

Identifizierung post-translationaler Modifikationen mittels Peptid Mikroarrays

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Sandra Mükusch
aus Darmstadt

2017

Die vorliegende Dissertation wurde von April 2013 bis Januar 2017 unter Leitung von Herrn Dr. habil. Harald Seitz am Fraunhofer Institut für Immunologie und Zelltherapie, Außenstelle Bioanalytik und Bioprozesse, Abteilung: Molekulare und Zelluläre Bioanalytik, Arbeitsgruppe: Biomarker-Identifizierung und Validierung in Potsdam-Golm angefertigt.

1. Gutachter: Dr. habil. H. Seitz

Fraunhofer-Institut für Immunologie und Zelltherapie, Außenstelle Bioanalytik und Bioprozesse (IZI-BB)
Am Mühlenberg 13
14476 Potsdam

Telefon: +49 331 58187-208

Fax: +49 331 58187-119

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Knaus

Institut für Chemie und Biochemie - Biochemie
Freie Universität Berlin
Thielallee 63
14195 Berlin

Telefon: +49-30-838-52935

Fax: +49-30-838-52936

Disputation am 04.07.2017

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere Ich, Sandra Mükusch, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer, als die der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form von mir noch nicht als Prüfungsarbeit eingereicht worden.

Potsdam, 21.Februar 2017

„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf
einem höheren Niveau.“

Enrico Fermi (1901-1954)

Danksagung

Ohne eine Vielzahl an Menschen, wäre es nicht möglich gewesen diese Arbeit anzufertigen. Hierbei gilt ein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Demuth der mich im Institut aufnahm, sowie Dr. Eva Ehrentreich Förster in deren Abteilung die Arbeit angefertigt worden ist. Ohne ihren unerbittlichen Einsatz bei jedweden Problemen, wären die Arbeitsbedingungen deutlich erschwert gewesen. Bei Frau Dr. Knaus möchte ich mich für die Übernahme des Gutachtens, sowie der Betreuung der externen Arbeit bedanken. Dr. Harald Seitz gilt der meiste Dank, er übernahm nicht nur die direkte Betreuung am Institut, sondern war stets offen für Diskussionen und gab mir wegweisende Tipps, wenn es mal nicht weiterging oder ich mich verrannt hatte. Danke für drei Jahre voll des Lernens und Staunens. Meiner restlichen Arbeitsgruppe bzw. den ehemaligen Mitarbeitern danke ich für den Spaß in Labor und Büro, sowie vielen Stunden mit endlosen Diskussionen. Auch die Gruppenausflüge und außer beruflichen Aktivitäten waren eine angenehme Ablenkung zum Laboralltag. Dr. Robert Wellhausen möchte ich hierbei speziell hervorheben, ohne ihn wäre mir das Einarbeiten in die Mikroarrays und den Spotter niemals so gelungen. Neben der Arbeit hattest du stets noch ein offenes Ohr für meine Sorgen, Zweifel und Bedenken. Neben der Arbeitsgruppe gab es noch eine Menge mehr Leute denen ich zu danken habe: Beate Morgenstern, Erik Rümpel, Michaela Schellhase, Katja Uhlig, Andre Lehmann, Dr. Markus von Nickisch-Rosenegk, Sebastian Hoppe und alle die ich nun vergessen habe. Des Weiteren möchte ich bei meiner Familie bedanken, meinen Eltern und Geschwistern die an mich glauben, mich unterstützen und immer für mich da sind, wenn ich sie brauche. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen. Neben der Familie sind vorallem meine Freunde, sei es neu gewonnen oder alte, immer eine Stütze gewesen. Sie sind die, die mich ablenkten, wenn es nötig war, aufbauten, wenn ich am Verzweifeln war, nun zum Ende der Dissertation viel Gejammer ertragen haben und fleißig nach Fehlern in der Arbeit suchten. Ich möchte auch einem weiteren besonderen Menschen danken, Kevin Marnold, der mir vor allem im letzten Jahr stets zur Seite stand, meine Launen ertragen hat und mit dem gemeinsamen Garten, sowie Buddy stets schaffte einen Ort der Entspannung zu generieren und mich von meinen Sorgen und Ängsten zu befreien.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Barmer GEK Gesundheitsreport 2014	5
Abbildung 2 Nozizeption.....	6
Abbildung 3 Schlüsselkomponenten der Nozizeption	8
Abbildung 4 Kinase Dendrogram	9
Abbildung 5 Kristallstruktur der PKA-Ca.	13
Abbildung 6 PKA Aktivierung mittels cAMP	14
Abbildung 7 cAMP aktivierte Signalwege.....	15
Abbildung 8 Schematische Darstellung des TRPVI	19
Abbildung 9 Überlagerung der Kristallstrukturen der Opioidrezeptoren	20
Abbildung 10 Regulation von Adenylylcyclasen.....	24
Abbildung 11 Kategorien von Mikroarrays	26
Abbildung 12 Assay Varianten mit Beads	30
Abbildung 13 Schematische Darstellung des Semi-Dry Blotting Verfahrens	45
Abbildung 14 Schematische Darstellung einer HPTLC-IS	46
Abbildung 15 Funktionsweise des BioPlex3D	51
Abbildung 16 Single vs. MultiPlex Bead Assay	52
Abbildung 17 <i>in vitro</i> Phosphorylierung von Peptid-Beads	53
Abbildung 18 Aufbau des Peptid Mikroarrays	55
Abbildung 19 Automatische Hybridisierstation zur Slideinkubation	56
Abbildung 20 <i>in vitro</i> Phosphorylierung von Peptiden auf Peptid Mikroarrays	57
Abbildung 21 Peptidaufbau	60
Abbildung 22 Agarosegel vom Restriktionsverdau des Plasmides pET15b_murine His ₆ -PKA-Ca mit <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	63
Abbildung 23 SDS-PAGE und WesternBlot der Expression der mPKA-Ca zu verschiedenen Zeitpunkten	64
Abbildung 24 SDS-PAGE der Aufreinigung der mPKA-Ca.....	65
Abbildung 25 WesternBlot des Aktivitätsnachweises der mPKA-Ca mit wt-CREB.	66
Abbildung 26 Immunologische Nachweis von Peptiden mittels Dünnschichtchromatographie	69
Abbildung 27 Semi-Quantitative Analyse eines Peptidgemisches mittels DC gekoppelt mit einem Immunoassay	70
Abbildung 28 DotBlot zur Detektion phosphorylierter Peptide	71
Abbildung 29 Tropfenabriss beim Dispensieren von Peptiden mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften.....	75
Abbildung 30 Bestimmung der einzusetzenden Antikörperkonzentration auf Peptid Mikroarrays	76
Abbildung 31 Fluoreszenzaufnahme des Spotpatterns eines Peptid Mikroarrays nach der Inkubation mit verschiedenen Primärantikörpern	79

Abbildung 32 Balkendiagramm zur Spezifität und Affinität des anti-pPKA Antikörpers in Abhängigkeit zu der Position des Phosphorylungsmotives	80
Abbildung 33 Balkendiagramm zum Einfluss des PEG-Linkers auf die Bindung des anti-pPKA Antikörpers	81
Abbildung 34 Fluoreszenzaufnahme der Phosphorylierung von Peptiden auf Peptid Mikroarrays durch die mPKA-C α	82
Abbildung 35 Balkendiagramm zur Bindung des anti-pPKA Antikörpers an die Negativkontrolle nach Kinaseinkubation	84
Abbildung 36 Mikroskopaufnahmen der HEK293 Zellen vor und nach 50 μ M Forskolin Stimulus mit 50 μ M IBMX	87
Abbildung 37 BCA-Standardreihe zur Bestimmung der Lysatkonzentration.	87
Abbildung 38 WesternBlot stimulierter Zelllysate von HEK293 Zellen	88
Abbildung 39 DotBlot zum Nachweis von aktiven Kinasen in stimulierten Zelllysate	90
Abbildung 40 Fluoreszenzaufnahmen einer Versuchsreihe eines Kinaseassays auf Peptid Mikroarrays	92
Abbildung 41 Scatterplot der Peptid Mikroarray Daten zweier Slides eines Batches nach anti-V5 Inkubation zur Bestimmung der Interslide Varianz.....	93
Abbildung 42 Normalisierte Daten des Kinaseassays zur Targetidentifizierung im Schmerzkontext... ..	95
Abbildung 43 Phosphorylierung von Peptiden mittels Zelllysate auf Peptid Mikroarrays	96
Abbildung 44 Balkendiagramm der Inhibition der mPKA-C α mittels PKI und H89 auf Peptid Mikroarrays	98
Abbildung 45 Balkendiagramm zur Kopplungskontrolle der Peptide am BioPlex3D	100
Abbildung 46 Verifikation der Peptid Mikroarraydaten und Kinetik mittels BioPlex3D	101
Abbildung 47 Hypothetisches Interaktionsmodell TRPV1, ARMS und PKA	104
Abbildung 48 Zeitabhängige Phosphorylierung von ARMS Peptiden mit Argininmotiven	106
Abbildung 49 Zeitabhängige Phosphorylierung von ARMS Peptiden mit Lysinmotiven	107
Abbildung 50 Schematische Darstellung zum Nachweis einer Phosphorylierung mit ATP- γ -S	110
Abbildung 51 Strukturformel γ -(2-Azidoethyl)-ATP	111
Abbildung 52 Schematische Darstellung der SPACC Reaktion	111
Abbildung 53 Fluoreszenzaufnahmen von Peptid Mikroarrays nach der Phosphorylierung von Peptiden mittels γ -(2-Azidoethyl)-ATP	112
Abbildung 54 Schematische Darstellung zur Detektion von phosphorylierten Peptiden mit neuartigen Phospho-Threonin Binder mit Hilfe des BioPlex3D	113
Abbildung 55 Balkendiagramm der Spezifität neuartiger Phospho Threonin Binder	114
Abbildung 56 Balkendiagramm der Sequenzabhängigkeit neuartiger phospho-spezifischer Binder ..	115
Abbildung 57 Peptidsequenzalignment der identifizierten Targetsequenzen	117
Abbildung 58 Projektverlauf der Identifizierung potentieller PKA-C α Phosphorylierungsstellen	125
Abbildung 59 Sequenzalignment ARMS human und ARMS Ratte	127
Abbildung 60 Zusammenfassung bekannter und neuer Phosphorylierungsstellen von ARMS.....	128

Abbildung 61 Fluoreszenzaufnahme der Expression von ARMS-WT und TRPVI-YFP.....	129
Abbildung 62 Sequenzalignment AC VIII (AS 599-623).....	134
Abbildung 63 Fluoreszenzaufnahmen der Co-Transfektion von ARMS Mutanten und TRPVI-YFP ..	163
Abbildung 64 DotBlot zur Bestimmung des Detektionslimits von phosphoryliertem Peptid	164

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Materialien	31
Tabelle 2 Chemikalien	31
Tabelle 3 Geräte	32
Tabelle 4 Software	33
Tabelle 5 6x CCE Puffer	34
Tabelle 6 5x SDS-Laufpuffer	34
Tabelle 7 Comassiefärbelösung für Polyacrylamidgele	34
Tabelle 8 Blotting Puffer für WesternBlot	34
Tabelle 9 10x TA Puffer	34
Tabelle 10 10x PBS (pH 7,2-7,4)	34
Tabelle 11 PBS+0,05 % Tween-20 (PBST)	35
Tabelle 12 10x PKA Puffer, pH 7,5	35
Tabelle 13 HPTLC Laufpuffer	35
Tabelle 14 Ninhydrin Färbelösung	35
Tabelle 15 10x TBE Puffer, pH 8,3	35
Tabelle 16 Lysepuffer IMAC	35
Tabelle 17 Waschpuffer IMAC	35
Tabelle 18 Elutionspuffer IMAC	36
Tabelle 19 Kulturmedium HEK293	36
Tabelle 20 Auftaumedium HEK293	36
Tabelle 21 Einfriermedium HEK293	36
Tabelle 22 Kulturmedium flüssig 1 Liter (2-YT), <i>E. coli</i>	36
Tabelle 23 Kulturmedium fest (LB-Agarplatten), <i>E. coli</i> pH 7,5	36
Tabelle 24 Verwendete Bakterienstämme	37
Tabelle 25 Verwendetes Plasmid	37
Tabelle 26 Verwendete Zelllinie	37
Tabelle 27 Primärantikörper	38
Tabelle 28 Sekundärantikörper	38
Tabelle 29 Restriktionsverdau	40
Tabelle 30 Zusammensetzung Trenngel einer SDS-PAGE (Volumen für 6 Gele)	42
Tabelle 31 Zusammensetzung Sammelgel einer SDS-PAGE (Volumen für 6 Gele)	42
Tabelle 32 <i>in vitro</i> Phosphorylierung von wt-CREB in Lösung zum Nachweis der Aktivität der mPKA- α	43
Tabelle 33 <i>in vitro</i> Phosphorylierung von Peptiden in Lösung zum Nachweis der Aktivität der mPKA- α	43
Tabelle 34 Transfektionsansatz	49
Tabelle 35 Targetproteine im Schmerzkontext	59

Tabelle 36 Versuchsaufbau zur Analyse des anti-pPKA Antikörpers mittels unterschiedlicher Plattformen	72
Tabelle 37 anti-pPKA Antikörpercharakterisierung mittels unterschiedlicher Methoden	73
Tabelle 38 Peptide zur Optimierung des Abstandes des Phosphorylierungsmotives zur Oberfläche..	78
Tabelle 39 MFI-Daten zur Analyse der Phosphorylierung der mPKA-C α in Abhängigkeit zum Phosphorylierungsmotiv	83
Tabelle 40 Intraslide Reproduzierbarkeit vor und nach einem Kinaseassay	85
Tabelle 41 Pearson R bei der Gegenüberstellung rekombinanter mPKA-C α (konzentrationsnormiert) und dem Verwenden einer definierten spezifischen Aktivität der mPKA-C α	94
Tabelle 42 Normalisierte MFI-Werte der veränderten Peptidsignale nach Inkubation mit der mPKA-C α und Zelllysat.....	97
Tabelle 43 Peptidsequenzen die zur Verifikation am BioPlex3D vermessen wurden.....	99
Tabelle 44 <i>vmax</i> 1/2 der potentiellen mPKA-C α Targetsites	102
Tabelle 45 Vergleichbarkeit Peptid Mikroarray und BioPlex3D.....	103
Tabelle 46 Potentielle Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α bei ARMS, Ratte	105
Tabelle 47 Peptide mit phosphoryliertem Threonin zum Testen von phospho Threonin spezifischen Bindern	114
Tabelle 48 Zuordnung der PeptidIDs zu Phosphorylierungsstellen innerhalb der Proteinsequenz....	124
Tabelle 49 Zusammenfassung potentieller Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α bei ARMS	126
Tabelle 50 Identifizierte Phosphorylierungsstelle TRPVI	131
Tabelle 51 TRPVI Phosphosites mit Erkennungsmotiv.....	131
Tabelle 52 Phosphorylierungsstellen der Adenylylcyclasen	133
Tabelle 53 Peptide zur Analyse des Einflusses von physiko-chemischen Eigenschaften auf das Spotten	157
Tabelle 54 Peptide mit potentiellen Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin Kinasen.....	157
Tabelle 55 Peptide zur Charakterisierung des anti-pPKA Antikörpers.....	162

Abkürzungsverzeichnis

Im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgeführt sind physikalische Größen und dem Duden nach gebräuchliche Abkürzungen

AC	Adenylylcyclasen
AKAPS	<i>A kinase anchoring proteins</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ARMS	<i>Ankyrin repeat-rich membrane spanning protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosin Monophosphat
CREB	Camp Response Binding Element
DAG	Diacylglycerol
dH₂O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOR	δ-Rezeptoren
FKS	Fötale Kälber Serum
FSK	Forskolin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guanin Exchange Faktor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>
HPTLC	Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IP₃	Inositoltriphosphat
KIDINS220	<i>Kinase-D- interacting substrate of 220 kDa</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MOR	μ-Rezeptoren
M-PER	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
mPKA-Cα	murine Protein Kinase A Katalytische Untereinheit α
pCREB	phosphoryliertes CREB
PIP₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
p-Peptid	phosphoryliertes Peptid
PKI	Proteinkinase Inhibitor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SNR	Signal zu Rauschen Verhältnis
SPAAC	<i>Strain Promoted Azid-Alkyne Click-Chemie</i>
Thr	Threonin
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid I
wt-CREB	Wildtyp CREB

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG.....	4
1.1 Schmerz.....	4
1.2 Nozizeption.....	6
1.3 Proteinkinasen.....	8
1.4 cAMP-abhängige Proteinkinase A	10
1.4.1 Aufbau und Regulation der PKA	10
1.4.2 Aufbau und Funktion der katalytischen Untereinheit C α der PKA (PKA-C α)	12
1.4.3 Stimulierung des PKA Signalweges.....	13
1.4.4 Potentielle Downstream Targets der PKA-C α in der Nozizeption	16
1.5 Multiplex Methoden zur Analyse von post-translationalen Modifikationen auf Peptidbasis ..	25
1.5.1 Mikroarrays	25
1.5.2 Bead basierte Systeme	29
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Chemikalien	31
2.1.2 Geräte	32
2.1.3 Software.....	33
2.1.4 Puffer	34
2.1.5 Medien.....	36
2.1.6 Zelllinien, Stämme, Plasmide	37
2.1.7 Antikörper	38
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.1 Plasmidpräparation aus <i>BL21(De3)+pLys</i>	39
2.3 Biochemische Methoden.....	40
2.3.1 Expression und Aufreinigung der murinen PKA-C α (mPKA-C α).....	40
2.3.2 Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS PAGE)	42

2.3.3	Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bicinchoninsäure (BCA)	43
2.3.4	Aktivitätskontrolle der mPKA-C α	43
2.3.5	WesternBlot	44
2.3.6	Methoden zur Detektion phosphorylierter Peptide	46
2.4	Zellkultur Methoden	47
2.4.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen	47
2.4.2	Kultivierung der Zellen	48
2.4.3	Stimulierung des cAMP-Signalweges bei HEK293 Zellen	48
2.4.4	Transiente Zelltransfektion und Zellfärbung	49
2.5	Methoden für <i>in vitro</i> Multiplexanalysen	50
2.5.1	Bead basierte Peptidanalyse mit Hilfe des BioPlex3D	50
2.5.2	Peptid Mikroarrays	54
2.6	Targetproteine und Peptiddesign	58
2.6.1	Auswahl an Targetproteinen im Schmerzkontext	58
2.6.2	Peptid Design	59
3	ERGEBNISSE	61
3.1	Aufreinigung und Aktivitätskontrolle der rek. mPKA-Cα	62
3.1.1	Plasmidpräparation pET15b- murine His ₆ -PKA-C α (pET15b PKA Cat)	62
3.1.2	Aufreinigung der mPKA-C α	63
3.1.3	Aktivitätsnachweis der mPKA-C α	65
3.2	Überprüfung der Assaykomponenten und Etablierung des Peptid Mikroarrays	67
3.2.1	Hochleistungsdünnschichtchromatographie zum Nachweis phosphorylierter Peptide	67
3.2.2	DotBlot zum Nachweis der Phosphorylierung an Peptiden	70
3.2.3	Validierung des anti-pPKA Antikörpers	72
3.2.4	Etablierung eines Kinaseassays auf Multiplexing Plattformen	74
3.3	Stimulierung des PKA Signalweges mittels Forskolin in HEK293 Zellen	86
3.3.1	Stimulierung der HEK293 Zellen nach Forskolin Stimulierung	86
3.3.2	Phosphorylierung von CREB mit Zellysat von stimulierten Zellen	89
3.4	Durchführen eines Kinaseassays mit potentiellen Targets des Schmerzkontextes auf Peptid Mikroarrays	90
3.4.1	Reproduzierbarkeit und Arrayqualität	91
3.4.2	Phosphorylierung von Peptiden mit rekombinanter PKA und Zellextrakt	93
3.4.3	Inhibition der Phosphorylierung durch PKI und H89	97

3.5	Verifikation mittels BioPlex3D	99
3.5.1	Verifikation der potentiellen mPKA-C α Targets	100
3.5.2	Screening von potentiellen Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α die die Interaktion von TRPVI/ARMS aus Ratte beeinflussen.....	103
3.6	Alternative Nachweismöglichkeiten von Phosphorylierungen	108
3.6.1	ATP-Analoga	109
3.6.2	Phospho Threonin spezifische Binder	112
4	DISKUSSION	116
4.1	Antikörpervalidierung	116
4.2	Alternative Nachweisttechnologien	118
4.2.1	ATP-Analoga	118
4.2.2	Phospho-Threonin Binder.....	119
4.3	Optimierung und Etablierung des Assays	120
4.3.1	Immuno-TLC und DotBlot zum Nachweis phosphorylierter Peptide.....	120
4.3.2	Kinaseassay Etablierung auf Multiplexing Plattformen.....	121
4.4	Identifizierung von potentiellen Phosphorylierungsstellen schmerzrelevanter Targets	123
4.4.1	ARMS.....	125
4.4.2	TRPVI.....	130
4.4.3	Opioidrezeptoren	132
4.4.4	Adenylylcyclasen	133
4.5	Ausblick	135
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	136
6	SUMMARY	137
7	LITERATURVERZEICHNIS	138
8	LEBENS LAUF	153
9	PUBLIKATIONEN	156
10	ANHANG	157

1 Einleitung

Eukaryoten unterliegen einem engmaschig regulierten Netz an Signalkaskaden. Zu Beginn der Entschlüsselung des humanen Genoms 1960 wurde angenommen, dass das humane Genom ca. 2 Millionen Protein codierende Sequenzen enthält. Nach Vollendung des humanen Genom Projektes im Jahr 2004 bestand der Katalog aus 24.500 potentiell Protein codierenden Sequenzen (Human Genome Sequencing 2004, Clamp, Fry *et al.* 2007). Bis zum heutigen Zeitpunkt sank die Zahl der bestätigten Protein codierenden Gensequenzen auf ca. 19.000 (Ezkurdia, Juan *et al.* 2014). Während das Genom der Zellen statisch ist, unterliegt das Proteom starken Änderungen. Das Proteom ist höchst variabel, variiert sowohl von Zelle zu Zelle und zwischen Geweben, als auch tageszeit- und ressourcen-abhängig. Die Vielzahl unterschiedlicher Splicevarianten und chemischer post-translationaler Modifikationen macht es möglich ein komplexes und gleichzeitig spezifisches Signalosom für eine Zelle zu einem spezifischen Zeitpunkt aufzubauen. Manche Mutationen im Genom führen aufgrund des statischen genetischen Codes, wobei je drei Basen für eine bestimmte Aminosäure codieren, zu keinem Effekt. Andere wiederum können zu einer Verschiebung des Leserasters oder zum Einbau einer anderen Aminosäure führen. Der Einbau einer anderen Aminosäure in ein Protein, kann einen Funktionsverlust oder veränderte Bindeeigenschaften zur Folge haben und somit ganze Signalkaskaden verändern. Die Änderung der Signalkaskaden kann weitreichende Auswirkungen haben, beispielsweise die Entstehung von Krankheiten wie Krebs, chronische Schmerzen, Rheuma etc. (Cohen 2001, Cohen 2002).

1.1 Schmerz

Laut der Definition der *International Association for the Study of Pain* ist Schmerz definiert als „ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit aktuellen oder potentiellen Gewebeschädigungen verknüpft ist oder mit Begriffen solcher Schädigungen beschrieben wird“ (Pain 2002). Die molekulare Weiterleitung und Verarbeitung von Schmerz wird als Nozizeption bezeichnet (abgeleitet aus dem

lat. nocere: schädigen) und dient im Körper als Warn- und Schutzsignal bei Verletzungen, z.B. durch das Einleiten direkter Schutzreflexe, wie dem Zurückziehen der Hand bei einer heißen Herdplatte (Giron, Griffis *et al.* 2015). Der Körper verfügt über ein so genanntes Schmerzgedächtnis, wodurch chronische Schmerzen entstehen können wie z.B. bei rheumatischen Erkrankungen, Krebs, Phantomschmerz nach Amputationen oder auch Migräne (Dr. med. Wolf Diemer, Sandkühler 2001).

In Deutschland leiden zurzeit 12 bis 15 Millionen Menschen unter chronischen Schmerzen. Dies entspricht fast einem Viertel der Bevölkerung, wobei die Schmerzen bei vier bis fünf Millionen zu starken Beeinträchtigungen im Leben führen (Schmerzliga 2013). Einem Gesundheitsbericht der Barmer GEK zu Folge nahm die Anzahl der Patienten mit chronischen Schmerzen von 2005 bis 2014 stetig zu (Abbildung 1) (T. G. Grobe 2016). Wie in der Abbildung zu sehen ist, fallen mehr als die Hälfte der mit Schmerz diagnostizierten Patienten (R52) in die beiden Diagnosekategorien der chronischen Schmerzen zu (ICD-Diagnose Code R52,1 „chronischer unbeeinflussbarer Schmerz“, sowie R52,2 „sonstiger chronischer Schmerz“).

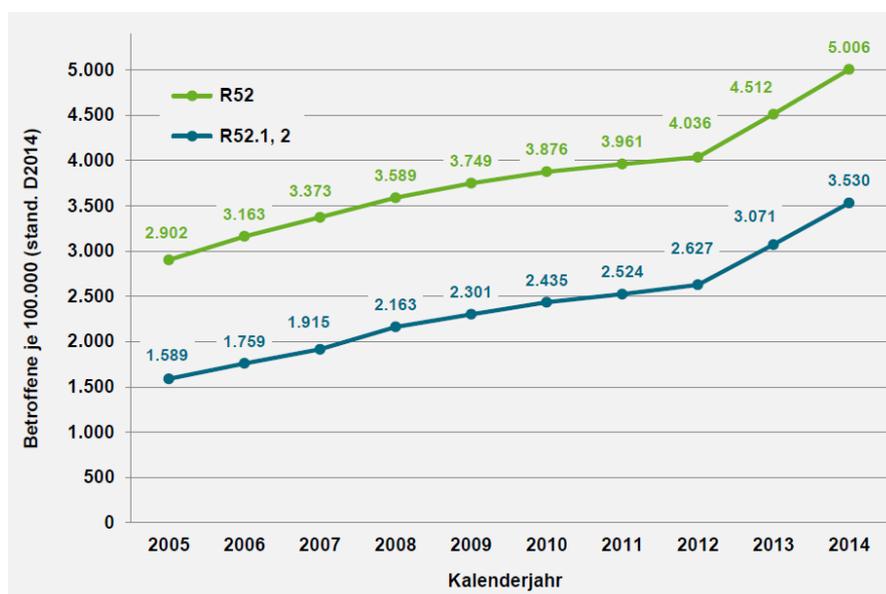


Abbildung 1 Barmer GEK Gesundheitsreport 2014

R52 ist die Diagnose Schmerz laut ICD, wobei R52 1,2 als chronische einzuordnen Schmerzen gelten. Seit dem Jahre 2005 ist ein stetiger Anstieg sowohl der generellen Schmerzdiagnose als auch der chronischen Schmerzdiagnosen R52 1,2 zu erkennen.

Chronische Schmerzen gelten als eine der Volkskrankheiten, deren genaue Ursachen auf molekularer Ebene bisher wenig untersucht sind (Giron, Griffis *et al.* 2015,

Bavencoffe, Li *et al.* 2016). Die Behandlung von chronischen Schmerzen verursacht hohe Kosten für das Gesundheitssystem, lange Krankheitszeiten und damit verbunden hohe Kosten für die Allgemeinheit (Devesa, Ferrándiz-Huertas *et al.* 2014, Giron, Griffis *et al.* 2015, T. G. Grobe 2016).

1.2 Nozizeption

Die neuronale Verschaltung von Schmerzen wird auch Nozizeption genannt. Dies beinhaltet sowohl die Sensitivierung von äußeren sowie inneren Nozirezeptoren bspw. *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1), als auch die Weiterleitung der Signale über Nervenfasern zum Rückenmark bzw. dem Hinterganglion (DRG Neurone) (Caterina, Schumacher *et al.* 1997).

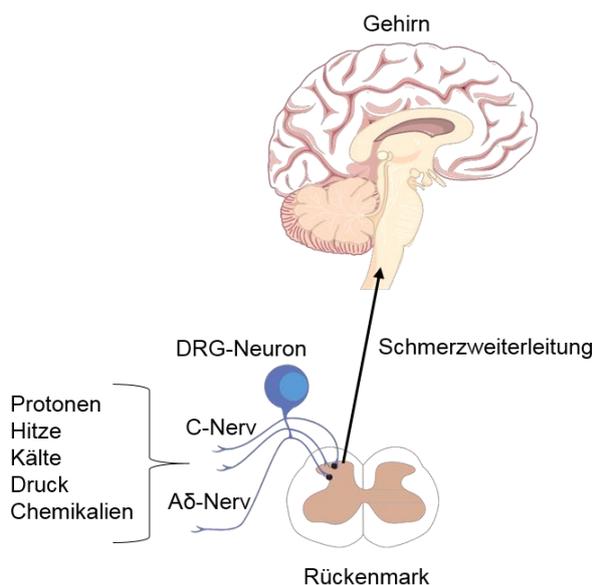


Abbildung 2 Nozizeption

Externe Stimuli wie z.B. Hitze aktivieren primäre Nozizeptoren. Dies sind freie Nervenenden der C- und A δ -Nerven, welche für die Signalweiterleitung zu DRG-Neuronen im Rückenmark sorgen. Nach der Verschaltung im Rückenmark folgt die Weiterleitung des Signals in das Zentrale Nervensystem (ZNS). (Abbildung modifiziert nach (Kuner 2010))

Die Erregung von freien Nervenenden der A δ und C-Nerven, welche, mit Ausnahme des Zentralen Nervensystems (ZNS), in allen Organsystemen des Menschen ausgebildet werden, kann durch Temperatur, Druck aber auch chemisch beispielsweise in Folge von Entzündungen erfolgen (Abbildung 2). Die Nerven enden im Hinterhorn des Rückenmarks, wo sie bei starker Erregung für ein massives Ausschütten von

Glutamat, einem Neurotransmitter, in den synaptischen Spalt sorgen. An der post-synaptischen Membran sorgt dies für die Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren und daraus resultierend einem Kalzium-Anstieg in der Zelle, durch den eine Reihe von Signalwegen aktiviert werden. Diese führen zu Langzeitveränderungen der Zelleigenschaften, wie z.B. die Änderung der Sensitivierungsstärke des Neurons (*long term potentiation* (LTP) (Dr. med. Wolf Diemer 1998, Sandkühler 2001, Petrenko, Yamakura *et al.* 2003, Patapoutian, Tate *et al.* 2009, Schmerzliga 2013, Giron, Griffis *et al.* 2015). Für die Ausbildung von neuropathischen oder inflammatorischen Schmerzen gehört eine Steigerung der Empfindlichkeit der nozizeptiven Neurone (Shapiro, Singer *et al.* 2016).

Bisher ist wenig darüber bekannt, welche Signalwege eine zentrale Rolle bei der Signalverarbeitung und bei der Ausbildung von chronischen Schmerzen spielen. Eine Schlüsselfunktion übernimmt das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch cAMP abhängige Proteinkinasen wie z.B. die Proteinkinase A und deren potentiellen Targets bzw. potentielle Phosphorylierungsstellen in den Vordergrund der Schmerzforschung rücken (Abbildung 3) (Malmberg, Brandon *et al.* 1997, Aley und Levine 1999, Hu, Song *et al.* 2001, Kawasaki, Kohno *et al.* 2004, Hucho und Levine 2007, Isensee, Diskar *et al.* 2014).

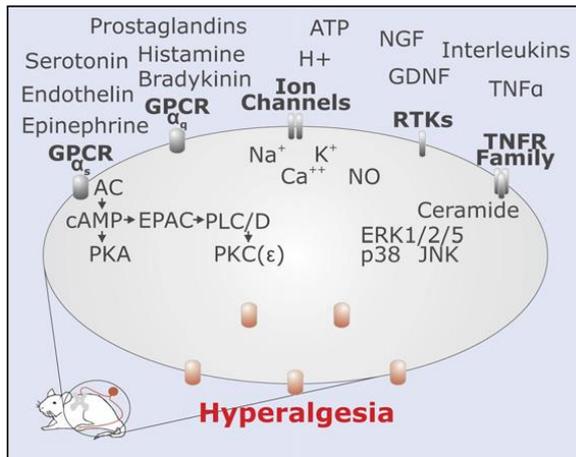


Abbildung 3 Schlüsselkomponenten der Nozizeption

Eine Vielzahl extrazellulärer Botenstoffe kann zur Aktivierung von unterschiedlichen Membranrezeptoren wie z.B. GPCRs, Ionenkanäle, Rezeptortyrosinkinasen (RTK) führen. Durch deren Aktivierung werden intrazelluläre Signalkaskaden angesteuert wie der cAMP-Signalweg. Es erfolgt eine Aktivierung der Proteinkinasen A oder auch PKC-ε, wobei deren downstream Targets bisher weitestgehend unbekannt sind. (Abbildung aus Hucho *et al.* 2007)

1.3 Proteinkinasen

Ungefähr 1,7 % der Gene des humanen Genoms codieren für Proteinkinasen, wobei ca. 30 % des Proteoms kovalente Phosphatgruppen als post-translationale Modifikation beinhalten (Cohen 2001, Manning, Whyte *et al.* 2002).

Proteinkinasen sind enzymatisch aktive Proteine, welche ein aktives Zentrum besitzen. Sie sind in der Lage, das γ-Phosphat von Adenosintriphosphat (ATP) auf ein Zielprotein (Target) zu übertragen und dieses dadurch chemisch zu modifizieren. Hierfür werden meist freie Hydroxylgruppen der Aminosäuren als Phosphatgruppenakzeptoren genutzt wie sie z.B. an Serinen, Threoninen oder Tyrosinen vorhanden sind.

Proteinkinasen werden auf Grund ihrer Targetspezifität in Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen unterschieden. Es gibt aber auch duale Proteinkinasen wie Kinasen des MAP-Signalweges, welche sowohl Serine/Threonine als auch Tyrosine phosphorylieren können (Nowacka, Baumgartner *et al.* 2016). Gebräuchlich ist die Einteilung der Kinasen anhand ihrer Sequenzhomologie innerhalb der katalytischen Domänen, sowie ihrer Targetspezifität (Abbildung 4) (Manning, Whyte *et al.* 2002).

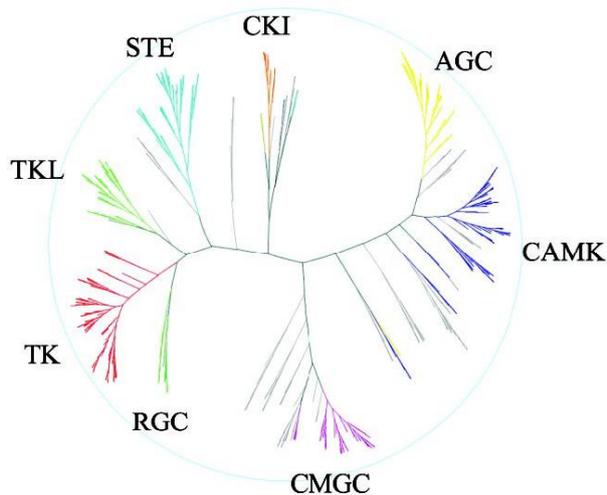


Abbildung 4 Kinase Dendrogram

Kinasen werden auf Grund ihrer Targetspezifität als auch ihrer Sequenzhomologie innerhalb der katalytischen Domäne in Gruppen eingeteilt. Umso näher die Kinasen bei einander liegen desto höher ist die Sequenzhomologie. In der Grafik sind acht Hauptgruppen (Tyrosin like Kinasen (TKL), STE, Zellkinase I (CKI), Calmodulin/Kalzium regulierte Kinasen(CAMK), Tyrosin Kinasen (TK), Rezeptor Guanylyl Cyclasen (RGC), CGMC) dargestellt, denen verschiedenen Kinasen zugeordnet werden.

Der CMGC Hauptgruppe werden beispielweise MAPK, sowie Kinasen der Zellzyklus Kontrolle zugeteilt, während der TK und TKL Gruppe die Tyrosinkinase, bzw. die Tyrosin-like Kinasen zugeordnet werden. Die AGC Gruppe wird benannt nach den Kinasen PKA, PKC und PKG, die dort zugeordnet sind. RGC steht für Rezeptor Guanylyl Cyclasen, welche den Second Messenger cGMP synthetisieren. CK1 (Zellkinase 1) ist eine eher kleine Gruppe, genau wie STE. CAMK steht für Calmodulin/Kalzium regulierte Kinase Gruppe.

Kinasen können als Monomere vorliegen aber auch aus mehreren Untereinheiten (katalytischen und regulatorischen Untereinheiten) bestehen. Die regulatorischen Untereinheiten verhindern eine unregulierte Aktivität der Kinase.

Proteinkinase sind in der Lage durch den Übertrag von Phosphatgruppen in die regulatorischen Zellprozesse einzugreifen. Zum Beispiel kommt es durch die Änderung des Phosphorylierungsgrades bestimmter Enzyme zu einer veränderten Aktivität. Des Weiteren können Phosphorylierungen zu einer Dimerbildung von Rezeptoren in der Zellmembran und dadurch zum Einschalten spezifischer Signalkaskaden führen. Ein Ausfall oder eine Entartung einzelner Schlüsselkomponenten wie Kinasen kann weitreichende Folgen haben. Neben den positiven Änderungen gibt es auch negative Einflüsse von Phosphorylierungen. Durch

Hyperphosphorylierungen von Enzymen, die maßgeblich am Zellwachstum oder der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, kommt es zu einer Entartung der Zelle und massiven Wachstum (Saloustros, Salpea *et al.* 2016, Shi, Zhu *et al.* 2016, Sun, Wang *et al.* 2016, Sun, Li *et al.* 2016). Post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierungen sind meist zeitlich begrenzt und revertierbar. Sogenannte Proteinphosphatasen dephosphorylieren Kinasetargets. Signalkaskaden sind ein engmaschig reguliertes Netzwerk. Proteinkinasen bzw. deren Targetidentifizierung gelten als eines der größten Forschungsbereiche in der Pharmaindustrie. Ein sehr gut beschriebener Signalweg ist der kanonische Proteinkinase A Signalweg (S.S. Taylor*; J. Yang 2004).

1.4 cAMP-abhängige Proteinkinase A

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) gilt als eine der am besten charakterisierten Kinasen. Sie wird auf Grund ihrer Targetspezifität und Sequenzhomologie in die Familie der AGC-Kinasen eingruppiert. Die Entdeckung erfolgte im Jahr 1968 von Walsh *et al.*, welcher als erstes die Kinase aufreinigete (Walsh, Perkins *et al.* 1968). In den folgenden Jahren kam es zur Sequenzierung durch Shoji im Jahr 1979, der Klonierung im Jahr 1989 und der Herstellung großer Mengen PKA aus *E. coli* Kulturen (Shoji, Titani *et al.* 1979, Slice und Taylor 1989). Die aktive PKA ist in Genregulationsprozesse durch die Phosphorylierung des *C-reactive Binding Protein* (CREB) an Ser133 des Proteins eingebunden. Des Weiteren ist bekannt, dass die PKA eine Rolle in Apoptose (Moujalled, Weston *et al.* 2011, Keshwani, Kanter *et al.* 2015), Krebs (Sapio, Gallo *et al.* 2016, Yu, Yang *et al.* 2016), Glycogenstoffwechsel (Zois und Harris 2016) und Schmerz (Malmberg, Brandon *et al.* 1997, Aley und Levine 1999, Paolillo, Feliciello *et al.* 1999, Schnizler, Shutov *et al.* 2008, Patapoutian, Tate *et al.* 2009, Isensee, Diskar *et al.* 2014, Zhou, Wang *et al.* 2015) spielt.

1.4.1 Aufbau und Regulation der PKA

Die Proteinkinase A besteht in ihrer inaktiven Form aus einem heterotetrameren Holoenzymkomplex zweier regulatorischer Untereinheiten und zweier katalytischer Untereinheiten. Es sind bis heute vier regulatorische Untereinheiten (RI α , RI β , RII α und RII β) und vier katalytische Untereinheiten (C α , C β , C γ , PrKX)

identifiziert worden. Die PKA wird ubiquitär exprimiert, wobei durch eine spezifische Zusammensetzung aus regulatorischen und katalytischen Subtypen eine gewebsspezifische Expression erfolgen kann (Skalhegg 1997). Die regulatorischen Untereinheiten übernehmen dabei die Funktion der Inaktivierung der katalytischen Untereinheit, als auch die Lokalisation der PKA. N-Terminal beinhalten sie eine Dimerisierungsdomäne, eine Auto-Phosphorylierungsstelle und zwei Bindestellen für die katalytische Untereinheit. Die regulatorischen Untereinheiten können durch die Bindung von *A kinase anchoring proteins* (AKAPS) die PKA an spezifische Orte transportieren und so ein zielgerichtetes Phosphorylieren von Signalmolekülen durch die aktive katalytische Untereinheit hervorrufen (S.S. Taylor*; J. Yang 2004). Es werden zwei Formen des PKA Holoenzym unterschieden, diese sind benannt nach den jeweiligen regulatorischen Untereinheiten: TypI PKA (RI α und RI β) und TypII PKA (RII α und RII β). TypI und TypII unterscheiden sich sowohl in ihrem Expressionsmuster als auch in ihren biochemischen Eigenschaften. TypI wird hauptsächlich cytoplasmatisch exprimiert und reagiert sensitiver auf cAMP als TypII (Corbin, Soderling *et al.* 1973, Corbin, Keely *et al.* 1975). Bei der Co-Expression von Cal mit entweder der R-II α oder RI α konnte bei Aktivitätsmessungen mit Zellysat festgestellt werden, dass bei der Co-Expression mit der RI α 100 nM cAMP für die Aktivierung der Cal ausreichen, während 500-5000 nM cAMP notwendig waren bei der Co-Expression mit RII α (Stakkestad, Larsen *et al.* 2011). PKA TypII liegt überwiegend verankert an Organellen vor (Taylor, Buechler *et al.* 1990). Die Aktivierung der PKA Subtypen erfolgt überwiegend durch die unterschiedliche Sensitivität (Affinität) gegenüber cAMP. Während TypI PKA schon durch schwache cAMP Anstiege aktiviert wird, wird TypII erst bei starken, andauernden cAMP Anstieg aktiv (Feliciello, Gottesman *et al.* 2001). Die Aktivierung erfolgt durch den intrazellulären Anstieg von cAMP und der daraus resultierenden Dissoziation des Holoenzym. Hierbei binden vier cAMP Moleküle an die regulatorischen Untereinheiten und führen so zur Dissoziation des Dimers der regulatorischen Untereinheiten und zur Freisetzung der katalytischen Untereinheiten (Corbin, Soderling *et al.* 1973, Corbin, Keely *et al.* 1975, Hofmann, Beavo *et al.* 1975). Die katalytischen Untereinheiten besitzen die enzymatische Aktivität und können im aktiven Zustand Targetproteine sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern phosphorylieren.

1.4.2 Aufbau und Funktion der katalytischen Untereinheit C α der PKA (PKA-C α)

Zurzeit sind vier Isoformen der katalytischen Untereinheit der PKA bekannt: C α , welche die am häufigsten exprimierte Form ist und in fast allen Geweben vorkommt; C γ wird nur im Hoden exprimiert; PrKX eine neu identifizierte Untereinheit und C β die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden (Uhler, Chrivia *et al.* 1986, Beebe, Øyen *et al.* 1990, Skalhegg 1997, Zimmermann, Chiorini *et al.* 1999, Turnham und Scott 2016).

Die katalytische Untereinheit C α der PKA wird durch das Gen *PRKACA* codiert. Die Transkription und Translation des Gens resultiert in einer Proteingröße von etwa 40 kDa.

Die katalytische Untereinheit beinhaltet am N-terminus einen kleinen Lobus, die ATP Bindestelle, welche aus β -Faltblattstrukturen besteht. Am Carboxy Terminus befindet sich die Proteinbindestelle, der große Lobus, welche vorwiegend aus α -Helices aufgebaut ist (Knighton, Zheng *et al.* 1991). Dazwischen befindet sich das katalytische Zentrum der Kinase (Abbildung 5).

Die katalytischen Untereinheiten besitzen Auto-Phosphorylierungsstellen am Thr197 und Ser338. Diese halten sie in einem aktiven, stabilen Zustand. Fehlen die Phosphorylierungen kommt es zu einem signifikanten Verlust der Aktivität (Thr197) oder zum Verlust der Stabilität im Falle der Dephosphorylierung von Ser338 (Yonemoto, McGlone *et al.* 1997, Gesellchen, Bertinetti *et al.* 2006).

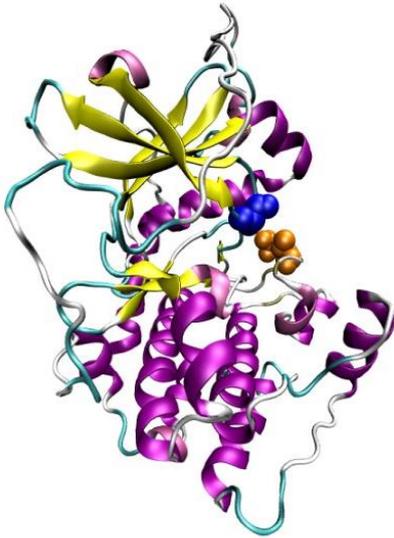


Abbildung 5 Kristallstruktur der PKA-Cα.

Die β -Faltblattstruktur des kleinen Lobus ist in Gelb dargestellt, in violett die α Helices des großen Lobus. Das Thr197, welches ausschlaggebend für die Aktivität der Untereinheit ist, ist in orange dargestellt. Dargestellt mit VMD 1.8

Im aktiven Zustand ist die PKA-C α in der Lage Zielsequenzen mit den Konsensussequenzen: Arg-Arg-X-Ser/Thr, Arg-Lys-X-X-Ser/Thr oder Arg/Lys-X-Ser/Thr zu phosphorylieren (Klussmann 2007). X repräsentiert hierbei eine beliebige Aminosäure. Das aktive Zentrum der katalytischen Untereinheit kann neben der Bindung an die regulatorischen Untereinheiten auch durch so genannte Pseudosubstrate inhibiert werden wie z.B. dem Proteinkinase Inhibitor (PKI) oder H89 (Hauer, Barthe *et al.* 1999, Lochner und Moolman 2006, Turnham und Scott 2016). PKI ist 75 Aminosäuren groß und bindet hochaffin und spezifisch über die Pseudosubstratsequenz (RRNAI) an das aktive Zentrum der katalytischen Untereinheit der PKA, wenn diese als aktives Monomer vorliegt. Für die hochaffine Bindung (2-4 nM) reicht ein Peptid aus, welches nur die Sequenzabschnitte 5 bis 24 des PKI beinhaltet (Scott, Fischer *et al.* 1985). H89 ist hingegen ein unspezifischer PKA Inhibitor und inhibiert auch andere Kinasen wie z.B. die PKC (Lochner und Moolman 2006).

1.4.3 Stimulierung des PKA Signalweges

Die Aktivierung der PKA erfolgt über den cAMP vermittelten Signalweg. Hierbei wird durch einen externen Stimulus wie z.B. Forskolin ein G-Protein gekoppelter Rezeptor

(GPCR) aktiviert. Im cytosolischen Bereich hat dieser ein G-Protein (Trimer bestehend aus $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$) gebunden, welches je nach Funktion der α -Untereinheit in drei Subtypen unterteilt werden: G_s , G_i und G_q . Diese wirken entweder aktivierend (G_s), inhibierend (G_i) auf die nachgeschaltete Adenylylcyclase. G-Proteine des Subtyps G_q führen zur Aktivierung der Phospholipase C. Durch die extrazelluläre Bindung eines Liganden an den GPCR kommt es zu einer Konformationsänderung und im Cytosol zu einer Aktivierung des G-Proteins durch den GEF (*Guanin exchange factor*). Dabei findet ein Austausch von Guanosin-5'-diphosphat (GDP) zu Guanosin-5'-triphosphat (GTP) am GEF statt. Durch diesen Austausch kommt es zur Abspaltung der α -Untereinheit des G-Proteins, welche danach an eine Adenylylcyclase bindet (Baltoumas, Theodoropoulou *et al.* 2013, Stewart und Fisher 2015). Die Aktivierung der Adenylylcyclase führt zur Produktion des second Messengers cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Der intrazelluläre Anstieg der cAMP Konzentration führt zur Bindung zweier cAMP Moleküle an die regulatorische Untereinheit der PKA und damit zur Freisetzung/Aktivierung der katalytischen Untereinheit (Abbildung 6). Die katalytischen Untereinheiten sind dann in der Lage Targetmoleküle im Cytoplasma oder auch im Zellkern z.B. den Transkriptionsfaktor CREB zu phosphorylieren.

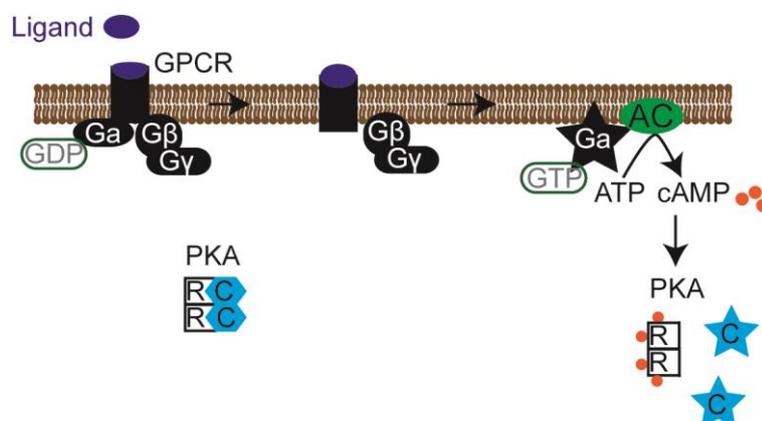


Abbildung 6 PKA Aktivierung mittels cAMP

Durch die Bindung eines Liganden an den, in der Zellmembran lokalisierten, GPCR Rezeptor kommt es zur Aktivierung des G-Proteins. An der α -Untereinheit kommt es zum Austausch von GDP zu GTP. Durch Bindung der aktiven $G\alpha$ an eine Adenylylcyclase (AC) kommt es zur Umwandlung von ATP zu cAMP. Dieses kann wiederum die bis zu dem Zeitpunkt inaktive Proteinkinase A aktivieren. Hierbei binden je zwei cAMP Moleküle an die regulatorische Untereinheit (R) und sorgen für die Dissoziation der katalytischen Untereinheit (C). Die aktive katalytische Untereinheit der PKA kann daraufhin Targetmoleküle phosphorylieren.

Neben der Aktivierung der PKA, kann ein Anstieg des cAMP Spiegels von 100 nM auf 1 μ M innerhalb der Zelle auch zur Aktivierung der Phospholipase C führen. Diese

wandelt Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in zwei weitere second Messenger um, das Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Während IP₃ zum Öffnen von membranständigen Kalziumkanälen des endoplasmatischen Retikulums führt, aktiviert DAG die Proteinkinase C (Nishizuka 1992, Sternweis und Smrcka 1992). Durch das einströmende Kalzium können weitere Signalwege, wie z.B. Kalziumabhängige Calmodulinkinasen, MAPK aktiviert werden. Durch einen positiven Feedbackloop stimuliert Kalzium auch spezifische Adenylylcyclase Subtypen und damit die Produktion von cAMP und die Aktivierung der PKA.

Die Gabe eines spezifischen Stimulus wie z.B. Forskolin führt nicht nur zur Aktivierung des kanonischen PKA Signalweges, sondern aktiviert auch eine Vielzahl anderer Kinasen wie MAPK, PKB, welche alle in einer Aktivierung und Stimulierung des Transkriptionsfaktors CREB münden können (Delghandi, Johannessen *et al.* 2005).

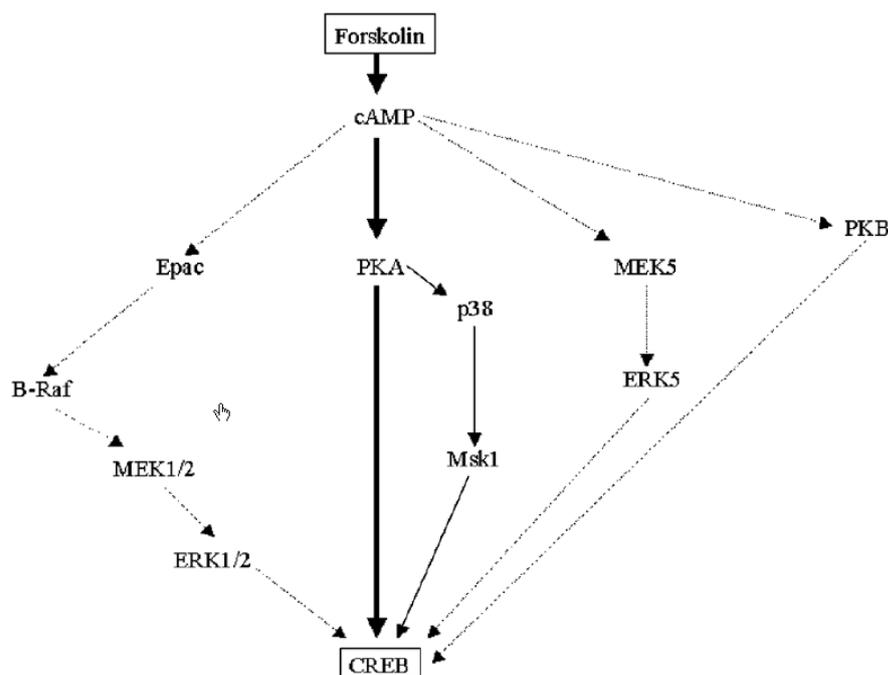


Abbildung 7 cAMP aktivierte Signalwege

Während die Stimulusgabe von Forskolin hauptsächlich die PKA aktiviert, können auch weitere Kinasen wie die PKB oder B-Raf aktiviert werden. Auch dies resultiert in einer Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB. Abbildung aus Delghandi *et al.* 2005

Signalwege sind sehr engmaschig und komplex miteinander verwoben, weswegen das Inaktivieren einzelner Faktoren wie z.B. der PKA, dennoch keine Änderung im Resultat

zur Folge hat: Die Aktivierung von CREB (Abbildung 7). Neben der Aktivierung muss auch eine Inaktivierung der Signalwege erfolgen.

Für den cAMP induzierten PKA Signalweg gibt es mehrere Kontrollmechanismen, die zur Inaktivierung führen. Das an der α -Untereinheit des G-Proteins gebundene GTP wird durch die intrinsische GTPase Aktivität hydrolysiert und zu GDP umgewandelt. Der GEF kann nicht mehr an die Adenylylcyclase binden, wodurch diese die Produktion von cAMP einstellt. Das noch vorhandene cAMP wird durch cAMP-Phosphodiesterasen, welche über einen Feedbackloop aktiviert werden, zu Adenosinmonophosphat (AMP) abgebaut. In Abwesenheit von cAMP bildet sich wieder das Holoenzym aus, wodurch keine aktive katalytische Proteinkinase A mehr vorliegt. Zusätzlich können GPCRs durch die β -adrenerge Rezeptor Kinase phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung bewirkt ein Binden des β -Arrestins an den Rezeptor und vermindert so eine Aktivierung des G-Proteins (Luttrell 2006, Luttrell und Gesty-Palmer 2010).

1.4.4 Potentielle Downstream Targets der PKA-C α in der Nozizeption

Die bisherige Schmerzforschung fokussiert sich vor allem auf die Funktion membranständiger Kanäle wie z.B. Opioidrezeptoren und Ionenkanäle wie dem *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1). Das Signalnetzwerk bzw. die Dynamik, das unter anderem durch Kinasen innerhalb der Zelle gesteuert wird, bleibt weitestgehend unbeachtet. Durch die Kombination molekularbiologischer Ansätze und systembiologischer Methoden kann eine große Zahl an Komponenten analysiert werden, die letztendlich helfen die grundlegenden Signalnetzwerke der Schmerzsensitivierung zu verstehen. TRPV1 positive Neurone bilden eine Untergruppe an Neuronen, die innerhalb der Schmerzweiterleitung eine wesentliche Rolle spielen. Isensee *et al.* identifizierte in TRPV1 positiven Neuronen ca. 240 differentiell exprimierte Gene, wobei viele in der Schmerzsensitivierung schon beschrieben worden sind. In den TRPV1 positiven Neuronen waren GPCRs und Signalproteine, die am Adenosin-, Kalzium- und Phosphatidylinositol Signalweg beteiligt sind, angereichert (Isensee, Wenzel *et al.* 2015). In 60 % der Neuronen war unter anderem die PKA RII β vorhanden. Innerhalb der Opioidforschung ist bekannt, dass eine kurzzeitige Gabe von Opioiden das cAMP-Level innerhalb der Zelle senkt und damit

das Schmerzsignal reduziert. Werden Opiode über eine lange Zeit verabreicht erfolgt eine Gewöhnung und es müssen höhere Dosen eingesetzt werden, um den intrazellulären cAMP Spiegel niedrig zu halten. Fällt der Opioidspiegel ab, resultiert dies in einem rapiden cAMP Anstieg und heftigen Schmerzen (Endres-Becker, Heppenstall *et al.* 2007). cAMP ist einer der Hauptregulatoren der PKA, weswegen ein Zusammenspiel zwischen Targets des Schmerzkontextes und der PKA vermutet wird. Einige der im Schmerzkontext potentiell involvierten Targets werden im Folgenden genauer vorgestellt.

1.4.4.1 Transient Receptor Potential Vanilloid I (TRPVI)

TRPVI ist ein durch Liganden aktivierter nicht-selektiver Kationenkanal und gehört zur Familie der Transient Receptor Potential Kanäle (TRP), welche in sechs Subfamilien unterteilt werden: TRPC (Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polysystin), TRPML (Mucolipin) und TRPA (Ankyrin) (Clapham 2003). TRPVI gehört zur Unterfamilie der Vanilloid Rezeptoren und wird hauptsächlich im peripheren Nervensystem, in vielen Bereichen des Gehirns, sowie in nicht neuronalem Gewebe exprimiert (Caterina, Schumacher *et al.* 1997, Fernandes, Fernandes *et al.* 2012). Knock-out Mäuse für TRPVI weisen Defekte in der Schmerzweiterleitung und bei Entzündungen auf. TRPVI scheint involviert zu sein in der hitzeabhängigen Schmerzweiterleitung und Entzündungsprozesse (Caterina, Leffler *et al.* 2000). Die Involvierung von TRPVI in nozizeptive Prozesse sowie ein eventueller Zusammenhang zur Langzeitpotenzierung von Schmerz wurde schon von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. Die Aktivierung von TRPVI und der daraus resultierenden Kalzium Einstrom führt durch Aktivieren von Signalwegen zu Langzeitveränderungen und damit zur Signalverstärkung bei der Weiterleitung neuronaler Signale durch Neurotransmitter (Clapham 2003, Latorre, Zaelzer *et al.* 2009, Fernandes, Fernandes *et al.* 2012, Julius 2013, Hilton, Rath *et al.* 2015, Cui, Gosu *et al.* 2016, Satheesh, Uehara *et al.* 2016).

TRPVI zählt zur Klasse der sechs Transmembran Rezeptoren, die als Homotetramer einen Kationen permeablen Kanal bilden (Latorre, Zaelzer *et al.* 2009). Dieser Kanal ist vorrangig durchlässig für Kalzium, kann aber auch durchlässig für Natrium, Kalium oder Magnesium (García-Martínez, Morenilla-Palao *et al.* 2000, Tominaga und Julius 2000) sein. Die Aktivierung des Kanals kann z.B. durch Hitze, Capsaicin,

Veränderungen im pH Wert oder Bradykinin erfolgen (Tominaga, Caterina *et al.* 1998). Die Aktivität von TRPV1 wird unter anderem durch die Phosphorylierung des Rezeptors gesteuert, wobei bisher nur wenige Phosphorylierungsstellen und deren Kinasen bekannt sind (Price, Jeske *et al.* 2005, Por, Gomez *et al.* 2013). Hierbei dienen die Aminosäuren 736-749 als Target unter anderem für die Proteinkinase A, PKC- ϵ und für Proteinphosphatasen (Zhang, Li *et al.* 2008). An Ser502, sowie Ser800 befinden sich zwei Phosphorylierungsstellen des TRPV1, welche durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden (Julius 2013). Bei einer Mutation dieser beiden Stellen zu Alanin ist die Sensitivität von TRPV1 deutlich vermindert. Liu *et al.* beschrieb 2015 die Phosphorylierung des TRPV1 am Thr407 durch die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5). Wird die Phosphorylierung an Thr407 durch Mutation dieser Stelle verhindert, wurde sowohl eine verringerte Expression als auch eine Verminderung der Kanalfunktion festgestellt (Liu, Du *et al.* 2015). Zwei durch die Proteinkinase A phosphorylierbaren Aminosäuren sind das Ser116 und das Thr370, durch deren Phosphorylierung die Co-Lokalisation des TRPV1 mit β -Arrestin-2 erhöht wird (Por, Gomez *et al.* 2013). Die Modulation von TRPV1 durch die Proteinkinase PKA oder PKC wird durch das AKAP150 reguliert (Schnizler, Shutov *et al.* 2008, Jeske, Patwardhan *et al.* 2009). Es befinden sich weitere potentielle Phosphorylierungsstellen für Kinasen in den cytoplasmatischen Sequenzabschnitten des TRPV1, welche bisher nicht experimentell bestätigt werden konnten.

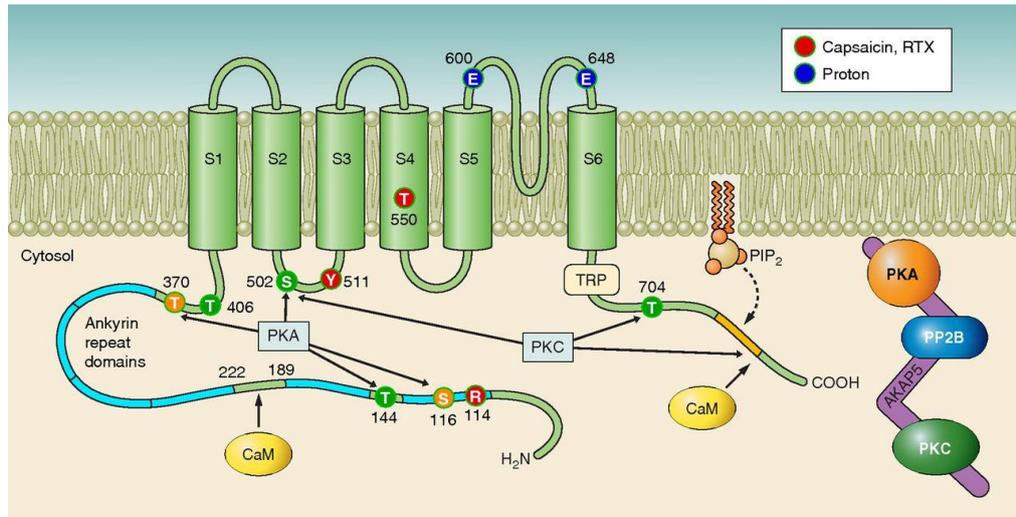


Abbildung 8 Schematische Darstellung des TRPV1

Der Aufbau des TRPV1 mit bekannten sowie potentiellen Phosphorylierungsstellen. (Abbildung aus (Bourinet, Altier *et al.* 2014)

1.4.4.2 Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und werden hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert (Law, Wong *et al.* 2000). Neben ihrer Wirkung auf die Schmerzweiterleitung und Abhängigkeit des Körpers von Opiaten sind sie an einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt wie z.B. Zellproliferation, Immunantwort, Fettleibigkeit, neurodegenerative Krankheiten und kardiovaskulären Prozessen (Feng, He *et al.* 2012).

Sie können auf Grund ihrer Wirkmechanismen und Liganden in vier Hauptklassen unterteilt werden:

μ -Rezeptoren (MOR), κ -Rezeptoren (KOR), δ -Rezeptoren (DOR), opioid receptor like (ORL)

Alle Rezeptoren beinhalten sieben Transmembran Domänen, einen extrazellulären N-Terminus und drei intrazelluläre Loops mit einer Vielzahl amphiphatischer Helices. Die Rezeptortypen weisen eine hohe Übereinstimmung der gesamten Aminosäuresequenzen auf, wobei die größten Unterschiede an den extrazellulären Ligandenbindedomänen und intrazellulären Bindestellen zu finden sind. Durch diese Unterschiede können sie durch verschiedene Faktoren aktiviert/inaktiviert werden (Chen, Mestek *et al.* 1993). Die große Übereinstimmung vor allem in den Transmembranbereichen (TM) ist bei einer Überlagerung der Kristallstrukturen gut zu erkennen, wobei die kleineren Abweichungen in Ligandenbindedomänen, den extrazellulären Loops, auch sichtbar werden (Abbildung 9).

A Seitliche Ansicht

B Cytoplasmatische Ansicht

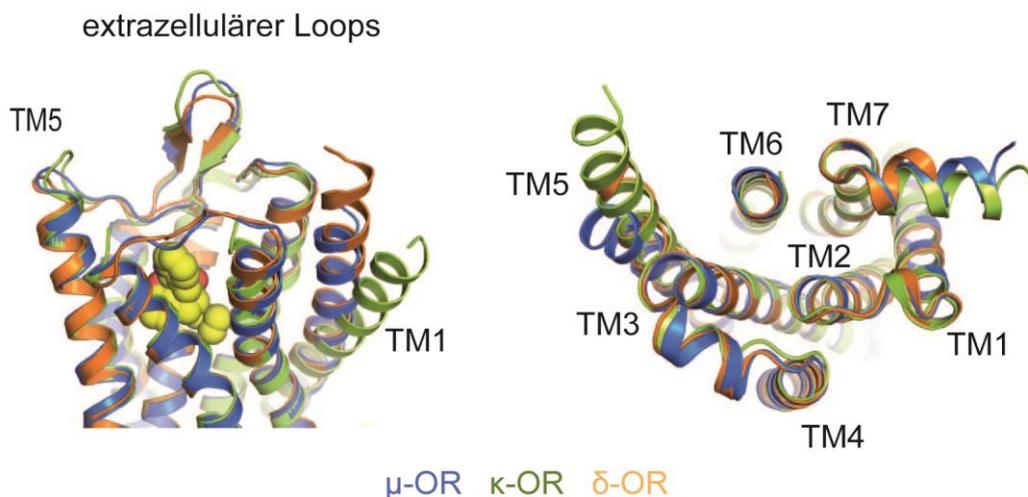


Abbildung 9 Überlagerung der Kristallstrukturen der Opioidrezeptoren

Die Sequenzen der Rezeptoren (μ -DOR: blau, δ -DOR: orange, κ -DOR: grün) sind hochkonserviert und weisen eine hohe Homologie auf, wodurch es grafisch eine nahezu perfekte Überlappung gibt. Abweichungen gibt es in den extrazellulären Loops, wo es zur Bindung der Agonisten kommt. Tm steht für Transmembran, gelb: gebundenes Naltrindole ein Agonist (Abbildung modifiziert nach (Granier, Manglik *et al.* 2012)

Im folgenden Abschnitt werden die Rezeptoren MOR und DOR näher beschrieben.

Nach Bindung von Opiaten, wie z.B. Morphin, aktivieren Opioidrezeptoren inhibitorische G-Proteine, was zu einer Verminderung der Adenylylcyclase Aktivität und damit zu einer Beeinflussung von PKA als auch PKC Signalwegen führt. Zusätzlich werden Kalzium Kanäle, Phospholipase C und Kinasen wie ERK1 und ERK2 (Law, Wong *et al.* 2000) beeinflusst. Neueste Entdeckungen zeigen, dass eine Hochregulierung von DOR durch den PKC Signalweg zum Aktivieren von Schutzmechanismen des Herzens und von Neuronen führt (Chao und Xia 2010). Die Hochregulierung von DOR in humanen Brustkrebszellen führt zur Aktivierung der PKC, was zu einer übermäßigen Phosphorylierung von ERKs und damit zur Entstehung von Krebs führt (Wei 2016).

Opioidrezeptoren beinhalten eine Vielzahl an bekannten und potentiellen Phosphorylierungsstellen. Beim μ -Rezeptor (MOR) sind bisher wenige Phosphorylierungsstellen bekannt. Zu einer Phosphorylierungsstelle, die nach der Bindung eines Agonisten phosphoryliert werden, wie z.B. bei Ser375, zum anderen Agonisten unabhängige Phosphorylierungen wie am Thr370 oder eine basale Phosphorylierung am Ser363. Eine Phosphorylierung am Ser375, die hauptsächlich durch die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 5 (GRK 5) stattfindet, gilt als initiale Phosphorylierungsstelle, woraufhin eine Phosphorylierung der Aminosäuren Thr370, Thr376 und Thr379 stattfindet. Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren durch GRK2/3 erfolgt nur bei der Bindung eines hocheffektiven Agonisten wie z.B. DAMGO. Die von Agonisten unabhängige Phosphorylierung am Thr370 wird durch die PKC α durchgeführt (Wang, Chen *et al.* 2008, Doll, Konietzko *et al.* 2011, Feng, Li *et al.* 2011, Lau, Trester-Zedlitz *et al.* 2011, Chen, Oldfield *et al.* 2013, Just, Illing *et al.* 2013, Mann, Illing *et al.* 2015). Sieben weitere potentielle Phosphorylierungsstellen im cytosolischen C-Terminus von MOR sind bisher noch nicht genauer untersucht wurden, da spezifische Antikörper oder passende Analysesysteme fehlen.

Der δ -Rezeptor (DOR) ist weit weniger untersucht als MOR, da der Rezeptor meist nicht als präferiertes Target für Wirkstoffe genutzt wird. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass chronische Entzündungen sowie eine vermehrte Behandlung mit Morphin zu einem Anstieg der Expression von DOR im Spinalganglion und DRG Neuronen führt (Beaudry, Mercier-Blais *et al.* 2015). MOR und DOR werden co-reguliert (Cahill, Morinville *et al.* 2001, Morinville, Cahill *et al.* 2003). DOR beinhaltet

ebenso wie MOR potentielle Phosphorylierungsstellen am C-Terminus. Kouhen *et al.* zeigte in Zellkulturexperimenten das zwei Phosphorylierungsstellen (Ser363 und Thr358) als primäre Phosphorylierungsstellen gelten. Gou *et al.* fand diese nahezu zeitgleich und konnte des Weiteren zeigen, dass die Phosphorylierung durch die GRK2 stattfindet. Beide Arbeitsgruppen zeigten einen Zusammenhang zwischen einer Agonist-induzierten Phosphorylierung sowie einer Internalisierung des Rezeptors (Guo, Wu *et al.* 2000, Kouhen, Wang *et al.* 2000). Im zweiten cytoplasmatischen Loop des DOR Rezeptors befindet sich eine Bindestelle für die Cyclin-depend-kinase 5 (CDK5), wobei Beaudry *et al.* zeigen konnte, dass die CDK5 tatsächlich einen Einfluss auf die Phosphorylierung diesen Loops hat, die exakte Phosphorylierungsstelle jedoch nicht benannt wurde (Beaudry, Mercier Blais *et al.* 2015).

1.4.4.3 Kinase-D-interacting substrate of 220 kDa (KIDINS220 oder ARMS)

Kinase-D-interacting substrate of 220 kDa oder ankyrin repeat-rich membrane spanning (KIDINS220 oder ARMS) ist ein integrales Membranprotein was hauptsächlich im neuronalen Gewebe exprimiert wird (Iglesias, Cabrera-Poch *et al.* 2000, Kong, Boulter *et al.* 2001). Durch eine Vielzahl an Interaktionen mit Proteinen des Cytoskeletts, Membranrezeptoren und cytosolischen Signalmolekülen spielt es unter anderem eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung und neuronalen Aktivität (Cesca, Satapathy *et al.* 2015). ARMS knockout Mäuse zeigen Defekte in der neuronalen, sowie kardialen Entwicklung (Wu, Arévalo *et al.* 2009, Cesca, Yabe *et al.* 2011, Neubrand, Cesca *et al.* 2012). Durch die zentrale Rolle innerhalb des Nervensystems wird ARMS auch mit einer Vielzahl von Krankheiten in Zusammenhang gebracht wie z.B. Alzheimer (López-Menéndez, Gamir-Morralla *et al.* 2013), Melanoma (Liao, Hsu *et al.* 2007), Übergewicht, spastischen Paraplegien (Josifova, Monroe *et al.* 2016), *Autismus Spectrum Disorder* (Pinto, Delaby *et al.* 2014) und Schizophrenie (Malaspina, Kranz *et al.* 2016).

ARMS ist ein 220 kDa großes Protein, welches 4 Transmembran Domänen beinhaltet. Am N- sowie C-Terminus ist ein langer Schwanz, welcher ins Cytoplasma ragt und eine Vielzahl an Protein-Protein Interaktionsmöglichkeiten liefert. Der N-Terminus

beinhaltet 12 Ankyrin reiche Domänen, welche die Interaktion mit RHO-GEF gewährleisten. Der C-Terminus beinhaltet eine Vielzahl potentieller post-translationaler Modifikationsstellen wie z.B. Phosphorylierungen. Diese Regionen regulieren die Interaktion mit Adapterproteinen wie der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) und Neutropin Rezeptor p75 (Scholz-Starke und Cesca 2016).

Bisher ist keine Kristallstruktur des Proteins bekannt. Als einzige Phosphorylierungsstelle konnte bisher das Ser918 *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Iglesias, Cabrera-Poch *et al.* 2000, Cabrera-Poch, SÃ¡nchez-Ruiloba *et al.* 2004). Iglesias *et al.* konnte nachweisen, dass die Phosphorylierung nach der Stimulierung der Proteinkinase D (PDK bzw. PKC μ) in PC12 Zellen anstieg. Damit war ARMS das erste physiologische Substrat der PDK. Cabrera-Poch *et al.* stellten fest, dass zwei weitere Kinasen (PKC ϵ und die kleine Tyrosin Kinase Src) ARMS ebenfalls am Ser918 phosphorylieren können. Der lange intrazelluläre C-Terminus beinhaltet weitere potentielle Phosphorylierungsstellen, die bisher nicht experimentell bestätigt oder mit einer Kinase in Verbindung gebracht werden konnten.

1.4.4.4 Adenylylcyclasen

Adenylylcyclasen (AC) sind membranassoziierte Enzyme, von welchen bisher acht membranständige Isoformen bekannt sind, sowie eine lösliche Adenylylcyclase (Taussig 2002). AC wandeln ATP in cAMP um, welches als sekundärer Botenstoff Signalwege wie den PKA Signalweg stimuliert. Generell besitzen die AC 12 Transmembrandomänen und einen cytosolischen N-/C-Terminus. Die Lyaseaktivität sitzt in dem cytosolischen Loop zwischen Transmembrandomäne 6 und 7 (Tesmer und Sprang 1998).

Die Isoformen werden auf Grund ihrer Regulation durch Kalzium oder G-Proteine in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die in dieser Arbeit relevanten AC I, V und VIII werden zwei Klasse zugeteilt:

AC I und AC VIII reagieren sensitiv auf Kalzium aktiviertes Calmodulin, während die AC V auch direkt durch Kalzium reguliert werden kann. Alle drei Isoformen können durch inhibitorische oder stimulierende G-Proteine reguliert werden (Abbildung 10)

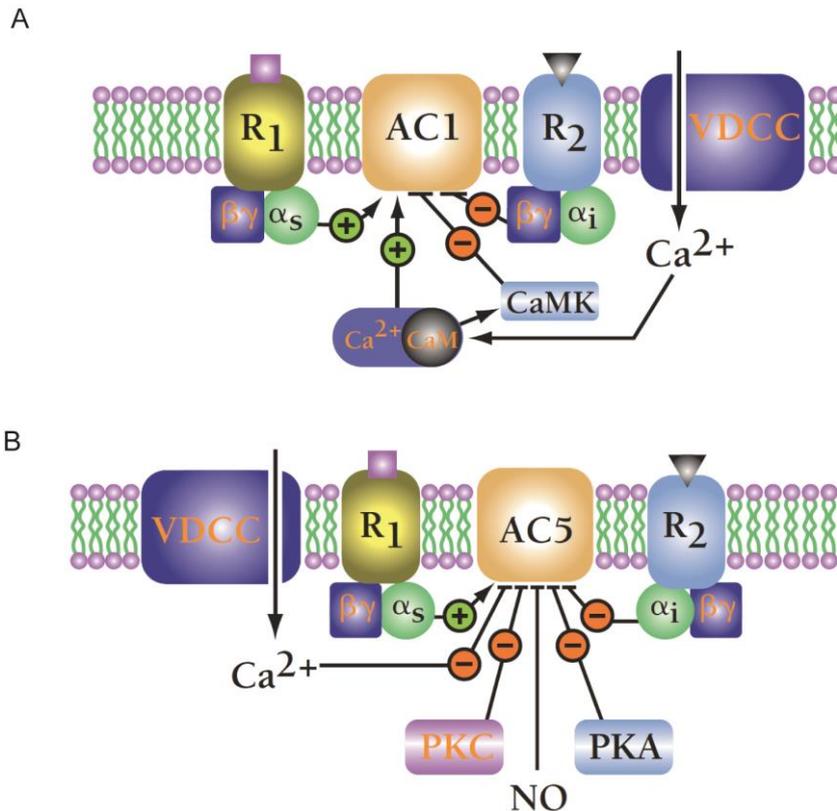


Abbildung 10 Regulation von Adenylylcyclasen

AC1 (stellvertretend dargestellt) und ACVIII können durch eine Vielzahl an Signalmolekülen beeinflusst werden. Im Gegensatz zu der AC5 (ACV) werden diese durch aktiviertes Calmodulin stimuliert (A) während die AC5 direkt durch einströmendes Kalzium inhibiert werden kann (B). Alle drei Adenylylcyclasen werden durch stimulierende oder inhibitorische G-Proteine (R1 und R2) reguliert. (Abbildung modifiziert nach (Taussig 2002))

Die Expression der AC erfolgt überwiegend in neuronalem oder muskulärem Gewebe, wobei AC I ausschließlich im Gehirn exprimiert wird (Taussig 2002). AC sind in viele zelluläre Prozesse eingebunden. Deren genaue Regulation oder Phosphorylierungsstellen sind aber weitestgehend unerforscht. Für die Isoform VIII wurde bisher eine Phosphorylierungsstelle (Ser112) als direkte Phosphorylierungsstelle der PKA nachgewiesen, sowie eine Bindestelle für Calmodulin (Gu und Cooper 1999, Willoughby, Halls *et al.* 2012). Bei der bovinen Isoform I wurde bisher eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Calmodulin Kinase V erwähnt (Taussig 2002). Isoform V zeigt eine Regulation durch die PKC, wobei die Phosphorylierungsstelle unbekannt ist (Kawabe, Ebina *et al.* 1996). Anhand eines Datenbankabgleichs von cytosolischen Bereichen der AC durch unsere Arbeitsgruppe konnten in den AC I 21, AC V 13 und AC VIII 23 potentielle Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin Kinasen identifiziert werden.

1.5 Multiplex Methoden zur Analyse von post-translationalen Modifikationen auf Peptidbasis

Unter Multiplexing wird das parallele Nachweisen mehrerer Analyten oder Targets in einem Ansatz verstanden. Multiplex Methoden, bei welchen wenig biologische Probe oder teure Lösungen verwendet werden müssen, gewinnen immer mehr Aufmerksamkeit im Bereich Forschung und Diagnostik. Es können hunderte von Datenpunkten in einem Ansatz erfasst werden, was eine deutliche Zeit- und Probensparnis und damit eine Kostenersparnis liefert. Bei kleinen Molekülen wie Peptiden ist es auf Grund des geringen Molekulargewichtes kaum möglich herkömmliche Methoden der Proteinanalytik wie z.B. SDS-PAGE, WesternBlot, FRET, BRET, Yeast-2-Hybrid für den Nachweis von post-translationalen Modifikationen anzuwenden. Die Massenspektrometrie, welche Moleküle auf Grund ihres Ladungs- zu-Masseverhältnisses auftrennt, findet oft Anwendung im Bereich der Protein- und Peptidanalytik. Für das Arbeiten mit komplexen Gemischen wie Zelllysat oder um phosphorylierte Peptide zu detektieren, muss jedoch eine komplexe Probenaufbereitung und Anreicherung stattfinden. Bei den Multiplex Anwendungen wie beispielsweise Mikroarrays und Bead basierten Systemen ist dies nicht der Fall, weshalb auf diese im folgenden Abschnitt detaillierter eingegangen wird.

1.5.1 Mikroarrays

Mikroarrays dienen dem parallelen Nachweis von mehreren tausend Proben und finden Anwendung im Bereich der DNA-, Protein-, Peptid-, Drogenanalytik (Schumacher, Mükusch *et al.* 2015) oder dem Nachweis von post-translationalen Modifikationen.

DNA Arrays sind seit ihrer Entstehung zu einem festen Bestandteil der Forschung geworden und haben Einzug in die klinische Diagnostik erhalten. Anwendungsbereiche sind z. B. Genexpressionsanalysen im Bereich der Tumorforschung und Mutationsanalysen, aber auch im Bereich der Medikamentenentwicklung.

Protein Mikroarrays sind auf Grund ihrer höheren Komplexität kaum in der Routinediagnostik zu finden, werden aber im Bereich der Forschung genutzt und

hinsichtlich ihrer Sensitivität, dem Durchsatz und der Prozessierung stetig weiter entwickelt (Hultschig, Kreuzberger *et al.* 2006, Kricka und Master 2009, Dasilva, Diez *et al.* 2013, Sutandy, Qian *et al.* 2013, Cretich, Damin *et al.* 2014). Die Grundlage für die modernen Protein Mikroarrays wurde ca. 1990 durch Ekins *et al.* gelegt, der das Prinzip eines konventionellen Immunoassays in einen Mikroassay übertrug (Ekins 1989, Ekins, Chu *et al.* 1990, Ekins und Chu 1991, Ekins 1998).

1.5.1.1 Mikroarray Kategorien

Protein Mikroarrays werden in drei Kategorien unterteilt: (1) Analytische Mikroarrays, (2) Funktionelle Mikroarrays und (3) Reverse Phase Mikroarrays (Stoevesandt, Taussig *et al.* 2009, Dasilva, Diez *et al.* 2013).

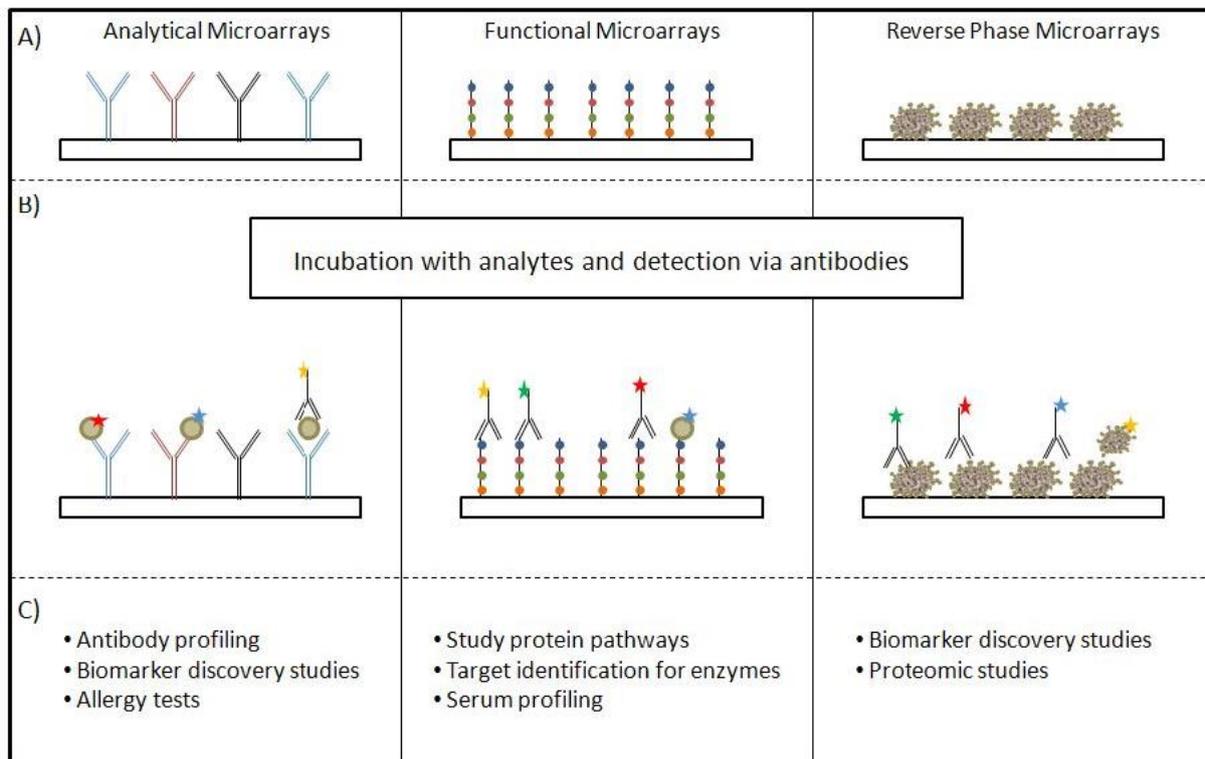


Abbildung 11 Kategorien von Mikroarrays

Dargestellt sind die drei Kategorien an Mikroarrays (A) und deren Analyten (B). Des Weiteren sind einige beispielhafte Anwendungen aufgelistet (C) (Schumacher, Mükusch *et al.* 2015)

Analytische Mikroarrays dienen der Analyse von Protein-Interaktionen. Hierbei können entweder Antikörper oder Proteine auf der Oberfläche immobilisiert sein. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Antigen was in Serumproben, Zelllysaten oder als

rekombinantes Protein vorliegen kann. Im Gegensatz dazu sollen mit Hilfe der funktionellen Mikroarrays Proteinsignalwege oder auch die Targetidentifizierung von Kinasen analysiert werden. Hierbei werden generell Proteine oder Peptide auf die Mikroarrayoberfläche gebracht und anschließend mit Kinasen, Proteinen, Serum oder Zelllysaten inkubiert. Einer der ersten war Zhu *et al.*, diese nutzten im Jahr 2000 einen funktionellen Proteinarray, um die Substratspezifität von Kinasen von Hefen zu analysieren (Zhu, Klemic *et al.* 2000, Zhu, Bilgin *et al.* 2001). Mit Hilfe funktioneller Proteinarrays ist es auch möglich post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierungen näher zu analysieren (Hu, Rho *et al.* 2014, Nikita Gahoi 2014). Zu den funktionellen Protein Mikroarrays gehören auch Peptid Mikroarrays, bei denen nur ein kleiner Ausschnitt einer Proteinsequenz auf der Oberfläche repräsentiert wird. Auf diese wird im Abschnitt 1.5.1.2 näher eingegangen.

Im Gegensatz zu den analytischen und funktionellen Mikroarrays werden bei den Reverse Phase Mikroarrays (RPMA) Zelllysate oder Gewebelysate auf die Oberfläche gespottet. So können im Vergleich zu den analytischen/funktionellen Mikroarrays beispielsweise Krankheitsverläufe durch das Aufbringen von Zelllysaten von verschiedenen Krankheitsphasen analysiert werden. Dies bedingt, dass der krankheitsauslösende Parameter bekannt ist. Es können des Weiteren unterschiedlichen Stimulierungszustände von spezifischen Proteinen und Gewebe zeitabhängig analysiert werden. Auf Grund der hohen Komplexität der Probe und der benötigten Spezifität des Antikörpers finden RPMA keine Anwendung in der *in vitro* Diagnostik (Wellhausen und Seitz 2012, Cretich, Damin *et al.* 2014).

Neben den klassischen drei Mikroarraykategorien gibt es inzwischen auch Proteinarrays die mit Hilfe von DNA Arrays entstehen: *Protein in situ Array* (PISA), *DNA Array to Protein Array* (DAPA); Nucleic Acid Programmable Protein Array (NAPPA) (He und Taussig 2001, Ramachandran, Hainsworth *et al.* 2004, He, Stoevesandt *et al.* 2008). Diese bieten den Vorteil, dass es keine Begrenzung auf Grund von nicht vorhandenen rekombinanten Proteinen, Lagerproblematiken oder nicht funktionellen Proteinen gibt. Als Vorlage werden hier DNA-Arrays bzw. DNA Templates genutzt, die mit Hilfe von zellfreien *in vitro* Transkriptions- / Translationssystemen in Proteinarrays umgeschrieben werden.

Die Detektion des gebundenen Analyten auf Mikroarrays erfolgt meist durch fluoreszenzmarkierte Antikörper (Dasilva, Diez *et al.* 2013). Es gibt aber auch die Möglichkeit der kolorimetrischen Färbung, welche häufig bei Vertikal Flow Arrays genutzt wird (Chinnasamy, Segerink *et al.* 2014, Chinnasamy, Segerink *et al.* 2014, Reutersward, Gantelius *et al.* 2015).

1.5.1.2 Peptid Mikroarrays

Für die meisten Protein-Protein Interaktionen ist nur ein kleiner Sequenzabschnitt des Gesamtproteins ausschlaggebend wie z. B. Kinasemotive oder auch spezifische Bindedomänen. Proteine sind in der Handhabung, Lagerung und Aufreinigung komplex, da sie leicht ihre natürliche Faltung und damit ihre Funktionalität verlieren. Wird hingegen mit Sequenzabschnitten (Peptiden) gearbeitet fallen diese Nachteile weg. Peptide sind im Vergleich zu Proteinen chemisch und physikalisch stabiler, wodurch sie auch relativ extreme Bedingungen aushalten ohne ihre biologische Funktion zu verlieren. Peptid Mikroarrays bieten die Möglichkeit mit bis zu 10.000 Sequenzen gleichzeitig zu arbeiten und biochemische Interaktionen, Inhibitoren oder auch kleine Moleküle wie Medikamente zu analysieren (Frank 2002, Min und Mrksich 2004). Hierbei können durch überlappende Sequenzen oder Punktmutationen ortsgenaue Analysen der Bindestellen vorgenommen werden (Katz, Levy-Beladev *et al.* 2011). Neben den klassischen Peptid Mikroarray, bei welchem die Peptide einzeln auf die Oberfläche aufgebracht werden, gibt es auch die Möglichkeit der SPOT-Synthese (Frank 2002). Bei dieser werden die Peptide direkt auf der Oberfläche synthetisiert, was eine schnelle und sehr flexible Arbeitsweise ermöglicht, da jedes Array mit spezifischen Peptiden hergestellt werden kann. Die Länge der Peptide, die direkt auf der Oberfläche synthetisiert werden können, ist limitiert auf ca. 50 Aminosäuren, wobei die optimale Peptidlänge bei 6-18 Aminosäuren liegt, da danach vermehrt Abbruchprodukte gebildet werden (Hilpert, Winkler *et al.* 2007).

Wird mit einer kleinen Anzahl an Peptiden, Peptidlängen >25 Aminosäuren gearbeitet oder sollen identische Peptid Mikroarrays hergestellt werden, wird auf Grund der geringeren Kosten und der Syntheseproblematik auf die klassischen Peptid Mikroarrays zurückgegriffen.

Einige Beispiele der Anwendungen sind z.B. das Screenen für Kinasetargets mit rekombinanter Kinase oder mit Zelllysat. Devkota *et al.* analysierte mit Hilfe von Peptid Mikroarrays z.B. die Targets der Kalzium/Calmodulin abhängigen Kinase III (Devkota, Warthaka *et al.* 2013), Hilhorst *et al.* nahm ein Targetscreening der rekombinanten PKA vor (Hilhorst, Houkes *et al.* 2009) und Li *et al.* analysierte die Aktivität der PKA mit Hilfe des Standardpeptides Kemptide in Zelllysat (Li, Liu *et al.* 2013). Peptid Mikroarrays werden auch in der medizinischen Diagnostik eingesetzt z.B. zur Detektion von Autoimmunerkrankungen, Krebs, Infektionen und Lebensmittelallergien (Springer 2016).

1.5.2 Bead basierte Systeme

In den letzten Jahren sind parallel zu den Mikroarrays Bead basierte Systeme in den Fokus der Multiplex Methoden und Forschung gelangt. Im Vergleich zu Mikroarrays sind dies Suspensionsassays, bei welchen alle Reaktionen in Lösung stattfinden. Durch die kovalente Kopplung von DNA, Proteinen oder Peptiden an Mikropartikel (Beads) können biochemische Analysen vorgenommen werden. Der Grad des Multiplexings hängt meist von der intrinsischen Färbung (Farbcodierung) der Beads ab. Beispielweise bietet Luminex 500 unterschiedliche Beads (xMAP Technology), während BD Bioscience bei dem BD Cytometric Bead Array nur 30 Beads zur Verfügung stehen (BD CBA). Die Beads können mit verschiedenen Fängermolekülen gekoppelt, gemischt und parallel analysiert werden. Die Identifizierung der Beads und die Quantifizierung der gebundenen Analyten erfolgt dabei mittels des Prinzips der Durchflusszytometrie.

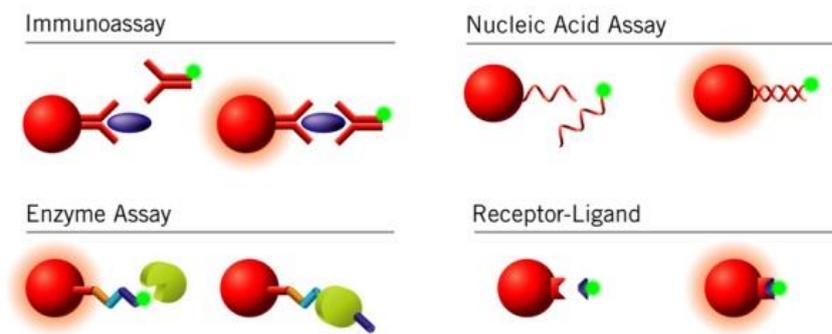


Abbildung 12 Assay Varianten mit Beads

Je nach Anwendung werden unterschiedliche Analyten an die Oberfläche der Beads gekoppelt, bspw. Antikörper, DNA, Peptide oder Proteine. Nachfolgend können dann Immuno Assays, Nukleinsäure Assays, Enzym Assays oder auch Rezeptor Liganden Bindungen analysiert werden. Die Grafik wurde dem Luminex Cookbook entnommen (Angeloni, Cordes *et al.* 2014).

Viele Prozesse wie z.B. das Waschen oder Koppeln kann bei dem Bead basierten Systemen voll- oder semiautomatisiert erfolgen, sodass die technische Reproduzierbarkeit steigt. Dadurch, dass die Beads in Lösung gelagert werden können, sind die gekoppelten Targets stabiler als z.B. auf Mikroarrays. Ein weiterer Vorteil der Bead Technologie ist, dass Zeitreihen der Targetphosphorylierung aufgenommen werden können und daher eine Klassifizierung der Targets nach Präferenz der Kinase möglich ist. Durch das Einsetzen unterschiedlicher Kinasekonzentrationen in Kombination mit Zeitreihen ist es auch möglich, kinetische Analyse mit diesen Systemen vorzunehmen, während bei den Peptid Mikroarrays auf Grund des Handlings nur Endpunktmessungen möglich sind. Ein weiterer Faktor der den Bead basierten Systemen einen Vorteil gegenüber den Peptid Mikroarrays verschafft, sind kurze Assayzeiten. Während ein Array mit Spotten und Durchführen der Versuchsreihe und Auswerten der Daten ca. fünf Tage dauert, können Bead basierte Versuche komplett an einem Tag abgearbeitet werden. Durch die leichte Handhabung und kurze Analysezeiten finden Bead basierte Messsysteme Einzug in die Routinediagnostik. Anwendungsbeispiele finden sich beispielsweise im Gebiet der Allergene, bei Infektionskrankheiten, HLA Typisierung, der Bestimmung von Zytokinen, Krebs und dem SNP basierten Genotyping zur Identifizierung von Resistenzen (Shepard, De Forni *et al.* 2008, Cervelli, Pisani *et al.* 2013, Dunbar und Hoffmeyer 2013, Lynch, Sanchez *et al.* 2014, Patel, Navidad *et al.* 2014, Chapman, Wuenschmann *et al.* 2015, Doseeva, Colpitts *et al.* 2015, McDonald, Ekeruche-Makinde *et al.* 2016, Zhang, Brankovics *et al.* 2016).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Standardchemikalien wie z.B. Natriumchlorid oder ähnliches sind hier nicht aufgeführt und wurden von der Firma Merck bezogen.

Tabelle 1 Materialien

Artikel	Artikelnummer	Hersteller
384-Well Platte	X7022	Genetix
96-Well Platte, white, flat bottom	735-0528	VWR
D-Tube Dialyzer Midi MWCo 6-8 kDa	715073	Calbiochem
Epoxy-modifizierte Objektträger		Eigenproduktion Fraunhofer IZI-BB
Filterpapier	3030-153	GE Healthcare
Frischhaltefolie		Saran
HPTLC-Cellulose 10x10cm	1.05787.0001	Merck KGaA
Hybond-Extra Nitrocellulosemembran (45 µm)	10600016	Amersham Bioscience
Kapillarröhrchen 80x0,6 mm	2930203	Marienfeld
MagPlex Microspheres	MC10XXX	Luminex
Nucleo Spin Plasmid	7400588.50	Macherey-Nagel
Polypropylen Säule	34964	Quiagen
ProteinLowBindTubes	0030108.116	Eppendorf

Tabelle 2 Chemikalien

Artikel	Artikelnummer	Hersteller
1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochlorid (EDC)	77149	Pierce
96-Well Platte, white, flat bottom	735-0528	VWR
Adenosintriphosphat (ATP)	10127523001	Roche Diagnostic GmbH
Agarose		Invitrogen GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	1610700	BioRad
BCA Protein Assay Kit	23225	Pierce (Thermo Fisher)
Bovines Serum Albumin Fraktion V	T844.3	Carl Roth
BSA – aufgereinigt	B9000S	New England Biolabs
Coomassie Blue G250	9598.2	Carl Roth

Artikel	Artikelnummer	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	31966-047	GIBCO
Ethanolamin	0342.1	Carl Roth
Forskolin	BML-CN100-0010	Enzo Life Science
Fötales Kälberserum (FKS)	S0615	Merck
GST-PKI	PKA-PKI2-100	Biaffin
H89	PKI-H089-005	Biaffin
L-Alanin-L-Glutamin	K0302	Merck
MagPlex Microspheres	MC10XXX	Luminex
Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER™)	78501	Thermo Scientific
Methanol	T909.1	Carl Roth
murine cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit α (mPKA- α)	PK-PKA-HCA050	Biaffin
Ninhydrin	6762	Merck KGaA
Ni-NTA Superflow	1018611	Quiagen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Scientific
PBS (Zellkultur)	L182-1023	BiochromAG
PonceauS - Lösung	A2935	AppliChem
Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA-Free – Calbiochem	539137	Merck KGaA
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)		Sigma Aldrich
Sulfo-NHS	24520	Pierce
SYBR Green I		Invitrogen GmbH
Trypsin/EDTA	L2143	Merck
Tween-20	9127.1	Carl Roth
UltraPure™ Tetramethylethyldiamin (TEMED)	15524010	Invitrogen GmbH
Western Blue Substrat	S3841	Promega

2.1.2 Geräte

Tabelle 3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Automatische Hybridisierstation zur Slideinkubation	Eigenbau IBMT- Potsdam Golm (heute IZI-BB) nach Epigenomics
Axon GenePix 4300 A Scanner	Molecular Devices
Typhoon Trio Variable Mode Imager	GE Healthcare
Automatisierte Waschstation Bio-Plex Pro II	BIO-RAD
Inkubator	Binder
Zellkulturbank	
FlexMap3D (BioPlex 3D)	Luminex

Bezeichnung	Hersteller
Microarrayspotter I2-400	M2-Automation
Elektrophorese Gelkammer	Hofer
Flachbettscanner	Hewlett Packard
Heizblock Thriller	peqLab
miniSpin Zentrifuge	Eppendorf
Multititerplattenschüttler Innova 4000 incubator shaker	New Brunswick Scientific
Rotationsinkubator	Neolab
Western Blot-Apparatur	Eigenbau MPI für molekulare Genetik - Berlin
FLUOstar Omega Plattenreader	BMG Labtech GmbH
pH-Meter, pH340i	Kika Werke
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex
Mikroskop- Olympus CK30	Olympus
Luftinkubator	Heidolph
Zentrifuge 5804 K	Eppendorf
Magnetischer Separator für Tubes	Dynal MPC-E 2/4
Konfokales Lasermikroskop LSM 510	Zeiss

2.1.3 Software

Tabelle 4 Software

Programm	Hersteller
Adobe Illustrator CS	Adobe System GmbH
OriginPro 2015 G 64 bit	OriginLab
GenePixPro v7	Molecular Devices
MS Office 2016	Microsoft Corp.
xPonent Software v2	Luminex Corp.
EndNote X7	Thomson Reuters
ImageJ	Wayne Rasband
Geneious v10.0.6	Biomatters LT
ZEN 2009	Zeiss

2.1.4 Puffer

Tabelle 5 6x CCE Puffer

Chemikalie	Konzentration
TRIS pH 6,8	1 M
SDS	5,7 %
Glycerol 87 %	14 %
β -Mercaptoethanol	7 %
Bromphenolblau	Eine Spatelspitze

Tabelle 6 5x SDS-Laufpuffer

Chemikalie	Konzentration
TRIS pH 8,3	623,24 mM
Glycin	6,26 M
SDS	0,5 % (v/v)

Tabelle 7 Comassiefärbelösung für Polyacrylamidgele

Chemikalie	Anteil
Methanol	45 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Coomassie Blue G 250	0,25 % w/v

Tabelle 8 Blotting Puffer für WesternBlot

Chemikalie	Konzentration
Glycin	39 mM
TRIS	48 mM
SDS	0,0375 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)

Tabelle 9 10x TA Puffer

Chemikalie	Konzentration
TRIS acetate	330mM
KaliumAcetat	660 mM
MagnesiumAcetat	100 mM

Autoklavieren und anschließend 5 mM DTT zusetzen

Tabelle 10 10x PBS (pH 7,2-7,4)

Chemikalie	Konzentration
NaCl	1,37 M
KH ₂ PO ₄	14,7 mM
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	78,1 mM
KCl	26,8 mM

Tabelle 11 PBS+0,05 % Tween-20 (PBST)

Chemikalie	Konzentration
10x PBS	1xPBS
Tween-20	0,05 % (v/v)

Tabelle 12 10x PKA Puffer, pH 7,5

Chemikalie	Konzentration
TRIS HCl (pH 7,7)	50 mM
Mg ₂ Cl	10 mM

Tabelle 13 HPTLC Laufpuffer

Chemikalie	Volumenanteil
n-Butanol	2,75 (v/v)
Eisessig	1 (v/v)
ddH ₂ O	2 (v/v)

Tabelle 14 Ninhydrin Färbelösung

Chemikalie	Volumen
Ninhydrin	0,2 g
Ethanol	100 mL

Tabelle 15 10x TBE Puffer, pH 8,3

Chemikalie	Konzentration
TRIS	89 mM
Borsäure	89 mM
Na ₂ EDTA (pH 8)	20 mM

Tabelle 16 Lysepuffer IMAC

Chemikalie	Konzentration
NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM

Tabelle 17 Waschpuffer IMAC

Chemikalie	Konzentration
NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM

Tabelle 18 Elutionspuffer IMAC

Chemikalie	Konzentration
NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM

2.1.5 Medien

Tabelle 19 Kulturmedium HEK293

Chemikalie	Volumenanteil
DMEM	ad 50 mL
L-Alanin-L-Glutamin	2 % (v/v)
FKS	10 % (v/v)

Tabelle 20 Auftaumedium HEK293

Chemikalie	Volumenanteil
DMEM	ad 50 mL
L-Alanin-L-Glutamin	2 % (v/v)
FKS	15 % (v/v)

Tabelle 21 Einfriermedium HEK293

Chemikalie	Volumenanteil
FKS	90 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

Tabelle 22 Kulturmedium flüssig 1 Liter (2-YT), *E. coli*

Chemikalie	Menge
Tryptone	16 g
Hefeextract	10 g
NaCl	5 g

Tabelle 23 Kulturmedium fest (LB-Agarplatten), *E. coli* pH 7,5

Chemikalie	Menge
Bacto-Tryptone	10 g
Hefeextract	5 g
NaCl	10 g
Agar-Agar	15 g

2.1.6 Zelllinien, Stämme, Plasmide

Tabelle 24 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Plasmid	Chromosomale Marker
BL21(De3)+pLys	pLys <i>oriP15A, CM^r, T7Lysozym</i>	<i>fhuA2[lon] ompT gal (λ DE3)[dcm]</i> <i>ΔhsdS λDE3 =λ sBamHioΔEcoRI-</i> <i>B int.: (lacI::PlacUV5::T7gene1)</i> <i>i21 Δnin5</i>
XL1-blue	<i>F'lac: lacIq,</i> <i>del(lacZ)M15, Tn10(Tc),</i> <i>proA+, proB+</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q</i> <i>ZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>

Tabelle 25 Verwendetes Plasmid

Plasmid	Vektor	Resistenz	Herkunft
murine His₆-PKA-Cα¹	pET15b	Ampicillin (100µg/ml)	S. Taylor (San Diego)
ARMS S882A, S1439/40A, S1251/52A	pcDNA3.1	Ampicillin (100µg/ml)	F. Herberg (Universität Kassel)
ARMS S882A, S1439/40A, S1251/52A	pcDNA3.1	Ampicillin (100µg/ml)	F. Herberg (Universität Kassel)
ARMS S1439/40A	pcDNA3.1	Ampicillin (100µg/ml)	F. Herberg (Universität Kassel)
ARMS S882A, T903A, S1439/40A, S1526/27A	pcDNA3.1	Ampicillin (100µg/ml)	F. Herberg (Universität Kassel)
ARMS T903A, S882A, S1252/52A, S1439/40A	pcDNA3.1	Ampicillin (100µg/ml)	F. Herberg (Universität Kassel)
ARMS WT	pcDNA3.1	Ampicillin (100µg/ml)	F. Herberg (Universität Kassel)
YFP-TRPVI	pcDNA3.1	Ampicillin (100µg/ml)	V. Spahn, C. Stein (Charité Berlin)

Tabelle 26 Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Organismus	Herkunft
HEK 293	<i>Homo sapiens</i>	DSMZ ACC 305

¹ Die murine Sequenz kodiert für KAPCA-MOUSE (P05132), AddGene Plasmid: 14921

2.1.7 Antikörper

Tabelle 27 Primärantikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Bestellnr.	Verdünnung	Klasse
PKAα cat(C-20)	Kaninchen	Santa Cruz	sc-903	1:1000	polyclonal
P-PKA Substrate (RRxS/T) (pPKA)	Kaninchen	Cell Signaling	9624 S	1:1000	monoclonal
P-VASP(S157)	Kaninchen	Acris	3111S	1:1000	polyclonal
CREB-1	Kaninchen	Santa Cruz	Sc-58	1:1000	polyclonal
Phospho CREB (Ser133) (pCREB)	Kaninchen	Cell Signaling	9191	1:1000	monoclonal
RGS His HRP Conjugate	Maus	Qiagen	-34450	1:1000	polyclonal
V5	Kaninchen	Bethyl	A190-120A	1:10000	polyclonal
Flag-Epitope (Flag)	Kaninchen	Thermo Scientific	PA1-984B	1:500	polyclonal
KIDINS220 (ARMS)	Maus	Thermo Scientific	P2201F8	1:1000	monoclonal

Tabelle 28 Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Bestellnr.	Verdünnung	Klasse
Alexa Fluor 555 (anti rabbit IgG (H+L))	Ziege	Invitrogen	A-21428	1:1000	polyclonal
Anti Rabbit IgG R-Phycoerythrin	Ziege	Invitrogen	P2771MP	1:1000	polyclonal
Anti Rabbit IgG - AP	Ziege	Sigma	A3687	1:1000	polyclonal
Alexa Fluor 594	Ziege	Invitrogen	A-1005	1:200	polyclonal

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmidpräparation aus *BL21(De3)+pLys*

2.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien erfolgte nach der Hanahan Methode Protokoll 23, 1.106 (Sambrook 2001). Im Anschluss wurde die Bakterienkultur aliquotiert und schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.2 Transformation

Die in 2.2.1.1 hergestellten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zu einem Aliquot von 100 µL Bakteriensuspension wurden 100 ng Plasmid pipettiert. Einem weiteren Aliquot wurde kein Plasmid hinzugefügt, dies dient als Negativkontrolle. Nach dem Hinzufügen des Plasmides wurde der Reaktionsansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für drei Minuten bei 42 °C auf dem Heizblock erwärmt. Anschließend wurden 500 µL 2YT Medium (Tabelle 22) zu den Reaktionsansätzen gegeben und diese bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Das Ausplattieren der Bakteriensuspension erfolgte auf LB-Agarplatten (Tabelle 23) mit 100 µg/mL Ampicillin. Diese wurden über Nacht bei 37 °C im Inkubator gelagert. Am Folgetag wurden die Kolonien ausgezählt und von einzelnen Kolonien eine Flüssigkultur für die Präparation des Plasmids (Abschnitt 2.2.1.3) oder eine Vorkultur zur Aufreinigung des gewünschten Proteins angesetzt (Abschnitt 2.3.1.1).

2.2.1.3 Aufreinigung und Restriktionsverdau von Plasmid DNA

Von den in 2.2.1.2 erfolgreich angewachsenen Klonen wurden Kolonien gepickt und in 5 mL Flüssigkulturmedium überführt. Die Kultur wuchs über Nacht bei 37 °C an und wurde am folgenden Tag geerntet. Die Reinigung der Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits. Zur Überprüfung der Plasmid DNA wurde diese mit Hilfe der Endonukleasen *NdeI* (New England Biolabs, 20 U/µL) und *HindIII* (Boehringer Mannheim GmbH, 10 U/µL) verdaut.

Der in Tabelle 29 beschriebene Ansatz wurde bei 37 °C für 90 Minuten und 300 rpm auf dem Heizblock inkubiert.

Tabelle 29 Restriktionsverdau

Plasmid	500 ng
<i>NdeI</i>	20 U
<i>HindIII</i>	10 U
10x TA Puffer	1x TA Puffer
ddH₂O	20 µl

Die DNA wurde anschließend mit SybrGreenI (1:10.000) sowie 6x DNA-Probenpuffer versetzt und auf ein 0,6 % Agarosegel aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung von 80 V für eine Stunde erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente, wobei das Gel stets mit 0,5 x TBE überschichtet war. Mit Hilfe des Typhoon Trio Variable Mode Imager wurde das Agarosegel eingescannt. Durch das Mitführen eines 1kb Markers wurden die nun sichtbaren DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zugeordnet.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression und Aufreinigung der murinen PKA-C α (mPKA-C α)

2.3.1.1 Überexpression der mPKA-C α

Slice und Taylor beschrieben 1989 das zu Grunde liegende Verfahren für die Aufreinigung der Proteinkinase A (Slice und Taylor 1989). Für das nachfolgende Protokoll wurde für die Vor-/Hauptkulturen 2YT Medium mit 100 µg/mL Ampicillin verwendet. Für die Überexpression der katalytischen Domäne der murinen Protein Kinase A (mPKA-C α) wurde von den in 2.2.1.2 hergestellten LB-Agar Platten ein Klon gepickt und mit diesem eine 5 mL Vorkultur angesetzt. Bei 37 °C wurde diese über Nacht auf dem Schüttler inkubiert und am nächsten Tag in eine 200 mL Hauptkultur überführt. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C inkubiert und bei einem OD₆₀₀ von 0,6 mit IPTG (400 µM Endkonzentration) induziert. Nach der Induktion wurde die Hauptkultur weitere vier Stunden bei 37 °C unter stetigem Schütteln inkubiert und im Anschluss für 20 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Zellernte durch die Zentrifugation bei 4.000 rpm für 20 Minuten durchgeführt. Das hierbei gewonnene Zellpellet wurde entweder bei -80 °C gelagert oder direkt wie in 2.3.1.2 beschrieben weiterverwendet.

2.3.1.2 Aufreinigung der mPKA-C α mittels Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Mittels einer Metallionen-Affinitätschromatographie können Proteine, welche mehrere Histidine beinhalten, mit zweiwertigen Metallionen ein Chelat bilden und aufgereinigt werden.

Die Aufreinigung der aktiven mPKA-C α erfolgte, mit einer NiNTA Säule, über den HIS₆-Tag der mPKA-C α . Das Zellpellet (aus 200 mL Kultur) aus 2.3.1.1 wurde durch die Zugabe von 10 mL Lysepuffer (Tabelle 16), vortexen oder stetigem Auf-und Ab-Pipettieren resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall lysiert. Hierbei wurde die Zellsuspension je zweimal für 5 x 30 Sekunden bei einer Leistung von 70 % beschallt. Um ein Erhitzen der Probe zu vermeiden erfolgte der Ultrazellaufschluss auf Eis. Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Zellreste durch Zentrifugation bei 4 °C, 13.200 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde eine Polypropylensäule mit Ni-NTA Superflow Agarose befüllt und mit 10 mL Waschpuffer (Tabelle 17) äquilibriert. Für 200 mL Bakterienkulturpellet wurden 800 μ L Ni-NTA Superflow Agarose genutzt. Die Säulen wurden mit dem Überstand der Zentrifugation befüllt, verschlossen und auf einem Roti-Rad für 90 Minuten bei 4 °C und 30 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Säulen von dem Roti-Rad entfernt und geöffnet, sodass der Durchlauf des Überstandes erfolgte. Der Durchlauf des Überstandes wurde in einem 15 mL Reaktionsgefäß aufbewahrt. Die Ni-NTA Superflow Agarose wurde anschließend dreimal mit je 10 mL kaltem Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen der Ni-NTA Superflow Agarose erfolgte die Elution der mPKA-C α . Hierbei erfolgte die Elution schrittweise: dreimal je 900 μ L Elutionspuffer (

Tabelle 18). Die Elutionen wurden in separaten 1,5 mL Reaktionsgefäßen aufgefangen. Während der gesamten Aufreinigung wurden nach jedem Arbeitsschritt 50 μ L Proben entnommen, mit 6 x CCE Puffer (Tabelle 5) versetzt, bei 95 °C für fünf Minuten aufgekocht und wie in 2.3.2 beschrieben analysiert.

2.3.2 Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS PAGE)

Die sogenannte SDS-PAGE wird genutzt um denaturierte Proteine ihrer Größe nach in einem Polyacrylamidgel zu separieren. Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel-, und einem Trenngel (Tabelle 30/Tabelle 31) modifiziert nach Sambrook *et al.* (Sambrook 2001). Die Polyacrylamidgele wurden nach Bedarf hergestellt, nach dem Polymerisieren mit einem feuchten Tuch umwickelt und bei 4 °C in Frischhaltefolie max. zwei Wochen gelagert.

Tabelle 30 Zusammensetzung Trenngel einer SDS-PAGE (Volumen für 6 Gele)

Zusammensetzung	10 %	12 %
dH₂O	19,8 mL	16,5 mL
30 % Acrylamid	16,7 mL	20,0 mL
1,5 M TRIS (pH 8,8)	12,5 mL	12,5 mL
10 % SDS	0,5 mL	0,5 mL
10 % APS	0,5 mL	0,5 mL
TEMED	0,02 mL	0,02 mL

Tabelle 31 Zusammensetzung Sammelgel einer SDS-PAGE (Volumen für 6 Gele)

Zusammensetzung	6 %
dH₂O	6,8 mL
30 % Acrylamid	1,7 mL
1,5 M TRIS (pH 8,8)	1,25 mL
10 % SDS	0,1 mL
10 % APS	0,1 mL
TEMED	0,01 mL

Es wurde zunächst das Trenngel in die Gelkammer gegeben und mit Wasser überschichtet, um eine klare Trennschicht zu schaffen. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel hinzugefügt. Sofort nach Zugabe des Sammelgels erfolgte die Einführung der Kämme mit den Taschen, sodass beim Polymerisieren der Geltaschen entstanden. Um die Taschen später besser sichtbar zu machen, wurde das Sammelgel mit 1 % Bromphenolblau versetzt.

Um Proteinproben mit Hilfe einer SDS-PAGE zu analysieren, wurden die Proben mit 6x CCE Puffer (Tabelle 5) versetzt und anschließend bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert. Nach dem Befüllen der Gelapparatur mit 1x SDS-Laufpuffer (Tabelle 6) wurde die gewünschte Probenmenge anschließend in die Taschen des Polyacrylamid Gels gegeben. Durch das Anlegen einer Spannung von 120 Volt für eine Stunde wurden die Proteine im Gel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Färbung des Gels

mit Hilfe einer Coomassie Färbelösung (Tabelle 7). Hierfür wurden die Gele fünf Minuten bei Raumtemperatur und stetigem Schütteln in die Färbelösung gelegt. Um den Hintergrund zu reduzieren folgte das Entfärben des Gels mit Hilfe von dH₂O.

2.3.3 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Zelllysaten oder rekombinanten Proteinen wurde nach den Angaben im Herstellerprotokoll des BCA Protein Assay Kits durchgeführt.

2.3.4 Aktivitätskontrolle der mPKA-C α

Nach der Aufreinigung der mPKA-C α musste überprüft werden, ob diese sich in einem aktiven Zustand befand und Targetmoleküle phosphorylieren konnte. Da im Rahmen dieser Arbeit mit Peptiden gearbeitet wurde, wurde die Aktivität der Kinase sowohl mit Proteinen (CREB) als auch Peptiden überprüft.

2.3.4.1 *In vitro* Phosphorylierung von Targetmolekülen in Lösung

Um eine Phosphorylierung von Targetmolekülen vorzunehmen wurde entweder das Targetprotein CREB oder ein Standardpeptid (CREB AS 122 bis 141) mit der Kinase inkubiert. Dabei entsprach die Phosphorylierungsstelle dem Ser133 des CREBs. Eine spezifische Aktivität war bei der rekombinanten mPKA-C α nicht bekannt. Für die Versuche wurde diese konzentrationsnormiert eingesetzt. Das Kinaseassay baute sich wie folgt auf:

Tabelle 32 *in vitro* Phosphorylierung von wt-CREB in Lösung zum Nachweis der Aktivität der mPKA-C α

mPKA-Cα	125 μ M
10x PKA-Puffer	1x PKA Puffer
ATP	0,6 mM
wt-CREB	200 pmol

Tabelle 33 *in vitro* Phosphorylierung von Peptiden in Lösung zum Nachweis der Aktivität der mPKA-C α

mPKA-Cα	125 μ M
10x PKA-Puffer	1x PKA Puffer
ATP	0,6 mM
Peptid	20 nmol

Die Kinaseassays wurden anschließend für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Im Falle der Phosphorylierung von wt-CREB wurde die Phosphorylierung über einen WesternBlot analysiert (Abschnitt 2.3.5). Der Nachweis der Phosphorylierung des Standardpeptides erfolgte mit den in 2.3.6.1 und 2.3.6.3 beschriebenen Methoden.

2.3.4.2 *In vitro* Phosphorylierung von Peptiden auf einer Oberfläche

Um eine direkte Phosphorylierung der Peptide auf einer Nitrocellulosemembran durchzuführen, wurden zunächst 100 pM des Peptides auf eine angefeuchtete Nitrocellulosemembran pipettiert und für ca. eine Minute eingetrocknet. Anschließend erfolgte eine Blockierung der Oberfläche für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % BSA in PBST unter stetigem Schütteln. Anschließend wurde der Reaktionsansatz (ohne das Targetpeptid) (Tabelle 33) zugegeben. Nach der Inkubation für 30 Minuten bei 30 °C, wurde die Membran zweimal mit PBST gewaschen und wie in 2.3.5 beschrieben behandelt. Da bei dieser Methode stets mit enzymatisch gekoppelten Sekundärantikörpern gearbeitet wurde, erfolgte die Dokumentation mit Hilfe eines Flachbettscanners.

2.3.5 WesternBlot

Der WesternBlot dient dem immunologischen Nachweis von Bestandteilen eines komplexen Proteingemischs. Hierfür wurde zunächst wie in 2.3.2 beschrieben eine SDS-PAGE für die Auftrennung der Proteine durchgeführt. Da die Proteine auf einem Polyacrylamidgel für Antikörper unzugänglich sind, wurden diese zunächst auf eine Transfermembran übertragen, z. B. Nitrocellulose. Dies geschah durch das sogenannte Blotting im semi-dry Verfahren. Hierbei wurden zunächst sechs Whatmanpaper, das SDS-PAGE, die Transfermembran und zuletzt erneut drei Whatmanpaper luftblasenfrei gestapelt (Abbildung 13). Die Whatmanpaper, sowie die Transfermembran wurden vorher in Blotting Puffer getränkt (Tabelle 8). Durch das Anlegen einer Stromstärke von 1,2 mA pro cm² für 90 Minuten wurden die Proteine auf die Transfermembran übertragen.

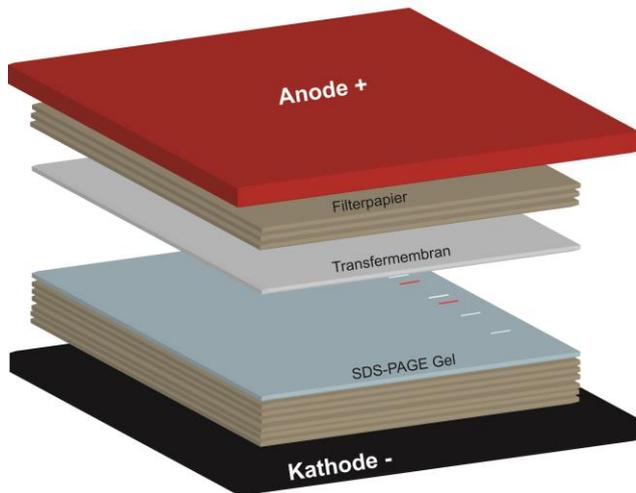


Abbildung 13 Schematische Darstellung des Semi-Dry Blotting Verfahrens

Nach Abschluss des Transfers wurde der Übertrag durch das Anfärben der Membran mit Ponceau S Lösung überprüft. Überschüssige Farbe konnte anschließend mit Hilfe von dH₂O entfernt werden. Nach der Dokumentation wurde die Membran weitere fünf Minuten mit dH₂O entfärbt. Um freie Bindestellen der Membran abzusättigen wurde diese anschließend mit 5 % BSA in PBST für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit einem Primärantikörper in PBST+1 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran zweimal für je fünf Minuten mit PBST gewaschen und anschließend mit einem Sekundärantikörper, verdünnt in PBST+1 % BSA, für eine Stunde bei Raumtemperatur unter stetigem Schütteln inkubiert. Die Primär-/Sekundärantikörper (Tabelle 27/Tabelle 28) wurden, soweit nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 1:1.000 verwendet. Abschließend wurde die WesternBlot Membran erneut zweimal für fünf Minuten mit PBST gewaschen.

Im Falle eines enzymatisch markierten Sekundärantikörpers, wie HRP oder alkalische Phosphatase, wurde die Membran mit dem entsprechenden präzipitierenden Farbstoff inkubiert. Die Dokumentation erfolgte je nach Sekundärantikörper entweder mit einem Flachbettscanner oder dem Typhoon Trio Variable Mode Imager.

2.3.6 Methoden zur Detektion phosphorylierter Peptide

Peptide können aufgrund des geringen Molekulargewichts nicht mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert werden. Daher wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, mit deren Hilfe ein Nachweis der Phosphorylierung an Peptiden möglich war.

2.3.6.1 High-performance thin-layer chromatography immunostaining (HPTLC-IS)

Der Nachweis phosphorylierter Peptide konnte mit Hilfe einer Auftrennung auf einer Dünnschichtchromatographieplatte mit anschließender Immunfärbung (Sambrook 2001) erfolgen (Abbildung 14). Diese Methode wurde im Rahmen der Doktorarbeit entwickelt, optimiert und veröffentlicht (Morschheuser, Mükusch *et al.* 2016)

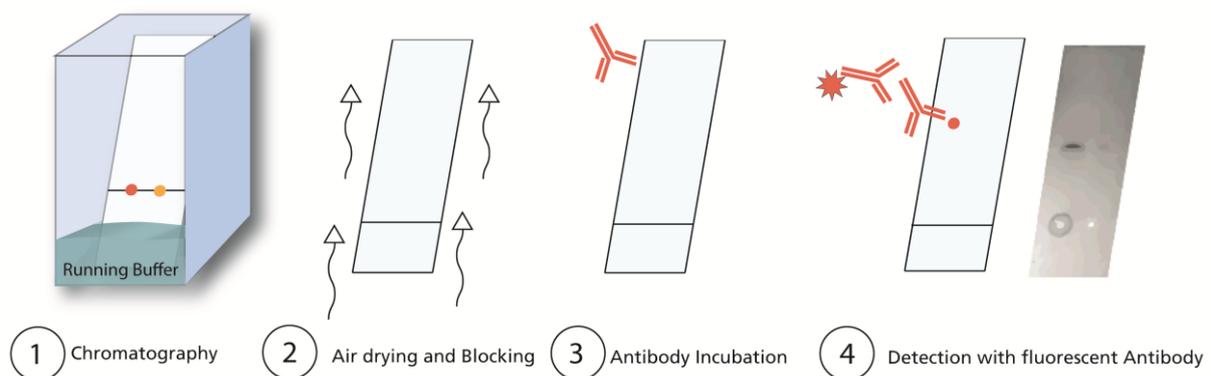


Abbildung 14 Schematische Darstellung einer HPTLC-IS

(1) Auftrag eines phosphorylierten Peptide (roter Punkt) und eines unphosphorylierten Peptides (gelber Punkt) auf eine Chromatographie Platte (HPTLC-Cellulose) und Durchführung der Chromatographie. (2) Anschließendes Lufttrocknen und Blocken der Oberfläche mit BSA. (3) Inkubation mit einem phosphospezifischen Antikörper (4) Inkubation der Platte mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper. Links schematisches Bild, rechts tatsächlich gemessenes Signal auf der Oberfläche. Spezifische Nachweis des phosphorylierten Peptides.

Hierbei wurde zunächst die HPTLC Cellulose Platte mit Methanol gewaschen und anschließend getrocknet. 1 cm von der unteren Kante entfernt wurde 10 µg Probe mit einer Glaskapillare aufgetragen und mit Hilfe des Laufpuffers (Tabelle 13) eine Chromatographie durchgeführt. Im Anschluss an die Chromatographie wurden die Platten getrocknet und in kleine Schalen überführt. Es erfolgte eine Blockierung freier Bindestellen an der Oberfläche für eine Stunde mit Hilfe von 5 % BSA (Blockierreagenz). Alle Inkubationen wurden bei 70 rpm bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde, dreimaliges Waschen mit PBST und die Inkubation mit dem

Sekundärantikörper (anti-rabbit, IgG, Alexa Fluor 555) für eine Stunde. Alle folgenden Schritte erfolgten, aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Fluorophors, abgedunkelt. Abschließend wurde die Platte dreimal mit PBST gewaschen und bei 55 °C getrocknet. Die Visualisierung erfolgte durch Anregen des Fluorophors bei 555 nm unter Zuhilfenahme des Typhoon Trio Variable Mode Imager.

2.3.6.2 Ninhydrin Färbung

Ninhydrin färbt alle primären Aminogruppen und wurde verwendet um den Auftrag auf den HPTLC Platten nachzuweisen. Hierfür wurden die Platten nach der wie in 2.3.6.1 beschriebenen Chromatographie, getrocknet und anschließend für 10 Sekunden in die Ninhydrinfärbelösung (Tabelle 14) gelegt. Durch eine anschließende Trocknung der Platten bei 80-100 °C im Trockenschrank erfolgte die Visualisierung der Proben. Es bildete sich ein schwach blauer bis lila farbener Niederschlag.

2.3.6.3 Nachweis von Phosphorylierten Peptiden mit Hilfe des DotBlot

Um den Nachweis von Phosphorylierungen an Peptiden mittels Dotblot durchzuführen, wurden 100 pM phosphoryliertes Peptid (ca. 2 µL) auf eine markierte Stelle einer angefeuchteten Nitrocellulosemembran pipettiert und für ca. eine Minute eingetrocknet. Anschließend wurde die Membranoberfläche wie in 2.3.5 beschrieben blockiert und behandelt.

2.4 Zellkultur Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde mit adhärenenten HEK293 Zellen (Human Embryonic Kidney cells, ACC-305, DSMZ) gearbeitet. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Zellkulturbank durchgeführt. Das Kultivieren der Zellen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die HEK293 Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 mL Reaktionsgefäß mit 5 mL Auftaumedium (Tabelle 20) überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g für fünf Minuten abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 15 mL Auftaumedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine

Zellkulturflasche überführt und zur Kultivierung in den Inkubator gestellt. Vorab wurde eine Probe (50 µL) in ein Reaktionsgefäß überführt. Die 50 µL Probe wurde 1:1 mit Trypanblau versetzt und mit Hilfe einer Thomakammer eine Zellzählung durchgeführt.

Um Zellen nach dem Kultivieren wieder einzulagern, erfolgte das Ablösen der Zellen und Bestimmen der Zellzahl wie in 2.4.2 beschrieben. Nach Bestimmen der Zellzahl wurden die Zellen in Einfriermedium (Tabelle 21) an Stelle von Kulturmedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C im Einfriercontainer gelagert. Nach 12 Stunden erfolgte das Überführen in die Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff.

2.4.2 Kultivierung der Zellen

Nachdem Auftauen der Zellen (s. 2.4.1) wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 90 % gesplittet. Hierfür wurde zunächst das alte Medium entfernt und die Zellkulturschale einmal mit 1 x PBS (Zellkultur) gewaschen. Der Puffer wurde abgenommen, damit anschließend ein Ablösen der Zellen mit Hilfe von 0,25 % Trypsin/EDTA für fünf Minuten bei 37 °C erfolgen konnte. Diese Reaktion wurde durch das Hinzufügen von 5 mL Kulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und eine Probe zum Bestimmen der Zellzahl entnommen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 200 x g für fünf Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen entsprechend der gewünschten Zellkonzentration ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Thomakammer.

2.4.3 Stimulierung des cAMP-Signalweges bei HEK293 Zellen

Zwei Tage vor Stimulierung der Zellen wurden die Zellen so ausgesät, dass am Tag der Stimulierung eine Zellzahl von $8 \cdot 10^6$ Zellen/mL pro 10 cm² Schale erreicht ist. Am Tag der Stimulierung wurde die Zelldichte mittels Mikroskop überprüft, wobei eine Konfluenz von ca. 90 % vorhanden sein sollte. Anschließend wurden die Zellen für zwei Stunden in 9 mL reinem DMEM ausgehungert. Die darauffolgende Stimulierung des cAMP-Signalweges erfolgte durch die Zugabe von 1 mL DMEM versetzt mit Stimulationsreagenz (50 µM Forskolin, sowie 10 µM IBMX, einem Phosphatasehemmer). Die Zellen wurden im Anschluss für 10 Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂ im Inkubator mit der Lösung inkubiert. Die angegebenen Konzentrationen entsprachen der Endkonzentration im Ansatz. Anschließend wurden die Zellen sofort

aus Eis gestellt, der Überstand entfernt und die Zellkulturschale mit 1 x PBS (Zellkultur) gewaschen. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers und 1 x PBS von der Oberfläche gelöst und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Abzentrifugieren der Zellen erfolgte bei 200 x g für fünf Minuten. Der Überstand wurde entfernt und die Zellyse mit Hilfe von MPER, versetzt mit einem Protease Inhibitor Cocktail (1:50), für 10 Minuten unter stetigem Schütteln durchgeführt. Nach erfolgter Lyse wurden die Zellreste bei 4 °C und 14000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand (Zellysat) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Das entstandene Pellet wurde in 1 x PBS resuspendiert und ebenfalls gelagert.

Da sich durch die Stimulierung der Phosphostatus von Proteinen geändert hat, wurde mit Hilfe eines WesternBlots (Abschnitt 2.3.5) und phospho-spezifischen Antikörpern die Stimulierung überprüft. Mittels BCA (Abschnitt 2.3.3) wurde der Proteingehalt des Zellysates bestimmt.

2.4.4 Transiente Zelltransfektion und Zellfärbung

Die transiente Transfektion der HEK293 Zellen wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt (pers. Mitteilung B. Morgenstern). Der Transfektionsansatz (Tabelle 34) wurde für 30 Minuten inkubiert und anschließend tropfenweise 10 µL pro Well auf die im 4-Well gewachsenen HEK293 Zellen gegeben. Nach 48 Stunden wurde der Überstand entfernt und die Zellen dreimal mit 1 x PBS vorsichtig gewaschen. Die Fixierung der transfizierten Zellen erfolgte durch 4 % PFA (Perfluoralkoxy)-Lösung bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen.

Tabelle 34 Transfektionsansatz

DNA ARMS	1,2 µg
DNA TRPVI	0,2 µg
DMEM	100 µL
Transfektionsreagenz	3,6 µL

Für eine Färbung der Zielproteine folgte die Permeabilisierung der Zellmembran durch 0,5 %tige TritonX-100 Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen, die Oberfläche mit 1 % BSA-Lösung für 15 Minuten blockiert und erneut dreimal mit 1 x PBS gewaschen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper KIDINS220 in 0,5 % BSA-Lösung bei Raumtemperatur über Nacht. TRPVI ist mit YFP direkt markiert und musste daher nicht mit einem Antikörper angefärbt werden. Am nächsten Tag wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen, die Zellen mit dem Sekundärantikörper anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 594 für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ablauf der Zeit 1 x PBS dreimal gewaschen. Bei allen Schritten wurden keine starken Bewegung des 4-Wellen vorgenommen, da dies zum Ablösen der Zellen geführt hätte. Die fixierten, transfizierten Zellen wurden mit Hilfe eines Konfokal Mikroskopes (LSM 510 von Zeiss) und dem Programm ZEN 2009 betrachtet. Die Aufnahmen der Zellen wurden immer bei einer 60 x Vergrößerung, 1 AU max. und gleichbleibenden Lasereinstellungen aufgenommen.

2.5 Methoden für *in vitro* Multiplexanalysen

2.5.1 Bead basierte Peptidanalyse mit Hilfe des BioPlex3D

Für eine Bead basierte Analyse des Phosphorylierungsstatus von Peptiden wurde das BioPlex3D genutzt. Hierbei wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit magnetischen Beads gearbeitet, den sogenannten *MagPlex Microspheres*. Dies sind carboxylierte magnetische Polystyrol Beads mit einem Durchmesser von 6,5 μm . An deren Oberfläche können mit Hilfe der EDC-NHS Chemie unterschiedliche Targets gekoppelt werden. Jeder Beadtyp beinhaltet eine spezifische Farbcodierung aus einem roten, infraroten und orange-roten Fluoreszenzfarbstoff. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse entstehen bis zu 500 unterschiedliche Beadregionen. Das Prinzip des BioPlex beruht auf dem eines Durchflusszytometers. Nach Aufnahme der Probe aus einer 96-Well Platte werden die magnetischen Beads nacheinander vermessen. Hierbei wird zunächst mit Hilfe des roten Lasers (λ_{ex} 635 nm) eine Anregung des internen Beadfarbstoffes vorgenommen und so die Zuordnung zu einer spezifischen Beadregion. Etwaige gebundene Analyten oder post-translationalen Modifikationen an einem solchen können mit Hilfe fluoreszenz-markierter Antikörper erfolgen. Hierbei erfolgt die Anregung des Reporters im grünen Wellenbereich (λ_{ex} 532 nm).

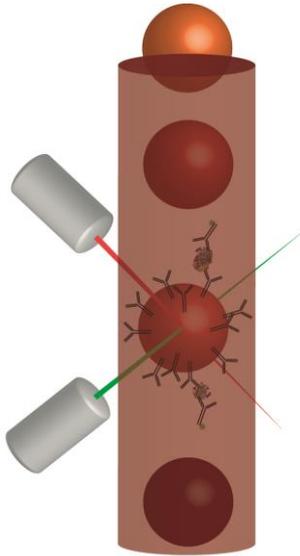


Abbildung 15 Funktionsweise des BioPlex3D

Die Beads (orange/rote Kugeln) werden wie im Durchflusszytometer einzeln vermessen. An diesen können bspw. gekoppelte Antikörper mit Hilfe von Sekundäntikörpern, die im grünen Bereich fluoreszieren, gelabelt werden. Zunächst erfolgt das Anregen des internen Beadfarbstoffes mit dem roten Laser, anschließend die Anregung des Sekundäntiköperers zum Nachweis des Analyten.

2.5.1.1 Kopplung von Peptiden an MagPlex Microspheres (Magnetische farbcodierte Beads)

Die Kopplung von Peptiden an magnetische farbcodierte Beads erfolgte nach dem Protokoll 4.2.1 des xMAP Cookbook (Angeloni, Cordes *et al.* 2014). Es wurden jeweils 5 µg Peptid an 1 Millionen MagPlex Beads gekoppelt. Als Lagerpuffer wurde 1 x PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Azid, pH 7.4 verwendet. Das Zählen der Peptid-Beads erfolgte mit Hilfe einer Thomakammer unter dem Mikroskop. Peptid-Beads lagerten im Dunkeln bei 4 °C. Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide beinhalten einen V5-Tag, weswegen die Kopplung mit einem anti-V5 Antikörper wie in 2.5.1.2 beschrieben überprüft wurde.

2.5.1.2 Immunoassay mit Peptid-Beads

Alle hierbei durchgeführten Schritte wurden aufgrund der fluoreszenten Farbcodierung der magnetischen Beads abgedunkelt durchgeführt. Für den Assay wurden 5000 der Peptid-Beads in je ein Well einer 96-Well Platte gegeben. Wurden mehrere Bead Regionen gleichzeitig verwendet, wurden diese zunächst im Single- und im Multiplex vermessen, um eventuelle Kreuzreaktivitäten der Peptide untereinander auszuschließen.

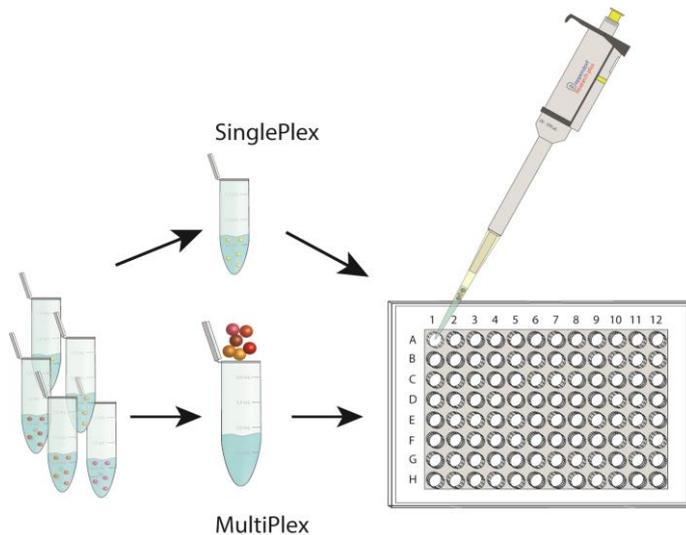


Abbildung 16 Single vs. Multiplex Bead Assay

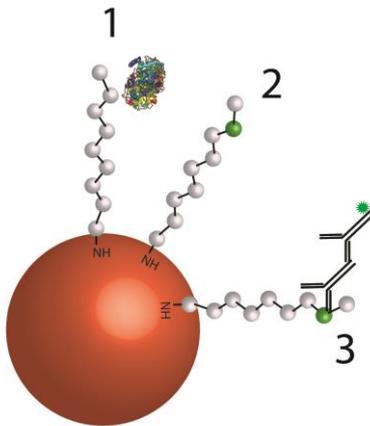
Es stehen mehrere gekoppelte Beadregionen zur Verfügung, an denen jeweils ein spezifisches Peptid gekoppelt war. Diese können entweder im SinglePlex (nur eine Beadregion pro Well) oder im MultiPlex (mehrere Beadregionen werden gemischt und dann in ein Well gegeben) vermessen werden.

Anschließend wurde die Peptid-Beads zweimal mit je 200 μL PBST mit Hilfe einer automatisierten Waschstation gewaschen. Die Waschstation beinhaltete Magneten unterhalb der Platte, um die Peptid-Beads während des Waschens am Boden zu halten. Im Anschluss wurden die Peptid-Beads mit einem Primärantikörper in PBST, 0,1 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur unter stetigem Schütteln von 600 rpm inkubiert, erneut mit Hilfe der automatisierten Waschstation dreimal mit PBST gewaschen und dann für eine Stunde mit einem R-Phycoerythrin markierten Sekundärantikörper (Tabelle 28) auf dem Schüttler inkubiert. Abschließend wurden die Peptid-Beads zweimal mit PBST gewaschen und für das Vermessen in 100 μL 1 x PBS resuspendiert.

2.5.1.3 *In vitro* Phosphorylierung von Peptid-Beads

Um Phosphorylierungen an Peptiden nachzuweisen wurden diese zunächst wie in 2.5.1.1 an die Beadoberfläche gekoppelt. Anschließend wurden die Beads in ein Well gegeben und zweimal mit PBST unter Zuhilfenahme der automatisierten Waschstation gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit der mPKA- $\text{C}\alpha$. Der Kinaseassayansatz setzte sich wie in 2.3.4.1 beschrieben zusammen, jedoch ohne das Targetmolekül. Pro Well wurden 100 μL Kinaseassayansatz verwendet, um eine optimale Durchmischung der Peptid-Beads zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und stetigem schütteln bei 600 rpm wurde durch Abnahme der Lösung sowie

dreimaligen Waschen mit PBST die Reaktion abgestoppt. Um den zeitlichen Verlauf einer Phosphorylierung zu betrachten wurde die Kinase zeitlich versetzt zu dem Ansatz hinzugefügt. Danach erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern wie in 2.5.1.2 beschrieben. Das Vermessen sowie die Auswertung erfolgte mit Hilfe des BioPlex3D und der Herstellersoftware xPonent 2.0.



- 1 Kinaseassay
- 2 Phosphorylation
- 3 Detection of Phosphorylation

Abbildung 17 *in vitro* Phosphorylierung von Peptid-Beads

Orange ist der Bead abgebildet, an welchen über den N-Terminus ein Peptid gekoppelt war. Im ersten Schritt wurde dieses Peptid mit einer Kinase inkubiert, welche zweitens für eine Phosphorylierung an der potentiellen Phosphorylierungsstelle sorgte. Nach der erfolgten Phosphorylierung konnte diese über einen Primären, sowie einen fluoreszent markierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden.

2.5.1.4 Messmethode und Datenauswertung der BioPlex3D Daten

Das Vermessen und Auswerten der Daten erfolgte mit Hilfe des BioPlex3D und der Software xPonent 2.0. Von jedem Well einer VWR 96 Wellplatte wurden hierbei mindestens 100 Einzelbeads pro Region, bei Standard-PMT und einem gesetzten Gate von 7.500-20.000, vermessen. Die Software generierte eine .csv Datei mit allen relevanten Daten wie z. B. Beadstatistiken, Medianwerte, Variationskoeffizient etc. Auf Grund der Arbeit mit Kinasen, welche eine höhere Varianz verursachen, wurde in dieser Arbeit stets mit den „Trimmed Data“ gearbeitet. Bei diesem werden 5 % der höchsten und niedrigsten Werte bei der Bildung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten nicht mit einberechnet. Die Rohdaten wurden bei Bedarf für eine statistische Auswertung herangezogen. (Cooperation 2013)

2.5.2 Peptid Mikroarrays

2.5.2.1 Slide Herstellung Epoxy

Alle in dieser Arbeit verwendeten Epoxy beschichteten Mikroarrayslides wurden am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie in der Außenstelle Bioanalytik und Bioprozesse in Potsdam-Golm hergestellt. Es wurde nach den Optimierungsversuchen stets mit dem gleichen Batch gearbeitet, um eventuelle Batch zu Batch Variationen innerhalb der Slides auszuschließen.

2.5.2.2 Herstellung und Aufbau der Peptid Mikroarrays

Die Herstellung der Peptid Mikroarrays erfolgte mit Hilfe des iTWO2-400 der Firma M2. Dieser ermöglicht mit Hilfe eines kontaktfreien Dispensierverfahrens über einen Piezzo-Kristall das Aufbringen von kleinsten Volumina auf die Oberfläche. Zunächst wurden alle Peptide mit Hilfe von 1 x PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zusammen mit einer Pufferkontrolle, dem Alexa Fluor 555 konjugiertem Antikörper sowie Positiv-/ und Negativkontrollen (Standardpeptid, sowie eine Alanin Mutante des Standardpeptides) für die mPKA-C α und für den verwendeten phospho-spezifischen Antikörper (phosphoryliertes Peptid, unphosphoryliertes Peptid) in eine 384-Well Platte überführt. Der Alexa Fluor 555 konjugierte Antikörper diente als sogenannter Eckpunktmarker auf dem Mikroarray, sodass stets die Orientierung der aufgetragenen Proben bekannt war. Nach dem Einstellen eines Tropfenvolumens von ca. 100 μ L wurde 1 nL Probe pro Spot aufgebracht. Um zu dokumentieren, dass tatsächlich ein Tropfen abgegeben wurde, wurde vor und nach jeder Probe eine Tropfenkontrolle durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte automatisch, wobei Tropfenvolumen, Abgabewinkel und Geschwindigkeit des Tropfens aufgezeichnet wurden. Hierbei wurden die Proben von A1 nach B1, C1 etc. fortlaufend aufgenommen und auf den Mikroarrayslide aufgebracht. Zwischen jeder Probe wurde ein intensives Waschprogramm mit PBST durchgeführt, womit eine Verschleppung der Proben von Well zu Well ausgeschlossen war. Jedes Peptid wurde in fünf Replikaten auf fünf Felder aufgeteilt und auf den Mikroarrayslide aufgebracht. Durch die Definition von fünf einzelnen Feldern, in denen jeweils randomisiert gespottet wurde, konnten spätere Effekte (z. B. durch ungleichmäßige Inkubation mit Lösungen, Flussgeschwindigkeiten etc.) vernachlässigt werden (Abbildung 18). Der Spot zu Spot Abstand betrug immer

600 μm . Nach der Herstellung der Peptid Mikroarrays wurden die Slides unter Vakuum bei 4° C für mindestens 48 Stunden gelagert. Für die Probenzuordnung wurde das .gal-File Format verwendet.

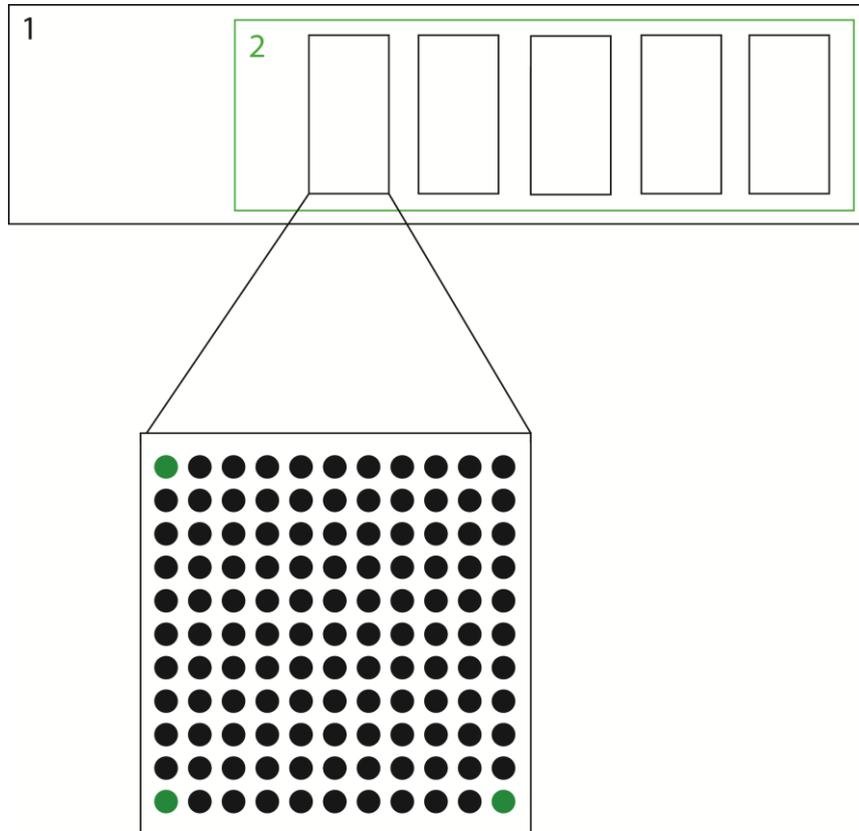


Abbildung 18 Aufbau des Peptid Mikroarrays

1) Stellt die Gesamtfläche des Mikroarrayslides dar. Da die Peptid Mikroarrays später mit Hilfe einer automatisierten Hybridisierstation gehandhabt wurden, stand nur ein begrenzter Teil des Epoxy beschichteten Slides für das Aufbringen der Proben zur Verfügung (grüne Umrandung 2) In diesem Rahmen wurden fünf unabhängige Felder definiert (schwarze Kästen). In diesen wurden die Proben randomisiert gespottet. Die Eckpunktmarker (grüne Punkte) befanden sich in jedem der Felder an derselben Position.

2.5.2.3 Handhabung der Peptid Mikroarray Slides

Alle Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu reduzieren. Nach der Lagerung für mindestens 48 Stunden wurden die Slides einmal mit dH_2O gewaschen und die Oberfläche durch Überschichten der Slides mit 50 mM Ethanolamin, unter dem Abzug bei Raumtemperatur und stetigem Schütteln von 70 rpm, blockiert. Nach zweimaligen Waschen mit PBST wurden die Slides in die automatisierte Hybridisierstation zur Slideinkubation gelegt und fixiert (Abbildung 19). Alle weiteren Schritte wurden mit Hilfe der Hybridisierstation durchgeführt. Vor jeder Nutzung der automatisierten Hybridisierstation wurden alle Schläuche zweimal für 10 Minuten mit PBST gereinigt.



Abbildung 19 Automatische Hybridisierstation zur Slideinkubation

Die Slides wurden in die Station eingelegt. Durch Schließen des Deckels wurden die Slides fixiert. Durch einen O-Ring wurde die Inkubationsfläche definiert und abgedichtet. Anschließend wurden Lösungen mit Hilfe eines automatisierten Pumpensystems über die Slides gepumpt. Hierbei konnten bis zu 10 Slides parallel bearbeitet werden.

Nach dem Fixieren der Slides in den Hybridisierkammern wurden diese zunächst einmal für 10 Minuten mit 20 mL PBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen für 10 Minuten mit PBST entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem fluoreszenz markierten Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Slides erneut zweimal mit PBST gewaschen. Nach dem Öffnen der Kammern wurden die Slides herausgenommen und mit Stickstoff getrocknet. Die Slides wurden mit dem Axon GenePix 4300A Scanner unter konstanter Laserstärke (40 %) und PMT (Photomultiplier, PMT Wert 400) Einstellungen eingescannt. Um eine möglichst genaue Aussage über den Versuchsablauf treffen zu können, wie z. B. Autofluoreszenz der Peptide, Hintergrundeffekte, Einfluss der Inkubationsschritte auf den Eckpunktmarker, wurden die Slides zu verschiedenen Zeitpunkten der Prozessierung eingescannt:

- Direkt nach dem Spotten
- Nach dem Blocken der Oberfläche
- Nach der Primärantikörper-Inkubation
- Nach der Sekundärantikörper-Inkubation

Da weder eine Autofluoreszenz der Peptide, noch ein Einfluss auf den Eckpunktmarker festgestellt wurde, erfolgte die Datenanalyse nur nach der Sekundärantikörper-Inkubation.

2.5.2.4 *In vitro* Phosphorylierung von Peptiden auf Mikroarraybasis

Um eine *in vitro* Phosphorylierung der Peptide auf den Mikroarrays durchzuführen, wurde der Kinaseassayansatz wie in Tabelle 32 vorbereitet. Es wurde kein Targetprotein dazugegeben. Die Slides wurden nachdem Fixieren in der Hybridisierstation 30 Minuten bei 30°C mit dem Kinaseassayansatz inkubiert. Dies erfolgte durch stetiges Hin-und Her-pumpen der Lösung über die Slides. Anschließend wurden die Slides wie in 2.5.2.3 behandelt, wobei der Waschpuffer durch PBST+ 1 % (v/v) SDS ersetzt wurde (Abbildung 20).

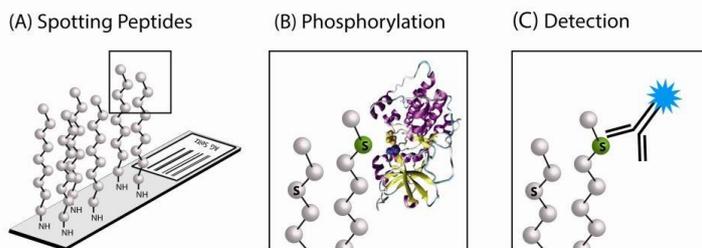


Abbildung 20 *in vitro* Phosphorylierung von Peptiden auf Peptid Mikroarrays

Wie in Abbildung (A) zu sehen, wurden zunächst die Peptide auf die Epoxy beschichteten Glasslides aufgebracht. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der mPKA-C α , welche Targetpeptide phosphorylierte (B). Anschließend erfolgte die Detektion der Phosphorylierung mit Hilfe von Antikörpern.

2.5.2.5 Datenauswertung

Die Datenauswertung der Peptid Mikroarrays erfolgte mit Hilfe der GenePixPro 7 Software.

Hierbei erfolgte zuerst eine Zuordnung der Features zu den Spots. Nachdem dies erfolgt war, wurde der lokale Hintergrund jeden Spots durch die Software berechnet und von dem eigentlichen Signal abgezogen. Um eine Autofluoreszenz der Peptide zu berücksichtigen wurden die Slides auch direkt nachdem Spotten gescannt und die Daten analysiert. Keines der Peptide wies eine deutliche Eigenfluoreszenz auf, sodass dies nicht weiter betrachtet wurde.

Die Rohdaten nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden für die Auswertung verwendet. Hierbei wurde stets mit den Hintergrund korrigierten MFI Werten gearbeitet. Es wurde anschließend aus den fünf Replikaten der Medianwert und die entsprechende Standardabweichung berechnet. Ebenfalls wurde eine Normierung der Daten mit Hilfe des Eckpunktmarkers vorgenommen. Hierbei wurde der Mittelwert des Eckpunktmarkers als 1 angenommen und für alle anderen Daten ein Korrekturfaktor berechnet. Der Eckpunktmarker (anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555) wurde nicht durch das Assay beeinflusst und konnte daher zu diesem Zweck herangezogen werden. Eine Normierung ist notwendig um mathematisch Abweichungen bei der Tropfengröße oder des Immobilisierungsverhaltens herauszurechnen. Die Normierung und alle weiteren Datenbearbeitungen der Rohdaten wurden in OriginPro 9.1 vorgenommen.

2.6 Targetproteine und Peptiddesign

2.6.1 Auswahl an Targetproteinen im Schmerzkontext

Die Auswahl der Targetproteine erfolgte innerhalb eines Konsortiums und beruht zum Teil auf Vorarbeiten der Kooperationspartner. Diese verwendeten RNA-Sequencing Methoden, um bei frisch präparierten TRPV1 positiven DRG-Neuronen nach Stimulusgabe eine Hoch- und Runterregulierung von Genen zu analysieren (Isensee, Diskar *et al.* 2014, Isensee, Wenzel *et al.* 2015). Durch einen Abgleich dieser Daten mit der durch Perkins *et al.* entworfenen PainNetworks² Datenbank, sowie einer PetriNetz Analyse durch Dr. Mary-Ann Blaetke der Universität Magdeburg wurden für diese Arbeit vorrangig GPCRs ausgewählt, die im Schmerzkontext als primäre Schmerzgene gelten und somit eine direkte Verbindung zum Schmerzkontext aufweisen (Perkins, Lees *et al.* 2013, Blätke, Rohr *et al.* 2014). GPCRs sind mit *in vitro* Methoden nur schwer zu analysieren, da sie in die Zellmembran eingebaut sind und bei einer Aufreinigung meist ihre Funktionalität verlieren bzw. der C-Terminus des G-Proteins in einer Mizelle nach innen gewandt vorliegt und somit eine Analyse nach möglichen Phosphorylierungsstellen schwer möglich ist. Des Weiteren ist eine Analyse von exakten Phosphorylierungsstellen innerhalb der GPCRs schwer möglich, weshalb

² <http://www.painnetworks.org> (Stand November 2016)

das Arbeiten mit Peptiden bei GPCRs einen Vorteil liefert. Folgende Targetproteine wurden ausgewählt:

Tabelle 35 Targetproteine im Schmerzkontext

Protein	Spezies	UniProt ID
Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	Mensch	Q9ULH0
Kinase D-interacting substrate of 220 kDa (ARMS)	Ratte	Q9EQG6-2
Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)	Mensch	Q8NER1
Mu-type opioid receptor (MOR)	Mensch	P35372
Delta-type opioid receptor (DOR)	Mensch	P41143
Adenylate cyclase type 8 (ACVIII)	Mensch	P40145
Adenylate cyclase type 5 (AC V)	Mensch	O95622
Adenylate cyclase type 1 (AC I)	Mensch	Q08828

2.6.2 Peptid Design

Zunächst wurde ein Standardpeptid für die mPKA-C α zur Etablierung des Assays designed. Die Sequenz deckte hierbei AS 122-141 (QKRREILSRRP**S**YRKILNDL) des humanen CREB (UniProtID: P16220) ab, wobei die Phosphorylierungsstelle dem Ser133 entsprach, welches ein bekanntes Target ist. Des Weiteren beinhalteten die Peptide einen C-Terminalen V5 Linker, um die Kopplung an Oberflächen zu überprüfen. Basierend auf den Resultaten der Optimierungsversuche (Abschnitt 3.2.4) wurden die Peptide anschließend folgendermaßen angefertigt:

Zur Identifizierung potentieller Serin/Threonin Kinasemotive der Targetproteine (Tabelle 35), wurden zwei Datenbanken verwendet.

- http://hprd.org/PhosphoMotif_finder (Stand August 2016)
- <http://www.phosphosite.org/homeAction.action> (Stand August 2016)

Es wurden nur die cytoplasmatischen Abschnitte der Proteine betrachtet.

Nach der Identifizierung der potentiellen Phosphorylierungsstellen für AGC Kinasen wurden rund um diese die Peptide designed. Alle Peptide hatten eine Länge von ca. 30 Aminosäuren. Die potentielle Phosphorylierungsstelle hatte einen Abstand von 7 Aminosäuren vom N-Terminus (Immobilisierung), anschließend 5 weitere Aminosäuren und abschließend am C-Terminus den V5-Tag (Abbildung 21). Die Sequenzen wurden aus der originalen humanen Proteinsequenz entnommen.

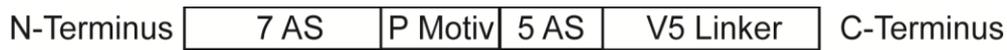


Abbildung 21 Peptidaufbau

Daraus resultierend wurden in dieser Arbeit insgesamt 186 unterschiedliche Peptide mit bekannten und potentiellen Phosphorylierungsstellen verwendet (Anhang 10, Tabelle 54). Ausgenommen sind hierbei die Peptide, die zur Optimierung und zur Charakterisierung des anti-pPKA Antikörpers verwendet wurden.

3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Arbeit beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es post-translationale Modifikationen (Phosphorylierungen) von Peptiden auf Multiplexing Plattformen nachzuweisen. Hierbei sollte die Phosphorylierung der Peptide sowohl mit Zelllysat als auch mit rekombinanten gereinigten Kinasen erfolgen und Unterschiede im Phosphorylierungsmuster analysiert werden. Die Ergebnisse lassen sich in sechs Abschnitte unterteilen:

Abschnitt 3.1: Aufreinigung der rekombinanten murinen PKA-C α

Abschnitt 3.2: Etablierung und Optimierung eines Kinaseassays auf Mikroarrays

Abschnitt 3.3.: Zellkulturexperimente und Stimulierung

Abschnitt 3.4: Kinaseassay zur Identifikation von PKA Targets im Schmerzkontext mittels Peptid Mikroarrays

Abschnitt 3.5: Verifikation der Peptid Mikroarray Daten, sowie die Analyse potentieller Phosphorylierungsstellen an ARMS mittels BioPlex3D

Abschnitt 3.6: Alternative Nachweisttechnologien zum Nachweis von Phosphorylierungen an Peptiden

Zunächst werden die Aufreinigung und Aktivitätskontrolle der rekombinanten Proteinkinase A (mPKA-C α) gezeigt. In Abschnitt 3.2 werden die Ergebnisse der Qualitätskontrolle einzelner Assaykomponenten, sowie die Etablierung des Kinaseassays auf Peptid Mikroarrays gezeigt. In Abschnitt 3.3 folgen die Daten der Etablierung der Stimulierung des PKA Signalweges auf HEK293 Zellen und dem Nachweis der aktiven Kinasen im Zelllysate. Im Anschluss werden im Abschnitt 3.4 die Ergebnisse des Kinaseassays auf Peptid Mikroarrays mit mPKA-C α und Zelllysate mit potentiellen Targets des Schmerzkontextes beschrieben und in Abschnitt 3.5 die Daten auf einer unabhängigen Plattform, dem BioPlex3D, verifiziert. Auf Grund von *in vivo* Daten von Kooperationspartnern wurden weitere potentielle Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α bei ARMS aus der Ratte mittels des BioPlex3D analysiert (Abschnitt 3.5.2). Um Kinasetargets unabhängig von Antikörpern analysieren zu können, werden im Abschnitt 3.6 alternative Nachweisttechnologien für die Analyse von Phosphorylierungen an Peptiden aufgezeigt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptidsequenzen sind Rohprodukte mit einem Säureamid am C-Terminus und einer Reinheit von mind. 80 %. Die Synthese wurde mittels MALDI-MS durch den Hersteller überprüft. Die Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

3.1 Aufreinigung und Aktivitätskontrolle der rek. mPKA-C α

In der Arbeit wurden Versuche zur Phosphorylierung von Peptiden bzw. Proteinen mit der katalytischen Untereinheit der murinen Protein Kinase A (mPKA-C α) durchgeführt. Diese ist eine sehr gut charakterisierte Kinase der AGC-Kinasen. Für die Versuche wurde die mPKA-C α in *E. coli* überexprimiert und mittels IMAC aufgereinigt.

3.1.1 Plasmidpräparation pET15b- murine His₆-PKA-C α (pET15b PKA Cat)

Das Plasmid pET15b PKA Cat wurde vom Kooperationspartner (Prof. F. Herberg, Universität Kassel) zur Verfügung gestellt (Narayana, Cox *et al.* 1997). Nach der Aufreinigung des Plasmides aus BL21(DE3)+pLys Zellen wurde, um die Größe des Inserts zu überprüfen, ein Restriktionsverdau mit *Nde*I und *Hind*III durchgeführt. Die Gesamtgröße des Plasmides beträgt 7383 bp, die Größe des Inserts 1980 bp.

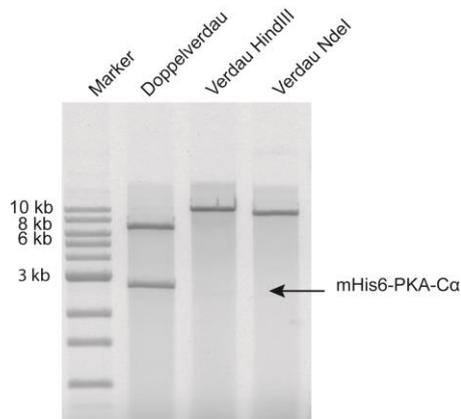


Abbildung 22 Agarosegel vom Restriktionsverdau des Plasmides pET15b_murine His₆-PKA-C α mit *NdeI* und *HindIII* Bei dem Doppelverdau (Spur 1) ist unter 3 kb eine deutliche Bande zu detektieren, die dem Insert der murinen His₆-PKA-C α entspricht. Bei den jeweiligen Einzelverdau (Spur 2 und Spur 3) kam es zur Linearisierung des Plasmides. 0,8 % Agarosegel, 80 V, 0,5xTBE

Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, wurde durch den Doppelverdau mit *HindIII* und *NdeI* ein größeres Vektorfragment als auch ein kleineres Insertfragment erhalten. Bei den Einzelverdau durch *HindIII* bzw. *NdeI* kam es zur Linearisierung des Plasmides.

Nachdem erfolgreichen Aufreinigen der Plasmid DNA und dem Anfertigen des Kontrollverdau wurde das Plasmid in BL21(DE3)-pLysS Zellen transfiziert und Kulturen für die Überexpression der mPKA-C α angesetzt.

3.1.2 Aufreinigung der mPKA-C α

Die mit einem His₆ Tag versehene mPKA-C α wurde mit Hilfe Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) im aktiven Zustand aufgereinigt. Hierfür wurden zunächst BL21(DE3)-pLysS Bakterien mit pET15b_His₆-murine PKA-C α transformiert und auf Selektivmedium ausgestrichen. Mit einem der gewachsenen Klone wurde eine Vorkultur angesetzt, diese am nächsten Tag in die Hauptkultur überführt, bei einer OD₆₀₀ mit IPTG induziert und die Expression der mPKA-C α gestartet. Da diese in hohen Konzentrationen toxisch für die Bakterienkultur ist wurde, um ein optimales Expressionslevel zu gewährleisten, zunächst überprüft zu welchem Zeitpunkt nach der Induktion das maximale Expressionslevel der mPKA-C α erreicht worden ist. Hierbei wurde zu sieben Zeitpunkten (0, 1, 2, 3, 4, 10, 19 Stunden) nach der Induktion Proben entnommen, diese mit Probenpuffer versetzte, aufgekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt, sowie ein WesternBlot zur Kontrolle angefertigt (Abbildung 23).

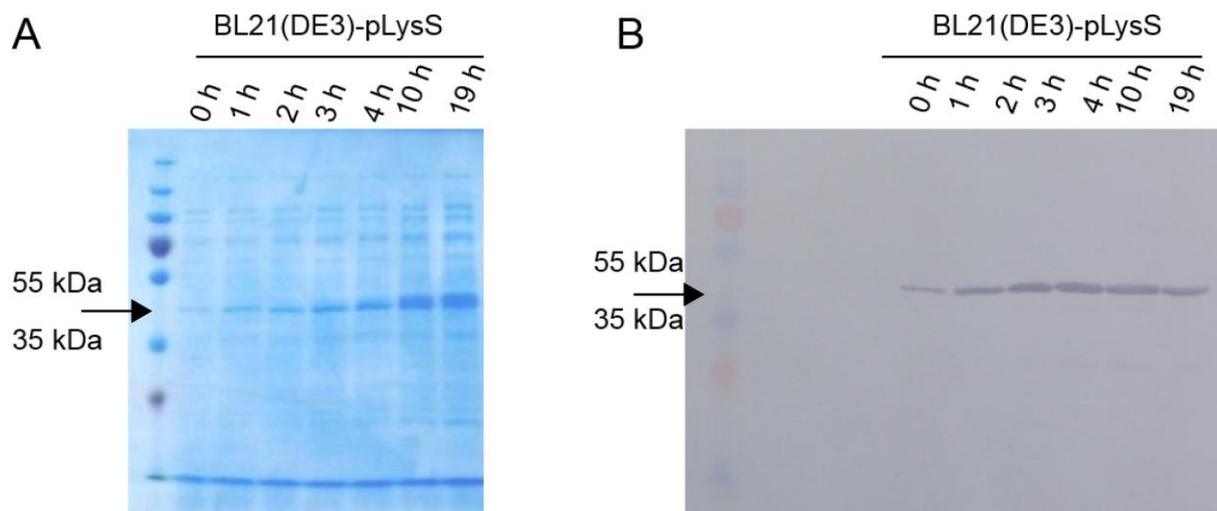


Abbildung 23 SDS-PAGE und WesternBlot der Expression der mPKA-C α zu verschiedenen Zeitpunkten

Aufgetragen sind Induktionsproben von BL21(DE3)+pLysS: vor Induktion, 1 h nach Induktion, 2 h nach Induktion, 3 h nach Induktion, 4 h nach Induktion, 10 h nach Induktion, 19 h n. Induktion. (A) 12% SDS-PAGE; (B) WesternBlot entwickelt mit RGS-His-HRP (1:1000). Nach der Induktion ist eine deutliche Überexpression der mPKA-C α erkennbar, wobei nach 4 h die maximale Expression erreicht ist.

Mit zunehmender Dauer der Induktion nimmt die Expression der mPKA-C α zu (Abbildung 23). Ab einer Induktion von 4 - 10 Stunden ist keine weitere Zunahme zu erkennen (Abbildung 23, A). Um sicherzustellen dass es sich dabei um die mPKA-C α handelt und um Abbauprodukte zu detektieren wurde ein WesternBlot angefertigt und die His₆ getaggte mPKA-C α mit Hilfe eines RGS-HIS-HRP Antikörpers nachgewiesen. Ab einer Induktionsdauer von vier Stunden war keine Zunahme der Signalintensität mehr zu beobachten und das maximale Expressionslevel erreicht (Abbildung 23, B). Für alle Aufreinigungen der mPKA-C α wurde eine Expressionsdauer von vier Stunden gewählt. Bei der Aufreinigung der mPKA-C α wurde nach jedem Schritt der Aufreinigung eine Probe entnommen und diese mittels SDS-PAGE analysiert:

- Nach der Zelllyse (n.L)
- Überstand (ÜS)
- Pellet (P)
- Durchlauf (D)
- Drei Waschproben (W)
- Proben der Elution (E 1, 2, 3, 4)

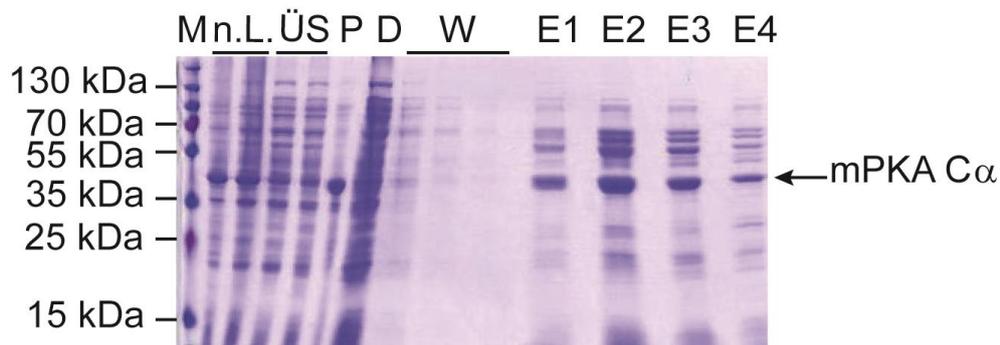


Abbildung 24 SDS-PAGE der Aufreinigung der mPKA-C α

Es erfolgte eine Analyse der während der Reinigung entnommenen Proben mittels SDS-PAGE. Nach der Zellyse (n.L.) ist eine Vielzahl an Proteinen in der Lösung vorhanden. Nach Zentrifugation befinden sich ein Großteil der Proteine im Überstand, während auf Höhe der mPKA-C α auch ein deutliches Signal in der Pelletfraktion sichtbar ist. Im Durchlauf (d.h. nach dem Inkubieren der NiNTA-Agarose mit dem Überstand) befand sich der Großteil der Proteine. Es folgte das Waschen der NiNTA-Agarose bei welchem nicht spezifische Binder entfernt werden und anschließend die Elution der an der NiNTA gebundenen Proteine. Neben der mPKA-C α bei ca. 42 kDa ist in den Elutionen (E1, E2, E3, E4) auch weitere Proteine sichtbar.

Nach der Lyse der Zellen befindet sich der Hauptanteil der mPKA-C α als lösliches Protein im Überstand (Abbildung 24, n.L. und ÜS), das fast vollständig an das NiNTA Material bindet (D). Im Pellet (P) sind nur geringe Mengen an mPKA-C α zu erkennen. Nach mehrmaligen Waschen der NiNTA-Agarose, wurde die mPKA-C α eluiert. In allen vier Elutionen ist auf Höhe der mPKA-C α eine Bande zu sehen. Neben der mPKA-C α Bande sind auch eine Vielzahl anderer Banden erkennbar.

Das für die Elution verwendete Imidazol verfälscht den Nachweis des Proteingehaltes mittels BCA, weswegen die mPKA-C α in 1 x NaMOPS umgepuffert wurde. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Assays. Für die Kinaseassays musste die Kinase sich in einem aktiven Zustand befinden, weswegen ein Aktivitätsnachweis der Kinase erfolgte.

3.1.3 Aktivitätsnachweis der mPKA-C α

Zur Überprüfung der Aktivität der mPKA-C α wurde humanes wt-CREB mit der mPKA-C α und ATP für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, anschließend auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis der Phosphorylierung des wt-CREBs erfolgte mit einem anti-pCREB Antikörper, der die Phosphorylierung der mPKA-C α an Ser133 von CREB spezifisch detektiert. Als Kontrolle wurde wt-CREB ohne die Inkubation mit der mPKA-C α (neg Ktrl), bereits phosphoryliertes wt-CREB

(pos Ktrl) und wt-CREB das mit ATP, aber ohne mPKA-C α (w/o mPKA-C α) inkubiert wurde verwendet.

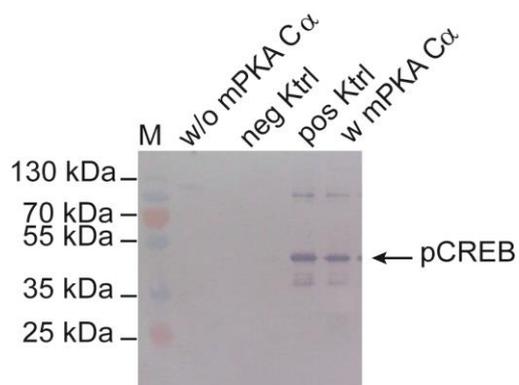


Abbildung 25 WesternBlot des Aktivitätsnachweises der mPKA-C α mit wt-CREB.

Die Aktivität der mPKA-C α wurde mit Hilfe der *in vitro* Phosphorylierung ihres Targets wt-CREB nachgewiesen. Als Negativkontrolle (neg Ktrl) dient hierbei das wt-CREB, als Positivkontrolle schon phosphoryliertes CREB (pCREB). Nach der Inkubation mit 5 ng/ μ l mPKA-C α kann mit Hilfe des p-CREB Antikörpers eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die aufgereinigte mPKA-C α befindet sich in einem aktiven Zustand und ist in der Lage Targetmoleküle zu phosphorylieren.

In Abbildung 25 ist die Phosphorylierung von wt-CREB durch die mPKA-C α gezeigt. In Gegenwart von ATP und der murinen PKA wurde wt-CREB phosphoryliert. Diese Phosphorylierung konnte durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Ohne Kinase (w/o mPKA-C α) bzw. ATP (neg Ktrl) fand keine Phosphorylierung statt. Das Ergebnis zeigt, dass sich die Kinase nach der Aufreinigung in einem aktiven Zustand befand (Abbildung 25).

In folgenden Kinaseassays wurde jeweils eine definierte Menge an Kinase eingesetzt. Für die meisten Versuche wurden Peptide eingesetzt. Um die Phosphorylierung von Peptiden durch die mPKA-C α zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Methoden zum einfachen und schnellen Nachweis von phosphorylierten Peptiden getestet. Diese Methoden und deren Etablierung werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.2 Überprüfung der Assaykomponenten und Etablierung des Peptid Mikroarrays

Um mit Multiplexing Plattformen für Screeningansätze arbeiten zu können müssen für alle Komponenten entsprechende Kontrollen durchgeführt werden.

Die generierten Daten müssen mindestens mit einer weiteren unabhängigen Plattform-/ Analysemethode überprüft werden, sodass falsch-positive oder falsch-negative Aussagen ausgeschlossen werden können. Hierfür wurden verschiedene Nachweissysteme für den schnellen Nachweis von Phosphorylierungen an Peptiden getestet und verglichen. Die Etablierung erfolgte mit dem Standardpeptid (Peptid: HQKRREILSRRPSYRKILNDLKGKIPNPLLGLDST) und dem phosphoryliertem Standardpeptid (p-Peptid: HQKRREILSRRPpSYRKILNDLKGKIPNPLLGLDST) für die mPKA-C α . Rot markiert ist hierbei die Erkennungssequenz des anti-pPKA Antikörpers bzw. die Targetsequenz der mPKA-C α (RRXS) mit dem phosphorylierbaren Serin, sowie blau markiert der V5-Tag. Für die Negativkontrolle wurde das Serin zu einem Alanin verändert.

3.2.1 Hochleistungsdünnschichtchromatographie zum Nachweis phosphorylierter Peptide

Die klassische Dünnschichtchromatographie (DC) trennt Moleküle auf Grund ihrer unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften auf und eignet sie sich unter anderem zur Detektion kleiner Moleküle wie z.B. Peptiden (Lepri, Desideri *et al.* 1980, Bhusan, Mahesh *et al.* 1989, van der Geer und Hunter 1994). Ziel war es mit Hilfe der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) eine einfache und schnelle Unterscheidung zwischen phosphorylierten Peptiden und unphosphorylierten Peptiden vornehmen zu können. Dazu wurde die HPTLC mit einem immunologischen Nachweis kombiniert werden.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden HPTLC-Cellulose Glasplatten ausgewählt. Als Laufmittel wurde das optimierte Laufmittel (n-Butanol/Eisessig/Wasser 2,75:1:2) verwendet (Panchagnula, Mikulskis *et al.* 2007). Für den Versuch wurden 10 μ g Standardpeptid bzw. phosphoryliertes Standardpeptid (Positivkontrolle) auf die Startlinie (1 cm oberhalb der Plattenkante) getropft, die Peptide chromatographisch aufgetrennt und im Anschluss nachgewiesen. Der

Nachweis erfolgte entweder über Ninhydrin, welches unspezifisch alle Peptide anfärbt oder mittels spezifischer Antikörper.

Die getesteten Optimierungen des Laufmittels konnten keine Trennung von phosphorylierten und unphosphorylierten Peptid mit Hilfe des Laufmittels ermöglichen. Für den immunologischen Nachweis von Peptiden auf Dünnschichtchromatographieplatten (HPTLC-Cellulose) und somit eine Unterscheidung zwischen Peptid und p-Peptid vornehmen zu können, wurde die HPTLC-Cellulose getrocknet, die Oberfläche blockiert und anschließend ein klassisches Sandwich Immunoassay durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden der anti-pPKA Antikörper (1:1.000), sowie ein gegen den V5-Tag der Peptide gerichteter anti-V5 Antikörper (1:10.000) verwendet. Ein enzymatisch gekoppelter Nachweis war auf HPTLC-Cellulose nicht möglich, da dies zu einem sehr hohen Hintergrundsignal führte. Es wurde stattdessen ein anti-rabbit, IgG, Alexa Fluor 555 fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper für die Detektion verwendet.

Der klassische Sandwich Assay wurde hierbei für die Anwendung auf HPTLC-Cellulose adaptiert. Folgenden Schritte wurden variiert:

- Trocknungszeit der HPTLC-Cellulose Platten nach der Chromatographie
- Intensität des Schüttelns bei allen Inkubationsschritten
- Dauer der Antikörperinkubation

Abbildung 26 zeigt den Nachweis von den Peptiden (Peptid und p-Peptid) auf HPTLC-Cellulose, die sich nur durch eine Phosphatgruppe unterscheiden.

Bei der Färbung mit Ninhydrin (Abbildung 26, A) und dem immunologischen Nachweis mit dem anti-V5 Antikörper (Abbildung 26, B) können beiden Peptide detektiert werden. Beim Nachweis mit dem anti-pPKA Antikörper (Abbildung 26, C) der nur das phosphorylierte Protein detektiert, konnte das p-Peptid spezifisch detektiert werden.

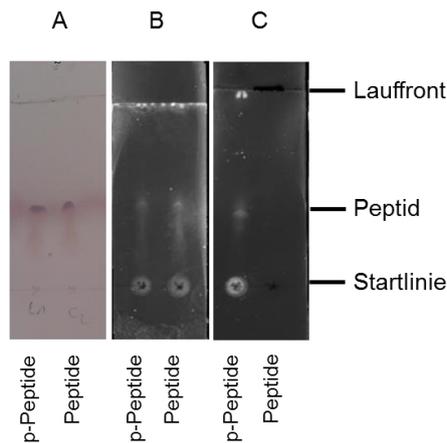


Abbildung 26 Immunologische Nachweis von Peptiden mittels Dünnschichtchromatographie

(A) Ninhydrin (B) anti-V5 Antikörper (C) anti-pPKA Antikörper. (A) Die Ninhydrinfärbung dient als generelle Kontrolle für die Dünnschichtchromatographie. In Teil B der Abbildung ist ein anti-V5 Antikörper verwendet worden, um zu zeigen, dass sowohl das p-Peptid als auch das Standardpeptid aufgetragen worden sind. In Teil C wurde ein phospho-spezifischer Antikörper verwendet der ausschließlich das p-Peptid detektiert. Es ist möglich einen spezifischen immunologischen Nachweis von Peptiden auf HPTLC-Cellulose Platten nachzuweisen. Pro Spot sind 10 µg des jeweiligen Peptides aufgetragen.

Nachdem eine Unterscheidung der Peptide hinsichtlich des Phosphostatus möglich war, wurde überprüft ob eine semi-quantitative Analyse vorgenommen werden kann (Abbildung 27). Dies war wichtig, falls die Kinase nur einen Teil des eingesetzten Peptides phosphoryliert. Hierfür wurden sechs Peptidgemische mit sinkendem Anteil p-Peptid im Verhältnis zu Peptid hergestellt (100, 70, 50, 30, 10, 0 % p-Peptid), auf die HPTLC-Cellulose aufgetragen, eine Chromatographie durchgeführt, getrocknet, geblockt und mit dem anti-pPKA Antikörper, sowie dem sekundären anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555 konjugiertem Antikörper, inkubiert.

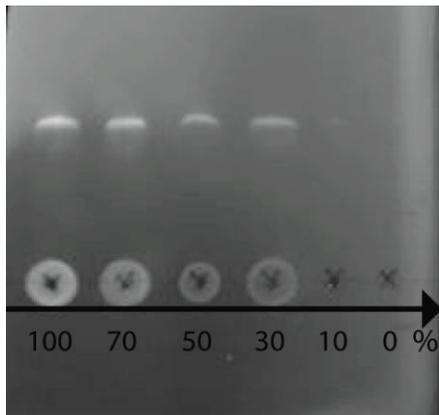


Abbildung 27 Semi-Quantitative Analyse eines Peptidgemisches mittels DC gekoppelt mit einem Immunoassay

Es wurden zunächst Peptidgemische hergestellt die einen sinkenden Anteil (100-0 %) an phosphoryliertem Peptid (p-Peptid) und einen steigenden Anteil unphosphoryliertes Standardpeptid enthielten. Je Spot wurden 5 μ L (16 μ g Peptidlösung) des jeweiligen Gemischs aufgetragen. Der Nachweis des p-Peptides erfolgte mit dem anti-pPKA Antikörper. Es konnte bis 10 % p-Peptid, was 1,6 μ g entspricht, nachgewiesen werden und eine quantitative Analyse scheint möglich zu sein.

Abbildung 27 zeigt, dass mit abnehmender p-Peptidkonzentration das Fluoreszenzsignal ebenfalls abnimmt. Das bedeutet, dass in einem Peptidgemisch mit sinkendem Anteil an phosphorylierten Peptid eine spezifische Detektion des p-Peptides erfolgte. Es waren bis zu 10 % des p-Peptides im Gemisch detektierbar, was einer p-Peptidkonzentration von 1,6 μ g entsprach. Der Grenzwert für das p-Peptid alleine lag bei 1,25 μ g und war damit vergleichbar (Anhang, Abbildung 64). Der Nachweis von phosphorylierten Peptiden mittels Immuno-HPTLC war somit möglich.

3.2.2 DotBlot zum Nachweis der Phosphorylierung an Peptiden

Der DotBlot wird schon seit den 90er Jahren zum Nachweis von Peptiden eingesetzt. Dadurch, dass keine kovalente Bindung an die Membranen erfolgt, kommt es leicht zum Verschmieren der Peptide (Weitzhandler und Hardy 1990, Canas, Dai *et al.* 1993). Ziel war es diese Methode zur Unterscheidung von phosphorylierten Peptiden zu etablieren, da sie schnell und kostengünstig durchzuführen ist. Es wurden die Standardpeptide (Peptid und p-Peptid) auf eine Nitrocellulosemembran Membran aufgetragen und die Oberfläche geblockt. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte mit Hilfe des phospho-spezifischen anti-pPKA Antikörpers. Als Kontrolle für das Immobilisieren der Peptide wurde der anti-V5 Antikörper verwendet (Abbildung 28, C).

Es erfolgte zunächst die Optimierung der Versuchsbedingungen:

- Wechsel des Membranmaterialies (Nitrocellulose anstelle von PVDF)
- Waschen mit stetigem leichten Schütteln (60 rpm) statt Stillstand
- Kleines Volumina an Waschlösung

Vor der Optimierung (s.o.) verschmierte das p-Peptid auf der Oberfläche (Abbildung 28, A). Nach der Optimierung konnte mit dem phosphorylierten Standardpeptid eine Konzentrationsreihe spezifisch auf der Membran detektiert werden (Abbildung 28, B). Als Kontrolle wurde eine Nitrocellulosemembran mit dem anti-V5 Antikörper inkubiert (Abbildung 28, C).

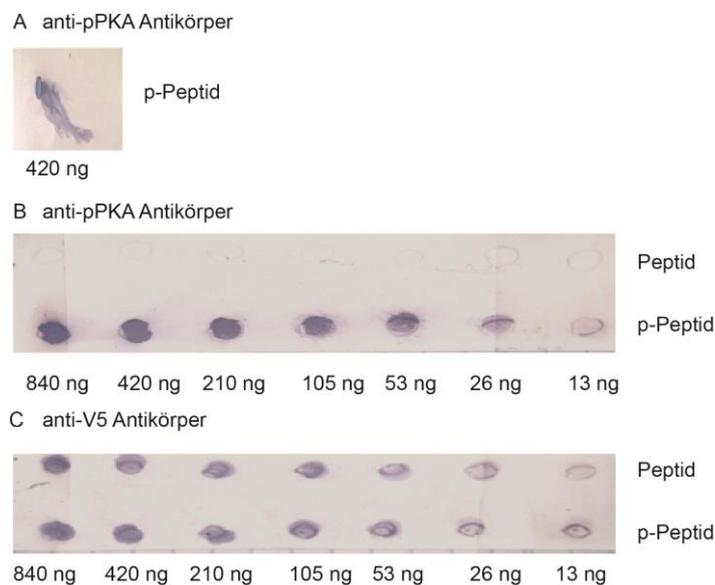


Abbildung 28 DotBlot zur Detektion phosphorylierter Peptide

(A) 420 ng phosphoryliertes Peptid aufgetragen auf eine PVDF Membran. Es ist kein spezifischer Auftragsspot zu detektieren, sondern das Peptid wird über die Membran verteilt. (B) Im Gegensatz dazu ist unter optimierten Bedingungen (Nitrocellulosemembran, geringeres Waschvolumen und Schütteln) bei einer Konzentrationsreihe des p-Peptides von 840 ng bis 13 ng bis zu 26 ng nachweisbar. (C) Bei der Ladekontrolle sind sowohl das Peptid, als auch das p-Peptid detektierbar. Ein unspezifischer Nachweis des un-phosphorylierten Peptides (Peptid) erfolgte nicht. Primärantikörper: anti-pPKA Antikörper (1:1.000), anti-V5 Antikörper (1:1.000), Sekundärantikörper: anti-rabbit, IgG Alkalische Phosphate (1:1.000), Alkalische Phosphatase Substrat: WesternBlue

Der DotBlot ist im Vergleich zur HPTLC sensitiver und schneller durchführbar, jedoch störanfälliger. Der Nachweis von phosphorylierten Peptiden mittels DotBlot ist möglich, das Detektionslimit als auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind aber abhängig von den verwendeten Antikörpern und Peptiden.

Nachdem zwei unabhängige Methoden als Kontrolle der Kinase bzw. zur Überprüfung der Phosphorylierung von Peptiden etabliert waren, wurde die Etablierung des

Kinaseassays auf Multiplexing Plattformen durchgeführt. Dazu wurde die Spezifität des phospho-spezifischen anti-pPKA Antikörpers überprüft.

3.2.3 Validierung des anti-pPKA Antikörpers

Der verwendete anti-pPKA Antikörper wird in der Literatur für die Detektion von PKA Targets genutzt (Hilhorst, Houkes *et al.* 2009). Laut Herstellerangaben erkennt er spezifisch RRxpS/T Motive, welche der Erkennungssequenzen der mPKA-C α entspricht. Um eine genauere Analyse der Erkennungssequenz des Antikörpers vorzunehmen, wurden Peptide designed, bei welchen die Erkennungssequenz variiert wurde. Die zwei Ausgangsequenzen sind: HVPHGESARRApSHTELPGKPIPPELLGLDST und HGSKLLPGKKApSERPSLGKPIPPELLGLDST. Bei den Sequenzen wurden die rot markierten Aminosäuren mutiert (Anhang, Tabelle 55). Des Weiteren wurde das phosphorylierte Standardpeptid oder phosphoryliert an beiden Serinen (HQKRREILpSRRPpSYRKILNDLGKPIPPELLGLDST) des rot markierten Bereichs getestet.

Um eine Plattform übergreifende Funktionalität des Antikörpers zu gewährleisten, wurden die Peptide auf vier unterschiedlichen Plattformen, nämlich Peptid Mikroarrays, BioPlex3D sowie den markierungsfreien Messmethode *Surface Plasmon Resonance* (SPR) und dem bscreen von Biometrics (*Biometrics 1 λ -Reflectometric Interference Detection* (RiDe)) mit dem anti-pPKA Antikörper vermessen (Tabelle 36). Als Ligand werden jeweils die immobilisierten Interaktionspartner und als Analyt der Interaktionspartner in Lösung bezeichnet.

Tabelle 36 Versuchsaufbau zur Analyse des anti-pPKA Antikörpers mittels unterschiedlicher Plattformen

Plattform	Ligand	Ligandkonzentration	Analyt	Detektion
Peptid Mikroarray	Peptid	50 pg je Spot	anti-pPKA AK	anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555
BioPlex3D	Peptid	5 μ g je 1 * 10 ⁶ Beads	anti-pPKA AK	RiDe
bScreen	Peptid	50 pg je Spot	anti-pPKA AK	SPR
SPR	anti-pPKA AK		Peptid	

Bei den Peptid Mikroarrays, dem BioPlex3D, sowie dem bScreen mit RiDe Detektion wurden die Peptide an die Oberflächen gekoppelt und mit dem anti-pPKA Antikörper (1:1.000) inkubiert. Für die SPR Messungen wurde der anti-pPKA Antikörper an die

Oberfläche eines Protein A Chips immobilisiert und mit den Peptiden inkubiert. Bei der SPR Messung wurden Peptidkonzentrationen zwischen 100 μ M und 0,78 μ M aller Peptide vermessen, wobei nach jedem Peptid eine Regeneration des Chips vorgenommen wurde. Während die Beads und das Peptid Mikroarray mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert und ausgelesen worden sind, konnten bei den labelfreien Methoden (bScreen und SPR) ein direktes Auslesen der Daten erfolgen (Tabelle 36). Die SPR Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Matthias Knappe (Universität Kassel) und die bScreen Messungen in Kooperation mit der Firma Biometrics durchgeführt.

Bei einer Gegenüberstellung der Daten der einzelnen Messmethoden (Tabelle 37), wurde eine grobe Unterteilung in gut (grün), schwach (gelb) und nicht detektierbar (n. d.) vorgenommen.

Tabelle 37 anti-pPKA Antikörpercharakterisierung mittels unterschiedlicher Methoden

Gut detektierbar, schwach detektierbar, n.d. nicht detektierbar

Motiv	Peptid Mikroarray	BioPlex3D	bScreen	SPR
RRSS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRAS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KKSS	n.d.	n.d.	n.d.	no data
KKAS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RRApS				
RRSpS				
RRpSS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RASpS				
ARSpS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RKSpS				
KRSpS	n.d.	n.d.	n.d.	
KKApS	n.d.	n.d.	n.d.	
KKpSS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KKSpS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
pSRRPS	n.d.	n.d.	n.d.	no data
pSRRPpS	No data			no data

Tabelle 37 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden. Neben dem vom Hersteller angegeben RRxP/pT Motiv erkennt der Antikörper auch RxxpS/pT, KRSpS und KKAps Motive. Der anti-pPKA Antikörper erkannte ausschließlich Targetsequenzen, welche im phosphorylierten Zustand vorliegen (grün markiert) und bei welchen der Abstand des phosphorylierten Serins mindestens drei

Aminosäuren Abstand zu einem Arginin an der -3 Position hat. Das Arginin an der -3 Position war ausschlaggebend für die Bindung des Antikörpers. Lysinmotive wurden zum Großteil nicht erkannt. Ausnahmen sind hierbei KRSpS, sowie KKApS welche nur mittels SPR mit geringen Signalstärken (gelb) detektiert werden konnten.

Zwischen den verschiedenen Methoden besteht eine hohe Übereinstimmung. Die Spezifität des anti-pPKA Antikörpers muss bei der Interpretation der Ergebnisse (Abschnitt 3.4 und 3.5) berücksichtigt werden, weil eventuell potentielle Targetsequenzen, welche nicht dem Standardmotiv RRxpS/T entsprechen, nicht detektiert werden, obwohl diese möglicherweise phosphoryliert wurden.

3.2.4 Etablierung eines Kinaseassays auf Multiplexing Plattformen

Im folgenden Abschnitt ist die Etablierung eines Kinaseassays auf Peptid Mikroarrays dargestellt.

Die verwendeten Peptide (Anhang, Tabelle 53) besitzen unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften was nach dem Lösen in Wasser, PBS oder DMSO die Tropfenbildung beim Spotten beeinflusst. Damit alle Peptide mit identischen Parametern und damit mit identischen Volumina beim Spotten dispensiert werden konnten, mussten die Spotbedingungen optimiert werden. Dazu wurde von allen Peptiden die Hydrophobizität und der isoelektrische Punkt mit Hilfe der Software ProtParam³ berechnet. Zur Optimierung der Spotbedingungen wurden 12 Peptide ausgewählt, welche die unterschiedlichen Hydrophobizitäten (von - 2.2 bis 0,8) und die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte von (pH 12,4 bis pH 4,16) repräsentierten und entweder in Wasser, 1 x PBS oder 1 x PBS mit bis zu 30 % DMSO gelöst waren.

³ web.expasy.org/protparam (Stand: August 2016)

<u>-2,241</u> •	<u>-1,505</u> •	<u>-0,919</u> •	<u>-0,776</u> •	<u>-0,605</u> •	<u>-0,529</u> •
<u>-0,067</u> •	<u>0,057</u> •	<u>0,171</u> •	<u>0,519</u> •	<u>0,605</u> •	0,813 •

Abbildung 29 Tropfenabriss beim Dispensieren von Peptiden mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften

In der Abbildung sind die jeweils geformten Tropfen nach dem erfolgten Tropfenabriss an der Nozzle, als auch die dazugehörigen Hydrophobizitäten der Peptide zu sehen. Es war möglich Peptide mit unterschiedlichen Hydrophobizitäten (s. Abbildung oben), unterschiedlichen isoelektrischen Punkten als auch Viskositäten unter den gleichen Bedingungen zu spotten. Der Tropfenabriss an der Nozzle war stets möglich und somit ein Aufbringen der Peptide auf die Oberfläche

Für das Spotten wurde eine Nozzle mit 70 µm Durchmesser verwendet. Durch das Einstellen spezifischer Parameter (70 V und 10 µs) beim Ansteuern des Piezzokristalls konnte eine einheitliche Tropfenabgabe bei allen Peptiden erfolgen. Unter diesen standardisierten Bedingungen war es möglich Tropfen mit ca. 110 pL ± 14 pL reproduzierbar abzugeben.

3.2.4.1 Anpassung der Antikörper und Peptidkonzentration auf Peptid Mikroarrays

Um ein optimales Spotbild zu erhalten und hohe Hintergrundsignale oder ein Verschmieren der Spots zu vermeiden, müssen die verwendeten Antikörperkonzentrationen sowie die zu spottenden Peptidkonzentration optimiert werden. Sowohl auf den Peptid Mikroarrays als auch auf dem BioPlex3D mussten, für eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen beiden Plattformen, möglichst gleiche Assaybedingungen gewährleistet werden. Die für Peptid Mikroarrays angepassten Antikörperkonzentrationen konnten auf die Versuche mit dem BioPlex3D erfolgreich übertragen werden. (Ergebnisse nicht gezeigt)

Zur Bestimmung der optimalen Antikörper- und Peptidkonzentration wurde ein Peptid Mikroarray mit dem Standardpeptid (HQKRREILSRRPSYRKILNDLGKPIPPLLGLDST) in unterschiedlichen Konzentrationen (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10,0 ng/µL) je 1 nL gespottet, für 48 Stunden bei 4 °C gelagert, mit Ethanolamin geblockt und die Inkubation mit dem

Primärantikörpern (anti-V5-Antikörper und anti-pPKA Antikörper) in variierenden Konzentrationen vorgenommen (pro Slide eine Konzentration). Für den anti-V5 wurden drei Verdünnungen getestet (1:1.000, 1:5.000, 1:10.000) und für den anti-pPKA Antikörper zwei Verdünnungen getestet (1:1.000 und 1:5.000). Der Nachweis einer Bindung des Primärantikörpers erfolgte mit dem Sekundärantikörper anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555 konjugiert (1:1.000). Wichtig für die Optimierung der Antikörper- und Peptidkonzentration sind folgende Faktoren, i) Messung im dynamischen Bereich, ii) Signal-zu-Rauschen Verhältnis, iii) Schmier auf dem Slide iv) Hintergrund und v) Spotmorphologie.

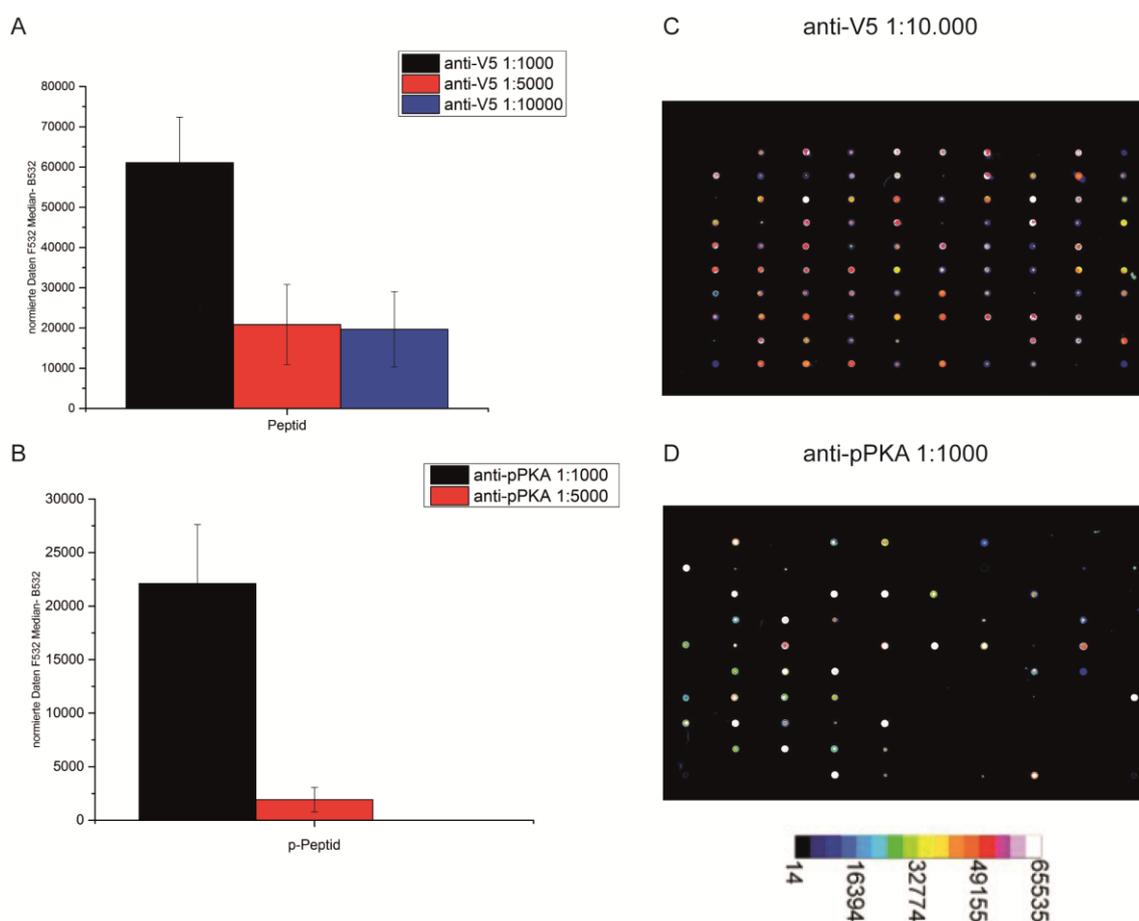


Abbildung 30 Bestimmung der einzusetzenden Antikörperkonzentration auf Peptid Mikroarrays

(A) Bei der Verwendung des anti-V5 Antikörpers in einer Verdünnung von 1:1.000 kam es zu einer Sättigung des Signals und ein hohes Hintergrundsignal wurde wahrgenommen. Bei 1:5.000 und 1:10.000 war kein großer Unterschied in der Signalstärke des Standardpeptides ersichtlich. Bei der Verwendung einer 1:10.000 Verdünnung wurden die gespotteten Peptide mit ausreichender Signalstärke detektiert, ohne ein hohes Hintergrundsignal zu erhalten (C). (B) Bei der Verwendung des anti-pPKA Antikörpers konnte bei einer Verdünnung von 1:5.000 zwar noch Signale gemessen werden, das Signal bei 1:1.000 war aber deutlich höher. Da später Signale nicht auf Grund einer zu hohen Antikörper Verdünnung nicht mehr messbar sein sollten, wurde beim anti-pPKA Antikörper mit einer 1:1.000 Verdünnung gearbeitet. (D). Die in der Abbildung gezeigten Signale entsprechen den Signalen von einer 50 ng/ μ L gespotteten Peptidlösung.

Abbildung 30 (A, B) zeigt die hintergrundkorrigierten normierten Median Werte für die Konzentration 50 ng/ μ L des unphosphorylierten (A) und phosphorylierten

Standardpeptides (B) aufgetragen. Nach der Inkubation mit dem anti-V5 Antikörper (Abbildung 30 A) in drei verschiedenen Verdünnungen liegen die Messwerte für die 1:1.000 Verdünnung in der Sättigung, was bedeutet, dass keine Konzentrationsunterschiede detektiert werden. Werden höhere Verdünnungen eingesetzt (1:5.000 oder 1:10.000) sanken die gemessenen MFI Werte, lagen aber im gut messbaren dynamischen Bereich und ergaben ein ausreichendes Signal-zu-Rauschen Verhältnis. Bei dem anti-pPKA Antikörper liegt dies bei einer 1:1.000 Verdünnung vor (Abbildung 30, B). Da nicht in der Signalsättigung gearbeitet wurde, sind Konzentrations-/Bindungsunterschiede messbar. Abbildung 30 C, D zeigt exemplarisch den Ausschnitt eines Peptid Mikroarrays nach der Inkubation mit dem anti-V5 Antikörper bei einer Verdünnung von 1:10.000 (C), sowie nach der Inkubation mit dem anti-pPKA Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung (D). Bei beiden Grafiken ist weder ein Verschmieren der Spots noch ein hohes Hintergrundsignal sichtbar. Die unterschiedlichen Signalintensitäten bilden die gespotteten unterschiedlichen Konzentrationen ab.

Auf Grund der in Abbildung 30 gezeigten Daten, wurde in allen weiteren Experimenten mit einer Antikörperverdünnung des anti-V5 Antikörpers von 1:10.000 und bei dem anti-pPKA Antikörper mit 1:1.000 gearbeitet. Mit den beiden Antikörperkonzentrationen ist es möglich beim Spotten mit einer Peptidkonzentration von 50 ng/ μ L zu arbeiten, was ca. 15 nmol Peptid pro Spot entspricht. Diese Peptid-/Antikörperkonzentrationen erlauben ein Arbeiten im dynamischen Bereich und ergaben ein gutes Signal-zu-Rauschen Verhältnis. Einen Schmier oder hohe Hintergrundsignale, auf Grund zu hoher Konzentrationen, wurden verhindert. Es traten auch keine ausblutenden Spots auf, sodass eine gute Spotmorphologie erhalten bleibt. Eine Veränderung der Sekundärantikörperkonzentration (anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555 konjugiert) wies keine deutliche Änderung der resultierende MFI Werte auf (Daten nicht gezeigt) und wurde daher bei 1:1.000 belassen.

Neben der Optimierung der einzusetzenden Peptid-/Antikörperkonzentration muss die Bindung der mPKA-C α und des Antikörpers an die Peptidsequenz gewährleistet werden.

3.2.4.2 Einfluss der Phosphorylierungsstelle auf die Bindung des anti-pPKA Antikörper

Bei den Versuchen wurde sichergestellt, dass eine Bindung sowohl der Kinase, als auch des Antikörpers gewährleistet ist. Befindet sich die Targetregion zu dicht an der Oberfläche von dem Slide können sterische oder physiko-chemische Eigenschaften eine Bindung im ungünstigsten Fall inhibieren. Zu diesem Zweck wurde der Abstand des Phosphorylierungsmotives zur Oberfläche variiert. Hierfür wurde das Standardpeptid (s.o.) verwendet und das Phosphorylierungsmotiv N-Terminal, mittig, C-Terminal positioniert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (Serin zu Alanin Austausch) für die Kinasereaktion und eine Positivkontrolle (phosphoryliertes Standardpeptid) für die Bindung des Antikörpers verwendet (Tabelle 38).

Tabelle 38 Peptide zur Optimierung des Abstandes des Phosphorylierungsmotives zur Oberfläche

Sequenz	Peptid	Motiv Abstand zur Oberfläche
HQRRP S YRKKRREILSILNDLGKPIP <small>N</small> PLLGLDST	N-	6 Aminosäuren
HQKRREILSILNDLRRP S YRKGKPIP <small>N</small> PLLGLDST	Mittig	14 Aminosäuren
HQKRREILSILNDLGKPIP <small>N</small> PLLGLDSTRRP S YRK	C-	31 Aminosäuren
HQKRREILSRRP A YRKILNDLGKPIP <small>N</small> PLLGLDST	Neg. Ktrl	14 Aminosäuren
HQKRREILSRRP p SYRKILNDLGKPIP <small>N</small> PLLGLDST	Pos Ktrl	14 Aminosäuren

Die Peptide (Tabelle 38) wurden auf eine Epoxy Glas Oberfläche gespottet. Mit dem Versuchsaufbau können 3 Fragen adressiert werden: i) hat der Abstand zur Oberfläche einen Einfluss auf die Bindung des anti-pPKA Antikörpers an die phosphorylierten Peptide ii) hat der Abstand zur Oberfläche einen Einfluss auf die Phosphorylierung der Peptide durch die PKA iii) bindet die Kinase unspezifisch an die Peptide. Als Vergleich diente bei den Versuchen die Bindung des anti-V5 Antikörpers an die Peptide. Diese Bindung sollte unabhängig von äußeren Einflüssen sein. Die Detektion erfolgte jeweils mit dem sekundären anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555 konjugiertem Antikörper. Im Folgenden werden die Ergebnisse zu diesen drei Fragestellungen vorgestellt.

In Abbildung 31, A sind direkt nach dem Spotten nur die Eckpunktmarker, sowie der fluoreszenzmarkierte Antikörper zu sehen. Nach der Inkubation mit dem anti-V5 Antikörper (Abbildung 31, B) konnten alle gespotteten Peptide nachgewiesen werden,

sodass dieser als Kontrolle für die Immobilisierung der Peptide auf den Peptid Mikroarrays verwendet werden kann. Der anti-pPKA Antikörper bindet spezifisch phosphorylierte Peptide. Befindet sich das Phosphorylierungsmotiv N-Terminal (6 Aminosäuren Abstand zur Oberfläche) konnten nur geringe Signale auf dem Peptid Mikroarray gemessen werden, befand es sich mittig (14 Aminosäuren) oder C-Terminal (31 Aminosäuren) stiegen die Signalintensitäten (Abbildung 31, C und Abbildung 32). Das bedeutet, dass die Bindung des anti-pPKA Antikörpers an die phosphorylierten Peptide abhängig ist von der Position des Phosphorylierungsmotives. Bei allen Kontrollen neg Ktrl, Puffer oder auch unphosphorylierten Peptid konnte keine unspezifische Bindung des anti-pPKA Antikörpers detektiert werden. Bei Inkubation mit dem anti-V5 Antikörper ist keine solche Abstufung zu erkennen, es ist daher auszuschließen, dass diese Effekte auf Grund von unterschiedlichen Oberflächenbeladungen zu Stande kamen.

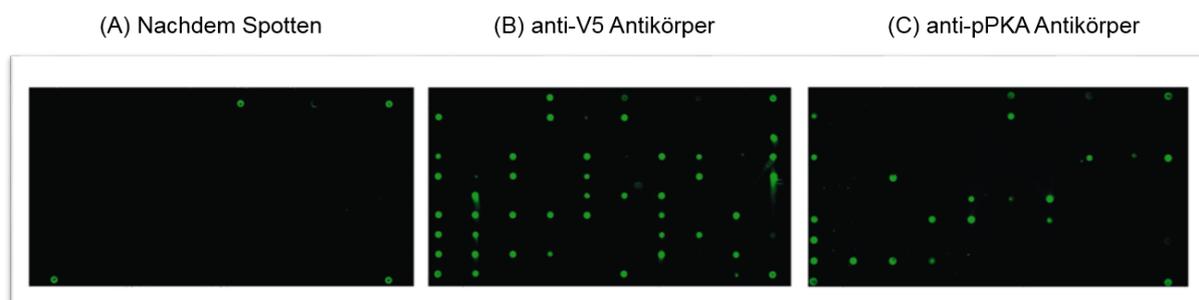


Abbildung 31 Fluoreszenzaufnahme des Spotpatterns eines Peptid Mikroarrays nach der Inkubation mit verschiedenen Primärantikörpern

Direkt nach dem Spotten waren nur die GuideDots (TamRa-Peptid) sowie der Sekundärantikörper (anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555 konjugiert) zu erkennen. (B) Wurde der Array mit einem anti-V5 Antikörper sowie anschließend mit einem Fluoreszenz markiertem Sekundärantikörper (anti-rabbit, IgG Alexa Fluor555 konjugiert) inkubiert, war eine deutliche Signalzunahme zu erkennen. Verglichen mit (C) ist eine höhere Anzahl an Spots zu erkennen. In Abbildung C wurde anstelle des anti-V5 Antikörpers der anti-pPKA Antikörper verwendet.

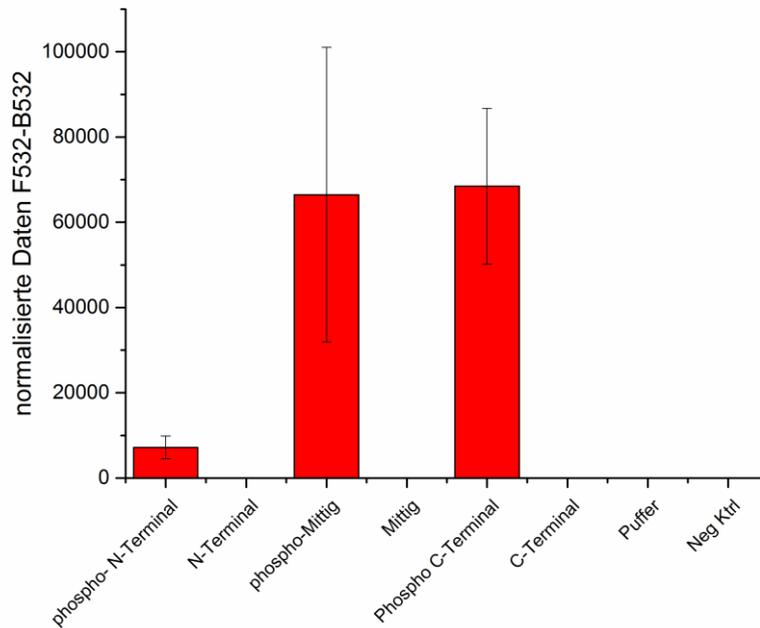


Abbildung 32 Balkendiagramm zur Spezifität und Affinität des anti-pPKA Antikörpers in Abhängigkeit zu der Position des Phosphorylierungsmotives

Auf der X-Achse ist jeweils eine phosphorylierte Variante (phospho) als auch unphosphorylierte Variante jedes Peptides aufgetragen. Zusätzlich wurden eine Puffer- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Wie zu sehen ist, bindet der anti-pPKA Antikörper schlechter, wenn sich das phosphorylierte Motiv C-Terminal, d.h. nahe der Glasoberfläche befand.

Um die Oberflächeneffekte zu minimieren wurde ein PEG-Linker am N-Terminus der Peptide eingefügt und so der Abstand zur Oberfläche vergrößert. Die Peptide mit einem PEG-Linker wurden zusammen mit den vorherigen Peptiden auf epoxylierte Glasslides gespottet und der Peptid Mikroarray mit dem anti-pPKA Antikörper inkubiert.

3.2.4.3 Einfluss des Abstandes zur Oberfläche des Phosphorylmotives auf die Phosphorylierung durch die mPKA-C α

Neben der Antikörperbindung musste sichergestellt werden, dass eine Bindung der Kinase an ihre Targetpeptide auf der Oberfläche gewährleistet ist und diese phosphorylieren kann. Um dies nachzuweisen, wurden die gleichen Peptide wie zur Antikörperbindungsanalyse (Tabelle 38) auf die Oberfläche gespottet, die Peptid Mikroarrays 48 Stunden gelagert, geblockt, für 30 Minuten bei 30°C mit 0,5 μ g der mPKA-C α inkubiert, gewaschen und mit Primärantikörpern (anti-V5 oder anti-pPKA Antikörper), sowie dem Alexa Fluor 555 konjugierten anti-rabbit, IgG Sekundärantikörper inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem anti-V5 Antikörper konnten alle Peptide detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zwischen den Peptid Mikroarrays mit und ohne Kinaseinkubation existierten sichtbare Unterschiede (Abbildung 34). Nach der Inkubation mit der mPKA-C α konnten Signale für Peptide gemessen werden, die ohne die Inkubation der mPKA-C α nicht detektierbar waren (Abbildung 34, Pfeil).

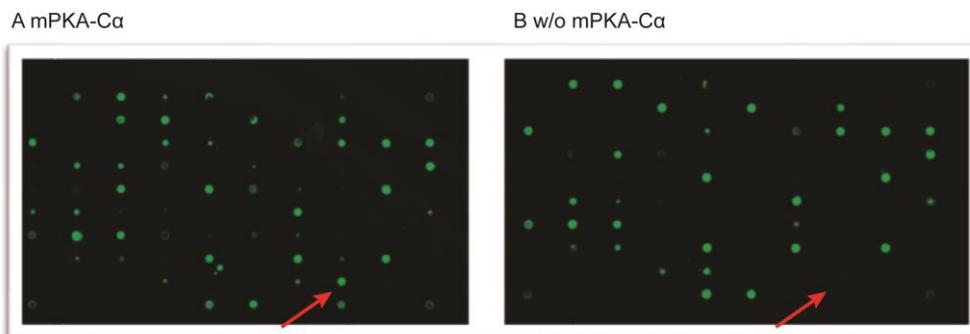


Abbildung 34 Fluoreszenzaufnahme der Phosphorylierung von Peptiden auf Peptid Mikroarrays durch die mPKA-C α

Wurden Peptid Mikroarrays mit 0,5 μ g mPKA-C α 30 Minuten bei 30 °C inkubiert (A) und anschließend gewaschen, konnte im Vergleich zu einem Peptid Mikroarray ohne Kinaseinkubation (B) eine deutliche Änderung der Signale wahrgenommen werden. Dies ist zum Beispiel sichtbar an der durch den roten Pfeil markierten Stelle. Es war möglich die Peptide auf der Peptid Mikroarrayoberfläche zu phosphorylieren.

Tabelle 39 MFI-Daten zur Analyse der Phosphorylierung der mPKA-C α in Abhängigkeit zum Phosphorylierungsmotiv

	Konzentration	w mPKA-C α			w/o mPKA-C α		
		N-Terminal	Mittig	C-Terminal	N-Terminal	Mittig	C-Terminal
Peptid	100 ng/ μ L	142,73	7026,13	12350,03	3,76	5,10	24,94
	50 ng/ μ L	243,56	7228,36	13409,49	0,93	8,02	28,69
	25 ng/ μ L	22,90	1794,33	4923,50	0,23	2,32	3,89
p-Peptid	100 ng/ μ L	5813,78	14744,33	13015,81	8778,39	17372,78	18631,43
	50 ng/ μ L	7116,13	8432,58	16701,56	12510,94	11919,63	17274,62
	25 ng/ μ L	3224,94	2730,85	16589,78	6378,07	3656,13	21214,58

Mit steigendem Abstand zur Oberfläche war ein höheres MFI-Signal messbar, sowohl konzentrationsabhängig, positionsabhängig und auch wenn das Peptid schon vorphosphoryliert (p-Peptid) gespottet worden war. Die Abhängigkeit der Bindung des Antikörpers, als auch der Kinase (Vergleich w mPKA-C α und w/o mPKA-C α) (Tabelle 39) der Position des Phosphorylierungsmotives war auch hier erkennbar, wobei der Effekt durch die Bindung des Antikörpers berücksichtigt werden muss. Im Vergleich zur Antikörperbindung, konnte bei den Kinaseassay Experimenten beobachtet werden, dass bei der C-Terminalen Positionierung des Phosphorylierungsmotives das Hintergrundsignal mit steigenden Peptidkonzentrationen ansteigt.

3.2.4.4 Unspezifische Kinasebindung an die Oberfläche

Bei den Kinaseassays auf den Peptid Mikroarrays konnte beobachtet werden, dass das als Negativkontrolle genutzte Peptid, welches an Stelle des Serin ein Alanin im Kinasemotiv enthält, deutliche Signale nach der Inkubation mit der mPKA-C α und dem anti-pPKA Antikörper ergab (Abbildung 35). Ohne die Inkubation der Kinase sind keinerlei Signale an dem Negativkontrollpeptid messbar.

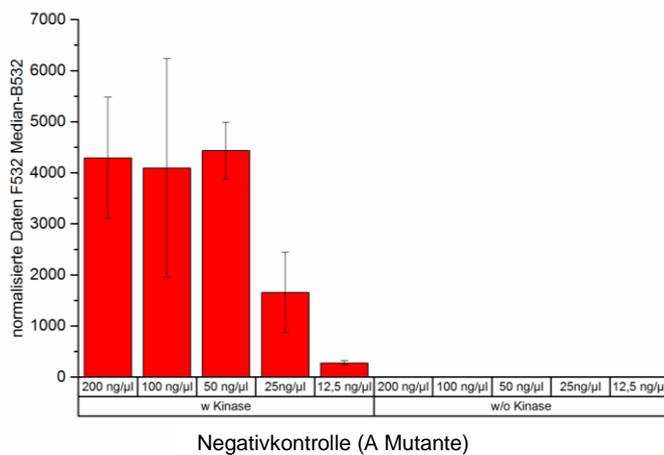


Abbildung 35 Balkendiagramm zur Bindung des anti-pPKA Antikörpers an die Negativkontrolle nach Kinaseinkubation

Aufgetragen ist eine Konzentrationsreihe der Negativkontrolle, während der Peptid Mikroarrayslide auf der linken Seite mit der mPKA-C α inkubiert worden ist, ist dies links nicht der Fall. Beide Slides wurden anschließend mit dem anti-pPKA Antikörper inkubiert. Es ist zu erkennen, dass nach der Inkubation mit der mPKA-C α (links) ein Anstieg der Signalintensität mit Hilfe des anti-pPKA Antikörpers zu messen war. Das Kontrollpeptid beinhaltet ein Alanin an Stelle des phosphorylierbaren Serins und kann nicht phosphoryliert werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die mPKA-C α an dem Peptid bindet und die Auto-Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α vom Antikörper detektiert werden. Durch die Zugabe von 1% SDS zum Waschpuffer konnte eine Reduktion der Signale an der Negativkontrolle erreicht werden. Unter den optimierten Bedingungen werden nur die Phosphorylierungen an Peptiden detektiert werden und nicht die mPKA-C α .

Für die Peptidsequenzen zur Identifikation potentieller Phosphorylierungsstellen im Schmerzkontext wurden daher alle Peptide so designend, dass das Phosphorylierungsmotiv mittig mit einem Abstand von sieben Aminosäuren zur Oberfläche positioniert war und der optimierte Waschpuffer mit 1% SDS verwendet.

3.2.4.5 Reproduzierbarkeit Peptid Mikroarrays

Vor der Analyse von unbekanntem Peptidtargets wurde eine Analyse hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Peptid Mikroarraydaten vorgenommen. Hierbei wurden die Rohdaten des Peptid Mikroarrays nach der Inkubation mit dem anti-pPKA Antikörper ohne Kinaseinkubation und mit Kinaseinkubation gegenübergestellt (Tabelle 40). Jeder Peptid Mikroarray besteht aus 5 identischen Blöcken mit jeweils einer Konzentration jedes Peptides. Zur Bestimmung der Intra-Slide Reproduzierbarkeit

wurden die MFI Werte von 5 identischen Blöcken in einem pairwise Scatterplot gegeneinander aufgetragen und die errechnete Korrelation tabellarisch dargestellt.

Tabelle 40 Intraslide Reproduzierbarkeit vor und nach einem Kinaseassay

Block	w/o mPKA-C α					w mPKA-C α				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	1	0,99	0,99	0,99	0,96	1	0,87	0,97	0,97	0,96
2		1	1	1	0,97		1	0,86	0,87	0,87
3			1	1	0,97			1	0,99	0,97
4				1	0,97				1	0,99
5					1					1

Die Daten zeigen, dass zwischen den einzelnen Blöcken eines Mikroarrays nach der Inkubation mit dem anti-pPKA Antikörper, eine gute technische Reproduzierbarkeit (> 0,95) existiert. Das bedeutet, dass sowohl das Dispensieren der Peptide als auch die Bindung der Peptide an die Oberfläche reproduzierbar funktioniert. Nach der Inkubation mit der mPKA-C α ist die Reproduzierbarkeit etwas geringer (< 0,9). Es lässt sich schlussfolgern, dass unter optimierten Bedingungen Peptid Mikroarrays reproduzierbar hergestellt werden können und der Assay verlässliche Daten liefert.

3.2.4.6 Zusammenfassung Etablierung des Kinaseassays auf Peptid Mikroarrays

Auf Grund der im Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Ergebnisse für die Optimierung der Peptid Mikroarrays ergaben sich folgende Versuchsbedingungen:

- potentielle Phosphorylierungsmotive für die mPKA-C α mittig in der Sequenz positioniert und ein Abstand von 7 Aminosäuren bis zur Oberfläche
- Antikörperkonzentrationen: anti-pPKA Antikörper (1:1.000), anti-V5 Antikörper 1:10.000
- Peptidkonzentration gespottet: 50 ng/ μ L, ca. 1 nL gespottet
- Kinaseassay: 5 ng/ μ L PKA, 30 Minuten bei 30 °C
- Waschpuffer: PBST+1 % SDS

Diese Versuchsbedingungen wurden für alle nachfolgenden Experimente verwendet. Neben der Arbeit mit rekombinanter Kinase wurden auch Versuche mit Zellysate durchgeführt werden. Die Arbeit mit Forskolin stimulierten und unstimulierten Zellextrakt von HEK293 Zellen, diente dazu spezifische PKA Targets nach einer Stimulierung zu identifizieren.

3.3 Stimulierung des PKA Signalweges mittels Forskolin in HEK293 Zellen

In dieser Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, welchen Einfluss die Stimulierung des PKA Signalweges auf die Targetspezifität der PKA-C α hat. Mit Peptid Mikroarrays kann ein Vergleich zwischen der Targetspezifität mit rekombinanter Kinase und un-/stimulierten Lysaten vorgenommen werden. Des Weiteren kann durch die Inhibierung der PKA-C α untersucht werden, ob weitere Kinasen im Zelllysate eine Phosphorylierung an den Peptidtargetsequenzen hervorrufen und es eine Überschneidung zwischen mehreren Signalkaskaden gibt. Hierfür wurde zunächst die Stimulierung des Proteinkinase A Signalweges mit 50 μ M Forskolin für 10 Minuten bei HEK293 Zellen vorgenommen, die Zellen anschließend lysiert und die Stimulierung mittels WesternBlot überprüft. Um die PKA in einem hyperaktiven phosphorylierten aktiven Zustand zu halten, wurde dem Stimulus der Phosphatasehemmer IBMX zugesetzt.

3.3.1 Stimulierung der HEK293 Zellen nach Forskolin Stimulierung

Forskolin und IBMX sind in reinem DMSO gelöst. Dies kann bei dem Stimulieren der HEK293 Zellen für ein Ablösen der Zellen von der Oberfläche führen. Forskolin und IBMX wurden für die Stimulierung der HEK293 Zellen in reinem DMEM auf die gewünschte Konzentration verdünnt und direkt in das, den Zelllayer überschichtende, Zellkulturmedium gegeben. Die Zellkulturschale wurde für 10 Minuten in den Inkubator gestellt, der Überstand im Anschluss entfernt und der Zelllayer mit 1 x PBS gewaschen. Vor und nach der Stimulusgabe erfolgte die Dokumentation der Zellen mittels Lichtmikroskopie, um Ablöseeffekte oder Absterben der Zellen, welche durch Stimulusgabe verursacht werden könnten, zu detektieren. Wie in Abbildung 36 gezeigt, waren nach der Stimulierung kaum absterbende Zellen zu erkennen.

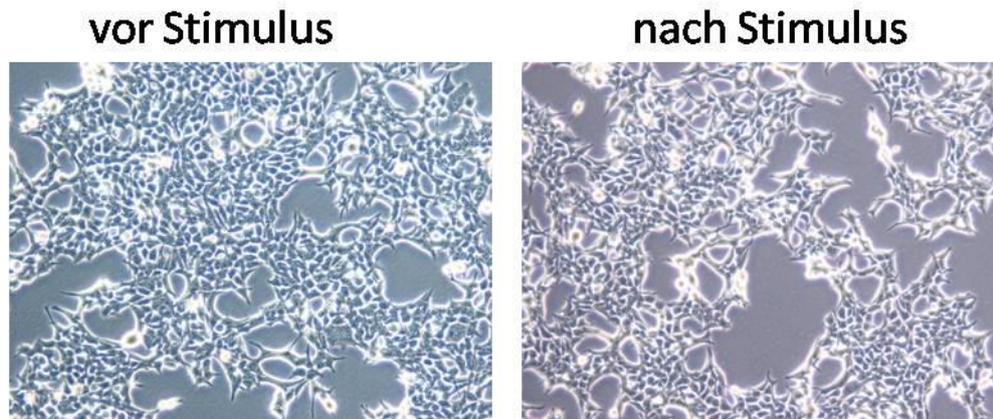


Abbildung 36 Mikroskopaufnahmen der HEK293 Zellen vor und nach 50 µM Forskolin Stimulus mit 50 µM IBMX

Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die Zellyse mittels M-PER und die Bestimmung der Proteinkonzentration des Zellysats. Um die Proteinkonzentration des Lysates zu bestimmen wurde eine Standardreihe mit Hilfe von Rinderserum Albumin (BSA) angefertigt (Abbildung 37). Jede Probe wurde in Duplikaten bestimmt.

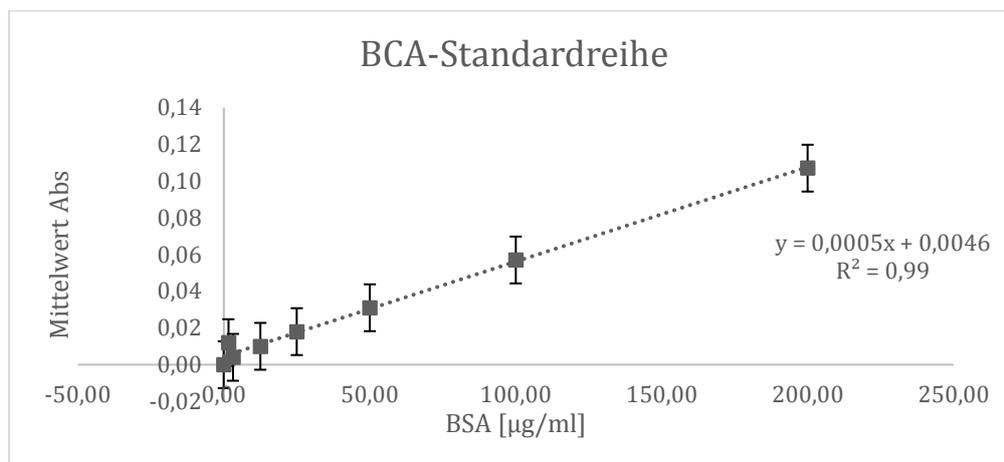


Abbildung 37 BCA-Standardreihe zur Bestimmung der Lysatkonzentration.

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption und der BSA Konzentration. Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,99

An Hand der Geradengleichung wurde die Proteinkonzentration der Lysate berechnet. Die Proteinkonzentration der Lysate lag jeweils zwischen 1-2 mg/mL. Für die folgenden Experimente wurden die Lysate konzentrationsnormiert verwendet.

Durch die Stimulierung kommt es zu einer erhöhten Bildung an cAMP, wodurch ein Großteil der PKA im dissoziierten Zustand vorliegt und Targetproteine phosphorylieren kann. Diese Veränderung des Phosphostatus von Proteinen wie z.B. VASP und CREB

lässt sich mittels WesternBlot überprüfen. Es wurde identische Mengen an stimuliertem Zelllysate mit und ohne IBMX, unstimuliertes Zelllysate mit DMSO und unstimuliertes Zelllysate auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mittels WesternBlot analysiert (Abbildung 38). Für den WesternBlot wurde zum einen der anti-pVASP Antikörper verwendet, welcher spezifisch eine Phosphorylierung am Serin 157 von VASP nach der Stimulierung detektiert. Zum anderen wurde der anti-pPKA Antikörper verwendet, welcher phosphorylierte Targets der PKA erkennt. Als Sekundärantikörper wurde ein Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase verwendet.

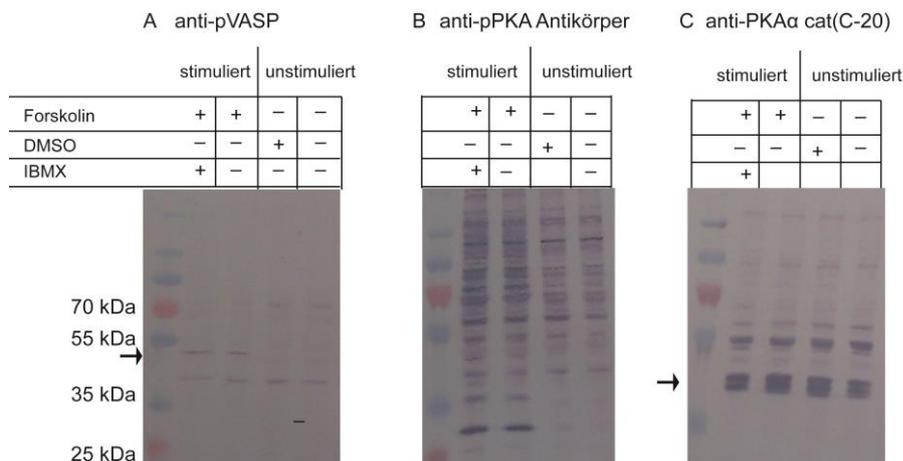


Abbildung 38 WesternBlot stimulierter Zelllysate von HEK293 Zellen

Um die Stimulierung des PKA Signalweges nachzuweisen wurden die HEK293 Zellen 10 Minuten mit 50 μ M Forskolin (FSK) stimuliert. Durch die Zugabe von IBMX, einem Phosphatasehemmer wurde der Stimulus aufrechterhalten. Als Kontrollen wurden unstimuliertes HEK293 sowie ein mit DMSO behandeltes HEK293 Lysat aufgetragen. Die Blots wurden mit den obenstehenden Antikörpern inkubiert. Bei den oben abgebildeten Blots (A, B) ist eine deutliche Änderung des Bandenmusters zu erkennen, wenn die Zellen mit Forskolin stimuliert worden sind. Während mit Hilfe des anti-pVASP Antikörpers direkt die Phosphorylierung von VASP nachgewiesen wurde (A), ist in (B) eine generelle Änderung des Phosphorylierungsmusters zu beobachten ist. Diese Änderungen kommen nicht auf Grund von unterschiedlichen Konzentrationen der PKA-C α (C)

Wie in Abbildung 38 links zu sehen ist, ändert sich bei stimuliertem Zellextrakt im Vergleich zu unstimuliertem Zellextrakt, das erhaltene Bandenmuster (A, B). Erfolgte die Inkubation mit anti-pVASP Antikörper kann, knapp unter 55 kDa, bei den stimulierten Lysaten eine Bande detektiert werden, welche bei den unstimulierten Lysaten nicht sichtbar ist (schwarzer Pfeil, pVASP). Nach der Inkubation mit dem anti-pPKA Antikörper ist zu erkennen, dass bei einer Stimulierung sehr viele Proteine phosphoryliert werden (Abbildung 38, B). Vergleicht man den jeweils die ersten beiden Spuren auf den Membranen (Abbildung 38, A und B) ist zu erkennen, dass die Zugabe von IBMX keinen zusätzlichen Effekt auf die Stimulierung hatte. Vergleicht man unbehandelte Lysate (letzte Spur auf den Membranen) mit den DMSO behandelten

Zellen ist in beiden Blots -in den entsprechenden Spuren- kein Unterschied im Bandenmuster sichtbar. DMSO hat folglich keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der Proteine. Die Änderung des Bandenpatterns könnten auch durch unterschiedliche Konzentrationen der Proteinkinase A in den Lysaten hervorgerufen werden. Um dies auszuschließen wurde ein WesternBlot mit dem anti-PKA α cat(C-20) Antikörper inkubiert, welcher die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A nachweist (Abbildung 38, C). Diese ist für die Phosphorylierung der Targets verantwortlich.

Es konnte gezeigt werden, dass auf Höhe der PKA-C α (ca. 42 kDa) keine deutlichen Intensitätsänderungen (schwarzer Pfeil). Die PKA-C α ist in allen Zelllysaten etwa gleich konzentriert vorhanden. Änderung des Phosphorylierungsmusters, welches über die WesternBlots detektiert werden konnten (Abbildung 38) beruhen daher nicht auf Konzentrationsänderung der Kinase, sondern auf der durch die Stimulierung hervorgerufenen Aktivierung der Proteinkinase A.

Es konnte erfolgreich eine Stimulierung des PKA Signalweges bei HEK293 Zellen vorgenommen werden, was über die Änderung des Phosphorylierungspatterns gezeigt wurde. Die Lysate wurden immer frisch präpariert und nicht länger als eine Woche gelagert.

3.3.2 Phosphorylierung von CREB mit Zelllysat von stimulierten Zellen

Um mit Hilfe der Lysate eine Phosphorylierung von potentiellen Targetpeptiden vornehmen zu können, müssen sich die im Lysat befindlichen Kinasen nach der Zellyse im aktiven Zustand befinden. Die Zellen wurden mit einem nativen Lysepuffer (M-PER) lysiert und das Lysat für die Kinaseassays verwendet. Zur Überprüfung der Aktivität der Kinasen im Lysat wurde unterschiedliche Mengen CREB auf eine Membran aufgetragen (DotBlot) und mit 100 μ g und stimulierten Lysat für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend folgt die Inkubation mit folgenden Antikörpern:

1. anti-RGS-HIS₆-HRP Antikörper; als Ladekontrolle, da das wt-CREB einen N-terminalen His-Tag besitzt
2. anti-pCREB Antikörper; detektiert spezifisch die Phosphorylierung am Ser133 von CREB

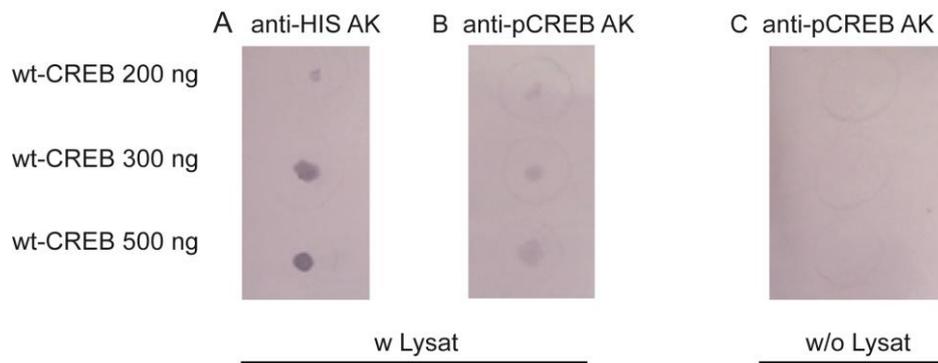


Abbildung 39 DotBlot zum Nachweis von aktiven Kinasen in stimulierten Zelllysate

Auf die Nitrocellulose Membran wurden unterschiedliche Konzentrationen wt-CREB aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde ein DotBlot mit einem anti-HIS Antikörper inkubiert. Hierbei ergaben alle wt-CREB Konzentrationen ein Signal. Wurde der DotBlot mit 100 µg stimulierten HEK293 Zelllysate inkubiert und anschließend mit dem anti-pCREB Antikörper inkubiert, konnte eine Phosphorylierung des wt-CREB nachgewiesen werden. Während der Blot ohne die Inkubation mit Lysat keine Signale nach der Inkubation mit dem anti-pCREB Antikörper aufwies. Dies zeigt, dass aktive Kinasen im stimulierten Zelllysate vorhanden waren. Als Sekundärantikörper wurde anti-rabbit, IgG Alkalische Phosphatase verwendet.

Nach der Inkubation des DotBlot mit dem anti-RGS-His₆-HRP Antikörper und dem anti-pCREB Antikörper konnte CREB bzw. phosphoryliertes CREB nachgewiesen werden (Abbildung 39, A und B). Ohne eine Inkubation mit Lysate waren keine Signale sichtbar (Abbildung 39, C). In dem mit M-PER hergestellten Zelllysate befinden sich die Kinasen im aktiven Zustand.

3.4 Durchführen eines Kinaseassays mit potentiellen Targets des Schmerzkontextes auf Peptid Mikroarrays

Nach der Etablierung des Kinaseassays mit rekombinanter mPKA-Cα auf Peptid Mikroarrays (Abschnitt 3.2.4), sowie der Etablierung der Stimulierung des PKA Signalweges bei HEK293 Zellen (Abschnitt 3.3) wurden 186 potentielle Targetpeptide analysiert. Die Peptid Mikroarrays sind dabei in 5 Felder unterteilt, wobei in jedem Feld jedes Peptid einmal gespottet ist. Die Peptide wurden mit rek. mPKA-Cα bzw. mit Zelllysate inkubiert und Phosphorylierungen mit dem anti-pPKA Antikörper detektiert. Durch das spezifische Inhibieren der mPKA-Cα mittels des spezifischen PKA Pseudosubstratinhibitors PKI oder dem unspezifischen Inhibitor H89, sollte eine Differenzierung von PKA spezifischen Signalen von anderen Signalen erfolgen. Für alle Versuche wurde das selbe Batch an Epoxy beschichteten Slides genutzt, um eventuelle Batch zu Batch Variationen bei der Oberflächenbeschichtung und damit der Oberflächenbeladung auszuschließen.

Das Kinaseassay wurde zunächst mit 250 U der rekombinanten mPKA-C α für 30 Minuten bei 30°C auf den Peptid Mikroarrays durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Kinaseassay mit ATP, aber ohne mPKA-C α durchgeführt. Anschließend wurden die Slides gewaschen und mit dem Primärantikörper (anti-pPKA oder anti-V5) und dem Sekundärantikörper (anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555 konjugiert) inkubiert.

3.4.1 Reproduzierbarkeit und Arrayqualität

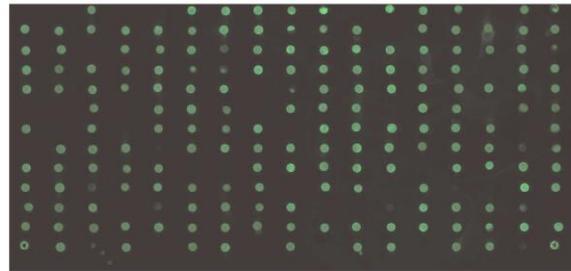
Pro Versuchsreihe wurden mindestens 4 Peptid Mikroarrays eines Batches parallel unter folgenden Bedingungen prozessiert:

- Auto-Fluoreszenz Überprüfen durch Einscannen nach dem Spotten
- Inkubation mit PBST und Detektion mit dem primären anti-pPKA Antikörper, um den unspezifischen Hintergrund zu bestimmen,
- Inkubation mit dem anti-V5 Antikörper zur Bestimmung der Arrayqualität und der Reproduzierbarkeit (Ladekontrolle)
- Kinaseassay mit ATP und mPKA-C α , primärer Antikörper: anti-pPKA Antikörper
- Kinaseassay mit ATP ohne mPKA-C α , primärer Antikörper: anti-pPKA Antikörper

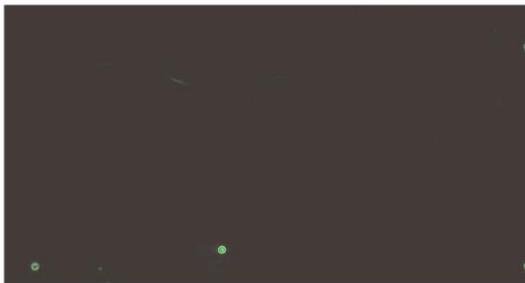
A nach Spotten



B Ladekontrolle



C w/o mPKA-Cα



D w mPKA-Cα



Abbildung 40 Fluoreszenzaufnahmen einer Versuchsreihe eines Kinaseassays auf Peptid Mikroarrays

(A) Darstellung des Peptid Mikroarrays direkt nach dem Spotten, es waren ausschließlich die Eckpunktmarker zu erkennen. Keine Autofluoreszenz der Peptide war detektierbar. (B) Inkubation des Peptid Mikroarrays mit dem anti-V5 Antikörper, alle Peptide waren detektierbar und auf die Oberfläche aufgebracht worden. (C) Inkubation des Peptidarrays mit dem pPKA Antikörper nach der Inkubation mit PBST. Ausschließlich die Eckpunktmarker als auch das Kontrollpeptid (phosphoryliertes Peptid) waren erkennbar. (D) Nach der Inkubation des Slides mit 250 U mPKA-C α und der Detektion der Phosphorylierung mit dem anti-pPKA Antikörper, erschienen einige Signale die im Vergleich zu (C) nicht vorhanden waren.

Exemplarisch ist eine solche Versuchsreihe in Abbildung 40 dargestellt. (A) Direkt nach dem Spotten ist nur die Detektion der Eckpunktmarkers (anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555 konjugierter Antikörper) möglich und keine Auto-Fluoreszenz der Peptide zu beobachten. Auch nach der Inkubation mit Puffer und Sekundärantikörper blieb dieses Bild bestehen. (B) Nach der Inkubation mit dem anti-V5 Antikörper können ein Großteil der Peptide mit ähnlichen Intensitäten detektiert werden. (C) Nach der Inkubation mit einem anti-pPKA Antikörper ohne vorherige Kinaseinkubation können nur die Eckpunktmarker detektiert werden. (D) Nach der Inkubation 250 U mPKA-C α sind spezifische Signale für phosphorylierte Peptide detektierbar. Auf allen Arrays sind nur sehr geringe unspezifische Hintergrundsignale zu detektieren, welche durch Verschmieren der Spots oder Schmutz auf der Oberfläche verursacht werden können. Die Spots weisen eine gleichmäßige Spotmorphologie auf. Beides spiegelt eine gute Arrayqualität wieder.

Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu beurteilen wurden die Daten eines Batches verwendet. Hierbei wurden zwei Slides mit dem anti-V5 Antikörper (Slide 1.1 und 1.2) inkubiert und die Interslide Varianz an Hand eines Vergleiches der Datenpunkte mit einem Scatterplot bestimmt.

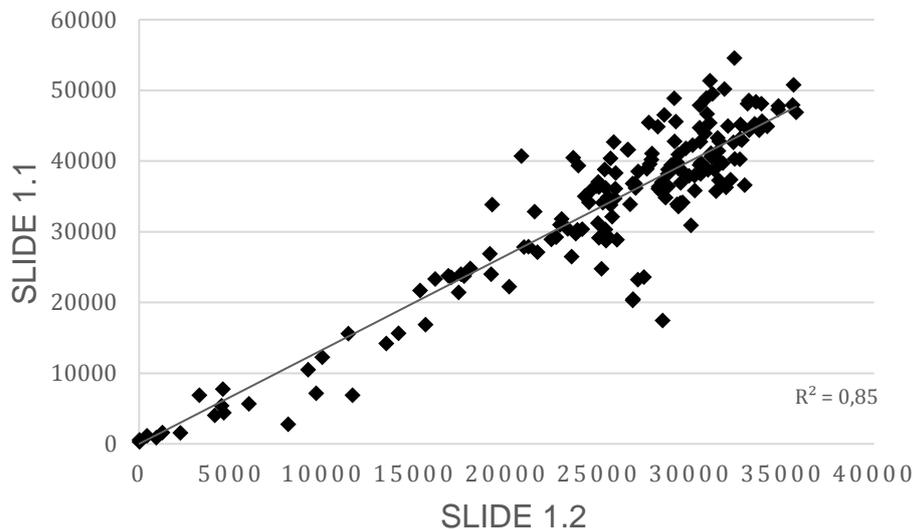


Abbildung 41 Scatterplot der Peptid Mikroarray Daten zweier Slides eines Batches nach anti-V5 Inkubation zur Bestimmung der Interslide Varianz

Wie in Abbildung 41 gezeigt, kann innerhalb eines Batches mit einem R^2 von 0,85 eine gute Reproduzierbarkeit erreicht werden. Somit ist die Oberflächenbeladungskapazität eines Batches vergleichbar. Obwohl die unterschiedlichen Peptide verschiedene physiko-chemische Eigenschaften besitzen, kann für 95 % der Peptide eine ausreichende Bindungskapazität erreicht werden.

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Daten des anti-pPKA Antikörpers wurden die Einzeldaten aus drei unabhängig geführten Kinaseassays eines Batches miteinander kombiniert und an Hand der Replikate die Interslide-, sowie Intraslide Reproduzierbarkeit bestimmt. Die Intraslide Reproduzierbarkeit der Peptidreplikate lag bis auf eine Ausnahme bei einem $CV < 5\%$. Auch die Interslide Varianz zwischen den Peptidarrays lag nach der Durchführung der Kinaseassays bei einem R^2 von 0,93.

3.4.2 Phosphorylierung von Peptiden mit rekombinanter PKA und Zellextrakt

Durch die Inkubation der Peptid Mikroarrays mit der mPKA-C α konnte eine Phosphorylierung von Peptiden auf Peptid Mikroarrays detektiert werden.

Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Experimenten wurde der Versuch mit einer definierten enzymatischen Aktivität (250 U) an mPKA-C α durchgeführt und die Daten mit den vorherigen Versuchen verglichen. Hierfür wurden die normierten Daten gegenübergestellt und ein Pearson R berechnet.

Tabelle 41 Pearson R bei der Gegenüberstellung rekombinanter mPKA-C α (konzentrationsnormiert) und dem Verwenden einer definierten spezifischen Aktivität der mPKA-C α

mPKA-C α	250 U
0,5 μ g	0,98
0 μ g	0,83

Die Tabelle 41 zeigt, dass beiden Slides (Inkubation mit 250 U oder 0,5 μ g mPKA-C α) mit einem Pearson R von 0,98 eine gute Reproduzierbarkeit aufweisen, sodass folgend eine Konzentration von 250 U mPKA-C α eingesetzt worden ist. Wie ebenfalls zu sehen ist, wird bei einer Gegenüberstellung der Daten ohne Kinase (0 μ g) und Inkubation mit 250 U Kinase der Pearson r auf 0,8 sinken. Durch die Inkubation mit der mPKA-C α findet folglich eine Veränderung an den Peptiden statt.

Zur Identifizierung von potentiellen Targets der mPKA-C α wurden 186 Peptide zusammen mit Kontrollen (dem Standardpeptid HQKRREILSRRP**S**YRKILNDLGKPIPPLLGLDST unphosphoryliert, phosphoryliert und als Alaninmutante) jeweils in 5 Replikaten gespottet, mit 250 U mPKA-C α inkubiert und potentielle Targets mit dem anti-pPKA Antikörper detektiert. Dieser Versuch wurde an mehreren Tagen (n=4) durchgeführt und ausgewertet. Exemplarisch dargestellt sind die zusammengeführten Daten aus 3 unabhängig durchgeführten Kinaseassays eines Peptid Mikroarray Batches an einem Tag (Abbildung 42). Für die Normalisierung der Daten wurde die Signalintensität der Eckpunktmarker verwendet. Nach dem Normalisieren der Daten sind neben der Positivkontrolle (p-Peptid), der Assaykontrolle (C2) und den Guidedots (Alexa 555, 20ng) die sich vom Hintergrundsignal abhebenden Signale deutlich zu erkennen (Abbildung 42).

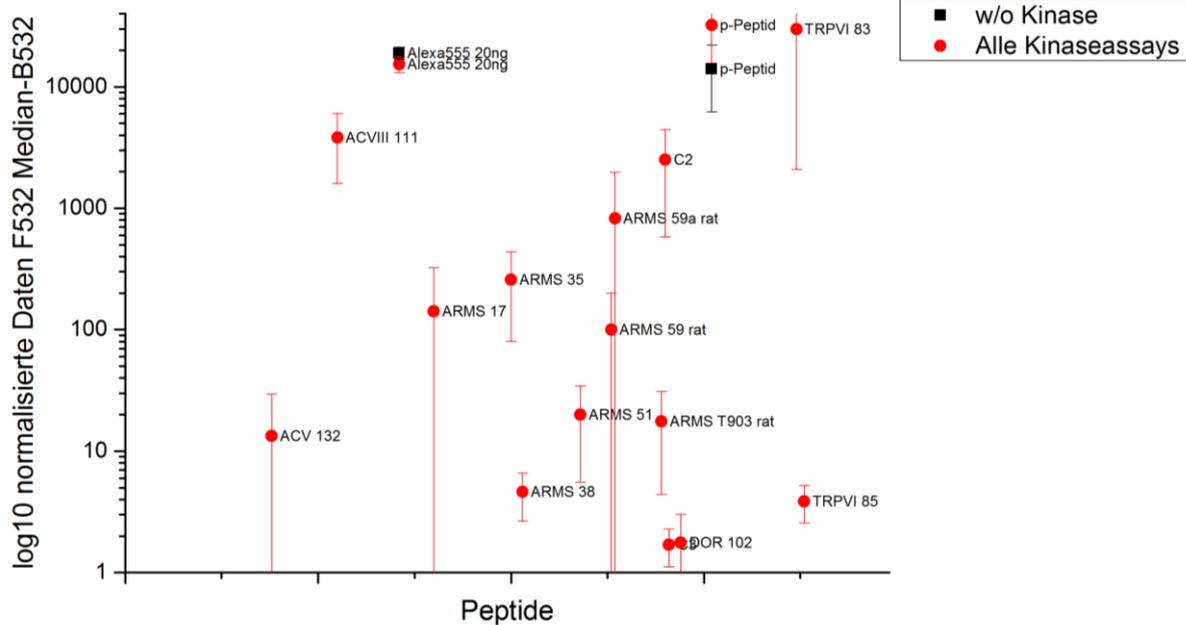


Abbildung 42 Normalisierte Daten des Kinaseassays zur Targetidentifizierung im Schmerzkontext

In der Abbildung sind einmal in schwarz hinterlegt, die Daten ohne Kinaseinkubation. Hierbei befinden sich bis auf den Eckpunktmarker (Alexa555,20ng) und das p-Peptid, alle um den 0 Wert und sind hier daher nicht aufgetragen. In Rot dargelegt sind die Mikroarraydaten für ein mit mPKA-C α inkubierten Peptidarrays (n=3). Es ist deutlich zu erkennen, dass 12 Peptide vermutlich eine Phosphorylierung durch die mPKA-C α erfahren haben und daher durch die Inkubation mit dem anti-pPKA Antikörper nachweisbar waren.

Als potentielles Target wurden alle Peptide gewertet, deren normalisierte Signalintensität nach dem Kinaseassay, im Vergleich zu den normalisierten Signalintensitäten ohne Kinaseinkubation, mind. 10fach höher war. Zusätzlich wurden alle Werte ausgeschlossen die niedriger liegen als die der Negativkontrolle (C3), da diese nicht phosphorylierbar ist. Insgesamt konnten 9 spezifische Peptide identifiziert werden (Tabelle 42). Bei den Wiederholungen wurden jedes Mal die gleichen Peptide identifiziert.

Nach den Versuchen mit rekombinanter Kinase, wurden die Versuche mit Zelllysat von HEK293 Zellen durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob nach einer Stimulierung des PKA Signalweges andere Peptide phosphoryliert werden und sich die Spezifität der rek. mPKA-C α von der Spezifität endogener humaner PKA-C α in Zellextrakt unterscheidet. Dazu wurden die Peptid Mikroarrays mit 40 μ g unstimulierten bzw. stimulierten HEK293 Zelllysat inkubiert. Als Kontrolle für die Funktionalität des Assays wurde unstimuliertes Zelllysat mit 250 U rek. mPKA-C α gespickt.

Tabelle 42 Normalisierte MFI-Werte der veränderten Peptidsignale nach Inkubation mit der mPKA-C α und Zelllysate

Peptid ID	w mPKA- C α	Stim. Zelllysate	Unstim. Zelllysate	Unstim.Zelllysate+ mPKA-C α	w/o mPKA- C α	Organismus
ACI 141	0	0,1	0	88	0	Human
ACV 132	13,3	0,5	0,1	912,8	0	Human
ACVIII 111	3816,9	0	0,13	2246,2	0	Human
ARMS 17	141,1	54,3	28,9	1048,2	0,1	Human
ARMS 35	258,9	1,3	0,4	4720	0	Human
ARMS 38	4,6	0	0	20,2	0	Human
ARMS 47	0	0	0	29	0	Human
ARMS 51	19,9	0,1	0	485,2	0	Human
ARMS 58 rat	0,5	0,9	0,1	372,6	0	Ratte
ARMS 59 rat	100	0,9	0	3289,8	0	Ratte
ARMS 59a rat	824	2,3	0,1	9621,2	0	Ratte
ARMS T903 rat	17,6	128	39,4	970,2	0	Ratte
TRPVI 83	29800,8	3,4	1,9	14073	0	Human
TRPVI 85	3,8	0,1	0	0	0	Human
DOR 102	1,8	0,2	0	2,6	0	Human
p-Peptid	32317	15319	6744	5683,4	14065,6	Human
Negativkontrolle (C3)	1,6	0	0	145,4	0	Human
Standardpeptid (C2)	2504,3	6,7	5,9	3916,6	0	Human

Die Versuche mit rek. mPKA-C α und mit Zellextrakt zeigen eine große Übereinstimmung bei den identifizierten Peptiden. Die Daten zeigen, dass bei den Versuchen mit Zelllysaten generell geringe Signalintensitäten gemessen wurden. Alle detektierten Signale für die Arbeiten mit Zelllysate liegen nahe des Hintergrundsignals (C3). Alle Peptide wurden mit stimulierten Extrakt besser phosphoryliert als mit unstimulierten Zellextrakt, wobei das Peptid ARMS T903 rat mit stimulierten Extrakt besser phosphoryliert wurde als mit rek. mPKA-C α . Durch Zugaben von rek. mPKA-C α zum unstimulierten Extrakt wurden teilweise deutlich höhere MFI erhalten als mit der mPKA-C α alleine. Die höheren Werte beim Spiken des Zelllysates mit mPKA-C α könnten ein Hinweis darauf sein, dass im Zellextrakt weitere Faktoren die Aktivität der mPKA-C α positiv beeinflussen.

3.4.3 Inhibition der Phosphorylierung durch PKI und H89

Zur Inhibition der Kinasereaktion wurde der Reaktionsmix mit zwei Inhibitoren versetzt. GST-PKI ist ein PKA spezifischer Inhibitor (K_i : 0,5 nM), während H89

(K_i: 48 nM) ein unspezifischer Inhibitor ist. Die Zugabe von H89 führt zu einer unvollständigen Inhibierung der PKA und inhibiert auch weitere Kinasen, wie z. B. PKB α , MAPKAP-K1b etc. (Meinkoth, Alberts *et al.* 1993, Hauer, Barthe *et al.* 1999, Johnson, Akamine *et al.* 2001, Lochner und Moolman 2006). Zu einem Kinaseassayansatz wurden entweder 50 nM PKI oder 1 μ M H89 zugesetzt. Als Kontrolle wurde ein Kinaseassay ohne Zugabe eines Inhibitors parallel durchgeführt.

Durch die Zugabe von PKI konnte eine komplette Inhibition der Phosphorylierung der Peptide erreicht werden (Abbildung 44) wohingegen die Zugabe von H89 die mPKA-C α nicht komplett inhibiert. Mit dem Versuch konnte gezeigt werden, dass eine komplette Inhibition der Phosphorylierung mittels PKI möglich war. Dadurch konnte des Weiteren festgestellt werden, dass keine Kinase mehr an den Targets oder der Oberfläche gebunden hat, da sonst die Auto-Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α ein Signal hervorgerufen hätten.

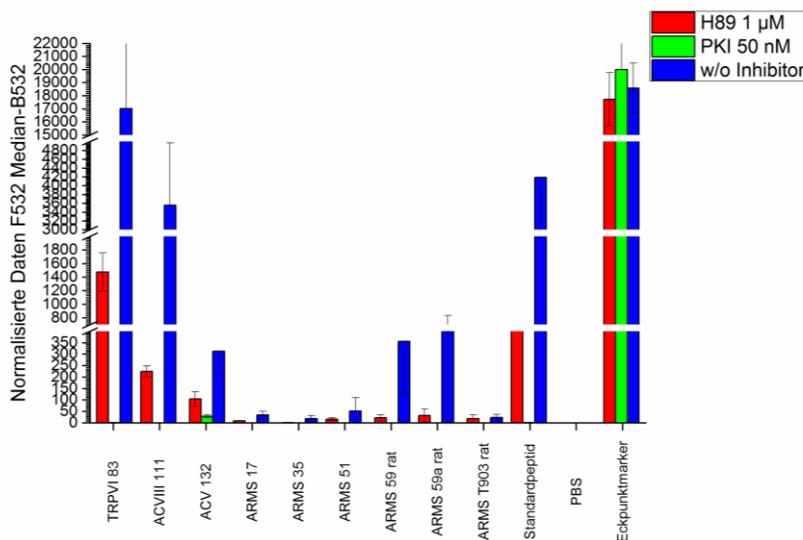


Abbildung 44 Balkendiagramm der Inhibition der mPKA-C α mittels PKI und H89 auf Peptid Mikroarrays

Dargestellt sind die Peptide die ohne Inhibitorzugabe ein positives Signal auf den Peptid Mikroarrays ergaben (blau). Durch die Zugabe von 50 nM PKI konnte die mPKA-C α komplett inhibiert werden (grün), wobei bei dem Nutzen von H89 eine Reduktion, aber keine vollständige Inhibition (rot) des Signals zu erkennen war,

3.5 Verifikation mittels BioPlex3D

Zur Verifikation der gemessenen Daten wurden die potentiellen positiven Targetpeptide mit Hilfe einer zweiten unabhängigen Methode erneut vermessen. Dazu wurde ein lösungsbasiertes Bead System, das BioPlex3D, verwendet. Bei der Targetidentifizierung mittels des BioPlex3D konnte neben der Verifikation der Daten, auch Daten über die Targetpräferenz der mPKA- α gesammelt werden. Auf Grund der höheren Sensitivität des BioPlex3D wurden auch potentielle Targetpeptide, mit sehr niedrigem Signal auf den Peptid Mikroarrays, vermessen. Die Etablierung des Kinaseassays wurde wie für die Peptid Mikroarrays beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Primärantikörper (anti-V5 und anti-pPKA Antikörper) entsprechen denen des Peptid Mikroarrays und wurden in derselben Verdünnung eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde an Stelle des anti-rabbit, IgG konjugierten Alexa Fluor 555 ein anti-rabbit, IgG R-Phycoerythrin gelabelter Antikörper verwendet.

Tabelle 43 Peptidsequenzen die zur Verifikation am BioPlex3D vermessen wurden

Peptid	Organismus	Sequenz
p-Peptid	Human	HQKRREILSRRPpSYRKILNDLGKPIPPELLGLDST
Standardpeptid	Human	HQKRREILSRRPSYRKILNDLGKPIPPELLGLDST
ACVIII 111	Human	HESVSSSDRRNSGATFTGKPIPPELLGLDST
ACV 132	Human	HAMIAKMNRQRTNSIGHNPGKPIPPELLGLDST
ARMS 17	Human	HGSKTALNRRDTYRRRQGKPIPPELLGLDST
ARMS 35	Human	HAPHGEPARRASHNELPGKPIPPELLGLDST
ARMS 51	Human	HQKAYNLNRTPTVTLNGKPIPPELLGLDST
TRPVI 83	Human	HGIQYFLQRRPSMKTLFGKPIPPELLGLDST
DOR 102	Human	HKEKDRSLRRITRMVLVGKPIPPELLGLDST
ARMS 59 rat	Ratte	HVPHGESARRSHTELPGKPIPPELLGLDST
ARMS 59a rat	Ratte	HVPHGESARRASHTELPGKPIPPELLGLDST
ARMS 59b rat	Ratte	HVPHGESARRSAHTELPGKPIPPELLGLDST
ARMS T903 rat	Ratte	HGSKTALNRRDTYRRRQGKPIPPELLGLDST

In der Tabelle 43 sind die Peptide, sowie der Organismus und die Sequenz angegeben. Innerhalb der Sequenz sind die potentiellen Phosphorylierungsstellen der PKA rot markiert und in Grün der C-terminale V5 Tag. Das p-Peptid liegt schon in phosphorylierter Form vor und wurde als Kontrolle für die Antikörperbindung genutzt, während das Standardpeptid als Kontrolle für die Phosphorylierung diente.

Durch den vorhandenen V5-Tag an allen Peptiden wurde die Kopplung der Peptide an die Beads mit Hilfe des anti-V5 Antikörpers routinemäßig überprüft. Es wurden hierbei 100 Beads pro Peptid unter Standard PMT Bedingungen mit einem Gate von

7.500-20.000 vermessen. Um Kreuzreaktivitäten zwischen den Peptiden auszuschließen sind alle Kontrollmessungen auch im Singleplex Ansatz durchgeführt worden. Es konnten keine Veränderungen der Signale zwischen Singleplex und Multiplex festgestellt werden. Alle folgenden Darstellungen sind Multiplex Messungen, d.h. alle 14 Peptide wurden parallel in einem Ansatz vermessen. Die Peptide konnten durch den V5-Tag im Multiplex detektiert werden, daraus folgt das die Kopplung aller Peptide an die Oberfläche der Beads erfolgreich war (Abbildung 45). Die Unterschiede bei den Signalintensitäten deuten auf geringe Schwankungen bei der Immobilisierung hin.

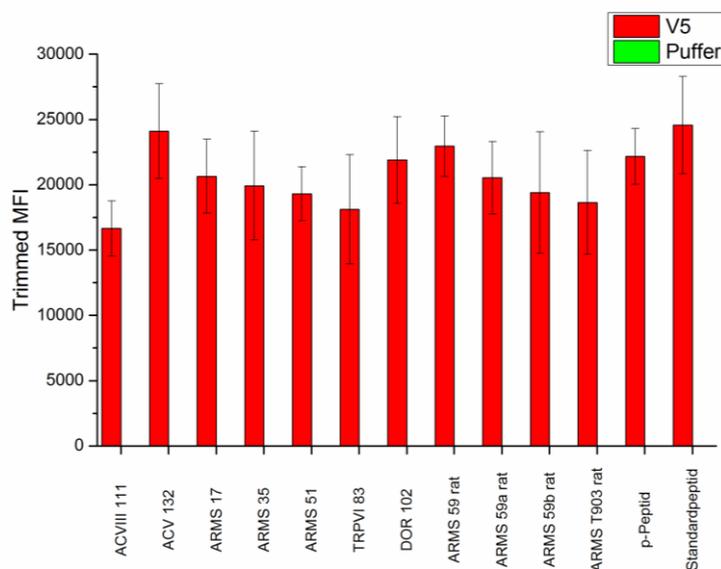


Abbildung 45 Balkendiagramm zur Kopplungskontrolle der Peptide am BioPlex3D

Alle gekoppelten Peptide sind durch Einsetzen des anti-V5-Antikörpers 1:10.000 und einem sekundär gelabelten R-Phycoerythrin Antikörpers messbar. Wie zu sehen ist, gab es zwischen den einzelnen Peptiden Schwankungen in der Signalintensität (rot). Fand die Inkubation ausschließlich mit dem Sekundärantikörper statt und der Primärantikörper wird durch Puffer ersetzt, waren keinerlei Hintergrundsignale detektiert worden (grün). Auf der Y-Achse sind die Trimmed MFI Werte aufgetragen, d.h. 5 % der höchsten und der niedrigsten Werte werden nicht in die Berechnung des Mittelwertes einbezogen.

3.5.1 Verifikation der potentiellen mPKA-C α Targets

Um eine möglichst detaillierte Darstellung des Ablaufs der Targetphosphorylierung zu erhalten und Unterschiede in der Kinasebindung zwischen den Targets zu detektieren wurde der Grad der Phosphorylierung zu unterschiedliche Zeitpunkten bestimmt. Anstelle der Endpunktmessung auf den Peptid Mikroarrays konnte so der zeitliche Verlauf der Reaktion untersucht werden. Die Peptide wurden mit 250 U mPKA-C α für definierte Zeiten (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 Minuten) inkubiert, die Beads anschließend

gewaschen und mit dem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Das p-Peptid wurde als Kontrolle für die Antikörperbindung verwendet und lieferte Werte zwischen 25.000 und 30.000 MFI. Die Messwerte wurden mit einem sigmoidalen Fit nach Michaelis-Menten gefittet. Die gemessenen Daten ließen sich anhand ihrer Kinetik in drei Kategorien einteilen (Abbildung 46).

A: Schnelle Kinetik

B: Mittlere Kinetik

C: langsame Kinetik

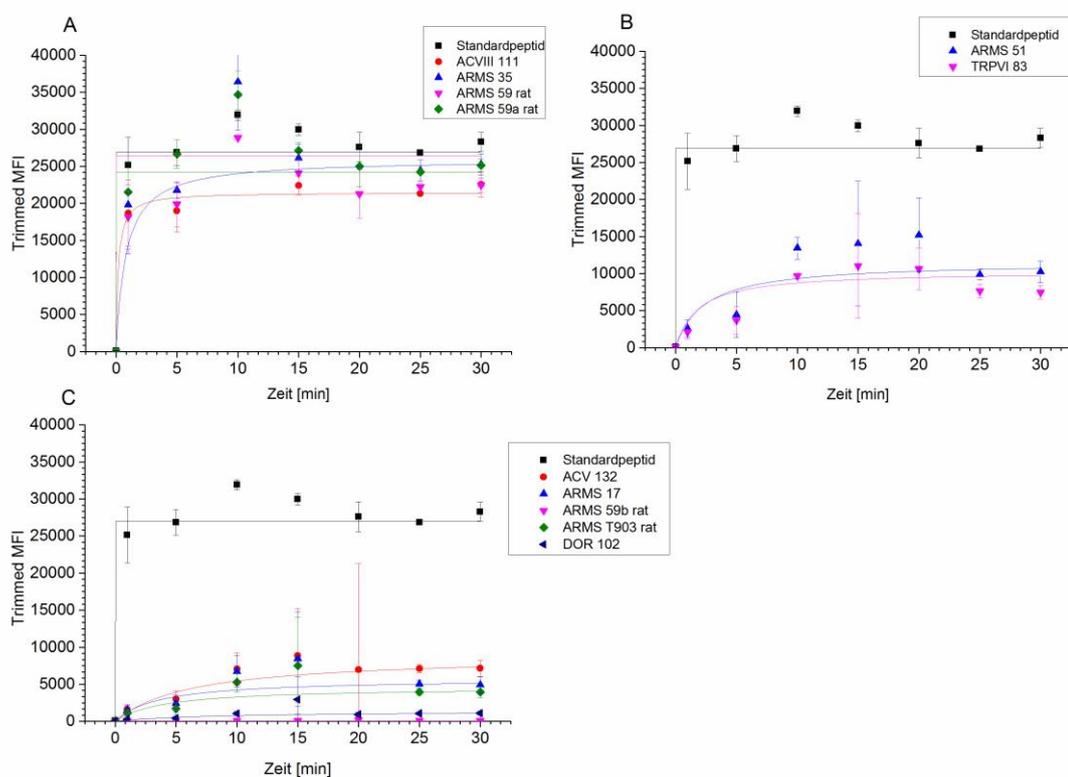


Abbildung 46 Verifikation der Peptid Mikroarraydaten und Kinetik mittels BioPlex3D

Es wurden acht Zeitpunkte in der Phosphorylierungskurve aufgenommen. Hierbei sind die Beads jeweils für 1, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten mit der mPKA-C α inkubiert worden. Mit steigender Dauer stieg auch die Signalintensität bei den meisten potentiellen Targets an, wobei deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Peptiden sichtbar wurden. Während ACVIII 111, ARMS 35, ARMS 59 rat, ARMS 59a rat alle vergleichbare Werte wie das Standardpeptid aufwiesen und schon nach ein bis fünf Minuten in der Sättigung sind und innerhalb der ersten Minuten die Hälfte alle Peptide phosphoryliert vorliegen (A), war bei den restlichen Peptiden eine langsamere Zunahme der Signale oder keine Signalveränderung feststellbar (B, C). Das Standardpeptid ist in allen Teilbereichen der Abbildung mitgeführt, um einen Orientierungswert zu erhalten (schwarzes Rechteck).

Teil A der Abbildung 46 zeigt, die Peptide die eine schnelle Kinetik, vergleichbar mit dem des Standardpeptides, aufweisen und innerhalb der ersten Minute in der Sättigung sind. In Teil B der Abbildungen sind die Peptide mit einer mittleren Kinetik

gruppiert, d.h. die Sättigung der Signale tritt nach fünf bis 10 Minuten ein. Die mit der langsamsten Kinetik sind in Teil C der Abbildung zusammengefasst, wobei die Sättigung hier erst nach 10-15 Minuten eintritt. Ein Sonderfall ist das ARMS 59b rat Peptid, bei welchem keine Phosphorylierung messbar ist. Hierbei befindet sich die potentielle Phosphorylierungsstelle direkt hinter dem Arginin (Tabelle 44). Wie bei der Qualitätskontrolle des Antikörpers (Abschnitt 3.2.3) zu sehen ist kann es sein, dass eine Phosphorylierung vorliegt, welche der anti-pPKA Antikörper nicht erkennt.

Die unterschiedlichen Signalintensitäten können auf Grund einer unterschiedlichen Antikörperbindung zu Stande kommen. Es wurde daher auch eine von dem Antikörper unabhängige Betrachtung vorgenommen, der Zeitpunkt an welchem die Hälfte eines Peptides phosphoryliert vorliegt ($v_{max_{1/2}}$). Hierbei werden Unterschiede in der Targetpräferenz der Kinase deutlich.

Tabelle 44 $v_{max_{1/2}}$ der potentiellen mPKA-C α Targetsites

Peptid	Phosphomotiv	$v_{max_{1/2}}$ [Minuten]
Standardpeptid	RRxS	0,03
ARMSVIII 111	RRNS	0,18
ARMS 35	RRAS	0,78
ARMS 59 rat	RRSS	0,03
ARMS 59a rat	RRAS	0,03
ARMS 51	RTPS	2,16
TRPVI 83	RRPS	1,8
ACV 132	RTNS	6,3
ARMS 17	RRDT	3,6
ARMS 59b rat	RRSA	-
ARMS T903 rat	RRDT	4,05
DOR 102	RRIT	7,74

Es existiert kein erkennbarer Zusammenhang zwischen dem Aufbau des Phosphorylierungsmotives und der zeitabhängigen Phosphorylierung der Peptide (Tabelle 44). Wäre dies der Fall müssten alle Peptide mit RRxS Motive (ACV 111, TRPVI 83, DOR 102, ARMS 17, ARMS 35, ARMS 59 rat) ähnliche $v_{max_{1/2}}$ aufweisen. Das kann bedeuten, dass nicht nur die Erkennungssequenz, sondern auch die Umgebungssequenz einen Einfluss auf die Phosphorylierung hat.

Eine Gegenüberstellung der Daten des BioPlex3D und der Peptid Mikroarraydaten zeigt eine gute Übereinstimmung (Tabelle 45). Für die BioPlex3D Daten wurde dabei die maximale Signalstärke am Ende der Inkubationszeit berücksichtigt, um einen

besseren Vergleich mit den Mikroarraydaten zu gewährleisten. Die Unterteilung innerhalb der Tabelle erfolgt folgendermaßen: +++ höchste Signalintensitäten, ++ mittlere Signalintensitäten, + niedrige Signale, sowie – kaum bis kein Signal. Konnten auf den Peptid Mikroarrays gute Signale vermessen werden, war dies auch beim BioPlex 3D möglich. Wurden niedrige bis keine Signale bei den Peptid Mikroarrays gemessen wie im Falle des ARMS 59b rat, DOR 102 oder ARMS T903 waren die Signale auch beim BioPlex3D niedrig.

Tabelle 45 Vergleichbarkeit Peptid Mikroarray und BioPlex3D

+++ höchste Signalintensitäten, ++ mittlere Signalintensitäten, + niedrige Signale, sowie – kaum bis kein Signal

Peptide	Peptid Mikroarray	BioPlex3D
Standardpeptid	+++	+++
ACVIII 111	+++	+++
ACV 132	++	++
ARMS 17	++	++
ARMS 35	++	+++
ARMS 51	+	++
TRPVI 83	+++	++
DOR 102	+	+
ARMS 59 rat	++	+++
ARMS 59a rat	++	+++
ARMS 59b rat	-	-
ARMS T903	+	+

3.5.2 Screening von potentiellen Phosphorylierungsstellen der mPKA- α die die Interaktion von TRPVI/ARMS aus Ratte beeinflussen

Dr. Melanie Kaufholz der Universität Kassel erstellte im Rahmen ihrer Dissertation ein hypothetisches Modell zur Interaktion der PKA, ARMS und TRPVI, welches auch durch weitere unveröffentlichte Daten gestützt wird (Abbildung 47). Die bisherigen Untersuchungen führten zu der Vermutung, dass eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von ARMS zu einer Änderung der Interaktion von ARMS und TRPVI führt. Während bei TRPVI bekannt ist, dass die PKA am Sensitivierungsprozess beteiligt ist, ist deren Interaktion und der Effekt auf ARMS wenig beschrieben (Bhave, Zhu *et al.* 2002, Bhave und Gereau 2004). Dr. Melanie Kaufholz konnte zeigen, dass ARMS cAMP-abhängig phosphoryliert wird, wobei die Kinase und die exakte Zuordnung der Phosphorylierungsstellen nicht bewiesen werden konnten. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

definierte Zeiten mit 250 U mPKA-C α inkubiert und die Phosphorylierung mit dem anti-pPKA Antikörper nachgewiesen. Für jede Beadpopulation wurden mindestens 100 Einzeldaten generiert und mit Standard-PMT, sowie einem Gate von 7.500 bis 20.000 vermessen.

Alle nachfolgenden Messungen wurden an drei unabhängigen Tagen, mit dem gleichen Batch durchgeführt (n=3), um Variationen auf Grund von Kopplungsvarianzen auszuschließen.

Tabelle 46 Potentielle Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α bei ARMS, Ratte

Peptid ID	Peptid	Sequenz
ARMS 59 rat	Ser1251-1252	HVPHGESARRSSHTELPKPIPPELLGLDST
ARMS 59a rat	Ser1251A	HVPHGESARRASHTELPGKPIPPELLGLDST
ARMS 59b rat	Ser1252A	HVPHGESARRSAHTELPGKPIPPELLGLDST
ARMS 60 rat	Ser1439/40	HGSKLLPGKKSSERPSLGKPIPPELLGLDST
ARMS 60a rat	Ser1440A	HGSKLLPGKKSAAERPSLGKPIPPELLGLDST
ARMS 60b rat	Ser1439A	HGSKLLPGKKASERPSLGKPIPPELLGLDST
ARMS 61 rat	Ser1526/S1527	HYLSDALLDKKDSDDSGVRGKPIPPELLGLDST
ARMS 61a rat	Ser1526A	HYLSDALLDKKDA DSGVRGKPIPPELLGLDST
ARMS 61b rat	Ser1527A	HYLSDALLDKKDSADSGVRGKPIPPELLGLDST
ARMS Ser882 rat	Ser882	HGTQEDTDRRVVSQNSLGGKPIPPELLGLDST
ARMS T903 rat	T903	HGSKTALNRRDTYRRRQGKPIPPELLGLDST
ARMS S918 rat	Ser918	HQMQRITITRQMSFDLTKGKPIPPELLGLDST

Die meisten Peptide enthalten klassische PKA Motive, die der Konsensussequenz RRXS/T entsprechen (Argininmotiv). Davon abweichende Peptidsequenzen KKXS/T wurden als Lysinmotiv bezeichnet. Der für die Detektion der Phosphorylierung verwendete anti-pPKA Antikörper erkennt die Sequenz RRXpS aber auch KKxpS, diese jedoch deutlich schlechter (Abschnitt 3.2.3).

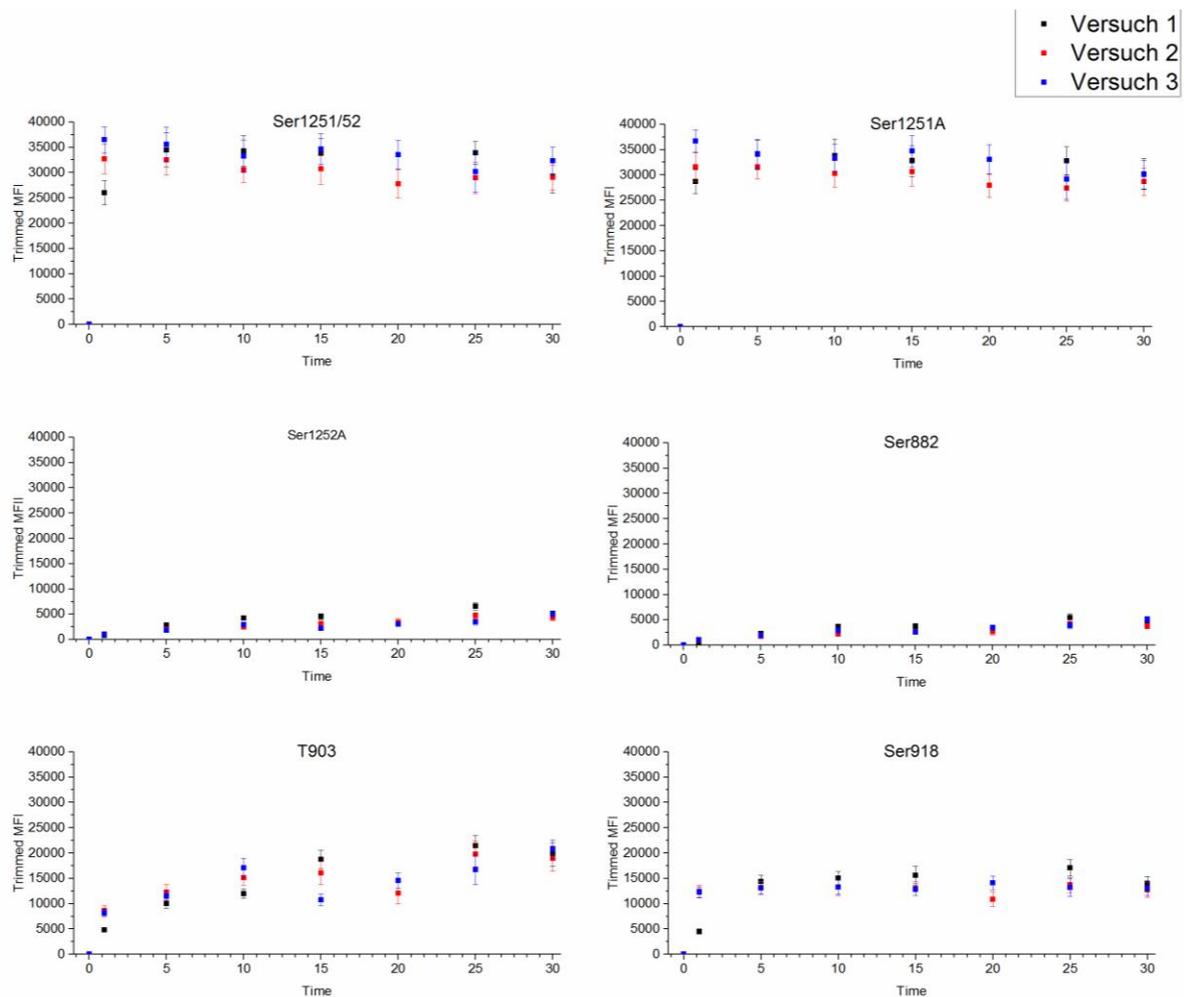


Abbildung 48 Zeitabhängige Phosphorylierung von ARMS Peptiden mit Argininmotiven

Bei Ser1251/52 wurde schon nach einer Minute eine maximale Phosphorylierung erreicht, das gleiche ist zu sehen, wenn an Stelle des Ser1251 ein Alanin in der Sequenz vorhanden ist. Verändert man hingegen das Ser 1252 zu Alanin war kaum noch ein Signal detektierbar. Ser882 zeigte trotz eines RRXS Kinasmotives nur schwache Signale. Bei T903 und Ser918 war eine stetige Phosphorylierung zu erkennen die erst nach 10 bis 15 Minuten ihr Maximum erreichte. Ser 918 zeigte ein ähnliches Phosphorylierungsmuster wie Ser1251/52 und erreichte auch nach einer Minute ihr Maximum. Dargestellt sind drei unabhängige Versuche, wobei eine hohe Übereinstimmung zwischen den einzelnen Messtagen vorliegt.

Abbildung 48 zeigt die zeitabhängige Phosphorylierung der ARMS Peptide, welche ein Argininmotiv beinhalten (Tabelle 46). Die Phosphorylierung durch die mPKA-Ca findet sehr schnell innerhalb der ersten Minuten statt, wie z.B. bei Ser1251/52, Ser1251A und Ser918 zu sehen ist. Bei diesen Sequenzen ist die maximale Phosphorylierung bereits nach ca. einer Minute erreicht. Das Peptid T903 wird langsamer phosphoryliert. Die maximale Phosphorylierung ist erst nach ca. 10 Minuten erreicht. Durch Mutation der einzelnen Serine in der Sequenz 1251/52 zu Alaninmutanten konnte nachgewiesen werden, dass bei Austausch des Ser1251 zu Alanin kaum ein Signalverlust zu sehen ist, während es bei einem Austausch des Ser1252 zu Alanin

kaum noch eine Phosphorylierung detektierbar ist. Das bedeutet, dass das Serin1252 vermutlich das präferierte Target der PKA ist.

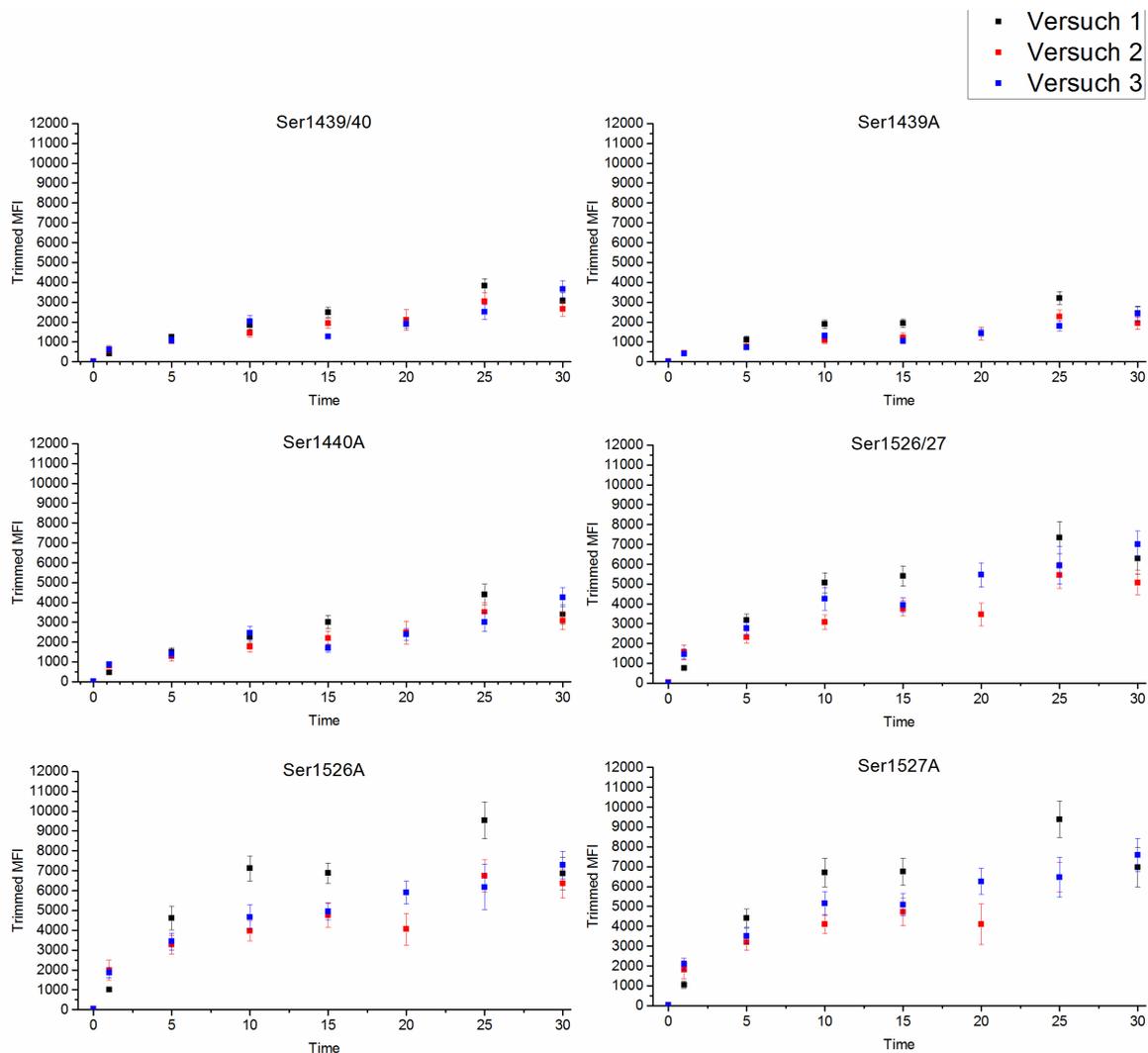


Abbildung 49 Zeitabhängige Phosphorylierung von ARMS Peptiden mit Lysinmotiven

Auch bei den Lysinmotiv Peptiden kam es zu einem leichten Anstieg der Signalintensitäten mit der Zeit bei der Inkubation mit der mPKA- α . Es erfolgte hierbei ein stetiger Anstieg der Phosphorylierung unabhängig von dem Peptid. Auch die Punktmutationen der doppelten Serine hatten hierbei keinen Einfluss, sondern die Signale blieben auf einem gleichen Niveau.

Abbildung 49 zeigt die zeitabhängige Phosphorylierung der ARMS Peptide, welche ein Lysinmotiv beinhalten (Tabelle 46). Wie in Abbildung 49 zu sehen ist, konnte mit Hilfe des anti-pPKA Antikörpers auch bei Lysinmotiven nach der Inkubation mit der mPKA- α ein Anstieg der Signalintensität und somit eine Phosphorylierung der Peptide gezeigt werden. Die maximale Phosphorylierung wurde deutlich langsamer erreicht.

Bei den untersuchten Peptiden von ARMS konnte eine Phosphorylierung durch die mPKA-C α vorgenommen werden. Bei den Argininmotiv Peptiden konnte bei Ser882, sowie Ser1252A eine deutlich verminderte Phosphorylierung im Vergleich zu den anderen detektiert werden und somit als direktes Target der mPKA identifiziert werden. Bei den Peptiden mit einem Lysinmotiv kann eine verminderte Signalintensität von Ser1439/40 im Vergleich zu Ser1526/26 festgestellt werden.

Das Screening potentieller Phosphorylierungsstellen von ARMS, Isoform 2 der Ratte welche die Interaktion mit dem TRPV1 eventuell beeinflusst hat gezeigt, dass alle untersuchten Phosphorylierungsstellen (Lysin und Argininmotive) von der mPKA-C α phosphoryliert und nachgewiesen werden konnten. Es bestehen aber deutliche Unterschiede was die Targetpräferenz angeht. Hierbei sind vor allem Ser1251/52 und Ser918 als Haupttargets der PKA-C α zu vermuten. Bei der Phosphorylierungsstelle Ser1251/52 konnte mit Hilfe der Alaninmutanten die Annahme gestärkt werden, dass das Ser1252 die Haupttargetsite der PKA-C α darstellt.

3.6 Alternative Nachweismöglichkeiten von Phosphorylierungen

Der Fokus dieser Arbeit lag darin Phosphorylierungen von Peptiden auf Multiplexing Plattformen nachzuweisen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aussage der Ergebnisse von der Spezifität der verwendeten Antikörper abhängt. Die Ergebnisse der Versuche mit Peptid Mikroarrays (Abschnitt 3.2.3) und die Untersuchungen der ARMS Peptide (Abschnitt 1.5.2) zeigen, dass Peptide mit einer veränderten Targetsequenz für den Antikörper (RRXpS/pT) von dem Antikörper nicht oder nur schlecht erkannt werden. Das bedeutet, dass mit dem Antikörper nur ein Teil an potentiellen Phosphorylierungsstellen detektiert werden kann.

Mit den getesteten phospho spezifischen Antikörper (Phospho-Serin, Phospho-Serin/Threonin, Phospho Threonin der Firma abcam) konnte keine spezifische Detektion von phosphorylierten Peptiden erfolgen. Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene nicht radioaktive Nachweismethoden für Phosphorylierungen ausgetestet, die eine sequenzunabhängige Detektion von Phosphorylierungen ermöglichen.

3.6.1 ATP-Analoga

Die Verwendung modifizierter ATP Varianten bietet einige Vorteile. Vor allem Enzyme gleicher Proteinkinase-Familien beinhalten oft ähnliche oder fast identische Targetsequenzen. Diese Enzyme in komplexen Gemischen wie z.B. Zelllysat zu unterscheiden wird durch die Nutzung von ATP-Analoga möglich. Das ATP kann beispielsweise so modifiziert werden, dass das übertragene Gamma-Phosphat nicht mehr aus der Bindetasche der Kinase zulösen ist, sodass eine kovalente Bindung zwischen Kinase und Target entsteht und so z.B. bei der Arbeit mit Zelllysat ein exakter Nachweis erfolgen kann, welche Kinase die Targetsequenz gebunden hat. Auch kann das γ -Phosphat amino oder azid modifiziert vorliegen, wodurch nachdem Übertrag des Phosphates mit Hilfe einer Click-Chemie Reaktion ein Farbstoff an das Phosphat angebracht werden kann. Ein weiterer Nutzen der Bioorthogonalen Chemie ist, dass sie in lebenden Zellen vollzogen werden kann (Prescher und Bertozzi 2005). Durch die Modifizierung des γ -Phosphates kann eine Unterscheidung zwischen dem natürlicherweise in Zellen vorkommenden ATP und dem Einbau von modifizierten ATPs vorgenommen werden. Der Nachteil von ATP Analoga besteht darin, dass sie von Kinasen schlechter erkannt/benutzt werden und daher bei deren Verwendung oftmals eine schlechtere Phosphorylierungseffizienz auftritt. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit verwendeten ATP-Derivate werden im Folgenden vorgestellt.

3.6.1.1 ATP- γ -S

Allen *et al.* beschrieb das ATP-Analoga ATP- γ -S (Allen, Li *et al.* 2007). Dieses ATP-Analoga trägt am gamma-Phosphat eine Schwefelgruppe. Wird das γ -Phosphat mit dem Schwefel auf ein Target übertragen, kann anschließend ein Alkylierungsreagenz (p-Nitrobenzyl mesylate, PNBM) genutzt werden, welches für die Bildung eines Thiophosphoester an dem übertragenen Phosphat sorgt. Dieser kann über einen Thiophosphoester Antikörper nachgewiesen. Verwendet man ATP, kommt es bei der Alkylierungsreaktion zu einer Etherbildung, welcher durch den Antikörper nicht erkannt wird (Abbildung 50). Da der Antikörper nicht sequenzspezifisch ist, sondern über den Nachweis der Thiophospho-Ester Gruppe reagiert, kann diese Methode verwendet werden um weitere Targets zu detektieren.

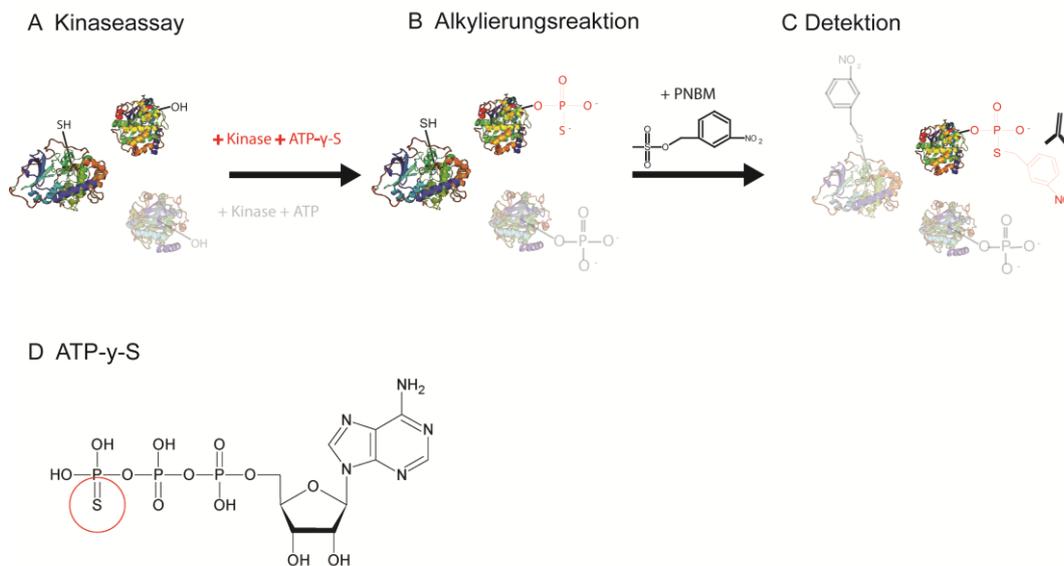


Abbildung 50 Schematische Darstellung zum Nachweis einer Phosphorylierung mit ATP-y-S

Durch Zugabe von ATP-y-S an Stelle von ATP können Targets phosphoryliert werden (A). Nachdem zu fügen eines Alkylierungsreagenzes wird ein Thiophosphoester gebildet. Im Gegensatz zu dem Ether bei dem Einbau normalen Phosphates (grau) (B). Dieser Ester kann im Anschluss spezifisch mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen werden (C). ATP-y-S unterscheidet sich durch das Schwefelatom am y-Phosphates des ATP (rot markiert) (D). Grafik modifiziert nach Allen *et al.*

Die Akzeptanz von ATP-Analoga ist durch die Modifikation am y-Phosphat reduziert. Deswegen wurde für die Versuche sowohl die eingesetzte Konzentration des ATP-y-S im Vergleich zu ATP erhöht als auch die Kinaseassayzeit verlängert. Für den Versuch wurden bei dem Kinaseassay auf Peptid Mikroarrays 1 mM ATP-y-S für 45 Minuten eingesetzt und die Alkylierungsreaktion für 45 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nachdem Assay konnten keine Signale auf den Peptid Mikroarrays detektiert werden. Es war nicht möglich die Phosphorylierung mit Hilfe des ATP-y-S auf Peptid Mikroarrays nachzuweisen. In ersten Vorversuchen mit dem BioPlex3D konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung des Standardpeptides an Beads mit Hilfe des ATP-y-S möglich war.

3.6.1.2 *y*-(2-Azidoethyl)-ATP

Lee *et al.* beschrieb als erster das ATP-Analoga *y*-(2-Azidoethyl)-ATP (Abbildung 51), um Targets der Proteinkinase cdk2 nachzuweisen (Lee, Elphick *et al.* 2009).

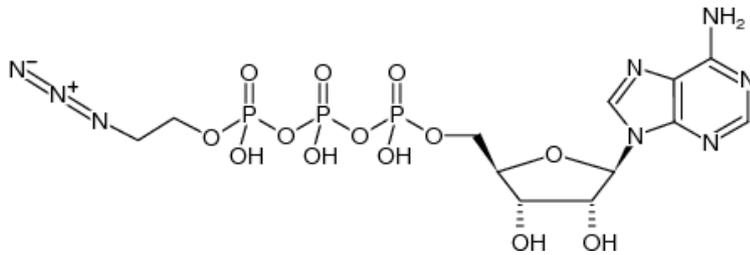


Abbildung 51 Strukturformel γ -(2-Azidoethyl)-ATP⁴

Der Übertrag des Azid-modifizierten γ -Phosphates kann mit Hilfe von DBCO-modifizierten Farbstoffen nachgewiesen werden. Diese Reaktion wird mit Hilfe der Cu(I) freien Strain Promoted Azid-Alkyne Click-Chemie (SPAAC) (Abbildung 51) gewährleistet.

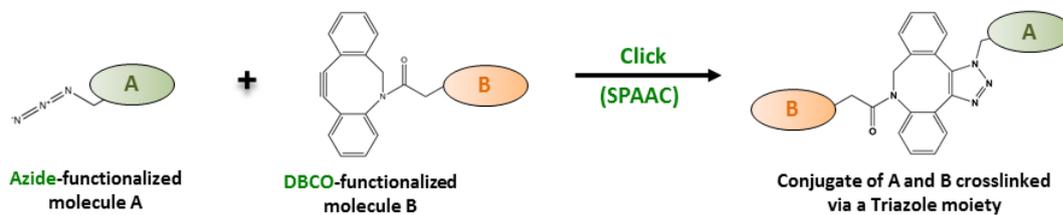


Abbildung 52 Schematische Darstellung der SPAAC Reaktion⁵

Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Aufbaus ist das Azid modifizierte Molekül A das Phosphorylierte Peptid an einer Oberfläche gekoppelt. Das Phosphat trägt hierbei die Azid Modifikation. Während Das DBCO funktionalisierte Molekül B ein Fluoreszenz Farbstoff darstellt. Durch die Inkubation beider sollte eine Reaktion stattfinden und so der Nachweis der Phosphorylierung erfolgen.

Der Kinaseansatz beinhaltete 1 mM γ -(2-Azidoethyl)-ATP, 1 x NaMOPS, sowie 500 U mPKA-C α . Die Assaydauer wurde auf eine Stunde erhöht. An Stelle des PKA Puffers wurde 1 x NaMOPS als Assaypuffer eingesetzt, um ein Abreagieren der Azid Gruppen, durch das im PKA Puffer enthaltene TRIS, nach Übertrag des Phosphates zu verhindern.

An Stelle von Antikörpern wurde der Peptid Mikroarray für eine Stunde bei 37 °C mit 2 μ g/mL DBCO-Sulfo-Cy3 Farbstoff inkubiert. Alle Waschschrte wurden wie im Standardprotokoll (2.5.2) beschrieben durchgeführt.

⁴ <https://www.jenabioscience.com/nucleotides-nucleosides/nucleotides-by-structure/nucleotides-labeled-with/azide-n3/nu-1701-gamma-2-azidoethyl-atp>

⁵ <https://www.jenabioscience.com/nucleotides-nucleosides/nucleotides-by-structure/nucleotides-labeled-with/dbco>

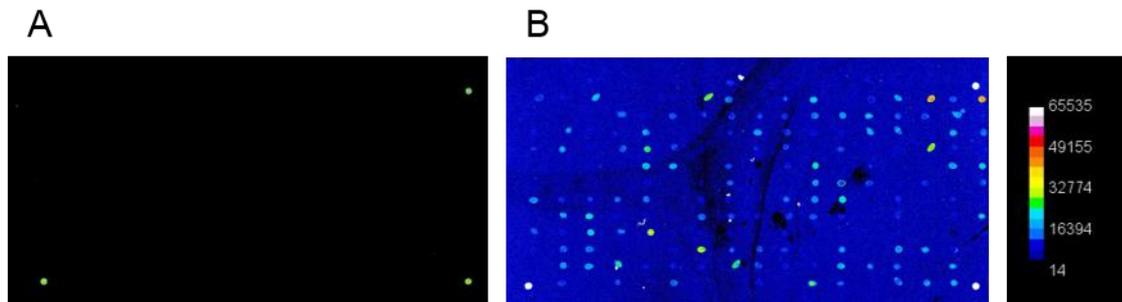


Abbildung 53 Fluoreszenzaufnahmen von Peptid Mikroarrays nach der Phosphorylierung von Peptiden mittels γ -(2-Azidoethyl)-ATP

Direkt nach dem Spotten waren nur die Eckpunktmarker zu erkennen (A). Nach dem Kinaseassay und der SPAAC Reaktion mit dem DBCO-Sulfo-Cy3 Farbstoff wurden mehrere Signale detektiert.

Die Durchführung des Kinaseassay mit dem Azid modifizierten ATP und der anschließenden SPAAC Reaktion mit DBCO-Sulfo-Cy3 führt zu einer Signalzunahme an den Peptiden. Diese Signalzunahme wurde auch bei der Negativkontrolle, welche nicht phosphoryliert werden kann, detektiert. Bei Vorversuchen auf dem BioPlex3D konnten bisher keine validen Daten produziert werden.

3.6.1.3 γ -AminoethylAmino(AEA)-ATP

Das γ -AEA-ATP wurde von der Firma BIOLOG (Bremen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Dieses trägt am γ -Phosphat eine Amino Gruppe. Nach Übertrag des amino modifizierten γ -Phosphates durch die mPKA-C α kann dieser mit Hilfe eines NHS-Ester Farbstoffes (Dyomics Dye 648P1 Fluorophore) nachgewiesen werden. Das Kinaseassay sowie die Inkubationszeiten und Kinasekonzentration wurden wie beim γ -(2-Azidoethyl)-ATP verwendet.

Nach dem Auswerten der Peptid Mikroarrays konnte eine Signalzunahme für alle Peptide, auch der Negativkontrolle, nachgewiesen werden. Der Farbstoff band an freie Aminogruppe der Peptide, welche ungeschützt vorlagen und ist somit nicht spezifisch für das übertragene Phosphat. Es erfolgten daher auch keine Versuche mit dem BioPlex3D.

3.6.2 Phospho Threonin spezifische Binder

In Kooperation mit Brian Kay (USA, Chicago) war es möglich drei neuartige spezifische anti-Phospho-Threonin Binder, welche aus der Forkhead Associated Domäne (FHA1) des Rad53 Proteins aus der Hefe stammen, zu testen. Die Binder haben eine Größe

von ca. 23 kDa und sollen sequenzunabhängig phosphorylierte Threonine detektieren (Venegas, Pershad *et al.* 2016). Diese Binder wurden mit am Threonin phosphorylierten Peptiden auf der BioPlex3D Plattform auf ihre Spezifität getestet werden. Alle drei Binder besitzen einen Flag-Tag, mit dessen Hilfe die Bindung an eine Targetsequenz nachgewiesen werden kann (Abbildung 54). Die Inkubation mit den 1:500 verdünnten Bindern erfolgte für eine Stunde bei 600 rpm bei Raumtemperatur. Als Primärantikörper wurde der Flag-Epitop Antikörper verwendet und als Sekundärantikörper der R-PE gelabelte Antikörper.

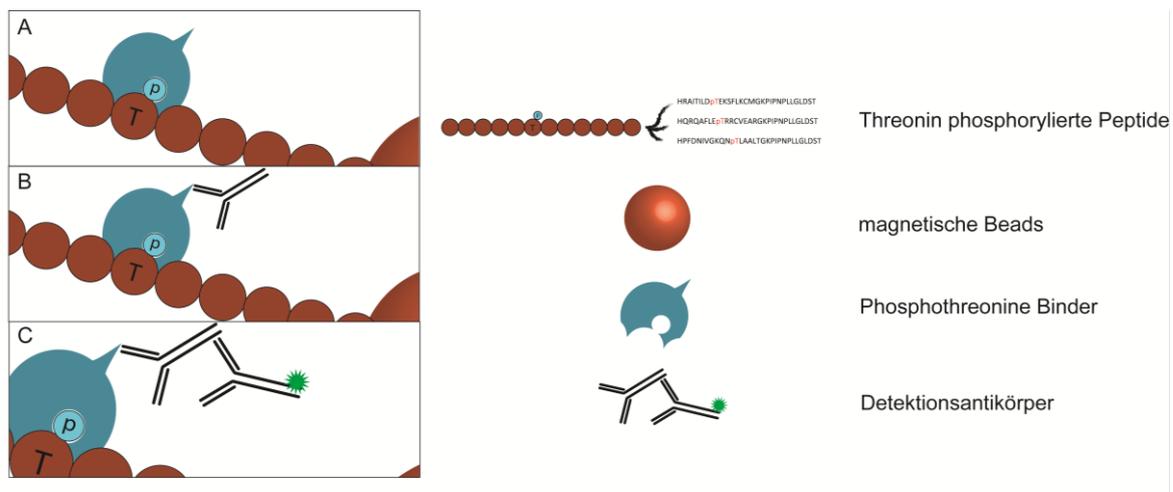


Abbildung 54 Schematische Darstellung zur Detektion von phosphorylierten Peptiden mit neuartigen Phospho-Threonin Binder mit Hilfe des BioPlex3D

Phosphorylierte 30-mer Peptide wurden an carboxylierte Beads gekoppelt. Anschließend wurden die Beads im Multiplex mit einem der Phosphothreonin Bindern inkubiert (1:500 verdünnt) (A) Die Binder werden anschließend über einen primären anti-Flag Antikörper (1:500) detektiert (B). Als Sekundärantikörper wurde der R-PE gelabelte Antikörper verwendet. (C)

Um die Spezifität der Binder zu testen wurden drei Peptide an Beads gekoppelt und mit den Bindern inkubiert. Die Peptide beinhalteten mittig entweder ein phosphoryliertes Threonin, ein phosphoryliertes Serin oder ein Alanin. Die Ergebnisse (Abbildung 55) zeigen, dass zwei von drei Bindern spezifisch für phosphoryliertes Threonin waren. Binder 2 zeigte eine Kreuzreaktivität mit phosphoryliertem Serin. Ohne Inkubation mit einem Binder konnte kein Signal nach Inkubation mit dem anti-Flag Antikörper gemessen werden (Abbildung 55).

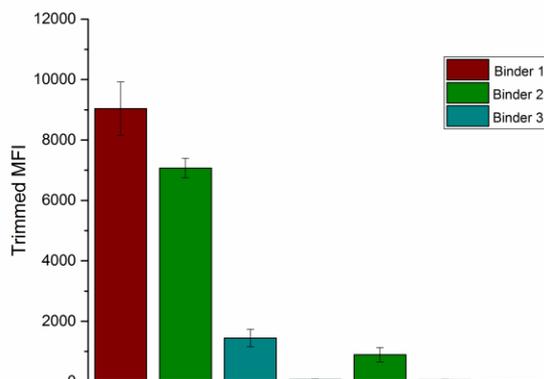


Abbildung 55 Balkendiagramm der Spezifität neuartiger Phospho Threonin Binder

Ein Peptid mit phosphoryliertem Threonin, sowie ein Peptid mit einem phosphoryliertem Serin wurden mit den drei Bindern inkubiert. Wie zu sehen ist, sind Binder 1 und 3 spezifisch für phosphorylierte Threonine, während Binder 2 auch das phosphorylierte Serin erkannte.

Zur weiteren Charakterisierung und Analyse der Sequenzabhängigkeit der Binder wurden 11 Peptide (Tabelle 47) mit unterschiedlichen Sequenzen verwendet. Die Sequenzen besitzen alle ein phosphoryliertes Threonin.

Tabelle 47 Peptide mit phosphoryliertem Threonin zum Testen von phospho Threonin spezifischen Bindern

Nr.	Sequenz
1	HKRELYNGpTADITLRFGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
2	HDERNECGQpTPLMIAAGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
3	HPPELPEQpTTKALPVRGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
4	HVTEDWFSDISPQpTMRRGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
5	HLLNIVSVpTGRLLRANGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
6	HDSSIEISKLpTDKVQAGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
7	HQKAYNLNRpTPSTVTLNGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
8	HPLLEIARQpTDSLKELGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
9	HRAITILDpTEKSFLKCMGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
10	HQRQAFLEpTRRCVEARGKPIP <small>N</small> PLLGLDST
11	HPFDNIVGKQNpTLAALTGKPIP <small>N</small> PLLGLDST

Es konnten mit allen 3 Bindern alle Peptide detektiert werden, wobei es zwischen den Bindern und zwischen den Peptidsequenzen deutliche Unterschiede gab (Abbildung 56).

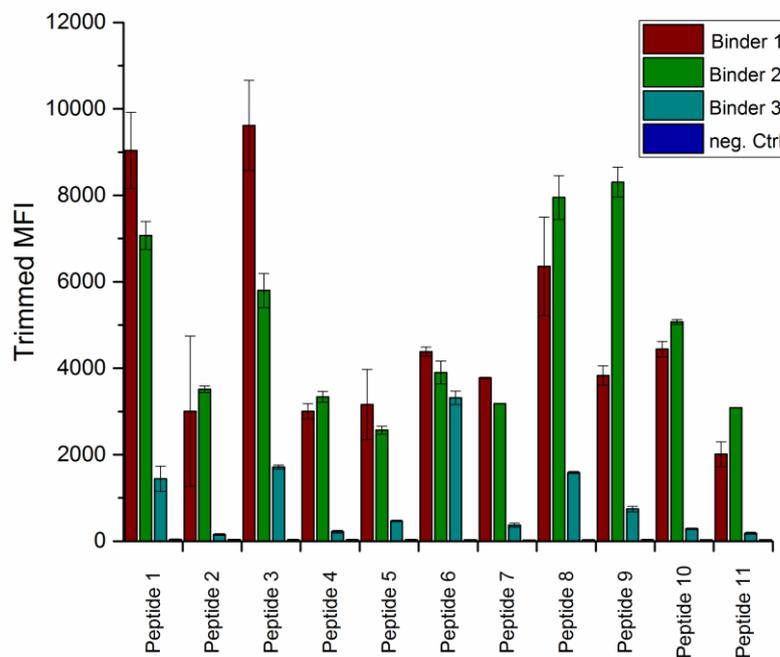


Abbildung 56 Balkendiagramm der Sequenzabhängigkeit neuartiger phospho-spezifischer Binder

Während die neg Kontrolle (blau) bei keinem der Binder ein Signal aufwies, konnte zwischen den einzelnen Peptidsequenzen (X-Achse) eine deutliche Differenz in der mittleren Fluoreszenz vermessen werden. Sie agieren demnach nicht sequenzunabhängig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Binder 1 und 3 in der Lage waren spezifisch phosphorylierte Threonine zu detektieren, aber nicht sequenzunabhängig. Während Binder 2 neben phosphorylierten Threonin, auch phosphoryliertes Serin detektiert und auch nicht sequenzunabhängig agiert. Das bedeutet, dass die Binder 1 und 3 geeignet sind um phosphorylierte Threonine zu detektieren, jedoch beide Binder unterschiedliche Sequenzen bevorzugt binden.

Weder mit Hilfe der ATP-Analoga noch den neuartigen Phospho-Threonin Bindern, konnten eine Nachweismethode etabliert werden, welche das Nutzen von Antikörpern ersetzen konnte. Während bei der Arbeit mit Click-Chemie Reagenzien ein unspezifisches Signal an der Negativkontrolle erkennbar war, war mit den Phospho-Threonin Bindern keine Sequenzunabhängige Bindung möglich. Für beide Methoden müssen weitere Optimierungsschritte erfolgen, sodass sie einen sequenzunabhängigen Nachweis von Phosphorylierungen ermöglichen.

4 Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert. Hierbei wird die Diskussion in zwei Aspekte unterteilt: in die Etablierung der Assays und die Identifizierung potentiell Targets.

4.1 Antikörpervalidierung

Zur Herstellung von Antikörpern werden Tiere z. B. Mäuse oder Kaninchen gezielt mit einem Immunogen infiziert. Diese Immunogene können synthetische Peptide, aufgereinigte Proteine oder ganze Zellen sein. Bei der Verwendung synthetischer Peptide ist im Anschluss bekannt, welches Bindemotiv der Antikörper erkennt, jedoch ist es möglich, dass die Targetsequenz im nativen Protein auf Grund der räumlichen Struktur nicht mehr erkannt wird. Dadurch, dass Antikörper eines der meist genutzten Tools in der biochemischen Forschung sind, rücken deren Validierung bei Firmen und Akademien immer mehr in den Fokus (ThermoFisherSCIENTIFIC 2015, Schumacher und Seitz 2016, Uhlen, Bandrowski *et al.* 2016, Prgomet, Andersson *et al.* 2017). Es soll eine höhere Effizienz erreicht und weniger falsch positive oder falsch negative Ergebnisse erhalten werden. Die Spezifität und Funktionalität jeden Antikörpers muss für jede Anwendung überprüft werden. Sind Antikörper unzureichend oder nicht validiert, kann für biologische Assays nur eine eingeschränkte Aussage getroffen werden und die Wahrscheinlichkeit für falsch positive/-negative Ergebnisse steigt an. Des Weiteren ist bekannt, dass Lot zu Lot Variationen auftreten können, weswegen für jeden Lot eine Qualitätskontrolle durchgeführt werden muss (Saper 2005, Bordeaux, Welsh *et al.* 2010). Durch die Arbeit mit unterschiedlichsten Methoden (lösungs-basierte und Oberflächen-basierte) und Targets (Proteine, Peptide) musste vorab eine Validierung des für die Targetidentifizierung genutzten Antikörpers vorgenommen werden. In dieser Arbeit wurde mit der murinen PKA-C α gearbeitet und es wurde der in der Literatur am häufigsten zitierte anti-pPKA Antikörper verwendet. Laut Herstellerangaben erkennt dieser spezifisch phosphorylierte Targets der PKA an Hand des Motives RRxpS/T. Der anti-pPKA Antikörper wurde hinsichtlich seiner Spezifität, Funktionalität und Selektivität auf acht verschiedenen Plattformen überprüft. Dieser wurde sowohl auf WesternBlots, DotBlots, Immuno-TLC als auch auf

Multiplexing Plattformen genutzt und wies ein spezifisches Signal für phosphorylierte Targets auf. Wie in Abschnitt 3.2.3 gezeigt, wurde eine genaue Analyse bezüglich der Bindung des Antikörpers an Peptidsequenzen mit Variationen des Bindemotives auf vier der acht Plattformen (SPR, BioPlex3D, Peptid Mikroarray und bScreen) getestet. Der Antikörper bindet:

- Funktional auf allen in der Arbeit verwendeten Plattformen
- Keine Abhängigkeit der Bindung von Faltungsstrukturen oder Linearität
- Phospho-spezifisch, keine Detektion unphosphorylierter Sequenzen
- RRxS/T präferierte Targetsequenz
- Arginin an -3 Position ausschlaggebend für die Bindung
- Detektion von KRxSS, KKxSS schwach mittels SPR, BioPlex3D möglich
- Abstand von +2 Aminosäuren zum Phosphat nötig für die Bindung

Bei der Targetidentifizierung (Abschnitt 3.4 und 3.5) konnte durch einen Vergleich der als phosphoryliert detektierten Peptide festgestellt werden, dass eine hohe Sequenzhomologie im Bereich des Phosphorylierungsmotives auftritt. Dies entspricht hauptsächlich dem Antikörperbindemotiv (RRxpS/T) (Abbildung 57). Das Arginin an der -3 Position tritt in allen Sequenzen auf, wobei das Arginin der -2 Position durch ein Glutamin oder Threonin ausgetauscht werden kann.

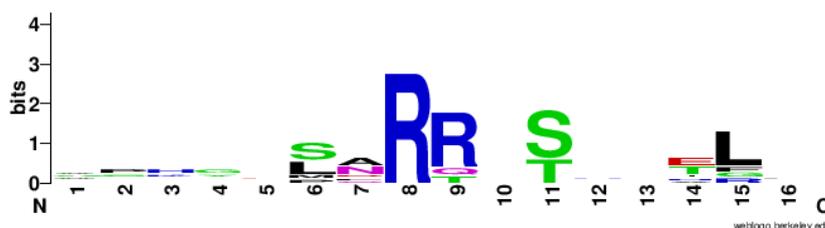


Abbildung 57 Peptidsequenzalignment der identifizierten Targetsequenzen⁶

Bei dem Alignment der in Tabelle 48 dargestellten Sequenzen, ist auffällig dominant das Arginin an der -3 Position der Phosphorylierungsstelle. An der -2 Position ist bevorzugt auch ein Arginin zu finden, wobei es dies auch durch Glutamin oder Threonin ausgetauscht werden kann.

Für die Arbeit mit einer Vielzahl an unterschiedlichsten Sequenzen heißt das, dass phosphorylierte Targetsequenzen, die von der Konsensussequenz abweichen,

⁶ Das Erstellen der Grafik erfolgte mit Hilfe von <http://weblogo.berkeley.edu>

eventuell nicht erkannt wurden. Daher wurden zusätzlich Antikörper unabhängige Nachweisttechnologien ausgetestet.

4.2 Alternative Nachweisttechnologien

4.2.1 ATP-Analoga

Neben der Verwendung von phospho-spezifischen Antikörpern gibt es auch alternative Nachweisttechnologien wie z.B. die Verwendung von ATP-Analoga um Phosphorylierungen nachzuweisen. Durch die Modifizierung des γ -Phosphates mit z.B. AZID oder einer Aminogruppe, kann nach der Phosphorylierung der Targets der Nachweis mit Hilfe von Click-Chemie Farbstoffen stattfinden. Diese Nachweismethodik bietet den Vorteil, dass sie komplett Sequenz-/Struktur unabhängig, extrem selektiv, pH unabhängig und biokompatibel funktioniert. Azide kommen natürlicherweise nicht in Zellen vor, weswegen eine hohe Selektivität erreicht wird. Ein weiterer Vorteil eines Click-Chemie basierten Nachweissystems ist, dass Lot zu Lot Variationen weniger stark auftreten, da diese chemische synthetisiert werden.

In dieser Arbeit wurde ATP- γ -S und Click-Chemie kompatible ATP-Analoga (γ -AEA-ATP, γ -(2-Azidoethyl)-ATP) auf Peptid Mikroarrays getestet. Nach Durchführung des Kinaseassays mit ATP- γ -S konnte keine Phosphorylierung detektiert werden. Mit den ATP-Analoga anstelle von ATP und der anschließenden Click-Reaktion mit einem Farbstoff, konnte an allen Peptiden eine Signalzunahme gemessen werden, auch an denen der Negativkontrolle, welche nicht phosphorylierbar ist. Diese Reaktion wird durch mehrere Faktoren, die das Reaktionsgleichgewicht verschieben, beeinflusst z. B.:

- Reaktionsdauer
- Farbstoff Konzentration
- Temperatur

Bei einem Click-Chemie Farbstoff, welcher mit Aminogruppen reagiert, kann es zusätzlich dazu kommen, dass ungeschützt vorliegenden Seitengruppen, der in dieser Arbeit verwendeten Peptide, mit dem Farbstoff reagieren. Es ist aus der Literatur weitergehend bekannt, dass modifizierte ATP-Analoga schlechter von Kinasen als

Phosphat Donor akzeptiert werden (Lee, Elphick *et al.* 2009). Dies liegt vermutlich an der hochspezifischen Bindetasche, die durch die veränderte Ladung und Größe des γ -Phosphates eine schlechtere Bindung der Substrate verursacht. Wenn die Assay Bedingungen angepasst werden, könnte in Zukunft ein Sequenz- und Struktur unabhängiges Nachweissystem etabliert werden, welches z. B. auch genutzt werden kann, um Kinasen zu analysieren welche eine Vorphosphorylierung benötigen.

4.2.2 Phospho-Threonin Binder

Eine weitere Nachweismethode für Phosphorylierungen an Threoninen ist die Arbeit mit neuartigen Phospho-Threonin spezifischen Bindern, welche sequenzunabhängig die Phosphorylierung detektieren sollen. Diese entstammen der Forkhead-assoziierten Domäne 1 (FHA1) und besitzen eine Größe von ca. 23 kDa. Wie im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden konnte (Abschnitt 3.6.2), waren zwei von den drei getesteten Bindern spezifisch für phosphorylierte Threonine, während der dritte untersuchte Binder auch phosphorylierte Serine erkannte. Nach einem Multiplex Assay mit den zwei verbleibenden Bindern mit 11 unterschiedlichsten Peptidsequenzen, welche alle ein phosphoryliertes Threonin enthielten, wurden diese alle detektiert. Es wurden aber deutliche Unterschiede in den Signalintensitäten festgestellt (Abbildung 56). Dies deutet daraufhin, dass die Binder nicht sequenzunabhängig, aber phospho-spezifisch an die phosphorylierten Peptide banden. Dies ist inzwischen auch von Venegas *et al.*, welcher diese neuartigen Bindern entwickelt, publiziert worden (Venegas, Pershad *et al.* 2016). Venegas *et al.* konnte nachweisen, dass die Bindeeffizienz davon abhängig ist, welche Aminosäure sich an der +3 Position nachdem phosphorylierten Threonin befindet. Der Vorteil solcher rekombinanten Affinitätsreagenzien ist unter anderem, dass sie mit 23 kDa kleiner als ein Antikörper sind was Ihnen eine bessere Zugänglichkeit der Targets bei hoher Dichte verschafft. Es bedarf noch einiger weiterer Entwicklungsschritte, sodass diese getesteten Binder wirklich sequenzunabhängig binden, da sie sonst auf einer Peptid Mikroarray Plattform keinen Vorteil liefern. Durch die Verwendung des Binders steigt die Komplexität und Dauer des Assays, da nach der Inkubation mit dem Binder die Bindung durch einen Primär- und einen Sekundär Antikörper nachgewiesen werden muss.

4.3 Optimierung und Etablierung des Assays

4.3.1 Immuno-TLC und DotBlot zum Nachweis phosphorylierter Peptide

Um valide Daten zu erhalten bzw. eine Überprüfung der Daten zu ermöglichen erfolgte die Etablierung des Kinaseassays auf Multiplex unabhängigen Methoden wie Immuno-TLC und DotBlot (Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2). Eine Auftrennung durch die Dünnschichtchromatographie war nicht erfolgreich. Diese Methode sollte für Peptide mit unterschiedlichsten physiko-chemischen Eigenschaften geeignet sein. Die Kombination eines immunologischen Nachweises mit Dünnschichtchromatographie erlaubte den spezifischen Nachweis von phosphorylierten Peptiden und wurde in dieser Arbeit erstmals angewendet und publiziert (Morschheuser, Mükusch *et al.* 2016). Die etablierte Methode ermöglichte eine semi-quantitative Aussage über die Menge der phosphorylierten Peptide in einem Gemisch zu treffen. Dies kann genutzt werden, um z.B. die Aktivität von Kinasen zu vergleichen. Mit Peptiden bzw. Aminosäuren wurde schon in den 1970-80er Jahren auf Dünnschichtchromatographieplatten experimentiert, der Nachweis beruhte entweder auf Ninhydrin, welches eine geringe Sensitivität aufweist, oder der spezifische Nachweis von z.B. Phosphaten bzw. Phosphorylierungen erfolgte mit Hilfe einer Radioaktivmarkierung (Burns und Turner 1967, Lepri, Desideri *et al.* 1980, Dunphy und Busch 1988, Bhusan, Mahesh *et al.* 1989, van der Geer und Hunter 1994, Ohguro und Palczewski 1995). Conti *et al.* zeigte 2012, dass eine Immunfärbung auf TLC Platten genutzt werden kann um Phospholipid Antikörper in Serum von Patienten mit dem Anti-Phospholipid Syndrom nachzuweisen (Conti, Alessandri *et al.* 2012). Es war die erste Studie, die mit einem solchen Nachweissystem versucht hat, klinische Daten zu erheben.

DotBlot ist eine etablierte molekularbiologische Methode um Proteine und Peptide schnell zu analysieren. Durch kleine Variationen (Fixierung, geringes Waschvolumen) konnte diese genutzt werden, um kleine Moleküle wie Peptide mit Hilfe spezifischer Antikörper nachzuweisen. Es war möglich eine Ja/Nein Antwort zu erhalten, eine quantitative Aussage war nicht möglich (Abbildung 28). DotBlot kann als Kontrollmethode für die Aktivität von Kinasen oder zum schnellen Testen der Spezifität von Antikörpern genutzt werden, aber nicht für quantitative Aussagen.

Beide etablierten Methoden bieten eine kostengünstige und schnelle Alternative zur Massenspektrometrie und HPLC, bei welchen ein Aufreinigen oder Ankonzentrieren der Peptide durchgeführt werden muss, Messprotokolle etabliert und teure Geräte verwendet werden müssen.

4.3.2 Kinaseassay Etablierung auf Multiplexing Plattformen

Peptid Mikroarrays werden in der Wissenschaft schon seit längerem für das Screenen nach Kinasetargets genutzt. In den meisten Veröffentlichungen wird jedoch nicht darauf eingegangen, welche Faktoren zur Erlangung valider Daten beachtet werden müssen. Faktoren, die die Assayqualität und Funktionalität beeinflussen, sind z. B.:

- Peptidaufbau
 - Abstand der Phosphorylierungsstelle zur Oberfläche
 - optimale Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle für Antikörper und Kinase
- Waschprotokolle zur Vermeidung unspezifischer Bindungen
- Beladungskapazität der gewählten Oberfläche
- Eingesetzte Antikörper-/Kinasekonzentration
- Reproduzierbarkeit

Diese Ergebnisse werden im Abschnitt 3.2.4 gezeigt. Wie die Ergebnisse verdeutlichen, konnte der Antikörper besser an die Phosphorylierungsstelle binden, wenn der Abstand zur Oberfläche steigt (Abbildung 32). Es war allerdings auch sichtbar, dass mit zunehmendem Abstand zur Oberfläche auch das Signal der unphosphorylierten Kontrolle ansteigt. Eine flexible PEG-Linkersequenz zwischen den Peptiden und der Oberfläche, zeigte keine Veränderung im Antikörperbindeverhalten und konnte somit beim Design der Peptide vernachlässigt werden (Abbildung 33). Bei der Untersuchung, ob die Kinase in der Lage ist die Targetsequenzen zu phosphorylieren, konnten dieselben Effekte gezeigt werden. Vermutlich überlagert der Effekt, den die Antikörperbindung hervorruft, einen möglichen Bindeeffekt der Kinase. Bei einer mittigen Positionierung der Phosphorylierungsstelle am Standardpeptid waren Kinase und Antikörper in der Lage zu binden. Auf Grund der Ergebnisse wurden die Phosphorylierungsstelle mit sieben Aminosäuren Abstand zum N-Terminus

positioniert. Die Etablierung wurde mit dem Standardpeptid durchgeführt, die Bindung an Peptide mit potentiellen Phosphorylierungsstellen kann davon abweichen. Bei der Analyse der Bindung der Kinase an die Targets konnte festgestellt werden, dass die Kinase nach dem Assay nicht von der Peptid Mikroarrayoberfläche komplett abzulösen war und daher eine Unterscheidung zwischen tatsächlicher Phosphorylierung des Peptides und der Auto-Phosphorylierung der mPKA-C α nicht unterschieden werden konnte. Durch Versetzen des Waschpuffers mit 1 % SDS, konnte die Kinase entfernt werden. Durch Evaluation der einzusetzender Antikörper-, Kinasekonzentration, zu spottenden Peptidkonzentration, Optimierung des Abstandes der Phosphorylierung zur Oberfläche und konstantes Beibehalten der Versuchsbedingungen, sowie Reagenzien konnte so ein Nachweissystem etabliert werden, mit welchem man in der Lage ist reproduzierbar Phosphorylierungen der Proteinkinase A auf Peptid Mikroarrays nachzuweisen. Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Batches mit dem anti-pPKA Antikörper war abhängig von dem Kinaseassay:

- Ohne Kinaseassay >0,95
- Mit Kinaseassay >0,85

Insgesamt wurde eine gute technische Reproduzierbarkeit erreicht. Die Signale des anti-V5 Antikörpers konnten als Ladekontrolle genutzt werden. Dadurch wurde sichtbar, dass durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Peptide die Beladungskapazität auf der Oberfläche schwankt (Abbildung 41). Es ist somit möglich eine generelle Ja/Nein Antwort auf den Peptid Mikroarrays zu generieren, aber es kann keine quantitative Aussage getroffen werden. Da sowohl die Beladungskapazität als auch die Antikörperbindung eine Rolle spielen, könnte durch zusätzliches Normieren jedes Spots mit Hilfe des V5-Signals und ein Gruppieren der Peptide nach den Erkennungssequenzen eventuell zusätzliche Daten gewonnen werden.

Andresen *et al.* postuliert, dass die Immobilisierungsrichtung zweitrangig ist im Vergleich zu dem Abstand zur Oberfläche, welcher benötigt wird um Peptide zu binden (Andresen, Grötzing *et al.* 2006). Ähnliches wurde auch von Wu *et al.* veröffentlicht, der durch eine verbesserte Erreichbarkeit der Phosphorylierungsstellen von Kinasen ein deutlich verbessertes Signal-zu-Rauschen Verhältnis als auch gesteigerte Signalsensitivität erreichte (Wu, Sylvester *et al.* 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde

daher keine gerichtete Immobilisierung vorgenommen, sondern der Fokus lag wie oben dargestellt auf der Optimierung des Abstandes des Phosphorylierungsmotives zur Oberfläche. Hierbei konnte durch den erhöhten Abstand zur Oberfläche eine verbesserte Erreichbarkeit der Phosphorylierungsstellen erreicht werden und die Signalintensität erhöht werden, wie es von Wu *et al.* postuliert wurde. Ein Anfügen einer Linkersequenz, um den Abstand zur Oberfläche zu erhöhen konnte z.B. bei Houseman *et al.* und Wegner *et al.* zu einer verbesserten Signalintensität führen (Houseman, Huh *et al.* 2002, Wegner, Lee *et al.* 2002). Dies konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Katz *et al.* erläutert, dass die Resultate eines Peptid Mikroarrays, wenn möglich, durch eine unabhängige Methode verifiziert werden sollten (Katz, Levy-Beladev *et al.* 2011). Der Screening Ansatz für die Identifizierung potentieller Phosphorylierungsstellen der PKA wurde zusätzlich auf dem BioPlex3D etabliert. Um eine hohe Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten wurde darauf geachtet, dass gleiche Antikörpermengen, Kinasekonzentrationen eingesetzt und wenig Variation im Versuchsaufbau vorgenommen wurden. Um Kopplungsvariationen auszuschließen wurde für alle Messungen ein Batch verwendet. Über den anti-V5 Antikörper wurde hierbei die Kopplung überprüft und ergab vergleichbare Werte für alle getesteten Peptide. Es war kein Zusammenhang zwischen geringen Signalen bei der Inkubation des anti-V5 und den gemessenen Signalen bei der Detektion der Phosphorylierung erkennbar. Es war daher nicht notwendig eine Normierung durchzuführen.

4.4 Identifizierung von potentiellen Phosphorylierungsstellen schmerzrelevanter Targets

Im Rahmen dieser Arbeit wurden potentielle Phosphorylierungsstellen von Serin/Threonin Kinasen bei den humanen Proteinen ARMS, TRPVI, MOR, DOR, AC VIII, AC V und AC I analysiert. Hierfür wurden alle cytosolischen Abschnitte der Proteine mit Hilfe zweier Datenbanken nach Serin/Threonin Kinase-motiven untersucht und Peptide designend. Der Aufbau der Peptide ist basierend auf den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2 wie folgt: N-Terminus

7 AS	P Motiv	5 AS	V5 Linker
------	---------	------	-----------

 C-Terminus

Es wurden sowohl bekannte als auch potentielle Kinasemotive der Proteine ausgewählt. Wie im Abschnitt 3.4 beschrieben wurden auf Peptid Mikroarrays 186 Peptide analysiert. Zusätzlich wurden noch einzelne Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α bei ARMS aus der Ratte analysiert. 139 Peptide enthielten dabei potentielle Phosphorylierungsstellen der PKA-C α und 58 beinhalteten ein Antikörperbindemotiv für den verwendeten anti-pPKA Antikörper. Nach dem Kinaseassay auf Peptid Mikroarrays wurden neun potentielle Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α identifiziert (Tabelle 48).

Tabelle 48 Zuordnung der PeptidIDs zu Phosphorylierungsstellen innerhalb der Proteinsequenz

Organismus	PeptidID	Protein (UniProtID)	Phosphorylierungsstelle
Human	ARMS 17	KIDINS220 (Q9ULH0)	Thr903
	ARMS 35		Ser1309
	ARMS 51		Ser1359
	TRPVI 83	TRPVI (Q8NER1)	Ser502
	ACV 132	AC V (O95622)	Thr674/Ser676
	ACVIII 111	ACVIII (P40145)	Ser614
Ratte	ARMS 59 rat	KIDINS 220 (Q9EQG6)	Ser1251/52
	ARMS 59a rat		Ser1251A
	ARMS T903 rat		Thr903
	ARMS 60 rat		Ser1439/40
	ARMS 61 rat		Ser1526/27

Diese neun Stellen konnten mit Hilfe des BioPLex3D verifiziert werden und eine Targetpräferenz erstellt werden (Abschnitt 0). Die Interbatch Varianz eines Batches lag nach Durchführung des Kinaseassays bei R^2 von 0,93, während die Peptidreplikate eine Intraslide Varianz von <5% aufwiesen. Eine abschließende Analyse ergab, dass vier Phosphorylierungsstellen schon in der Literatur beschrieben sind und fünf erstmals mittels *in vitro* Methoden nachgewiesen werden konnten (Abbildung 58).

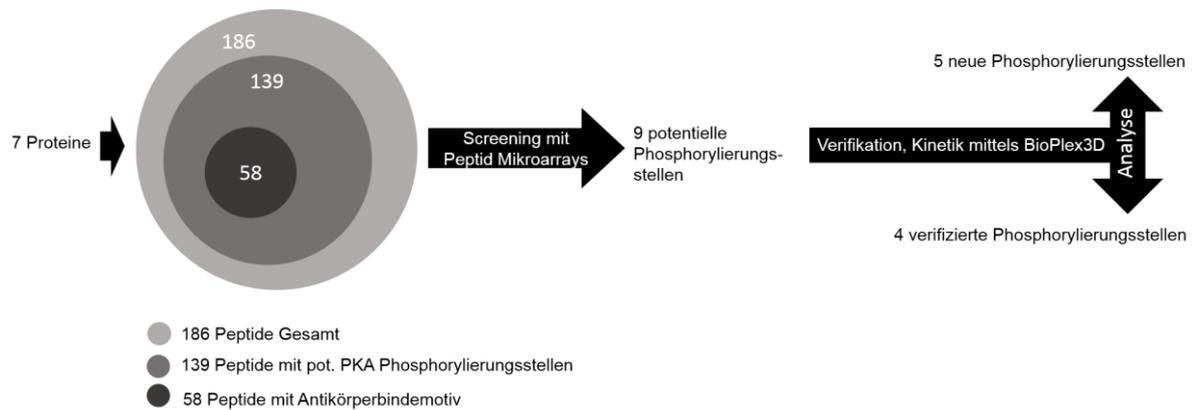


Abbildung 58 Projektverlauf der Identifizierung potentieller PKA-Cα Phosphorylierungsstellen

Aus sieben Proteinen wurden die cytosolischen Domänen nach Ser/Threonin Kinase Motiven untersucht und Peptide designed. Es wurden mit den Kontrollen 186 Peptide auf Peptid Mikroarrays gespottet und an Hand eines Kinaseassays die Phosphorylierbarkeit dieser überprüft. Davon enthielten 139 Peptide eine potentielle Phosphorylierungsstelle der PKA und 58 das Antikörperbindemotiv des anti-pPKA Antikörpers. Es konnten neun potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, welche im Anschluss mit Hilfe des BioPlex3D verifiziert und ein Ranking bezüglich der Targetspezifität erstellt. Im Anschluss erfolgte eine Zuordnung der Phosphorylierungsstellen und ein Literaturabgleich. Hierbei waren vier der Phosphorylierungsstellen schon in der Literatur beschrieben und fünf Phosphorylierungsstellen konnten zum ersten Mal mit *in vitro* Methoden nachgewiesen werden.

Eine Phosphorylierung der Peptide durch Zelllysat, um den Crosstalk verschiedener Signalwege zu erforschen, war nicht erfolgreich. Wie in dem Abschnitt 3.4.3 gezeigt, konnte die Phosphorylierung durch die Inhibition der mPKA-Cα mit PKI aufgehoben werden und somit gezeigt werden, dass nicht die Auto-Phosphorylierung der Kinase detektiert wurde. Im Folgenden werden die identifizierten Phosphorylierungsstellen der einzelnen Targets diskutiert.

4.4.1 ARMS

ARMS ist ein Transmembranprotein mit vier Transmembrandomänen, welches vorwiegend in neuronalen Geweben exprimiert wird. Weder existiert eine Kristallstruktur, noch ist viel über die Funktionalität des Proteins bekannt. Aus der Liste mit 57 Peptiden für ARMS, human und 6 Peptiden bei ARMS aus der Ratte, welche alle potentielle Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin Kinasen beinhalteten, konnten 3 Peptide des humanen ARMS, sowie 6 Peptide des ARMS aus der Ratte als Targets der mPKA-Cα identifiziert werden (Tabelle 49). Auf Grund der kürzeren Aminosäuresequenz von ARMS, Isoform 2 der Ratte kommt es zu einer Verschiebung

der Phosphorylierungsstellen im Vergleich zur humanen Sequenz. In Tabelle 49 wurden die Phosphorylierungsstellen daher nach Homologien gruppiert. Eine Gruppe wird dabei immer durch einen doppelten Unterstrich von der nächsten getrennt.

Tabelle 49 Zusammenfassung potentieller Phosphorylierungsstellen der mPKA- α bei ARMS

	P-Stelle		Peptid Mikroarray	BioPlex3D	Motiv	Literatur <i>in vitro</i> Daten	Massenspek. Daten
Human	Ser882		kein Signal	n. a.	RRVS	✓	✓ 13x
Ratte			n. a.	Signal			
Human	Thr903		Signal	n. a.	RRDT	x	✓ 1x
Ratte			Signal				
Human	Ser918		kein Signal	n. a.	RQMS	✓	✓ 77x
Ratte			schwaches Signal mit gespiktem Lysat				
Human	Ser1309	Ser1251/52	Signal	n. a.	RRSS	x	✓ 8x
Ratte							x
Human	Ser1359		Signal		RRTPS	x	✓ 15x
Ratte		Ser1439/40	kein Signal	Signal	KKSS	x	x
Ratte		Ser1526/27	kein Signal	Signal	KKDSS	x	x

	kein Signal
	Signal
	schwaches Signal mit gespiktem Lysat
n.a.	nicht analysiert

Die Tabelle 49 zeigt, dass die meisten der Phosphorylierungsmotive Arginin beinhalteten (RxxS/T, RRxS/T) und Lysinmotive nur mittels des BioPlex3D nachweisbar waren. Alle homologen Phosphorylierungsstellen zeigten auf beiden Plattformen ein identisches Verhalten wie z.B. Ser1309 und Ser1251/52. Bis auf Ser918, Ser882 und die Lysinmotive, welche nur schwach durch den Antikörper detektiert werden, wurden die Phosphorylierungen Plattform und Spezies übergreifend detektiert (Tabelle 49). Massenspektrometrisch sind fünf der sieben Phosphorylierungsstellen und Ser882 und Ser918 mittels *in vitro* Daten beschrieben worden sind. Für die Phosphorylierungsstellen Ser1359, Ser1439/40 und Ser1526/27 müssten die entsprechenden homologen Sequenzen der anderen Spezies noch vermessen werden. Bei Ser918 und Ser882 konnte trotz Homologie zur

Rattensequenz bei der humanen Sequenz auf Peptid Mikroarrays keine Phosphorylierung detektiert werden und wurden daher nicht mittels BioPlex3D überprüft. Diese Diskrepanzen könnten auf Grund der höheren Sensitivität des BioPlex3D auftauchen.

Interessant ist, dass die Phosphorylierungsstelle Ser882 ein perfektes Antikörperbindemotiv für den anti-pPKA AK aufweist (RRVS), aber bei Ser918 (RQMS) und Thr903 (RRDT) ein zwei bis dreifach höheres Signal messbar ist (Abbildung 48). Auch bei einer Betrachtung der zeitabhängigen Phosphorylierung ist zu erkennen, dass $v_{max1/2}$ doppelt so schnell erreicht ist. Ser918 und Thr903 scheinen im Vergleich zu Ser882 ein präferiertes Target zu sein. Dies kann bedeuten, dass nicht nur die Erkennungssequenz, sondern auch die Umgebungssequenz einen Einfluss auf die Phosphorylierung hat.

Bei der Phosphorylierungsstelle Ser1251/52 der Ratte ist auf Grund zweier hintereinanderliegender Serine unbekannt, welches Serin das präferierte Target der PKA-C α darstellt. Es fällt auf, dass bei der humanen Sequenz (Ser1309) keine zwei Serine hintereinander vorkommen, sondern anstelle des Ser1251 ein Alanin in der Sequenz eingebaut ist (Abbildung 59). Dies stärkt, zusammen mit den Daten der Alaninmutanten (Abbildung 48) die Theorie, dass das Ser1252 das präferierte Target der PKA-C α darstellt.



Abbildung 59 Sequenzalignment ARMS human und ARMS Ratte

Wie im Abschnitt 3.5.2, Abbildung 49 zu sehen führt bei den Phosphorylierungsstellen Ser1439/40 und Ser1526/27 eine Mutation der einzelnen Serine nicht zu einem Signalverlust, sondern bleibt auf konstantem Niveau. Es ist davon auszugehen, dass eine Phosphorylierung stattgefunden hat. Diese müsste aber über unabhängige Methoden noch überprüft werden. Um die Problematik der Antikörperspezifität zu umgehen könnten alternative Nachweismöglichkeiten, die unabhängig von Sequenz und Antikörper agieren genutzt werden, wie z.B. radioaktive Markierung, ATP-Analoga, Farbstoffe. Durch diese Arbeit konnte mit *in vitro* Methoden nachgewiesen werden, dass die PKA-C α die ausführende Kinase der

Phosphorylierungsstellen Thr903, Ser1309, Ser1359 beim humanen ARMS ist. Bei ARMS, Ratte wurden die Stellen Ser882, Thr903, Ser918, Ser1251/52, Ser1439/40 und Ser1526/27 durch die PKA-C α phosphoryliert (Abbildung 60).

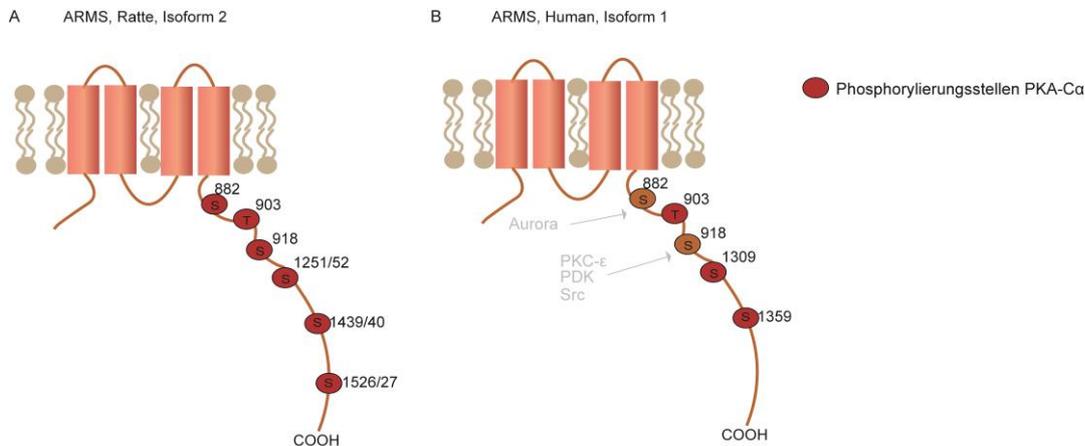


Abbildung 60 Zusammenfassung bekannter und neuer Phosphorylierungsstellen von ARMS

Im Rahmen der Arbeit konnten mehrere Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α an ARMS, Ratte (A) sowie Human (B) identifiziert werden (rot). Bei ARMS, Human (B) sind in grau hinterlegt schon bekannte Kinasen und deren Target dargestellt.

Um auszuschließen, dass *in vivo* weitere Kinasen an der Phosphorylierung beteiligt sind, könnte die PKA im Zelllysat inhibiert werden. Tabelle 49 zeigt, dass die Detektion einiger phosphorylierter Peptide von ARMS bereits mehrmals massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte (PhosphoSitePlus®, www.phosphosite.org, Cell Signaling Technology® (CST) *curation set* #6821 (2009), PhosphoSitePlus®, www.phosphosite.org, CST *curation set* #5165 (2008), #4831 (2008), #3013 (2007), #3014 (2007) und #2929 (2007), (Giansanti, Stokes *et al.* 2013)).

Die der Phosphorylierung zu Grunde liegenden Kinasen sind aber weitestgehend unbekannt. *In Vitro* Daten existieren nur für Ser918 und Ser882. Von ARMS ist bisher keine Kristallstruktur vorhanden und einzig Ser918 ist bekannt als Phosphorylierungsstelle der PDK, PKC ϵ und Src, sowie Ser882 welches in mitotischen Zellen durch die Aurora Kinase phosphoryliert wird (Cabrera-Poch, Sanchez-Ruiloba *et al.* 2004, Kettenbach, Schweppe *et al.* 2011).

Nachdem nun einige Phosphorylierungsstellen von ARMS durch die mPKA-C α identifiziert werden konnten (Abbildung 60), stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Mutationen der Phosphorylierungsstellen auf die Funktionalität von ARMS und dessen Interaktion mit anderen Proteinen haben. Bei einer Transfektion des Wildtyps, sowie

Alaninmutanten von ARMS, Isoform 2, Ratte zusammen mit TRPVI-YFP ist deren Expression und Einbau in die Zellmembran nachweisbar (unveröffentlichte Daten). Exemplarisch gezeigt ist die Expression von ARMS-WT (Abbildung 61). Die Fluoreszenzaufnahmen zu den Alaninmutanten befinden sich im Anhang (Anhang, Abbildung 63).

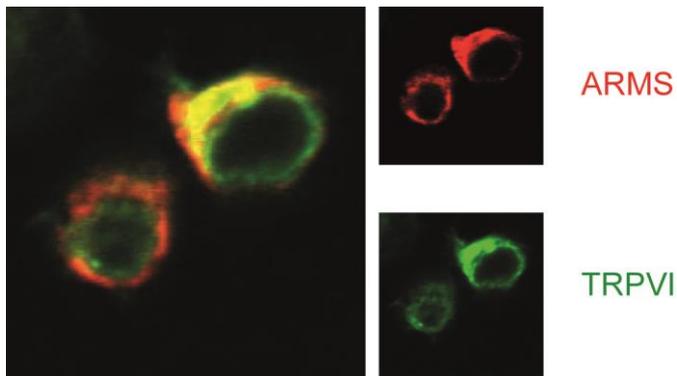


Abbildung 61 Fluoreszenzaufnahme der Expression von ARMS-WT und TRPVI-YFP

ARMS als auch TRPVI-YFP werden in den HEK293 Zellen exprimiert und in die Zellmembran eingebaut. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokal Mikroskop (LSM510 von Zeiss) bei 60x Vergrößerung, 1 AU max. aufgenommen. Für die Zellfärbung wurde der Primärantikörper anti-KIDINS220 (ARMS) (1:1000) und der Sekundärantikörper anti-mouse, IgG Alexa Fluor 594 (1:200) verwendet.

Dr. Melanie Kaufholz konnte im Rahmen ihrer Dissertation aufzeigen, dass ARMS basal phosphoryliert vorliegt. Eine Stimulierung der Zellen mit Forskolin/IBMX und der dadurch verbundenen Erhöhung der cAMP-Konzentration führte zu einer Änderung des Phosphorylierungsgrades von ARMS. Sie konnte aufzeigen, dass Ser1251/52 *in vivo* eine bevorzugte Phosphorylierungsstelle von ARMS ist, was sich mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen deckt. Eine Phosphorylierung am Ser882 wirkt vermutlich inhibitorisch auf die Phosphorylierung des Thr903. Die in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten, bei welchen die Phosphorylierungsstellen direkt durch die mPKA- α phosphoryliert worden sind, stärken die Annahme, dass die PKA die ausführende Kinase *in vivo* ist. ARMS weist cytosolisch mehrere Protein-Protein-Interaktionsdomänen auf wie z.B. eine SAM-Domäne und kann somit durch die Rekrutierung von Adapterproteinen bestimmte Signaltransduktionskaskaden beeinflussen. Peter *et al.* zeigte z.B., dass ARMS die Sensitivität des Schmerz relevanten Kanals TRPVI reguliert (Peter 2016). Eine Änderung des Phosphorylierungsstatus von ARMS hatte eine physiologische Relevanz bei der Sensitivierung von TRPVI. Es ist nicht auszuschließen, dass auch weitere

Signalkomponenten eine Rolle spielen. Weitere bekannte Interaktionen von ARMS wurden z.B. von Arevalo *et al.* publiziert. Dieser zeigte, dass das Adapterprotein CrkL über die SH3 Domäne mit der prolinreichen Region von ARMS interagiert. Bei einer NGF (Nerve-Growth-Faktor) induzierten Phosphorylierung am Tyr1096 von ARMS, wird die Bindung über die SH2 Domäne des CrkL bevorzugt und die SH3 Domäne freigegeben. Mit Hilfe der freien SH3 Domäne kann nun ein GEF binden und den MAPK-Signalweg aktivieren (Arévalo, Yano *et al.* 2004, Arévalo, Pereira *et al.* 2006).

Ähnlich wie bei der Interaktion von TRPVI mit ARMS konnte auch bei B-Zell Rezeptoren durch die Interaktion des Rezeptors mit ARMS eine Sensitivierung detektiert werden sowie eine verbesserte Bindung von Raf1 und B-Raf (Fiala, Janowska *et al.* 2015). Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Phosphorylierungsstellen könnten einen genaueren Aufschluss darüber geben, wie die Interaktion von ARMS mit anderen Zellmembran assoziierten Proteinen funktioniert. Neben der reinen Identifizierung der Stellen müssten *in vivo* Studien mit Mutanten durchgeführt werden, bei welchen nur einzelne Phosphorylierungsstellen übrigbleiben. An Hand derer können die genauen Funktionen dieser analysiert werden. Da bei der Interaktion von ARMS mit B-Zell Rezeptoren und TRPVI ein ähnlicher Effekt hervorgerufen wird, liegt dem eventuell ein generelles Konzept zu Grunde, welches abhängig vom Phosphorylierungsgrad von ARMS ist.

4.4.2 TRPVI

TRPVI ist ein Transmembranrezeptor, welcher auf thermische Reize öffnet und für einen Einstrom von Kalzium in die Zelle sorgt. Durch dieses werden unter anderem Adenylylcyclasen aktiviert, das cAMP in der Zelle steigt an und es kommt zu einer Aktivierung der PKA.

Von 31 potentiellen Phosphorylierungsstellen wurde nur ein Peptid des humanen TRPVI phosphoryliert detektiert (Tabelle 50). Wie in den Ergebnissen 3.4.2, 3.5.1 dargelegt, fand diese am Peptid 83 statt, welches dem Ser502 entspricht. Die Phosphorylierung war sowohl auf Peptid Mikroarrays als auch mit dem BioPlex3D nachweisbar. Mit dem BioPlex3D konnte das Ser502 zu den „mittel schnell“ phosphorylierbaren Targets zu geordnet werden.

Tabelle 50 Identifizierte Phosphorylierungsstelle TRPVI

Peptid ID	P-Stelle	Peptid Mikroarray	BioPlex3D	Motiv	Literatur <i>in vitro</i> Daten	Massenspek. Daten
TRPVI 83	Ser502			RRPS	✓	✓

P-Stelle Phosphorylierungsstelle
 Motiv Aminosäuresequenz downstream der Phosphorylierungsstelle
 Massenspek. Daten Häufigkeit mit der die Phosphorylierungsstelle Massenspektrometrisch in der Literatur erwähnt ist

Das Ser502 ist die am häufigsten in der Literatur beschriebene Phosphorylierungsstelle des TRPVI. Bhave *et al.* beschreibt folgende Stellen als PKA abhängige Phosphorylierungsstellen des TRPVI: Ser5, Ser116, Thr144, Thr370, Ser502 (Bhave, Zhu *et al.* 2002). Ser5, Thr144 und Thr370 wurden hierbei als *minor Targetsites* identifiziert, während Ser116 und Ser502 als *major sites* gelten. Ser116 wurde in einer weiteren Studie von Spahn *et al.* als Phosphorylierungsstelle der PKA am TRPVI bestätigt (Spahn, Stein *et al.* 2014). In der Tabelle 51 sind die in dieser Arbeit entsprechenden Peptide der jeweiligen Phosphorylierungsstellen hinterlegt, sowie das Erkennungsmotiv.

Tabelle 51 TRPVI Phosphosites mit Erkennungsmotiv

Peptid ID	Phosphorylierungsstelle	Erkennungsmotiv
62	Ser5	KKWS
70	Ser116	RRS
71	Thr144	KKHLT
80	Thr370	RKFT
83	Ser502	RRPS

Das identifizierte Ser502 kann auf Grund der geringen $v_{max1/2}$ -Werte auch hier als *major Targetsite* der PKA angenommen werden. Sie wird neben der PKA auch von PKC- ϵ und der CAMKII phosphoryliert und dient vorallem der Sensitivierung des TRPVI (Bhave, Zhu *et al.* 2002, Bhave, Hu *et al.* 2003, Jung, Shin *et al.* 2004, Liu, Ma *et al.* 2004)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Bestätigung der Phosphorylierung des Ser502 durch die PKA erfolgen, alle weiteren Stellen konnten nicht detektiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass alle weiteren Stellen keine Erkennungsmotive für den verwendeten anti-pPKA Antikörper trugen. Ser116 z. B. kann auf Grund der Phosphorylierung nahe des Arginins, wie in Abschnitt 3.2.3 der Antikörpervalidierung erläutert, nicht von diesem erkannt werden, auch die Lysin Motive bei Ser5 und Thr144 würden, wenn überhaupt schwach detektierbar sein. Es ist daher nicht verwunderlich, dass keine Detektion einer Phosphorylierung nach dem Assay auf Peptid Mikroarrays erfolgte. Die entsprechenden Peptide könnten mit dem sensitiveren BioPlex3D nochmals nachgemessen werden.

4.4.3 Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren werden vorrangig im ZNS exprimiert und reagieren sensitiv auf körpereigene, sowie medikamentöse Opiate. MOR und DOR wurden als potentielle Targets der mPKA-C α betrachtet und analysiert. Hierbei wurden 6 Peptide bei MOR und 4 Peptide für DOR untersucht. Einzig bei dem Peptid DOR 102 mit dem Erkennungsmotiv „RRIT“ konnten geringe Signale, welche aber nicht 10xfach höher als die der Negativkontrolle lagen, verzeichnet werden (Tabelle 42). Bisher ist in der Literatur keine direkte Interaktion mit der PKA-C α beschrieben worden und auch in dieser Arbeit konnte keine Interaktion von MOR oder DOR Peptiden mittels des Peptide Mikroarrays oder BioPlex3D aufgezeigt werden. Bei Opioidrezeptoren kommt es schnell zur Toleranzentwicklung, wobei zur Zeit diskutiert wird, ob Phosphorylierungen am Rezeptor hierbei eine Rolle spielen wie z. B. Phosphorylierung des Ser363 durch die GRK5 oder PKC α am Thr370 von MOR (Yousuf, Miess *et al.* 2015). Für MOR sind bisher Ser375, Thr370, Ser363 und das Thr370 als Phosphorylierungsstellen beschrieben worden, während bei DOR Thr358 und Ser363 in der Literatur erwähnt sind (Chen, Oldfield *et al.* 2013, Mann, Illing *et al.* 2015). Sind die Kinasen bekannt, sind dies GRKs oder die PKC- α . Eine Aktivierung von den Opioidrezeptoren wirkt, durch das steigende cAMP Level, aktivierend auf die Proteinkinase A, es existiert aber scheinbar kein PKA-C α vermittelter positiver/negativer Feedbackloop, wodurch eine Toleranzwirkung oder Sensitivierung des Rezeptors erfolgt.

4.4.4 Adenylylcyclasen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten AC handelt es sich um Typ I, V, und VIII. Alle werden im Gehirn exprimiert und produzieren bei Aktivierung über G-Proteine cAMP welches für die Aktivierung verschiedener Kinasen verantwortlich ist. Während der Typ V direkt durch Kalzium stimuliert und aktiviert werden kann, müssen Typ VIII und I über Calmodulin angesteuert werden. Trotz ihrer Involvierung in einer Vielzahl an Signalwegen sind deren Phosphorylierungsstellen kaum untersucht. In dieser Arbeit wurden für AC VIII 23, AC V 13 und AC I 21 potentielle Phosphorylierungsstellen von Serin/Threonin Kinasen analysiert. Wie in Abschnitt 3.4.2 und 3.5.1 gezeigt, wurden folgende als Phosphorylierungsstellen der mPKA-C α identifiziert:

Tabelle 52 Phosphorylierungsstellen der Adenylylcyclasen

Peptid ID	P-Stelle	Peptid Mikroarray	BioPlex3D	Motiv	Literatur <i>in vitro</i> Daten	Massenspek. Daten
AC V 132	Thr674/Ser676			RRPS	✓	✓
AC VIII 111	Ser614			RRNS	x	✓

P-Stelle
Motiv
Massenspek. Daten

Phosphorylierungsstelle
Aminosäuresequenz downstream der Phosphorylierungsstelle
Häufigkeit mit der die Phosphorylierungsstelle Massenspektrometrisch in der Literatur erwähnt ist

Wie in Tabelle 48 zu sehen ist, konnte das Thr674/Serin676 der AC V als Targetsite der PKA identifiziert werden. Wie den BioPlex Daten zu entnehmen ist, wird es nur langsam phosphoryliert (Abbildung 46). Wie in der Tabelle 52 angegeben beinhaltet die Peptidsequenz nicht nur das Ser676, sondern auch Thr674. Um auszuschließen, dass das Thr674 durch die PKA phosphoryliert wird, müsste eine Alaninmutante des Peptides vermessen werden. Die Phosphorylierung am Ser676 ist bereits in der Literatur beschrieben worden, weshalb anzunehmen ist, dass das Ser676 durch die mPKA-C α phosphoryliert worden ist und nicht das ebenfalls in der Peptidsequenz enthaltene Thr674.

In der Literatur ist beschrieben, dass die AC V über Kalzium als auch über G-Proteine aktiviert werden kann und eine Phosphorylierung durch die PKA am Ser676 sich inhibitorisch auf die Cyclase Aktivität auswirkt (Iwami, Kawabe *et al.* 1995, Bauman, Soughayer *et al.* 2006). Dieser negative Feedbackloop wird über das AKAP79/150 gesteuert und drückt das lokale cAMP Level in der Zelle (Bauman, Soughayer *et al.* 2006).

Für die AC VIII konnte eine Phosphorylierung des Peptides AC VIII 111 nachgewiesen werden, welches dem Ser614 entspricht. Dieses wies sowohl auf Peptid Mikroarrays als auch bei dem BioPLex3D vergleichbare Daten mit dem des Standardpeptides auf und wies eine schnelle Kinetik auf. Es sind bisher zwei PKA Targetsites, das Ser112 und Ser614, in der Literatur beschrieben worden (Gu und Cooper 1999, Willoughby, Halls *et al.* 2012). Das Ser614 wurde einzig in einer in-depth Analyse von Phosphorylierungsstellen des Mäuse Hirns über einen massenspektrometrischen Ansatz nachgewiesen (Wiśniewski, Nagaraj *et al.* 2010). Ein *in vitro* Nachweis oder das Wissen über die durchführende Kinase oder Funktion ist nicht bekannt gewesen, aber kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit der PKA- α zugeordnet werden. Das Ser614 liegt in einem hochkonservierten Bereich und ist sowohl in der Ratte, der Maus und dem Menschen zu finden (Abbildung 62, rot unterlegt), weswegen nicht auszuschließen ist, dass der Phosphorylierung eine wichtige Funktion zu Grunde liegt.

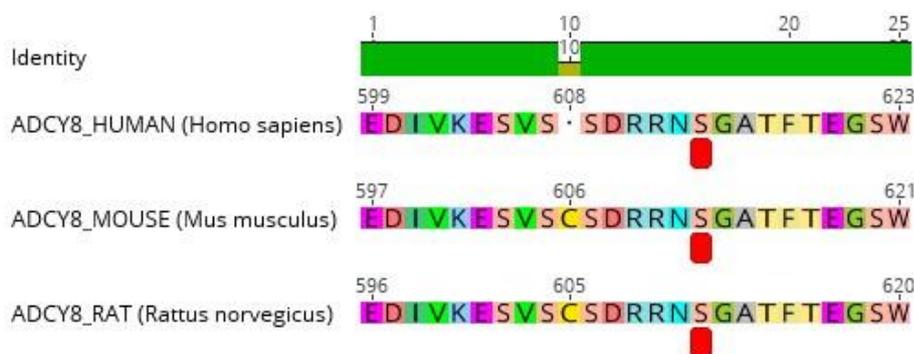


Abbildung 62 Sequenzalignment AC VIII (AS 599-623)

Da diese Stelle bisher nicht beschrieben worden ist, müssen *in vivo* Versuche hinsichtlich der Funktion durch gezieltes Mutieren des Ser614 erfolgen. Eventuell beinhaltet eine Phosphorylierung des Ser614 der AC VIII durch die PKA eine Inhibition der Cyclase Aktivität wie es für AC V in der Literatur beschrieben worden ist.

4.5 Ausblick

Generell können durch Multiplexing Methoden eine Vielzahl an Molekülen parallel untersucht werden, was eine Vielzahl an Daten liefert. Neben der reinen *in vitro* Analyse müssen die Ergebnisse im Anschluss in einen funktionellen Zusammenhang gestellt werden und durch *in vivo* Studien wie z.B. siRNA Knockdown der PKA, Mutationsstudien der entsprechenden Phosphorylierungsstellen, Interaktionsanalysen der Mutanten etc. unterstützt werden. Die mit Hilfe von Multiplexing Methoden gesammelten Daten können *in vivo* Modelle stützen und erweitern, wie z.B. im Falle der Interaktion des Signalkomplexes TRPV1/ARMS/PKA gezeigt.

Shigaki *et al.* zeigte, dass das Arbeiten mit Zelllysat und die Detektion von Phosphorylierungen möglich ist (Shigaki, Yamaji *et al.* 2007). Wäre dies in Zukunft auf den hier verwendeten Peptid Mikroarrays möglich, könnte durch das Verwenden von speziellen ATP-Analoga, mit denen ein UV-Crosslinking der Kinase an die Targetsequenz möglich ist einen Überblick darüber geben, welche Kinase exakt an welcher Peptidsequenz bindet. Darüber hinaus kann das hier auf die PKA und schmerzrelevante Targets entwickelte Tool für eine Reihe weiterer Studien verwendet werden wie z.B. Inhibitorscreening, Antikörperanalysen oder auch Kinasemotivstudien.

5 Zusammenfassung

Multiplex Technologien rücken immer mehr in den Fokus der Wissenschaft und klinischen Forschung. Diese Technologien wie bspw. Mikroarrays oder Bead basierte Systeme erlauben es hunderte oder tausende Nachweise in einem Experiment durchzuführen und dadurch Zeit, Kosten und Probenvolumen zu sparen. Ziel dieser Arbeit war es ein Tool zu entwickeln, welches das schnelle Screening nach Phosphorylierungsstellen auf Multiplexing Plattformen erlaubt und erweiterbar ist für weitere post-translationale Modifikationen. Als Modell System wurden hierbei die Membranproteine TRPV1 und ARMS als Target der Proteinkinase A (PKA-C α) verwendet.

Um einen detaillierten Einblick in die biochemischen Grundlagen chronischer Schmerzen zu erhalten, wurde ein Tool entwickelt, welches speziell Phosphorylierungen an primären Schmerztargets mit Hilfe eines anti-pPKA Antikörpers detektiert. Basierend auf einer Literaturrecherche wurde der cytosolische Teil von ausgewählten Membranproteinen (ARMS, ACI, ACV, ACVIII, MOR, DOR, TRPVI) nach Ser/Thr Phosphorylierungsstellen untersucht und Peptide (~30 AS) designend, welche die potentielle Phosphorylierungsstelle mittig beinhalteten. Die Ergebnisse zeigen, dass der anti-pPKA Antikörper nicht nur die Bindestelle RRxpS/T bindet, sondern auch RKpS/T und abgeschwächt auch Lysinmotive. Nach Optimierungen der Peptid Mikroarray Herstellung und des Assayprotokolls konnte eine Intra-/Inter-slide Reproduzierbarkeit der Peptid Mikroarrays von ca. 0,9 erreicht werden. Nach der Etablierung des Kinaseassays auf zwei Multiplexing Plattformen, DotBlot und TLC, wurde 186 Peptide nach potentiellen Phosphorylierungsstellen der PKA-C α analysiert. Mit Hilfe des Peptid Mikroarrays konnten dabei 11 Peptide als Targets der PKA-C α identifiziert werden, welche durch die Zeit-aufgelöste Analyse auf dem BioPlex3D verifiziert werden konnten. Es war möglich eine Einteilung der Peptide in *major* und *minor* Targets der PKA-C α vorzunehmen. Fünf der 11 Phosphorylierungsstellen wurden dabei erstmals mit *in vitro* Methoden detektiert. Wie an Hand des TRPVI/ARMS/PKA Interaktions-Modell gezeigt, können die detektierten P-Stellen in biologische Modelle implementiert werden. Sie helfen herauszufinden wie Proteine interagieren und welche Stellen im cytosolischen Bereich dabei eine entscheidende Rolle spielen.

6 Summary

Multiplexing technologies are gaining more and more attention in the life science area. These technologies like microarray or bead based systems allow the detection of hundred or even thousands of reactions in one experiment. With this opportunity it is possible to save time, costs and sample volume, which is important in case of patient samples for example. Regarding to this the aim of this work was to set up a fast screening tool for phosphorylation sites on multiplexing platforms with the potential to be extended to other post-translational modifications. As a model system chronic pain with a focus on ARMS and PKA is used.

To get a closer look into the protein network I set up a tool, to especially look for the phosphorylation sites of kinases on primary pain targets by making use of an anti-pPKA Antibody. Therefore I did a computer based sequence analysis for Ser/Thr phosphorylation sites (p-sites) on the cytosolic part of pre-selected human membrane proteins (ARMS, ACI, ACV, ACVIII, MOR, DOR, TRPVI) and designed peptides (30aa) with a midterm possible phosphorylation sites. The results clearly show that the anti-pPKA antibody is not only binding to the RRxpS/T recognition sites, but also RKxpS and in a weakened form Lysine binding sites. After optimizing the spotting procedure of the peptides (e.g. concentration, spotting conditions) and the assay protocol (e.g. washing and blocking steps, antibody concentration) the Intra- and Interslide reproducibility lies around 0,90. After the establishment of the assay on two independent multiplexing platforms (peptide microarrays and a Bead based system), as well as DotBlot and TLC, 186 peptides were screened for PKA-C α target sites. By using peptide microarrays 11 peptides were identified as targets for the Proteinkinase A, which were verified with a time-resolved analysis on the BioPlex3D. Five of the 11 detected p-sites were detected for the first time using *in vitro* methods. Due to the time-resolved analysis it was possible to group the peptides as major and minor target sites for the PKA-C α .

As shown with the TRPVI/ARMS/PKA interaction model the identified p-sites can be implemented into biological models and can help to discover how several proteins interact and which sites of the cytosolic part may play a major role.

7 Literaturverzeichnis

1. Aley, K. O. and J. D. Levine (1999). "Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain." The Journal of Neuroscience **19**(6): 2181-2186.
2. Allen, J. J., M. Li, C. S. Brinkworth, J. L. Paulson, D. Wang, A. Hubner, W.-H. Chou, R. J. Davis, A. L. Burlingame, R. O. Messing, C. D. Katayama, S. M. Hedrick and K. M. Shokat (2007). "A semisynthetic epitope for kinase substrates." Nat Meth **4**(6): 511-516.
3. Andresen, H., C. Grötzinger, K. Zarse, O. J. Kreuzer, E. Ehrentreich-Förster and F. F. Bier (2006). "Functional peptide microarrays for specific and sensitive antibody diagnostics." PROTEOMICS **6**(5): 1376-1384.
4. Angeloni, S., R. Cordes, S. Dunbar, C. Garcia, G. Gibson, C. Martin and V. Stone (2014). xMAP Cookbook-A collection of methods and protocols for developing multiplex assay with xMAP Technology, Luminex Corporation.
5. Arévalo, J. C., D. B. Pereira, H. Yano, K. K. Teng and M. V. Chao (2006). "Identification of a Switch in Neurotrophin Signaling by Selective Tyrosine Phosphorylation." Journal of Biological Chemistry **281**(2): 1001-1007.
6. Arévalo, J. C., H. Yano, K. K. Teng and M. V. Chao (2004). "A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein." The EMBO Journal **23**(12): 2358-2368.
7. Baltoumas, F. A., M. C. Theodoropoulou and S. J. Hamodrakas (2013). "Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials." Journal of Structural Biology **182**(3): 209-218.
8. Bauman, A. L., J. Soughayer, B. T. Nguyen, D. Willoughby, G. K. Carnegie, W. Wong, N. Hoshi, L. K. Langeberg, D. M. F. Cooper, C. W. Dessauer and J. D. Scott (2006). "Dynamic Regulation of cAMP Synthesis through Anchored PKA-Adenylyl Cyclase V/VI Complexes." Molecular cell **23**(6): 925-931.
9. Bavencoffe, A., Y. Li, Z. Wu, Q. Yang, J. Herrera, E. J. Kennedy, E. T. Walters and C. W. Dessauer (2016). "Persistent Electrical Activity in Primary Nociceptors after Spinal Cord Injury Is Maintained by Scaffolded Adenylyl Cyclase and Protein Kinase A and Is Associated with Altered Adenylyl Cyclase Regulation." The Journal of Neuroscience **36**(5): 1660-1668.
10. Beaudry, H., A. A. Mercier-Blais, C. Delaygue, C. Lavoie, J. L. Parent, W. Neugebauer and L. Gendron (2015). "Regulation of μ and δ opioid receptor functions: involvement of cyclin-dependent kinase 5." British Journal of Pharmacology **172**(10): 2573-2587.
11. Beebe, S. J., O. Øyen, M. Sandberg, A. Frøysa, V. Hansson and T. Jahnsen (1990). "Molecular Cloning of a Tissue-Specific Protein Kinase (Cy) from Human Testis—Representing a Third Isoform for the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase." Molecular Endocrinology **4**(3): 465-475.
12. Bhave, G. and R. W. Gereau (2004). "Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization." Journal of Neurobiology **61**(1): 88-106.
13. Bhave, G., H.-J. Hu, K. S. Glauner, W. Zhu, H. Wang, D. J. Brasier, G. S. Oxford and R. W. Gereau (2003). "Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(21): 12480-12485.

14. Bhave, G., W. Zhu, H. Wang, D. J. Brasier, G. S. Oxford and R. W. Gereau Iv (2002). "cAMP-Dependent Protein Kinase Regulates Desensitization of the Capsaicin Receptor (VR1) by Direct Phosphorylation." Neuron **35**(4): 721-731.
15. Bhusan, R., V. K. Mahesh and P. V. Mallikharjun (1989). "Thin layer chromatography of peptides and proteins: A review." Biomedical Chromatography **3**(3): 95-104.
16. Blätke, M. A., C. Rohr, M. Heiner and W. Marwan (2014). A Petri-Net-Based Framework for Biomodel Engineering. Large-Scale Networks in Engineering and Life Sciences. P. Benner, R. Findeisen, D. Flockerzi, U. Reichl and K. Sundmacher. Cham, Springer International Publishing: 317-366.
17. Bordeaux, J., A. W. Welsh, S. Agarwal, E. Killiam, M. T. Baquero, J. A. Hanna, V. K. Anagnostou and D. L. Rimm (2010). "Antibody validation." BioTechniques **48**(3): 197-209.
18. Bourinet, E., C. Altier, M. E. Hildebrand, T. Trang, M. W. Salter and G. W. Zamponi (2014). "Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling." Physiological Reviews **94**(1): 81-140.
19. Burns, D. J. W. and N. A. Turner (1967). "Peptide mapping on cellulose thin layers." Journal of Chromatography A **30**(0): 469-475.
20. Cabrera-Poch, N., L. a. Sanchez-Ruiloba, M. a. Rodriguez-Martinez and T. Iglesias (2004). "Lipid Raft Disruption Triggers Protein Kinase C and Src-dependent Protein Kinase D Activation and Kidins220 Phosphorylation in Neuronal Cells." Journal of Biological Chemistry **279**(27): 28592-28602.
21. Cahill, C. M., A. Morinville, M.-C. Lee, J.-P. Vincent, B. Collier and A. Beaudet (2001). "Prolonged Morphine Treatment Targets δ Opioid Receptors to Neuronal Plasma Membranes and Enhances δ -Mediated Antinociception." The Journal of Neuroscience **21**(19): 7598-7607.
22. Canas, B., Z. Dai, H. Lackland, R. Poretz and S. Stein (1993). "Covalent Attachment of Peptides to Membranes for Dot-Blot Analysis of Glycosylation Sites and Epitopes." Analytical Biochemistry **211**(2): 179-182.
23. Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum and D. Julius (2000). "Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor." Science **288**(5464): 306-313.
24. Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.
25. Cervelli, C., F. Pisani, A. Aureli, R. Azzarone, M. Scimitarra, C. Battistoni, B. Di Iulio, D. Fracassi, M. A. Scarnecchia, A. Famulari and F. Papola (2013). "For Anti-HLA-Specific Donor Antibodies Detection By Flow Cytometry Cytotoxic Crossmatches Comparison of Methods." Transplantation Proceedings **45**(7): 2761-2764.
26. Cesca, F., A. Satapathy, E. Ferrea, T. Nieuw, F. Benfenati and J. Scholz-Starke (2015). "Functional Interaction between the Scaffold Protein Kidins220/ARMS and Neuronal Voltage-Gated Na(+) Channels." The Journal of Biological Chemistry **290**(29): 18045-18055.
27. Cesca, F., A. Yabe, B. Spencer-Dene, A. Arrigoni, M. Al-Qatari, D. Henderson, H. Phillips, M. Koltzenburg, F. Benfenati and G. Schiavo (2011). "Kidins220/ARMS is an essential modulator of cardiovascular and nervous system development." Cell Death & Disease **2**(11): e226.

28. Chao, D. and Y. Xia (2010). "Ionic storm in hypoxic/ischemic stress: Can opioid receptors subside it?" Progress in neurobiology **90**(4): 439-470.
29. Chapman, M. D., S. Wuenschmann, E. King and A. Pomés (2015). "Technological Innovations for High-Throughput Approaches to In Vitro Allergy Diagnosis." Current allergy and asthma reports **15**(7): 36-36.
30. Chen, Y.-J., S. Oldfield, A. J. Butcher, A. B. Tobin, K. Saxena, V. V. Gurevich, J. L. Benovic, G. Henderson and E. Kelly (2013). "Identification of phosphorylation sites in the COOH-terminal tail of the μ -opioid receptor." Journal of neurochemistry **124**(2): 189-199.
31. Chen, Y., A. Mestek, J. Liu and L. Yu (1993). "Molecular cloning of a rat κ opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptors." Biochemical Journal **295**(3): 625-628.
32. Chinnasamy, T., L. I. Segerink, M. Nystrand, J. Gantelius and H. Andersson Svahn (2014). "Point-of-care vertical flow allergen microarray assay: proof of concept." Clinical chemistry **60**: 1209-1216.
33. Chinnasamy, T., L. I. Segerink, M. Nystrand, J. Gantelius and H. A. Svahn (2014). "A lateral flow paper microarray for rapid allergy point of care diagnostics." Analyst **139**(10): 2348-2354.
34. Clamp, M., B. Fry, M. Kamal, X. Xie, J. Cuff, M. F. Lin, M. Kellis, K. Lindblad-Toh and E. S. Lander (2007). "Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(49): 19428-19433.
35. Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-524.
36. Cohen, P. (2001). "The role of protein phosphorylation in human health and disease." European Journal of Biochemistry **268**(19): 5001-5010.
37. Cohen, P. (2002). "Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century?" Nat Rev Drug Discov **1**: 309 - 315.
38. Conti, F., C. Alessandri, M. Sorice, A. Capozzi, A. Longo, T. Garofalo, R. Misasi, D. Bompane, G. R. V. Hughes, M. A. Khamashta and G. Valesini (2012). "Thin-layer chromatography immunostaining in detecting anti-phospholipid antibodies in seronegative anti-phospholipid syndrome." Clinical & Experimental Immunology **167**(3): 429-437.
39. Cooperation, L. (2013). "xPONENT® 3.1 Rev. 2 Software User Manual."
40. Corbin, J. D., S. L. Keely and C. R. Park (1975). "The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues." Journal of Biological Chemistry **250**(1): 218-225.
41. Corbin, J. D., T. R. Soderling and C. R. Park (1973). "Regulation of Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependent Protein Kinase: I. PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF THE ADIPOSE TISSUE ENZYME IN CRUDE EXTRACTS." Journal of Biological Chemistry **248**(5): 1813-1821.
42. Cretich, M., F. Damini and M. Chiari (2014). "Protein microarray technology: how far off is routine diagnostics?" Analyst **139**(3): 528-542.
43. Cui, M., V. Gosu, S. Basith, S. Hong and S. Choi (2016). Chapter Three - Polymodal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Nociceptor: Structure, Modulators, and Therapeutic Applications. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. D. Rossen, Academic Press. **Volume 104**: 81-125.

44. Dasilva, N., P. Diez, M. Gonzalez-Gonzalez, S. Matarraz, J. M. Sayagues, A. Orfao and M. Fuentes (2013). "Protein microarrays: technological aspects, applications and intellectual property." Recent Pat Biotechnol **7**(2): 142-152.
45. Delghandi, M. P., M. Johannessen and U. Moens (2005). "The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells." Cellular Signalling **17**(11): 1343-1351.
46. Devesa, I., C. Ferrándiz-Huertas, S. Mathivanan, C. Wolf, R. Luján, J.-P. Changeux and A. Ferrer-Montiel (2014). "αCGRP is essential for algescic exocytotic mobilization of TRPV1 channels in peptidergic nociceptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(51): 18345-18350.
47. Devkota, A. K., M. Warthaka, R. Edupuganti, C. D. J. Tavares, W. H. Johnson, B. Ozpolat, E. J. Cho and K. N. Dalby (2013). "High-Throughput Screens for eEF-2 Kinase." Journal of Biomolecular Screening.
48. Doll, C., J. Konietzko, F. Pöll, T. Koch, V. Höllt and S. Schulz (2011). "Agonist-selective patterns of μ-opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies." British Journal of Pharmacology **164**(2): 298-307.
49. Doseeva, V., T. Colpitts, G. Gao, J. Woodcock and V. Knezevic (2015). "Performance of a multiplexed dual analyte immunoassay for the early detection of non-small cell lung cancer." Journal of Translational Medicine **13**: 55.
50. Dr. med. Wolf Diemer, P. D. r. p. H. B. (1998). Chronische Schmerzen-Kopf- und Rückenschmerzen, Tumorschmerzen. Gesundheitsbericht des Bundes Robert Koch-Institut. **7**.
51. Dunbar, S. A. and M. R. Hoffmeyer (2013). Microsphere-based multiplex immunoassays: development and applications using Luminex® xMAP® technology. The Immunoassay Handbook. D. Wild. Amsterdam, Elsevier.
52. Dunphy, J. C. and K. L. Busch (1988). "Imaging analysis and selected sequence monitoring of small peptides using planar chromatography/secondary ion mass spectrometry." Biological Mass Spectrometry **17**(5): 405-410.
53. Ekins, R., F. Chu and E. Biggart (1990). "Multispot, multianalyte, immunoassay." Ann Biol Clin (Paris) **48**(9): 655-666.
54. Ekins, R. P. (1989). "Multi-analyte immunoassay." J Pharm Biomed Anal **7**(2): 155-168.
55. Ekins, R. P. (1998). "Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays." Clin Chem **44**(9): 2015-2030.
56. Ekins, R. P. and F. W. Chu (1991). "Multianalyte microspot immunoassay--microanalytical "compact disk" of the future." Clin Chem **37**(11): 1955-1967.
57. Endres-Becker, J., P. A. Heppenstall, S. A. Mousa, D. Labuz, A. Oksche, M. Schäfer, C. Stein and C. Zöllner (2007). "μ-Opioid Receptor Activation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Currents in Sensory Neurons in A Model of Inflammatory Pain." Molecular Pharmacology **71**(1): 12-18.
58. Ezkurdia, I., D. Juan, J. M. Rodriguez, A. Frankish, M. Diekhans, J. Harrow, J. Vazquez, A. Valencia and M. L. Tress (2014). "Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes." Human Molecular Genetics **23**(22): 5866-5878.
59. Feliciello, A., M. E. Gottesman and E. V. Avvedimento (2001). "The biological functions of A-kinase anchor proteins1." Journal of Molecular Biology **308**(2): 99-114.

60. Feng, B., Z. Li and J. B. Wang (2011). "Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of the μ -Opioid Receptor and Its Effects on Receptor Signaling." Molecular Pharmacology **79**(4): 768-775.
61. Feng, Y., X. He, Y. Yang, D. Chao, L. H. Lazarus and Y. Xia (2012). "Current Research on Opioid Receptor Function." Current Drug Targets **13**(2): 230-246.
62. Fernandes, E. S., M. A. Fernandes and J. E. Keeble (2012). "The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves." British Journal of Pharmacology **166**(2): 510-521.
63. Fiala, G. J., I. Janowska, F. Prutek, E. Hobeika, A. Satapathy, A. Sprenger, T. Plum, M. Seidl, J. Dengjel, M. Reth, F. Cesca, T. Brummer, S. Minguet and W. W. A. Schamel (2015). "Kidins220/ARMS binds to the B cell antigen receptor and regulates B cell development and activation." The Journal of Experimental Medicine **212**(10): 1693-1708.
64. Frank, R. (2002). "High-Density Synthetic Peptide Microarrays: Emerging Tools for Functional Genomics and Proteomics." Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening **5**(6): 429-440.
65. Frank, R. (2002). "The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications." Journal of Immunological Methods **267**(1): 13-26.
66. García-Martínez, C., C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J. M. Merino and A. Ferrer-Montiel (2000). "Identification of an Aspartic Residue in the P-loop of the Vanilloid Receptor That Modulates Pore Properties." Journal of Biological Chemistry **275**(42): 32552-32558.
67. Gesellchen, F., O. Bertinetti and F. W. Herberg (2006). "Analysis of posttranslational modifications exemplified using protein kinase A." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics **1764**(12): 1788-1800.
68. Giansanti, P., M. P. Stokes, J. C. Silva, A. Scholten and A. J. R. Heck (2013). "Interrogating cAMP-dependent Kinase Signaling in Jurkat T Cells via a Protein Kinase A Targeted Immune-precipitation Phosphoproteomics Approach." Molecular & Cellular Proteomics : MCP **12**(11): 3350-3359.
69. Giron, S. E., C. A. Griffis and J. F. Burkard (2015). "Chronic Pain and Decreased Opioid Efficacy: An Inflammatory Link." Pain management nursing : official journal of the American Society of Pain Management Nurses **16**(5): 819-831.
70. Granier, S., A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, W. I. Weis and B. K. Kobilka (2012). "Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole." Nature **485**(7398): 400-404.
71. Gu, C. and D. M. F. Cooper (1999). "Calmodulin-binding Sites on Adenylyl Cyclase Type VIII." Journal of Biological Chemistry **274**(12): 8012-8021.
72. Guo, J., Y. Wu, W. Zhang, J. Zhao, L. A. Devi, G. Pei and L. Ma (2000). "Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated δ -opioid receptor phosphorylation." Molecular Pharmacology **58**(5): 1050-1056.
73. Hauer, J. A., P. Barthe, S. S. Taylor, J. Parello and A. Padilla (1999). "Two well-defined motifs in the cAMP-dependent protein kinase inhibitor (PKI α) correlate with inhibitory and nuclear export function." Protein Science : A Publication of the Protein Society **8**(3): 545-553.
74. He, M., O. Stoevesandt, E. A. Palmer, F. Khan, O. Ericsson and M. J. Taussig (2008). "Printing protein arrays from DNA arrays." Nat Meth **5**(2): 175-177.

75. He, M. and M. J. Taussig (2001). "Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method)." Nucleic Acids Research **29**(15): e73-e73.
76. Hilhorst, R., L. Houkes, A. van den Berg and R. Ruijtenbeek (2009). "Peptide microarrays for detailed, high-throughput substrate identification, kinetic characterization, and inhibition studies on protein kinase A." Analytical Biochemistry **387**(2): 150-161.
77. Hilpert, K., D. F. H. Winkler and R. E. W. Hancock (2007). "Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion." Nat. Protocols **2**(6): 1333-1349.
78. Hilton, J. K., P. Rath, C. V. M. Helsell, O. Beckstein and W. D. Van Horn (2015). "Understanding Thermosensitive Transient Receptor Potential Channels as Versatile Polymodal Cellular Sensors." Biochemistry **54**(15): 2401-2413.
79. Hofmann, F., J. A. Beavo, P. J. Bechtel and E. G. Krebs (1975). "Comparison of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle." Journal of Biological Chemistry **250**(19): 7795-7801.
80. Houseman, B. T., J. H. Huh, S. J. Kron and M. Mrksich (2002). "Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity." Nat Biotech **20**(3): 270-274.
81. Hu, J., H.-S. Rho, R. H. Newman, W. Hwang, J. Neiswinger, H. Zhu, J. Zhang and J. Qian (2014). "Global analysis of phosphorylation networks in humans." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics **1844**(1, Part B): 224-231.
82. Hu, S.-J., X.-J. Song, K. W. Greenquist, J.-M. Zhang and R. H. LaMotte (2001). "Protein kinase A modulates spontaneous activity in chronically compressed dorsal root ganglion neurons in the rat." PAIN **94**(1): 39-46.
83. Hucho, T. and J. D. Levine (2007). "Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology." Neuron **55**(3): 365-376.
84. Hultschig, C., J. Kreutzberger, H. Seitz, Z. Konthur, K. Büssow and H. Lehrach (2006). "Recent advances of protein microarrays." Current Opinion in Chemical Biology **10**(1): 4-10.
85. Human Genome Sequencing, C. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." Nature **431**(7011): 931-945.
86. Iglesias, T., N. Cabrera-Poch, M. P. Mitchell, T. J. P. Naven, E. Rozengurt and G. Schiavo (2000). "Identification and Cloning of Kidins220, a Novel Neuronal Substrate of Protein Kinase D." Journal of Biological Chemistry **275**(51): 40048-40056.
87. Isensee, J., M. Diskar, S. Waldherr, R. Buschow, J. Hasenauer, A. Prinz, F. Allgöwer, F. W. Herberg and T. Hucho (2014). "Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons." Journal of Cell Science **127**(1): 216-229.
88. Isensee, J., C. Wenzel, R. Buschow, R. Weissmann, A. W. Kuss and T. Hucho (2015). "Subgroup-Elimination Transcriptomics Identifies Signaling Proteins that Define Subclasses of TRPV1-Positive Neurons and a Novel Paracrine Circuit." PLoS ONE **9**(12): e115731.
89. Iwami, G., J.-i. Kawabe, T. Ebina, P. J. Cannon, C. J. Homcy and Y. Ishikawa (1995). "Regulation of Adenylyl Cyclase by Protein Kinase A." Journal of Biological Chemistry **270**(21): 12481-12484.
90. Jeske, N. A., A. M. Patwardhan, N. B. Ruparel, A. N. Akopian, M. S. Shapiro and M. A. Henry (2009). "A- Kinase Anchoring Protein 150 Controls Protein Kinase C-mediated Phosphorylation and Sensitization of TRPV1." Pain **146**(3): 301-307.

91. Johnson, D. A., P. Akamine, E. Radzio-Andzelm, Madhusudan and S. S. Taylor (2001). "Dynamics of cAMP-Dependent Protein Kinase." Chemical Reviews **101**(8): 2243-2270.
92. Josifova, D. J., G. R. Monroe, F. Tessadori, E. de Graaff, B. van der Zwaag, S. G. Mehta, T. D. Study, M. Harakalova, K. J. Duran, S. M. C. Savelberg, I. J. Nijman, H. Jungbluth, C. C. Hoogenraad, J. Bakkers, N. V. Knoers, H. V. Firth, P. L. Beales, G. van Haften and M. M. van Haelst (2016). "Heterozygous KIDINS220/ARMS nonsense variants cause spastic paraplegia, intellectual disability, nystagmus, and obesity." Human Molecular Genetics **25**(11): 2158-2167.
93. Julius, D. (2013). "TRP Channels and Pain." Annual Review of Cell and Developmental Biology **29**(1): 355-384.
94. Jung, J., J. S. Shin, S.-Y. Lee, S. W. Hwang, J. Koo, H. Cho and U. Oh (2004). "Phosphorylation of Vanilloid Receptor 1 by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II Regulates Its Vanilloid Binding." Journal of Biological Chemistry **279**(8): 7048-7054.
95. Just, S., S. Illing, M. Trester-Zedlitz, E. K. Lau, S. J. Kotowski, E. Miess, A. Mann, C. Doll, J. C. Trinidad, A. L. Burlingame, M. von Zastrow and S. Schulz (2013). "Differentiation of Opioid Drug Effects by Hierarchical Multi-Site Phosphorylation." Molecular Pharmacology **83**(3): 633-639.
96. Katz, C., L. Levy-Beladev, S. Rotem-Bamberger, T. Rito, S. G. D. Rudiger and A. Friedler (2011). "Studying protein-protein interactions using peptide arrays." Chemical Society Reviews **40**(5): 2131-2145.
97. Kawabe, J.-i., T. Ebina, Y. Toya, N. Oka, C. Schwencke, E. Duzic and Y. Ishikawa (1996). "Regulation of type V adenylyl cyclase by PMA-sensitive and -insensitive protein kinase C isoenzymes in intact cells." FEBS Letters **384**(3): 273-276.
98. Kawasaki, Y., T. Kohno, Z.-Y. Zhuang, G. J. Brenner, H. Wang, C. Van Der Meer, K. Befort, C. J. Woolf and R.-R. Ji (2004). "Ionotropic and Metabotropic Receptors, Protein Kinase A, Protein Kinase C, and Src Contribute to C-Fiber-Induced ERK Activation and cAMP Response Element-Binding Protein Phosphorylation in Dorsal Horn Neurons, Leading to Central Sensitization." The Journal of Neuroscience **24**(38): 8310-8321.
99. Keshwani, M. M., J. R. Kanter, Y. Ma, A. Wilderman, M. Darshi, P. A. Insel and S. S. Taylor (2015). "Mechanisms of cyclic AMP/protein kinase A- and glucocorticoid-mediated apoptosis using S49 lymphoma cells as a model system." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**(41): 12681-12686.
100. Kettenbach, A. N., D. K. Schweppe, B. K. Faherty, D. Pechenick, A. A. Pletnev and S. A. Gerber (2011). "Quantitative Phosphoproteomics Identifies Substrates and Functional Modules of Aurora and Polo-Like Kinase Activities in Mitotic Cells." Science signaling **4**(179): 10.1126/scisignal.2001497.
101. Klussmann, E. (2007). Protein Kinase A. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. New York, Elsevier: 1-9.
102. Knighton, D., J. Zheng, L. Ten Eyck, V. Ashford, N. Xuong, S. Taylor and J. Sowadski (1991). "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." Science **253**(5018): 407-414.
103. Kong, H., J. Boulter, J. L. Weber, C. Lai and M. V. Chao (2001). "An Evolutionarily Conserved Transmembrane Protein That Is a Novel Downstream Target of Neurotrophin and Ephrin Receptors." The Journal of Neuroscience **21**(1): 176-185.

104. Kouhen, O. M.-E., G. Wang, J. Solberg, L. J. Erickson, P.-Y. Law and H. H. Loh (2000). "Hierarchical Phosphorylation of δ -Opioid Receptor Regulates Agonist-induced Receptor Desensitization and Internalization." Journal of Biological Chemistry **275**(47): 36659-36664.
105. Kricka, L. J. and S. R. Master (2009). "Quality control and protein microarrays." Clin Chem **55**(6): 1053-1055.
106. Kuner, R. (2010). "Central mechanisms of pathological pain." Nat Med **16**(11): 1258-1266.
107. Latorre, R., C. Zaelzer and S. Brauchi (2009). "Structure–functional intimacies of transient receptor potential channels." Quarterly Reviews of Biophysics **42**(3): 201-246.
108. Lau, E. K., M. Trester-Zedlitz, J. C. Trinidad, S. J. Kotowski, A. N. Krutchinsky, A. L. Burlingame and M. von Zastrow (2011). "Quantitative encoding of a partial agonist effect on individual opioid receptors by multi-site phosphorylation and threshold detection." Science signaling **4**(185): ra52-ra52.
109. Law, P.-Y., Y. H. Wong and H. H. Loh (2000). "Molecular Mechanisms and Regulation of Opioid Receptor Signaling." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **40**(1): 389-430.
110. Lee, S. E., L. M. Elphick, A. A. Anderson, L. Bonnac, E. S. Child, D. J. Mann and V. Gouverneur (2009). "Synthesis and reactivity of novel γ -phosphate modified ATP analogues." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **19**(14): 3804-3807.
111. Lepri, L., P. G. Desideri and D. Heimler (1980). "Reversed-phase and soap thin-layer chromatography of amino acids." Journal of Chromatography A **195**(1): 65-73.
112. Li, T., X. Liu, D. Liu and Z. Wang (2013). "Sensitive Detection of Protein Kinase A Activity in Cell Lysates by Peptide Microarray-Based Assay." Analytical Chemistry **85**(15): 7033-7037.
113. Liao, Y.-H., S.-M. Hsu and P.-H. Huang (2007). "ARMS Depletion Facilitates UV Irradiation–Induced Apoptotic Cell Death in Melanoma." Cancer Research **67**(24): 11547-11556.
114. Liu, B., W. Ma, S. Ryu and F. Qin (2004). "Inhibitory modulation of distal C-terminal on protein kinase C-dependent phospho-regulation of rat TRPV1 receptors." The Journal of Physiology **560**(Pt 3): 627-638.
115. Liu, J., J. Du, Y. Yang and Y. Wang (2015). "Phosphorylation of TRPV1 by cyclin-dependent kinase 5 promotes TRPV1 surface localization, leading to inflammatory thermal hyperalgesia." Experimental Neurology **273**: 253-262.
116. Lochner, A. and J. A. Moolman (2006). "The Many Faces of H89: A Review." Cardiovascular Drug Reviews **24**(3-4): 261-274.
117. López-Menéndez, C., A. Gamir-Morralla, J. Jurado-Arjona, A. M. Higuero, M. R. Campanero, I. Ferrer, F. Hernández, J. Ávila, M. Díaz-Guerra and T. Iglesias (2013). "Kidins220 accumulates with tau in human Alzheimer's disease and related models: modulation of its calpain-processing by GSK3 β /PP1 imbalance." Human Molecular Genetics **22**(3): 466-482.
118. Luttrell, L. M. (2006). Transmembrane Signaling by G Protein-Coupled Receptors. Transmembrane Signaling Protocols. H. Ali and B. Haribabu. Totowa, NJ, Humana Press: 3-49.
119. Luttrell, L. M. and D. Gesty-Palmer (2010). "Beyond Desensitization: Physiological Relevance of Arrestin-Dependent Signaling." Pharmacological Reviews **62**(2): 305-330.

120. Lynch, H. E., A. M. Sanchez, M. P. D'Souza, W. Rountree, T. N. Denny, M. Kalos and G. D. Sempowski (2014). "Development and Implementation of a Proficiency Testing Program for Luminex Bead-Based Cytokine Assays." Journal of immunological methods **0**: 62-71.
121. Malaspina, D., T. M. Kranz, A. Heguy, S. Harroch, R. Mazgaj, K. Rothman, A. Berns, S. Hasan, D. Antonius, R. Goetz, M. Lazar, M. V. Chao and O. Gonen (2016). "Prefrontal neuronal integrity predicts symptoms and cognition in schizophrenia and is sensitive to genetic heterogeneity." Schizophrenia research **172**(1-3): 94-100.
122. Malmberg, A. B., E. P. Brandon, R. L. Idzerda, H. Liu, G. S. McKnight and A. I. Basbaum (1997). "Diminished Inflammation and Nociceptive Pain with Preservation of Neuropathic Pain in Mice with a Targeted Mutation of the Type I Regulatory Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase." The Journal of Neuroscience **17**(19): 7462-7470.
123. Mann, A., S. Illing, E. Miess and S. Schulz (2015). "Different mechanisms of homologous and heterologous μ -opioid receptor phosphorylation." British Journal of Pharmacology **172**(2): 311-316.
124. Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "The Protein Kinase Complement of the Human Genome." Science **298**(5600): 1912-1934.
125. McDonald, J. U., J. Ekeruche-Makinde, M. M. Ho, J. S. Tregoning and O. Ashiru (2016). "Development of a custom pentaplex sandwich immunoassay using Protein-G coupled beads for the Luminex® xMAP® platform." Journal of Immunological Methods **433**: 6-16.
126. Meinkoth, J. L., A. S. Alberts, W. Went, D. Fantozzi, S. S. Taylor, M. Hagiwara, M. Montminy and J. R. Feramisco (1993). "Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase." Molecular and Cellular Biochemistry **127**(1): 179-186.
127. Min, D.-H. and M. Mrksich (2004). "Peptide arrays: towards routine implementation." Current Opinion in Chemical Biology **8**(5): 554-558.
128. Morinville, A., C. M. Cahill, M. J. Esdaile, H. Aibak, B. Collier, B. L. Kieffer and A. Beaudet (2003). "Regulation of δ -Opioid Receptor Trafficking via μ -Opioid Receptor Stimulation: Evidence from μ -Opioid Receptor Knock-Out Mice." The Journal of Neuroscience **23**(12): 4888-4898.
129. Morschheuser, L., S. Mükusch, M. Riedner, H. Seitz and S. Rohn (2016). "High-performance thin-layer chromatography as a fast screening tool for phosphorylated peptides." Journal of Chromatography B **1008**: 198-205.
130. Moujalled, D., R. Weston, H. Anderton, R. Ninnis, P. Goel, A. Coley, D. C. S. Huang, L. Wu, A. Strasser and H. Puthalakath (2011). "Cyclic-AMP-dependent protein kinase A regulates apoptosis by stabilizing the BH3-only protein Bim." EMBO Reports **12**(1): 77-83.
131. Narayana, N., S. Cox, S. Shaltiel, S. S. Taylor and N.-h. Xuong (1997). "Crystal Structure of a Polyhistidine-Tagged Recombinant Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase Complexed with the Peptide Inhibitor PKI(5-24) and Adenosine." Biochemistry **36**(15): 4438-4448.
132. Neubrand, V. E., F. Cesca, F. Benfenati and G. Schiavo (2012). "Kidins220/ARMS as a functional mediator of multiple receptor signalling pathways." Journal of Cell Science **125**(8): 1845-1854.
133. Nikita Gahoi, S. R., and Sanjeeva Srivastava (2014). "Array-based Proteomic Approaches to Study Signal Transduction Pathways: Prospects, Merits and Challenges " Proteomics Journal.

134. Nishizuka, Y. (1992). "Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C." Science **258**(5082): 607-614.
135. Nowacka, J. D., C. Baumgartner, C. Pelorosso, M. Roth, J. Zuber and M. Baccarini (2016). MEK1 is required for the development of NRAS-driven leukemia.
136. Ohguro, H. and K. Palczewski (1995). "Separation of phospho- and non-phosphopeptides using reverse phase column chromatography." FEBS Letters **368**(3): 452-454.
137. Pain, I. A. f. t. S. o. (2002). "Classification of Chronic Pain." **2**.
138. Panchagnula, V., A. Mikulskis, L. Song, Y. Wang, M. Wang, T. Knubovets, E. Scrivener, E. Golenko, I. S. Krull, M. Schulz, H. Heinz Emil and W. F. Patton (2007). "Phosphopeptide analysis by directly coupling two-dimensional planar electrochromatography/thin-layer chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1155**(1): 112-123.
139. Paolillo, M., A. Feliciello, A. Porcellini, C. Garbi, M. Bifulco, S. Schinelli, C. Ventra, E. Stabile, G. Ricciardelli, G. Schettini and E. V. Avvedimento (1999). "The Type and the Localization of cAMP-dependent Protein Kinase Regulate Transmission of cAMP Signals to the Nucleus in Cortical and Cerebellar Granule Cells." Journal of Biological Chemistry **274**(10): 6546-6552.
140. Patapoutian, A., S. Tate and C. J. Woolf (2009). "Transient receptor potential channels: targeting pain at the source." Nat Rev Drug Discov **8**(1): 55-68.
141. Patel, A., J. Navidad and S. Bhattacharyya (2014). "Site-Specific Clinical Evaluation of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for Detection of Infectious Gastroenteritis in Fecal Specimens." Journal of Clinical Microbiology **52**(8): 3068-3071.
142. Perkins, J. R., J. Lees, A. Antunes-Martins, I. Diboun, S. B. McMahon, D. L. H. Bennett and C. Orengo (2013). "PainNetworks: A web-based resource for the visualisation of pain-related genes in the context of their network associations." Pain **154**(12): 2586.e2581-2586.e2512.
143. Peter, J. K., C.; Kaufholz, M.; Buschow, R.; Isensee, J.; Hucho, T.; Herberg, F. W.; Schwede, F.; Stein, C.; Jordt, S.-E.; Brackmann, M.; Spahn, V. (2016). "Ankyrin-rich membrane spanning protein as a novel modulator of transient receptor potential vanilloid 1 - function in nociceptive neurons." European Journal of Pain, Manuskript eingereicht.
144. Petrenko, A. B., T. Yamakura, H. Baba and K. Shimoji (2003). "The Role of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review." Anesthesia & Analgesia **97**(4): 1108-1116.
145. Pinto, D., E. Delaby, D. Merico, M. Barbosa, A. Merikangas, L. Klei, B. Thiruvahindrapuram, X. Xu, R. Ziman, Z. Wang, Jacob A. Vorstman, A. Thompson, R. Regan, M. Pilorge, G. Pellecchia, Alistair T. Pagnamenta, B. Oliveira, Christian R. Marshall, Tiago R. Magalhaes, Jennifer K. Lowe, Jennifer L. Howe, Anthony J. Griswold, J. Gilbert, E. Duketis, Beth A. Dombroski, Maretha V. De Jonge, M. Cuccaro, Emily L. Crawford, Catarina T. Correia, J. Conroy, Inês C. Conceição, Andreas G. Chiocchetti, Jillian P. Casey, G. Cai, C. Cabrol, N. Bolshakova, E. Bacchelli, R. Anney, S. Gallinger, M. Cotterchio, G. Casey, L. Zwaigenbaum, K. Wittemeyer, K. Wing, S. Wallace, H. van Engeland, A. Tryfon, S. Thomson, L. Soorya, B. Rogé, W. Roberts, F. Poustka, S. Mougá, N. Minshew, L A. McInnes, Susan G. McGrew, C. Lord, M. Leboyer, Ann S. Le Couteur, A. Kolevzon, P. Jiménez González, S. Jacob, R. Holt, S. Guter, J. Green, A. Green, C. Gillberg, B. A. Fernandez, F. Duque, R. Delorme, G.

- Dawson, P. Chaste, C. Café, S. Brennan, T. Bourgeron, Patrick F. Bolton, S. Bölte, R. Bernier, G. Baird, Anthony J. Bailey, E. Anagnostou, J. Almeida, Ellen M. Wijsman, Veronica J. Vieland, Astrid M. Vicente, Gerard D. Schellenberg, M. Pericak-Vance, Andrew D. Paterson, Jeremy R. Parr, G. Oliveira, John I. Nurnberger, Anthony P. Monaco, E. Maestrini, Sabine M. Klauck, H. Hakonarson, Jonathan L. Haines, Daniel H. Geschwind, Christine M. Freitag, Susan E. Folstein, S. Ennis, H. Coon, A. Battaglia, P. Szatmari, James S. Sutcliffe, J. Hallmayer, M. Gill, Edwin H. Cook, Joseph D. Buxbaum, B. Devlin, L. Gallagher, C. Betancur and Stephen W. Scherer (2014). "Convergence of Genes and Cellular Pathways Dysregulated in Autism Spectrum Disorders." American Journal of Human Genetics **94**(5): 677-694.
146. Por, Elaine D., R. Gomez, Armen N. Akopian and Nathaniel A. Jeske (2013). "Phosphorylation regulates TRPV1 association with β -arrestin-2." Biochemical Journal **451**(1): 101-109.
147. Prescher, J. A. and C. R. Bertozzi (2005). "Chemistry in living systems." Nat Chem Biol **1**(1): 13-21.
148. Prgomet, Z., T. Andersson and P. Lindberg (2017). "Optimization, validation, and identification of two reliable antibodies for immunodetection of WNT5A." Biotechnic & Histochemistry: 1-13.
149. Price, T. J., N. A. Jeske, C. M. Flores and K. M. Hargreaves (2005). "Pharmacological interactions between calcium/calmodulin-dependent kinase II α and TRPV1 receptors in rat trigeminal sensory neurons." Neuroscience Letters **389**(2): 94-98.
150. Ramachandran, N., E. Hainsworth, B. Bhullar, S. Eisenstein, B. Rosen, A. Y. Lau, J. C. Walter and J. LaBaer (2004). "Self-Assembling Protein Microarrays." Science **305**(5680): 86-90.
151. Reutersward, P., J. Gantelius and H. Andersson Svahn (2015). "An 8 minute colorimetric paper-based reverse phase vertical flow serum microarray for screening of hyper IgE syndrome." Analyst **140**(21): 7327-7334.
152. S.S. Taylor*; J. Yang, J. W. N. M. H. E. R.-A. G. A. (2004). "PKA: A portrait of protein kinase dynamics." Biochimica et Biophysica Acta.
153. Saloustros, E., P. Salpea, M. Starost, S. Liu, F. R. Faucz, E. London, E. Szarek, W.-j. Song, M. A. Hussain and C. A. Stratakis (2016). "Prkar1a gene knockout in the pancreas leads to neuroendocrine tumorigenesis." Endocrine-Related Cancer.
154. Sambrook, M. R. G. J. (2001). Molecular Cloning A Laboratory Manual.
155. Sandkühler, J. (2001). "Schmerzgedächtnis: Entstehung, Vermeidung und Löschung." Dtsch Arztebl International **98**(42): A-2725.
156. Saper, C. B. (2005). "An open letter to our readers on the use of antibodies." The Journal of Comparative Neurology **493**(4): 477-478.
157. Sapio, L., M. Gallo, M. Illiano, E. Chiosi, D. Naviglio, A. Spina and S. Naviglio (2016). "The Natural cAMP Elevating Compound Forskolin in Cancer Therapy: Is it Time?" Journal of Cellular Physiology.
158. Satheesh, N. J., Y. Uehara, J. Fedotova, M. Pohanka, D. Büsselberg and P. Kruzliak (2016). "TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity." Neuropeptides **57**: 1-8.
159. Schmerzliga, D. (2013). Chronischer Schmerz: Daten, Fakten, Hintergründe, Deutsche Schmerzliga e.V.
160. Schnizler, K., L. P. Shutov, M. J. Van Kanegan, M. A. Merrill, B. Nichols, G. S. McKnight, S. Strack, J. W. Hell and Y. M. Usachev (2008). "Protein Kinase A Anchoring

- via AKAP150 Is Essential for TRPV1 Modulation by Forskolin and Prostaglandin E." The Journal of Neuroscience **28**(19): 4904-4917.
161. Schnizler, K., L. P. Shutov, M. J. Van Kanegan, M. A. Merrill, B. Nichols, G. S. McKnight, S. Strack, J. W. Hell and Y. M. Usachev (2008). "Protein Kinase A Anchoring via AKAP150 Is Essential for TRPV1 Modulation by Forskolin and Prostaglandin E2 in Mouse Sensory Neurons." The Journal of Neuroscience **28**(19): 4904-4917.
162. Scholz-Starke, J. and F. Cesca (2016). "Stepping Out of the Shade: Control of Neuronal Activity by the Scaffold Protein Kidins220/ARMS." Frontiers in Cellular Neuroscience **10**: 68.
163. Schumacher, S., S. Mükusch and H. Seitz (2015). "Up-to-Date Applications of Microarrays and Their Way to Commercialization." Microarrays **4**(2): 196.
164. Schumacher, S. and H. Seitz (2016). "Quality control of antibodies for assay development." New Biotechnology **33**(5, Part A): 544-550.
165. Scott, J. D., E. H. Fischer, K. Takio, J. G. Demaille and E. G. Krebs (1985). "Amino acid sequence of the heat-stable inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(17): 5732-5736.
166. Shapiro, H., P. Singer and A. Ariel (2016). "Beyond the classic eicosanoids: Peripherally-acting oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids mediate pain associated with tissue injury and inflammation." Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA) **111**: 45-61.
167. Shepard, B. D., D. De Forni, D. R. McNamara, A. Foli, S. A. Rizza, R. S. Abraham, K. Knutson, P. J. Wettstein, F. Lori and A. D. Badley (2008). "Beneficial Effect of TRAIL on HIV Burden, without Detectable Immune Consequences." PLoS ONE **3**(8): e3096.
168. Shi, Y.-X., T. Zhu, T. Zou, W. Zhuo, Y.-X. Chen, M.-S. Huang, W. Zheng, C.-J. Wang, X. Li, X.-Y. Mao, W. Zhang, H.-H. Zhou, J.-Y. Yin and Z.-Q. Liu (2016). Prognostic and predictive values of CDK1 and MAD2L1 in lung adenocarcinoma.
169. Shigaki, S., T. Yamaji, X. Han, G. Yamanouchi, T. Sonoda, O. Okitsu, T. Mori, T. Niidome and Y. Katayama (2007). "A Peptide Microarray for the Detection of Protein Kinase Activity in Cell Lysate." Analytical Sciences **23**(3): 271-275.
170. Shoji, S., K. Titani, J. G. Demaille and E. H. Fischer (1979). "Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." Journal of Biological Chemistry **254**(14): 6211-6214.
171. Skålhegg, B. S. T., K. (1997). "Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, mregulation, and subcellular localization of subunits of PKA." Front Biosci **2**: 331-342.
172. Slice, L. W. and S. S. Taylor (1989). "Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli." Journal of Biological Chemistry **264**(35): 20940-20946.
173. Spahn, V., C. Stein and C. Zöllner (2014). "Modulation of Transient Receptor Vanilloid 1 Activity by Transient Receptor Potential Ankyrin 1." Molecular Pharmacology **85**(2): 335.
174. Springer (2016). Peptide Microarrays, Humana Press.
175. Stakkestad, Ø., A. C. V. Larsen, A.-K. Kvissel, S. Eikvar, S. Ørstavik and B. S. Skålhegg (2011). "Protein kinase A type I activates a CRE-element more efficiently than protein kinase A type II regardless of C subunit isoform." BMC Biochemistry **12**: 7-7.

176. Sternweis, P. C. and A. V. Smrcka (1992). "Regulation of phospholipase C by G proteins." Trends in Biochemical Sciences **17**(12): 502-506.
177. Stewart, A. and R. A. Fisher (2015). Chapter One - Introduction: G Protein-coupled Receptors and RGS Proteins. Progress in Molecular Biology and Translational Science. A. F. Rory, Academic Press. **Volume 133**: 1-11.
178. Stoevesandt, O., M. J. Taussig and M. He (2009). "Protein microarrays: high-throughput tools for proteomics." Expert Rev Proteomics **6**(2): 145-157.
179. Sun, C., G. Wang, K. H. Wrighton, H. Lin, Z. Songyang, X.-H. Feng and X. Lin (2016). "Regulation of p27(Kip1) phosphorylation and G1 cell cycle progression by protein phosphatase PPM1G." American Journal of Cancer Research **6**(10): 2207-2220.
180. Sun, D., X. Li, Y. He, W. Li, Y. Wang, H. Wang, S. Jiang and Y. Xin (2016). YAP1 enhances cell proliferation, migration, and invasion of gastric cancer in vitro and in vivo.
181. Sutandy, F. X., J. Qian, C. S. Chen and H. Zhu (2013). "Overview of protein microarrays." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 27**: Unit 27 21.
182. T. G. Grobe, S. S., J. Szecsenyi (2016). BARMER GEK Arztreport 2016, BARMER GEK. **37**: 294.
183. Taussig, R. K. S. R. (2002). "Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling." Molecular Interventions **2**(3): 168-184.
184. Taylor, S. S., J. A. Buechler and W. Yonemoto (1990). "cAMP-Dependent Protein Kinase: Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes." Annual Review of Biochemistry **59**(1): 971-1005.
185. Tesmer, J. J. G. and S. R. Sprang (1998). "The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase." Current Opinion in Structural Biology **8**(6): 713-719.
186. ThermoFisherSCIENTIFIC (2015). International Working Group On Antibody Validation Meets To Drive Toward More Effective Biomedical Research. Biospace.
187. Tominaga, M., M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum and D. Julius (1998). "The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli." Neuron **21**(3): 531-543.
188. Tominaga, M. and D. Julius (2000). "Capsaicin Receptor in the Pain Pathway." The Japanese Journal of Pharmacology **83**(1): 20-24.
189. Turnham, R. E. and J. D. Scott (2016). "Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology." Gene **577**(2): 101-108.
190. Uhlen, M., A. Bandrowski, S. Carr, A. Edwards, J. Ellenberg, E. Lundberg, D. L. Rimm, H. Rodriguez, T. Hiltke, M. Snyder and T. Yamamoto (2016). "A proposal for validation of antibodies." Nat Meth advance online publication.
191. Uhler, M. D., J. C. Chrvia and G. S. McKnight (1986). "Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase." Journal of Biological Chemistry **261**(33): 15360-15363.
192. van der Geer, P. and T. Hunter (1994). "Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by electrophoresis and chromatography on thin-layer cellulose plates." ELECTROPHORESIS **15**(1): 544-554.
193. Venegas, L. A., K. Pershad, O. Bankole, N. Shah and B. K. Kay (2016). "A comparison of phosphospecific affinity reagents reveals the utility of recombinant Forkhead-associated domains in recognizing phosphothreonine-containing peptides." New Biotechnology **33**(5, Part A): 537-543.

194. Walsh, D. A., J. P. Perkins and E. G. Krebs (1968). "An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle." Journal of Biological Chemistry **243**(13): 3763-3765.
195. Wang, F., X. Chen, X. Zhang and L. Ma (2008). "Phosphorylation State of μ -Opioid Receptor Determines the Alternative Recycling of Receptor via Rab4 or Rab11 Pathway." Molecular Endocrinology **22**(8): 1881-1892.
196. Wegner, G. J., H. J. Lee and R. M. Corn (2002). "Characterization and Optimization of Peptide Arrays for the Study of Epitope–Antibody Interactions Using Surface Plasmon Resonance Imaging." Analytical Chemistry **74**(20): 5161-5168.
197. Wei, Y., Zhang, B., Li, X., Liu, X., Zhang, J., Lei, B., Li, B., Zhai, R., Chen, Q., Li, Y. (2016). "Upregulation and activation of δ -opioid receptors promotes the progression of human breast cancer." Oncology Reports **36**.
198. Weitzhandler, M. and M. Hardy (1990). "Sensitive blotting assay for the detection of glycopeptides in peptides maps." Journal of Chromatography A **510**: 225-232.
199. Wellhausen, R. and H. Seitz (2012). "Facing Current Quantification Challenges in Protein Microarrays." Journal of Biomedicine and Biotechnology **2012**: 831347.
200. Willoughby, D., M. L. Halls, K. L. Everett, A. Ciruela, P. Skroblin, E. Klussmann and D. M. F. Cooper (2012). "A key phosphorylation site in AC8 mediates regulation of Ca(2+)-dependent cAMP dynamics by an AC8–AKAP79–PKA signalling complex." Journal of Cell Science **125**(23): 5850-5859.
201. Wiśniewski, J. R., N. Nagaraj, A. Zougman, F. Gnäd and M. Mann (2010). "Brain Phosphoproteome Obtained by a FASP-Based Method Reveals Plasma Membrane Protein Topology." Journal of Proteome Research **9**(6): 3280-3289.
202. Wu, D., J. E. Sylvester, L. L. Parker, G. Zhou and S. J. Kron (2010). "Peptide reporters of kinase activity in whole cell lysates." Peptide Science **94**(4): 475-486.
203. Wu, S. H., J. C. Arévalo, F. Sarti, L. Tessarollo, W.-B. Gan and M. V. Chao (2009). "Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning/Kidins220 protein regulates dendritic branching and spine stability in vivo." Developmental Neurobiology **69**(9): 547-557.
204. Yonemoto, W., M. L. McGlone, B. Grant and S. S. Taylor (1997). "Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*." Protein Engineering **10**(8): 915-925.
205. Yousuf, A., E. Miess, S. Sianati, Y.-P. Du, S. Schulz and M. J. Christie (2015). "Role of Phosphorylation Sites in Desensitization of μ -Opioid Receptor." Molecular Pharmacology **88**(4): 825-835.
206. Yu, T., G. Yang, Y. Hou, X. Tang, C. Wu, X. a. Wu, L. Guo, Q. Zhu, H. Luo, Y. e. Du, S. Wen, L. Xu, J. Yin, G. Tu and M. Liu (2016). "Cytoplasmic GPER translocation in cancer-associated fibroblasts mediates cAMP/PKA/CREB/glycolytic axis to confer tumor cells with multidrug resistance." Oncogene.
207. Zhang, H., B. Brankovics, T. A. J. van der Lee, C. Waalwijk, A. A. D. van Diepeningen, J. Xu, J. Xu, W. Chen and J. Feng (2016). "A single-nucleotide-polymorphism-based genotyping assay for simultaneous detection of different carbendazim-resistant genotypes in the *Fusarium graminearum* species complex." PeerJ **4**: e2609.
208. Zhang, X., L. Li and P. A. McNaughton (2008). "Proinflammatory Mediators Modulate the Heat-Activated Ion Channel TRPV1 via the Scaffolding Protein AKAP79/150." Neuron **59**(3): 450-461.
209. Zhou, X. L., Y. Wang, C. J. Zhang, L. N. Yu, J. L. Cao and M. Yan (2015). "PKA is required for the modulation of spinal nociceptive information related to ephrinB–EphB signaling in mice." Neuroscience **284**: 546-554.

210. Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein and M. Snyder (2001). "Global analysis of protein activities using proteome chips." Science **293**(5537): 2101-2105.
211. Zhu, H., J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed and M. Snyder (2000). "Analysis of yeast protein kinases using protein chips." Nat Genet **26**(3): 283-289.
212. Zimmermann, B., J. A. Chiorini, Y. Ma, R. M. Kotin and F. W. Herberg (1999). "PrKX Is a Novel Catalytic Subunit of the cAMP-dependent Protein Kinase Regulated by the Regulatory Subunit Type I." Journal of Biological Chemistry **274**(9): 5370-5378.
213. Zois, C. E. and A. L. Harris (2016). "Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy." Journal of Molecular Medicine **94**(2): 137-154.

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus **G**ründen des **D**atenschutzes nicht enthalten

9 Publikationen

Während der Bearbeitungszeit dieser Doktorarbeit sind 2 „Peer-Reviewed“ Publikationen veröffentlicht worden.

- (i) Schumacher, S., S. Mükusch und H. Seitz (2015). "Up-to-Date Applications of Microarrays and Their Way to Commercialization." Microarrays **4**(2): 196.

- (ii) Morschheuser, L., S. Mükusch, M. Riedner, H. Seitz und S. Rohn (2016). "High-performance thin-layer chromatography as a fast screening tool for phosphorylated peptides." Journal of Chromatography B **1008**: 198-205.

10 Anhang

Im Anhang befinden sich alle in dieser Arbeit verwendeten Peptidsequenzen unter Angabe der Sequenz, Hydrophobizitäten und isoelektrischen Punkte. Alle in dieser Arbeit generierten Rohdaten befinden sich auf der beigelegten DVD. Die Ordner auf der DVD sind nach den Abschnitten der Arbeit benannt, sodass eine Zuordnung zu den entsprechenden Ergebnissen erfolgen kann. Neben den Daten sind auch die 16 bit Mikroarraybilder hinterlegt.

Tabelle 53 Peptide zur Analyse des Einflusses von physiko-chemischen Eigenschaften auf das Spotten

Nr	Peptidsequenz	iP	Hydrophobizität	MW	Lösungsmittel
1	HERMRPRKRQGSVRRRV	12,40	-2,241	2203,26	1xPBS+30%DMSO
2	HQKRREILSRRPSYRKILNDL	11,45	-1,505	2629,46	1xPBS+30%DMSO
3	CxEKLSRGLRYYYYDKNIIHKTA	9,43	-0,919	2714,43	ddH2O
4	CxGLRYYYYDKNIIHKTAGKRYV	9,66	-0,776	2704,43	ddH2O
5	CxYYDKNIIHKTAGKRYVYRFV	9,66	-0,605	2780,46	ddH2O
6	CxDKNIIHKTAGKRYVYRFVCD	9,24	-0,529	2672,37	ddH2O
7	CxIHKTAGKRYVYRFVCDLQSL	9,31	-0,067	2643,38	ddH2O
8	CxYRFVCDLQSLGYPPEELHA	4,65	0,057	2600,24	ddH2O
9	CxVYRFVCDLQSLGYPPEELH	4,65	0,171	2628,27	ddH2O
10	HLIWTSSNIFWHMLVH	7,02	0,519	2021,3	1xPBS
11	CxFVCDLQSLGYPPEELHAML	4,13	0,605	2525,2	ddH2O
12	HTQEDLEYMPGKMPNV	8,61	0,813	1889,1	1xPBS

Tabelle 54 Peptide mit potentiellen Phosphorylierungsstellen für Serin/Threonin Kinasen

Nr	PeptidID	Peptid Sequenz	iP	Hydrophobizität	MW
1	ARMS 1	HMSVLISQSVINYGKPIPPLLGLDST	6,74	0,263	2892,54
2	ARMS 2	HDERNECGQTPLMIAAGKPIPPLLGLDST	4,75	-0,457	3186,58
3	ARMS 3	HALMWACYKGRDVELGKPIPPLLGLDST	6,74	0,000	3393,76
4	ARMS 4	HPPELPEQTTKALPVRGKPIPPLLGLDST	6,76	-0,613	3214,77
5	ARMS 5	HFLFTDYNRLSSVGGETGKPIPPLLGLDST	10,17	-0,916	3344,70
6	ARMS 6	HTRLFRVFKTEDTQGGKKKGPPIPPLLGLDST	10,17	-0,916	3621,02
7	ARMS 7	HTQGKKKWKKTCCCLPSGKPIPPLLGLDST	9,79	-0,820	3274,77
8	ARMS 8	HVLDSLLNSQRKRLHNAAGKPIPPLLGLDST	9,99	-0,438	3473,92
9	ARMS 9	HNAASKLHKLKSEGFMGKPIPPLLGLDST	9,83	-0,555	3327,81
10	ARMS 10	HELMARMAKTIDSFTQNGGKPIPPLLGLDST	6,75	-0,466	3522,80
11	ARMS 11	HKVLQMLDTRVLFVSKGGKPIPPLLGLDST	9,70	0,071	3372,90
12	ARMS 12	HQNLNSVLRDSNINGHGKPIPPLLGLDST	6,92	-0,657	3219,67
13	ARMS 13	HLPVFLNSRGLSNARKFGKPIPPLLGLDST	11,00	-0,187	3357,87
14	ARMS 14	HGLSNARKFLVTSATNGDGKPIPPLLGLDST	8,60	-0,306	3289,74

Nr	PeptidID	Peptid Sequenz	iP	Hydrophobizität	MW
15	ARMS 15	HGIQEDARRVVSQNSLGGKPIPPELLGLDST	5,43	-0,755	3283,69
16	ARMS 16	HNSLGEMTKLGSKTALNGKPIPPELLGLDST	8,51	-0,397	3202,70
17	ARMS 17	HGSKTALNRRDITYRRRQGGKPIPPELLGLDST	11,45	-1,306	3516,91
18	ARMS 18	HQMQRITRQMSFDLTKGKPIPPELLGLDST	9,99	-0,652	3522,84
19	ARMS 19	HVTEDWFSDISPQTMRRGKPIPPELLGLDST	5,43	-0,658	3506,76
20	ARMS 20	HFSDISPQTMRRLLNIGKPIPPELLGLDST	10,84	0,233	3329,79
21	ARMS 21	HLLNIVSVTGRLLRANGKPIPPELLGLDST	10,84	0,223	3177,83
22	ARMS 22	HQISFNWDRLASWINLTGKPIPPELLGLDST	6,75	-0,216	3502,84
23	ARMS 23	HLTEQWPYRTSWLILYGKPIPPELLGLDST	6,75	-0,303	3507,86
24	ARMS 24	HEGIPDQMTLKTIERGKPIPPELLGLDST	5,48	-0,590	3332,74
25	ARMS 25	HTLKTIERISKNIPTGKPIPPELLGLDST	9,53	-0,437	3315,86
26	ARMS 26	HRNFEVFLSSRTPVLVARGKPIPPELLGLDST	10,74	-0,066	3529,95
27	ARMS 27	HPLHEGPPRAPSGYSQPGKPIPPELLGLDST	6,92	-0,842	3228,67
28	ARMS 28	HPRAPSGYSQPPSVCSSGKPIPPELLGLDST	8,21	-0,550	3259,63
29	ARMS 29	HNGPFAGGVVSPQPHSSGKPIPPELLGLDST	6,92	-0,352	3076,57
30	ARMS 30	HFFAPYLYTPRYYPGGGKPIPPELLGLDST	8,39	-0,337	3350,71
31	ARMS 31	HGSQHLSRPSVKTSLPRDQGGKPIPPELLGLDST	9,99	-0,679	3644,98
32	ARMS 32	HDAEGLSSPTDSSRSGPAPGGKPIPPELLGLDST	4,66	-0,617	3454,70
33	ARMS 33	HMLPQYCTTIKANINGKPIPPELLGLDST	9,11	-0,297	3276,74
34	ARMS 34	HVVPEDPRFLSESSSGGKPIPPELLGLDST	4,75	-0,403	3144,61
35	ARMS 35	HAPHGEPARRASHNELPGKPIPPELLGLDST	7,03	-0,903	3277,71
36	ARMS 36	HLPHTELSSQTPYTLNFGKPIPPELLGLDST	5,99	-0,419	3386,75
37	ARMS 37	HGLDEGAPRHSNLSWQGGKPIPPELLGLDST	6,00	-0,750	3205,63
38	ARMS 38	HNLSWQSQRTRTPSLSSLNGKPIPPELLGLDST	10,84	-0,752	3613,90
39	ARMS 39	HDSSIEISKLTDKVQAGKPIPPELLGLDST	5,84	-0,380	3172,70
40	ARMS 40	HGPGSTTISGRSSPHSTYYGKPIPPELLGLDST	8,51	-0,655	3393,70
41	ARMS 41	HNLEQEKGDSEPKPDGKPIPPELLGLDST	4,95	-1,403	3252,66
42	ARMS 42	HEPKPDDGRKSFLMKRGKPIPPELLGLDST	9,52	-1,008	3342,79
43	ARMS 43	HSSGVSTNDASPLDPITGKPIPPELLGLDST	4,41	-0,313	3099,57
44	ARMS 44	HGSKLLPGKKSSERSSLFQTDGKPIPPELLGLDST	9,53	-0,711	3703,99
45	ARMS 45	HSLFQTDLKLKGSGLRYQGKPIPPELLGLDST	9,53	-0,453	3492,91
46	ARMS 46	HTEESDNTPLLKDDGKPIPPELLGLDST	4,23	-0,943	3015,50
47	ARMS 47	HPIRTFIKAKEYLSDALLDGKPIPPELLGLDST	6,76	-0,017	3632,00
48	ARMS 48	HDSSDSGVRSSSESSPNGKPIPPELLGLDST	4,66	-0,907	3049,46
49	ARMS 49	HDSGVRSSSESSPNHSLHNEVGKPIPPELLGLDST	5,76	-0,832	3576,76
50	ARMS 50	HPSECSLIASSPEENWPGKPIPPELLGLDST	4,40	-0,503	3284,60
51	ARMS 51	HQKAYNLNRTPTSTVTLNGKPIPPELLGLDST	9,70	-0,642	3358,80
52	ARMS 52	HFDEMEGIRETSQVILRGKPIPPELLGLDST	4,90	-0,387	3461,80
53	ARMS 53	HETSQVILRPSSSPNPTTIGKPIPPELLGLDST	6,75	-0,406	3465,85
54	ARMS 54	HTIQNENLKSMTHKRSQRGKPIPPELLGLDST	10,28	-1,113	3609,92
55	ARMS 55	HKSMTHKRSQRSSYTRLGKPIPPELLGLDST	11,07	-1,072	3591,91
56	ARMS 56	HSQRSSYTRLSKDPPEGKPIPPELLGLDST	8,50	-1,110	3289,71

Nr	PeptidID	Peptid Sequenz	iP	Hydrophobizität	MW
57	ARMS 57	HSTGFGEERESILGKPIPPELLGLDST	4,83	-0,456	2960,63
58	ARMS 58 rat	HQMQRITRQMSFDLTKGKPIPPELLGLDST	9,99	-0,652	3522,84
59	ARMS 59 rat	HVPHGESARRSSHTELPKPIPPELLGLDST	7,03	-0,794	3298,72
60	ARMS 60 rat	HGSKLLPGKKSSERPSLGKPIPPELLGLDST	10,00	-0,671	3222,81
61	ARMS 61 rat	HYLSDALLDKKDSDSGVRGKPIPPELLGLDST	5,71	-0,579	3507,82
62	ARMS 59a rat	HVPHGESARRASHTELPKPIPPELLGLDST	7,03	-0,710	3287,66
63	ARMS 59b rat	HVPHGESARRSAHTELPKPIPPELLGLDST	7,03	-0,710	3287,60
64	ARMS 60a rat	HGSKLLPGKKASERPSLGKPIPPELLGLDST	10,00	-0,587	3212,74
65	ARMS 60b rat	HGSKLLPGKKSAERPSLGKPIPPELLGLDST	10,00	-0,587	3212,74
66	ARMS 61a rat	HYLSDALLDKKSDASDSGVRGKPIPPELLGLDST	5,41	-0,500	3493,87
67	ARMS 61b rat	HYLSDALLDKKSDASDSGVRGKPIPPELLGLDST	5,41	-0,500	3493,87
68	ARMS T903 rat	HGSKTALNRRDITYRRRQKPIPPELLGLDST	11,45	-1,306	3524,99
69	TRPVI 62	HMKKWSSTD LGGKPIPPELLGLDST	8,51	-0,580	2691,41
70	TRPVI 63	HAAADPLQKDTCPDPLGKPIPPELLGLDST	4,56	-0,440	3093,58
71	TRPVI 64	HNSRPPPAKPQLSTAKSRGKPIPPELLGLDST	11,10	-0,975	3373,86
72	TRPVI 65	HPAKPQLSTAKSRTFLGKPIPPELLGLDST	11,10	-0,574	3339,88
73	TRPVI 66	HTRLFGKGDSEEAFFGKPIPPELLGLDST	5,48	-0,583	3092,59
74	TRPVI 67	HLDSCPTITVSPVITIQGKPIPPELLGLDST	5,21	0,290	3225,73
75	TRPVI 68	HGDGPTGARLLSQDSVAGKPIPPELLGLDST	5,30	-0,323	3082,60
76	TRPVI 69	HQDSVAASTEKTLRLYDRRGKPIPPELLGLDST	8,50	-0,776	3647,94
77	TRPVI 70	HKTLRLYDRRSIFEAVGKPIPPELLGLDST	9,69	-0,387	3405,89
78	TRPVI 71	HLLLFLQKSKKHLTDNGKPIPPELLGLDST	9,53	-0,347	3336,89
79	TRPVI 72	HLTDNEFKDPETGKTCLGKPIPPELLGLDST	4,83	-0,703	3349,69
80	TRPVI 73	HPLLEIARQTDSLKELGKPIPPELLGLDST	5,48	-0,177	3377,89
81	TRPVI 74	HEIARQTDSLKELVNAGKPIPPELLGLDST	5,48	-0,427	3225,74
82	TRPVI 75	HSYTDSYYKGQTALHIAGKPIPPELLGLDST	6,92	-0,477	3356,70
83	TRPVI 76	HSWQTADISARDSVGN TVGKPIPPELLGLDST	5,30	-0,388	3345,70
84	TRPVI 77	HDNTADNTK FVTSMYNEIGKPIPPELLGLDST	4,66	-0,600	3501,71
85	TRPVI 78	HLGAKLHPTLKLEELTGKPIPPELLGLDST	6,92	-0,197	3201,81
86	TRPVI 79	HTLKLEELTNKKGMTPLALAGKPIPPELLGLDST	8,44	-0,209	3610,02
87	TRPVI 80	HEIQEPECRHLSRKFTEWAYGGKPIPPELLGLDST	6,05	-0,834	4018,02
88	TRPVI 81	HSCIDTCEKNSVLEVIGKPIPPELLGLDST	4,75	0,023	3191,62
89	TRPVI 82	HVIAYSSSETPNRHDMGKPIPPELLGLDST	6,00	-0,570	3245,61
90	TRPVI 83	<i>HGIQYFLQRRPSMKT LFGKPIPPELLGLDST</i>	10,28	-0,335	3523,91
91	TRPVI 84	HRAITILDTEKSFLKCMGKPIPPELLGLDST	8,18	-0,039	3407,83
92	TRPVI 85	HSFLKCMRKA FRSGKLLQVGGKPIPPELLGLDST	10,46	-0,132	3708,05

Nr	PeptidID	Peptid Sequenz	iP	Hydrophobizität	MW
93	TRPVI 86	HGKLLQVGYPDGDGKDDGKPIPPELLGLDST	5,36	-0,670	3144,65
94	TRPVI 87	HDPGNCEGVKRTLSFSLRSGKPIPPELLGLDST	8,21	-0,518	3504,81
95	TRPVI 88	HGVKRTLSFSLRSSRVSGRHWKGPPIPPELLGLDST	12,01	-0,608	3983,21
96	TRPVI 89	HFALVPLLREASARDRQSAGKPIPPELLGLDST	8,75	-0,209	3538,94
97	TRPVI 90	HREASARDRQSAQPEEGKPIPPELLGLDST	5,56	-1,253	3268,65
98	TRPVI 91	HYLRQFSGSLKPEDAEGKPIPPELLGLDST	5,48	-0,680	3278,69
99	TRPVI 92	HPEDAIEVFKSPAASGEGKPIPPELLGLDST	4,50	-0,533	3072,54
100	MOR 93	HMYVIVRYTKMKTATNIYGKPIPPELLGLDST	9,70	-0,128	3633,94
101	MOR 94	HPVKALDFRTPRNAKIIIGKPIPPELLGLDST	10,28	-0,159	3491,01
102	MOR 95	<i>HCYGLMILRLKSVRMLSGSGKPIPPELLGLDST</i>	9,78	0,227	3565,93
103	MOR 96	HSKEKDRNLRRITRMVLVVVGKPIPPELLGLDST	10,93	-0,362	3851,20
104	MOR 97	HSNIEQQNSTRIRQNTGKPIPPELLGLDST	8,75	-1,093	3327,73
105	MOR 98	HQQNSTRIRQNTDRHPSGKPIPPELLGLDST	10,74	-1,390	3476,80
106	DOR 99	HLVMFGIVRYTKMKTATNIYGKPIPPELLGLDST	9,82	0,100	3788,05
107	DOR 100	HPVKALDFRTPAKAKLGKPIPPELLGLDST	10,00	-0,297	3193,83
108	DOR 101	HCYGLMLLRLRSVRLLSGKPIPPELLGLDST	10,05	0,300	3431,93
109	DOR 102	HKEKDRSLRRITRMVLVGKPIPPELLGLDST	10,93	-0,555	3539,02
110	ACVIII 103	<i>HGIFISYLSRAQRQAGKPIPPELLGLDST</i>	8,60	-0,297	3263,74
111	ACVIII 104	HQRQAFLETRRCVEARGKPIPPELLGLDST	9,50	-0,703	3401,81
112	ACVIII 105	HSILFADVKGFTNLSTTGKPIPPELLGLDST	6,75	0,110	3252,74
113	ACVIII 106	HMGLSMIKTIRYVRSRGKPIPPELLGLDST	11,00	-0,197	3349,85
114	ACVIII 107	HWDVDIANKLESGGIPGGKPIPPELLGLDST	4,66	-0,287	3209,67
115	ACVIII 108	HPGRIHISKATLDCLNGKPIPPELLGLDST	8,21	-0,217	3176,71
116	ACVIII 109	HSLPEDIVKESVSSSDGKPIPPELLGLDST	4,43	-0,403	3130,60
117	ACVIII 110	HEDIVKESVSSSGKPIPPELLGLDST	4,75	-0,385	2718,41
118	ACVIII 111	HESVSSDRRNSGATFTGKPIPPELLGLDST	6,76	-0,703	3239,62
119	ACVIII 112	HGATFTEGSWSPELFDGKPIPPELLGLDST	4,31	-0,403	3279,61
120	ACVIII 113	HPFDNIVGKQNTLAALTGKPIPPELLGLDST	6,75	-0,126	3240,75
121	ACVIII 114	HNTLAALTRNSINLLPGKPIPPELLGLDST	8,75	-0,027	3149,76
122	ACVIII 115	HKRIEHTIDLRSGDKLRGKPIPPELLGLDST	9,69	-0,826	3475,94
123	ACVIII 116	HKPFSLMFKDSSLEHKGKPIPPELLGLDST	8,45	-0,537	3332,76
124	ACVIII 117	HKDSSLEHKYSQMRDEGKPIPPELLGLDST	6,03	-1,210	3391,68
125	ACVIII 118	HGQQLEYTARLDLWVRVGKPIPPELLGLDST	6,75	-0,368	3533,88
126	ACVIII 119	HSTYMAVSGLSPEKQQCGKPIPPELLGLDST	6,74	-0,384	3267,63

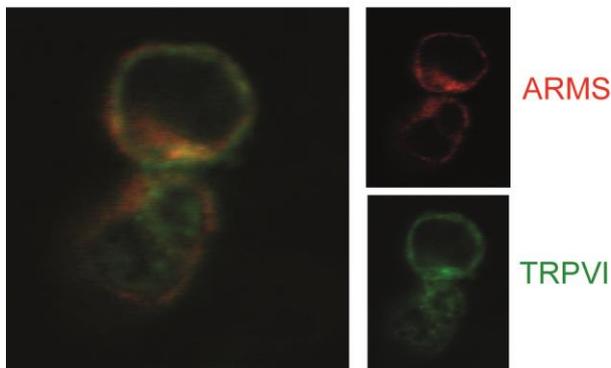
Nr	PeptidID	Peptid Sequenz	iP	Hydrophobizität	MW
127	ACVIII 120	HESIQEINKHSFNNFEGKPIPPELLGLDST	5,36	-0,797	3374,69
128	ACVIII 121	HWGKTVNLASRMDSTGVSGGKPIPPELLGLDST	8,60	-0,324	3404,75
129	ACVIII 122	HRMDSTGVSGRIQVPEGKPIPPELLGLDST	6,76	-0,490	3170,65
130	ACVIII 123	HGISEQEGKIKTYFLLGRGKPIPPELLGLDST	8,44	-0,397	3477,90
131	ACVIII 124	HIKKGHYNRRLLSPSGKPIPPELLGLDST	10,28	-0,463	3293,84
132	ACVIII 125	HGHYNRRLLSPSGTEPGGKPIPPELLGLDST	8,60	-0,800	3380,76
133	ACVIII 126	HPGAQAEGTDKSDLPGKPIPPELLGLDST	4,66	-0,734	3924,49
134	ACV 127	HTHYPAEVSQRQAFQEGKPIPPELLGLDST	6,01	-0,810	3329,68
135	ACV 128	HTRECIQARLHSQRENQGGKPIPPELLGLDST	8,24	-1,029	3507,81
136	ACV 129	HIEAISLVREVTGVNVNGKPIPPELLGLDST	5,45	0,184	3251,79
137	ACV 130	HGERNAYLKEHSIETFLGKPIPPELLGLDST	6,03	-0,561	3445,80
138	ACV 131	HIETFLILRCTQKRKEGKPIPPELLGLDST	9,20	-0,403	3416,90
139	ACV 132	HAMIAKMNRQRTNSIGHNPGKPIPPELLGLDST	11,00	-0,682	3577,87
140	ACV 133	HIDARSIDRLRSEHVRKGGKPIPPELLGLDST	9,97	-0,765	3489,93
141	ACV 134	HVRKFLTFREPDLGKPIPPELLGLDST	6,76	-0,338	3301,82
142	ACV 135	HFREPDLKYSKQVDDGKPIPPELLGLDST	5,55	-1,142	3535,83
143	ACV 136	<i>HLHAQQVESTARLDFLWGKPIPPELLGLDST</i>	6,00	-0,239	3452,82
144	ACV 137	HARLDFLWKLQATEEKEEGKPIPPELLGLDST	5,01	-0,700	3644,92
145	ACV 138	HDRFRQLEKIKTIGSTYGKPIPPELLGLDST	9,52	-0,674	3493,90
146	ACV 139	HLNDSTYDKVGKTHIKAGKPIPPELLGLDST	8,39	-0,655	3328,78
147	ACV 140	HGNTVNVASRMDSTGVPDGKPIPPELLGLDST	5,30	-0,403	3258,63
148	ACV 141	HGAERAAGTSRRRGLRGKPIPPELLGLDST	11,83	-0,827	3152,74
149	ACV 142	HPELEALFRGYTLRLEQAAGKPIPPELLGLDST	5,53	-0,270	3615,94
150	ACV 143	<i>HFVRILTERSQRKAFLQGKPIPPELLGLDST</i>	10,90	-0,355	3530,98
151	ACV 144	HNMRVGLHTGRVLCGVGKPIPPELLGLDST	9,50	0,057	3150,69
152	ACV 145	HEAAGLPGKVHITKTTLAGKPIPPELLGLDST	8,51	-0,081	3245,81
153	ACV 146	HEPGYGHENSFLKTHGKPIPPELLGLDST	7,03	-0,973	3310,68
154	ACV 147	HETFFIVPSHRRKIFPGKPIPPELLGLDST	9,99	-0,267	3412,88
155	ACV 148	HDDKRRALRTASEKLRNGKPIPPELLGLDST	10,26	-1,142	3467,91
156	ACV 149	HRTASEKLRNRSSFSTNVGKPIPPELLGLDST	10,90	-0,787	3491,86
157	ACV 150	HFSTNVVYTTGTRVNGKPIPPELLGLDST	8,60	-0,277	3194,67
158	ACV 151	HISRLLEARQTELEMAGKPIPPELLGLDST	5,53	-0,280	3298,77
159	ACV 152	HMADLNFFTLKYKHVEGKPIPPELLGLDST	6,92	-0,257	3394,77
160	ACV 153	HKDFYKDIEKIKTIGSTYGKPIPPELLGLDST	8,31	-0,634	3587,92
161	ACV 154	HIEKIKTIGSTYMAAVGGKPIPPELLGLDST	8,44	0,074	3220,75
162	ACV 155	HPTSGTKAKKSISSHLGKPIPPELLGLDST	10,00	-0,565	3167,73
163	ACV 156	HTKAKKSISSHLSTLADFGKPIPPELLGLDST	9,53	-0,306	3372,84
164	ACV 157	HGNTVNVASRMDSTGVQGGKPIPPELLGLDST	6,75	-0,366	3231,63

Nr	PeptidID	Peptid Sequenz	iP	Hydrophobizität	MW
165	ACV 160	HYHFVCRGKVSVKGGKPIPPELLGLDST	9,87	-0,337	3203,74
166	ACV 161	HGRTDGNGSQIRSLGLDRGKPIPPELLGLDST	8,75	-0,769	3340,76
167	162	HVCPMPGVSVRAGLPPGKPIPPELLGLDST	8,23	0,160	3018,61
168	163	HSVRAGLPPHSPGQYLPKGKPIPPELLGLDST	8,60	-0,419	3214,73
169	164	HKRELYNGpTADITLRFKGKPIPPELLGLDST	8,50	-0,503	3415,77
170	165	HTIVADQpTPBTRFLKYGKPIPPELLGLDST	8,50	-0,442	3469,80
171	166	HLRLNQPGpTPTRTAYKKGKPIPPELLGLDST	10,45	-0,861	3462,85
172	167	HGSFVNKpTRGWLHKKGKPIPPELLGLDST	10,46	-0,740	3373,78
173	168	HALKDEPQpTVPDVYKKKGKPIPPELLGLDST	8,34	-0,866	3574,88
174	169	HDERNECGQpTPLMIAAGKPIPPELLGLDST	4,75	-0,457	3266,55
175	170	HPPELPEQpTTKALPVRGKPIPPELLGLDST	6,76	-0,613	3294,74
176	171	HVTEDWFSDISPQpTMRRGKPIPPELLGLDST	5,43	-0,658	3586,73
177	172	HLLNIVSVpTGRLLRANGKPIPPELLGLDST	10,84	0,223	3257,80
178	173	HDSSIEISKLpTDKVQAGKPIPPELLGLDST	5,43	-0,380	3252,66
179	174	HQKAYNLNRpTPSTVTLNGKPIPPELLGLDST	9,70	-0,642	3438,77
180	175	HPLLEIARQpTDSLKELGKPIPPELLGLDST	5,48	-0,177	3457,86
181	176	HRAITILDpTEKSFLKCMGKPIPPELLGLDST	8,18	-0,039	3487,80
182	175	HQRQAFLEpTRRCVEARGKPIPPELLGLDST	9,50	-0,703	3481,78
183	176	HPFDNIVGKQpTLAALTGKPIPPELLGLDST	6,75	-0,126	3320,72
184	C1	HQKRREILSRPSYRKILNDLGKPIPPELLGLDST-COOH	11,29	-0,963	4160,30
185	C2	HQKRREILSRPSYRKILNDLGKPIPPELLGLDST-COOH	11,29	-0,963	4080,33
186	C3	HQRREILLRRPAYRKILNDLGKPIPPELLGLST	11,45	-0,579	4090,38

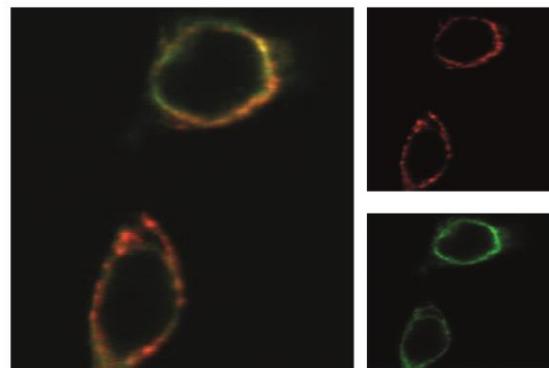
Tabelle 55 Peptide zur Charakterisierung des anti-pPKA Antikörpers

Peptid	Peptid Sequenz
1	HVPHGESARRApSHTELPGKPIPPELLGLDST
2	HGSKLLPGKKApSERPSLGKPIPPELLGLDST
3	HVPHGESARRSpSHTELPGKPIPPELLGLDST
4	HVPHGESARRpSSHTELPGKPIPPELLGLDST
5	HVPHGESARASpSHTELPGKPIPPELLGLDST
6	HVPHGESAARSpSHTELPGKPIPPELLGLDST
7	HGSKLLPGKKpSSERPSLGKPIPPELLGLDST
8	HGSKLLPGKKSspSERPSLGKPIPPELLGLDST
9	HVPHGESARKSpSHTELPGKPIPPELLGLDST
10	HVPHGESAKRSpSHTELPGKPIPPELLGLDST
11	HQKRREILSRPpSYRKILNDLGKPIPPELLGLDST
12	HQKRREILpSRRPpSYRKILNDLGKPIPPELLGLDST

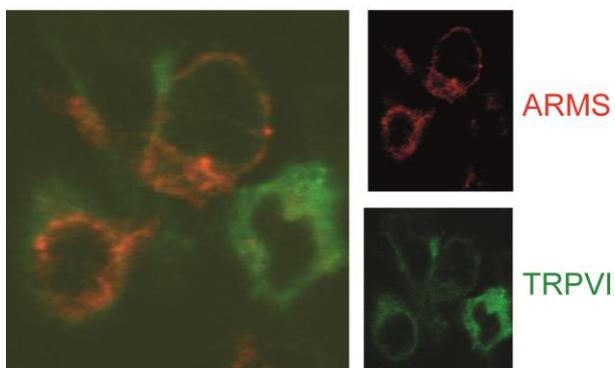
A ARMS S882A,S1439/40A,S1251/52 A



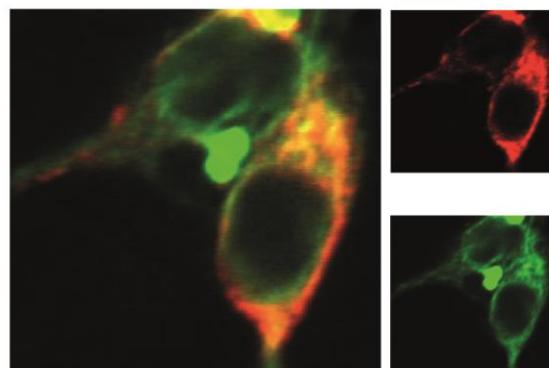
B S882A,T903A,S1439/40A,S1526/27A



C ARMS S1439/40A,S1526/27A,SS1251/52A



D ARMS T903A,S882A,S1251/52A,S1438/40A



E ARMS S1439/40A

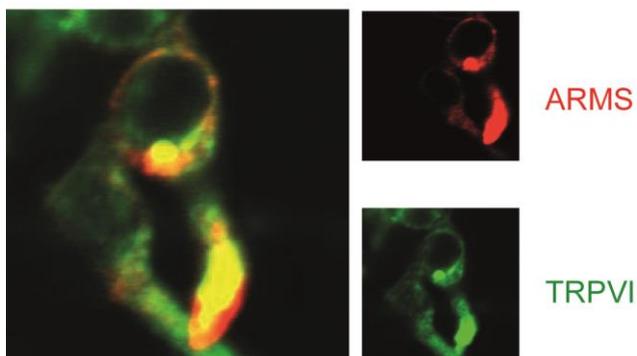


Abbildung 63 Fluoreszenzaufnahmen der Co-Transfektion von ARMS Mutanten und TRPVI-YFP

HEK293 Zellen wurden mit den jeweiligen ARMS Mutanten und dem YFP gelabelten Wildtyp TRPVI transfiziert. Bei den Mutanten sind die jeweils ausgetauschten Aminosäurestellen durch Alanin über der Abbildung benannt. Sowohl ARMS, als auch TRPVI befindet sich in der Zellmembran. Bei keinem der ARMS Konstrukte konnte eine Lokalisation außerhalb der Zellmembran detektiert werden.

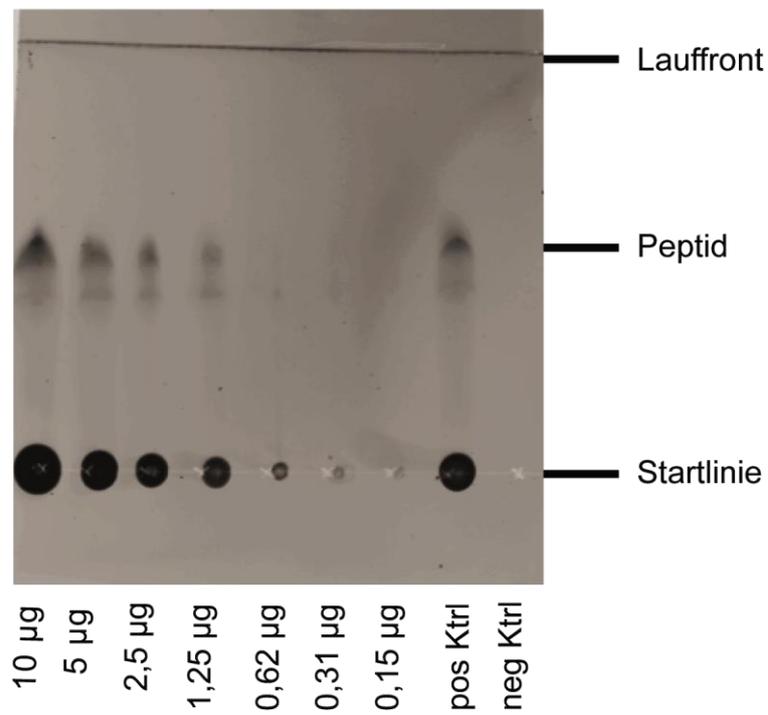


Abbildung 64 DotBlot zur Bestimmung des Detektionslimits von phosphoryliertem Peptid

Aufgetragen sind abnehmende Mengen an phosphoryliertem Peptid (p-Peptid) sowie Kontrollen. Es erfolgte eine HPTLC-IS. Primärantikörper war hierbei der anti-pPKA Antikörper und als Sekundärantikörper wurde der anti-rabbit, IgG Alexa Fluor 555 verwendet. Bis 1,25 µg phosphoryliertes Peptid waren detektierbar. Bei geringeren Mengen sind nur noch die Auftragspunkte auf der Startlinie nachweisbar.