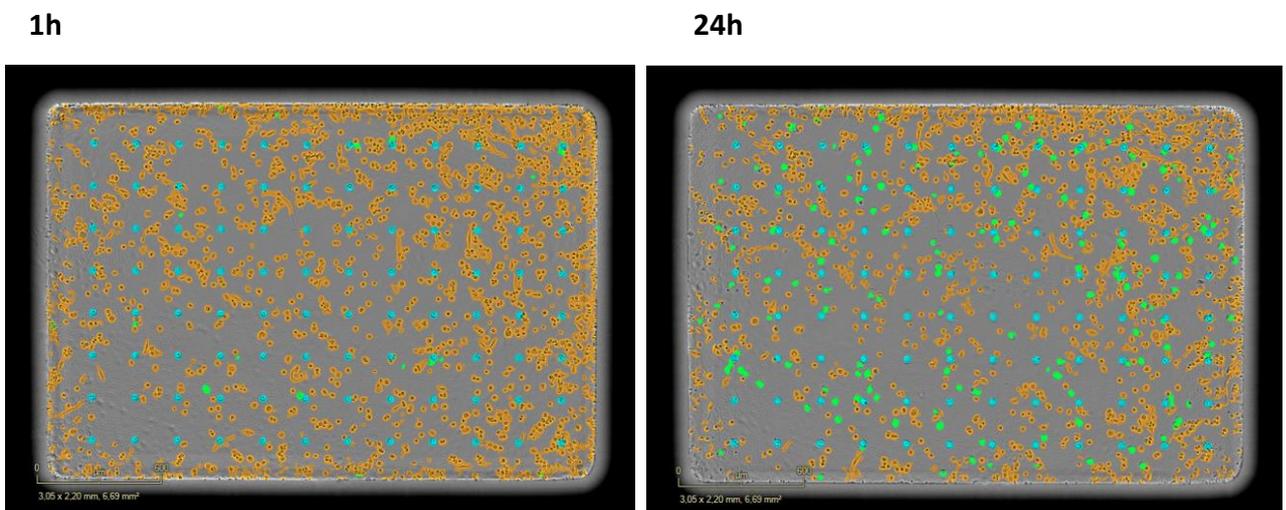


Abbildung 9: Differenzierte THP-1 Zellen auf einer porösen Membran im Phasenkontrastmikroskop. Zellen auf der Oberseite der Membran sind orange dargestellt. Zellen auf der Unterseite der Membran sind grün dargestellt. Die Poren sind in türkis markiert. Links: 1 Stunde nach Zugabe des Chemokins in das Reservoir-Well befinden fast keine Zellen auf der Unterseite der Membran. Rechts: Das selbe Well nach 24 Stunden, deutlich zu erkennen ist, dass die Anzahl an Zellen auf der Unterseite der Membran angestiegen ist.

In Abbildung 9 ist dasselbe Well mit differenzierten THP-1 Zellen am Anfang sowie am Ende einer Messung dargestellt. Zellen auf der Oberseite der Membran sind in orange, Zellen auf der Unterseite in grün und die Poren in blau dargestellt. Hier ist gut zu erkennen, dass nach 24 Stunden deutlich mehr Zellen auf der Unterseite der Membran zu finden sind, was sich durch die erhöhte Anzahl grün dargestellter Zellen zeigt. Dies spiegelt deutlich sichtbar die Migration der differenzierten Zellen wieder. Bei den undifferenzierten THP-1 ist die Migration optisch nicht zu bemerken, da diese nicht adhären wachen und daher nicht auf der Unterseite der Membran haften.

3 Ergebnisse

Wie in Abbildung 10 dargestellt, ist sowohl bei den differenzierten als auch bei den undifferenzierten THP-1-Zellen eine Migration wahrzunehmen. Bei den differenzierten THP-1 Zellen wird hierbei die Zunahme der Fläche, welche von Zellen besetzt ist, an der Unterseite der Membran dargestellt. Deutlich zu sehen ist, dass die Zellen nur auf das Chemokin C5a reagieren und keine Migration in der Negativ-Kontrolle, welche nur Medium enthält, sowie in der Probe mit MCP-1 zu sehen ist. Dies ist ein weiterer Indikator für eine funktionierende Differenzierung, da die THP-1 Zellen durch die Differenzierung die Rezeptoren für das Chemokin MCP-1 ausbilden und nur noch durch C5a stimuliert werden.

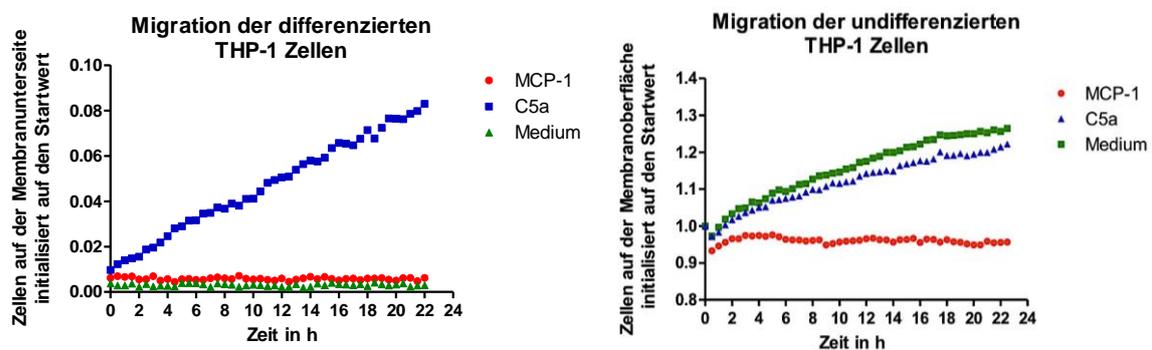


Abbildung 10: Reaktion der THP-1 Zellen auf verschiedene Chemokine. Die undifferenzierten Zellen reagieren auf das Chemokin MCP-1 (1 µg/ml), die differenzierten Zellen lassen sich durch C5a (135 nM) stimulieren.

Die Migration der undifferenzierten THP-1-Zellen kann durch die Beobachtung der Zellen auf der Oberseite der Membran festgestellt werden. Dabei wird die Differenz des Anstiegs der Zellen zwischen Positiv- und Negativ-Kontrolle untersucht. Bei der Negativ-Kontrolle, welche nur Medium im Reservoir-Well enthält, kann hier ein Anstieg der von Zellen bedeckten Fläche beobachtet werden, während die Positiv-Kontrolle, welche MCP-1 enthält, eine konstante Fläche zeigt. Dies entsteht durch die fortschreitende Proliferation der Zellen. Weiterhin fällt auf, dass nur das Chemokin MCP-1 eine stimulierende Wirkung auf die Zellen zeigt. In den Wells der mit MCP-1 stimulierten Zellen bleibt die mit Zellen bedeckte Fläche in etwa konstant, was auf die Migration und gleichzeitige Proliferation zurückzuführen ist. Auch für das Chemokin C5a ist hier eine geringe Steigung zu sehen. Jedoch ist die Stimulierung mit MCP-1 wesentlich effizienter, weshalb alle weiteren Versuche mit diesem Zelltyp mit MCP-1 durchgeführt wurden.

3.2.4 Verschiedene Beschichtungen

Um ein optimales Messfenster zu erhalten, muss auch die Beschichtung der Membran an die beiden Zelltypen angepasst werden. Hier wurden die beiden vorgeschlagenen Beschichtungen aus Matrigel und Fibronectin getestet.

Für die differenzierten THP-1 Zellen ist auf Fibronectin keine Migration vorhanden, während auf Matrigel eine deutliche Zellmigration zu beobachten ist. Die Fibronectin-Beschichtung bildet nach dem Start der Messung zunehmend unebene Strukturen um einige Poren aus. Von einer Kontamination ist hierbei nicht auszugehen, da diese sich gleichmäßig im Well verteilen würde. Diese unebenen Strukturen waren bei allen Versuchen mit den differenzierten Zellen zu sehen und breiteten sich in der Regel von den Ecken des Wells aus.

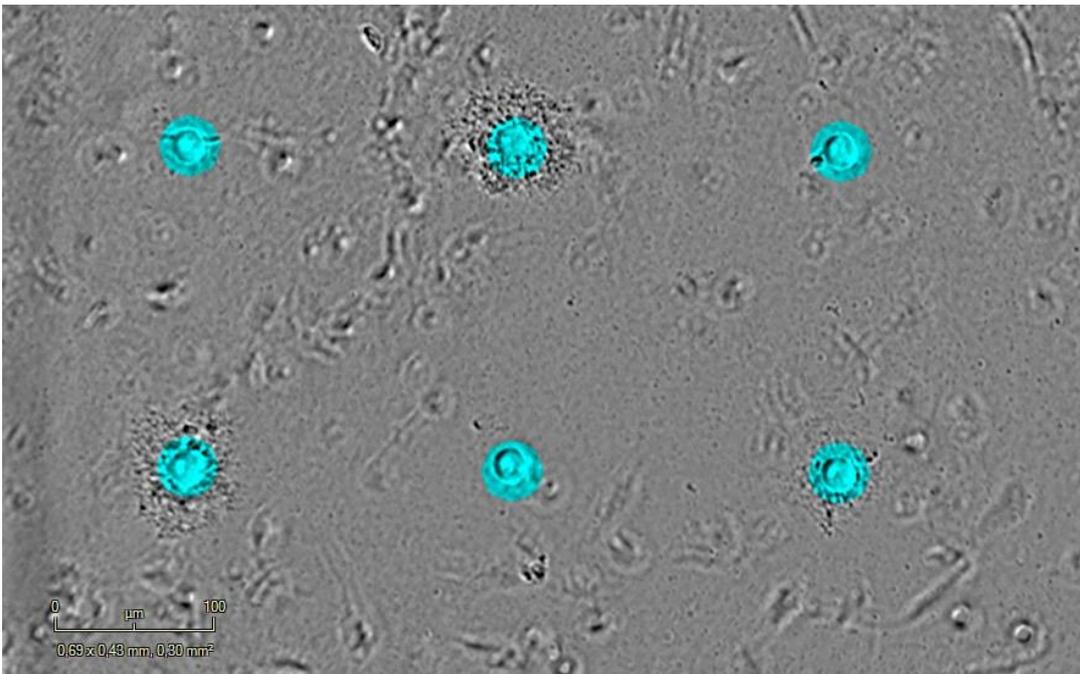


Abbildung 11: Fibronectin-Beschichtung (5µg/ml ohne BSA) mit Phasenkontrastmikroskop aufgenommen, 10x Objektiv. Fokussiert wurde die Unterseite der Membran. Zellen auf der Oberseite der Membran sind verschwommen zu erkennen. Die Poren in der Membran sind türkis markiert. Um einige Poren sind unebene Strukturen zu erkennen.

In Abbildung 11 ist die Membran im Phasen-Kontrast-Mikroskop von unten zu sehen. Die Poren sind hier türkis markiert. Um einige der Poren sind die unebenen Strukturen gut zu erkennen, während andere völlig intakt wirken. Bei keiner der getesteten Fibronectin-Konzentrationen ist eine Migration der differenzierten THP-1 Zellen zu beobachten. Dagegen funktioniert die Migration der Zellen auf Matrigel sehr gut.

3 Ergebnisse

Auch für die undifferenzierten Zellen wurde die Migration mit Matrigel und Fibronektin getestet. Mit beiden Beschichtungen ist eine Migration der Zellen zu beobachten, jedoch ist eine deutlich stärkere Migration bei einer Matrigelbeschichtung zu beobachten. Die bestimmten Steigungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Differenz der Steigung der Zunahme bzw. Abnahme der von Zellen bedeckten Fläche zwischen Positiv- und Negativ- Kontrolle. Für beide Zelltypen ist die Matrigel-Beschichtung besser geeignet.

Coating	Differenzierte THP-1 Zellen	Undifferenzierte THP-1 Zellen
Matrigel	$3,25 \cdot 10^{-3}$	$12,8 \cdot 10^{-3}$
Fibronektin	-	$7,9 \cdot 10^{-3}$

Aus den genannten Gründen wurde entschieden sowohl für die differenzierten als auch für die undifferenzierten Zellen eine Matrigelbeschichtung zu nutzen.

3.2.5 Verschiedene Chemokine

Um eine geeignete Konzentration der Chemokine für die Untersuchung der Inhibitoren der SLK auszuwählen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven der beiden Chemokine zur Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration aufgenommen. Für die Untersuchung der Inhibitoren ist es entscheidend, dass eine klare Migration zu beobachten ist, andererseits ist auch ein sparsamer Umgang mit den Chemokinen wichtig.

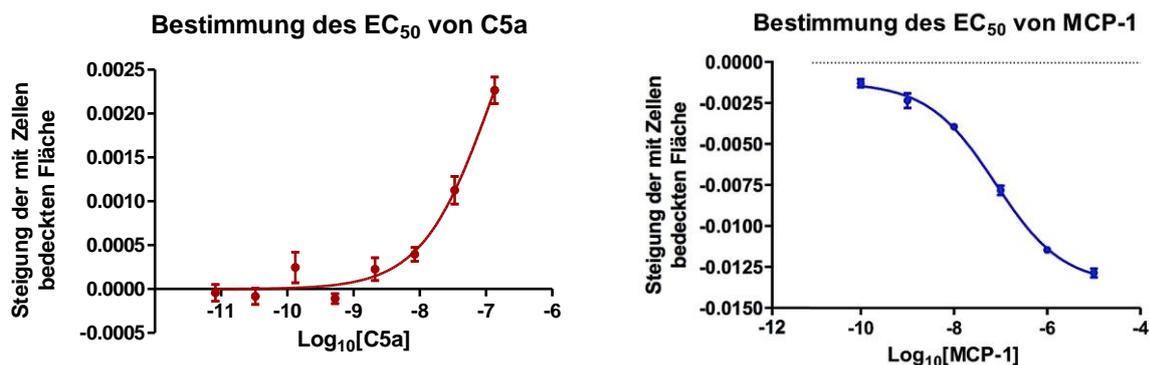


Abbildung 12: Dosis-Wirkungskurve von beiden Chemokinen. Auf der Y-Achse ist die Veränderung der Fläche, die die Zellen einnehmen, aufgetragen, während auf der X-Achse der dekadische Logarithmus der Konzentration des Chemokins abgebildet ist. Links ist die Zunahme der Zellen auf der Unterseite der Membran zu sehen. Rechts abgebildet ist die Veränderung der Zellen auf der Oberfläche der Membran.

3 Ergebnisse

Für die undifferenzierten THP-1-Zellen ist in Abbildung 12 eine vollständig ausgebildete Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Die experimentell bestimmte, mittlere effektive Konzentration von MCP-1 beträgt 77 ng/ml, was im Bereich der Literaturwerte liegt (Essen BioScience 2016a).

Für die differenzierten THP-1-Zellen ergibt sich ein EC_{50} von 127 nM. Dieser Wert liegt etwa bei dem 10-fachen des Literaturwertes. Bei der Betrachtung der Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 12 fällt auf, dass die Dosis-Wirkungskurve für dieses Chemokin nicht vollständig ausgebildet ist. Dadurch ist der berechnete Wert für die mittlere effektive Konzentration vom Schätzen eines Maximalwertes für den Anstieg abhängig. Das Programm legt diesen auf etwa $4,4 \cdot 10^{-3}$ fest, wodurch ein recht hoher EC_{50} berechnet wird. Die Bestimmung eines Wertes mit höherer Konzentration war aus Gründen der Konzentration der Stock-Lösung nicht möglich. Die bestimmten EC_{50} Werte sind zum Vergleich mit den Literaturwerten in Tabelle 9 abgebildet.

Tabelle 9: Abbildung der mittleren effektiven Konzentration der beiden genutzten Chemokine; Abgebildet ist der Literaturwert im Gegensatz zum experimentell bestimmten Wert.

Chemokin	Literaturwert	Experimentell bestimmter Wert
MCP-1	1-1000 ng/ml	77 ng/ml
C5a	13,5 nM	127 nM

Es wurde entschieden bei einer Konzentration von MCP-1 von 1 µg/ml und C5a von 33,8 nM zu arbeiten. Diese Konzentrationen reflektieren deutlich die Verfügbarkeit des Chemokins und nicht so sehr den ermittelten EC_{50} -Wert.

3.2.6 Bestimmung der Toxizität der Inhibitoren

Um geeignete Konzentrationen für den Einsatz der Inhibitoren zu finden, wurde zunächst die Toxizität dieser mittels undifferenzierter THP-1-Zellen geprüft.

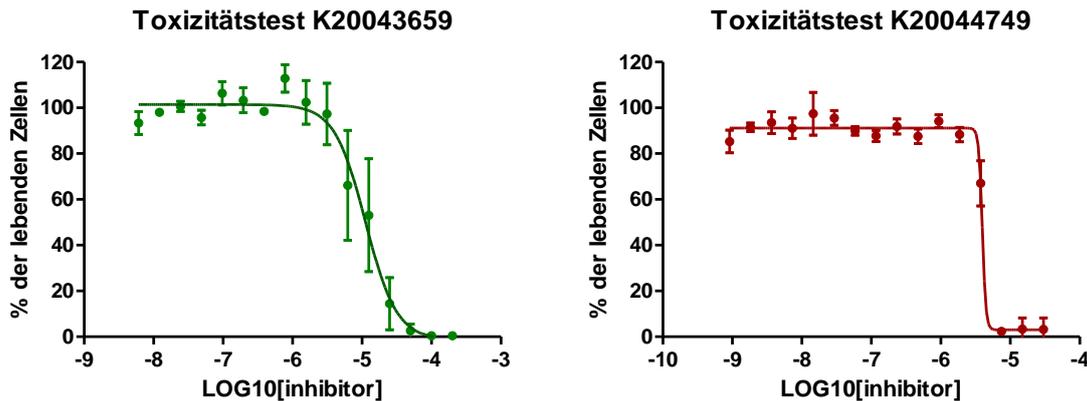


Abbildung 13: Toxizität der niedermolekularen Inhibitoren auf undifferenzierte THP-1-Zellen. Viabilität der Zellen 24 Stunden nach Zugabe der Substanzen mit CellTiterGlo durch Messung der Lumineszenz bestimmt. Der IC₅₀ von K20043659 beträgt 11,3 µM und der IC₅₀ von K20044749 beträgt 4,0 µM

In Abbildung 13 ist die Toxizität der Inhibitoren auf die undifferenzierten Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Dabei wurde eine 24 Stunden Inkubation genutzt, da dies auch der untersuchten Zeitspanne des Migrationsassays entspricht. Beide Inhibitoren scheinen also in hohen Konzentrationen giftig auf die Zellen wirken und die Zellen sterben. Die hier bestimmten IC₅₀-Werte betragen für K20043659 11,3 µM und für K20044749 4,0 µM, was bedeutet, dass bei diesen Konzentrationen noch etwa 50 % der Zellen leben.

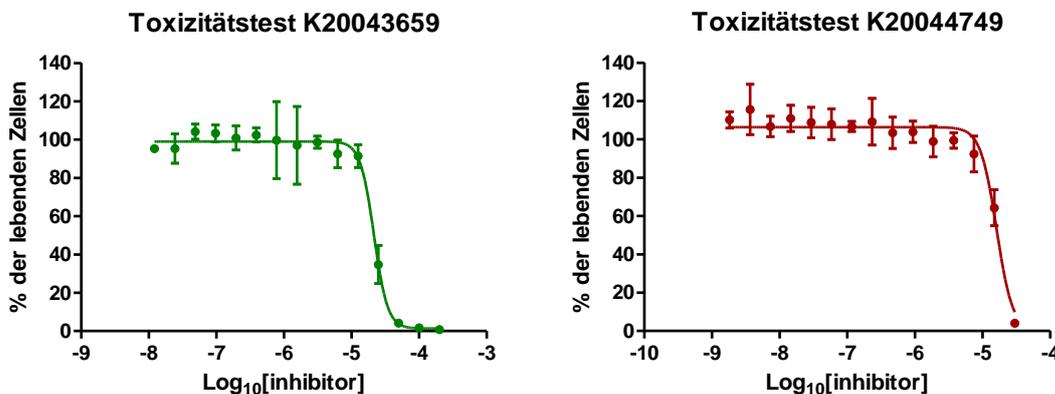


Abbildung 14: Toxizität der niedermolekularen Inhibitoren auf die differenzierte THP-1 Zellen. Viabilität wurde nach 24 Stunden mit CellTiter-Glo bestimmt. Der IC₅₀ von K20043659 beträgt 21,6 µM und der IC₅₀ von K20044749 beträgt 16,2 µM

In Abbildung 14 ist die Toxizität der Inhibitoren auf die differenzierten Zellen dargestellt. Hierbei ergeben sich deutlich höhere Werte für den IC₅₀ von 21,6 µM für K20043659 und 16,2 µM für K20044749. Die Inhibitoren scheinen auf die differenzierten Zellen weniger

3 Ergebnisse

giftig zu wirken. Es fällt auf, dass auch hier die Toxizität von K20044749 höher ist, da die Zellen bereits bei geringeren Konzentrationen der Substanz sterben.

Tabelle 10: Darstellung der IC₅₀-Werte der Inhibitoren für das Enzym und die Toxizität auf Zellen; Bei den Werten für das Enzym handelt es sich um Literaturwerte; die IC₅₀-Werte für die Toxizität wurden experimentell bestimmt.

	K20043659	K20044749
IC ₅₀ SLK	9,35 µM	1,57 µM
IC ₅₀ Toxizität differenzierte Zellen	21,6 µM	16,2 µM
IC ₅₀ Toxizität undifferenzierte Zellen	11,3 µM	4 µM

In Tabelle 10 sind die IC₅₀-Werte, welche von dem Kooperationspartner bestimmt wurden im Vergleich zu den bestimmten IC₅₀-Werten für die Toxizität der Substanzen dargestellt. Um die Inhibierung der Migration zu beobachten, müssen die Zellen leben, weshalb entschieden wurde als höchste Konzentration der Substanz K20043659 12,5 µM und der Substanz K20044749 3,75 µM einzusetzen. Bei diesen Konzentrationen ist bei den undifferenzierten Zellen zwar mit einer gewissen Toxizität zu rechnen, jedoch liegen die Werte noch über dem IC₅₀ des Enzyms, was wichtig ist um eine möglichst vollständige Inhibition des Enzyms zu gewährleisten.

Würden deutlich geringer Konzentrationen gewählt, ist auch nicht mehr mit einer Inhibition auf das Enzym zu rechnen.

3.2.7 Inhibition der Migration durch die getesteten Inhibitoren

Die Untersuchung der Inhibitoren im Migrationsassay ergab sehr verschiedene Werte für den IC₅₀ der beiden Substanzen. Beide Substanzen wurden zwei Mal mit beiden Zelltypen getestet. In den Wiederholungen ergaben sich teilweise sehr verschiedene Werte für den IC₅₀ der Substanzen.

Bei den differenzierten THP-1 Zellen konnten für beide Substanzen komplett ausgebildete Dosis-Wirkungskurven aufgenommen werden. Hierbei fällt jedoch auf, dass die Migration der Zellen bei K20043659 mit einem Maximalwert von etwa $1,6 \cdot 10^{-3}$ unter der Steigung der Positiv-Kontrolle liegt. Im Gegensatz dazu ist bei K20044749 keine vollständige

3 Ergebnisse

Inhibition der Steigung zu beobachten. In Abbildung 12 sind die aufgenommenen Dosis-Wirkungskurven zu sehen.

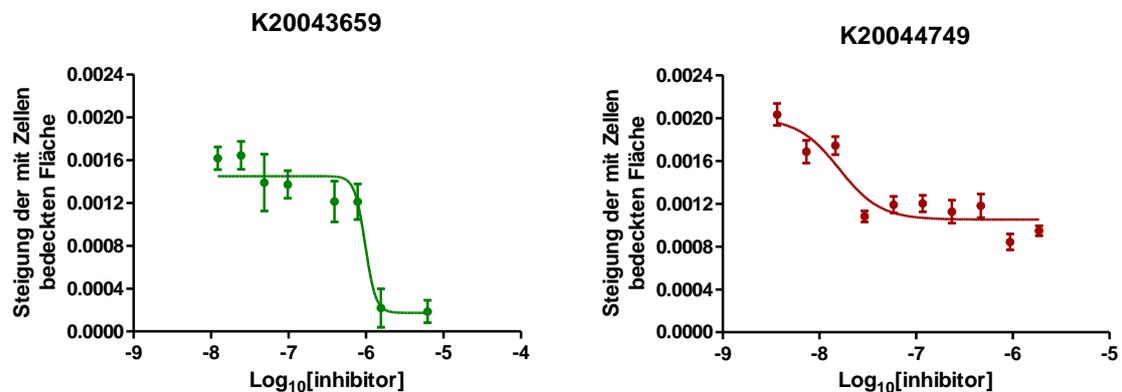


Abbildung 15: Dosis-Wirkungskurven der Inhibitoren im Migrationsassay mit differenzierten THP-1 Zellen. Bei beiden Kurven ist ein oberes und ein unteres Plateau angedeutet. Der hier bestimmte IC_{50} für K20043659 beträgt 977 nM und der IC_{50} für K20044749 beträgt 16 nM

Der IC_{50} , welcher sich aus Abbildung 15 ergibt, beträgt für K20043659 977 nM und für K20044749 16 nM. Auffällig bei der Auswertung ist, dass die Anpassung der Maske zur Bestimmung wobei es sich um Zellen handelt und wobei um Hintergrund, hier einen großen Einfluss auf die einzelnen Werte und damit auch auf den bestimmten IC_{50} hatte. Bei einer Wiederholung des Experiments ergeben sich stark abweichende IC_{50} -Werte. Diese betragen für K20043659 5,4 nM und für K20044749 905 nM. Diese starken Schwankungen lassen sich durch die Komplexität des zellulären Systems und des Messsystems erklären.

Die undifferenzierten Zellen zeigen interessanter Weise ein abweichendes Verhalten auf die Substanzen.

3 Ergebnisse

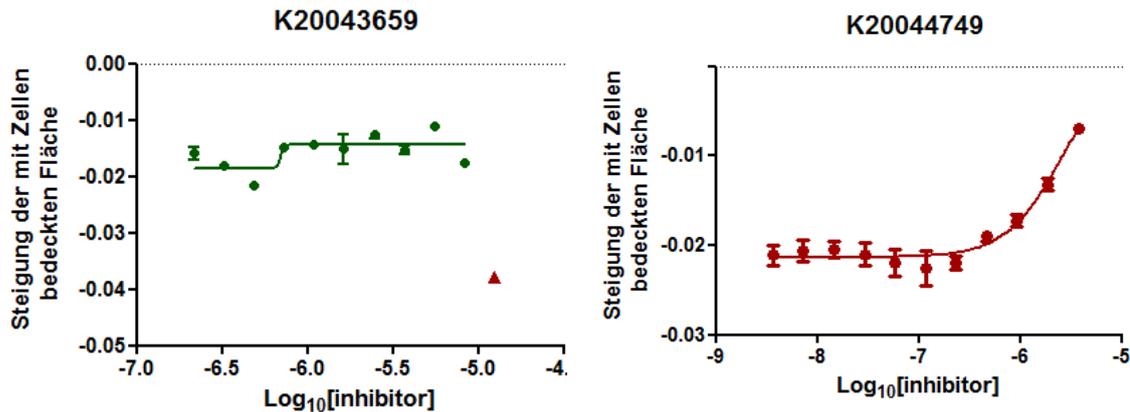


Abbildung 16: Dosis-Wirkungskurven der beiden Inhibitoren im Migrationsassay mit undifferenzierten Zellen. Für K20043659 lässt sich kein plausibler IC₅₀ bestimmen. Die Werte streuen hier so sehr, dass die Software versucht einen Kurvenverlauf darin zu erkennen. Der rote Punkt entspricht toten, nicht migrierten Zellen. Bei K20044749 lässt sich deutlich eine Inhibition der Migration erkennen. Der hier bestimmte IC₅₀ beträgt 1,8 µM

Für die Substanz K20043659 lässt sich mit den undifferenzierten Zellen kein plausibler IC₅₀ bestimmen. Die gemessenen Werte streuen durch die komplexen Abläufe in den Zellen. Da die Software versucht einen sigmoidalen Kurvenverlauf in den Messpunkten wiederzufinden, interpretiert es die streuenden Werte und legt eine nicht sinnvolle Dosis-Wirkungskurve durch die Daten. Wiederholungen bestätigen diese Vermutung, dass hier kein Einfluss auf das Migrationsverhalten festgestellt werden kann.

Bei der Inhibition der undifferenzierten Zellen mit K20043659 ist deutlich zu sehen, dass die Zellen bei der höchsten, in Abbildung 16 rot dargestellten, Konzentration sterben. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, ziehen sich die sterbenden Zellen bei dieser hohen Konzentration an K20043659 im Laufe der Zeit zusammen, was zu einer scheinbaren Abnahme der mit Zellen bedeckten Fläche führt.

Für die Substanz K20044749 konnte eine sinnvolle Dosis-Wirkungskurve aufgenommen werden. Hierbei ist der Kurvenverlauf nicht komplett ausgebildet, da die Toxizität der Substanz K20044749 zu hoch ist, um das obere Plateau zu erreichen. Die Dosis-Wirkungskurve ist in Abbildung 16 dargestellt.

Der hier bestimmte IC₅₀ beträgt 2,6 µM und in einer ebenfalls in Duplikaten ausgeführten Wiederholung wurde 1,8 µM bestimmt. Der IC₅₀ des Enzyms lag bei 1,57 µM, was in etwa im selben Bereich liegt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Substanz das Enzym in der Zelle genau wie außerhalb der Zelle inhibiert.

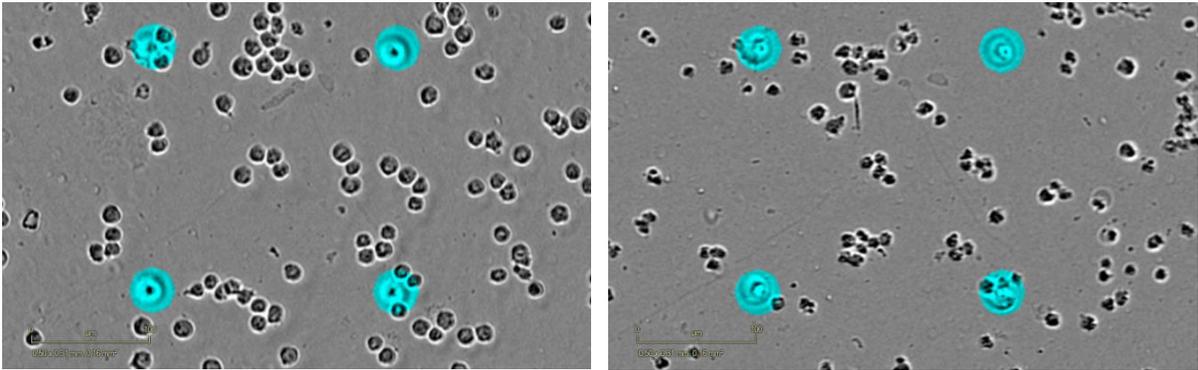


Abbildung 17: Undifferenzierten Zellen mit Inhibitor K20043659. Links: die undifferenzierten THP-1 Zellen bei der Zugabe des Inhibitors. Rechts: Dasselbe Well 24 Stunden nach Zugabe des Inhibitors. Die Zellen sind wesentlich kleiner und zeigen morphologische Veränderungen.

Beide Inhibitoren zeigen einen Effekt auf die Migration der Zellen. Die Beobachtungen zeigen, dass die Inhibitoren verschieden Effekte auf die beiden Zelltypen haben. K20043659 zeigt keine Inhibition auf die Migration der undifferenzierten Zellen, sondern nur eine toxische Wirkung. Im Gegensatz dazu zeigt dieser Inhibitor eine Hemmung der Migration der differenzierten THP-1 Zellen. K20044749 zeigt auf beide Zelltypen eine inhibierende Wirkung.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Migration mit diesem System gut beobachtet werden kann. Weitere Optimierungen im Bereich der Chemokin-Konzentration, Beschichtung der Membran und Anpassung der Maske zur Auswertung können zu einem noch robusterem Testsystem führen.

4 Diskussion

4.1 Enzym

Beide hier getesteten Testsysteme haben sich als nicht für die Detektion einer Aktivität dieses Enzyms geeignet erwiesen. Bei beiden lässt sich keine wesentliche Differenz im FRET-Signal zwischen Positiv- und Negativ-Kontrolle detektieren. Des Weiteren stehen auch die fluoreszierenden Eigenschaften des Inhibitors K20044749 der Untersuchung mit dem FRET-System im Weg. Daher ist es empfehlenswert auf ein anderes System auszuweichen.

Dafür kommt zum Beispiel das ADP-Glo-System von Promega in Frage. Dieses ist für jedes Enzym geeignet, welches ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) umwandelt. Bei der SLK handelt es sich um eine Kinase, die eine Phosphat-Gruppe von ATP auf Paxillin überträgt. Durch die Übertragung dieser wird aus ATP ADP+P_i. Bei diesem Testsystem wird nach der abgeschlossenen Reaktion das überschüssige ATP, was in dem Reaktionsmix verbleibt, inaktiviert, bis nur noch ADP vorhanden ist. Durch das Hinzufügen des Kinase Detection Mixes wird das ADP zu ATP konvertiert. Das neu gebildete ATP reagiert im nächsten Schritt mit der Luciferase, wodurch Licht generiert wird, welches gemessen werden kann. Es wird in diesem Assay also das umgesetzte ATP gemessen (Alves, Goueli & Zegzouti 2012).

Weiterhin ist eine radioaktive Markierung des Substrates durch die Nutzung von radioaktiv markiertem ATP möglich (Hastie, McLauchlan & Cohen 2006). Bei der Phosphorylierung von Proteinen bindet die γ -Phosphatgruppe des ATPs an das Protein. Wurde diese Phosphatgruppe vorher radioaktiv markiert, kann mit jedem phosphorylierten Protein ein höheres radioaktives Signal gemessen werden. Dadurch ist eine direkte Messung des Substratumsatzes möglich. Es handelt sich hierbei um ein schnelles, einfaches und sensitives Messsystem.

Die vorgestellten Möglichkeiten stellen nur einen kleinen Teil der vorhandenen Testsysteme dar. Viele weitere Messverfahren können für die weiteren Untersuchungen der SLK Inhibitoren genutzt werden.

4.2 Differenzierung

Die durchgeführten Versuche deuten darauf hin, dass die Differenzierung wie gewünscht abläuft. Durch die Zugabe von PMA sind deutliche morphologische Veränderungen zu beobachten. Außerdem lässt sich aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens nach Differenzierung auf Behandlung mit den beiden Chemokinen auf eine veränderte Expressionsrate der verschiedenen Gene schließen.

Der Rezeptor CCR2, der Rezeptor für MCP-1, ist speziell für die Einwanderung der Monozyten in Gewebe zuständig. Dieser transmembrane Rezeptor gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird von Chemokinen aktiviert. MCP-1 ist der stärkste Aktivator des Rezeptors, wobei auch viele andere Chemokine, wie z.B. CCL7, CCL8, CCL12, CCL13 und CCL16 diesen aktivieren können(Luttmann et al. 2014). Nach der Differenzierung der Monozyten in Makrophagen wird die Expression des Rezeptors herunter reguliert, da die Monozyten zu diesem Zeitpunkt bereits in entzündetes Gewebe eingewandert sind und somit an den Ort gelangt sind, an dem sie benötigt werden (Chu et al. 2014).

Nach der Differenzierung lässt sich deutlich eine Stimulierung durch C5a erkennen. C5a ist Bestandteil des Komplementsystems, welches Teil der Immunantwort ist. Für C5a existieren zwei Rezeptoren, C5aR (auch CD88) und C5L2 (auch GPR77). Diese erfüllen verschiedene Funktionen, gehören allerdings beide zu den GPCRs. Nur C5aR wird für die Aktivierung der Migration benötigt. Verschiedenen Quellen zufolge kommt es zu einer Expression von C5aR ausschließlich auf Makrophagen(Luttmann et al. 2014) oder ausschließlich auf Monozyten(Mittar, Paramban & McIntyre 2011) sowie auf beide Zelltypen (Rink, Kruse & Haase 2015).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten zunächst auf eine Expression von C5aR ausschließlich in Makrophagen hin. Eine genauere Untersuchung der Migration zeigt allerdings, dass sowohl die differenzierten als auch die undifferenzierten THP-1 Zellen von C5a stimuliert werden können. Wie bereits in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, ist die Steigung der mit Zellen bedeckten Fläche bei den differenzierten Zellen etwa um den Faktor vier geringer. Da die Stimulierung mit dem Chemokin MCP-1 so viel größer ist, kann die Stimulierung durch C5a bei den undifferenzierten THP-1 Zellen kaum

wahrgenommen werden. Eine genauere Untersuchung zeigt allerdings, dass auch hier eine Aktivierung der Zellen stattfindet. Die Untersuchung der Differenz der Steigung der nicht stimulierten Zellen und der durch C5a stimulierten Zellen ergibt eine Steigung von etwa $2,6 \cdot 10^{-3}$. Dieser Wert ist näherungsweise so groß wie die Steigung der differenzierten Zellen für C5a, welcher $3,2 \cdot 10^{-3}$ beträgt. Diese Untersuchung deutet folglich darauf hin, dass sich die Expression der Rezeptoren für C5a im Laufe der Differenzierung nicht wesentlich verändert.

4.3 Experimentell bestimmter Wert für EC_{50} von C5a

Bei der Betrachtung der experimentell bestimmten Werte für die EC_{50} der Chemokine fällt auf, dass der EC_{50} von MCP-1 im Bereich des von EssenBioscience angegebenen Bereichs liegt.

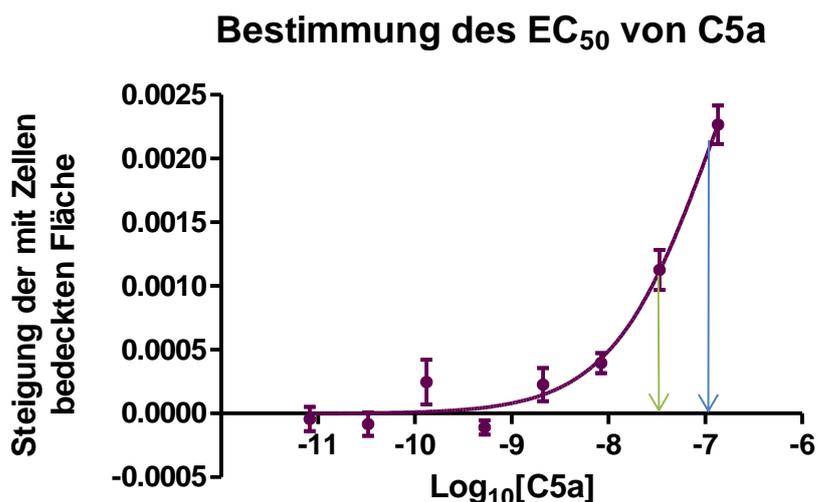


Abbildung 18: Dosis-Wirkungskurve von C5a. in blau eingezeichnet ist der vom Programm bestimmte EC_{50} . In grün dargestellt ist ein alternativer EC_{50} , wenn davon ausgegangen wird, dass die Steigung keine höheren Werte erreicht als hier dargestellt.

Der EC_{50} von C5a liegt dagegen deutlich über dem von EssenBioscience angegebenen Wert. Er beträgt in etwa das 10-fache. Dafür kann es verschiedene Gründe geben. An erster Stelle ist hier die Auswertungsmethode zu nennen. Die Bestimmung wird mit Hilfe der Software Prism (GraphPad Software) durchgeführt. Für eine optimale Bestimmung ist sowohl die Ausbildung des oberen wie auch die Ausbildung des unteren Plateaus notwendig. Bei den durchgeführten Versuchen wurde das obere Plateau nicht erreicht, weshalb die Software dieses approximiert. In diesem Fall wird der obere Schwellenwert

4 Diskussion

auf etwa $4,4 \cdot 10^{-3}$ festgelegt, wodurch die halbmaximale Steigung bei etwa $2,2 \cdot 10^{-3}$ erreicht ist. Diese Steigung tritt bei einer Chemokin-Konzentration von 127 nM auf. Wird das obere Plateau allerdings bei einer geringeren Steigung erreicht, sinkt auch der Wert für den EC_{50} deutlich. Wird das obere Plateau beispielweise bereits bei $2,2 \cdot 10^{-3}$ erreicht, entspricht die halbmaximale Steigung $1,1 \cdot 10^{-3}$, welche bereits bei einer Chemokin-Konzentration von 33,8 nM erreicht werden würde. In Abbildung 18 ist der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve von C5a dargestellt. Der blaue Pfeil markiert den von der Software bestimmten Wert für den EC_{50} . Der grüne Pfeil markiert den EC_{50} , wenn davon ausgegangen wird, dass keine höheren Steigungen erreicht werden können. Für die exakte Bestimmung des EC_{50} könnte eine Wiederholung mit höheren Chemokin-Konzentrationen sinnvoll sein. Aufgrund der Konzentration der Stock-Lösung war dies nicht umsetzbar.

Außerdem handelt es sich bei Chemokinen um temperaturempfindliche Substanzen, bei denen mehrmaliges Auftauen und Einfrieren nach Möglichkeit vermieden werden soll. Das Auftauen und Einfrieren kann allerdings nicht vollständig vermieden werden, wodurch es zwangsläufig zu einer Verminderung der Aktivität der Substanz kommen kann.

Des Weiteren ist es möglich, dass die Differenzierung nicht vollständig abgelaufen ist, wodurch die Zellen weniger sensitiv reagieren können. In dem hier verwendeten Protokoll für die Differenzierung werden die Zellen 48 Stunden mit 5 ng/ml PMA behandelt und direkt danach für das Migrationsassay genutzt. Die Untersuchung verschiedener Differenzierungsprotokolle zeigt teilweise bessere Ergebnisse, wenn die Zellen nach Abschluss der Differenzierung in Kultivierungsmedium regeneriert werden (Daigneault et al. 2009). Dadurch erholen sich die Zellen und die Differenzierung wird abgeschlossen.

Eine weitere Möglichkeit, warum die Zellen erst bei höheren C5a-Konzentrationen migrieren als erwartet, ist, dass für die Beschichtung der Membran nicht Fibronectin wie vorgeschlagen, sondern Matrigel genutzt wurde. Fibronectin wird von Makrophagen bevorzugt zur Adhäsion genutzt, da es besonders in verwundeten Geweben vorhanden ist und die Makrophagen dadurch weiterhin aktiviert werden (Wang, Fu 2001). Matrigel wird

aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarcoma gewonnen, welches sehr reich an extrazellulären Matrix-Proteinen ist. Näherungsweise besteht es zu 60% aus Laminin, 30% Collagen IV und 8% Entactin. Des Weiteren enthält es viele Wachstumsfaktoren, die natürlich in dem Tumor vorhanden sind. Durch diese Zusammensetzung bildet sich eine Beschichtung auf der die Monozyten gut adhären (Corning Incorporated 2012). Es ist jedoch denkbar, dass die vorgeschlagene Fibronectin-Beschichtung bessere Ergebnisse zeigen könnte.

Für die verminderte Aktivität des Chemokins sind viele Faktoren denkbar. Eine Optimierung müsste sich deshalb mit all diesen Möglichkeiten auseinandersetzen.

4.4 Weitere Anwendung der Verfahren

Für weitere Untersuchungen niedermolekularer SLK-Inhibitoren ist von Interesse welches der beiden Testsysteme für das Migrationsassay besser geeignet ist. Bei einem Screening für die Inhibitoren ist sowohl eine möglichst einfache Handhabung sowie ein klares, wenig fehlerbehaftetes Ergebnis von Vorteil.

Das Migrationsassay mit den undifferenzierten THP-1 Zellen hat den Vorteil der Zeitersparnis, da die Differenzierung alleine 48 Stunden in Anspruch nimmt. Ergebnisse können hier bereits nach 24 Stunden ausgewertet werden. Dadurch lässt sich recht schnell eine Aussage über die Wirkung der verschiedenen Substanzen treffen und in kürzerer Zeit können mehr Proben getestet werden.

Außerdem wird hier die Migration der Monozyten untersucht. Dies entspricht dem Vorgang der Einwanderung der Zellen in das entzündete Gewebe. Es ist das Ziel mit den Inhibitoren genau diesen Vorgang zu unterbrechen und somit den Verlauf der Krankheit direkt zu stoppen.

Weiterhin beträgt die Steigung bei dem Versuchsaufbau mit den undifferenzierten Zellen in etwa das 4-fache der Steigung mit den differenzierten Zellen. Eine Migration zeigt sich hier also wesentlich deutlicher als mit den differenzierten Zellen.

Ein Nachteil bei diesem Assay ist, dass eine Stunde nach dem Aussäen der Zellen das Chemokin zugegeben und der Versuch gestartet werden muss. Der Inhibitor wird direkt in

4 Diskussion

die Zellsuspension zugegeben, wodurch die Zellen bereits eine Stunde mit dem Inhibitor inkubieren bevor der Versuch gestartet wird. Da die Zellen nicht adhärent wachsen, ist auch kein Medienwechsel möglich, weshalb der Versuch direkt nach dem Aussäen der Zellen gestartet werden muss.

Außerdem ist die Toxizität bei diesem Assay als wesentlich kritischer einzuschätzen. Wirkt eine Substanz stark toxisch, sterben die Zellen und ziehen sich zusammen. Sie proliferieren nicht mehr und auf das gesamte Well betrachtet sinkt die Fläche, welche von Zellen bedeckt ist. Dieser Vorgang kann unter Umständen mit einer Migration verwechselt werden, da auch hier die mit Zellen bedeckte Fläche auf der Oberseite beobachtet wird. Aus diesem Grund ist es unbedingt notwendig einen Toxizitätstest mit den Substanzen vor Beginn des Migrationsassays durchzuführen.

Das Migrationsassay mit den differenzierten Zellen hat den Vorteil, dass eine klare Aussage über die Migration getroffen werden, da nur Zellen, die auf die Unterseite der Membran wandern zur Auswertung genutzt werden. Ist eine Substanz zu toxisch, sterben die Zellen und es findet keine Migration statt. Eine toxische Wirkung einer Substanz kann so nicht mit einer Migration verwechselt werden.

Weiterhin sind die einzelnen Arbeitsschritte hier weniger zeitintensiv. Nach dem Abschluss der Beschichtung können die Platten einige Tage bei 37 °C gelagert werden, solange genug PBS in den Wells ist und die Beschichtung nicht austrocknet. An einem weiteren Tag kann dann das Aussäen der Zellen stattfinden. Danach folgt eine weitere Unterbrechung von 48 Stunden, in der die Zellen differenzieren. Bevor nun der Wirkstoff sowie das Chemokin hinzugefügt wird, können Vorbereitungen getroffen werden.

Mit diesem System wird die Migration der Zellen nach der Differenzierung in Makrophagen untersucht. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, wirken die Substanzen allerdings nicht gleich stark auf die verschiedenen Zelltypen. So war in dem hier beschriebenen Fall z.B. die Toxizität der Substanzen auf die undifferenzierten THP-1 Zellen größer. Mit diesem Testsystem kann folglich eher die Auswirkung der Substanzen auf die Migration der Makrophagen bestimmt werden, nachdem sie bereits in das Gewebe eingewandert und zu Makrophagen differenziert sind.

Um dieses Assayformat allerdings für einen Screen zu nutzen, sind weitere Optimierungen sinnvoll. Die gemessenen Steigungen sind sehr gering. Um zu einer größeren Steigung zu gelangen, könnte eine Optimierung des Differenzierungsprotokolls sinnvoll sein. So kann z.B. die PMA-Konzentration sowie die Einwirkdauer in der Differenzierung eine große Rolle spielen (Lund et al. 2016, Kohro et al. 2004). Dabei lassen sich z.B. Unterschiede in der Sekretion von Pro-Entzündungscytokinen, TNF und IL-8 feststellen, was auf verschiedene Differenzierungsphasen der Zellen hindeutet. Des Weiteren wird auch eine Erholungsphase der Zellen nach der Differenzierung von bis zu fünf Tagen teilweise als sinnvoll angesehen, in der die Differenzierung abgeschlossen wird und die Zellen sich von dem Stress der Differenzierung erholen können.

Weiterhin kann eine Optimierung der Beschichtung zu einer verbesserten Migration führen. Hierbei wurde nicht wie von Essen BioScience empfohlen eine Fibronektin-Beschichtung genutzt, sondern eine Matrigelbeschichtung. Bei der Beschichtung mit Fibronektin fällt auf, dass dieses in den ersten 24 Stunden noch zu funktionieren scheint, da die undifferenzierten Zellen hier noch eine Migration zeigen. Nach 48 Stunden, also nach Abschluss der Differenzierung bilden sich um die Poren wie in Abbildung 11 beschrieben unebene Strukturen. Die Qualität des Coatings scheint sich insgesamt zu verschlechtern, wodurch keine Migration mehr möglich ist. Hier könnten weitere Versuche zur Untersuchung der Ursache dieser Verschlechterung sinnvoll sein.

Insgesamt kann aufgrund der vorliegenden Daten keine eindeutige Entscheidung getroffen werden, welches der beiden Systeme besser für eine Untersuchung von Inhibitoren geeignet ist.

4.5 Fazit

In dieser Arbeit wurde die Eignung des IncuCyte-Systems für die Untersuchung von Zellmigration und deren Inhibitoren untersucht. Es zeigt sich deutlich, dass das System gut zur Beobachtung der Migration von sowohl Monozyten als auch Makrophagen geeignet ist. Für beide Zelltypen kann ein funktionierendes Assay etabliert werden. Vor allem die kontinuierliche Messung sowie der über lange Zeiträume stabile Gradient sind sehr geeignet für die Untersuchung weiterer Inhibitoren.

4 Diskussion

Weiterhin wurde ein biochemisches Assay mit einem FRET-System geprüft, welches sich als ungeeignet erwies. Zur Bestätigung der Inhibition der SLK auf enzymatischer Ebene sind weitere Tests mit anderen Testsystemen notwendig.

Insgesamt lässt sich in dieser Arbeit der inhibierende Effekt der beiden Substanzen bestätigen. Auf biochemischer Ebene konnte die inhibierende Wirkung nicht bestätigt werden, allerdings zeigt die Untersuchung in dem Migrationsassay einen deutlichen Einfluss auf die Chemotaxis. Die gehemmte Zellmigration ist ein Indikator für die Validierung der SLK als therapeutischen Ansatzpunkt. Die hier getesteten Inhibitoren müssen jedoch, um einen Effekt zu erzielen, in hohen Konzentrationen eingesetzt werden, in denen sie teilweise toxisch auf die Zellen wirken. Bis zum Einsatz in Krankheits- oder Tiermodellen müssten hier also noch deutliche Optimierungen durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

- Alves, J., Goueli, S.A. & Zegzouti, Hicham 2012, "SLK Kinase Assay ", *ADP-Glo™ Kinase Assay Application Notes SER-THR KINASE SERIES: SLK*, , no. Promega.
- Al-Zahrani, K., Baron, K.D. & Sabourin, L.A. 2013, "Ste20-like kinase SLK, at the crossroads: A matter of life and death", *Cell Adhesion & Migration*, vol. 7, no. 1, pp. 1-10.
- Auwerx, J. 1991, "The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation", *Experientia*, vol. 47, no. 1, pp. 22-31.
- Bach, I. 2000, "The LIM domain: regulation by association", *Mechanisms of development*, vol. 91, no. 1–2, pp. 5-17.
- Caron, M., Rodenbrock, A., Roby, P., Bouchard, N., Padrós, J., Paquet, V., Normand, C., Roy, M., Brechler, V. & Beaudet, L. 2006, "Development and Optimization of Kinase Assays using New LANCE Ultra TR-FRET Reagents", *Application Note LANCE Ultra TR-FRET Technology*, .
- Chanput, W., Mes, J.J. & Wichers, H.J. 2014, "THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach", *International immunopharmacology*, vol. 23, no. 1, pp. 37-45.
- Christen, P., Jaussi, R. & Benoit, R. 2016, "Biochemie und Molekularbiologie", *Springer Spektrum*, .
- Chu, H.X., Arumugam, T.V., Gelderblom, M., Magnus, T., Drummond, G.R. & Sobey, C.G. 2014, "Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system", *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 34, no. 9, pp. 1425-1429.
- Cisbio Bioassays 2009, "Product information: Document reference : 62STxPEB rev05", *HTRF® KinEASE™-STK*, .
- Clegg, R.M. 2009, "Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done", *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 33, pp. 1-57.
- Corning Incorporated 2012, "Corning® Matrigel® Matrix Frequently Asked Questions.", .
- Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B. & Dockrell, D.H. 2009, "The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages", *PLoS ONE*, vol. 5, no. 1, pp. e8668.
- Essen BioScience 2016a, "IncuCyte™ Chemotaxis Cell Migration General Protocol", *PROTOCOL IncuCyte ZOOM® Live-Cell Imaging System*, .

- Essen BioScience 2016b, *IncuCyte™ ClearView 96-Well Chemotaxis Plate*. Available: <http://www.essenbioscience.com/en/products/reagents-consumables/incucyte-clearview-96-well-cell-migration-plate/> [2016, 9/11].
- Gryczynski, Z., Gryczynski, I. & Lakowicz, J.R. 2005, "2 - Basics of Fluorescence and FRET" in *Molecular Imaging*, eds. A. PERIASAMY & R.N. DAY, American Physiological Society, San Diego, pp. 21-56.
- Hastie, C.J., McLauchlan, H.J. & Cohen, P. 2006, "Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol", *Nat.Protocols*, vol. 1, no. 2, pp. 968-971.
- Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T. & Kodama, T. 2004, "A Comparison of Differences in the Gene Expression Profiles of Phorbol 12-myristate 13-acetate Differentiated THP-1 Cells and Human Monocyte-derived Macrophage", *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, vol. 11, no. 2, pp. 88-97.
- Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschlager, M. & Dolznig, H. 2013, "In vitro cell migration and invasion assays", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 752, no. 1, pp. 10-24.
- Lund, M.E., To, J., O'Brien, B.A. & Donnelly, S. 2016, "The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus", *Journal of immunological methods*, vol. 430, pp. 64-70.
- Luttmann, W., Bratke, K., Kupper, M. & Myrtek, D. 2014, *Der Experimentator: Immunologie*, Springer Berlin Heidelberg.
- Mittar, D., Paramban, R. & McIntyre, C. 2011, "Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation", *BD Biosciences*, , no. Application Note.
- Moore, K.J., Sheedy, F.J. & Fisher, E.A. 2013, "Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance", *Nat Rev Immunol*, vol. 13, no. 10, pp. 709-721.
- Promega 2015, "CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Instructions for Use of Products G7570, G7571, G7572 and G7573 ", *TECHNICAL BULLETIN*, vol. TB288.
- Quizi, J.L., Baron, K., Al-Zahrani, K., O'Reilly, P., Sriram, R.K., Conway, J., Laurin, A. & Sabourin, L.A. 2013, "SLK-mediated phosphorylation of paxillin is required for focal adhesion turnover and cell migration", *Oncogene*, vol. 32, no. 39, pp. 4656-4663.
- Rink, L., Kruse, A. & Haase, H. 2015, "Immunologie fur Einsteiger", *Springer Spektrum*, .
- Shang, M., Talukdar, H.A., Hofmann, J.J., Niaudet, C., Asl, H.F., Jain, R.K., Rossignoli, A., Cedergren, C., Silveira, A., Gigante, B., Leander, K., de Faire, U., Hamsten, A., Ruusalepp, A., Melander, O., Ivert, T., Michoel, T., Schadt, E.E., Betsholtz, C.,

- Skogsberg, J. & Björkegren, J.L.M. 2014, "Lim Domain Binding 2: A Key Driver of Transendothelial Migration of Leukocytes and Atherosclerosis", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 34, no. 9, pp. 2068-2077.
- Storbeck, C.J., Wagner, S., O'Reilly, P., McKay, M., Parks, R.J., Westphal, H. & Sabourin, L.A. 2009, "The Ldb1 and Ldb2 Transcriptional Cofactors Interact with the Ste20-like Kinase SLK and Regulate Cell Migration", *Molecular biology of the cell*, vol. 20, no. 19, pp. 4174-4182.
- Wang, A.C.C. & Fu, L. 2001, "Fibronectin regulates the activation of THP-1 cells by TGF-1", *Inflammation Research*, vol. 50, no. 3, pp. 142-148.
- World Health Organisation Reviewed June 2016, , *Cardiovascular diseases (CVDs)*.
Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> [2016, August].
- Yoshie, O. & Matsushima, K. 2015, "CCR4 and its ligands: from bench to bedside", *International immunology*, vol. 27, no. 1, pp. 11-20.
- Zamir, E. & Geiger, B. 2001, "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions", *Journal of cell science*, vol. 114, no. 20, pp. 3583.

Anhang

Materialien

THP-1 Zellen	ATCC	ATCC® TIB-202™	
--------------	------	----------------	--

Geräte	IncuCyte	EssenBioscience	
	Megafuge 16R	Thermo Electron LED GmbH	
	HERAsafe HSP 12	Thermo Electron LED GmbH	
	HERAcell 240	Thermo Electron LED GmbH	
	VWB 12 V	VWR	
	EnSpire	PerkinElmer	
	EnVison	PerkinElmer	
	Sceptor	Merck Millipore	
	Echo	Labcyte	
	Microscope IT 400	VWR	
	Pipetboy acu	INTEGRA	
	Pipetman (2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml)	Gilson	

Verbrauchsmaterialien	IncuCyte ClearView 96-well Cell Migration Plate	EssenBioscience	4582
	IncuCyte ClearView 96-well Reservoir Plate	EssenBioscience	4600
	Sceptor Sensors - 60 µm	Merck Millipore	PHCC60050
	VWR Reagent Reservoirs	VWR	89094-664
	Kulturflaschen Cellstar 75 cm2	Greiner	658170
	CELLtiter-Glo	Promega	G7570
	white 384-well plate	Greiner Bio-One	781073
	Zentrifugentubes 50 ml	Greiner Bio-One	227261
	Zentrifugentubes 15 ml	Greiner Bio-One	188271

Serologische Pipetten 5 ml;10 ml; 25 ml; 50 ml	Sarstedt	86.1253.025 86.1254.025 86.1685.001 86.1689.025
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf	0030 120.086
OptiWell-Platte	PerkinElmer	6004290
384-Well Platte	Corning	REF 3824
384-Well Platte	Greiner	REF 784905
Labcyte Platte 384LDV	LabCyte	LP0200
Versiegelungsfolie (96- well Microtiter Plate Sealers)	BioChromato	R80.120.00
Pipettenspitzen (1-200 µl)	VWR	613-0742
Pipettenspitzen (100-1,25 ml)	VWR	613-0738
One Touch™ tips (1-20 µL)	Sorenson Bioscience	10300
One Touch™ tips (1-330 µL)	Sorenson Bioscience	10410

Medien+ Lösungen	Charcoal-stripped FCS	Biochrom GmbH	S3113
	Glutamine	Capricorn	GLN-B
	Dulbecco's PBS (1x), W/O Ca and Mg, w/o Phenol Red	Capricorn	PBS-1A
	Penicillin/Streptomycin (100x)	Capricorn	PS-B
	RPMI 1640	Capricorn	RPMI-HXA
	PMA (CAS 16561-29-8), VE = 5mg	Santa Cruz Biotechnology	sc-3576A
	Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix, *LDEV-Free, 10mL	Corning	354234
	Mercaptoethanol	gibco	21985-023
	MCP-1	Bachem	40.401.910.100
	C5a-Chemokin	PeproTech	300-70
	Human Fibronectin (0.5 mg/ml) 2.5 mg	Cell Guidance Systems Ltd	AP23
	CellTiter-Glo	Promega Corporation Germany	G7573

DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG Germany	200-664-3
NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG Germany	215-185-5
SLK (Human) Recombinant Protein	SignalChem	S11-10G-10
SLK (Human) Recombinant Protein	Abnova	P5640
Ulight	PerkinElmer	TRF 0125-C
LANCE Detection Buffer	PerkinElmer	CR97-100
Europium-anti-phospho-peptide antibody	PerkinElmer	TRF 0210-D
ATP	Sigma-Aldrich	A1852-1VL
ATP	ThermoFischer	R0441
EDTA	Sigma-Aldrich	MFCD00003541
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG Germany	9105.4
MgCl ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG Germany	KK36.2
EGTA	Carl Roth GmbH & Co. KG Germany	3054.2
DTT	Carl Roth GmbH & Co. KG Germany	6908.1
Tween 20	Sigma-Aldrich	9005-64-5
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG Germany	T171.3
BSA	Sigma-Aldrich	MFCD00130384
HTRF KinEASE STK Discovery kit	cisbio Assays	62STOPEB

Software	Prism	GraphPad Software	
	IncuCyte ZOOM 2016A	EssenBioscience	
	IncuCyte ZOOM Plate Map Editor 2016A	EssenBioscience	