

## Schneller zum Erfolg bei *in vitro* Kinase Assays

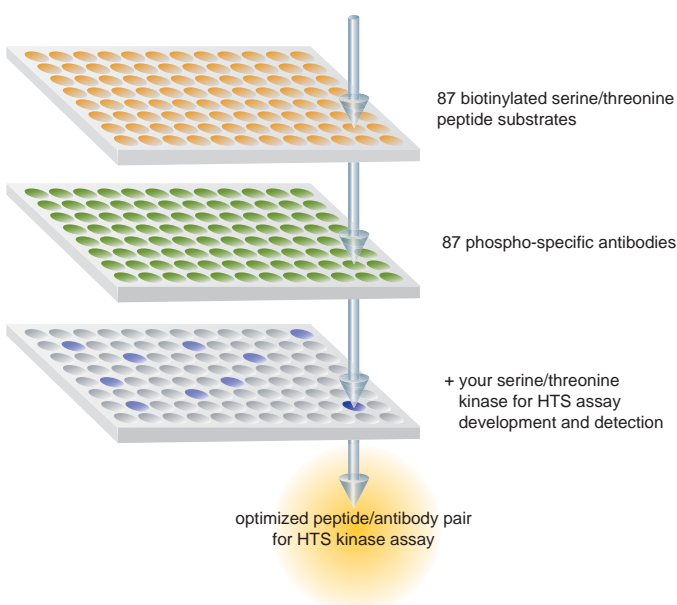
*Salvatore V. Russello, Kelly Rourke, Christopher Salvatore, Christopher Bunker,*  
*Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA*

► Kinasen sind die essentiellen Kontrollpunkte in nahezu allen Bereichen der Zellphysiologie. Durch Proteinphosphorylierungen haben sie maßgeblichen Anteil an der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle und ermöglichen letztendlich die Reaktion auf diverse äußere Stimuli oder physiologische bzw. energetische Zustände der Zelle.

Diese wichtige Rolle der Kinasen in der zellulären Kontrolle wird deutlich durch die Vielzahl von bekannten Krankheiten, die durch deregulierte Kinase-Aktivitäten ausgelöst werden. Das menschliche Genom umfasst 518 putative Serin/Threonin bzw. Tyrosin-Kinasogene, darunter auch optimale Kandidaten für einen zielgerichteten therapeutischen Eingriff. Die pharmazeutische Forschung sucht daher mit Nachdruck in Hochdurchsatzverfahren (High Throughput Screening) nach

therapeutischen Angriffspunkten für bereits bekannte oder bislang unbekannte neue Wirkstoffe.

Besonders kritisch für die erfolgreiche Wirkstoffsuche im HTS-Format ist die schnelle Entwicklung eines *in vitro* Peptid-Kinase-Tests. Diese Kinase-Tests, die mit Hilfe von klassischen ELISA's oder neuen Technologien wie LANCE<sup>®</sup>, HTRF<sup>®</sup> oder Alphascreen<sup>®</sup> detektiert werden können, haben bereits zur Entdeckung neuer Kinase-Substrat-Konsensussequenzen geführt. Die empirische Entwicklung von Kinase-Assays ist jedoch äußerst arbeitsintensiv, langwierig und kostspielig. Nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass für jede der oben genannten Plattformen eigens optimierte Reagenzien, d.h. geeignete Antikörper und Peptide, gefunden werden müssen, die die *in vitro*-Peptid-



**Abb. 1: Prinzip des Kinase Substrate Screening Kits**

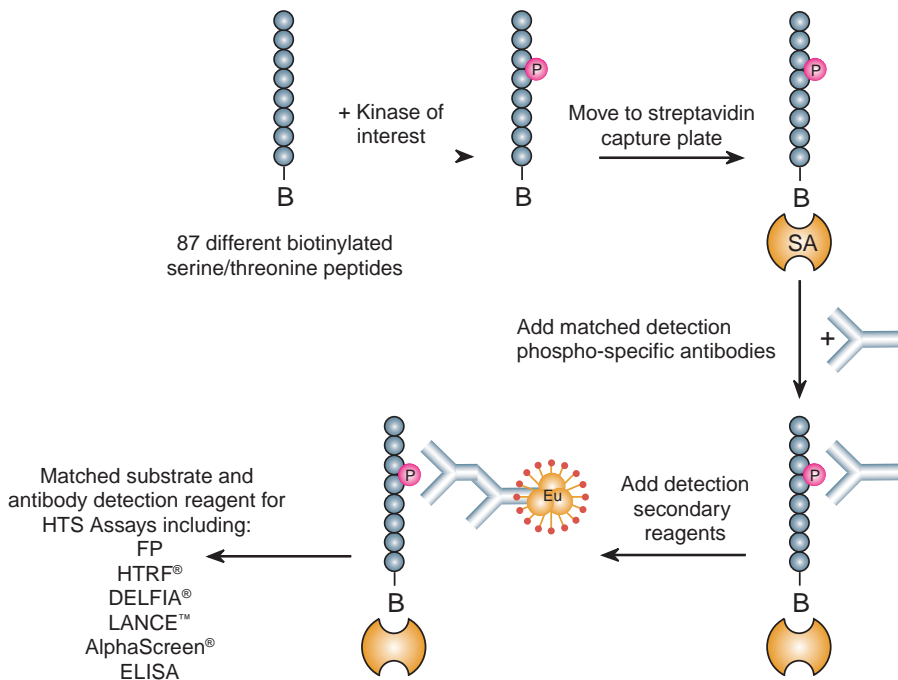


Abb. 2. Schema: Versuchsaufbau des Kinase Substrate Screening Kits

Phosphorylierungen reproduzierbar und genau detektieren können.

Zur Lösung dieses Problems hat Cell Signaling Technology, Hersteller von Aktivierungszustand-spezifischen Antikörpern, einen effizienten Test entwickelt. Dieser Test erlaubt die Identifikation neuer *in vitro* Substrate bekannter oder unbekannter Ser/Thr Kinasen und liefert gleichzeitig ohne zusätzlichen Aufwand den optimalen korrespondierenden phosphospezifischen Antikörper.

Das Kinase Substrate Screening Kit enthält 87 biotinierte Peptidsubstrate für *in vitro* Kinasierungen im 96-well Format. Nach Kinasierung werden die biotinierten Peptide auf einer mitgelieferten Streptavidin-beschichteten 96-well Platte gebunden und die Phosphorylierung mit Hilfe von 87 korrespondierenden phosphospezifischen Antikörpern ausgewertet (Abb. 1). Zur Kontrolle der Resultate und zur Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses enthält das Kit entsprechende Kontroll-Peptide. Jeder Antikörper liegt in bereits optimierten gebrauchsfertigen Formulierungen vor. Das Kinase Screening Kit ermöglicht typischerweise Signal-

Rausch-Verhältnisse von 1:10 bis über 1:1000 (DELFI<sup>®</sup>). Alle mitgelieferten Peptidsequenzen des Arrays stammen aus biologischen/physiologischen Systemen und weisen keine homologen Bereiche auf, um so ein möglichst breites Spektrum anzubieten.

Im Folgenden präsentieren wir einen Teil der Ergebnisse des Kinase Screening Kits von CST mit der Proteinkinase Akt 1 in einem DELFI<sup>®</sup> Ansatz. Die Experimente zeigen, dass unter Verwendung des Kits für eine beliebige Kinase bekannte Substrate verifiziert und neue unbekannte *in vitro* Kinase-Substrate gefunden werden.

**Methodik**

Die Kinase Reaktionen wurden im 96-well Format nach der dem Kit (Cell Signaling Technology #7400) beiliegenden Vorschrift mit 2,5 Units Akt 1 (Cell Signaling Technology, #9274) durchgeführt (Abb. 2). Biotinierte Nonphospho-Peptide als Kinase-Substrate sowie entsprechende Phospho- und Nonphospho-Peptide mit identischer Sequenz als Positiv- und Negativ-Kontrollen stammen ebenfalls aus dem Kit.

den auf die Streptavidin-konjugierte 96-well Bindeplatte übertragen und gewaschen. Die Detektion der Peptidphosphorylierungen wurden mit je 100 µl der dem Kit beiliegenden fertig verdünnten phospho-spezifischen Antikörpern durchgeführt (1h bei RT), gewaschen und anschließend mit Europium markierten anti-rabbit und anti-mouse sekundären Antikörpern verschiedener Anbieter (1:1000 bzw. 1:100 für 30 min bei RT) markiert. Nach weiterem Waschen wurde DELFI<sup>®</sup>-Enhancement-Solution hinzugegeben (5 min RT) und mit einem Time-resolved Reader ausgewertet (Alle Werte im Ergebnisteil beziehen sich auf 5 pmol Streptavidin-gebundener Peptide.)

**Ergebnisse**

Ein typisches Ergebnis mit Akt 1 als Test-Kinase zeigt die Abbildung 3.

Akt1 phosphorylierte mehrere Peptidsequenzen des Assays, nicht nur die ebenfalls detektierte Akt1 Substrat Konsensus-Sequenz (RxRxxS\*) in den Positiv-Kontrollen (gelb). Mit dem Kit wurde experimentell bestätigt, dass Akt 1 daneben auch die bereits gut charakterisierten *in vitro* Substrate eNOS am Ser1177 und GSK-3alpha/beta

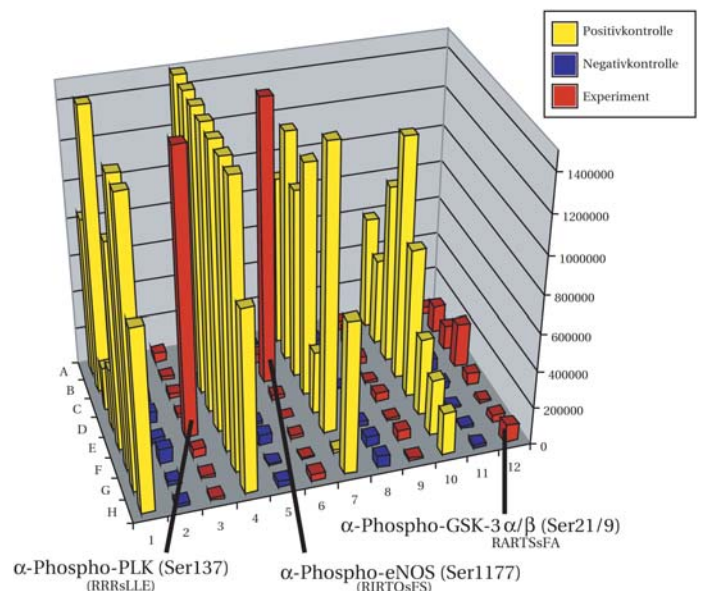


Abb. 3: Experimentelle Daten im Kinase Substrate Screening Kit mit Akt1-Kinase

am Ser 21/9 phosphoryliert. Bisher unbekannt war, dass Akt 1 auch PLK am Ser 137 *in vitro* phosphorylierte. Das PLK korrespondierende Peptid (RRRS\* LLEE ) besitzt eine partielle Akt-Konsensussequenz (RxxS\*), deren Phosphorylierung in diesem Assay signifikant und reproduzierbar mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 1:64 gemessen wurde. Nicht gezeigt sind die Daten für die Parallel-Experimente mit Erk2 und CKII, die bei Interesse gerne bei den Autoren angefordert werden können.

### **Fazit**

Mit dem neuen Kinase Assay Screening Kit von Cell Signaling Technology steht dem Anwender erstmals ein Kit-basierendes System zur Verfügung, das die Etablierung eines geeigneten *in vitro* Kinase-Assays erheblich erleichtert und beschleunigt. Es ist ideal für DELFIA<sup>®</sup>, LANCE<sup>®</sup>, HTRF<sup>®</sup> oder Alphascreen<sup>®</sup> Anwendungen, aber ebenso gut für Charakterisierungen im kleinen Maßstab in klassischen ELISA-Tests geeignet.

Das Kinase Substrate Screening Kit bietet die Möglichkeit, schnell und kostengünstig für eine beliebige zu untersuchende Kinase entsprechende *in vitro* Substrate zu detektieren. Zeitgleich erhält man einen geeigneten korrespondierenden Antikörper für das entsprechende Peptid-Substrat.

Für nachfolgende Experimente im HTS-Format steht dem Anwender die Möglichkeit offen, die mit Hilfe des Kits ermittelten Peptide und Antikörper separat in HTS-tauglichen Formulierungen (PBS-gepuffert und Carrier-frei) und bedarfsdeckenden Großpackungen vom gleichen Hersteller (Cell Signaling Technology) zu beziehen.

### **Korrespondenzadresse:**

**New England Biolabs GmbH**  
**Dr. Carsten Lanwert**  
**Brüningstr. 50, Geb. G810**  
**D-65926 Frankfurt /Main**