

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Ein HTS-Phosphorylierungs-Assay mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie

¹Steffen Hadamovsky, ²Oliver Birkert, ²Günter Gauglitz, ¹Gerald Birk

¹ Boehringer Ingelheim Pharma KG, Abt. Leitstrukturfindung, 88397 Biberach an der Riss

² Institut für Physikalische und Theoretischen Chemie, Auf der Morgenstelle 8, 72074 Tübingen

Tel. 07351-5497890

steffen.hadamovsky@bc.boehringer-ingelheim.com <http://www.boehringer-ingelheim.com/>

Registriernummer der Online-Anmeldung: 139

Vortrag

Die Phosphorylierung ist ein übliches Verfahren zur Charakterisierung von Kinasen und geeigneten Substraten[1,2]. Für die pharmazeutische Industrie sind neue Verbindungen von Interesse, die in der Lage sind, die Phosphorylierungsaktivität solcher Kinasen zu hemmen. Das Hochdurchsatzscreening hilft bei der Suche nach solchen Inhibitoren. Mit herkömmlichen Methoden wird die Menge des phosphorylierten Proteins bei einer Aktivitätsstudie durch den Einbau von radioaktivem Phosphor bestimmt. Anhand des Ausmaßes der Phosphorylierung kann auf die inhibierende Wirkung der untersuchten Substanzen geschlossen werden. Der Nachweis der Phosphorylierung mit einer markierungsfreien Methode wie der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIfS) bedeuten den angestrebten Verzicht auf den Umgang mit radioaktiven Isotopen und machen die Markierung als zusätzlichen Arbeits- und Kostenpunkt überflüssig.

Die Reflektometrische Interferenzspektroskopie stellt eine neuartige Methode zur markierungsfreien Messung von Interaktionen zwischen ausreichend großen Reaktionspartnern dar[3]. Mit Ihrer Hilfe kann die spezifische Bindung an eine Sensoroberfläche über den Zuwachs der optischen Schichtdickenänderung ausreichend schnell, reproduzierbar und zuverlässig untersucht werden. Dabei besteht mit Hilfe des hier verwendeten Prototyps die Möglichkeit, in einer Mikrotiterplatte 96 Wells simultan zu vermessen und somit ein Screening von Substanzbibliotheken durchzuführen[4,a].

Bei der Entwicklung des Assays musste auf die Anforderungen von markierungsfreien Detektionsmethoden Rücksicht genommen werden. Die Menge an phosphoryliertem Substrat wurde mit Hilfe eines Antikörpers, der zwischen phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form unterscheiden kann, bestimmt. Sind die Bindungsstellen des Antikörpers durch das phosphorylierte Substrat belegt, so kann dieser nicht mehr spezifisch mit der Sensoroberfläche wechselwirken. Damit

gibt das Sensorsignal direkt Auskunft über die Menge an phosphoryliertem Substrat. Mit diesem System können somit neue Inhibitoren identifiziert werden.

Die einzelnen Bestandteile des Assays sollten – bedingt durch die Detektionsmethode – keine oder höchstens geringe unspezifische Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche aufweisen. Unterschiedliche Kinasen und Substrate die dazu geeignet sind wurden untersucht. Als Substrate haben sich langkettige synthetische Substrate sowie kurzkettige und sehr kleine Substrate als besonders geeignet erwiesen. Als Kinase wurde der Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) verwendet. Mit ihm konnte die Detektion der Phosphorylierung und deren Inhibition mit der RfS-Technologie gezeigt werden.

Die Phosphorylierung des Substrates Polyaminosäure Poly-(Glu,Tyr) 4:1 durch die EGF-R-Kinase stellt ein universelles Target dar und zeigt die Möglichkeit des Einsatzes der RfS-Technologie im Screening auf. Aufgrund der indirekten Messung der Phosphorylierung kann diese auch mit sehr kleinen und preisgünstigen Substraten nachgewiesen werden, was bisher im Screening kaum durchführbar war. Kinasen, Substrate, Antikörper und Hilfsstoffe können bei diesem universellen Assaysystem vielfältig ausgetauscht oder verändert werden.

Literatur

- [1] Hardie, G., Hanks, S. (1995) *Protein Kinase Facts Book (Two-Volume Set)*, Academic Press Inc; ISBN:0123247195.
- [2] Deshpande, S.S., Mineyev, I., Owicki, J.C. (1999) A robust, versatile tyrosine kinase assay for HTS in Drug Discovery, SPIE Conference on Advanced Assay Technologies for Drug Discovery. SPIE Vol. 3603.
- [3] Schmitt, H-M., Brecht, A., Piehler, J., Gauglitz, G. (1997) *Biosensors Bioelectronics* **12**, 809-816.
- [4] Rothmund, M., Schütz, A., Brecht, A., Gauglitz, G., Berthel, G., Gräfe, D. (1997) *Fresenius J. Anal. Chem.*, **359**, 15ff

- [a] <http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/projects/librarian/>