

BestMasters

Emilia Schax

# Protein- Microarrays für die Wirkstoffentwicklung

Herstellung und Charakterisierung  
eines bakteriellen Hitzeschockproteins



Springer Spektrum

---

# BestMasters

Mit „BestMasters“ zeichnet Springer die besten Masterarbeiten aus, die an renommierten Hochschulen in Deutschland, Österreich und der Schweiz entstanden sind. Die mit Höchstnote ausgezeichneten Arbeiten wurden durch Gutachter zur Veröffentlichung empfohlen und behandeln aktuelle Themen aus unterschiedlichen Fachgebieten der Naturwissenschaften, Psychologie, Technik und Wirtschaftswissenschaften.

Die Reihe wendet sich an Praktiker und Wissenschaftler gleichermaßen und soll insbesondere auch Nachwuchswissenschaftlern Orientierung geben.

---

Emilia Schax

# Protein-Microarrays für die Wirkstoffentwicklung

Herstellung und  
Charakterisierung eines  
bakteriellen Hitzeschockproteins

 Springer Spektrum

Emilia Schax  
Hannover, Deutschland

Zugl.: Masterarbeit Leibniz Universität Hannover 2012

BestMasters

ISBN 978-3-658-08802-6

ISBN 978-3-658-08803-3 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-658-08803-3

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer Fachmedien Wiesbaden 2015

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer Fachmedien Wiesbaden ist Teil der Fachverlagsgruppe Springer Science+Business Media ([www.springer.com](http://www.springer.com))

## Geleitwort

Die Protein-Mikroarraytechnologie kann bisher nicht den wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Erfolg aufweisen wie die DNA-Arraytechnologie. Dies liegt auch daran, dass die Anwendungsfelder komplex und teilweise noch nicht verstanden sind und bisherige Verfahren nicht einfach zu ersetzen sind. Beim Hochdurchsatzwirkstoffscreening, der Hochdurchsatzsondierung bis hin zur Diagnostik kann diese Technik dennoch robuste und wirtschaftlich interessante Möglichkeiten liefern.

Dabei spielt letztendlich die Entwicklung und Umsetzung des Konzeptes der Miniaturisierung von Testverfahren eine wesentliche Rolle. Dieser Ansatz wurde von Frau Schax exzellent umgesetzt. Hier wurden Proteine, sogenannte Targets, die in der Krebstherapie wichtig sind und dabei eine Schlüsselrolle einnehmen, stabil auf Arrayoberflächen etabliert, um daran Wirkstoffe zu testen. Aufgrund des hohen Miniaturisierungsgrades können Tests kostengünstig durchgeführt werden und auf einer kleinen Fläche kann eine Vielzahl von Proben parallel untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt ist, relevante funktionsfähige Proteine direkt zu verwenden, was gerade beim Wirkstoffscreening von erheblichem Vorteil ist. Erste vielversprechende Tests haben ergeben, dass sich daraus eine ungeahnte Bandbreite von Anwendungen erschließen lässt welche dazu dienen können, neue Wirkstoffe aufzuspüren. Die besten Wirkstoffe werden über das Testsystem herausgefiltert und lassen sich gegen unterschiedliche Targets screenen. So wurden aus einer prädiktiv evaluierten Bibliothek nicht nur geeignete Wirkstoffe gegen Krebs gescreent, sondern auch – je nach eingesetztem Target – Möglichkeiten zur Antibiotikasuche etabliert. Die Target-orientierte Wirkstoffsuche in der Arbeit von Frau Schax liefert damit wertvolle Kandidaten und somit erste Hinweise, um Wirkstoffe gegen Krebs und pathogene Mikroorganismen zu entwickeln. Die ermittelten Daten konnten mit einem hohen Z-Wert belegt werden, der die Genauigkeit des Verfahrens widerspiegelt. Die Arbeit hat insofern einen besonderen Stellenwert, als die flexible Kombination unterschiedlicher Verfahren semisynthetischer und biosynthetischer Chemie

in Verbindung mit biophysikalischer und biotechnologischer Expertise zu einem Gesamtkonzept entwickelt wurde. Dies führte zu einer neuen Methode, die mittlerweile vom Screening bis hin zur Diagnostik über hierarchische Clusteranalyse reicht.

Die Autorin hat mit Ihrer Arbeit und dem tiefen Verständnis für die Komplexität des Themas einen sehr wichtigen Beitrag für die Entwicklung und Anwendbarkeit eines neuartigen Testverfahrens gezeigt und damit erfolgreich interdisziplinäres Forschen dokumentiert.

Prof. Dr. Thomas Scheper; PD Dr. Carsten Zeilinger

## Vorwort

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper herzlich bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, die Masterarbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Die vergangenden Monate waren für mich eine sehr lehrreiche Zeit und ermöglichten mir in einem sehr interessanten Gebiet der Life Sciences zu arbeiten.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Johanna Walter, die mich ausgezeichnet betreute. Sie war immer mein erster Ansprechpartner, wenn ich Hilfe benötigte oder Ergebnisse diskutieren wollte. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Carsten Zeilinger möchte ich mich einerseits für die Übernahme des Koreferats bedanken und andererseits für die intensive Betreuung gerade am Anfang der Arbeit. Dank ihm durfte ich neue Techniken der Molekularbiologie und der Bioinformatik erlernen und mein vorhandenes Wissen vertiefen. Desweiteren bedanke ich mich bei ihm für das zur Verfügung stellen des humanen Hsp90 $\alpha$  Proteins.

Herr Dr. Frank Stahl stand mir während der Masterarbeit und des gesamten Studiums immer zur Seite. Vielen Dank für die hilfreichen Gespräche. Bei Herrn Martin Pähler möchte ich mich für seine unverzichtbare Hilfsbereitschaft in allen Belangen des Institutsalltags bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Andreas Kirschning, Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover, der mir potentielle Inhibitoren für die Hitzeschockproteine zur Verfügung stellte.

Lieber Arbeitskreis, ihr seid eine tolle Gruppe und ich habe die Zeit mit euch sehr genossen. Meinen Kommilitonen des Life Science Studiengangs danke ich für die unzähligen Gespräche, für die schöne Zeit während des Studiums und für das gegenseitige Aufmuntern, wenn es mal nicht so gut lief.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums.

Emilia Schax

# Inhaltsverzeichnis

Geleitwort.....	V
Vorwort .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	XI
Tabellenverzeichnis .....	XIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XV
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Zielsetzung.....	2
<b>2 Theorie.....</b>	<b>5</b>
2.1 Hitzeschockproteine .....	5
2.1.1 Evolution der Hitzeschockproteine.....	6
2.1.2 Genregulation und Genexpression der Hitzeschockproteine .....	9
2.1.3 Aufbau der Hitzeschockproteine .....	12
2.1.4 Funktion der Hitzeschockproteine .....	14
2.2 <i>Helicobacter pylori</i> und sein Hitzeschockprotein HtpG .....	17
2.3 Hitzeschockproteine als Target zur Krankheitsbekämpfung.....	19
<b>3 Praktischer Teil .....</b>	<b>25</b>
3.1 Produktion des Hitzeschockproteins HtpG aus <i>H. pylori</i> .....	25
3.1.1 Bioinformatische Vorarbeiten.....	26
3.1.2 Interaktion von HtpG mit anderen Proteinen.....	31
3.1.3 Klonierungsarbeiten mit HtpG.....	32
3.1.4 Expression und Aufreinigung von HtpG .....	38
3.1.5 Zusammenfassung und Diskussion.....	41
3.2 Direkt-kompetitiver Verdrängungsassay im Protein-Microarray Format .....	42
3.2.1 Entwicklung des direkt-kompetitiven Verdrängungsassays .....	43
3.2.2 Screening von Inhibitoren.....	48
3.2.3 Zusammenfassung und Diskussion.....	62

---

<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>65</b>
<b>5</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>69</b>
5.1	Verbrauchsmaterialien.....	69
5.2	Geräte .....	69
5.3	Reagenzien .....	70
5.4	Reaktionskits .....	71
5.5	DNA, Enzyme, Marker, Antikörper .....	72
5.6	Softwaretools .....	72
5.7	Lösungen und Puffer .....	73
5.8	Inhibitoren .....	75
5.9	Polymerase-Kettenreaktion.....	76
5.10	Agarosegelelektrophorese .....	77
5.11	Zusammensetzungen der Nährmedien.....	78
5.12	Ligation.....	78
5.13	Transformation .....	78
5.14	Restriktionsenzymverdau .....	79
5.15	Kultivierung.....	79
5.16	Zellaufschluss und Proteinaufreinigung .....	79
5.17	Dialyse und Entfernung des SUMO Fusionsproteins .....	80
5.18	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	80
5.19	Kolloidale Coomassie-Färbung .....	81
5.20	Semi-dry Western Blot .....	81
5.21	Direkt-kompetitiver Verdrängungsassay .....	82
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>89</b>