

Markierungsfreie „Microscale Thermophoresis“ zur Bestimmung von Bindestellen und Affinitäten bei Protein-Liganden-Wechselwirkungen**

Susanne A. I. Seidel, Christoph J. Wienken, Sandra Geissler, Moran Jerabek-Willemsen, Stefan Duhr, Alwin Reiter, Dirk Trauner, Dieter Braun und Philipp Baaske*

Die Untersuchung der Bindung von Proteinen an niedermolekulare Substanzen, Nukleinsäuren und Ionen gibt nicht nur grundlegende Einblicke in zelluläre Prozesse, sondern ebnet auch den Weg zu verbesserter Krankheitsdiagnose und -behandlung. Wir stellen hier eine neuartige, markierungs- und vorbereitungsfreie Methode zur Quantifizierung biomolekularer Wechselwirkungen vor, bei der zusätzliche Informationen über den Bindungsvorgang gewonnen werden können. Die Technik basiert auf der vor kurzem entwickelten „Microscale thermophoresis“ (MST).

Viele Verfahren zur Untersuchung der Biomolekülbindung setzen eine fluoreszierende oder radioaktive Markierung voraus.^[1] Andere Methoden wie etwa die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) oder die Quarzkristallmikrowaage (QCM) beruhen auf Oberflächenimmobilisierung.^[2] Diese Markierung oder Oberflächenimmobilisierung können den Bindungsvorgang beeinflussen oder sogar verhindern.^[3] Verknüpfungsreaktionen und anschließend erforderliche Aufreinigungsschritte sind zudem zeitaufwändig und für einige Biomoleküle schwer optimierbar. Dies trifft besonders auf Proteinpräparationen zu, die typischerweise eine geringe Ausbeute haben oder schwer löslich sind, wie etwa Trans-

membranrezeptorsysteme. Eine vor kurzem entwickelte lösungsbasierte, markierungsfreie Methode ist die kinetische Kapillarelektrophorese mit Massenspektrometrie (KCE-MS), die lediglich voraussetzt, dass die Bindungspartner elektrophoretisch trennbar sind.^[4] Eine weitere Methode ist die Rückstreuinterferometrie („back-scattering interferometry“, BSI) die nur eingesetzt werden kann, wenn bei der Bindung eine messbare Veränderung des Brechungsindex auftritt; diese Methode weist eine bemerkenswerte Empfindlichkeit für hochaffine Wechselwirkungen auf.^[5] Die meisten wirklich markierungsfreien Wechselwirkungsstudien wurden bis dato mit isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) durchgeführt. ITC macht die thermodynamischen Parameter eines Bindungsereignisses direkt zugänglich, verbraucht aber beträchtliche Proteinmengen, um ein messbares Signal zu liefern.^[6]

MST ist dagegen durch einen geringen Probenverbrauch gekennzeichnet. Wie der Name schon sagt, basiert MST auf Thermophorese, der gerichteten Bewegung von Partikeln entlang eines Temperaturgradienten.^[8,9] Ein räumlicher Temperaturunterschied ΔT führt zu einer Depletion der solvatisierten Biomoleküle im Bereich der höheren Temperatur, die durch den Soret-Koeffizienten S_T quantifiziert ist:

$$c_{\text{heiß}}/c_{\text{kalt}} = \exp(-S_T \Delta T).$$

Diese thermophoretische Depletion hängt von der Grenzfläche zwischen Molekül und Lösungsmittel ab.^[9] Unter konstanten Pufferbedingungen gibt die Thermophorese Auskunft über Größe, Ladung und Lösungsentropie der Moleküle. Aufgrund bindungsinduzierter Änderungen der genannten Parameter weicht die Thermophorese eines Proteins in der Regel signifikant von der Thermophorese eines Protein-Liganden-Komplexes ab.^[10,11] Selbst wenn sich Größe oder Ladung beim Bindungsvorgang nicht signifikant verändern, kann durch MST die bindungsinduzierte Änderung der Lösungsentropie detektiert werden. Die Bindung von Glutamat an einen ionotropen Glutamatrezeptor (iGluR) etwa bewirkt eine Konformationsänderung, die mithilfe von MST beobachtet werden kann. Die Bindung führt dazu, dass die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Proteins zuklappt, was die Aktivierung des Rezeptors zur Folge hat (Abbildung 1B).^[12,13]

Der MST-Messaufbau besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop, in dessen Strahlengang ein 1480-nm-Infrarotlaser eingekoppelt wird (Abbildung 1A). Der Laserstrahl wird in Kapillaren fokussiert, welche die Probe enthalten, um dort einen mikroskopischen Temperaturgradienten zu erzeugen. Bisher wurde die thermophoretische Bewegung mithilfe einer

[*] S. Geissler, Dr. M. Jerabek-Willemsen, Dr. S. Duhr, Dr. P. Baaske NanoTemper Technologies GmbH
Flößergasse 4, 81369 München (Deutschland)
E-Mail: philipp.baaske@nanotemper.de
Homepage: <http://www.nanotemper.de>

S. A. I. Seidel, Dr. C. J. Wienken, Prof. D. Braun
Systems Biophysics and Functional Nanosystems
Ludwig-Maximilians-Universität München
Amalienstraße 54, 80799 München (Deutschland)

A. Reiter, Prof. D. Trauner
Department Chemie und Biochemie und Center of Integrated Protein Science, Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, Haus F, 81377 München (Deutschland)

[**] Wir danken der Nanosystems Initiative Munich (NIM) und dem Zentralen Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) für finanzielle Unterstützung. Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, das Center for NanoScience (CeNS), das Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM), einen Einzelantrag der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und die DFG-Forschergruppe 1279 („Protein Switches as Optogenetic Tools“) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204268> zu finden.

Die Wiederverwertung dieses Beitrags ist gestattet in Übereinstimmung mit den Geschäftsbedingungen, die unter <http://angewandte.de/open> aufgeführt sind.

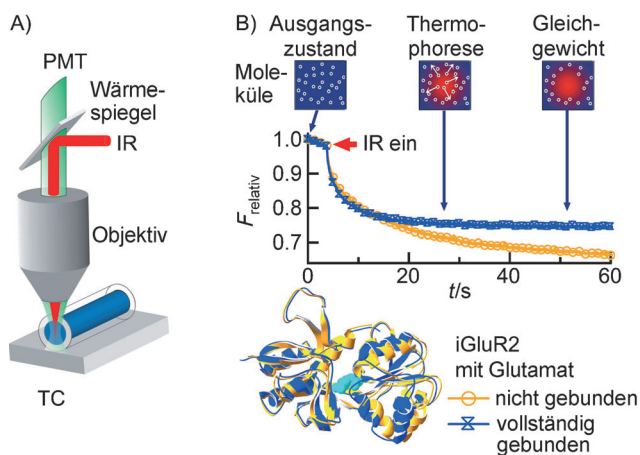


Abbildung 1. Markierungsfreie MST. A) Die Proteinprobe mit intrinsischer Tryptophanfluoreszenz befindet sich in einer Kapillare, deren Grundtemperatur mit einem Peltier-Element (TC) geregelt wird. Die Fluoreszenz wird mit einer UV-Leuchtdiode angeregt und mit einem Photoelektronenvervielfacher (PMT) detektiert. Die Lösung in der Kapillare wird lokal mit einem IR-Laser erhitzt, der über einen Wärme-Spiegel in den Strahlengang eingekoppelt wird. B) Die normalisierte Fluoreszenz des erwärmten Bereichs ist gegen die Zeit aufgetragen. Nach dem Einschalten des IR-Lasers bei $t=5$ s sinkt die Fluoreszenz aufgrund der Temperaturerhöhung, und die fluoreszierenden Proteine bewegen sich durch Thermophorese vom erwärmten Bereich weg. Die ungebundene iGluR2-Ligandenbindungsdomäne (gelb; PDB-Nummer 1FTO) zeigt eine stärkere thermophoretische Depletion als der Komplex mit Glutamat (blau; PDB-Nummer 1FTJ).^[7] Dies spiegelt die bindingsinduzierte Konformationsänderung des Proteins wider.

Fluoreszenzmarkierung erfasst, die an einem der Bindungspartner angebracht wurde (Standard-MST). Um den Markierungsvorgang zu vermeiden, schlagen wir nun vor, die intrinsische Proteinfluoreszenz zu nutzen. Diese ist hauptsächlich auf die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Trp) zurückzuführen, wobei das Tryptophan-Signal die Fluoreszenz dominiert. Zur Fluoreszenzanregung wird eine UV-Leuchtdiode, zur Fluoreszenzaufzeichnung ein Photoelektronenvervielfacher (PMT) benutzt. Speziell im Bereich kleiner Wellenlängen um 350 nm, der bei der markierungsfreien MST verwendet wird, sind PMTs im Einzelphotonzählbetrieb um ein Vielfaches empfindlicher als die bei der Standard-MST eingesetzten CCD-Kameras.

Beispielhafte Aufnahmen des Fluoreszenzsignals sind in Abbildung 1B dargestellt. Nach der Temperaturerhöhung ändert sich die Fluoreszenz zunächst sprunghaft, was eine spezifische Eigenschaft der Fluorophore darstellt. Dieser „Temperatursprung“, der innerhalb einiger 100 ms stattfindet, lässt sich sehr einfach von der nachfolgenden, vergleichsweise langsamen Thermodiffusion unterscheiden, die mehrere Sekunden andauert.^[11] Um die Bindungsaffinität ableiten zu können, wird eine Verdünnungsreihe angefertigt, in der die Konzentration des Liganden variiert, während die Konzentration des fluoreszierenden Proteins konstant bleibt. Jeder Verdünnungsschritt durchläuft die Temperaturänderung, wobei die resultierende Fluoreszenzänderung aufgezeichnet wird. Das Thermophoresesignal ändert sich schrittweise mit der Ligandenkonzentration. Dies entspricht dem sich ändernden Verhältnis von ungebundenem Protein und

gebundenem Komplex und spiegelt die bindingsinduzierte Veränderung der Moleküleigenschaften wider (Abbildung 1B). Um die Dissoziationskonstante K_D aus diesen Rohdaten zu erhalten, wird das Fluoreszenzsignal auf das Signal vor der Temperaturerhöhung normalisiert. Durch die Verwendung relativer Fluoreszenzsignale werden Probleme umgangen, die bei der Analyse der absoluten Fluoreszenz oder kleiner, bindingsinduzierter Veränderungen der Absorptions- und Emissionsspektren entstehen können. Aus der Standard-Proteinfluoreszenzspektroskopie ist bekannt, dass solche Signale schwer zu interpretieren sind, besonders wenn mehrere Trp-Reste auftreten oder wenn es zur Energieübertragung zwischen Aminosäuren kommt.^[14] Wie wir nachfolgend belegen, stellt die markierungsfreie MST ein wertvolles Hilfsmittel zur Untersuchung der Bindung zahlreicher Liganden an verschiedenste Proteinklassen dar.

Bei der schnellen exzitatorischen synaptischen Transmission im Zentralnervensystem der Säugetiere spielen iGluRs eine Schlüsselrolle.^[15] Die Erforschung der Ligandenbindung der vielfältigen iGluR-Untergruppen ist ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung.^[12] Mit markierungsfreier MST wurde die Wechselwirkung verschiedener Agonisten mit den Nicht-NMDA-Rezeptoruntereinheiten iGluR2 und iGluR6 untersucht. Es kamen lösliche Varianten der LBDs zum Einsatz, die durch Fusion der beiden eigentlich diskontinuierlichen extrazellulären Fragmente S1 und S2 hergestellt wurden.

Die LBD der AMPA-Rezeptoruntereinheit iGluR2 (29.2 kDa; Abbildung 1B) enthält vier Tryptophanreste. Eine Konzentration von $2 \mu\text{M}$ zeigte eine ausreichende UV-Fluoreszenzintensität, ohne wesentlich zu bleichen. Die Auswertung der thermophoretischen Mobilitätsänderung ergab $K_D = (835 \pm 43) \text{ nM}$ für den natürlichen Agonisten Glutamat (147.13 Da; Abbildung 2). Der Literaturwert von 821 nM wird dadurch exakt wiedergegeben.^[16] Der photoaktivierbare Agonist Azobenzolglutamat (GluAzo; 367.15 Da), der die „Fernsteuerung“ der neuronalen Erregbarkeit ermöglicht, bindet die iGluR2-LBD mit $K_D = (19 \pm 5) \mu\text{M}$ (Abbildung 2).^[17] MST bestätigt, dass das als Kainatrezeptoragonist entworfene GluAzo auch an iGluR2 bindet.^[18] Bei Zugabe von GluAzo zu iGluR2-LBD, das mit einer sättigenden

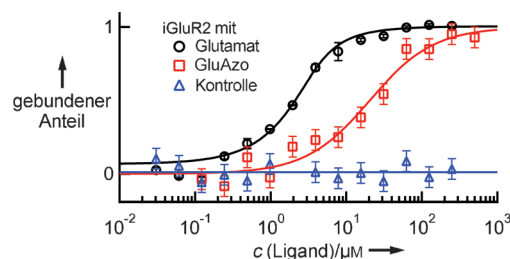


Abbildung 2. Ligandenbindung an Membranrezeptoren. Die Bindungskurven wurden aus der, durch die Bindung der titrierten Liganden bedingten, Änderung der thermophoretischen Mobilität bei einer konstanten iGluR2-LBD-Konzentration von $2 \mu\text{M}$ berechnet. Die Kurven zeigen Bindungsaffinitäten von $(835 \pm 43) \text{ nM}$ für Glutamat und $(19 \pm 5) \mu\text{M}$ für GluAzo. Die beiden Agonisten konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle, da eine Vorinkubation von iGluR2 mit einer sättigenden Glutamatmenge die GluAzo-Bindung verhindert (Kontrolle).

Konzentration Glutamat (500 μM) vorinkubiert wurde, kam es nicht zur Änderung der Thermophorese. Dies belegt die Spezifität des GluAzo-Signals und zeigt, dass beide Agonisten um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Das Ergebnis der markierungsfreien Messung wurde mit einer Standard-MST-Messung mit markierter iGluR2-LBD überprüft (siehe die Hintergrundinformationen, Abbildung S-1). Die so bestimmte K_D weicht mit $(22 \pm 8) \mu\text{M}$ nicht signifikant von der markierungsfreien Analyse ab. Das zeigt, dass die markierungsfreie MST nicht durch Autofluoreszenz gestört wurde und dass die Markierung die Wechselwirkung nicht beeinflusste. Zusätzlich wurde die Ligandenbindung der Kainatrezeptoruntereinheit iGluR6 quantifiziert. Die iGluR6-LBD (4 Trp; 29.3 kDa) wurde in einer Konzentration von 2 μM eingesetzt. In Übereinstimmung mit dem literaturbekannten K_I -Wert von $(355 \pm 74) \text{ nM}$ ergaben sich 359 nM als Obergrenze der Glutamataffinität (Abbildung S-2).^[19] Die iGluR6-LBD bindet GluAzo mit $K_D = (3.2 \pm 0.4) \mu\text{M}$ (Abbildung S-3).

Die markierungsfreie MST ist empfindlich genug, um die Bindung niedermolekularer Substanzen zu messen. Drei selektive niedermolekulare p38 α -Inhibitoren wurden getestet. P38 ist eine stressregulierte, mitogenaktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase). P38 α (59.5 kDa) gilt als die wichtigste Unterform bei der Cytokinsynthese im Rahmen der Entzündungsreaktion. Wirksame p38 α -Inhibitoren könnten daher zur Entwicklung neuartiger Behandlungsmethoden bei Entzündungserkrankungen führen.^[20]

Die Kinase enthält 5 Tryptophanreste, sodass eine Konzentration von 100 nM ausreichend war. Wie Abbildung 3 zeigt, bindet p38 α den Inhibitor SB202190 (331 Da) mit $K_D = (48 \pm 21) \text{ nM}$, was den Literaturwert von 37 nM wiedergibt.^[21] Die Obergrenzen der Affinität zu PD169316 (360 Da) und SB239063 (368 Da) wurden zu 33 nM bzw. 20 nM bestimmt. Dies stimmt gut mit den bereits berichteten IC_{50} -Werten von 130 nM (PD169316) und 44 nM (SB239063) überein.^[22,23] Unspezifische Wechselwirkungen sind auszuschließen, da hitzedenaturierte p38 α -Kinase keine Bindung zeigte.

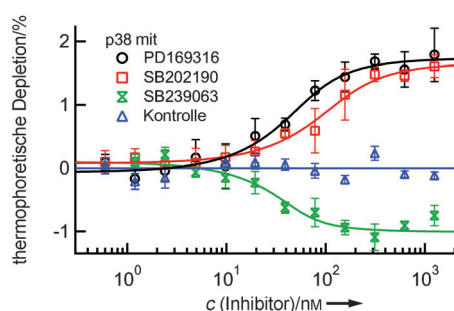


Abbildung 3. Die Bindung dreier selektiver niedermolekularer Inhibitoren an die nichtaktivierte Form der MAP-Kinase p38 α ($c = 100 \text{ nM}$) wurde getestet. Strukturunterschieden entsprechend hat die Bindung von SB202190 und PD169316 verglichen mit SB239063 einen entgegengesetzten Einfluss auf die Thermophorese. SB202190 bindet mit einer K_D von $(48 \pm 21) \text{ nM}$. Die für PD169316 und SB239063 bestimmte Obergrenze der Affinität beträgt 33 nM bzw. 20 nM. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Literaturwerten überein.^[21–23] Hitzedenaturierte p38 α zeigte keine Bindung (Kontrolle).

Bemerkenswerterweise liefert das Thermophoresesignal zusätzliche Informationen über die Liganden. Verglichen mit der ungebundenen Kinase zeigt der Komplex aus p38 α und SB202190 beziehungsweise PD169316 eine reduzierte Depletion, graphisch dargestellt durch die positive Steigung der Bindungskurve. Die Bindung an SB239063 hat den gegenteiligen Effekt (Abbildung 3). Abgesehen von einer einzigen funktionellen Gruppe sind 4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazol (SB202190) und 4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazol (PD169316) strukturell identisch. Die Struktur des Inhibitors der zweiten Generation, *trans*-1-(4-Hydroxycyclohexyl)-4-(4-fluorphenyl)-5-(2-methoxypyridimidin-4-yl)imidazol (SB239063), zeigt hingegen erhebliche Abweichungen. Diese Unterschiede bedingen wahrscheinlich den unterschiedlichen Effekt auf die thermophoretische Depletion.

Mit markierungsfreier MST wurden verschiedenartige biomolekulare Bindungsvorgänge quantifiziert, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Alle gemessenen Affinitäten be-

Tabelle 1: Proteinbindungsstudien mit markierungsfreier MST.^[a]

Bindungsreaktion	K_D -Werte laut markierungsfreier MST	Literaturwerte
<i>iGluR2</i>		
Glutamat	$(835 \pm 43) \text{ nM}$	$821 \text{ nM}^{[16]}$
GluAzo	$(19 \pm 5) \mu\text{M}$	–
<i>iGluR6</i>		
Glutamat	$\leq 359 \text{ nM}^{[b]}$	$(355 \pm 74) \text{ nM}$ (K_I) ^[19]
GluAzo	$(3.2 \pm 0.4) \mu\text{M}$	–
<i>p38α</i>		
SB202190	$(48 \pm 21) \text{ nM}$	$37 \text{ nM}^{[21]}$
PD169316	$\leq 33 \text{ nM}^{[b]}$	130 nM (IC_{50}) ^[22]
SB239063	$\leq 20 \text{ nM}^{[b]}$	44 nM (IC_{50}) ^[23]
<i>Thrombin</i> ^[c]		
15-mer	$(32 \pm 15) \text{ nM}$	25 bis $100 \text{ nM}^{[25,26]}$
29-mer	$(133 \pm 42) \text{ nM}$	0.5 oder $100 \text{ nM}^{[26,27]}$
<i>Syt 1</i> ^[c]		
Ca^{2+}	$(326 \pm 26) \mu\text{M}$	50 μM bis $3 \text{ mM}^{[28]}$

[a] Die gemessenen Affinitäten stimmen für alle untersuchten biomolekularen Bindungsereignissen mit den Literaturwerten überein. [b] Diese Werte stellen Affinitätsobergrenzen dar. Die genauen Fehlerabschätzungen sind in den Hintergrundinformationen zu finden. [c] Beschreibung, Abbildungen und Durchführung: siehe die Hintergrundinformationen.

stätigen die entsprechenden, dort angegebenen Literaturwerte. Im Fall der LBD des Transmembranrezeptors iGluR2 beobachteten wir, dass GluAzo die gleiche Bindestelle wie Glutamat in Anspruch nimmt, jedoch mit einer viel geringeren Affinität. Die Affinität niedermolekularer Inhibitoren der p38 α -Kinase wurde gemessen, wobei strukturelle Unterschiede der Inhibitoren zu einem entgegengesetzten Einfluss auf die Thermophorese führten. Diese interessante Beobachtung lässt vermuten, dass Thermophorese nicht nur dafür eingesetzt werden kann, Bindungsaffinitäten zu bestimmen, sondern auch, um zusätzliche Informationen über die Bin-

duungsart zu gewinnen. Vergleichende Studien mit markierungsfreier MST wären nötig und stellen möglicherweise ein Hilfsmittel zur Klassifizierung neuartiger Liganden dar. Die Anwendungsmöglichkeiten der markierungsfreien MST beschränken sich jedoch nicht auf die Untersuchung niedermolekularer Verbindungen. Wie wir zeigen, können auch Aptamer- und Ionenbindung analysiert werden (siehe die Hintergrundinformationen).

Die markierungsfreie MST eignet sich besonders für Screeningverfahren, da für eine typische Wechselwirkungsmessung nur 50 μL einer 0.1–2.0 μM Proteinlösung benötigt werden. Zudem beträgt die Messzeit nur 5–10 Minuten. Ermöglicht wird dies durch das einfache „Mischen-und-Messen“-Protokoll ohne arbeitsintensive Probenvorbereitung durch etwa Oberflächenimmobilisierung oder Markierung. Die Bindungspartner werden weder durch eine Oberfläche noch durch eine Markierung modifiziert, sodass ihre nativen Moleküleigenschaften unverändert bleiben. Daher werden Bindungsaffinitäten im natürlichen Zustand gemessen.

Die markierungsfreie MST setzt eine ausreichende intrinsische Proteinfluoreszenz voraus, wohingegen eine UV-Fluoreszenz der Liganden oder des Puffers mit Problemen verbunden ist. Die erforderliche Mindestkonzentration eines Proteins mit durchschnittlichem Trp-Gehalt (≥ 2 Trp) beträgt etwa 100 nM, was eine exakte Quantifizierung von $K_D \geq 50$ nM ermöglicht. Affinere Wechselwirkungen können zwar noch qualitativ detektiert, jedoch nicht präzise quantifiziert werden. Sollte ein Protein nicht genügend Trp-Reste enthalten, so ist es möglich, diese durch Mutationen einzufügen. Ein konservativer Austausch gegen eine andere aromatische Aminosäure beeinträchtigt die Moleküleigenschaften und -funktionen in vielen Fällen nicht.^[24] Als Alternative stehen Markierung und Standard-MST zur Verfügung. Hierbei können im Regelfall niedrigere Proteinkonzentrationen verwendet werden, was die genaue Quantifizierung auch hochaffiner Bindungen bis in den Bereich von 1 nM ermöglicht.^[9] Eine Autofluoreszenz des Puffers, etwa aufgrund Trp-haltiger Proteinzusätze, erhöht die Hintergrundfluoreszenz und damit das Rauschen. Dies führt zu einem konstanten Versatz des Thermophoresesignals, verändert die bindungsspezifische Affinität jedoch nicht. Wenn beide Bindungspartner eine ähnlich starke Trp-Fluoreszenz aufweisen, ist eine direkte Quantifizierung mit markierungsfreier MST nicht möglich. Der Beitrag des titrierten autofluoreszierenden Liganden zum gemessenen Thermophoresesignal muss über Kontrollmessungen quantifiziert und dann abgezogen werden. Eine derartige Korrektur sollte es ermöglichen, das bindungsspezifische Thermophoresesignal abzuleiten. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die meisten Liganden keine UV-Fluoreszenz aufweisen. Dies schließt einen Großteil der niedermolekularen Verbindungen ein, welche den Hauptteil der heute verwendeten Pharmazeutika ausmachen.

In Anbetracht der einfachen Durchführbarkeit und vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten stellt die markierungsfreie MST ein vielversprechendes Hilfsmittel dar, das in allen Bereichen der Lebenswissenschaften dazu beitragen kann, unser Wissen über Proteinwechselwirkungen zu erweitern.

Experimentelles

Der Versuchsaufbau basiert auf einem Zeiss-Axiotech-Vario-Mikroskop mit 40 \times Quarzobjektiv, numerische Apertur 0.8 (Partek GmbH, Münster, Deutschland). Zur Anregung wurde eine UVTOP-Leuchtdiode mit einer zentralen Wellenlänge von 285 nm (Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) verwendet, zur Detektion ein Photoelektronenvervielfacher (P10PC, ET Enterprises Ltd, Uxbridge, Großbritannien). Fluoreszenzfilter für Tryptophan (F36-300) wurden von AHF-Analysentechnik (Tübingen, Deutschland) bezogen. Quarzkapillaren von Polymicro Technologies (Phoenix, USA) mit verschiedenen Innendurchmessern und einem Volumen von jeweils ca. 500 nL wurden verwendet. Vor der Messung wurde die Polyimidbeschichtung über offener Flamme entfernt, und die Kapillaraußenseiten wurden mit Ethanol gereinigt. Der Temperaturgradient wurde mit einer IR-Laserdiode (Furukawa FOL1405-RTV-617-1480, $l = 1480$ nm, $k = 320$ mm für Wasser, 320 mW Maximalleistung) erzeugt, die von der AMS Technologies AG (München, Deutschland) erworben wurde. Der IR-Laserstrahl wurde über einen Wärmereflexionspiegel (NT46-386; Edmund Optics, Barrington, USA) in den Fluoreszenzstrahlengang eingekoppelt und mit dem Objektiv des Mikroskops in die Flüssigkeit fokussiert. Mithilfe des temperaturabhängigen Farbstoffs TAMRA wurde gemessen, dass die Temperatur der Lösung innerhalb des Laserspots mit einem $1/e^2$ -Durchmesser von 25 μm um 6 K ansteigt. Alle Messungen wurden bei einer Ausgangstemperatur der Kapillaren von 20°C ausgeführt, die mithilfe eines Peltier-Element kontrolliert wurde.

IGluR2- und iGluR6-LBD-Konstrukte wurden freundlicherweise von Mark Mayer zur Verfügung gestellt. P38 α wurde freundlicherweise von Krishna Saxena zur Verfügung gestellt; PD169316, SB202190 und SB239063 wurden von Sigma Aldrich (München, Deutschland) erworben. IGLuR2-LBD wurde für die Standard-MST-Kontrolle mithilfe des Monolith-NT-Proteinmarkierungssystem RED (NanoTemper Technologies, München, Deutschland) entsprechend des mitgelieferten Protokolls markiert.

Die Messungen wurden in den folgenden Puffern durchgeführt: iGluR2- und iGluR6-LBD: 10 mM HEPES pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA; p38 α : 50 mM Tris pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05 % TWEEN20. Für die Negativkontrolle wurde p38 α 1 h bei 95°C denaturiert. Alle Lösungen wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, nachdem die Proteine mit den verschiedenen Zielproteinen vermischt worden waren.

Die K_D -Werte wurden berechnet, indem der Anteil gebundener Proteine mit der K_D als einzigem freien Parameter an die quadratische Lösung des Massenwirkungsgesetzes für das Bindungsgleichgewicht angepasst wurde.^[29] Anpassungsfunktion, Anzahl der Wiederholungen und Erklärung der Fehlerbalken sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 1. Juni 2012

Online veröffentlicht am 24. September 2012

Stichwörter: Analytische Methoden · Bindungsaffinität · Markierungsfreie Verfahren · Microscale Thermophoresis · Proteinkonformationen

- [1] a) Y. Chen, J. D. Müller, S. Y. Tetin, J. D. Tyner, E. Gratton, *Biophys. J.* **2000**, 79, 1074–1084; b) M. G. Fried, *Electrophoresis* **1989**, 10, 366–376.
- [2] a) L. G. Fägerstam, A. Frostell, R. Karlsson, M. Kullman, A. Larsson, M. Malmqvist, H. Butt, *J. Mol. Recognit.* **1990**, 3, 208–214; b) D. G. Myszk, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8, 50–57; c) W. H. King, *Anal. Chem.* **1964**, 36, 1735–1739.
- [3] M. M. Baksh, A. K. Kussrow, M. Mileni, M. G. Finn, D. J. Bornhop, *Nat. Biotechnol.* **2011**, 29, 357–360.

- [4] J. Bao, S. M. Krylova, D. J. Wilson, O. Reinstein, P. E. Johnson, S. N. Krylov, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2551–2554.
- [5] D. J. Bornhop, J. C. Latham, A. Kussrow, D. A. Markov, R. D. Jones, H. S. Sorensen, *Science* **2007**, *317*, 1732–1736.
- [6] a) S. Leavitt, E. Freire, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 560–566; b) R. J. Falconer, B. M. Collins, *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24*, 1–16; c) I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3–18.
- [7] N. Armstrong, E. Gouaux, *Neuron* **2000**, *28*, 165–181.
- [8] a) C. Ludwig, *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math.-Naturwiss. Kl.* **1856**, 539; b) S. Iacopini, R. Piazza, *Europhys. Lett.* **2003**, *63*, 247–253.
- [9] S. Duhr, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19678–19682.
- [10] C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, S. Duhr, *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 100.
- [11] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr, D. Braun, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2286–2290; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2238–2241.
- [12] P. Stawski, H. Janovjak, D. Trauner, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7759–7772.
- [13] M. L. Mayer, *Nature* **2006**, *440*, 456–462.
- [14] C. A. Royer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769–1784.
- [15] R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, S. F. Traynelis, *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 7–61.
- [16] N. Armstrong, M. Mayer, E. Gouaux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5736–5741.
- [17] M. Volgraf, P. Gorostiza, S. Szobota, M. R. Helix, E. Y. Isacoff, D. Trauner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 260–261.
- [18] M. Volgraf, *I. Photocontrol of Ionotropic Glutamate Receptors and II. Total Synthesis of Exiguamine A and B.*, Bibliobazaar, Llc, [S.L.], **2011**.
- [19] C. K. Tygesen, J. S. Rasmussen, S. V. Jones, A. Hansen, K. Hansen, P. H. Andersen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 13018–13022.
- [20] C. Dominguez, D. A. Powers, N. Tamayo, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2005**, *8*, 421–430.
- [21] B. Frantz, T. Klatt, M. Pang, J. Parsons, A. Rolando, H. Williams, M. J. Tocci, S. J. O’Keefe, E. A. O’Neill, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13846–13853.
- [22] H. Nordin, M. Jungnelius, R. Karlsson, O. P. Karlsson, *Anal. Biochem.* **2005**, *340*, 359–368.
- [23] F. C. Barone, E. A. Irving, A. M. Ray, J. C. Lee, S. Kassis, S. Kumar, A. M. Badger, R. F. White, M. J. McVey, J. J. Legos, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 312–321.
- [24] a) F. Hannemann, A. K. Bera, B. Fischer, M. Lisurek, K. Teuchner, R. Bernhardt, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11008–11016; b) M. L. Scalley, Q. Yi, H. Gu, A. McCormack, J. R. Yates, D. Baker, *Biochemistry* **1997**, *36*, 3373–3382.
- [25] a) L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566; b) M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118.
- [26] D. M. Tasset, M. F. Kubik, W. Steiner, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 688–698.
- [27] P.-H. Lin, R.-H. Chen, C.-H. Lee, Y. Chang, C.-S. Chen, W.-Y. Chen, *Colloids Surf. B* **2011**, *88*, 552–558.
- [28] A. Radhakrishnan, A. Stein, R. Jahn, D. Fasshauer, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25749–25760.
- [29] S. Lippok, S. A. I. Seidel, S. Duhr, K. Uhland, H.-P. Holthoff, D. Jenne, D. Braun, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3523–3530.